

Universitatea Babeș-Bolyai Cluj-Napoca  
Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică

Teză de doctorat

**Studii computaționale asupra interacțiunilor necovalente/slabe din  
biomolecule**

Conducător științific

Conf. dr. Radu Silaghi-Dumitrescu

Doctorand

Juan Francisco Carrascoza Mayén

Cluj-Napoca

2016

Universitatea Babeș-Bolyai Cluj-Napoca  
Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică

**Teză de doctorat**  
**Studii computaționale asupra interacțiunilor de legătură slabe și necovalente**  
**din biomolecule**

Conducător științific  
Conf. dr. Radu Silaghi-Dumitrescu

Doctorand  
Juan Francisco Carrascoza Mayén

Comisia de doctorat:

Președinte

Prof. Dr. Mircea Ducea

Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca

Referenți

Prof. Dr. Vasile Chiș

Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca

CS I. Dr. Attila Bende

Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru  
Tehnologii Izotopice și Moleculare, Cluj-Napoca

Conf. Dr. Ionel Humelnicu

Universitatea Alexandru Ioan Cuza, Iași

Susținere publică: Cluj-Napoca, februarie 2016

## Cuprins

Rezumat	4
Introducere	5
Capitolul 1. Estimarea computațională a contribuțiilor interacțiunilor slabe/necovalente din structurile biomoleculilor	9
1.1 Studiul computațional al elementelor de structură secundară a proteinelor: simulări Ramachandran	10
1.1.1. Introducere	10
1.1.2. Metodologie	12
1.1.3. Rezultate și discuții	13
1.1.4. Concluzii	26
1.1.5. Bibliografie	26
1.2. Modelarea structurilor de helix $\alpha$	30
1.2.1. Introducere	30
1.2.2. Metodologie	31
1.2.3. Rezultate și discuții	32
1.2.4. Concluzii	50
1.2.5. Bibliografie	50
1.3 Despre rolul alaninei și serinei din structura de foaie $\beta$ a fibroinei	55
1.3.1. Introducere	55
1.3.2. Metodologie	57
1.3.3. Rezultate și discuții	59
1.3.4. Concluzii	71
1.3.5. Bibliografie	71
1.4. O nouă componentă sterică în efectul anomic	75
1.4.1. Introducere	75
1.4.2. Metodologie	76
1.4.3. Rezultate și discuții	76
1.4.4. Concluzii	80
1.4.5. Bibliografie	81

Capitolul 2. Studii computaționale asupra unor complecși bioanorganici: studii de caz asupra interacțiunilor dictate de către legăturile slabe/necovalente	82
2.1. Dinamica metaloproteinelor. Parametrizare și considerații generale	83
2.1.1. Introducere	83
2.1.2. Metodologie	89
2.1.3. Rezultate și discuții	90
2.1.4. Concluzii	95
2.1.5. Bibliografie	96
2.2. Dinamica complecșilor hemoglobină-haptoglobină. Importanța stresului oxidativ	100
2.2.1. Introducere	100
2.2.2. Metodologie	101
2.2.3. Rezultate și discuții	102
2.2.4. Concluzii	111
2.2.5. Bibliografie	112
2.3. Dinamica hemeritrinei și a derivaților cu hemeritrină	114
2.3.1. Introducere	114
2.3.2. Metodologie	114
2.3.3. Rezultate și discuții	116
2.3.4. Concluzii	119
2.3.5. Bibliografie	119
2.4. Legarea antioxidantilor la hemoglobină și mioglobină	121
2.4.1. Introducere	121
2.4.2. Metodologie	122
2.4.3. Rezultate și discuții	124
2.4.4. Concluzii	132
2.4.5. Bibliografie	133
2.5. Interacțiuni ADN - ligand. Bleomicina.	135
2.5.1. Introducere	135
2.5.2. Metodologie	139
2.5.3. Rezultate și discuții	141

2.5.4. Concluzii	154
2.5.5. Bibliografie	154
Concluzii generale	159
Anexe	160
Abrevieri	196
Mulțumiri	201
Lista de lucrari	202

## Rezumat

În această lucrare natura proteinelor și a peptidelor este abordată din punct de vedere teoretic în cadrul a două capitole. Primul capitol conține subiecte legate de structura secundară și de cea terțiară a proteinelor, luând în considerare proprietățile mecanice și structurale ale aminoacizilor. Mai precis, se referă la modul în care aminoacizii dictează/controlază construcția structurilor secundare și terțiare. În plus, prima parte cuprinde și o secțiune ce trece în revistă factorii structurali ce determină efectul anomic, din perspectiva interacțiunilor necovalente ale oxigenului și sulfurii din biomolecule. S-au utilizat o varietate de metode, pornind de la *ab initio* (incluzând post-HF) și DFT, și mergând până la mecanică moleculară.

Al doilea capitol prezintă interacțiunile biomoleculilor cu liganzi, precum și interacțiuni proteină-proteină, în metaloproteine. Un interes aparte este acordat globinelor și ADN, fiind prezentate studii de docking proteină-ligand și proteină-proteină ce oferă o nouă perspectivă.

Această lucrare dezvoltă și noi parametri de câmp de forțe pentru dinamica moleculară a unor metalo-enzime și medicamente.

**Cuvinte cheie:** metaloproteine; dinamică moleculară; QM/MM; docking; hemoglobină; bleomicină; DFT; AMBER; câmpuri de forțe; hemeritricină; haptoglobină; structura proteinelor.

Împachetarea proteinelor are la bază interacțiunile necovalente din cadrul lanțului polipeptidic, precum și alți factori externi.<sup>1,2</sup> Printre factorii de mediu care influențează preferința pentru un aranjament anume, sunt cei care implică structuri non-aminoacidice, cum ar fi solventul, liganzii organici, metale și alții.<sup>3</sup> În cele mai multe cazuri, probabil în toate, aceste influențe sunt esențiale pentru funcționalitatea proteinei.<sup>4</sup>

În această teză sunt prezentate studii teoretice asupra interacțiunilor proteinelor, *centrate pe importanța interacțiunilor slabe și necovalente ca pași pentru o mai bună înțelegere a rolului jucat de metale în biomolecule*. Pentru aceasta s-au utilizat o serie întreagă de tehnici ilustrând complexitatea provocărilor impuse de astfel de sisteme, precum și capacitatea noastră de a le face față. Aceasta include utilizarea comparativă a mai multor câmpuri de forță pentru optimizarea geometriei, cât și pentru dinamica și pentru calcule de docking. Parametrizarea centrilor organici și anorganici a inclus ioni de cobalt și fier. Calculele de dinamică au fost realizate în mai multe regimuri, incluzând condiții de limită periodică (PBC). Au fost aplicate de asemenea metode semiempirice, teoria funcționalelor de densitate (DFT), Hartree-Fock, și procedee de analiză a funcției de undă precum NBO – atât pentru studiul stării fundamentale cât și al izomerilor și conformerilor. Au fost realizate de asemenea studii de dinamică *ab initio*.

Capitolul 1 examinează modul în care interacțiunile slabe dirijează plierea în biomolecule și în special în proteine. Exemplele accentuează importanța interacțiunilor intra-aminoacid în împachetare, așa cum reiese din diagramele de tip Ramachandran obținute pe baza unor rezultate DFT. De asemenea o analiză detaliată a performanțelor metodelor computaționale (de la mecanică moleculară la semiempirice, DFT și Hartree-Fock) în descrierea precisă a unui model esențial de pliere biomoleculară - helixul peptidic alfa. Sunt prezentate aplicații ale metodelor celor mai performante în cazul altor modele canonice de pliere precum foaia  $\beta$  în fibroină, unde calcule semiempirice și DFT permit argumentarea alegerii unei anume structuri primare a acestei proteine. Secțiunea finală a capitolului 1 prezintă aplicații asupra unor zaharuri ilustrând astfel capacitatea acestor metode computaționale de a fi aplicate dincolo de cazul polipeptidelor.

Capitolul 2 prezintă o serie de cazuri de interacțiuni ale proteinelor cu elemente externe. Acestea includ analiza teoretică a schimbărilor conformaționale ale haptoglobinei la interacțiunea cu hemoglobina (Hb), precum și modul în care hemoglobina și mioglobina interacționează cu molecule mici de antioxidanți. Această interacțiune este importantă nu doar ca

și exemplul de interacțiune proteină-proteină relevantă din punct de vedere fiziologic, ci și pentru o mai bună înțelegere a modului în care speciile reactive (de exemplu gruparea hemică din hemoglobină, care se știe că este un generator de radicali) se comportă în corpul nostru. Sunt prezentate de asemenea studii de parametrizare și explorare a dinamicii hemeritrinei, o proteină non-hemică ce conține fier, recent propusă ca posibil înlocuitor al Hb în substitute de sânge datorită reactivității scăzute față de agenții de stres oxidativ. La finalul capitolului 2 este tratat un alt caz de interacțiune metal-biomoleculă asociată stresului oxidativ. Această ultimă parte nu este centrată pe metaloproteine ci pe interacțiunea ADN-metalopeptide – un subiect mult mai complex din punct de vedere metodologic.

Calcularea conformațiilor moleculare favorabile nu este trivială, deoarece numărul atomilor din structurile proteice este adesea mai mare de 100 (și în acest context trebuie amintit paradoxul Levinthal). Aplicarea teoriilor de nivel înalt precum post-Hartree-Fock, sau chiar și Hartree-Fock însuși, poate fi destul de solicitantă din punct de vedere al resurselor computaționale necesare; această problemă poate fi eludată prin alegerea atentă a unor modele de dimensiune redusă - deși mai puțini atomi nu sunt neapărat garanția unei probleme mai simple. Cel mai adesea se încearcă un compromis între precizie și resurse, ceea ce deschide calea implementării unor teorii care rulează mai rapid precum metodele semiempirice și mecanica moleculară.

O provocare obișnuită ce apare la calcularea plierilor biomoleculare este corecția contribuțiilor energetice datorate legăturilor de hidrogen<sup>3,5</sup>. Legăturile de hidrogen pot fi ușor subestimate din punct de vedere energetic și structural chiar și la nivel DFT - și asta deoarece solvatarea apoasă explicită este foarte scumpă din punctul de vedere al resurselor computaționale necesare pentru aceste tipuri de calcule. Prin urmare, prima aproximare necesară este folosirea de solvent implicit<sup>6</sup>, care în unele cazuri poate conduce la erori datorate absenței legăturilor de hidrogen distincte cu solventul – lipsă ce mai departe conduce la o atribuire incorectă a contribuțiilor energetice; vom prezenta o serie de astfel de rezultate<sup>7</sup>.

Teoria Hartree-Fock nu este în general recomandată pentru calcule pe sisteme ce conțin mai mult de câțiva atomi (ex. 25), și prin urmare nu este cea mai bună metodologie pentru structuri proteice. Cu toate acestea Hartree-Fock s-a dovedit utilă pentru analiza interacțiunilor atomice precum în situsurile active ale unor enzime (pentru o sinteză pe această temă a se consulta referința 8). Metodologia DFT este probabil una dintre cele mai populare în ceea ce



privește analiza interacțiunilor atomice din aminoacizi și s-a arătat că aceasta conduce la rezultate bune într-un timp relativ scurt. Merită aici menționată seria de funcționale M06 dezvoltată de Truhlar (și variațiile ulterioare) ce includ parametri pentru metalele tranzitionale, de o mare importanță în ceea ce privește studiul metalo-enzimelor<sup>8,9</sup>. Metodologiile semi-empirice pot fi în principiu mai potrivite pentru structuri proteice deoarece conțin în ecuația Hartree-Fock parametri precalculați care accelerează remarcabil aceste calcule.<sup>7</sup>

Cu toate acestea marea problemă în aplicarea metodelor computaționale în sisteme biologice rămâne cea legată de cerințele de timp și de putere de calcul, ca și de precizie (nivel de teorie). În momentul redactării acestei lucrări, teoria și hardware-ul au evoluat suficient de mult încât să fie posibil să se realizeze calcule cu o rezoluție de 1.0 Å pe structuri polipeptidice având sub 80 de aminoacizi<sup>10</sup>. Fără îndoială că într-un viitor previzibil vor fi posibile performanțe mai mari.

## **Capitolul 1. Estimarea computațională a contribuțiilor interacțiunilor slabe/necovalente din structurile biomoleculilor**

### **1.1. Studiul computațional al elementelor de structură secundară a proteinilor: simulări Ramachandran <sup>1</sup>**

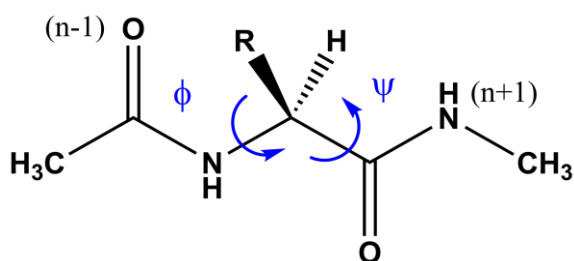
Conformația de structură secundară a proteinelor este descrisă adesea ca o funcție a unghiurilor diedre exprimate prin perechi ( $\phi$ ,  $\psi$ ) ce pot fi reprezentate prin diagrame grafice de tip Ramachandran ce permit o interpretare ușoară. Aceste grafice reprezintă zone interzise și permise<sup>1,2</sup>. Aproximativ 40% din toți aminoacizii din structură sunt conținuți în doar 2% din graficul Ramachandran – așa-numitele “zone permise”<sup>3,4</sup>. Regiunile interzise sunt cele definite de o distanță de contact minimă între aminoacizii vecini ( $n+1$ ) și ( $n - 1$ ), ‘ $n$ ’ fiind aminoacidul cu carbonul central  $\alpha$ - de referință<sup>5</sup>. Măsurarea schimbărilor energetice la rotația unghiurilor diedre  $\psi$  și  $\phi$  în jurul carbonului  $\alpha$  ajută la înțelegerea de o manieră cantitativă, a preferințelor conformaționale ale structurilor peptidice tridimensionale - permițând o serie de predicții<sup>5-7</sup>.

