

Universitatea Babeş-Bolyai  
Facultatea de fizică

Teză de doctorat

Rezumat

---

Simularea numerică a unor procese  
biomoleculare complexe

---

Autor:

Alexandra Farcaş

Conducător de doctorat:

Prof. Dr. Titus Adrian Beu

2018

Cuvinte cheie: simulări de dinamică moleculară, câmp de forțe CHARMM, polietilenimină, poliplex, proteine Ras, stări conformaționale.

# Cuprins

1	Introducere	3
2	Dinamică moleculară	5
	Referințe	6
3	Polietilenimină	7
	Referințe	12
4	Formarea complexului ADN-polietilenimină	14
	Referințe	17
5	Proteinele NRas implicate în semnalizarea celulară	18
	Referințe	22
6	Concluzii	24
7	Mulțumiri	26
8	Lista de lucrări publicate	27

# 1

## Introducere

Soluționarea provocărilor societale (în special bioeconomie, securitate, energie, transport, spațiu, ecoinovare) va depinde, în cele din urmă, de dezvoltarea sectorului sănătății. Deoarece domeniile cheie de cercetare pentru cercetarea în domeniul sănătății se schimbă și se dezvoltă rapid, cercetarea cancerului rămâne un subiect prioritar. Biofizica modernă și biologia moleculară oferă cunoștințe importante în medicină (o provocare centrală este de a investiga comportamentul biomoleculilor). Caracterizarea dinamicii structurale a sistemelor moleculare permite descrierea detaliată a fenomenelor biologice. Descoperirea, dezvoltarea și furnizarea de medicamente pentru a dezvolta de noi strategii terapeutice pentru tratamentul diverselor afecțiuni, prin utilizarea interfeței dintre fizică și biologie pentru a obține o mai bună înțelegere a moleculilor și a semnalizării celulare, au un mare impact asupra provocărilor majore din sănătatea globală.

Dinamica moleculară (MD) permite caracterizarea inaccesibilă experimental a proceselor dinamice la rezoluție atomică. Mai mult, datorită disponibilității acesteia, apar noi perspective legate de mecanismele implicate în diverse afecțiuni. Pe de altă parte, simulările MD au potențialul de a extinde cunoștințele privind mecanismele țintă pentru biomoleculi și comportamentul proteinelor oncogenice. Foarte adesea, proteinele mutante sunt identificate, dar nu este clar cum sunt legate de afecțiunile specifice.

Această teză este organizată după cum urmează. Capitolul 1 reprezintă introducerea. Capitolul 2 descrie principalele aspecte ale metodologiei de simulare MD. Este prezentată o descriere detaliată a ecuațiilor de mișcare și a diferitelor ansambluri termodinamice utilizate

pentru modelarea condițiilor din viața reală. Menționăm în mod special programele software MD utilizate pe scară largă de către cercetători pentru a simula diferite sisteme complexe biomoleculare. În acest capitol sunt prezentate elementele definitorii ale câmpurilor de forță din mecanică moleculară.

Capitolul 3 descrie funcția de energie potențială a câmpului de forță CHARMM și, în particular, descrierea dezvoltării câmpului de forțe pentru polietilenimină (PEI). Câmpul de forță atomistic a fost parametrizat pentru a reproduce proprietățile structurale și dinamica lanțurilor de polimeri în soluție. Este prezentată optimizarea sarcinilor atomice și a parametrilor pentru legături, unghiuri și unghiuri diedrale. Simulările atomistice MD ne-au permis să studiem influența dimensiunii lanțului PEI și a fracției de protonare asupra structurării dinamice descrise în termeni de rază de rotație, distanță între atomii de azot terminali, lungime de persistență, funcții de distribuție radială și coeficienții de difuzie. Rezultatele sunt în concordanță foarte bună cu datele experimentale.

Capitolul 4 se concentrează pe simulări ale polimerilor cationici ca vectori genetici și urmăresc reducerea considerabilă a încercărilor experimentale de a dezvolta noi vectori genetici. Am considerat un lanț PEI protonat alternativ ca polimer reprezentativ utilizat pentru a descrie complexarea dintre lanțurile PEI și lanțul ADN. Simulările MD ale amestecurilor PEI/ADN au fost efectuate la nivel atomistic pentru a înțelege procesele implicate în livrarea materialului genetic. Am descris modul de legare a ADN-ului cu lanțuri PEI, strâns legate de interacțiunile electrostatice dintre grupările amino încărcate pozitiv (lanțuri PEI) cu grupările fosfat încărcate negativ (ADN).

În capitolul 5, sunt descrise structura și compoziția membranelor biologice (mai exact lipide și proteine, care reprezintă aproape toată masa membranelor). Aici, prezentăm comparativ trei tipuri de modele de membrane de la simple la complexe și motivăm utilizarea modelelor membranare folosite în studiul proteinelor ancorate în membrană. În acest capitol este prezentată o descriere detaliată a nanodomniilor, a nanoclusterelor și a mecanismului de semnalizare celulară. Ulterior, ne concentrăm asupra proteinelor Ras, rezumând caracteristicile generale și studiind popularea stărilor conformaționale și orientarea proteinei NRas.

Simulările și rezultatele din aceste trei capitole au fost publicate sau sunt în curs de publicare. Structura generală a articolelor este păstrată în capitolele tezei, astfel încât fiecare capitol conține o scurtă introducere, detalii de simulare, rezultate, concluzii și bibliografie. În capitolul 6, rezumăm contribuțiile tezei și prezentăm perspectivele de cercetare.

# 2

## Dinamică moleculară

Dinamica moleculară (MD) este unul dintre instrumentele principale utilizate pentru studierea comportamentului sistemelor la nivel microscopic. Această metodologie computațională este utilizată ca o completare a măsurătorilor RMN și a cristalografiei de raze X pentru a investiga flexibilitatea structurală a sistemelor moleculare. În cadrul simulărilor MD clasice, prin integrarea ecuațiilor de mișcare se obțin traiectorii care permit studierea sistemelor alcătuite din mai multe particule. Din aceste traiectorii, se poate studia o mare varietate de proprietăți, inclusiv termodinamice și alte cantități macroscopice, care pot fi validate prin comparație cu rezultatele experimentale.

### Reprezentare atomistică

Reprezentarea atomistică este o descriere detaliată la nivel de atom a unui sistem, care modelează comportamentul colectiv al atomilor componenți. Fiecare atom dintr-o moleculă este considerat ca un punct, cu masă și sarcină specifică. Câmpurile de forțe diferă prin modul de parametrizare (derivate din date experimentale și /sau din calcule ab-initio). Pentru a reduce numărul de parametri și a dezvolta câmpuri de forță transferabile, parametrii sunt calculați din molecule mici care sunt subunități ale moleculelor de interes.

