

Raport Științific de Etapă

al proiectului

Studiul mecanismului molecular al opacifierii gamma D-cristalinului, și screeningul compușilor anti-cataractă in *silico*

Cod proiect PN-III-P4-PCE-2021-0316, Contract de Finanțare nr. PCE59 / 02.06.2022

Etapa 2/2023

WP2. Screeningul in silico al inhibitorilor împotriva agregării mutantului hgDp23T-Cristalin

WP1. Interacțiunea hgDp23T:aB-Cristalin (partea 2)

WP2. Screeningul *in silico* al inhibitorilor împotriva agregării mutantului h γ D-p23T-Cristalin

Cataracta reprezintă o afecțiune oftalmologică cu frecvență destul de crescută care duce la reducerea acuității vizuale ca urmare a pierderii transparenței cristalinului [1,2]. Până în prezent niciun medicament eficient împotriva cataractei nu a fost descoperit și aprobat. Prin urmare, dezvoltarea rapidă a unor compuși terapeutici care să fie folosiți în profilaxia sau tratarea cataractei este absolut necesară. Însă, metodele tradiționale folosite în procesul de descoperire a medicamentelor necesită timp îndelungat, fiind costisitoare. În acest studiu, am folosit *screening-ul in silico* al unor compuși naturali din baza de date ZINC, în scopul de a detecta potențiali inhibitori ai agregării proteinei oculare h γ D-Cristalin ca urmare a mutației Pro23Thr care cauzează cataracta congenitală [3,4].

Prima parte a acestui raport descrie în detaliu a studiului teoretic în vederea identificării unor potențiali inhibitori împotriva agregării proteinei mutante p23T h γ D-Cristalin (h γ D-p23T). Într-o primă etapă am efectuat un studiu extins de literatură și un screening al bazei de date *Zinc* cu scopul de a identifica clase de compuși având potențial pentru inhibarea agregării proteinei h γ D-Cristalin (h γ D-crys). Am urmărit identificarea cu precizie a etapelor teoretice și practice necesare acestui studiu cu scopul de a automatiza, pe cât posibil, aceste procese. Ulterior am efectuat un studiu comparativ extins utilizând metode de andocare moleculară pentru un număr semnificativ ai potențialilor inhibitori identificați în etapa preliminară. De asemenea a fost demarat și studiul agregării γ D-Cristalinului, al interacțiunii cu potențiali inhibitori, folosind metoda de dinamică moleculară. Proteinele structurale denumite cristalin sunt proteinele predominante ale lentilei oculare și contribuie preponderent la indicele optim de refracție necesar pentru a focaliza corect lumina pe retină. Aceste proteine trebuie să rămână stabile și solubile la concentrații foarte mari pe întreaga durată de viață. La mamifere există trei clase de cristalin, α -, β - and γ -cristalin, iar în acest studiu suntem interesați de proprietățile γ -cristalinului, care este predominant în regiunea centrală (nucleu) a lentilei oculare unde poate atinge concentrații foarte mari (>400 mg/ml în cazul mamiferelor, și chiar >1000 mg/ml în cazul unor specii de pești).

Proteina γ D-cristalin din lentila oculară umană, reprezentată în Figura 1, este o proteină monomerică compusă din 173 de aminoacizi aranjați în două domenii omoloage structural. Fiecare domeniu este compus din 8 foi- β antiparalele, acestea fiind conectate printr-o peptidă linker având o interfață hidrofobă care joacă un rol crucial în determinarea stabilității proteinei.

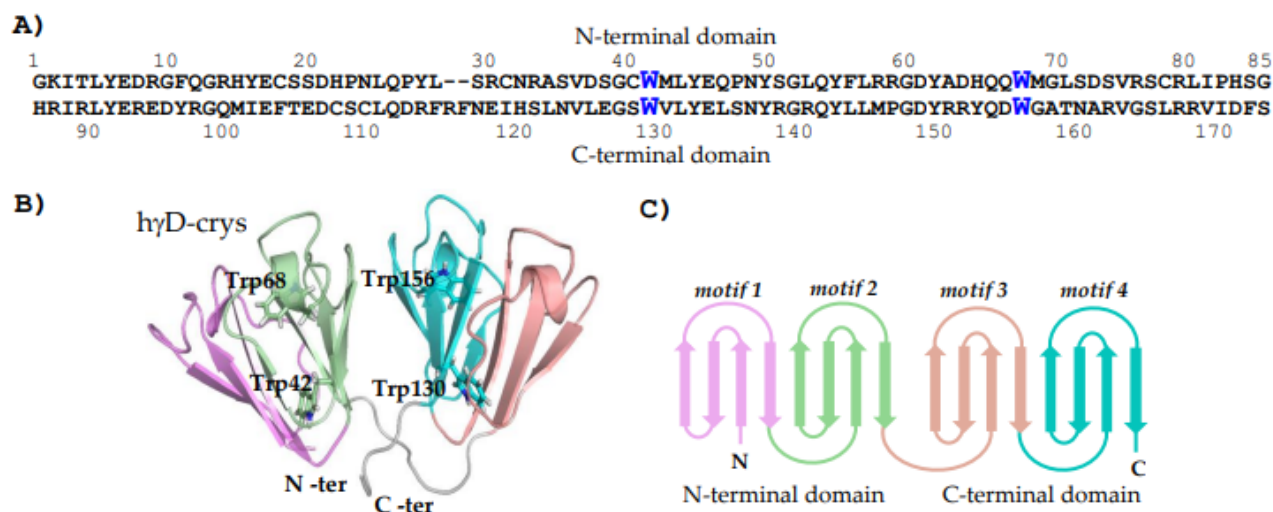


Figura 1 Structura h γ D-cristalin. (A) Secvența de aminoacizi ai h γ D-cristalinului, domeniul N-terminal în partea superioară (N-ter) iar C-terminal în cea inferioară (C-ter). (B) Structura tridimensională a h γ D-cristalinului (PDB ID: 1HK0) (C) Topologia complexă a h γ D-cristalinului constând din patru, așa numite, motive grecești, distribuite în domeniile N- și C-terminal separate printr-o buclă scurtă. Fiecare motiv este colorat diferit.

În vederea utilizării în simulările de andocare și de dinamică moleculară au fost identificate în baza de date RCSB, conformațiile proteinei native h γ D-cristalin, și a celei prezentând mutația p23T. Astfel, structurile moleculare folosite în ambele tipuri de simulări au fost obținute folosind structura cristalografică pentru proteina nativă h γ D-crys (RCSB ID: 1HK0) [5] și structura determinată prin rezonanță magnetică nucleară (RMN) în soluție, (RCSB ID: 2KFB) pentru mutantul h γ D-p23T [6].

Act 2.1-Screeningul inhibitorilor *in silico* folosind compuși chimici disponibili în baza de date Zinc

În această etapă inițială dedicată identificării de potențiali inhibitori ai agregării h γ D-cristalinului am efectuat un studiu de literatură extins și am efectuat diverse simulări preliminare pentru a identifica rapiditatea/viteza cu care putem practic efectua acest screening. Sistemul al cărui comportament la nivel molecular din punct de vedere biofizic și termodinamic încercăm să-l analizăm este extrem de complex. Deoarece doar analiza unui singur inhibitor necesită timp considerabil de ordinul unei zile întregi în cazul andocării moleculare, sau luni pentru a calcula o traiectorie de dinamică moleculară suficient de lungă, este dificil să se urmărească o analiză exhaustivă a sute, mii sau milioane de compuși disponibili în baza de date de compuși moleculari organici ZINC. Acest lucru va fi oarecum asemănător cu identificarea prin încercări succesive a unui cifru prin parcurgerea tuturor posibilităților care, chiar dacă s-ar putea face cu o viteză considerabilă, este rareori fezabilă în practică. Alegerea unui subset al bazei de date ZINC este o abordare mai fezabilă. Aceasta a fost și motivația noastră inițială atunci când am ales să analizăm comparativ andocarea diferiților fitocompuși în acest studiu. Un efort substanțial a fost dedicat, în consecință, determinării cât mai raționale și documentate a acestui subset de structuri. Pe lângă studierea inițială a lanosterolului, un compus cu potențial demonstrat de inhibare a agregării h γ D-cristalinului, am identificat un set de 13 compuși naturali pe care i-am studiat comparativ în detaliu, în interacțiune atât cu proteina nativă h γ D-crys cât și cu cea prezentând mutația p23T. Astfel, am selectat cațiva fitocompuși cu potențial efect terapeutic prezenți cu preponderență în diferite plante: *Origanum vulgare*, *Olea europaea*, *Thymus vulgaris*, *Allium cepa*, *Spinacia oleracea*, *Fabaceae- Glycine max*, *Crataegus pinnatifida*, *Vaccinium angustifolium*, *Curcuma longa*, *Vitis vinifera*, *Vitex negundo*, *Rubus fruticosus*, *Foeniculum Vulgare*, *Ferula Persica*, *Ferula assa-foetida*, *Euphorbia helioscopia*, *Rubus fruticosus* (Tabelul 1, iar structurile chimice în Figura 7).

Tabelul 1. Grupul de compuși naturali studiați cu potențial împotriva agregării γ D-cristalinului

Natural compounds	Plant	ZINC code
Apigenin	<i>Origanum vulgare</i>	ZINC000003871576
Luteolin	<i>Olea europaea</i>	ZINC000018185774
Eriodictyol	<i>Thymus vulgaris</i>	ZINC000000058117
Quercetin	<i>Allium cepa</i>	ZINC000003869685
Myricetin	<i>Spinacia oleracea</i>	ZINC000003874317
Genistein	<i>Fabaceae (Glycine max)</i>	ZINC000018825330
Vitexin	<i>Crataegus pinnatifida</i>	ZINC000004245684
Isovitexin	<i>Crataegus pinnatifida</i>	ZINC000004095704
Chlorogenic acid	<i>Vaccinium angustifolium</i>	ZINC000006482465
Curcumin	<i>Curcuma longa</i>	ZINC000100067274
Resveratrol	<i>Vitis vinifera</i>	ZINC000000006787
Vitedoin A	<i>Vitex negundo</i>	ZINC000014883365
Ellagic acid	<i>Rubus fruticosus</i>	ZINC000003872446

Am intenționat prin acest studiu nu doar să identificăm un inhibitor specific al agregării mutantului hγD-p23T, ci și să testăm capacitatea metodelor *in silico* disponibile actualmente de a compara și a prezice activitatea unui potențial inhibitor.

A2.2 Docking molecular al proteinei hγD-p23T-Cristalin cu potențiali inhibitori rezultați din screeningul *in silico*

Am inițiat acest studiu de andocare moleculară printr-o analiză a interacțiunii dintre ambele proteine γD-cristalin, cea nativă hγD-crys și cea mutantă hγD-p23T, cu lanosterol, un compus identificat ca având un posibil efect de diminuare a agregatelor proteice de acest tip [7-10]. În ciuda faptului că solubilitatea și biodisponibilitatea lanosterolului nu favorizează formulările apoase și unii cercetători se îndoiesc în ceea ce privește eficacitatea acestuia [11], credem că acest sistem poate servi drept referință pentru studiile ulterioare mai extinse folosind o serie de compuși naturali, aleși din baza de date ZINC, cu potențial împotriva agregării γD-cristalinului.

