

# Računalna studija mehanizmom temeljenih ireverzibilnih inhibitora monoamin oksidaze B

---

Vrban, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:615045>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-24**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
Istraživanje i razvoj lijekova

*Lucija Vrbanić*

*Računalna studija mehanizmom temeljenih ireverzibilnih inhibitora  
monoamin oksidaze B*

Diplomski rad

Rijeka, 2022.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
Istraživanje i razvoj lijekova

*Lucija Vrban*

*Računalna studija mehanizmom temeljenih ireverzibilnih inhibitora  
monoamin oksidaze B*

Diplomski rad

Rijeka, 2022.

Mentor: dr.sc. Robert Vianello

Komentor: doc.dr.sc. Željko M. Svedružić

UNIVERSITY OF RIJEKA  
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY  
Graduate programme  
Drug research and development

*Lucija Vrban*

*Computational study of the monoamine oxidase B mechanism-based  
irreversible inhibitors*

Master's thesis

Rijeka, 2022.

Mentor: dr.sc. Robert Vianello, Ph.D.

Co-Mentor: doc.dr.sc. Željko M. Svedružić, Ph.D.

Diplomski rad obranjen je dana 26. rujna 2022. pred povjerenstvom:

1. prof. dr. sc. Miranda Mladinić Pejatović
2. doc. dr. sc. Jurica Novak
3. dr. sc. Robert Vianello
4. doc. dr. sc. Željko Svedružić

Rad ima 70 stranica, 24 slika, 7 tablica i 66 literaturnih navoda.

Zahvaljujem se svom mentoru, dr. sc. Robertu Vianellu, na iznimnoj pomoći i strpljenju tijekom izrade ovog rada, te diskusijama koje su svakako obogatile moje shvaćanje biokemijskih procesa.

Također se želim zahvaliti svom komentoru, doc. dr. sc. Željku Svedružiću, čija su predavanja razlog zbog kojeg sam se odlučila baviti računalnom kemijom.

Zahvaljujem i svojoj obitelji na svim odslušanim 'seminarima' i neizmjerne podršci.

## Sažetak

**Pozadina:** Monoamin oksidaza B (MAO-B) flavoenzim je odgovoran za metabolizam endogenih i egzogenih amina, uključujući monoaminske neurotransmitere čija je narušena homeostaza implicirana kod razvitka mnogih neurodegenerativnih oboljenja. MAO-B predstavlja osnovnu farmakološku metu za liječenje Alzheimerove i Parkinsonove bolesti. Komercijalni lijekovi, selegilin i razagilin, administriraju se uz dijetalne restrikcije te, u većim dozama, gube selektivnost što rezultira učestalijim nuspojavama većeg intenziteta. Stoga, postoji pritisak tržišta za razvitkom novih, mehanizmom temeljenih inhibitora MAO-B enzima.

**Rezultati:** Inovativni pristup razvijen je za dizajn novih inhibitora te uključuje spajanje temeljnih aromatskih struktura s propargilaminskom jezgrom koja je prisutna kod komercijalno dostupnih lijekova koji ciljaju MAO enzime. Metodom molekuskog pristajanja i potom simulacijama molekulske dinamike, dobiven je povoljniji termodinamički profil vezanja novodizajniranog liganda *N*-metil-*N*-propargil-2-indol (**42Me**) na aktivno mjesto MAO-B. Optimalniji kinetički profili inhibitorne aktivnosti spoja **42Me** okarakteriziran je mehanističkim DFT izračunima na klaster modelu MAO-B enzima. Sprovedenjem populacijske analize liganda, potvrđen je mehanizam hidridne apstrakcije prvog koraka inhibicijske reakcije na temelju referentnog liganda koji ima dobro poznat mehanizam vezanja.

**Zaključak:** Dobiveni rezultati ukazuju na to da je novodizajnirani ligand **42Me** kinetički te termodinamički povoljniji propargilaminski inhibitor MAO-B (MAOI) od postojećih lijekova, selegilina i razagilina. Reakcija inhibicije MAO-B enzima s kandidatom **42Me** efikasija je 69x naspram selegilina, odnosno 622x od razagilina. Primijenjen dizajn propargilaminskih MAOI pokazao se uspješnim te će dobiveni rezultati pomoći u daljnjem razvoju inhibitora poboljšanih kinetičkih i termodinamičkih parametara.

**Ključne riječi:** Monoamin oksidaza B MAO-B, propargilaminski inhibitori, Parkinsonova bolest, dizajn lijekova, molekulska pristajanje, molekulska dinamika, DFT izračun klaster modela enzima



## Abstract

**Background:** Monoamine oxidase B (MAO-B) is a flavoenzyme responsible for the metabolism of endogenic and exogenic amines such as monoamine neurotransmitters whose disturbed homeostasis is implicated in the wide range of neurodegenerative pathogenesis. MAO-B represents a primary pharmacological target for the treatment of Alzheimer's and Parkinson's disease. Commercial drugs, selegiline, and rasagiline, are administrated with dietary restrictions and in high doses are associated with more frequent and greater intensity side effects. There is a constant market pressure for the development of new, mechanism-based MAO-B inhibitors with more favorable pharmacokinetic profiles.

**Results:** An innovative approach was developed for the drug design which involves joining of the scaffolds with propargylamine core which is present in commercial drugs which target MAO enzymes. A more favorable thermodynamic profile was obtained for the newly designed *N*-methyl-*N*-propargyl-2-indol (**42Me**) using methods of script based molecular docking and molecular dynamics simulations. A more optimal kinetic profile of the inhibitory activity of the **42Me** was characterized *via* the DFT mechanistic calculation on the MAO-B cluster-model. The population analysis affirmed the mechanism of hydride abstraction in the first step of the inhibition reaction.

**Conclusion:** Obtained results show that newly designed **42Me** is kinetically and thermodynamically more favourable propargylamine inhibitor (MAOI) than known drugs, selegiline and rasagiline. MAO-B inhibition reaction with **42Me** is 69x more efficacious than selegiline, or 622x more efficacious than rasagiline. Applied propargylamine MAOI design approach was proved succesful and acquired results will assist in the development of the new inhibitors with better kinetic and thermodynamic parameters.

**Keywords:** Monoamine oxidase B MAO-B, propargylamine inhibitors, Parkinson's disease, drug design, molecular docking, molecular dynamics, DFT calculation of the cluster-model

# Sadržaj

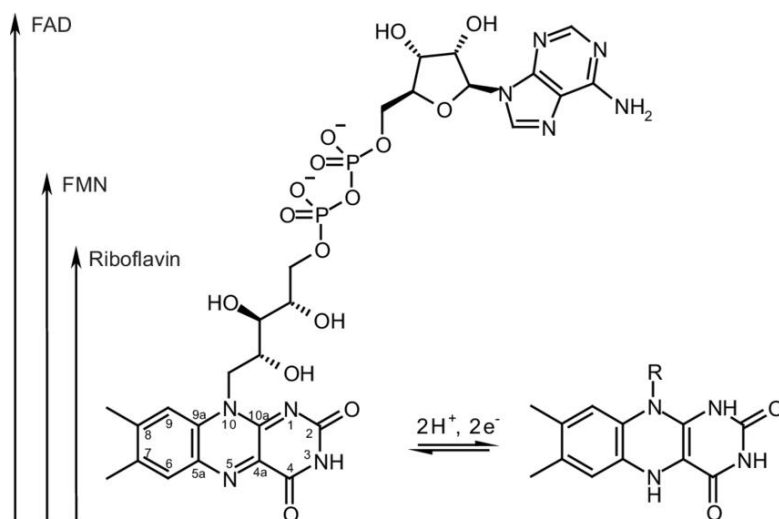
1. UVOD .....	1
1.1. Flavoproteini.....	1
1.1.2. Monoamin oksidaze .....	2
1.1.3. Izoforme monoamin oksidaze.....	2
1.1.4. Aktivno mjesto monoamin oksidaza .....	5
1.1.5. Katalitički mehanizam monoamin oksidaza.....	7
1.1.6. Klinički značaj monoamin oksidaza .....	8
1.1.6.1. Razvoj inhibitora monoamin oksidaza.....	9
1.2. Teorijska osnovica <i>in silico</i> metoda.....	12
1.2.1. CADD pristup.....	12
1.2.2. SBDD pristup .....	13
1.2.2.1. Molekulsko pristajanje .....	14
1.2.2.2. Simulacije molekulske dinamike .....	15
1.2.2.2.1. MM-PBSA analiza .....	17
1.2.2.3. Kvantno-mehanički izračuni.....	18
1.2.2.3.1. Klasterni model enzima .....	19
1.2.2.3.2. DFT metode.....	19
1.2.2.3.2.1. Izračun energije i geometrijska optimizacija.....	21
1.2.2.3.2.2. Frekvencijski izračun .....	24
1.2.2.3.2.3. IRC procedura .....	25
1.2.2.3.2.4. Solvatacijski efekti .....	26
1.2.2.3.2.5. Populacijska analiza .....	27
2. Cilj rada .....	28
3. Materijali i metode .....	29
3.1. Skriptom bazirano molekulsko pristajanje temeljnih struktura .....	30
3.2. Dizajn kandidata spojeva .....	30
3.3. Skriptom bazirano molekulsko pristajanje temeljnih struktura .....	30
3.4. Klasične simulacije molekulske dinamike.....	31
3.5. DFT mehanistički izračun na klaster modelu MAO-B enzima .....	32
4. Rezultati .....	34
4.1. Molekulsko pristajanje temeljnih heteroaromatskih struktura .....	34
4.2. Dizajn kandidata spojeva odabranih temeljnih heteroaromatskih struktura .....	35
4.3. Molekulsko pristajanje kandidata spojeva .....	36
4.4. Dizajn kandidata spojeva odabranih temeljnih heteroaromatskih struktura .....	37

4.5.	Simulacije molekulske dinamike odabranih kandidata spojeva .....	38
4.5.1.	MM-PBSA analiza odabranih kandidata spojeva .....	40
4.6.	Klasterni model MAO-B aktivnog mjesta odabranih kandidata spojeva.....	43
4.7.	Populacijska analiza kandidata spoja 42Me .....	46
5.	Diskusija .....	50
5.1.	Spoj 42Me pokazuje bolji termodinamički profil od selegilina i razagilina .....	50
5.2.	Spoj 42Me pokazuje bolji kinetički profil reakcije inhibicije od selegilina i razagilina te slijedi mehanizam hidridne apstrakcije .....	53
5.2.	Racionalizacija dizajna molekule 42Me .....	56
5.3.	Pristajanje kandidata spojeva unutar MAO-B veznog mjesta energetski je povoljno i stabilno .....	57
5.4.	Temeljne aromatske strukture usidrile su se u MAO-B aktivno mjesto.....	58
6.	Zaključak.....	60
7.	Bibliografija .....	61
8.	Curriculum vitae .....	66

# 1. UVOD

## 1.1. Flavoproteini

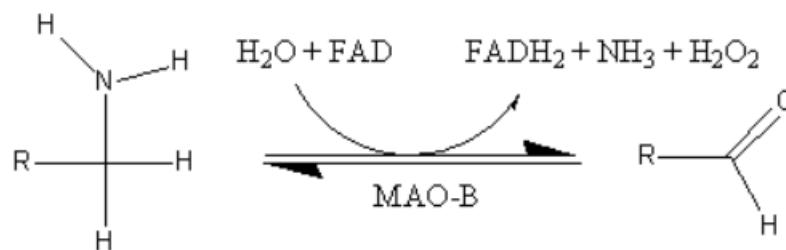
Flavoproteini su enzimi koji u svojoj strukturi sadrže riboflavin, odnosno vitamin B2 i njegove derivate kao prostetičku skupinu ili kofaktor. Najčešći derivati riboflavina dobiveni enzimatskom biosintezom su flavin adenin dinukletid (FAD) i flavin mononukleotid (FMN) (Slika 1). Flavini mogu biti vezani za protein nekovalentnim interakcijama ili kovalentnom vezom (5-10% slučajeva) <sup>1</sup>. FAD sadrži tročlani heteroaromatski izoaloksazinski prsten koji preko atoma C8 tvori kovalentnu vezu sa sumporom cisteina proteina od interesa; monoaminske oksidaze B (MAO-B). (Slika 1) S obzirom na to da FAD može razmijeniti jedan ili dva elektrona, najčešće sudjeluje u oksido-redukcijskim reakcijama. Intuitivno, flavoproteini se većinski nalaze na unutarnjoj membrani mitohondrija. Flavoproteini su enzimi, i to u 90% slučajeva oksido-reduktaze dok manji postotak otpada na ligaze, lijaze, transferaze i izomeraze <sup>2</sup>.



**Slika 1** Strukture riboflavina, FAD-a i FMN-a u oksidiranom (lijevo) i reduciranom (desno) stanju <sup>3</sup>.

Aminske-oksidaze uključuju poliamin-oksidazu (PAO), amin-oksidazu lijevih aminokiselina (LAO) i monooksidaze. U slučaju bakterija i nižih

eukariota, aminske-oksidge predstavljaju izvor amonijaka. Katabolizam poliamina kod bakterija, biljaka i praživotinja odvija se putem PAO, dok kod kralježnjaka MAO održava homeostazu egzogenih i endogenih amina te njihovih derivata. Katalizom amina, FAD u sklopu MAO-B omogućava formaciju pripadajućeg aldehida i amonijaka pomoću molekularnog kisika i molekula vode u reakciji koja se naziva oksidativna deaminacija <sup>4</sup>. Reakcija se sumarno izražava kao:



**Slika 2 Sumarna reakcija oksidativne deaminacije katalizirana od strane MAO-B enzima <sup>5</sup>.**

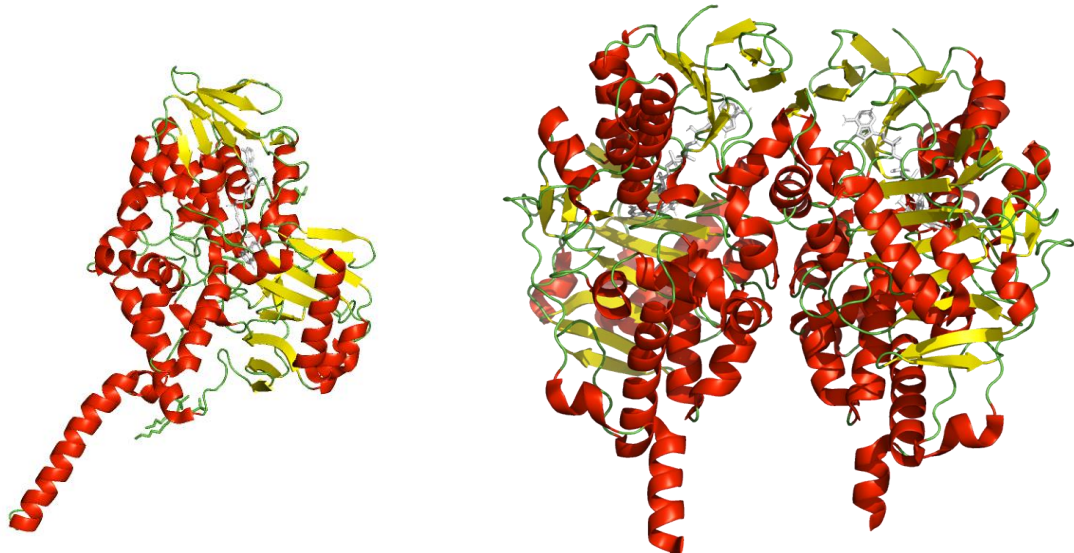
### 1.1.2. Monoamin oksidaze

Monoamin oksidaze obitelj su flavoenzima odgovornih za metabolizam širokog spektra endogenih (monoaminski neurotransmiteri poput serotonina, dopamina, adrenalina i noradrenalina) i egzogenih monoamina (monoamini uneseni hranom poput tiramina). MAO enzim otkrila je još 1928. godine Mary Hare-Bernheim i nazvala tiramin oksidaza. MAO-B selektivno razgrađuje benzilamin i feniletilamin, a manju selektivnost posjeduje i za dopamin <sup>6</sup>.

### 1.1.3. Izoforme monoamin oksidaze

MAO enzim postoji u dvije izoforme u ljudskom tijelu; MAO-A i MAO-B. MAO-A je monomer, dok je MAO-B dimer (Slika 3). Ovi izoenzimi integralni su proteini koji se razlikuju prema preferenciji supstrata, inhibitorskoj specifičnosti te distribuciji po stanicama i tkivima (Tablica 1). MAO-A preferira oksidaciju voluminoznijih supstrata poput serotonina, adrenalina i noradrenalina te specifično veže ireverzibilni inhibitor klogilin. MAO-B, s

druge strane, oksidira feniletilamin, benzilamin te specifično veže ireverzibilne inhibitore selegilin i razagilin. Dopamin, tiramin i triptamin podjednako su efikasno oksidirani od strane oba izoenzima <sup>7</sup>.



**Slika 3 3D strukture izoforme A (lijevo) i B (desno) MAO enzima.** Žuta boja predstavlja sekundarnu strukturu  $\beta$ -ploče, crvena  $\alpha$ -uzvojnice, a zelena petlje. Bijelom bojom označen je kofaktor FAD PDB: 275X (MAO-A), PDB: 2C67 (MAO-B) <sup>8</sup>.

MAO-A prevalentno se nalazi u gastrointestinalnom traktu, placenti, te plućnom vaskularnom endotelu. Oba izoenzima nalaze se u jetri, međutim prevalentnija je B izoforma. Limfociti i trombociti ekspimiraju samo MAO-B. MAO-A se u centralnom živčanom sustavu većinski nalazi u simpatičkim i kateholaminergičnim neuronima, dok se MAO-B pretežito nalazi u hipotalamusu, striatumu te serotonergičnim neuronima i glijalnim stanicama. Štoviše, više od 80% MAO enzima u mozgu B je izoforme.

Geni kojima su izoenzimi kodirani smješteni su na X-kromosomu u ljudskom organizmu. Sastoje se od 15 egzona te su identične egzon-intron organizacije. Egzon 12 kodira kovalentno vezan kofaktor FAD te predstavlja najviše očuvan egzon sa 93.9% identične primarne aminokiselinske sekvence između oba izoenzima. Prijašnje navedeno navodi na zaključak

da su izoforme nastale duplikacijom zajedničkog gena pretka (engl. *common ancestral gene*)<sup>9</sup>.

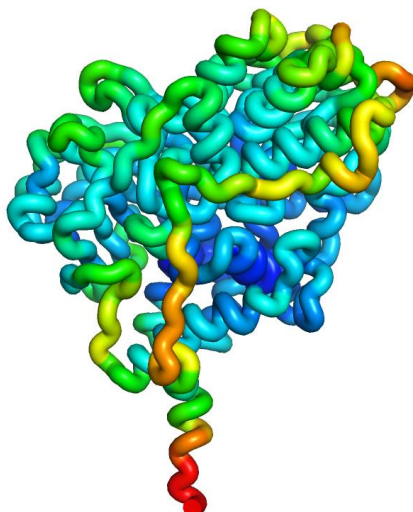
**Tablica 1. Usporedba distribucije po stanicama i tkivima te selektivnosti endogenih i egzogenih supstrata izoenzima MAO-A i MAO-B.**

\* označava prisutnost obje izoforme, ali prevalentost MAO-B izoenzima naspram lokacije/supstrata

	MAO-A	MAO-B
Distribucija po stanicama i tkivima	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SŽS: simpatički i kateholaminergični neuroni</li> <li>• plućni vaskularni endotel</li> <li>• placenta</li> <li>• gastrointestinalni trakt</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SŽS*: glijalne stanice i serotonergični neuroni</li> <li>• trombociti i limfociti</li> <li>• jetra*</li> </ul>
Specifičnost supstrata	<ul style="list-style-type: none"> <li>• serotonin</li> <li>• (nor)adrenalin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• dopamin*</li> <li>• feniletilamin</li> <li>• benzilamin</li> </ul>
Zajednički supstrati	<ul style="list-style-type: none"> <li>• dopamin</li> <li>• tiramin</li> <li>• triptamin</li> </ul>	
Selektivnost inhibitora	<ul style="list-style-type: none"> <li>• klorgilin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• selegilin</li> <li>• razagilin</li> </ul>

Izoforme dijele 70% primarne aminokiselinske strukture, dok je 85% aminokiselina slično, međutim njihova aktivna mjesta pokazuju različiti afinitet vezanja supstrata i inhibitora<sup>1</sup>.





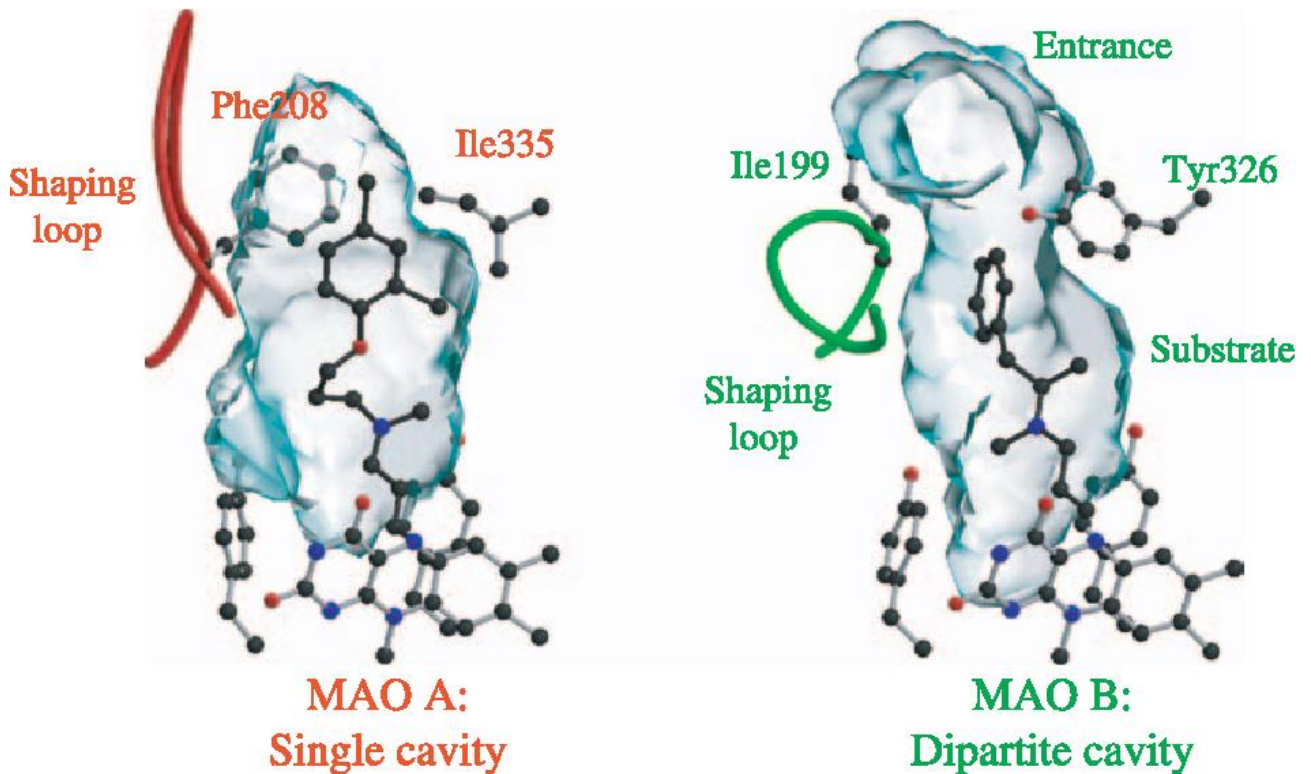
**Slika 4 MAO-B vizualizirana pomoću prikaza 'b putty factor' koristeći program PyMOL. Plave linije označuju najmanju, zelene i žute linije označavaju srednju, dok crvene linije označuju najveću mobilnost.**

Relativne razlike mobilnosti MAO-B proteina prikazane na slici 4. Iz navedenog je vidljivo da su najmobilniji dijelovi proteina transmembranska  $\alpha$ -uzvojnica te površinske  $\alpha$ -uzvojnice što upućuje na supramolekulsku regulaciju proteina, odnosno vezanjem na druge proteine na mjestima koja su se pokazala najdinamičnijima. Sličan primjer površinske regulacije katalitičke aktivnosti zabilježena je kod vezanja SARS-CoV-2 proteina šiljka divljeg tipa virusa te B.1.351 južnoafričkog mutanta na MAO enzime. Naime, došlo je do značajne promjene afiniteta enzima prema fiziološkim supstratima, a samim tim i katalitičke aktivnosti enzima <sup>9</sup>.

