

RAPORTARE STIINTIFICA GEMNS 2017

Proiect EURO NANO MED II

Nanoparticule magnetice, încapsulate în grafene multi-funcționale, ca detectori autonavigabili, termal-inteligenți pentru integrin-receptori, utilizabili în tratamentul anti-cancer ghidat prin imagistică de rezonanță magnetică.

Acronim GEMNS

RST - Raport științific și tehnic, Partener 7 (ID-57)

1. Obiective anul 2017;

T4.5. Prezicerea toxicității theranostice a GEMNS prin strategii QSAR (in silico)

T4.5b. Studii QSAR

2. Rezumatul etapelor 2015 (WP1), 2016 (WP4) și 2017

GEMNS – este un dispozitiv molecular, construit dintr-un nucleu magnetic (Fe sau Co) acoperit de straturi de grafena, care poate produce efect theranostic. Peste grafena se depun straturi de polimeri, funcționalizați, care leagă covalent grafena și o imunoglobulină iar enzima (glucozoxidază GOx) va fi legată non-covalent. Prin schimbarea polarității câmpului magnetic exterior, sistemul se încălzește și eliberează enzima, care transformă glucoza în produse de reacție și apă oxigenată H₂O₂, care probabil va modifica proprietățile celulei canceroase, devenind mai sensibilă la diversele terapii anti-cancer.

Etapa **WP1 (2015)**. (**T1.2a**) Au fost realizate modele ale enzimei GOx (cu evidențierea a două situsuri de legare intensă, denumite LIG1 (în interiorul enzimei) și LIG2 (pe suprafața enzimei), prin studii de andocare moleculară); Compleksii enzima-polimer au fost studiați prin Dinamica moleculară, care a permis evaluarea cantitativă a interacțiunilor enzima-polimer, la nivelul diferitelor aminoacizi din structura enzimei (Grad de realizare 100%).

T1.2b. Au fost generate structuri polimerice PEI (polietilenimina) de diferite dimensiuni moleculare și forme (liniar, ramificat și dendrimer) pentru aflarea optimului (forma/mărime) în interacțiunea polimerului cu enzima (Grad de realizare 100%).

Etapa **WP4 (2016)**. (**T1.3** din 2015). Modelarea interacțiunilor enzima-polimer-GEMNS funcție de temperatură. Studiile au fost efectuate pe două tipuri de polimeri: 1. Poly(ethylenimine) (PEI: C14N8 (liniar și trei izomeri ramificați), C18N10 (linear și trei izomeri ramificați)) și 2. Poly(amidoamine) (PAMAM - G0, G1, G1.5, G2, G3). Au fost definite capacitățile lor de legare a grafenei, imunoglobulinei și enzimei în complexul numit GEMNS. Activitatea GOx a fost studiată în trei domenii de temperatură: normal (26-27 °C), eutermic (36-37 °C) și hypertermic (42-46 °C). A fost efectuat un studiu de Dinamica Moleculară pe trei domenii de interes (27°C, pH 6.5); (37°C, pH 7.4) și respectiv (46°C, pH 7.4). Au fost studiate schimbările conformationale ale

aminoacizilor din buzunarul de legare al FAD/GOx care determina schimbări în structura și stabilitatea/activitatea FAD și în cele din urmă ale GOx.

A fost generată “in silico” o unitate funcțională ce compune GEMNS (o sferă grafenică cu miez magnetic, învelită cu straturi de polimeri (PEI/PAMAM) funcționalizați, care se leagă covalent de grafena și de o imunoglobulină Ig (printr-o punte disulfidică) și non-covalent de enzima GOx) (Grad de realizare 100%).

Coroborarea datelor cu date experimentale ale altor grupuri, parteneri GEMNS; Calculele de Dinamică Moleculară au evidențiat **aceleși dimensiuni ale structurii globale GEMNS** ca cele obținute **experimental de Grupul de la Varsovia**.

Au fost efectuate calcule de chimie cuantică și topologie moleculară pe polimerul PEI și alți polimeri utilizați ca drug-carriers, în chimia medicinală; a fost studiată în detaliu **structura elicoidală a unor astfel de polimeri**.

Etapa **WP4 (2016)** (T4.5a.) Predicția toxicității teranostice a GEMNS prin strategii QSAR. Toxicitatea componentelor GEMNS a fost urmărită prin studierea „spațiului proprietăților QSAR/QSPR”, în principal a proprietăților topologice a macromoleculor adiționale (non-enzimatic). Predicția proprietăților fizice și metabolitelor a fost făcută cu procedurile reunite QSAR & vHTTS (virtual High Throughput Toxicity Screening) care utilizează caracteristicile fragmentale ale macromoleculor pentru a prezice toxicități globale. Studiile au arătat că PEI și PAMAM nu prezintă reactivitate chimică în organism și nici proprietăți genotoxice și citotoxice. Au fost studiați și șase dendrimeri sintetizați în laboratorul nostru, care au arătat toxicități de 1000 ori mai mari în comparativ cu PAMAM/PEI. (Grad de realizare 100%).

3 GEMNS – Raport Științific și tehnic 2017

T4.5b. Studii QSAR. În absența unor studii experimentale clare de toxicitate a polimerilor, din cauza distribuției topologice a caracteristicilor structurale locale, se impune evaluarea teoretică a toxicității polimerilor liberi și funcționalizați. Toxicitatea polimerilor va fi cu atât mai mare cu cât ei sunt implicați în interacțiuni cu aminoacizii situsurilor de legare ale enzimelor implicate în procesele de interes în proiectul GEMNS. Descrierea topologiei locale s-a realizat cu programul original “TopoCluj”, care permite și o evaluare a similarității secvențelor primare și secundare ale proteinelor. Bazele de date utilizate au fost PubChem și PubMed. În etapele de reducerea datelor au fost folosite programele: MLR, PCA, PLS și NNA. Studiile au oferit informații și despre dispersia ori agregarea structurilor GEMNS funcționalizate.

Datele experimentale, colectate de partenerii de Proiect GEMNS (care ar putea rafina/confirma rezultatele teoretice) au început să sosească abia în momentul când raportul pe anul 2017 era deja scris. **Dificultățile aparute la dispersarea diverselor structuri GEMNS funcționalizate au fost cauza solicitării, prin Consorțiu, de prelungire a proiectului până în noiembrie 2018.**

(Grad de realizare 80%).

Rezultatele obținute de noi (Partener P7) sunt prezentate în continuare.

A. STUDII DE TOXICITATE

1. Studii experimentale: PEI/PAMAM/ZAC- evaluarea toxicității.

Mai mulți dendrimeri cu nucleu aromatic "ZAC"ⁱ, de generație zero, sintetizați în laboratoarele noastre, au fost studiați experimental și computațional pentru evaluarea toxicității. Sinteza chimică a dendrimerilor a fost efectuată utilizând trei derivați diferiți de bromometilbenzen ca nucleu aromatic și dialcanolamine ca unități de ramificare, cu diferite lungimi ale lanțului de carbon. Datorită prezenței mai multor grupări hidroxil la periferia dendrimerilor, acești compuși au arătat o polaritate ridicată și o solubilitate în apă.

Dendrimerii ZAC studiați au fost sintetizați chimic conform procedurii de literatură descrisă de Füstös și colab. În funcție de poziția relativă a substituenților pe nucleul aromatic, au fost studiați derivații 1,4-bis (bromometil) benzen, 1,3,5-tris (bromometil) benzen și 1,3,5-tris (bromometil) - 2,4,6-trimetilbenzen. Derivatizareaⁱⁱ a fost efectuată cu diethanolamină, disponibilă comercial (DEA) și dipropanolamină preparată "ad-hoc", respectiv dibutanolamină și dipentanolamină.

Procedeul general de preparare a compușilor ZAC # 1-6 este prezentat în Figura 1. La o soluție de brommetilbenzen în acetonitril, s-a adăugat dialcanolamina corespunzătoare, sub agitare continuă. Pentru a se evita formarea sării de bromhidrat de dialcanolamină datorită acidului bromhidric rezultat, a fost adăugat carbonat de potasiu în exces. Amestecul de reacție a fost refluxat timp de 24 de ore, fiind monitorizat pe cromatografie în strat subțire (eluant hexan: toluen 7: 3). Precipitatul rezultat a fost separat prin filtrare în vid, iar filtratul a fost evaporat la presiune redusă pentru a se obține produsul brut. După purificare, dendrimerii se prezintă sub formă de lichide vâscoase, ușor gălbui. Structura lor a fost confirmată prin spectroscopie RMN (1H, 13C) și spectrometrie de masă.

