

Raport Științific Final

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
perioada: **02.06.2022 – 31.12.2024**

Obiective prevăzute ale proiectului:

O.1 Caracterizarea interacțiunii hγD-p23T:αB-Cristalin

Pentru a înțelege mai bine modul în care modificările structurale ale variantei mutante P23T hγD-Cristalin conduc la cataractă congenitală, ne-am propus să efectuăm studii comparative de interacțiune între proteina nativă hγD-Crys și hγD-P23T, cu proteina de tip șoc termic αB-Crys, Pentru a determina dacă αB-Crys este capabilă să suprimă agregarea mutantului hγD-p23T, am folosit RMN în soluție.

O.2 Screeningul *in silico* al inhibitorilor împotriva agregării mutantului hγDp23T-Cristalin

N-am propus să identificăm noi inhibitori de supresie împotriva agregării hγD-P23T, utilizând screeningul compușilor *in silico*. Inhibitorii potențiali ai agregării hγD-P23T vor fi căutați prin andocarea compușilor găsiți în baza de date ZINC, urmând să fie analizați prin simulări de dinamică moleculară pentru a îmbunătăți rezultatele de andocare, pentru a clasifica subsetul din punct de vedere al scorului de energie liberă și a afinității prezise de legare a proteinei.

O.3 Teste de suprimare ale agregării proteinei hγDp23T-Cristalin

În vederea testării potențialilor inhibitori ai agregării variantei mutante P23T hγD-Cristalin *in vitro* ne-am propus să efectuăm teste de turbiditate, studii RMN de legare proteină-ligand în soluție, și ITC.

Plan de lucru

Etapa 1 / 2022

WP1. Interacțiunea hγDp23T: αB-Cristalin (partea 1)

A 1.1 - Studiul perturbării deplasărilor chimice RMN în soluție

Etapa 2/2023

WP2. Screeningul *in silico* al inhibitorilor împotriva agregării mutantului hγDp23T-Cristalin

Act 2.1-Screeningul inhibitorilor *in silico* folosind compușii chimici disponibili în baza de date ZINC

Act 2.3 - Simulare de dinamică moleculară al complexului proteină-inhibitor (hγD-p23T:inhibitor)

Act 2.3 - Simulare de dinamică moleculară al complexului proteină-inhibitor (hγD-p23T:inhibitor)

WP1. Interacțiunea hγDp23T:αB-Cristalin (partea 2)

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

Etapa 3/2024

WP3. Teste de suprimare ale agregării proteinei hγDp23T-Cristalin

Act 3.1 - Testare analitică a turbidității proteinei hγDp23T-Cristalin

Act 3.2 - Studiul interacțiunii proteină-inhibitor (hγDp23T-Cristalin:inhibitor) prin RMN

Act 3.3 - Studiul interacțiunii inhibitor-proteină (inhibitor:hγDp23T-Cristalin) prin ITC

1. Introducere

Cataracta este principala cauză de pierdere a vederii, ca urmare a modificărilor degenerative cauzate de vârstă, sau a mutațiilor genetice, ducând la opacifierea cristalinului. În timp ce cataracta cauzată de vârstă apare în general după 60 de ani, cataracta congenitală se manifestă încă din copilărie. În prezent, nu există nicio posibilitate de prevenție, singurul tratament fiind intervenția chirurgicală. Prin urmare, o elucidare completă a mecanismului molecular de opacifiere a cristalinului este esențială, în vederea dezvoltării metodelor terapeutice alternative. Până în prezent niciun medicament eficient împotriva cataractei nu a fost descoperit și aprobat, așadar 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.

Proiectul de cercetare urmărește să investigheze procesul de agregare la nivel molecular, cauzat de mutația Pro23Thr (h γ D-P23T) a proteinei gamma D-cristalin, provocând cataracta congenitală. Ne-am propus să obținem informații despre mecanismul de interacțiune din interiorul lentilei, pentru a înțelege modul în care sistemul de supraveghere ocular scapă de sub control agregarea gamma D-cristalinului cauzate de mutația genetică. În plus, au fost testați potențiali inhibitori împotriva agregării proteinei mutante h γ D-P23T. Cercetarea implică metode care permit caracterizarea structurală, și de interacțiune macromoleculară, prin Rezonanță Magnetică Nucleară, ITC, screening *in silico*, teste de suprimare a agregării *in vitro*, modelare și dinamică moleculară. O astfel de abordare integrativă în studierea cataractei este promițătoare, contribuind la descoperirea de metode alternative de prevenție și tratament.

2. Obiective prevăzute/realizate ale proiectului:

0.1 Caracterizarea interacțiunii h γ D-p23T: α B-Cristalin (partea 1)

Pentru îndeplinirea acestui obiectiv au fost realizate următoarele activități:

A 1.1 - Studiul perturbării deplasărilor chimice RMN în soluție

Procesul de descoperire al medicamentelor este unul complex și de durată, implicând o abordare interdisciplinară. Dezvoltarea bazată pe cercetarea fundamentală începe cu identificarea receptorului, proteinele fiind în general țintă principală de interacțiune cu potențialele medicamente. Elucidarea relației dintre activitatea biologică și cea structurală este esențială în procesul de selecție ai diverșilor compuși, care odată optimizați devin potențiali candidați în profilaxie sau tratament.

În această etapă a proiectului ne-am propus să înțelegem mecanismul molecular al procesului de agregare al mutantului Pro23Thr gamma-D cristalin (h γ D-p23T) care cauzează cataracta congenitală, studiind modul de interacțiune cu proteina chaperonă de tip șoc termic α B-cristalin (α B-Crys). Mecanismul detaliat de agregare al mutantului h γ D-p23T nu este elucidat, din cauza lipsei de informații structurale ale speciilor predispuse spre agregare. Înțelegerea mecanismului molecular al agregării h γ D-p23T, este o etapă preliminară în screeningul compușilor capabili să blocheze procesul de separare de fază lichid-precipitant, în vederea dezvoltării de metode alternative de prevenire și tratament ale cataractei congenitale cauzată de acest mutant.

1.1a Clonarea, transformarea, expresia, și purificarea proteinelor

Ca prim pas în studierea structurii și modului de interacțiune al proteinelor din familia cristalinelor (prezente în proporție de 90% în lentila oculară), am preparat gamma-D cristalin nativă (h γ D-Crys) având o secvență de 173 aminoacizi, mutantul h γ D-p23T, și proteina chaperonă α B-Crys având o secvență de 175 aminoacizi, marcate izotopic cu ^{15}N , precum și α B-Crys nemarcată izotopic, pentru măsurători RMN în soluție. Producția de proteine s-a realizat prin metoda recombinantă. ADN-ul sintetic care codifică

proteina h γ D-Crys nativă, mutantul h γ D-p23T, și α B-Crys, a fost inserat în mod individual în vectorul de expresie pET-14b, urmând să fie transformate în celulele de expresie BL21(DE3), rezistente la carbenicilină. Proteinele au fost exprimate în mediul de cultura LB (α B-Crys nemarcată izotopic), sau mediu modificat M9 în prezența izotopului ^{15}N , pentru γ D-Crys nativă, mutantul γ D-p23T, și α B-Crys, marcate uniform cu ^{15}N . Celulele au fost crescute într-un incubator/agitator (~225 rpm), la o temperatură de 37°C, iar expresia proteinelor a fost indusă cu 1 mM IPTG.

Proteinele au fost purificate prin metode care exploatează diferențele în proprietățile fizico-chimice și afinitatea de legare, folosind coloanele de schimb ionic (Q-FF și SP-FF), precum și cromatografie de excludere a mărimii prin utilizarea gelurilor poroase (coloana size-exclusion Superdex), atașate sistemului de purificare FPLC-Äkta. Calitatea proteinelor analizată prin 15% SDS-PAGE (**Figura 1**), indică o expresie suficientă (~10 mg/mL), și o puritate ridicată, necesare pentru studiul RMN.

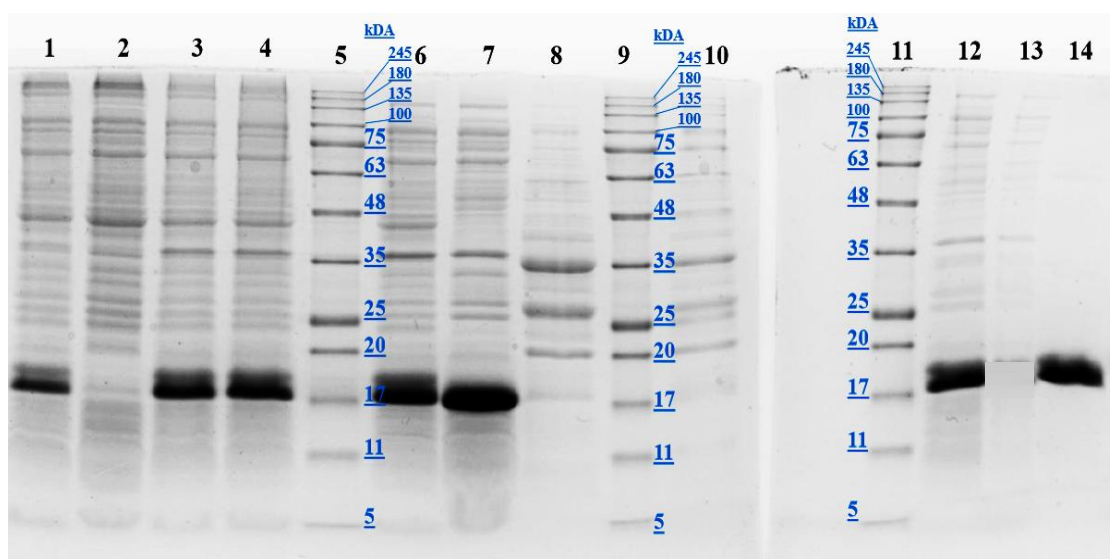


Figura 1. SDS-PAGE gel 15%, conținând probe în diferite stadii de purificare ale proteinei h γ D-p23T cristalin
1 – 2h după inducerea expresiei proteinei cu 1mM IPTG, **2 –** înaintea inducerii expresiei proteinei,
3 – 2.5 h după inducerea expresiei proteinei, **4 – 3h** după inducerea expresiei proteinei,
5 – standard (masă moleculară proteine), **6 –** amestec rezultat în urma sonicării, înainte de purificare,
7 – fracția care nu se atașează de coloana de tip **Q-FF**, în soluție tampon **A** (0% NaCl),
8 – fracția care se atașează de coloana **Q-FF**, în urma eluției în soluție tampon **B** (50% NaCl),
9 – standard (masă moleculară proteine), **10 –** fracția care se atașează de coloana **Q-FF**, în urma eluției în soluție tampon **B** (100% NaCl), **11 –** standard (masă moleculară proteine),
12 – fracția care se atașează de coloana **SP-FF**, în urma eluției în soluție tampon **B** (50% NaCl),
13 – fracția care nu se atașează de coloana de tip **SP-FF**, în soluție tampon **A** (0% NaCl),
14 – fracția finală purificată folosind coloana size-exclusion Superdex

1.1b Studii de interacțiune intermoleculară prin RMN în soluție

Secvența de pulsuri ^1H - ^{15}N -HSQC a fost folosită pentru a evalua calitatea, și integritatea structurală a proteinelor, fiind un indicator care arată dacă o macromoleculă suferă schimbări structurale majore în urma unei mutații. Experimentele ^1H - ^{15}N -HSQC au fost deasemenea folosite pentru a studia complexe macromoleculare. Proteinele h γ D-Crys, h γ D-P23T, și α B-Crys marcate izotopic cu ^{15}N , la o concentrație de ~50 μM , în 50 mM fosfat de sodiu (pH=7) soluție tampon, 90% H_2O /10% D_2O , au fost folosite pentru măsurători RMN (spectrometru Bruker AVANCE^{III}).

