



СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“
ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЯ И ФАРМАЦИЯ
Катедра „Фармацевтична и приложна органична химия“

Николай Ангелович Тошев

Теоретично изследване на факторите, управляващи процесите на свързване и селективност на инхибитори на хистон деацетилазата

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация, представена за присъждане на образователна и научна

степен

„Доктор“

по професионално направление 4.2. Химически науки

(Теоретична химия)

Научни ръководители:

проф. дхн Тодор Минков Дудев

доц. д-р Диана Валентинова Чешмеджиева

София, 2021



Николай Ангелович Тошев

**Теоретично изследване на факторите, управляващи
процесите на свързване и селективност на инхибитори на
хистон деацетилазата**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация, представена за присъждане на образователна и научна
степен

„Доктор“

по професионално направление 4.2. Химически науки
(Теоретична химия)

Научни ръководители: **проф. дхн Годор Минков Дудев**
доц. д-р Диана Валентинова Чешмеджиева

Научно жури:

проф. дхн Годор Дудев
проф. дхн Борис Гълъбов
проф. дхн Васил Делчев
проф. д-р Наташа Трендафилова
доц. д-р Галя Маджарова

София, 2021

Дисертацията съдържа 87 страници, в които са включени 31 фигури, 35 уравнения, 20 таблици, 6 схеми и са цитирани 141 литературни източника.

Номерацията на фигурите, уравненията, таблиците и схемите в автореферата съвпадат с тези от дисертационния труд.

Дисертационният труд е обсъден и насрочен за защита на катедрен съвет на Катедра „Фармацевтична и приложна органична химия“ към Факултета по химия и фармация на СУ „Св.Климент Охридски“ гр.София, проведен на 15.04.2021г.

Николай Тошев е бил редовен докторант през периода 07.07.2017г. до 01.12.2019г. и задочен докторант през периода 01.12.2019г. до 01.09.2020г.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на __.07.2021г. от __:__ часа в Заседателната зала на Факултета по химия и фармация на СУ „Св.Климент Охридски“.

Материалите по защитата са на разположение в Деканата на ФХФ, СУ, бул.Джеймс Баучър №1, стая 107, и са публикувани на интернет страницата на ФХФ, СУ.

Благодарности

Бих искал да изразя огромната си благодарност и признателност на моите учители в науката проф.дхн Тодор Дудев и доц.д-р Диана Чешмеджиева за огромното търпение, доверие, вяра и подкрепа. Малко са думите на благодарност, които мога да изразя към доц. Чешмеджиева за търпението, с което тя ме учеше да обръщам внимание на детайлите и да вниквам в дебрите на Теоретичната химия. Проф.Дудев като опитен пълководец успя да ме изведе до защита, въпреки всички обрати, които неминуемо следваха целия път на докторантурата ми. **БЛАГОДАРЯ ВИ!**

Всъщност всичко започна от моите учители в гимназията Зоя Главинова и Лиляна Балева, продължи с академичните наставници асистент В. Делчев (понастоящем проф. дхн В.Делчев, ПУ „П.Хилендарски“) и асистент Пламен Ангелов (понастоящем доц. д-р П. Ангелов, ПУ „П.Хилендарски“), които ме подготвиха за поредната олимпиада по химия. **БЛАГОДАРЯ ВИ!**

Благодаря и на всички преподаватели във Факултета по химия и фармация и Катедра „Аналитична химия“ (проф.Ганева, доц.Дакова, проф.Караджова), където положения преди това фундамент успя да се втърди и надстрои! **БЛАГОДАРЯ ВИ!**

Специално място в сърцето ми заемат колегите от Института по електрохимия и енергийни системи на БАН! **БЛАГОДАРЯ ВИ!**

Благодаря на хората, които бяха до мен и изиграха ключова роля в много трудни и решаващи за мен моменти - Васил Базелков, Мина Ветренска, Детелина Христова, Алена Палашева, Огнян Аргиров, Йолина Хубенова, Нина Георгиева, Деница Ничева, Силвия Христова, Мария Петрова, Калина Каменова-Петрова, Пламен Даскалов, Тихомир Бъбаров и още много.....! **БЛАГОДАРЯ ВИ!**

Посвещавам настоящата дисертация на моето семейство!

С огромна обич към родителите ми, които ме подкрепяха безусловно и бяха зад мен и на прекрасната ми съпруга, която с огромно търпение и вяра също извървя този труден път с мен !!!

БЛАГОДАРЯ ВИ!

Съдържание

I. Увод	6
II. Цел и задачи на дисертационния труд	9
III. Резултати и обсъждане	11
1. Изчислителен протокол	11
2. Калибриране/валидиране на изчисленията.	12
3. Хидроксамови киселини - изомерия, тавтомерия, метално координиране.....	13
4. Тавтомерни форми при депротониране на SAHA.....	17
5. Метален афинитет и селективност на SAHA	20
6. Конкуrentно заместване на двувалентни биогенни метали в комплекси на SAHA.....	22
7. Тавтомерия, метален афинитет и селективност на сяра и селенови производни на хидроксамови киселини (SAHA-S, SAHA-Se) с модифицирана хидроксилна група	24
8. Тавтомерия, метален афинитет и селективност на S и Se производни на хидроксамови киселини с модифицирана карбонилна група (carb-S-SAHA и carb-Se-SAHA)	31
9. Фактори, управляващи процесите на свързване, афинитет и селективност на инхибиторите на хистон деацетилазата към активния център на ензима HDAC8	40
9.1. Изследвани инхибитори.....	40
9.2. Моделиране на активния център	41
9.3. Влияние на дължината на линкера	42
9.4. Ефект от модифицирането на крайната група	46
9.5. Модификацията на свързващата група	47
9.6. Безлинкерни инхибитори	49
IV. Изводи	52
V. Приноси	54
1. Участия в национални и международни форуми, свързани с дисертационния труд	54
2. Публикации, свързани с дисертационния труд	55
3. Награди	56
4. Участие в проекти.....	56
VI. Литературни източници	57

I. Увод

Един от съвременните подходи за лечението на раковите заболявания се свързва с използването на епигенетични лекарства, които са в състояние да нормализират различни състояния, свързани с промени, които претърпяват белтъците. Установено е, че генната експресия е дерегулирана при редица социално значими заболявания и пряко корелира с развитието на заболяването. Този тип лекарства повлияват генната транскрипция и водят до нормализиране на експресията им.

Нарушаването на баланса между ацетилирането и деацетилирането на хистоните е един от молекулярните механизми, проявяващ се при развитието на такива заболявания като рак, неврологични заболявания, имунни заболявания, вирусни и паразитни инфекции, алкохолна зависимост. Нарушаването на този баланс води до дерегулирана експресия на хистон деацетилазите.

Човешките хистон деацетилази (HDACs), са група от 18 ензима, класифицирани в четири класа. Клас I, II и IV са металопротеини и изискват метален кофактор, докато клас III, наречени сиртуини, изискват NAD^+ като кофактор.

HDAC8 е най-добре изучения ензим от семейството на човешките хистон деацетилази. Той е протеин, съдържащ 377 аминокиселини, който се намира в ядрото и цитоплазмата. Неговата експресия е дерегулирана при редица ракови заболявания, което го превръща във важна терапевтична мишена.

Епигенетичните лекарства, инхибитори на хистон деацетилазата (HDACi), инхибират активността на хистон деацетилазните ензими. В резултат на инхибирането, в туморни клетки се наблюдава спиране на клетъчния растеж, диференциация и апоптоза. Това насочва вниманието към изучаването на HDACi, както и на взаимодействията между HDACi и HDACs.

Хидроксамовите киселини са клас обещаващи органични биолиганди, които се свързват с хистон деацетилазите. Чрез хидроксамовата си глава те се координират към металния кофактор в центъра на HDACs, реализирайки по такъв начин инхибиторното си действие. Останалата част от молекулата на хидроксамовите киселини чрез серия от електростатични и Ван-дер-Валсови взаимодействия се свързва с различни участъци на ензимния джоб, стабилизирайки допълнително по такъв начин ензимно-инхибиторната система. S и Se аналози на хидроксамовите киселини, също инхибират металопротеините и имат съществен инхибиторен потенциал.

През 2006 г. FDA, одобрява първия лекарствен препарат - инхибитор на хистон деацетилазата, SAHA (suberoyl anilide hydroxamic acid; субероиланилид хидроксамова киселина). SAHA е лекарство с приемлив терапевтичен индекс, с ниска токсичност и проявява средна ефикасност (за разлика от веществата с по-висока ефикасност, които обаче проявяват и по-висока токсичност).

През периода 2006-2021г. са одобрени други хидроксамови киселини - инхибитори на хистон деацетилазата (Panobistat, Entiostat) с приложение в клиничната практиката.

За съжаление, всички одобрени към настоящия момент HDACi едновременно инхибират множество изоформи на HDACs. При множественото инхибиране едновременно се инхибират всички форми на хистон деацетилазата, в резултат на което се разрушават молекулярни пътища, свързани не само с онкогенезата, но и такива, които са свързани с други важни за организма процеси. В резултат на това се наблюдават множество странични ефекти - умора, диария, тромбоцитопения, сърдечна токсичност.

Селективното инхибиране, се счита за един от подходите, който може да разреши този проблем. При него изоформено-специфичен инхибитор (HDACi) се свързва с определена изоформа на HDACs, реализирайки по такъв начин инхибиторния си потенциал.

Всъщност, началото на второто десетилетие на XXI век, поставя концепцията за изоформеното инхибиране във фокуса на медицинските химици като подход за минимизиране на страничните ефекти от действието на лекарствените препарати и повишаването на терапевтичния индекс. Това обаче изисква детайлно познаване на взаимодействията в HDACi-HDAC8 системата, с цел създаването на селективни към определена изоформа инхибитори.

Началото на тези изследвания е положено в края на 90-те години на XX век, когато Finnin и съавтори [1], провеждат изследване на две хидроксамови киселини – TSA (Trichostatin A) и SAHA, в което те анализират взаимодействията и свързването им в активния център на ензима HDAC8. Това е първото изследване, което от една страна поставя фундамент, а от друга страна отправя много въпроси за факторите, управляващи процесите на свързване на инхибиторите на хистон деацетилазата и HDAC8. Тук е и първото направление в настоящия дисертационен труд, което се стреми да даде отговор на въпросите: как промяната на структурата на инхибитора, чрез варирането и модифицирането на различни структурни участъци, води до промяна на неговия афинитет/селективност, кои промени във

фармакофорния модел водят до усилването, а кои до отслабването на взаимодействията в ензимния джоб ?

Второто направление на изследванията е свързано с установяването на афинитета/селективността на хидроксамови киселини и техни сяра и селен съдържащи производни към биогенни двувалентни йони.

В настоящия дисертационен труд чрез моделна система ние искаме да установим как се изменя афинитета/селективността на инхибиторите на хистон деацетилазата към двувалентни йони.

Целта на настоящата дисертация е установяването на факторите, управляващи процесите на свързване и селективност на инхибитори на хистон деацетилазата, както и ролята на металния кофактор в ензимния процес.

II. Цел и задачи на дисертационния труд

Цел на настоящата дисертация е с помощта на теорията на функционала на плътността да се проведе систематично теоретично изследване на факторите, управляващи процесите на свързване и селективност на инхибиторите на хистон деацетилазата. За да дадем отговор на тези въпроси е необходимо да се изследват:

- I) физикохимичните свойства на хидроксамовите киселини и модифицираните със сяра и селен аналози на хидроксамовите киселини, използвайки като моделна молекула SAHA;
- II) факторите, управляващи процесите на свързване и афинитета/селективността на хидроксамовите киселини към активния център на ензима HDAC8;

За изпълнението на така поставената цел (I) е необходимо да се изпълнят следните задачи:

1. Да се определи стабилността на тавтомерните форми, геометрията, енергията на свързване и енергията на депротониране на SAHA и на модифицираните с S и Se аналози на SAHA, както в газова фаза, така и в разтворител.
2. Да се определи стабилността на депротонираните тавтомерни форми на SAHA и на модифицираните с S и Se аналози на SAHA, както в газова фаза, така и в разтворител.
3. Да се моделират комплекси на SAHA и на модифицираните с S и Se аналози на SAHA с двувалентни биогенни метални йони (Zn^{2+} , Fe^{2+} и Mg^{2+}), да се определи геометрията, енергиите на свързване и депротониране на съответните метал-лиганд комплекси, както в газова фаза, така и в разтворител.

За изпълнението на така поставената цел (II) е необходимо да се изпълнят следните задачи:

1. Да се сравни и установи афинитета на серия структурно подобни на SAHA хидроксамови киселини към HDAC8;
2. Да се моделират взаимодействията между хидроксамовите киселини и активния център на ензима HDAC8, за да се установят факторите, които управляват процеса на свързване на хидроксамовите киселини към активния център на хистон деацетилаза HDAC8;
3. Да се установи как се изменя афинитета и селективността на серия хидроксамови киселини при промяната на различните елементи от фармакофорния модел на

инхибитора (наличие/липса на линкер, промяна на дължината на линкера, структурата и вида на крайната група, вида на свързващата частица) към HDAC8;

4. Да се установи как „вътрешните“ и „външните“ фактори влияят на афинитета/селективността на инхибитора към активния център на HDAC8;

5. Да се определи най-приложимия фармакофорен модел за структурно подобните на SAHA хидроксамови киселини, когато те са свързани с HDAC8;

III. Резултати и обсъждане

1. Изчислителен протокол

В настоящия дисертационен труд, с помощта на теорията на функционала на плътността е проведено детайлно квантово-химично изследване на хидроксамовите киселини, техните сярра и селен производни, както и на свързването на хидроксамовите киселини към активния център на ензима HDAC8.

Изследванията са проведени с помощта на програмния пакет за квантово-химични изчисления Gaussian 09 [2]. Молекулната геометрия на молекулата/комплекса е оптимизирана, след което е проведен вибрационен анализ с цел доказване на локален минимум на потенциалната повърхност. Физико-химичните величини, изменения на енталпията (ΔH) и Гибсовата свободна енергия (ΔG), са изчислени съгласно следните стандартни формули:

$$\Delta H = \Delta E_{el} + \Delta E_{th} + p\Delta V \quad (13)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (14)$$

където ΔE_{el} , ΔE_{th} и ΔS са, съответно, измененията в електронната енергия, термичната енергия и ентропията между продуктите и реагентите на реакцията, а $p\Delta V$ е работен член.

Изчисленията бяха проведени в газова среда, воден разтвор (диелектрична константа $\epsilon = 78$) и метанол (модел на диелектрична среда в ензимен активен център, $\epsilon = 33$). За пресмятане на изменението на свободната енергия в разтворител е използван следният термодинамичен цикъл (сх.1),

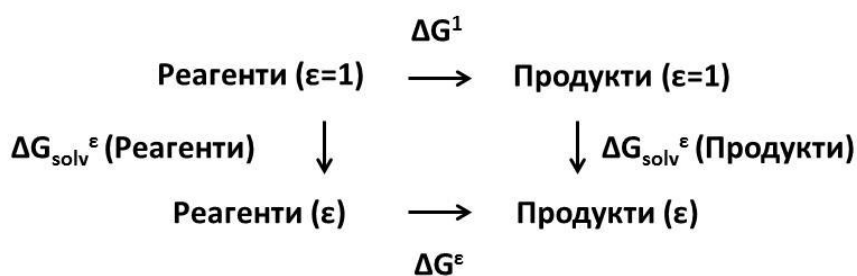


Схема 1. Термодинамичен цикъл за изчисляване на свободната енергия в кондезирана фаза.

където ΔG^1 е свободната енергия в газова фаза, ΔG^ϵ е свободната енергия в кондензирана среда, характеризираща се с диелектрична константа ϵ . Изчисляването на свободната енергия на солватация, $\Delta G_{\text{solv}}^\epsilon$, т.е енергията за пренос на молекулата от газова фаза в среда с диелектрична константа ϵ , се изчислява чрез използването на РСМ метода. Така, изменението на свободната енергия в кондензирана среда, ΔG^ϵ , е:

$$\Delta G^\epsilon = \Delta G^1 + \Delta G_{\text{solv}}^\epsilon (\text{продукти}) - \Delta G_{\text{solv}}^\epsilon (\text{реагенти}) \quad (15)$$

2. Калибриране/валидиране на изчисленията.

За оптимизирането на SAHA и нейните S и Se производни е използван хибридният функционал B3LYP [3] с базис 6-311++G(d,p) [4]. Анализът на литературата за изследванията на хидроксамовите киселини с помощта на квантово-химични методи ни насочи към избора на комбинация от метод и базисен набор [5]. Използването на хибридният функционал B3LYP с базис 6-311++G(d,p) е подходящ за изследването на стабилността и геометриите на конформерите на различни хидроксамови киселини. От друга страна, това е популярен и евтин метод за предсказване на геометрии, честоти и енергии, и е подходящ за изследване на метални комплекси [6], [7], [8].

Комбинацията от метод и базис беше избрана, от една страна, на база описаните предишни изследвания на хидроксамовите киселини, и, от друга, на базата на проведена наша собствена валидация на приложимостта на този модел, чрез сравнение с налични експериментални данни [9], [10]. Данните са представени в табл.4. Както се вижда, предсказаните геометрични параметри са в много добро съответствие с експерименталните стойности.

Таблица 4. Сравнение на изчислени и получени експериментални средни стойности на връзката метал-кислород и метал-азот в комплекси на Mg^{2+} , Zn^{2+} и Fe^{2+} . Дължините на връзките са представени в Å.

Комплекс	Връзка	Експериментална стойност	Изчислена стойност B3LYP/6-311++G (d, p)
$[Mg(H_2O)_6]^{2+}$	Mg-O	2.07±0.03,[7]	2.11
$[Zn(H_2O)_6]^{2+}$	Zn-O	2.08±0.03,[7]	2.13
$[Fe(H_2O)_6]^{2+}$	Fe-O	2.12/2.13, [9]	2.14
$[Mg(H_2O)_5(imidazole)_1]^{2+}$	Mg-N	2.19±0.06,[10]	2.14
$[Zn(H_2O)_n(imidazole)_1]^{2+}$	Zn-N	2.00±0.02,[11]	1.97
$[Mg(H_2O)_5(imidazole)_1]^{2+}$	Fe-N	2.06±0.11,[10]	2.04

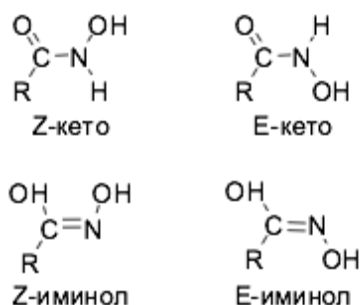
Всички изчисления на ензимно-инхибиторните комплекси в настоящия дисертационен бяха извършени с помощта на програмния пакет Gaussian09 [2]. Комплексите между хидроксамовите киселини и активния център на ензима HDAC8 бяха оптимизирани в газова фаза на ниво на теория B3LYP/6-31+G(d), в резултат, на което бяха получени съответните електронни енергии на изучаваните комплекси - E_{el}^1 . Изборът на този метод и базис е на базата на предишни проучвания [12], с помощта на който е установено, че този набор от метод и базис, с висока точност описва молекулната геометрия, свойствата на изследваните молекули и техните производни, както и добре съвпада с експериментални данни [13],[14].