#### **1.1.4. Aktivno mjesto monoamin oksidaza**

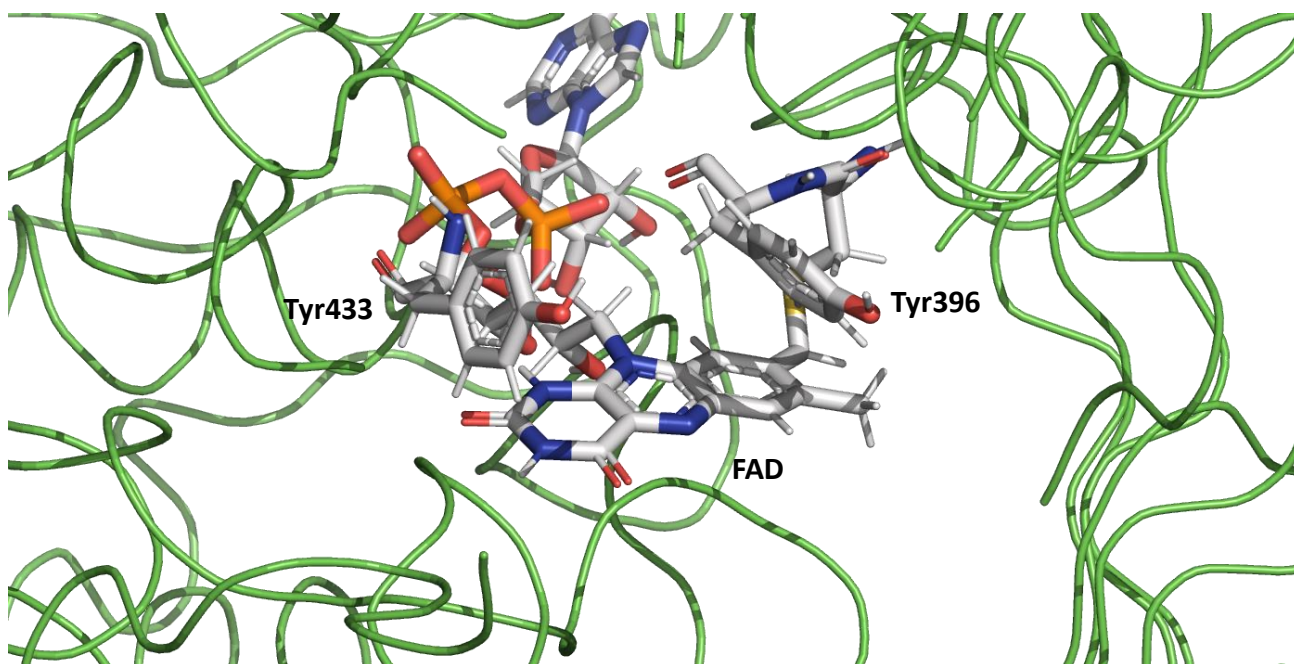
Aktivno mjesto MAO-B izoforme dvodijelne je konformacije, a sastoji se od ulazne šupljine približnog volumena  $290 \text{ \AA}^3$  i supstratne šupljine volumena približnog  $400 \text{ \AA}^3$ . Sveukupni volumen aktivnog mjesta MAO-B iznosi približno  $800 \text{ \AA}^3$ . Postiže se otvorenom konfiguracijom koja omogućuje spajanje dvaju šupljina. Na samom ulazu u supstratnu šupljinu nalaze se tzv. „gatekeeping residues”, odnosno rezidue koje utječu na selektivnost vezanja. U slučaju MAO-B to su Ile 199 i Tyr326. Naime, utvrđeno je da mutacije ovih rezidua povećavaju vrijednosti  $K_m$  određenih supstrata, dok

konstante brzine katalitičke reakcije ostaju nepromijenjene. Dakle, može se zaključiti da Ile199 i Tyr326 ne utječu na katalitičku aktivnost MAO-B, već na selektivnost vezanja supstrata. Aktivno mjesto izoforme A jednodijelno je, manjeg volumena približnog  $550 \text{ \AA}^3$  <sup>10</sup>.



**Slika 5 Usporedba aktivnog mjesta ljudskog MAO-A enzima.** MAO-A s klogilinom kao kovalentnim aduktom (lijevo) i MAO-B sa selegilinom kao kovalentnim aduktom (desno) <sup>11</sup>. Skraćenice: Phe fenilalanin, Ile izoleucin, Tyr tirozin.

Aktivno mjesto MAO-B izrazito je hidrofobnog karaktera te je prepoznatljivo po tzv. 'aromatskom kavezu' kojeg čine dva tirozina i flavinski kofaktor FAD (Slika 6). Kofaktor FAD koji se nalazi u aktivnom mjestu MAO enzima, zaslužan je za njegovu katalitičku funkciju, pritom prelazeći u reduciranu formu FADH<sub>2</sub>. Zbog spomenute važnosti, FAD predstavlja najpopularniju metu lijekova koji djeluju na MAO enzime <sup>6</sup>.



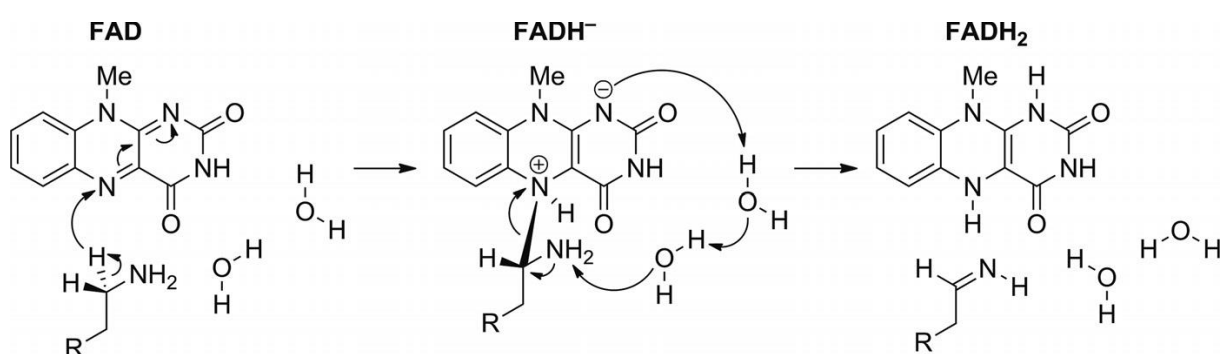
**Slika 6 'Aromatski kavez' aktivnog mjesta MAO-B enzima.** Vizualizirano u program PyMOL pomoću prikaza vrpce. Skraćenice: FAD flavin adenin dinukleotid, Tyr tirozin.

### 1.1.5. Katalitički mehanizam monoamin oksidaza

Katalitički mehanizam uključuje prijenos vodika sa supstrata na kofaktor FAD u koraku koji određuje ukupnu brzinu reakcije, no priroda vodika koji prelazi tijekom desetljeća postala je kontroverzna tema. Nekoliko mehanizama je predloženo uključujući radikalski (prelazi  $H^\bullet$ ), nukleofilni polarni mehanizam (prelazi  $H^+$ ) te hidridni mehanizam koji uključuje prijelaz hidrida ( $H^-$ ).

Računalnim metodama dobiveni termodinamički i kinetički parametri hidridne apstrakcije vodika sa  $C(\alpha)$  supstrata na  $N_5$  atom kofaktora enzima, predloženi od strane Vianella i sur., u izvrsnom su slaganju s eksperimentalno dobivenim rezultatima te predstavljaju najizgledniji katalitički mehanizam MAO enzima <sup>12</sup> <sup>13</sup>. Izračunata kinetička barijera korištenjem empirijskog modela valentne veze povoljnija je u odnosu na druge predložene mehanizme, te iznosi 16.1 kcal/mol za dopamin kao supstrat. Eksperimentalno dobivena vrijednost iznosi  $\Delta G^\ddagger = 16.5$  kcal/mol što je u izvrsnom slaganju s računalno dobivenom vrijednosti <sup>14</sup>.

MAO enzim oksidira monoaminske supstrate pritom indirektno stvarajući odgovarajući aldehyd, amonijak (u slučaju terciarnog amina) ili supstituiran amin (u slučaju sekundarnog amina). Prvi korak podrazumijeva prijenos hidrida sa supstrata na N<sub>5</sub> atom FAD kofaktora. Rezultat je kovalentni adukt između N<sub>5</sub> kofaktora i C(α) supstrata. Potom N<sub>1</sub> atom FAD kofaktora deprotonira amino skupinu supstrata uz pomoć dviju molekula vode u aktivnom mjestu uz nastajanje slobodnog imina<sup>12</sup> (Slika 7), koji napušta aktivno mjesto enzima te se hidrolizira uz pomoć vode do aldehyda.



**Slika 7 Predloženi hidridni mehanizam katalitičke oksidacije MAO-B (14).**

### 1.1.6. Klinički značaj monoamin oksidaza

Brza inaktivacija monoaminskih neurotransmitera ključna je za održavanje sinaptičke

funkcije, te svaka trajna promjena u njihovom metabolizmu može dovesti do psihijatrijskih i neuroloških poremećaja. S obzirom na to da neurotransmiteri kontroliraju emocije, pažnju, vrše kontrolu kognitivnih i motoričkih funkcija, njihova ravnoteža od esencijalne je važnosti za normalnu funkciju mozga i u konačnici cijelog organizma. Promijenjena funkcija ili razina MAO enzima u centralnom živčanom sustavu implicirana je u mnogim psihijatrijskim i neurološkim poremećajima uključujući depresiju, Parkinsonovu i Alzheimerovu bolest, shizofreniju, podložnost razvoju ovisnosti, poremećaju pažnje i migrenama<sup>15</sup>.

Starija životna dob kod mnogih je od navedenih poremećaja jedan od rizičnih faktora njihove incidencije, a s obzirom da je udio starije populacije u konstantom porastu zbog poboljšanih uvjeta života i pristupačnijeg javnog zdravstva, neurodegenerativne bolesti su u 2019. godini bile peti po redu globalni uzrok smrti. Svake tri sekunde u svijetu netko oboli od demencije, te je u 2020. godini više od 55 milijuna ljudi živjelo s njom. Ovaj broj će se udvostručiti svakih 20 godina, što rezultira brojkom od 78 milijuna u 2030. godini, odnosno 139 milijuna u 2050. godini. Ovakve alarmirajuće brojke ukazuju na nužnost razvitka novih lijekova koji bi ciljali uzrok ili barem simptome neurodegenerativnih oboljenja <sup>16</sup>.

#### **1.1.6.1. Razvoj inhibitora monoamin oksidaza**

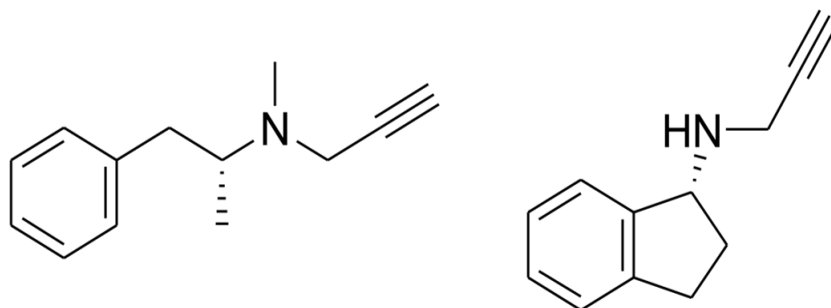
Prevelika aktivnost MAO-B enzima dovodi do nakupljanja reaktivnih kisikovih vrsta (Slika 2) koje uzrokuju mitohondrijalnu štetu. Šteta je popraćena oštećenjima i disfunkcijom neurona rezultirajući neurodegenerativnim poremećajima. Zbog navedenog, lijekovi koji ciljaju MAO enzime inhibiraju ih, te se nazivaju MAO inhibitorima <sup>3</sup>.

MAOI predstavljaju prvu liniju terapije Parkinsonove bolesti, te se često koriste kod rezistentne i atipične depresije. MAOI se koriste i kod tretmana poremećaja prehrane, paničnog poremećaja <sup>17</sup>, različitih vrsta fobije (socijalna fobija, agorafobija i sl.) te poremećaja osobnosti <sup>18</sup>.

Kao što je slučaj kod mnogih znanstvenih otkrića, MAOI su otkriveni slučajno. Naime, za liječenje tuberkuloze koristio se izoniazid. Međutim, 1952. godine ustanovljeno je da su pacijenti koji su ujedno bolovali i od depresije imali olakšane simptome. Tada je prvi put prepoznat potencijal MAOI kao antidepresiva. Iako je prvi antidepresiv iproniazid pozitivno utjecao na simptome depresije, 1961. godine povučen je s tržišta zbog hepatotoksičnosti i svoje neselektivne naravi <sup>19</sup>.

Neselektivni ireverzibilni MAOI inhibiraju obje MAO izoforme dovodeći do nakupljanja egzogenih, hranom unesenih amina u tijelo poput tiramina iz čokolade, sira i fermentiranih pića poput pive i vina. Njihovo nakupljanje može dovesti do opasnih i potencijalno letalnih nuspojava poput nesаницe, nemirnosti, povišenog krvnog tlaka, intrakranijalnih krvarenja i "efekta sira" (engl. 'cheese effect') koji dovodi od hipertenzivne krize koja može rezultirati smrću <sup>19</sup>.

Razvitak MAOI potom se nastavio u smjeru selektivnih inhibitora za pojedinu izoformu, te je 1996. godine na američko tržište pušten selegilin (poznat i kao *L*-deprenil), potom 2006. godine razagilin <sup>20</sup>. Oba inhibitora selektivni su ireverzibilni inhibitori MAO-B temeljeni na katalitičkom mehanizmu, a struktura im se može razdijeliti na propargilaminsku jezgru bogatu elektronima, aminski te aromatski dio. Selegilin i razagilin stvaraju kovalentni adukt s kofaktorom FAD onemogućujući daljnju katalitičku aktivnost enzima.



**Slika 8** Strukture propargilaminskih inhibitora MAO-B enzima selegilin (lijevo) i razagilin (desno).

Oba inhibitora djeluju dvojako:

1. produljuju poluživot dopamina u nigrostrijatalnom putu, te
2. sprječavaju nastanak oksidativne štete degradacijom monoamina.

Na taj se način simptomi deplecije dopamina ublažuju te se poboljšava kvaliteta života bolesnika. Danas se češće koristi razagilin zbog manjeg broja nuspojava koje izaziva. Naime, selegilin se u organizmu putem citokroma P450 2B6/2C19 metabolizira u L-metamfetamin, potom u L-amfetamin koji inhibira transport dopamina vezikulama što dovodi do autooksidacije dopamina u citoplazmi i dodatnog izvora reaktivnih kisikovih vrsta <sup>17</sup>. Zbog amfetaminskog metabolita, selegilin uzrokuje nesanicu, smanjeni apetit i nemirnost, a u većim dozama gubi selektivnost. Razagilin se metabolizira putem citokroma P450 1A2 u 1-aminoindan koji djeluje neuroprotektivno, te ima slične nuspojave poput selegilina, ali puno manjeg intenziteta. Međutim, njegovo vezanje nije toliko farmakodinamički povoljno kao što je vezanje selegilina. U visokim dozama, inhibiraju i MAO-A, stoga je i dalje potrebna posebna prehrana tijekom uzimanja ovih lijekova <sup>21</sup>.

Zbog visoke prevalencije i konstantnog rasta broja oboljenih od neurodegenerativnih bolesti, pritisak za razvitkom novih, selektivnih, ireverzibilnih i mehanizmom temeljenih inhibitora MAO enzima boljeg farmakološkog profila je konstantan. Često viđen pristup razvoja novih selektivnih ireverzibilnih inhibitora MAO enzima uključuje mijenjanje farmakofornih skupina na već postojećim inhibitorima poput klogilina ili razagilina. Međutim, zbog neuspješnosti ovog pristupa u smislu plasiranja boljih inhibitora naspram postojećih, za ovaj znanstveni problem usvojen je pristup koji kreće od hidrofobnih, aromatskih komponeneti koje će potom biti spajane s propargilaminskom jezgrom; farmakoforom koji se pokazao kao esencijalan dio najnovije generacije inhibitora MAO-B (21).

## **1.2. Teorijska osnovica *in silico* metoda**

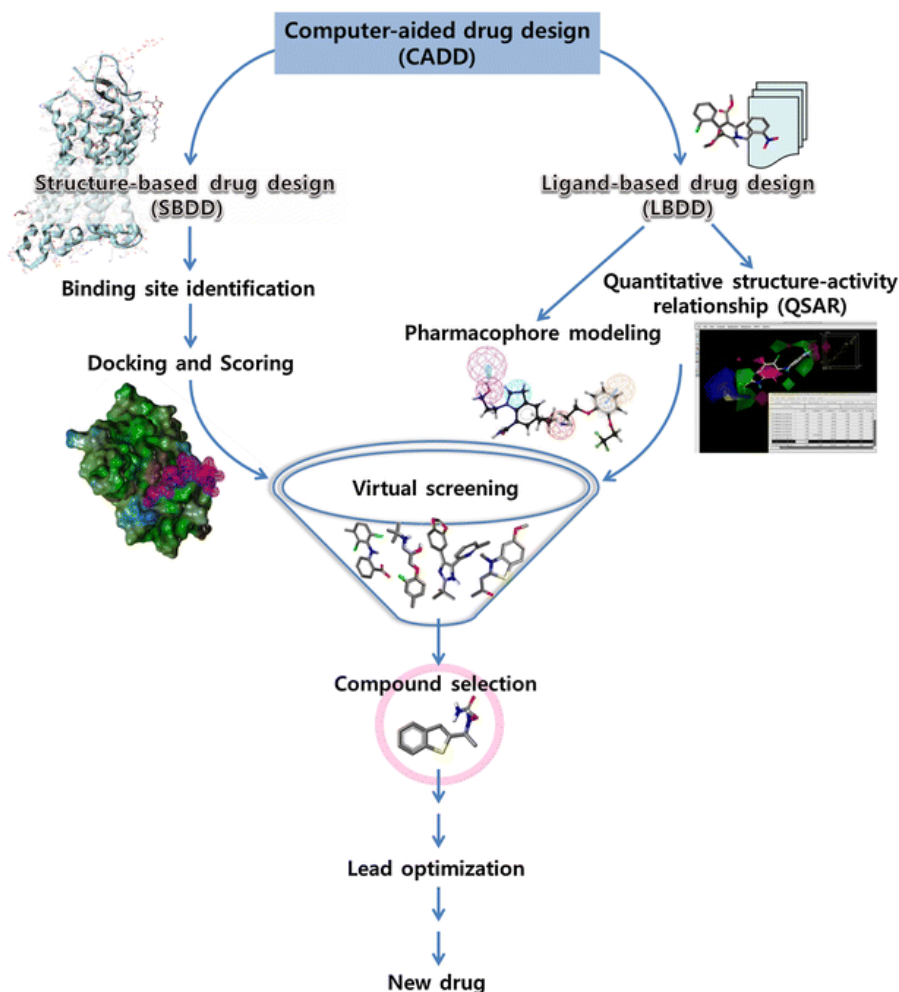
Računalna kemija ili molekulsko modeliranje uključuje *ab initio*, poluempirijske i empirijske pristupe pomoću kojih se istražuju strukture i svojstva molekula te materijala. Zasniva se na zakonima klasične i kvantne fizike čija su načela implementirana u računalne programe koji se potom koriste za provođenje računalnih simulacija s ciljem rješavanja realnih kemijskih problema.

Snaga računalne kemije vidljiva je kod eksperimentalno nedostupnih podataka i kao dopuna eksperimentalnim podacima u vidu boljeg shvaćanja reakcijskih mehanizama. Računalna kemija nudi mogućnost istraživanja, osim stabilnih struktura, i kratko-živućih prijelaznih stanja te nestabilnih intermedijera čije se strukture ne mogu odrediti ili mjeriti eksperimentalnim metodama. Najčešća primjena računalnih metoda uključuje dizajn novih i/ili modifikaciju postojećih lijekova <sup>22</sup>.

### **1.2.1. CADD pristup**

Računalno-potpomognuti dizajn lijekova (engl. *computer-aided drug design*, CADD) čini široki spektar različitih teorijskih i računalnih pristupa koji su dio modernog istraživanja i razvoja lijekova. CADD pristup može se ugrubo podijeliti u dvije kategorije; dizajn lijekova baziran na strukturi (engl. *structure-based drug design*, SBDD) i dizajn lijekova baziran na ligandu (engl. *ligand-based drug design*, LBDD). Dizajn lijekova baziran na strukturi ovisi o dostupnosti 3D strukture mete od interesa i razumijevanja prirode i samog oblika aktivnog mjesta <sup>22</sup>. Kristalne strukture mogu se preuzeti koristeći se repozitorijem kristalnih struktura proteina (engl. *protein data bank*, PDB) <sup>23</sup>.





**Slika 9** Tijek rada CADD pristupa <sup>24</sup>.

### 1.2.2. SBDD pristup

Početnu točku predstavlja struktura receptora od interesa koja može potjecati iz eksperimentalnih podataka dobivenih tehnikom nuklearne magnetne rezonantne spektroskopije, rendgenske kristalografije ili računalnom tehnikom homolognog modeliranja. Nakon preuzimanja strukture s PDB-a, strukturu je potrebno pripremiti za daljnje analize o čemu će više riječi biti u poglavlju 'Materijali i metode'.

Neke od najčešćih SBDD metoda uključuje virtualni probir temeljen na strukturi, molekulska pristajanje (engl. *molecular docking*) i simulacije molekulske dinamike (MD). Navedene metode daju informaciju o energetici

vezanja, interakcijama između proteina i liganda te o konformacijskim promjenama nakon vezanja liganda u aktivno mjesto <sup>22</sup>.