---

<sup>1</sup> Din lucrarea: Carrascoza, Francisco; Zaric, Snezana; Silaghi-Dumitrescu, Radu. "Computational study of protein secondary structure elements: Ramachandran plots revisited". Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2014, 50, 125-133

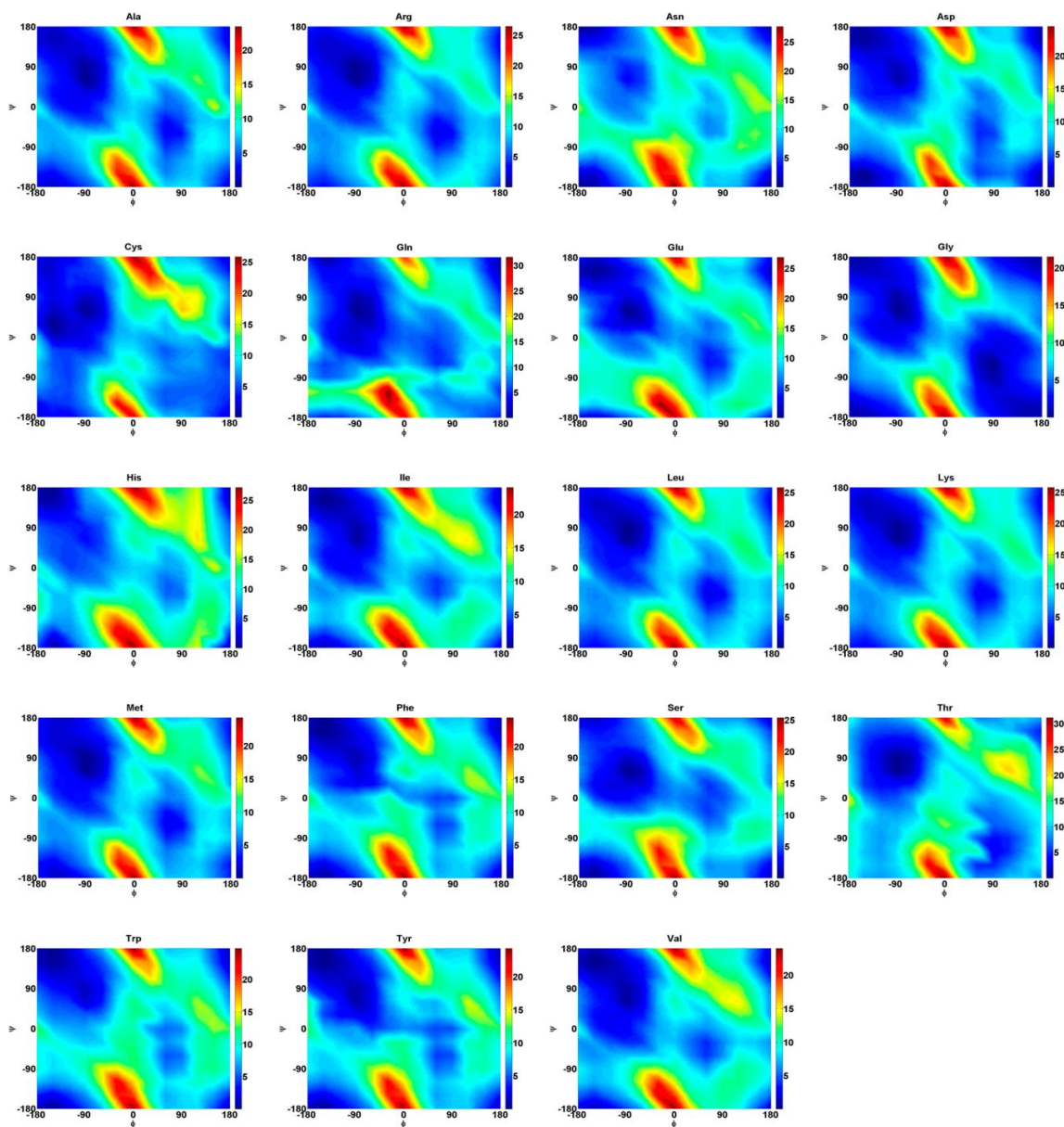
Preferința pentru un anumit tip de structură secundară este dictată de interacțiunile interatomice – atât repulsive cât și atractive (în principal legături de hidrogen clasice și ne-clasice) <sup>8</sup>.

Pentru studiul nostru au fost construite 19 structuri analoge de (S) 2-acetamido-N-metilpropanamidă, similare cu cei 19 aminoacizi cheie. Legăturile peptidice sunt capate cu grupări metil. Prolina nu a fost examinată, deoarece unghiurile sale diedre sunt constrânse datorită structurii sale moleculare interne. Suprafețele de energie potențială au fost apoi construite pentru unghiurile  $\psi$  și  $\phi$  ale fiecărui model folosind metode DFT: M06-2x/6-311\*\* <sup>1</sup> și PW91/6-311\*\* în vid, după cum sunt implementate în programul Gaussian 09 <sup>2</sup>. Scanările s-au realizat în pași de câte 30 de grade, conducând la un total de 169 structuri ce pot fi privite ca o matrice de 13 x 13 molecule de la -180 grade, la +180 grade pentru  $\psi$  și -180 la +180 grade pentru  $\phi$ .



**Figura 1.1.1.** Structurile de 2-acetamido-N-metilpropanamidă examinate în acest studiu. Unghiurile  $\phi$  și  $\psi$  sunt marcate cu săgeți albastre. O (n-1) se referă la oxigenul din poziția (n-1) unde (n-1) este aminoacidul anterior aminoacidului central (n). În mod similar H (n+1) se referă la hidrogenul din poziția (n+1) față de aminoacidul n. R este catena laterală a aminoacidului.

A fost măsurat nivelul de similaritate dintre grafice (Tabelul 1.1.1) determinându-se că cele 19 structuri aminoacidice comune pot fi grupate în trei categorii pe baza similarității deviațiilor. Aceste categorii bazate pe modele de tip aminoacid în vid sunt aproape identice cu preferințele statistice raportate de Malkov care a examinat preferințele *experimentale* în structuri secundare de aminoacizi determinate prin difracție cu raze X și disponibile în Protein Data Bank. Tabelul 1.1.1 prezintă o comparație între graficele PES raportate aici și preferințele statistice raportate anterior de către Malkov și colaboratorii.



**Figura 1.1.2.** Scanări PES PW91PW91/6-311+G\*\* pentru fiecare model de aminoacid.

S-au găsit bineînțeles și discordanțe între diagramele Ramachandran bazate pe date DFT și cele experimentale/statistice. Aceste diferențe sunt explicate prin considerente de chimie supramoleculară: unele regiuni care prezintă minime locale pentru modelele bazate pe un singur aminoacid nu sunt viabile la nivel supramolecular în sensul că interacțiunile cu alte lanțuri polipeptidice sau cu alți aminoacizi din același lanț polipeptidic sunt împiedicate. Aceste date sunt centrate pe proprietățile intrinseci al unui aminoacid, un element care după cunoștința

noastră este de obicei ignorat, deoarece pentru îmbunătățirea similarității se apelează întotdeauna la modele mai mari de polipeptide reale din punct de vedere biologic.

**Tabelul 1.1.1.** Deviațiile calculate pentru toate graficele de scanare PES. ATD = Deviația Totală Medie. Prima coloană indică Grupurile cărora aparțin respectivii aminoacizi. Numerele semnaleză membrii aceluiași grup care au fost folosiți pentru calcularea mediei grupului.

Grup	Amino Acid	ATD	Grup 1	Grup 2	Grup 3
1	Gly	17.34	2.42	2.68	<b>3.51</b>
	Ala	15.74	0.81	1.29	2.04
	<b>Gln</b>	15.59	1.10	1.78	2.27
	Lys	15.11	<b>0.42</b>	1.27	1.86
	Leu	15.08	<b>0.46</b>	1.40	1.95
	Met	15.06	<b>0.62</b>	1.41	2.13
	Arg	14.96	<b>0.52</b>	1.31	1.84
	Ile	14.95	<b>0.80</b>	1.64	1.98
	Val	14.88	<b>0.85</b>	1.70	2.03
2	Thr	14.78	2.47	<b>2.13</b>	2.79
	Phe	14.75	1.49	<b>1.05</b>	1.19
	Tyr	14.72	1.45	<b>1.03</b>	1.05
	Ser	14.67	1.70	<b>1.18</b>	1.55
	Trp	13.90	1.82	1.40	<b>0.81</b>
3	<b>His</b>	13.64	2.28	1.93	1.92
	Asp	13.56	2.09	1.53	<b>0.85</b>
	Glu	12.87	2.62	2.20	<b>1.44</b>
	<b>Cys</b>	11.93	3.30	3.27	2.86
	Asn	11.59	3.94	3.39	<b>2.42</b>

**Tabelul 1.1.2.** Preferințele aminoacizilor pentru diferite tipuri de structură secundară, determinate pe baze statistice (Malkov et al., <sup>3</sup> coloana 2) și DFT (acest studiu).

Amino acid	Similaritatea de grup	Statistica de grup	Minime DFT favorizate	DFT - al doilea clasat
Ala	1	helix $\alpha$	2.2 <sub>7</sub> -ribbon	$\beta$ -sheet
Leu	1	helix $\alpha$	2.2 <sub>7</sub> -ribbon	$\beta$ -parallel, bend
Glu	3	helix $\alpha$	foaie $\beta$ antiparalelă	2.2 <sub>7</sub> -ribbon
Gln	1	helix $\alpha$	2.2 <sub>7</sub> -ribbon	foaie $\beta$ antiparalelă
Arg	1	helix $\alpha$	2.2 <sub>7</sub> -ribbon	foaie $\beta$ curbată
Met	1	helix $\alpha$	2.2 <sub>7</sub> -ribbon	foaie $\beta$ curbată
Lys	1	helix $\alpha$	2.2 <sub>7</sub> -ribbon	foaie $\beta$ curbată
Val	1	Strand	foaie $\beta$ antiparalelă, 2.2 <sub>7</sub> -ribbon	foaie $\beta$ paralelă
Ile	1	Strand	foaie $\beta$ antiparalelă, 2.2 <sub>7</sub> -ribbon	foaie $\beta$ paralelă
Tyr	2	Strand	foaie $\beta$ planară, Antiparallel	foaie $\beta$ paralelă, 2.2 <sub>7</sub> -ribbon
Phe	2	Strand	foaie $\beta$ planară, Antiparallel	foaie $\beta$ paralelă, 2.2 <sub>7</sub> -ribbon
Thr	2	Strand	Bend type II	2.2 <sub>7</sub> -ribbon, <sub>3</sub> <sub>10</sub> Turn I
Trp	3	Strand	foaie $\beta$ planară, Antiparallel	foaie $\beta$ paralelă, 2.2 <sub>7</sub> -ribbon
Gly	-	Alta	2.2 <sub>7</sub> -ribbon	foaie $\beta$ curbată
Asn	3	Alta	foaie $\beta$ planară	2.2 <sub>7</sub> -ribbon
Pro	N.A.	Alta	N.A.	N.A.

Cu toate acestea, pentru peptide mici, inclusiv chimie prebiotică, asemenea modele mici conțin informații ce nu pot fi obținute prin observații experimentale asupra unor proteine întregi/polipeptide. Prezentul studiu încearcă să aducă deci contribuții la cuantificarea relativă a efectelor intramoleculare din interiorul fiecărui aminoacid, prin contrast cu cele intermoleculare cu aminoacizii învecinați – dar și cu cele intramoleculare la nivel de structură primară.

## 1.2. Modelarea structurilor de helix alfa <sup>2</sup>

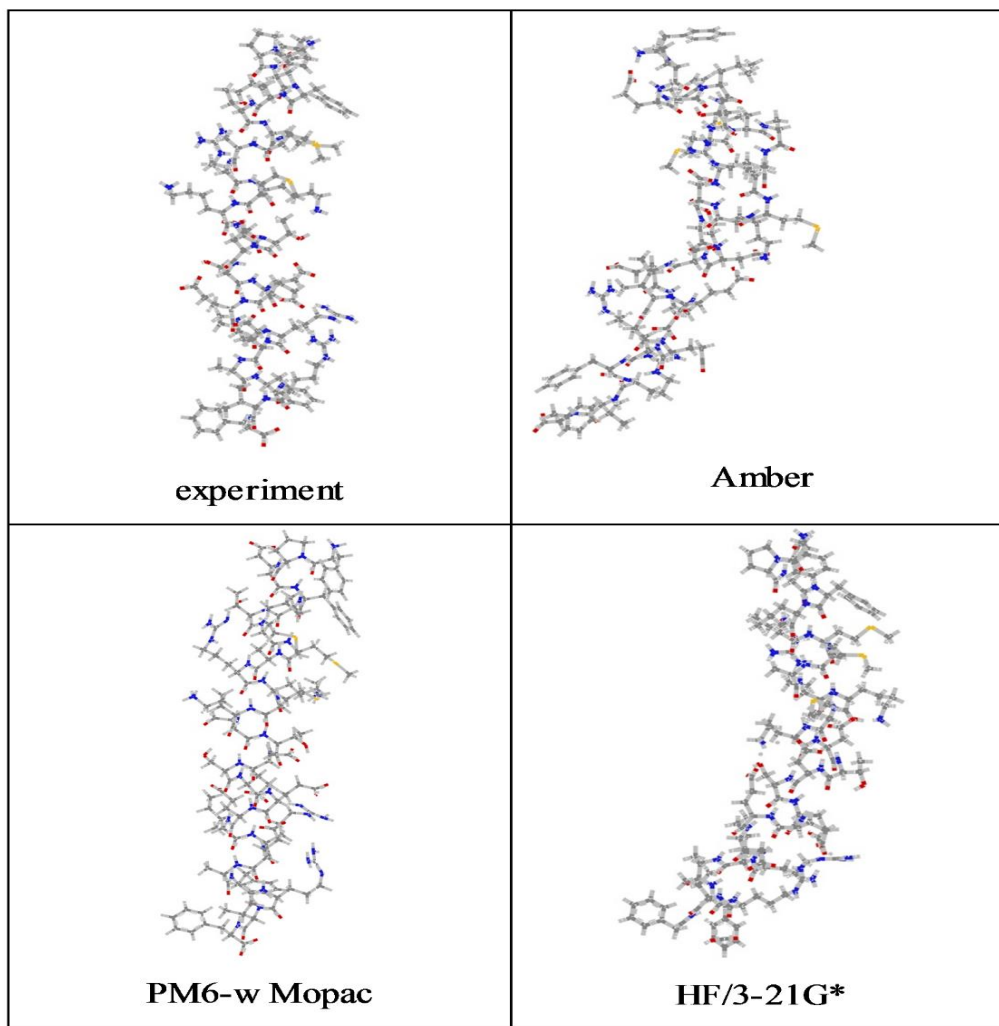
În acest studiu sunt raportate rezultate de optimizare a geometriilor unor proteine mici și polipeptide. Aceste optimizări s-au realizat fie în vid fie cu ajutorul unui model de solvatare continuă CPCM implementat în programul Gaussian09<sup>5</sup>, la nivele PM6-D2, HF/3-21G\*, M062X/6-31G\*\*, M062/6-311+G\*\*, BP86/6-31G\*\*. Calculele MM au fost făcute cu ajutorul câmpurilor de forțe AMBER și UFF după cum sunt implementate în Gaussian09<sup>5</sup> și Hyperchem<sup>6</sup>. Metoda semiempirică PM6-D2 folosită este cea implementată în programele Gaussian09<sup>5</sup> și MOPAC<sup>7</sup>; s-a folosit de asemenea și implementarea PM3 din Hyperchem<sup>6</sup>.

