



Софийски университет „Свети Климент Охридски“

Факултет по химия и фармация

Катедра „Фармацевтична и приложна органична химия“

**Теоретично изследване на механизма на терапевтично
действие на абиогенния метален катион галий (III)**

Николета Мирославова Кирчева

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертация, представена за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ по професионално направление 4.2. Химически науки (Теоретична химия)

Научен ръководител: проф. дхн Тодор Минков Дудев

София 2020г.

Дисертацията съдържа 98 страници, в които са включени 36 фигури, 4 Таблици, 58 уравнения и 144 цитирани литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на Катедрен съвет на Катедра „Фармацевтична и приложна органична химия“ към Факултета по химия и фармация на СУ „Св. Климент Охридски“, проведен на 13.02.2020г.

Николета Кирчева е била редовен докторант към Катедра „Фармацевтична и приложна органична химия“, ФХФ, СУ от 15.02.2017г. до 13.02.2020г.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на ____ . ____ . 2020г. отчаса

в Заседателната зала на Факултета по химия и фармация на СУ „Св. Климент Охридски“.



Софийски университет „Свети Климент Охридски“

Факултет по химия и фармация

Катедра „Фармацевтична и приложна органична химия“

**Теоретично изследване на механизма на терапевтично
действие на абиогенния метален катион галий (III)**

Николета Мирославова Кирчева

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертация, представена за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ по професионално направление 4.2. Химически науки
(Теоретична химия)

Научен ръководител: проф. дхн Тодор Минков Дудев

Научно жури:

Проф. дхн Тодор Минков Дудев

Проф. дхн Борис Симеонов Гълъбов

Доц. д-р Ивайла Недялкова Панчева-Кадрева

Проф. д-р Николай Георгиев Василев

Доц. д-р Ивелина Мирчева Георгиева

СЪДЪРЖАНИЕ

Увод. Цел и задачи.	5
Резултати и обсъждане	
I. Галий (III) в антитуморната терапия	
1. Изследване конкуренцията Ga^{3+}/Fe^{3+}.	6
2. Свързване със субстратите на РНР.	19
II. Галий (III) в антибактериалната терапия	31
Изводи	47
Списък с публикации, включени в дисертацията	48
Забелязани цитати	48
Участия в конференции и обучителни школи	49
Участия в проекти	50

Увод

Галият е елемент от тринадесета (IIIА) група на периодичната система. Въпреки че той няма познати физиологични функции в човешкото тяло, определени негови характеристики му позволяват да се включва в клетъчните процеси и да взаимодейства с някои биологично активни протеини, особено с онези, които участват в метаболизма на желязото. Това е довело до разработването на няколко галиеви съединения като диагностични и терапевтични препарати в медицината, най-вече в областта на метаболитните костни заболявания, рака и заразните болести. Тематиката на настоящата дисертация изследва предполагаемите механизми на терапевтично действие на галия.

Цел и задачи

Основната цел на настоящия дисертационен труд е да анализира детайлно изказаните в литературата твърдения, а също така и тези, формулирани от нас, касаещи механизма на терапевтично действие на галия с помощта на квантово-химични изчисления. Крайъгълният камък, около който се обединява действието на галия в антитуморната и антибактериалната терапии, е „гладът“ за желязо на бързоделещите се неопластични и бактериални клетки. Споделяйки голям брой физико-химични характеристики с фери йона (Fe^{3+}), галият, имитирайки нативния кофактор, успява да заблуди целевите клетки, засягайки селективно техния метаболизъм. Съответните металопротеини, свръхекспресирани в засегнатите тъкани, се инактивират поради невъзможността на галия да участва в окислително-редукционни процеси, типични за нативния фери йон. Това повдига и въпросите за определяне на факторите, които управляват конкуренцията между двата йона в биологичните системи, както и за проследяване на биохимичните пътища, по които абиогенният галий проявява своя терапевтичен ефект. Следователно, за изпълнението на тези цели е необходимо да се изпълнят следните задачи:

- Подробно проучване на наличните в литературата данни за предполагаемите механизми на действие на галия.
- Калибриране и валидиране на избрания теоретичен метод и базис, с който да бъдат оценени физико-химичните параметри на всяка една група моделни реакции, в съответствие с известни в литературата експериментални данни.
- Моделиране на съответните реакции в зависимост от изследваната хипотеза.
- Обобщение и интерпретиране на получените резултати.

Резултати и обсъждане

За представянето на моделираните и оптимизирани структури в настоящия автореферат е използвана универсална цветова схема, представен на Фигура 1:



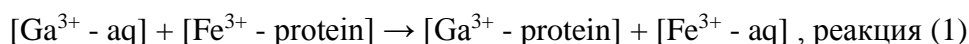
Фигура 1. Цветова схема за обозначение на атомите/йоните в настоящия автореферат.

I. Галий (III) в антитуморната терапия.

1. Изследване конкуренцията $\text{Ga}^{3+}/\text{Fe}^{3+}$.

1.1. Изчислителен протокол.

Основна моделна реакция в това изследване е :



където $[\text{M}^{3+} - \text{aq}]$ представлява несвързаната форма на метала в разтвора в близост до активния център, докато $[\text{M}^{3+} - \text{protein}]$ е металният йон, свързан с лигандите от активния център. Свободната енергия за йонна обмяна (ΔG^ε) в среда с диелектрична константа ε може да се представи като сума от електронните (ΔG^1) и солватационни ($\Delta \Delta G_{\text{solv}}^\varepsilon$) ефекти:

$$\Delta G^\varepsilon = \Delta G^1 + \Delta \Delta G_{\text{solv}}^\varepsilon, (1)$$

Където ΔG^1 е разликата в свободните енергии на продуктите и реагентите в газова фаза за реакция (1):

$$\Delta G^1 = \sum_i^{\text{products}} (\Delta E_{el} + \Delta E_{th}) - \sum_j^{\text{reactants}} (\Delta E_{el} + \Delta E_{th}) - T(\sum_i^{\text{products}} \Delta S - \sum_j^{\text{reactants}} \Delta S) + \Delta PV, (2)$$

а $\Delta \Delta G_{\text{solv}}^\varepsilon$ е разликата в солватационните свободни енергии на продуктите и реагентите:

$$\Delta \Delta G_{\text{solv}}^\varepsilon = \sum_i^{\text{products}} \Delta G_{\text{solv}}^\varepsilon - \sum_j^{\text{reactants}} \Delta G_{\text{solv}}^\varepsilon, (3)$$

Положителна стойност на ΔG^ε показва Fe^{3+} - селективен, докато отрицателна стойност – Ga^{3+} - селективен метален център. Трябва да се отбележи, че целта на изследването не е възпроизвеждане на точни експериментални данни, а по-скоро установяване на тенденции/зависимости при изследваните термодинамични величини, като се варират

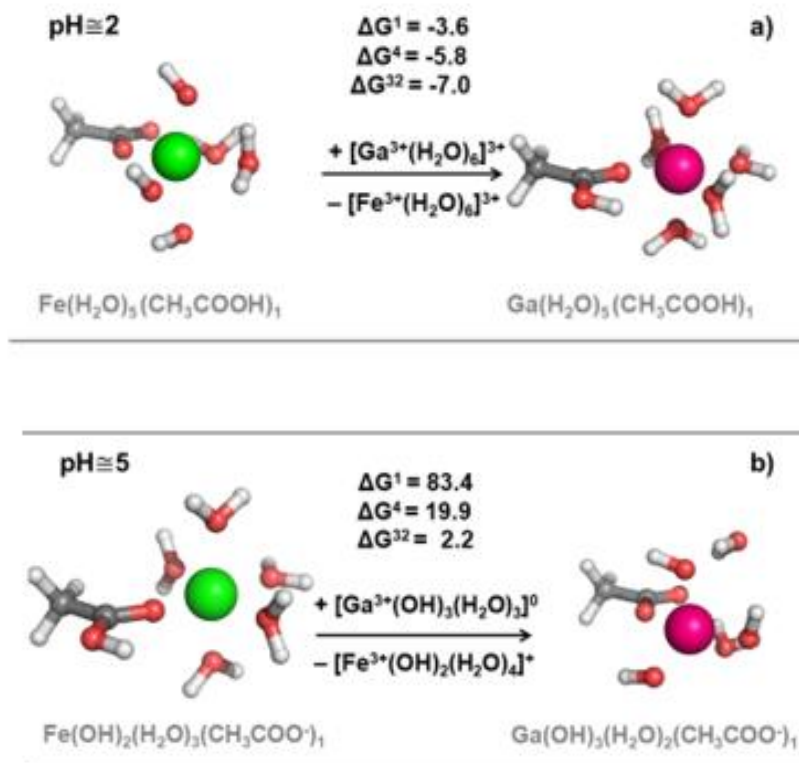
параметри като композиция на активния център, състояние на протониране, тип на лигандите и експозиция към разтворителя.

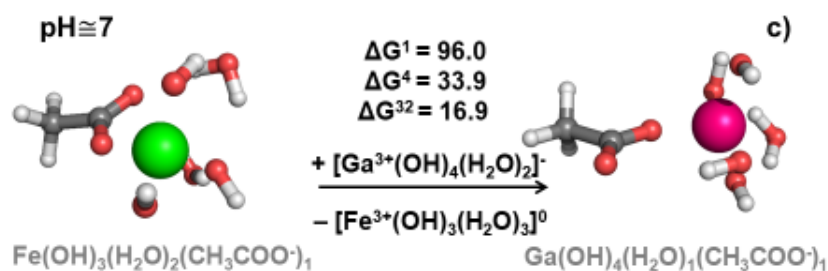
Изчисленията са направени с програмния пакет Gaussian09 на теоретично ниво B3LYP/6-31+G(3d,p). За всяка структура е проведен анализ на вибрационните честоти: имагинерни честоти не бяха установени за нито една от изследваните структури. Влиянието на диелектричната среда върху термодинамиката на изследваните процеси беше оценено с помощта на РСМ изчисления. Диелектрична константа $\epsilon=4$ (разтворител диетилов етер) имитира среда на активен център, разположен дълбоко в протеиновата обвивка, докато $\epsilon=32$ (разтворител метанол) наподобява център, експониран към разтворителя.

1.2. Моделни реакции

➤ Карбоксилатни лиганди

Хем-несъдържащи железни центрове в протеините, които са податливи на галиева атака, като тези в трансферин и РНР, съдържат няколко карбоксилатни лиганди, произлизащи от страничните вериги на аспартат или глутамат [48], [109], [110]. В съответствие с това бяха моделирани метални центрове с $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ лиганди и беше изследвана тяхната метална селективност (Фигури 11 и 12).



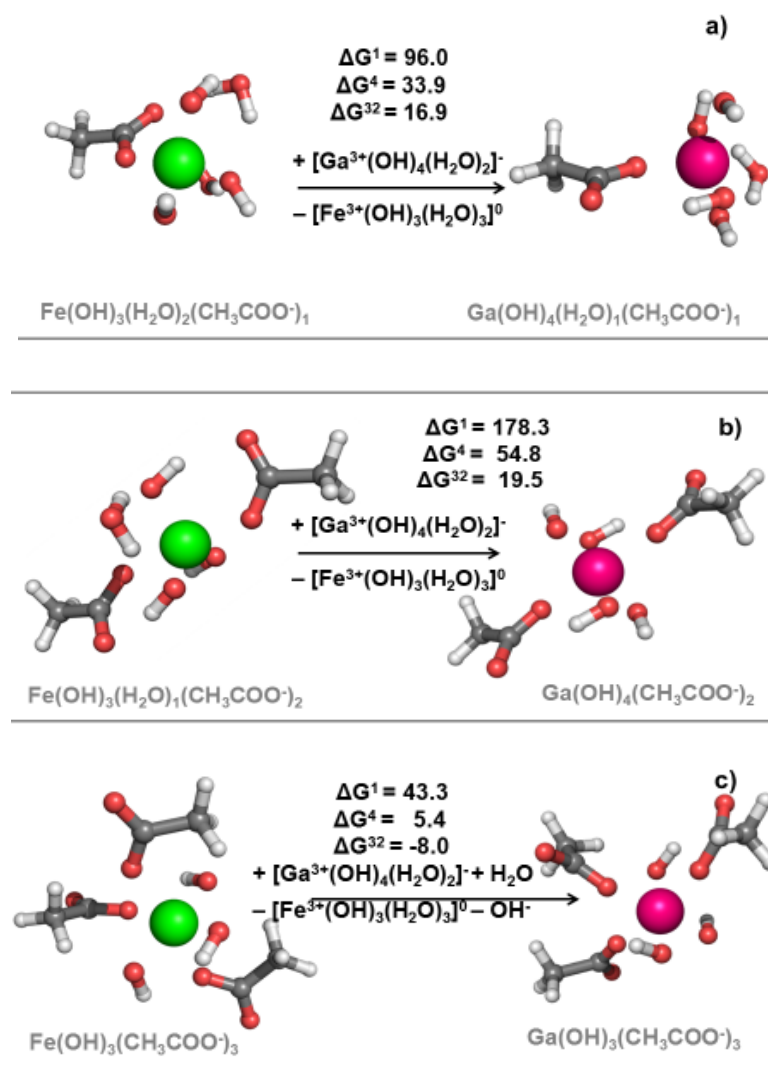


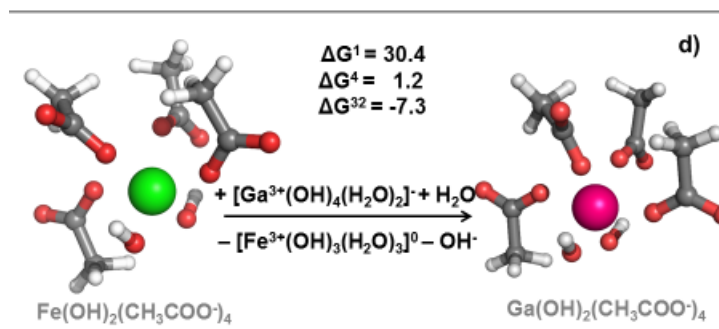
Фигура 2. B3LYP/6-31+G (3d, p) оптимизирани структури на Fe^{3+} и Ga^{3+} - йони, свързани с 5 води и един ацетатен лиганд а) при $\text{pH} \approx 2$, б) при $\text{pH} \approx 5$ и в) при $\text{pH} \approx 7$.

Процесът на заместване $\text{Ga}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ е доминиран от реакционната енталпия, тъй като ентропийният фактор ($T\Delta S$) допринася едва 1-2 kcal/mol към цялата свободна енергия. Конкуренцията $\text{Ga}^{3+}/\text{Fe}^{3+}$ силно зависи от pH на средата, тъй като то влияе върху степента на протониране на металосвързаните водни молекули. Тъй като най-ниските стойности на pK_a на Ga^{3+} - и Fe^{3+} - хидрати са съответно 3.09 и 2.68 напълно протонирана хидратационна сфера на двата метала може да съществува при $\text{pH} \leq 2$. При това киселинно pH карбоксилатните лиганди също са протонирани. Изчисленията показват, че при $\text{pH} \approx 2$ заместването на нативния с абиогенен метал в активния център, богат на водни молекули и един неутрален CH_3COOH , е термодинамично изгодно в рамките на изследваните диелектрични константи (отрицателни стойности на ΔG^e ; $\epsilon = 1-32$; Фигура 2а). Повишаването на pH на средата, обаче, променя тенденцията, като при $\text{pH} \geq 5$ заместването $\text{Ga}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ изглежда неправдоподобно, доказано с положителните стойности на ΔG на Фигура 2 б) и в). Колкото по-високо е pH, толкова по-селективен към Fe^{3+} е металният център (по-високи по абсолютна стойност свободни енергии за смяна на метала във Фигура 2 в) спрямо Фигура 2 б)). Това се дължи най-вече на по-голямата депротонираща сила на Ga^{3+} йон спрямо Fe^{3+} , което дава като резултат Ga^{3+} - съдържащи комплекси с повече отрицателно заредени HO^- лиганди в сравнение с комплексите на нативния йон: $\text{pK}_{a1} = 3.09$, $\text{pK}_{a2} = 3.55$, $\text{pK}_{a3} = 4.4$ за Ga^{3+} предполага образуването на $[\text{Ga}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^0$ при $\text{pH} \approx 5$, докато $\text{pK}_{a1} = 2.68$, $\text{pK}_{a2} = 3.73$ и $\text{pK}_{a3} = 6.33$ за Fe^{3+} водят до образуването на $[\text{Fe}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_4]^+$ комплекс при същото pH. Продължавайки тенденцията, $\text{pK}_{a4} = 6.05$ за галиевите хидрати дава $[\text{Ga}(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ при $\text{pH} \approx 7$, а по-високата $\text{pK}_{a4} = 9.35$ за желязните хидрати дава $[\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^0$ при физиологични условия. По този начин с повишаването на pH положителният заряд на Ga^{3+} се насища с отрицателно заредени HO^- лиганди в по-голяма степен, отколкото Fe^{3+} , като това води до

по-слабо изразеното предпочитание на Ga^{3+} към идващия отново отрицателен ацетатен йон CH_3COO^- (оцетната киселина с $\text{pK}_a = 4.8$ е йонизирана при $\text{pH} \geq 5$) в сравнение с фери-йона. Този ефект е по-силно изразен при $\text{pH} \approx 7$, отколкото при $\text{pH} \approx 5$, тъй като насищането със заряд при по-високо pH е по-силно изразено.