### **1.2.2.1. Molekulsko pristajanje**

Molekulsko pristajanje bavi se opisom načina kako dvije molekulske strukture međusobno pristaju, a najčešće se istražuje pristajanje malih molekula poput lijekova na vezno mjesto proteina od interesa ili pristajanje dvaju proteina. Proces počinje s receptorom čija je 3D struktura poznata, odnosno čija je kristalografska struktura dostupna za korištenje. Nagli razvitak računalnih metoda i infrastrukture omogućio je vrlo jednostavan pristup bazama eksperimentalno određenih 3D struktura proteina, ali i bazama malih molekula što povećava učinkovitost same metode.

Molekulsko pristajanje metodologija je koja obuhvaća više pristupa koji se dijele na temelju fleksibilnosti kompleksa uključujući simulacije pristajanja s nefleksibilnim ligandom i receptorom, s fleksibilnim ligandom i nefleksibilnim receptorom te fleksibilnim ligandom i receptorom <sup>22</sup>.

Metode molekulskog pristajanja temelje se na izračunu afiniteta vezanja i algoritma pretraživanja potencijalnog veznog mjesta. Ova metodologija koristi se najčešće kao početna točka za otkrivanje potencijalnih lijekova jer omogućuje razumijevanje interakcija između lijekova i receptora. Nakon što je vezno mjesto definirano, ili literaturnim pregledom ili algoritmima pronalaska potencijalnih veznih mjesta, cilj je pronaći optimalnu konformaciju potencijalnog lijeka. Konformacija ispitivane molekule uvelike ovisi o broju i tipu interakcija koje održavaju novonastali kompleks lijeka i proteina stabilnim, odnosno totalnoj energiji sustava. Totalna energija sustava previđa se procjenom interakcija sustava <sup>25</sup>.

Molekulsko pristajanje uključuje dva ključna koraka; algoritam pretraživanja veznog mjesta koji nasumično generira različite konformacije

i orijentacije liganda te funkcija bodovanja koja daje procjenu afiniteta vezanja generiranih konformacija. Algoritam optimizacije gradijenta nedeterministički je algoritam implementiran u program AutoDock Vina <sup>25</sup>. Konformacija liganda koju karakterizira povoljno bodovanje te odgovarajući položaj u suglasnosti s eksperimentalnim podacima (ako su dostupni) ukazuje na dobro pristajuću molekulu. Funkcije bodovanja mogu se podijeliti u 4 skupine; funkcije temeljene na polju sila (funkcija programa AutoDock Vina), empirijski temeljene, temeljene na znanju te funkcije temeljene na strojnom učenju.

S obzirom na to da je vezno mjesto većine proteina hidrofobnog karaktera, najpoželjnije interakcije na veznom mjestu između potencijalnog lijeka i proteina također su hidrofobnog karaktera, poput  $\pi$ - $\pi$  slagajućih interakcija <sup>26</sup>.

Molekulska pristajanja kao metoda ima svoja ograničenja poput poteškoća s uzrokovanjem velikog broja konformacija receptora, ali i liganda te poteškoća implementacije efekata otapala u algoritam, redukcije konformacijskog prostora zbog limitacija sustava (nefleksibilan receptor i fiksirana vrijednost kutova liganda), pojednostavljena funkcija bodovanja koja je često temeljena na empirijskim slobodnim energijama vezanja kako bi se smanjio vremenski utrošak pristajanja <sup>27</sup>.

Zbog navedenih ograničenja, molekulska pristajanja predstavlja početnu točku dizajna novih lijekova, te se najčešće analiza nastavlja u smjeru simulacija molekulske dinamike.

#### **1.2.2.2. Simulacije molekulske dinamike**

Molekulska dinamika bazirana je na klasičnoj, Newtonovoj fizici koja se bavi numeričkim rješavanjem jednadžbi gibanja s ciljem opisivanja gibanja molekula u fiziološkim uvjetima. Često predstavlja korak koji slijedi nakon

molekulskog pristajanja. Obzirom na to da simulacija molekulske dinamike nastoji opisati fizičko gibanje atoma i molekula, njezina pouzdanost nadilazi pouzdanost molekulskog pristajanja. Ova metodologija obuhvaća više tipova simulacija, poput simulacija svih atoma (engl. *all-atom*, AA) i krupno-čestičnih simulacija (engl. *coarse-grained*, CG). Simulacije svih atoma preciznije su od krupno-čestičnih, te se koriste kod detaljnijih opisa sustava što zahtijeva CADD pristup, dok se krupno-čestične simulacije koriste za opis smatanja proteina ili većih konformacijskih promjena. Na vremenskoj skali, AA simulacije izvode se na razini nanosekunda i mikrosekunda, dok CG simulacije na razini milisekunda. Simulacije molekulske dinamike daju informaciju o molekulskim interakcijama prije, nakon i tijekom vezanja liganda te o termodinamičkom profilu vezanja.

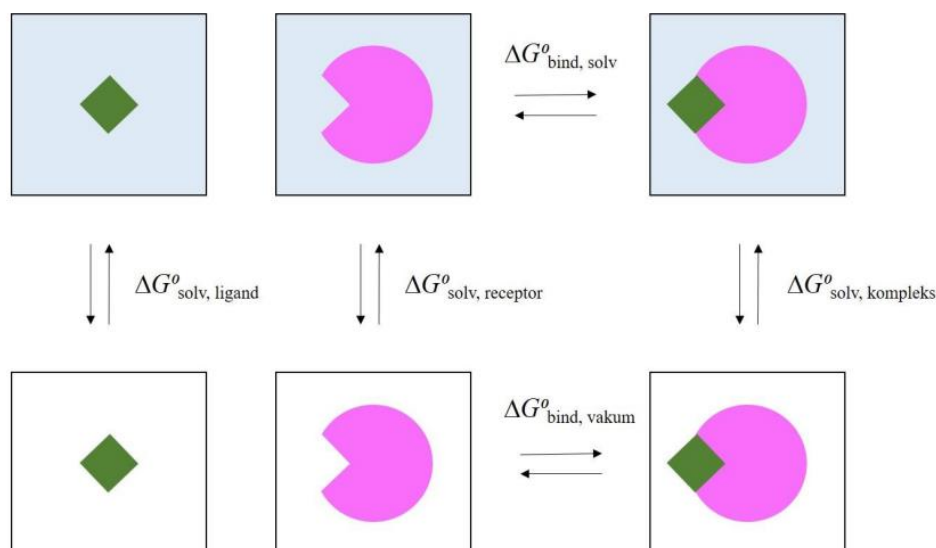
Simulacija daje uvid u dinamičku evoluciju sustava u vremenu tako da se numerički rješava Newtonova jednačba gibanja što daje informaciju o trajektorijama atoma. Međuatomske sile i energije opisane su pomoću molekulsko-mehaničkih polja sila koja čine skupovi jednačbi i konstanti pomoću kojih se računski procjenjuju intermolekulske i intramolekulske sile. U obzir se uzimaju kovalentne (istezanje veza, savijanje valentnog i promjene torzijskog kuta) i nekovalentne interakcije (vodikove veze, ionske veze, van der Waalsove sile i hidrofobne interakcije). Dakle, potencijalna energija ovisi o konformaciji promatranog sustava. Atomi su aproksimirani kao točke naboja, dok su veze između njih okarakterizirane poput opruga koje se mogu savijati, vibrirati i rotirati. Vremenski korak mora biti manji od najmanje relevantne promjene na vremenskoj skali kako bi se ista mogla opaziti. Odnosno, vremenski korak mora biti manji od perioda najviše frekvencije koju ima vibracija vodikovog atoma. Nakon svakog vremenskog koraka, računa se sila na pojedinačnom atomu koja daje informaciju o novoj poziciji i brzini čestice. Prije samog izvođenja simulacije, odnosno produkcijske faze, sustav se minimizira na način da se locira minimum na plohi potencijalne energije. Minimizacija se provodi kako bi sustav bio relaksiran, bez neprirodnih duljina veza ili kutova. Potom slijedi uvođenje

tlaka (1 atm) i temperature (310 K) kako bi sustav bio simuliran u fiziološkim uvjetima. Uvođenjem temperature atomi dobivaju inicijalnu brzinu koja se prilagođava sukladno Maxwell-Boltzmann razdiobi brzina. Promatrani sustav postavlja se u simulacijsku kutiju solvatiranu prigodnim otapalom kako bi se postigao neutralni ukupni naboj. Model otapala može biti eksplicitan ili implicitan. Eksplicitan model otapala uključuje eksplicitne molekule otapala sa smanjenim brojem sloboda gibanja zbog smanjenja računalne zahtjevnosti. Međutim, zbog eksplicitno prisutnih molekula vode dolazi do problema rubnih uvjeta. Naime, molekule otapala izlaze s ruba kutije. Zbog prijašnje navedenog, koristi se metoda periodičnih rubnih uvjeta (engl. *periodic boundary conditions*, PBC) koja okružuje promatrani sustav njegovim kopijama. Zahvaljujući PBC metodi, izbjegava se interakcija čestica sustava s vakuumom što omogućuje očuvanje broja čestica, mase, energije i linearnog momenta promatranog sustava. Implicitni model računalno je manje zahtjevan naspram eksplicitnog jer molekule otapala ne tretira diskretno, već ih zamjenjuje kontinuumom s dielektričnom konstantom i hidrofobnim/hidrofilnim parametrima <sup>28,29</sup>.

Provedene MD simulacije koriste empirijske metode koje ne definiraju elektrone eksplicitno, već implicitno. Međutim, stvaranje/pucanje kovalentnih veza uključuje izmjenu elektrona koje mogu opisati kvantno-mehaničke metode koje su temeljene na rješavanju Schrödingerove jednadžbe za izračun potencijalne energije sustava.

#### **1.2.2.2.1. MM-PBSA analiza**

Nakon provedenih MD simulacija, Gibbsove energije solvatacije enzima izračunate su korištenjem MM-PBSA (engl. *molecular mechanics–Poisson-Boltzmann surface area*) metode. Energije se prvotno računaju u vakuumu te se potom usklađuju na temelju doprinosa energije solvatacije (Slika 10) <sup>30</sup>.



**Slika 10 Termodinamika određivanja energije vezanja MM-PBSA metodom.** Bijela pozadina označava vakuum, dok plava vodeni medij <sup>15</sup>.

### 1.2.2.3. Kvantno-mehanički izračuni

Metode kvantne mehanike bazirane su na numeričkom rješavanju Schrödingerove jednadžbe. Najbitnija informacija dobivena rješavanjem Schrödingerove jednadžbe elektronska je energija sustava. Ova metodologija najpouzdanija je od dosad spomenutih, ali računalno i vremenski najzahtjevnija.

Kvantna računalna kemija ne bi bila ostvariva bez aproksimacija pomoću kojih je moguć opis velikih molekulskih sustava. Začetak računalne kemije korelira s razvitkom kvantne kemije početkom 1920-ih godina. Uspjeh kvantne računalne kemije temeljio se na sljedećim aproksimacijama:

1. Atomi i molekule mogu se opisati koristeći samo dva tipa čestica; jezgre i elektrone.
2. Veličina jezgre je toliko malena da ne utječe na kemijsku točnost te se tretira kao 'točkasti' naboj, dok su korekcije kvantne elektrodinamike zanemarivo male.

3. Jezgra je tisuću puta teža od elektrona te se njezina brzina zanemaruje (tj. jezgra je fiksirana) što omogućuje rješavanje Schrödingerove jednadžbe samo za elektrone uz fiksni položaj jezgara, kako bi se opisala svojstva sustava <sup>31</sup>.

Dvije aproksimacije ističu se kao ključne za omogućavanje korištenja kvantno-mehaničkih metoda za izračun realnih kemijskih problema:

1. Born-Oppenheimer aproksimacija govori da se, zbog velike razlike u masi jezgre i elektrona, njihovo gibanje može odvojeno opisati pomoću čega se dobiva elektronska valna funkcija sustava, neophodna za rješavanje Schrödingerove jednadžbe.

2. Kohn-Sham aproksimacija predstavlja Schrödingerovu jednadžbu koja definira fiktivan sustav čestica koje nisu u interakciji, ali sustavu daju istu gustoću kao interagirajući sustav, omogućujući rješavanje Schrödingerove jednadžbe koristeći samo jednu elektronsku valnu funkciju <sup>32</sup>.

#### **1.2.2.3.1. Klasterni model enzima**

Klasterni model (engl. *cluster model*) podrazumijeva manji broj reaktivnih aminokiselinskih ostataka u aktivnom mjestu, kofaktor, ligand od interesa, relevantne molekule vode i sl. Na ovaj način fokus je stavljen, u kontrastu na MD simulacije, na samo aktivno mjesto kako bi se pobliže objasnio mehanizam promatrane reakcije. Ovakav pristup smanjuje komputacijsku zahtjevnost samog izračuna, a dobiveni energetske profili većinski su u slaganju s eksperimentalno dostupnim podacima. Klasterni model koristi se najčešće kod određivanja mehanizama reakcije ili potvrde istih za što je korišten i u ovom diplomskom radu <sup>33</sup>.

#### **1.2.2.3.2. DFT metode**

Trenutno najpouzdanija i najčešće korištena metoda kvantno mehaničkog modeliranja teorija je funkcionala gustoće (engl. *density functional theory*, DFT). Svojstva atoma i molekula opisuju se funkcijama funkcija, odnosno

funktionalima. U slučaju DFT-a svojstva su opisana funkcionalom prostorno ovisne elektronske gustoće. Uspon DFT-a ne bi bio moguć bez Kohn-Shamove aproksimacije. Dakle, DFT za rješavanje Schrödingerove jednadžbe koristi elektronsku gustoću, i jednu elektronsku valnu funkciju. Elektroni kod DFT metoda međusobno interagiraju na način da dolazi do ravnoteže privlačnih i odbojnih sila u molekuli. Relevantni parametri su funkcionali i osnovni skupovi <sup>34</sup>.

Funktional koji točno povezuje elektronsku gustoću s energijom ne postoji te je tijekom godina razvijen veliki broj funkcionala za velik broj molekularnih sustava. Funkcionali se međusobno razlikuju na temelju opisa funkcionala izmjene, korelacije i udjela Hatree-Fock funkcionala. Korišteni DFT funkcional hibridni je M06-2X funkcional. Ova obitelj funkcionala razvijena je od strane prof. Donalda Truhlara na Sveučilištu Minnesota 2006. godine <sup>35</sup>. Uključuju članove koji su parametrizirani obzirom na eksperimentalne podatke te ovise o gustoći kinetičke energije. M06-2X funkcional pokazao se odgovarajućim za opis reakcija u aktivnom mjestu MAO enzima te je iz tog razloga i korišten <sup>12</sup>.

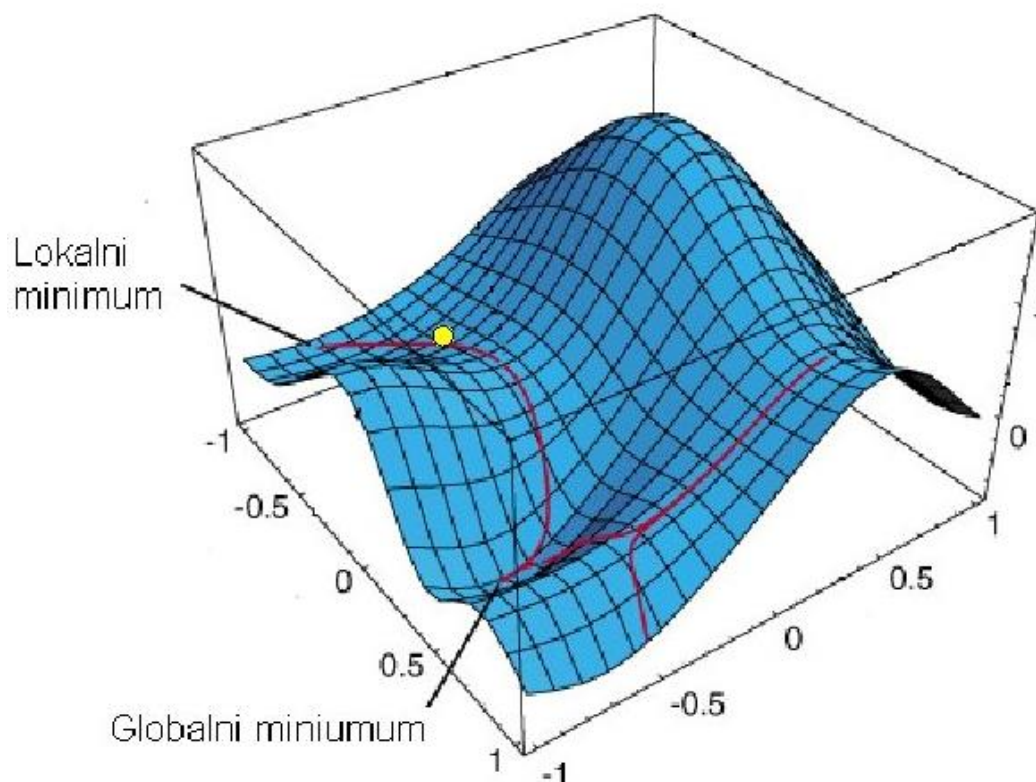
Osnovni skup baza je vektorskog prostora u koji se smještaju molekulske orbitale. Molekulske orbitale opisane su prigodnim valnim funkcijama čiji je broj osnovnih funkcija u svakom osnovnom skupu ograničen. Što je veći broj osnovnih funkcija, to je pouzdanost osnovnog skupa veća. Linearna kombinacija osnovnih funkcija koja daje najnižu energiju molekularnom sustavu predstavlja Kohn-Shamove orbitale. Podjela osnovnog skupa odnosi se na broj primitivnih gausijanskih orbitala koje opisuju unutarnje, ali i vanjske, valentne orbitale čineći složenu osnovnu funkciju. Podjela uključuje i prisutnost difuzijskih i/ili polarizacijskih funkcija. Korišten je Popleov osnovni skup, 6-31G(d), za sve izračune osim izračuna u jednoj točki (engl. *single-point*) za koji je korištena viša razina teorije <sup>36</sup>.



Osnovni kvantno-mehanički izračuni korišteni u ovom diplomskom radu su izračun elektronske energije i geometrijska optimizacija, frekvencijski izračun te izračun gradijenta intrinzične reakcijske koordinate (engl. *intrinsic reaction coordinate*, IRC).

#### **1.2.2.3.2.1. Izračun energije i geometrijska optimizacija**

Svaka promjena strukture molekule (duljina veze ili vrijednosti kuta) utječe na energiju, a posljedično i na ostala svojstva sustava. Varijacija energije molekulskog sustava malim promjenama u strukturi specificirana je plohom potencijalne energije (engl. *potential energy surface*, PES). Ploha potencijalne energije matematička je funkcija koja pridružuje energiju odgovarajućoj molekulskoj strukturi, odnosno geometriji. PES je rezultat uključivanja Born-Oppenheimer aproksimacije u Schrödingerovu jednadžbu koja aproksimira da se elektronska distribucija unutar molekulskog sustava brzo prilagođava promjenama položaja jezgre. Dakle, energija i ponašanje molekule može se izraziti kao funkcija pozicije jezgre, odnosno kao ploha potencijalne energije. PES uključuje onoliko dimenzija koliko je potrebno da se jednoznačno odredi geometrija molekulskog sustava <sup>37</sup>.



**Slika 11 Prikaz plohe potencijalne energije dvoatomne molekule s istaknutim lokalnim i globalnim minimumom <sup>38</sup>.**

Točka na dnu PES-a iz koje „pomak“ u svakom smjeru dovodi do stanja više energije te gdje sve komponente gradijenta energije iznose 0 naziva se minimum. Minimumi mogu biti lokalni (najniža točka energije na određenom dijelu PES-a) i globalni (najniža točka energije na cijelom PES-u). Minimumi odgovaraju strukturama reaktanata i među(prodakata) ili različitim konformerima u slučaju istraživanja prostorno varijabilnog sustava <sup>37</sup>.

Stacionarne točka svaka je točka na PES-u gdje su vrijednosti sila jednake 0. Sedlasta točka prvog reda odgovara stacionarnoj točki u kojoj postoji jedna negativna vrijednost matrice druge derivacije, dok su sve ostale pozitivne. Sedlasta točka označava prijelazno stanje (engl. *transition state*, TS) koje povezuje dva minimuma <sup>39</sup>.

Geometrijska optimizacija iterativni je izračun koji koristeći optimizacijske algoritme teži minimizaciji energije sustava i pronalasku stacionarnih točaka na PES-u, najčešće minimuma. Lociranje minimuma tijekom geometrijske optimizacije naziva se minimizacijom. Svaka uspješna optimizacija dovodi do lociranja stacionarne točke. Optimizacijski algoritmi služe za računanje energije i gradijenta energije u jednoj točki, potom određujući koliko daleko i u kojem smjeru treba napraviti novi korak. Gradijent daje informaciju u kojem smjeru energija najbrže opada od određene točke te karakterizira strmest nagiba. Određeni optimizacijski algoritmi računaju i drugu derivaciju energije poštujući molekulske koordinate (kartezijski sustav, Z-matriks ili kombinirani koordinatni sustav) dajući informaciju o matrici konstantnih sila, odnosno Hessianu. Hessian matrica karakterizira zaobljenost površine u određenoj točki što dodatno pridonosi odluci o idućem koraku na PES-u. Optimizacija sedlaste točke prvog reda, odnosno prijelaznog stanja, nešto je zahtjevnija od optimizacije minimuma. Iziskuje dodatne optimizacijske algoritme i početnu geometriju koja predstavlja prijedlog prijelaznog stanja.

Optimizacija je okončana tek kada sustav konvergira. Konvergencija načelno znači da su sile unutar sustava jednake 0, a idući korak ispod je prethodno određene vrijednosti koju zadaje algoritam (engl. *threshold*). Konvergencija sustava postignuta je onda kada su ispunjeni sljedeći kriteriji, u slučaju programa Gaussian:

**Tablica 2. Primjer kriterija konvergencije geometrijske optimizacije nakon nekoliko iteracija (hartree/bohr za sile, angstrom za pomak).**

Kriterij	Vrijednost	Prag	Konvergencija
Maksimalna sila	0.000007	0.000450	Da
Kvadratna sredina sile	0.000001	0.000300	Da
Maksimalni pomak	0.000727	0.001800	Da
Kvadratna sredina pomaka	0.000105	0.001200	Da

Sva 4 kriterija moraju esencijalno biti 0 kako bi sustav konvergirao. Prvi kriterij maksimalne komponente sile daje informaciju o maksimalnoj sili na određeni atom u molekulskom sustavu koja mora biti manja od 0.000450 hartree/bohr. Drugi kriterij govori o prosječnoj sili na sve atome u molekulskom sastavu koja mora biti manja od 0.000300 hartree/bohr. Treći i četvrti kriterij sadrže informaciju o maksimalnoj strukturnoj promjeni određene koordinate, odnosno prosječnoj promjeni svih strukturnih parametara. Nekoliko kriterija konvergencija potrebno je s obzirom na to da u dijelovima PES-a koji su vrlo plitki vrijednosti sila iznose približno 0, a svaki korak je izrazito velik dok sustav teži k dolini PES-a (prema minimumu), kako bi se izbjeglo lociranje lažnog minimuma. Također, na vrlo strmim dijelovima PES-a vrijednosti sila su izrazito velike, dok su koraci vrlo mali <sup>37</sup>.