Astfel, structura moleculară tridimensională a lanosterolului a fost optimizată la nivel *ab initio* folosind software-ul Gaussian 09 [12] cu funcționala hibridă meta-GGA M06-2X și setul de bază 6-311++G(d,p). În urma calculelor nu au fost obținute frecvențe vibraționale imaginare ceea ce demonstrează că structura optimizată corespunde unui minim al suprafeței de energie potențială (PES) și nu unei stări de tranziție. Această conformație este reprezentată în Figura 2.

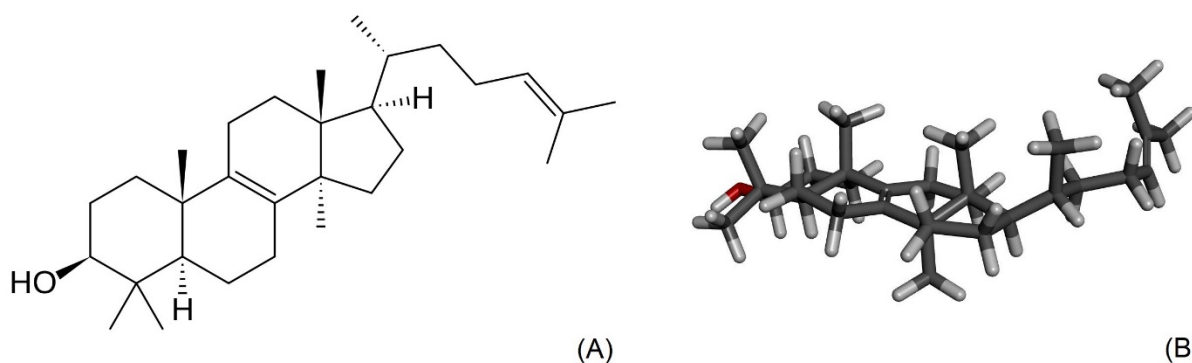


Figura 2. Structura Lanosterolului. (A) Lanosterolul, $C_{30}H_{50}O$, greutate moleculară 426.7 g/mol (B) Structura moleculară optimizată a lanosterolului folosind programul Gaussian 09.

În întregul studiu *in silico* de andocare moleculară am folosit metoda Monte-Carlo implementată în software-ul Autodock v4.2 [13]. Programul AutoDockTools v 1.5.6 [13,14] a fost folosit pentru a genera fișierele cu parametrii procedurii de andocare și fișierele pdbqt, care conțin într-un singur fișier coordonatele atomice (PDB), sarcinile parțiale (Q) și tipurile de atomi (T). În simulare am folosit procedura de andocare standard implementată în AutoDock. După adăugarea inițială a tuturor atomilor de hidrogen atât pentru proteină, cât și pentru ligand, toți atomii de hidrogen nepolari au fost ulterior îndepărtați automat. Pentru calculul sarcinilor atomice a fost utilizată metoda Gasteiger-Marsili [15]. Flexibilitatea ligandului a fost luată în considerare prin stabilirea a cinci unghiuri de torsiune în jurul legăturilor simple care au fost detectate automat în AutoDock în cadrul procedurii dedicate ligandului. Proteinele de hγD-cristalin au fost menținute rigide. Utilitarul AutoGrid a fost folosit pentru a precalculea hărțile energiilor de interacțiune ale diferitelor tipuri de atomi înainte de rularea efectivă a procedurii de andocare. Am stabilit dimensiunea maximă a grilei de 126x126x126 puncte cu o distanță între punctele grilei de 0.475 Å. Proteinele de hγD-cristalin au fost incluse în totalitate în volumul de căutare de formă

cubică, centrat pe proteine. Un algoritm genetic Lamarckian a fost folosit pentru a căuta cei mai buni conformeri folosind parametrii implicați. Am urmat metodologia standard de andocare și am folosit aceiași parametri detaliați într-un articol publicat de către grupul nostru de cercetare [16]. Pentru a obține o statistică și o distribuie bună în clusteri, am efectuat 2000 de rulări, fiecare în parte fiind generată într-un mod aleator. Vizualizarea și analiza rezultatelor de andocare au fost efectuate folosind Biovia Discovery Studio Visualizer v20.1 și Chimera v1.14 [17].

Prezentăm în continuare rezultatele obținute ca urmare a simulărilor de andocare moleculară dintre lanosterol și proteina nativă h_yD-crys, și mutantul h_yD-p23T. Astfel, în Figura 3 sunt prezentate conformațiile având energia de legare maximă (cea mai favorabilă) a complexului dintre lanosterol și proteina nativă h_yD-crys, și respectiv mutantul h_yD-p23T. Energiile de legare ale acestor conformații sunt: -9,16 kcal/mol pentru complexul cu proteina nativă h_yD-crys și -8.94 kcal/mol pentru complexul cu varianta mutantă h_yD-p23T. Observăm deci că legarea lanosterolului la proteina mutantă h_yD-p23T este mai defavorabilă, cu ~0.22 kcal/mol, față de cea obținută pentru proteina nativă h_yD-crys. Acesta este întrucâtva un rezultat nefavorabil deoarece ne așteptam ca interacțiunea lanosterolului cu varianta mutantă h_yD-p23T să fie mai intensă.

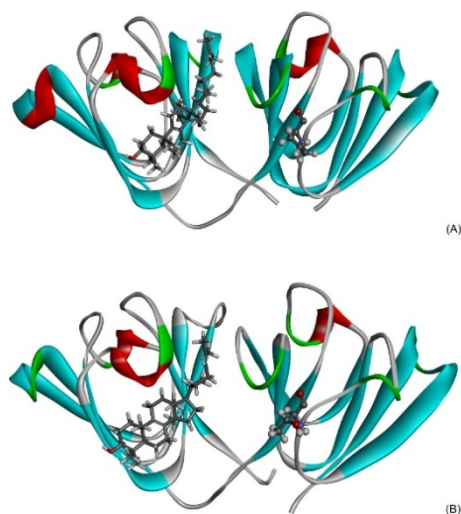


Figura 3. Conformațiile cu energia de legare maximă obținute în urma simulărilor de andocare moleculară a lanosterolului la (A) proteina nativă h_yD-crys și (B) varianta mutantă h_yD-p23T. În imagini am evidențiat și aminioacizii din poziția 23.

Pentru a înțelege mai în detaliu diferențele dintre aceste rezultate menționăm că după efectuarea celor 2000 de rulări, conformațiile obținute au fost clasificate ținând cont de similaritatea structurilor. În Figura 4 reprezentăm histogramele distribuțiilor de energie de legare ale tuturor clusterelor identificate în timpul analizei de andocare.

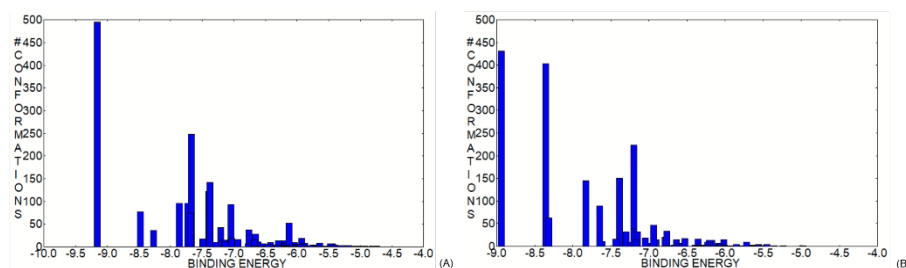


Figura 4. Histogramele distribuției energiei de legare la h_yD-cristalin ai clusterilor conformaționali ai lanosterolului. (A) pentru proteina nativă h_yD-crys și (B) varianta mutantă, h_yD-p23T.

Pentru a înțelege corect aceste reprezentări, precizăm că poziția fiecărui cluster pe axa energiei de legare este determinată doar de membrul având cea mai mare energie de legare al clusterului. Semnul minus apare deoarece căutăm efectiv complecșii care au energii mai mici decât suma energiilor protagoniștilor, moleculelor gazdă și oaspete, calculate individual. Pe lângă energia de legare, o altă informație semnificativă este frecvența cu care este identificată fiecare conformație de legare, reprezentată ca intensitate în histograme. Pe măsură ce numărul de membri dintr-un grup este mai mare, acea conformație de legare particulară este mai favorizată sau a fost identificată mai des. O altă informație suplimentară, o reprezintă gama energiilor de legare ale membrilor fiecărui grup sau cel puțin energia de legare medie a grupului. Având în vedere aceste specificații, dacă revenim la studiul de andocare al lanosterolului la proteinele h γ D-cristalin, în Figura 4 putem observa, conformația cu cea mai mare energie de legare are și cel mai mare număr de membri în ambele cazuri, 495 pentru proteina nativă h γ D-crys față de 431 pentru mutantul h γ D-p23T, intervalul de energie de legare al membrilor acestui cluster fiind de 3.45 față de 2.96 kcal/mol iar energia medie de legare, -8.0 față de -8.02 kcal/mol. Aceste valori demonstrează că aceste configurații de legare sunt identificate cu preponderență și, după cum putem observa, diferă destul de puțin pentru cele două proteine. Acest fapt demonstrează fiabilitatea acestei metode, însă totuși în limita marjei de eroare menționate anterior. În Figurile 5 și 6 prezentăm o analiză în detaliu a interacțiunilor intermoleculare care intervin în interiorul situsului de legare.

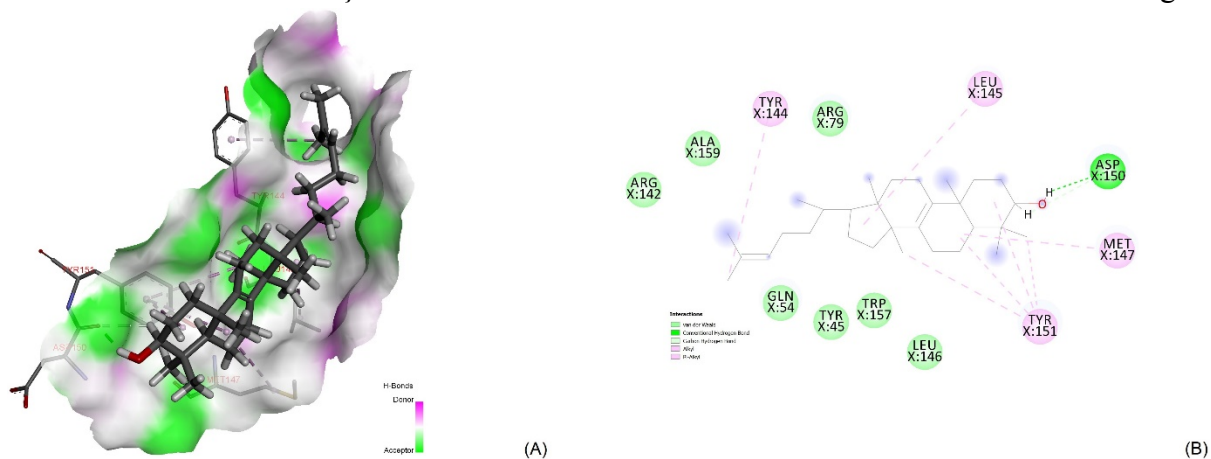


Figura 5. Interacțiunile de proximitate în interiorul situs-ului de legare (A) și hărțile bidimensionale corespunzătoare (B) dintre lanosterol și proteina nativă h γ D-crys.

