Разширена хабилитационна справка на гл. ас. д-р Мирослав Рангелов

Въведение*

Рибозомата е сложна молекулна машина, превеждаща генетичния код от неговата временна форма - информационна РНК до протеини, които са ключов строителен материал за живата клетка и са основните катализатори в метаболитните пътища, осигуряващи обмена на материя и енергия между живата клетка и неживата природа. Ключовата роля на бактериалната рибозома я прави важна цел на антибактериалните средства, и в действителност, голям брой от клинично значимите антибиотици са насочени към тази сложна транслационна рибонуклеопротеинова машина.

Пълната XDR (X-ray diffraction) атомна структура на голямата рибозомна субединица показва отсъствие на протеини в границите на 18Å от активния център, с което доказва, че пептидилтрансферазата е РНК ензим (рибозим). Публикуваните структурни и биохимични особености на консервативния аденинов остатък A2486 (A2451 в Escherichia coli) в 23S рибозомната РНК доведоха до предпололожения за механизма на пептидил трансферния рРНК катализ, които включват този нуклеотид като основен каталитичен елемент. Но *in vivo* и *in vitro* изследвания, направени по-късно, показват, че голямата рибозомна субединица с мутиран A2451 продължава да има значителна пептидилтрансферазна активност.

Химичната реакция, водеща до синтез на пептидна връзка в рибозомата, е реакция на аминолиза. По време на елементарния акт на образуване на пептидна връзка, нарастващата полипептидна верига, естерифицирана към цис-1,2-диола на тРНК на 3`-крайния аденозин, реагира със следващата аминокиселина във вътрешността на рибозомния пептидилтрансферен център. Поради тази причина аминолизата на естери е широко изследвана както експериментално **[1o]**, така и теоретично **[2o]** като моделна реакция на образуването на пептидна връзка в живите клетки.

---

* Хабилитационната справка съдържа цитирана литература, която е обозначена със суфикси, както следва: избраните статии на автора, използвани като база за хабилитационна справка, т.е. попадащи в група В - носят суфикс “v”, статиите от група Г са със суфикс “g”, а цитираните статии, не влизащи в графи В и Г, са обозначени със суфикс “o”.

Различни изчислителни изследвания върху механизма на тази реакция са провеждани на малки моделни системи, като за да се симулира обкръжението в пептидилтрансферазния център на рибозомата, тези изследвания са правени във вакуум или в апротни разтворители с ниска полярност. Също така са изследвани малки и по-големи молекули с протоно донорни и протоно акцепторни центрове като катализатори на процеса, но без особен успех.

Описаните в точка **1)** изследвания са насочени към каталитичните възможности на много близкото обкръжение на карбонилния въглероден атом, който претърпява реакцията на аминолиза при ацилният трансфер, при която нов аминокиселинен остатък се прехвърля от транспортната РНК към удължаващата се полипептидна верига. Съществуват и много неясноти в чисто механистичната работата на рибозомата. Тъй като транслацията на генетичния код се осъществява чрез голям брой молекулни движения, отговорни за различни етапи от транслационния процес, молекулно динамичната симулация на цялата рибозома във физиологична среда би хвърлила светлина върху много от фините механизми, използвани при работата на тази сложна молекулна машина.

Един от големите проблеми в молекулно динамичната (MD) симулация на подобни големи нуклеопротеини е некомпенсираният заряд на фосфатните групи. Ние разработихме евристичен метод за тяхната неутрализация, който приложихме върху рибозомата.

Друг проблем, породен от ограниченията на XRD метода, е, че всички налични рибозомни XRD структури съдържат много липсващи мономери и са неподходящи директно за симулации с методите на молекулната динамика. Поради тази причина е конструирана нова цялостна рибозомна структура (на *E. coli*) на базата на най-цялостните налични PDB структури.

Разработените от нас алгоритми и методологии при изследванията върху работата на рибозоматар, както и върху молекулно динамичният модел на цялата рибозома, могат да се използват с успех при много разнообразни задачи в областта на разработването на нови лекарства и някои примери за тези успешни приложения са описани в точка **2).**

1) Изследвания върху молекулните аспекти на рибозомния каталитичен механизъм. [1v, 2v, 3V, 4V]

Алтернативен каталитичен ефект върху катализираната от рибозомата реакция може да дойде от вицинално разположената 2'-OH на 3'-крайния аденозин на тРНК, който винаги е близо до реакционния център. Решаващата роля на съседният 2`-OH върху каталитичната активност на рибозимите е също така експериментално потвърдена от загубата на пептидил трансферазната активност на рибозомата при 2'-деокси-пептидил-тРНК мутанти. **[1o(e)]** В по-ранна наша работа вътремолекулният каталитичен ефект на вициналната OH група при амонолиза на моноацилиран катехол беше моделирана успешно **[3o],** което доведе до продължение на проучванията на този каталитичен ефект върху по-близки до аминоацилирани транспортни РНКи и по-конформационно подвижни модели.

За съжаление дори най-простият алифатен модел, който включва вицинална хидроксилна група, има много голяма конформационна свобода, което доведе до разработването от нас и по-нататъшното оптимизиране на голям брой софтуерни алгоритми за автоматизиране на множеството изчисления, необходими за тези изследвания.

Някои от тези методологии и алгоритми, разработени от нас, са изброени по-долу:

1.1) Набор от методологии в областта на теоретичното изследване на системи с конформационно разнообразни реакционни пътища. [1v]

Изчислителното моделиране на реакционните механизми и енергетиката им е важна стъпка в изследването на процесите, протичащи в биологичните системи **[4o],** каталитичните системи **[5o]**, органичния синтез **[6o]** и др. Изборът на изчислителен метод **[7o]** и конструирането на началните структури на реагентите, преходните състояния, междинните продукти и крайните продукти често се извършват на базата на предишен опит и химическа интуиция. Този подход обаче не е подходящ, когато за пълното изследване на реакционния механизъм се изисква изчисляване на голям брой структури, поради размера или гъвкавостта на моделираната система.

Тук предлагаме автоматизирани процедури за етапите на едно систематично изследване на подобни реакционни механизми, които осигуряват надеждност и изчислителна ефективност.

Описаните процедури са имплементирани в софтуерният пакет MolRan.

Автоматизираните процедури за първите етапи на систематично изчислително изследване на реакционните механизми включват:

1.1.1) Методология за избор на изчислителен метод и базисен набор на основата на статистически анализ на изчислените структурни и енергетични данни, спрямо експерименталните стойности. [1v]

Първата стъпка в изчислителното моделиране е изборът на изчислителен метод и базисен набор, които са подходящи за изследваната химична система. За да се определи кой метод е надежден и в същото време е изчислително ефективен, ние разработихме алгоритъм за изчерпателен тест на различни комбинации от методи и базисни набори, статистически анализ на получените данни за структурите и енергиите им, както и сравняването им с експериментални стойности.