Međutim, da bi se priroda stacionarne točke jednoznačno odredila, potrebno je provesti frekvencijski izračun na odgovarajućoj razini teorije.

#### **1.2.2.3.2.2. Frekvencijski izračun**

Izračuni energije i geometrijske optimizacije koriste aproksimaciju pozicije jezgre u kojem su jezgre u potpunosti stacionarne. Međutim, frekvencijski izračun ne koristi tu aproksimaciju u izračunu. Molekulske frekvencije rezultat su druge (i viših) derivacija energije uzimajući u obzir pozicije jezgre i rješavanje vibracijskih Schrödingerovih jednadžbi.

Frekvencijski izračun koristi se u slučaju:

1. karakterizacije prirode lociranih stacionarnih točaka
2. izračuna frekvencija vibriranja atoma unutar molekulskog sustava
3. izračuna termokemijskih parametara
4. izračuna IR i Raman spektra

Stacionarna točka može se okarakterizirati kao minimum (reaktanti, produkti, intermedijeri) ako ne postoji imaginarna frekvencija. Prijelazno stanje, odnosno sedlasta točka prvog reda okarakterizirana je jednom imaginarnom frekvencijom (ako ih postoji više, onda treba ponoviti minimizaciju dok se ostale ne otklone) <sup>37</sup>.

### **1.2.2.3.2.3. IRC procedura**

Prijelazno stanje mora se dodatno potvrditi procedurom intrinzične reakcijske koordinate koja povezuje prijelazno stanje s 2 minimuma. Locirani minimumi mogu biti povezani pomoću više reakcijskih puteva, međutim put dobiven IRC procedurom smatra se putem s najnižom energijom.

IRC procedurom parcijalno se optimiziraju molekulske strukture duž reakcijske koordinate. Napredni smjer podrazumijeva pronalaženje minimuma koji odgovara (među)produktima, dok povratni smjer odgovara reaktantima.

Osnovni podatak kvantno-mehaničkih izračuna informacija je o elektronskoj energiji. Uspješnim završetkom geometrijske optimizacije dobivena energija ne odgovara realnoj energiji molekule. S obzirom na to da molekula nikada nije u stanju potpunog mirovanja, već posjeduje određeno vibracijsko, rotacijsko i translacijsko gibanje, potrebno je na izračunatu elektronsku energiju nadodati određene korekcije energije i drugih termokemijskih parametara. Postoje 4 korekcije koje se moraju uzeti u obzir kod računanja ukupne elektronske energije; korekcija nulte točke, termalna korekcija energije, termalna korekcija entalpije te termalna korekcija slobodne Gibbsove energije <sup>37</sup>.

Korekcija nulte točke predstavlja energiju koja odgovara najnižem vibracijskom stanju molekule pri 0 K. Termokemijski izračuni poput

entalpije i entropije proizlaze iz vibracijskog, rotacijskog i translacijskog gibanja te uključuju aproksimaciju rigidnog rotora za opis rotacijskog gibanja i aproksimaciju idealnog plina za opis translacijskog gibanja. Moguće je postavljanje temperature (zadana vrijednost iznosi 298.15 K), tlaka (zadana vrijednost iznosi 1 atm) i izotopa atoma u postavkama izračuna. Gibbsova slobodna energija jednaka je razlici entalpije i entropije pomnožene s temperaturom <sup>39</sup>.

#### **1.2.2.3.2.4. Solvatacijski efekti**

Kemijske reakcije većinski se odvijaju u otopini čije otapalo često i sudjeluje u samoj reakciji. Također, otapalo mijenja samu strukturu i energiju molekuskog sustava te je od ključne važnosti izračunati interakciju otapala i otopljene tvari. Postoji implicitna i eksplicitna solvatacija i kombinacija obje solvatacije, odnosno supramolekulski solvatacijski model.

Eksplicitna solvatacija podrazumijeva eksplicitno dodavanje molekula vode što rezultira stvaranjem solvatacijskih ljuski u mikrookolišu promatranog sustava. Eksplicitna solvatacija postavlja izazov opisa prve ljuske. Naime, molekule otapala vezane su intermolekulskim silama za prvu ljusku te mijenjaju gibanje, energiju te samim time i reaktivnost samog sustava. Voda je posebice problematično otapalo jer molekule interagiraju jakim vodikovim vezama te se često znaju tijekom izračuna pomaknuti dalje od sustava i tvoriti vodene grozdove. Potrebno je odrediti optimalan broj molekula vode za svaki kemijski sustav kako ne bi došlo do migracije tih molekula unutar prostora prve solvatacijske šupljine.

Implicitna solvatacija podrazumijeva model polarizacijskog kontinuuma te se odvija na način da prvotno nastaje solvatacijska šupljina, potom molekulkulski sustav ulazi unutar novonastale šupljine i konačno slijedi relaksacija kontinuuma oko molekule. Kako bi se u obzir uzele i elektrostatske interakcije na većim udaljenostima te polarizacijski efekt

ostatka proteina, korištena je vodljiva metoda polarizabilnog kontinuuma (engl. *conductor-like polarisable continuum model*, CPCM) s vrijednosti dielektrične konstante 4 i UFF (engl. *universal force field*) atomskim radijusom zbog visoke hidrofobnosti aktivnog mjesta, dok drugi parametri odgovaraju čistoj vodi.

Supramolekulski model solvatacije podrazumijeva kombinaciju eksplicitne i implicitne solvatacije te je računski najzahtjevniji, ali i najpouzdaniji model<sup>37</sup>.

#### **1.2.2.3.2.5. Populacijska analiza**

Populacijska analiza predstavlja izračun distribucije elektronske gustoće u prostoru. S obzirom na to da se naboji ne mogu eksperimentalno izračunati jer su posljedica modela, a ne fizikalno svojstvo, primjena izračunatih parcijalnih naboja od velike je važnosti. Parcijalni naboj definira se kao naboj oko odgovarajuće atomske jezgre u nekom vremenskom prosjeku. Parcijalni naboji opisuju polarnost molekula, predviđaju mjesta nukleofilnih, odnosno elektrofilnih napada i dr.

NBO (engl. *natural bond orbital*) analiza uključuje skup metoda transformacije valne funkcije u lokaliziranu formu koja odgovara jednom centru. Osnovni skup atomskih orbitala prevodi se pomoću prirodnih atomskih orbitala i prirodnih hibridnih orbitala u prirodne vezujuće orbitale. Prirodne orbitale dijagonaliziraju matricu elektronske gustoće<sup>37</sup>.

## 2. Cilj rada

Dosadašnji pristupi razvitka mehanizmom-temeljenih, ireverzibilnih inhibitora MAO-B enzima uključivali su modifikacije već postojećih komercijalnih lijekova te nisu rezultirali novim inhibitorima poboljšanog termodinamičkog i kinetičkog profila.

Razvili smo novu proceduru dizajna lijekova koja se temeljila na podrobnom biokemijskom poznavanju MAO-B enzima. Termodinamički profil reakcije inhibicije novo-dizajniranih kandidata spojeva ispitan je metodama molekuskog pristajanja, klasičnim simulacijama molekulske dinamike te MM-PBSA analizom. Sprovedenjem mehanističkih DFT izračuna na modelu klastera MAO-B enzima, ispitan je kinetički profil reakcije inaktivacije enzima te mehanizam hidridne apstrakcije kandidata spojeva.



### 3. Materijali i metode

Početna točka bila je struktura MAO-B enzima visoke rezolucije (1.7 Å) u kompleksu s *N*-metil-1-aminoindanom preuzeta iz baze kristalnih struktura proteina (engl. *Protein Data Bank*, PDB). PDB kod strukture je 2C67<sup>8</sup>. Korištena struktura preuzeta je i prethodno obrađena tako da su kristalne molekule vode izbrisane kako bi se omogućila slobodna difuzija naknadno dodanih molekula vode tijekom ekvibracijskog i produkcijskog dijela MD simulacija bez smanjivanja stupnjeva slobode kretanja molekula otapala. Protonacijska stanja pojedinih aminokiselina određena su korištenjem predikcijskog poslužitelja PROPKA3.11 te procjenom vodikovih veza u mikrokolišu tih aminokiselinskih ostataka<sup>40</sup>. Eksplicitni vodici koji nedostaju nadodani su korištenjem modula tLEaP koji je integriran u paket AmberTools16<sup>15</sup>. MAO-B je homodimer koji sadrži kovalentno vezani FAD kofaktor za konzervirani Cys397 aminokiselinski ostatak u svakoj podjedinici. Za provođenje molekuskog sidrenja i MD simulacija korišten je MAO-B monomer.

Analiza glavnih komponenti statistička je tehnika simplifikacije dimenzionalnosti velikih skupova podataka s velikim brojem značajki. Ortogonalnom transformacijom set opservacija potencijalno povezanih varijabli pretvara se u set vrijednosti linearno ne-koreliranih varijabli, odnosno glavnih komponenta poredanih po važnosti. Ovakva analiza može prikazati relativne razlike u mobilnosti samog proteina. Kretanje proteina promatra se kao projekcija na jednu od ravnina (*x-y*, *x-z* ili *y-z*) te je analizirano u programskom jeziku R koristeći paket Bio3D u integriranom radnom okruženju RStudio. Rezultati su vizualizirani koristeći opciju '*b-putty factor*' u programu PyMOL.

### **3.1. Skriptom bazirano molekulske pristajanje temeljnih struktura**

Protonacijska stanja liganada provjerene su koristeći MarvinSketch pri pH=7.2 <sup>41</sup>. Fizikalno-kemijska svojstva i ADME parametri procijenjeni su koristeći web stranicu SwissADME <sup>42</sup>. Predprocesiranje liganada podrazumijevalo je dodavanje eksplicitnih vodikova, dodjeljivanje naboja i specifikaciju ukupnog naboja liganda pomoću UCSF Chimera alata DockPrep <sup>43</sup>. Predprocesiranje MAO-B monomera uključivalo je uklanjanje kristalnih molekula vode te svih neproteinskih dijelova proteina pomoću programa UCSF Chimera kako bi se olakšala opservacija protein-ligand interakcija. Provedeno je skriptom bazirano grupno molekulske pristajanje (engl. *batch molecular docking*) samih temeljnih struktura na FAD vezno mjesto koristeći program AutoDock Vina kroz UCSF Chimera sučelje <sup>44</sup>. Temeljne strukture koje su se usidrile na FAD vezno mjesto te njihove konformacije s najnižim vrijednostima funkcije bodovanja odabrane su za daljnju analizu.

### **3.2. Dizajn kandidata spojeva**

Za dizajn novih inhibitora razvijen je inovativni pristup koji uključuje spajanje temeljnih aromatskih struktura <sup>45</sup> s propargilaminskom jezgrom koja je prisutna kod komercijalno dostupnih lijekova koji ciljaju MAO enzime <sup>15</sup> pomoću etilenske poveznice (engl. linker). Potom je na svakom jedinstvenom, slobodnom mjestu kostura prstena nadodana ili metilna (-CH<sub>3</sub>) skupina ili atom vodikova (-H) koristeći program PyMOL <sup>46</sup>.

### **3.3. Skriptom bazirano molekulske pristajanje temeljnih struktura**

Provedeno je skriptom bazirano grupno molekulske pristajanje novodizajniranih kandidata spojeva na FAD vezno mjesto koristeći program AutoDock Vina kroz UCSF Chimera sučelje. Kandidati spojevi koji su se usidrili na FAD vezno mjesto te njihove konformacije s najnižim vrijednostima funkcije bodovanja odabrani su za daljnju analizu.

### 3.4. Klasične simulacije molekulske dinamike

Geometrije FAD kofaktora i liganda optimizirane su te su im izračunati RESP (engl. *restrained electrostatic potential*) naboji na HF/6-31G(d) razini teorije dok je ostatak enzima modeliran pomoću AMBER ff14SB polja sila<sup>47</sup>. Simulacije molekulske dinamike (MD) provedene su koristeći softverski paket GROMACS 2020.4. Molekulsko pristajanje ne opisuje gibanje molekula i proteina od interesa pri fiziološkim uvjetima te se MD metode koriste kako bi se takvo gibanje opisalo. Sustav liganda s kartezijskim koordinatama dobivenim molekulskim pristajanjem i proteina stavljen je u kockastu simulacijsku kutiju dimenzija otprilike 10 Å ispunjenu molekulama vode što omogućava provođenje simulacija uz periodične rubne uvjete u svim smjerovima i 5 iona natrija kako bi sustav bio nabojem neutralan.

Provedena je minimizacija sustava koristeći algoritam najstrmijeg spuštanja (engl. *steepest descent*), potom ekvilibracija koristeći NVT ansambl gdje je uvedena konstanta temperatura od 310 K i NPT ansambl gdje je uveden konstantan tlak u iznosu 1 atm koristeći integrator žabe u skoku (engl. *leap-frog*) u trajanju od 250 ps. Svim teškim atomima sustava gibanje je tijekom minimizacije i ekvilibracije bilo ograničeno kako bi se minimizacija i ekvilibracija lakše provele te potom potpuno relaksirano u preostalim fazama simulacije. Vodikove veze ograničene su LINCS (engl. *linear constraint solver*) algoritmom<sup>48</sup>, dok su dalekosežne elektrostatske interakcije opisane PME (engl. *particle-mesh Ewald*) metodom<sup>49</sup>. Minimizacija i ekvilibracija sustava provode se s ciljem osiguranja da je sistem od interesa simuliran bez nepravilnih geometrija, neprirodnih kuteva ili energija kako bi bio što sličniji opisu prirodnog sustava. Konačno, provedene su produkcijske MD simulacije u trajanju od 300 ns i 150 000 000 koraka s vremenskim korakom od 2 fs koristeći 30 čvorova Bullx DLC720 superračunala Bura, što je razuman vremenski okvir za opis vezanja liganda na aktivno mjesto i popratnih promjena unutar aktivnog mjesta proteina.

MD simulacije potom su vizualizirane u programu VMD (engl. *visual molecular dynamics*) kako bi se provjerio položaj i orijentacija liganada na aktivnom mjestu te eliminirali ligandi koji su izašli iz samog veznog mjesta, s obzirom na to da je to indikacija neodgovarajućeg afiniteta naspram veznog mjesta <sup>50</sup>. Nakon sprovedene MD simulacije, evaluirana je slobodna ukupna Gibbsova energija vezanja te doprinos svake pojedine aminokiseline proteina na vezanje liganada pomoću MM-PBSA metode) koristeći programski paket *g\_mmpbsa* <sup>51</sup>. Informacija o doprinosu svake aminokiseline vezanju izrazito je vrijedna informacija kod modifikacije liganada, ali i odabira aminokiselina za daljnju kvantno-mehaničku analizu.

Nakon MD simulacija, dobiven je uvid u termodinamički profil vezanja kandidata inhibitora. Ligandi s najnižom ukupnom Gibbsovom energijom vezanja i optimalnim položajem naspram kofaktora FAD odabrani su za daljnju kvantno-mehaničku analizu kinetičkih parametara reakcije inhibicije bazirane na mehanizmu hidridne apstrakcije.

### **3.5. DFT mehanistički izračun na klaster modelu MAO-B enzima**

Kartezijeve koordinate aminokiselina Ile197, Gln204, Tyr324, Phe341, Tyr396, Tyr433, kofaktora FAD i novo-dizajniranih liganada spremljene su u PDB obliku u programu VMD iz posljednje strukture dobivene iz dinamičke evolucije sustava u vremenu. Nadalje, sve amino skupine (-NH<sub>2</sub>) i karboksilne skupine (-COOH) vezane za  $\alpha$ -atom ugljika zamijenjene su s atomom vodika rezultirajući s terminalnim metilnim skupinama na aminokiselinskim ostacima koristeći program Avogadro <sup>52</sup>. Klaster je uključivao samo enzimatski dio kofaktora FAD te je riboflavinska skupina kofaktora presječena je na  $N_{10}$  flavinskog prstena i zamijenjena s metilnom skupinom.

Nakon MD simulacija kreiran je klasterni model MAO-B koji osim odgovarajućeg inhibitora uključuje FAD kofaktor i aminokiselinske ostatke Ile197, Gln204, Tyr324, Phe341, Tyr396, te Tyr433.

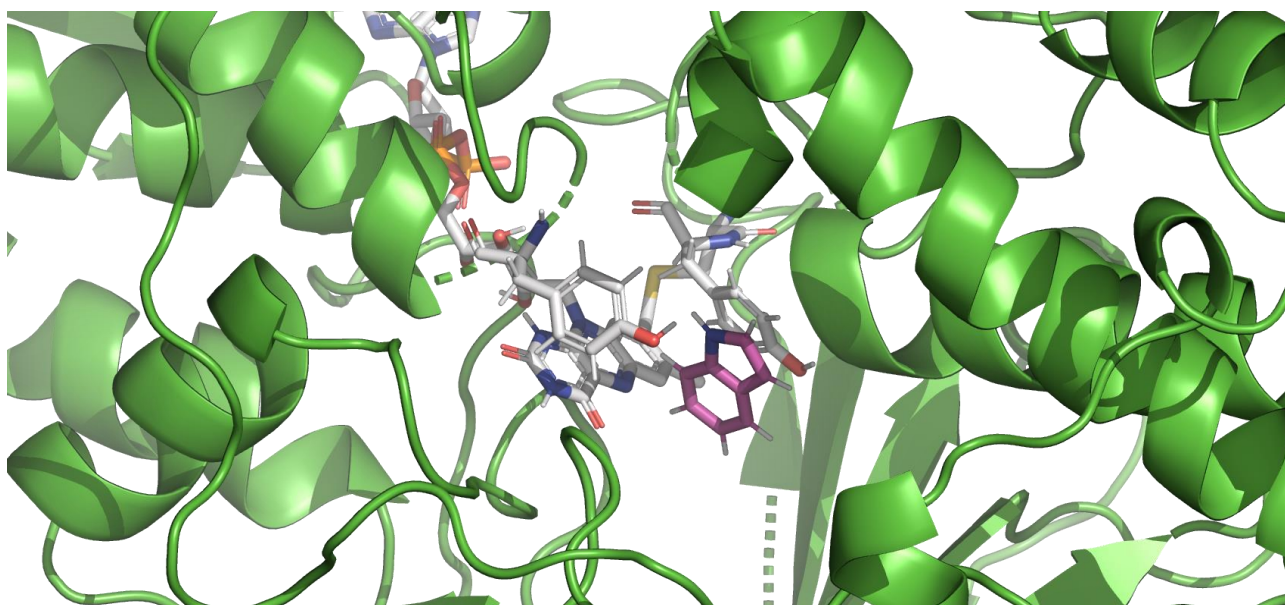
Optimizacijom geometrije klastera koristeći programski paket Gaussian preuzetih iz MD simulacija na M06-2X/6-31G(d) teorijskoj razini dobivene su stacionarne točke koje odgovaraju reaktivnom kompleksu enzima i inhibitora, što ujedno predstavlja i početnu točku za QM račune. Na svim dobivenim stacionarnim točkama (minimumima i prijelaznim stanjima) proveden je frekvencijski račun na navedenoj razini teorije, dok su poboljšane energije izračunate na fiksnoj geometriji korištenjem PBE0/6-311++G(d,p) razine teorije (sukladno s prijašnjim rezultatima na istom biološkom sustavu). Kako bi se u obzir uzele i elektrostatske interakcije na većim udaljenostima te polarizacijski efekt ostatka proteina, korišten je CPCM model s vrijednosti dielektrične konstante otapala ( $\epsilon = 4.0$ ) zbog visoke hidrofobnosti aktivnog mjesta, dok drugi parametri odgovaraju čistoj vodi<sup>53</sup>. Svi kvantno-mehanički izračuni provedeni su na računalnom klasteru Isabella u sklopu Sveučilišnog računskog centra (SRCE) Sveučilišta u Zagrebu.

Reakcijski profili slobodne energije vezanja vizualizirani su koristeći aplikaciju mechaSVG<sup>54</sup>.

## 4. Rezultati

### 4.1. Molekulsko pristajanje temeljnih heteroaromatskih struktura

Molekulsko pristajanje provedeno je na kristalnoj strukturi monomera MAO-B enzima u kompleksu s razagilinom (**RAS**) dobivenoj s web stranice *Protein Data Bank* (identifikacijski kod 2C67) <sup>8</sup>. Struktura visoke rezolucije (1.7 Å) dobivena je metodom rendgenske difrakcije. Ne sadrži mutacije, a svaki monomer sastoji se od 520 aminokiselinskih ostataka. Prije provedbe molekulskog pristajanja, ligand razagilin uklonjen je iz strukture, zajedno sa svim molekulama vode. Molekule su usidrene pomoću programa AutoDock Vina kroz UCSF Chimera sučelje <sup>44</sup>. Afinitet vezanja kostura i njegovo pozicioniranje u aktivno mjesto MAO-B enzima od esencijalne je važnosti za dizajn kandidata spojeva te je primarno provedeno njihovo pristajanje.



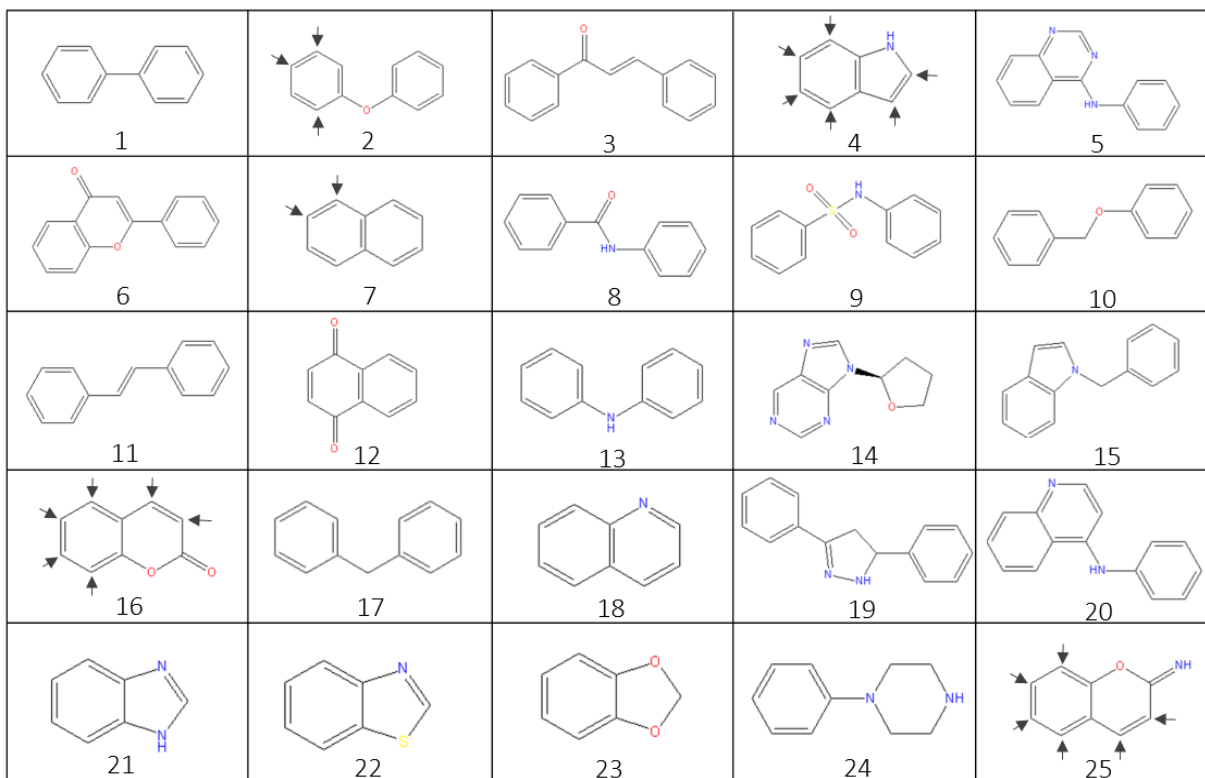
**Slika 12 Indol usidren u aktivno mjesto MAO-B.**

Osim 20 temeljnih aromatskih struktura dobivenih provedenim istraživanjem od strane Zdravila i suradnika <sup>45</sup>, ispitano je i dodatnih 5 heteroaromatskih kostura koji dijele visoku strukturnu sličnost s ostalim temeljnim strukturama (Slika 13). Od 25 analiziranih kostura, kosturi 2, 4, 7, 16 i 25 usidrili su se u aktivno mjesto s afinitetom vezanja koji varira oko vrijednosti od  $-6 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Navedeni kosturi odabrani su za strukturne

modifikacije, na način da im je na sve kemijski neekvivalentne položaje pridodana propargilaminska skupina te na novo-priređenim derivatima sprovedeno molekulske pristajanje.