Дали и до каква степен повишаването на броя на карбоксилатните лиганди в свързващия център влияе върху термодинамиката на обмена $\text{Ga}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$? Отговор на този въпрос може да се даде с моделирането на комплекси с един, два, три и четири CH_3COO^- лиганда и проследяването на конкуренцията между двата йона в заобикалящата среда. Резултатите са обобщени на Фигура 3.





Фигура 3. V3LYP/6-31+G (3d, p) оптимизирани структури на Fe^{3+} и Ga^{3+} йони, свързани към а) един, б) два, в) три, г) четири карбоксилатни лиганда при $\text{pH} \approx 7$.

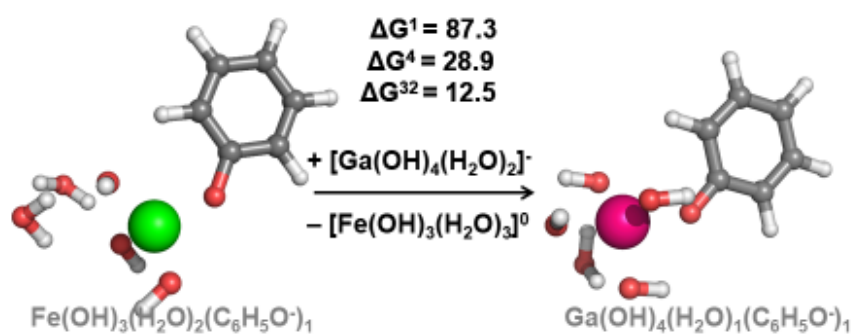
Представените данни демонстрират, че свързващи центрове с един или два ацетатни аминокиселинни остатъка са силно селективни по отношение на Fe^{3+} йоните и силно възпрепятстват $\text{Ga}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ заместване (силно положителни стойности за ΔG за метална обмяна във Фигура 3 а) и б)). Железни центрове с два карбоксилатни остатъка са по-добре защитени от атаката на абиогенния галий, отколкото онези, съдържащи само един карбоксилат (по-висока положителна стойност на свободната енергия на Фигура 3 б) в сравнение с Фигура 3 а)). И в двата случая по-силно отрицателният заряд на Ga^{3+} -комплекси в сравнение с тези на Fe^{3+} структури (-2 срещу -1 на Фигура 3 а), както и -3 срещу -2 на Фигура 3 б)) прави първият по-нестабилен, отколкото втория, което прави $\text{Ga}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ замяната неизгодна. Нарастването на броя на карбоксилатните лиганди над два, обаче, обръща тенденцията и прави металните центрове по-малко желязо/повече галий-селективни: докато $\Delta G^4/\Delta G^{32}$ за първите две реакции са силно положителни (34/17 и 55/20 kcal/mol, съответно; Фигура 3а) и б)), те съществено се понижават за последните две реакции, като достигат 5/-8 и 1/-7 kcal/mol, съответно (Фигура 3с) и 3д)). Трябва да се отбележи, че за разлика от първите две реакции във Фигура 3, цялостните заряди на метал-карбоксилатните комплекси, участващи в последните две реакции (Фигура 3 с) и 3 д)), са еднакви: -3. Това поставя Ga^{3+} на еднаква основа с конкурентния Fe^{3+} йон, като по този начин се повишава конкурентноспособността на първия. Отрицателните стойности, изчислени за ΔG^{32} , предполагат, че сравнително експонирани към разтворителя активни центрове, съдържащи няколко Asp/Glu аминокиселинни остатъци, са селективни за Ga^{3+} .

Показаните на Фигура 3 резултати (както и тези от следващите Фигури 4 и 5) демонстрират, че електронните ефекти са тези, които насочват обменната реакция в

полза на фери-йона (положителни свободни енергии в газова фаза), докато солватационните ефекти са тези, които наклонят везните в полза на абиогенния галий (по-слабо положителни или дори отрицателни $\Delta G^4/\Delta G^{32}$ стойности). Като цяло, експонирането в по-голяма степен на активния център към разтворителя повишава конкурентноспособността на Ga^{3+} , тъй като свободните енергии за $\text{Ga}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ замаяната намаляват с увеличаването стойността на диелектричната константа (Фигура 3). Тази тенденция за реакциите от 3 а) и 3 б) се дължи най-вече на по-благоприятната солватация на галий-ацетатните комплекси, отнесени спрямо съответните желязо-съдържащите комплекси, която се увеличава с увеличаване на ϵ : разликите в солватационните енергии между дианионния $[\text{Ga}(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})(\text{CH}_3\text{COO}^-)]^{2-}$ и моноанионния $[\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})_2(\text{CH}_3\text{COO}^-)]^-$ (Фигура 3 а) при $\epsilon=4$ е -96.9 kcal/mol , докато при $\epsilon=32$ е -123.4 kcal/mol . По същия начин, разликите при $\epsilon=4$ и 32 между трианионния $[\text{Ga}(\text{OH})_4(\text{CH}_3\text{COO}^-)_2]^{3-}$ и дианионния $[\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})(\text{CH}_3\text{COO}^-)_2]^{2-}$ (Фигура 3 б)) са съответно -158.3 и -203.1 kcal/mol . За реакции 3 с) и 3 д) благоприятната солватация на освобождавания се HO^- допринася за понижаване на свободните енергии на метален обмен в активни центрове с по-висока диелектрична константа.

➤ *Фенолатни лиганди*

Конкуренцията между изследваните метални йони в свързващи центрове, изградени от $\text{H}_2\text{O}/\text{HO}^-$ и фенолат, $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^-$ (модел за йонизиран Туг в страничната верига), е представена на Фигура 4.

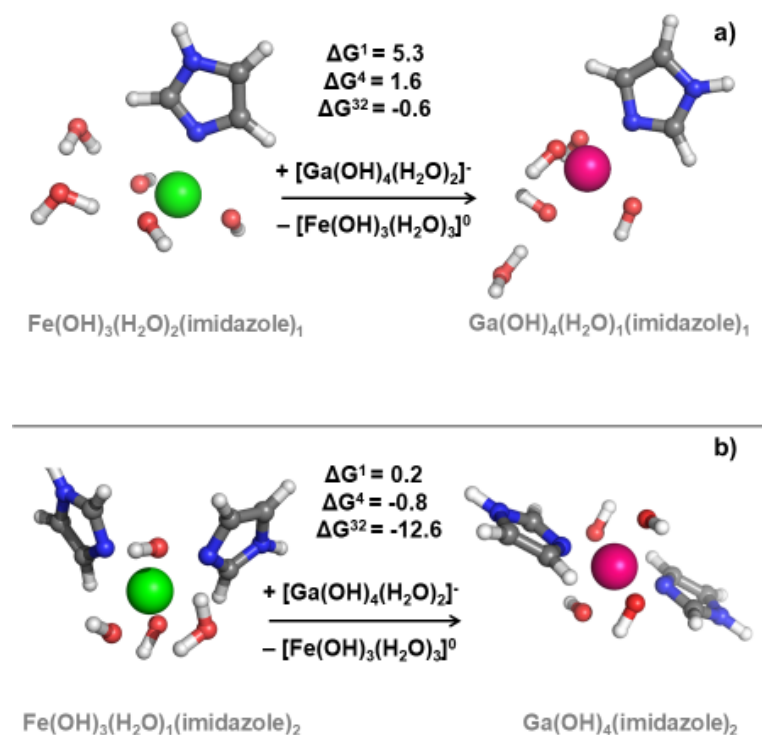


Фигура 4. V3LYP/6-31+G (3d, p) оптимизирани структури на Fe^{3+} и Ga^{3+} йони, свързани с един фенолат при $\text{pH} \approx 7$.

Несвързаният тирозин се характеризира с pK_a стойност от 10. При свързването с тривалентен метален катион, обаче, както е случаят на *holo-Tf*, pK_a стойността се

понижава и Туг се координира към метала в депротонираната си форма като фенолат. Данните от Фигура 4 показват, че моноядрени метални сайтове, съдържащи фенолатен лиганд, са селективни по отношение на Fe^{3+} йони (положителни ΔG , независимо от стойностите на ϵ) и добре защитени от Ga^{3+} атака. Интересно е, че числата във Фигура 4 ($\Delta G^1/ \Delta G^4/ \Delta G^{32} = 87/29/12$ kcal/mol; $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^-$ лиганд) са подобни на тези от Фигура 2с)/3 а) ($\Delta G^1/ \Delta G^4/ \Delta G^{32} = 96/34/17$ kcal/mol; CH_3COO^- лиганд), което предполага, че зарядът на лиганда има по-голямо влияние върху селективността на свързващия сайт, отколкото химическата му структура

➤ *Имидазолови лиганди*



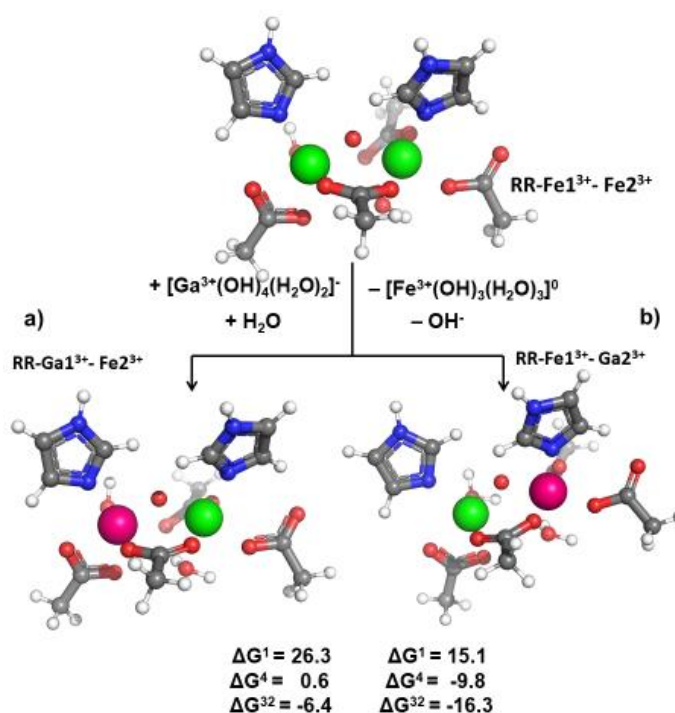
Фигура 5. V3LYP/6-31+G (3d, p) оптимизирани структури на Fe^{3+} и Ga^{3+} йони, свързани с а) един и б) два имидазола при $\text{pH} \approx 7$.

Селективността на свързващи центрове, изградени от неутрални имидазолови лиганди (модели за His-съдържащи странични вериги), е изследвана и представена на Фигура 5 а) и б). Имидазоловият пръстен от His-странична верига има $\text{pK}_a \sim 6$ и е обикновено незареден при физиологично рН. Неутралните имидазоли, за разлика от заредените лиганди, благоприятстват $\text{Ga}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ замяната, тъй като съответните ΔG стойности са отрицателни или по-слабо положителни в сравнение със съответните им

експериментално установените, като изчислената ΔG^4 (0.9 kcal/mol) за обмена $\text{Ga}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ е близка до експериментално определената ΔG за дълбоко заровения трансферинов свързващ сайт в границите от 2.4 до 2.9 kcal/mol.

1.4. Конкуренция $\text{Ga}^{3+}/\text{Fe}^{3+}$ за свързване с РНР.

Рентгеновата кристалография разкрива структурата на джелезния свързващ център (PDB 1MXR; 1.42Å резолюция): двата Fe^{3+} - йона са свързани чрез мост от глутамат и оксо (O^{2-}) йон, докато останалите позиции от металната координационна сфера са допълнени от His, Asp/Glu и водни молекули. Така посочената структура е използвана за моделиране на РНР димери-свързващ сайт (**RR-Fe1³⁺- Fe2³⁺**; Фигура 7), обект на най-вероятна атака от страна на абиогенния галий, за да се изследва метало-селективните свойства на активния център.



Фигура7. V3LYP/6-31+G (3d, p) оптимизирани структури на Fe^{3+} и Ga^{3+} йони, свързани с модел на рибонуклеотид редуктазен активен център при $\text{pH} \approx 7$.

Алтернативни структури с Ga^{3+} йони, заместващи или първия (**RR-Ga1³⁺- Fe2³⁺**), или втория (**RR-Fe1³⁺- Ga2³⁺**) фери-йон са оптимизирани и показани на Фигура 16 заедно със съответните стойности на ΔG^e . Замяната на нативния с абиогенния метален йон скъсява съответните дължини на връзките с лигандите (средно с около 0.1 Å), но запазва цялостната форма на металния комплекс видимо непроменена. Получените

термодинамични данни показват, че Ga^{3+} би могъл да замени Fe^{3+} в кой да е от двата РНР – центъра, ако в голяма степен са експонирани към разтворителя (отрицателни ΔG^{32} във Фигура 7). Въпреки това, двата свързващи центъра се различават по афинитета си към абиогенния галий: вторият свързващ сайт, съдържащ повече отрицателно заредени протеинови лиганди, отколкото първия, проявява по-силно предпочитание към Ga^{3+} и най-вероятно е по-правдоподобната цел за галиева атака: $\Delta G^4/\Delta G^{32}$ за реакцията на заместване $RR-Fe^{3+}-Fe^{2^{3+}} \rightarrow RR-Fe^{3+}-Ga^{2^{3+}}$ са -9.8/-16.3 kcal/mol и са с по-ниски стойности в сравнение с реакцията на заместване $RR-Fe^{3+}-Fe^{2^{3+}} \rightarrow RR-Ga^{3+}-Fe^{2^{3+}}$ на първа позиция, които са 0.6/-6.4 kcal/mol (Фигура 7 а) и б)). Вторият метален център, макар и заровен в протеиновата структура, би могъл предпочетено да свърже абиогенния галиев йон (отрицателна ΔG^4 ; Фигура 7 б)).

1.5. Дискусия

- *Фактори, определящи преимуществената селективност на протеините към Ga^{3+} спрямо Fe^{3+} .*

Проведените DFT изчисления хвърлят светлина върху механизма на $Fe^{3+}-Ga^{3+}$ конкуренция в протеинови активни центрове и разкриват ключовите фактори, ръководещи този процес. Както вътрешни (самият протеин), така и външни (рН на вътре/извън клетъчната среда) фактори могат да повлияят на металната селективност:

- *рН на средата.* Понижаването на рН на заобикалящите биологични течности благоприятства селективността към Ga^{3+} . При силно киселинни условия (рН \approx 2; Фигура 11 а) галиевият катион бива предпочетен, докато при повишено рН (\geq 5) се наблюдава селективност към Fe^{3+} (Фигура 2 б) и с)).
- *Заряд и брой на протеиновите лиганди.* Неутрални лиганди, като His, благоприятстват Ga^{3+} пред Fe^{3+} (Фигура 5 а) и б)). Един или два заредени остатъка (Asp^-/Glu^- или Tyr^-) изместват селективността по посока на ферийона (Фигури 3 а) и б); 4), докато включването на трети или четвърти киселинен остатък в първата координационна сфера измества селективността по посока на галиевия катион (Фигура 3с) и d)).
- *Експониране на активния център към разтворителя.* Метални центрове, експонирани към разтворителя, се характеризират с повишена Ga^{3+} спрямо

Fe^{3+} селективност, докато недостъпни за разтворителя свързващи джобове са по-добре защитени от галиева атака.

➤ **Предпоставки за галий-базирана терапия.**

Галиевите съединения са широко изучавани и използвани в медицинската практика като лекарства и като образни агенти. Настоящите DFT изчисления показват, че изходът от конкуренцията между нативното желязо и абиогенния галий е резултат от баланса между вътрешни и външни фактори, като варирането им може да наклони строго контролираното равновесие в едната или другата посока. Събраните данни спомагат да се определят вероятните цели за галий-базирана терапия: това са октаедрични, сравнително експонирани към разтворителя активни сайтове на метален фери-йон, изградени от повече аминокиселинни остатъци. По-дълбоко заровени в протеиновата обвивка метални центрове, съставени от отрицателно заредени лиганди, изглеждат добре защитени от галиева намеса.