3. Хидроксамови киселини - изомерия, тавтомерия, метално координиране.

Хидроксамовите киселини са едни от най-важните класове органични биолиганди. Могат да се разглеждат като производни на хидроксиламина и карбоксилните киселини. Притежават по-висока хелатираща способност от съответните карбоксилни киселини [15]. Хидроксамовите киселини са слаби киселини със стойности на pK_a на N-OH протона във водни разтвори от порядъка на 8.5-9.4 [16]. Съществуват данни, че в непротонни полярни разтворители като DMSO някои от хидроксамовите киселини се държат по-скоро като N-H киселини, отколкото като N-OH киселини [17], [18].

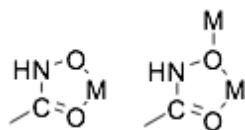
За хидроксамовите киселини е характерна кето-иминолна тавтомерия, като те могат да съществуват под формата на кето (1Z, 1E) и иминолна форма (2Z, 2E), всяка от които има две ротамерни форми [19]. В резултат на свободното въртене около C-N връзката, хидроксамовите киселини, хидроксаматото и хидроксиматото анионите могат да проявяват освен кето-иминолна тавтомерия, така и цис/транс (Z, E) изомерия (фиг.14).

Кето формата преобладава в кисела среда, докато енолната форма е по-стабилна в алкална среда. С помощта на ЯМР спектроскопия е доказано, че всеки тавтомер може да съществува като (Z) и (E) изомер [20] (фиг. 14).



Фигура 14. Тавтомерни форми на хидроксамовите киселини.

Производните на хидроксамовата киселина са сред най-ефективните хелатиращи групи между познатите натурални и синтетични инхибитори на хистон деацетилазата. Способността на хидроксамовата част да действа като лиганд спрямо металните йони е разнообразна и предопределя възможността за получаването на различни метални комплекси. За хидроксамовите киселини е известно, че инхибират уреазата, динуклеарен Ni^{2+} - съдържащ ензим, който катализира хидролизата на карбамид до карбамат и амоняк. [21], [15].



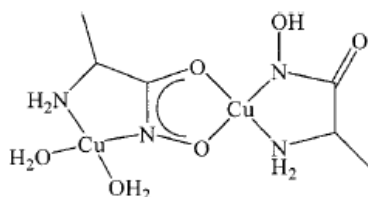
Фигура 15. Бидентатно координирани метални комплекси с хидроксамови киселини.

Най-разпространения начин на свързване на метала към хидроксамовите киселини е чрез свързването му с хидроксаматото частта и карбонилния кислород, образувайки стабилен 5 атомен хелатен пръстен (фиг.15). Цветните комплекси на метали с хидроксамови киселини намират широко приложение в аналитичната химия. Бидентантното координиране на монохидроксамовите киселини към преходни метални йони като Fe^{3+} , Co^{2+} и Ni^{2+} , води до

образуването на 3:1 октаедрични комплекси [15], [22], [23], докато в случаите на Cu^{2+} 2:1 тетрагонални комплекси, които имат допълнителни 2 монодентантни лиганда, е предпочитаната геометрия [24], [25].

Наблюдавано е и монодентатното координиране чрез депротонирането на N или O атом, но неговата реализация изисква специални условия за осигуряване на допълнителна стабилизация на комплекса.

Добавянето на допълнителна група, може да доведе до значително увеличение на координационната способност на хидроксаматната група [26], [27]. Такъв пример е комплексът на Cu^{2+} с α -аминохидроксамови киселини – фиг. 16.



Фигура 16. Комплекс на Cu^{2+} с α -аминохидроксамови киселини

Други важни физиологични функции на хидроксамовите киселини е способността им да освобождават NO в прости биологични системи [15], т.е. да оказват хипотензивен ефект [28]. Установена е и възможността на някои представители на хидроксамовите киселини (напр. тепоксалин) да бъдат инхибитори на циклооксигеназите COX_1 и COX_2 . [29].

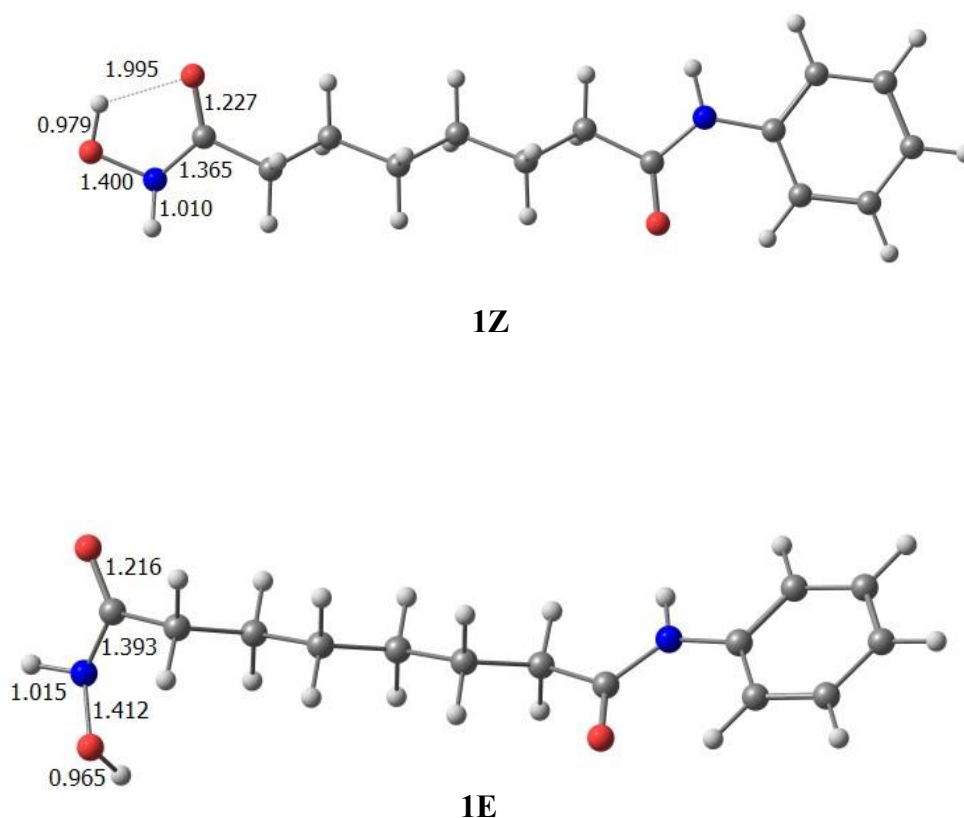
За всички изследвани молекули в настоящия дисертационен труд първоначално са определени стабилните конформери на неутралната и депротонираните форми. Това е необходимата първа стъпка, за да може изхождайки от получените резултати да се установи конкретна форма на свързване с биогенните двувалентни йони (Zn^{2+} , Fe^{2+} и Mg^{2+}) в металните комплекси.

Нашите изчисления с помощта на теорията на функционала на плътността разкриха стабилните конформери на SAHA в газова фаза и разтворител (вода и метанол). Най-стабилна в газова фаза се оказа 1Z-кето формата. Данните са представени в табл. 5.

Таблица 5. Относителни, спрямо най-стабилния конформер, свободни гибсови енергии в (kcal/mol) на кето и иминолните тавтомери на SAHA, получени при пълна оптимизация в газова фаза- ΔG_{SAHA}^1 , в метанол - ΔG_{SAHA}^{33} и във вода - ΔG_{SAHA}^{78} при ниво на теория B3LYP/6-311++G(d, p).

	ΔG_{SAHA}^1	ΔG_{SAHA}^{33}	ΔG_{SAHA}^{78}
1Z	0.0	0.0	0.0
1E	2.1	1.9	1.9
2Z	2.7	-	5.4
2E	12.7	-	11.2

На фиг. 17 е показана оптимизираната геометрия на 1Z-кето и 1E-кето тавтомерите на SAHA в газова фаза.



Фигура 17. Оптимизирани геометрии на 1Z-кето и 1E-кето тавтомер на SAHA - B3LYP/6-311++G(d, p).

От табл.5 се вижда общата тенденция, че кето формите са по-стабилни от имино формите. Най-голямата стабилност в серията на 1Z-кето формата се дължи на наличието на вътрешномолекулна водородна връзка .

При 1Z-кето конформера, за разлика от 1E-кето конформера, е възможно образуването на вътрешномолекулна водородна връзка (фиг. 17). Данните за термодинамично по-изгодния 1Z-кето конформер са в съгласие с предишни ЯМР изследвания [30].

В разтворител най-стабилния конформер също е 1Z – кето формата. Разликата при двата конформера 1Z-SAHА и 1E-SAHА намалява незначително - 1.9 kcal/mol при изменение на разтворителя. Относителните свободни енергии в kcal/mol са представени в табл. 5 [13].

В хода на изследването можем да заключим, че кето – тавтомерните форми са по-стабилни от иминолните форми, 1Z- кето тавтомерът е по-стабилен от 1E- кето тавтомера, а промяната в полярността на средата не влияе на относителната стабилност на конформерите.

Сравнявайки стабилността на кето тавтомерните форми на SAHА можем да запишем следния ред на намаляването на стабилността: 1Z>1E>2Z>2E.

4. Тавтомерни форми при депротониране на SAHА

Въпреки, че SAHА е достатъчно изследван обект, предвид използването му като одобрен лекарствен препарат, неговата форма на депротониране в комплексите с ензими е все още дискуссионна [31].

За хидроксамовите киселини е характерно наличието на два потенциално кисели протона в хидроксамовата глава (O-H и N-H), което обуславя два потенциално възможни механизма на депротониране (сх.3). pK_a за депротониране на протона от хидроксилната група е интервала от 8.5-9.4 [17], [18]. В апротонни разтворители някои аналози на хидроксамовите киселини се проявяват по-скоро като N-H вместо O-H киселини. [18]. Различни експериментални и теоретични изследвания върху Zn-съдържащи ензими показват, че свързването с цинковия йон води до понижаване на pK_a на лиганда [32], [33], [34], [35]. Най-вероятно, слабите киселини се свързват с цинковия йон в депротонирана форма, а киселият протон се пренася към съседната диада His-Asp [36].

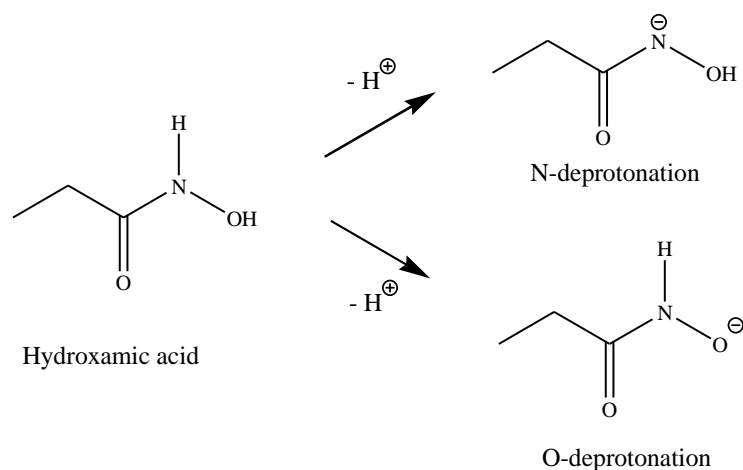


Схема 3. Възможни механизми на депротониране на хидроксамовите киселини.

Първоначално проведохме оценка на стабилността на получените депротонирани форми в газова фаза, а след това и в разтворител (вода). За да изпълним така поставената задача моделирахме двата възможни варианта (ОН и NH пътища) на депротониране на SAHA, които са представени на сх.3. Реакцията на депротониране може да бъде представена като $A \rightarrow A^- + H^+$. Изчислени са гибсовите енергии на депротониране и са изследвани само двата най-стабилни йона при депротониране на 1Z и 1E изомерите. Резултатите са представени в табл. 6.

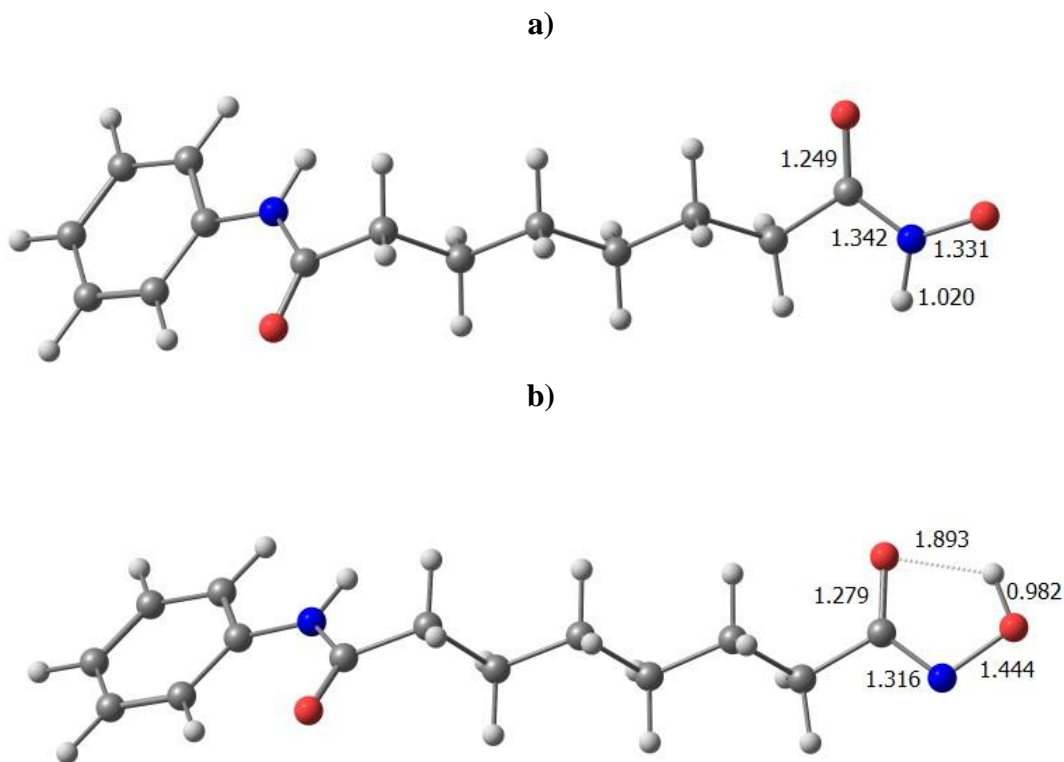
Таблица 6. Изменение на Гибсовите енергии (в kcal/mol) в газова фаза и във вода за реакцията на депротониране на SAHA ($AH \rightarrow A^- + H^+$).

	ΔG_{SAHA}^1	ΔG_{SAHA}^{78}
1Z, O-депротонирана	347.9	24.6
1E, O-депротонирана	339.5	26.0
1Z, N-депротонирана	334.2	19.9
1E, N-депротонирана	341.8	25.2

Експериментално получените стойностите за $\Delta G_{solv}^{78}(H^+)$ за -264.0 kcal/mol са получени от експериментални данни [37].

След оптимизирането на геометрията на депротонирани форми, установихме, че най-стабилна в газова фаза е 1Z-N-депротонираната форма и при двата конформера на SAHA (фиг.18-a). В газова фаза тази форма е с 13.7 kcal/mol по-стабилна от 1Z-O-депротонираната (фиг.18-b). Тази разлика намалява два пъти в полярна среда, но въпреки това остава достатъчно висока (4.7 kcal/mol във вода). Обяснението на по-високата стабилност се дължи

на вътрешномолекулната водородна връзка, която се запазва в 1Z-N-депротонираната форма за разлика от останалите форми (фиг.18). Следва да отбележим, че изчислената от нас свободна енергия на депротониране в газова фаза (334.2 kcal/mol, табл. 6) много добре корелира с експериментално установената стойност (339.1 kcal/mol) и разкрива, че ацетохидроксамовата киселина CH_3CONHOH се държи в основата си като NH киселина в газова фаза [38].



Фигура 18. Оптимизирани геометрии на депротонирани форми на SAHA при B3LYP/6-311++ G (d, p) ниво на теория а) 1Z-O-депротонирана форма и б) 1Z-N- депротонирана форма. Дължините на връзките са дадени в Å.

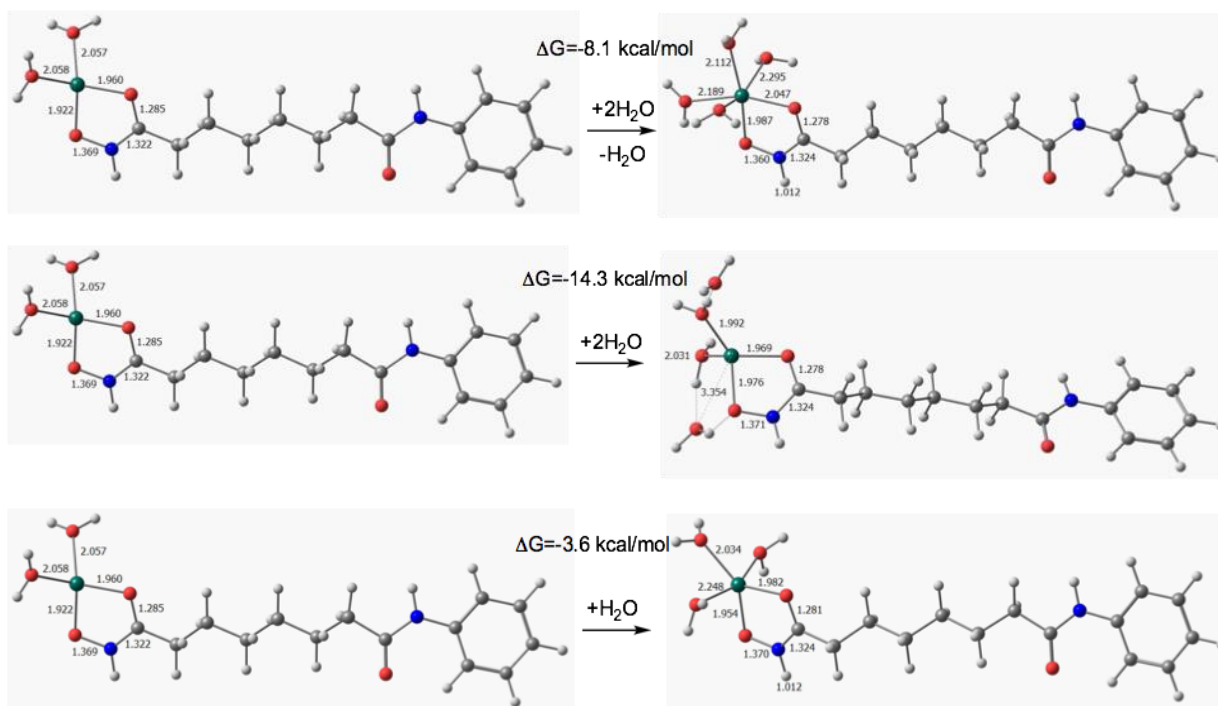
Във водна среда 1Z-N-кето депротонирания конформер, също остава най-стабилен (табл. 6). За 1E- конформерите е установена обратната тенденция: 1E-O-депротонирани форми, които се характеризират с по-ниска стойност на ΔG , изглежда да бъдат по-стабилни в сравнение с техните 1E-N-депротонирани аналози.