#### **4.2. Dizajn kandidata spojeva odabranih temeljnih heteroaromatskih struktura**

Razvijen je inovativni pristup za dizajn novih inhibitora MAO-B s obzirom na to da dosadašnji pristupi nisu izrodili novim inhibitorima boljeg farmakološkog profila <sup>53</sup>. Pristupi su najčešće uključivali mijenjanje farmakofornih skupina na već postojećim lijekovima. Procedura za dizajn novih inhibitora uključivala je spajanje temeljnih aromatskih struktura <sup>45</sup> na svakom jedinstvenom, slobodnom mjestu kostura s dušikom propargilaminske jezgre koja je prisutna kod komercijalno dostupnih lijekova koji ciljaju MAO enzime (3). Spojevi su nacrtani koristeći program PyMOL <sup>46</sup>. Na kraju je dodatno ispitan utjecaj prisutnosti metilne ( $-CH_3$ ) skupine umjesto atoma vodika ( $-H$ ) na N-atomu propargilaminske podjedinice, obzirom da je to identificirano kao jedan od efekata koji doprinosi većoj efikasnosti selegilina (**SEL**) u odnosu na razagilin. Strukturnim modifikacijama dobiveno je 50 novo-dizajniranih spojeva (Slika 13). Uslijedilo je skriptom bazirano pristajanje svih 50 kandidata.



**Slika 13 Prikaz 25 temeljnih struktura (prvih 20 iz ChEMBL20 baze molekula) korištenih kod dizajna kandidata spojeva.** Strukture 2, 4, 7, 16 i 25 nadograđene su na strelicama označenim mjestima stvarajući kemijsku vezu između specificiranog ugljika prstena s N-H, odnosno N-CH<sub>3</sub> skupinama.

### 4.3. Molekulsko pristajanje kandidata spojeva

Molekulsko pristajanje 50 novo-dizajniranih kandidata spojeva istaknulo je 7 kandidata s obećavajućim konformacijama i afinitetima vezanja (Tablica 3). Strukturnom modifikacijom indolnog prstena (prsten 4 sa Slike 13), dizajnirana su tri spoja koji su postigli optimalan položaj u aktivnom mjestu te zadovoljavajuće afinitete vezanja. Točnije, spojevi *N*-propargil-2-indol (**42H**), *N*-metil-*N*-propargil-2-indol (**42Me**) i *N*-propargil-5-indol (**45H**) postigli su u prvoj pozi u aktivnom mjestu afinitete vezanja od -7.5 kcal mol<sup>-1</sup>, -6.3 kcal mol<sup>-1</sup>, odnosno -6.8 kcal mol<sup>-1</sup>. Spoj 8-*N*-propargil-2H-kromen-2-in (**258H**) nastao strukturnom modifikacijom prstena 25 (Slika 13) postigao je afinitet vezanja prve poze u aktivnom mjestu MAO-B u iznosu od -7.1 kcal mol<sup>-1</sup>. Nadalje, spoj 1-*N*-propargilnaftalen (**71H**) nastao modifikacijom naftalena, odnosno 7. prstena sa Slike 12 postigao je u prvoj



pozi afinitet vezanja od  $-7.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Konačno, strukturnim modifikacijama kumarina, prstena 16 sa Slike 2, dizajnirani su spojevi 3-*N*-propargilkumarin (**163H**) i 7-*N*-propargilkumarin (**167H**). Spojevi su postigli afinitet vezanja u prvoj pozi od  $-7.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ , odnosno  $-6.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

**Tablica 3 Izračunati afiniteti vezanja spojeva kandidata i kontrolnih molekula.**

Afiniteti vezanja odnose se na 1. pozu dobivenu metodom molekuskog sidrenja u programu AutoDock Vina.

<b>Spoj kandidat</b>	<b>Afinitet vezanja (<math>\text{kcal mol}^{-1}</math>)</b>
<b>42H</b>	-7.5
<b>42Me</b>	-6.3
<b>45H</b>	-6.8
<b>258H</b>	-7.1
<b>71H</b>	-7.8
<b>163H</b>	-7.0
<b>167H</b>	-6.6
<b>SEL</b>	-6.2
<b>RAS</b>	-5.9

#### **4.4. Dizajn kandidata spojeva odabranih temeljnih heteroaromatskih struktura**

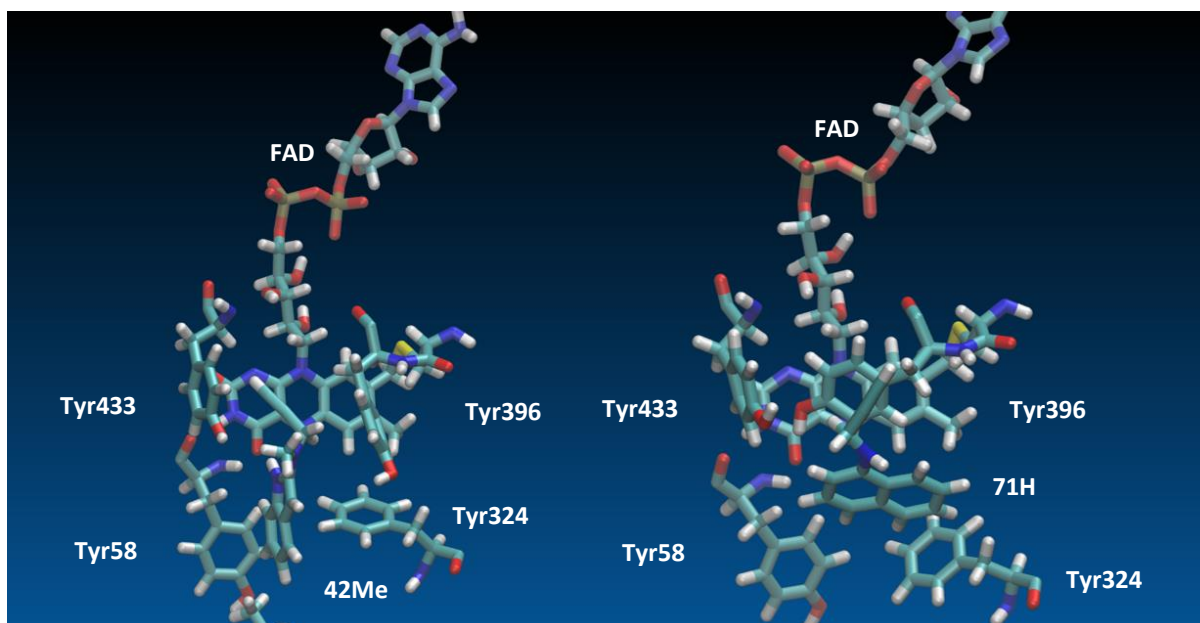
Razvijen je inovativni pristup za dizajn novih inhibitora MAO-B s obzirom na to da dosadašnji pristupi nisu izrodili novim inhibitorima boljeg farmakološkog profila <sup>53</sup>. Pristupi su najčešće uključivali mijenjanje farmakofornih skupina na već postojećim lijekovima. Procedura za dizajn novih inhibitora uključivala je spajanje temeljnih aromatskih struktura <sup>45</sup> na svakom jedinstvenom, slobodnom mjestu kostura s dušikom propagilaminske jezgre koja je prisutna kod komercijalno dostupnih lijekova koji ciljaju MAO enzime (3). Spojevi su nacrtani koristeći program PyMOL <sup>46</sup>. Na kraju je dodatno ispitan utjecaj prisutnosti metilne ( $-\text{CH}_3$ )

skupine umjesto atoma vodika (-H) na N-atomu propargilaminske podjedinice, obzirom da je to identificirano kao jedan od efekata koji doprinosi većoj efikasnosti selegilina (**SEL**) u odnosu na razagilin. Strukturnim modifikacijama dobiveno je 50 novo-dizajniranih spojeva (Slika 13). Uslijedilo je skriptom bazirano pristajanje svih 50 kandidata.

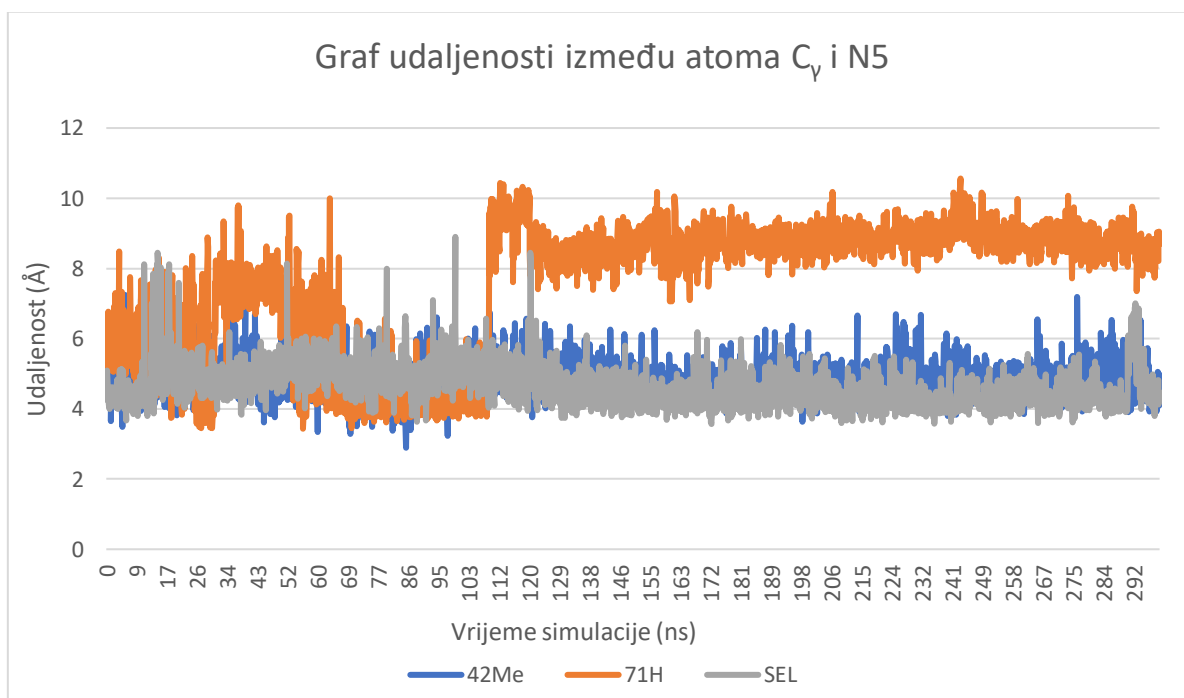
#### **4.5. Simulacije molekulske dinamike odabranih kandidata spojeva**

S obzirom da metode molekuskog pristajanja nisu u mogućnosti simulirati dinamiku sistema u vremenu te vremenski ovisnu prilagodbu strukture proteina vezanom ligandu, sljedeći rezultati dobiveni su klasičnim simulacijama molekulske dinamike. Dodatna potvrda vezanja unutar aktivnog mjesta provedena je MD simulacijama u vodenom mediju pri fiziološkim uvjetima od 1 atm i 310 K u trajanju od 300 ns. Ključan rezultat predstavlja zadržavanje liganda unutar 'aromatskog kaveza' aktivnog mjesta MAO-B enzima.

Od 7 ispitanih kandidata, spojevi **42H**, **42Me**, **163H** te **167H** nisu u niti jednom trenutku od simuliranih 300 ns napustili 'aromatski kavez' aktivnog mjesta. Spojevi **71H** i **45H** potisnuti su iz 'aromatskog kaveza' nakon približno 100 ns simulacije od strane aminokiselinskog ostatka Tyr396 (Slika 14). Kandidat **258H** nalazi se unutar 'aromatskog kaveza' približno polovinu simuliranog vremena.



**Slika 14** Ligandi 42Me (lijevo) i 71H (desno) u aktivnom mjestu MAO-B. Prikazane su posljednje strukture dobivene dinamičkom evolucijom sustava u vremenu. Vizualizirano u programu VMD.



**Slika 15** Grafički prikaz udaljenosti između C<sub>γ</sub> kandidata spojeva 71H, 42Me i kontrolnog spoja selegilina, te N5 atoma kofaktora FAD.

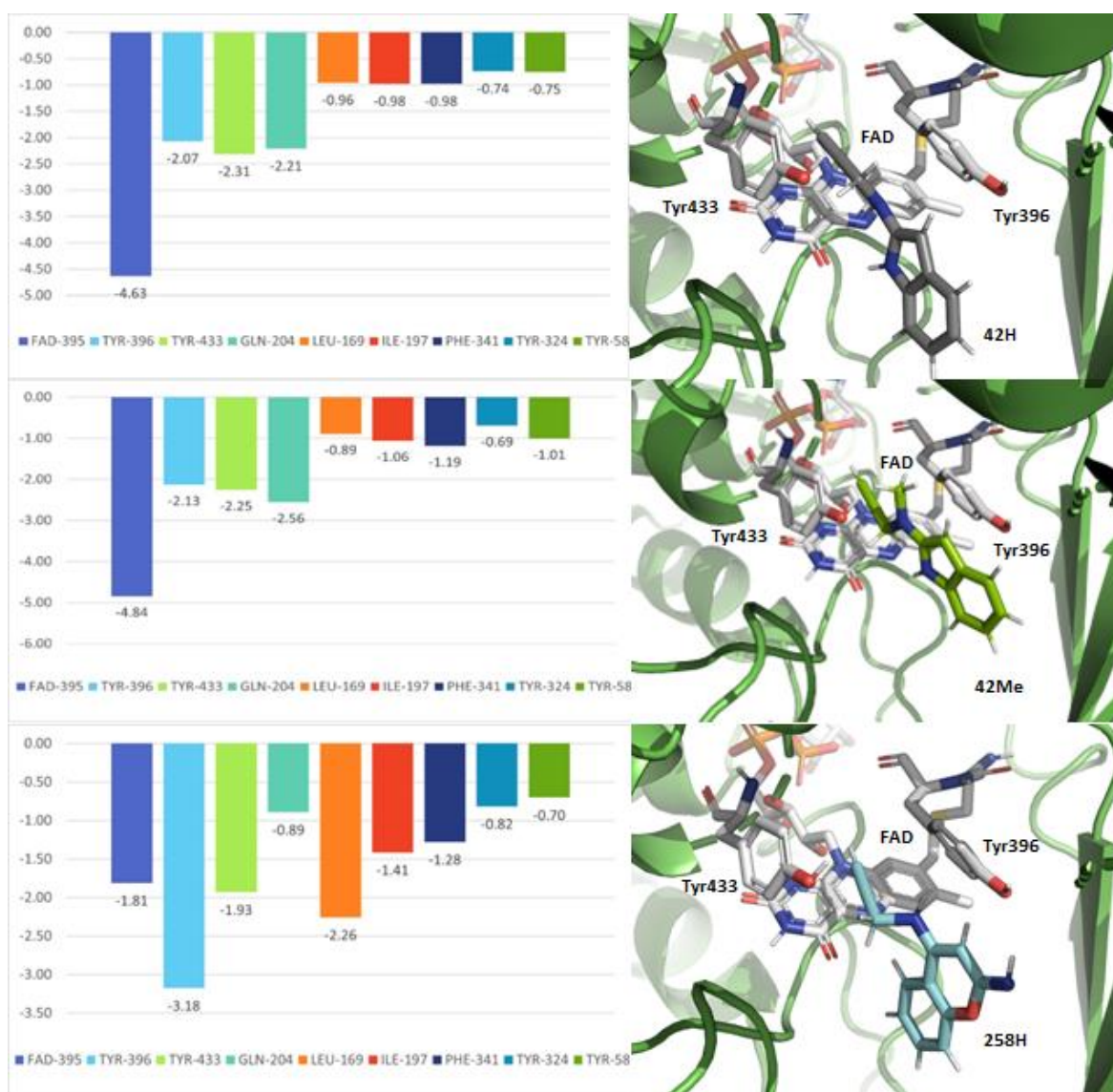
Slika 15 ukazuje na većinski očuvanu udaljenost od približno 5 Å između atoma C<sub>γ</sub> inhibitora i atoma N<sub>5</sub> FAD kofaktora svih 300 ns MD simulacije. Kandidat spoj **42Me** pokazuje identičan trend kao i kontrolna molekula selegilina. Međutim, kandidat spoj **71H** nakon približno 100 ns simulacije povećava udaljenost C<sub>γ</sub> atoma propagilaminske grupe naspram N<sub>5</sub> FAD kofaktora s približno 5 Å na 9 Å. Opisana udaljenost **71H** i FAD-a ostaje očuvana kroz idućih 200 ns simulacije.

#### 4.5.1. MM-PBSA analiza odabranih kandidata spojeva

Kako bi se utvrdilo koje aminokiseline imaju najznačajniji doprinos Gibbsovoj slobodnoj energiji vezanja provedena je MM-PBSA analiza. Za tri kandidata od 7 analiziranih, izračunata Gibbsova slobodna energija vezanja povoljnija je ili usporediva s izračunatim energijama kontrolnih molekula selegilina te razagilina. Detaljnije, Gibbsova slobodna energija kandidata **42H** iznosi -22.0 kcal mol<sup>-1</sup>, kandidata **42Me** -21.5 kcal mol<sup>-1</sup>, a najpovoljnija energija izračunata je za spoj **258H** te iznosi -22.7 kcal mol<sup>-1</sup>. Izračunate energije kandidata negativnije su od energija kontrolnih molekula koje iznose -20.0 kcal mol<sup>-1</sup> za selegilin te -18.1 kcal mol<sup>-1</sup> za razagilin (Tablica 4). Izračunate energije MM-PBSA metodom preostala 4 kandidata (**45H**, **71H**, **163H** i **167H**) nisu iznosom negativnije od kontrola i/ili ne zauzimaju odgovarajući položaj unutar aktivnog mjesta te se na njima nisu provele daljnje analize.

**Tablica 4 Izračunata slobodna Gibbsova energija vezanja ( $\Delta G_{bind}$ ) kandidata spojeva i kontrolnih molekula.** Energija je izračunata iz MD simulacija pomoću *g\_mmpbsa* programskog paketa.

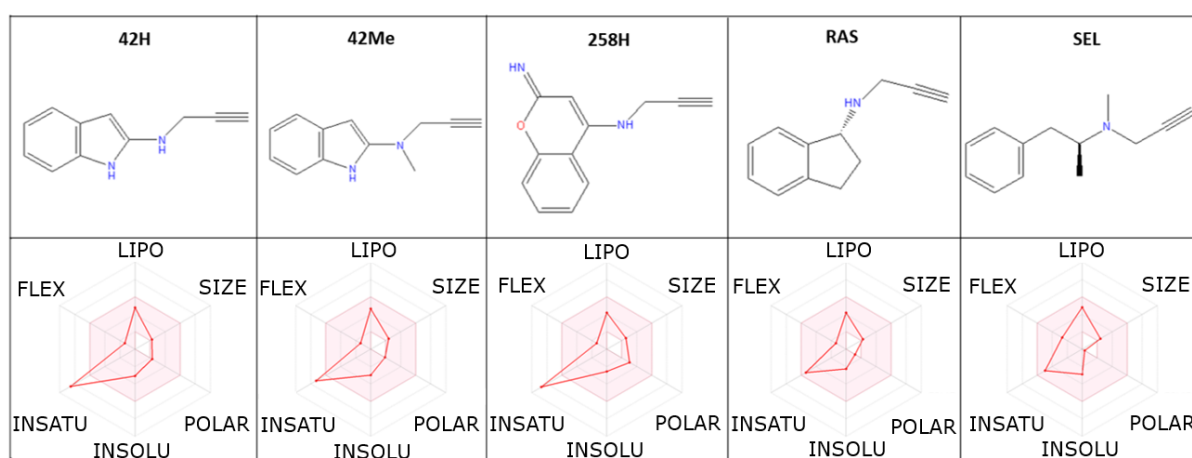
<b>Spoj kandidat</b>	<b><math>\Delta G_{bind}</math> (kcal mol<sup>-1</sup>)</b>
<b>42H</b>	-22.0
<b>42Me</b>	-21.5
<b>258H</b>	-22.7
<b>SEL</b>	-20.0
<b>RAS</b>	-18.1



**Slika 16** Razdioba energije vezanja po pojedinim aminokiselinskim ostacima i aktivno mjesto MAO-B s usidrenim spojevima 42H, 42Me i 258H. Izračunat doprinos označenih aminokiselinskih ostataka slobodnoj Gibbsovoj energiji vezanja (iz MD simulacija korištenjem MM-PBSA pristupa i dekompozicija slobodne energije po pojedinom aminokiselinskim ostacima) u kcal mol<sup>-1</sup>.

Daljnja analiza dekompozicije Gibbsove slobodne energije vezanja po pojedinim aminokiselinskim ostacima omogućuje uvid u termodinamički doprinos energiji vezanja svake aminokiseline u proteinu te predstavlja snažan alat u razumijevanju protein-ligand interakcija te ciljanog razvoja novih liganada. Kandidatu **42H** Tyr396, Leu169, Tyr433 i potom FAD

kofaktor najviše doprinose energiji vezanja i to iznosima od  $-3.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ ,  $-2.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ ,  $-1.9 \text{ kcal mol}^{-1}$  i  $-1.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Energiji vezanja spoja **258H** najviše doprinosi kofaktor FAD s  $-4.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ , potom Tyr433 s  $-2.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ , Gln204 s  $2.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ , te Tyr196 s  $-2.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Vrlo slični trend uviđen je i kod kandidata **42Me** kojem kofaktor FAD pridonosi energiji vezanja s  $-4.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ , potom Gln204 s  $-2.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ , Tyr433 s  $2.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ , te naposljetku Tyr396 s  $-2.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Provedena analiza omogućila je osnovu po kojoj su odabrane aminokiseline za model MAO-B klastera.