Pentru a determina precis performanțele metodelor computaționale, dar și pentru determina punctele forte dar și limitările fiecăreia în contextul chimiei supramoleculare a polipeptidelor, au fost examinate atât structuri de helix  $\alpha$  bazate pe modele pur teoretice (Gly<sub>10</sub>, Gli<sub>50</sub>, Ile<sub>10</sub>, Ile<sub>50</sub>) cât și modele realiste (un fragment de helix  $\alpha$  din calmodulină și mici proteine complete, având codurile PDB 3CLN<sup>48</sup> și respectiv 1ALG). S-a dovedit că PM6-D2 asigură descrierea geometrică cea mai precisă pentru modele de Gli și Ile, fiind urmată îndeaproape de metodologia M06-2X, în special când se include și solvatarea. Majoritatea celorlalte metode eșuează în a prezice un helix canonic acceptabil. Structurile de calmodulină și 1ALG sunt discutate mai jos ca și exemple reprezentative pentru rezultatele obținute. Pentru calmodulină în mod special, metoda AMBER nu modelează bine helixul alfa, ci conduce la un punct de deformare în mijlocul structurii (cf. Figura 1.2.1) și câteva distanțe inacceptabil de lungi (>3 Å) ce ar trebui să corespundă unor legături de hidrogen (aminoacizii 74-85). Și metodologia HF conduce la un helix deformat, care mai prezintă și inconvenientul de a avea carboxilatul C-terminal eliminat sub formă de CO<sub>2</sub> în timpul optimizării de geometrie. Metoda MOPAC PM6

---

<sup>2</sup> Din lucrarea: Lupan, Alexandru; Kun, Attila; Carrascoza, Francisco; Silaghi-Dumitrescu, Radu. Performance of computational methods for modeling  $\alpha$  helical structures. Journal of Molecular Modeling 2013, **19**(1), 193-203.

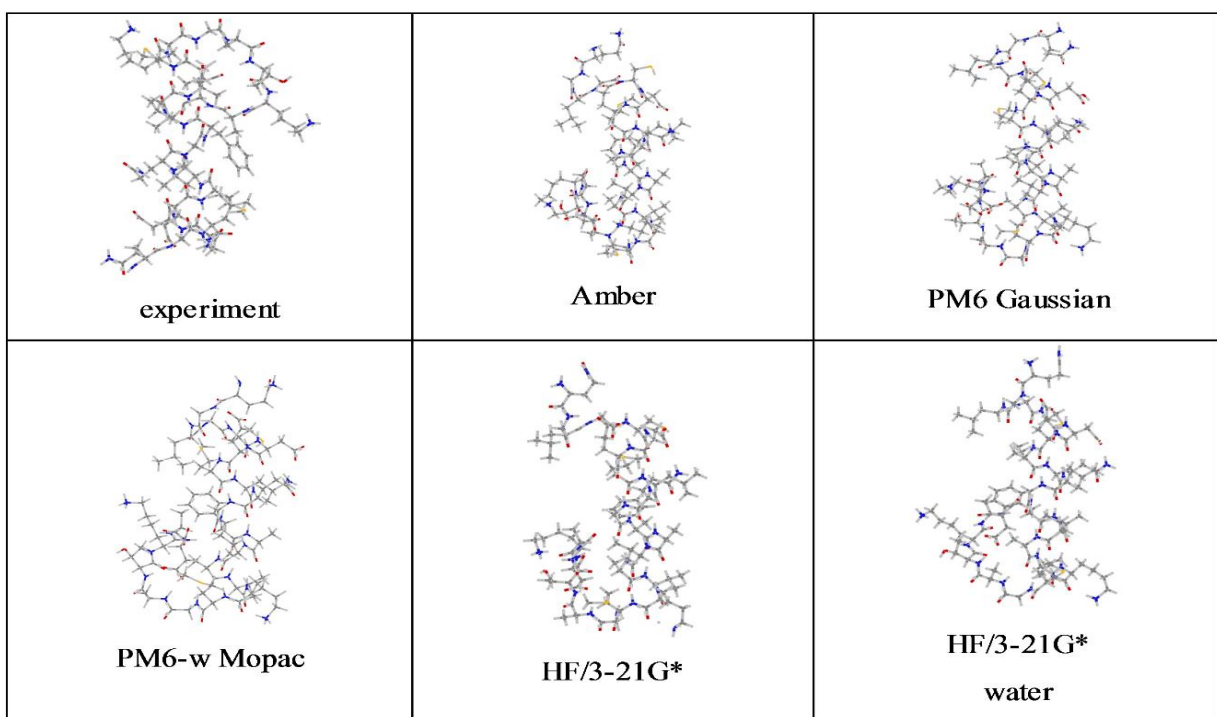
este singura care păstrează structura de helix  $\alpha$ ; totuși, în acest caz tendința de structură canonică este exagerată: chiar dacă în structura experimentală distanțele corespunzătoare unora din legăturile de hidrogen sunt de 3 Å, metoda PM6 plasează toate legăturile de hidrogen în intervalul  $\sim 1.9-2.0$  Å.



**Figura 1.2.1.** Reprezentarea grafică a geometriei buclei lungi din 3CLN optimizată cu diferite metode.

Structura PDB 1ALG este o proteină compusă din 24 de aminoacizi, având o structură globală de helix  $\alpha$ . Metodele care eșuează să modeleze structurile cu helix canonic al unor modele mici/simple discutate înainte (ex. implementările Gaussian ale PM6, sau HF/3-21G\* în vid), reproduc destul de bine regularitatea structurii helicale a proteinei complete, cunoscute experimental, 1ALG. De fapt, chiar și acolo unde structura experimentală prezintă deviații de la

helixul  $\alpha$ , precum primele două legături de hidrogen care sunt mai lungi și ultima care este mai scurtă, metodele computaționale eșuează în a modela precis aceste deviații.



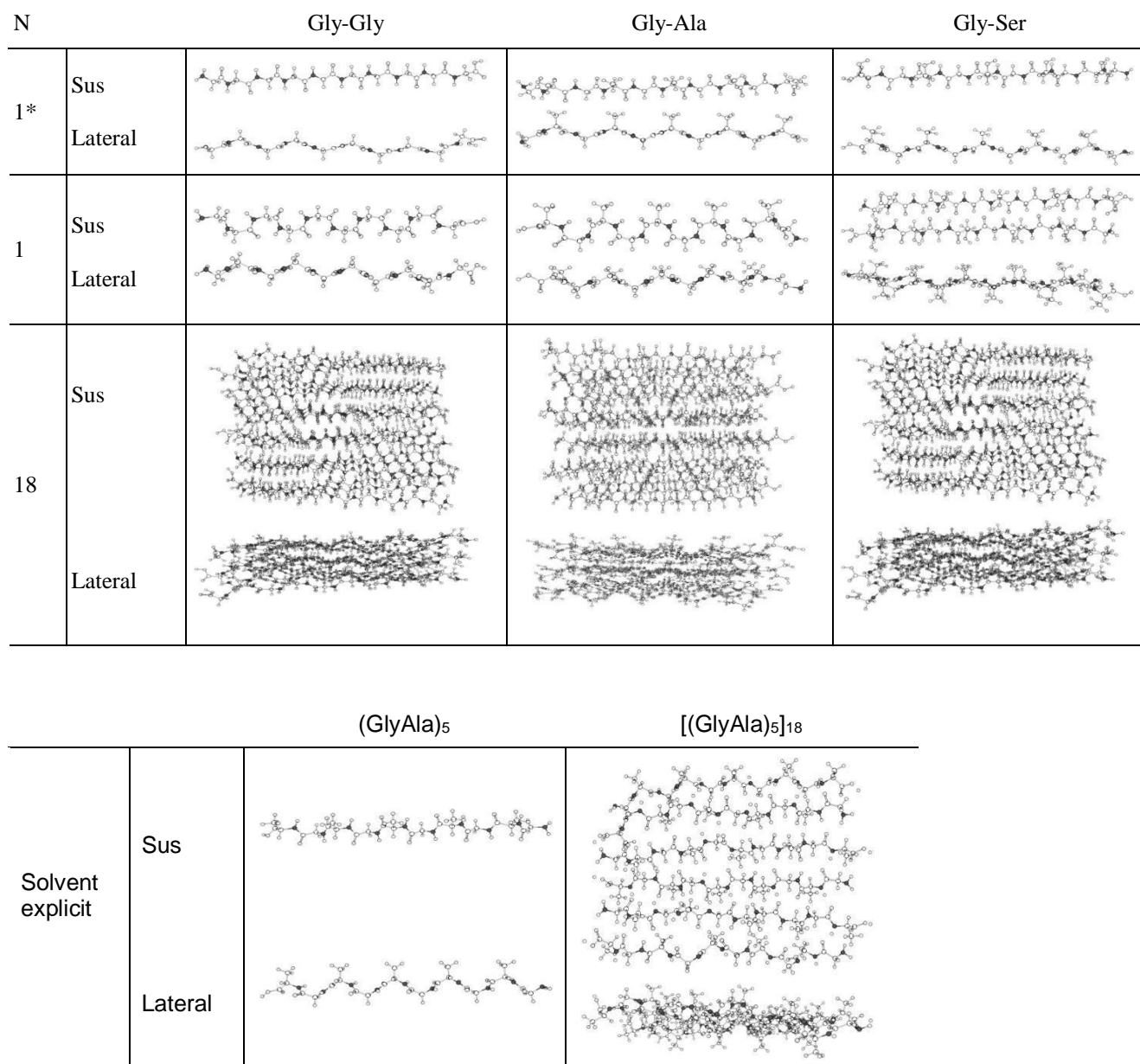
**Figura 1.2.3.** Reprezentarea grafică a geometriei 1ALG optimizată cu diferite metode.

### 1.3. Despre rolul alaninei și serinei din structura de foaie $\beta$ a fibroinei <sup>3</sup>

În forma 'silk II', fibroina este formată aproape exclusiv din straturi de foi  $\beta$ , bogate în glicină, alanină, și serină. Argumentul acestei compoziții particulare s-a presupus a fi îndreptat în direcția minimizării repulsiilor sterice; puține dovezi numerice au fost aduse în favoarea acestui argument. Prin urmare, acest studiu intenționează să ofere date computaționale pe un set de modele care să contureze rolul pe care fiecare din cei trei aminoacizi (Gly, Ala, Ser) îl joacă în fibroină. Se raportează în prezenta teză rezultate computaționale pe modele de fibroină la nivele de teorie semi-empiric PM6-D2 și DFT M062X <sup>13</sup>/6-31G\*\* precum și calcule MM/MD cu câmpuri de forțe AMBER realizate cu programul AMBERToolkit versiunea 14 <sup>15</sup> care simulează condițiile fiziologice prin intermediul unei cutii de apă. În cazul calculelor PM6, s-a utilizat un câmp electrostatic din cadrul programului MOPAC, în timp ce calculele DFT au fost realizate