5. Метален афинитет и селективност на SAHA

С помощта на B3LYP функционала изследвахме взаимодействието на три биогенни двувалентни метални йона (Zn^{2+} , Fe^{2+} и Mg^{2+}) с хидроксамова киселина SAHA. Установихме предпочитаното координационно число и геометрия на свързване на SAHA със съответните метали (Zn^{2+} , Fe^{2+} и Mg^{2+}), вида и геометрията на получените комплекси, изяснявайки по такъв начин влиянието на лиганда и металния йон в хода на комплексообразването.

За да изясним селективността на лиганда, първоначално определихме координационното число на цинковия йон в комплексите с SAHA. Координационната геометрия на двувалентния йон е определяща за структурата и свойствата на металните комплекси. От нея можем да съдим за силата на взаимодействие между катиона и лиганда. Металния катион чрез своите характеристики (вид, заряд, йонен радиус) определя начина на свързване с лиганда (хидроксамова киселина) и вида на получения комплекс.

В настоящия дисертационен труд изследвахме промяната на гибсовите енергии при промяна на координационното число на цинковите комплекси с SAHA. Моделирахме няколко цинкови комплекси с лиганда, които се различават по броя на координираните водни молекули (водата е разгледана експлицитно). Цинковите йони се свързват в хексааква комплекси, но при координирането на активни молекули е установено, че цинкът предпочита тетраедрична координация. За тази цел създадохме няколко моделни системи, чиито структури и относителните гибсови енергии са показани на фиг.19.



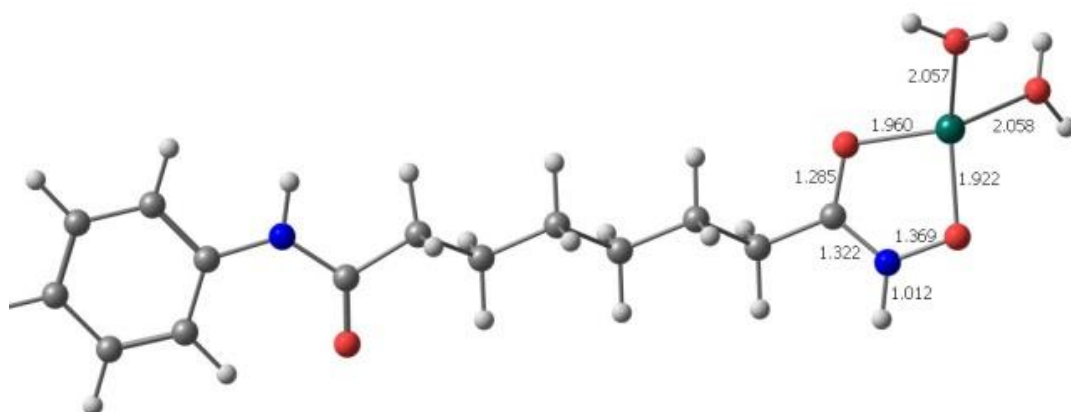
Фигура 19. Оптимизирани структури на ниво B3LYP/6-311++G (d, p) на Zn – съдържащи комплекси с различно координационно число. Изменението на свободната енергия (в kcal/mol) за всяка реакция е дадена над нея.

В първата моделна система две водни молекули са оптимизирани в комплекс с тетраедрична геометрия. Във втория и третия комплекс, цинковият йон е пента- и хекса координиран. Разгледахме и система, в която цинковия йон е тетра координиран, а две допълнителни молекули са разположени във втората координационна сфера (фиг. 19).

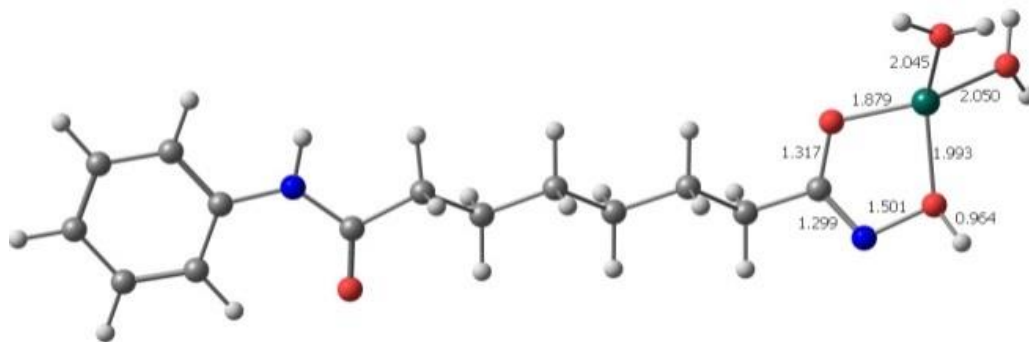
Анализирайки резултатите от тези модели, можем да видим, че с увеличаването на координационното число на цинка отслабва силата на взаимодействие с лиганда. Всъщност, термодинамично най-изгодно е координирането на 4 молекули вода, като две са разположени в първата координационна сфера на метала, а останалите две са разположени във втората координационна сфера. Така образувания комплекс притежава тетраедрична геометрия (фиг.19). Вижда се, че двата комплекса с тетраедрична координация имат и близка геометрия.

След това трябваше да установим стабилността на депротонираните тавтомери при комплексообразуване. По тази причина ние първо установихме енергията на дисоциация на протон от свързаната с цинк SAHA. Резултатите показват, че комплексът на 1Z-O-депротонираната форма на лиганда при координация с цинка (фиг. 20) става по-стабилен в газова фаза (с 16.8 kcal/mol) в сравнение с комплекса на 1Z-N-депротонирания лиганд с цинка, което е в съгласие с предишни получени кристалографски данни [1], [39].

Това изменение може да се обясни с процеса на йонизация на O-H връзката. Йонизацията увеличава негативния заряд на кислородния атом, който директно участва в комплексообразуването, в резултат на което се осъществява енергийно по-изгодно метално хелатиране, отколкото ако се беше реализирало депротонирането на връзката N-H, където отрицателно заредения азотен атом не се свързва към металния катийон.



a)



b)

Фигура 20. Оптимизирани геометрии на цинкови комплекси свързани с: (a) 1Z-O-депротонирана SAHA и (b) 1Z-N-депротонирана SAHA при изчисления на ниво на теория B3LYP/6-311++G(d, p).

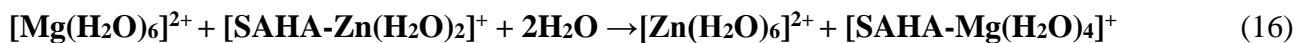
6. Конкуrentно заместване на двувалентни биогенни метали в комплекси на SAHA.

В протеините магнезият и цинкът често се конкурират за един активен център. В редица изследвания е доказано, че тези два двувалентни метала могат, макар и с различен афинитет, да се свързват с един и същи протеин [40], [41], [42], [43].

Тези два метала са сред най-разпространените метали в клетката. Имат структурна и каталитична роля в протеините, както и близки йонни радиуси (0.65 Å и 0.74 Å), което предполага подобни координативни свойства. Ако изходим от класификацията на Irving-Williams, магнезият е твърд катион, за когото е характерно свързването с твърди кислород съдържащи лиганди, докато цинкът е на границата между меки и твърди катиони и за него е характерно свързването с азотни или сяра съдържащи лиганди [44]. Координационното число, което е най-често срещано, също се различава при магнезия и цинка като първият предпочита да бъде хекса координиран, а втория - тетра координиран.

За да установим селективността и афинитета на SAHA към металните йони, изследвахме промяната в свободната енергия при конкурентното заместване на тези йони в комплексите на SAHA. Към групата добавихме и Fe^{2+} , тъй като има данни, че той също може да е активатор на хистон деацетилазата [45]. Селективността на лиганда SAHA, по отношение на металите може да бъде изразена като свободната енергия на заместване ΔG на нативния метал Zn^{2+} от другите два метални катиона (Fe^{2+} и Mg^{2+}). Положителната стойност на енергията на свободен йонен обмен (ΔG) показва по-висока селективност и афинитет на лиганда към нативния, отколкото към конкурентния йон, докато отрицателната стойност показва по-висока селективност към конкурентния йон. Следва да отбележим, че нашата цел е да установим тренда на промяна на гибсовата енергия, а не да възпроизведем абсолютните стойности.

Енергетичните промени са изчислени за следните две заместителни реакции:

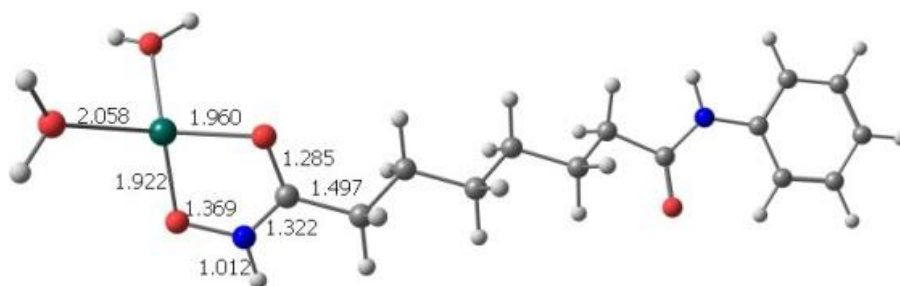


Получените резултати от така моделираните комплекси на двувалентни метални йони и комплекси на SAHA с тези йони, са представени в табл. 7. Комплексите са представени на фиг.21.

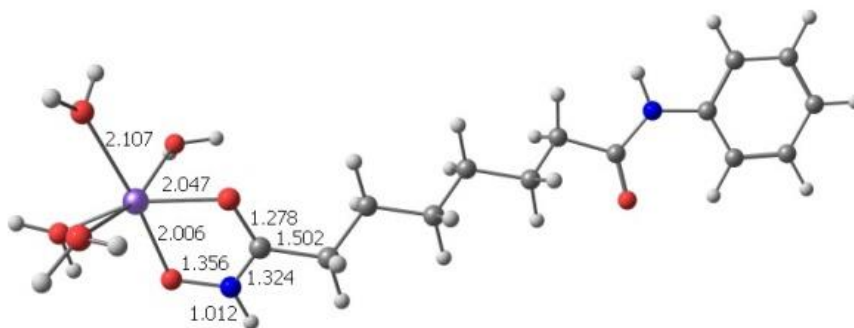
Таблица 7. Изменение на свободната енергия (в kcal/mol) за реакцията йонен обмен на Zn^{2+} в комплекси с Mg^{2+} и Fe^{2+} .

Реакция	ΔG^1	ΔG^{33}	ΔG^{78}
$[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+} + [\text{SAHA-Zn}(\text{H}_2\text{O})_2]^+ + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow$ $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+} + [\text{SAHA-Mg}(\text{H}_2\text{O})_4]^+$	-1.7	19.9	20.7
$[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+} + [\text{SAHA-Zn}(\text{H}_2\text{O})_2]^+ + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow$ $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+} + [\text{SAHA-Fe}(\text{H}_2\text{O})_4]^+$	-6.4	16.1	16.6

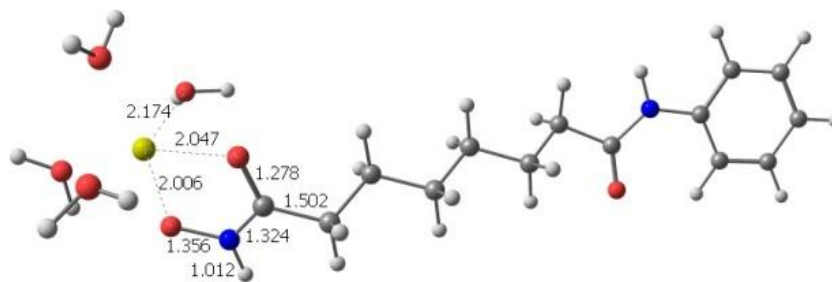
ΔG^{33} и ΔG^{78} се отнасят за енергията в разтворител (метанол или вода) от PCM/B3LYP/6-311++G (d, p) изчисления.



a)



b)



с)

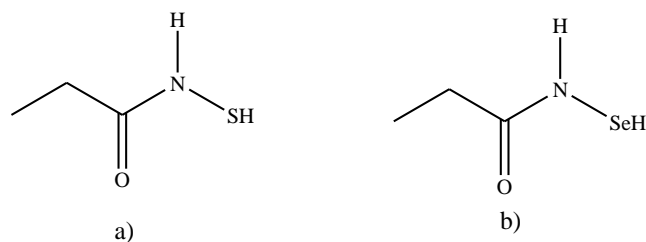
Фигура 21. Оптимизирани структури на ниво B3LYP/6-311++G (d, p) на комплекси на SAHA с: а) Zn^{2+} , б) Fe^{2+} и с) Mg^{2+} (със зелен цвят е отбелязан цинковия катион, лилаво – желязо, а с жълт цвят е отбелязан магнезиевия йон).

Така моделираните комплекси на SAHA с двувалентни метали, показват, че в газова фаза реакцията на заместване с конкурентен метален йон (Fe^{2+} и Mg^{2+}) към цинковия комплекс е ендотермична и е термодинамично възможна единствено в газова фаза. В полярен протонен разтворител (вода и метанол), обаче реакцията на заместване има положителна стойност на гибсовата енергия и става неблагоприятна. Това предполага, че ще бъде трудно на двата метални йона да изместят цинка от комплекси, когато е свързан с SAHA.

7. Тавтомерия, метален афинитет и селективност на сяра и селенови производни на хидроксамови киселини (SAHA-S, SAHA-Se) с модифицирана хидроксилна група

Установени са някои природни продукти - инхибитори на хистон деацетилазата, съдържащи сяра и селен (алилмеркаптани в чесъна и сулфорафан в броколи [46]). Съществуват и сяра съдържащи аналози на хидроксамовите киселини [47], показващи по-висока активност към HDAC8 в сравнение с SAHA. Това от своя страна ни мотивира да модифицираме и изследваме съответните сяра и селен съдържащи аналози на SAHA.

В началото на нашето изследване си поставихме въпроса как би се променило равновесието между тавтомерните форми на SAHA при заместването на кислороден атом от хидроксамовата глава на SAHA с друг атом (S, Se) от същата група на периодичната система. (фиг.22). За да дадем отговор на този въпрос ние моделирахме и охарактеризирахме термодинамично сяра и селеновите производни на тези молекули.



Фигура 22. Производни на SAHA с модифицирана хидроксилна група: а) серни (SAHA-S) и б) селенови (SAHA-Se).

Нашите изчисления с помощта на теорията на функционала на плътността ни разкриха стабилните конформери на SAHA-S, SAHA-Se, както в газова фаза, така и в разтворител (вода и метанол). Най-стабилна в газова фаза се оказа 1Z-кето тавтомера (табл. 8), също както при немодифицираната молекула на SAHA.

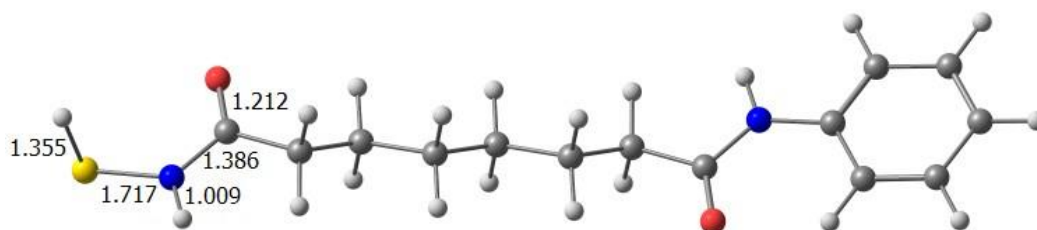
Таблица 8. Относителни, спрямо най-стабилния конформер, свободни гибсови енергии в (kcal/mol) на кето и иминолните тавтомери на SAHA-S и SAHA-Se, получени при пълна оптимизация в газова фаза- ΔG^1 , в метанол - ΔG^{33} и във вода - ΔG^{78} при ниво на теория B3LYP/6-311++G (d, p).

	ΔG^1	ΔG^{33}	ΔG^{78}
1Z-SAHA-S	0.0	0.0	0.0
1E-SAHA-S	0.9	0.7	2.45
1Z-SAHA-Se	0	0	0
1E-SAHA-Se	0.3	1.5	1.6

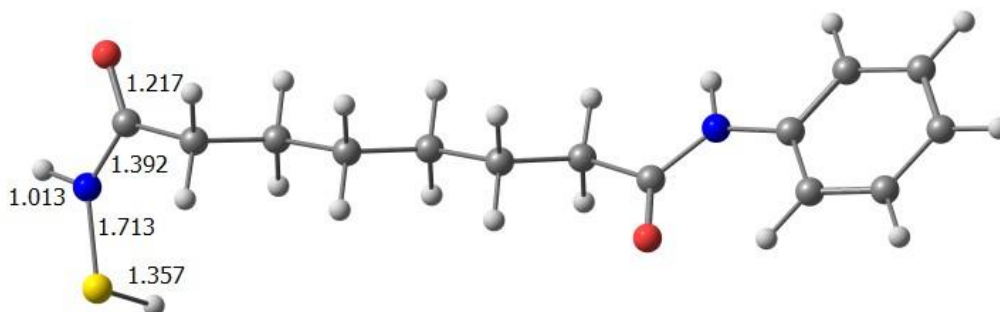
1Z-SAHA-S е по-стабилна от 1E-SAHA-Se формата с 0.9 kcal/mol, като тази разлика се увеличава до 2.45 kcal/mol във водна среда. При селеновото производно на SAHA, 1Z-SAHA-Se формата също е по-стабилна в сравнение с 1E-формата в газова фаза, въпреки значително по-малката енергетична разлика между двете форми – 0.3 kcal/mol. Във водна среда 1Z-кето формата 1Z-SAHA-Se, остава по-стабилна с 1.6 kcal/mol. Въпреки предпочитаната стабилност на 1Z-кето формата при сяра и селеновите производни, разликата между 1Z и 1E-кето формите е значително по-малка, отколкото при тавтомерните форми на SAHA (табл. 8). Това се дължи на отсъствието на вътрешномолекулна водородна връзка при сяра и селеновите производни, която е характерна за молекулата на SAHA (фиг. 23). Сравнявайки дължините на връзките можем да отбележим, че връзката N–O в SAHA (1.400 Å) е много по-къса в сравнение с аналогичните връзки в производните на SAHA: с N–S (1.717 Å) и N–Se (1.865 Å). Същото

можем да кажем и за C-N връзката в SAHA, която е по-къса (1.365 Å) в сравнение с тази в SAHA-Se (1.381 Å) и тази при SAHA-S (1.386 Å).