Figura 2 ilustrează spectrele ^1H - ^{15}N HSQC (298 K) ale h γ D-p23T (a) și α B-Crys (b) marcate cu ^{15}N . Proteina h γ D-Crys nativă este monomerică, foarte solubilă, și nu prezintă niciun semn de precipitare la

o concentrație fiziologică de ~100mg/ml. În schimb, hγD-p23T suferă un proces de separare de fază (agregare) la o concentrație de ~10mg/ml, în condiții fiziologice, pH=7, 37°C (**Figura 2a, stanga**). Frația solubilă a hγD-p23T prezintă semnale de rezonanță bine dispersate și vizibile pentru numărul așteptat de aminoacizi (**Figura 2a, dreapta**), similar cu proteina monomerică hγD-Crys nativă. În schimb, proteina αB-Crys oligomerizează într-un ansamblu macromolecular de ~24-mers (MW~500 kDa). Cu excepția aminoacizilor aparținând C-terminal (G154–K175), care este mult mai flexibil generând linii de rezonanță spectrală înguste, vizibile în spectrele HSQC, restul semnalelor sunt lărgite dincolo de limita de detecție (**Figura 2b, dreapta**). Gelul 15% SDS-PAGE indică o puritate ridicată a proteinelor (**Figura 2b, stanga**).

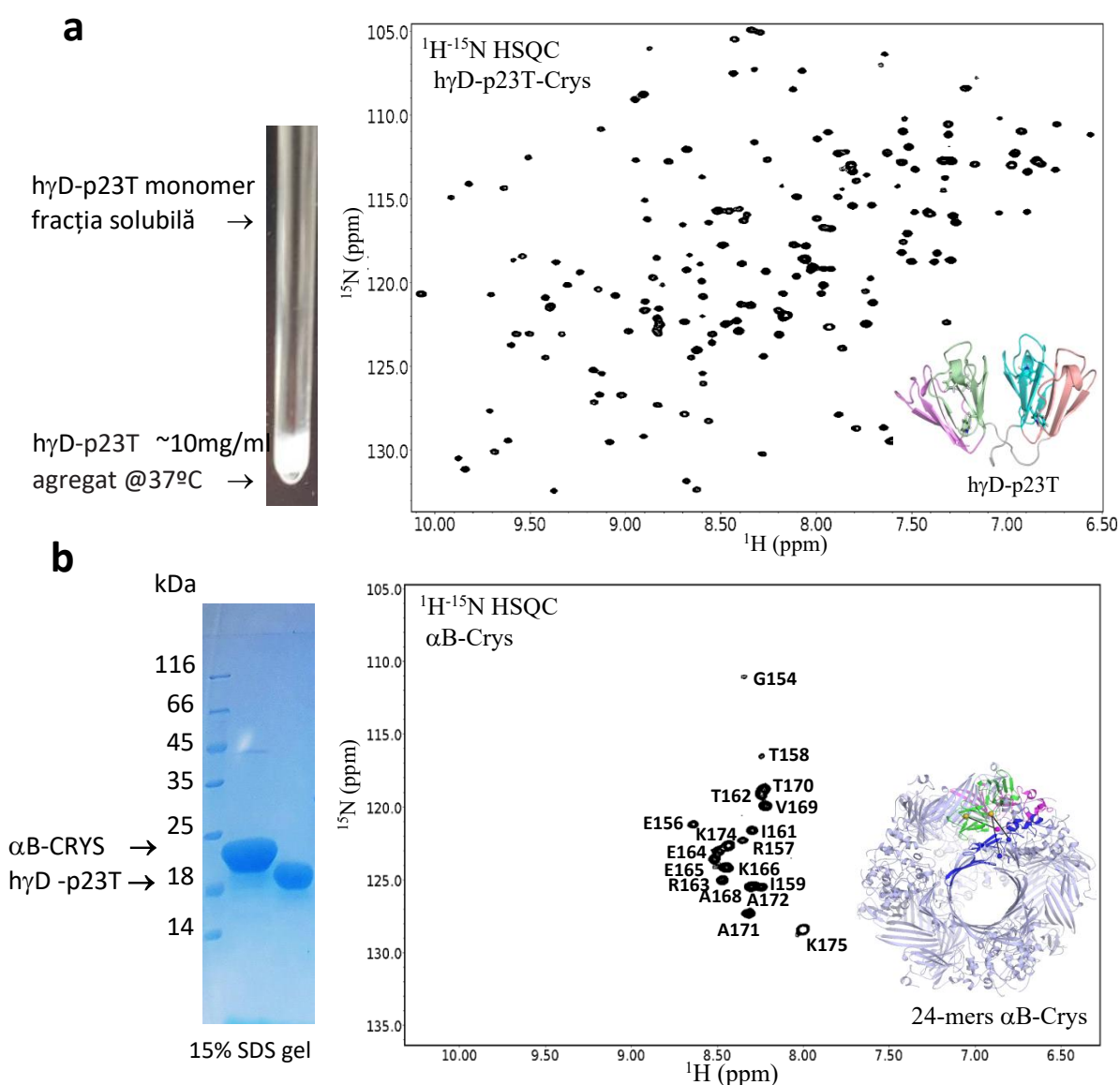


Figura 2. Spectrele ¹H-¹⁵N HSQC (298 K) ale proteinelor marcate izotopic: a) hγD-p23T, b) αB-Crys

Pentru studierea complexului hγD-Crys/hγD-p23T:αB-Crys, am efectuat experimente de interacțiune RMN în soluție, comparând perturbațiile deplasărilor chimice ale semnalelor de rezonanță NH în spectrele ¹H-¹⁵N-HSQC, corespunzătoare proteinelor ¹⁵N-hγD-Crys, și ¹⁵N-hγD-p23T (~50μM), în prezența αB-Crys (nemarcată izotopic), aflate în soluție tampon conținând 50 mM fosfat de sodiu

(pH=7), 90% H₂O/10% D₂O. Analiza modificărilor spectrale HSQC nu indică o perturbare vizibilă a deplasărilor chimice, observându-se doar o reducere a intensității semnalelor NH, ca urmare a efectului lărgirii liniilor de rezonanță, ceea ce indică o interacțiune nespecifică între h γ D-Crys, respectiv h γ D-p23T, cu proteina chaperonă α B-Crys (**Figura 3**). Studiul comparativ prin suprapunerea spectrelor ¹H-¹⁵N HSQC ale ¹⁵N-h γ D-Crys (**Figura 3a**), și ¹⁵N-h γ D-p23T (**Figura 3b**) în absența (semnale de rezonanță reprezentate în negru), respectiv prezența α B-Crys nemarcată izotopic (semnale de rezonanță reprezentate în roz), este un indicator al regimului de schimb chimic, și al calității complexului. Prin urmare, fracția solubilă (monomerică) a mutantului h γ D-p23T interacționează nespecific cu proteina chaperonă α B-Crys, de o manieră asemănătoare proteinei h γ D-Crys nativă, sugerând doar o interacțiune tranzitorie de verificare a integrității structurale. Totuși, această interacțiune nespecifică nu este suficientă pentru a preveni procesul de agregare al mutantului h γ D-p23T, în condiții fiziologice.