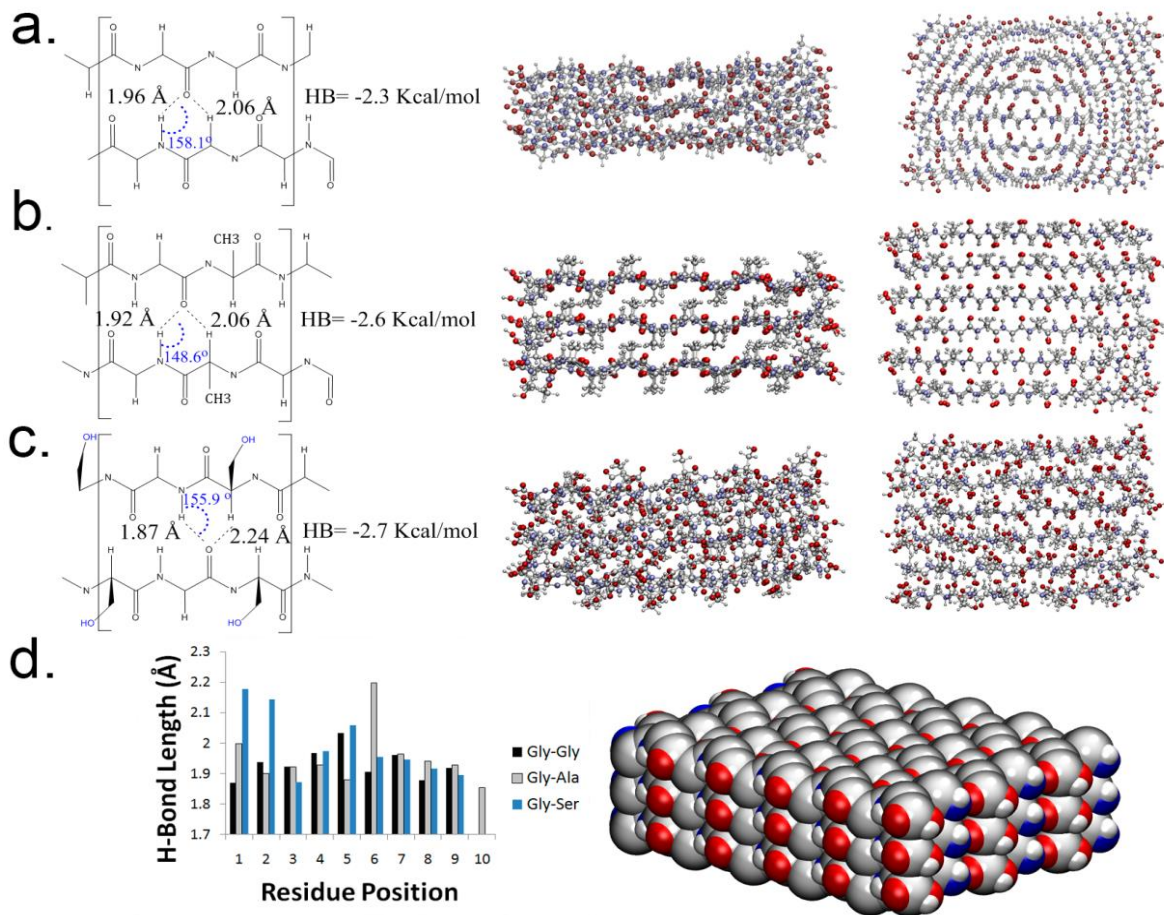
<sup>3</sup> Din lucrarea: Carrascoza, Francisco; Lupan, Alexandru; Cosar, Ciprian; Kun, Attila; Silaghi-Dumitrescu, Radu. On the roles of the alanine and serine in the  $\beta$ -sheet structure of fibroin *Biophysical Chemistry*, 2015, 197, 10-17; Cosar, Ciprian. *Molecular modeling of fibroin* (Master thesis), Babes-Bolyai University, Cluj-Napoca, 1-64 (2012).

atât în vid cât și folosind un model de solvent CPCM, implementat în Gaussian09. Modelele folosite includ decapeptidele (Gly)<sub>10</sub>, (Gly–Ala)<sub>5</sub> și (Gly–Ser)<sub>5</sub>, precum și ansambluri de 1, 2, 8, 18-meri (Figura 1.3.1 și 1.3.2).

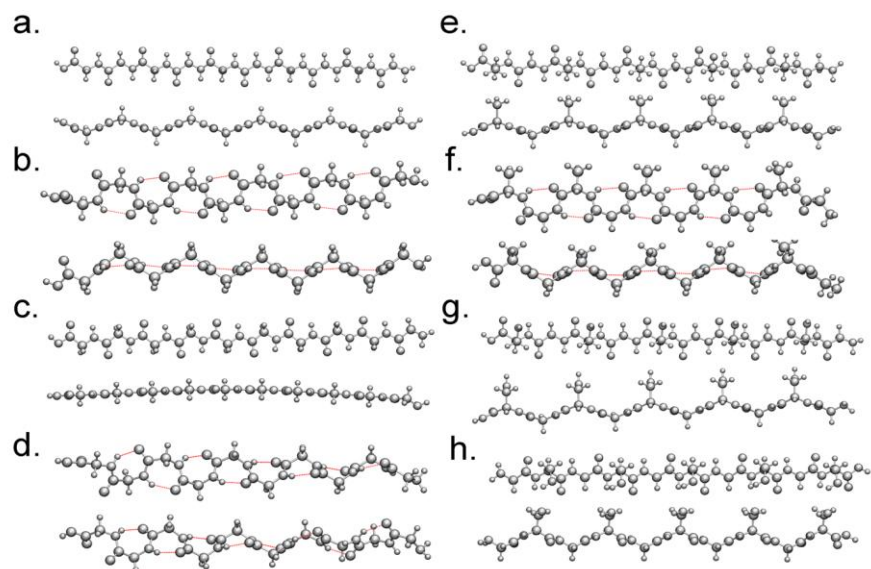


**Figura 1.3.1.** Geometriile obținute după optimizarea PM6. N = numărul de monomeri din model.  
1\* = monomer extras din centrul unui ansamblu 18-meric.

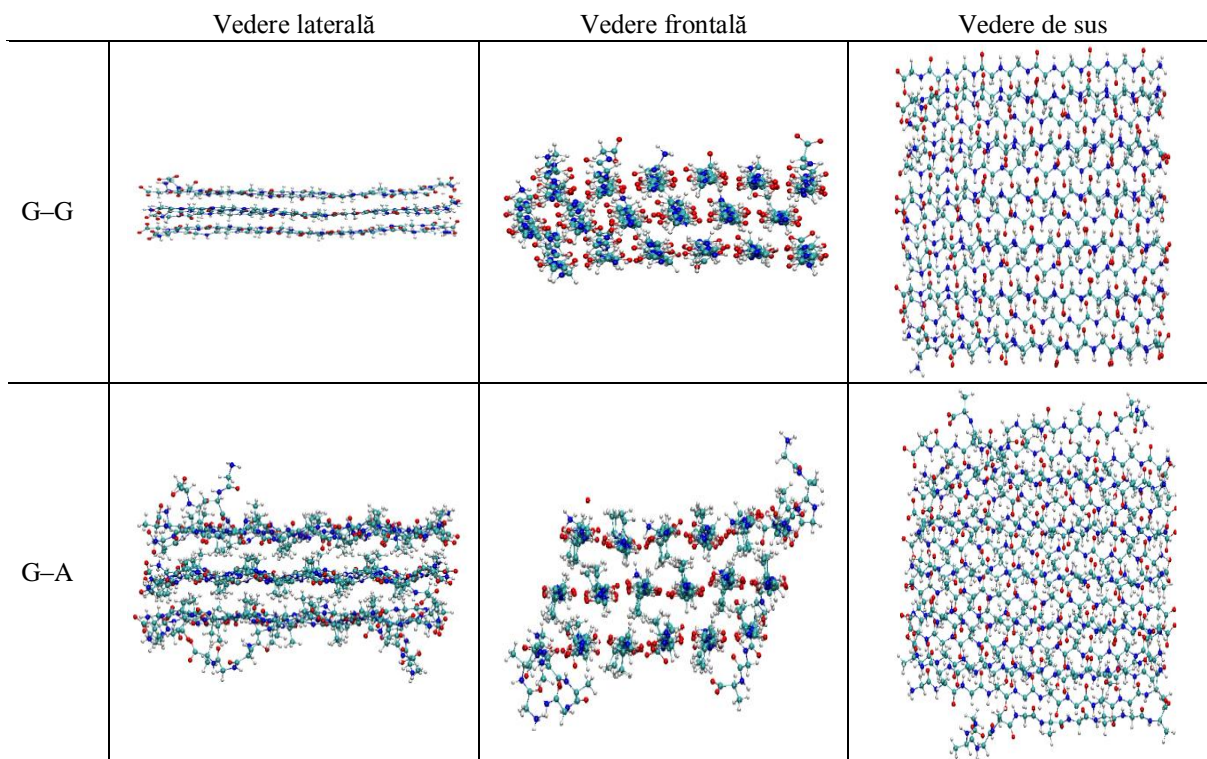


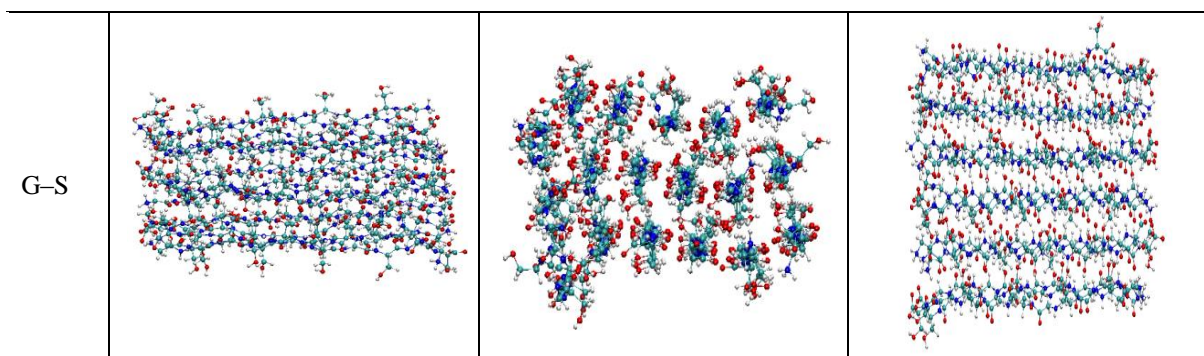


**Figura 1.3.2.** Geometriile optimizate PM6 ale modelelor de fibroină. **Stânga:** Lungimile legăturilor de hidrogen, unghiurile și energia de formare. **Centru:** vedere laterală. **Dreapta:** vedere de sus. **A.**  $(\text{Gly}_{10})_{18}$  antiparalel *E*. **B.**  $((\text{Gly-Ala})_5)_{18}$  antiparalel *E*. **C.**  $((\text{Gly-Ser})_5)_{18}$  antiparalel *E*. **B. Stânga.** Lungimile legăturilor de hidrogen dintr-un monomer luat din centrul structurii 18-merice. **D. Dreapta:** modelul tridimensional al ansamblurilor octadecamerice optimizate. **Abrevieri:** HB: energia medie a legăturilor de hidrogen.



**Figura 1.3.3.** Decapeptidele Gly<sub>10</sub>, (Gly-Ala)<sub>5</sub> și (Gly-Ser)<sub>5</sub> organizate în formă de foi β: geometriile înainte și după optimizarea cu ajutorul metodelor DFT (M06-2x/6-31G\*\*) și PM6. Legăturile de hidrogen interne sunt indicate prin linii roșii. Pentru fiecare structură sunt indicate perspectivele de sus și laterale. **A.** Gly<sub>10</sub>-geometria de plecare. **B.** Gly<sub>10</sub> optimizat PM6. **C.** Gly<sub>10</sub> nepliat optimizat DFT. **D.** Gly<sub>10</sub> pliat optimizat DFT. **E.** (Gly-Ala)<sub>5</sub> geometria de plecare. **F.** (Gly-Ala)<sub>5</sub> optimizat PM6. **G.** (Gly-Ser)<sub>5</sub> geometria inițială. **H.** (Gly-Ser)<sub>5</sub> optimizat PM6.





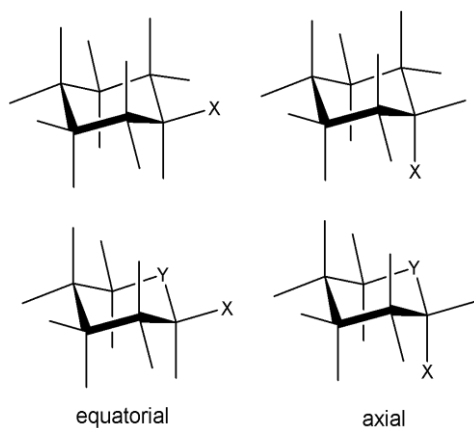
**Figura 1.3.4.** Structurile 18-merice după 5 nanosecunde de MM/MD.

Energiile de stabilizare PM6 ale celor 18 decapeptide organizate pe straturi antiparalele *E* de foi  $\beta$  sugerează că în loc să stabilizeze structura de foaie  $\beta$ , alanina și serina induc repulsii sterice (Figura 1.3.3). Pe de altă parte, catena laterală a alaninei rigidizează foaia, permițându-i să-și mențină structura pliată chiar și în cazul unei singure foi  $\beta$ , evitând apariția de conformații diferite care ar împiedica formarea unei structuri multistrat pliate. Aceste conformații alternative sunt foi complet planare, fiind mai puțin stabile comparativ cu foaia pliată și conformația panglică 2.27. Rolul serinei este acela de a modula hidrofobicitatea, astfel încât peptida nou sintetizată să fie maleabilă după ieșirea din ribozom, pentru fi posibilă construcția unui ansamblu supramolecular și nu precipitarea datorită hidrofobității. Importanța înțelegerii rolului pe care fiecare aminoacid îl joacă în structura polimerică poate fi relevantă în domenii precum modelarea teoretică a peptidelor, designul de materiale, sau fabricarea de biopolimeri.

#### 1.4. O nouă componentă sterică în efectul anomic <sup>4</sup>

Pentru explicarea efectului anomic s-au propus diverse explicații – majoritatea bazate pe interacțiuni sterice, separarea de sarcină și hiperconjugare. Reîntorcându-ne la această temă prin intermediul metodelor computaționale aflăm că oxigenul piranoid nu este hibridizat  $sp^3$  iar ca urmare a acestei situații perechile de electroni neparticipanți de la oxigen sunt în conformație eclipsată față de substituentul ecuatorial al atomului de carbon vecin. Acest conflict steric pare a fi una din cauzele importante ale efectului anomic. Natura de hibridizare non- $sp^3$  a atomului de oxigen nu este limitată la carbohidrați fiind întâlnită în motivele structurale de bază (ex. apă, metanol, formaldehidă).

<sup>4</sup> Din lucrarea: Silaghi-Dumitrescu, Radu; Carrascoza Mayén, Juan Francisco. A twist in the anomeric effect. *Studia Universitatis Babeș-Bolyai Seria Chimia* 2014, LIX(3), 95-101.



**Figura 1.4.1.** Structurile de interes pentru acest studiu. X și Y sunt de obicei atomi de oxigen, în care motivul structural este relevant pentru chimia carbohidraților.