На фиг.23 са представени оптимизираните геометрии на 1Z-SAHA-S и 1-E-SAHA-S, а на фиг. 24 - оптимизираните геометрии на 1Z-SAHA-Se и 1-E-SAHA-Se.

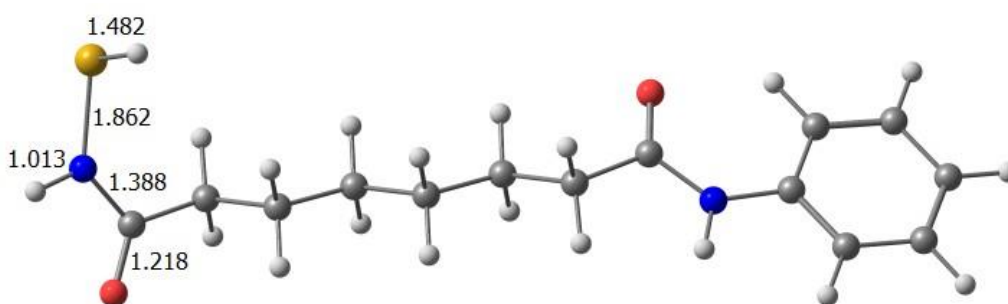


a)

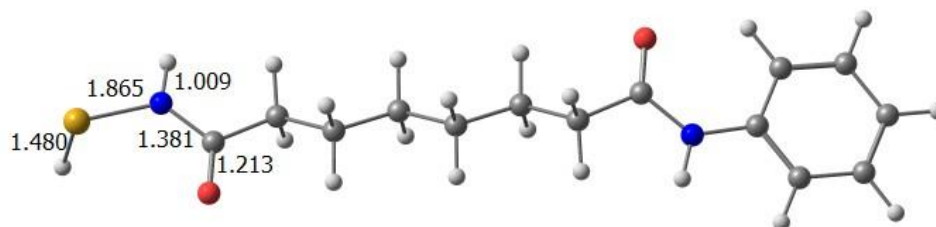


b)

Фигура 23. Оптимизирани геометрии: (a) 1Z-SAHA-S и (b) 1E-SAHA-S - B3LYP/6-311++G (d, р). На фигурата хетероатомите са отбелязани съответно с O-червен цвят, N-син цвят, S- жълт.



a)



b)

Фигура 24. Оптимизирани геометрии: (a) 1Z-SAHA-Se и (b) 1E-SAHA-Se- B3LYP/6-311++G (d, p). На фигурата хетероатомите са отбелязани съответно с O-червен цвят, N-син цвят, Se-охра.

Изследвани са възможностите за S(Se)–H и N–H депротониране и е оценена стабилността на получените форми в газова фаза и разтворител (вода). Изчислени са гибсовите енергии на депротониране и са изследвани само двата най-стабилни йона при депротониране на 1Z и 1E изомерите. Реакцията на депротониране може да бъде представена като $A \rightarrow A^- + H^+$, а Гибсовите енергии на депротониране са обобщени в табл. 8. Възможните варианти на депротониране са представени на сх. 4 .

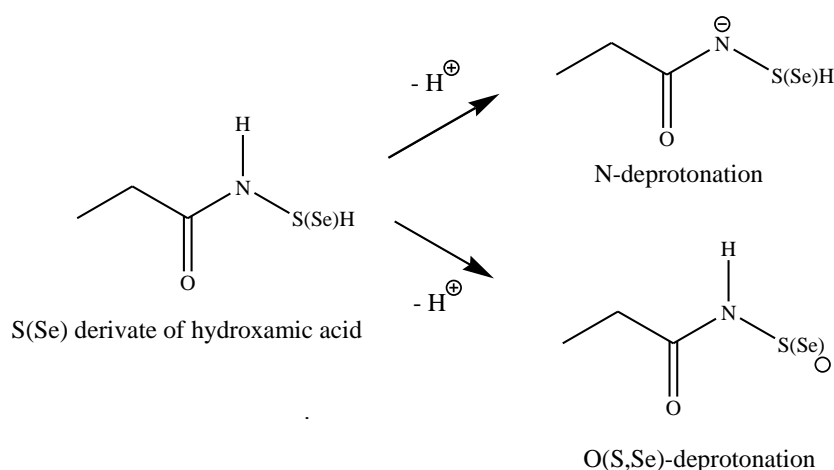


Схема 4. Възможни пътища на депротониране на S и Se производни на хидроксамовите киселини.

Установихме, че депротонирането при сяр- и селеновите аналози на SAHA протича по-лесно отколкото при SAHA. Серните и селеновите аналози се депротонират по-лесно при 1Z-SH/SeH групата, отколкото в 1Z-NH групата. Това се дължи на наличието на стабилизираща системата вътрешномолекулна водородна връзка в S/Se аналози и може да се обясни с по-

високата киселинност на тиолната и селенолната група в сравнение с хидроксилната група от хидроксамовата глава. Енергиите на депротониране са представени в табл. 9.

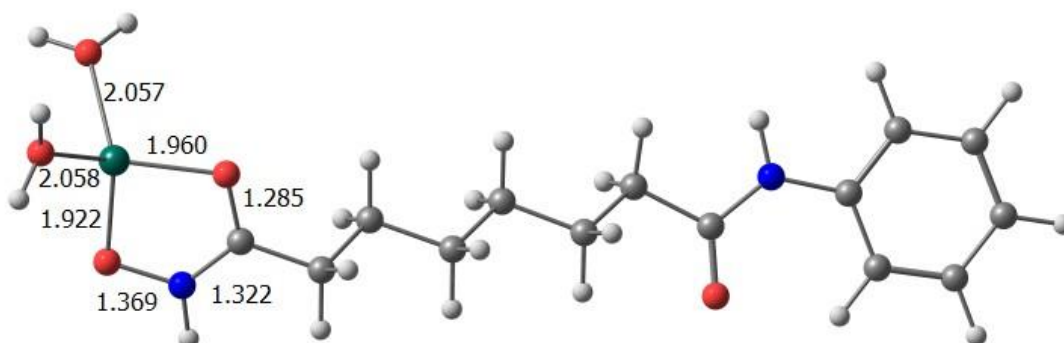
Таблица 9. Изменение на Гибсовите енергии (в kcal/mol) в разтворител вода при депротониране на SAHA, SAHA-S и SAHA-Se.

Депротонирана форма	ΔG_{SAHA}^{78}	ΔG_{SAHA-S}^{78}	$\Delta G_{SAHA-Se}^{78}$
1Z O, S, Se	24.6	13.5	7.8
1E O, S, Se	26.0	13.9	8.7
1Z N	19.9	26.2	26.4
1E N	25.2	32.2	32.0

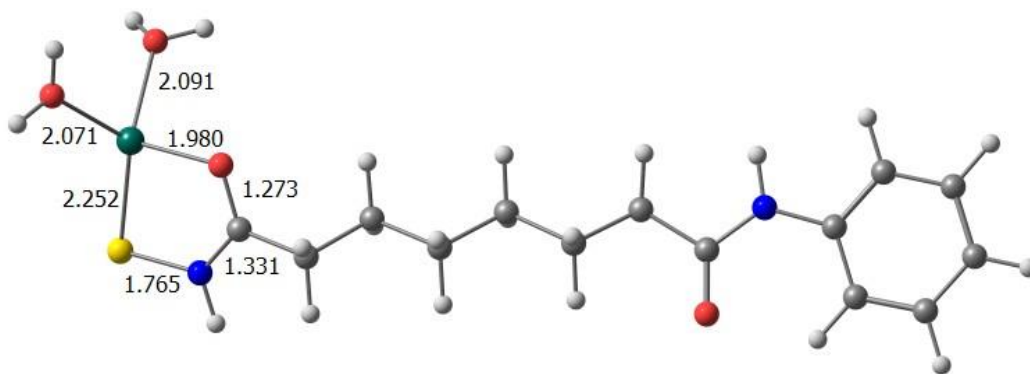
Данните от табл. 9, показват, че колкото по-тежък е хетероатомът в OH/SH/SeH групата, толкова е по-благоприятно откъсването на протон в тази позиция.

Анализирайки стойностите за промяната на гибсовата енергия за реакцията на депротониране, можем да отбележим, че селеновите аналози са по-силни нуклеофили от съответните серни аналози. Термодинамично най-изгодни са 1Z конформерите, депротонирани при тиолната (-SH) или селенолната група (-SeH). Получените резултати за стабилните конформери и депротонираните форми са изходна отправна точка за следващия етап на изследването, а именно определянето на афинитета на различни двувалентни метални йони към модифицираните със сяра и селен аналози на хидроксамовите киселини.

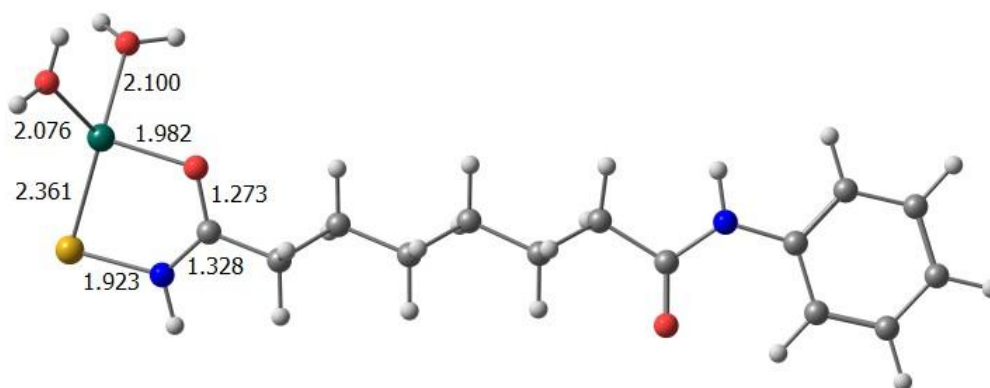
Изследвали сме комплекси на двувалентни метални катиони със серни и селенови аналози на SAHA (SAHA-S, SAHA-Se), в които кислородния атом от хидроксилната група, свързана с азота, е заместен със сяра и селен. На фиг.25 са показани оптимизирани геометрии на цинковите комплекси с SAHA, SAHA-S и SAHA-Se.



a)



b)

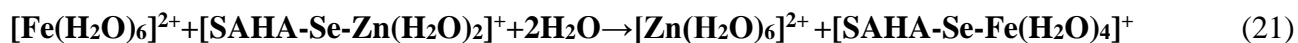
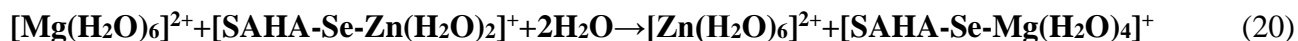
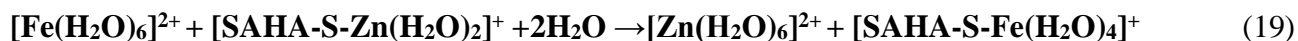
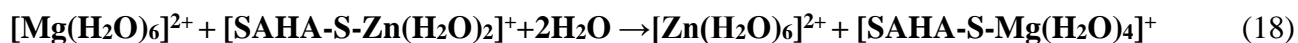


c)

Фигура 25. Оптимизирани геометрии на цинкови комплекси с SAHA, SAHA-S и SAHA-Se на ниво B3LYP/6-311++G (d, p).

С цел установяването на афинитета/селективността на модифицираните със сяра и селен аналози на SAHA към биогенни двувалентни йони, е изчислена свободната енергия на конкурентното заместване на тези йони (Zn^{2+} , Fe^{2+} и Mg^{2+}) в комплексите на SAHA-S и SAHA-Se.

Енергетичните промени са изчислени за следните четири заместителни реакции:



Получените резултати от така моделираните комплекси на двувалентни метални йони и комплекси на SAHA с тези йони, са представени в табл.10 и табл.11.

Таблица 10. Изменение на свободната енергия (в kcal/mol) за реакцията йонен обмен на Zn^{2+} с Mg^{2+} в комплекси със SAHA-S и SAHA-Se.

Реакция	ΔG^1	ΔG^{33}	ΔG^{78}
$[Mg(H_2O)_6]^{2+} + [SAHA-S-Zn(H_2O)_2]^+ + 2H_2O \rightarrow [Zn(H_2O)_6]^{2+} + [SAHA-S-Mg(H_2O)_4]^+$	10.5	25.7	25.9
$[Mg(H_2O)_6]^{2+} + [SAHA-Se-Zn(H_2O)_2]^+ + 2H_2O \rightarrow [Zn(H_2O)_6]^{2+} + [SAHA-Se-Mg(H_2O)_4]^+$	14.9	29.2	29.4

Таблица 11. Изменение на свободната енергия (в kcal/mol) за реакцията йонен обмен на Zn^{2+} с Fe^{2+} в комплекси със SAHA-S, SAHA-Se.

Реакция	ΔG^1	ΔG^{33}	ΔG^{78}
$[Fe(H_2O)_6]^{2+} + [SAHA-S-Zn(H_2O)_2]^+ + 2H_2O \rightarrow [Zn(H_2O)_6]^{2+} + [SAHA-S-Fe(H_2O)_4]^+$	2.2	18.9	19.2
$[Fe(H_2O)_6]^{2+} + [SAHA-Se-Zn(H_2O)_2]^+ + 2H_2O \rightarrow [Zn(H_2O)_6]^{2+} + [SAHA-Se-Fe(H_2O)_4]^+$	4.4	21.1	21.5

Анализът на резултатите показва, че модифицираните със сяра и селен аналози на хидроксамовата киселина SAHA имат значително по-висока енергия на йонен обмен, отколкото SAHA.

Конкурирането на Mg^{2+} със свързания Zn^{2+} в комплекс на SAHA е термодинамично неизгодно. В газова фаза изменението на енергията на йонен обмен за Mg^{2+} при SAHA има отрицателна стойност ($\Delta G^1 = -1.7$ kcal/mol), при SAHA-S се увеличава до ($\Delta G^1 = 10.5$ kcal/mol), а при SAHA-Se достига максимална стойност ($\Delta G^1 = 14.9$ kcal/mol). От така получените данни става ясно, че термодинамично е възможно конкурирането на Mg^{2+} с Zn^{2+} единствено с немодифицирания комплекс на SAHA в газова фаза. В разтворител вода изменението на енергията на йонен обмен за Mg^{2+} при SAHA има положителна стойност ($\Delta G^{78} = 20.7$ kcal/mol), при SAHA-S се увеличава ($\Delta G^{78} = 25.9$ kcal/mol), а при SAHA-Se достига максимална стойност ($\Delta G^{78} = 29.4$ kcal/mol).

Конкурирането на Fe^{2+} със свързания Zn^{2+} в комплекс на SAHA, също както Mg^{2+} , е термодинамично неизгодно. В газова фаза изменението на енергията на йонен обмен за Fe^{2+} при SAHA има отрицателна стойност ($\Delta G^1 = -6.4$ kcal/mol), при SAHA-S се увеличава до ($\Delta G^1 = 2.2$ kcal/mol), а при SAHA-Se достига максимална стойност ($\Delta G^1 = 4.3$ kcal/mol). От така

получените данни, става ясно, че термодинамично е възможно конкурирането на Fe^{2+} с Zn^{2+} единствено с немодифицирания комплекс на SAHA в газова фаза. В разтворител вода изменението на енергията на йонен обмен за Fe^{2+} при SAHA има положителна стойност ($\Delta G^{78} = 16.4 \text{ kcal/mol}$), при SAHA-S се увеличава ($\Delta G^{78} = 19.2 \text{ kcal/mol}$), а при SAHA-Se достига максимална стойност ($\Delta G^{78} = 21.5 \text{ kcal/mol}$). В разтворител термодинамично не е възможно конкурирането на Fe^{2+} с Zn^{2+} свързан в комплекс с SAHA. Получените данни ни дават основание да заключим, че S и Se комплекси на SAHA проявяват по-висока селективност към Zn^{2+} , както в газова фаза, така и във водна среда. Цинкът предпочита сяра и селен съдържащите лиганди и е по-трудно да бъде изместен от тези комплекси. Този извод е логичен, имайки предвид по-мекия характер на Zn^{2+} в сравнение с Mg^{2+} и Fe^{2+} , което благоприятства в значителна степен взаимодействието между Zn^{2+} и меките S и Se съдържащи лиганди в сравнение с неговите Mg^{2+} и Fe^{2+} конкуренти [13]. Във водна среда, SAHA и сяра и селен съдържащите аналози проявяват по-висок афинитет/селективност към Zn^{2+} , които нарастват в реда $\text{O} < \text{S} < \text{Se}$.

8. Тавтомерия, метален афинитет и селективност на S и Se производни на хидроксамови киселини с модифицирана карбонилна група (carb-S-SAHA и carb-Se-SAHA)

Друг възможен начин за модифицирането на хидроксамовите киселини със сяра и селен е чрез модифицирането на кислородния атом от карбонилната група ($-\text{C}=\text{O}$) на хидроксамовата глава (сх.5);

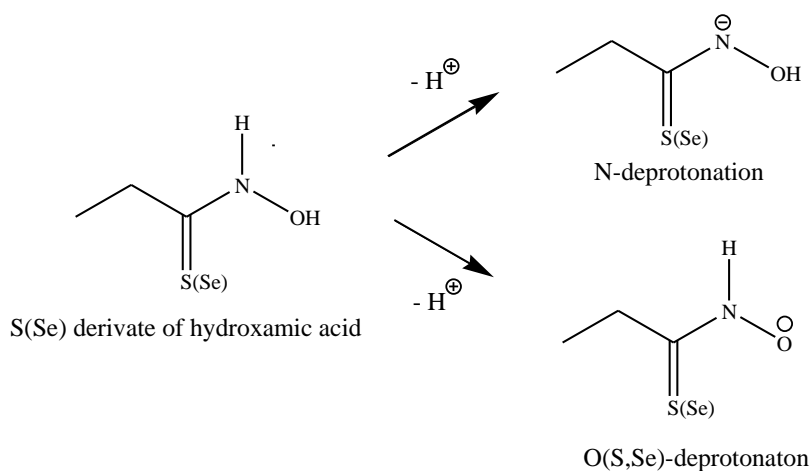


Схема 5. Възможни модификации на хидроксамовите киселини със сяра (carb-S-SAHA) и селен (carb-Se-SAHA).