**Slika 17 ADME svojstva kontrolnih molekula selegilina i razagilina te novo-dizajniranih spojeva 42H, 42Me i 258H.** Slikovni prikaz struktura kontrolnih molekula selegilina i razagilina te novo-dizajniranih spojeva 42H, 42Me i 258H nacrtanih u programu ChemDraw<sup>41</sup> i fizikalno-kemijska svojstva za oralnu bioraspodjivost procijenjena koristeći web stranicu SwissADME.<sup>55</sup> Fizikalno-kemijski deskriptori prikazani su pomoću jedinstvenog grafičkog prikaza u obliku šesterokuta (engl. bioavailability radar): LIPO označava lipofilnost, FLEX fleksibilnost, INSATU nezasićenost, INSOLU netopljivost, POLAR polarnost, a SIZE veličinu spoja.

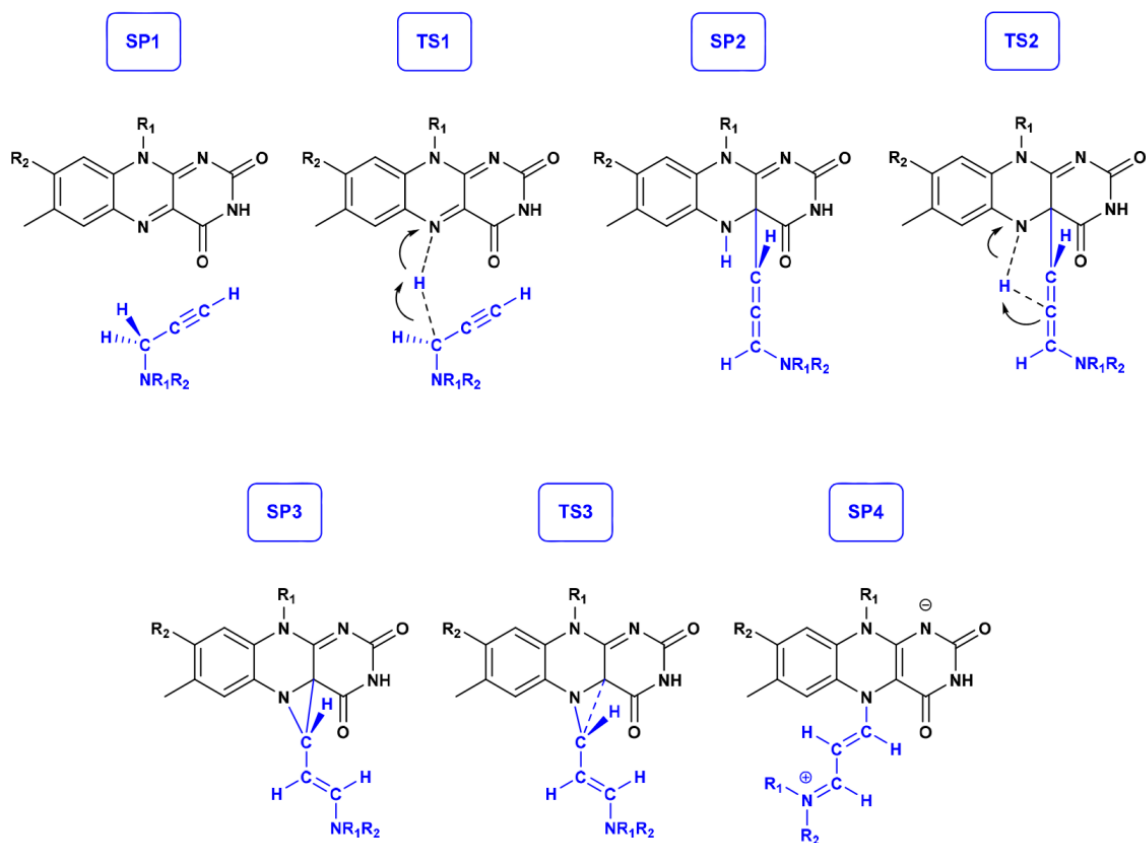
Ružičasto obojeno polje označava optimalan raspon vrijednosti za svaki parametar te pozitivno korelira s oralnom bioraspodjivošću, a svaki kut šesterokuta predstavlja jedan parametar. Parametar lipofilnosti molekule (LIPO) kvantificiran je vrijednošću  $\log P$  izračunatog korištenjem programa XLOGP 3.2.2 i mora zadovoljiti vrijednosti između  $-0.7$  i  $+5.0$ . Veličina molekule (SIZE) kvantificirana je vrijednošću molekulske mase koja mora

biti između 150 i 500 g mol<sup>-1</sup>. Polarnost molekule (POLAR) kvantificirana je vrijednošću TPSA koja mora biti u rasponu od 20 do 130 Å<sup>2</sup>. Parametar netopljivosti molekule (INSOLU) kvantificiran je negativnom vrijednošću logaritma molarne topljivosti koja ne smije biti veća od 6, a izračunata je topološkom metodom Delaneyja (*log S*). Parametar (INSATU) opisuje nezasićenost molekule koja je kvantificirana udjelom sp<sup>3</sup> hibridiziranih ugljikovih atoma u ukupnom broju atoma ugljika i njegova vrijednost ne smije biti niža od 0.25. Fleksibilnost molekule (FLEX) kvantificirana je brojem rotirajućih veza kojih ne smije biti više od 9<sup>55</sup>.

Kandidati spojevi **42H**, **42Me** i **258H** pokazuju zadovoljavajuće vrijednosti svih fizikalno-kemijskih deskriptora osim vrijednosti nezasićenosti molekule.

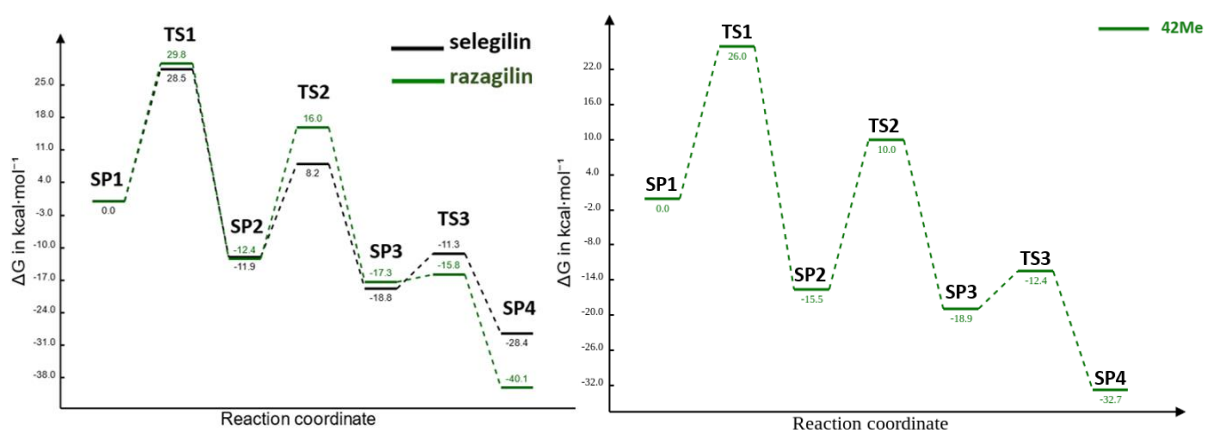
#### **4.6. Klasterni model MAO-B aktivnog mjesta odabranih kandidata spojeva**

Za potrebe razjašnjavanja kinetičkog reakcijskog profila kandidata spojeva i potvrde mehanizma djelovanja istih, simuliran je klasterni model MAO-B aktivnog mjesta s kandidatima od interesa. Slika 18 prikazuje mehanizam hidridne apstrakcije u reakciji ireverzibilne inhibicije propargilaminskim inhibitorom.



**Slika 18** Pripadajuće kemijske strukture stacionarnih točaka (SP) i prijelaznih stanja (TS) tijekom mehanizma hidridne apstrakcije reakcije ireverzibilne inhibicije MAO-B enzima propargilaminskim inhibitorom <sup>53</sup>.

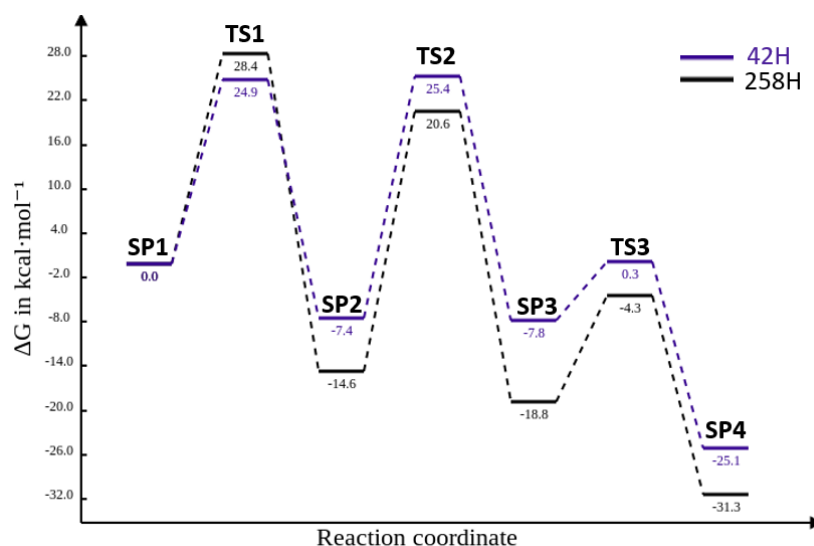
Daljnja kvantno-mehanička analiza provedena je u programu Gaussian 16 na 3 kandidata; *N*-propargil-2-indol (**42H**), *N*-metil-*N*-propargil-2-indol (**42Me**) i 8-*N*-propargil-2H-kromen-2-in (**258H**).



**Slika 19** Reakcijski profili slobodne energije ireverzibilne inhibicije MAO-B enzima kontrolnih molekula, selegilina i razagilina, te kandidata spoja 42Me. Akronimi SP i TS odgovaraju stacionarnim točkama, odnosno prijelaznim stanjima.



Dobivene vrijednosti referentnih lijekova te kandidata **42Me** pokazuju visoku sličnost i zajednički energijski trend (Slika 19). Naime, kod sva tri sustava najviša energija aktivacije iskazuje korak nastajanja prvog prijelaznog stanja (TS1). Prva energetska barijera za selegilin iznosi 28.5 kcal mol<sup>-1</sup>, za razagilin 29.8 kcal mol<sup>-1</sup>, te 26.0 kcal mol<sup>-1</sup> za **42Me**. Formacijom druge stacionarne točke (SP2) sustav selegilina pada energijom u odnosu na reaktante na vrijednost od - 11.9 kcal mol<sup>-1</sup>, sustav razagilina -12.4 kcal mol<sup>-1</sup> te sustav spoja **42Me** na -15.5 kcal mol<sup>-1</sup>. Drugo prijelazno stanje naspram stanja reaktanata energijski se razlikuje za 8.2 kcal mol<sup>-1</sup> u slučaju selegilina, odnosno 16.0 kcal mol<sup>-1</sup> za razagilin, te 16.6 kcal mol<sup>-1</sup> za **42Me**. Sustavi potom padaju energijom duž reakcijske koordinate do SP3 stanja u kojem poprimaju negativne energijske vrijednosti; selegilin -18.8 kcal mol<sup>-1</sup>, razagilin -17.3 kcal mol<sup>-1</sup> i -18.9 kcal mol<sup>-1</sup> **42Me**. TS3 sustavima selegilina, razagilina te **42Me** podiže energijske vrijednosti na -11.3 kcal mol<sup>-1</sup>, -15.8 kcal mol<sup>-1</sup> te -12.4 kcal mol<sup>-1</sup>. Konačno, produkti poprimaju vrijednosti od -28.4 kcal mol<sup>-1</sup>, -40.1 kcal mol<sup>-1</sup> te -32.7 kcal mol<sup>-1</sup>.



**Slika 20** Reakcijski profili slobodne energije ireverzibilne inhibicije MAO B enzima kandidata spoja **42H** i **258H**. Akronimi SP i TS odgovaraju stacionarnim točkama, odnosno prijelaznim stanjima.

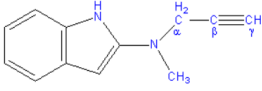
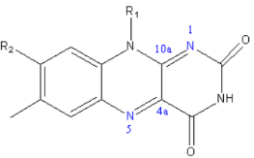
S druge strane, kandidati **42H** i **258H** pokazuju drukčiji reakcijski profil od dosad opisanih (Slika 20). Prva energija aktivacije u odnosu na reaktante kod sustava **42H** razlikuje se za 24.9 kcal mol<sup>-1</sup>, odnosno 28.4 kcal mol<sup>-1</sup> za **258H**. Potom SP2 poprima negativnu vrijednost od -7.4 kcal mol<sup>-1</sup> za **42H**, te -14.6 kcal mol<sup>-1</sup> za **258H**. Drugo prijelazno stanje zauzima najvišu točku reakcijskog profila s vrijednosti od 25.4 kcal mol<sup>-1</sup> za **42H**, tj. 20.6 kcal mol<sup>-1</sup> za **258H**. SP3 sustava **42H** poprima negativnu vrijednost od -7.8 kcal mol<sup>-1</sup>, dok sustava **258H** -18.8 kcal mol<sup>-1</sup>. U kontrastu s prijašnjim rezultatima, TS3 kandidata **42H** poprima pozitivnu vrijednost od 0.3 kcal mol<sup>-1</sup>, a **258H** -4.3 kcal mol<sup>-1</sup>. Naposljetku, sustav produkata pada na energijski minimum od -25.1 kcal mol<sup>-1</sup> za **42H**, odnosno -31.3 kcal mol<sup>-1</sup> za **258H**.

#### **4.7. Populacijska analiza kandidata spoja 42Me**

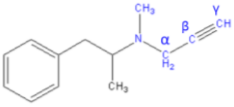
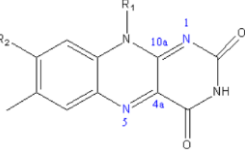
S ciljem potvrde prvog koraka reakcije inhibicije koji uključuje prijenos hidrida sa C( $\alpha$ ) inhibitora na N<sub>5</sub> FAD kofaktora, provedena je populacijska analiza.

Tablica 5 prikazuje vrijednosti, u točkama SP1 i TS1, parcijalnih NBO naboja relevantnih atoma, molekula i veza, te duljine relevantnih veza. Vidljivo je da ukupni naboj kandidata **42Me** tijekom prvog koraka hidridne apstrakcije postaje iznosom negativniji, dok FAD kofaktora pozitivniji. Isti trend pokazuje i kontrolna molekula selegilina čije su vrijednosti prikazane u Tablici 6.

**Tablica 5 Distribucija naboja (NBO analiza, u |e|) i duljine relevantnih veza (u Å).** Vrijednosti se odnose na prvi korak hidridne apstrakcije reakcije ireverzibilne inhibicije s kandidatom 42Me i kontrolne molekule selegilina na (CPCM)/M06-2X/6-31G(d) teorijskoj razini. Akronimi SP i TS odgovaraju stacionarnim točkama, odnosno prijelaznim stanjima.

Sustav	Atom/ molekula/ve za	SP1	TS1
	N <sub>amino</sub>	-0.47	-0.43
	C(N <sub>amino</sub> )	-0.46	-0.45
	α - H	0.28	0.38
	α - C	-0.34	-0.21
	β - C	-0.06	-0.08
	γ - C	-0.26	-0.22
	<b>42Me</b>	0.00	0.40
	N-C(metil)	1.45	1.46
	N-C(α)	1.45	1.39
	C(α)-C(β)	1.48	1.41
C(β)-C(γ)	1.21	1.23	
	N5	-0.35	-0.51
	C4a	0.10	0.04
	C10a	0.45	0.47
	N1	-0.36	-0.39
	<b>FAD</b>	0.02	-0.39
	N5-C4a	1.29	1.34
	C4a-C10a	1.47	1.45
	C10a-N1	1.37	1.37

**Tablica 6 Distribucija naboja (NBO analiza, u |e|) i duljine relevantnih veza (u Å).** Vrijednosti se odnose na prvi korak hidridne apstrkacije reakcije ireverzibilne inhibicije s kandidatom 42Me i kontrolne molekule selegilina na (CPCM)/M06-2X/6-31G(d) teorijskoj razini. Akronimi SP i TS odgovaraju stacionarnim točkama, odnosno prijelaznim stanjima.

Sustav	Atom/ molekula/ve za	SP1	TS1
	N <sub>amino</sub>	-0.54	-0.55
	C(N <sub>amino</sub> )	-0.49	-0.48
	α - H	0.27	0.39
	α - C	-0.34	-0.27
	β - C	-0.05	0.05
	γ - C	-0.24	-0.28
	<b>SEL</b>	0.06	0.33
	N-C(metil)	1.46	1.47
	N-C(α)	1.47	1.45
	C(α)-C(β)	1.47	1.38
	C(β)-C(γ)	1.21	1.24
	N5	-0.36	-0.55
	C4a	0.11	0.09
	C10a	0.46	0.49
	N1	-0.36	-0.38
	<b>FAD</b>	0.01	-0.28
	N5-C4a	1.29	1.34
	C4a-C10a	1.43	1.47
	C10a-N1	1.37	1.36

**Tablica 7 Distribucija naboja (NBO analiza, u |e|) i duljine relevantnih veza (u Å) kandidata 42Me i kontrolne molekule selegilina na (CPCM)/M06-2X/6-31G(d) teorijskoj razini. Akronimi SP i TS odgovaraju stacionarnim točkama, odnosno prijelaznim stanjima.**

Sustav	Atom/veza	SP4 (42Me)	SP4 (SEL)
	N <sub>amino</sub>	-0.39	-0.39
	C(N <sub>amino</sub> )	-0.47	-0.47
	α - C	0.16	0.16
	β - C	-0.45	-0.45
	γ - C	0.16	0.16
	N-C(metil)	1.45	1.45
	N-C(α)	1.33	1.33
	C(α)-C(β)	1.39	1.39
	C(β)-C(γ)	1.39	1.39
	N5	-0.35	-0.35
	C4a	-0.13	-0.13
	C10a	0.45	0.45
	N1	-0.44	-0.44
	N5-C4a	1.42	1.42
	C4a-C10a	1.40	1.40
C10a-N1	1.40	1.40	

## 5. Diskusija

### 5.1. Spoj **42Me** pokazuje bolji termodinamički profil od selegilina i razagilina

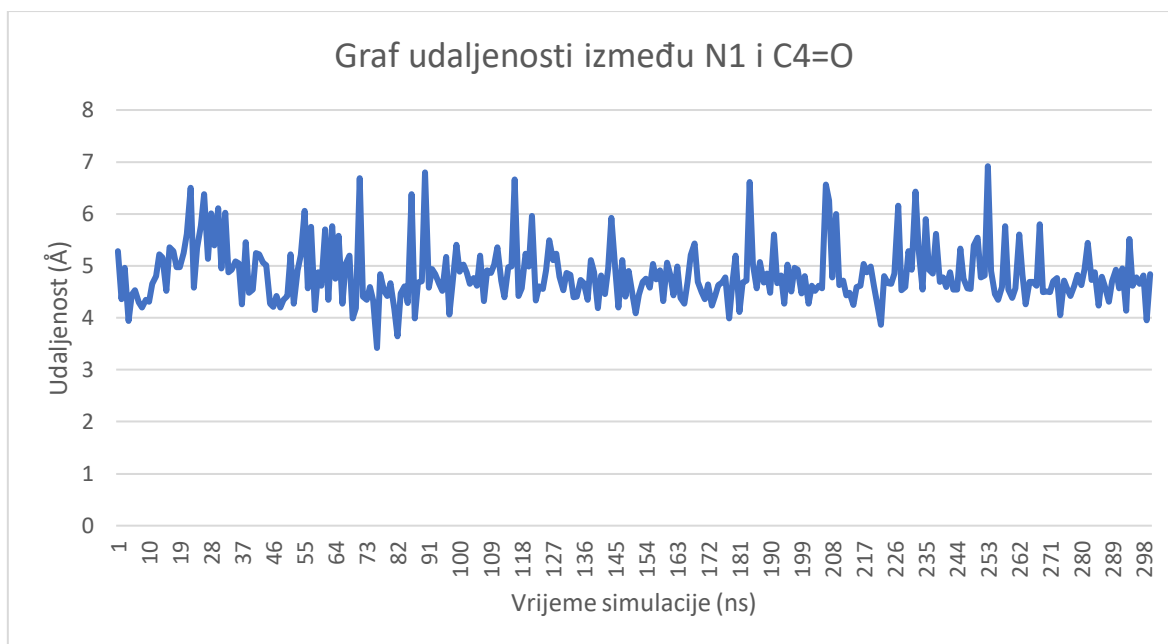
Strukturnim modifikacijama dobiveno je 50 kandidata spojeva, od kojih je 7 usidreno u 'aromatski kavez' MAO-B aktivnog mjesta. Referentni lijekovi selegilin i razagilin postigli su afinitet vezanja od  $-6.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ , odnosno  $-5.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Dizajn novih kandidata rezultirao je kandidatima s afinitetima vezanja većim od oba referentna lijeka. To se odnosi na ligande **42H**, **45H**, **258H**, **71H**, **163H** i **167H**, koji nadmašuju afinitete oba referentna spojeva i čiji se afiniteti kreću u rasponu od  $-6.6 \text{ kcal mol}^{-1}$  (**167H**) pa sve do  $-7.8 \text{ kcal mol}^{-1}$  (**71H**), što potvrđuje i ispravnost primijenjene strategije u razvoju novih MAO-B inhibitora.

Kandidat spoj **42Me** tijekom svih 300 ns MD simulacije ostaje u reaktivnoj konformaciji unutar 'aromatskog kaveza' MAO-B aktivnog mjesta što ide u prilog povoljnom vezanju na aktivno mjesto enzima. Prosječna udaljenost između C( $\gamma$ ) atoma **42Me** i N<sub>5</sub> FAD-a iznosi približno 5 Å kao i kod kontrolne molekule selegilina, što potvrđuje pogodnu orijentaciju liganda u aktivnom mjestu.

MM-PBSA analizom dobivena Gibbsova slobodna energija kandidata **42Me** iznosi  $-21.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Izračunata energija kandidata **42Me** negativnija je iznosom od energija referentnih lijekova koje iznose  $-20.0 \text{ kcal mol}^{-1}$  za selegilin te  $-18.9 \text{ kcal mol}^{-1}$  za razagilin (Tablica 4). Dobivene vrijednosti selegilina i razagilina u vrlo dobrom su relativnom slaganju s eksperimentalnim podacima za ta dva spoja. Naime, eksperimentalno određene  $K_i$  i  $IC_{50}$  vrijednosti za selegilin iznose 9 nM i 1.3 nM, dok su za rasagilin 700 nM i 82.5 nM<sup>56-59</sup>, iz čega proizlazi relativna razlika u njihovim afinitetima od  $2.5 \text{ kcal mol}^{-1}$  (prema  $K_i$  vrijednostima), odnosno  $2.6 \text{ kcal mol}^{-1}$  (prema  $IC_{50}$  vrijednostima) u korist selegilina. Time zaključujemo da se ovdje izračunata vrijednost od  $\Delta\Delta G_{\text{bind}} = 2.0 \text{ kcal mol}^{-1}$  nalazi u vrlo dobrom slaganju s eksperimentalnim mjerenjima, što potvrđuje vrijednost MM-PBSA metode u izračunu relativnih afiniteta ispitivanih liganada.