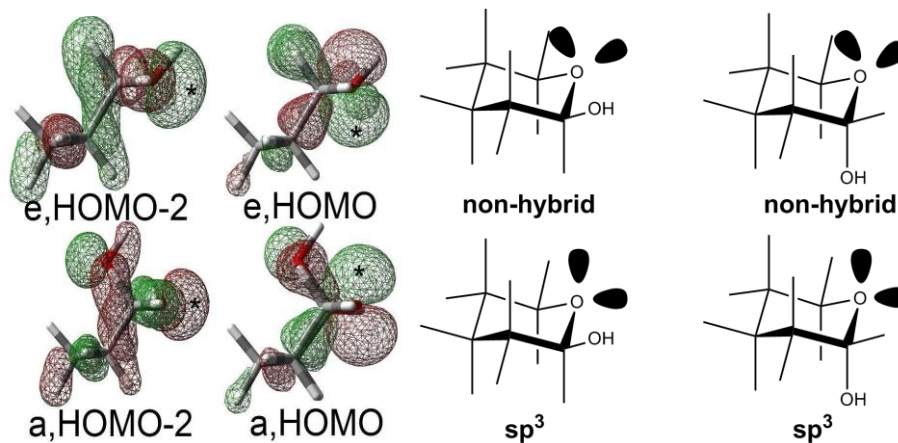
Geometriile acestor modele au fost optimizate cu funcționala BP86<sup>17,18</sup>, cu setul de bază 6-31G\*\* implementat în programul Spartan<sup>19</sup>. Pentru calcule SCF, s-a folosit un grid fin iar criteriile de convergență setate au fost standard. Analiza NBO s-a făcut la nivel DFT BVP86 / 6-31G\*\* în vid folosind implementările din programul Gaussian09<sup>2</sup> și aplicând criteriile de convergență SCF standard.

Orbitalii moleculari pentru izomerii axial și ecuatorial ai tetrahidropiran-2-olului, unul din cei mai simpli compuși ce prezintă efect anomic, au fost calculați la nivel DFT. Se observă că una din perechile neparticante ale oxigenului piranoid este perpendiculară pe planul C-O-C (în HOMO), în timp ce cealaltă pereche a aceluiași atom de oxigen este aflată în acest plan (HOMO-2 în izomerul ecuatorial, HOMO-1 în cel axial). Astfel, atomul de oxigen piranoid are doi orbitali p perpendiculari unul pe altul.

Această situație contravine hibridizării  $sp^3$  invocate la discutarea efectului anomic și întâlnită la atomii de oxigen din chimia organică. Doi orbitali p perpendiculari unul pe altul într-un atom neimplicat în legături multiple pot fi cel mai bine explicați ca ținând de un atom nehibridizat.

Această situație, cu un atom de oxigen nehibridizat, ridică o problemă conformațională – substituenții găsiți în poziții ecuatoriale la atomii de carbon legați direct la oxigenul piranoid se vor găsi conformație *eclipsată* cu una din perechile neparticante ale atomului de oxigen, fiind astfel defavorizat energetic, cf. Figura 1.4.2. *Această observație constituie o explicație plauzibilă pentru efectul anomic.*

Conformația *eclipsată* indusă de absența hibridizării la atomul de oxigen anomic este motivul principal al efectului anomic.



**Figura 1.4.2. Stânga:** Orbitalii de frontieră calculați pentru tetrahidropiran-2-ol, prezentând cele 2 perechi neparticipante ale atomului de oxigen piranoid (fiecare lob este marcat cu un simbol \*), cu un unghi între ei de 90°. **Dreapta:** Compararea efectelor sterice ale atomului de oxigen piranoid hibridizat  $sp^3$  vs ne-hibridizat din modelele studiate aici; sunt marcate perechile neparticipante de la oxigen.

Informațiile obținute prin analiza orbitalilor de legătură naturali (NBO) arată că una din perechile neparticipante ale oxigenului de la conformerul ecuatorial are un caracter de 56.4% s și 43.6% p, în timp ce orbitalul celeilalte perechi neparticipante este 0.3% s și 99.7% p, însemnând că doar una dintre ele nu este un hibrid (Tabelul 1.4.1).

Aceste date constituie argumente pentru o descriere  $sp^2$  a oxigenului piranoid. Această descriere este în conformitate cu observațiile referitoare la orientarea spațială făcute pe modele de oxigen.

**Tabelul 1.4.1.** Analiza NBO a oxigenului piranoid din conformerul ecuatorial. Sunt prezentate doar perechea neparticipantă și orbitalii Rydberg.

OT	Conformerul ecuatorial		Conformerul axial	
	Occ	% Hibridizare	Occ	Coefficienți/ Hibrizi
LP(1)	-1.97	s 56.42% p 43.58%	-1.96	s 49.61% p 50.39%
LP(2)	-1.93	s 0.36% p 99.64%	-1.90	s 0.87% p 99.13%
RY*1	-5.97e-3	s 16.75% p 83.25%	-5.12e-3	s 1.26% p 98.74%
RY*2	-2.40e-3	s 22.45% p 77.55%	-2.23e-3	s 6.57% p 93.43%
RY*3	-6.80e-3	s 11.55% p 88.45%	-16.0e-3	s 44.75% p 55.25%
RY*4	-4.70e-3	s 12.73% p 87.27%	-1.0e-3	s 10.76% p 89.24%

Abrevieri. OT: Tip de orbital; Occ: Ocupare. LP: orbital neparticipant; RY\*: orbital Rydberg.

## Capitolul 2. Studii computaționale asupra unor complecși bioanorganici: studii de caz asupra interacțiunilor dictate de către legăturile slabe/necovalente

### 2.1. Dinamica metaloproteinelor. Parameterizare și considerații generale

În această secțiune ne concentrăm asupra construcției parametrilor câmpului de forțe AMBER<sup>20</sup> necesari pentru studiul anumitor situsuri active conținând metale tranzitionale, parametri ce vor fi utilizați în studiile următoare.

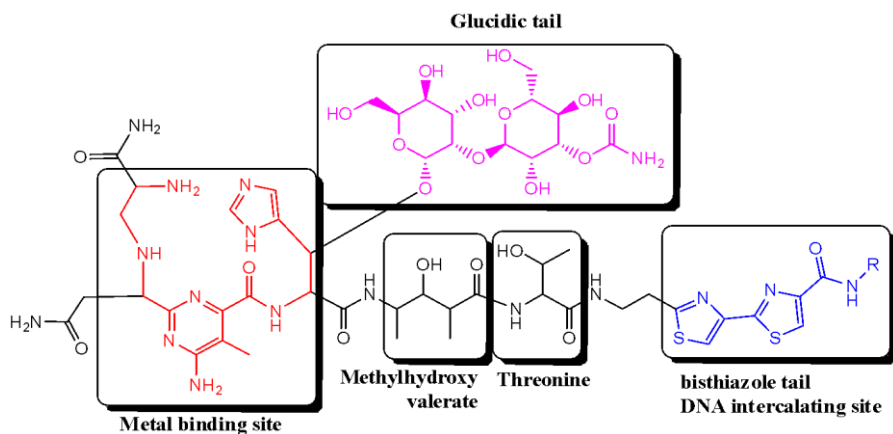
Una din speciile pentru care am dezvoltat astfel de parametri este bleomicina un medicament anticancer ce secționează catena de ADN, prin intermediul unui centru metalic pe bază de fier sau cobalt, conform unui mecanism de reacție încă incomplet elucidat. Este prezentată și dezvoltarea de parametri pentru hemeritrină. Hemeritrina reprezintă o provocare datorită situsului activ cu proprietăți paramagnetice ce conține doi atomi de fier - ceea ce constituie un caz deosebit pentru calculele teoretice. Pentru gruparea hemică am completat parametrii de câmp de forță cu proprii noștri parametri special dezvoltați pentru legăturile apropiate de atomul de fier. Aceste rezultate au fost apoi folosite la studii de dinamică a complexului haptoglobină-hemoglobină, docking, și dinamică pe mioglobină și hemoglobină.

Pentru obținerea acestor parametri, se selectează din baza de date cu proteine o structură de metalo-proteină. Optimizarea geometriei modelelor truncate s-a realizat la nivel de teorie MP2<sup>25-27</sup> cu setul de bază 6-311G\*\* implementat în programul Gaussian 09<sup>5</sup>. Acest model cu energia minimizată s-a folosit la calculele ulterioare.

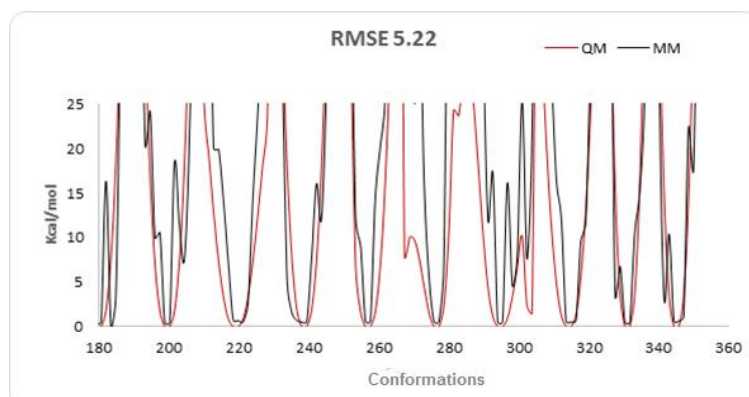
Sarcinile au fost obținute prin metoda RESP<sup>28</sup>. Pentru determinarea tipului de atom s-a folosit programul AntechAMBER. Modulul Leap inclus în AMBERTools s-a utilizat pentru obținerea parametrilor lipsă din AMBER FF 99 SB; unii parametri au fost preluați din AMBER03 FF sau GAFF. Lista parametrilor lipsă a fost apoi menținută pentru etapa următoare. Au fost apoi atribuiți prin analogie parametri van der Waals-Lennard Jones. Parametrii referitori la unghiuri și legături au fost calculați folosind matricea Hessiană calculată la nivel DFT cu aceeași funcțională și set de bază. Parametrii diedrici au fost determinați prin crearea unor grafice PES pentru fiecare unghi diedru și optimizând din nou la nivel DFT conform metodologiei menționate anterior.

Valorile RMSE obținute pentru bleomicină (Figura 2.1.1) sunt departe de parametrii torsionali acceptabili (Figura 2.1.2), pentru care o limită normală ar trebui să fie de sub 1 Å

RMSE; cu toate acestea este posibil să observăm că setul de parametri poate determina corect conformațiile de minim din datele QM – și, cel mai important, combinația acestor parametri cu date QM a condus la rezultate QM/MM având valori RMSD foarte bune, de sub 0.5 Å.



**Figura 2.1.1.** Structura bleomicinei (BLM). R = CH<sub>2</sub>S<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>



**Figura 2.1.2.** Bleomicina. Validarea parametrilor diedrici pentru bleomicină, pentru menținerea clarității sunt arătați doar 360 de conformeri.





Un model teoretic al catenelor complexului de haptoglobină umană cu hemoglobină  $\alpha$  și  $\beta$  [Hp-  $\alpha$ Hb;  $\beta$ Hb] a fost construit prin tehnici de homologie și MD. Catenele laterale inițiale au fost preluate de la complexul corespunzător pentru porc, iar zonele lipsă au fost minimizezate prin același protocol de mecanică moleculară descris mai sus.

Secvența de plecare pentru studiul de homologie este [>gi|386783|gb|AAA88080.1|haptoglobin \[Homo sapiens\]](#). Ca și referință s-a folosit structura cu ID PDB **4F40**.

Calcululele MM/MD au fost realizate folosind programul YASARA <sup>32</sup> cu câmpul de forțe AMBER <sup>20</sup> 03FF și PBC, în condiții fiziologice într-o cutie cubică de apă ce a fost modelată la 5 Å distanță față de oricare atom din proteină. Sistemul a fost minimizat energetic, echilibrat la condiții NVT și NPT și testat 5 ns în condiții NPT, iar la final oprit și minimizat din nou pentru a obține conformația finală.

Secvențele Hp de *Sus scrofa* și *Homo sapiens* Hp au o identitate de 74.11 %, conform determinării realizate cu programul UCSF Chimera <sup>14</sup> pe o secțiune truncată a proteinei.

O forță motrice cheie pentru studiul nostru, cât și pentru alte experimente îl reprezintă atribuirea corectă a semnalelor radicalilor liberi din spectrele EPR ale hemoglobinei ce interacționează cu peroxid atât in vitro cât și in vivo.<sup>6</sup>

Datele de accesibilitate la solvent (SAS) par să confirme Y145, Y35 și Y24 ca și locații probabile pentru radicalul Hb – în același timp infirmând Y42, Y130 și Y140 (cf. Tabelul 2.2.1).

**Tabelul 2.2.1** Contribuția la Suprafața de Solvent Accesibilă (SAS) pentru tirozinele alese din subunitățile  $\alpha$  și  $\beta$  din hemoglobină. Numerele prezentate reprezintă contribuțiile la SAS totală în Å<sup>2</sup>.

Structure	Y42. $\alpha$	Y140. $\alpha$	Y35. $\beta$	Y145. $\beta$	Y130. $\beta$	Y24. $\alpha$
Hb X-Ray	23	17	21	59	1	9
Hb Ave	26	50	35	85	4	63
Hp X-Ray complex	59	16	17	4	2	4
Hp Ave complex	59	49	21	72	4	45

Pentru Tyr42 legăturile de hidrogen asociate fenolului rămân în general neschimbate la legarea la Hp. Datele noastre reprezintă în cel mai bun caz o mică dovadă pentru interpretarea că Tyr42 este locația radicalului Hb și Hb/Hp observat experimental. Nici unul din celelalte fragmente de Tyr nu a fost determinat ca fiind de interes pentru schimbări asociate legăturilor de hidrogen.

Un alt argument este schimbarea unghiului diedru corespunzător planarității ciclului Tyr la trecerea de la tetramer Hb la complex Hp:Hb (Tabelul 2.2.2). Valorile de difracție cu raze X și

MD  $\theta$  par a fi în favoarea Tyr42. Totuși, datele MD sugerează că și Tyr35 este un bun candidat, și ținând cont de limitele metodei, Tyr145 și Tyr140 nu pot fi excluse. În favoarea Tyr130 stau datele cristalografice nu însă și calculele MD. Tyr42 este un candidat improbabil.