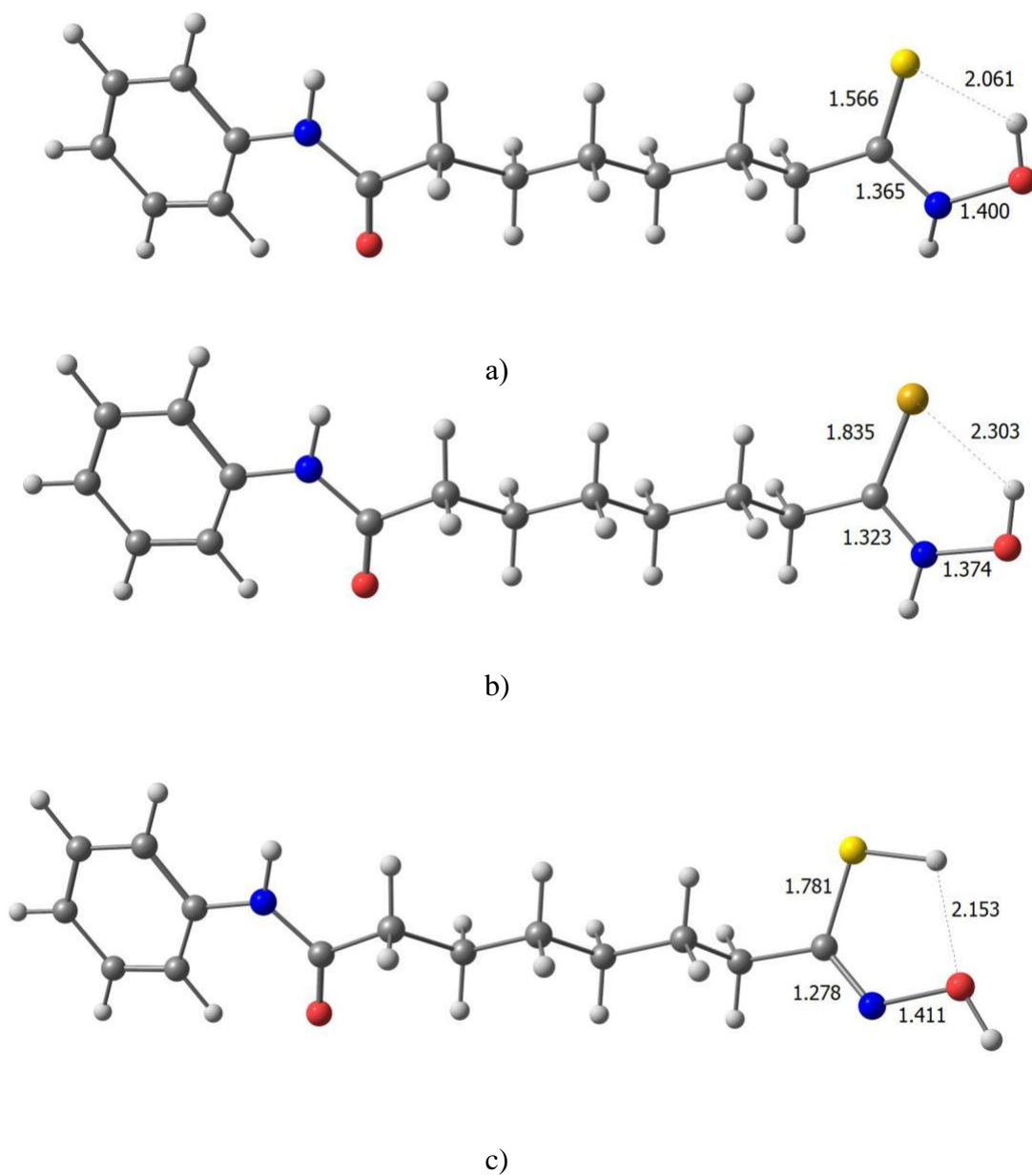
В научната литература отсъстват данни за сяра и селенови производни на хидроксамовите киселини, в които кислородният атом в карбонилната група от хидроксамовата глава - (C = O) -NHOH) е модифициран чрез заместването му със сяра и селен. За да установим, как включването на сяра и селен в хидроксамовата глава на SAHA, която се координира към метала, променя афинитета/селективността към биогенни метални катиони (Zn^{2+} , Fe^{2+} и Mg^{2+}), ние моделираме производни на хидроксамовите киселини (сх.5 (C = S) -NHOH и - (C = Se) -NHOH и с помощта на теорията на функционала на плътността и PCM проведохме изчисления в различни диелектрични среди.

Мотивирани в търсенето на нови инхибитори на хистон деацетилазата, ние подробно изследвахме геометрията и модела на депротониране на съдържащите сяра и селен аналози на SAHA. След това нашите изследвания се фокусираха в посока на установяването на това как замяната на кислорода от карбонилната група в хидроксамовата глава със сяра (carb-S-SAHA) и селен (carb-Se-SAHA), повлиява на нейните физикохимични и координативни свойства в сравнение с първоначалната немодифицирана молекула на SAHA (carb-O-SAHA).

За тази цел, първо е необходимо да установим, как замяната на кислородния атом в карбонилната група на хидроксамовата глава с атом на сяра и селен влияе върху стабилността на тавтомерните форми (кето и иминолни), характерни за хидроксамовите киселини. След това е необходимо да установим кое е предпочитаното място за депротониране на хидроксамовата група и кои атоми участват в координацията на металния катион към хидроксамовата глава. Това ще ни даде възможност на следващия етап да установим, как замяната на O \rightarrow S и O \rightarrow Se в карбонилната група на хидроксамовата глава модулира нейния афинитет/селективност към основни биогенни катиони на метали като (Zn^{2+} , Fe^{2+} и Mg^{2+}). Така проведените изчисленията ще ни разкрият ключовите фактори, които управляват координативните свойства на модифицираните със сяра и селен производни на хидроксамовите киселини и процесите на свързване на инхибиторите на хистон деацетилазата.

Възможни са две тавтомерни форми на хидроксамовите киселини: кето и иминолни тавтомери (фиг. 26). Освен това всеки тавтомер може да приеме E- или Z-конформация [19].

Моделирани са четирите възможни конформера (фиг.26), както за S, така и за Se производни. Най-стабилната форма в газовата фаза и във воден разтвор е 1Z-кето carb-X-SAHA формата (табл. 12 и фиг.26). По-високата стабилност на 1Z-кето-carb-X-SAHA тавтомера се дължи на образуването на вътрешно молекулна водородна връзка между -OH групата и съседната заместена карбонилна група (C = S, C = Se), както се вижда от фиг. 27.



Фигура 26. Оптимизирани геометрии на ниво на теория B3LYP/6-311++G (d, р) а) 1Z-кето-carb-S-SAHА, б) 1Z-кето-carb-Se-SAHА в) 2Z-carb-S-SAHА.

Нашите изчисления разкриха стабилните конформери в газова фаза и разтворител (вода и метанол). Най-стабилна в газова фаза най-стабилна се оказа 1Z-кето формата (табл.12).

Таблица 12. Относителни, спрямо най-стабилния конформер, свободни гибсови енергии в (kcal/mol) на кето и иминолните тавтомери на carb-X-SAHA (AH→A⁻+H⁺), където X=O, S, Se, които са получени при пълна оптимизация в газова фаза- ΔG^1 и във вода - ΔG^{78} при ниво на теория B3LYP/6-311++G (d, p).

	ΔG^1 -carb-O SAHA	ΔG^1 -carb-S- SAHA	ΔG^1 -carb-Se- SAHA	ΔG^{78} -carb-O- SAHA	ΔG^{78} -carb-O- SAHA	ΔG^{78} -carb-O- SAHA
1Z	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1E	2.1	5.0	5.4	1.9	5.0	4.2
2Z	2.7	0.6	1.1	5.4	3.2	3.8

Изчисленията показват, че при всички carb-S и carb-Se аналози на SAHA най-стабилния конформер е 1Z-кето формата, точно, както и в немодифицираната молекула на SAHA. В сравнение с немодифицираната SAHA (carb-O-SAHA), обаче, разликата в свободната енергия между 1Z-кето и 1E-кето формите при по-тежките елементи (Z) е по-силно изразена.

Следва да отбележим, че 2Z -иминолната форма на carb-S-SAHA и carb-Se-SAHA са доста по-близки по енергия (съответно разлика в свободната енергия е 0.6 kcal/mol и 1.1 kcal/mol), съотнесена към 1Z конформера, което може да се обясни със стабилизиращия ефект на вътрешномолекулната водородна връзка.

Двата най-стабилни конформера за заместените SAHA аналози са 1Z и 2Z и тук е голямата разлика в сравнение с първоначалното съединение- carb-O-SAHA, където двата най-стабилни конформера са 1Z-кето и 1E-кето формите [14].

Както вече споменахме в литературния обзор, хидроксамовите киселини са слаби киселини, които притежават два кисели протона в хидроксамовата глава (-OH и -NH). Те могат да бъдат отделени в хода на химическата/биохимичната реакция, а самата хидроксамова киселина да бъде депротонирана, проявявайки по този начин OH и NH-киселинни свойства [48]. След като анализирахме модела на депротониране на SAHA и модифицираните в хидроксилната група със сяра и селен производни на хидроксамовите киселини (SAHA-S и SAHA-Se), възникна въпроса: какъв ще бъде модела на депротониране на S и Se аналози на SAHA, при които е модифициран кислородния атом в карбонилната група на хидроксамовата глава?

За да изясним този въпрос, ние моделирахме двата възможни варианта на депротониране в carb-S-SAHA и carb-Se-SAHA аналози (аналогично на OH или NH депротонирането и

проведохме оценка на стабилността на получените депротонирани форми. Резултатите са представени в табл.13.

Получените резултати показват, че в газова фаза най-стабилната е 1Z-N-депротонираната форма на carb-S-SAHA (фиг. 27). Тя е с 17.1 kcal/mol по-стабилна в газова фаза от 1Z-O-депротонираната форма на carb-S-SAHA и с 7.9 kcal/mol по-стабилна в разтворител вода от 1Z- O-депротонирана форма на carb-S-SAHA (табл. 13).

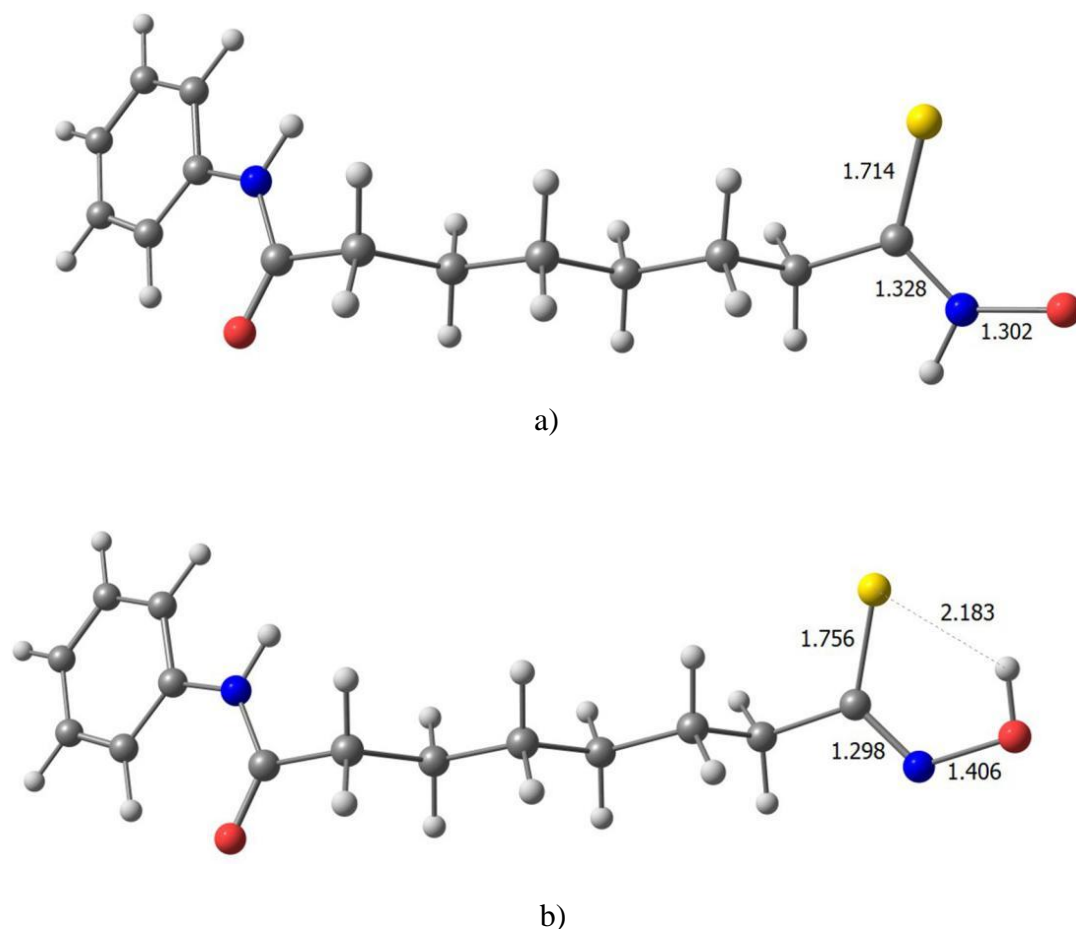
При селеновите производни, се запазва същата тенденция - 1Z-N-депротонираната форма на carb-Se-SAHA да е по-стабилна от 1Z-O-депротонираната форма на carb-S-SAHA, както в газова фаза, така и във водна среда.

Стабилизирането на 1Z-N-депротонираната форма се дължи главно на вътрешномолекулната водородна връзка, която се запазва от първоначалната основна структура, аналогично на немодифицираната SAHA и другите изследвани модифицирани сяра и селенови аналози на хидроксамовите киселини. Данните от проведените изчисления, представени в табл. 13, показват, че карбонилните S и Se аналози на SAHA, подобно на основната немодифицирана карбонилна O-конструкция [49], се държат като NH киселини, както в газова фаза, така и във воден разтвор.

Таблица 13. Изменение на Гибсовите енергии (в kcal/mol) в газова фаза и във вода за реакцията на депротониране на carb-X-SAHA ($AH \rightarrow A^- + H^+$), където X=O, S, Se. Експериментално получените стойностите за $\Delta G_{solv}^{78}(H^+)$ за -264.0 kcal/mol са получени от експериментални данни [37].

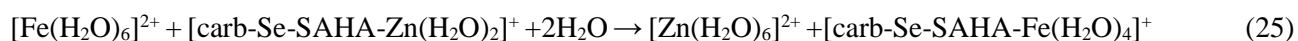
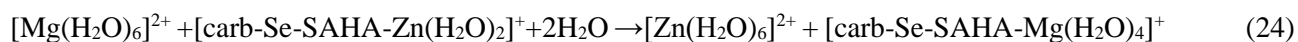
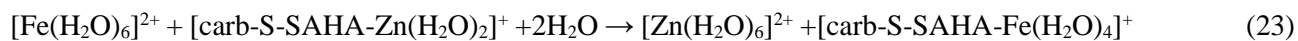
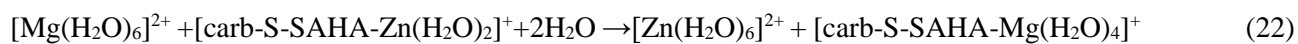
	ΔG^1 -carb-O-SAHA	ΔG^1 -carb-S-SAHA	ΔG^1 -carb-Se-SAHA	ΔG^{78} -carb-O-SAHA	ΔG^{78} -carb-O-SAHA	ΔG^{78} -carb-O-SAHA
1Z-N-депротонирана	347.9	336.7	333.4	24.6	17.5	15.8
1Z-O-депротонирана	334.2	319.6	316.3	19.9	9.6	7.9

От представените в табл.13 данни виждаме, че енергиите на депротониране намаляват в реда C=O > C=S > C=Se, т. е колкото по-тежък е хетероатомът, свързан в карбонилната група C=O/C=S/C=Se, която е част от хидроксамовата глава, толкова повече се благоприятства дисоциацията на протон от NH групата и се проявяват NH киселинните свойства на производните на SAHA.



Фигура 27. B3LYP/6-311++G (d, p) оптимизирани структури на депротонирана carb-S-SAHA при (a) -OH група и (b) -NH група от хидроксамовата глава. Дължините на връзките са дадени в Å.

С цел установяването на селективността и афинитета на модифицираните със сяра и селен аналози на SAHA (carb-X-SAHA) към биогенни двувалентни йони, е изчислена свободната енергия на конкурентното заместване на тези йони (Zn^{2+} , Fe^{2+} и Mg^{2+}) в комплексите на carb-X-SAHA (X=O, S, Se). Енергетичните промени са изчислени за следните четири заместителни реакции:



В този модел carb-X-SAHA производните се намират в тяхната O- депротонирана форма като общия заряд на металните комплекси е +1. В предишно наше изследване [13] беше показано, че дори и SAHA да показва NH киселинност в газова фаза и разтвор, то при комплексообразуване предпочитаната форма на свързване е чрез O-депротонирана форма. Термодинамичните параметри, изчислени за carb-X-SAHA в газова фаза и различни среди, са обобщени в табл.14 и табл. 15. Оптимизираните структури на металните комплекси са показани на фиг. 28.

Таблица 14. Изменение на свободната енергия (в kcal/mol в газова фаза ΔG^1 и във вода ΔG^{78}) за реакцията йонен обмен на Mg^{2+} с Zn^{2+} в комплекси с carb-X-SAHA (X=O, S, Se).

Реакция	ΔG^1	ΔG^{78}
$[Mg(H_2O)_6]^{2+} + [SAHA-Zn(H_2O)_2]^+ + 2H_2O \rightarrow [Zn(H_2O)_6]^{2+} + [SAHA-Mg(H_2O)_4]^+$	-1.7	20.7
$[Mg(H_2O)_6]^{2+} + [carb-S-SAHA-Zn(H_2O)_2]^+ + 2H_2O \rightarrow [Zn(H_2O)_6]^{2+} + [carb-S-SAHA-Mg(H_2O)_4]^+$	9.4	31.5
$[Mg(H_2O)_6]^{2+} + [carb-Se-SAHA-Zn(H_2O)_2]^+ + 2H_2O \rightarrow [Zn(H_2O)_6]^{2+} + [carb-Se-SAHA-Mg(H_2O)_4]^+$	2.9	30.9

Таблица 15. Изменение на свободната енергия (в kcal/mol в газова фаза ΔG^1 и във вода ΔG^{78}) за реакцията йонен обмен на Fe^{2+} с Zn^{2+} в комплекси с carb-X-SAHA- (X=O, S, Se).