Като пример беше моделирана структурата на мравчената киселина и нейния димер, както и амонолизата на мравчената киселина на различни теоретични нива (около шестдесет комбинации от 6 квантово-химични метода и различни базисни набори). По-нататъчния статистически анализ на получените структурни и енергетични резултати, доведоха до дефинирането на B3LYP/6-31G** като най-бърз, но все още надежден метод за правилно описание на геометрията на моделираните структури и енергиите на реакцията.

1.1.2) Методология за определяне на всички различими конформации на преходните структури при системи с голяма конформационна свобода [1v]

Всяко задълбочено теоретично изследване изисква систематично изследване на всички възможни преходни структури и междинни съединения, принадлежащи към различни реакционни пътища, и идентифициране на структурите, съответстващи на най-ниските бариери, за да се определи най-енергетично изгодния реакционен път. Това търсене е особено сложно в системи с голяма конформационна свобода, където е важно да се проверят различни възможни конформации на преходните състояния и междинните продукти, за да се избере между тях набор от структури с ниска енергия, които да бъдат изчислени на последващ етап от по-адекватен, но по-ресурсоемък изчислителен метод.

Поради тази причина бе разработена автоматизирана процедура за конформационно търсене на структурите на преходните състояния и стабилни структури от дадено конформационно семейство.

Предимството на тази методология е, че енергитично най-изгодният път на изследваната реакция ще бъде намерен автоматично сред почти всички възможни конформации на участващите в реакцията структури само от един изчислен от ползвателя комплект структури, описващи реакционния път.

Методологията може най-общо да се раздели на няколко автономни основни стъпки, които могат да се използват и по отделно за други изчислителни задачи.

1.1.2.1) Методология за конформационно търсене на преходни структури, както и на стабилни структури [1v]

Нови набори от геометрии са генерирани чрез стъпково изменение на всички диедрични ъгли, които не участват в математическото представяне на атомите, директно включени

в преходно състояние (т.е. атоми, върху които са разположени основните части на преходния вектор). Генерирането на различните структури се осъществява чрез разработен алгоритъм, основан на представяне на молекулите чрез теория на графите.**[1v]**

1.1.2.2) Методология за частична релаксация на структурите от големи групи от генерирани структури [1v]

Използвана е оптимизационна процедура, базирана на оптимизационният метод “конюгиран градиент” с използване на аналитични първи производни. За тази предварителна оптимизация се използва модифицирана версия на силовото поле ММ, допълнено от експоненциален член за описание на водородните връзки. По време на геометричната оптимизация на структурите на ниво ММ атомите, участващи в късане и формиране на връзки, се запазват автоматично фиксирани едни спрямо други.**[1v]**

1.1.2.3) Методология за откриване и елиминиране на конформационно еквивалентни структури [1v]

Геометричната прилика на структурите се оценява по-нататък чрез числено оптимизиране на позицията на едната молекула, по отношение на другата, чрез конюгиран градиентен квази-Нютонов метод. Градиентите се изчисляват по метода на полиномна екстраполация на Риддър, като RMSD разстоянието между еквивалентните атоми от двете молекули в двойката служи като функция за минимизиране. Тази стъпка на процедурата позволява значително намаляване на броя на структурите, които трябва да бъдат третирани на по-високи изчислителни нива.**[1v]**

1.1.2.4) Методология за логическо свързване на структури от различни конформационни басейни на основа на геометричната им прилика [1v]

Поради сложността на преходния вектор при много от преходните структури и промяната на атомите, върху които главните му компоненти са позиционирани по протежение на реакционната координата, IRC търсенето често не може да достигне до стабилни структури. Поради тази причина, за да се намерят междинните съединения, към които водят различните преходни структури, както и междинните съединения, от които могат да се получат преходните структури, се използва методология, подобна на описаната по-горе, която се прилага за елиминиране на еквивалентни структури. В настоящата процедура всяка двойка междинни и преходни структури се позиционират една върху друга, като структурата на междинния продукт се позиционира в центъра на координационната система, а позицията на преходната стуктура се минимизира чрез транслация и ротация. Следващата стъпка е промяна на структурата на преходното състояние чрез модификация на атомите на база на преходния вектор на структурата, умножен по вариационен коефициент. Подобно на търсенето на еквивалентни структури, оптимизацията се извършва чрез квази-Нютонов метод, а RMSD разстоянието между еквивалентни атоми от двете молекули в двойката служи като функция за минимизиране. **[1v]**

1.1.2.5) Методология за генериране на неизвестна геометрия на преходни структури, основана на предварително определена свързаност на атомите, участващи в реакцията. [1v]

Разработихме подход за автоматичното конструиране на началните структури на преходни състояния с желана атомна свързаност (топология), но неизвестна геометрия.

При този подход се конструира и варира масив (комплекс) от точки във фазовото пространство на геометричните координати, който позволява идентифициране на точката с най-ниска енергия, съответстваща на глобалния минимум, при евентуално спазване на наложени от потребителя ограничения. При прилагането си процедурата води до локализиране на най-ниското по енергия преходно състояние, с желана свързаност на атомите на базата на предварително дефинирани, образуващи се и разцепващи се връзки, както и непроменящите се ковалентни връзки. Като пример са използвани хексагонални преходни структури. Минимизиращата функция е дефинирана от модифицираното ММ поле, приложено в програмата MolRan.**[1v]**

Първоначалният комплекс се състои от 2N/5 (N е броят на всички степени на свобода в системата) случайни геометрии и оптимизацията продължава до вариация в изменението на обема на комплекса $1x10^{-3}$. За разлика от други методи, използвани за намиране на структури на преходни състояния, този подход е в състояние да намери най-ниска по енергия структура на преходно състояние с предварително определена топология без първоначално предположение за структурата. Този метод е особено полезен, когато системата претърпява големи непредвидими промени от реагенти към продукти или когато елементарният етап на реакцията включва разцепване/образуване на повече от една връзка, където приложимостта на повечето от традиционните подходи, за локализиране на преходното състояние, е ограничена.**[1v]**

1.1.3) Разработена е методология за анализ на възможностите за катализ от протонно-донорна или протонно-акцепторна група, според нейното положение спрямо реакционния център. [3V]