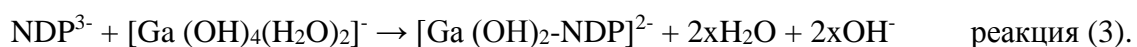
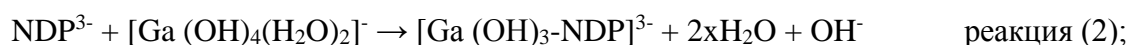
Проведените DFT изчисления потвърждават експерименталните данни, че Ga^{3+} не може да измести Fe^{3+} йона в центъра на серумния трансферин, тъй като свободните енергии на реакцията на заместване $\text{Ga}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ в недостъпния за разтворителя сайт са положителни (Фигура 6). Въпреки това абиогенният галий може да се свърже с голям афинитет със свободните места, оставени незаети от нативното желязо (само 30% от центрите за метално свързване в трансферина са заети от фери-йони), като по този начин достига и навлиза в таргетната клетка. В ендозомите Ga^{3+} се освобождава от трансферина при по-високо рН (6.8), отколкото желязото, при което този процес започва при 5.5. Проведените изчисления са в съответствие и с тези експериментални данни, тъй като показват, че афинитетът на Ga^{3+} йон към протеиновия свързващ сайт (а оттам и стабилността на неговия Tf-комплекс), съотнесен към този на Fe^{3+} , намалява с увеличаването на рН на средата (по-положителни по-малко благоприятна ΔG при рН ≈ 7 , отколкото при рН ≈ 5 , съответно във Фигура 2 с) и b)). Хипотезата, че вътре в клетката Ga^{3+} може успешно да се конкурира с нативния Fe^{3+} за свързване с окислената форма на рибонуклеотид редуктазата, което инхибира ензима, е подкрепена от показаните на Фигура 7 резултати. Два са основните фактори, които допринасят към този процес: 1) геометрията на комплекса се свива при свързване с Ga^{3+} йон, различаваща се с около 0.1 \AA за всяка метал-лиганд дължина на връзка спрямо Fe^{3+} - комплекса; 2) заместването на нативния редокс-активен фери-йон с редокс-неактивния галий води до невъзможност

за протичането на ензимната реакция. DFT изчисленията показват, че вторият желязо-свързващ сайт, изграден от повече отрицателно заредени остатъци, е по-вероятната цел за атака от страна на Ga^{3+} йон.

2. Свързване със субстратите на РНР.

2.1. Изчислителен протокол.

Взаимодействието между NDP (N = G/C; съответно гуанин/цитозин) и Ga^{3+} може да се запише по следния схематичен начин:



Реакция (2) представлява образуването на монодентатен комплекс между метала и пирофосфатния участък на субстрата; реакция (3) предполага бидентатен начин на метално свързване. Взети са под внимание различните позиции на свързания метал към фосфатните групи (свързани изцяло само към α или към β , както и едновременно към двата α - и β - участъка), след което е оценена стабилността на получените комплекси. Необходимо е да се отбележи, че свързване към нуклеобазата или рибозния пръстен към метала не е било моделирано тук, тъй като предишни изчисления показват, че това не са горещите точки (“hot spots”) за координиране на метала в трифосфати (ATP/GTP) или дифосфати (ADP/GDP).

Бяха моделирани целите молекули на пурин- и пиримидин-съдържащ нуклеотид дифосфат – съответно гуанозин дифосфат и цитидин дифосфат. В условията на физиологично рН пирофосфатният участък е напълно депротониран, поради което субстратите са моделирани като тризаредени аниони : GDP^{3-} и CDP^{3-} . Другият реагент е моделиран като $[Ga(OH)_4(H_2O)_2]^-$, тъй като първите четири pK_a стойности за галиевия аква-комплекс са под 7 ($pK_{a1} = 3.09$, $pK_{a2} = 3.55$, $pK_{a3} = 4.4$, $pK_{a4} = 6.05$), следователно хидратираният Ga^{3+} съществува почти изцяло като анионен комплекс $[Ga(OH)_4(H_2O)_2]^-$.

Конформационното пространство на метало-свързаните NDP е много богато с голямо разнообразие от възможни атрактори от страна на лиганда и координационни форми на свързване на металния катион. Следователно, бяха моделирани различни места на свързване при кислородните атоми от пирофосфатната част, което е своеобразен вид нетипичен конформационен анализ, а на получените изходни структури беше проведена

пълна оптимизация. Всички напълно оптимизирани структури са локални минимуми от потенциалната енергетична повърхнина, потвърдено от липсата на имагинерни стойности в анализа на вибрационните честоти.

И тук всички изчисления бяха проведени с програмата Gaussian 09[122]. Сред голям набор от плътностни функционали и базисни набори, комбинацията от M062X/6-311++G(d,p) се оказва най-подходяща за провеждане на изследването и при възпроизвеждането на различни структурни и термодинамични параметри на метал-нуклеотидни комплекси. След пълната оптимизация в газова фаза и направен честотен анализ, са изведени стойностите за електронните енергии, E_{elect} , термалните енергии, включително и zero-point енергията, E_T , както и ентропията, S . Съответните величини са скалирани с емпиричен фактор 0.983 и приложени в уравнение (2) за намиране на свободната енергия в газова фаза ΔG^1 за реакции (2) и (3), по аналогия с протокола от т.1.1. (стр.6). Солватационните ефекти са отразени чрез прилагането на РСМ изчисления на ниво SMD, по имплементираната в Gaussian 09 схема. Използвани са въведените в програмата van der Waals радиуси за всички изграждащи молекулите атоми, включително и за галиевия, чийто радиус е 2.0 Å. За всяка геометрично оптимизирана структура са направени т.нар. single-point изчисления с цел, получаване на данни за изпълнение на уравнение (3) и намиране на $\Delta G_{\text{solv}}^{\epsilon}$ или в пропанонитрил ($\epsilon = 29$, имитиращ белтъчна среда), или във вода ($\epsilon = 78$). Разликата между енергиите в газова и кондензирана фаза дава свободните енергии на солватация, $\Delta G_{\text{solv}}^{\epsilon}$. Съгласно уравнение (1) за реакция (2) може да се запише:

$$\Delta G^{\epsilon} (\text{реакция 2}) = \Delta G^1 + \Delta G_{\text{solv}}^{\epsilon}([\text{Ga}(\text{OH})_3 - \text{NDP}]^{3-}) + 2\Delta G_{\text{solv}}^{78}(\text{H}_2\text{O}) + \Delta G_{\text{solv}}^{78}(\text{OH}^-) - \Delta G_{\text{solv}}^{78}(\text{NDP}^{3-}) - \Delta G_{\text{solv}}^{78}([\text{Ga}(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_2]^-), (4)$$

Подобно уравнение може да се напише и за реакция (3). Важно е да се отбележи, че в изчисленията са използвани експериментално определените свободни енергии на хидратация за H_2O (-6.3 kcal/mol) и за OH^- (-107 kcal/mol). Така проведена методология се е доказала много точна при възпроизвеждането на експериментални термодинамични данни. Например, свободната енергия на дисоциация на водата $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HO}^- + \text{H}^+$, определена по настоящия протокол чрез прилагането на експерименталните стойности за участниците е 20.9 kcal/mol, което е много добро съответствие с експерименталната стойност от 19.1 kcal/mol.

Както тук, така и в предишното изследване, ролята на релативистичните ефекти върху термодинамиката на Ga^{3+} е била оценена и определена като незначителна чрез провеждането на „релативистични“ и „нерелативистични“ изчисления върху галиевите комплекси чрез използването на програмата ADF (версия 2014.10).

2.2. Образуване на монодентатни комплекси.

Обобщено са представени стойностите на свободните енергии на образуване в различен разтворител за монодентатните Ga-CDP комплекси в Таблица 1, докато за монодентатните Ga-GDP структури това е направено в Таблица 2.

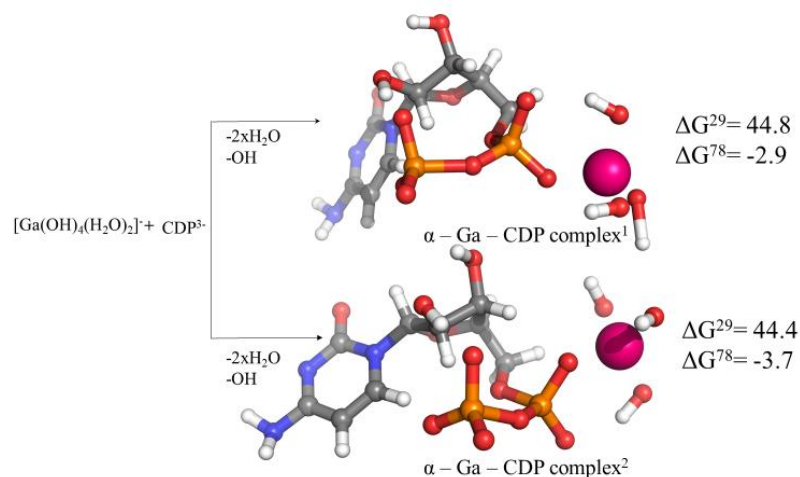
Таблица 1. Стойности на свободните енергии на образуване на монодентатните Ga-CDP комплекси в пропанонитрил (ΔG^{29}) и вода (ΔG^{78}).

Monodentate Ga-CDP complexes			
		ΔG^{29} kcal/mol	ΔG^{78} kcal/mol
α	1	44.8	-2.9
	2	44.4	-3.7
β	1	38.0	-9.3
	2	34.5	-12.7
	3	30.9	-16.5

Таблица 2. Стойности на свободните енергии на образуване на монодентатните Ga-GDP комплекси в пропанонитрил (ΔG^{29}) и вода (ΔG^{78}).

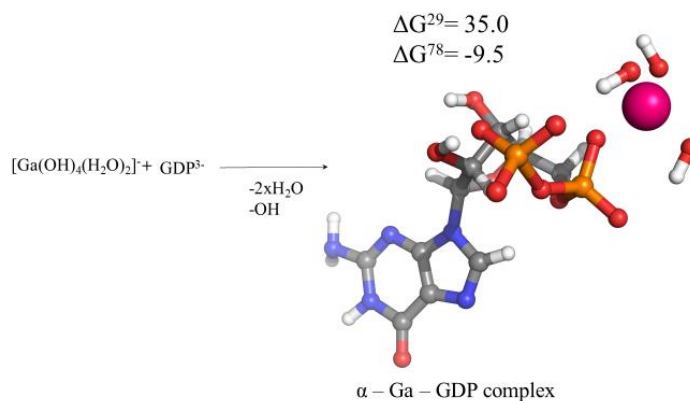
Monodentate Ga-GDP complexes			
		ΔG^{29} kcal/mol	ΔG^{78} kcal/mol
α	1	35.0	-9.5
	2	-	-
β	1	32.9	-11.4
	2	28.3	-15.9
	3	27.3	-17.5

Образуването на двата възможни α -Ga-CDP – монодентатни комплекса е показано на Фигура 8, както и стойностите на съответните свободни енергии в различна среда.



Фигура 8.Образуване на монодентатни $\alpha\text{-Ga-CDP}$ комплекси. Показаните структури са оптимизирани.

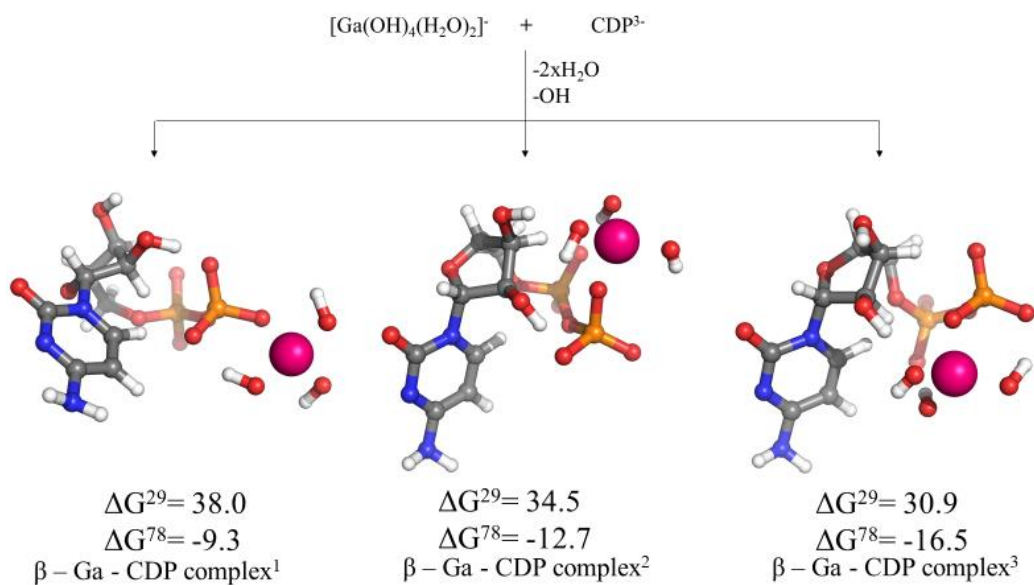
Стойностите за ΔG^{78} показват, че изследваните комплекси се образуват спонтанно и са стабилни във водна среда. И двата кислородни атома в алфа-позиция изглеждат еднакво благоприятни за образуване на комплекс, тъй като съответните свободни енергии са почти идентични (-2.9 и -3.7 kcal/mol). И в двете структури се формират водородни връзки между Н-атом от HO-Ga участък и несвързания с метала $\alpha\text{-O(P)}$ атом от фосфатната група. В допълнение, β -фосфатът е ангажиран във водородно свързване с HO-група от рибозния пръстен. Що се касае до монодентатните $\alpha\text{-Ga-GDP}$ комплекси, само една структура беше напълно оптимизирана (Фигура 9) поради спонтанна изомеризация на втория възможен α -продукт в β -свързан комплекс. По-ниската свободна енергия за образуването на $\alpha\text{-Ga-GDP}$ ($\Delta G^{78} = -9.5$ kcal/mol; Фигура 9) в сравнение с двата $\alpha\text{-Ga-CDP}$ ($\Delta G^{78} = -2.9$ и -3.7 kcal/mol; Фигура 8) предполага по-висока стабилност на първия спрямо другите два комплекса. Това се дължи на факта, че Ga-GDP има по-богата мрежа от вътрешномолекулни връзки. Както се вижда от Фигура 9 такива връзки се формират между две различни HO-Ga участъка и $\alpha\text{-O(P)}$ и $\beta\text{-O(P)}$ атоми от фосфатите. Също така се осъществява и водородна връзка между пуриновата база и β -фосфатния участък. Трябва да се отбележи и, че Н-връзката между $\beta\text{-O(P)}$ и HO-групата от рибозата е по-къса с 0.15\AA в GDP-комплекса спрямо CDP, което предполага и по-голяма сила на взаимодействието.



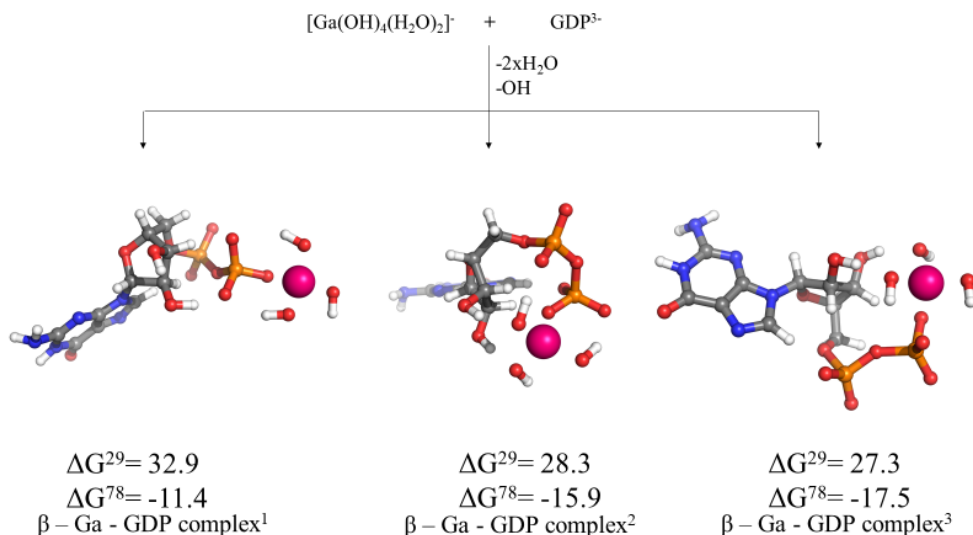
Фигура 9. Образуване на монодентатен α -Ga-GDP комплекс.

Получените резултати показват, че понижаването на диелектричната константа на средата влияе неблагоприятно върху процеса на комплексообразуване, като съответните стойности за ΔG^{29} са положителни (Таблица 1 и 2, както и Фигура 8 и 9).

Възможните β -монодентатни комплекси бяха моделирани и геометрично оптимизирани, като техните структури са показани на Фигура 10 (β -Ga-CDP) и на Фигура 11 (β -Ga-GDP).



Фигура 10. Образуване на монодентатни β -Ga-CDP комплекси.



Фигура 11. Образуване на монодентатни β -Ga-GDP комплекси.

За всички изследвани реакции свободните енергии на образуване са силно отрицателни (Фигури 10 и 11, както и Таблицы 1 и 2) и по-високи по абсолютна стойност в сравнение с тези, намерени за α -монодентатните комплекси, което свидетелства за това, че монодентатното метално свързване към β -фосфата е енергетично по-изгодно спрямо това за съседния α -фосфат. Необходимо е да бъде подчертана ролята на вътрешномолекулните водородни връзки за стабилизирането на металните комплекси. Не е учудващ фактът, че колкото по-богата е мрежата от водородни връзки, толкова по-стабилен става комплексът. Първата β -монодентатна Ga-CDP структура ($\Delta G^{78} = -9.3$ kcal/mol; отбелязана като β -Ga-CDP complex¹ на Фигура 10) притежава водородна връзка между HO-Ga и β -O(P); във втората структура ($\Delta G^{78} = -12.7$ kcal/mol) всички три HO-Ga групи формират H-връзки с α -O(P) атома, с кислород от хидроксилна група от рибозния пръстен и с β -O(P) атом на по-голямо разстояние; третата и най-предпочетена конформация ($\Delta G^{78} = -16.5$ kcal/mol) притежава същия тип водородно свързване, като връзката HO-Ga- β -O(P), обаче, е значително по-къса. Същата тенденция се наблюдава и при монодентатните β -Ga-GDP комплекси (Фигура 11 и Таблица 2). Отново, както и при монодентатните α -структури, Ga-GDP изглеждат по-стабилни в сравнение с Ga-CDP комплексите (по-ниски свободни енергии на комплексообразуване, показано на Фигури 10 и 11).