**Tabelul 2.2.2.** Valorile unghiurilor diedre  $\theta$  pentru tirozină (exprimate în grade). Sunt prezentate doar valorile cele mai mici ale celor două unghiuri complementare (complementul se obține prin scădere din  $120^\circ$ ).

Element	Y42	Y145	Y35	Y140	Y130. $\beta$	Y24. $\alpha$
Hb X-Diff	47	10	35	37	46	11
Hb ave	57	47	48	59	37	42
Hp X-Diff	54	39	51	53	54	23
Hp ave	47	30	45	46	7	3

În concluzie, parametrii legați de hidrofobicitate confirmă Y145, Y35 și Y24 ca locații probabile pentru radicalul Hb – și improbabile Y42, Y130 și Y140. Valorile  $\theta$  par a favoriza Y42, datele de MD susținând și Y35 iar într-o mai mică măsură Y145 și Y140. Y130 și Y24 apar ca fiind candidații cei mai puțin favorabili conform valorilor  $\theta$  mai ales din perspectiva datelor MD. Per total Y35 și Y145 par a fi candidații cu cele mai puține argumente de nesatisfacere a celor două criterii (valori  $\theta$  și hidrofobicitate deduse din spectrele de rezonanță electronică de spin, RES, măsurate experimental pentru radicali liberi induși de către peroxid în hemoglobină și respectiv în complexul hemoglobină-haptoglobină.

### 2.3. Dinamica hemeritrinei și a derivaților cu hemeritrină

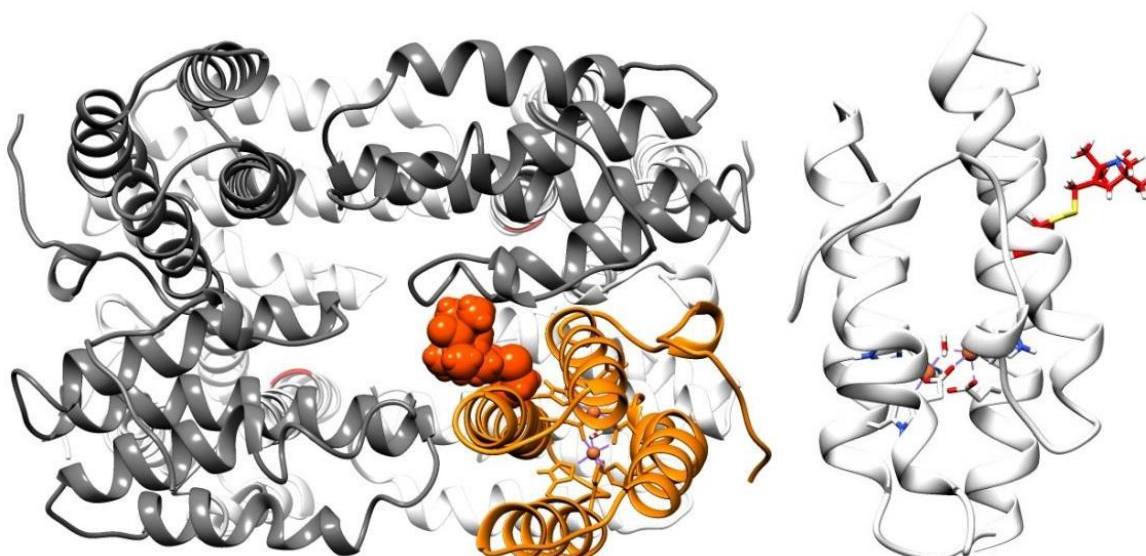
Hemeritrina (Hr) este o proteină homo-octamerică  $\alpha$ -helicală cu un situs activ non-heminic di-feric, fiind găsită în viermi marini și bacterii. A fost studiată ca posibilă alternativă la hemoglobină ca materie de plecare pentru obținerea de transportori de oxigen artificiali (“substitute de sânge”) atât în formă PEG-ilată sau în formă de glutaraldehidă polimerizată<sup>33-35</sup>. Stabilitatea acestor materiale în condiții fiziologice relevante a fost puțin studiată până acum. Recent (1-oxil-2,2,5,5-tetrametilpirolin-3-methyl)metantiosulfonatul (MTSSL) a fost atașat la poziția C51 a fiecărui monomer al Hr pentru a analiza semnalele EPR ce pot oferi informații asupra stabilității structurii octamerice Hr<sup>36</sup>. Aici prezentăm un studiu teoretic asupra comportamentului Hr marcate cu MTSSL.

Simulările MM/MD au fost realizate folosind YASARA<sup>32</sup>. Structurile Hr monomerice și octamerice au fost modelate folosind structura PDB ID 1I4Y<sup>37</sup> obținută prin difracție de raze X și raportată pe siteul Protein Data Bank<sup>38</sup>; geometria a fost minimizată din punct de vedere

energetic la nivelul de teorie semiempirică PM6. Fiecăruia dintre monomeri i-a fost atașat MTSSL în poziția Cys51 oținându-se astfel la structurile prezentate în Figura 2.3.1.

Fiecare sistem a fost solvatat cu apă în sistemul TIP3P<sup>42</sup> simulând condițiile fiziologice într-un cub cu latura de 10 Å. Fiecare sistem a fost supus unei minimizări, echilibrări în condiții NVT iar apoi NPT; sampling-ul a fost rulat cu un pas de 5 ns iar imaginile traiectoriei au fost salvate la fiecare 3 ps.

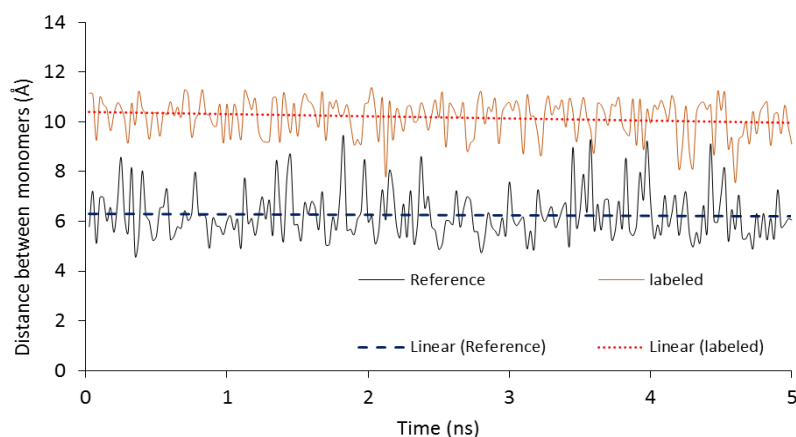
**Figura 2.3.1. Stânga-** Monomerul Hr MTSSL (panglici portocalii cu marcajul MTSSL ca suprafață VDW portocalie) marcând la poziția C51 nteracțiunea cu monomerii vecini (panglici gri). Monomerii Hr (care nu sunt vecini și nu interacționează cu MTSSL) sunt reprezentați sub formă de panglici albe, pentru claritate. **Dreapta-** Monomerul Hr (panglici albe) marcajele MTSSL sunt în model stick, iar centrii metalici, Fe(Cl)-OH-Fe, sunt reprezentați în model 'ball-and-stick'.



**Figure 2.3.1. Left-** Hr monomer-MTSSL (orange ribbons with MTSSL label in orange VDW surfaces) labeled at C51 position interacting with neighbor monomers (gray ribbons). Hr back monomers (not neighbors, not interacting with MTSSL label) are represented in white ribbons for clarity. **Right-** Hr monomer (in white ribbons) MTSSL label in red ball and sticks, metallic center, Fe(Cl)-OH-Fe, represented in balls and sticks.

Figura 2.3.2 arată că fragmentul de cisteină cu marcaj de spin se află suficient de aproape de interfața intermonomerică pentru a afecta interacțiunile monomer-monomer. Într-adevăr, distanța dintre atomii de carbon  $\alpha$  a Cys51 marcată (Cyx51) dintr-o catenă și Asp23 a catenei vecine este în medie mai lungă cu 5 Å în structura cu marcaj de spin – o creștere suficientă pentru a împiedica forțele intermoleculare tipice (legături de hidrogen și interacțiuni

hidrofobice). Această diferență la structurile cu geometrie optimizată se menține pe parcursul celor 5 nanosecunde de simulare MD – deși cu o ușoară scădere în timp.



**Figura 2.3.2.** Distanța dintre doi monomeri în octamerul Hr; sunt prezentate Hr nativă și marcată MTSSL. Distanța este măsurată între lanțurile A și B CYX50 C $\alpha$  și Asp23 C $\alpha$ , în modelul Hr octameric. Liniile neagră/albastră prezintă datele și trendul modelului Hr octameric de referință. Liniile maro/roșu prezintă datele și trendul modelului Hr octameric marcat MTSSL.

Datele oferă sprijin pentru interpretarea experimentelor în care Hr este un templat sau materie de pornire pentru substitute de sânge – și deci în formă multimerică și derivatizată chimic cu polietilen glicoli, marcaje de spin și/sau alți reactivi. S-a demonstrat aici că derivatizarea cu marcaj de spin a poziției Cys51 nativă din Hr destabilizează structura octamerică pentru a conduce la o ușoară creștere a accesibilității solventului la centru diferit. Consecințele derivatizării chimice vor constitui dezavantaje funcționale pentru o proteină transportoare de oxigen. Aceasta impune o serie limitări în ceea ce privește relevanța studiilor RES de marcaj de spin cu Hr, și sugerează de asemenea necesitatea unei investigații atente a efectelor procedurilor de PEGilare în contextul candidaților pentru substitute de sânge.

#### 2.4. Legarea antioxidantilor la hemoglobină și mioglobină

În ciuda similarității structurale limitate, ascorbatul și uratul, antioxidanții principali din plasmă, prezintă ambii valori  $K_m$  ridicate pentru Hb. Ne putem gândi la o varietate de compuși cu potențială acțiune biologică care la rândul lor ar putea prezenta afinități cinetice ridicate și dacă în cazul lor ar putea fi detectabili complecși stabili cu Hb.

Datele noastre, nepublicate încă, privitoare la activitatea peroxidazică a Hb și a mioglobinei (Mb) față de acidul galic, rutin, acidul cafeic, și 3-hidroxi flavonă, urmărită în paralel cu ascorbat și urat, conduc la valori  $K_m$  foarte scăzute deși sunt implicate substanțe fără

importanță fiziologică evidentă. Spectrele  $^1\text{H}$  și  $^{13}\text{C}$ -RMN relevă o interacțiune multisitus selectivă, între Hb și moleculele de antioxidant.

Calcululele de docking globină-ascorbat prezentate în acest capitol confirmă într-adevăr interacțiunile multisitus, unele cu afinitate de nivel micromolar.

S-au folosit structurile cu codurile PDB ID 2DXM <sup>46</sup> și 1MBO <sup>47</sup>. Fiecare sistem a fost supus unei minimizări de energie MM/MD 'steepest descent' folosind AMBER <sup>48</sup> și câmpul de forțe 99SB.

Apoi s-a utilizat programul AutoDock Tools <sup>44</sup> pentru studierea rotațiilor și sarcini Gasteiger<sup>45</sup> atribuite fiecărui ligand, și grupării heminice, ce au fost obținute prin calcule la nivel DFT B3LYP/6-311G\*\* și apoi fitate manual cu ajutorul programului Resp implementat în pachetul AMBERToolkit.

Toate calculele de docking prezentate aici au fost realizate cu programele Autodock4 și Autogrid4 <sup>49</sup>. Docking-ul generalizat s-a făcut cu un grid pe toată proteina.

Pentru început s-a făcut un calcul de docking ce lua în considerare întreaga proteină iar după identificarea celor mai bune poziții de docking cele mai bune 3 au fost rafinate printr-un docking localizat folosind un algoritm GA.

Galatul și cafeatul au fost identificați în mod surprinzător ca având afinități mai ridicate pentru Hb comparativ cu doi antioxidanți endogeni din sânge precum ascorbatul și uratul (cf. Tabelul 2.4.1); cu toate acestea ordinea determinată *este* identică cu cea experimentală.

**Tabelul 2.4.1.** Afinitățile Mb și Hb pentru cafeat, galat, urat și ascorbat.

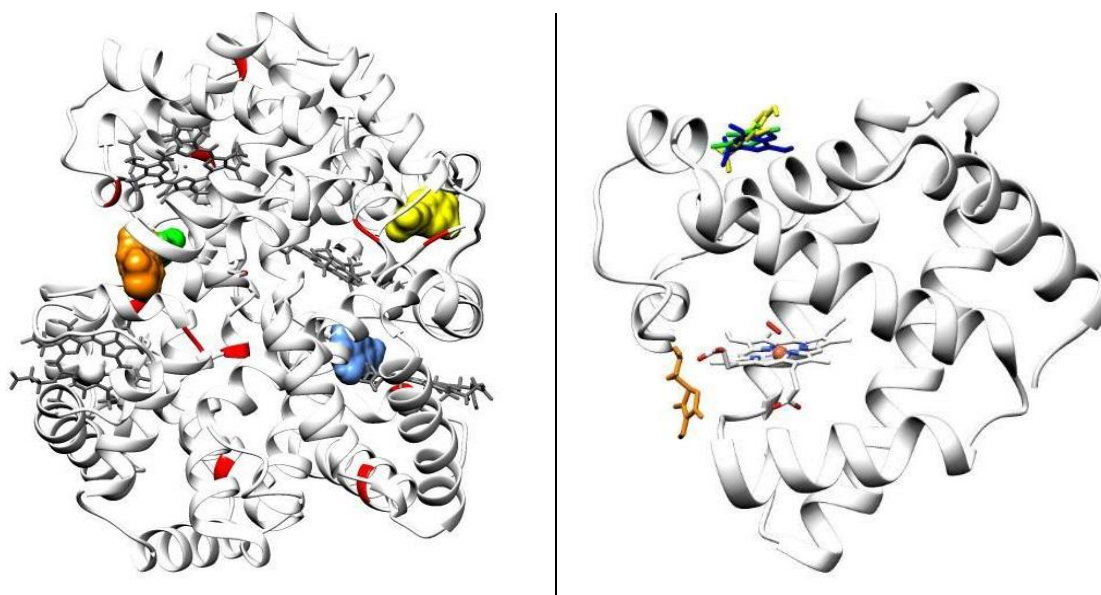
Afinitate pentru:	Trend
Mb	Cafeat > galat >urat>ascorbat
Hb	Galat>cafeat>ascorbat>urat
Hb experimental	Acid galic > acid cafeic >ascorbat>urat

Aminoacizii implicați în defnirea situsurilor de legare a ascorbatului la Hb includ Tyr42 ca fiind poziția de docking cea mai bună. De fapt, această tirozină este unica prezentă în toate cele trei situsuri de legare din Hb, ceonform acestor calcule (Figura 2.4.1 și Tabelul 2.4.2)

Situsurile de legare ale cafeatului în Hb implică dintre toate tirozinele posibile doar Tyr145, care a fost considerată importantă în ceea ce privește reactivitatea redox relevantă din punct de vedere biologic a Hb. Datele noastre din Capitolul 2.2. cu privire la localizarea unui radical tirozil detectat experimental în Hb, sugerează atât Tyr145 cât și Tyr35 ca fiind locațiile

cele mai probabile ale radicalului tirozinic indus de peroxid (pe baza datelor spectrale RES), și posibil implicit și ale situsului de legare a unor antioxidanți capabili să reducă eficient acel radical. (cf. Figura 2.4.1, Tabelul 2.4.2).