Алгоритъмът води до построяването на графични карти, представящи каталитичния ефект на молекула-сонда, при различните ѝ положения около атомите, върху които са разположени основните компоненти на преходния вектор. Тъй като ефектът от катализатора е промяна на енергийния бариер на скоростоопределящият етап, за да се оцени каталитичния ефект на някой фактор върху изследвания процес, е необходимо да се изчисли разликата в промяната на енергията, дължаща се на този фактор за реагентите, от една страна, и за преходните структури, от друга. Разработеният алгоритъм изчислява тази разлика автоматично чрез генериране на начални геометрии, в които само позицията на молекулата-сонда е фиксирана спрямо избраните атоми. Следва минимизация на енергията на системата посредством избран софтуерен пакет за квантови изчисления и автоматично прочитане на резултата от изчисленията. Графичното представяне на такава разлика може да се разглежда като каталитична карта и може да се използва за определяне на влиянието на съседни групи в ензими и особено при конструирането на теозими или компузими. В допълнение, такива карти са удобен инструмент за проектиране на лекарствени молекули с функционални групи, ориентирани подходящо за активиране или инхибиране на моделираните процеси. **[3v]**

Като цяло, каталитичните карти, конструирани по начина, описан тук, могат да бъдат използвани за прогнозиране на оптималното положение на групите в хипотетични рибозимни или ензимни активни центрове. Те могат също така да помогнат за конструирането на нови или в модифицирането на известни лекарства, целещи ензимни активни центрове, както и за прогнозиране на лекарствената активност, спрямо известни рецептори.

Методологията е демонстрирана при проследяване влиянието на протоно донорна група, съседна на реакционния център по време на естерна амонолиза на ацилиран диол, като модел на реакцията на образуване на пептидна връзка в рибозомата.

В случая построяването на каталитичните карти беше в резултат на подробно сканиране на пространството около реакционните центрове в различните преходни състояния, с молекула вода като молекула сонда, действаща като типичен протонодонор.**[3v]**

- Каталитичните карти на влиянието на съседна протонодонорна група върху преходните състояния на амонолиза на ацилиран етандиол показват, че участието на кислородния атом на вициналната хидроксилна група във водородна връзка със съседен донор на протон може да намали активационната енергията на реакцията с до 7.2 kcal/mol. **[3v]**

- Каталитичният ефект е най-ясно изразен при скоростоопределящия етап на реакцията, т.е. първото шестчленно преходно състояние на стадийния механизъм TS16. **[3v]**

- При всички ориентации на съседната група, водородната връзка има положителен каталитичен ефект, т.е. допълнителната протоно донорна група е в състояние само да активира, но не и да инхибира процеса чрез влияние върху преходното състояние на скоростоопределящия етап. **[3v]**

- Моделирането на водна молекула, стабилизирана в по-разширен рибозомен модел на молекула аденозин чрез водородни връзки между нея и 2’OH на рибозата, както и между нея и N3 атома на нуклеобазата, ни позволи да заключим, че такъв съседен протонодонорен център ще улесни pro-S атаката на аминогрупата с около 7 kcal/mol, докато ефектът в случай на pro-R атака би бил два пъти по-

малък. Този резултат е в съответствие с наличните експериментални данни. **[3v]**

1.1.4) Изброените методологии и алгоритми са имплементирани в програмния пакет MolRan [1v, 3v]

MolRan е графична среда, базирана на OpenGL, и е предназначен за визуализация и генериране на молекулни геометрии, както и за анализ на химичните свойства и електронната структура на структури, получени чрез квантово-химични изчисления със специализирани изчислителни софтуерни пакети, като Gaussian или GAMESS. Различни предварително дефинирани входни файлови формати, като z-матрица, декартови и фракционни (напр. Xyz, pdb, cif), се поддържат в допълнение към напълно адаптивен четец на файлове, който може да извлича и представя структурни данни от текстови файлове, (например от файловете на друг софтуер за изчислителна химия). Разработени са различни инструменти за графично представяне, които позволяват на потребителя да визуализира Hessian, градиенти и други вектори, проекции на Newman по избрани атоми, MD траектории, RMS структури и т.н. **[1v, 3v]**

Програмата включва и набор от инструменти за генериране, зареждане и визуализиране на мрежи, генерирани на базата на различни данни, например Ван дер Ваалсови сфери, повърхности достъпни за разтворителя, мрежи на базата на орбитални коефициенти и примитиви, с цел визуализация на АО или МО еквипотенциални повърхности. В последния случай мрежата може да бъде заредена и от cube файл. Вградените инструменти позволяват математическа модификация на генерираните/визуализираните мрежи. Налична е и серия от инструменти за конструиране на входни файлове за задачи от конформационният анализ, както и за анализ на получените резултати. Реализираният файлов конструктор може да

генерира входни файлове с множество задачи със структури, варирайки избрани структурни параметри (междуатомни разстояния, валентни ъгли или диедрични ъгли), като избраните променливи могат да се променят синхронно или независимо. **[1v, 3v]**

1.2) Моделиране на рибозомалната каталитична активност чрез амонолиза на диоли [1v, 2v]

Проведохме изчислителното моделно изследване **[1v]** върху процеса на образуване на пептидна връзка в рибозомата, чрез изследване на влиянието на вицинална ОН група при моноацилирани диоли върху елементарния акт на естерна аминолиза. Това е алтернативен каталитичен ефект за тази реакция, който може да се осъществи от 2 '-ОН на 3'О терминалния аденозин на тРНК, който винаги е близо до реакционния център, а неговото отсъствие води до инактивиране на рибозомата.

При изследването използвахме моделна реакция - аминолиза на 1-О-формил 1,2-етандиол като този избор на реагентите се определя от присъствието във формилетандиоловата молекула на вицинална хидроксилна група до реакционния център, аналогично на рибозния пръстен в тРНК. Реакцията е подходящ модел за изясняване на механизма на биосинтеза на пептидна връзка в рибозомата, според теоретични **[8o]** и експериментални **[9o]** изследвания. **[1v]**

Резултатите от изследването включват изчерпателно търсене на различни възможни конформации на преходните структури, при които вициналната хидроксилна група образува вътрешномолекулни водородни връзки, водещи до стабилизиране на наблюдаваните структури или активно участва в протонния трансфер, т.нар. proton shuttle механизъм.