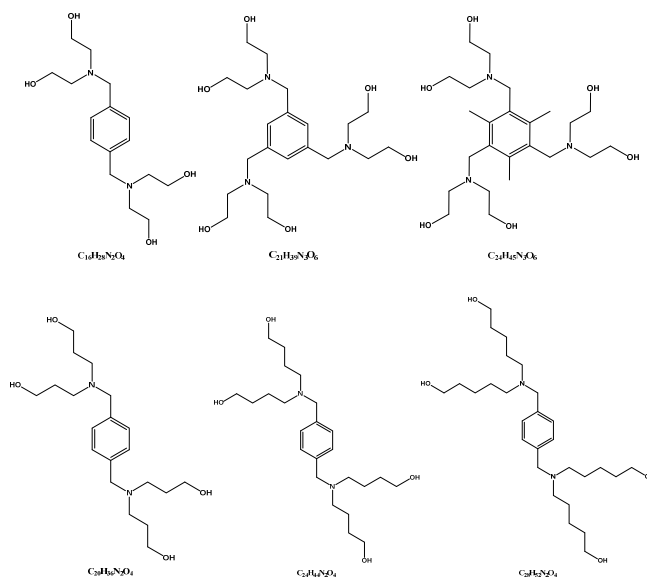


Figura 1. Dendrimeri ZAC sintetizați.

2. Metode experimentale și computaționale

În funcție de costuri și criteriul timp, au fost aleși trei compuși pentru testarea toxicității in vitro, anume doi dendrimeri G0 și G1 și compusul C16H28N2O4 procurat din comerț.

Compușii au fost testați folosind concentrația in crescendo (μM), pe următoarele tipuri de culturi de celule: FD, GBL8, GBL12 și GM1. La fiecare analiză celulară s-au testat doi compuși, fiecare având un martor neutru "NP" fără polimeri. Concentrațiile utilizate pentru fiecare probă au fost: 0,05, 0,1, 1,2,5,5, 10, 50, 100 și, respectiv, 200 μM .

Rezultatele au fost stabilite utilizând date de spectroscopie obținute prin citirea țeștului celulelor de cultură marcate cu un compus cu specificitate ridicată pentru celulele viabile.

Metoda computațională folosită pentru a construi modelul QSAR include trei etape (i) fundamentarea modelului, (ii) calculul descriptorilor; (iii) geneza modelului QSAR.

În *fundamentarea modelului* (i) s-au generat modele 3D ale dendrimerilor testați. Pentru a mima procesul de solvatareⁱⁱⁱ, pentru fiecare valoare μM a fost construit un model de solvatare pentru fiecare compus, rezultând o bibliotecă de 30 modele de solvatare. Exemple de model de solvatare sunt prezentate în Figura 2. Modelele de solvatare au fost generate utilizând programul-software Schrodinger. Concentrațiile de M utilizate sunt în concordanță cu concentrațiile pM utilizate în bioteste. Moleculele au fost optimizate la nivelul câmpurilor de forțe OPLS 2005^{iv}.

Descriptorii moleculari (ii) au fost calculați pe modelele de solvatare complete (polimer plus molecule de apă – Figura 3). S-a folosit programul-software TopoCluj.

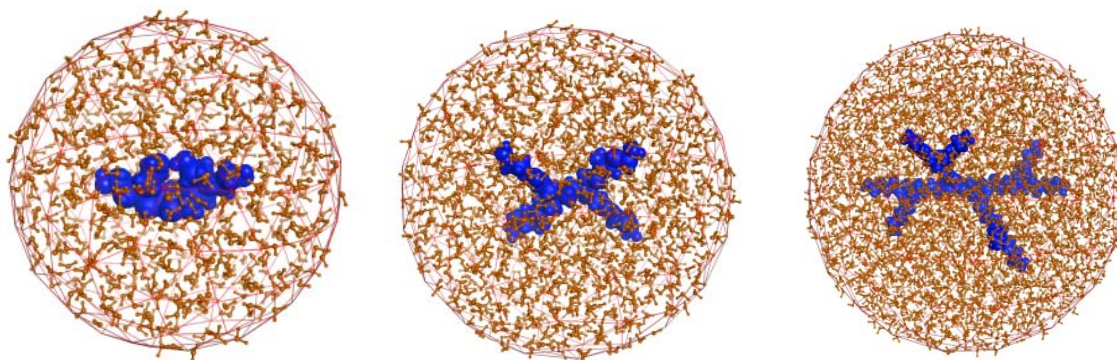


Figura 2. Modele de solvatare a polimerilor (de la stânga la dreapta): NP, G0, G1. Moleculele de apă sunt reprezentate ca sfere și bastoane, în portocaliu auriu atomii ligandului sunt reprezentați ca spații pline, în albastru. Suprafața sferei de hidratare este triangulată, în roșu. În model sunt de asemenea prezenți atomi de Cl.

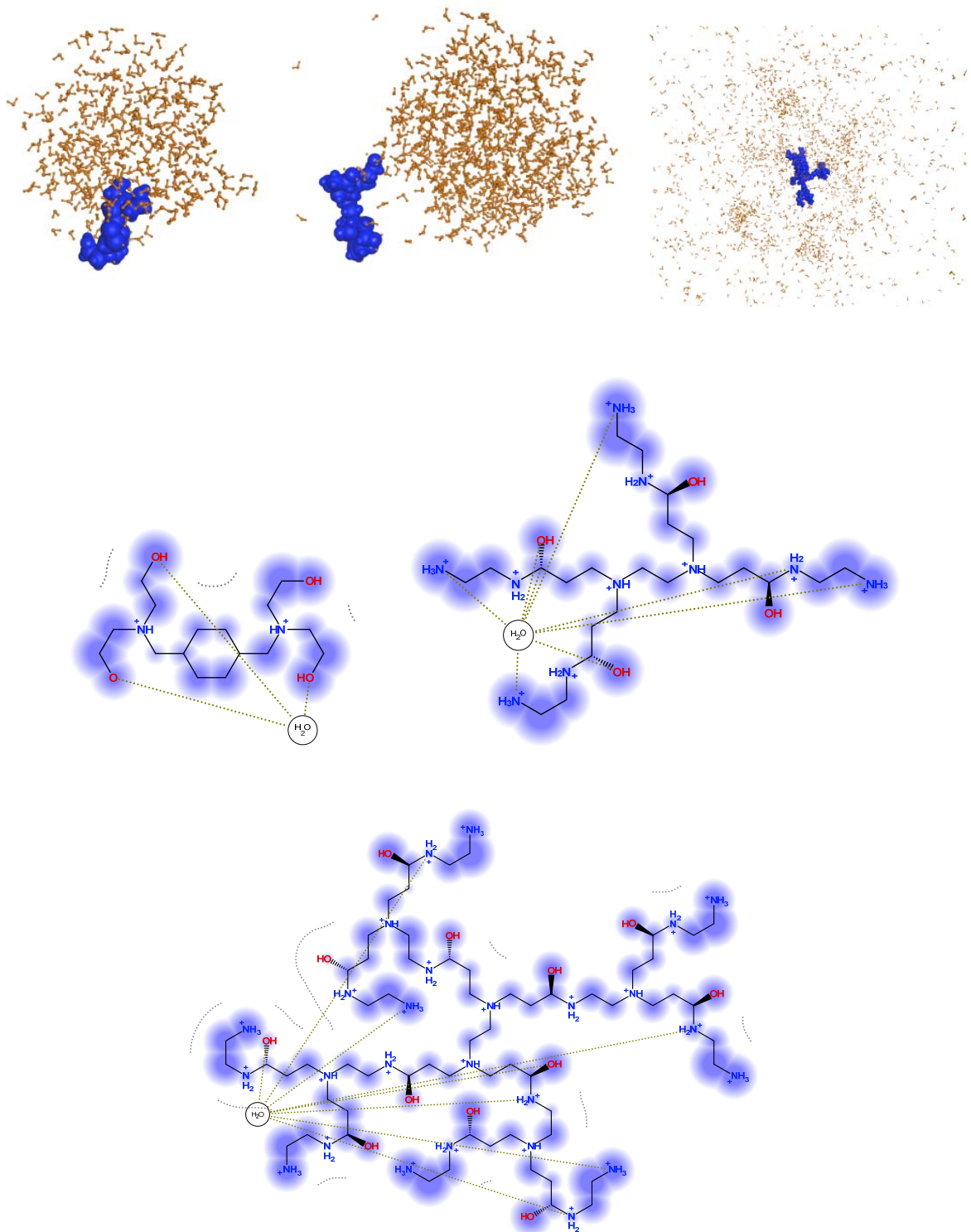


Figura 3. Solvatarea moleculelor de polimer (cu apă- model computațional)

Modelul QSAR (iii) a fost construit folosind mai multe tehnici de regresie liniară. Variabila dependentă a fost aleasă valoarea spectroscopică obținută pentru fiecare tip de polimer și

respectiv concentrație. Ca variabile independente au fost folosiți descriptorii topologici, în special valorile proprii au fost folosite pentru descrierea inter-relației cu datele spectrale.