Energia potențială a câmpului de forțe CHARMM ia în considerare contribuția interacțiunilor legate,

$$\begin{aligned}
U_{bonded} = & \sum_{bonds} k_b (b - b_0)^2 + \sum_{angles} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \\
& \sum_{dihedrals} k_\psi [1 + \cos(n\psi - \delta)] + \\
& \sum_{impropers} k_\omega (\omega - \omega_0)^2 + \sum_{Urey-Bradley} k_{UB} (b^{1,3} - b_0^{1,3})^2,
\end{aligned} \tag{2.1}$$

respectiv nelegate:

$$U_{non-bonded} = \sum_{atoms\ i,j} \frac{q_i q_j}{\epsilon_0 r_{ij}} + \epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{r_{ij}^{min}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{r_{ij}^{min}}{r_{ij}} \right)^6 \right], \tag{2.2}$$

$$r_{ij}^{min} = (r_i^{min} + r_j^{min}) / 2, \quad \epsilon_{ij} = \sqrt{\epsilon_i \epsilon_j}. \tag{2.3}$$

## Reprezentare semi-atomistică

Sistemele complexe biomoleculare, care includ proteine inserate în membrană, sunt dificil de investigat prin simulări atomistice. Scala de timp a proceselor biologice necesită extinderea dramatică a timpului de simulare. În acest sens, simulările semi-atomistice (CG) utilizează o reprezentare simplificată a sistemelor, care permite simulări lungi de ordinul microsecundelor. Modelele CG derivate din câmpurile de forță atomistice reproduc în mod realist comportamentul fizic al modelelor atomistice. Descrierea CG a unui sistem biomolecular se referă la pseudo-atomi și este o reprezentare la rezoluție mai mică decât cea atomistică. Deoarece fiecare bead CG este compus din grupuri întregi de atomi se reduce numărul de site-uri de interacție, îmbunătățind astfel viteza de simulare. Energia potențială a câmpului de forțe CG definește interacțiunea dintre bead-uri.

## Referințe

- [1] K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, O. Guvench, P. Lopes, I. Vorobyov, MacKerell, A. D., J. Comput. Chem., 31 (2010), 671.
- [2] S. J. Marrink, H. J. Risselada, S. Yefimov, D. P. Tieleman, A. H. de Vries, J. Phys. Chem. B, 111 (2007), 7812.

# 3

## Polietilenimină

### Parametrizarea câmpului de forțe CHARMM

Câmpul de forțe (FF) este construit prin parametrizarea energiei potențiale folosind calcule ab initio, date experimentale sau ambele. Ca un pas indispensabil pentru realizarea simulărilor PEI realiste, parametrii CHARMM FF pentru lanțuri PEI protonate/neprotonate au fost derivați prin fitarea datelor obținute din calcule ab initio cu cele obținute prin mecanică moleculară. Pentru a dezvolta parametri compatibili cu CHARMM, pluginul fTK (Force Field Tool Kit) [1] distribuit ca parte a pachetului software de modelare moleculară VMD [2] a fost utilizat pentru a gestiona procesul de ajustare a parametrilor FF. Dezvoltarea FF implică definirea reziduurilor funcționale și a tipurilor de atomi care au un nume caracteristic, masă și sarcină specifică. În procesul de parametrizare s-au utilizat două modele tetramerice liniare: PEI4p0 - neprotonat (vezi Fig. 3.1a) și PEI4p1 - protonat la azotul central (vezi Fig. 3.1b).

Definirea noilor tipuri de atomi în construcția FF este crucială: NH2 – atom de azot aferent grupării NH<sub>2</sub>; HN2 – atom de hidrogen aferent grupării NH<sub>2</sub>; NH1 – atom de azot aferent grupării NH; HN1 – atom de hidrogen aferent grupării NH<sub>1</sub>; NH2P – atom de azot aferent grupării NH<sub>2</sub><sup>+</sup>; HN2P – atom de hidrogen aferent grupării NH<sub>2</sub><sup>+</sup>; CH2 – atom de carbon adiacent atomului NH<sub>1</sub>; CH2P – atom de carbon adiacent atomului NH<sub>2</sub>P; CH2X – atom de carbon adiacent atomului CH<sub>2</sub>P; HC2 – atom de hidrogen adiacent atomilor CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>P, sau CH<sub>2</sub>X.



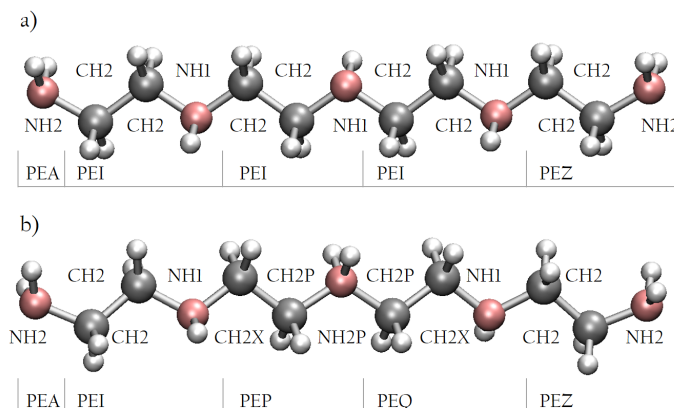


Figure 3.1. Polimeri model utilizați în parametrizarea câmpului de forțe CHARMM pentru PEI: a) PEI4p0 neprotonat și b) PEI4p1 protonat la azotul central. Primul polimer model conține 3 reziduuri neprotonate PEI, unul la începutul lanțului PEA și un patch terminal PEZ. Al doilea polimer model este construit folosind un reziduu PEA, unul neprotonat PEI, două reziduuri PEP și PEQ care posedă împreună sarcina unitară 1 și patch-ul PEZ. Modelele PEI sunt reprezentate cu sfere (atomul de azot este reprezentat cu culoarea roz, atomii de carbon cu gri și atomii de hidrogen corespunzători cu alb).

Am definit următoarele tipuri de reziduuri funcționale: PEI – monomerul CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH neprotonat; PEP – monomerul CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub><sup>+</sup> neprotonat; PEQ – monomerul care leagă reziduurile PEI și PEP; PEA – gruparea NH<sub>2</sub> de la începutul lanțului, PEZ – patch de la sfârșitul lanțului care înlocuiește NH cu NH<sub>2</sub>. Reziduurile PEP și PEQ asigură o tranziție graduală a sarcinii de pe reziduurile protonate pe cele neprotonate, secvența (CH<sub>2</sub>X-CH<sub>2</sub>P-NH<sub>2</sub>)-(CH<sub>2</sub>P-CH<sub>2</sub>X-NH<sub>1</sub>).

Parametrii aferenți sarcinilor, legăturilor, unghiurilor și unghiurilor diedrale au fost optimizați folosind procedura implementată în fTK. În cazul parametrilor comuni a modelului neprotonat PEI4p0 și a modelului protonat PEI4p1 au fost luați în considerare cei din modelul neprotonat.

#### Parametrii Lennard Jones

Parametrii aferenți interacțiunilor nelegate au fost atribuiți fiecărui tip de atom după tipuri similare provenite din CGenFF [3].

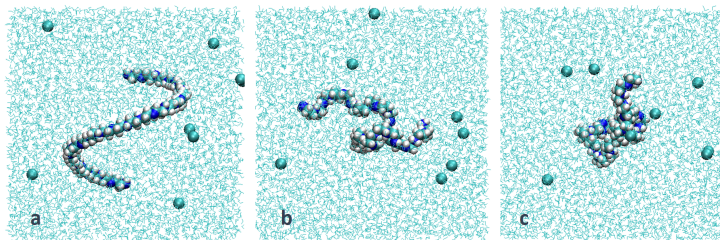


Figure 3.2. (a) Configurația inițială, respectiv (b), (c) configurații intermediare ale unei traiectorii tipice pentru lanțuri helicoidale solvate PEI26-mers cu fracție de protonare 1/3. Lanțurile PEI și ionii de clor sunt reprezentați cu sfere.