2.3.Образуване на бидентатни комплекси.

Няколко са вариантите за бидентатно свързване на метала към пирофосфатната част от нуклеотид дифосфата: един α,α -; три β,β -; шест α,β - комплекса. От тях бяха моделирани α,α -Ga-CDP (Фигура 12) и α,α -Ga-GDP (Фигура 15); трите β,β -Ga-CDP (Фигура 13) и трите β,β -Ga-GDP (Фигура 16); три α,β - Ga-CDP (Фигура 12) и три α,β - Ga-CDP комплекса (Фигура 15). Стойностите за свободните енергии на образуване на бидентатните Ga-CDP структури са обобщени в Таблица 3, а тези за бидентатните Ga-GDP – в Таблица 4.

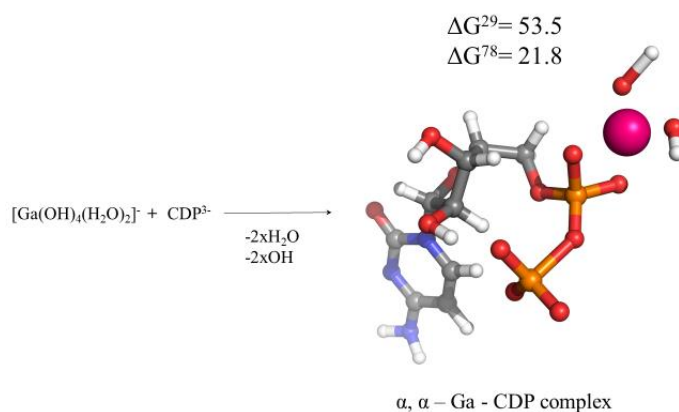
Таблица 3. Свободни енергии на образуване на бидентатни Ga-CDP комплекси в среда с различна диелектрична константа: пропанонитрил ($\epsilon=29$) и вода($\epsilon=78$).

		Bidentate Ga-CDP complexes	
		ΔG^{29} , kcal/mol	ΔG^{78} , kcal/mol
α, α		53.5	21.8
β, β	1	38.4	6.0
	2	31.4	3.7
	3	28.4	1.7
α, β	1	16.1	-10.3
	2	15.6	-10.8
	3	20.3	-11.5

Таблица 4. Свободни енергии на образуване на бидентатни Ga-GDP комплекси в среда с различна диелектрична константа: пропанонитрил ($\epsilon=29$) и вода($\epsilon=78$).

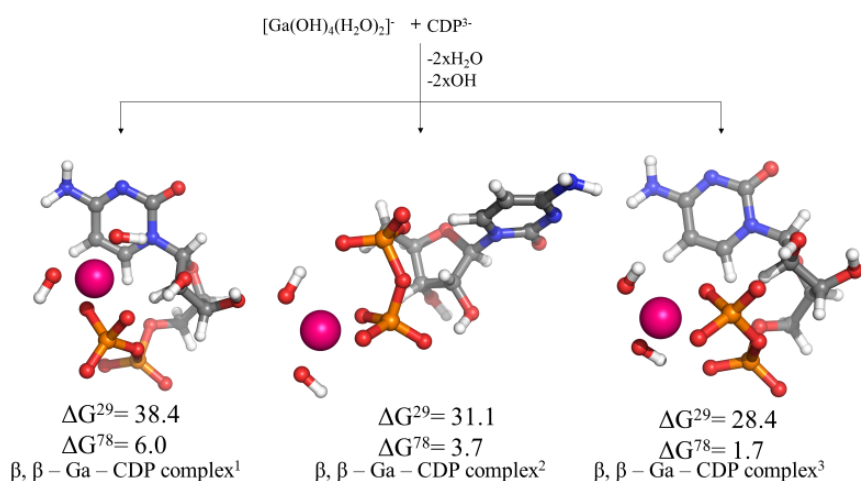
		Bidentate Ga-GDP complexes	
		ΔG^{29} , kcal/mol	ΔG^{78} , kcal/mol
α, α		60.6	30.7
β, β	1	31.9	4.9
	2	24.4	-0.7
	3	13.2	-11.7
α, β	1	11.4	-13.1
	2	11.4	-13.1
	3	11.7	-14.6

Бидентатното свързване на Ga^{3+} не е благоприятно нито при α -, нито при β -фосфатите на CDP, което се вижда от положителните стойности на свободните енергии на комплексобразуване. Това се дължи основно на предизвиканото напрежение в областта на фрагмента (P)O-Ga-O(P) след идването на катиона (O-Ga-O ъгъл от 77° в CDP- комплекса спрямо 106° в $[\text{Ga}(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_2]^-$), което повлиява отрицателно върху процеса. В допълнение, в бидентатния α, α -комплекс липсват водородните връзки, които са от съществено значение за стабилизирането на молекулата, като само β -фосфатните кислородни атоми взаимодействат с базата и НО-групата от рибозния пръстен.



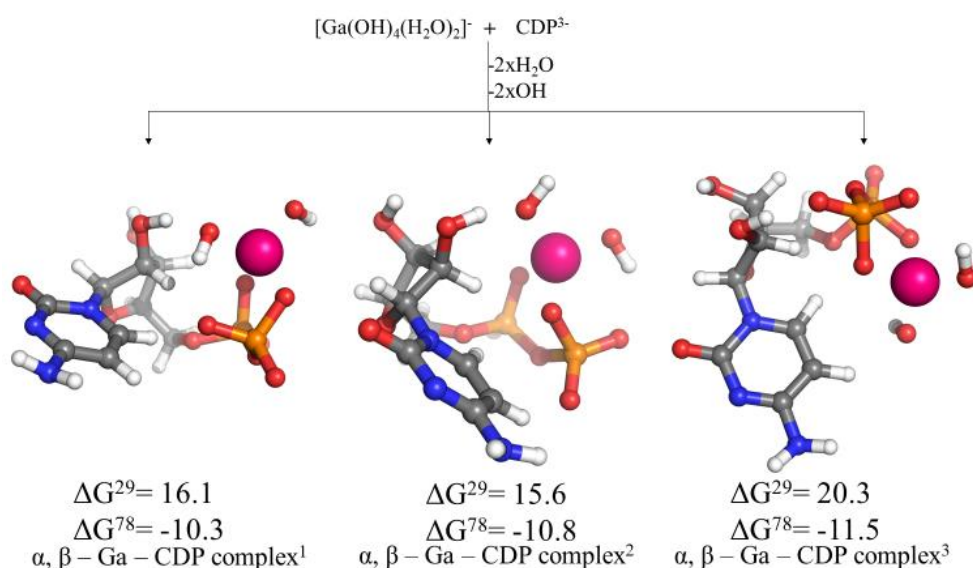
Фигура 12. Образуване на бидентатен α, α -Ga-CDP комплекс.

Бидентатните β, β -структури са оказват по-стабилни поради наличието на по-богато устроена мрежа от водородни връзки, което се вижда от по-ниските стойности на свободните енергии за тяхното формиране (Таблица 3 и Фигура 13). Все пак, обаче, както ΔG^{29} , така и ΔG^{78} са положителни, което показва, че и този начин на свързване не е благоприятен.



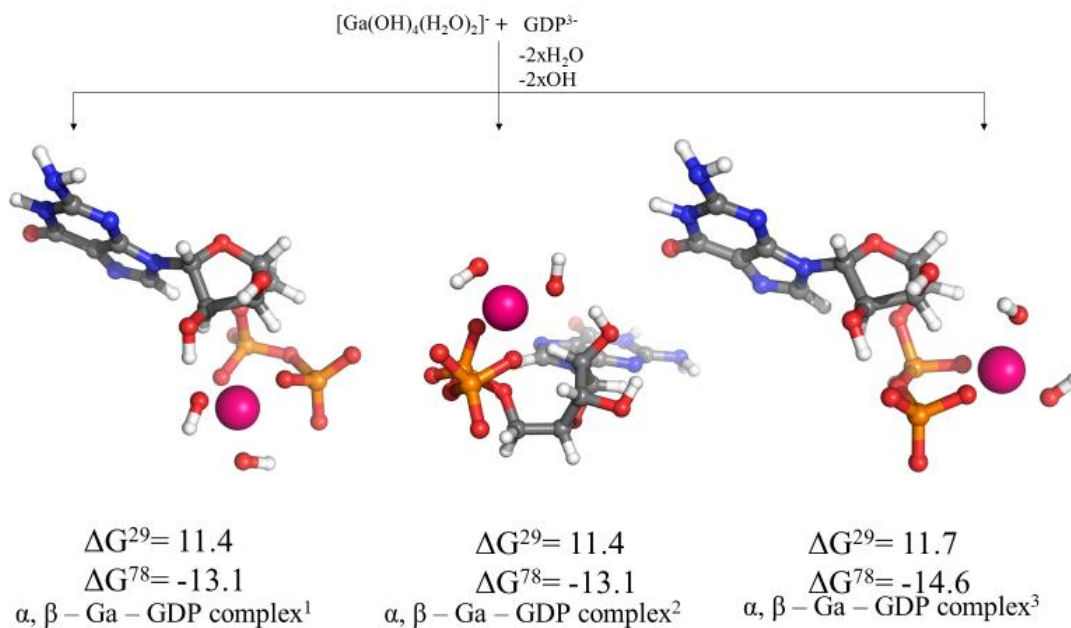
Фигура 13. Образуване на бидентатни β, β -Ga-CDP комплекси.

Проведените изчисления показват, че едновременното свързване на абиогенния метален катион както към α -, така и към β -фосфатните участъци е енергетично изгодно, тъй като съответните енергии на образуване във водна среда са силно отрицателни (Фигура 14). Стойностите на ΔG^{78} и за трите изследвани α, β -Ga-CDP изомерни комплекса са много близки и се различават в рамките на 1 kcal/mol. Три са факторите, които допринасят за тази стабилност. Първо, напрежението в (P)O-Ga-O(P) е до голяма степен облекчено (ъгълът при O-Ga-O в комплекса е вече 96° спрямо 106° в $[\text{Ga}(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_2]^-$). Второ, броят на вътрешномолекулните водородни връзки е нараснал значително. И трето, зарядът, трансфериран от лигандите към Ga^{3+} център в α, β -структурите (2.46 е за най-стабилната структура; популационен анализ на Hirshfeld), е по-голям спрямо този в съответните α, α - (2.43 е) и β, β – структури (2.45 е). Същите тенденции се наблюдават и при разглеждането на свободните енергии в пропанонитрил (ΔG^{29}), въпреки че те във всички случаи са подчертано положителни.

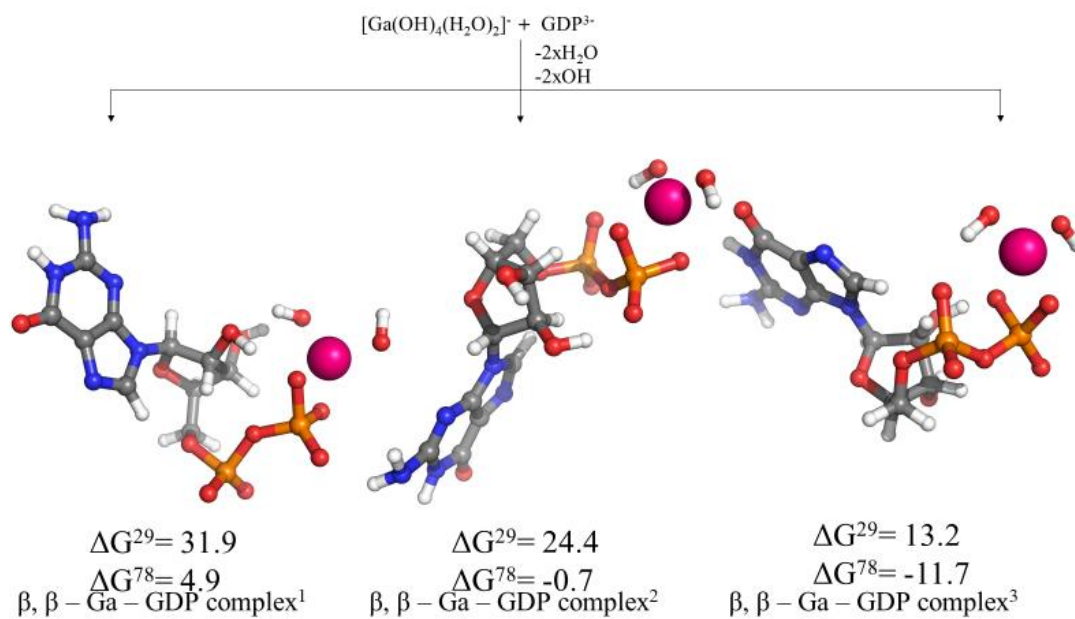


Фигура 14. Образуване на бидентатни α, β -Ga-CDP комплекси.

При образуването на бидентатни Ga-GDP комплекси се наблюдават същите закономерности, валидни и при дотук обсъдените Ga-CDP структури. Отново бидентатните α, β -Ga-GDP комплекси са най-стабилни, следвани от β, β -аналозите им.

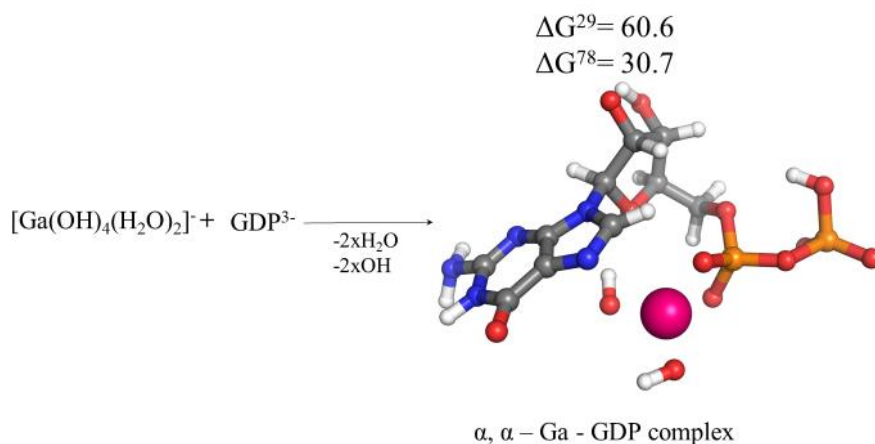


Фигура 15. Образуване на бидентатни α, β -Ga-GDP комплекси.



Фигура 16. Образуване на бидентатни β, β -Ga-GDP комплекси.

И тук образуването на бидентатен α, α -Ga-GDP комплекс е най-неблагоприятно поради положителните ΔG^\ominus .



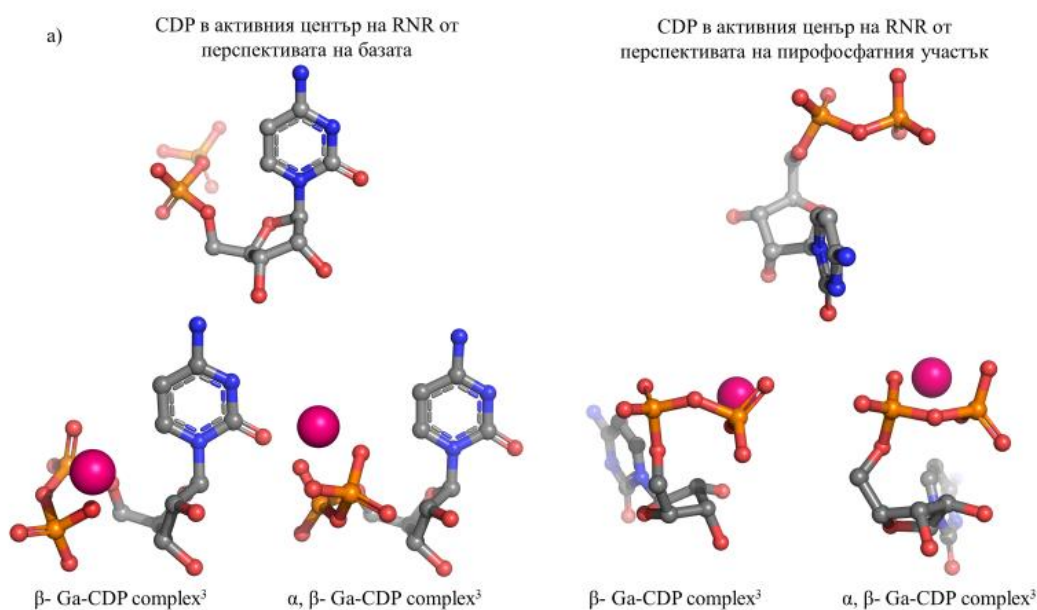
Фигура 17. Образуване на бидентатен α, α -Ga-GDP комплекс.