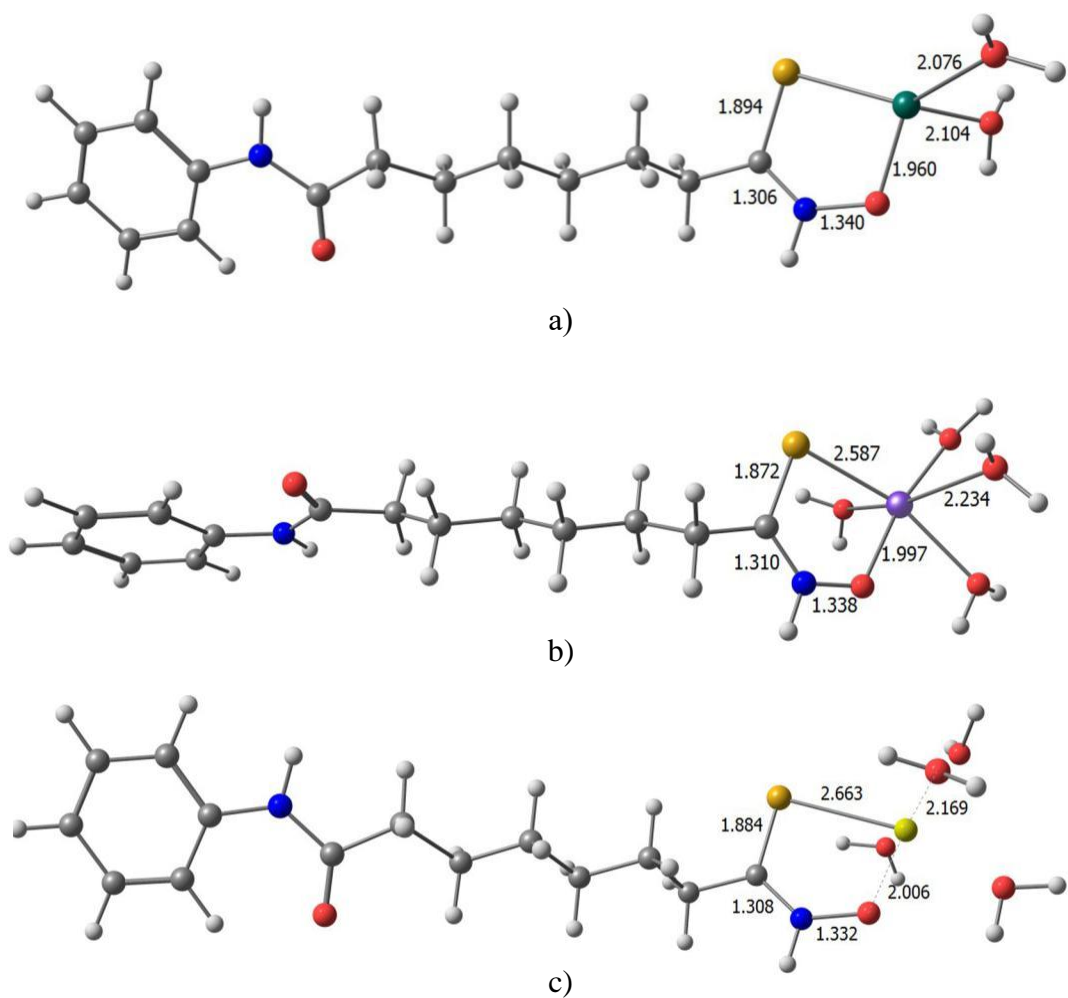
Реакция	ΔG^1	ΔG^{78}
$[Fe(H_2O)_6]^{2+} + [SAHA-Zn(H_2O)_2]^+ + 2H_2O \rightarrow [Zn(H_2O)_6]^{2+} + [SAHA-Fe(H_2O)_4]^+$	-6.4	16.4
$[Fe(H_2O)_6]^{2+} + [carb-S-SAHA-Zn(H_2O)_2]^+ + 2H_2O \rightarrow [Zn(H_2O)_6]^{2+} + [carb-S-SAHA-Fe(H_2O)_4]^+$	0.1	19.2
$[Fe(H_2O)_6]^{2+} + [carb-Se-SAHA-Zn(H_2O)_2]^+ + 2H_2O \rightarrow [Zn(H_2O)_6]^{2+} + [carb-Se-SAHA-Fe(H_2O)_4]^+$	2.9	19.3

Анализа на резултатите показва, че carb-S-SAHA и carb-Se-SAHA, имат значително по-висока енергия на йонен обмен, отколкото SAHA.

Конкурирането на Mg^{2+} със свързания Zn^{2+} в комплекси на SAHA, термодинамично не е изгодно. В газова фаза изменението на енергията на йонен обмен за Mg^{2+} при SAHA има отрицателна стойност ($\Delta G^1 = -1.7$ kcal/mol), при carb-S-SAHA се увеличава до ($\Delta G^1 = 9.4$ kcal/mol), а при carb-Se-SAHA спада до ($\Delta G^1 = 2.9$ kcal/mol). От така получените данни става ясно, че термодинамично е възможно конкурирането на Mg^{2+} с Zn^{2+} единствено с немодифицирания комплекс на SAHA в газова фаза. В разтворител вода изменението на енергията на йонен обмен за Mg^{2+} при SAHA има положителна стойност ($\Delta G^{78} = 20.7$ kcal/mol), при carb-S-SAHA се увеличава до ($\Delta G^{78} = 31.5$ kcal/mol), при carb-Se-SAHA има стойност, почти както при carb-S-SAHA ($\Delta G^{78} = 30.9$ kcal/mol). В разтворител термодинамично не е възможно конкурирането на Mg^{2+} с Zn^{2+} в комплекса с carb-S-SAHA и carb-Se-SAHA.

Конкурирането на Fe^{2+} със свързания Zn^{2+} в комплекси на SAHA, също, както Mg^{2+} термодинамично не е изгодно. В газова фаза изменението на енергията на йонен обмен за Fe^{2+} при SAHA има отрицателна стойност ($\Delta G^1 = -6.4$ kcal/mol), при carb-S-SAHA се увеличава до ($\Delta G^1 = 0.1$ kcal/mol) и при carb-Se-SAHA достига максимална стойност ($\Delta G^1 = 2.9$ kcal/mol). От така получените данни, се вижда, че термодинамично е възможно конкурирането на Fe^{2+} с Zn^{2+} единствено с немодифицирания комплекса на SAHA в газова фаза. В разтворител вода изменението на енергията на йонен обмен за Fe^{2+} при SAHA има положителна стойност ($\Delta G^{78} = 16.4$ kcal/mol), при carb-S-SAHA се увеличава ($\Delta G^{78} = 19.2$ kcal/mol) и при carb-Se-SAHA достига максимална стойност ($\Delta G^{78} = 19.3$ kcal/mol). В разтворител термодинамично не е възможно конкурирането на Fe^{2+} с Zn^{2+} в комплексите на SAHA, carb-S-SAHA и carb-Se-SAHA.

Получените термодинамични данни ни дават основание да заключим, че S и Se комплекси на SAHA (carb-S-SAHA и carb-Se-SAHA) проявяват по-висока селективност към Zn^{2+} , както в газова фаза така и във водна среда. Сяра и селеновите производни на SAHA имат по-голяма селективност към цинка, отколкото немодифицираната SAHA (табл.13 и табл. 14). Това се дължи предимно на по-мекия характер на Zn^{2+} , в сравнение с тези на Mg^{2+} и Fe^{2+} , което благоприятства взаимодействията между Zn^{2+} и „меките“ S и Se съдържащи лиганди в по-голяма степен, отколкото тези между Mg^{2+} и Fe^{2+} и carb-S SAHA/carb-Se SAHA. До подобен извод, достигнахме и при другия тип модифицирани със сяра и селен производни на SAHA (SAHA-S and SAHA-Se).



Фигура 28. Оптимизирани геометрии на цинкови комплекси на ниво на теория B3LYP/6-311++G (d, p) на комплексите на carb-Se SAHA с a) Zn²⁺, b) Fe²⁺ и c) Mg²⁺ (Zn²⁺ – зелен цвят, Fe²⁺ – лилаво и Mg²⁺ жълто).

9. Фактори, управляващи процесите на свързване, афинитет и селективност на инхибиторите на хистон деацетилазата към активния център на ензима HDAC8

9.1. Изследвани инхибитори

Използвайки кристалографски определена структура на комплекса между HDAC8 и SAHA, ние моделирахме активния център на ензима с включен инхибитор (виж по-долу). Тази структура беше използвана като моделна система за нашите квантово-химични пресмятания, в която впоследствие молекулата на SAHA беше заменена с друга хидроксамова киселина с различен строеж (сх.6). Широкия набор от аналози на SAHA, които използвахме ни позволи да оценим ролята на различни фактори върху силата на взаимодействието на инхибитора с ензимния джоб.

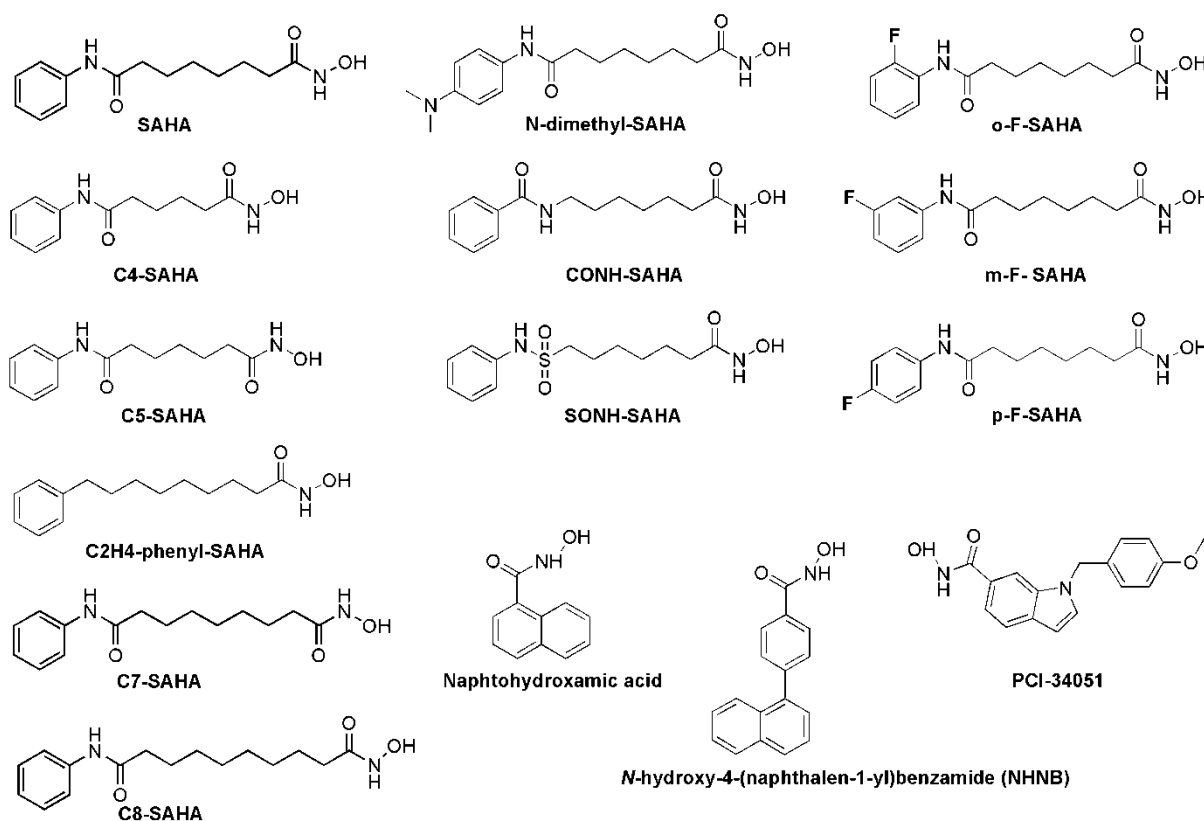


Схема 6. Структура на моделираните HDACi в активния център на HDAC8.

Изследваните молекули в представената схема условно могат да се категоризират в няколко различни подгрупи:

а) в първата подгрупа са включени структурно подобни на SAHA хидроксамови киселини, които съдържат същите елементи от фармакофорния модел (хидроксамова глава, крайна група и свързваща единица), но се различават по броя на метиленовите групи,

съдържащи се в линкерната част. В тази подгрупа освен SAHA, която съдържа линкер от 6 метиленови групи, са включени и C4-SAHA (линкер, състоящ се от 4 метиленови групи), C5-SAHA (линкер, състоящ се от 5 метиленови групи), C7-SAHA (линкер с дължина 7 метиленови групи) и C8-SAHA (линкер, състоящ се от 8 метиленови групи).

Тези модифицирани по отношения на линкерната част аналози на SAHA, ще ни разкрият ролята и мястото на дължината линкерната група, както и нейните структурни характеристики, като фактор, влияещ на процесите на свързване, афинитет и селективност на инхибиторите на хистон деацетилазата към HDAC8.

b) във втората подгрупа производни, структурно подобни на SAHA хидроксамови киселини, които съдържат същите елементи от фармакофорния модел (хидроксамова глава, крайна група и линкер), но се различават единствено по вида и структурата на свързваща единица. В тази подгрупа освен SAHA, при която свързваща единица е анилидна група (-NHCO-), са включени производните на хидроксамовите киселини- CONH-SAHA (амидна група, имаща структура, обратна на анилидната) и C₂H₄-phenyl-SAHA, където полярната анилидна група е заменена с две неполярни метиленови групи.

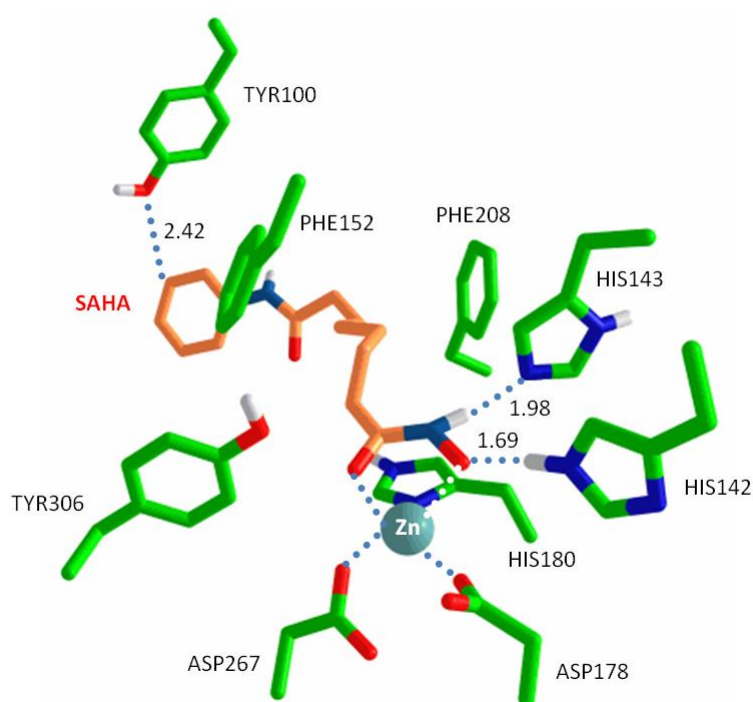
c) в третата подгрупа са включени представители, при които е модифицирана само крайна група. Останалите участъци – хидроксамова глава, линкер и свързваща единица са същите като при SAHA. Избрани са няколко представители, при които: (а) е добавен електрон-акцепторен заместител в различно положение в крайното бензеновото ядро на o, m, p- позиция, респективно: o-F-SAHA, m-F-SAHA, p-F-SAHA, и (б) добавен е електрон-донорен заместител в крайната група-N-dimethyl-SAHA.

d) в четвъртата група са включени хидроксамови киселини, при които отсъства линкерна част. Тези производни на хидроксамовите киселини съдържат хидроксамова глава и крайна група, но при тях отсъства линкерна част. Такива представители са Naphtohydroxamic acid, PCI-34051 и N-hydroxy-4-(naphtalen-1-yl) benzamide (NHNB) [50].

9.2. Моделиране на активния център

За моделирането на активния център на ензима беше използвана рентгеновата кристална структура от PDB (Protein Data Base) с код: 4QA0 и резолюция 2.24Å, която представлява молекула SAHA свързана с HDAC8. От така взетата структура, В веригата беше отстранена, а А веригата заедно с кристализирания инхибитор беше запазена. С помощта на програмата Raswin [51] и Gaussview 06 [52] отстранихме остатъците, които са на разстояние повече от 3 Å от инхибитора в активния център на ензима. Директно координираните към цинковия йон остатъци (Asp178, Asp 267, His180) бяха запазени. Остатъците Tyr306, His142, His 143 също

бяха запазени заради приноса им във взаимодействията в системата SAHA-HDAC8 въпреки, че са по-отдалечени от свързания инхибитор. Водородните атоми бяха добавени към всички остатъци. C_{α} атомите на всички аминокиселини бяха модифицирани в метилови групи и, за да се запази интегритета на ензимния джоб, бяха държани замразени по време на геометричната оптимизация на системата. На фиг. 29 е показана първоначалната структура на активния център на системата SAHA-HDAC8, която е използвана в настоящия дисертационен труд като отправна точка в бъдещите изчисления. От така създадения файл молекулата на SAHA беше заменена със съответната хидроксамова киселина, описана в по-горната схема и бяха получени съответните моделни ензимно-инхибиторни комплекси HDACi-HDAC8.



Фигура 29. SAHA в активния център на ензима HDAC8 (взето от pdb:4QA0).

9.3. Влияние на дължината на линкера

При свързването на молекулата на SAHA към активния център на HDAC8 различни фактори оказват влияние върху процесите на свързване и допринасят за стабилността на образуваните комплекси. От една страна, цинковия йон се координира бидентатно към хидроксамовата глава, а от друга страна се реализират серия от електростатични и Ван-дер-Валсови взаимодействия, които допълнително стабилизират образуваната ензимно-инхибиторна система.

Ще се измени ли афинитетът на инхибитора при промяната на дължината на неговата линкерна верига? За да отговорим на този въпрос, ние моделирахме серия хидроксамови киселини, които са аналози на SAHA и се различават само по дължината на линкерната верига – съдържат 4, 5, 7 и 8 метиленови групи. Енергетичните промени са изчислени за следните четири заместителни реакции, където SAHA (притежаваща линкер от 6 метиленови групи) се конкурира за активния център на HDAC8 с нейните аналози.