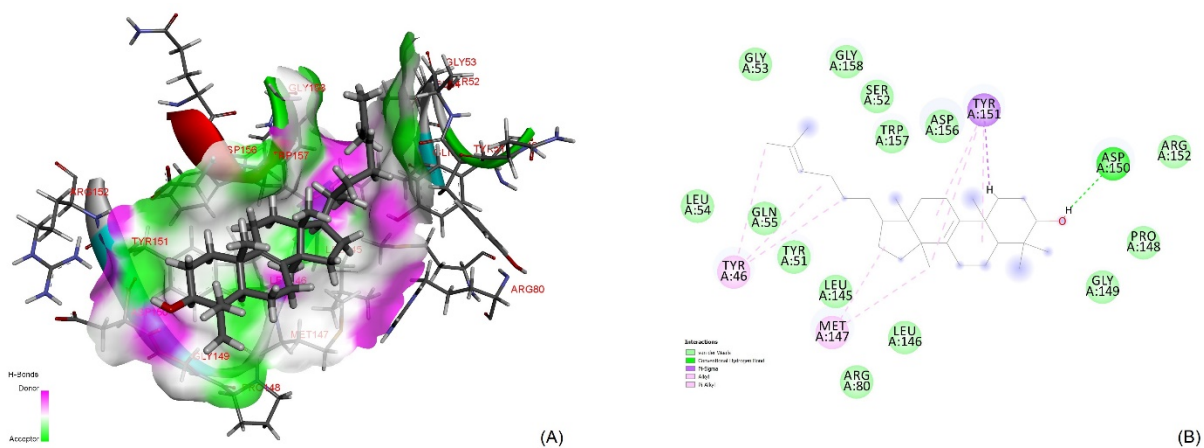


Figura 6. Interacțiunile de proximitate în interiorul situs-ului de legare (A) și hărțile bidimensionale corespunzătoare (B) dintre lanosterol și varianta mutantă h γ D-p23T h γ D-cristalin.

După cum am putut remarca încă din Figura 3 cele două conformații sunt destul de similare, gruparea hidroxil a moleculei de lanosterol interacționează în ambele cazuri cu aminoacidul Asp150 iar Tyr151 este în vecinătate. Molecula de lanosterol pare doar puțin deplasată.

Această analiză inițială a fost urmată de un studiu simiar de andocare moleculară pentru un grup de 13 compuși naturali cu potențial împotriva agregării γ D-cristalinului aleși după un studiu de literatură și un screening din baza de date *ZINC*. Prezentăm acești compuși studiați în Tabelul 1 și Figura 7.

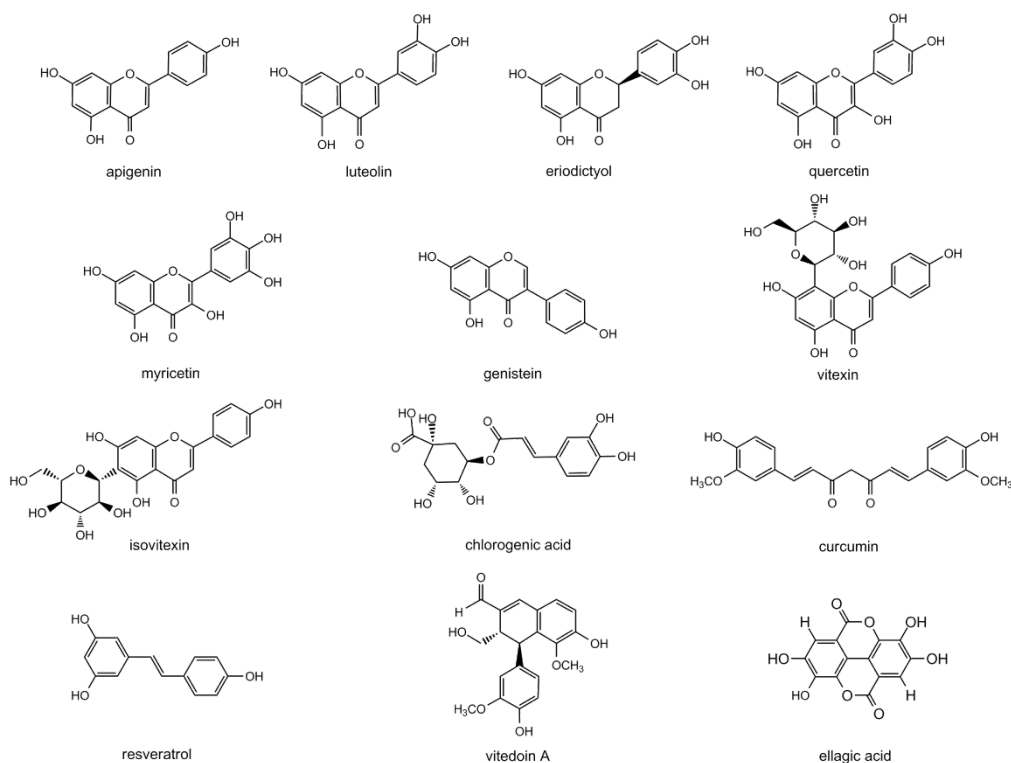


Figura7. Structurile chimice ale compușilor naturali analizați ca potențiali inhibitori ai cataractei.

Prezentăm în continuare comparativ rezultatele obținute. Menționăm că am utilizat în calcule aceleași structuri pentru proteina nativă h γ D-crys (1HK0), și respectiv pentru γ D-p23T (2KFB). Scopul studiului a fost nu doar să identificăm un potențial inhibitor al agregării h γ D-cristalinului cu efect mai bun decât lanosterolul, ci să și testăm fiabilitatea procedurii de andocare moleculară pentru acest caz particular.

În Tabelul 2 am adunat rezultatele obținute pentru conformațiile având energia de legare în valoare absolută maximă pentru toți potențialii inhibitori naturali investigați în interacțiunea cu proteina nativă h γ D-crys și cu proteina mutantă h γ D-p23T. Specificăm pentru fiecare, energia de legare a celei mai bune conformații andocate și, de asemenea, energia de legare medie a membrilor din clusterul său și numărul de membri ai clusterului căruia îi aparține această conformație. După cum se observă în tabel, pentru genistein, resveratrol și curcumină, am specificat câte doi izomeri. Atât pentru genistein, cât și pentru resveratrol atunci când sunt andocate la proteina mutantă h γ D-p23T, am specificat două conformații cu cea mai scăzută energie de legare. Le menționăm pentru că, pentru genistein, ambele structuri au avut exact aceeași energie de legare, dar sunt andocate la două situs-uri diferite. Pentru resveratrol am specificat din nou două conformații de andocare cele mai probabile, deoarece diferența de energie dintre ele a fost suficient de mică. Pentru curcumină am efectuat calculul pentru ambii tautomeri de curcumină cunoscuți: enol-keto și diketo. Am considerat că ambele conformații sunt relevante pentru a fi specificate și pentru a sublinia incertitudinile metodei de andocare moleculară asupra căreia vom insista mai mult în finalul prezentării rezultatelor.

Analizând rezultatele prezentate în acest tabel observăm că valorile absolute ale energiilor de legare cu proteina nativă h_yD-crys sunt în general mai mari decât cele pentru mutantul h_yD-p23T. Pentru toate moleculele investigate, am calculat o medie de aproximativ -7,8 kcal/mol față de -6,5 kcal/mol, sugerând o afinitate mai puternică a tuturor compușilor investigați cu proteina nativă h_yD-crys. Acest lucru este oarecum opus față de ceea ce ne așteptam inițial să punem în evidență, similar în cazul andocării moleculei de lanosterol.

Tabelul 2. Energiile de legare ale celor mai bune conformații andocate ale compușilor naturali investigați la wild-type h_yD-crys (RCSB ID: 1HK0) and h_yD-p23T mutant (RCSB IDs: 2KFB).

Compound	Lowest Binding Energy	Mean Binding Energy	Number in Cluster	Lowest Binding Energy	Mean Binding Energy	Number in Cluster
	nativ h _y D-crys - 1HK0			mutant h _y D-P23T - 2KFB		
Apigenin	-8.15	-7.20	275	-6.27	-5.99	214
Luteolin	-8.23	-7.17	157	-6.50	-5.88	395
Eriodictyol	-7.53	-6.48	53	-6.68	-6.35	786
Quercetin	-8.32	-7.15	192	-6.37	-5.71	403
Myricetin	-8.34	-6.92	118	-6.24	-5.56	355
Genistein	-8.90	-8.02	314	-6.19	-5.83	36
				-6.19	-5.79	194
Vitexin	-7.22	-6.22	92	-6.18	-4.77	206
Isovitexin	-7.08	-5.50	52	-6.50	-5.58	1452
Chlorogenic Acid	-6.81	-5.14	18	-6.13	-4.68	76
Curcumin enol-keto	-7.69	-6.67	7	-7.36	-5.94	210
Curcumin diketo	-8.95	-6.33	11	-7.16	-5.88	217
Resveratrol	-7.80	-6.98	77	-5.97	-5.47	165
				-5.93	-5.44	472
Vitedoin A	-6.71	-5.85	16	-6.16	-5.01	240
Ellagic Acid	-7.89	-7.31	477	-7.66	-7.30	109

Menționăm că nu am efectuat încă un studiu experimental pentru a determina modul în care un anumit inhibitor interacționează comparativ cu proteina nativă h_yD-crys față de mutantul h_yD-p23T. și nu am găsit un studiu în literatură la care să facem referire. Cu toate acestea, știm că mutantul h_yD-p23T agregă la concentrații semnificativ mai mici decât proteina nativă h_yD-crys [18,19]. Acesta este și faptul care ne-a motivat efectiv să inițiem acest studiu pentru a încerca, să înțelegem cum o singură mutație punctuală poate avea un efect drastic asupra afinității și echilibrului statistic ale acestor proteine și cum poate fi influențat acest echilibru.

Chiar dacă este necesară o investigație mai precisă pentru a clarifica acest rezultat teoretic, avem totuși în vedere și limitarea sau imprecizia calculelor de andocare moleculară unde se fac multe aproximări. Presupunem că afinitatea mai mare obținută pentru toate moleculele investigate pentru proteina nativă h_yD-crys poate fi cauzată în esență de faptul că cele două structuri proteice nu sunt determinate în aceleași condiții experimentale. Structura proteinei native h_yD-crys a fost rezolvată prin cristalografie de raze X, în timp ce structura proteinei mutante h_yD-p23T a fost rezolvată folosind RMN, în soluție. În plus, toți atomii aparținând proteinelor au fost păstrați rigizi în timpul calculelor. De asemenea, subliniem că am analizat afinitatea dintre potențiali inhibitori și h_yD-p23T ca monomeri, fără a lua în considerare nici un detaliu cu privire la interacțiunile proteină-proteină care determină agregarea acestui

mutant. Ne vom referi, în cele ce urmează, la cele mai scăzute valori ale energiilor de legare specificate în Tabelul 2, dar și la conformațiile de andocare care, pentru o mai bună comparație, sunt toate reprezentate în Figura 8. Detalii privind interacțiunile din interiorul situsurilor de legare ai proteinei native hγD-crys, respectiv mutantului hγD-p23T, cu toți cei 13 potențiali inhibitori și hărțile lor de interacțiuni 2D corespunzătoare sunt, de asemenea, reprezentate în Anexa 1.