- Установено е, че каталитичното ускоряване на естерната амонолиза чрез водородна връзка от вицинална хидроксилна група при тетрагонални преходни състояния (осъществяващо се предпочитано чрез съгласуван механизъм), не е голямо, като свободната енергия на активиране се намалява само с 5,2 kcal/mol. Получената свободна енергия на активиране, $\Delta G^{\#}$ = 44.3 kcal/mol, все още е доста висока и поради тази причина е малко

вероятно да се осъществи пътят през тетрагонални преходни структури. Причината за този слаб каталитичен ефект са сравнително малките ъгли при протонните преноси в преходните структури, около 125-130 °, много по-малки от оптималния ъгъл от 180°. Сравнението със стабилизацията на преходните структури чрез водородна връзка от външна водна молекула предполага, че стабилизирането в случая на моноацилиран етандиол е близко до максимално възможното стабилизиране на този тип. **[2 v, 1v]**

-Другият механизъм на каталитично ускоряване при естерната амонолиза на вицинални диоли, чрез участието на вициналната хидроксилна група в преноса на протон посредством хексагонални преходни структури, не влияе съществено върху стабилността на преходните състояния при съгласувания механизъм и при втората стъпка на степенния механизъм. **[2 v, 1v]**

- Участието на вициналната хидроксилна група в преноса на протон стабилизира значително първото преходно състояние на степенния механизъм; свободната енергия на активирането е намалена с 16.0 и 10.8 kcal/mol спрямо референтната стойност при структурите без участие на вицинална хидроксилна група. Получената свободна енергия на активиране, 33.5 kcal/mol, е значително по-ниска от бариерите, изчислени за некатализираната реакция, както и при реакцията, протичаща през тетрагонални преходни структури, с участиети на водородна връзка от вициналната хидриксилна група. Основната причина за този ефект е заместването на един неблагоприятен пренос на протон в TS1 (4-членен) с два благоприятни протонни преноса в TS1 (6-членна), което намалява ъгловите изкривявания**. [2 v, 1v]**

- Предложен е подобен каталитичен ефект за аминолиза на 2-деокси естери **[10o],** подпомогнат от водна молекула, където OH групата на водата действа като протонна совалка по аналогичен начин, както при OH в моделираната реакция на аминолиза при моноацилиран 1,2-етандиол. Както ние показахме, обаче, отчитането на транслационната и ротационната ентропия на свободната водна молекула води до увеличаване на свободната

Гибсова енергията на активиране за водния процес. Такава загуба на ентропия няма в случая на катализа от вицинална ОН, тъй като каталитичната група е свързана с ковалентна връзка с реакционния център**. [2v, 1v]**

-В допълнение моделираният тук като етандиол съседен 2'-ОН на рибозата, е леснодостъпен, понеже е в непосредствена близост до реакционния център по време на синтеза на всяка пептидна връзка. Катализ, включващ допълнителна водна молекула, изисква подхождане на външна водна молекула към реакционния център за осъществяването на всеки реакционен етап. Поради това, ние разглеждаме съседният 2'-ОН на рибозата като реалистичен и подходящ медиатор за пренос на протон при образуването на пептидна връзка в рибозомата. **[2v, 1v]**

-Установено е, че ролята на протонна совалка на съседната ОН група води до по-силно ускорение на реакцията на образуване на пептидна връзка, отколкото ускорението чрез допълнителна водородна връзка от тази група. По-благоприятната структура на преходните състояния при естерна аминолиза в резултат на участието на вициналната хидроксилна група в протонния трансфер води до намаляване на свободната енергия на активиране с 16.0 kcal/mol, което съответства на около 10^9-кратно ускорение на реакцията по отношение на некатализирания процес. **[2v, 1v]**

- Отчитането на влиянието на средата върху реакционния център чрез модел на непрекъснатата поляризуема среда (PCM) (за ε от 5 до 80) води до по-нататъшно стабилизиране на скоростоопределящото преходно състояние, с 4 -5 kcal/mol. **[2v, 1v]**

1.3) Функционално изследване на механизма на миграция на ацилна група между вицинални ОН групи в моноформилиран цис-тетрахидрофуран-3,4-диол като моделна система за миграцията на ацилна група в амино-ацилираната тРНК [4v]

Миграцията на ацилна група в моноацилирани диоли или ацилирани въглехидрати е важна реакция както за живите клетки, така и в синтетичната органична химия.

Докато тази реакция е нежелана за повечето химични синтетични реакции, поради намаляване на селективността, тя е необходима за живата клетка, където такива химични трансформации са отговорни за миграцията на ацилна група при голямо разнообразие от химични съединения, като липиди, ацилирани захари и нуклеозиди. Една от най-интересните реакции на ацилна миграция е тази между вициналните хидроксилни групи в аминоацилираната тРНК, която е субстрат в синтеза на пептидна връзка в рибозомата. Добре известно е, че в клетката такава аминоацилирана тРНК съществува в две изомерни форми, 2-ацилирана и 3-ацилирана, с равновесие между тях, но рибозомата може да обработва само 3-амино-ацилирана тРНК. За да хвърлим светлина върху този процес беше проведено DFT изследване на механизма на миграция на ацилна група между вициални ОН групи в моноформилиран цис-тетрахидрофуран-3,4-диол като моделна система на миграцията на ацилна група в амино-ацилирана тРНК. **[4v]**

- Бяха изследвани два алтернативни пътя (съгласуван и степенен) за миграция на формилна група между вицинални хидроксилни групи в тетрахидрофуран-3,4-диол. Резултатите от изчисленията показват, че стадийният механизъм през ортоестерен междинен продукт е предпочитан с 45-48 kJ/mol в сравнение със синхронния механизъм, където миграцията на формилна група и преноса на протон от съседна ОН група се извършва едновременно през четири-центрово преходно състояние. Поради големите конформационни ограничения в THF пръстена, пространствените пречения могат да увеличат енергията на преходните състояния с 24 kJ/mol в степенния реакционен път на реакцията и с 37 kJ/mol в съгласувания път на реакцията. **[4v]**

- Моделът на непрекъснатата поляризуема среда (PCM) за четири разтворителя беше ползван като оценка на ефекта на разтворителя върху енергията на реакцията. Изчислената енергия на активиране на реакцията във вакуум, 188 kJ/mol, е доста висока, а след като се вземе под внимание влиянието на разтворителя, тази енергия се намалява, но само с 16 kJ/mol. **[4v]**

- Моделирана е и ацилна миграция към предварително йонизирана вицинална хидроксилна група, при което се симулира процеса в присъствието на сравнително силна база. Резултатите предполагат, че в реалните системи процесът най-вероятно се катализира, чрез предварително депротониране на съседна OH група. В този случай изчисленията показват, че миграцията на ацилна група протича спонтанно без бариер. **[4v]**

-Освен това, във всички разгледани разтворители, образуваният междинен продукт е с 15-30 kJ/mol по-стабилен от първоначалния/крайния анион на моноформилирания THF-3,4-диол, което показва, че такива йонизирани ортоестери вероятно могат да бъдат наблюдавани експериментално в присъствието на достатъчно силна база. **[4v]**

2) Други дейности, свързани с установяване на механизмите използвани от рибозомата при работата ѝ и прилагане на разработените методологии върху други системи