Ca și în cazul ascorbatului, galatului și uratului au de asemenea Tyr42 prezentă într-unul dintre cele mai eficiente trei situsuri de legare.



**Figura 2.4.1.** Pozițiile de legare cu afinitatea cea mai mare pentru toți cei 4 liganzi. Mioglobina și hemoglobina sunt reprezentate ca panglici albe, iar gruparea hemică în mod sticks. Liganzii sunt în reprezentare de tip suprafață Van der Waals: Ascorbatul, portocaliu. Cafeatul, galben, Galatul albastru iar Uratul, verde.

**Tabelul 2.4.2.** Rezultatele de docking în situs: Cele mai bune 3 poziții sunt evaluate pe baza energiei de legare (kcal/mol) și a constantei de inhibiție (mM).

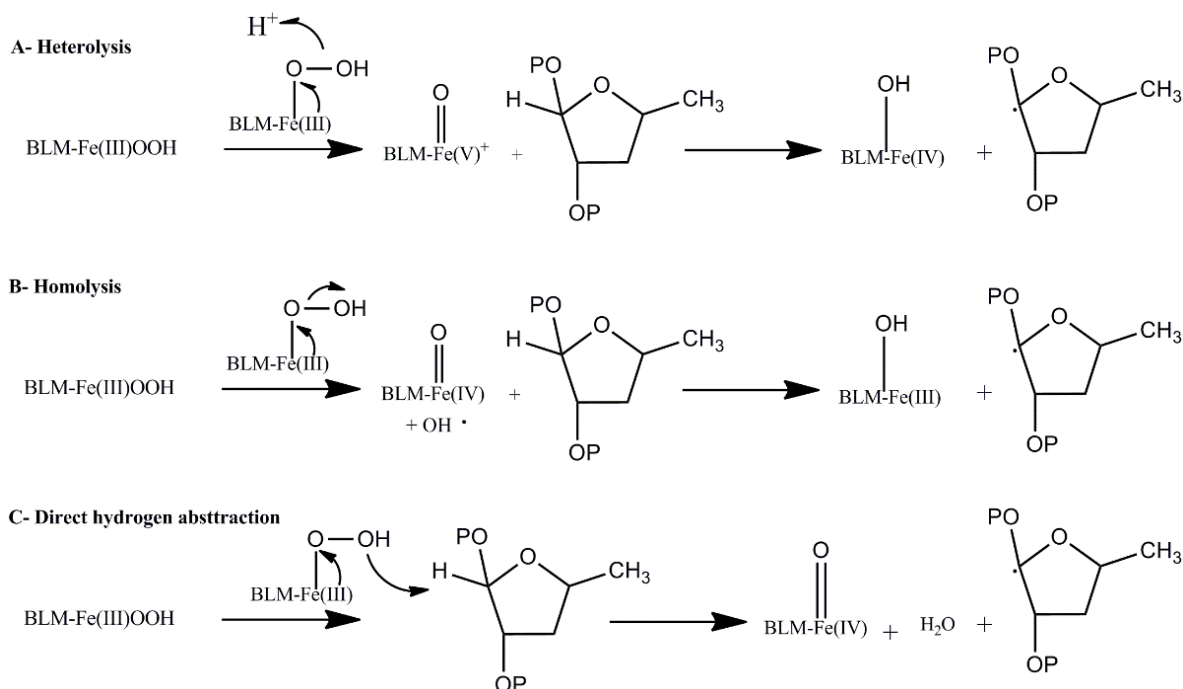
Mioglobină	* Conformații		
	1	2	3
Ascorbat	1	2	3
Energie de legare	-8.3	-7.9	-6.3
Constantă de legare	0.79	2.1	22
Cafeat			
Energie de legare	-10.8	-10.3	-9.2
Constantă de legare	0.01	0.03	0.19
Galat			
Energie de legare	-10.6	-8.8	-7.5
Constantă de legare	0.016	0.37	3.1
Urat			
Energie de legare	-9.1	-8.2	-6.5
Constantă de legare	0.23	0.99	17

Hemoglobină	*Conformații		
	1	2	3
Ascorbat			
Energie de legare	-8.6	-6.6	-3.2
Constantă de legare	0.54	14	2000
Cafeat			
Energie de legare	-10.9	-10.4	-6.9
Constantă de legare	0.01	0.03	8.4
Galat			
Energie de legare	-11.4	-10.1	-9.0
Constantă de legare	0.004	0.420	0.24
Urat			
Energie de legare	-7.9	-7.8	-7.1
Constantă de legare	1.8	1.9	6.4

Unele dintre aceste situsuri de legare sunt conforme cu unele propuneri anterioare bazate pe experimente, prin implicarea unor resturi de tirozină în căi de transport de electroni către sau dinspre situsul hemic. În ciuda datelor experimentale ce sugerează modalități de legare similare pentru toate moleculele mici de antioxidanți (afinitate ridicată, situsuri de legare multiple), sunt relevate diferențe clare între antioxidanții studiați aici prin calcule de docking atât în ceea ce privește locația situsurilor cât și în termeni de energie de interacțiune. S-au găsit dovezi privitoare la implicarea Tyr42 în legarea la Hb a trei dintre cele patru substraturi studiate (ascorbatul și uratul, ca substraturi relevante din sânge, sunt incluse pe această listă), dar de asemenea Tyr145 (cu urat și cafeat) și Tyr35 (cu galat).

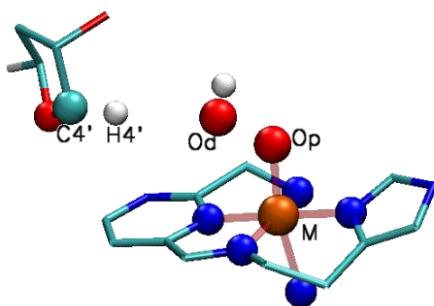
## 2.5. Interacțiuni ADN - ligand. Bleomicina.

Bleomicina (BLM, Figura 2.1.2) este un medicament antitumoral cu utilizare clinică. Cu toate acestea mecanismul de reacție prin care catena dublă de ADN este scindată generând doi produși de oxidare <sup>1-3</sup>, nu este înțeles complet fiind în continuare subiect de dezbatere (2.5.1). Starea cheie a BLM este complexul feric-hidroperoxo, notat în mod comun ca ABLM (bleomicina activată). Asupra structurii acestuia s-a concentrat studiul de față – examinând comparativ structuri înrudite de cobalt, și două stări diferite de oxidare ale metalului.



**Figura 2.5.1.** Teorii despre mecanismul de reacție dintre ABLM și citosina C4'.

Toate calculele MM/MD raportate aici asupra BLM s-au realizat simulând condiții fiziologice într-o cutie de apă cubică de 10 Å față de proteină și implementând câmpul de forțe AMBER<sup>48</sup> 03, dar și calcule YASARA folosind ABLM cu Fe(III) și Co(III), și calcule folosind GROMACS<sup>53</sup> realizate pe BLM cu Fe(II), Fe(III), Co(II) și Co(III), și calcule semi-empirice/MM/MD doar pentru Fe(III)-BLM. Parametrii pentru ABLM au fost obținuți conform descrierii din Secțiunea 2.1 iar nivelele de teorie PM6<sup>11</sup> și AMBER<sup>48</sup> 03 FF au fost cele implementate în AMBERTools versiunea 14<sup>48</sup>. Atomii definiți pentru regiunea semi-empirică în calculul QM/MM sunt descriși în Figura 2.5.2; sarcina fierului a fost setată în acest caz la 3+. Restul atomilor au fost tratați la nivel clasic MM/MD.



**Figura 2.5.2.** Modelul complexului Bleomicină-DNA folosit pentru definirea regiunii QM pentru calculele QM/MM. Sunt prezentați doar atomii de hidrogen relevanți. Figura a fost obținută cu programul VMD<sup>58</sup>.



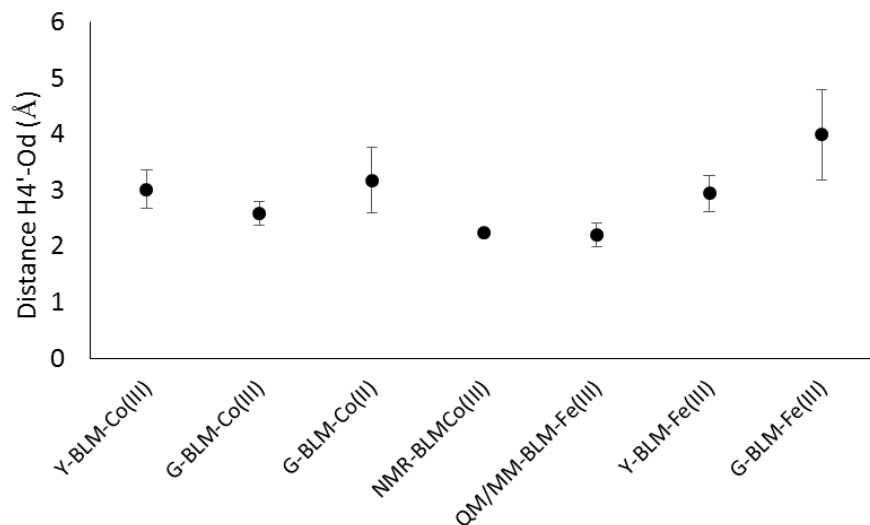
Rezultatele obținute aici sugerează la prima vedere, în concordanță cu anterioare date experimentale și teoretice, că majoritatea structurilor nu permit o bună accesibilitate a solventului la fragmentul peroxidic. Totuși, datele GROMACS și QM/MM (nu însă și YASARA) indică de asemenea că situsul peroxidic se deschide tranzitoriu expunând o suprafață de la 3.5 Å<sup>2</sup> până la 21 Å<sup>2</sup> a fragmentului peroxidic (valorile exacte variază în funcție de metodologie, metal și starea de oxidare). Pentru Fe(III) ABLM, care este cazul cel mai relevant, GROMACS determină o suprafață de ~6 Å<sup>2</sup> (Tabelul 2.5.1). Figura 2.5.3 ne oferă o ilustrare grafică a acestui din urmă caz.

Oxigenul distal al fragmentului metal-peroxo este localizat majoritatea timpului într-un interval de 2.5 până la 5 Å de cel mai apropiat atom de hidrogen din ADN. Distanțele NMR-medii ale structurilor cu Co sunt în zona de valori mici a acestui interval, sugerând contacte apropiate. Calculele noastre QM nepublicate, cât și cele raportate anterior<sup>21,22</sup> sugerează că la asemenea distanțe mici clivajul facil al legăturii O-OH este de neevitat, fiind urmat de inserția grupării OH peroxidic în riboză.

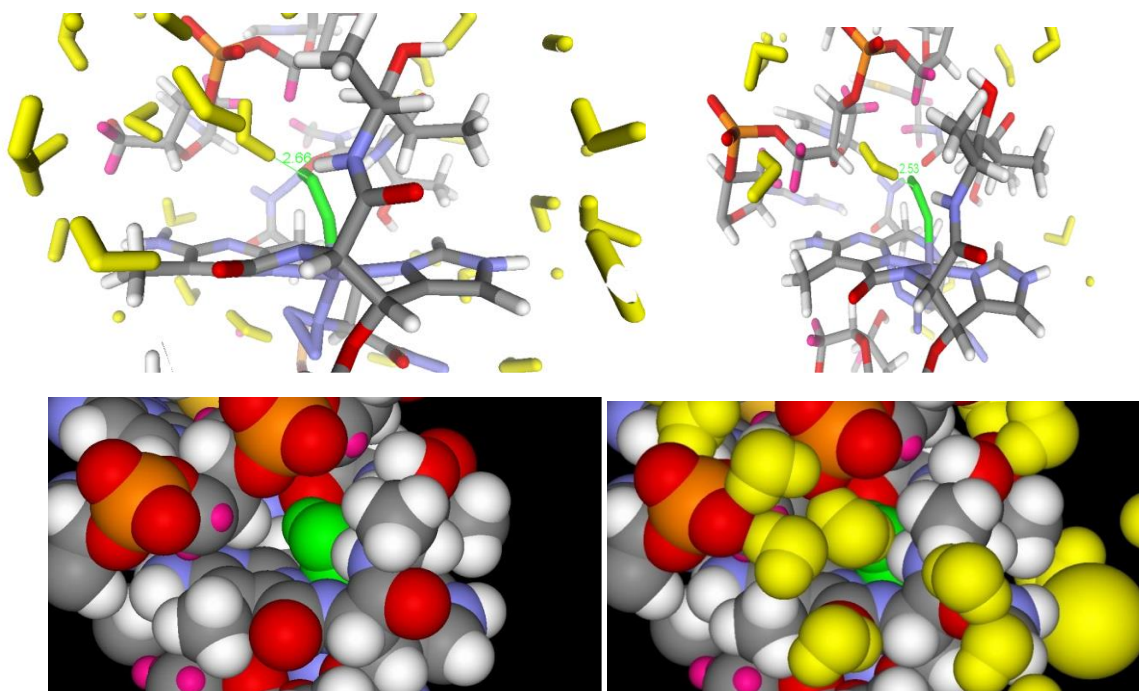
**Tabelul 2.5.1.** SAS per atom de-a lungul traiectoriei. Toate valorile sunt prezentate în Å<sup>2</sup>.

