

СПРАВКА ЗА ПРИНОСНИЯ ХАРАКТЕР НА ТРУДОВЕТЕ НА ПРОФЕСОР ДХН ТОДОР ДУДЕВ

Научната ми продукция е отразена в една монографична книга, три глави от книги и 120 публикации в реферирани научни издания. Основните научни приноси са обобщени на следващите страници.

1. Фактори, управляващи процесите на метално свързване (metal binding) и селективност в металопротеините.

Около 40% от всички известни протеини съдържат метални кофактори. Металните катиони играят незаменима роля в редица жизнено важни за организмите процеси като ензимен катализ, стабилизиране на протеинната структура, предаване на сигналите в и между клетките, дишане и фотосинтеза. В серия от работи (чрез комбинирано използване на квантово-химични изчисления, пресмятания в непрекъсната диелектрична среда и анализ на структурите в Protein Data Bank) ние, за пръв път в тази област, проведохме систематични изследвания на ролята на различни фактори, контролиращи процесите на метално свързване и селективност в металопротеините (работи 20, 27, 28, 29, 33, 35, 41, 42, 45, 46, 59, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 71, 72, 73, 78, 80, 82, 83, 84). По-конкретно това са: (а) физико-химичните свойства на металния кофактор, (б) молекулните характеристики на лигандите от първата координационна сфера, (в) свойствата на втората координационна сфера, (г) приносите на протеинната матрица и разтворителя, (д) физиологичните концентрации на биогенните катиони, (е) вътрешно- и външномолекулни електрични полета и (ж) механични сили. В резултат на проведените изследвания бяха установени серия от физически закономерности, на които се подчиняват процесите на метално свързване и селективност в протеините, съдържащи метални кофактори. Получените резултати дават възможност за по-задълбочено опознаване на биофизиката и биохимията на металопротеините и хвърлят допълнителна светлина върху ролята на металните йони за правилната организация и функциониране на биологичните системи. Установените физически

закономерности имат потенциала да бъдат използвани като ръководни принципи при конструирането на нови металопротеини със зададени характеристики, а също така и при проектирането/дизайна на нови лекарствени продукти. Резултатите от изследванията са обобщени в няколко обзорни публикации, които се отличават с висока цитируемост в научната литература, и са отпечатани в *Chemical Reviews* (работи 4 и 9), *Accounts of Chemical Research* (работи 2 и 8), *Annual Review of Biophysics* (работа 7), *Journal of Inorganic Biochemistry* (работа 1) и *Journal of the Chinese Chemical Society* (работа 10). Последната статия беше удостоена от Китайското химическо дружество с медал и награда за най-добра публикация за 2003 година (виж приложението).

2. Детерминанти на катионна селективност в йонни канали

Йонните канали представляват специализирани протеини, които транспортират йони през клетъчните мембрани. Те са незаменими компоненти на живата клетка и регулират мускулния тонус, предаването на сигнали в клетката, секрецията на хормони, усещанията за болка и вкус. Много от тях (особено voltage-gated Na^+ , K^+ , Ca^{2+} и протонни канали) се отличават със забележителна катионна селективност, която им позволява много ефикасно да избират и пропускат само желаните за транспортиране метални катиони като игнорират конкурентните катиони от клетъчния/извънклетъчния разтвор. Определянето на ключовите фактори, контролиращи йонната селективност в йонните канали, е обект на интензивни изследвания и е от значителен интерес както за биологията, така и за медицината и фармакологията. В наши работи, чрез моделни изчисления, успяхме да разкрием детерминантите на катионна селективност в тези системи. Определящ фактор за избора на K^+ спрямо Na^+ в калиеви канали се явява високата степен на координираност на металния катион в йонния канал (координационно число 8, както във филтъра за селективност, така и в аква-комплексите в неговата околност; работа 63). От друга страна, натриевите канали проявяват избирателност към Na^+ спрямо K^+ в резултат на благоприятна комбинация от няколко фактора,

характеризиращи филтъра на селективност: ниска степен на координираност на металния катион (координационно число 3), наличие на силни електронодонорни лиганди и тясна пора, отговаряща на размерите на натриевия катион (работа 61). Резултатите от изследванията са обобщени в глава от книга, издадена от Springer (C. Lim and T. Dudev, "Potassium Versus Sodium Selectivity in Monovalent Ion Channel Selectivity Filters" in The Alkali Metal Ions: Their Role for Life, Vol. 16 of Metal Ions in Life Sciences (Eds. A. Sigel, H. Sigel, R.K.O. Sigel), Springer International, Cham, Switzerland, 2016, pp. 325-347).