Au fost generate două modele: (I) un *model estimativ*, folosit pentru a evalua apariția sau neapariția efectului toxic al căii metabolice finale și (II) un *model predictiv*, utilizat pentru a prezice cu precizie datele spectroscopice derivate din analiză.

În modelul estimativ (I), datorită importanței colinearității (ce apare atunci când două variabile, x_m și x_n , într-o regresie multiplă, au o corelație non-zero) și multicolarității (ce apare când mai mult de două variabile predictor, x_m , x_n , și x_r , sunt intercorelabile), au fost calculate *toleranța* și *VIF* (valoarea inflației), pentru evaluarea descriptorilor, pe lângă statisticile usulate (variabilitatea, etc).

În modelul predictiv (II), coliniaritatea ori multicolaritatea nu este o problemă și anume deoarece nu influențează, nu are nici un impact asupra modelului global de regresie și a statisticilor asociate (r^2 , f , p). Scopul modelului este de a prezice acurat și precis o variabilă dependentă. Corelațiile derivate cu acest tip de model nu sunt necesar statistic semnificative.

Figura 4 ilustrează o cultură de cellule în prezența unui astfel de polimer.

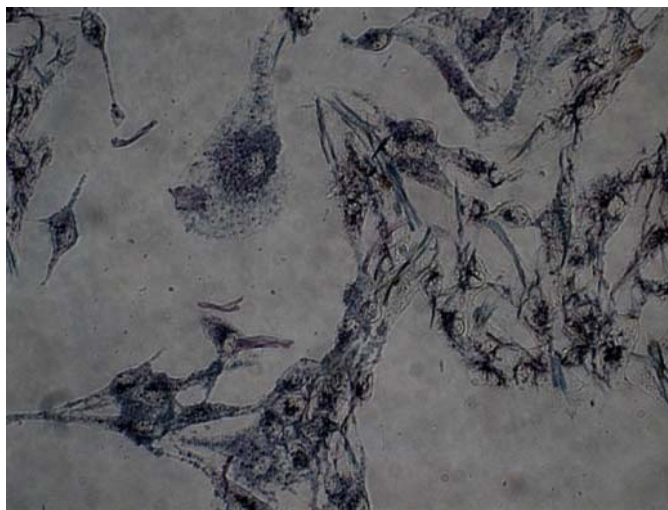


Figura 4. Mediu de cultură, cu polimer - viabilitate celulară demonstrată (celulele viabile colorate in albastru)

3.QSAR.

Un model QSAR a fost propus pentru predicția toxicității polimerilor utilizați. Modelul are statistica: $r^2=0.844$, $p=0.849$, $q^2=0.844$, $RMSD=3.03$. Ecuația modelului este: $y=3.1831+0.844979*Toxicitatea\ observată$ (Figura 5).

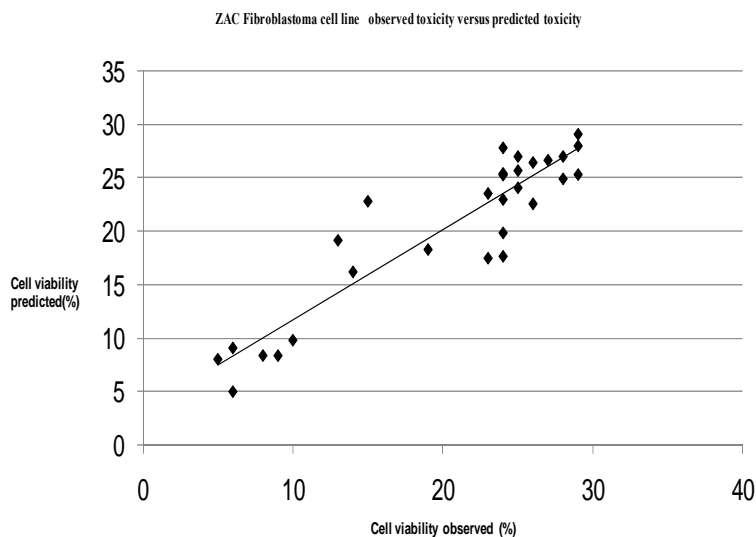


Figura 5. Corelația între toxicitatea observată și toxicitatea prezisă prin QSAR.

Procedura descrisă mai sus a fost urmată și pentru testarea polimerului dendritic PAMAM.

B. MORFOLOGIA UNITATII GEMNS

Morfologia propusă computațional a fost confirmată experimental.

A fost proiectat un model de particule magnetice MNP (magnetic nanoparticle) compuse, constând dintr-un nucleu de fier, acoperit cu un mono-strat de grafenă. A fost de asemenea calculat un model MNP protonat gata de funcționare. Miezul a fost validat, în funcție de forma, mărimea și compoziția MNP, atât experimental cât și computațional; a fost calculat un model al unui complex molecular biofuncțional final. Au fost propuse două funcționalități distincte pentru această unitate: (i) o unitate enzimatică constând în 1GPE^v glucose oxidază, GOx) și (ii) 4CNI (anticorp IL-6, Ig). Ca suport între straturile de grafenă și grupele funcționale s-au utilizat două tipuri de polimeri: polietilenimină (PEI) și poliamidoamină (PAMAM). Stratul de PEI ramificat ajută GOx să se lege non-covalent în timp ce Ig este legat covalent. Anvelopa PAMAM acoperă întregul edificiu. GOx și Ig sunt "fixați" pe stratul polimer pe o suprafață minimă de 200x200 Å², fără interacțiuni; aceasta reprezintă concentrația maximă a proteinelor funcționale (GOx și Ig). Modelul funcționalizat este conceput a acoperi un sferoid.

Gradul de funcționalitate a fost maximizat pentru a conține numărul maxim de structuri într-un spațiu minim. Atât particula MNP cât și unitatea funcțională au fost optimizate la nivelul teoretic HF/6-31G (d), protonat la 310,15 K, la pH de 7,4, într-un mediu ionic de NaCl, cu o concentrație molară de 0,145M · dm⁻³. Întregul model a fost construit folosind câmpul de forțe AMBER 98^{vi}.

Figura 6 prezintă imaginea TEM reprezentativă a nanoparticulelor sintetizate. Se observă tipuri distincte de MNP: (i) particule constând în straturi fragmentate de grafenă, fără miez de metal;

(ii) particule cu straturi de grafene adecvate, dar fără miez de metal; (iii) particule cu strat riguros de grafenă și miez metalic incomplet; (iv) particule cu miez de metal și strat grafenă incomplet și, în final, (v) particule cu straturi de grafenă adecvate și miez metalic înconjurător riguros. De asemenea, forma particulelor este supusă unor variații: (i) triunghi curbat; (ii) semiluna; (iii) elipsoidală și (v) sferică. Miezul metalului variază de asemenea: (i) heterogen; (ii) omogen; (iii) hipodens centru cu limită hiperdensă (iv) centru hiperdens cu limite hypodense, etc.

În Figura 7, sunt prezentate două particule de rază distinctă. Ambele particule au miez de metal în contact direct cu stratul de grafen cu straturi reduse; se observă nucleul heterogen.