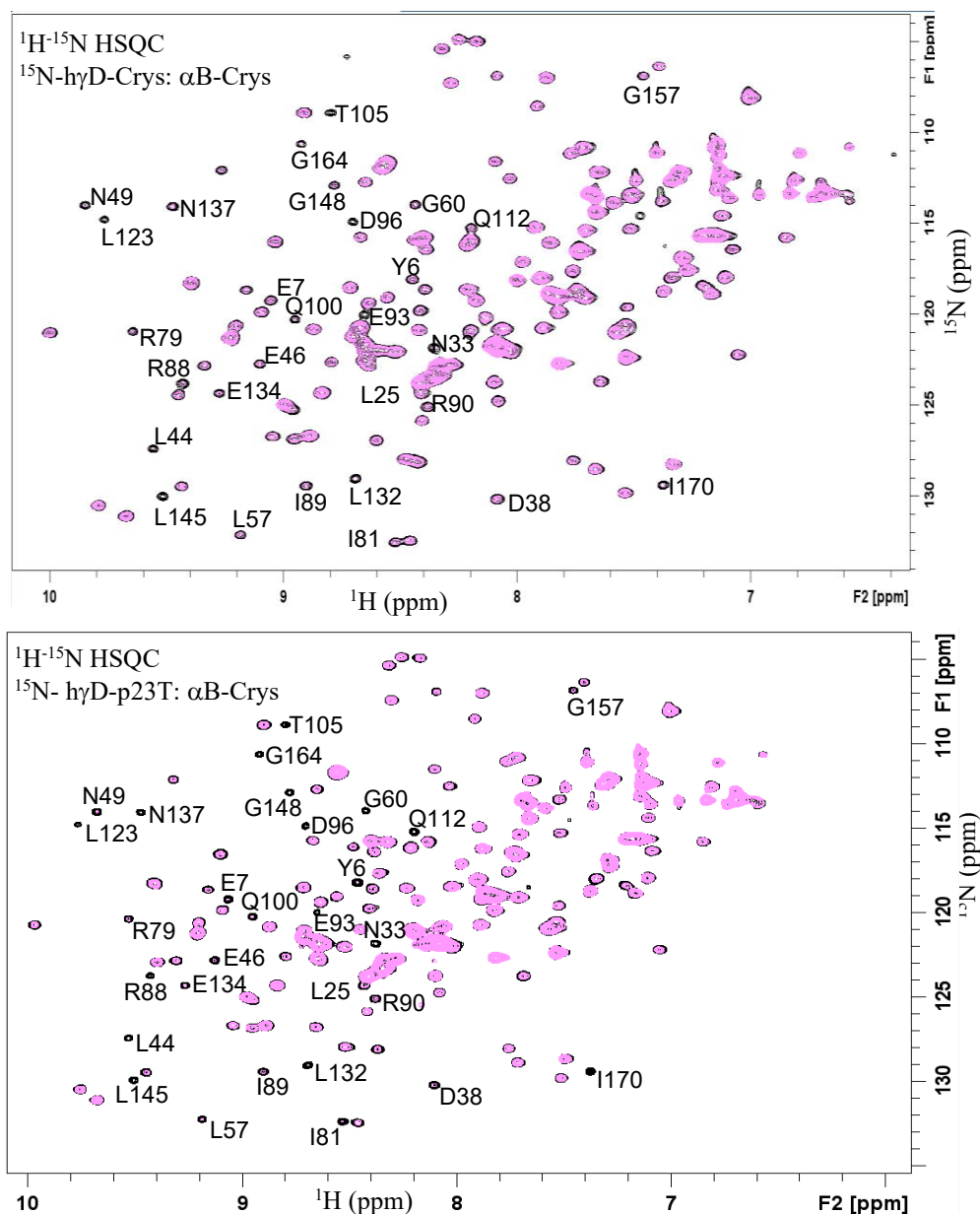


Figura 3. Spectrele ¹H-¹⁵N HSQC (281 K) ale h γ D-Crys și h γ D-p23T marcate izotopic cu ¹⁵N, în absența (negru), respectiv în prezența α B-Crys nemarcată izotopic (roz): a) h γ D-Crys, b) h γ D-p23T; Semnalele de rezonanță afectate (lărgite), corespunzătoare h γ D-Crys, și h γ D-p23T în complex cu α B-Crys, sunt marcate.

O.2 Screeningul *in silico* al inhibitorilor împotriva agregării mutantului h γ Dp23T-Cristalin

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 mutante Pro23Thr h γ D-Cristalin care cauzează cataracta congenitală.

Pentru îndeplinirea acestui obiectiv au fost realizate următoarele activități:

A. 2.1-Screeningul inhibitorilor *in silico* folosind compușii 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. 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. Pe lângă studiul inițial al 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 9**).

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

A. 2.2 Docking molecular al proteinei γ D-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 γ D-cristalin, cea nativă γ D-crys și cea mutantă 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.

Astfel, structura moleculară tridimensională a lanosterolului a fost optimizată la nivel *ab initio* folosind software-ul Gaussian 09 cu funcționala hibridă meta-GGA M06-2X și setul de bază 6-311++G(d,p). În urma calculului 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 4**.

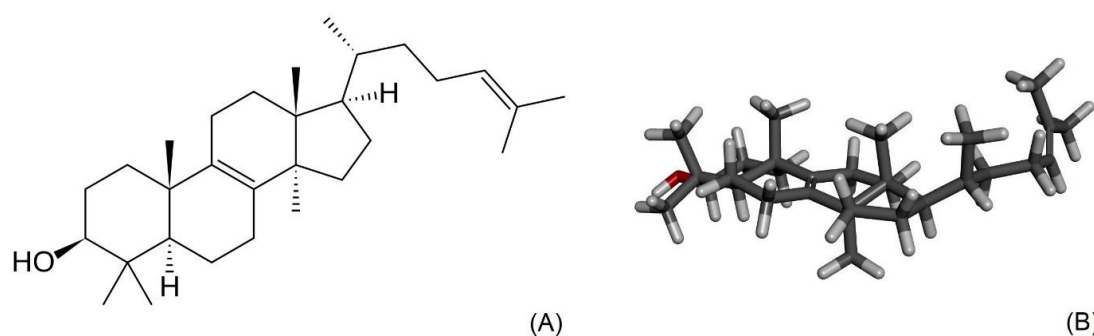


Figura 4. Structura Lanosterolului. (A) Lanosterolul, $C_{30}H_{50}O$, greutate moleculară 426.7 g/mol (B) Structura moleculară optimizată a lanosterolului folosind programul Gaussian 09.

În cadrul studiului *in silico* de andocare moleculară am folosit metoda Monte-Carlo implementată în software-ul Autodock v4.2. 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. 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 γ D-cristalin au fost menținute rigide. Utilitarul AutoGrid a fost folosit pentru a precalcula hărțile energiilor de interacțiune ale diferitelor tipuri de atomi înainte de rularea efectivă a procedurii de andocare. Am stabilit dimensiunea maximă a grilei de $126 \times 126 \times 126$ puncte cu o distanță între punctele grilei 0.475 Å. Proteinele de γ D-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. Pentru a obține o statistică și o distribuire 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.

Prezentăm în continuare rezultatele obținute ca urmare a simulărilor de andocare moleculară dintre lanosterol și proteina nativă γ D-crys, și mutantul γ D-p23T. Astfel, în **Figura 5** sunt prezentate conformațiile având energia de legare maximă (cea mai favorabilă) a complexului dintre lanosterol și proteina nativă γ D-crys, și respectiv mutantul γ D-p23T. Energiile de legare ale acestor conformații sunt: -9,16 kcal/mol pentru complexul cu proteina nativă γ D-crys și -8.94 kcal/mol pentru complexul

cu varianta mutantă hyD-p23T. Observăm deci că legarea lanosterolului la proteina mutantă hyD-p23T este mai defavorabilă, cu ~ 0.22 kcal/mol, față de cea obținută pentru proteina nativă hyD-crys.

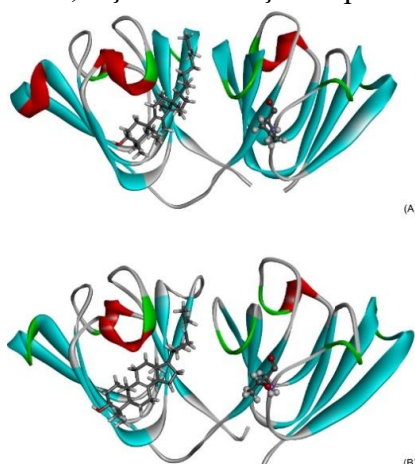


Figura 5. Conformațiile cu energia de legare maximă obținute în urma simulărilor de andocare moleculară a lanosterolului la (A) proteina nativă hyD-crys și (B) varianta mutantă hyD-p23T. În imagini am evidențiat și aminoacizii din poziția 23.

În **Figura 6** sunt reprezentate histogramele distribuțiilor de energie de legare ale tuturor clusterelor identificate în timpul analizei de andocare.

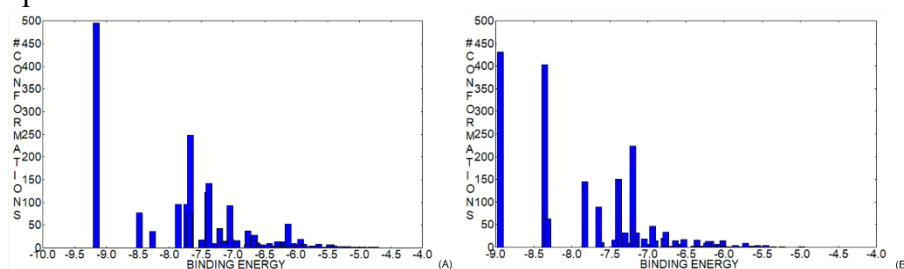


Figura 6. Histogramele distribuției energiei de legare la hyD-cristalin ai clusterilor conformaționali ai lanosterolului. (A) pentru proteina nativă hyD-crys și (B) varianta mutantă, hyD-p23T.

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 hyD-cristalin, în **Figura 6** 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 hyD-crys față de 431 pentru mutantul hyD-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 7 și 8** prezentăm o analiză în detaliu a interacțiunilor intermoleculare care intervin în interiorul situsului de legare.

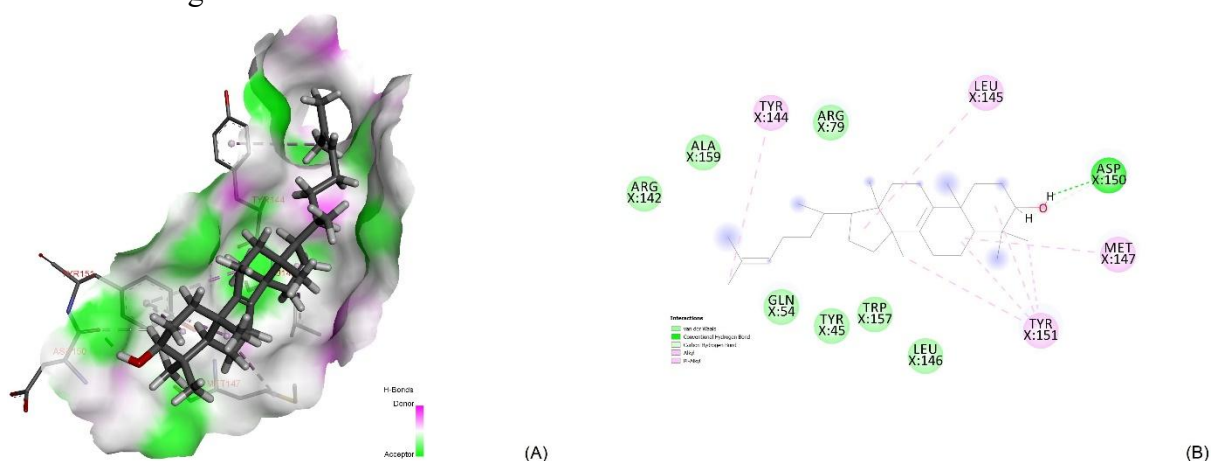


Figura 7. Interacțiunile de proximitate în interiorul situs-ului de legare (A) și hărțile bidimensionale corespunzătoare (B) dintre lanosterol și proteina nativă hγD-crys.

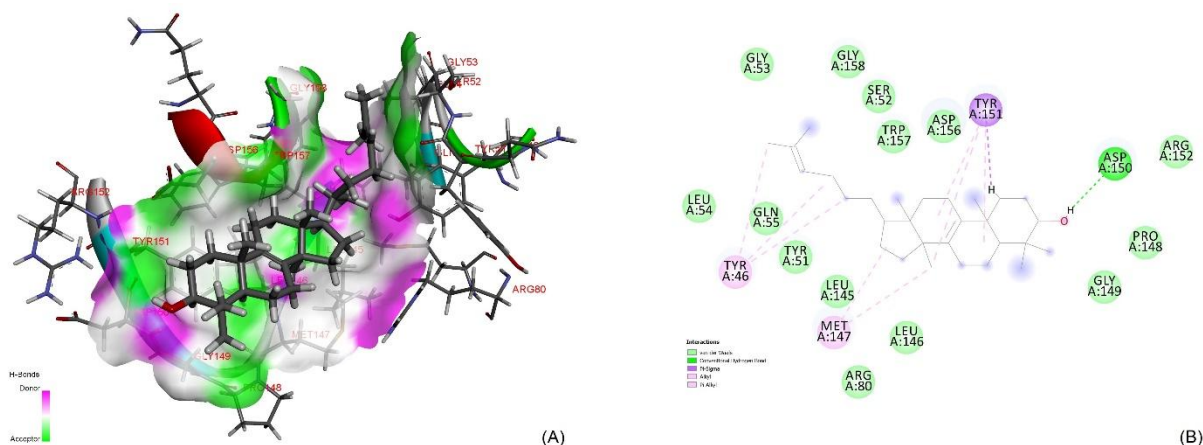


Figura 8. Interacțiunile de proximitate în interiorul situs-ului de legare (A) și hărțile bidimensionale corespunzătoare (B) dintre lanosterol și varianta mutantă hγD-p23T hγD-cristalin.