#### Sarcinile atomice parțiale

Sarcinile atomice parțiale ale CHARMM FF reproduc interacțiunile QM cu o singură moleculă de apă de tip TIP3P [4] plasată în poziții reprezentative. Folosind metodologia CHARMM, atomii componenți ai polimerilor model PEI sunt atribuiți unei liste de acceptori, donori sau ambele. Profilele de interacție sunt calculate caracterizând interacțiunile complexelor formați de polimerul model PEI și câte o moleculă de apă folosind calcule la nivelul de teorie HF/6-31G(d) cu ajutorul programului Gaussian. Sarcinile rezultate din calculele ab initio au fost modificate în limita a 5%, pentru a construi reziduuri funcționale independente. Sarcina cumulată a reziduurilor PEP și PEQ este 1.

#### Optimizarea parametrilor pentru legături și unghiuri

Comparația între matricile hessiene dintre QM și MM calculate în coordonate interne furnizează valorile de echilibru pentru legături și unghiuri. Calculul suprafeței de energie potențială (PES) a fost făcut prin generarea de mici distorsiuni de-a lungul legăturilor și unghiurilor. MM PES locală a fost evaluată folosind parametri pentru legături și unghiuri pentru fiecare conformație.

#### Optimizarea parametrilor diedrali

Profilele de energie potențială de torsiune au fost determinate prin scanarea unghiurilor diedrale de interes. Parametrii diedrali au fost calculați prin minimizarea diferenței dintre QM și MM PES în procesul de optimizare folosind metoda simulating annealing..

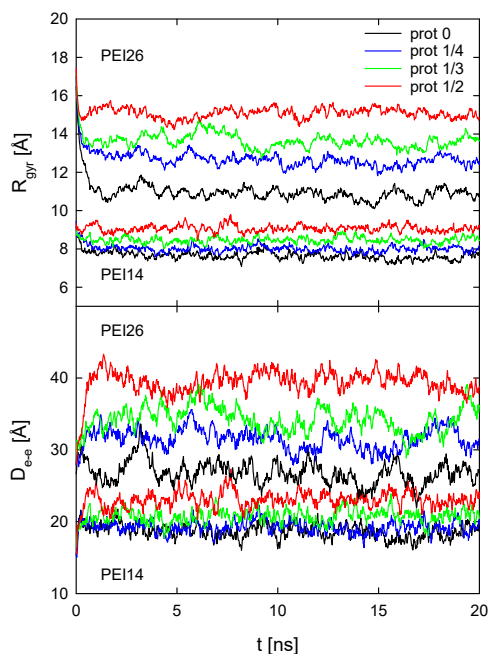


Figure 3.3. Evoluția în timp a razei de girație mediate pe ansamblu, respectiv distanța între atomii de azot terminali pentru PEI 14-mers and 26-mers la diferite fracții de protonare.

### Lanțuri PEI liniare în soluție

Configurațiile inițiale elicoidale cu fracție de protonare diferită 0, 1/4, 1/3, și 1/2 pentru PEI 14, 26 și 50-mers au fost folosite în simulările de dinamică moleculară. Figura 3.2 prezintă imagini provenite de la o traiectorie tipică pentru 26-mers cu protonare 1/3, ilustrând lanțul inițial elicoidal și două configurații intermediare ale lanțului PEI.

Dependența de timp a  $R_g$  și  $D_{e-e}$  pentru diferite fracții de protonare (egală cu 0 (neprotonat) - negru, 1/4 - albastru, 1/3 - verde, and 1/2 (alternativ protonat) - roșu) sunt reprezentate în Fig. 3.3, unde cele mai compacte configurații corespund lanțurilor neprotonate. Valorile  $R_g$  și  $D_{e-e}$  cresc cu creșterea lanțului, iar pentru o lungime dată cu creșterea fracției de protonare.

### Lungimea de persistență

În urma simulărilor, lungimea de persistență a lanțurilor liniare PEI are valoarea 4.81 Å. Lungimea de persistență este în bună concordanță cu valoarea obținută de Lee et al. [6] pentru polietilenoxid (4.3 Å). Figura 3.4 ne arată că modelul worm-like chain reproduce cu

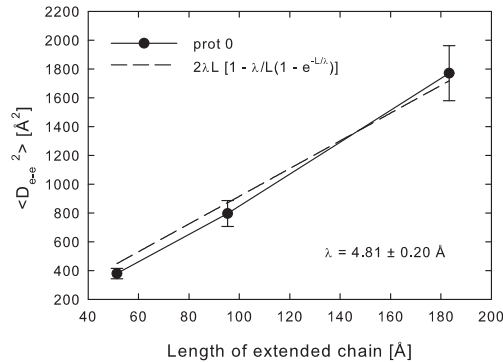


Figure 3.4. Dependența valorii medii pătratice a distanței dintre atomii de azot terminali de lungimea extinsă a polimerilor obținuți prin dinamică moleculară și fitarea lor. Modelul worm-like chain descrie foarte bine lanțurile PEI neprotonate.

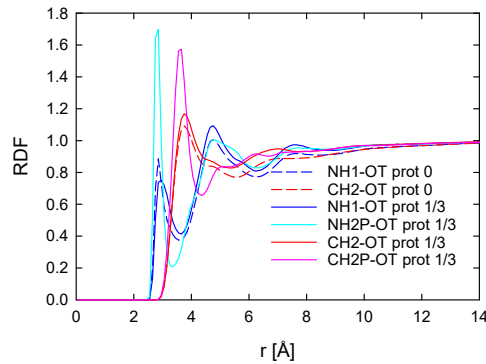


Figure 3.5. Funcțiile de distribuție radiale ale atomilor de azot și carbon pentru PEI 26 mers cu atomii de oxigen ai apei (neprotonat - linie punctată și lanțuri protonate 1/3 - linie continuă).

succes comportamentul lanțurilor neprotonate.

### Funcțiile de distribuție radiale

Funcția de distribuție radială descrie organizarea locală medie a atomilor. Din profilele RDF reprezentate în Fig. 3.5, putem vedea diferite afinități ale atomilor de carbon și azot pentru atomii de oxigen ai apei. Prima și a doua sferă de solvatare sunt foarte pronunțate pentru speciile de azot, dar pentru speciile de carbon a doua sferă de solvatare nu este bine definită. Atomii de oxigen ai apei sunt situați în medie mai aproape de speciile de azot decât de speciile de carbon.

## Coeficientul de difuzie

Coeficientul de difuzie este o mărime utilizată pentru descrierea dinamicii polimerilor în soluție. Calculul acestora s-a realizat utilizând relația Einstein. Coeficientul de difuzie al lanțurilor PEI descrește atât cu lungimea lanțului și cu fracția de protonare.

## Rezumat

Parametrizarea câmpului de forțe CHARMM pentru polietilenimină a fost prezentată bazat pe articolul publicat [7]. Folosind procedura de parametrizare implementată în fFTK, am determinat parametrii compatibili cu câmpul de forțe CHARMM36. Întregul set de date a fost furnizat de calcule ab initio de înaltă calitate. Sarcinile parțiale atomice și termenii pentru legături, unghiuri și unghiuri diedrale au fost ajustați consistent în procesul de parametrizare.