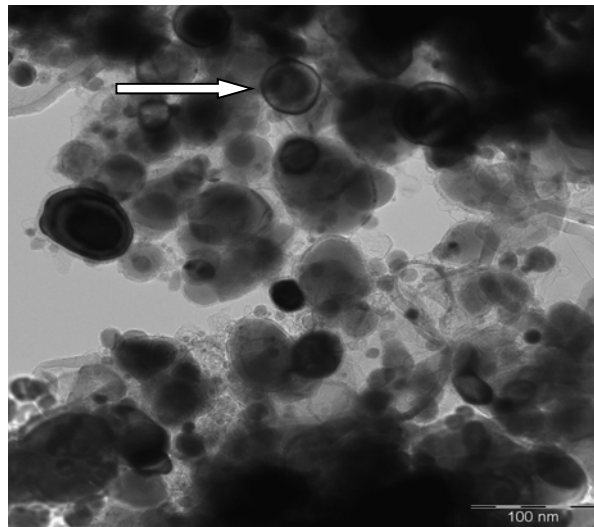


Figura 6. Imagine TEM (microscopie electronică de transmisie). Este prezentată populația MNP de diferite forme și mărimi. Pot fi observate variații în coaja de grafenă și miezul de fier. Săgeata albă indică o nanoparticulă cu diametrul de 125nm, cu un raport adecvat, grafenă/nucleu Fe.

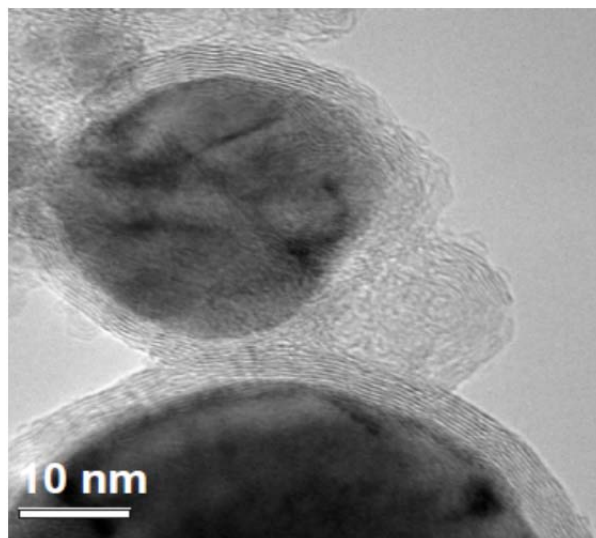


Figura 7. Imagine TEM: două MNP în contact. Stratul de grafenă este vizibil în jurul nucleului Fe. Forma și densitatea particulelor nu sunt bine definite; se observă unele neregularități în straturile de grafenă și o tendință de agregare a particulelor.

În Figura 8, este prezentată o particulă "ideală"; forma este aproape sferică, stratul de grafenă este hiperdens și fără defecte, nucleul este hipodens omogen, cu o margine hiperdensivă. Între miezul de metal și acoperirea cu grafenă cu puține straturi se observă o regiune hipodensă.

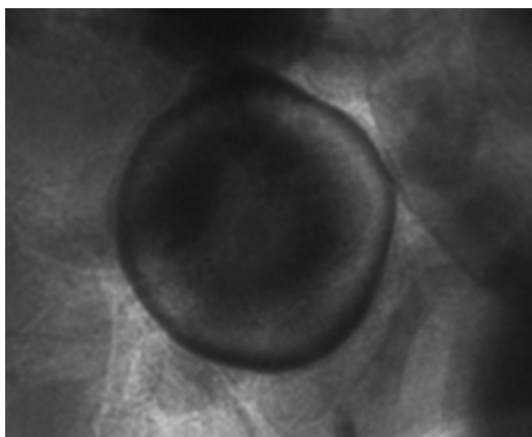


Figura 8. Imaginea TEM ilustrează un detaliu al Figurii 6 (MNP marcat cu săgeată albă). Miezul metalic este acoperit cu straturi de grafenă.

Rezultate computaționale. Un model de particule compuse, constând într-un mono-strat de grafenă cu miezul un cluster icosaedral^{vii} de atomi de Fe, prezintă abateri minore de la forma ideală sferică, atât în ceea ce privește forma stratului grafenic cât și a clusterului metalic interior. Analiza "elemental" a modelului pentru complexul cu formula moleculară este următoarea: $C_{15348}Fe_{204}$; C 98,68%, Fe 1,31%; 10812 atomi de H au fost introduși în sistem, pe ambele părți ale monostratului de grafenă (Figura 9). Diametrul modelului rezultat a fost de 20 Å (2nm).

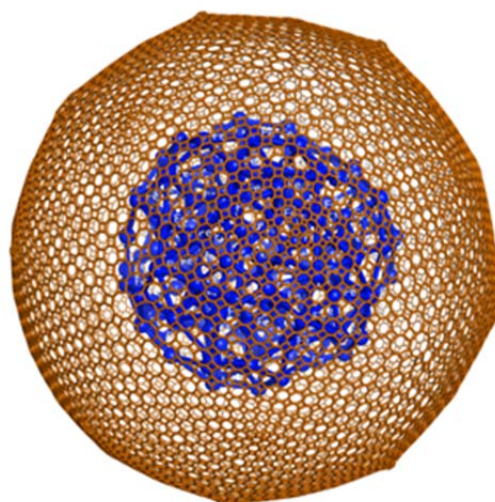


Figura 9. Sfera monostrat de grafenă (colorat în aurul portocaliu) conținând un cluster icosahedral de Fe⁺⁺ (în albastru marin).

Un model de MNP protonat este prezentat în Figura 10. Sistemul a fost hidrogenat pentru a determina pozițiile ipotetice disponibile pentru funcționalizarea ulterioară.

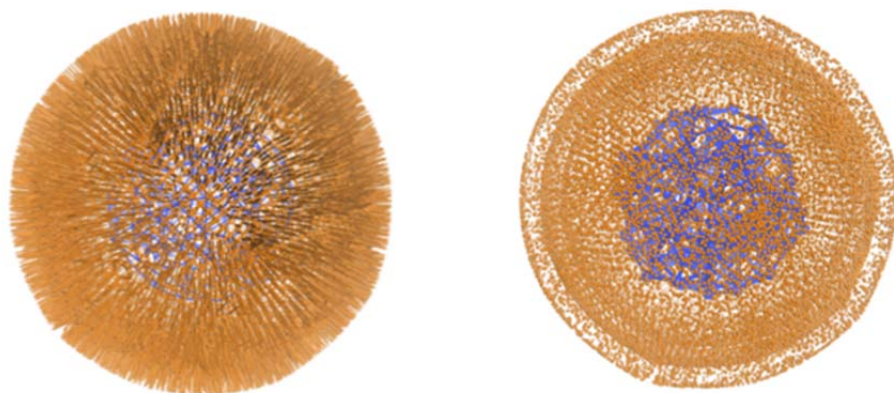


Figura 10. Grafene monostrat sferice, conținând un cluster icosahedral de Fe, populat cu atomi dehidrogen (reprezențați ca bastoane, în orange auriu (stânga); Atomi de carbon și hidrogen din interiorul anvelopei și în afara ei (dreapta).