Получените данни показват, че и тук Ga^{3+} преференциално свързва GDP пред CDP (пониски $\Delta G^{29}/\Delta G^{78}$ за комплексите на образуване с първата спрямо тези с втората база), като отново по-големият брой вътрешномолекулни водородни връзки определя по-голямата стабилност на Ga-GDP структурите. Това е особено забележимо, защото дори и свободните енергии на образуване за два β, β -Ga-GDP комплекса са отрицателни.

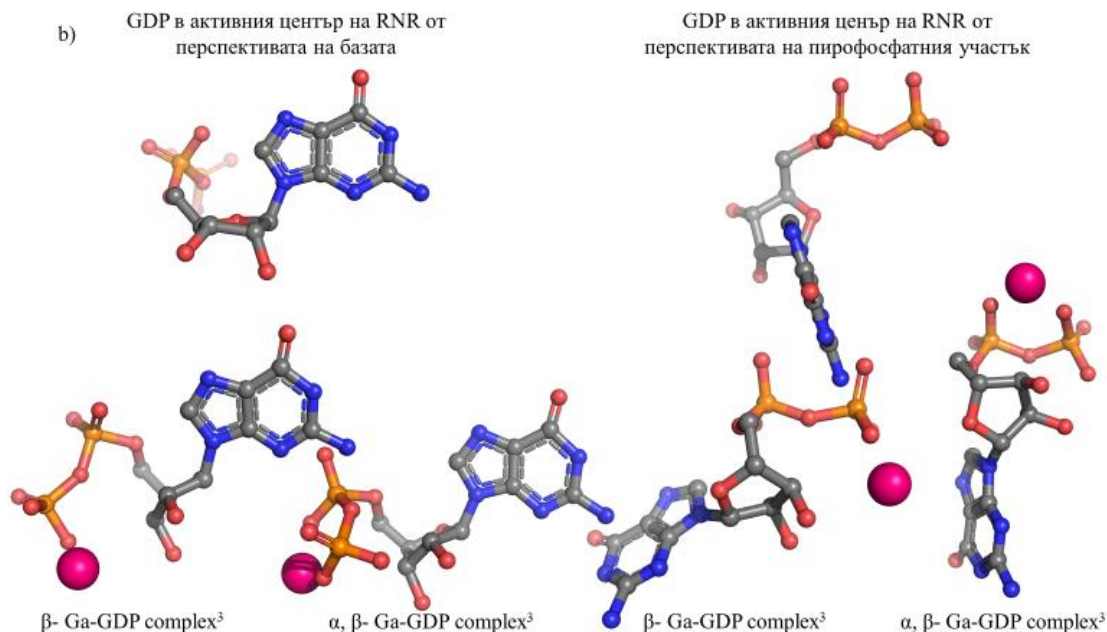
Процесът на метално свързване към нуклеотид дифосфатите е изследван при имплицитно отчитане на разтворителя, защото са взети под внимание техническите трудности, произлизащи от моделирането на експлицитна солватационна обвивка при този тип изчисления. Все пак си зададохме въпроса до каква степен наблюдаваните тенденции зависят от начина на задаване на разтворителя – имплицитно като безструктурен континуум с определена диелектрична константа, или като среда, изградена от експлицитни водни молекули, свързани с водородни връзки към взаимодействащите си участъци. За да отговорим на този въпрос, моделирахме няколко реакции, като взехме под внимание две експлицитни водни молекули от разтворителя, свързани към CDP-лиганда и монодентатен α -Ga-CDP (Фигура 8), както и бидентатни α, α - и α, β - Ga-CDP (Фигура 12 и 14) комплекси. Изчисленията разкриват, че ΔG^{78} на съответните реакции не се променят съществено при добавянето на експлицитни водни молекули: $\Delta G^{78}(\alpha)$ са -3.7 kcal/mol (имплицитен разтворител) и -1.6 kcal/mol (експлицитни води); $\Delta G^{78}(\alpha, \alpha)$ са 21.8 kcal/mol (имплицитен разтворител) и 21.2 kcal/mol (експлицитни води); $\Delta G^{78}(\alpha, \beta)$ са -10.8 kcal/mol (имплицитен разтворител) и -10.1 kcal/mol (експлицитни води). Този пример ясно показва, че наблюдаваните тенденции в имплицитен разтворител са валидни и при експлицитно моделиране на водни молекули.

2.4. Конформация на Ga-CDP/Ga-GDP комплексите в сравнение с CDP/GDP в активния център на ензима.

Рибонуклеотид редуктазните структури, съдържащи субстрати CDP и GDP в активния си център на R1 субединицата, са определени чрез рентгеноструктурна кристалография и депозирани в банката за протеинови данни (PDB, със съответни номера 5CNS и 3HND). Цялостните, експериментално определени структури на ензим-свързаните субстрати, взети от PDB, са съпоставени на Фигура 18 за CDP и на Фигура 19 за GDP към най-стабилните (монодентатни β - и бидентатни α,β -комплекси) метало-свързани структури, за получаването на чиято геометрия е допълнително проведена пълна оптимизация във вода. Внимателно разглеждане на представените структури разкрива значителни разлики в конформациите на свободните от метал ензим-свързани субстрати и получените най-стабилни моно- и бидентатни Ga-CDP и Ga-GDP. Не е изненадващо, че основните различия засягат пирофосфатния участък, чиято структура е значително деформирана. Например, торзионният ъгъл C-O-P-O в експерименталната CDP-структура е -108.5° , докато същият в оптимизираните β - и α,β -Ga-CDP комплекси е съответно 66.5° и 101.1° (Фигури 10 и 14). Друг диедричен ъгъл, който е представителен за настъпващите конформационни разлики при свързването с метала, е O-P-O-P; наблюдаваните стойности са 146.4° (CDP), 74.7° (монодентат) и 85.8° (бидентат), както е представено на Фигура 18.



Фигура 18. Съпоставяне на най-стабилните моно- и бидентатни комплекси на галия и тази субстрата CDP в активния център на РНР.



Фигура 19. Съпоставяне на най-стабилните моно- и бидентатни комплекси на галия и тази на субстрата GDP в активния център на РНР.

Наблюдаваните тенденции са валидни и за свободния GDP и съответните металосвързани комплекси, където ъгълът O-P-O-P е: 136.5° (GDP) спрямо -154.2° (монодентат) и -131.7° (бидентат). Очевидно свързването на галиевия катион към пирофосфатния участък, който се очаква да е от първостепенно значение за разпознаването между субстрата и активния център на ензима, съществено го деформира.

2.5. Дискусия.

➤ *Образуване на Ga-NDP комплекси.*

Проведените изчисления хвърлят светлина върху термодинамичните аспекти от разпознаването между Ga^{3+} и NDP^{3-} . Получените данни демонстрират, че пирофосфатният участък наистина е „гореща точка“ (“hot spot”) на свързване с металния катион, тъй като координирането на метала към фосфатните групи дава стабилни комплекси във водна среда, показано чрез отрицателните стойности на свободните Гибсови енергии на образуване (Таблицы 1 до 4). Тези резултати са в съответствие с данни от други изследвания върху метал-нуклеотидното разпознаване между ATP/GTP и ADP/GDP и други метални катиони (Mg^{2+} или Li^{+}). При това сред различните начини на Ga^{3+} - фосфатно свързване, монодентатното β- (Фигури 10 и 11) и бидентатното α,β- (Фигури 14 и 15) координиране изглеждат най-предпочетените, защото дават като резултат метални комплекси, характеризирани със силно отрицателни стойности на

свободните енергии във водна среда. Формирането на богата, вътрешномолекулна мрежа от водородни връзки при идването на метала допринася съществено за стабилността на тези комплекси. Изчисленията предполагат, че галият е по-склонен да образува монодентатни β -, отколкото в бидентатни α, β -комплекси (по-ниски ΔG^{78}). Това се дължи основно на два фактора. Първо, свързването на метала в бидентатен комплекс поражда известно напрежение, което отсъства в монодентатните структури: $(\alpha)O-Ga-O(\beta)$ ъгълът в бидентатните комплекси е по-малък, т.е. напрегнат, в сравнение с този в свободния $[Ga(OH)_4(H_2O)_2]^-$, докато съответният ъгъл $HO-Ga-O(\beta)$ в монодентатните комплекси остава непроменен спрямо несвързания хидратиран метален катион. Второ, тройнозареденият монодентатен анионен комплекс $[Ga(OH)_3-NDP]^{3-}$ е по-добре солватиран, отколкото съответния двузареден бидентат $[Ga(OH)_2-NDP]^{2-}$, което повишава „печалбата“ на свободна енергия за първия вид структури.

Изведените тенденции са валидни за Ga^{3+} - съдържащите комплекси както с пуриновата GDP^{3-} , така и с пиримидиновата CDP^{3-} бази. Все пак, структурите с GDP^{3-} изглеждат по-стабилни в сравнение с тези със CDP^{3-} , което се вижда от по-ниските стойности на ΔG^e за образуването на комплексите (Таблицы 1 до 4). Детайлният анализ на геометриите на $Ga-NDP$ молекулите разкрива, че по-сложната мрежа от водородни връзки, включваща в по-голяма степен гуаниновата спрямо цитозиновата база, се отразява върху стабилността на съответните комплекси, и благоприятства образуването на $Ga-GDP$ пред $Ga-CDP$ структури.

С цел да се изследва влиянието на полярността на разтворителя върху формирането на $Ga-NDP$ комплекси, бяха изчислени свободните енергии на образуване в две различни среди, характеризиращи се с диелектрични константи 29 и 78. Както реагентите, така и продуктите са заредени частици, така че се очаква солватационните ефекти да бъдат от съществено значение. И наистина, диелектричните свойства на средата са първостепенен фактор, влияещ върху термодинамичните параметри на $Ga-NDP$ разпознаването. От изчисленията става ясно, че понижаването на диелектричната константа на средата измества посоката на реакцията, като съответните ΔG^e се променят от отрицателни при $\epsilon = 78$ към положителни при $\epsilon = 29$.

➤ *Биологична намеса.*

Нуклеотид дифосфатите се намират основно в цитозола преди навлизането на галиевия катион в клетката. Изчисленията разкриват, че идващият Ga^{3+} може доста

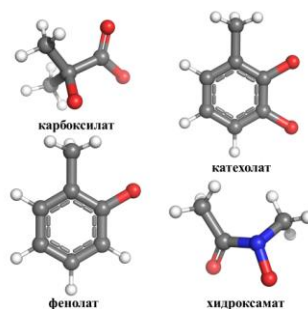
ефективно да свърже свободните нуклеотид дифосфати от вътреклетъчното пространство. По този начин се понижава концентрацията на съществено важните субстрати на рибонуклеотид редуктазата. От друга страна, метало-свързаните NDP не могат да служат като подходящи субстрати за ензима, тъй като поради значителната промяна в структурата си (Фигури 18 и 19), не биха могли да паснат в активния център на РНР. Необходимо е да се отбележи, че ензимът има много висока специфичност по отношение на нуклеотид дифосфатите, като формата на субстратния център е много деликатно настроена към тяхната геометрия по начин, който не позволява на монофосфатите да се свържат достатъчно стабилно, а трифосфатите са твърде обемисти, за да паснат в тесния свързващ джоб. Настоящите изчисления подкрепят наскоро изказаната хипотеза за механизма на терапевтично действие на Ga^{3+} , постулираща, че металният катион чрез свързването си със свободните нуклеотид дифосфати и формирането на метални комплекси, от една страна, и образуването на структури, които не са разпознаваеми за ензима, от друга, лишава РНР от нейните субстрати, като по този начин понижава ензимната активност в раковите клетки.

3. Галий (III) в антибактериалната терапия.

1. Изчислителен протокол.

1.1. Използвани модели.

Целите молекули на два изследвани сидерофора – пиохелин и преацинетобактин са моделирани експлицитно. Поради големия размер на други видове сидерофори и ограничения в изчислителната мощност, техните съответни лигиращи групи, участващи само в директен контакт с металния катион, са запазени за моделиране (Фигура 20), тъй като такъв тип електростатични взаимодействия са отговорни в най-голяма степен за енергията на стабилизация на металния комплекс.



Фигура 20. Модели на основните лиганди, свързващи метала в структурата на сидерофорите, използвани в настоящето изследване.

И тук, както при изследването на конкуренцията между Fe^{3+} и Ga^{3+} за свързване на протеини в противораковата терапии са отчетени константите на хридацията на отделните метални катиони и съгласно техните стойности са моделирани съответните комплекси.

1.2. Моделни реакции.

Съществуват повече от 500 сидерофора с разнообразни структура, състав и заряд. Следователно е от изключителен интерес кои молекулни характеристики благоприятстват свързването на абиогенния галий спрямо нативното желязо, като по този начин повишават податливостта на бактериите към Ga^{3+} -базираната терапията, известна като „Троянски кон“. Ето защо ние моделирахме реакции на конкуренция между двата метални катиона за свързване първо към отделните четири основни лигиращи групи (Фигура 20), в съотношение 1:1 метал: лиганд. След това беше изследвана атаката на галия към 1:2 желязо: лиганд комплекси, където всички възможни комбинации между основните групи на сидерофорите бяха взети под внимание. Конкуренцията между Ga^{3+} и Fe^{3+} за свързване със сидерофорната молекула е моделирана като:



където $[\text{Fe}/\text{Ga-siderophore}]$ означава комплекс между фери/галиевия йон и моделния сидерофор. Комплексите са моделирани в съответствие с налични в литературата експериментални данни, като или хидроксамовата C/N-O⁻, или карбонилната C=O групи координират метала. Хидроксилните HO-групи от лигандите са депротонирани, тъй като това е тяхното най-разпространено състояние в по-големите структури при физиологично pH, особено в присъствие на метален катион.

1.3. DFT/SMD изчисления.

За провеждането на изчисленията е използван програмният пакет Gaussian 16. Термодинамичните параметри са оценени на ниво B3LYP/6-31+G(3d,p) в съчетание с SMD – базирани изчисления за влиянието на разтворителя. Тази комбинация от метод/базисен набор и приложения след това изчислителен протокол е валидиран и сметен за надежден, тъй като възпроизвежда много добре експериментално установената свободна енергия на образуване на $[\text{Fe}(\text{pyochelin})(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ комплекс във водна среда при киселинни условия (виж т.2.1). За оценяване на електронните енергии в кондензирана

фаза, $E_{\text{elect}}^{\varepsilon}$, е направена пълна геометрична оптимизация на всяка структура за дадена диелектрична среда (пропанонитрил ($\varepsilon=29$), имитиращ белтъчното обкръжение на рецептора, или вода ($\varepsilon=78$)). Направен е анализ на вибрационните честоти на същото теоретично ниво. Липсата на имагинерни честоти за всяка оптимизирана структура е показателна, че дадената геометрия е минимум в повърхнината на потенциалната енергия. Вибрационните честоти са използвани за получаването на термичните енергии, E_T^{ε} , и ентропиите, S^{ε} . Тези стойности са приложени в изчисляването на Гибсовите свободни енергии в различни среди за реакция (4), ΔG^{ε} , при стайна температура, $T=298.15$ K, съгласно формулата:

$$\Delta G^{\varepsilon} = \Delta E_{\text{elect}}^{\varepsilon} + \Delta E_T^{\varepsilon} - T\Delta S^{\varepsilon}, \quad (5),$$

където $\Delta E_{\text{elect}}^{\varepsilon}$, ΔE_T^{ε} и ΔS^{ε} са съответните разлики между продуктите и реагентите. Горният индекс „ ε “ и тук се отнася за стойността на диелектричната константа, характеризираща средата.

2. Резултати.

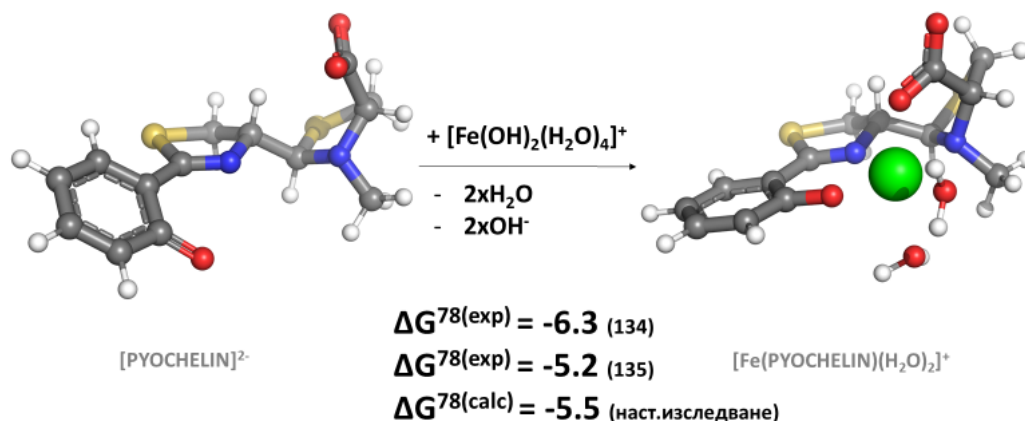
2.1. Валидиране на метода.