Както беше споменато по-горе, водородните връзки играят важна роля в рибозомната каталитична активност. Образуването на водородни връзки се използва често от природата за структурирането на различни биомолекули, молекулно разпознаване и т.н. Познанията за активните центрове на ключови биомолекули ни позволяват да използваме способността за образуване на водородни връзки на различни функционални групи като инструмент при селективното свързване на лекарствата с техните цели. В допълнение на повишаването на взаимодействията между или вътре в молекулите, образуването на водородни връзки може да повлияе на реактантността на различни активни центрове или дори да промени реакционния механизъм на химични или биохимични процеси **[11o]**

Моделирани бяха с DFT различни, свързани с водородни връзки, комплекси на метанол, с различни протон акцепторни и протон-донорни молекули, съдържащи Cl, F, NH2, OH, OR и COOH. Установена е обща корелация между енталпията на свързване на комплекса и електростатичния потенциал на водородния център, участващ във формирането на водородната връзка. Изчислените енталпии на

свързване на различни комплекси могат да се използват за изясняване кои функционални групи могат потенциално да образуват водородна връзка с 2'-OH хидроксилната група на рибозата, която да е достатъчно силна, за да блокира нейното участие в катализа на синтеза на пептидна връзка. Такова блокиране може да доведе до инхибиране на биосинтезата на протеин в живата клетка, ако съответната група е доставена като част от лекарствена молекула в близост до активния център на рибозомата. Според нашите резултати, такава активност може да се осъществи чрез вторични или третични амини, алкокси групи, депротонирани карбоксилни групи и алифатни флуориди, но не и от другите моделирани функционални групи. **[1g]**

Металните йони (Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}) играят важна роля в стабилността, нагъването и функционирането на нуклеиновите киселини. Тяхното присъствие е от съществено значение за структурната цялост на хромозомите. Тези йони помагат за поддържане на пространствената конфигурация на ДНК и РНК не само чрез неутрализиране на отрицателните заряди на фосфатните групи, но също и чрез посредничеството на някои от тях във взаимодействията между отделните части на макромолекулите. Металните йони играят важна роля за стабилизиране на третичната структура на РНК в рибозомата.**[7g,12o]**

Поради тази причина изследвахме с помощта на *ab initio* Born Oppenheimer молекулна динамика, взаимодействията между натриеви или магнезиеви йони и фосфатните групи на РНК скелета, моделирани като динуклеотидни фрагменти във воден разтвор. Резултатите показват, че натриевите йони имат по-висока подвижност от тази на магнезиевите йони. Координационният брой на натриевите йони често се променя в неравномерни интервали, вариращи от няколко фемтосекунди до около 10 пс, като най-често срещаното координационно число е пет, следвано от шест. Магнезиевият йон е стабилен както директно свързан към кислороден атом от фосфатната група, така и напълно солватиран с водни молекули. И в двете състояния йонът Mg^{2+} има точно шест кислородни атома в първата координационна обвивка. Изследвано е и солватирането на крайните фосфатни кислородни атоми от водни молекули, участващи във водородни връзки. Началното състояние (атомните координати) на динуклеотида са взети от участък с

едноверижна РНК от атомна класическа симулация на МД на рибозома във воден разтвор. **[2g]**

Тъй като рибозомата е съставена главно от РНК вериги, това води до огромно количество отрицателно заредени фосфатни групи с липсващи противойони в PDB структурите им. В природата тези групи се неутрализират от Na^{+}, Mg^{2+} йони и малко количество положително заредени аминокиселинни остатъци от полипептидните вериги. За неутрализиране на тези групи в структурата на рибозомата беше разработен евристичен алгоритъм за добавяне на противойони в големи нуклеопротеинови комплекси, основаващ се на добавяне на моно- и двувалентни йони в зависимост от обкръжението на фосфатните групи. Алгоритъмът добавя липсващите йони, оптимизирайки техният вид и позиция с цел най-добро взаимодействие с обкръжаващата ги нуклеопротеиновата структура. Прилагането на евристичния алгоритъм води до получаване на електронеутрална структура, подходяща за молекулно динамични симулации.

Използвайки този алгоритъм, в рамките на проекта 7FP PRACE, беше проведена молекулно динамична симулация на цялостен атомен модел на рибозома на *E. coli*, на базата на която бе разработен модел, използваем при дизайна на лекарства. **[13o]** Много от разработените алгоритми при работата по рибозомния механизъм както и при работата по целия рибозомен модел могат да се използват с успех при голямо разнообразие от задачи в областта на лекарствения дизайн.

Известно е, че има разлика между кристалната структура на протеините и тяхната структура в разтвор. Тези структурни различия често са малки, но функционално значими. Стойностите на RMDS между NMR и кристалните структури варират от около 1.5 Å до около 2.5 Å, но корелацията между конформационните отклонения и вида на остатъка показва, че хидрофобните аминокиселини са по-сходни в кристални и ЯМР структури, отколкото хидрофилните аминокиселини. Тъй като енергията на типичната водородна връзка (един от основните участници във взаимодействията между лекарство и неговата прицелна молекула) се променя драстично с разстоянието, тази разлика между структурата на протеините в кристал и в разтвор е много важна за добрата *in silico* оценка на лекарствената активност в техните активни центрове. Релаксацията на кристалната структура на протеините

до множество конформации в разтвор може да се осъществи чрез методите на молекулната динамика. Друг проблем е липсата на мономери в XRD структурите, главно във външните региони на глобуларните структури, което води до накъсване на полипептидните вериги, и като резултат те не могат да бъдат интерпретирани правилно от повечето молекулно динамични софтуерни пакети.

За всички гореспоменати проблеми, успешно разработените методики и алгоритми за симулациите на големия нуклеопротеинов комплекс на рибозомата бяха широко използвани за първоначална подготовка на структурите за други софтуерни пакети, както и за анализ на резултатите, получени от други софтуери. Тези алгоритми заедно с други софтуерни пакети като GROMACS, COOT, CCP4 и MOE бяха използвани в серия от работи, където беше извършена качествена и количествена оценка на взаимодействията между лекарство-подобни молекули и техен рецептор:

1) Беше тестван набор от лиганди спрямо вътрешният джоб, образуван от активиращия сегмент и P-веригата на V599E мутантът на B-Raf. Установени бяха лиганди, които при свързвнето си с V599E B-Raf стабилизират неактивна конформация на ензима и са обещаващи кандидати в борбата с B-Raf зависимите карциноми.**[3g]**