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 γD-cristalinului aleși după un studiu de literatură și un screening din baza de date *ZINC*. Prezentăm acești compuși studiați în **Tabelul 1** și **Figura 9**.

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 hγD-crys și cu proteina mutantă hγD-p23T. 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 hγD-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.

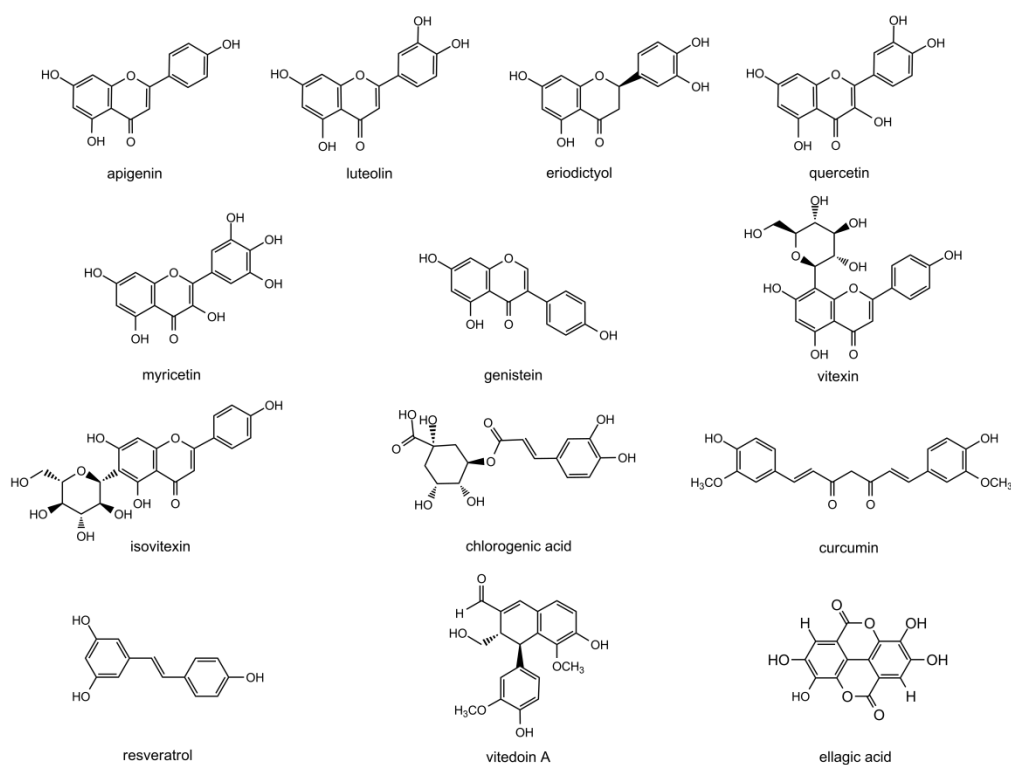


Figura 9. Structurile chimice ale compușilor naturali analizați ca potențiali inhibitori ai cataractei.

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

Compound	Lowest Binding Energy	Mean Binding Energy	Number in Cluster	nativ h γ D-crys - 1HK0			mutant h γ D-P23T - 2KFB		
				Lowest Binding Energy	Mean Binding Energy	Number in Cluster	Lowest Binding Energy	Mean Binding Energy	Number in Cluster
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			

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 γ D-crys sunt în general mai mari decât cele pentru mutantul h γ D-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 γ D-crys. Acest lucru este oarecum opus față de ceea ce ne așteptam inițial să punem în evidență, similar în cazul andocării moleculei de lanosterol. 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 h γ D-crys. De asemenea, cu excepția genistein și a vitexinului, toate flavonoidele sunt andocate în același buzunar aparținând domeniului C-terminal, când interacționează cu proteina mutantă h γ D-p23T.

Acest rezultat comparativ sugerează că aceste buzunare ale γ D –cristalinului pot găzdui, cu afinități diferite, molecule de diferite dimensiuni. Dacă, dintre flavonoide, pentru proteina nativă h γ D-crys, genistein are cea mai mare afinitate cu o energie de legare de -8,9 kcal/mol, pentru proteina mutantă h γ D-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.

Comparând energiile de legare cu proteina mutantă h γ D-p23T pentru toate moleculele investigate, observăm că resveratrolul, așa cum rezultă din calcule, este molecula cea mai scăzută afinitate pentru mutantul h γ D-p23T. În general, buzunarele de legare preferate pentru proteina nativă h γ D-crys și mutantul h γ D-p23T din **Figura 10**, 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 γ D-crys și mai stabilă decât vitexina atunci când este andocată la mutantul h γ D-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. Conformerul de curcumină se află, de asemenea, între cele mai bine legate molecule la mutantul h γ D-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. 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 γ D-crys și aproape de valorile obținute pentru resveratrol, atunci când este andocată la mutantul h γ D-p23T. Acidul elagic, pe de altă parte, este molecula lider atunci când este andocat la mutantul h γ D-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 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, 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 γ D-cristalin, și care a fost studiat din punct de vedere experimental în numeroase studii, după cum am menționat anterior.

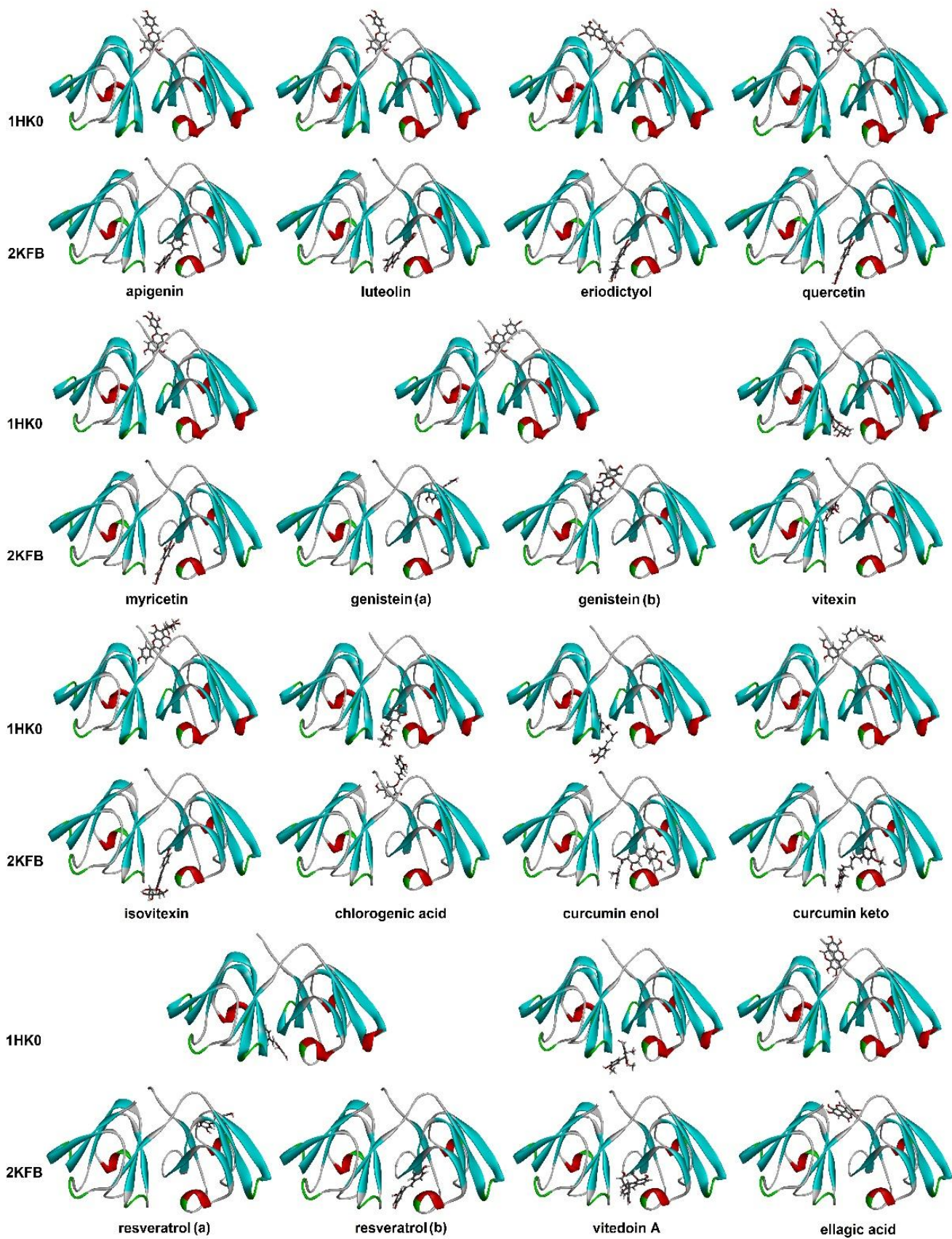


Figura 10. Structurile chimice ale compușilor naturali analizați ca potențiali inhibitori ai cataractei.

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

În această etapă a simulărilor de dinamică moleculară am demarat calcularea traiectoriilor de dinamică moleculară ale proteinelor, varianta nativă hγD-crys și cea mutantă hγD-p23T, în stare liberă, respectiv în prezența potențialilor inhibitori. Inițial 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 (**Figura 11**). Astfel ambele proteine hγD-cristalin, varianta nativă hγD-crys și cea mutantă hγD-p23T, sunt neutre din punct de vedere electric în ciuda prezenței în structura lor a aminoaciziilor încărcăți negativ (glutamatul și aspartatul) și pozitiv (arginina și lizina). Masa moleculară a componentelor este necesară pentru estimarea dimensiunilor și a volumului inițial al celulelor de simulare. Masa moleculară a proteinei native hγD-crys este 20.537 kDa, a mutantului hγD-p23T este 20.593 kDa, a lanosterolului este 426.71 g/mol, iar a apei 18.01528 g/mol.