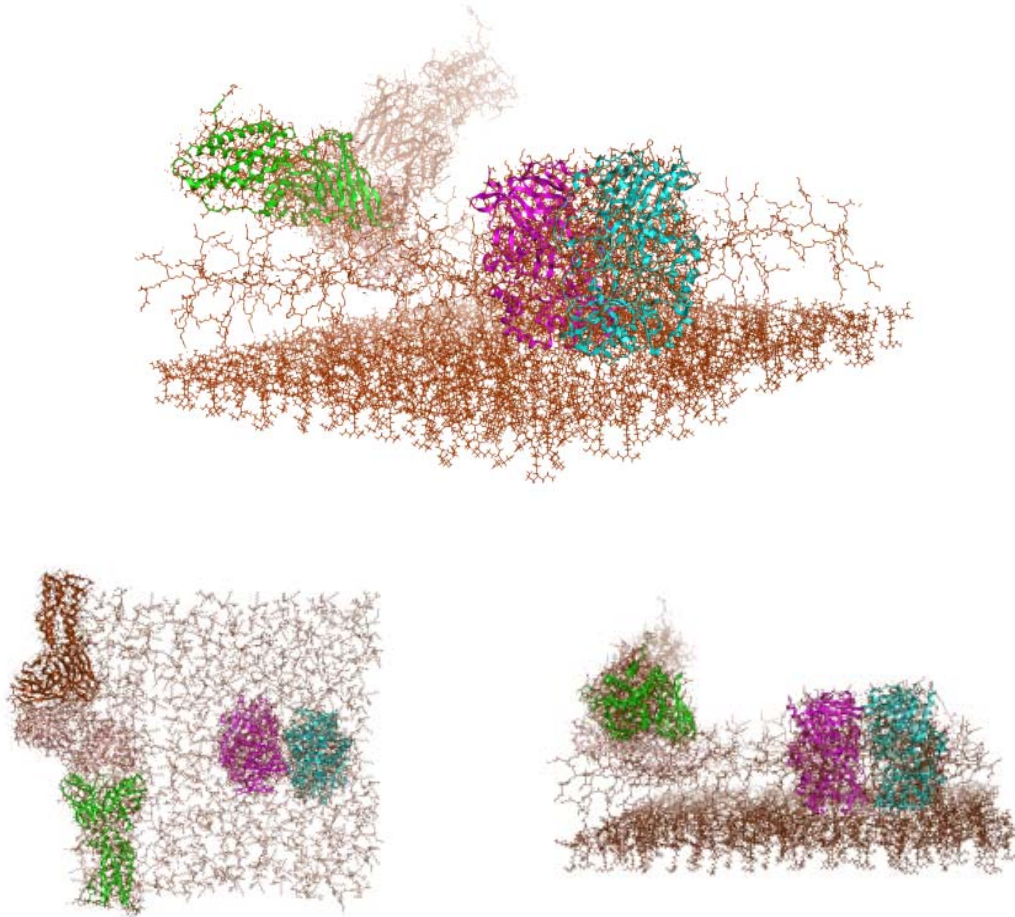


Figura 11. Unitatea funcțională. Sus: straturile de polimer și grafenă sunt reprezentate în bile și bastoane. Proteinele sunt reprezentate în panglici cu unitățile funcționale colorate. Jos: Vedere de sus (stânga) și vedere laterală (dreapta).

Prin calcul numeric, s-a arătat că o unitate funcțională, cu o suprafață de 40000\AA^2 ($200 \times 200\text{\AA}$) este repetată de 123 de ori, pentru a acoperi o sferă cu diametrul apropiat de 125nm (1250\AA), găsită experimental. Aceasta înseamnă că 123 unități (adică molecule) GOx și 123 unități Ig, cu raportul GOx:Ig de 1:1, sunt necesare pentru a acoperi sfera modelată. Acest model presupune că unitatea funcțională este plasată pe suprafața sferei în același mod (aceeași poziție, aceeași orientare) și nu există interacțiuni cu unitățile funcționale învecinate. Modelul presupune de asemenea că spațiul este umplut la maxim cu unitatea funcțională.

Un model computațional mai realist, presupunând interacțiuni cu alte unități funcționale, dar păstrând poziția și orientarea relativă fixă, poate fi, de asemenea, conceput. Într-un astfel de caz, o unitate funcțională mai mare poate avea $1200 \times 1200\text{\AA}^2$, fiind compusă din 36 de unități funcționale. În acest model, o sferă poate conține un număr de unități 123GOx și $30,70$ unități de Ig, cu raportul GOx: Ig de 4: 1. Un model cu interacțiuni între unitățile funcționale și poziția și

orientarea liberă a unității funcționale, adică o reacție de succes considerabil mai mică de 100% este mai aproape de fenomenele autentice.

Concluzii. Raportul corect nucleu/anvelopă și dimensiunea consecutivă a particulelor, determinată experimental, se corelează cu modelul computațional al unităților funcționale; diametru de 125nm este dimensiunea optimă, în ceea ce privește perspectiva biofuncționalizării.

C. EVALUAREA SUPRAFETEI FUNCTIONALE

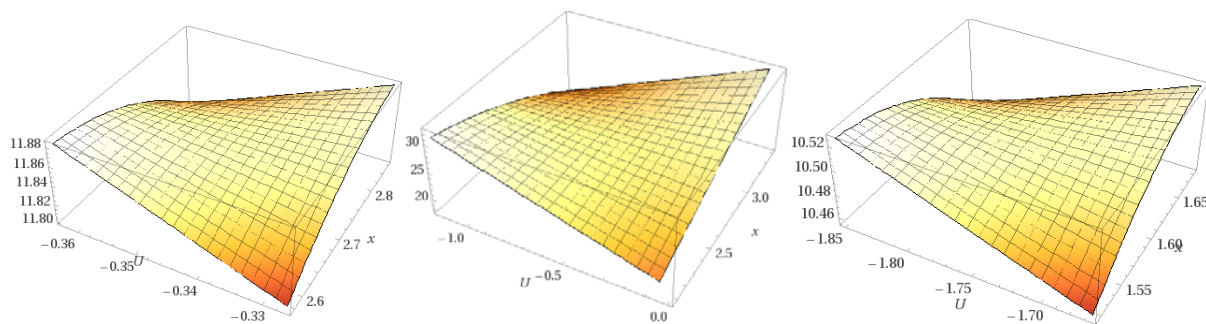
Această metodă se bazează pe descriptori care mimează procesul de recunoaștere moleculară. Recunoașterea moleculară este simulată utilizând andocarea moleculară. În condiții fiziologice, când interacțiunea dintre un ligand și un receptor are loc, ligandul și receptorul "se modelează" unul pe celălalt, pentru a forma un complex capabil să acționeze asupra unui țesut viu.

O problemă comună a descriptorilor moleculari este lipsa lor de "sensibilitate" la variații conformaționale (aceleași valori – degenerate - pentru conformația liberă și fixată a unui ligand Tabelul 1). O altă problemă a descriptorilor moleculari este caracterizarea unui întreg proces printr-o singură valoare numerică. Pentru a rezolva această problemă, a fost utilizată o suprafață topologică moleculară. Suprafața a fost generată utilizând coordonatele cartesiene ale atomilor liganzi în forma liberă și în formă andocată. Suprafața topologică adoptată de un ligand este conformă cu specificul receptorului și, eventual, corelată cu efectul biologic. Suprafața obținută a fost caracterizată folosind operatorul discriminant polinomial și Laplacianul.

Tabelul1. Ecuatii Cartesiene ale liganzilor $MraY^{viii}$			
Molecula andocată	X	Z	Y
Caprazamicyn A	$Y=1.1474\ln(x)+2.1222$	$Y=2.2825\ln(x)+7.4555$	$y=1.4935\ln(x)+4.3625$
Liposidomicyn D	$Y=0.6125\ln(x)+8.986$	$Y=1.8278\ln(x)+9.8712$	$Y=0.1306\ln(x)+9.6344$
Muraymycin C	$Y=1.9153\ln(x)+2.4093$	$Y=-0.492\ln(x)+22.764$	$Y=0.1996\ln(x)+7.3225$
Mureidomycin A	$Y=0.9779\ln(x)+6.4303$	$Y=-0.93\ln(x)+19.552$	$Y=0.6179\ln(x)+7.1176$
Tunicamycin I	$Y=0.6101\ln(x)+10.26$	$Y=1.5282\ln(x)+14.268$	$Y=0.851\ln(x)+6.0062$
$MraY$	$Y=-0.991\ln(x)+34.353$	$Y=3.639\ln(x)-12.969$	$Y=-6.486\ln(x)+56.661$