2) Беше осъществено докинг проучване, с цел изясняване на взаимодействията между лекарство-подобни лиганди и ксантин оксидаза (XO). Изследваните морфолиндионови производни притежават инхибиращи свойства спрямо XO и са обещаващи кандидати при лечение на подагра и други състояния, свързани с прекомерно производство на пикочна киселина, както и като противовъзпалителни лекарства. **[4g,5g]**

3) VV-Хеморфин-5 е ендогенен опиоиден пептид от семейството на хеморфините, с афинитет към опиоидните рецептори. Бяха синтезирани серия от C-амидни аналози, базирани на структурата на VV-Хеморфин-5, модифициран в позиции 1 и 7 с не/природни аминокиселини. Пептидните производни бяха оценени според тяхната антиконвулсивна активност и невротоксичност. Резултатите от докинг проучването показват, че свързването им към каппа опиоидните рецептори може да е механизмът

на тяхната антиконвулсивна активност. Резултатите предполагат, че включването на непротеиногенни и/или природни аминокиселини в позиции 1 и 7 на VV-Hemorphin-5 скелета заслужават по-нататъшна оценка в модели на епилепсия. **[5v]**

4) Едноверижните антитела (**s**ingle **c**hain **v**ariable **f**ragment, scFv), получени чрез фагов дисплей, притежават редица предимства, които ги правят предпочитан инструмент в науката, лабораторната диагностика и медицината. Успехът в последните години на генното инженерство, прилагано върху антитела, заедно с бактериалните експресионни системи, са ключови за дизайна и производството на антитела с редица приложения. Разнообразни стратегии за селекция и скрининг могат да бъдат използвани за получаване на една стъпка на много на брой високо афинитетни scFv молекули с различна приложимост. Важността на богатството на получения репертоар се основава на високата специфичност и селективност на антителата, като същевременно те предлагат различни биологични профили при тъканното представяне на уникалните молекули.

C1q е първият подкомпонент от класическия път на комплемента, който има разпознаващи функции, и който претърпява конформационна промяна при активацията си, при което се експонират нео-епитопи. Наивна библиотека, като част от фагов дисплей, е използвана за получаане на едновереижни антитела (scFv), които имат мимикрия с глобуларните региони, наречени “глави” (ghC1q). По-нататък антителата са използвани за *in silico* моделиране, за да се характеризират региони от C1q глобуларните “глави”, които са с ключово значение за нейното разползнаване и свързване.

На базата на нуклеотидната секвенция на инхибиторното антитяло scFv A1, е генериран структурен 3D модел на полипептидната верига, като хомоложен модел на базата на алайнмента (alignment) на депозирани кристализирани scFv от PDB (Protein Data Bank). Получената структура е използвана за намиране на конформацинно и електростатично подобие между хомоложната структура на антитялото и естествената C1q молекула (глобуларните глави). Това подобие помогна за намиране на региони от C1q

молекулата, ключови за генерирането на СЛЕ (Системен Лупус Еритематозус) антитела, тъй като патогенезата на СЛЕ се асоциира с конформационни или секвенционни нео-епитопи в ghC1q веригите. Представения модел ще бъде полезен по-нататък за изясняване на свойствата на свързващите места на нови scFv молекули, което е стъпка напред в разбирането на разпознаващия механизъм на C1q и неговите биологични патофизиологични прицелни молекули. **[6g]**

3) Планове за бъдещето

- В бъдеще ще продължа работата по настоящите проекти и натрупания опит в областта на изчислителната химия и лекарствения дизайн ще се използва за разкриване на механистичните аспекти и характеристики на биомолекулите, представляващи интерес за лабораторията
- Ще бъде кандидатствано за финансиране по европейски и национални програми с цел осигуряване на изчислителни ресурси за конструирането на цялостен работещ молекулен модел на прокариотна и човешка рибозома, и разликата между тях ще бъде използвана за разработването на нови антибиотици, както и за откриване на възможни химични модификации във вече съществуващите, с оглед избягване на бактериалната антибиотична резистентност. Подобни модели ще бъдат ползвани за изследване на 16S рРНК функционалната вариабилност и резултатите ще се използват в областта на микробиологията и микробната екология, където в днешно време дефиницията за микробен вид е тясно обвързана с 16S рибозомната секвенция
- Дългогодишният опит в областта на HPLC и неговото използване в химичния анализ на комплексни матрици и в химичната кинетика ще бъде използван за нуждите на групата, както и в областта на археологията и фитохимията
- Ще продължи развиването на нов софтуер за разрешаване на трудни химични задачи
- Ще бъде направено усилие за привличане на млади хора в тези области като дипломанти и докторанти

Избрани публикации (Група В) :

[1v] Rangelov, M.A., Petrova, G.P., Yomtova, V.M., Vayssilov, G.N., Hierarchical approach to conformational search and selection of computational method in modeling the mechanism of ester ammonolysis, *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 29(2), (2010). 246-255

[2v] Rangelov, M.A., Petrova, G.P., Yomtova, V.M., Vayssilov, G.N., Catalytic role of vicinal OH in ester aminolysis: Proton shuttle versus hydrogen bond stabilization, *Journal of Organic Chemistry* 75(20), (2010). 6782-6792

[3v] Rangelov, M.A., Petrova, G.P., Yomtova, V.M., Vayssilov, G.N.**,** Determination of the optimal position of adjacent proton-donor centers for the activation or inhibition of peptide bond formation - A computational model study, *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 30, (2011). 10-14

[4v] Rangelov, M.A., Vayssilov, G.N., Petkov, D.D., Quantum chemical model study of the acyl migration in 2′(3′)- formylnucleosides, *International Journal of Quantum Chemistry* 106(6), (2006). 1346-1356

[5v] Todorov, P., **Rangelov, M.**, Peneva, P., Todorova, N., Tchekalarova, J.**,** Anticonvulsant evaluation and docking analysis of VV-Hemorphin-5 analogues, *Drug Development Research* 80(4), (2019). 425-437

Публикации от група “Г” цитирани в текста :

[1g] Kolev, S.K., Petkov, P.S., **Rangelov, M.A.**, Vayssilov, G.N., Density functional study of hydrogen bond formation between methanol and organic molecules containing Cl, F, NH 2 , OH, and COOH functional groups, *Journal of Physical Chemistry A*, 115(48), (2011), 14054-14068

[2g] Kolev, S., Petkov, P.S., **Rangelov, M.**, Vayssilov, G.N., Ab initio molecular dynamics of Na+ and Mg2+ countercations at the backbone of RNA in water solution *ACS Chemical Biology*, 8(7), (2013). 1576-1589

[3g] Mavrova, A.T., Dimov, S., Yancheva, D., **Rangelov, M.**, Wesselinova, D., Tsenov, J.A., Synthesis, anticancer activity and photostability of novel 3-ethyl-2-mercapto-thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-ones , *European Journal of Medicinal Chemistry,* 123, (2016). 69-7921