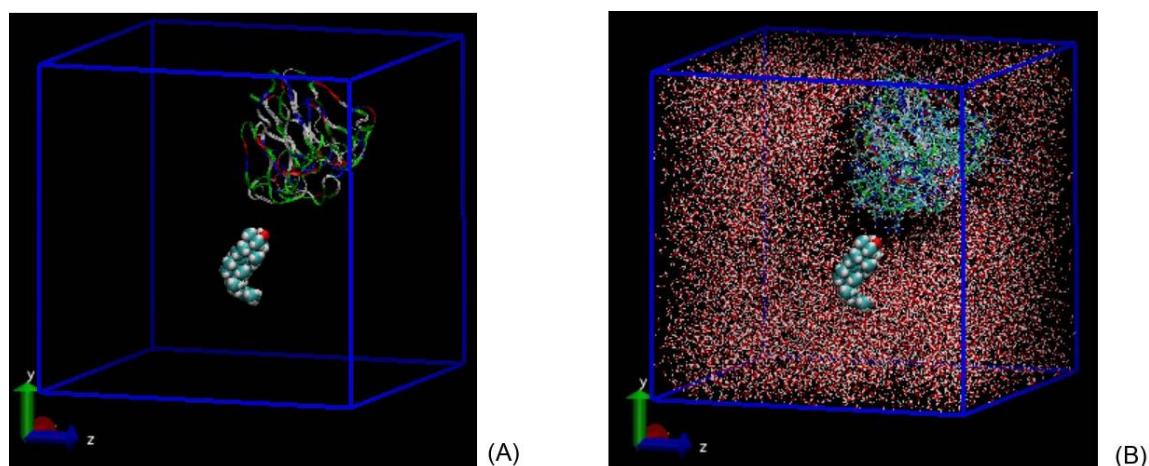


Figura 11. (A) Cutia de simulare inițială pentru simulările de dinamică moleculară conținând o proteină hγD-cristalin mutantă P23T și o moleculă de lanosterol. (B) Aceeași cutie de simulare în care am reprezentat și moleculele de solvent, modelul de apă SPC în acest caz.

În **Figura 11** reprezentăm structura inițială pentru sistemul conținând mutantul hγD-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.

Deviația conformatională medie (RMSD) corespunzătoare atomilor de carbon C α 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) sunt prezentate în **Figura 12**.

Remarcăm faptul că după aproximativ 10 ns mutantul hγD-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 conformationale RMSF corespunzător fiecărui amino acid din lanțul polipeptidic este prezentat în Figura 12B pentru hγD-p23T în stare liberă (negru), respectiv hγD-p23T în complex cu lanosterolul (magenta).

Valorile deviațiilor reprezentate în Figura 12B 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 când proteina se află în stare liberă, decât 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.

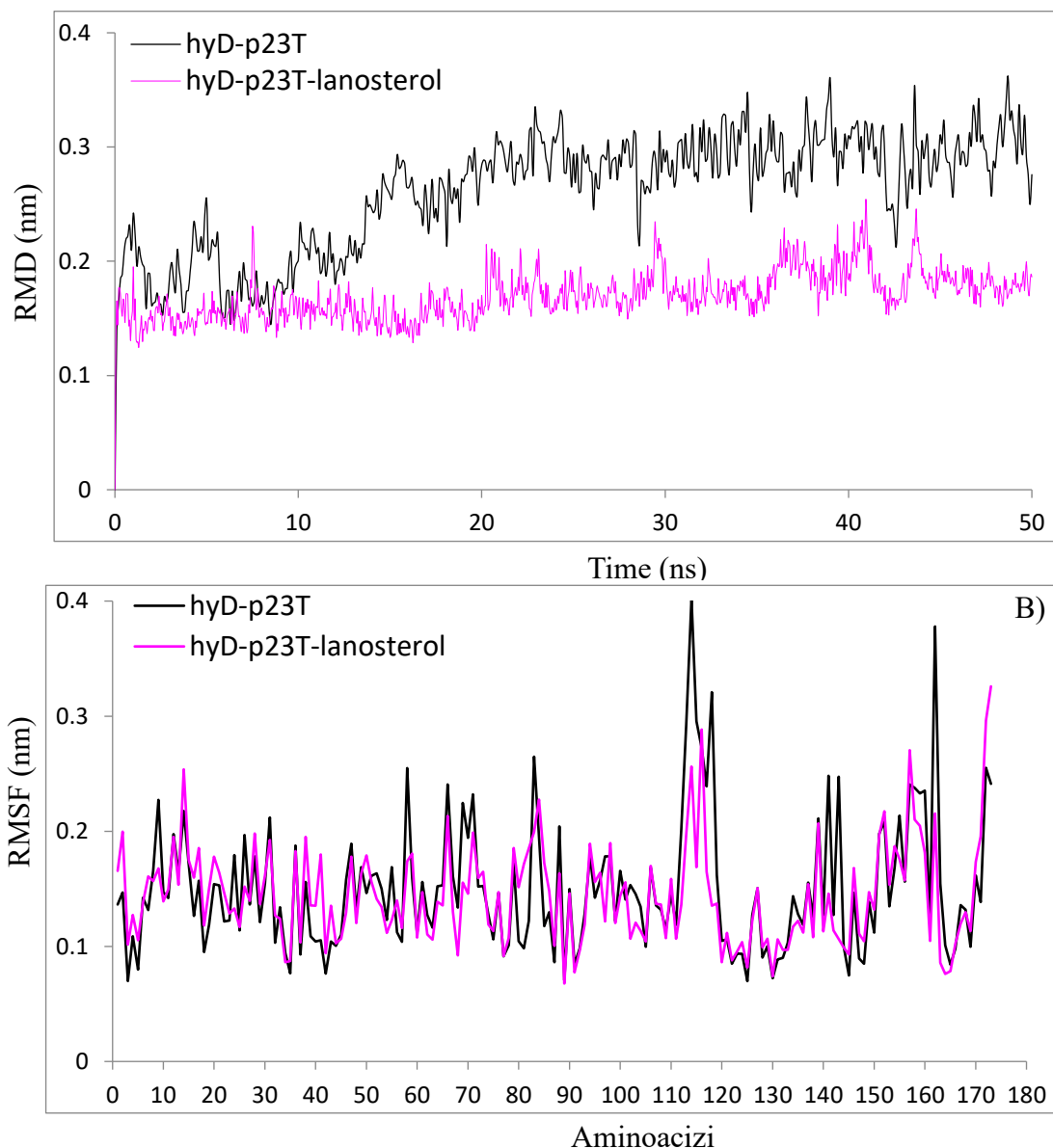


Figura 12 A) Deviația conformatională medie (RMSD) corespunzătoare atomilor de carbon C α din lanțul polipeptidic principal monitorizată în timpul simulării (50 ns) pentru mutantul h γ D-p23T în stare liberă (negru), respectiv h γ D-p23T în complex cu lanosterolul (magenta). B) Deviația corespunzătoare fiecărui amino acid (RMSF) monitorizată în timpul simulării (50 ns) pentru h γ D-p23T în stare liberă (negru), respectiv h γ D-p23T în complex cu lanosterolul (magenta).

O.1 Caracterizarea interacțiunii h γ D-p23T: α B-Cristalin (partea 2)

A.2.4 - Măsurători de relaxare RMN ale complexului h γ Dp23T: α B-Cristalin

Pentru studiul dinamicii macromoleculare am efectuat respectiv măsurători de relaxare RMN transversală $^{15}\text{N-T}_2$, care să probeze formarea complexului h γ D-p23T: α B-Crys. 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. Mecanismele 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 h γ D-p23T: α B-Crys am efectuat măsurători de relaxare,

comparând timpii de relaxare $^{15}\text{N-T}_2$ ale semnalelor de rezonanță NH în spectrele $^1\text{H-}^{15}\text{N-HSQC}$, corespunzătoare proteinei marcată izotopic cu ^{15}N , $^{15}\text{N-hyD-p23T}$ în stare liberă, respectiv în prezența chaperonei $\alpha\text{B-Crys}$ (nemarcată izotopic), aflate în soluție tampon 50 mM fosfat de sodiu (pH=7). Măsurătorile timpilor de relaxare $^{15}\text{N-T}_2$ au fost efectuate cu un spectrometru Bruker Advance III, folosind secvența de pulsuri CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) reprezentată în **Figura 13**.

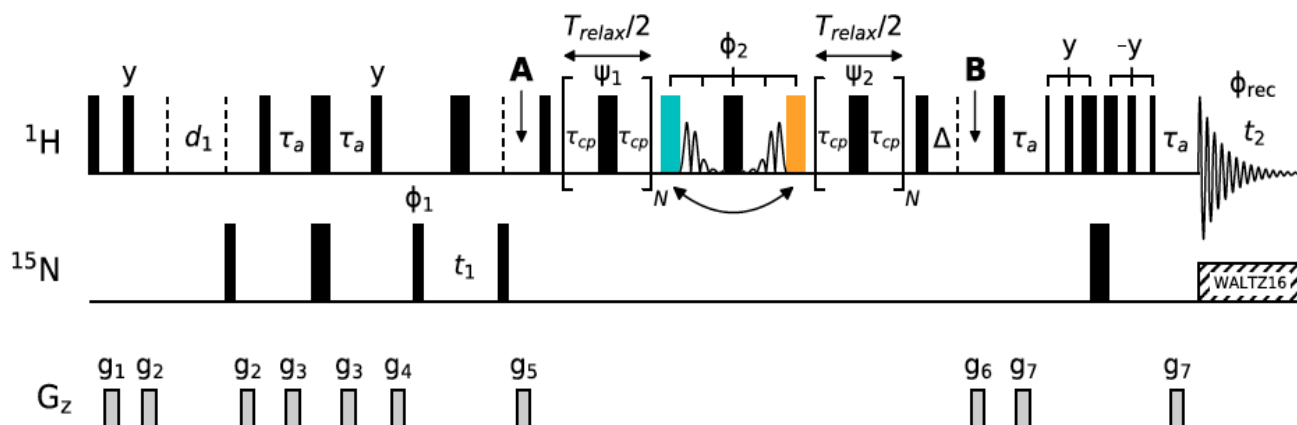


Figura 13 Secvența de pulsuri CPMG-HSQC, într-un câmp neomogen (gradient, G). Barele înguste descriu pulsurile de 90° , respectiv cele largite descriu pulsurile de 180° .

Un impuls de radiofrecvență de 90° înclină magnetizarea în plan transversal (x,y). Pierderea coerenței de fază în plan transversal reprezintă de fapt relaxarea transversală T_2 . Magnetizarea este reorientată printr-o serie de impulsuri ($\tau-180^\circ-\tau$), aplicate la intervale 2τ unul de celălalt, iar între aceste impulsuri este înregistrată amplitudinea ecourilor rezultate.