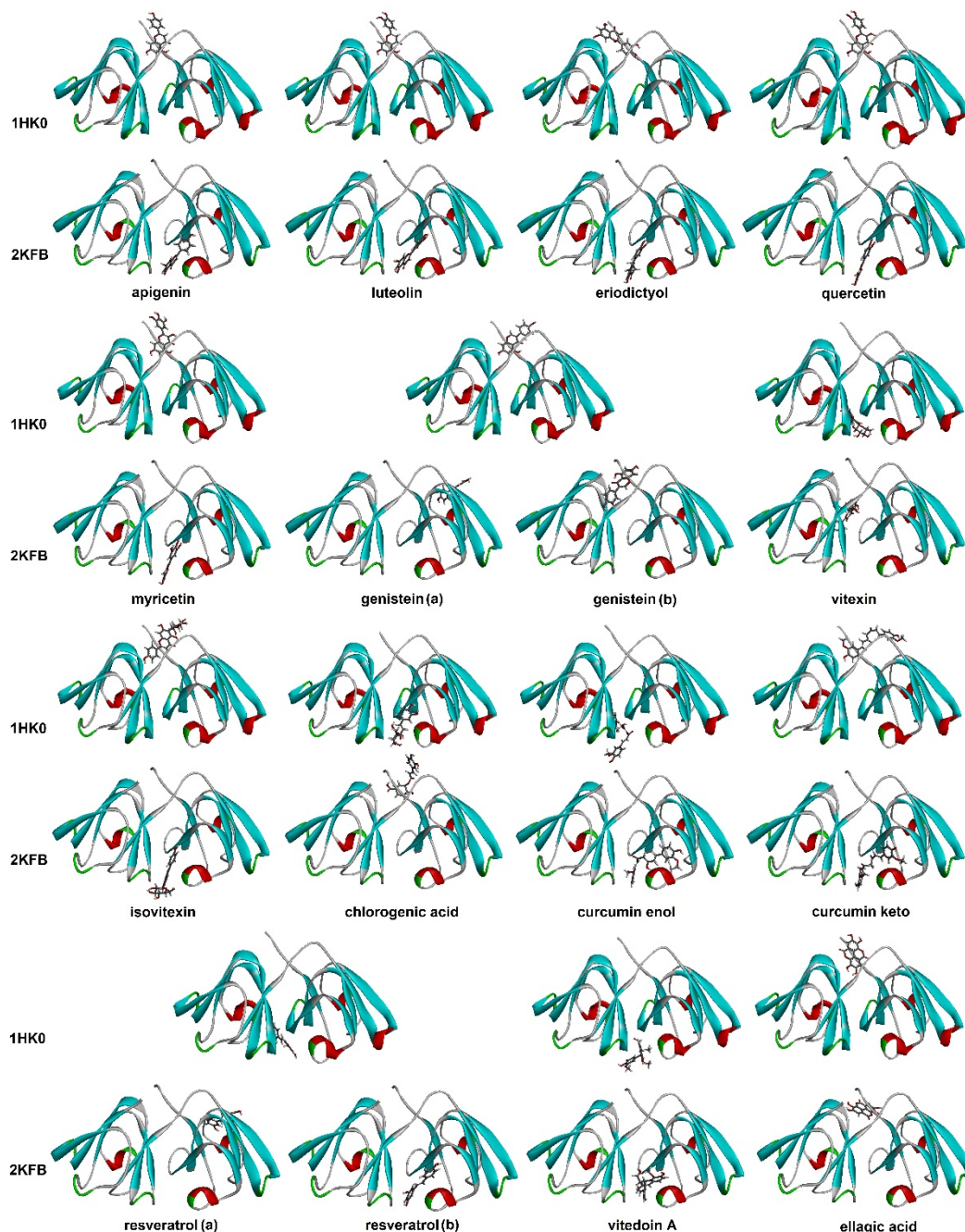


Figura 8. Structurile chimice ale compușilor naturali analizați ca potențiali inhibitori ai cataractei.

Analizând rezultatele pentru toate flavonoidele, cu excepția vitexinului, toate aceste molecule preferă andocarea în același buzunar creat între domeniul C-terminal și linkerul dintre domeniile N- și C-terminal, atunci când interacționează cu proteina nativă hγD-crys. De asemenea, cu excepția genistein și a vitexinului, toate flavonoidele sunt andocate în același buzunar aparținând domeniului C-terminal, atunci când interacționează cu proteina mutantă hγD-p23T. Acest rezultat comparativ sugerează că aceste buzunare ale γ-cristalinului pot găzdui, cu afinități diferite, molecule de diferite

dimensiuni. Dacă, dintre flavonoide, pentru proteina nativă hYD-crys, genistein are cea mai mare afinitate cu o energie de legare de -8,9 kcal/mol, pentru proteina mutantă hYD-p23T este eriodictiolul care are cea mai mare afinitate având energie de legare cea mai mică de -6,68 kcal/mol, în timp ce genistein are o afinitate redusă pentru proteina mutantă. Remarcăm că energiile de legare diferă doar cu maxim 0,5 kcal/mol, vitexina având o energie de legare de -6,18 kcal/mol. Comparând energiile de legare cu proteina mutantă hYD-p23T pentru toate moleculele investigate, observăm că resveratrolul, așa cum rezultă din calcule, este molecula cea mai scăzută afinitate pentru mutantul hYD-p23T.

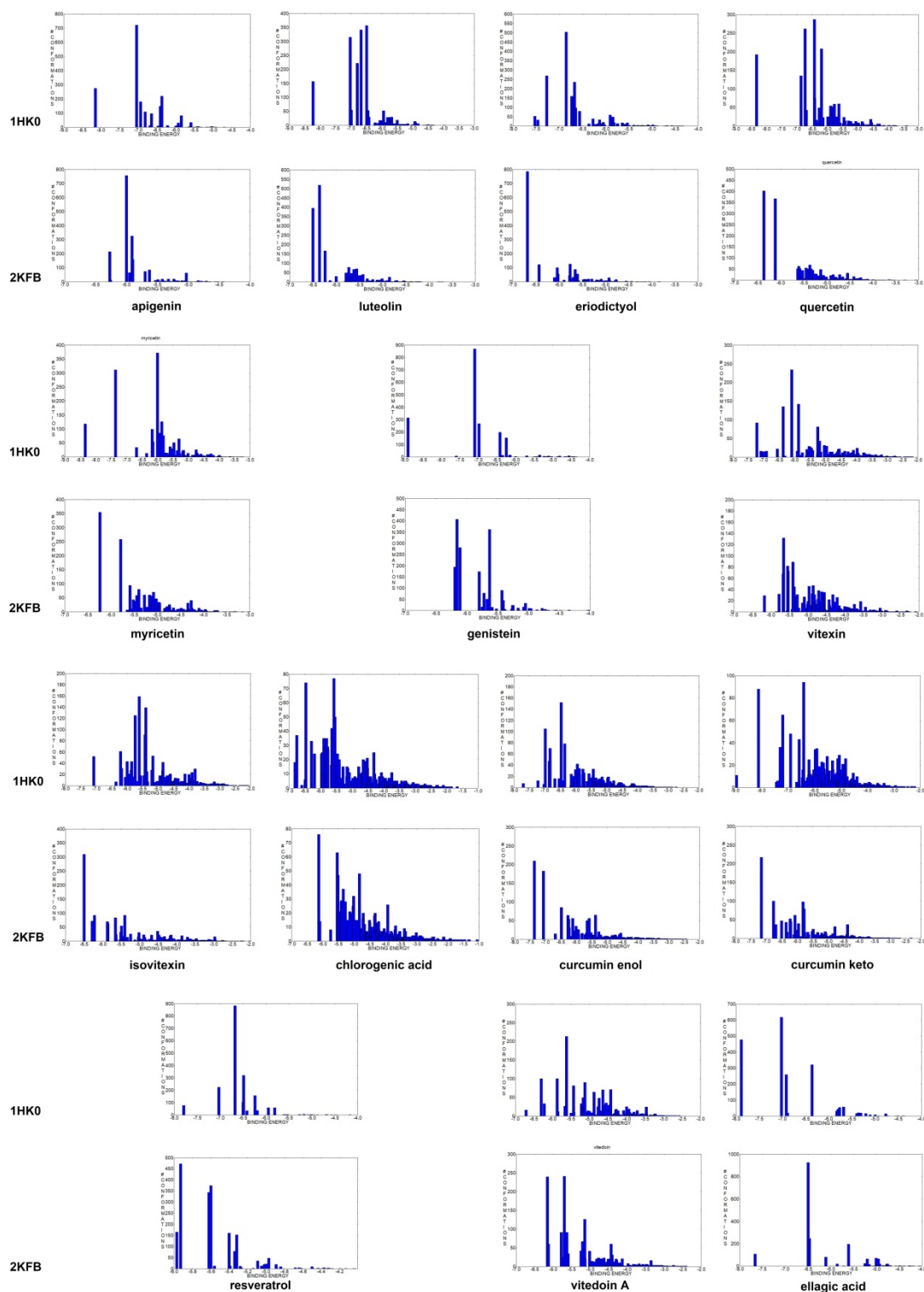


Figura 9. Histograme ale grupurilor de energii de legare pentru toți inhibitorii naturali potențiali investigați care rezultă din calculele de andocare moleculară la proteina nativă hYD-crys (1HK0) și hYD-p23T mutant (2KFB).

Pentru resveratrol am ales să prezentăm două configurații legate de mutantul h_YD-p23T cu energii de legare foarte apropiate -5,97 kcal/mol și -5,93 kcal/mol. Am reprezentat, de asemenea, cea mai apropiată structură de cea cu energie de legare în valoare absolută maximă, deoarece a fost identificată cu preferință (clusterul său are 492 de membri față de 165 pentru conformația principală) și pentru că, după cum putem vedea în Figura 6, se leagă în același buzunar, aparținând domeniului C-terminal care se extinde în spațiul dintre domeniile N- și C-terminal, ca și majoritatea flavonoidelor.