Енергиите на заместване на SAHA от изследваните хидроксамови киселини в различни диелектрични среди са представени в табл. 16

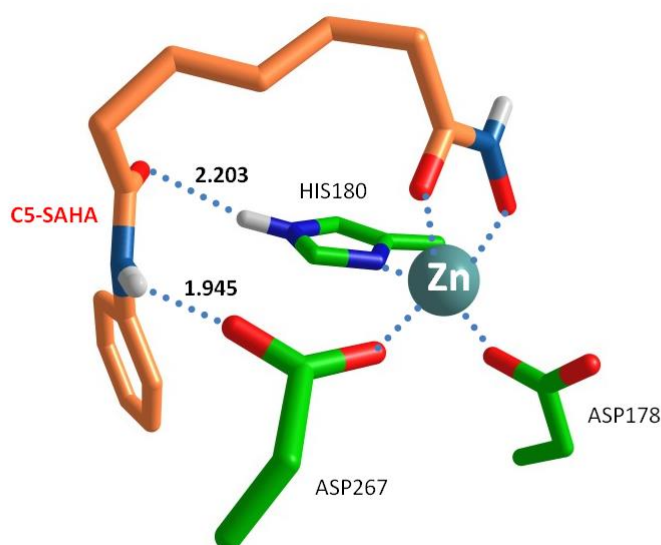
Таблица 16. Енергии (в kcal / mol) на заместване на SAHA от аналози с променлива дължина на линкерната верига в различни диелектрични среди.

Инхибитор	ΔE^1	ΔE^{78}	ΔE^{33}
SAHA	0.0	0.0	0.0
C4-SAHA	-0.24	0.34	0.36
C5-SAHA	-11.28	-8.61	-8.90
C7-SAHA	2.79	1.80	1.89
C8-SAHA	5.58	6.18	6.27

От реакция №23 в нашето изследване, виждаме, че C5-SAHA има значително по-висок афинитет от SAHA при свързването си към HDAC8, тъй като ΔE на SAHA \rightarrow C5-SAHA имат отрицателни стойности в целия диелектричен обхват. Детайлен анализ на структурата на комплекса C5-SAHA-HDAC8 разкрива, че това се дължи на допълнителното стабилизиращо взаимодействие между C5-SAHA и аминнокиселиния остатък от активния център (фиг.30). Липсата на една метиленова група в C5-SAHA, в сравнение с SAHA, поставя анилидната група от свързващата група на хидроксамовата киселина в подходящо положение, в резултат на което се образува водородна връзка между кислородния атом, който не е свързан с метала от карбоксилната група на Asp267, и водородния атом от анилидната –NHCO- групата на C5-SAHA. Тук следва да обърнем внимание, че водородната връзка между C = O (от инхибитора) и H-N (His180), характерна за SAHA, е отслабена (разстояние на връзката 2.20 Å), а вместо

това се създава по-силна NH (инхибитор)... -OOC (Asp267) водородна връзка (дължина на връзката 1.95 Å). Тези взаимодействия в настоящата дисертация, наричаме „ключови“ тъй като те допринасят съществено за енергетиката и допълнителното стабилизиране на ензимно-инхибиращите комплекси.

Всъщност, при C5-SAHА имаме едновременно и двете ключови взаимодействия, които при другите комплекси отсъстват (кислородът от карбонилната група с водорода от His180 и O от Asp 267 с водорода от амидната (фиг.30).



Фигура 30. Ключови взаимодействия между C5-SAH в активния център на HDAC8.

Следва да обърнем внимание, че разтворителят и неговия вид практически не оказват влияние на термодинамиката на заместителната реакция SAHA →INHIBITOR.

В резултат на по-дългия линкер в C7-SAHА и C8-SAHА взаимодействията между аспартата от активния център и водородните атоми от крайната група отслабват, което от своя страна лежи в основата на по-ниския афинитет на C7-SAHА и C8-SAHА към HDAC8 в сравнение с SAHA. Увеличаването на дължината на линкера над тази на SAHA (т.е. до 7 и 8 метиленови групи), намалява афинитета на инхибитора, което се доказва и от положителните стойности на ΔE в целия диелектричен обхват. В тази серия, колкото по-дълга е линкерната верига, толкова по-нисък е афинитетът към HDAC8 (по-висока ΔE за C8-SAHА, отколкото за C7-SAHА).

Анализирайки зависимостта структура–афинитет на комплексите, можем да видим, че това се дължи главно на отслабването на силата на взаимодействията между C=O (инхибитора) ... Н-N (His180) в серията SAHA → C7-SAHA → C8-SAHA. Дължината на водородната връзка нараства от 1.96 Å до 2.00 Å, докато при C8-SAHA това взаимодействие не се реализира.

Таблица 17. Изчислени разстояния (в Å) между Zn^{2+} и неговите лиганди в активния център на HDAC8.

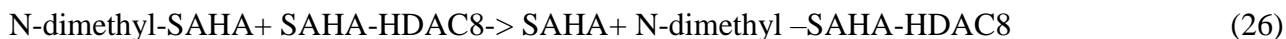
Инхибитор	NH	O=C	Asp267	His180	Asp178
	(хидроксамова глава)	(хидроксамова глава)			
SAHA	2.14	2.13	2.06	2.15	2.01
C4-SAHA	2.14	2.16	2.03	2.15	2.02
C5-SAHA	2.13	2.12	2.10	2.15	2.00
C7-SAHA	2.16	2.11	2.05	2.15	2.02
C8-SAHA	2.14	2.13	2.05	2.16	2.02

В изследваните комплекси са наблюдавани две взаимодействия, обозначени като „ключови“: (а) C=O групата от анилидният фрагмент на свързващата частица осъществява водородна връзка с Н-N групата от His180; (б) взаимодействие между водорода от анилидната група на свързващата частица и карбонилния кислород от остатъка от Asp267 от активния център. Те оказват влияние върху афинитета и селективността на структурно подобните на SAHA хидроксамови киселини по отношение на активния център на ензима HDAC8. Второстепенните взаимодействия, които са значително по-слаби от „ключовите“, също допринасят за допълнителната стабилизация на ензимно-инхибиторната система. Като пример за „второстепенни взаимодействия“ можем да посочим, взаимодействието между карбонилния кислород от Asp267 от активния център и водородните атоми от крайната група на бензеновото ядро. Нещо повече, промяната на дължината на линкера, не засяга структурата (и съответно енергията) на металния център на ензима, а неговите геометрични характеристики се отклоняват в много тесни граници, в рамките на серията (табл. 17). По този начин, разликите в афинитета/селективността на различните хидроксамови киселини се дължат в по-голяма степен на ключовите стабилизиращи и допълнителни взаимодействия, които възникват между различни участъци на инхибитора и активния център на HDAC8, отколкото на координиращата способност на метала към хидроксамовата глава.

9.4. Ефект от модифицирането на крайната група

В табл. 18 са представени енергиите на заместване на SAHA от изследваните хидроксамови киселини в активния център на HDAC8, притежаващи същата структура, но с модифицирана крайната група.

Енергетичните промени са изчислени за следните четири заместителни реакции:



Модифицирането на крайната група с различни заместители в бензеновото ядро се характеризира с незначително изменение на реакционната енергия. Нито N-dimethyl-SAHA, който притежава електрон-донорна група, нито различни модифицирани флуорни производни, които притежават електрон-акцепторна група, съответно о, m, p -моно заместени бензенови производни, не играят съществена роля в енергетиката на процеса и показват сходна енергия на обмен в системата SAHA → Inhibitor, в рамките на няколко kcal/mol в различна среда.

Можем да заключим, че при изследването на влиянието на заместители с различна електронната природа, които са разположени в различна позиция в бензеновото ядро не установихме влиянието нито на електронната природа на заместителите, нито на позицията им в бензеновото ядро върху афинитета на съответната хидроксамова киселина към активния център на HDAC8.

Енергиите на заместване на SAHA от изследваните хидроксамови киселини в различни диелектрични среди са представени в табл.18.

Таблица 18. Енергии (в kcal/mol) на заместване на SAHA от аналози с модифицирана крайна група в различни диелектрични среди.

Инхибитор	ΔE^1	ΔE^{78}	ΔE^{33}
SAHA	0.0	0.0	0.0
N-dimethyl-SAHA	-0.94	-1.20	-1.19
o-F-SAHA	-5.13	-1.78	-1.86
m-F-SAHA	-0.92	-0.22	1.89
p-F-SAHA	-4.94	-1.08	-1.39

Тук, също както и в предишната подгрупа от инхибитори, промените в крайната група, която е максимално отдалечена от хидроксамовата глава в активния център не влияят върху структурата и енергетиката на свързване между металния йон и хидроксамовата глава. Видът на разтворителя практически не оказва влияние на термодинамиката на заместителната реакция SAHA → Inhibitor.

9.5. Модификацията на свързващата група

Изследвано е влиянието на модификацията на свързващата група върху афинитета/селективността, чрез изследването на енергетичните промени за следните заместителни реакции:



Енергиите на заместване на SAHA от аналози с модифицирана свързваща група в различни диелектрични среди са представени в табл. 19.

Таблица 19. Енергии на заместване на SAHA (в kcal/mol) от аналози с модифицирана свързваща група в различни диелектрични среди.

Инхибитор	ΔE^1	ΔE^{78}	ΔE^{33}
SAHA	0.0	0.0	0.0
C ₂ H ₄ -phenyl-SAHA	1.63	2.48	2.52
CONH-SAHA	-0.97	3.06	2.88
SONH-SAHA	0.36	-1.03	-1.01

Анализът на резултатите в табл. 19, подчертава важността и значението на анилидната –NHCO- група за енергетиката на ензимно-инхибиторното взаимодействие. Молекулата на C₂H₄-phenyl-SAHA, при която анилидната група отсъства, не може да се конкурира успешно с SAHA за активния център на HDAC8 (положителни ΔE на обмен на SAHA → C₂H₄-phenyl-SAHA в табл.19).

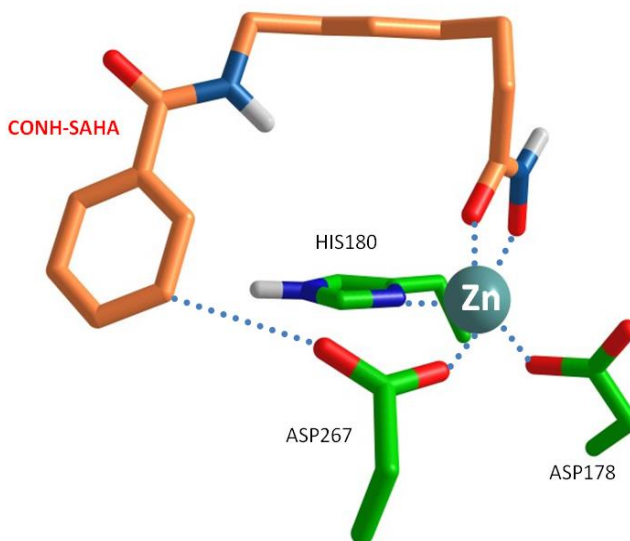
От друга страна, заместването на анилидната група (-NHCO-) с amidна (-CONH-) в молекулата на SAHA, води до по-нисък афинитет на хидроксамовата киселина CONH-SAHA към HDAC8 в сравнение със SAHA. Това би могло да бъде обяснено с невъзможността (поради

стерични причини) за образуването на водородна връзка между карбонилната група от инхибитора C=O и водорода (NH от His180).

Аналогично, по-ниския афинитет на C₂H₄-phenyl-SAHA, може да бъде обяснен с липсата на стабилизиращи взаимодействия в системата C₂H₄-phenyl-SAHA-HDAC8, които присъстват при SAHA-HDAC8. По своята химическа природа тези ключови стабилизиращи взаимодействия, които са характерни за системата SAHA-HDAC8, представляват взаимодействия между свързващата група и аминокиселини остатъци от джоба на ензима.

В молекулата на SONH-SAHA, където анилидната група е заменена със сулфонамидна, наличието на силна вътрешномолекулна водородна връзка между сулфонамидната група и съседните аминокиселини остатъци от ензимния джоб показват, че реакцията на обмен SAHA → SONH-SAHA е благоприятна в разтворител (отрицателни стойности ΔE^{78} и ΔE^{32}).

Липсата на свързваща група в C₂H₄-phenyl-SAHA изменя не само афинитета към активния център на ензима HDAC8, но и подчертава важноста на отделянето и като отделен елемент, различен от линкера във фармакофорния модел на структурно подобните на SAHA хидроксамови киселини. Наличието на тази група в молекулата, подобрява взаимодействията между инхибитора и активния център, което води до промяната на афинитета. Тези изводи съвпадат с предишни изследвания, [53] които утвърждават, че свързващата група може да усилва определени взаимодействия в ензимния джоб.

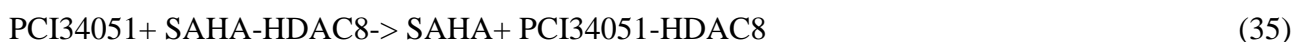


Фигура 31. Координиране на CONH-SAHA в активния център.

9.6. Безлинкерни инхибитори

Наличието на инхибитори [50], с приложение във фармацевтичната практика, при които отсъства линкерна част, насочи нашия интерес към изследването на влиянието (липсата/наличие) им в молекулата върху афинитета/селективността на съответната хидроксамова киселина към активния център на ензима HDAC8.

Изследвали сме влиянието на модификацията на линкерната част върху афинитета/селективността, чрез изследването на енергетичните промени за следните заместителни реакции:



Енергиите на заместване на SAHA от безлинкерни инхибитори в различни диелектрични среди са представени в табл. 20.

Таблица 20. Енергии (в kcal/mol) на заместване на SAHA с безлинкерни инхибитори в различни диелектрични среди.

Инхибитор	ΔE^1	ΔE^{78}	ΔE^{33}
SAHA	0.0	0.0	0.0
Naphtohydroxamic acid	2.85	4.47	4.71
PCI34051	6.23	5.78	5.95
N-hydroxy-4-(naphtalen-1-yl) benzamide (NHNB)	1.65	0.32	0.33

Можем да отбележим, че всички енергии на заместване са положителни, което предполага по-нисък афинитет в сравнение с SAHA на тези молекули към HDAC8. Обяснението на това можем да търсим в специфичната структура на тези инхибитори, която е лишена от въглеродороден линкер и анилидна група, като по този начин липсват важни стабилизиращи взаимодействия между инхибитора и ензима гостоприемник, както беше обсъдено по-горе. Нещо повече, относително обемистите ароматни групи свързани директно с хидроксамовата глава на инхибитора, не се вписват добре в тесния канал, който води към активния център на HDAC8.

Вида на разтворителя практически не оказва влияние на термодинамиката на заместителната реакция SAHA →INHIBITOR.

В заключение, с помощта на проведените изчисления с теорията на функционала на плътността и анализа на зависимостта структура-афинитет, бяха разкрити две „ключови“ и няколко „допълнителни“ взаимодействия в ензимно-инхибиторната система. Анализът на тези взаимодействия ни помогна да установим факторите, управляващи процесите на свързване, афинитета и селективността на инхибиторите на хистон деацетилазата към активния център на ензима HDAC8.

“Ключови” се оказват следните взаимодействия:

(1) взаимодействието между кислородния атом от анилидната група (-NHCO-) на инхибитора (или водорода от сулфонамидната група) на SAHA и водороден атом от His180. Отсъствието на такова взаимодействие при други представители на серията (например, C₂H₄-фенил-SAHA и C8-SAHA) понижава техния афинитет към активния център, в сравнение с SAHA.

(2) взаимодействието между водородния атом от анилидната група (-NHCO-) на инхибитора и кислородния атом от карбоксилната от Asp267 от активния център на ензимния джоб. Установено е, че това взаимодействие е най-силното в комплекса C5-SAHA-HDAC8, както и че наличието му директно корелира със значително по-големия афинитет на C5-SAHA към HDAC8 в сравнение с всички останали хидроксамови киселини, при които това взаимодействие отсъства. Трябва да се подчертае ролята на свързващата единица (анилидна, амидна или сулфонамидна група) за определянето на афинитета на инхибитора и селективността към ензима гостоприемник. По този начин, с оглед на нашето изследване, предлагаме, рекласифицирането на свързващата частица като самостоятелна структурна единица в рамките на обсъждания фармакофорен модел, отделено от линкера, заедно с хидроксамовата глава и крайната група.

В изследваните ензимно-инхибиторни системи, съществуват и допълнителни взаимодействия, които макар и не в такава степен, като ключовите взаимодействия, също допринасят за стабилизирането на ензимно-инхибиторния комплекс. Въпреки че тези взаимодействия са значително по-слаби от ключовите, е много вероятно те също да имат принос към афинитета на хидроксамовите киселини към ензима HDAC8.

Измежду аминокиселинните остатъци, които са координирани към цинковия йон в активния център на HDAC8, можем да отбележим ролята на Asp267 и His180, които играят важна роля не само заради свързването към катиона в активния център, но и участват в процесите, управляващи свързването, афинитета и селективността на инхибитора към ензима.

За разлика от тях е установено, че другите аминокиселинни остатъци - Asp178, His142 и His143, намиращи се в близост до каталитичния център, не участват в ключови или допълнителни взаимодействия и по този начин не допринасят за процеса на разпознаване в системата инхибитор- HDAC8.

От анализа на дължините на връзките между цинковия йон и хидроксамовата глава в различни ензимно-инхибиторни комплекси виждаме, че геометрията (и, съответно, енергетиката) на металния център не се променят съществено при промяна на отделните елементи от фармакофорния модел на хидроксамовите аналози. По този начин афинитетът и селективността на инхибиторите и техните производни зависят в значителна степен от структурните и физикохимични характеристики на линкера, свързващата единица и крайната група, а не толкова от взаимодействието между хидроксамовата глава и металния йон.

IV. Изводи

За цел (I)

1. С помощта на теорията на функционала на плътността е проведено систематично теоретично изследване на физикохимичните свойства на SAHA, инхибитор на хистон деацетилазата и модифицираните с S и Se аналози - SAHA-S, SAHA-Se, carb-S-SAHA, carb-Se-SAHA. Определени са стабилните конформери за всяко едно от изследваните съединения. При всички случаи най-стабилна е 1Z-кето формата. Определени са и енергиите на депротониране и за двата възможни протона O-H и N-H. Получени са данните както за газова фаза, така и за разтворител.
2. Установено е, че при SAHA, SAHA-S, SAHA-Se, carb-S-SAHA, carb-Se-SAHA термодинамично по-изгодно е депротонирането на N-H групата. В металните комплекси по-изгодно е бидентатното координиране с O- H депротонирани лиганди.
3. Установено е, че S и Se съдържащите аналози се депротонират по-лесно в сравнение със SAHA.
4. Изследвано е влиянието на координационното число върху стабилността на металните комплекси. Установено е, че най- изгодна е тетраедрична конфигурация, при която две молекули вода от втората координационна сфера на метала са моделирани експлицитно.
5. Изследван е афинитетът на двувалентни метални йони (Zn^{2+} , Fe^{2+} и Mg^{2+}) към серия инхибитори на хистон деацетилаза (SAHA, SAHA-S, SAHA-Se, carb-S-SAHA, carb-Se-SAHA). Установено е, че Zn^{2+} проявява най-висок афинитет към всички изследвани лиганди.