Suprafața astfel obținută reprezintă un tip special de suprafață, o varietate (manifold) bidimensională. În matematică, un manifold este un spațiu topologic care seamănă local cu spațiul Euclidian în apropierea fiecărui punct. Fiecare punct al unui distribuitor n-dimensional are o vecinătate care este homeomorfă spațiului euclidian (există o funcție continuă între cele două spații care are o funcție inversă continuă) a dimensiunii n. Astfel, un manifold are proprietatea de a fi Euclidian la nivel local, o proprietate conservată de un homeomorfism local^{ix}. Pe o astfel de proprietate se bazează minimizarea în algoritmi de andocare. Un discriminant

polinomial este produsul pătratului diferențelor dintre rădăcinile polinomiale. În algebră, discriminantul unui polinom este o funcție polinomială a coeficienților săi. Discriminantul este utilizat pe scară largă în teoria numerelor prin generalizarea acestuia ca suprafață discriminantă^x. Discriminantul polinomial se calculează până la un factor constant; se pot folosi diferite normalizări^{xi}. Pentru o ecuație pătratică $a_2z^2 + a_1z + a_0 = 0$, discriminantul unui polinom univariat $p(x)$ este dat de expresia: $D_2 = (a_1)^2 - 4a_0a_2$. Discriminanții se folosesc în geometria algebrică în studiul curbelor algebrice, în general, al hiperperfectiilor algebrice. Dacă V este o astfel de curbă sau suprafață, V este definită ca setul zero al unui polinom multivariat. Acest polinom poate fi considerat un polinom univariat, cu coeficienții polinomiali în celelalte variabile. Discriminantul în raport cu variabila aleasă definește o hipersuprafață W în spațiul altor variabile. Un punct în W reprezintă proiecția exactă a unui punct în V , care este fie singular fie tangente fie admite un hiperplan tangent, care este paralel cu axa variabilei alese. Dacă f este un polinom bivariat în X și Y cu coeficienți reali, astfel încât $f = 0$, este ecuația implicită a unei curbe algebrice plane. Calculul rădăcinilor discriminantului X și Y permite calcularea tuturor punctelor remarcabile ale curbei, cu excepția punctelor de inflexiune. Laplacianul este un operator diferențial dat de divergența gradientului unei funcții în spațiul Euclidian. Laplacianul $\Delta f(p)$ al unei funcții f într-un punct p , până la o dimensiune constantă, este rata la care valoarea medie a funcției f , peste sfera centrată în p deviază de la $f(p)$, când raza sferei crește. În sistemul de coordonate Carteziene, Laplacianul este dat de suma a două derivate parțiale ale funcției f în raport cu fiecare variabilă independentă. Laplacianul reprezintă densitatea fluxului unei funcții. De exemplu, rata netă la care o substanță chimică dizolvată într-un fluid se deplasează spre/dinspre un punct este proporțională cu Laplacianul concentrației chimice în acel punct; exprimată simbolic, ecuația rezultată este ecuația de difuzie. Se utilizează pe scară largă în științe pentru modelarea fenomenelor fizice.



CaprazamicynA

Liposidomicyn D

Muraymycin

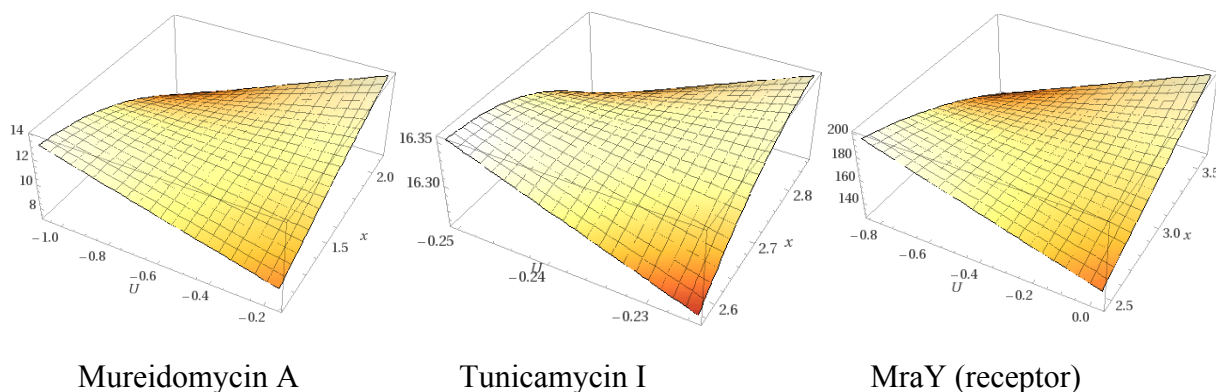


Figura 12. Manifold pt inhibitori MraY andocați

plot 3D integrat, $y=1.1474\ln(x)+2.1222 U 2.2825\ln(x)+7.4555 U 1.4935\ln(x)+4.3625$

$Y=f(1.1474\ln(x)+2.1222 U 2.2825\ln(x)+7.4555 U 1.4935\ln(x)+4.3625)dx$

S-au studiat structurile a cinci membri reprezentativi ai claselor inhibitorilor MraY: Caprazamicina A, Lipozidomicina B, Muraimicina CI, Mureidomicina A, Tunicamicina I (Figura 12). Toate structurile au fost extrase din ^{xii}. Structurile pot fi regăsite după cum urmează: Caprazamicină A, de la referința^{xiii}, Liposidomicin de la BromPubChemCID443576, Muraimicină Clfrom de la^{xiv}, Mureidomicină prin substanțe chimice de interes biologic, ChEBI ID: 29632, Tunicamycin I de la Pub Chem CID 56927848. Structurile au fost construite prin generarea de structuri 3D din reprezentările 2D regăsite utilizând sursele enumerate mai sus. Această metodologie a fost utilizată pentru a avea o metodă uniformă de construcție. Software-ul LigPrep integrat în pachetul Schrodinger 2009 a fost utilizat pentru pregătirea liganzilor. Molecule au fost minimize energetice, în vid, folosind Ligprep (Schrodinger, New York, NY, SUA). Soluția moleculară folosită a fost OPLS2005 (Schrodingersuite, NewYork, NY, SUA).

Molecula MraYa fost aleasă ca receptor. Structura a fost regăsită utilizând PDck 5ckr, care reprezintă MraY în complex cu Muramycin D2. Ligandul și moleculele de apă au fost eliminate din model. Modelul a fost preparat suplimentar folosind expertul de pregătire a proteinei după cum urmează: au fost atribuite ordine de obligațiuni, au fost adăugați atomi de hidrogen, buclele de aminoacizi au fost corectate folosind Prime (o stare protonată la pH 7,4 a fost astfel generată). Structura a fost minimizată energetic utilizând câmpul de forțe OPLS2005, în vid. Complecșii receptorului MraY cu liganzii au fost generați cu o procedură de andocare. Software-ul folosit a fost AutoDockVina^{xv} Receptorul (MraY) a fost considerat fi xat, liganzii au fost considerați mobili. Situsul activ al MraY a fost regăsit din literatură^{xvi} folosind structura PDP 5ckr (vezi Figura 15). Afinitățile de legătură au fost înregistrate, în kcal / mol. Procedura de andocare este după cum urmează. Se deschide fila PDB care conține MraY fără ligand. Liganzii, inițial în format SDF, au fost transformați în PDB, cu ajutorul programului PyMol. Conform cerințelor Autodock Vina, filele au fost preparate din pdb-urile proteinei (MraY) și ale liganzilor. Grila,

care cuprinde toate fragmentele selectate, are următoarele coordonate: centru_x = 9.74; centru_y = 16,09; centru_z = 4.86, cu un spațiu de 0.375. Dimensiunea casetei rectangulare a fost setată la: size_x = 25, size_y = 25, size_z = 25. Toate datele sunt exprimate în Å. După rularea procedurii de andocare, cea mai bună poziție a fost luată în considerare pentru fiecare ligand, în ceea ce privește valorile afinității de legare (kcal / mol). Când buzunarul de legare nu este cunoscut, se face maparea receptorului pentru fixarea mai multor locații cele mai active, apoi se decide care dintre acestea este adecvat pentru un anumit caz (ligand și, respectiv, receptor). AutoDock sau software similare pot detecta cavitățile și buzunarele de legătură. De exemplu, în AutoDock4.2 (Scripps Research Institute & Olso Laboratory SUA, San Diego, CA, SUA), se poate construi o grilă suficient de mare pentru a acoperi întreaga suprafață a proteinei, cu o spațiere a rețelei mai mare decât valoare implicită de 0,375 Å și cu mai multe puncte ale grilei în fiecare dimensiune. Astfel, experimentele preliminare de andocare, efectuate cu AutoDock4.2 (The Scripps Research Institute & Olso Laboratory SUA, San Diego, CA, SUA), permit aflarea unor anumite regiuni ale proteinei, preferate de ligand. Acest procedeu este denumit uneori "andocare oarbă". Apoi, într-o a doua rundă de andocare, pot fi construite grile mai mici în jurul acestor potențiale situri de legare. În cazul în care proteina este foarte mare, atunci ea poate fi divizată cu grile care se suprapun. După identificarea sitului de legare, andocarea este efectuată pe AutoDock4.2 (Institutul de Cercetare Scripps & Olso Laboratory SUA, San Diego, CA, SUA) sau AutoDock Vina așa cum este descris mai sus.