Sisteme eficiente pentru livrarea materialului genetic bazate pe polimeii cationici sunt esențiale pentru implementarea terapiei genice în aplicații clinice. În acest sens, am folosit de dinamică moleculară pentru investigarea lanțurilor PEI solvate de diferite fracții de protonare. Structurarea dinamică a fost caracterizată prin raza de rotație, distanța dintre atomii de azot terminali, lungimea de persistență, funcția de distribuție radială și coeficientul de difuzie.

Raza de rotație și distanța dintre atomii de azot terminali crește cu mărimea lanțului și protonarea. Orientarea moleculelor de apă în raport cu atomii de carbon și azot este dată de funcțiile de distribuție radiale. Coeficienții de difuzie ai centrului de masă scad atât cu lungimea lanțului, cât și cu fracția de protonare și descriu foarte bine rezultatele experimentale anterioare.

## Referințe

- [1] C. G. Mayne, J. Saam, K. Schulten, E. Tajkhorshid, J. C. Gumbart, Rapid parameterization of small molecules using the Force Field Toolkit, *J. Comput. Chem.*, 34 (2013), 2757.
- [2] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: Visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.*, 14 (1996), 33.

- [3] K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, O. Guvench, P. Lopes, I. Vorobyov, A. D. MacKerell Jr., CHARMM General Force Field: A Force field for Drug-Like Molecules Compatible with the CHARMM All-Atom Additive Biological Force Field, *J. Comput. Chem.*, 31 (2010), 671.
- [4] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, M. L. Klein, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, *J. Chem. Phys.*, 79 (1983), 926.
- [5] J. E. Mark, P. J. Flory, The Configuration of the Polyoxyethylene Chain, *J. Am. Chem. Soc.*, 87 (1965), 1415.
- [6] H. Lee, R. M. Venable, A. D. Mackerell Jr., R.W. Pastor, Molecular Dynamics Studies of Polyethylene Oxide and Polyethylene Glycol, *Biophysical Journal*, 95 (2008), 1590.
- [7] T. A. Beu, A. Farcaș, CHARMM force field and molecular dynamics simulations of protonated polyethylenimine, *J. Comput. Chem*, 38 (27) (2017), 2335.

# 4

## Formarea complexului ADN-polietilenimină

### Terapia genică

Cercetătorii au încercat de zeci de ani să ofere implementarea clinică a terapiei genice, dar foarte puțini pacienți au primit tratament eficace. Terapia genică este concepută pentru a introduce acizi nucleici în celule pentru a trata cancerul și diverse afecțiuni (imunologice, neurologice și cardiovasculare) [1].

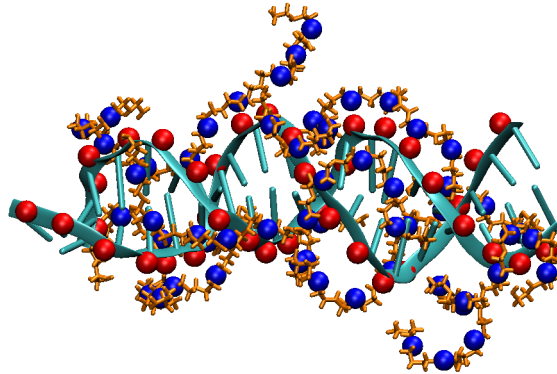


Figure 4.1. Formarea poliplex-ului PEI/ADN. Atomii de azot de la grupările amino protonate sunt reprezentate cu sfere în albastru și atomii de fosfor ai ADN-ului în roșu.

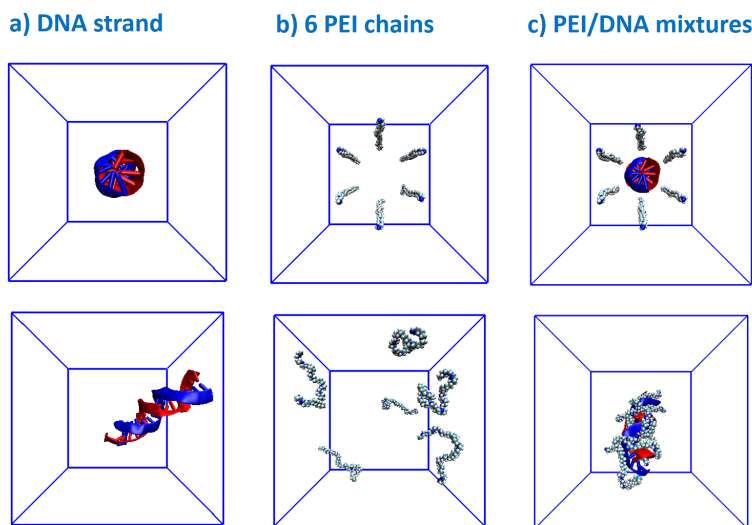


Figure 4.2. Configurații inițiale/intermediare ale unei traiectorii tipice pentru a) ADN (lanțul A - roșu, lanțul B - albastru, b) lanțuri PEI și c) amestec PEI/DNA. Moleculele de apă și atomii de clor sunt excluși pentru claritate.

#### Vectori nonvirali de livrare de gene

Vectorii nonvirali asigură livrarea sigură a materialului genetic în celulele gazdă [2]. Dintre toți vectorii de gene nonvirali, polimerii cationici sunt cei mai utilizați vectorii nonvirali. Se poate observa că amestecurile de polimeri cationici cu ADN formează poliplecși (vezi Fig. 4.1). Polietilenimina este considerată unul dintre cei mai eficienți polimeri cationici folosiți pentru transferul de gene in vivo / vitro. Datorită densității mari a grupărilor de amino a polimerilor, transfecția este foarte eficientă (efectul "proton sponge"). În această lucrare am efectuat simulări MD atomistice pentru a studia interacțiunea lanțurilor PEI cu ADN-ul.

#### Formarea complexelor dintre acizi nucleici și polimeri sintetici

Am considerat 3 tipuri de sisteme, respectiv, (a) ADN solvatat (vezi Fig. 4.2a), (b) lanțuri PEI solvate (see Fig. 4.2b), și (c) amestec ADN-PEI (vezi Fig. 4.2c).

Dependența de timp a razei de girație ( $R_g$ ) pentru PEI20-mers în soluție cu fracție de protonare 1/2 este ilustrată în Fig. 4.3, unde raza de girație medie este reprezentată cu linia neagră. Această figură indică polimerul este inițial rigid și se compactează în decursul simulării. Valoarea obținută pentru lanțuri protonate alternativ PEI20-mers, și anume  $1.25 \pm$



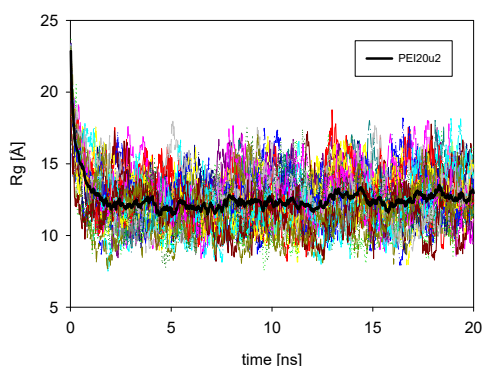


Figure 4.3. Evoluția în timp a razei de girație pentru 6 lanțuri protonate alternativ PEI 20-mers extrase din 4 traiectorii independente. Media este reprezentată cu negru.

0.50 nm, este în concordanță cu valoarea de  $1.27 \pm 0.56$  nm, obținută de Choudhury et al. [3] prin simulări de dinamică moleculară.  $R_g$  medie a lanțurilor PEI în interacțiune cu ADN este 12.65 Å .