Analizom dekompozicije Gibbsove slobodne energije vezanja po pojedinim aminokiselinskim ostacima omogućuje se uvid u termodinamički doprinos energiji vezanja svake aminokiseline u proteinu te predstavlja snažan alat u razumijevanju protein-ligand interakcija te ciljanog razvoja novih liganada. Kofaktor FAD najviše pridonosi energiji vezanja kandidata **42Me** s  $-4.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ , potom Gln204 s  $-2.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ , Tyr433 s  $-2.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ , te naposljetku Tyr396 s  $-2.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Najznačajnija interakcija 42Me je s FAD kofaktorom, što je u izvrsnom slaganju s predloženim mehanizmom inhibicije reakcije, kao i u slaganju s analizom dekompozicije Gibbsove slobodne energije vezanja po pojedinim aminokiselinskim ostacima referentnih lijekova. Glutamin može sudjelovati svojom amino skupinom na bočnom lancu u povoljnoj X-H $\cdots$ N (X = N, O) interakciji s indolnim prstenom liganda. Hidrofobne  $\pi$ - $\pi$  slagajuće interakcije, ali i N-H $\cdots$ N interakcije može tvoriti indolni prsten s fenilnim prstenom, odnosno hidroksilnom (-OH) skupinom tirozina. Sve navedene interakcije hidrofobne su prirode, što je potvrda uspješnog pristupa dizajna molekule.

Razagilin formira vodikovu vezu preko sekundarnog amina propargilaminske jedinice i karbonilnog C4=O kisika FAD kofaktora. Rezultat je nepovoljna orijentacija bliže kofaktoru što posljedično negativno utječe na reaktivnost razagilina. Ovakva pozicija onemogućuje postizanje kuta metilenskog vodika približne vrijednosti  $0^\circ$ , kuta pogodnog za hidridnu apstrakciju<sup>53</sup>. Međutim, **42Me** ostvaruje snažnu vodikovu vezu preko N<sub>1</sub> dušika indolnog prstena te karbonilnog C4=O kisika FAD kofaktora (Slika 1). Iako je ovakva interakcija kod razagilina nepovoljna jer uključuje reaktivnu propargilaminsku skupinu, izgledno je da djeluje pozitivno na reaktivnost kandidata **42Me** s obzirom na izračunate vrijednosti Gibbsove slobodne energije vezanja (Tablica 4). Također, vrijedi istaknuti da se udaljenosti vodikove veze razlikuju (oko 3.4 Å za razagilin, te 2.9 Å za **42Me**) između razagilina i **42Me**, te ih pozicionira na različite udaljenosti od kofaktora.

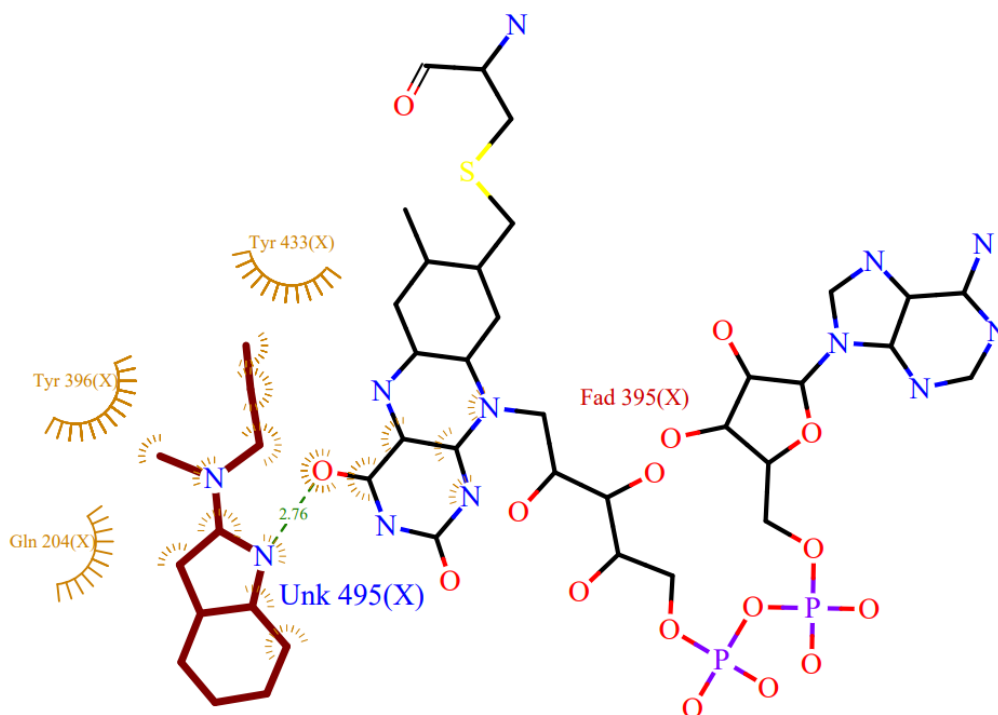


**Slika 21 Grafički prikaz udaljenosti između  $N_1$  atoma kandidata **42Me** te  $C4=O$  kisika FAD kofaktora.** Vrijednosti dobivene iz MD simulacija.

S druge strane, isti dušik liganda **42Me** u mogućnosti je sudjelovati i u hidrofobnoj,  $N-H\cdots n$  interakciji s heterocikličkim, aromatskim prstenom FAD kofaktora što bi moglo dovesti do smanjenja frekvencije formacije vodikove veze.  $C-H\cdots n$  interakcije od velikog su značaja za vezanje neurotransmitera za njihove receptore, te predstavljaju jednu od najpoželjnijih interakcija kod dizajna lijekova za neurodegenerativna ili psihijatrijska oboljenja <sup>61</sup>.

Dakle, kandidat spoj **42Me** pokazuje značajno bolji termodinamički profil od referentnih molekula, a interakcija s identičnim aminokiselinskim ostacima aktivnog mjesta upućuje i na identičan mehanizam djelovanja istih.





**Slika 22 2D reprezentacija interakcija spoja 42Me i FAD kofaktora. 2D frag generiran je koristeći PLIP program.** Interakcije su prikazane na posljednjoj strukturi dobivenoj dinamičkom evolucijom sustava u vremenu. Struktura 42Me predstavljena je smeđom bojom te je označena skraćenicom Unk495(X). Vodikove veze označene su zelenom isprekidanom crtom, dok su atomi i aminokiseline koje sudjeluju u hidrofobnim interakcijama označene žutom bojom .

## 5.2. Spoj 42Me pokazuje bolji kinetički profil reakcije inhibicije od selegilina i razagilina te slijedi mehanizam hidridne apstrakcije

Iako MAO-B zadnjih 60-ak godina predstavlja najčešću metu dizajna lijekova koji ciljaju neurodegenerativne bolesti, i dalje postoji određena doza skepticizma znanstvene zajednice oko pitanja točnog mehanizma djelovanja<sup>53</sup>. Mehanizam hidridne apstrakcije predložen od strane Vianella i sur. najizgledniji je mehanizam djelovanja MAO-B enzima<sup>12,62-64</sup>. Mehanizam hidridne apstrakcije predočen je na Slici 5 te se sastoji od 3 koraka i tri pripadajućih prijelaznih stanja. Prvi korak uključuje prijenos hidrida sa C( $\gamma$ ) inhibitora na N<sub>5</sub> atom FAD kofaktora što rezultira formacijom adukta između C4a atoma FAD kofaktora i C( $\gamma$ ) inhibitora s prepoznatljivim alenskim motivom. U drugom koraku dolazi do prijenosa N<sub>5</sub> vodikovog

atoma na C( $\beta$ ) inhibitora što dovodi do spontanog nastajanja sterički napetog tročlanog prstena između N<sub>5</sub> i C4a atoma kofaktora te C( $\gamma$ ) inhibitora. Posljednji korak karakterizira pucanje veze između C4a atoma kofaktora te C( $\gamma$ ) inhibitora dajući konačni kovalentni adukt. Identična struktura adukta može se pronaći u kristalografskim strukturama MAO-B enzima inhibiranog propargilaminskim inhibitorima što dodatno ide u prilog izglednosti predloženog mehanizma.

Mehanizam inhibicije MAO-B enzima spojem **42Me** započinje hidridnom apstrakcijom. Naime, udaljenost atoma N<sub>5</sub> kofaktora i C( $\alpha$ ) inhibitora u točki SP1 iznosi 3.07 Å te predstavlja optimalnu udaljenost za prijenos hidrida<sup>53 63</sup>. Tijekom prvog prijelaznog stanja, prelazeći  $\alpha$ -H atom smješten je između C( $\alpha$ ) atoma **42Me** i N<sub>5</sub> atoma FAD kofaktora s udaljenostima od 1.433 Å, odnosno 1.234 Å (C( $\alpha$ ) -  $\alpha$ -H - N<sub>5</sub>). Navedene udaljenosti dijele visoko podudaranje s udaljenostima zabilježenim za kontrolnu molekulu selegilina (1.471 Å i 1.256 Å). Prijelazno stanje okarakterizirano je jednom imaginarnom frekvencijom iznosa  $\nu_{imag} = 1265i \text{ cm}^{-1}$ , te odgovara opisanom prijelazu  $\alpha$ -H atoma što je također u odličnom podudaranju sa selegilinom čija imaginarna frekvencija iznosi  $\nu_{imag} = 1364i \text{ cm}^{-1}$ . Prema Tablici 3, ukupni naboj kandidata **42Me** u točki SP1 iznosi 0.00 |e|, a kofaktora 0.02 |e|. Apstrakcijom hidrida u prvom koraku reakcije dolazi do povećanja pozitivnog naboja liganda na 0.40 |e|, te recipročnog smanjenja naboja kofaktora na negativnu vrijednost od -0.39 |e| što se izvrsno slaže s prethodnim izračunima, te s nabojima dobivenim na kontrolnim molekulama selegilina i razagilina (Tablica 6). U slučaju selegilina vrijednosti iznose 0.06 |e| (SP1) i 0.33 |e| (TS1), dok za FAD 0.01 |e| (SP1) i -0.28 |e| (TS1). Iz navedenih vrijednosti uočljiv je prijelaz otprilike jedne trećine elektrona s kandidata **42Me** na FAD kofaktor što potvrđuje apstrakciju hidrida u prvom koraku reakcije ireverzibilne inhibicije MAO-B enzima. Osim u ukupnim nabojima molekula inhibitora i kofaktora, prijelaz hidrida evidentan je i promatrajući mijenjanje naboja na C( $\alpha$ ) atomu inhibitora, te N<sub>5</sub> atomu kofaktora. Naime, naboj C( $\alpha$ ) atoma poprima

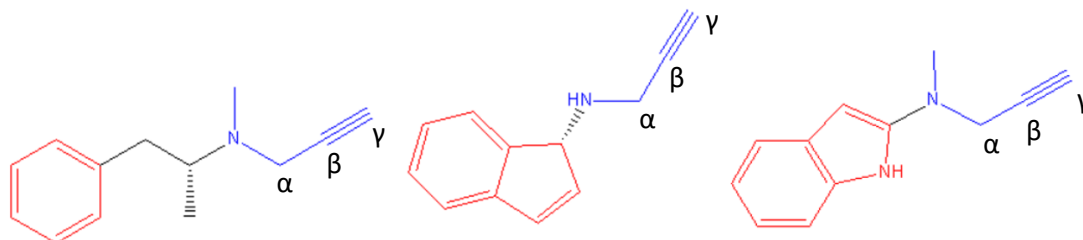
pozitivnije vrijednosti u točki TS1 naspram točke SP1, dok je ostatak naboja brzo kompenziran susjednom elektron-donirajućom amino skupinom što je vidljivo iz smanjenja naboja  $N(C_{\text{met}})$ , te smanjenom  $C(\alpha)$ - $N(C_{\text{met}})$  udaljenosti (Tablica 5). Isti oblik kompenzacije prisutan je i kod referentnog lijeka selegilina (Tablica 6) <sup>53</sup>. Daljnjim napredovanjem reakcije dolazi do formacije nove  $C(\gamma)$ - $C4a$  veze i ponovne raspodjele elektronske gustoće dovodeći do elektroneutralnosti fragmenta inhibitora i kofaktora, što je također u skladu s NBO izračunima.

Energetska barijera za korak hidridne apstrakcije spoja **42Me** iznosi 26.0 kcal mol<sup>-1</sup> (Slika 19) te je manja od referentnih lijekova selegilina (28.5 kcal mol<sup>-1</sup>) i razagilina (29.8 kcal mol<sup>-1</sup>) što sugerira efikasnije reakcije inhibicije MAO-B enzima za 69, odnosno 622 puta u odnosu na postojeće referentne lijekove. Vrijedno je spomenuti da je izračunata razlika energije aktivacije (1.3 kcal mol<sup>-1</sup>) prvog koraka reakcije hidridne apstrakcije kontrolnih molekula u izvrsnom slaganju s eksperimentalno dobivenim vrijednostima (1.7 kcal mol<sup>-1</sup>) pridajući dodatni kredibilitet dobivenim rezultatima <sup>65 66</sup>. Reakcija inhibicije slijedi sve korake kontrolnih molekula, te također završava izrazito egzorgeno ( $\Delta G_r = -32.7$  kcal mol<sup>-1</sup>) dajući konačni kovalentni adukt s prepoznatljivim konjugiranim cijaninskim lancem te nukleofilnim  $C(\beta)$  atomom (Tablica 7) <sup>53</sup>.

Provedena analiza ukazuje na značajno bolji kinetički profil kandidata spoja **42Me** naspram referentnih molekula te potvrdu prvog koraka hidridne apstrakcije. Daljnje modifikacije kandidata u vidu supstitucije heteroatoma indolnog prstena i/ili dodavanja dodatnih elektrofilnih farmakofora mogle bi rezultirati poboljšanim termodinamičkim i kinetičkim profilom. Također, podrobnija istraživanja bi se trebala provesti i specifično za drugi korak reakcije inhibicije kako bi se utvrdile koje točno komponente uzrokuju neočekivanu energetska barijeru.

## 5.2. Racionalizacija dizajna molekule 42Me

Kandidat spoj **42Me** dizajniran je po uzoru na već postojeće komercijalno dostupne lijekove, selegilin i razagilin. Strukture selegilina i razagilina mogu se razdijeliti na dva osnovna dijela: aromatski dio i propargilaminsku jezgru (Slika 23).



**Slika 23** Strukture spoja **42Me** te referentnih lijekova, **selegilina** i **razagilina**. **S lijeva na desno: selegilin, razagilin, 42Me**. Crvenom bojom označeni su aromatski dijelovi molekula, dok je propargilaminska jezdrina obojana plavom bojom s označenim ugljicima.

Aromatski prstenovi selegilina i razagilina sudjeluju u stabilizirajućim n-n ili C-H...n interakcijama s aromatskim aminokiselinama u aktivnom mjestu poput tirozina i fenilalanina, ali i hidrofobnim aminokiselinama poput izoleucina. Hidrofobni, aromatski dijelovi zaslužni za pogodnu orijentaciju selegilina i razagilina u kojoj su spremni za hidridnu apstrakciju. Amino skupina razagilina formira vodikovu vezu s karbonilnom kisikom FAD kofaktora pozicionirajući razagilin bliže FAD-u. Ovakva pozicija onemogućuje postizanje kuta metilenskog vodika približne vrijednosti  $0^\circ$ , kuta pogodnog za hidridnu apstrakciju<sup>53</sup>. Dakle, interakcije od interesa na aktivnom mjestu koje bi novo-dizajnirani kandidati spojevi trebali ostvarivati hidrofobnog su karaktera.

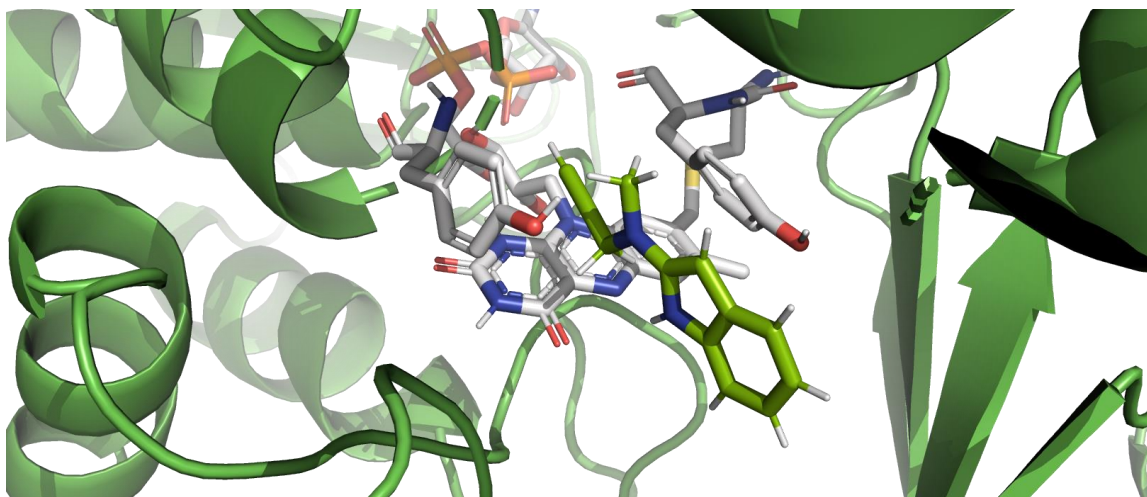
Propargilaminska jezgra svojom trostrukom vezom također pridonosi stabilizaciji kompleksa unutar aktivnog mjesta, međutim njezina je osnovna funkcija doniranje acetilenskog vodika ( $\alpha$ -H) na N<sub>5</sub> FAD kofaktora, čime se inicira inhibicija enzima. Potpuni mehanizam djelovanja složen je i kompleksan, uključuje tri prijelazna stanja, a korak koji odlučuje brzinu reakcije prvi je korak hidridne apstrakcije (Slika 18).

Kandidat spoj **42Me** sastoji se od heterocikličnog aromatskog prstena indola čiji delokalizirani elektroni tvore stabilizirajuće i orijentirajuće, hidrofobne n-n slagajuće interakcije te propargilaminske jezgre zaslužene za mehanizam hidridne apstrakcije. Struktura *N*-metil-*N*-propargil-2-indola sadrži i tercijarni amin za koji je ustanovljeno da pogoduje vezanju jer može djelovati samo kao akceptor vodikove veze te stabilizira novonastali negativni naboj nastao apstrakcijom hidrida što povećava šansu za nastankom reaktivne konformacije <sup>53</sup>.

Kandidat spoj **42Me** veličinom i volumenom više nalikuje na referentni lijek razagilin, dok mu prisustvo tercijarnog amina omogućava izgledno bolje vezanje poput selegilina, s obzirom da su prijašnja istraživanja ukazala na to da vodikova veza između sekundarnog amina propargilaminske jedinice i karbonilnog C4=O kisika djeluje nepovoljno na vezanje za aktivno mjesto <sup>53</sup>. Indikativno, struktura kandidata **42Me** može se okarakterizirati kao hibrid struktura referentnih lijekova.

### **5.3. Pristajanje kandidata spojeva unutar MAO-B veznog mjesta energetski je povoljno i stabilno**

Strukturnim modifikacijama dobiveno je 50 kandidata spojeva, od kojih je 7 usidreno u 'aromatski kavez' MAO-B aktivnog mjesta. Kontrolne molekule selegilin i razagilin postigli su afinitet od  $-6.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ , odnosno  $-6.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Pri tome, vrijedi uočiti da smo uspjeli dizajnirati nekoliko liganada s afinitetima vezanja većim od oba referentna lijeka. To se odnosi na ligande **42H**, **45H**, **258H**, **71H**, **163H** i **167H**, koji nadmašuju afinitete obiju referentnih spojeva i čiji afiniteti se kreću u rasponu od  $-6.6 \text{ kcal mol}^{-1}$  (**167H**) pa sve do  $-7.8 \text{ kcal mol}^{-1}$  (**71H**), što potvrđuje vrijednost primijenjene strategije u razvoju novih MAO-B inhibitora.



**Slika 24 Usidren spoj 42Me u MAO-B aktivnom mjestu. Vizualizacija provedena u programu PyMOL.**

#### **5.4. Temeljne aromatske strukture usidrile su se u MAO-B aktivno mjesto**

Provedenom analizom molekuskog sidrenja temeljnih heteroaromatskih struktura, izabrano je 5 prstena za daljnje strukturne modifikacije. Točnije, prsten difenil-etera, indola, naftalena, kumarina te 2H-kromen-2-ina usidrili su se unutar 'aromatskog kaveza' MAO-B aktivnog mjestu. Difenil-eter u 4. pozi zauzeo je odgovarajući položaj s afinitetom vezanja od  $-6.5 \text{ kcalmol}^{-1}$  te se afinitet vezanja naspram 1. poze razlikuje za  $0.2 \text{ kcalmol}^{-1}$  što spada u raspon od  $0.5 \text{ kcalmol}^{-1}$  za koji se može pretpostaviti da je rezultat statističke pogreške same metode. Indol se usidrio u aktivno mjesto u 3. pozi s afinitetom vezanja od  $-5.7 \text{ kcal mol}^{-1}$  koji se razlikuje od 1. poze zanemarivih  $0.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Naftalen se usidrio u 5. pozi s afinitetom od  $-6.2 \text{ kcal mol}^{-1}$  te se od 1. poze razlikuje za  $0.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Kumarin se usidrio pored kofaktora FAD u prvoj pozi te je postigao najviši afinitet vezanja od  $-6.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Odmah iza njega slijedi 2H-kromen-2-in koji je također u prvoj pozi postigao afinitet vezanja od  $-6.8 \text{ kcalmol}^{-1}$ . Svi spomenuti afiniteti vezanja vrijednostima odgovaraju očekivanim; energija otpuštena njihovim vezanjem u aktivno mjesto odgovara eksperimentalno utvrđenim vrijednostima <sup>1</sup>.

Ostali heteroaromatski prstenovi nisu postigli adekvatno vezanje u vidu same pozicije na MAO-B ili nisu postigli željene afinitete vezanja. Većina ispitanih struktura nespecifično se vezala na površinu proteina zbog svoje hidrofobne prirode. Kombinacija nespecifičnog vezanja i preniskih afiniteta vezanja rezultirala je eliminacijom ostalih heteroaromatskih struktura iz daljnjih analiza.

## 6. Zaključak

Slobodna Gibbsova energija vezanja novo-dizajniranog spoja *N*-metil-*N*-propargil-2-indola povoljnija od referentnih lijekova, selegilina i razagilina. Dobivena je provedbom klasičnih simulacija molekulske dinamike i MM-PBSA analize te iznosi  $-21.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ , dok selegilina  $-20.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ , odnosno razagilina  $-18.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Također, izračunata relativna razlika u energijama kontrola ( $\Delta\Delta G_{\text{bind}} = 2.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) u odličnom je poklapanju s eksperimentalnim vrijednostima ( $\Delta\Delta G_{\text{bind}} = 2.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) što daje kredibilitet dobivenim rezultatima. Kinetički profil spoja ispitan je prema kemijskoj reakciji inhibiciji enzima provedbom DFT mehanističkih izračuna na klasternom modelu MAO-B enzima. Na temelju duljina veza i populacijske analize elektronske gustoće, potvrđen je mehanizam hidridne apstrakcije prvog koraka inhibicijske reakcije. Energija aktivacije prvog koraka reakcije iznosi  $26.0 \text{ kcal mol}^{-1}$  te je niža u usporedbi s referentnim molekulama koje iznose  $28.5 \text{ kcal mol}^{-1}$  za selegilin, odnosno  $29.8 \text{ kcal mol}^{-1}$  za razagilin. Nadalje, razlika energije aktivacije od  $1.3 \text{ kcal mol}^{-1}$  za referentne lijekove u odličnom je slaganju s eksperimentalno dobivenim vrijednostima od  $1.7 \text{ kcal mol}^{-1}$  dodatno potvrđujući točnost dobivenih rezultata. Inovativni pristup dizajna mehanizmom-temeljenih inhibitora pokazao se uspješnim te bi idući korak predstavljao modifikacije kandidata **42Me**. Modifikacije bi uključivale supstituciju atoma indolnog prstena s heteroatomima s ciljem postizanja stabilizirajućih interakcija s reziduama 'aromatskog kaveza' MAO-B enzima.