În Figura 9 sunt reprezentate histogrammele clusterilor cu valorile energiilor de legare pentru toți potențiali inhibitori naturali investigați. În analiza practică, histogrammele sunt de o importanță crucială și am descris, de asemenea, în detaliu semnificația lor anterior, în timpul analizei de legare a lanosterolului. Ele ne oferă o vedere practică, ordonată și interactivă a grupurilor de conformații identificate, pe lângă faptul că ajută la identificarea domeniilor predilecte de interacțiune ale proteinelor cu potențialele molecule inhibitoare și la identificarea celei mai stabile configurații. De exemplu pentru genistein, din reprezentarea histogrammei pentru interacțiunea cu proteina mutantă h_YD-p23T, observăm că am obținut două grupuri de conformații suprapuse la cea mai mică energie de legare, una având 36 de membri și alta având 194. De aceea le-am specificat pe amândouă în Tabelul 2 și Figura 8, după cum am menționat, genistein (a), fiind conformația principală a clusterului având 36 de membri și genistein (b) cea a clusterului cu 194 de membri. De asemenea, pentru resveratrol, în Figura 8, conformația numită resveratrol (a) este cea având energia de legare maximă -5,97 kcal/mol și aparține grupului cu numai 165 de membri. În general, buzunarele de legare preferate pentru proteina nativă h_YD-crys și mutantul h_YD-p23T din Figura 8, sunt cele preferate de majoritatea flavonoidelor, cu unele excepții. Remarcăm aici vitexina care fiind de dimensiune mai mare probabil nu s-a încadrat în buzunarul creat între C-terminal și linkerul dintre domeniile N- și C-terminal, care este andocată în spațiul dintre domeniile N- și C-terminal. Izovitexina, pe de altă parte, respectă tendința situsurilor de legare preferate ale majorității flavonoidelor pentru ambele proteine, chiar dacă este mai puțin stabilă decât vitexina în interacțiune cu proteina nativă h_YD-crys și mai stabilă decât vitexina atunci când este andocată la mutantul h_YD-p23T. Un caz particular este acidul clorogenic care se leagă într-un mod oarecum inversat tendinței menționate pentru majoritatea flavonoidelor, dar cu o energie de legare relativ scăzută la ambele proteine, comparativ cu celelalte molecule investigate. Un alt comportament surprinzător este cel al curcuminei pentru care am calculat andocarea ambilor tautomeri cunoscuți enol-keto și diketo. Observăm aici că tautomerul diketo cu o energie de legare de -8,95 kcal/mol este liderul tuturor compușilor naturali investigați, urmat de genistein cu o energie de -8,9 kcal/mol atunci când este andocat la proteina nativă h_YD-crys. Conformerul de curcumină se află, de asemenea, între cele mai bine legate molecule la mutantul h_YD-p23T, cu o energie de legare de -7,16 kcal/mol ceva mai redusă decât cea a tautomerului enol-keto, -7,36 kcal/mol, și a acidului elagic având o energie de legare de -7,66 kcal/mol. Legarea curcuminei diketo urmează, de asemenea, tendința menționată creată de majoritatea flavonoidelor și este andocată în aceleași buzunare menționate, în cazul ambelor proteine. Vitedoina A și acidul elagic, deoarece sunt mai voluminoase, nu sunt în conformitate cu tendința majorității flavonoidelor. Vitedoin A nu a arătat o capacitate bună de legare, fiind molecula cel mai puțin legată de proteina nativă h_YD-crys și aproape de valorile obținute pentru resveratrol, atunci când este andocată la mutantul h_YD-p23T. Acidul elagic, pe de altă parte, este molecula lider atunci când este andocat la mutantul h_YD-p23T, având cea mai mare energie de legare în valoare absolută -7,66 kcal/mol, menționată deja. Dacă comparăm energiile de legare ale moleculelor lider atât pentru proteina nativă h_YD-crys, cât și pentru mutantul h_YD-p23T, -8,95 kcal/mol pentru curcumina diketo și cea a acidului elagic cu valorile obținute inițial pentru lanosterol, -9,16 kcal/mol pentru complexul cu proteina nativă

h_yD-crys și -8,94 kcal/mol pentru complexul cu mutant h_yD-p23T, observăm că lanosterolul este în mod clar liderul. Acest rezultat nu este oarecum surprinzător având în vedere că actualmente lanosterolul, în ciuda solubilității scăzute, este inhibitorul potențial consacrat al agregării proteinelor de h_yD-cristalin, și care a fost studiat din punct de vedere experimental în numeroase studii, după cum am menționat anterior.

A 2.3 - Simulare de dinamică moleculară al complexului proteină-inhibitor (h_yD-p23T:inhibitor)

În această etapă a simulărilor de dinamică moleculară am demarat calcularea traiectoriilor de dinamică moleculară ale proteinelor, varianta nativă h_yD-crys și cea mutantă h_yD-p23T, în stare liberă, respectiv în prezența potențialilor inhibitori. Initial am construit sistemele de calcul care conțin proteinele investigate, potențiali inhibitori și moleculele de solvent, apă în cazul nostru, și posibili ioni dacă sunt necesari pentru neutralizarea sarcinilor neechilibrate din sistem.

Astfel ambele proteine h_yD-cristalin, varianta nativă h_yD-crys și cea mutantă h_yD-p23T, sunt neutre din punct de vedere electric în ciuda prezenței în structura lor a aminoaciziilor încărcate negativ (glutamatul și aspartatul) și pozitiv (arginina și lizina). Astfel, ambele proteine conțin un număr de: 6 His, 21 Arg, 1 Lys, 10 Glu și 12 Asp. Nu este astfel necesar să adăugăm alți ioni în soluție pentru a asigura neutralitatea sistemului. Cum doar aproximativ 10% din His sunt protonate la pH fiziologic nu am luat în acest calcul prezența celor 6 histidine. Masa moleculară a componentelor este necesară pentru estimarea dimensiunilor și a volumului inițial al celulelor de simulare. Masa moleculară calculată a proteinei native h_yD-crys este 20.537 kDa și cea a mutantului h_yD-p23T este 20.593 kDa. Masa moleculară a lanosterolului este 426.71 g/mol iar a apei 18.01528 g/mol.

În Figura 10 reprezentăm structura inițială pentru sistemul conținând mutantul h_yD-p23T, molecule de lanosterol și apă. Procesul de calcul include o minimizare și ulterior echilibrare a sistemului pentru a evita apariția unor forțe de interacțiune extrem de mari rezultate din distribuția inițială aleatoare a moleculelor componente în cutia de simulare.

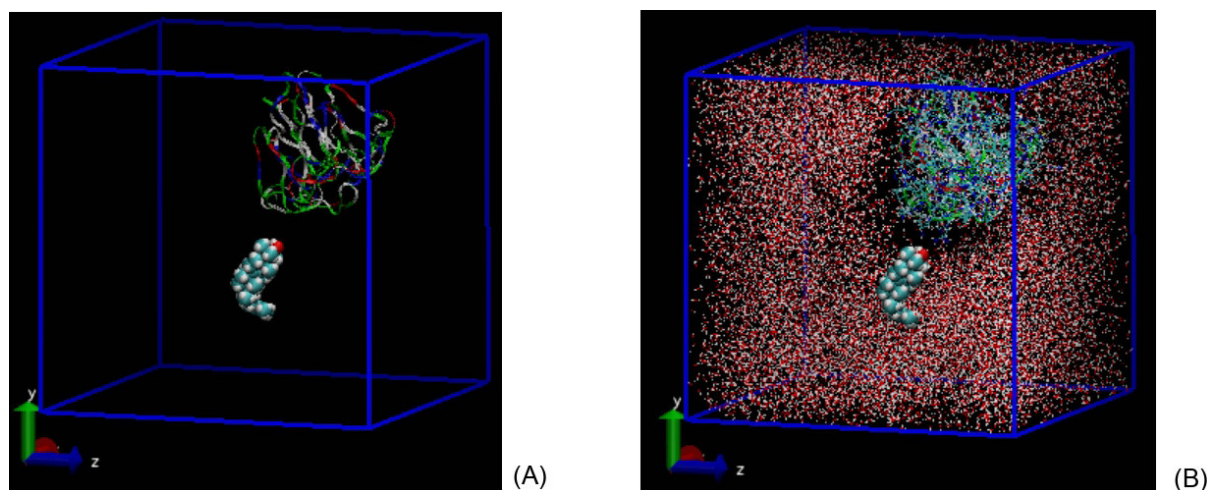


Figura 10. (A) Cutia de simulare inițială pentru simulările de dinamică moleculară conținând o proteină h_yD-cristalin mutantă P23T și o moleculă de lanosterol. (B) Aceeași cutie de simulare în care am reprezentat și moleculele de solvent, modelul de apă SPC în acest caz.

Deviația conformatională medie (RMSD) corespunzătoare atomilor de carbon C α din lanțul polipeptidic principal monitorizată în timpul simulării (50 ns) pentru mutantul h_yD-p23T în stare liberă (negru), respectiv h_yD-p23T în complex cu lanosterolul (magenta) sunt prezentate în Figura 11. Remarcăm faptul că după aproximativ 10 ns mutantul h_yD-p23T prezintă o ușoară variație în dinamica macromoleculară

în comparație cu hγD-p23T în complex cu lanosterolul, rezultând o dinamică conformațională rigidă în prezența ligandului. Profilul deviației conformaționale RMSF corespunzător fiecărui amino acid din lanțul polipeptidic este prezentat în Figura 11B pentru hγD-p23T în stare liberă (negru), respectiv hγD-p23T în complex cu lanosterolul (magenta). Valorile deviațiilor reprezentate în Figura 11B indică gradul de flexibilitate al fiecărui aminoacid. Din analiza graficului reiese faptul că 24 din cei 173 aminoacizi ai hγD-p23T manifestă o flexibilitate mai crescută cand proteina se află în stare liberă, decat în prezența ligandului, respectiv 10 aminoacizi au flexibilitate redusă, iar 139 manifesta flexibilitate identică. În ansamblu, am obținut o valoare RMSF medie de 0.165 pentru mutantul hγD-p23T aflat în stare liberă, respectiv 0.147 pentru hγD-p23T în complex cu lanosterolul.