В няколко изследвания за пръв път беше показано, че от определящо значение за избора на Na^+ (спрямо Ca^{2+}) или Ca^{2+} (спрямо Na^+), съответно в *натриеви* или *калциеви* канали, притежаващи еднакъв филтър за селективност със структура Glu-Glu-Glu-Glu, е степента на хидратираност на транспортирания катион, която е тясно свързана с размера на пората: ниска степен на хидратираност благоприятства преминаването на Ca^{2+} катиони, докато увеличаването на хидратната обвивка е в полза на Na^+ (публикации 6, 56, 57). Степента на хидратираност на металния катион като ключов фактор в процеса на конкуренция между металните катиони в магнезиеви йонни канали беше също анализирана и оценена (работа 54). Детайлният механизъм на изключително високата селективност на voltage-gated $\text{Hv}1$ и influenza A M2 протонни канали беше установен в работи 44 и 48.

3. Установяване на механизма на терапевтично действие на абиогенни метални йони: Li^+ и Ga^{3+}

Установено е, че абиогенни метални йони, като Li^+ и Ga^{3+} , имат благотворно влияние при лечението на някои заболявания при хората. Така например, литият (под формата на разтворими соли) се използва много успешно при лечение на пациенти, страдащи от биполарно разстройство. Галият, от своя страна, е много подходящо антираково и антибактериално средство. Механизмът на терапевтично действие, на атомно ниво, на тези метални йони, не е достатъчно добре изучен. С цел изясняване на този проблем, бяха проведени моделни изчисления върху серия от протеини и изследван процесът на конкуренция между нативните метални йони

(Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ и Fe^{3+}) и техните абиогенните конкуренти в съответните биологични системи. В резултат на проведените изчисления бяха разкрити няколко основни механизма на терапевтично действие на тези абиогенни катиони. Така например, за лития беше установено, че той, чрез заместване на нативния катион (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+) дезактивира/инхибира ключови металоензими, които са свръхекспресирани/хиперактивни при пациенти, страдащи от неврологични заболявания (работи 2, 5, 33, 40, 59). Нашите теоретични предсказания за конкуренцията между Mg^{2+} и Li^+ в инозитол монофосфатазата бяха впоследствие потвърдени от експериментални изследвания (литиев ЯМР) от колеги от Израел (Anat Haimovich, Uzi Eliav, and Amir Goldbourt, J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 12, 5647–5651). От друга страна, галият успешно се конкурира с Fe^{3+} в протеини, свръхекспресирани в туморни клетки, и нискомолекулни сидерофори, секретирани от патогенни бактерии. Заместването на редокс-активния ферийон с редокс-неактивния галий води до инхибирането/дезактивирането на съответните неблагоприятни за организма биологични обекти (работи 1, 18, 25, 46).

4. Метално-индуцирано нагъване на протеините (metal-induced protein folding): Моделиране на процесите на зародишообразуване в zinc-finger протеини

Zinc-finger протеините са едни от най-разпространените еукариотни транскрипционни фактори, които специфично се свързват и разпознават определени участъци от веригата на ДНК. За тяхното правилно нагъване и функциониране е необходимо включването на цинкови катиони в протеинната структура, които инициират процеса на нагъване и играят ролята на зародишообразуващи центрове. Чрез проведените теоретични изследвания (работа 65) ние за пръв път показвахме дискретния механизъм на зародишообразуването, иницирано от цинковия катион, и оценихме ролята на различни фактори при протичане на процеса. Беше демонстрирано решаващото участие на амидната група от полипептидната верига, която заедно със страничните вериги на Cys и His участва в свързването на металния катион, понижава енергията на металния комплекс, повишава компактността на зародишообразуващия център, редуцира

конформационното пространство и успешно направлява процеса на нагъване на протеина за постигане на съответната функционална конформация. Получените данни могат да бъдат използвани при изследванията на процесите на нагъване на други класове металопротеини, където метални йони изпълняват ролята на зародишообразуващи центрове.

5. Нестандартни натурални аминокиселини: оценка на техния потенциал за използване в проектирането и конструирането на металопротеини със зададени свойства

За пръв път беше дадена оценка на комплексообразуващите свойства – метален афинитет и селективност – на няколко нестандартни, но природно съществуващи аминокиселини като γ -карбоксиглутаминова киселина, селеноцистеин и пиролизин (статия 62). Резултатите от теоретичния анализ разкриват, че тези неканонични аминокиселини притежават по-висок афинитет по отношение на биогенни метални катиони (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+}), отколкото техните стандартни аминокиселинни аналози (съответно глутаминова киселина, цистеин и лизин). Проявяват отчетлива избирателност към Zn^{2+} спрямо Mg^{2+} и Ca^{2+} . Проведените изследвания показват, че редките аминокиселини селеноцистеин, пиролизин и γ -карбоксиглутаминовата киселина имат потенциала да бъдат използвани като ефикасни металосвързващи лиганди при проектирането и конструирането на нови металопротеини със специфични свойства.