Astfel, o serie de măsurători $^{15}\text{N-T}_2$ 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 $hyD-p23T$ în stare liberă, respectiv 2ms, 8ms, 13ms, 22ms, 60 ms, și 110 ms pentru complexul $hyD-p23T:\alpha\text{B-Crys}$. Valorile timpilor de relaxare $^{15}\text{N-T}_2$ s-au obținut prin fitarea datelor experimentale folosind o ecuație exponențială care descrie descreșterea amplitudinii semnalelor de rezonanță în funcție de timpul τ .

Din măsurătorile de relaxare RMN am extras atât valorile timpilor de relaxare $^{15}\text{N-T}_2$ pentru fiecare aminoacid corespunzător secvenței proteinei, precum și informații de dinamică macromoleculară pe care $hyD-p23T$ le experimentează în prezența chaperonei $\alpha\text{B-Crys}$, în ansamblu. Valoarea medie a timpului de relaxare $^{15}\text{N-T}_2$ obținută pentru complexul $hyD-p23T:\alpha\text{B-Crys}$ am interpretat-o comparativ cu proteina $hyD-p23T$ 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 $hyD-p23T:\alpha\text{B-Crys}$ (**Figura 14**). Diferența de ~ 20 ms între valorile timpilor de relaxare $^{15}\text{N-T}_2$ indică o restricționare a dinamicii macromoleculare a mutantului $hyD-p23T$ în prezența chaperonei $\alpha\text{B-Crys}$ per ansamblu, ca urmare a formării complexului macromolecular. Din datele măsurătorilor de relaxare reiese faptul că fracția solubilă (monomerică) a mutantului $hyD-p23T$ interacționează nespecific cu proteina chaperonă $\alpha\text{B-Crys}$, într-o manieră tranzitorie de verificare a integrității structurale.

În cazul complexului $hyD-p23T:\alpha\text{B-Crys}$ 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 $hyD-p23T$ (~ 60 ms), indicând faptul că $\alpha\text{B-Crys}$ interacționează în mod preferențial cu acest domeniu. Această observație se corelează cu observațiile experimentale de denaturare induse *in 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 $\alpha\text{B-Crys}$.

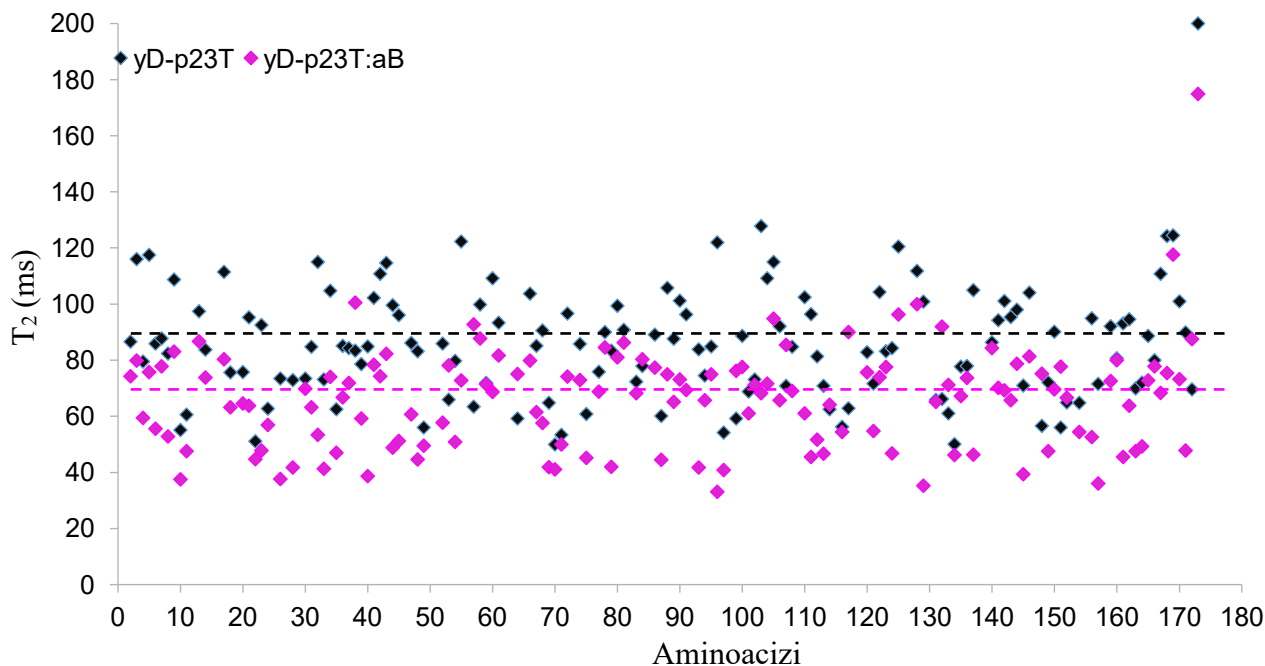


Figura 14. Valorile timpilor de relaxare $^{15}\text{N-T}_2$ corespunzătoare secvenței de aminoacizi a mutantului $\gamma\text{D-p23T}$ în stare liberă (reprezentate în neagră), respectiv $\gamma\text{D-p23T}:\alpha\text{B-Crys}$ complex (magenta).

Acesta este un prim studiu RMN care evidențiază rolul protector al proteinei chaperonă $\alpha\text{B-Crys}$, 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 $\text{h}\gamma\text{D-p23T}$, în condiții fiziologice. În aparență procesul de autoasociere al mutantului $\text{h}\gamma\text{D-p23T}$ este unul pronunțat în care proteina își păstrează structura tridimensională nealterată, astfel încât reușește să „evadeze” de sub supravegherea proteinei chaperonă $\alpha\text{B-Crys}$, cauzând cataracta.

O.3 Teste de suprimare ale agregării proteinei $\text{h}\gamma\text{Dp23T-Cristalin}$

Testele de suprimare ale agregării proteinei $\text{h}\gamma\text{Dp23T-Cristalin}$ *in vitro* a fost efectuată utilizând măsurători de turbiditate (OD 350 nm), studii RMN de interacțiune proteină-ligand în soluție, și ITC.

Pentru îndeplinirea acestui obiectiv au fost realizate următoarele activități:

A. 3.1 - Testare analitică a turbidității proteinei $\text{h}\gamma\text{Dp23T-Cristalin}$

Efectul vitaminei C împotriva la agregării a $240 \mu\text{M}$ $\text{h}\gamma\text{D-P23T}$ a fost evaluat prin monitorizarea densității optice la 350 nm a soluției proteice incubate la 37°C , în absența, respectiv prezența vitaminei C. Evoluția curbei de agregare a $\text{h}\gamma\text{D-P23T}$ în prezența vitaminei C (2 mM, 5 mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM și 20 mM), comparativ cu proba control (linia punctată neagră), este reprezentată în **Figura 15**. Pe durata incubării s-a observat o ușoară creștere a valorilor de turbidității a soluției proteice $\text{h}\gamma\text{D-P23T}$ de la 1,05 la 1,45, în absența vitaminei C.

Nu a fost observat niciun efect semnificativ asupra reducerii turbidității pentru proteina $\text{h}\gamma\text{D-P23T}$ incubată cu 2 mM vitamina C. Cu toate acestea, la concentrații mai mari de vitamina C (5-8 mM) se observă o scădere rapidă și semnificativă a turbidității în primul minut, cu un timp de recuperare de ~50 min. Soluția de proteică $\text{h}\gamma\text{D-P23T}$ în prezența a 15 mM de vitamina C devine complet limpede, absorbanta scăzând la cea a probei control (soluția tampon 100 mM fosfat de sodiu, 5 mM DTT).

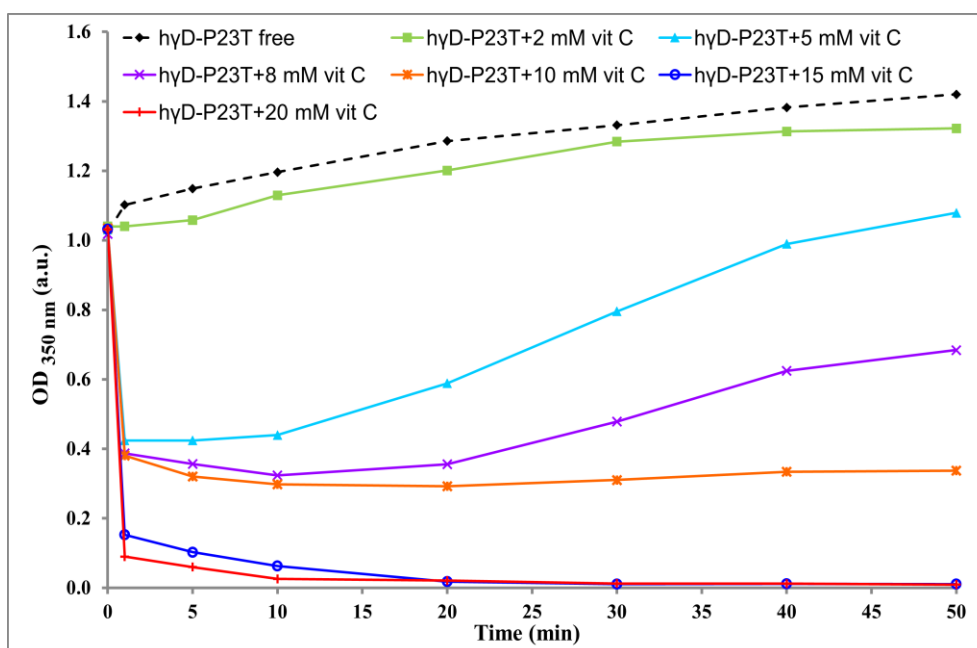


Figura 15. Evoluția curbei de agregare (absorbanta UV la 350 nm) a proteinei a 240 μM h γ D-P23T (240 μM) incubată la 37°C pe o perioadă de 50 de minute, în absență (linie punctată neagră) și prezență de vitamina C (2 mM, 5 mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM și 20 mM). Proba de referință reprezintă proteina h γ D-P23T fără vitamina C, incubată la 37°C (linie neagră punctată). În absența vitaminei C, se atinge o stare de echilibru datorită formării de agregate care împrăștie lumina, acestea începând să se dizolve în prezența vitaminei C, indicând solubilizarea proteinei agregată anterior.

Prin urmare, testele de turbiditate *in vitro* dovedesc faptul că vitamina C este capabilă nu numai să prevină agregarea h γ D-P23T, ci și să dizolve agregarea proteinei mutante, așa cum reiese din evoluția curbei de agregare în timp.