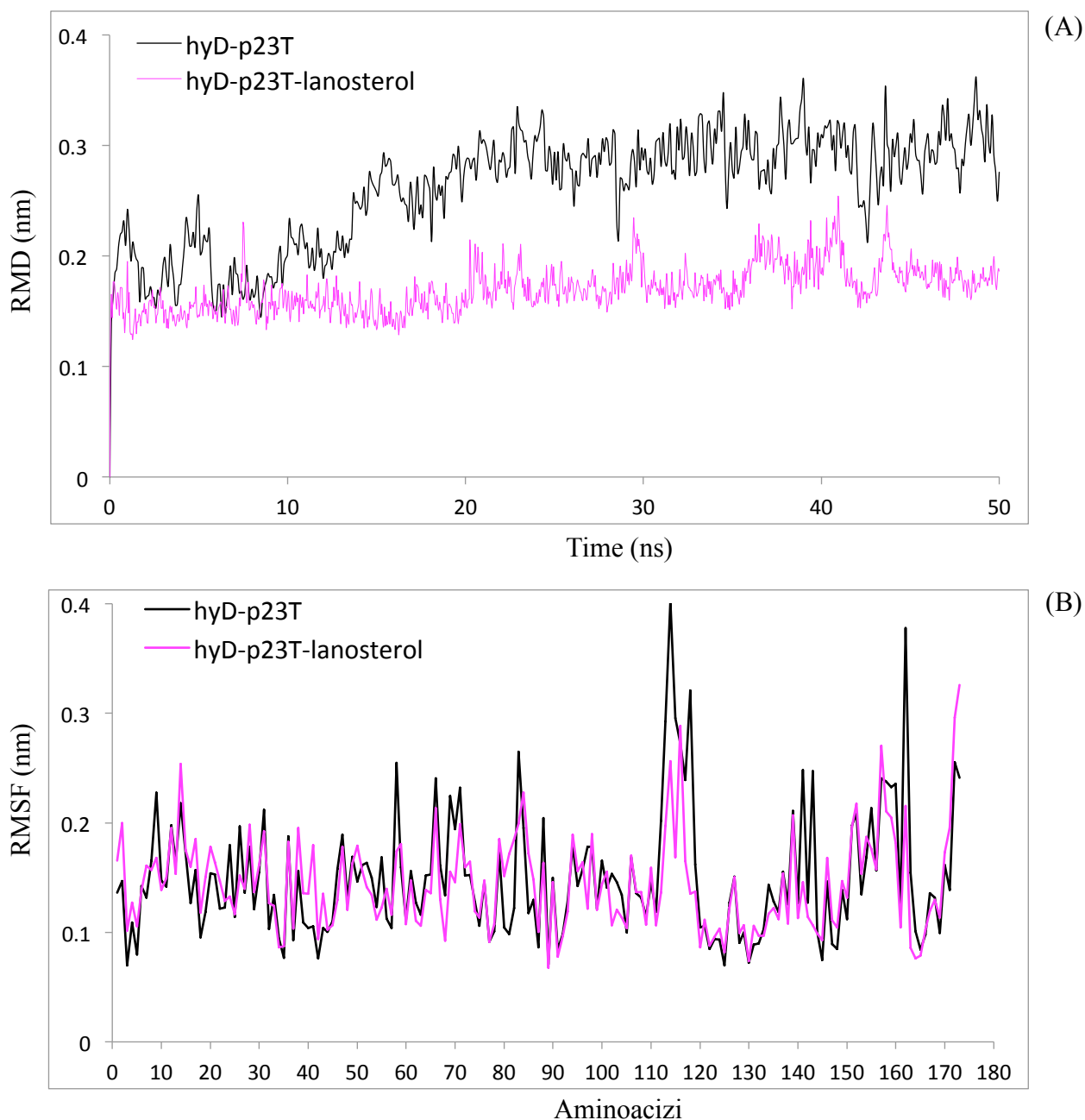


Figura 11 A) Deviația conformațională medie (RMSD) corespunzătoare atomilor de carbon Cα din lanțul polipeptidic principal monitorizată în timpul simulării (50 ns) pentru mutantul hγD-p23T în stare liberă (negru), respectiv hγD-p23T în complex cu lanosterolul (magenta). B) Deviația corespunzătoare fiecărui amino acid (RMSF) monitorizată în timpul simulării (50 ns) pentru hγD-p23T în stare liberă (negru), respectiv hγD-p23T în complex cu lanosterolul (magenta).

În Figura 12 este reprezentată ilustrativ configurația conținând 10 proteine pentru mutantul h_yD-p23T și 10 molecule de lanosterol. Pentru a observa comparativ dinamica și a investiga posibila agregare diferențiată a proteinei native și a celei mutante calculăm și sisteme fără ligand. Aceste sisteme le simulăm la diferite temperaturi deoarece experimental se cunoaște faptul că proteina h_yD-P23T are o dependență inversată a solubilității cu temperatura, clusterelor proteice se dispersează cu descreșterea nu cu creșterea temperaturii ceea ce complică considerabil studiul teoretic al acestor sisteme [20]. Acest comportament este similar cu cel observat anterior de noi într-un sistem care conține ciclodextrine, piridine metilate și puțină apă, care prezintă la încălzire o tranziție de fază reentrantă lichid-solid [21]. Efortul de calcul este astfel substanțial, fiind necesar calculul unor traiectorii lungi, de minim 100ns, iar fiecare simulările de la fiecare temperatură necesită o nouă echilibrare a sistemului în prealabil. Analiza traiectoriilor și a comportamentului statistic al moleculelor din sistem și a celui particular al interacțiunilor proteină-proteină, proteină-inhibitor este de asemenea un proces laborios și dezvoltarea unor scripturi complexe de analiză adaptate acestor sisteme.

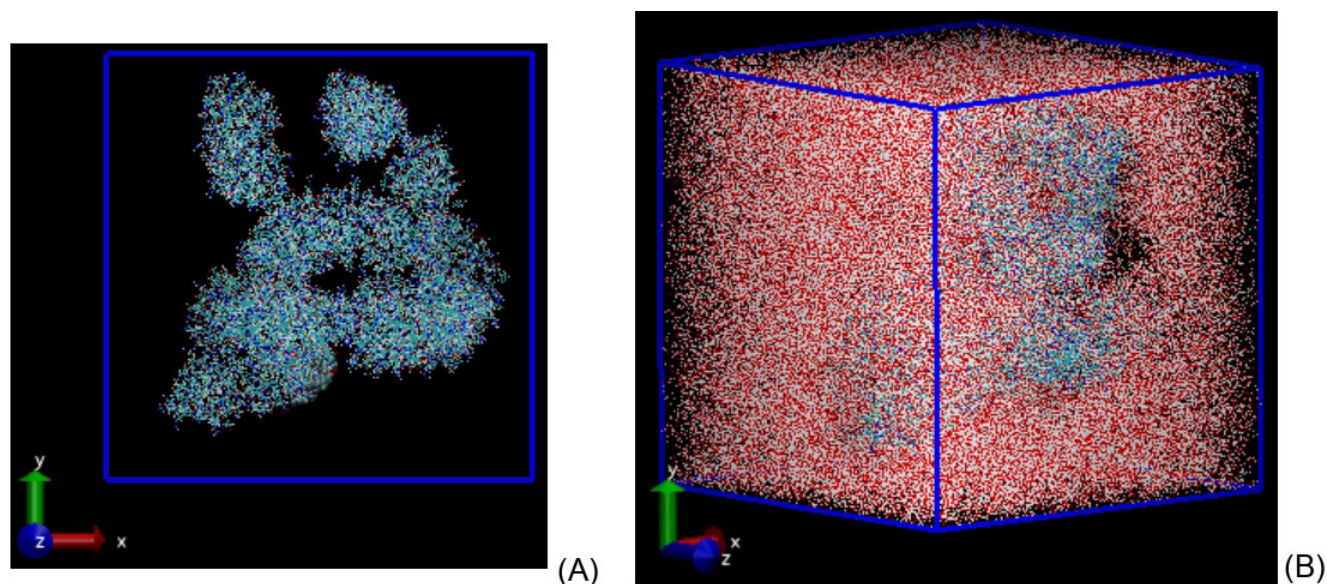


Figura 12. (A) Cutia de simulare inițială pentru simulările de dinamică moleculară conținând 10 proteine h_yD-p23T mutante și 10 molecule de lanosterol. (B) Aceași cutie de simulare în care am reprezentat și moleculele de de solvent.

În paralel cu țelul de a pune în evidență în aceste simulări agregarea proteinelor și identificarea interfețelor de interacțiune dintre acestea, pe lângă sistemele conținând lanosterolul prezentate anterior, pregătim și sisteme în care vom testa comparativ comportamentul unora dintre potențialii inhibitori studiați în etapa de andocare moleculară, prezentată în detaliu în acest raport.

Intenționăm, de asemenea, să efectuăm și un studiu de dinamică moleculară la neechilibru în care vom putea energia liberă și parametrii termodinamici folosind metoda „umbrella sampling”.

WP1. Interacțiunea hgDp23T:αB-Cristalin (partea 2)

A 2.4 - Măsurători de relaxare RMN ale complexului hgDp23T:αB-Cristalin

În această etapă am efectuat studii suplimentare de dinamică moleculară care să probeze formarea complexului hγD-p23T:αB-Crys. Pentru studiul dinamicii macromoleculare am efectuat studii de relaxometrie RMN în soluție, respectiv măsurători de relaxare transversală ^{15}N -T₂. Valorile timpilor de relaxare împreună cu alți parametri măsurabili, cum ar fi deplasările chimice și cuplajele scalare spin-spin (J), conferă spectroscopiei RMN superioritate față de alte metode folosite în studiile structurale ale complexelor macromoleculare. Mecanisme fizice care determină timpul de relaxare depind atât de timpul de corelație rotațional (τ_c), precum și de flexibilitatea internă a fiecărui aminoacid din lanțul polipeptidic.

Pentru studierea complexului hγD-p23T:αB-Crys am efectuat măsurători de relaxare, comparând timpii de relaxare ^{15}N -T₂ ale semnalelor de rezonanță NH în spectrele ^1H - ^{15}N -HSQC, corespunzătoare proteinei marcată izotopic cu ^{15}N , ^{15}N -hγD-p23T în stare liberă, respectiv în prezența chaperonei αB-Crys (nemarcată izotopic), aflate în soluție tampon conținând 50 mM fosfat de sodiu (pH=7).

Măsurătorile timpilor de relaxare ^{15}N -T₂ au fost efectuate cu un spectrometru Bruker Advance, folosind secvența de pulsuri CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) reprezentată în Figura 13.

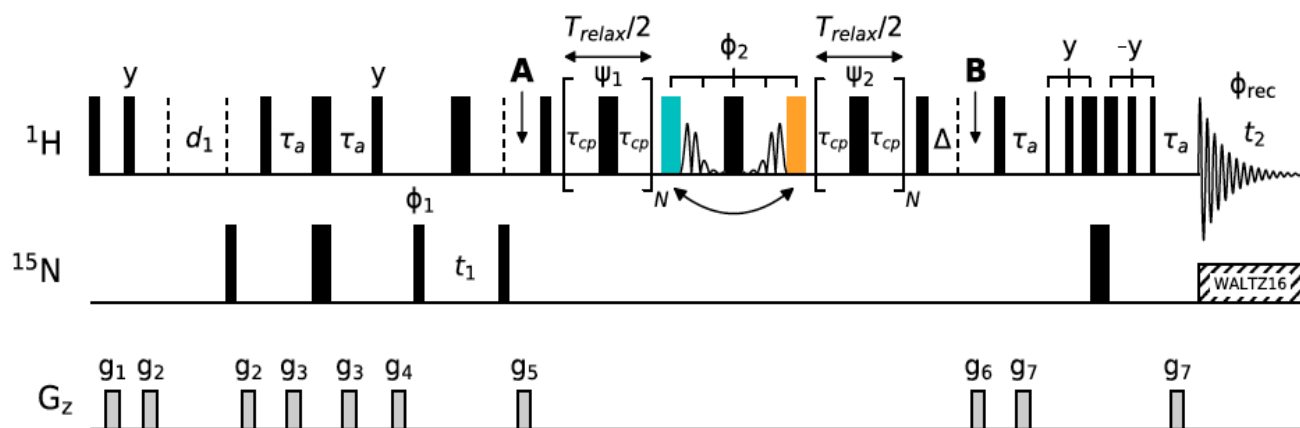


Figura 13 Secvența de pulsuri CPMG-HSQC, într-un câmp neomogen (gradient, G).

Barele înguste descriu pulsurile de 90°, respectiv cele largite descriu pulsurile de 180°.

Un impuls de radiofrecvență de 90° înclină magnetizarea în plan transversal (x,y). Pierderea coerenței de fază în plan transversal reprezintă defapt relaxarea transversală T₂. Magnetizarea este reorientată printr-o serie de impulsuri (τ -180°- τ), aplicate la intervale 2 τ unul de celălalt, iar între aceste impulsuri este înregistrată amplitudinea ecourilor care iau naștere.