6. Определяне на ключовите фактори, контролиращи механизма на нередокси-окислителните (non-redox) реакции на никотинамид аденин динуклеотид (NAD^+)

Никотинамид аденин динуклеотидът (NAD^+) е незаменим коензим/субстрат за голям брой ензими, катализиращи както редокси-окислителни, така и нередокси-окислителни процеси. Аденозин-дифосфат-риболизиралите ензими катализират процеса на разкъсване на никотинамид-гликозилната връзка в NAD^+ и добавянето на нуклеофилна група към аномерния въглероден атом от рибозния остатък. Предишни изследвания на механизма на хидролизата на NAD^+ са

фокусирани главно върху особеностите и влиянието на никотинамид-рибозния остатък в хода на каталитичния процес. Ролята на дифосфатната група от NAD^+ (отрицателно заредена, гъвкава и химически реактивна структурна единица), обаче, остава неоценена. Липсват също така систематични изследвания относно ролята на други фактори, като вида/нуклеофилността на атакуващия нуклеофил и диелектричните свойства на средата, върху механизма на хидролизата на NAD^+ . Целта на изследванията, включени в нашата работа 60, е да се предостави липсващата информация по тези въпроси и определят ключовите фактори, контролиращи механизма на процеса. Използвайки комбинация от DFT изчисления и пресмятания в непрекъсната диелектрична среда, ние моделирахме $\text{S}_{\text{N}}1$ и $\text{S}_{\text{N}}2$ реакционните механизми и дадохме оценка (за пръв път в литературата) на ролята на дифосфатната група при стабилизирането на (1) основното състояние на NAD^+ , (2) оксокарбокатионния интермедиат, (3) реакционния продукт и (4) нуклеофилната молекула. Получени бяха също така данни за влиянието на химическата природа на атакуващия нуклеофил и диелектричните свойства на средата върху реакционния механизъм. Показано е как комбинацията от различни фактори оказва влияние върху скоростта на процеса.

7. Термодинамични изследвания върху процесите на хидратиране и взаимодействие на макроциклични молекули с метални/немтални йони и лекарствени субстанции

Различни класове макроциклични молекули (циклодекстрини, кукурбитурили, бамбусурили и каликсарени) проявяват силно изразени комплексообразуващи свойства към органични/неорганични йони и лекарствени субстанции и намират широко приложение в промишлеността, медицината и фармацията. В серия от работи бяха моделирани макроциклични молекули-домакини и изследвани термодинамичните параметри на техните взаимодействия с набор от метални йони (статии 12, 16, 26, 37, 38, 39), вода (36, 24) и лекарствени субстанции (14, 21). Бяха определени ключовите фактори, управляващи процесите на комплексообразуване в тези системи, както и оптималните условия за протичане на процесите на разпознаване между молекулата-домакин и молекулата-гост.

8. Нов подход за определяне на енергията на напрежение (ring strain) в напрегнати цикли

Предложен е нов подход (чрез използване на *ab initio* изчисления) за пресмятане на енергията на напрежение (E_{RS}) в напрегнати цикли (№ 88). Методът също така позволява определянето на относителния принос на различни източници на напрежение към E_{RS} . Подходът е калибриран чрез възпроизвеждане на експериментално определените енергии на напрежение в моно- и бициклохлороводороди, циклични етери и амини. Новият формализъм е използван за предсказване на енергиите на напрежение в серии от циклични фосфоестери, циклични флуороводородни клъстери и циклични магнезиеви диалдехидни хелати. Методът е приложен от нас за оценка на ролята на E_{RS} за увеличената реактивоспособност на пет-членни циклични фосфати спрямо техни алифатни или шест-членни циклични аналози. Предложеният метод е добре приет и използван от научната общност (цитиран 182 пъти в литературата).

9. Нови методи за интерпретация на интензивностите на ивиците в инфрачервените и Раманови спектри

Анализът на интензивностите на ивиците във вибрационните спектри предоставя изключително ценна и незаменима в редица случаи информация относно разпределението на електричните заряди в молекулите и тяхната динамика по време на вибрационното движение. Разработен е от нас нов подход за анализ на интензивностите в инфрачервените спектри, наречен „Ефективни заряди на връзките от свободни от ротация атомни полярни тензори” (статия 103). Подобен подход е използван и при създаването на метод за анализ на интензивностите на линиите в Рамановите спектри, наречен „Ефективни индуцирани заряди на връзките от свободни от ротация тензори на поляризуемост” (статия 96). Новите методи са приложени за анализ на интензивностите в редица серии от органични и неорганични молекули (работи 77, 89, 90, 91, 93, 95, 97, 99). Показано е, че тези

методи предлагат удобен и надежден подход при изучаване на спектралните свойства на молекулите. Резултатите от многогодишните ни изследвания в областта на вибрационните интензивности са обобщени в монографичната книга “Vibrational Intensities”, обявена от критиката за „Нова класика” в тази област (*Analytical Chemistry News & Features*, October 1, 1997, p. 618).