A. 3.2 - Studiul interacțiunii proteină-inhibitor (h γ Dp23T-cristalin:inhibitor) prin RMN

Pentru a obține informații despre modul posibil de interacțiune dintre vitamina C și agregatele amorfe h γ D-P23T, am folosit RMN în soluție. Efectul anti-agregare a fost investigat prin monitorizarea modificărilor deplasărilor chimice în spectrul HSQC ^1H - ^{15}N al h γ D-P23T marcat uniform cu izotopul ^{15}N , în absența și prezența vitaminei C. Proteina a fost concentrată până la punctul de separării de fază (~250 μM), în condiții native (pH 7.0). Spectrele RMN ale h γ D-P23T marcate cu ^{15}N , în soluție tampon 100 mM fosfat de sodiu, 5 mM DTT, NaN3 0,02%, D2O 10%, au fost înregistrate la 298 K.

În comparație cu proteina nativă h γ D-Crys, care este o proteină monomerică și extrem de solubilă (până la ~300 mg/ml), h γ D-p23T agregă la o concentrație de peste 4 mg/ml (~200 μM) la temperatura camerei, cu partea solubilă prezentând un spectru RMN bine dispersat, similar cu o proteină monomerică (contururi negre) (**Figura 16A**). Partea insolubilă a fost separată prin centrifugare (~15.000xg), apoi resuspendată în soluție tampon RMN suplimentat cu o cantitate crescândă de vitamina C, până la punctul în care agregatele h γ D-p23T s-au dizolvat complet. Semnalul RMN al agregatelor amorfe h γ D-P23T se recuperează treptat, pe măsură ce agregatul s-a dizolvat, soluția proteică devenind complet limpede în prezența a 15 mM vitamina C. O suprapunere a spectrelor pentru h γ D-P23T monomeric (contururi negre). și h γ D-P23T anterior agregat, dizolvat în prezența a 15 mM de vitamina C (contururi cyan), este prezentată în **Figura 16A**.

mici perturbații de deplasare chimică pentru reziduurile Y6, R9, G10, R14, E17 și S122, L126, E127, G128, și N-εH amid al inelului aromatic W130.

O reprezentare a structurii 3D a proteinei hγD-P23T indicând aminoacizii care suferă perturbări de deplasare chimică în prezența a 15 mM vitamina C este furnizată în **Figura 16B**. Locația mutației Thr23 este marcată cu o sferă albastră. Poziția reziduurilor ale căror rezonanțe amidice prezintă $\Delta\delta > 0,2$ ppm, $0,2 \text{ ppm} > \Delta\delta > 0,1$ ppm și $0,1 \text{ ppm} > \Delta\delta > 0,05$ ppm sunt prezentate cu magenta, albastru și, respectiv, cyan. Diferențele de deplasare chimică au fost calculate din: $\Delta\delta = [(\Delta\delta\text{H})^2 + (\Delta\delta\text{N} \times 0,15)^2]^{1/2}$, unde $\Delta\delta\text{H}$ și $\Delta\delta\text{N}$ sunt modificările de deplasare chimică observate pentru ^1H , respectiv ^{15}N .

Aparent, în cazul agregatelor proteice amorfe, interacțiunea cu vitaminei C are loc prin intermediul situsurilor multiple, nu doar printr-un singur punct de contact, perturbând astfel interacțiunile de tip suprafață-suprafață, reușind astfel să prevină agregarea.

Examinarea structurii cristaline hγD-P23T (PDB: 4JGF)⁴² indică faptul că Thr23 este poziționat la interfața dintre cele două molecule din unitatea asimetrică, sugerând o bază moleculară pentru o modificare a interacțiunilor proteină-proteină în regiunea poziției mutante Thr23. O analiză suplimentară a structurii hγD-P23T (PDB: 4JGF) indică prezența legăturilor de hidrogen, cum ar fi lanțul lateral Arg88 și carboxilul principal al Leu71, lanțul lateral Arg167 și lanțul lateral Glu93 și gruparea NH al His15 și lanțul lateral Gln12, al moleculelor simetrice din punct de vedere cristalografic. Prin urmare, o interacțiune ligand-proteină cu acei aminoacizi implicați în orice contact intermolecular poate perturba rețeaua de legături de hidrogen din jur.

Aceste date RMN de înaltă rezoluție conferă detaliu la nivel atomic, dovedind că vitamina C poate interacționa cu agregatele amorfe hγD-P23T restabilind forma solubilă monomerică, cel mai probabil printr-o interacțiune cu secvența aminoacizilor flexibilă aparținând C-terminal terminală, și cu alte bucle flexibile expuse la suprafață, incluzând aminoacizii din jurul poziției mutante P23T. Prin urmare, este posibil ca situsurile predispuse la agregare să fie protejate de la auto-asamblare prin interacțiunea cu vitamina C.

A.3.3 - Studiul interacțiunii inhibitor-proteină (inhibitor:hγDp23T-Cristalin) prin ITC

Calorimetria Izoterma de Titrare (ITC) este o tehnică experimentală deosebit de adecvată evidențierii și caracterizării cantitative a proceselor de complexare moleculară.

Pentru a pune în evidență interacțiunea diferiților liganzi cu proteina hγD-P23T am efectuat o serie de experimente ITC în care am baleat atât concentrația ligandului cât și a proteinei, precum și temperatura. În urma măsurătorilor efectuate am ales datele cele mai elocvente prin care am reușit să punem în evidență interacțiunea ligandului cu proteina hγD-P23T.

Pentru a înțelege mecanismul de legare a vitaminei C și proteina hγD-P23T au fost efectuate experimente de ITC utilizând calorimetrul Nano ITC^{2G} (TA Instruments, New Castle, Delaware, SUA).

Soluțiile preparate în soluție tampon (25 mM fosfat de sodiu au fost degazate complet înainte de utilizare. Celula probă a fost încărcată cu hγD-P23T în soluție (25 μM). Înainte de injecția de titrare se aplică la celula referință o putere constantă (<1 mW). Acest semnal direcționează circuitul feedback spre activarea căldurii localizată pe celula probă. Acesta reprezintă semnalul de baza. Prin intermediul unei seringi Hamilton 250 μL controlate de calculator au fost injectate serii de 25 de injecții de vitamina C (25 mM) a câte 10 μL în celula probă (1 mL). Intervalul dintre injecții a fost de 500s respectiv 300 s, timp suficient de lung pentru ca semnalul să revină la linia de baza și pentru ca echilibrul sistemului să fie menținut. Omogenizarea rapidă și completă a amestecurilor vitamina C: hγD-P23T în celula de probă a fost asigurată prin agitare cu o viteză de 250 rpm. Prin măsurarea variației entalpiei la fiecare injecție, au fost obținute datele brute, constând din 25 peak-uri, reprezentate grafic ca variația fluxului termic (kJ s^{-1}) în

funcție de timp (min). Prin integrarea peak-urilor obținute și folosind software-ul NanoAnalyze (TA Instruments, New Castle, DE, USA) se obține un grafic al variației de entalpie per mol de injectant (kJ mol^{-1}) în funcție de raportul molar al amestecului. Căldura de diluție a fost măsurată în condiții experimentale identice, prin injectarea soluției de ligand în același buffer în care au fost preparate componentele de interacție. **Figura 17** prezintă termograma ITC la $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, care ilustrează răspunsul calorimetric dat de interacția vitamina C: h γ D-P23T.

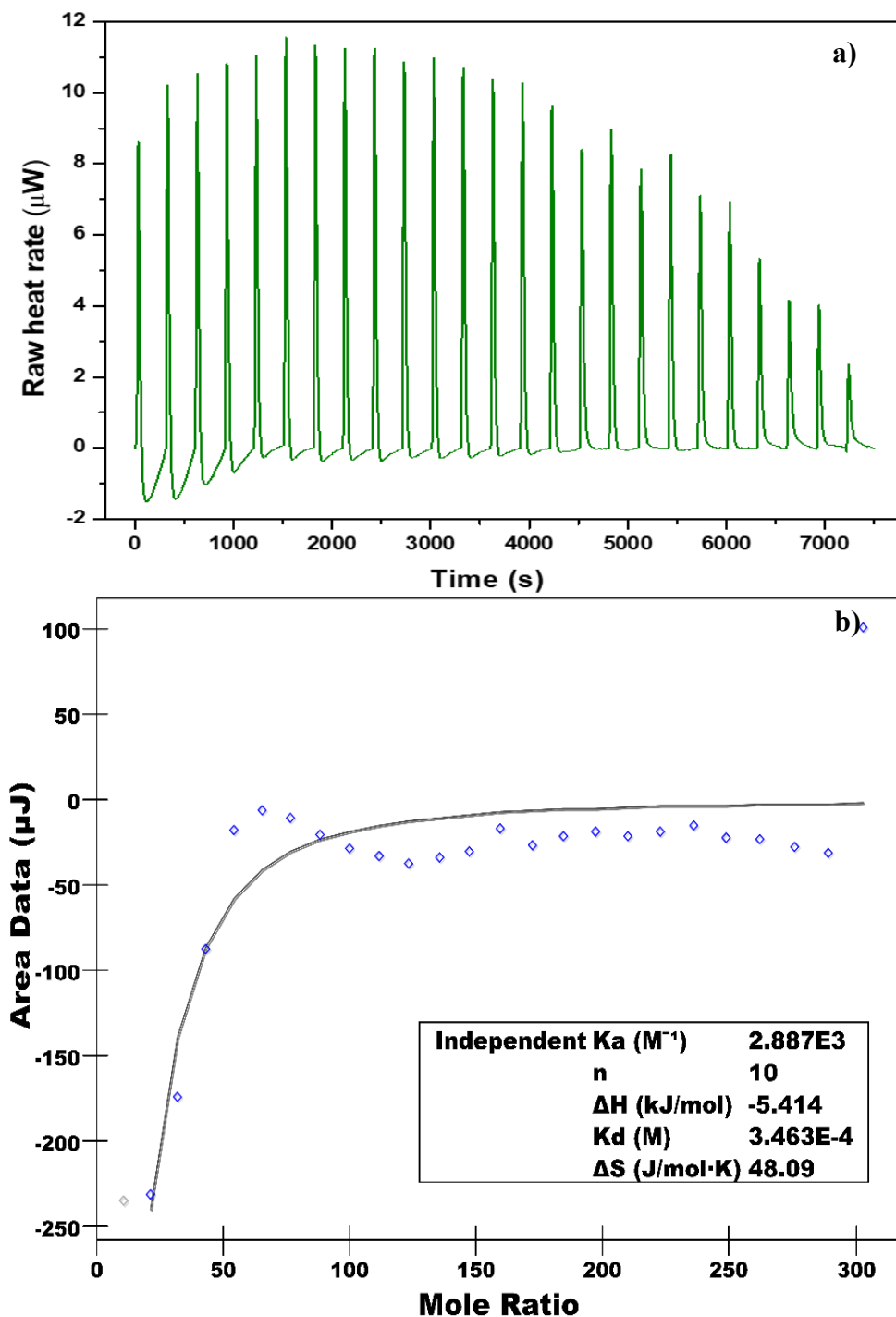


Figura 17. Variația fluxului de căldură în funcție de timp, titrant: vitamina C; titrand: h γ D-P23T. (a) Căldura eliberată prin injectarea vitaminei C în celula de reacție, care conține soluție de h γ D-P23T. Volumul de injecție a fost $10\text{ }\mu\text{L}$ iar căldura de diluție a fost scăzută. (b) Dependența căldurii eliberate pe injecție în funcție de raportul molar al partenerilor de reacție. Linia solidă este obținută prin fitarea datelor experimentale.