Astfel, o serie de măsurători ^{15}N -T₂ au fost efectuate pentru fiecare probă la 298 K, folosind valori optime ale intervalelor de întârziere τ : 17ms, 34ms, 61ms, 87ms, 130 ms pentru proteina hγD-p23T în stare liberă, respectiv 2ms, 8ms, 13ms, 22ms, 60 ms, și 110 ms pentru complexul hγD-p23T:αB-Crys. Valorile timpilor de relaxare ^{15}N -T₂ s-au obținut prin fitarea datelor experimentale folosind o ecuație exponențială care descrie descreșterea amplitudinii semnalelor de rezonanță în funcție de timpul τ . Curbele de relaxare reprezentative pentru aminoacizi selectați atât din domeniul N-terminal și C-terminal, precum și cei aparținând buclei de conectare dintre cele două domenii, sunt reprezentate în Figura 14.

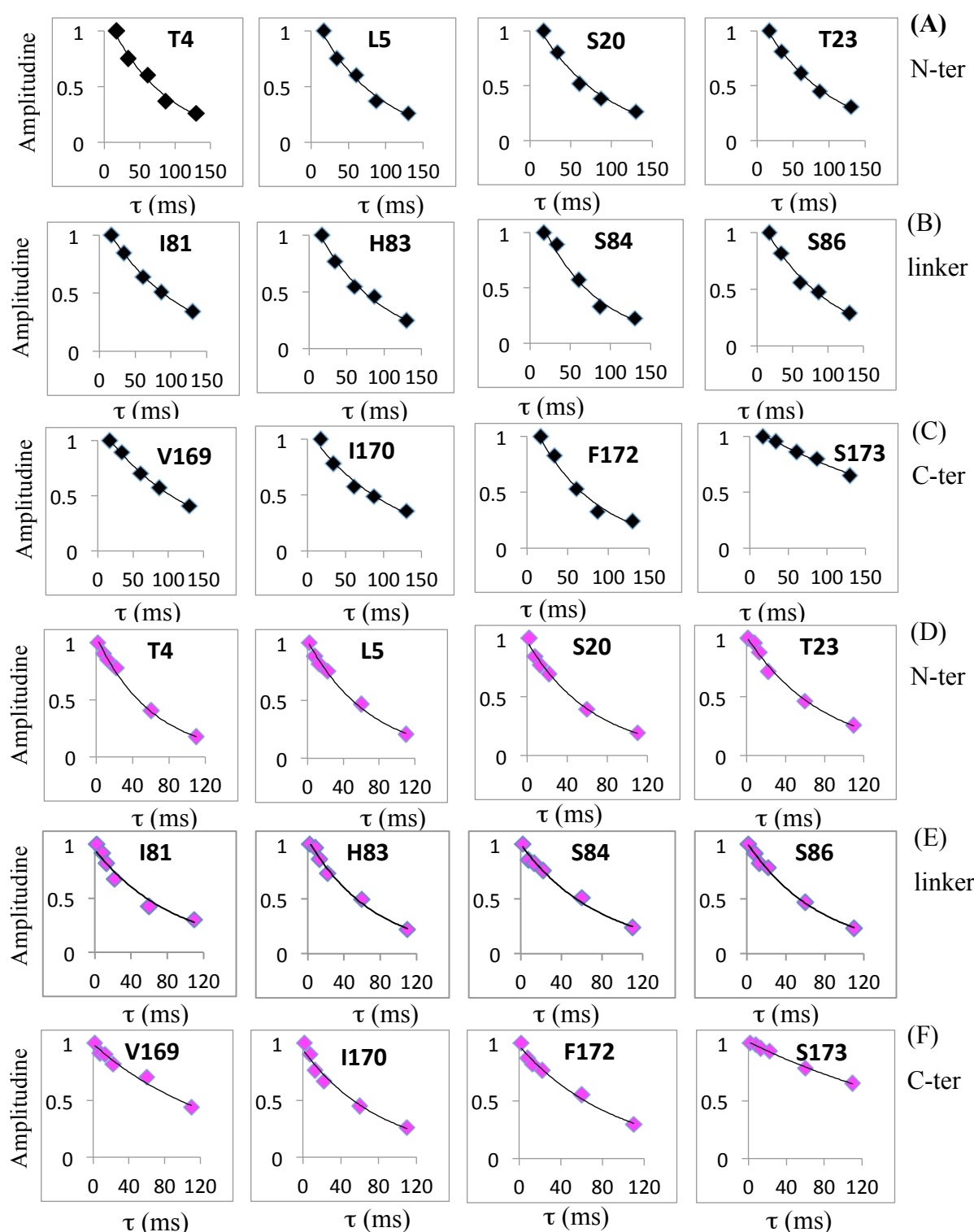


Figura 14. Curbele de relaxare ^{15}N - T_2 corespunzătoare mutantului $\gamma\text{D-p23T}$ (reprezentate în neagră):
A) domeniul N-terminal, B) bucla de legătură, C) C-terminal; respectiv $\gamma\text{D-p23T}:\alpha\text{B-Crys}$ complex (magenta):
D) domeniul N-terminal, E) bucla de legătură, F) C-terminal

Din măsurătorile de relaxare RMN am extras atât valorile timpilor de relaxare ^{15}N - T_2 pentru fiecare aminoacid corespunzător secvenței proteinei, precum și informații de dinamică macromoleculară pe care $\text{h}\gamma\text{D-p23T}$ le experimentează în prezența chaperonei $\alpha\text{B-Crys}$, în ansamblu. Valoarea medie a timpului de relaxare ^{15}N - T_2 obținută pentru complexul $\text{h}\gamma\text{D-p23T}:\alpha\text{B-Crys}$ am interpretat-o comparativ cu proteina $\text{h}\gamma\text{D-p23T}$ aflată în stare liberă.

Am obținut o valoare medie al timpului de relaxare $^{15}\text{N-T}_2$ de ~ 89 ms pentru proteina în stare liberă, respectiv 69 ms pentru complexul h γ D-p23T: α B-Crys (Figura 15).

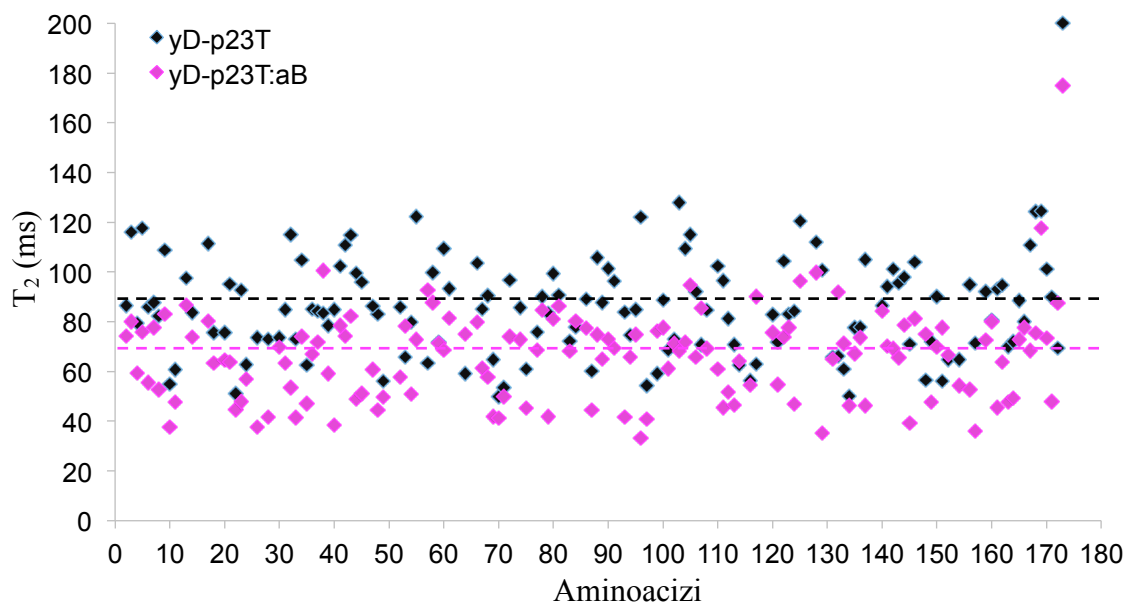


Figura 15. Valorile timpilor de relaxare $^{15}\text{N-T}_2$ corespunzătoare secvenței de aminoacizi a mutantului γ D-p23T în stare liberă (reprezentate în negru), respectiv γ D-p23T: α B-Crys complex (magenta).

Diferența de ~ 20 ms între valorile timpilor de relaxare $^{15}\text{N-T}_2$ indică o restricționare a dinamicii macromoleculare a mutantului h γ D-p23T în prezența chaperonei α B-Crys per ansamblu, ca urmare a formării complexului macromolecular. Din datele măsurătorilor de relaxare reiese faptul că fracția solubilă (monomerică) a mutantului h γ D-p23T interacționează nespecific cu proteina chaperonă α B-Crys, într-o manieră tranzitorie de verificare a integrității structurale.

În cazul complexului h γ D-p23T: α B-Crys se observă o scădere mai pronunțată a valorilor timpilor de relaxare $^{15}\text{N-T}_2$ pentru semnalele de rezonanță aparținând domeniului N-terminal al h γ D-p23T (~ 60 ms), indicând faptul că α B-Crys interacționează în mod preferențial cu acest domeniu. Această observație se corelează cu observațiile experimentale de denaturare induse în *vitro* care arată faptul că domeniul N-terminal se dezintegrează cel dintâi, sugerând faptul că acest proces este prevenit în urma interacțiunii cu proteina chaperonă α B-Crys. Acesta este un prim studiu RMN care evidențiază rolul protector al proteinei chaperonă α B-Crys, asigurând o pliere tridimensională adecvată a proteinelor partenere (cristalinelor), prezente în lentila oculară. Totuși, această interacțiune nespecifică nu este suficientă pentru a preveni procesul de agregare al mutantului h γ D-p23T, în condiții fiziologice. În aparență procesul de autoasociere al mutantului h γ D-p23T este unul pronunțat în care proteina își păstrează structura tridimensională nealterată, astfel încât reușește să „evadeze” de sub supravegherea proteinei chaperonă α B-Crys, cauzând cataracta.