Program	ABLM	Atom	Suprafața Medie	Deviația Standard	SAS Maxim
GROMACS	Co(II)	Op	0.00	0.00	0.00
		Od	0.01	0.07	1.00
	Co(III)	Op	0.00	0.00	0.00
		Od	0.00	0.02	0.33
	Fe(II)	Op	1.85	0.31	0.33
		Od	2.52	0.40	0.33
	Fe(III)	Op	1.81	0.31	0.00
		Od	2.55	0.41	0.33
YASARA	Co(III)	Op	0.00	0.00	0.00
		Od	0.00	0.00	0.00
	Fe(III)	Op	0.00	0.00	0.00
		Od	0.00	0.00	0.00
AMBERTool s	Fe(III)	Op	0.00*	0.85	0.00*
		Od	0.00*	1.60	3.48

\* Valorile calculate sunt negative. Valoarea prezentată este calitativă.



**Figura 2.5.3.** Comparația rezultatelor obținute folosind diverse programe de dinamică moleculară clasică. Etichetele sunt următoarele: Prima literă: Y = YASARA, G= GROMACS, NMR= MD cu constrângeri NMR conform Stubbe et. al.<sup>59</sup> (deviația standard +/-0.003 Å). QMMM= calcule de dinamică QM/MM rulate cu AMBERTools. Stările de oxidare ale metalului sunt indicate pe axa x.



**Figura 2.5.4.** Ilustrarea contactelor peroxid-solvent în timpul simulărilor de dinamică moleculară ABLM-DNA pentru sisteme Fe(III) și Fe(II) în GROMACS. **Sus:** Reprezentare stick (distanțele peroxid-apă și oxigen-oxigen sunt marcate în verde; Fe(III) în stânga iar Fe(II) în dreapta); **jos:** reprezentare space-fill *cu* (în dreapta) și *fără* (stânga) prezentarea solventului. Culorile: apa de solvatare – galben; peroxidul– verde; celelalte – CPK standard.

Figura 2.5.4 ilustrează că moleculele de apă moleculele de apă, conform calculelor de dinamică moleculară, intră tranzitoriu în contact direct cu ligandul hidroperoxo. Dacă aceste date sunt corecte, atunci imaginea de ansamblu desprinsă în urma acestor calcule asupra interacțiunii ABLM-DNA este cea în care legătura oxigen-oxigen este inițial scindată pentru a genera un intermediar de valență ridicată iar acesta ulterior va oxida deoxiriboza. Că acest fapt se întâmplă direct sau prin intermediul unor radicali hidroxil proveniți de la solvent și generați în situsul activ prin homoliza FeO-OH, rămâne a fi studiat prin intermediul unor calcule QM/MM bazate pe DFT.

### Bibliografie selectivă

- 1 Zhao, Y., Yan, Z. & Truhlar, D. G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06 functionals and 12 other functionals. *Theor. Chem. Acc.* **119**, 525-525, doi:10.1007/s00214-007-0401-8 (2008).
- 2 Gaussian 09 (Gaussian, Inc., Wallingford, CT, USA, 2009).
- 3 Malkov, S. N., Živković, M. V., Beljanski, M. V., Hall, M. B. & Zarić, S. D. A reexamination of the propensities of amino acids towards a particular secondary structure: classification of amino acids based on their chemical structure. *J. Mol. Model.* **14**, 769-775, doi:10.1007/s00894-008-0313-0 (2008).
- 4 Spartan v. Spartan 5.0 (, Inc., 18401 Von Karman Avenue Suite 370, Irvine, CA 92612 U.S.A.).
- 5 Gaussian v. 09a (Wallingford CT, 2009).
- 6 Hypercube, I. *HyperChem Release 7 for Windows: Getting Started.* (2002).
- 7 Stewart, J. J. P. *et al. MOPAC Manual (version 3.10): A General Molecular Orbital Package -- Cray-XMP Version.* (1986).
- 8 Wavefunction, I. *Spartan Physical Chemistry Edition - Tutorial and Activities.* (2006).
- 9 Korth, M., Martin, K., Michal, P., Jan, Ř. & Pavel, H. A Transferable H-Bonding Correction for Semiempirical Quantum-Chemical Methods. *J. Chem. Theory Comput.* **6**, 344-352, doi:10.1021/ct900541n (2010).
- 10 Klamt, A. & Schuurmann, G. Cosmo - a New Approach to Dielectric Screening in Solvents with Explicit Expressions for the Screening Energy and Its Gradient. *J Chem Soc Perk T 2*, 799-805, doi:Doi 10.1039/P29930000799 (1993).
- 11 Stewart, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J. Mol. Model.* **13**, 1173-1213, doi:10.1007/s00894-007-0233-4 (2007).
- 12 Stewart, J. J. MOPAC: a semiempirical molecular orbital program. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **4**, 1-105 (1990).
- 13 Zhao, Y. & Truhlar, D. G. Density functionals with broad applicability in chemistry. *Acc. Chem. Res.* **41**, 157-167, doi:10.1021/ar700111a (2008).
- 14 Gaussian v. 09A (2009).
- 15 AMBER v. 2014 (University of California, San Francisco.).
- 16 Ryckaert, J.-P., Jean-Paul, R., Giovanni, C. & Berendsen, H. J. C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* **23**, 327-341, doi:10.1016/0021-9991(77)90098-5 (1977).

- 17 Becke, A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A* **38**, 3098-3100 (1988).
- 18 Perdew, J. P. Erratum: Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas. *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* **34**, 7406-7406, doi:10.1103/physrevb.34.7406 (1986).
- 19 Wavefunction, I. *Getting Started with Spartan (Second Edition)*. (2003).
- 20 AMBER v. 99SB (University of California, San Francisco., 2015).
- 21 Case, D. A. *et al.* The AMBER biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* **26**, 1668-1688, doi:10.1002/jcc.20290 (2005).
- 22 Mayne, C. G., Saam, J., Schulten, K., Tajkhorshid, E. & Gumbart, J. C. Rapid parameterization of small molecules using the Force Field Toolkit. *J. Comput. Chem.* **34**, 2757-2770, doi:10.1002/jcc.23422 (2013).
- 23 Mayne, C. G., Gumbart, J. C. & Emad, T. The Force Field Toolkit: Software for the Parameterization of Small Molecules from First Principles. *Biophys. J.* **104**, 31a, doi:10.1016/j.bpj.2012.11.209 (2013).
- 24 Oda, A., Yamaotsu, N. & Hirono, S. New AMBER force field parameters of heme iron for cytochrome P450s determined by quantum chemical calculations of simplified models. *J. Comput. Chem.* **26**, 818-826, doi:10.1002/jcc.20221 (2005).
- 25 Head-Gordon, M., Martin, H.-G., Pople, J. A. & Frisch, M. J. MP2 energy evaluation by direct methods. *Chem. Phys. Lett.* **153**, 503-506, doi:10.1016/0009-2614(88)85250-3 (1988).
- 26 Sæbø, S., Svein, S. & Jan, A. Avoiding the integral storage bottleneck in LCAO calculations of electron correlation. *Chem. Phys. Lett.* **154**, 83-89, doi:10.1016/0009-2614(89)87442-1 (1989).
- 27 Frisch, M. J., Martin, H.-G. & Pople, J. A. A direct MP2 gradient method. *Chem. Phys. Lett.* **166**, 275-280, doi:10.1016/0009-2614(90)80029-d (1990).
- 28 Cornell, W. D., Piotr, C., Bayly, C. I. & Kollmann, P. A. Application of RESP charges to calculate conformational energies, hydrogen bond energies, and free energies of solvation. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 9620-9631, doi:10.1021/ja00074a030 (1993).
- 29 Becke, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **98**, 5648, doi:10.1063/1.464913 (1993).
- 30 Chiabrando, D., Deborah, C., Francesca, V., Veronica, F. & Emanuela, T. in *Acute Phase Proteins - Regulation and Functions of Acute Phase Proteins* (2011).
- 31 Stoedkilde, K., Torvund-Jensen, M., Moestrup, S. K. & Andersen, C. B. F. Structure of T. brucei haptoglobin-hemoglobin receptor binding to human haptoglobin-hemoglobin. doi:10.2210/pdb4wjg/pdb (2014).
- 32 Krieger, E. & Vriend, G. YASARA View - molecular graphics for all devices - from smartphones to workstations. *Bioinformatics* **30**, 2981-2982, doi:10.1093/bioinformatics/btu426 (2014).
- 33 Hathazi, D. *et al.* Oxidative protection of hemoglobin and hemerythrin by cross-linking with a nonheme iron peroxidase: potentially improved oxygen carriers for use in blood substitutes. *Biomacromolecules* **15**, 1920-1927, doi:10.1021/bm5004256 (2014).
- 34 Fischer-Fodor, E., Mot, A., Deac, F., Arkosi, M. & Silaghi-Dumitrescu, R. Towards hemerythrin-based blood substitutes: comparative performance to hemoglobin on human leukocytes and umbilical vein endothelial cells. *J. Biosci.* **36**, 215-221 (2011).
- 35 Kryatov, S. V., Rybak-Akimova, E. V. & Schindler, S. Kinetics and mechanisms of formation and reactivity of non-heme iron oxygen intermediates. *Chem. Rev.* **105**, 2175-2226, doi:10.1021/cr030709z (2005).
- 36 Takacs, I. M., Augustin, M., Radu, S.-D. & Grigore, D. EPR investigation of libration motion of spin labeled hemerythrin. *J. Mol. Struct.* **1073**, 18-23, doi:10.1016/j.molstruc.2014.01.074 (2014).
- 37 Farmer, C. S. *et al.* The crystal structures of *Phascolopsis gouldii* wild type and L98Y methemerythrins: structural and functional alterations of the O<sub>2</sub> binding pocket. *J. Biol. Inorg. Chem.* **6**, 418-429, doi:10.1007/s007750100218 (2001).
- 38 Berman, H. M. *et al.* The Protein Data Bank. *Nucleic acids research* **28**, 235-242 (2000).

- 39 Frisch, Æ., Roy Dennington, I. I., Keith, T. A. & Millam, J. *GaussView Reference: Version 4.* (2007).
- 40 AMBER v. 2003 (2003).
- 41 Essmann, U. *et al.* A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* **103**, 8577, doi:10.1063/1.470117 (1995).
- 42 Jorgensen, W. L. Quantum and statistical mechanical studies of liquids. 10. Transferable intermolecular potential functions for water, alcohols, and ethers. Application to liquid water. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 335-340, doi:10.1021/ja00392a016 (1981).
- 43 Lee, C., Yang, W. & Parr, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B Condens. Matter* **37**, 785-789 (1988).
- 44 Morris, G. M., Goodsell, D. S., Huey, R. & Olson, A. J. Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: parallel applications of AutoDock 2.4. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **10**, 293-304 (1996).
- 45 Gasteiger, J., Johann, G. & Mario, M. A new model for calculating atomic charges in molecules. *Tetrahedron Lett.* **19**, 3181-3184, doi:10.1016/s0040-4039(01)94977-9 (1978).
- 46 Chatake, T. *et al.* Protonation states of buried histidine residues in human deoxyhemoglobin revealed by neutron crystallography. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 14840-14841, doi:10.1021/ja0749441 (2007).
- 47 Phillips, S. E. V. Structure and refinement of oxymyoglobin at 1.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **142**, 531-554, doi:10.1016/0022-2836(80)90262-4 (1980).
- 48 AMBER v. 14 (2014).
- 49 Morris, G. M., Ruth, H. & Olson, A. J. in *Current Protocols in Bioinformatics* (2002).
- 50 Li, C.-L., Chun-lian, L., Yu, S., Dong-yun, L. & Xi-cheng, W. in *Lecture Notes in Computer Science* 1159-1163 (2005).
- 51 Dewar, M. J. S., Zoebisch, E. G., Healy, E. F. & Stewart, J. J. P. Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 3902-3909, doi:10.1021/ja00299a024 (1985).
- 52 Cerutti, D. S., Duke, R. E., Darden, T. A. & Lybrand, T. P. Staggered Mesh Ewald: An extension of the Smooth Particle-Mesh Ewald method adding great versatility. *Journal of chemical theory and computation* **5**, 2322, doi:10.1021/ct9001015 (2009).
- 53 Pronk, S. *et al.* GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics* **29**, 845-854, doi:10.1093/bioinformatics/btt055 (2013).
- 54 Cheatham, T. E. & Kollman, P. A. Insight into the stabilization of A-DNA by specific ion association: spontaneous B-DNA to A-DNA transitions observed in molecular dynamics simulations of d[ACCCGCGGGT]<sub>2</sub> in the presence of hexaamminecobalt(III). *Structure* **5**, 1297-1311, doi:10.1016/s0969-2126(97)00282-7 (1997).
- 55 Bryce, R. Manchester's AMBER force field data base.
- 56 Shen, T., Wong, C. F. & McCammon, J. A. Atomistic Brownian dynamics simulation of peptide phosphorylation. *Journal of the American Chemical Society* **123**, 9107-9111 (2001).
- 57 Chaudhri, A. & Lukes, J. R. Velocity and stress autocorrelation decay in isothermal dissipative particle dynamics. *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics* **81**, 026707 (2010).
- 58 Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics* **14**, 33-38, 27-38 (1996).
- 59 Hoehn, S. T., Junker, H. D., Bunt, R. C., Turner, C. J. & Stubbe, J. Solution structure of Co(III)-bleomycin-OOH bound to a phosphoglycolate lesion containing oligonucleotide: implications for bleomycin-induced double-strand DNA cleavage. *Biochemistry* **40**, 5894-5905 (2001).