Pentru a furniza caracterizarea lanțurilor PEI libere în soluție și a celor aflate în interacțiune cu ADN-ul am comparat probabilitatea de distribuție a  $R_g$  medie pentru lanțurile PEI. Lanțurile PEI libere în soluție prezintă un singur peak, care corespunde unei configurații aleatoare. Distribuția profilului pentru lanțuri PEI în interacțiune cu ADN prezintă un peak la aproximativ 14 Å și un peak adițional, care corespunde valorilor  $R_g$  ale lanțurilor PEI care interacționează direct cu ADN (parte a poliplexului PEI/DNA). Lanțurile PEI libere în soluție contribuie la eficientizarea terapiei genice, sugerat de experimente [4].

Pentru a descrie electrostatica în jurul ADN și rolul distribuției de sarcină a PEI, au fost calculate distribuțiile cumulative de ioni în jurul ADN-ului. Prin urmare, mai mulți ioni de sodiu se află în jurul ADN-ului necomplexat decât în jurul celui complexat, ultimul atragând mai mulți ioni de clor. O descreștere în numărul ionilor de sodiu atrași evidențiază efectul de ecranare a lanțurilor PEI asupra grupărilor fosfat aferente ADN-ului.

## Rezumat

În acest capitol, procesul de auto-asamblare a PEI/ADN a fost descris prin simulări de dinamică moleculară. Simulările confirmă că lanțurile PEI și ADN formează poliplexi PEI/ADN datorită interacțiunilor electrostatice dintre grupările amino încărcate pozitiv și grupările fosfat încărcate negativ.

Ne concentrăm asupra studiului comparativ dintre lanțurile PEI libere, respectiv ADN liber în soluție și amestec PEI/ADN. Rezultatele noastre arată că unele din lanțurile PEI protonate alternativ se leagă de ADN și prezintă o rază considerabil mai mare de rotație în comparație cu cele în formă liberă. S-a constatat că mai puțini ioni de sodiu sunt atrași de poliplecși decât de ADN necomplexat.

Câmpul de forță dezvoltat permite înțelegerea la nivel atomistic a modului în care lanțurile PEI interacționează cu ADN-ul. Pentru a arăta impactul protonării polimerului asupra complexării dintre ADN și lanțurile PEI, am determinat numărul de grupări amino protonate/neprotonate în contact direct cu ADN-ul. Concluzionăm că îmbunătățirea sistemelor de livrare a genelor necesită reglarea vectorilor nonvirali pe bază de PEI prin controlarea precisă a parametrilor, cum ar fi protonarea și lungimea lanțurilor de polimeri.

## Referințe

- [1] M. A. Mintzer, E. E. Simanek, Nonviral vectors for gene delivery, *Chem. Rev.*, 109 (2009), 259.
- [2] D. W. Pack, A. S. Hoffman, S. Pun, P. S. Stayton, Design and development of polymers for gene delivery, *Nature Rev. Drug Discov.*, 4 (2005), 581.
- [3] C. K. Choudhury, S. Roy, Structural and dynamical properties of polyethylenimine in explicit water at different protonation states: a molecular dynamics study, *Soft Matter*, 7 (2013), 2269.
- [4] Y. Yue, F. Jin, R. Deng, J. Cai, Y. Chen, M. C. M. Lin, H. F. Kung, C. Wu, Revisit Complexation between DNA and Polyethylenimine - Effect of Uncomplexed Chains Free in the Solution Mixture on Gene Transfection, *J Controlled Release*, 155 (2011), 67.

# 5

## Proteinele NRas implicate în semnalizarea celulară

Proteinele NRas sunt implicate într-o serie de căi de transducție implicate în diverse procese biologice, care includ diferențierea, creșterea și proliferarea [1]. Mutațiile punctuale găsite în diferite căi de semnalizare sunt asociate cu aproximativ 30% din tipurile de cancer. Până în prezent, un număr redus de studii care investighează rolul NRAS în cancer în contextul modificărilor genetice specifice. Din acest motiv, au fost realizate simulări de dinamică moleculară pentru a studia implicația mutațiilor proteinelor NRas care sunt ancorate în membrană.

Proteina NRas este atașată de membrană prin intermediul a 2 modificări postranslaționale (palmitilare și farnesilare). Pentru că studiile anterioare au fost focusate pe HRas și KRas, comportamentul structural al proteinei NRas inserate în membrană nu este foarte bine înțeles. Orientarea proteinei relativ la membrană este dependentă de apariția mutației și implică schimbări în interacțiunile dintre lipide și proteine, care duc la diferite distribuții ale stărilor conformaționale. Investigațiile noastre sunt focusate pe mutația G12V, care este predominantă în NRas.

Proteinele Ras controlează activitatea căilor de semnalizare implicate în diverse procese moleculare. Proteinele Ras funcționează ca switch-uri binare, care oscilează între starea activă GTP-legat și starea inactivă GDP-legat. Activitatea acestora este regulată de 2 clase de proteine: GEF și GAP [2].

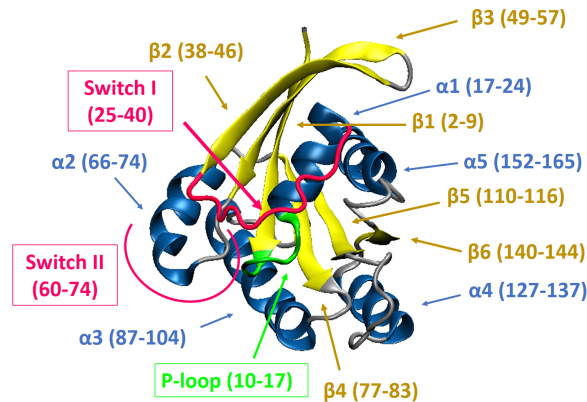


Figure 5.1. Structura secundară a domeniului G al proteinei NRas: colorat în albastru pentru helix-uri și galben pentru lanțurile beta. Regiunile funcționale importante, switch I (magenta) și switch II (magenta), alături de P-loop (verde) sunt ilustrate.

### Structura Ras

Proteinele Ras sunt compuse din 2 subunități: domeniul G și regiunea hipervariabilă (HVR). Domeniul G al proteinei Ras cuprinde 166 aminoacizi, cu structura secundară [3] alcătuită din 6 lanțuri beta și 5 helix-uri (vezi Fig. 5.1). În plus, 3 regiuni mediază trecerea din starea activă GTP-legat în starea inactivă GDP-legat [4]. P-loop (G1 region) este alcătuit din reziduurile 10-17, Switch I (G2 region) din reziduurile 25-40, iar Switch II din reziduurile 60-74.

Mecanismul de activare al proteinelor Ras implică legarea proteinelor GEF care transformă proteina Ras în stare activă favorizând eliberarea GDP și legarea GTP [5]. Deoarece concentrația în citoplasmă a GTP este de 10 ori mai ridicată decât în cazul GDP, aceasta favorizează legarea GTP-ului de proteină. Astfel, proteina este transformată în stare activă, fapt ce permite legarea efectorilor de domeniul G, care duce la activarea diferitelor căi de semnalizare.