Bibliografie

1. Clark J.I., Clark J.M., Lens cytoplasmic phase separation. *Int. Rev. Cytol.*, 192, 171-187, (2000).
2. Fernández-Silva A, French-Pacheco L, Rivillas-Acevedo L, Amero C. 2020. Aggregation pathways of human γ D crystallin induced by metal ions revealed by time dependent methods. *PeerJ*, 8, e9178 (2020)
3. Evans P., Wyatt K., Wistow G.J., Bateman O.A., Wallace B.A., and Slingsby C. The P23T cataract mutation causes loss of solubility of folded γ D-crystallin. *J. Mol. Biol.*, 343, 435-444, (2004).
4. Pande A., Annunziata O., Asherie N., Ogun O., Benedek G.B., Pande J., Decrease in protein solubility and cataract formation caused by the Pro23 to Thr mutation in human γ D-crystallin. *Biochemistry*, 44, 2491-2500, (2005).
5. Basak, A.K., Bateman, O., Slingsby, C., Pande, A., Asherie, N., Ogun, O., Benedek, G., Pande, J. High-Resolution X-Ray Crystal Structures of Human Gamma d Crystallin (1.25Å) and the R58H Mutant (1.15Å) Associated with Aculeiform Cataract *J. Mol. Biol.*, 328: 1137-1147 (2003).
6. Jung J., Byeon I.L., Yang Y., King J., and Gronenborn A.M., The Structure of the Cataract-Causing P23T Mutant of Human γ D-Crystallin Exhibits Distinctive Local Conformational and Dynamic Changes. *Biochemistry* 48(12), 2597-2609 (2009)
7. Huff, M., Telford, D., Lord of the rings – the mechanism for oxidosqualene: lanosterol cyclase becomes crystal clear. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26 (7), 335-340 (2005)
8. Zhao, Ling; et al., Lanosterol reverses protein aggregation in cataracts. *Nature*, 523(7562), 607-611 (2015)
9. Shen, Xinyue; Zhu, Manhui; Kang, Lihua; Tu, Yuanyuan; Li, Lele; Zhang, Rutan; Qin, Bai; Yang, Mei; Guan, Huaijin, Lanosterol Synthase Pathway Alleviates Lens Opacity in Age-Related Cortical Cataract. *Journal of Ophthalmology*, 2018, 1-9 (2018)
10. Wang K., Hoshino M., Uesugi K., Yagi N., Pierscionek B.K., Andley U.P., Oxysterol Compounds in mouse mutant α A- and α B-crystallin lenses can improve the optical properties of the lens. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 63 (2022)
11. Daszynski, D.M., Santhoshkumar, P., Phadte, A.S. et al. Failure of Oxysterols Such as Lanosterol to Restore Lens Clarity from Cataracts. *Sci. Rep.*, 9, 8459 (2019).
12. M.J.Frisch, H.B.Schlegel, G.E.Scuseria, M.A.Robb, J.R.Cheeseman, G. Scalmani, V.Barone, B. Mennucci, G.A.Petersson, H.Nakatsuji, M.Caricato, X.Li, H.P.Hratchian, A.F.Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, Ö. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, Gaussian09, Revision D.01, Gaussian, Inc, Wallingford CT, 2009.
13. G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, et al., *J. Comput. Chem.*, 30(16), 2785-2791 (2009)
14. O. Trott, A.J. Olson, *J. Comput. Chem.*, 31(2), 455-461 (2010)
15. J. Gasteiger, M. Marsili, *Tetrahedron*, 36, 3219-3228 (1980)
16. C. G. Floare, M. Bogdan, M. Tomoaia-Cotisel, A. Mocanu, *J. Mol. Struct.*, 1248, 131477 (2022)
17. E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, *J. Comput. Chem.*, 25, 1605-1612 (2004)
18. Broide, M.L.; Berland, C.R.; Pande, J.; Ogun, O.O.; Benedek, G.B. Binary-Liquid Phase-Separation of Lens Protein Solutions. *P Natl Acad Sci USA* 1991, 88, 5660-5664.
19. Boatz, J.C.; Whitley, M.J.; Li, M.; Gronenborn, A.M.; van der Wel, P.C.A. Cataract-associated P23T γ D-crystallin retains a native-like fold in amorphous-looking aggregates formed at physiological pH. *Nature Communications* 2017, 8, 15137.
20. Pande, A.; Annunziata, O.; Asherie, N.; Ogun, O.; Benedek, G.B.; Pande, J. Decrease in Protein Solubility and Cataract Formation Caused by Pro23 to Thr Mutation in Human γ D-Crystallin. *Biochemistry* 2005, 44, 2491-2500.
21. Plazanet, M.; Floare, C.; Johnson, M.R.; Schweins, R.; Trommsdorff, H.P. Freezing on heating of liquid solutions. *J Chem Phys* 2004, 121, 5031-5034.

Rezumat al activităților realizate în etapa-2/2023

A 2.1 - Screeningul inhibitorilor in silico folosind compuși chimici disponibili în baza de date Zinc

În această etapă inițială dedicată identificării de potențiali inhibitori ai agregării h γ D-cristalinului am ales să analizăm comparativ andocarea diferiților fitocompuși din baza de date ZINC. Un efort substanțial a fost dedicat, în consecință, determinării cât mai raționale și documentate a acestui subset de structuri. Pe lângă studierea inițială a lanosterolului, un compus cu potențial demonstrat de inhibare a agregării h γ D-cristalinului, am identificat un set de 13 compuși naturali pe care i-am studiat comparativ în detaliu, în interacțiune atât cu proteina nativă h γ D-crys cât și cu cea prezentând mutația p23T.

Astfel, am selectat cațiva fitocompuși cu potențial efect terapeutic prezenți cu preponderență în diferite plante: *Origanum vulgare*, *Olea europaea*, *Thymus vulgaris*, *Allium cepa*, *Spinacia oleracea*, *Fabaceae-Glycine max*, *Crataegus pinnatifida*, *Vaccinium angustifolium*, *Curcuma longa*, *Vitis vinifera*, *Vitex negundo*, *Rubus fruticosus*, *Foeniculum Vulgare*, *Ferula Persica*, *Ferula assa-foetida*, *Euphorbia helioscopia*, *Rubus fruticosus*.

A 2.2 - Docking molecular al proteinei hgDp23T-Cristalin cu potențiali inhibitori rezultați din screeningul in silico

Am inițiat acest studiu de andocare moleculară printr-o analiză a interacțiunii dintre ambele proteine γ D-cristalin, cea nativă h γ D-crys, și cea mutantă h γ D-p23T cu lanosterol, un compus identificat ca având un posibil efect de diminuare a agregatelor proteice de acest tip. În ciuda faptului că solubilitatea și biodisponibilitatea lanosterolului nu favorizează formulările apoase și unii cercetători se îndoiesc în ceea ce privește eficacitatea acestuia, credem că acest sistem poate servi drept referință pentru studiile ulterioare mai extinse folosind o serie de compuși naturali, aleși din baza de date ZINC, cu potențial împotriva agregării γ D-cristalinului. În întregul studiu *in silico* de andocare moleculară am folosit metoda Monte-Carlo implementată în software-ul Autodock v4.2. Apoi, am ales un set de 13 compuși naturali pe care i-am studiat comparativ în detaliu, în interacțiune atât cu proteina nativă h γ D-crys cât și cu cea prezentând mutația p23T.

Comparând energiile de legare ale moleculelor lider atât pentru proteina nativă h γ D-crys, cât și pentru mutantul h γ D-p23T, -8,95 kcal/mol pentru curcumina diketo și cea a acidului elagic cu valorile obținute inițial pentru lanosterol, -9,16 kcal/mol pentru complexul cu proteina nativă h γ D-crys și -8,94 kcal/mol pentru complexul cu mutant h γ D-p23T, am observat că lanosterolul este în mod clar liderul. Acest rezultat nu este oarecum surprinzător având în vedere că actualmente lanosterolul, în ciuda solubilității scăzute, este inhibitorul potențial consacrat al agregării proteinelor de h γ D-cristalin, și care a fost studiat din punct de vedere experimental în numeroase studii, după cum am menționat anterior.

A 2.3 - Simulare de dinamică moleculară al complexului proteină-inhibitor (h γ D-p23T:inhibitor)

Această etapă a simulărilor de dinamică moleculară a fost demarată fiind în curs de finalizare. Am construit sisteme de calcul care conțin proteinele investigate, potențiali inhibitori și moleculele de solvent, apă în cazul nostru, și de posibili ioni dacă sunt necesari pentru neutralizarea sarcinilor neechilibrate din sistem. Pentru a observa comparativ dinamica moleculară și a investiga posibila agregare diferențiată a proteinei native și a celei mutante am luat în calcul și sisteme fără ligand. Aceste sisteme le simulăm la diferite temperaturi. În paralel cu țelul de a pune în evidență în aceste simulări agregarea proteinelor și identificarea interfețelor de interacțiune dintre acestea, pe lângă sistemele conținând lanosterolul prezentate anterior, pregătim și sisteme în care vom testa comparativ comportamentul unora dintre potențialii inhibitori studiați în etapa de andocare moleculară, prezentată în

detaliu în acest raport. De asemenea a fost demarat și studiul agregării γ D-Cristalinului, al interacțiunii cu potențiali inhibitori, folosind metoda de dinamică moleculară.

A 2.4 - Măsurători de relaxare RMN ale complexului hγDp23T:αB-Cristalin

Pentru studierea complexului hγD-p23T:αB-Crys am efectuat măsurători de relaxare transversală în soluție, comparând timpii de relaxare ^{15}N -T₂ ale semnalelor de rezonanță NH în spectrele ^1H - ^{15}N -HSQC, corespunzătoare proteinei ^{15}N -hγD-p23T în stare liberă. Diferența de ~20 ms între valorile timpilor de relaxare ^{15}N -T₂ indică o restricționare a dinamicii macromoleculare a mutantului hγD-p23T în prezența chaperonei αB-Crys, ca urmare a formării complexului macromolecular.

În cazul complexului hγD-p23T:αB-Crys se observă o scădere mai pronunțată a valorilor timpilor de relaxare ^{15}N -T₂ pentru semnalele de rezonanță aparținând domeniului N-terminal al hγD-p23T, indicând faptul că αB-Crys interacționează în mod preferențial cu acest domeniu. Această observație se corelează cu observațiile experimentale de denaturare induse în *vitro* care arată faptul că domeniul N-terminal se dezintegrează cel dintai, sugerând faptul că acest proces este prevenit în urma interacțiunii cu proteina chaperonă αB-Crys. Prin urmare, fracția solubilă (monomerică) a mutantului hγD-p23T interacționează nespecific cu proteina chaperonă αB-Crys, în cadrul unei interacțiuni tranzitorie de verificare a integrității structurale. Acesta este un prim studiu RMN care evidențiază rolul protector al proteinei chaperonă αB-Crys, asigurând o pliere tridimensională adecvată a proteinelor partenere (cristalinelor), prezente în lentila oculară. Totuși, această interacțiune nespecifică nu este suficientă pentru a preveni procesul de agregare al mutantului hγD-p23T, în condiții fiziologice. În aparență procesul de autoasociere al mutantului hγD-p23T este unul pronunțat în care proteina își păstrează structura tridimensională nealterată, astfel încât reușește să „evadeze” de sub supravegherea proteinei chaperonă αB-Crys, cauzând cataracta.

Director Proiect,
Dr. Elena Matei



Diseminare

Articol trimis spre publicare, aflat în proces de evaluare: *International Journal of Molecular Sciences*

Titlu: Human γ D-crystallin drug survey: a molecular docking investigation

Autori: Călin G. Floare ^{1,*}, Adrian Pîrnău¹, Mihaela Mic¹ and Elena Matei ^{1,*}

Comunicări la conferințe științifice:

1. C G Floare, A Pirnau, M Mic, E Matei, “*In-silico* analysis of potential inhibitors of eye lens γ -crystallin aggregation and cataract prevention”, 14th International Conference PIM-2023, Cluj-Napoca, Romania
2. E Matei, A Filip, C G Floare, A Pirnau, M Mic, “Molecular aggregation pathway of cataract-associated γ D-crystallin p23T congenital defect”, *The annual international conference of Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology (RSBMB)*, Cluj-Napoca, Romania
3. E Matei, A Filip, C G Floare, A Pirnau, M Mic, “Structural study of cataract-causing p23T mutant of γ D-crystallin by Nuclear Magnetic Resonance”, 14th International Conference PIM-2023, Cluj-Napoca, Romania