Căldura eliberată prin titrarea vitaminei C în soluția de hγD-P23T indică faptul că cele două componente interacționează. Procesul de asociere este direct proporțional cu cantitatea de vitamina C adăugată, iar semnalul este diminuat progresiv o dată cu saturarea site-urilor proteinei vitamina C: hγD-P23T (Figura 17a). În termograma obținută în urma procesului de titrare izotermă peak-urile de căldură au fost integrate iar dependența căldurii eliberate per injecție a fost exprimată în funcție de raportul molar al partenerilor de reacție (Figura 17b).

Datele calorimetrice corectate au fost analizate pe baza unui model de legare independent, pentru a determina valorile constantei de asociere (K) și stoichiometria legării (n), precum și modificările de entalpie și entropie (ΔH și ΔS) ale reacției. Valoarea variației energiei libere (ΔG) a fost calculată ulterior folosind următoarea ecuație: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$.

Analiza termogramele obținute în urma interacțiunii vitaminei C și proteina hγD-P23T au fost utilizate în investigarea eficienței asocierii moleculare. Stoichiometria, afinitatea de asociere și entalpia de reacție au fost determinate prin fitarea variației valorilor căldurilor de reacție integrate la titrarea ligandului.

Parametrii termodinamici ai procesului de legare au fost determinați pe baza datelor reprezentate în Figura 17 prin aplicarea unui model independent.

Valoarea constantei de asociere obținută din măsurătorile ITC a fost de $K = 2.887 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ și corespunde unei energii libere Gibbs $\Delta G = -19.74 \text{ Kcal/mol}$. Valoare negativă ΔG sugerează că formarea complexului de incluziune în soluție a avut loc spontan fiind energetic favorabil. Valoarea variației de entalpie $\Delta H = -5.414 \text{ kcal/mol}$ este favorabilă reacției de legare.

Acest parametru global implică numeroase contribuții, cum ar fi efecte de hidratare, interacțiuni de tip Van der Waals și de hidrogen la interfața proteină-ligand precum și variații conformaționale ale partenerilor care interacționează. Efectul entropiei ($\Delta S = 48.9 \text{ J/molK}$) este pozitiv și aduce o contribuție semnificativă la variația negativă a energiei libere Gibbs în comparație cu efectele căldurii. Valoarea negativă a variației de entalpie $\Delta H < 0$ împreună cu valoarea pozitivă a variației de entropie $\Delta S > 0$ confirmă faptul că la procesul de legare contribuie atât interacțiunile de tip hidrofobic cât și cele de tip electrostatic. Analiza termodinamică indică faptul că în procesele de legare sunt implicate multiple interacțiuni de tip hidrofob, Van der Waals precum și interacțiuni de hidrogen. Din datele obținute se poate observa că vitamina C interacționează cu proteina hγD-P23T, fapt confirmat de valoarea constantei de disociere ($K_d = 0.3 \text{ mM}$).

3. Prezentarea rezultatelor obținute, a indicatorilor de rezultat realizați; a nerealizărilor înregistrate față de rezultatele estimate prin cererea de finanțare (dacă este cazul), cu justificarea acestora

- (1) **Doă protocoale experimentale** de expresie, marcare izotopică, și purificare ale proteinelor: gamma-D cristalin (hγD-Crys), și mutantul Pro23Thr (hγD-p23T), marcate izotopic cu ¹⁵N, respectiv expresia și purificarea proteinei chaperonă αB-Crystalin.
- (2) **Identificarea și testarea *in vitro* a vitaminei C** ca potențial inhibitor al agregării proteinei mutante hγD-p23T gamma-D cristalin, care cauzează cataracta congenitală.
- (3) **Implementarea și optimizarea** unui protocol integrativ privind *screeningul* și testarea potențialilor inhibitori ai agregării proteinelor, asociate cataractei, precum și altor patologii.
- (4) **Dotarea** laboratorului de Biochimie din cadrul INCDTIM cu o parte din aparatura necesară expresiei, marcării izotopice, și purificării proteinelor pentru studii biomoleculare RMN complexe.

Diseminare

(1) Articole în reviste cotate ISI

1. Alina Filip, Bogdan Cozar, Calin G Floare, Adrian Pîrnau, Mihaela Mic, Angela M.Gronenborn, Elena Matei* „Aggregation inhibitory effect of vitamin C on cataract-associated P23T γD-crystallin” *International Journal of Biological Macromolecules*, 302, 140579 (2025) (**factor impact 8.5**)
2. Călin G. Floare*, Adrian Pîrnău, Mihaela Mic, and Elena Matei* „An exploration of human γD-crystallin affinity for potential aggregation inhibitors: a molecular docking investigation” *STUDIA UBB CHEMIA*, LXIX, 3, 2024 (p. 67-91) DOI:10.24193/subbchem.2024.3.05
3. E Matei*, A Filip, CG Floare, A Pirnau, M Mic “Molecular aggregation pathway of cataract-associated γD-crystallin p23T congenital defect”, *Studia UBB, BIOLOGIA*, 68 (2), 2023 (p. 172-173).

* *autor correspondent*

(2) Comunicări la conferințe științifice

1. Elena Matei, Alina Filip, Calin G. Floare, Adrian Pîrnau, Mihaela Mic, “Structural Study of Cataract Associated P23T mutant of γD-crystallin”, *18th National Conference of Biophysics, September 2024, Iași, Romania*
2. 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*
3. E Matei, A Filip, C G Floare, A Pirnau, M Mic, “Structural study of cataract-causing p23T mutant γD-crystallin by Nuclear Magnetic Resonance”, *14th International Conference PIM-2023, Cluj-Napoca*
4. E Matei, A Filip, C G Floare, A Pirnau, M Mic, “Molecular aggregation pathway of cataract-associated γD-crystallin p23T congenital defect”, *The annual international conference of Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology (RSBMB), September 2023, Cluj-Napoca, Romania*

(3) Pagina web a proiectului: <https://www.itim-cj.ro/PNCDI/antiactract/>

4. Impactul estimat al rezultatelor obținute, cu sublinierea celui mai semnificativ rezultat obținut

Impactul rezultatelor proiectului

Proiectul s-a finalizat cu obținerea unor rezultate semnificative cu impact atât în domeniul științific, cât și medical. Rezultatele obținute în cadrul proiectului au contribuit la:

1. Optimizarea protocoalelor experimentale de clonare, transformare, expresie, și purificare ale proteinelor: gamma-D cristaline (hγD-Crys), mutantul hγD-p23T, αB-Cristalin marcate izotopic cu ¹⁵N.
2. Optimizarea secvenței de pulsuri RMN ¹H-¹⁵N HSQC folosit pentru a evalua calitatea, structura tridimensională a proteinelor, studiul interacțiunilor proteina-proteina, respectiv proteina-ligand, astfel:
 - (i) Secvența de pulsuri RMN ¹H-¹⁵N HSQC a fost folosită pentru a studia interacțiunea dintre proteinele hγD-Crys, respectiv hγD-p23T, formarea complexului cu proteina αB-Crys.
 - (ii) Experimentul ¹H-¹⁵N HSQC a fost de asemenea folosit pentru a studia interacțiunea dintre proteina mutanta hγD-p23T și vitamina C, un potențial inhibitor al agregării acesteia.
3. Identificarea potențialilor inhibitori ai agregării hγD-cristalinului analizați comparativ prin andocarea diferiților fitocompuși din baza de date *ZINC*.
4. Investigarea experimentală a efectului vitaminei C asupra agregării proteinei mutante hγD-P23T, utilizând spectroscopie RMN în soluție în combinație cu spectroscopie de fluorescență și teste de turbiditate *in vitro*. Rezultatele acestui studiu au confirmat că vitamina C este capabilă să moduleze procesul de separare de fază și să restabilească solubilitatea agregatelor hγD-P23T, cu impact în dezvoltarea unor metode terapeutice alternative de prevenție și tratament a cataractei congenitale.

Rezultatul cel mai semnificativ

Având în vedere faptul că până în prezent nu a fost aprobat niciun medicament împotriva cataractei, testarea unor compuși cu potențial terapeutic în profilaxia sau tratarea cataractei este absolut necesară. Studii anterioare au relatat faptul că vitamina C, un antioxidant vital aflat în umoarea apoasă oculară, ar avea potențial efect în diminuarea stresului oxidativ care cauzează cataracta la vârstă înaintată. Însă, până în prezent nu a fost testat efectul vitaminei C asupra agregării cristalinelor cauzate de mutații genetice, asociate cataractei congenitale. Acesta este primul studiu *in vitro* care evaluează potențialul profil terapeutic al vitaminei C într-un model de cataractă ereditară. Prin urmare, am investigat efectul vitaminei C asupra tendinței de agregare a proteinei mutante P23T γD-cristalinului uman, care cauzează cataracta congenitală, prin RMN în soluție, și alte tehnici biofizice. În urma studiilor experimentale *in vitro* am descoperit în premiera faptul că vitamina C este capabilă să prevină și să inverseze agregarea mutantului hγD-P23T. Am evidențiat apariția unor agregate amorfe a mutantul hγD-P23T în condiții native, la *pH* fiziologic, pe care am reușit să le solubilizăm în forma monomerică în prezența vitaminei C. Din datele RMN a reieșit faptul că efectul inhibitor al vitaminei C asupra procesului de separare de fază a mutantului hγD-P23T este mediat de interacțiunea cu regiunile predispuse la agregare, în principal cele din jurul poziției mutante P23T, și a porțiunii secvențiale C-terminal. Mecanismul molecular care stă la baza capacității vitaminei C de a inhiba agregarea hγD-P23T este relevant pentru înțelegerea și prevenirea cataractei congenitale, deschizând noi posibilități terapeutice. Studiul actual evidențiază și confirmă posibilitatea că un nutrient anti-oxidant hidrosolubil și bine tolerat, cum este vitamina C, poate dizolva agregatele cristalinului, încetinind astfel apariția sau inversând cataracta.

Director Proiect,
Dr. Elena Matei