[4g] Smelcerovica,A., **Rangelov, M.**, Smelcerovic, Z., Veljkovic, A., Cherneva, E., Yancheva, D., Nikolic, G.M., Petronijevic, Z., Kocic, G., Two 6-(propan-2-yl)-4-methyl-morpholine-2,5-diones as new non-purinexanthine oxidase inhibitors and anti-inflammatory agents, Food and Chemical Toxicology 55, (2013). 493-497

[5g] Šmelcerović,Z., **Rangelov, M.**, Cherneva, E., Kocić, G., Stojanović, S., Jevtović-Stoimenov, T., Petronijević, Z., Yancheva, D., Inhibition mechanism and molecular modeling studies of the interactions of 6-(propan-2-yl)-3-methyl-morpholine-2,5-dione with xanthine oxidase , *Bulgarian Chemical Communications*, 47(3), (2015). 783-7

[6g] Rangelov, M. A.; Todorova, N. H.; Tsacheva, I. G., In silico investigation of single-chain variable fragment (scFv) antibody, structurally similar to native C1q globular heads , *Bulgarian Chemical Communications,* 49 (E), (2017), 50-53

[7g] Kolev, S.K., Petkov, P.S., **Rangelov, M.A.**, Trifonov, D.V., Milenov, T.I., Vayssilov, G.N., Interaction of Na+, K+, Mg2+ and Ca2+ counter cations with RNA, *Metallomics*, 10(5), (2018). 659-678

Други цитати :

[1o]

(a) Rodnina,M.V. Beringer,M., Wintermeyer, W., Mechanism of peptide bond formation on the ribosome, *Quart. Rev. Biophys*. 39, (2006). 203–225.

(b) Zhong, M.H. Strobel,S.A. , Synthesis of isotopically labeled P-site substrates for the ribosomal peptidyl transferase reaction, *J. Org. Chem*. 73, (2008). 603–611.

(c) Simonović, M., Steitz, T.A., Cross-crystal averaging reveals that the structure of the peptidyl-transferase center is the same in the 70S ribosome and the 50S subunit, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of Americ*a, 105 (2), (2008). 500-505.

(d) Schroeder, G.K., Wolfenden, R., The rate enhancement produced by the ribosome: An improved model, *Biochemistry*, 46 (13), (2007). 4037-4044.

(e) Weinger, J.S., Parnell, K.M., Dorner, S., Green, R., Strobel, S.A., Substrate-assisted catalysis of peptide bond formation by the ribosome, *Nature Structural and Molecular Biology*, 11 (11), (2004). 1101-1106.

(f) Dorner, S., Panuschka, C., Schmid, W., Barta, A., Mononucleotide derivatives as ribosomal P-site substrates reveal an important contribution of the 2′-OH to activity, *Nucleic Acids Research*, 31 (22), (2003). 6536-6542.

(g) Zhu, Y., Mao, Z., Gao, C., Aminolysis-based surface modification of polyesters for biomedical applications,*RSC Advances*, 3(8), (2013). Pages 2509-2519

(h) Zeng, S.a, Liu, J.a, Anankanbil, S.b, Chen, M.a, Guo, Z.b, Adams, J.P.c, Snajdrova, R.c, Li, Z., Amide Synthesis via Aminolysis of Ester or Acid with an Intracellular Lipase, *ACS Catalysis* 8(9), (2018). 8856-8865

[2o]

(a) Štrajbl, M., Florián, J., Warshel, A., Ab initio evaluation of the potential surface for general base-catalyzed methanolysis of formamide: A reference solution reaction for studies of serine proteases, *Journal of the American Chemical Society*, 122 (22), (2000). 5354-5366

(b) Trobro, S., Åqvist, J. Mechanism of peptide bond synthesis on the ribosome, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (35), (2005). 12395-12400.

(c) Trobro, S., Åqvist, J. Analysis of predictions for the catalytic mechanism of ribosomal peptidyl transfer, *Biochemistry*, 45 (23), (2006). 7049-7056.

(d) A. Gindulyte, A. Bashan, I. Agmon, L. Massa, A. Yonath, J. Karel, The transition state for formation of the peptide bond in the ribosome, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103 (2006). 13327–13332.

(e) Montecinos, R., Gazitúa, M., Santos, J.G.,The effect of the electrophilic group on the hierarchy of nucleofuges in the aminolysis reactions of thiol- and

dithiocarbonates with secondary alicyclic amines: A kinetic and theoretical study, *New Journal of Chemistry*, 43(16), (2019). Pages 6372-6379

(f) Teotia, M.Email Author, Tarannum, N., Chauhan, M., Soni, R.K.,Structure-based rational design, synthesis, crystal structure, DFT and molecular docking of 1,4-benzene dicarboxamide isomers with application as hardeners, *New Journal of Chemistry*, 43(21), (2019). 7972-7983

[3o]

(a) Rangelov, M.A., Vayssilov, G.N., Yomtova, V.M., Petkov, D.D.,Theoretical study of the o-OH participation in catechol ester ammonolysis, Organic and Biomolecular Chemistry, 3 (5), (2005) 737-744.

[4o]

(a) Blomberg, M.R.A., Siegbahn,P.E.M., Quantum chemistry as a tool in bioenergetics, *Biochim. Biophys. Acta* 1797, (2010). 129–142.

(b) Baná˘s,P., Jure˘cka,P., Walter,N.G., ˘Sponer,J., Otyepka,M., Theoretical studies of RNA catalysis: hybrid QM/MM methods and their comparison with MD and QM, *Methods*, 49, (2009). 202–216.

(c) Dudev,T., Lim,C., Metal binding affinity and selectivity in metalloproteins: insights from computational studies, *Ann. Rev. Biophys.*, 37, (2008). 97–116.

(d) Gao,J., Ma,S., Major,D.T., Nam, K., Pu,J., Truhlar, D.G., Mechanisms and free energies of enzymatic reactions, *Chem. Rev*., 106, (2006). 3188–3209

(e) Huggins, D.J., Biggin, P.C., Dämgen, M.A., Essex, J.W., Harris, S.A., Henchman, R.H., Khalid, S., Kuzmanic, A., Laughton, C.A., Michel, J., Mulholland, A.J., Rosta, E., Sansom, M.S.P., van der Kamp, M.W. , Biomolecular simulations: From dynamics and mechanisms to computational assays of biological activity, Wiley Interdisciplinary Reviews: *Computational Molecular Science* ,9(3),(2019). Article number e1393

(f) Cupellini, L., Corbella, M., Mennucci, B., Curutchet, C., Electronic energy transfer in biomacromolecules, Wiley Interdisciplinary Reviews: *Computational Molecular Science*, 9(2),(2019). e1392

[5o]

(a) Morokuma,K., Theoretical studies of structure, function and reactivity of molecules—a personal account, *Proc. Jpn. Acad. B*, 85, (2009). 167–182.