Валидирането на използвания метод е осъществено чрез моделирането на реакцията на образуване на желязо: пиохелинов комплекс в отношение 1:1 при киселинни условия ($\text{pH} \approx 4$) във водна среда. Чистият пиохелин е под формата на дианион в съответствие със стойностите на неговите дисоциационни константи (а именно, $\log K_4^{\text{H}} < 2$ и $\log K_3^{\text{H}} = 2.2$). Хидратираният аква-комплекс на фери-йона е моделиран като $[\text{Fe}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_4]^+$ съгласно съответстващите му pK_a стойности. Експериментите предоставят доказателства за преобладаващата структура на комплекса (октаедрична, с пиохелина тетраденратно координиран към метала и две водни молекули, запълващи координационната сфера, PDB данни в разтворител етан-1,2-диол 1XKW), както и за термодинамичните параметри за реакцията на образуване на комплекса ($\log(K_{\text{FeL}^+}) = 4.6$ or 3.8). Моделната реакция на образуване на комплекса е:



Молекулните структури и свободните енергии на комплексообразуване са представени на Фигура 21. Както може да бъде видяно, нашите изчисления възпроизвеждат задоволително наличните експериментални ΔG стойности на реакцията: $\Delta G^{78(\text{calc})}$ е -5.5

kcal/mol, докато експерименталните стойности, $\Delta G^{78(\text{exp})}$, са -6.3 kcal/mol или -5.2 kcal/mol.

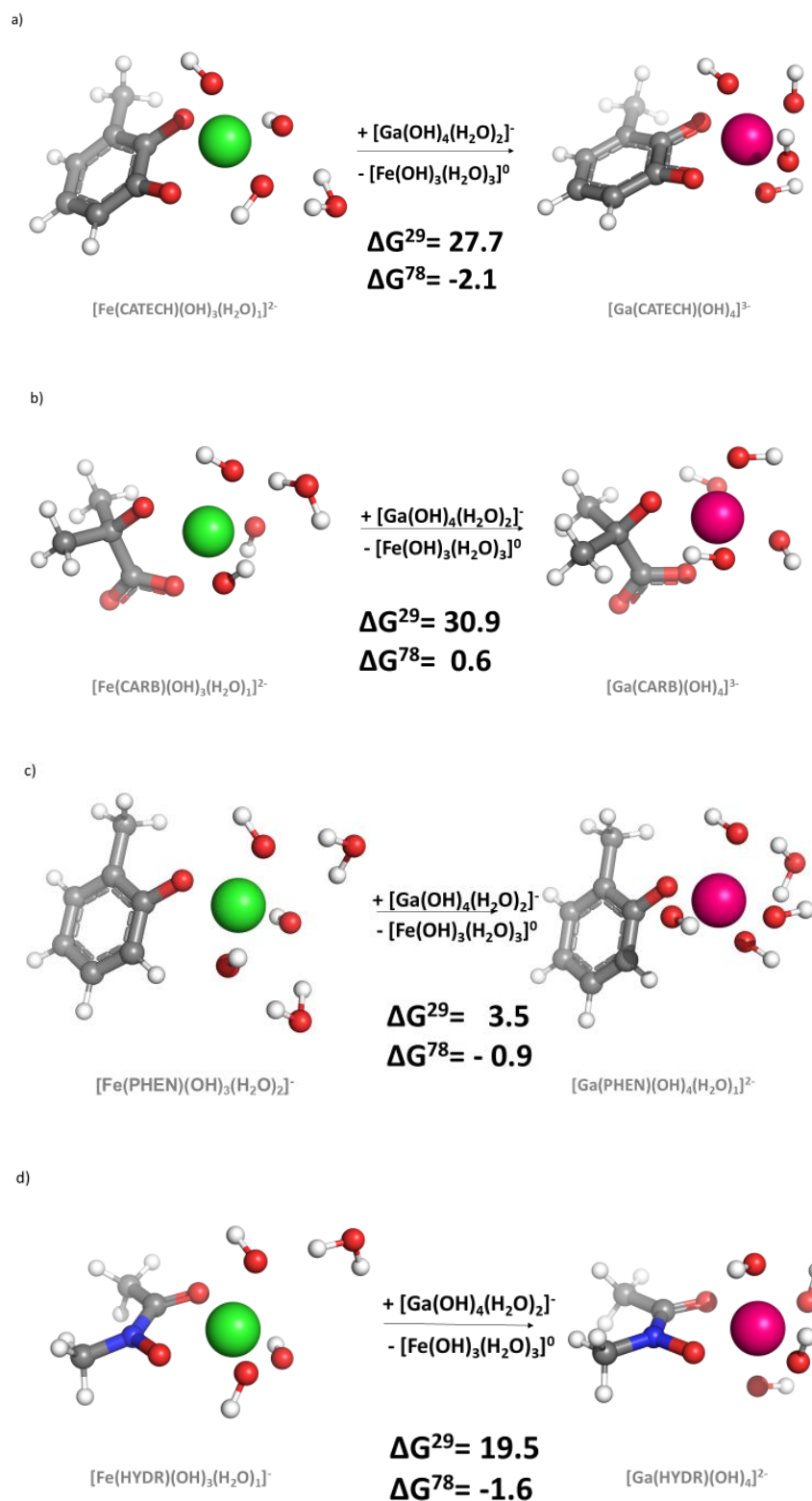


Фигура 21. Изчислени и експериментални свободни енергии (в kcal/mol) на образуване на $[\text{Fe}^{3+} - \text{pyochelin}]$ - комплекс. B3LYP/6-31+G(3d,p) оптимизирани структури във водна среда.

2.2. Образуване на комплекси чрез използване на само една основна група от сидерофорните молекули.

Сидерофорите свързват металния катион преимуществено в октаедрична геометрия, дарявайки два или три бидентатни лиганда, а металната координационна сфера се допълва от друга сидерофорна молекула, вода/хидроксид или карбоксилат. Градивните единици на сидерофорите се категоризират в четири подкласа, изложени на Фигура 20, се определят като: карбоксилат, катехолат, фенолат и хидроксамат. Тези групи са моделирани под формата на аниони, тъй като това е тяхното най-често срещано състояние, когато са свързани с метал. Аминокиселинните/ полиметиленовите вериги, свързващи сидерофорните метал-лигиращи единици, нямат съществена роля при комплексообразуването, тъй като те се намират обикновено на голямо разстояние от металния център. Затова тези остатъци са опростени до метилва група (Фигура 20).

Свободните енергии на образуване, изчислени за $\text{Ga}^{3+}/\text{Fe}^{3+}$ конкуренцията в 1:1 метал: свързваща група комплекси са представени на Фигура 22. Реакциите са моделирани в съответствие с хидратационни константи, отговарящи на неутрално $\text{pH} \approx 7$.



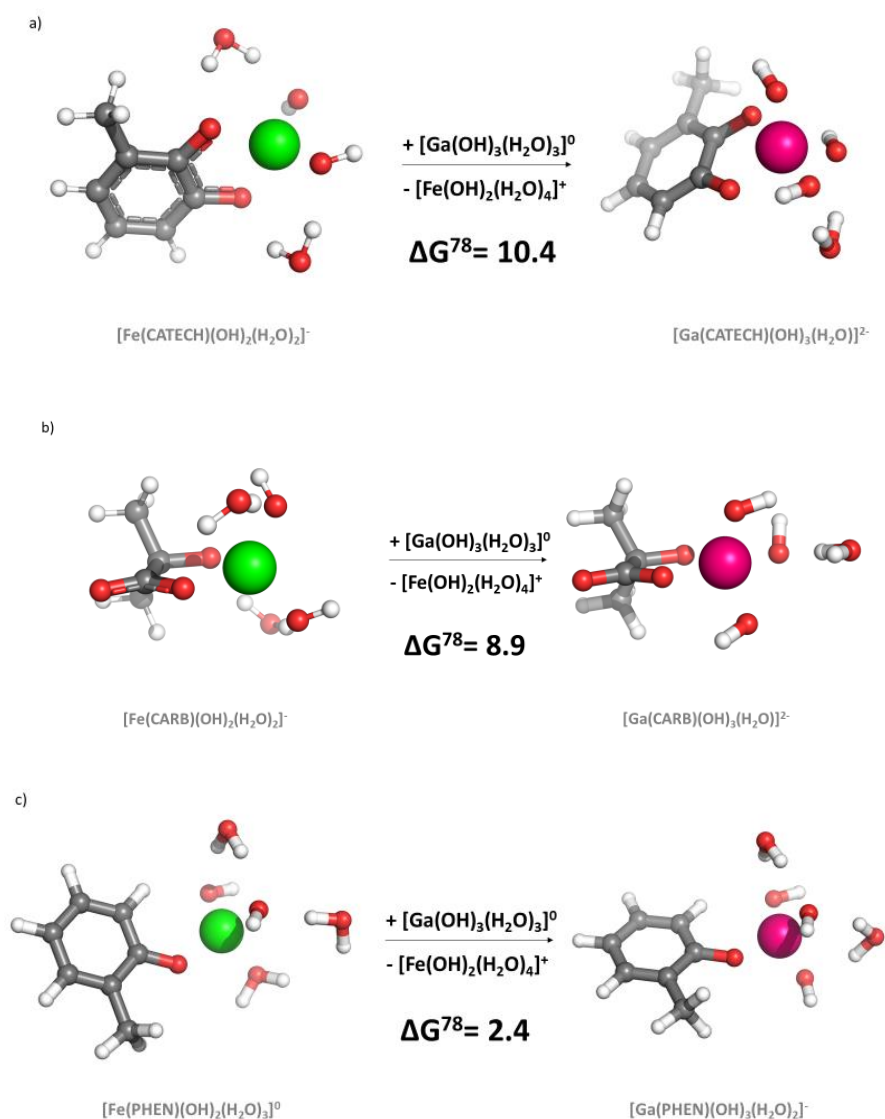
Фигура 22. ΔG° стойности (в kcal/mol) на реакциите на $\text{Ga}^{3+}/\text{Fe}^{3+}$ конкуренция за образуване на комплекси с а) катехолат, б) карбоксилат, в) фенолат, г) хидроксамат в две различни среди. Показаните структури са оптимизирани на ниво B3LYP/6-31+G(3d,p) във вода.

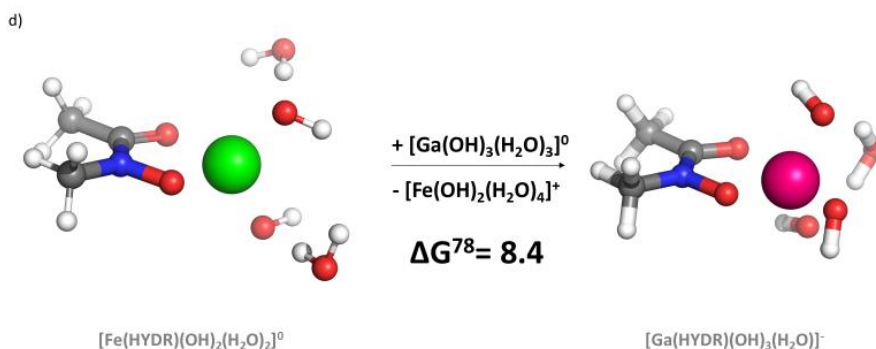
Изчисленията показват, че три от моделираните реакции във водна среда са благоприятни, като галият се конкурира успешно с фери-йона за свързване с катехолата, фенолата и хидроксамата, тъй като съответните стойности за ΔG^{78} са -2.1, -0.9, -1.6 kcal/mol (Фигура 22 а), с) и d)). Една от основните причини за този резултат е индуцираното напрежение от около 3-3.3° във валентния ъгъл O(лиганд)-M³⁺-O(лиганд) във фери- в сравнение с галий-съдържащите комплекси: O(CATECH)-Fe³⁺-O(CATECH) е 79.2° спрямо 82.04° в O(CATECH)-Ga³⁺-O(CATECH); Fe³⁺-O(PHEN)-C(PHEN) е 132.3° спрямо 135.4° в Ga³⁺-O(PHEN)-C(PHEN); O(HYDR)-Fe³⁺-O(HYDR) е 74.6° спрямо 77.9° в O(HYDR)-Ga³⁺-O(HYDR). Това води до удължаване на връзките Fe³⁺-O(лиганд) в съответните комплекси, като най-явна е разликата между Fe³⁺-O(HYDR) и Ga³⁺-O(HYDR): съответно 2.2Å спрямо 2.07Å. Друга причина е по-ниският заряд на комплексите с нативния йон, което е резултат от по-високата стойност на pK_{a4} константата му. Следователно, тези комплекси са по-слабо солватирани в полярната водна среда. Като цяло, обаче, разликите в свободните енергии между трите реакции са малки, което свидетелства за близка Ga³⁺/Fe³⁺ селективност на тези комплекси във водна среда. Единственото изключение от тази поредица реакции е конкуренцията между металите за свързване с карбоксилатния лиганд, където съответната Гибсова свободна енергия е положителна: $\Delta G^{78} = 0.6$ kcal/mol (Фигура 22b)). Заместването с абиогенния йон води до несъществени промени в структурата на комплексите, като ъгълът O(CARB)-M³⁺-O(CARB) се увеличава от 77.8° на 80.4°, а метал-О връзките са в рамките на 1.93-1.98Å.

Наблюдаваните тенденции в промяната на стойностите на ΔG се обръщат, когато реакциите са моделирани в пропанонитрил, като всички свободни енергии на Гибс са силно положителни ($\Delta G^{29} = 27.2; 30.9; 3.5$ и 19.5 kcal/mol на Фигура 22 от а до d)). Обяснението отново се състои в стойностите на валентните ъгли, разгледани по-горе, както и в степента на предизвиканото напрежение. В пропанонитрил фери-съдържащите комплекси не търпят почти никакви структурни промени, докато техните галий-съдържащи двойници се преформират в по-голяма степен, като съответните ъгли намаляват до почти същите стойности, каквито са в структурите на нативния йон: O(CATECH)-Fe³⁺-O(CATECH) е 78.8° спрямо 79.4° в O(CATECH)-Ga³⁺-O(CATECH); O(CARB)-Fe³⁺-O(CARB) е 78.6° спрямо 80.0° в O(CARB)-Ga³⁺-O(CARB); Fe³⁺-O(PHEN)-C(PHEN) е 138.5° спрямо 138.04° в Ga³⁺-O(PHEN)-C(PHEN); O(HYDR)-Fe³⁺-O(HYDR) е 74.8° спрямо 76.2° в O(HYDR)-Ga³⁺-O(HYDR). В допълнение може да се отбележи, че

неполярният пропанонитрил солватира по-добре Fe^{3+} -съдържащите структури, които имат по-нисък заряд. Важно е да се подчертае, че от всички моделни реакции в пропанонитрил двете реакции с по-ниска положителна стойност за ΔG са тези с моноанионните хидроксаматен и фенолатен лиганди (Фигура 22 с) и d)), които съществено се различават от другите две реакции (с дианионни катехолатен и карбоксилатен лиганди; Фигура 22 а) и b)).

Същите комплекси са моделирани отново във водна среда, но при киселинни условия (рН 5 – 6). При това рН, следвайки промените в съответните pK_a стойности, хидратираното Fe^{3+} е под формата на монокатионен комплекс $[\text{Fe}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_4]^+$, докато Ga^{3+} съществува като неутрален $[\text{Ga}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^0$ комплекс. Структурите на метал-съдържащите комплекси, както и съответните ΔG^{78} за $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Ga}^{3+}$ замяна са показани на Фигура 23.





Фигура 23. ΔG^{78} стойности (в kcal/mol) на реакциите на Ga^{3+}/Fe^{3+} конкуренция за образуване на комплекси с а) катехолат, б) карбоксилат, с) фенолат, d) хидроксамат във водна среда при киселинно рН 5-6. Показаните структури са оптимизирани на ниво B3LYP/6-31+G(3d,p).

Проведените изчисления показват, че изследваният рН интервал е от съществено значение за конкуренцията между двата катиона, тъй като всички разгледани реакции на метален обмен сега се проявяват неблагоприятни за Ga^{3+} , което се характеризира с положителните стойности на свободните Гибсови енергии: $\Delta G^{78} = 10.4; 8.9; 2.4$ и 8.4 kcal/mol, съответно за катехолат-, карбоксилат-, фенолат- и хидроксамат-съдържащи комплекси. В резултат на това, киселинната среда (в изследвания интервал) не благоприятства абиогенния катион.