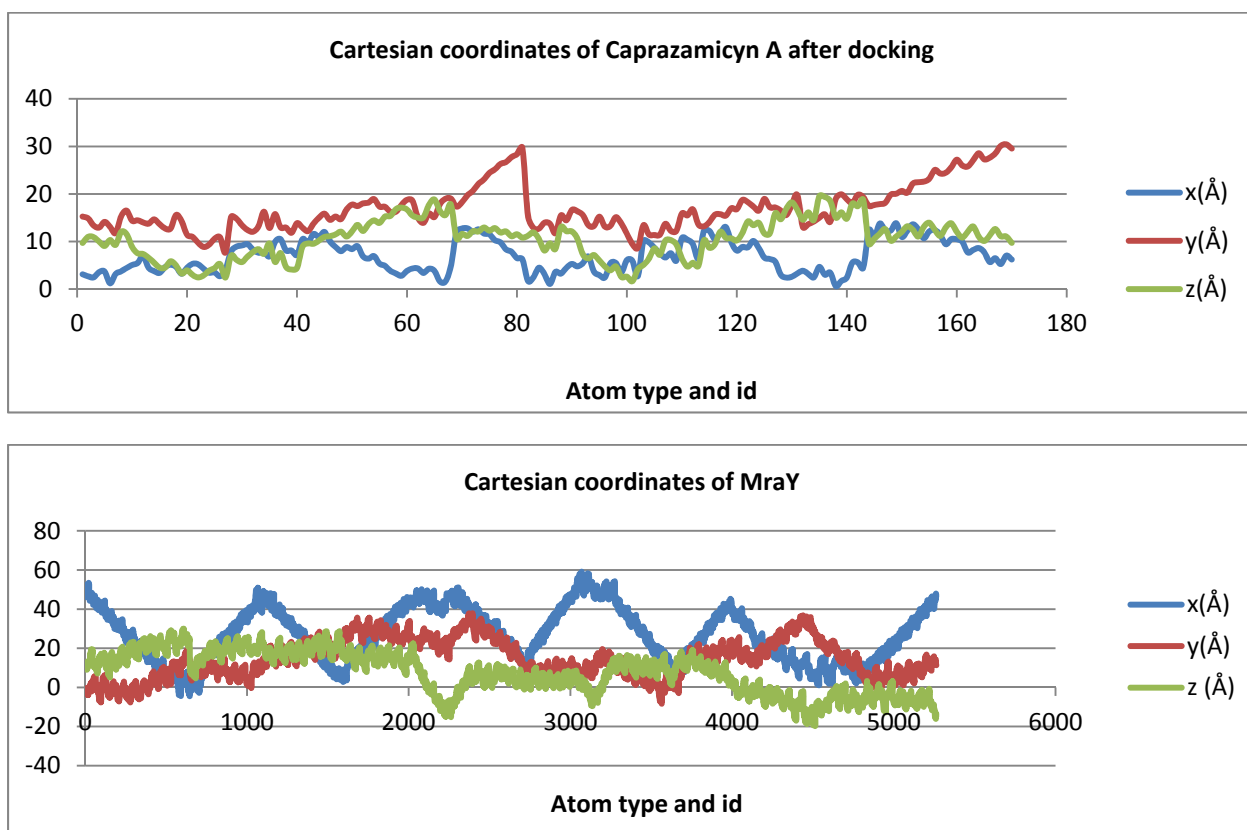


Figura 13 Variația coordonatelor Carteziene ale MraY

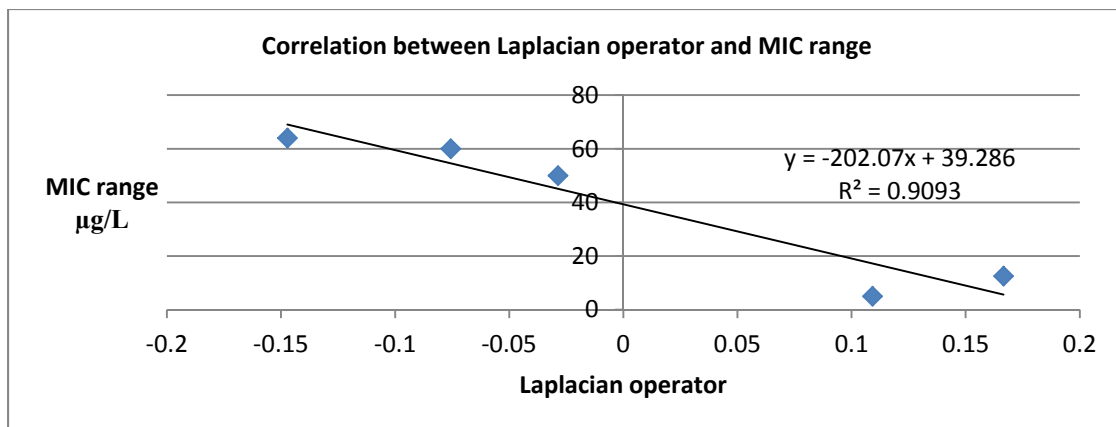


Figura 14 Corelatia dintre operatorul Laplacian și MIC

Suprafața topologică a ligandului, după andocare, este modelată/condiționată în mod clar de către receptor. Această suprafață este un manifold bidimensional; ea este modelată de forțele intra- și intermoleculare implicate în andocare. Operatorul Laplacian și discriminantul polinomialau fost calculați cu o funcție polinomială de gradul doi, fiecare ligand, înainte și după andocare. Ecuțiile coordonatelor Cartesiene (Figura 13) sunt corelate cu energiile de legătură (andocare) și valorile MIC (Figura 14). Acești operatori, pot fi utilizați în predicția bioactivității, ce implică complexul ligand-receptor.

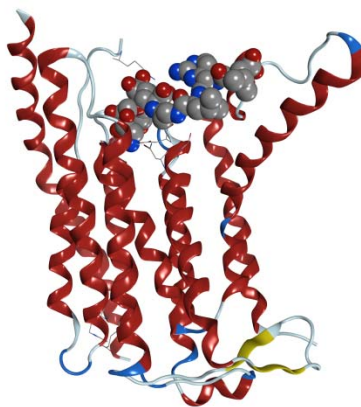


Figura 15. 5ckr prezentând MraY în complex cu Muramymycin D2.

D. AGREGAREA PROTEINELOR ȘI INTERACȚIUNEA CU NANOMATERIALELE

Proteinele își manifestă acțiunea numai atunci când structura lor terțiară și cuaternară este intactă. În această stare, anumite regiuni ale proteinei localizate la locul de legare pot să se orienteze și să permită realizarea procesului de recunoaștere moleculară și formarea completă a

complexului ligand- receptor. În condiții nefiziologice, cum ar fi: temperatură ridicată/scăzută, presiune osmotică mărită/scăzută, radiații, reactivi chimici - proteinele native sunt denaturate. Desfășurarea este un proces reversibil atunci când regiunile active ale proteinei (adică receptorul) se desfășoară și permit dezlipirea ligandului. În starea desfășurată, energia proteică și entropia sunt ridicate. În starea nativă pliată, energia și entropia sunt scăzute.