(b) Loffreda,D., Delbecq,F., Vigné,F.,Sautet,P., Fast prediction of selectivity in heterogeneous catalysis from extended brønsted-evans-polanyi relations: a theoretical insight, *Angew. Chem., Int. Ed.* 48, (2009). 8978–8980.

(c) Zinovjev, K., Tuñón, I., Reaction coordinates and transition states in enzymatic catalysis, Wiley Interdisciplinary Reviews: *Computational Molecular Science*, 8(1), (2018).e1329

[6o]

(a) T. Mineva, E. Sicilia, N. Russo, Density-functional approach to hardness evaluation and its use in the study of the maximum hardness principle, J. Am. Chem.Soc. 120 (1998) 9053–9058.

(b) F.P. Rotzinger, Treatment of substitution and rearrangement mechanisms of transition metal complexes with quantum chemical methods, Chem. Rev. 105 (2005) 2003–2037.

(c) Galabov,B., Nikolova,V., Wilke,J.J., Schaefer,H.F., Allen,W.D., Origin of the SN2 benzylic effect, *J. Am. Chem. Soc.*, 130, (2008). 9887–9896.

(d) Hu, P., Ye, J., Jiang, H., Which isomer is better for charge transport:: Anti - Or syn -?, *Journal of Materials Chemistry C*, 7(20), (2019). 5858-5873

[7o]

(a) Proynov, E., Kong, J., Assessment of a new hybrid functional on thermochemistry, metal–ligand bonding and reaction barriers, in: Theoretical Aspects of Catalysis, vol. 3, Heron Press, Sofia, 2009, pp. 1–9.

(b) Afzal, M.A.F., Hachmann, J., Benchmarking DFT approaches for the calculation of polarizability inputs for refractive index predictions in organic polymers, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 21(8),(2019). 4452-4460

(c) Loskot, P., Atitey, K., Mihaylova, L., Comprehensive review of models and methods for inferences in bio-chemical reaction networks, *Frontiers in Genetics*,10,(2019). Article number 549

[8o]

(a) 2o (d)

(b) Wallin,G., Åqvist,J., The transition state for peptide bond formation reveals the ribosome as a water trap, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107, (2010). 1888–1893.

(c) Rangelov, M.A., Vayssilov,G.N., Yomtova,V.M., Petkov,D.D., The syn-oriented2-OH provides a favorable proton transfer geometry in 1,2-diol monoester aminolysis: implications for the ribosome mechanism, *J. Am. Chem. Soc.* 128, (2006). 4964–4965.

[9o]

(a) [1o (a)]

(b) Changalov, M.M., Ivanova, G.D., **Rangelov, M.A.,** Acharya, P., Acharya, S., Minakawa, N., Földesi, A., Stoineva, I.B., Yomtova, V.M., Roussev, C.D., Matsuda, A., Chattopadhyaya, J., Petkov, D.D., 2′/3′-O-peptidyl adenosine as a general base catalyst of its own external peptidyl transfer: Implications for the ribosome catalytic mechanism, ChemBioChem, 6(6), (2005). 992-996

(c) Chattopadhyaya,J., Petkov,D.D., 2/3-O-peptidyl adenosine as a general base catalyst of its own external peptidyl transfer: implications for the ribosome catalytic mechanism, *ChemBioChem*, 6, (2005). 992–996.

(d) - [1o (b)]

[10o]

(a) Yang, W., Drueckhammer, D.G., Computational studies of the aminolysis of oxoesters and thioesters in aqueous solution, *Organic Letters*, 2 (26), (2000). 4133-4136.

[11o]

(a) Hynes, J. T., Klinman, J. P., Limbach, H.-H., Schowen, R. L., Eds. Hydrogen Transfer Reactions , *Wiley-VCH: Weinheim*, (2007).

(b) Testa, B., van de Waterbeemd, H., Folkers, G., Guy, R., Pharmacokinetic Optimization in Drug Research: Biological, Physicochemical, and Computational Strategies , *Wiley: Zurich, Switzerland*, (2001).

(c) Hirota, S., Lin, Y.-W., Design of artificial metalloproteins/metalloenzymes by tuning noncovalent interactions, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 23(1), (2018). 7-25

[12o]

(a) Celander, D., and Cech, T., Visualizing the higher order folding of a catalytic RNA molecule. *Science* 251, (1991). 401−407.

(b) Sigel, A., Sigel, H., and Sigel, R., Structural and Catalytic Roles of Metal Ions in RNA , Vol.9, (2011) 101−124, *RSC Publishing:Cambridge, U.K*.

(c) Strick, R., Strissel, P. L., Gavrilov, K., and Levi-Setti, R., Cation-chromatin binding as shown by ion microscopy is essential for the structural integrity of chromosomes, *J. Cell Biol*. 155, (2001). 899−910.

(d) Levi-Setti, R., Gavrilov, K. L., and Rizzo, P. J., Divalent cation distribution in dinoflagellate chromosomes imaged by high resolution ion probe mass spectrometry. *Eur. J. Cell Biol.* 87, (2008). 963−976.

(e) Hud, N. V., and Polak, M., DNA-cation interactions: the major and minor grooves are flexible ionophores. *Curr. Opin. Struct. Biol*. 11, (2001). 293−301.

(f) Egli, M., DNA-cation Interactions: Quo Vadis? *Chem. Biol*. 9, (2002). 277−286.

(g) Draper, D. E., A guide to ions and RNA structure., *RNA*, 10, (2004), 335−343.

(h) Chen, S.-J., RNA folding: conformational statistics, folding kinetics, and ion electrostatics, *Annu. Rev. Biophys.* 37, (2008). 197−214.

(i) Klein, D. J., Moore, P. B., and Steitz, T. A., The contribution of metal ions to the structural stability of the large ribosomal subunit, *RNA*, 10, (2004). 1366−1379.

(j) Bashan, A., and Yonath, A,. The linkage between ribosomal crystallography, metal ions, heteropolytungstates and functional flexibility, *J. Mol. Struct.*, 890, (2008). 289−294

[13o]

(a) Rangelov, M.A.,Petkov, P.,Markov, S.,Vayssilov, G.N., Litov, L. “Algorithm for the ribosome structure neutralisation and development of force field for drug candidates,” *Journal of peptide science*, 20 (1), (2014) S52-S52