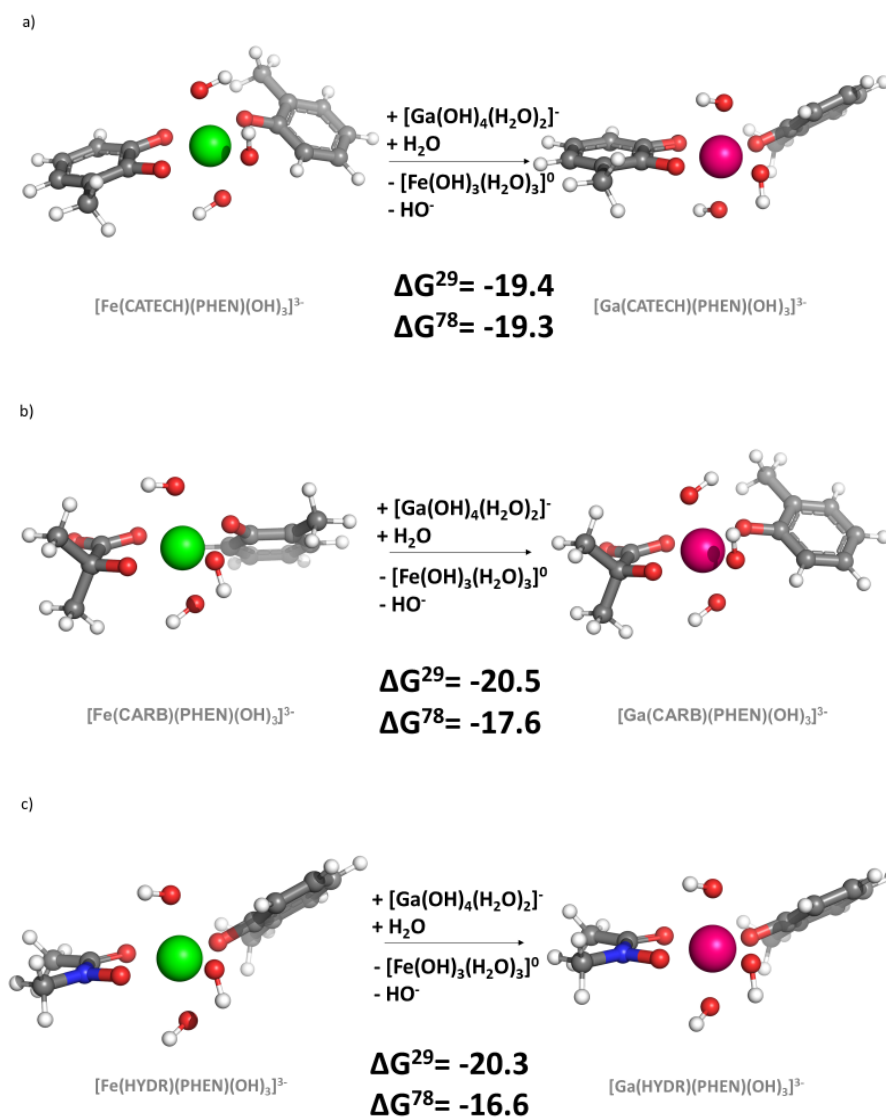
2.3. Образуване на комплекси чрез комбиниране на две основни групи, изграждащи сидерофорните молекули.

Поради това, че сидерофорните молекули често представляват комбинация от различните групи, представени на Фигура 20, следващата стъпка в настоящето изследване е моделиране на всички възможни смесени комбинации в 1:2 съотношение на метал: лигираща група. Резултатите могат да бъдат разпределени в две категории в зависимост от присъствието/отсъствието на монодентатния фенолатен лиганд. В първата група, PHEN-съдържащите комплекси са моделирани в „лицев“ (facial) – тип ориентация на НО-групи, защото структурите с меридионална (meridional) ориентация не могат да бъдат оптимизирани, тъй като връзката метал-фенолат се къса лесно при това разпределение на лигандите. В не-PHEN-съдържащата група комплекси, обаче, двата оставащи хидроксидни лиганда могат или едновременно да заемат аксиални позиции, или единият да бъде в аксиално, а другият – в екваториално разположение (Фигура 25). Случаят на две НО-групи в екваториално разположение не е разглеждан, тъй като това би

оставило единият от двата бидентатни лиганда в неблагоприятната двойно аксиална подредба.

- PHEN-съдържащи комплекси.

Три са възможните комбинации от лиганди, които са моделирани в този случай, като те са представени на Фигура 24 заедно със съответстващите стойности на свободните Гибсови енергии на $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Ga}^{3+}$ замяна в две среди.

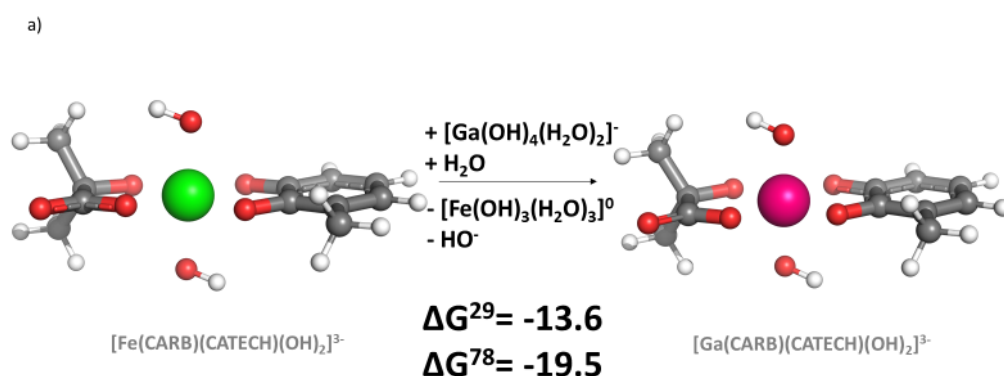


Фигура 24. ΔG^\ominus стойности (в kcal/mol) на реакциите на $\text{Ga}^{3+}/\text{Fe}^{3+}$ конкуренция за образуване на 1:2 фенолат-съдържащи комплекси с а) катехолат, б) карбоксилат, в) хидроксамат в две различни среди. Показаните структури са оптимизирани на ниво B3LYP/6-31+G(3d,p) във вода.

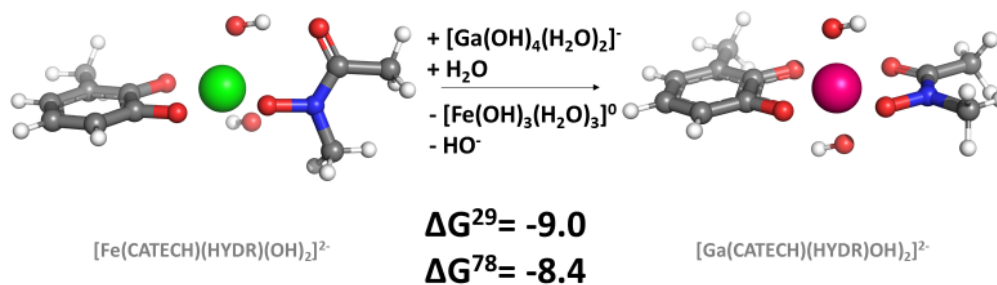
Получените ΔG^\ominus стойности предполагат, че добавянето на фенолатен лиганд към комплекса улеснява значително атаката на външния йон, тъй като всички стойности на свободната Гибсова енергия имат силно изрезени отрицателни стойности, както във вода, така и в пропанонитрил: $\Delta G^{29/78} = -19.4/ -19.3; -20.5/ -17.6$ и $-20.3/ -16.6$ kcal/mol съответно за образуването на фенолат-съдържащи комплекси с катехолат, карбоксилат и хидроксамат. Обоснованието на тези резултати се корени в промените в геометрията на фери-съдържащите структури, които ги правят по-нестабилни в сравнение с техните галий-съдържащи двойници: дължините на (PHEN)-O-M³⁺ връзките са около 0.12Å по-големи в Fe³⁺-комплексите, докато валентните ъгли (PHEN)-C-(PHEN)-O-M³⁺ са около 6-8° по-малки, което се проявява като следствие в по-напрегнати структури. Същата тенденция се запазва и в катехолат/ карбоксилат/ хидроксамат - съдържащата част на молекулата, където фери-йонът е от 0.05 до 0.23Å по-отдалечен от кислородните атоми в сравнение с галиевия йон. В същото време, съответстващите валентни ъгли са 4.4-5.4° по-големи в Ga³⁺ - комплексите.

- Аксиални спрямо екваториални не-PHEN-съдържащи комплекси

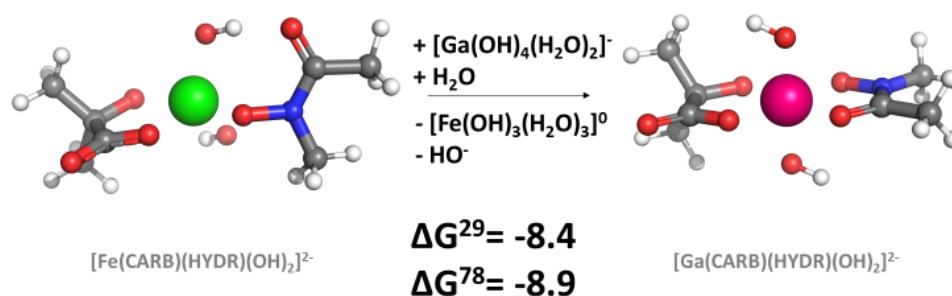
На Фигура 25 са представени резултатите от моделните реакции на галиева атака към желязни комплекси, изградени чрез комбиниране на катехолатен, карбоксилатен и хидроксаматен лиганди. Свободните Гибсови енергии на тези реакции, макар и отново отрицателни, са съществено по-малки по абсолютна стойност, отколкото тези, намерени за PHEN-съдържащите комплекси (Фигура 24).



b)



c)

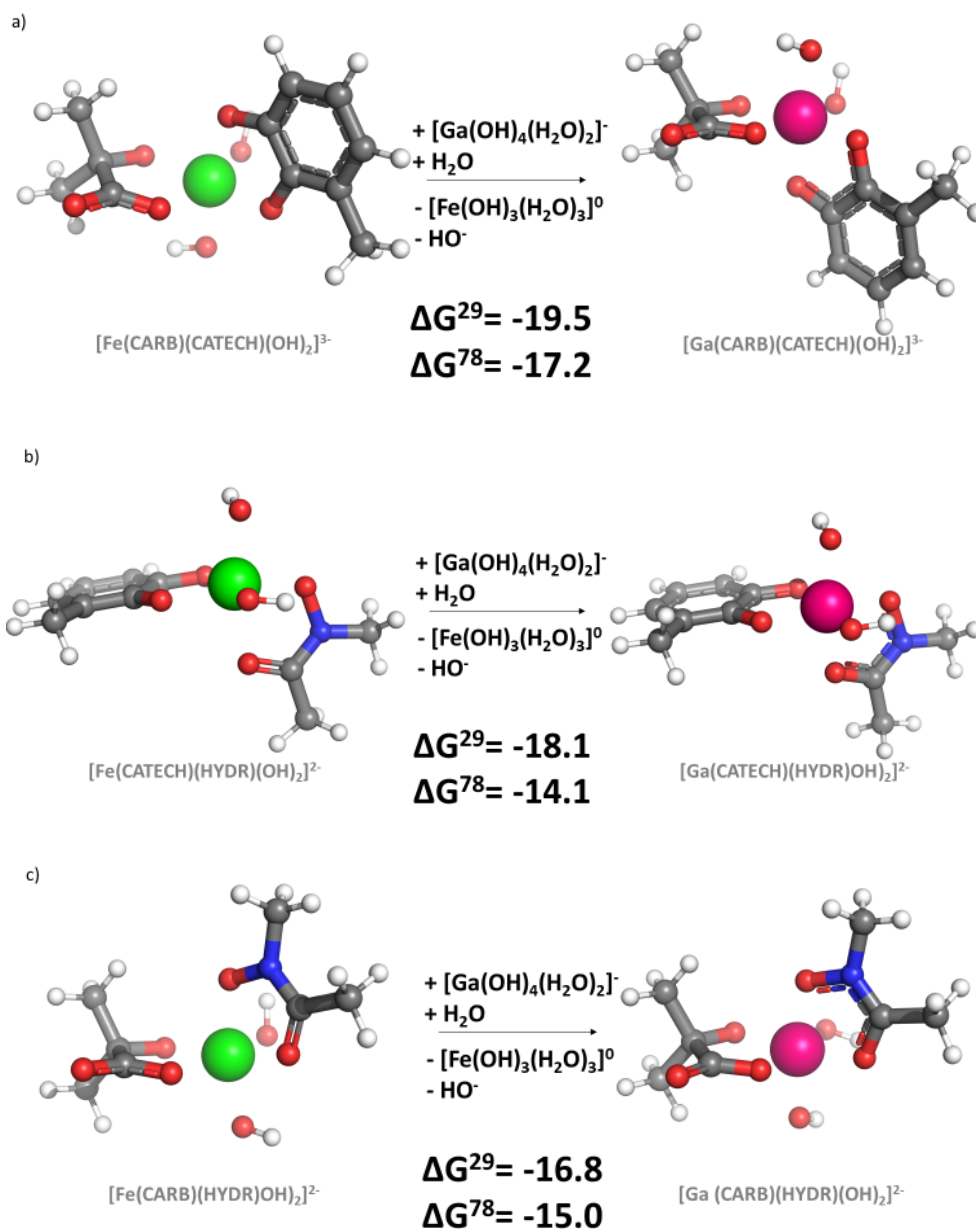


Фигура 25. ΔG° стойности (в kcal/mol) на реакциите на $\text{Ga}^{3+}/\text{Fe}^{3+}$ конкуренция за образуване на 1:2 не-PHEN-съдържащи комплекси с а) карбоксилат/катехолат, б) катехолат/ хидроксамат, с) карбоксилат/ хидроксамат и две аксиално разположени НО-групи в две различни среди. Показаните структури са оптимизирани на ниво ВЗLYP/6-31+G(3d,p) във вода.

Изчисленията показват, че комплексът $[\text{Fe}(\text{CARB})(\text{CATECH})(\text{OH})_2]^{3-}$ е най-уязвим за галиева атака и в двете среди, тъй като съответните свободни енергии на метален обмен са много по-отрицателни в сравнение с тези, получени за другите два комплекса: $\Delta G^{29/78}$ за $[\text{Fe}(\text{CARB})(\text{CATECH})(\text{OH})_2]^{3-}$ са -13.6/ -19.5 kcal/mol (Фигура 25 а)), докато $\Delta G^{29/78}$ за $[\text{Fe}(\text{CATECH})(\text{HYDR})(\text{OH})_2]^{2-}$ и $[\text{Fe}(\text{CARB})(\text{HYDR})(\text{OH})_2]^{2-}$ са респективно -9.0/ -8.4 и -8.4/ -8.9 kcal/mol (Фигура 25 б) и с)). Това най-вече се дължи на повишената стабилност на $[\text{Fe}(\text{CATECH})(\text{HYDR})(\text{OH})_2]^{2-}$ и $[\text{Fe}(\text{CARB})(\text{HYDR})(\text{OH})_2]^{2-}$ в сравнение с $[\text{Fe}(\text{CARB})(\text{CATECH})(\text{OH})_2]^{3-}$. Няколко фактора допринасят за този ефект: координационната връзка между Fe^{3+} йона и карбонилната ($-\text{C}=\text{O}$) – група от хидроксаматния лиганд се къса (Фигура 25 б) и с)), което от една страна сменя напрежението в тази част на комплекса, а от друга страна сближава двете аксиално разположени НО-групи към нативния йон. Може още да се допълни и че

освободената карбонилна група образува вътрешномолекулна водородна връзка с една от хидроксилните групи, което благоприятства енергетиката на желязния комплекс.

Вземайки под внимание алтернативната конфигурация на НО-групите в структурата на металните комплекси, т.е. едната в екваториално, а другата – в аксиално разположение, бяха моделирани досега разгледаните реакции, които са показани на Фигура 26.



Фигура 26. ΔG^\ominus стойности (в kcal/mol) на реакциите на $\text{Ga}^{3+}/\text{Fe}^{3+}$ конкуренция за образуване на 1:2 не-PHEN-съдържащи комплекси с а) карбоксилат/катехолат, б) катехолат/ хидроксамат, в) карбоксилат/ хидроксамат и една аксиално- и една

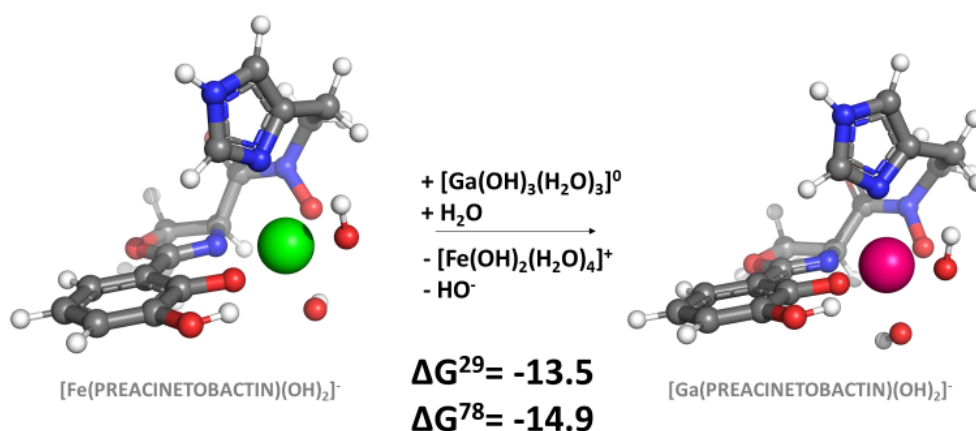
екваториално- разположени НО-групи в две различни среди. Показаните структури са оптимизирани на ниво B3LYP/6-31+G(3d,p) във вода.