### Mutații punctuale Ras

Mutația punctuală reprezintă o substituție în proteină a unui aminoacid cu altul. Mutațiile punctuale în proteinele Ras sunt asociate cu diferite tipuri de cancer. Mutațiile genei Ras apar în peste 30% din toate cancerele umane. Cea mai comună mutație în NRas este G12V, reprezentată de substituția aminoacidului la poziția 12, de la glicină la valină.

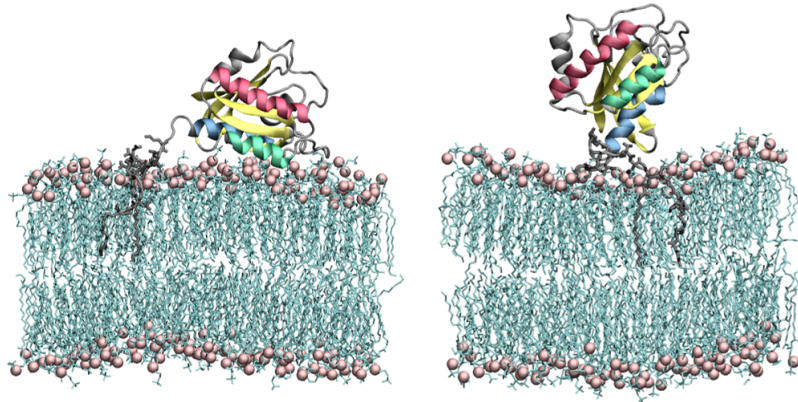


Figure 5.2. Cele 2 configurații de pornire ale proteinei NRas în stare GDP-legat (stânga) și GTP-legat (dreapta). Cele 5 helix-uri sunt colorate în culori diferite, helix-urile beta în galben, modelul membranar reprezentat în albastru cu atomii de fosfor în roz.

#### Orientarea NRas relativ la membrană

Trajectoriile proteinei în stare naturală NRas (WT) și NRas cu mutație G12V (G12V) au fost analizate prin studierea proprietăților structurale. Structurile HRas reprezentative [6] (orientare paralelă dominantă în HRas GTP-legat, respectiv perpendiculară pentru HRas GDP-legat a domeniului G reprezentate în Fig. 5.2) au fost folosite ca structuri inițiale pentru toate simulările de dinamică moleculară. NRas WT prezintă o configurație predominant paralelă în raport cu bistratul lipidic și NRas G12V prezintă o orientare la un unghi de  $45^{\circ}$ - $60^{\circ}$ . Aceste orientări corespund la conformațiile GTP-, respectiv GDP-legat obținute din simulări ale proteinei HRas [6], și din experimente de spectroscopie IRRA ale proteinei NRas inserate în bistratul lipidic (DPPC:DOPC:CHOL 50:25:25) [7, 8].

#### Stări conformaționale

Cei trei izomeri ai proteinelor Ras adoptă 2 conformații diferite, cunoscută ca Starea 1 (inactivă) și Starea 2 (activă) [10]. Forma activă/inactivă se referă la interacția specifică dintre Ras și efectori. Recent, Li et al. [9] au arătat că proteinele în stare naturală prezintă 2 substări ale Stării 2: TYR32<sub>in</sub> și TYR32<sub>out</sub>, unde primul este asociat cu interacția dintre Ras și efectori și al doilea cu afinitate pentru GAP. Din analiza simulărilor am identificat existența tuturor stărilor cunoscute (Starea 1 și Starea 2 (TYR32<sub>in</sub> - TYR<sub>OX</sub>, TYR32<sub>out</sub> - TYR<sub>OZ</sub>)). Totodată, am identificat o nouă substare a Stării 2, TYR<sub>OY</sub> (vezi Fig. 5.3). Conformațiile schematice ale Stării 2 pentru proteina NRas sunt reprezentate în Fig. 5.3, unde cele 3 substări ale Stării

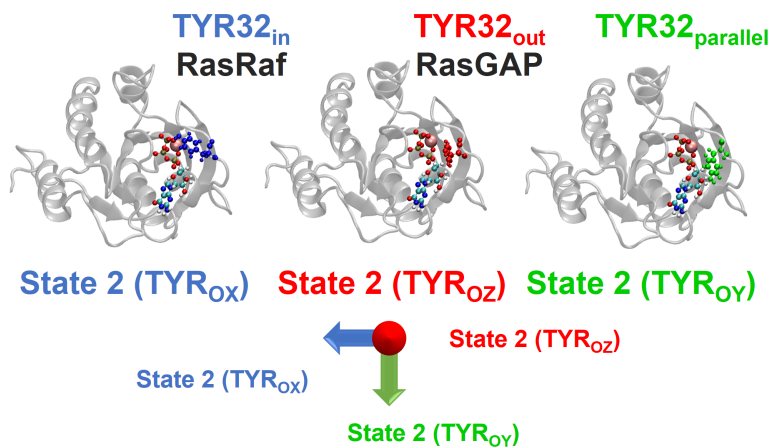


Figure 5.3. NRas prezintă 3 substări conformaționale ale stării 2, care sunt caracterizate de orientarea diferită a rezidului Tyr32. Recent a fost propus că  $TYR_{OX}$  (albastru) corespunde la Ras-Raf (procesul de transmitere de semnal), în timp ce  $TYR_{OZ}$  (roșu) la Ras-GAP (hidroliză GTP amplificată) [9]. Propunem că  $TYR_{OY}$  (verde) corespunde unei stări transmițătoare de semnal. Proteina este reprezentată în gri, rezidul TYR32 și molecula GTP cu sfere vdW. Săgețile ne indică orientarea diferită a rezidului TYR32 în cele 3 substări, cu vârful săgeții către vârful aminoacidului.

2 sunt caracterizate de orientarea diferită a rezidului TYR32:  $TYR_{OX}$  blochează cavitatea în care este situat GTP,  $TYR_{OZ}$  este orientat în exterior și  $TYR_{OY}$  este paralel cu cavitatea.

Alternanța între stările  $TYR_{OX}$  și  $TYR_{OZ}$  dispăre, proteina NRas G12V rămânând blocată în substarea  $TYR_{OY}$  (cu rezidul TYR32 orientat către rezidul ALA18). Această substare apare frecvent în prezența NRas G12V inserat în membrana celulară. Deoarece G12V este o mutație oncogenă, propunem că noua substare  $TYR_{OY}$  a proteinei NRas blochează proteina într-o stare permanent activă. Aceasta previne tranziția în substarea  $TYR_{OZ}$ , legarea GAP de Ras și, prin urmare, creșterea ratei hidrolizei și inactivarea Ras.

## Rezumat

În cadrul acestui capitol, am realizat simulări de dinamică moleculară a unor bistraturi lipidice ternar simetric, simplu și complex asimetric. Bistraturile lipidice ternare reprezintă cele mai simple modele care prezintă separație de fază și sunt ideale pentru a fi folosite în studiul proteinelor NRas ancorate în membrană.

În mod specific, am investigat popularea stărilor conformaționale și orientarea proteinelor

NRas complexate cu guanosina tri-fosfat (GTP). Am arătat că orientarea domeniului G a proteinei NRas WT și NRas G12V corespunde la GTP-/GDP-legat H-/N-Ras WT. NRas WT are o orientare predominant paralelă în raport cu membrana și NRas G12V prezintă o orientare la un unghi.