За цел (II)

6. Изследвано е влиянието на дължината на линкерната верига, вида на свързващата единица, модифицирането на крайната група, липсата и/или наличието на линкер върху афинитета/селективността на серия хидроксамови киселини към ензима HDAC8.
7. Установено е наличието на серия „ключови“ и „допълнителни“ взаимодействия, които оказват съществено влияние върху афинитета/селективността на хидроксамовата киселина към активния център на HDAC8. Взаимодействието между кислородния атом от анилидната група (-NHCO-) на инхибитора на SAHA и водороден атом от His180.

Отсъствието на такова взаимодействие при други представители на серията (например, C₂H₄-фенил-SAHА и C8-SAHА се свързва) с по-нисък афинитет.

8. Установена е ключовата роля на свързващата единица за определянето на афинитета на инхибитора и селективността към ензима гостоприемник. По този начин, с оглед на нашето изследване, предлагаме рекласифицирането на свързващата частица като самостоятелна структурна единица в рамките на обсъждания фармакофорен модел, отделно от линкера, заедно с хидроксамовата глава и крайната група. Фармакофорен модел от 4 структурни единици, при класификацията на хидроксамовите киселини е по-удачен в сравнение с 3-структурния фармакофорен модел.
9. Установено е влиянието върху афинитета/селективността на аминокиселинните участъци от ензимния джоб. Измежду, аминокиселинните остатъци, които са координирани към цинковия йон в активния център на HDAC8, можем да отбележим ролята на Asp267 и His180, които взимат участие не само при свързването към катиона във активния център, но и имат ключова роля във процесите, управляващи свързването, афинитета и селективността на инхибитора към ензима. За разлика от тях е установено, че другите аминокиселинни остатъци - Asp178, His142 и His143, намиращи се в близост до каталитичния център, не участват в ключови или допълнителни взаимодействия и по този начин не допринасят за процеса на разпознаване в системата инхибитор-HDAC8.
10. Интересни изводи можем да направим и от анализа на дължините на връзката между цинковия йон и хидроксамовата глава в различни ензимно-инхибиторни комплекси. Беше установено, че геометрията (и, съответно, енергетиката) на металния център не се променят при промяна на отделните елементи от фармакофорния модел на хидроксамовите аналози. По този начин афинитетът и селективността на инхибиторите, и техните производни, се формира от структурните и физикохимични характеристики на линкера, свързващата единица и крайната група, а не толкова от взаимодействието между хидроксамовата глава и металния йон.

V. Приноси

1. Участия в национални и международни форуми, свързани с дисертационния труд

Николай Тошев, Диана Чешмеджиева, Тодор Дудев, “Фактори, определящи металния афинитет и селективност на инхибитори на хистон деацетилазата използвани в клиничната практика”, XVI Национална конференция по химия за студенти и докторанти – 17-19 май 2017 г., София, България, Факултет по химия и фармация, **(устен доклад)**.

Николай Тошев, Диана Чешмеджиева, Тодор Дудев, “Фактори, определящи металния афинитет и селективност на функционализирани със сяра и селен инхибитори на хистон деацетилазата с потенциално приложение в клиничната практика”, XVII Национална конференция по химия за студенти и докторанти – 16-18 май 2018 г., София, България, Факултет по химия и фармация, **(устен доклад)**.

Nikolay Toshev, Diana Cheshmedzhieva, Todor Dudev, “Investigation of the metal affinity and selectivity of inhibitors of histone deacetylase with potential use in oncology”, Летняя школа-конференция молодых ученых «Моделирование умных материалов», Кластер конференций, Институт химии растворов им.Г.А.Крестова, Российской академии наук, 01.07-06.07.2018г., Суздаль, Русия, **(постер)**.

Nikolay Toshev, Diana Cheshmedzhieva, Todor Dudev, “DFT study of interactions between hydroxamic acids and histone deacetylases”, 11 Chemistry conference, 11-13 October 2018, University of Plovdiv, Faculty of Chemistry, Plovdiv, Bulgaria, **(устен доклад)**.

Nikolay Toshev, Diana Cheshmedzhieva, Todor Dudev, “DFT study of interactions between hydroxamic acids and histone deacetylases”, VII Всероссийская конференция по структуре и энергетике молекул, ИГХТУ, 19-23.11.2018, Иваново, Русия **(устен доклад)**.

Nikolay Toshev, Diana Cheshmedzhieva, Todor Dudev, “DFT study of interactions between a series of hydroxamic acids and HDAC8 enzyme”, 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, **(устен доклад)**.

Nikolay Toshev, Diana Cheshmedzhieva, Todor Dudev, “DFT study of interactions between a series of hydroxamic acids and HDAC8 enzyme”, XXIV Всероссийская конференция молодых ученых-химиков (с международным участием), 23-25.04.2019, Нижний Новгород, Русия, **(устен доклад)**.

Николай Тошев, Диана Чешмеджиева, Тодор Дудев, “Изследване на взаимодействията между серия хидроксамови киселини и ензима HDAC8”, XVIII Национална

конференция по химия за студенти и докторанти – 15-17 май 2019 г., София, България, Факултет по химия и фармация, (устен доклад).

2. Публикации, свързани с дисертационния труд

1. Factors governing the affinity and selectivity of histone deacetylase inhibitors for the HDAC8 enzyme active site: Implications for anticancer therapy, **Toshev, N.**, Cheshmedzhieva, D., Dudev T., Journal of Physical Organic Chemistry, 2021, .Q3, IF=1.53 (препоръчана за публикуване, две положителни рецензии),
2. Hydroxamic acid derivatives as histone deacetylase inhibitors: a DFT study of their tautomerism and metal affinities/selectivities, Cheshmedzhieva, D., **Toshev, N.**, Gerova, M., Petrov, O., Dudev, T., Journal of Molecular Modeling, 2018, 24(5), 114, Q3, IF=1.35.
3. Sulfur and selenium derivatives of suberoyl anilide hydroxamic acid (SAHA) as a plausible HDAC inhibitors: A DFT study of their tautomerism and metal affinity/selectivity, Cheshmedzhieva, D., **Toshev, N.**, Gerova, M., Petrov, O., Dudev, T. Bulgarian Chemical Communications, 2018, 50, с. 228-236, Q4, IF=0.24

Забелязани цитати на публикациите свързани с дисертационния труд (без самоцитати).

По статия №2

- a) Uba, Abdullahi Ibrahim, and Kemal Yelekçi. "Pharmacophore-based virtual screening for identification of potential selective inhibitors of human histone deacetylase 6." Computational biology and chemistry 77 (2018): 318-330.
- b) Song, Hyerim, Yun Jeong Hwang, Jae Won Ha, and Yong Chool Boo. "Screening of An Epigenetic Drug Library Identifies 4-((Hydroxyamino) Carbonyl)-N-(2-Hydroxyethyl)-N-Phenyl-Benzeneacetamide That Reduces Melanin Synthesis by Inhibiting Tyrosinase Activity Independently of Epigenetic Mechanisms." International Journal of Molecular Sciences 21, no. 13 (2020): 4589.
- c) Woźniczka, Magdalena, Mirosława Świątek, Joanna Gądek-Sobczyńska, Beata Pasternak, and Aleksander Kufelnicki. "Spectroscopic determination of metal-ligand coordination by biologically active 2-picolinehydroxamic acid with iron (III) and oxidovanadium (IV) in aqueous solutions." Acta Chimica Slovenica 66, no. 3 (2019): 711-718.

3.Награди

Първа награда на Национален конкурс за наградата „Аквахим“ на Съюза на химиците в България за 2018г. „За най-добра дипломна работа“.

4.Участие в проекти

1. „Механизми, катализ и реактивоспособност при органични реакции“ № ДН 09/4 на ФНИ от 15.12.2016, приключил.
2. „Интегрирано експериментално и теоретично изследване на взаимодействието на калциеви протеини със стронциеви йони. Следствия относно използването на стронция в медицината и фармакологията“, Конкурс за проекти по програми за двустранно сътрудничество 2019г. – България- Русия, 2019-2021 г., настоящ.

VI. Литературни източници

1. Finnin, M.S., et al., *Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors*. 1999. **401**(6749): p. 188-193.
2. Frish, M., et al., *Gaussian 09, revision A. 02*. 2009.
3. Perdew, J.P.J.P.R.B., *Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas*. 1986. **33**(12): p. 8822.
4. Huzinaga, S.J.T.J.o.c.p., *Gaussian-Type functions for polyatomic systems. I*. 1965. **42**(4): p. 1293-1302.
5. Dunning Jr, T.H.J.T.J.o.C.P., *Gaussian basis functions for use in molecular calculations. I. Contraction of (9s5p) atomic basis sets for the first-row atoms*. 1970. **53**(7): p. 2823-2833.
6. Dunning, T.H. and P.J. Hay, *Gaussian Basis Sets for Molecular Calculations*, in *Methods of Electronic Structure Theory*, H.F. Schaefer, Editor. 1977, Springer US: Boston, MA. p. 1-27.
7. Dudev, T. and C. Lim, *A DFT/CDM Study of Metal– Carboxylate Interactions in Metalloproteins: Factors Governing the Maximum Number of Metal-Bound Carboxylates*. *Journal of the American Chemical Society*, 2006. **128**(5): p. 1553-1561.
8. Lee, T.J. and H.F.J.T.J.o.c.p. Schaefer III, *Systematic study of molecular anions within the self-consistent-field approximation: OH⁻, CN⁻, C2H⁻, NH⁻ 2, and CH⁻ 3*. 1985. **83**(4): p. 1784-1794.
9. Sham, T., J. Hastings, and M. Perlman, *Structure and dynamic behavior of transition-metal ions in aqueous solution: an EXAFS study of electron-exchange reactions*. *Journal of the American Chemical Society*, 1980. **102**(18): p. 5904-5906.
10. Kuppuraj, G., M. Dudev, and C. Lim, *Factors governing metal– ligand distances and coordination geometries of metal complexes*. *The journal of physical chemistry B*, 2009. **113**(9): p. 2952-2960.
11. Harding, M.M., *The geometry of metal–ligand interactions relevant to proteins*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 1999. **55**(8): p. 1432-1443.
12. Przychodzeń, W. and J. Chojnacki, *Conformational analysis of N-isopropylbenzohydroxamic acids: crystal structure, DFT, and NMR studies*. *Structural Chemistry*, 2008. **19**(4): p. 637-644.
13. Cheshmedzhieva, D., et al., *Hydroxamic acid derivatives as histone deacetylase inhibitors: a DFT study of their tautomerism and metal affinities/selectivities*. 2018. **24**(5): p. 114.
14. Cheshmedzhieva, D., et al., *Sulfur and selenium derivatives of suberoyl anilide hydroxamic acid (SAHA) as a plausible HDAC inhibitors: a DFT study of their tautomerism and metal affinity/selectivity*. p. 228.
15. Marmion, C.J., D. Griffith, and K.B.J.E.J.o.I.C. Nolan, *Hydroxamic acids– an intriguing family of enzyme inhibitors and biomedical ligands*. 2004. **2004**(15): p. 3003-3016.
16. Fazary, A.E.J.J.o.C. and E. Data, *Thermodynamic studies on the protonation equilibria of some hydroxamic acids in NaNO₃ solutions in water and in mixtures of water and dioxane*. 2005. **50**(3): p. 888-895.
17. Bordwell, F., et al., *Acidities of carboxamides, hydroxamic acids, carbohydrazides, benzenesulfonamides, and benzenesulfonohydrazides in DMSO solution*. 1990. **55**(10): p. 3330-3336.
18. Ventura, O.N., et al., *Acidity of hydroxamic acids: an ab initio and semiempirical study*. 1993. **115**(13): p. 5754-5761.
19. Brown, D.A., et al., *cis–trans Isomerism in monoalkylhydroxamic acids by ¹H, ¹³C and ¹⁵N NMR spectroscopy*. 1988. **26**(11): p. 970-973.
20. Codd, R.J.C.C.R., *Traversing the coordination chemistry and chemical biology of hydroxamic acids*. 2008. **252**(12-14): p. 1387-1408.

21. Amtul, Z., R. Siddiqui, and M.J.C.m.c. Choudhary, *Chemistry and mechanism of urease inhibition*. 2002. **9**(14): p. 1323-1348.
22. Brown, D., D. McKeith, and W.J.I.C.A. Glass, *Transition metal complexes of monohydroxamic acids*. 1979. **35**: p. 5-10.
23. Brown, D.A. and A.L.J.I.C. Roche, *Design of metal chelates with biological activity. 3. Nickel (II) complexes of alkyl and amino hydroxamic acids*. 1983. **22**(15): p. 2199-2202.
24. Kurzak, B., H. Kozłowski, and E.J.C.c.r. Farkas, *Hydroxamic and aminohydroxamic acids and their complexes with metal ions*. 1992. **114**(2): p. 169-200.
25. Fernandes, M.C.M., E.B. Paniago, and S.J.J.o.t.B.C.S. Carvalho, *Copper (II) mixed ligands complexes of hydroxamic acids with glycine, histamine and histidine*. 1997. **8**(5): p. 537-548.
26. Kurzak, B., K. Kurzak, and J.J.I.c.a. Jezierska, *Solution properties of Cu (II)-L- α -alaninehydroxamic acid*. 1986. **125**(2): p. 77-82.
27. Kurzak, B., K. Kurzak, and J.J.I.c.a. Jezierska, *Solution properties of Cu (II) \square L- α -leucinehydroxamic acid*. 1987. **130**(2): p. 189-193.
28. Zamora, R., et al., *Oxidative release of nitric oxide accounts for guanylyl cyclase stimulating, vasodilator and anti-platelet activity of Piloty's acid: a comparison with Angeli's salt*. 1995. **312**(2): p. 333-339.
29. Tam, S.S., et al., *Tepoxalin, a novel dual inhibitor of the prostaglandin-H synthase cyclooxygenase and peroxidase activities*. 1995. **270**(23): p. 13948-13955.
30. Senthikumar, L. and P.J.J.o.m.s. Kolandaivel, *Molecular interaction study of formohydroxamic acid (FHA) with water*. 2006. **791**(1-3): p. 149-157.
31. Zhou, J., R. Wu, and H.-B.J.P.C.C.P. Luo, *Inhibition mechanism of SAHA in HDAC: a revisit*. 2015. **17**(44): p. 29483-29488.
32. Wang, D., P. Helquist, and O.J.T.J.o.o.c. Wiest, *Zinc binding in HDAC inhibitors: a DFT study*. 2007. **72**(14): p. 5446-5449.
33. Cross, J.B., et al., *The Active Site of a Zinc-Dependent Metalloproteinase Influences the Computed $p K a$ of Ligands Coordinated to the Catalytic Zinc Ion*. 2002. **124**(37): p. 11004-11007.
34. Hightower, K.E., et al., *H-Ras peptide and protein substrates bind protein farnesyltransferase as an ionized thiolate*. 1998. **37**(44): p. 15555-15562.
35. Chen, K., L. Xu, and O.J.T.J.o.o.c. Wiest, *Computational exploration of zinc binding groups for HDAC inhibition*. 2013. **78**(10): p. 5051-5055.
36. Bressi, J.C., et al., *Exploration of the HDAC2 foot pocket: Synthesis and SAR of substituted N-(2-aminophenyl) benzamides*. 2010. **20**(10): p. 3142-3145.
37. Tissandier, M.D., et al., *SPECTROSCOPY, GASEOUS CLUSTERS, AND MOLECULAR BEAMS-The Proton's Absolute Aqueous Enthalpy and Gibbs Free Energy of Solvation from Cluster-Ion Solvation Data*. 1998. **102**(40): p. 7787-7794.
38. Decouzon, M., et al., *The gas-phase acidity and the acidic site of acetohydroxamic acid: a FT-ICR study*. 1990. **55**(13): p. 3980-3981.
39. Somoza, J.R., et al., *Structural snapshots of human HDAC8 provide insights into the class I histone deacetylases*. 2004. **12**(7): p. 1325-1334.
40. Ciancaglini, P., et al., *Effect of membrane moiety and magnesium ions on the inhibition of matrix-induced alkaline phosphatase by zinc ions*. 1990. **22**(7): p. 747.
41. Lukat, G.S., A.M. Stock, and J.B.J.B. Stock, *Divalent metal ion binding to the CheY protein and its significance to phosphotransfer in bacterial chemotaxis*. 1990. **29**(23): p. 5436-5442.
42. Sun, G. and R.J.J.B. Budde, *Substitution studies of the second divalent metal cation requirement of protein tyrosine kinase CSK*. 1999. **38**(17): p. 5659-5665.
43. Lee, L.V., et al., *Role of metal ions in the reaction catalyzed by L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase*. 2000. **39**(16): p. 4821-4830.
44. Dudev, T. and C.J.T.J.o.P.C.B. Lim, *Metal selectivity in metalloproteins: Zn²⁺ vs Mg²⁺*. 2001. **105**(19): p. 4446-4452.

45. Kim, B., A.S. Pithadia, and C.A.J.P.S. Fierke, *Kinetics and thermodynamics of metal-binding to histone deacetylase 8*. 2015. **24**(3): p. 354-365.
46. Sprnins, V., G. Barany, and L.J.C. Wattenberg, *Effects of organosulfur compounds from garlic and onions on benzo [a] pyrene-induced neoplasia and glutathione S-transferase activity in the mouse*. 1988. **9**: p. 131-134.
47. Gu, W., et al., *Carbonyl-and sulfur-containing analogs of suberoylanilide hydroxamic acid: Potent inhibition of histone deacetylases*. 2006. **14**(10): p. 3320-3329.
48. Dudev, T. and C.J.C.r. Lim, *Competition among metal ions for protein binding sites: determinants of metal ion selectivity in proteins*. 2014. **114**(1): p. 538-556.
49. Remko, M., P.D. Lyne, and W.G.J.P.C.C.P. Richards, *Molecular structure, gas-phase acidity and basicity of N-hydroxyurea*. 1999. **1**(23): p. 5353-5357.
50. Tabackman, A.A., et al., *Structure of 'linkerless' hydroxamic acid inhibitor-HDAC8 complex confirms the formation of an isoform-specific subpocket*. 2016. **195**(3): p. 373-378.
51. Sayle, R.A. and E.J.J.T.i.b.s. Milner-White, *RASMOL: biomolecular graphics for all*. 1995. **20**(9): p. 374-376.
52. Dennington, R., T. Keith, and J. Millam, *GaussView, version 5*. 2009.
53. Marks, P.A. and R.J.N.b. Breslow, *Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug*. 2007. **25**(1): p. 84-90.