Данните, показани на Фигура 26, демонстрират, че този тип на свързване на НО-групите благоприятства в голяма степен атаката на галиевия йон в сравнение с предишното им разположение (Фигура 25), тъй като свободните Гибсови енергии стават много по-отрицателни: $\Delta G^{29/78} = -19.5/ -17.2$ за (CARB)/(CAT), $-18.1/ -14.1$ за (CAT)/(HYDR) и $-16.8/ -15.0$ за (CARB)/(HYDR) комбинациите. Съчетанието от екваториално/аксиално разположение на хидроксилните групи позволява запазването на първоначалната октаедрична геометрия в желязо-съдържащите комплекси. В настоящия случай не се наблюдава разкъсването на връзката между (CARB)/(HYDR)-C=O участък и Fe^{3+} йона, което се получава при предишното разпределение на лигандите около метала (Фигура 25 b) и c)), в следствие на което напрежението в комплексите с нативния йон ги прави по-нестабилни (и по-податливи на атака от страна на външния галий). Променената конфигурация се отразява върху стойностите на валентните ъгли (те са $5-6^\circ$ по-малки в Fe^{3+} -комплексите), както и върху дължините на Fe^{3+} -лиганд връзките, които са $0.06-0.24\text{\AA}$ по-дълги в сравнение със съответстващите им Ga^{3+} -съдържащи структури.

2.4. Моделна реакция с преацинетобактин.

В светлината на изведените зависимости, засягащи моделни сидерофорни молекули, е от изключителен интерес да се види колко добре те могат да бъдат приложени към реални сидерофори. Съгласно експериментални данни най-податливата на галий-базирана терапия бактерия сред 6 изследвани вида е *Acinetobacter baumannii*, при която терапевтичният ефект на Ga^{3+} е наблюдаван при най-ниска концентрация на абиогенния метал. Основният метало-свързващ сидерофор, секретирани от бактерията, е доказано преацинетобактин. Интересно е още да се отбележи, че авторите използват галий като диамагнитен двойник на фери-йона, за да придобият доказателства за стехиометрията на метал-сидерофорния комплекс. Конкуренцията Ga^{3+}/Fe^{3+} е моделирана в случая с цялата молекула на сидерофора, чиято първоначална структура е взета от рентгенографски данни, депозирани в PDB (код 6H7F). Той е изграден от катехолат, който действа под формата на монодентатна лигираща група, по подобие на фенолата; близко разположени хидроксамат и два N-съдържащи пръстена (имидазол и

оксазолин). Оптимизираните структури на металните комплекси, както и съответните термодинамични данни за реакцията на заместване, са представени на Фигура 27.



Фигура 27. ΔG^\ominus стойности (в kcal/mol) на реакцията на $\text{Ga}^{3+}/\text{Fe}^{3+}$ конкуренция за свързване със сидерофора преацинетобактин в две различни среди в киселинни условия ($\text{pH} \approx 6$). Показаните структури са оптимизирани на ниво B3LYP/6-31+G(3d,p) във вода.

Съответстващите аква-комплекси на металните йони са $[\text{Ga}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^0$ и $[\text{Fe}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_4]^+$ в съответствие с експерименталните условия (киселинно $\text{pH} \approx 6$). Проведените изчисления предполагат, че галият наистина силно успява да свърже молекулата на преацинетобактина, както и че е потенциален конкурент на нативния Fe^{3+} (отрицателни стойности на ΔG^\ominus в двете изследвани диелектрични среди). Галиевият йон, макар и по-обемн, отново се разполага в по-голяма близост до лигиращите групи в сравнение с фери-йона. Ga^{3+} -съдържащият комплекс е по-компактен, което се вижда в най-голяма степен при разглеждането на дължините на координационните връзки, най-вече с азотните атоми от пръстените, където абиогенният йон е разположен с 0.18Å (оксазолин) и 0.24Å (имидазол) по-близо.

2.5. Дискусия.

➤ Фактори, определящи $\text{Ga}^{3+}/\text{Fe}^{3+}$ конкуренцията в сидерофори

Основната цел на настоящето изследване е да установи коя/кои група/и от четирите основни, изграждащи молекулите на сидерофорите, благоприятсват атака на абиогенния метал към желязо-съдържащите комплекси. В допълнение са дешифрирани някои структурни характеристики, които могат да наклонят баланса между конкуриращите се катиони. Първо, основната група, която може да бъде определена като благоприятстваща атаката на Ga^{3+} , е фенолатът. В първата група моделни реакции

$[\text{Ga}(\text{PHEN})(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ не просто се образува лесно във вода (отрицателна ΔG^{78}), но и притежава най-близката до нула ΔG^{29} в неполярната среда (Фигура 22). Освен това, всички двойни PHEN-съдържащи комплекси предпочетено образуват Ga^{3+} -структури, като съответните $\Delta G^{29/78}$ стойности са подчертано отрицателни (Фигура 24). Втората група с относително висок афинитет към външния катион е хидроксаматът, особено ако е свързан бидентатно (Фигури 22 d), 26 b) и c)). Нашите изчисления разкриват колко са важни вътрешномолекулните взаимодействия между лигиращите групи за решаването на изхода между конкуриращите се метали. Изложените данни на Фигура 25 и 26 ясно показват степента, в която се променят термодинамичните показатели, повлияни от създаването/разкъсването на водородни/координационни връзки. Чрез моделирането на реакциите в две различни среди беше установен ефектът на диелектричните свойства (полярност) на средата за $\text{Ga}^{3+}/\text{Fe}^{3+}$. Беше показано, че в по-слабо полярния пропанонитрил (имитиращ протеиновата обвивка на рецептора) металните комплекси могат да търпят такъв тип промени, че да се повлияе балансът между двата катиона. Стойността на рН на средата е друг фактор от съществено значение. Изчисленията предполагат, че в определени случаи промяната на рН на средата може напълно да обърне селективността спрямо метала (сравни Фигури 22 и 23). По този начин рН на средата изглежда важно средство за накланяне на везните в посока към единия или другия метал.

➤ *Биологична намеса*

Представените резултати, които разкриват, че абиогенният метален катион галий е потенциален конкурент на нативното желязо (III) за свързване със сидерофорите, са в съответствие с изложение в литературата експериментални данни. В две отделни изследвания, касаещи металната специфичност на двата основни сидерофора на бактерията *Pseudomonas aeruginosa* – пиохелин и пиовердин, способността на галия да свързва сидерофорите с висок афинитет е експлицитно доказана. Наред с други метали галият е единственият, който успява да се конкурира с желязото за образуване на метал-пиовердинов комплекс. Трябва да се отбележи още и че Ga^{3+} -пиовердиновият комплекс се конкурира с Fe^{3+} -пиовердиновия комплекс за свързване с рецептора от повърхността на бактериалната клетка. Пиохелиновият път, обаче, е много по-слабо селективен, отколкото пиовердиновия, като освен желязото и неговия физико-химичен двойник галия, той транспортира и редица други метали. Все пак, галият е този, който доказано се свързва най-силно със сидерофора. Образуваният комплекс лесно се разпознава от

рецептора и външният метален катион се транспортира в бактериалната клетка, макар и по-бавно спрямо този на нативния метал. В допълнение, друг сидерофор десфериоксамин В (desferrioxamine В), изграден изцяло от хидроксаматни метало-свързващи единици, доказано силно свързва Ga^{3+} , като рК на комплексообразуване е определена $29.5 M^{-1}$, относително близо до тази на нативното желязо (III), която е определена $32 M^{-1}$. Други метали, като цинк например, свързват DFO В със стойност на рК само от 12. Този сидерофор е от голямо значение, тъй като способността на бактерията, която го секретира, да образува биофилм, както и да расте - *Staphylococcus aureus*, се понижава при третиране с галий-базирани комплекси.

Неотдавнашни експериментални изследвания, засягащи различни видове микобактерии като *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium* комплекс (MAC) и *M. abscessus*, проучват потенциала на галия като антибактериален агент и показват обещаващи резултати. Олаканми и сътрудници конкретно изследват способността на галия да се конкурира с желязото (III) и предоставят данни, че абиогенният метал ефективно се натрупва в желязо-обогатени бактериални клетки, като по този начин понижава концентрацията на Fe^{3+} , докато обратният случай не се наблюдава (при добавянето на желязо към галий-обогатени клетки концентрацията на външния метал не се понижава съществено). Интересно е, че структурата на сидерофора карбоксимикобактин, секретирани от различните видове микобактерии, наподобява тази на преацинетобактина (показан от нас да проявява висок афинитет на свързване спрямо Ga^{3+}) в участъците си на метално свързване: изграден е от фенолат, оксазолин и два хидроксамата (в сравнение с монодентатен катехолат, оксазолин, един хидроксамат и имидазол в преацинетобактин, Фигура 27).

Изводи

- 1) Установени са факторите (рН и диелектрична константа на средата, вид на свързващата група), както и тяхното влияние върху конкуренцията между металите за свързване в структурите на Fe(III)-протеини.
- 2) Моделирана е реакцията на Ga³⁺/ Fe³⁺ на заместване в активен център на трансферин и е потвърдена с теоретични изчисления невъзможността на галия да измести желязото.
- 3) Моделирана е реакцията на Ga³⁺/Fe³⁺ на заместване в активен център на рибонуклеотид редуктаза. Показана е способността на абиогенния метален катион да се конкурира с нативния йон, вследствие на което се дезактивира ензимът.
- 4) Установено е, че галий(III) лесно образува монодентатни комплекси със субстратите на рибонуклеотид редуктазата, особено в β-пирофосфатния участък. Термодинамично стабилните бидентатни комплекси са основно в комбинация на α, β-положението.
- 5) Разкрито е влиянието на диелектричната константа на средата, като е установено, че взаимодействието между метала и NDP е предпочетено във водна среда.
- 6) Присъствието на голяма (пуринова) база повишава „печалбата“ на енергия в сравнение с малката (пиримидинова) база.
- 7) Образуването на Ga³⁺-NDP комплекси понижава концентрацията на свободните субстрати, както и значително изкривява тяхната геометрия, вследствие на което се нарушава разпознаването между субстрата и ензима.
- 8) Изследвани и определени са факторите (рН и диелектрична константа на средата, вид на лигиращата група), насочващи конкуренцията Ga³⁺/Fe³⁺ в моделни структури на Fe(III)-съдържащи бактериални сидерофори.
- 9) Установено е, че галий(III) предпочетено свързва РНЕН-съдържащи сидерофори, докато втората Ga³⁺-промотираща група е хидроксаматът.
- 10) Моделирана е реакцията на Ga³⁺/Fe³⁺ заместване в експлицитно заложена цялостна структура на сидерофора преацинетобактин. Установена е склонността му предпочетено да свързва абиогенния метален катион, вследствие на което се понижава концентрацията на нативното Fe³⁺, като в допълнение се блокира входът към клетката поради невъзможността на абиогенния метал да се редуцира.

Списък на публикациите, включени в дисертацията:

1. Nikolova V, Angelova S, **Markova N**, Dudev T. Gallium as a Therapeutic Agent: A Thermodynamic Evaluation of the Competition between Ga^{3+} and Fe^{3+} Ions in Metalloproteins. *J Phys Chem B*. 2016;120:2241–8. **(IF: 3.177; Q2)**
2. **Kircheva N**, Dudev T. Mechanism of therapeutic action of abiogenic Li^+ and Ga^{3+} ions: Insights from theoretical studies. *Bulg Chem Commun*. 2018;50:55–62. **(SJR: 0.137; Q4)**
3. **Kircheva N**, Dudev T. Novel Insights into Gallium's Mechanism of Therapeutic Action: A DFT/PCM Study of the Interaction between Ga^{3+} and Ribonucleotide Reductase Substrates. *J Phys Chem B*. 2019;123(26):5444–51. **(IF: 2.923; Q2)**
4. **Kircheva N**, Dudev T. Gallium as an Antibacterial Agent: A DFT/SMD Study of the $\text{Ga}^{3+}/\text{Fe}^{3+}$ Competition for Binding Siderophores. **изпратена в списание**

Забелязани цитати:

Nikolova, V., Angelova, S., Markova, N., Dudev, T., “Gallium as a Therapeutic Agent: A Thermodynamic Evaluation of the Competition between Ga^{3+} and Fe^{3+} Ions in Metalloproteins”, *Journal of Physical Chemistry B*, 120, 9 (2016), 2241-2248;

Цитира се в:

1. Zhichao Zeng; Ruiyue Ma; Chun Liu; Yongqian Xu; Hongjuan Li; Fengyu Liu; Shiguo Sun, “A crab-like fluorescent probe for Ga(III) detection in body fluids and biological tissues”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 250, pp. 267-273 @2017
2. Kolanowski, J. L.; Liu, F.; New, E. J. "Fluorescent probes for the simultaneous detection of multiple analytes in biology", *Chemical Society Reviews* 47(1), pp. 195-208, @2018
3. Kumar, P.; Burman, U.; Kaul, R.K. Ecological Risks of Nanoparticles: Effect on Soil Microorganisms (Book Chapter), *Nanomaterials in Plants, Algae, and Microorganisms 1*, pp. 429-452, @2018
4. Qi, J.; Qian, K.; Tian, L.; Cheng, Z.; Wang, Y. "Gallium(III)-2-benzoylpyridine-thiosemicarbazone complexes promote apoptosis through Ca^{2+} signaling and ROS-mediated mitochondrial pathways", *New Journal of Chemistry* 42(12), pp. 10226-10233, @2018
5. Qi, J.; Yao, Q.; Qian, K.; Tian, L.; Cheng, Z.; Wang, Y. "Gallium(III) complexes of α -N-heterocyclic piperidylthiosemicarbazones: Synthesis, structure-activity

relationship, cellular uptake and activation of caspases-3/7/9", Journal of Inorganic Biochemistry 186, pp. 42-50, @2018

6. Velikyán, I. "Prospective of 68 Ga Radionuclide Contribution to the Development of Imaging Agents for Infection and Inflammation", Contrast Media and Molecular Imaging 2018, 9713691, @2018

7. Gugala, N.; Chatfield-Reed, K.; Turner, R.J., Chua, G. "Using a chemical genetic screen to enhance our understanding of the antimicrobial properties of gallium against escherichia coli, Genes 10(1), 34, @2019

Участия в конференции и обучителни школи:

1. Modeling interactions in biomolecules, 02-09.09.2017, Pilsen, Czech Republic; "Gallium as a Therapeutic Agent: A Thermodynamic Evaluation of the Competition between Ga^{3+} and Fe^{3+} Ions in Metalloproteins" (постер)
2. XVII Национална Конференция по Химия за Студенти и Докторанти, 16-18.05.2018, София, България; „Теоретично изследване на абиогенни йони с терапевтичен ефект“ (устен доклад)
3. 16th International Congress in Quantum Chemistry, 18-23.06.2018, Menton, France; "Mechanism of Gallium's Therapeutic Action: A DFT/PCM Study of the Competition between Ga^{3+} and Fe^{3+} Ions in Metalloproteins" (постер)
4. Bio-Comp-Camp, Обучителна Школа 3, 24-28.09.2018, Банско, България
5. Chemistry Today for Tomorrow, A final conference in the framework of the project BG05M2OP001-2.009-0028 funded by operational program "Science and Education for Smart Growth, 1.02.2019, Sofia, Bulgaria; "The abiogenic ion Ga^{3+} and its mechanism of therapeutic action: insight from theoretical research" (устен доклад)
6. Национална студентска конференция по фармацевтични и химични науки, 4-5.04.2019г., София, България; "Theoretical study of gallium's mechanism of therapeutic action" (устен доклад)
7. "Advanced Materials" Workshop, 21-25.07.2019, Св. Св. Константин и Елена, Варна, България; "A DFT/PCM study of the complexation between Ga^{3+} and ribonucleotide reductase substrates" (устен доклад)
8. 10th Jubilee National Conference on Chemistry, 26-28.09.2019, Sofia, Bulgaria; "The abiogenic ion gallium and its mechanism of therapeutic action: insights from theoretical research" (устен доклад)

Участия в проекти:

1. „Галият като терапевтично средство. Изследвания върху процесите на конкуренция между Ga^{3+} и Fe^{3+} в биологични системи“; определен за финансиране въз основа на проведено от „СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ “СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“ ПРЕДЛОЖЕНИЕ ЗА ФИНАНСИРАНЕ ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТ В ОБЛАСТИТЕ НА НАУКАТА, В КОИТО УНИВЕРСИТЕТЪТ ПОДГОТВЯ СТУДЕНТИ И ДОКТОРАНТИ 2015 г.“ **(приключил)**.
2. “Теоретично изследване на влиянието на различни катиони върху образуването на комплекси на включване на химиотерапевтика цисплатин (cis-Pt) в циклодекстрини”; определен за финансиране въз основа на проведено от „СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ “СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“ ПРЕДЛОЖЕНИЕ ЗА ФИНАНСИРАНЕ ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТ В ПОДКРЕПА НА ДОКТОРАНТИ 2019 г.“ **(приключил)**.
3. „Интегрирано експериментално и теоретично изследване на взаимодействието на калциеви протеини със стронциеви йони. Следствия относно използването на стронция в медицината и фармакологията“, определен за финансиране въз основа на проведен от Фонд „Научни изследвания“ „КОНКУРС ЗА ПРОЕКТИ ПО ПРОГРАМИ ЗА ДВУСТРАННО СЪТРУДНИЧЕСТВО 2018 г. – БЪЛГАРИЯ – РУСИЯ 2018-2019 г.“ **(настоящ)**.
4. „Комплекси на флуоресцентни багрила с биомиметични молекулни контейнери - BIRDCagE.“; определен за финансиране въз основа на проведен от Фонд „Научни изследвания“ „КОНКУРС ЗА ФИНАНСИРАНЕ НА ФУНДАМЕНТАЛНИ НАУЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ– 2019 г.“ **(настоящ)**.