Am identificat toate stările conformaționale aferente Ras cunoscute: Starea 2 (activă) și Starea 1 (inactivă). Rezultatele noastre obținute prin dinamică moleculară ne indică apariția unei noi substări a stării 2 cu reziduul TYR32 orientat paralel cu cavitatea în care este situată molecula GTP. Reziduul TYR32 este orientat diferit în cadrul celor 3 substări. Noua substare apare cu predominanță pentru proteinele NRas inserate în membrană în prezența mutației G12V. Pentru că mutația G12V este oncogenică și pentru că în simulări conformația aferentă GAP legat de Ras nu apare, propunem că noua substare este aferentă unei conformații aferente prezenței efectorilor. Prin urmare, fără amplificarea hidrolizei de GAP, proteina NRas G12V rămâne permanent activă.

## Referințe

- [1] M. Barbacid, ras genes, *Annu. Rev. Biochem.*, 56 (1987), 779.
- [2] J. Tcherkezian, N. Lamarche-Vane, Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins, *Biol. Cell*, 99 (2007), 67.
- [3] E. F. Pai, U. Krengel, G. A. Petsko, R. S. Goody, W. Kabsch, A. Wittinghofer, Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis, *EMBO J.*, 9 (1990), 2351.
- [4] M. Spoerner, C. Herrmann, I. R. Vetter, H. R. Kalbitzer, A. Wittinghofer, Dynamic properties of the Ras switch I region and its importance for binding to effectors, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98 (2001), 4944.
- [5] J. L. Bos, H. Rehmann, A. Wittinghofer, GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins, *Cell*, 129 (2007), 865.
- [6] A. A. Gorfe, M. Hanzal-Bayer, D. Abankwa, J. F. Hancock, J. A. McCammon, Structure and Dynamics of the Full-Length Lipid-Modified H-Ras Protein in a 1,2-Dimyristoylglycerol-3-phosphocholine Bilayer, *J. Med. Chem.*, 50 (2007), 674.

- [7] S. Kapoor, G. Triola, I. R. Vetter, M. Ernkamp, H. Waldmann, R. Winter, Revealing conformational substates of lipidated N-Ras protein by pressure modulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109 (2012), 460.
- [8] S. Kapoor, K. Weise, M. Ernkamp, G. Triola, H. Waldmann, R. Winter, The role of G-domain orientation and nucleotide state on the Ras isoform-specific membrane interaction, *Eur. Biophys. J.*, 41 (2012), 801.
- [9] Y. Li, Y. Zhang, S. Stephan, S. Cui, C. Kotting, F. Xia, K. Gerwert, Specific Substates of Ras to Interact with GAPs and Effectors: Revealed by Theoretical Simulations and FTIR Experiments, *J. Phys. Chem. Lett.*, 9 (2018), 1312.
- [10] M. Geyer, T. Schweins, C. Herrmann, T. Prisner, A. Wittinghofer, H.R. Kalbitzer, Conformational transitions in p21ras and in its complexes with the effector protein Raf-RBD and the GTPase activating protein GAP, *Biochemistry*, 35 (1996), 10308.



# 6

## Concluzii

Teza este organizată în trei părți principale. Prima parte prezintă o nouă parametrizare a câmpului de forță CHARMM pentru polietilenimină (PEI). Am dezvoltat un câmp de forțe realist pentru PEI, riguros derivat din calcule ab initio de înaltă calitate. Abilitatea acestui câmp de forțe pentru PEI de a descrie atât lanțurile neprotonate cât și cele protonate permite simularea realistă a lanțurilor PEI împreună cu acizi nucleici, lipide sau proteine. Am investigat structura dinamică a lanțurilor PEI solvate cu diferite fracții de protonare, în termeni de parametri sintetici. Câmpul de forțe dezvoltat reprezintă o piatră de temelie pentru eforturile viitoare de dezvoltare a câmpurilor de forțe atomistice care descriu cu acuratețe o gamă largă de sisteme complexe biomoleculare.

În cea de-a doua parte, este prezentată o nouă perspectivă asupra comportamentului atomistic al poliplex-ului PEI/ADN, care vizează îmbunătățirea vectorilor nonvirali bazați pe lanțuri PEI, utilizând simulări de dinamică moleculară. Distribuția particulară a sarcinii de-a lungul lanțurilor PEI determină interacțiunea electrostatică dintre ADN-ul încărcat negativ și lanțurile PEI încărcate pozitiv, cât și formarea unor poliplecși. Comportamentul de legare a site-urilor de interacțiune încărcate ale lanțurilor PEI și ale ADN-ului extind domeniul polimerilor cationici, permițând un design îmbunătățit al protocoalelor de livrare de gene.

Partea a treia se referă la proteinele NRas care reprezintă principala cauză a melanomului, cancerului tiroidian și leucemiei. Am folosit simulări de dinamică moleculară pentru a investiga popularea stărilor conformaționale și orientarea proteinelor NRas complexate

cu guanosina tri-fosfat (GTP) ancorate în membrană. Orientarea domeniului catalitic (G-domain) al proteinei NRas naturale (WT) este paralelă cu membrana, contrar cazului G12V, care este la un unghi față de membrană și corespunde stării GDP-legate a NRas. Simulările de dinamică moleculară realizate au trecut prin toate stările conformaționale cunoscute anterior: starea 1 (inactivă) și starea 2 (activă). Totodată, am identificat o nouă sub stare a stării 2, cele 3 sub stări ale stării 2 fiind caracterizate de orientarea diferită a rezidului tirozină situat în poziția 32: o sub stare orientată către rezidul glicină situat în poziția 12 (oncogenic), perpendicular pe “buzunarul” GTP, una paralel cu acesta, orientată către rezidul alanină situat în poziția 18 și una în afara proteinei, perpendiculară pe planul celorlate două orientări. Mai mult, am găsit că popularea acestei noi stări conformaționale este predominantă în prezența mutației oncogenice (G12V). Considerând că această mutație este oncogenică și că în simulările realizate sub starea corespunzătoare hidrolizei GTP nu este prezentă în cazul mutației (în contrast cu proteina în stare naturală), postulăm că noua sub stare este transmițătoare de semnal.

## Perspective

Dezvoltarea unui câmp de forțe semiatomistic pentru PEI va contribui la dezvoltarea domeniului polimerilor sintetici permițând efectuarea simulărilor de dinamică moleculară la scară largă. Investigațiile semi-atomistice a poliplex-ului PEI/ADN au ca scop eficientizarea procesului de condensare. Mai mult, dezvoltarea unui câmp de forțe atomistic pentru PEI ramificat va oferi modele de arhitecturi optime ale polimerilor cationici pentru a exploata potențialul acestora ca vectori nonvirali.

De-a lungul ultimei linii de cercetare, urmărim dezvoltarea unei noi abordări privind identificarea potențialelor medicamente împotriva proteinelor oncogenice Ras. Vom investiga dinamica asocierii proteinei complete NRas complexate cu guanosina tri-fosfat (GTP) pentru a determina site-urile de legare cu tăria corespunzătoare. Rezultatele ar putea fi utilizate pentru a proiecta noi medicamente necesare pentru prevenirea asocierii proteinelor oncogenice Ras. Altă direcție de cercetare va include calcule de energie liberă, și anume potențialul profilului de forță medie (PMF) pentru tranziția dintre sub stările active corespunzătoare NRas.