U društvu u kojem neurodegenerativne bolesti zauzimaju sve više top pozicija na ljestvicama smrtnosti, lijekovi koji ciljaju njihove simptome predstavljaju izrazito bitan faktor u kvantiteti i kvaliteti života oboljelih. Dobiveni rezultati pomoći će u razvoju inhibitora povoljnijih farmakodinamičkih i farmakokinetičkih parametara.



## 7. Bibliografija

- 1 Ramsay RR, Albrecht A. Questions in the Chemical Enzymology of MAO. *Chemistry* 2021; **3**: 959–978.
- 2 Leferink N. Characterization and redesign of galactonolactone dehydrogenase, a flavoprotein producing vitamin C. 2009.
- 3 Manzoor S, Hoda N. A comprehensive review of monoamine oxidase inhibitors as Anti-Alzheimer's disease agents: A review. *Eur J Med Chem* 2020; **206**: 112787.
- 4 Ramsay RR. Molecular aspects of monoamine oxidase B. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2016; **69**: 81–89.
- 5 Human\_Monoamine\_Oxidase\_B. [https://collab.its.virginia.edu/access/content/group/f85bed6c-45d2-4b18-b868-6a2353586804/2/Ch32\\_Chen\\_K\\_Monoamine\\_Oxidase\\_B\\_\(Human\)-\\_-/Ch32\\_Chen\\_K\\_Monoamine\\_Oxidase\\_B\\_\(Human\)\\_Human\\_Monoamine\\_Oxidase\\_B.html](https://collab.its.virginia.edu/access/content/group/f85bed6c-45d2-4b18-b868-6a2353586804/2/Ch32_Chen_K_Monoamine_Oxidase_B_(Human)-_-/Ch32_Chen_K_Monoamine_Oxidase_B_(Human)_Human_Monoamine_Oxidase_B.html) (accessed 25 Apr2022).
- 6 Yeung AWK, Georgieva MG, Atanasov AG, Tzvetkov NT. Monoamine Oxidases (MAOs) as Privileged Molecular Targets in Neuroscience: Research Literature Analysis. *Front Mol Neurosci* 2019; **12**: 143.
- 7 Waller DG, Sampson AP. Neurotransmission and the peripheral autonomic nervous system. In: *Medical Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier, 2018, pp 73–90.
- 8 Bank RPD. RCSB PDB - 2C67: MAO inhibition by rasagiline analogues. <https://www.rcsb.org/structure/2c67> (accessed 11 Jul2022).
- 9 Hok L, Rimac H, Mavri J, Vianello R. COVID-19 infection and neurodegeneration: Computational evidence for interactions between the SARS-CoV-2 spike protein and monoamine oxidase enzymes. *Comput Struct Biotechnol J*, 2022, **20**: 1254-1263.
- 9 Chen K, Shih JC. Monoamine Oxidase A and B: Structure, Function, and Behavior. In: Goldstein DS, Eisenhofer G, McCarty R (eds). *Advances in Pharmacology*. Academic Press, 1997, pp 292–296.
- 10 Milczek EM, Binda C, Rovida S, Mattevi A, Edmondson DE. The 'gating' residues Ile199 and Tyr326 in human monoamine oxidase B function in substrate and inhibitor recognition. *FEBS J* 2011; **278**: 4860–4869.
- 11 Finberg JPM. Update on the pharmacology of selective inhibitors of MAO-A and MAO-B: Focus on modulation of CNS monoamine neurotransmitter release. *Pharmacology & Therapeutics* 2014; **143**: 133–152.
- 12 Vianello R, Repič M, Mavri J. How are Biogenic Amines Metabolized by Monoamine Oxidases? *Eur J Org Chem* 2012; **2012**: 7057–7065.
- 13 Vianello R, Mavri J. EVB simulation of the catalytic activity of monoamine oxidases: from chemical physics to neurodegeneration. *Theory and applications of the empirical valence bond approach: from physical chemistry to chemical biology* 2017; : 199–231.

- 14 Edmondson DE, Binda C, Wang J, Upadhyay AK, Mattevi A. Molecular and mechanistic properties of the membrane-bound mitochondrial monoamine oxidases. *Biochemistry* 2009; **48**: 4220–4230.
- 15 Tandarić T. Računalno istraživanje mehanizma ireverzibilne inhibicije enzima monoaminoksidaze B. 2021. <https://www.bib.irb.hr/1113549> (accessed 14 Mar2022).
- 16 ADI - Dementia statistics. <https://www.alzint.org/about/dementia-facts-figures/dementia-statistics/> (accessed 14 Dec2021).
- 17 Atiwannapat P, Arden PC, Stewart JW. Monoamine Oxidase Inhibitors for Various Psychiatric Disorders and Conditions. *Psychiatric Annals* 2014; **44**: 567–573.
- 18 Hori A. Pharmacotherapy for personality disorders. *Psychiatry Clin Neurosci* 1998; **52**: 13–19.
- 19 Frontiers | The Tuberculosis-Depression Syndemic and Evolution of Pharmaceutical Therapeutics: From Ancient Times to the Future | Psychiatry. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpsy.2021.617751/full> (accessed 28 Apr2022).
- 20 Ramachandrai CT, Subramanyam N, Bar KJ, Baker G, Yeragani VK. Antidepressants: From MAOIs to SSRIs and more. *Indian J Psychiatry* 2011; **53**: 180–182.
- 21 Jost WH. A critical appraisal of MAO-B inhibitors in the treatment of Parkinson's disease. *J Neural Transm* 2022. doi:10.1007/s00702-022-02465-w.
- 22 *Uvod u računalnu kemiju i dizajn lijekova*. (Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu = Manualia Universitatis studiorum Zagrabiensis). Medicinska naklada.: Zagreb., 2020.
- 23 Zardecki C, Dutta S, Goodsell DS, Voigt M, Burley SK. RCSB Protein Data Bank: A Resource for Chemical, Biochemical, and Structural Explorations of Large and Small Biomolecules. *J Chem Educ* 2016; **93**: 569–575.
- 24 Macalino SJY, Gosu V, Hong S, Choi S. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. *Arch Pharm Res* 2015; **38**: 1686–1701.
- 25 Forli S, Huey R, Pique ME, Sanner MF, Goodsell DS, Olson AJ. Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nat Protoc* 2016; **11**: 905–919.
- 26 Liu J, Wang R. Classification of current scoring functions. *J Chem Inf Model* 2015; **55**: 475–482.
- 27 Pinzi L, Rastelli G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *Int J Mol Sci* 2019; **20**: 4331.
- 28 Schlick T. *Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide: An Interdisciplinary Guide*. Springer: New York, NY, 2010 doi:10.1007/978-1-4419-6351-2.
- 29 GROMACS - Gromacs. <https://www.gromacs.org/> (accessed 14 Dec2021).
- 30 Genheden S, Ryde U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opin Drug Discov* 2015; **10**: 449–461.
- 31 Pielak L. From Quantum Theory to Computational Chemistry. A Brief Account of Developments. In: *Handbook of Computational Chemistry*. 2012, pp 1–12.

- 32 Handbook of Computational Chemistry | SpringerLink.  
<https://link.springer.com/referencework/10.1007/978-3-319-27282-5> (accessed 11 Nov2021).
- 33 Siegbahn PEM, Himo F. The quantum chemical cluster approach for modeling enzyme reactions. *WIREs Computational Molecular Science* 2011; **1**: 323–336.
- 34 Parr RG. Density Functional Theory. *Annual Review of Physical Chemistry* 1983; **34**: 631–656.
- 35 Zhao Y, Truhlar DG. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: Two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theoretical Chemistry Accounts* 2008; **120**: 215–241.
- 36 Ditchfield R, Hehre WJ, Pople JA. Self-Consistent Molecular-Orbital Methods. IX. An Extended Gaussian-Type Basis for Molecular-Orbital Studies of Organic Molecules. *J Chem Phys* 1971; **54**: 724–728.
- 37 Foresman JB, Frisch Ae. *Exploring Chemistry With Electronic Structure Methods: A Guide to Using Gaussian*. 2nd edition. Gaussian: Pittsburgh, Pa, 1996.
- 38 Optimizacija uvod metode koje ne koriste derivacije funkcije.  
<https://slidetodoc.com/optimizacija-uvod-metode-koje-ne-koriste-derivacije-funkcije/> (accessed 19 Apr2022).
- 39 Ochterski JW. Thermochemistry in Gaussian, Gaussian Inc., 1-19- June 2, 2000.
- 40 Søndergaard CR, Olsson MHM, Rostkowski M, Jensen JH. Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pKa Values. *J Chem Theory Comput* 2011; **7**: 2284–2295.
- 41 Kaushik M. A review of Innovative Chemical Drawing and Spectra Prediction Computer Software. *Mediterranean Journal of Chemistry* 2014; **3**: 759–766.
- 42 Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports* 2017; **7**: 42717.
- 43 UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis - PubMed.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15264254/> (accessed 14 Mar2022).
- 44 Eberhardt J, Santos-Martins D, Tillack AF, Forli S. AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *J Chem Inf Model* 2021; **61**: 3891–3898.
- 45 Zdrazil B, Guha R. The Rise and Fall of a Scaffold: A Trend Analysis of Scaffolds in the Medicinal Chemistry Literature. *J Med Chem* 2018; **61**: 4688–4703.
- 46 Rigsby RE, Parker AB. Using the PyMOL application to reinforce visual understanding of protein structure. *Biochem Mol Biol Educ* 2016; **44**: 433–437.
- 47 Alenaizan A, Burns LA, Sherrill CD. Python implementation of the restrained electrostatic potential charge model. *International Journal of Quantum Chemistry* 2020; **120**: e26035.

- 48 Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, Fraaije JGEM. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry* 1997; **18**: 1463–1472.
- 49 Abraham MJ, Gready JE. Optimization of parameters for molecular dynamics simulation using smooth particle-mesh Ewald in GROMACS 4.5. *Journal of Computational Chemistry* 2011; **32**: 2031–2040.
- 50 Hsin J, Arkhipov A, Yin Y, Stone JE, Schulten K. Using VMD: an introductory tutorial. *Curr Protoc Bioinformatics* 2008; **Chapter 5**: Unit 5.7.
- 51 Kumari R, Kumar R, Lynn A. g\_mmpbsa—A GROMACS Tool for High-Throughput MM-PBSA Calculations. *J Chem Inf Model* 2014; **54**: 1951–1962.
- 52 Avogadro - Free cross-platform molecular editor. Avogadro. <https://avogadro.cc/> (accessed 14 Mar2022).
- 53 Tandarić T, Vianello R. Computational Insight into the Mechanism of the Irreversible Inhibition of Monoamine Oxidase Enzymes by the Antiparkinsonian Propargylamine Inhibitors Rasagiline and Selegiline. *ACS Chem Neurosci* 2019; **10**: 3532–3542.
- 54 Angnes RA. mechaSVG. 2022. <https://github.com/ricalmang/mechaSVG> (accessed 14 Mar2022).
- 55 Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep* 2017; **7**: 42717.
- 56 Toprakçı M, Yelekçi K. Docking studies on monoamine oxidase-B inhibitors: Estimation of inhibition constants ( $K_i$ ) of a series of experimentally tested compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2005; **15**: 4438–4446.
- 57 Design, synthesis, biological evaluation and docking studies of sulfonyl isatin derivatives as monoamine oxidase and caspase-3 inhibitors - MedChemComm (RSC Publishing). <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/md/c6md00228e> (accessed 19 Jun2022).
- 58 Li Y, Qiang X, Luo L, Yang X, Xiao G, Zheng Y *et al.* Multitarget drug design strategy against Alzheimer's disease: Homoisoflavonoid Mannich base derivatives serve as acetylcholinesterase and monoamine oxidase B dual inhibitors with multifunctional properties. *Bioorg Med Chem* 2017; **25**: 714–726.
- 59 Park HR, Kim J, Kim T, Jo S, Yeom M, Moon B *et al.* Oxazolopyridines and thiazolopyridines as monoamine oxidase B inhibitors for the treatment of Parkinson's disease. *Bioorg Med Chem* 2013; **21**: 5480–5487.
- 60 Infield DT, Rasouli A, Galles GD, Chipot C, Tajkhorshid E, Ahern CA. Cation- $\pi$  interactions and their functional roles in membrane proteins. *J Mol Biol* 2021; **433**: 167035.
- 61 Dougherty DA. The Cation- $\pi$  Interaction. *Acc Chem Res* 2013; **46**: 885–893.
- 62 Maršavelski A, Vianello R. What a difference a methyl group makes: The selectivity of monoamine oxidase B towards histamine and *N*-methylhistamine. *Chem Eur J* 2017; **23**: 2915–2925.

- 63 Repič M, Vianello R, Purg M, Duarte F, Bauer P, Kamerlin SCL, Mavri J. Empirical valence bond simulations of the hydride transfer step in the monoamine oxidase B catalyzed metabolism of dopamine. *Proteins* 2014; **82**: 3347–3355.
- 64 Mavri J, Matute RA, Chu ZT, Vianello R. Path Integral Simulation of the H/D Kinetic Isotope Effect in Monoamine Oxidase B Catalyzed Decomposition of Dopamine. *J Phys Chem B* 2016; **120**: 3488–3492.
- 65 Ramsay RR, Albrecht A. Kinetics, mechanism, and inhibition of monoamine oxidase. *J Neural Transm (Vienna)* 2018; **125**: 1659–1683.
- 66 Hubálek F, Binda C, Li M, Herzig Y, Sterling J, Youdim MBH *et al.* Inactivation of purified human recombinant monoamine oxidases A and B by rasagiline and its analogues. *J Med Chem* 2004; **47**: 1760–1766.

## 8. Curriculum vitae

### Lucija Vrban

**Address:** Ulica Bana Josipa Jelačića, 53220, Otočac, Croatia

**Email address:** [lucija.vrban2@gmail.com](mailto:lucija.vrban2@gmail.com)

**LinkedIn:** [linkedin.com/in/lucija-vrban-a8466b205](https://www.linkedin.com/in/lucija-vrban-a8466b205)

**Date of birth:** 10/02/1998 **Nationality:** Croatian

## EDUCATION AND TRAINING

---

[ 08/2019 – 09/2022 ] Magistrica istraživanja i razvoja lijekova

*Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju*

**Address:** Ulica Radmile Matejčić 2, 51 000, Rijeka, Croatia

Thesis: Računalna studija mehanizmom temeljenih ireverzibilnih inhibitora monoamin oksidaze B

[ 09/2022 – 09/2022 ] Postersko izlaganje na “Computational Chemistry Day 2022”

*Institut Ruđer Bošković*

**Address:** Bijenička cesta 54, 10000, Zagreb

[ 08/2022 – 08/2022 ] Usmeno izlaganje na 2. ljetnoj školi kemije za studente

*Odjel za biotehnologiju*

**Address:** Ul. Radmile Matejčić 2, 51000, Rijeka, Croatia

[ 07/2022 – 07/2022 ] Postersko izlaganje na simpoziju “Joint ICGEB – ALS Society of Canada Symposium on Inflammation & Proteinopathy in ALS/FTD Spectrum Disorder”

*Odjel za biotehnologiju u suradnji sa ICGEB-om i ALS Society of Canada*

**Address:** Ul. Radmile Matejčić 2, 51000, Rijeka, Croatia

[ 09/06/2022 ] „Najnoviji napredak u HPC i AI tehnologijama na područjima računalne i medicinske kemije“

*Institut Ruđer Bošković, Hrvatski centar kompetencija za HPC*

**Address:** Bijenička cesta 54, 10000, Zagreb

[ 06/2022 ] "OSNOVE PROGRAMIRANJA (PYTHON)"

*Sveučilišni računski centar*

**Address:** Josipa Marohnića 5, 10000, Zagreb, Croatia

[ 04/2022 ] "KVANTNO-KEMIJSKI PROGRAMI NA KLASTERU ISABELLA: RJEŠAVANJE KEMIJSKIH PROBLEMA UPOTREBOM OPTIMALNIH METODA"

*Sveučilišni računski centar*

**Address:** Josipa Marohnića 5, 10000, Zagreb, Croatia

[ 03/2022 ] "RAČUNALNI KLASTER ISABELLA I HTC CLOUD"

*Sveučilišni računski centar*

**Address:** Josipa Marohnića 5 , 10000, Zagreb, Croatia

[ 2022 – 01/2022 ] Postersko izlaganje na XIV. susretu mladih kemijskih inženjera

*Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa*

**Address:** Marulićev trg 19, 10000, Zagreb, Croatia

[ 08/2021 – 08/2021 ] Usmeno izlaganje na 1. ljetnoj školi kemije za studente

*Institut Ruđer Bošković*

**Address:** Bijenička cesta 54, 10000, Zagreb, Croatia

[ 03/06/2021 – 10/06/2021 ] 2021 BioExcel Summer School on Biomolecular Simulations Attendance

*Centre of Excellence for Computational Biomolecular Research*

**Main subject / occupational skills covered:**

Teorijska predavanja i live izvedba vježbi i zadataka simulacija molekulske dinamike, biomolekulskog pristajanja, izračuna slobodne energije, metadinamike te kvantno-mehaničkih/ molekulske-mehaničkih (QM/MM) metoda.

[ 03/2021 ] Learn Python 3 course

*Codecademy*

**Main subject / occupational skills covered:**

Fundamentalni koncepti programskog jezika Python 3 uključujući kontrolu toka, korištenje popisa, varijabli tipa 'string', funkcija, petlji, modula, rječnika, klasa, rad s različitim tipovima datoteka.

[ 12/2020 ] Code Foundations Certificate

*Codecademy*

**Main subject / occupational skills covered:**

Upoznavanje s bazičnim konceptima programskih jezika poput varijabli, funkcija i kontrole toka. Pregled glavnih područja primjene programskih jezika poput informatičkih znanosti, web razvoja i podatkovne znanosti.

[ 12/2020 ] Learn How to Code Course

*Codecademy*

**Main subject / occupational skills covered:**

Upoznavanje s bazičnim konceptima programiranja poput operatora, varijabli, tipova datoteka, funkcija i kontrole toka, popisa i petlji.

[ 08/2016 – 07/2019 ] Prvostupnica biotehnologije i istraživanja lijekova

*Odjel za biotehnologiju, Sveučilište Rijeka*

**Address:** Ulica Radmile Matejčić 2, 51000, Rijeka, Croatia

[ 08/2012 – 05/2016 ] Gimnazijalka

*Srednja škola Otočac, Opća gimnazija*

**Address:** Ul. Ćirila i Metoda 2, 53220, Otočac, Croatia

## **WORK EXPERIENCE**

---

[ 08/2022 – danas ] E-znanstvenik

*Sveučilište u Zagrebu Sveučilišni računski centar (SRCE)*

**City:** Zagreb

**Main activities and responsibilities:**

Stjecanje znanja o platformama za napredno računanje. Sudjelovanje u pripremi upitnika namijenjenog korisnicima Isabelle za potrebe programa znanstvene zajednice. Priprema korisničkih aplikacija iz područja računalne kemije na računalnom klasteru Isabella.

[ 12/2021 – danas ] Članica organizacijskog odbora SiSK-a

*7. Simpozij studenata kemičara*

**City:** Zagreb **Country:** Croatia

**Main activities and responsibilities:**

Članica organizacijskog odbora kao predstavica Odjela za biotehnologiju; koordinacija, organiziranje, reklamiranje i izvedba simpozija.

Članica tima za planiranje; koordinacija rasporeda simpozija.

[ 05/2019 – 07/2019 ] Stručna praksa



### *Jadran galenski laboratorij*

**City:** Rijeka **Country:** Croatia

#### **Main activities and responsibilities:**

Poznavanje procesa tijekom razvoja, registracije, te proizvodnje i kontrole kvalitete proizvoda. Poznavanje više analitičkih tehnika. Poznavanje procesa za proizvodnju. Poznavanje procesa validacije proizvodnog postupka

[ 05/2019 – 07/2019 ] Stručna praksa

### *Zavod za javno zdravstvo*

**City:** Rijeka **Country:** Croatia

#### **Main activities and responsibilities:**

Poznavanje procesa higijensko-epidemiološkog nadzora u kontroli proizvodnje i prometa namirnica.

Poznavanje procesa kontrole kvalitete zraka, vode za piće, mora, hrane i predmeta opće uporabe.

## **VOLUNTEERING**

---

[ 12/2021 – Current ] Članica glazbene sekcije

Klub studenata elektrotehnike (KSET), Zagreb

[ 02/2022 – 07/2022 ] Account manager

Job Fair, Zagreb

Dnevna komunikacija s firmama koje sudjeluju na Job Fair-u. Akomodacija istih firmi tijekom trajanja Job Fair-a.

[ 09/2020 – 12/2020 ] Agent u call centru

INFO-CENTAR za COVID19, Rijeka

Rad u call centru; prenošenje informacija o mjestima i terminima testiranja, upućivanje na pregled kod odgovarajućeg zdravstvenog djelatnika, komunikacija s dijagnostičkim laboratorijima i dežurnim epidemiolozima.

[ 02/2021 – 09/2021 ] Volonter

Grupa za strukturu i funkciju molekula, Rijeka

Provedba metoda molekuskog pristajanja i metoda molekulske dinamike bioloških sustava.

## **PUBLICATIONS**

---

[ 2022 ] Vrban L. Superračunala Reaktor ideja 6(8): 5-8.

[ 2022 ] Vrban L. Računalni kemičari na prvoj liniji borbe protiv pandemije koronavirusa - kako to? Reaktor ideja 6(4): 13-17.

[ 2021 ] Vrban L. Dizajn MAO inhibitora računalnim metodama; koja je uloga računalne kemije u razvoju novih lijekova, Reaktor ideja 6(2): 8-12.

[ 2021 ] Vrban L. Razvoj i značaj računalne kemije Reaktor ideja 6(1): 12-14.

## HONOURS AND AWARDS

---

[ 14/06/2022 ] Najbolji poster na 2. Simpoziju studenata biotehnologije

**Awarding institution:** Udruga studenata biotehnologije Sveučilišta u Rijeci

Postersko izlaganje na temu "Computational Study of the Monoamine Oxidase B Mechanism-Based Irreversible Inhibitors".

## LANGUAGE SKILLS

---

**Mother tongue(s):** Croatian **Other language(s):**

English

LISTENING C2 READING C2 WRITING C2

SPOKEN PRODUCTION C2 SPOKEN INTERACTION C2