# 7

## Mulțumiri

În primul rând, aș dori să-mi exprim recunoștința sinceră față de conducătorului de doctorat Prof. Dr. Titus A. Beu pentru că mi-a oferit oportunitatea de a aborda acest domeniu fascinant și pentru sprijinul oferit pe parcursul anilor de studii doctorale și a elaborării tezei de doctorat. În mod deosebit, doresc să mulțumesc d-lui dr. Lorant Janosi pentru toată răbdarea și îndrumarea acordată în studiul proteinelor oncogenice în cadrul institutului INCDTIM. Mai mult, aș dori să mulțumesc celorlalți membrii ai comisiei de îndrumare: Prof. Dr. Zoltán Néda și Prof. Dr. Vasile Chiș pentru sprijinul acordat.

Doresc să mulțumesc pentru proofreading-ul tezei de doctorat: Andrada-Elena Ailenei and Dr. Roxana Pasca.

Mulțumesc pentru susținerea financiară oferită de către Unitatea Executivă pentru Finanțarea Învățământului Superior, a Cercetării, Dezvoltării și Inovării (UEFISCDI) prin intermediul proiectelor de cercetare: PN-III-P4-IDPCE-2016-0474, PN-II-RU-TE-2014-4-2418, PN-III-P1-1.1-TE-2016-0032.

# 8

## Lista de lucrări publicate

### Articole

1. T. A. Beu, A. Farcaș, ” Tight-binding normal mode analysis of suspended single-wall carbon nanotubes”, EPL 113, 37004 (2016).  
ISI: 1.957  
AIS = 0.8
2. T. A. Beu, A. Farcaș, ” CHARMM force field and molecular dynamics simulations of protonated polyethylenimine”, J. Comput. Chem. 38(27), 2335 (2017).  
ISI: 3.229  
AIS = 1.4
3. T. A. Beu, A. Farcaș, ” Structure and Dynamics of Solvated Polyethylenimine Chains”, AIP Conference Proceedings 1916, UNSP 020001 (2017).
4. A. Farcaș, T. A. Beu, ” Complexation of DNA with cationic polymers”, STUDIA UBB CHEMIA, LXIII, 2, 165 (2018).  
ISI: 0.305  
AIS = 0.1
5. T. A. Beu, A. E. Ailenei, A. Farcaș, ” CHARMM Force Field for Protonated Polyethyleneimine”, J. Comput. Chem., accepted (2018), DOI:10.1002/jcc.25637.

ISI: 3.221

AIS = 1.4

### Articole (în pregătire)

1. A. Farcaș, L. Janosi, " Distribution and Dynamics of N-Ras Conformational States and Substates are Modulated by Membrane and Point Mutation", în pregătire.
2. T. A. Beu, A. Farcaș, A. E. Ailenei, " MARTINI Force Field for Protonated Polyethylenimine", în pregătire.

### Participări la conferințe

1. A. Farcaș, L. Buimaga Iarinca, C. Floare, L. Janosi, " Ras proteins-Mammalian membrane interactions and dynamics using coarse-grained models", National Conference in Biophysics (CNB), 2-4 June 2016, Cluj-Napoca, Romania, prezentare poster.
2. A. Farcaș, L. Buimaga Iarinca, C. Floare, L. Janosi, " Plasma membrane model dynamics in the presence of Ras protein nanoclusters", International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences (IC-ANMBES), 29 June-1 July 2016, Brasov, Romania, prezentare poster.
3. T. A. Beu, A. Farcaș, " Force Field Modeling and Molecular Dynamics Simulations of Cationic Polymers", Molecular Modeling in Chemistry and Biochemistry (MOLMOD), 13-15 November 2016, Cluj-Napoca, Romania, prezentare orală.
4. A. Farcaș, T. A. Beu, " Molecular Dynamics Simulations of Cationic Polymers", 19th International Union of Pure and Applied Biophysics (IUPAB) and 11th European Biophysical Societies' Association (EBSA) Congress, 16-20 July 2017, Edinburgh, UK, prezentare poster, premiu "best poster award".
5. A. Farcaș, L. Buimaga Iarinca, C. Floare, L. Janosi, " Influence of G12V mutation on NRas proteins' aggregation", 19th International Union of Pure and Applied Biophysics (IUPAB) and 11th European Biophysical Societies' Association (EBSA) Congress, 16-20 July 2017, Edinburgh, UK, prezentare poster, premiu "best poster award".

6. L. Janosi, C. Floare, A. Farcaș, L. Buimaga Iarinca, " In silico study of Ras-binding peptides' self-association", 19th International Union of Pure and Applied Biophysics (IUPAB) and 11th European Biophysical Societies' Association (EBSA) Congress, 16-20 July 2017, Edinburgh, UK, prezentare poster.
7. L. Buimaga Iarinca, C. Floare, A. Farcaș, A. S. Porav, L. Janosi, " Use of complementary molecular modeling approaches in search of peptides binding to oncogenic Ras", 19th International Union of Pure and Applied Biophysics (IUPAB) and 11th European Biophysical Societies' Association (EBSA) Congress, 16-20 July 2017, Edinburgh, UK, prezentare poster.
8. T. A. Beu, A. Farcaș, " CHARMM force field and molecular dynamics simulations of polyethylenimine chains", 4th International Conference on Physical and Theoretical Chemistry, 18-19 September 2017, Dublin, Ireland, prezentare orală.
9. A. Farcaș, L. Buimaga Iarinca, C. Floare, L. Janosi, " Multiscale Models of Wildtype and G12V Mutant NRas Oncogenic Systems", 11th International Conference on Processes in Isotopes and Molecules (PIM), 27-29 September 2017, Cluj-Napoca, Romania, prezentare poster.
10. A. Farcaș, T. A. Beu, " Cationic Polymers as Drug Delivery Systems", International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences (IC-ANMBES), 23-25 May 2018, Brasov, Romania, prezentare orală.
11. A. Farcaș, L. Buimaga Iarinca, A. S. Porav, C. Floare, L. Janosi, " Structural Features and Aggregation of NRas Proteins and it's Oncogenic Mutations", International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences (IC-ANMBES), 23-25 May 2018, Brasov, Romania, prezentare poster.
12. L. Buimaga Iarinca, A. Farcaș, L. Janosi, " Use of Molecular Docking as a Tool for Comparative Binding Analysis of Large Peptides to Ras Wild Type and Oncogenic Proteins", International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences (IC-ANMBES), 23-25 May 2018, Brasov, Romania, prezentare poster.

13. T. A. Beu, A. Farcaș, A. E. Ailenei, " Atomistic and Coarse-Grained Modelling of Gene Delivery Polymers", 12th Joint Conference on Mathematics and Computer Science (12th MaCS), 14-17 June 2018, Săcuieu, Romania, prezentare orală.
14. T. A. Beu, A. Farcaș, A. E. Ailenei, " Atomistic and Coarse-Grained Modelling of Polyethylenimine for Gene Delivery Applications", Polymer World Congress (PWC), 3-6 September 2018, Stockholm, Sweden, Romania, prezentare orală.

### Alte contribuții

1. A. Farcaș, C. Floare, L. Buimaga Iarinca, L. Janosi, " Mammalian membrane model behavior in the presence of Ras protein nanoclusters", FEBS JOURNAL 283, 236-236 (2016).
2. A. Farcaș, L. Buimaga Iarinca, C. Floare, L. Janosi, " Effect of complex mammalian membrane models with multiple membrane components on Ras protein nanoclustering", FEBS JOURNAL 283, 235-235 (2016).