A fost aleasă pentru studiu proteina 1ATU cu o greutate moleculară de 41,97 kDa, în interacțiune cu polimerul dendrimeric PAMAM de diferite generații: C22H48N10O4 (G0), C62H128N26O12 (G1), C110H192N26O44 (G1.5), C142H288N58O28 (G2), C302H512N122O60 (G3) și o serie de dendrimeri de generație zero, cu nucleu aromatic „ZAC“: C16H28N2O4, C20H36N2O4, C22H40N2O4, C24H45N3O6, C28H52N2O4. Au fost construite un număr total de 10 sisteme (proteină:PAMAM). Structurile au fost optimizate pentru starea intravasculară normală: NaCl 0,15M, 310.15K temperatură, constantă dielectrică 78. Pentru a studia topologia interacțiunii proteice cu polimerii, a fost utilizată o tehnică pentru amplificarea și expunerea regiunilor de proteină care interacționează cu stratul de polimer. Rezultatul acestei tehnici este o "coardă" de proteine care are structură primară, secundară, dar nu terțiară. Analiza a inclus descriptori topologici și anumite proprietăți fizico-chimice (sarcini parțiale, suprafață, volum, log P, refractivitate, polarizabilitate, masă). Datele biochimice privind reacția care ar putea induce o absorbție a polimerului pe proteină au fost corelate cu datele de toxicitate ale polimerilor. Stratul de polimer 1ATU liber și structura 3D a 1ATU au fost, de asemenea, luate în studiu. Diagrama de coordonate 3D (x, y, z) a fost reprezentată pentru toate structurile, în scopul evidențierii diferențelor în topologia secvențelor proteice adică forma diferită pentru fiecare pereche de polimer 1ATU și pentru a determina situsul topologic al proprietăților.

S-a studiat suprafața de agregare a proteinei, în toate șirurile proteice rezultate plus structura „nativă“ 1ATU și pentru structurile „libere“ PAMAM. Astfel pot fi descrise și comparate proprietățile de interacțiune biologică și topologia lor (în termeni de reacții biochimice, agregare, etc.). Procesul global de agregare a fost de asemenea caracterizat prin calcularea potențialului Zeta pentru un domeniu de temperatură (de la 273°K la 320°K) și un domeniu de pH în jur de 7,4. Câmpul de forțe OPLS3 folosit pentru a optimiza suprafețele de agregare.

Pentru a corela proprietățile topologice cu agregarea, a fost efectuată o analiză computațională pe proteina nativă și pe moleculele de polimer (PAMAM și ZAC).

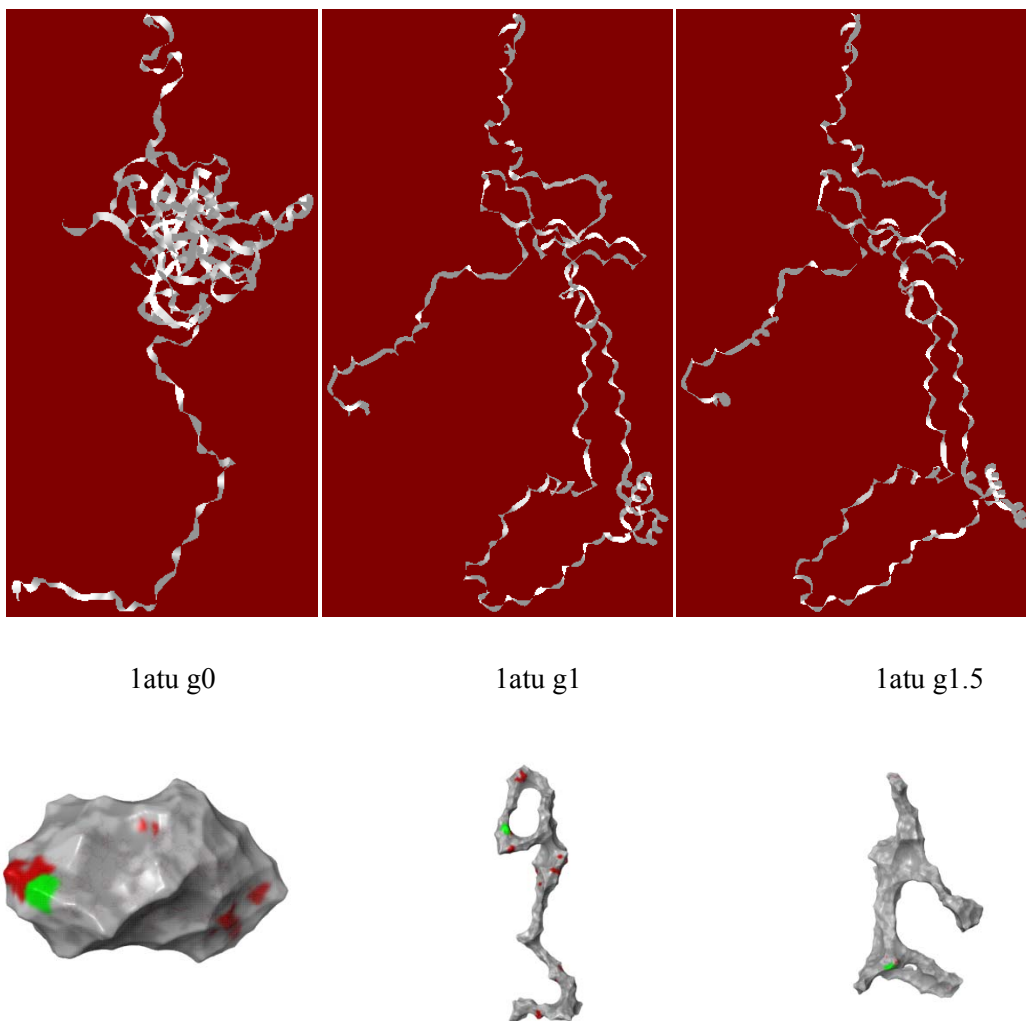


Figura 16. Structura 1ATU 3D "nativă", "liberă" și respectiv g1.5. Suprafața de agregare este colorată în roșu; sunt reprezentați toți Aa care pot contribui potențial la un proces de agregare. În verde este reprezentat Aa cu cea mai mare șansă de a produce o agregare.

Șirurile de proteine 1ATU sunt denumite în funcție de interacțiunea lor cu stratul de polimer.

S-a calculat scorul de agregare a șirurilor de proteină. Cel mai mic scor are șirul generat de stratul G1.5.

În Figura 17 sunt reprezentate comparativ scorul proteinei native, scorul pentru șirul proteic liber și scorul pentru PAMAM, G1.5.

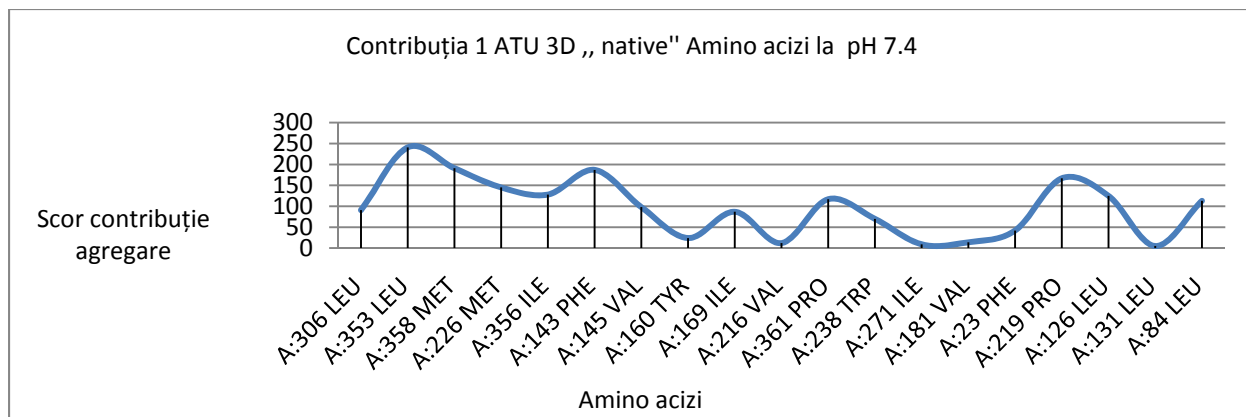


Figura 17. Scoruri de agregare pentru proteina nativă, pentru șirul liber și scorul pentru complexul G1.5.

Straturile de polimeri au un efect cuantificabil asupra proteinelor și favorizează reacții diferite. Acest efect este demonstrat de variația coordonatelor topologice. Variația proprietăților topologice determină variații ale proprietăților biochimice care favorizează diferite tipuri de reacții. Din punctul de vedere al 1ATU, PAMAM G1.5 are potențial cea mai scăzută interacțiune cu proteinele și efectele toxice. Această proprietate este reflectată de analiza șirului de proteine și de analiza biochimică a PAMAM G1.5, care a arătat că nu există reacții biochimice potențial obligatorii cu proteine. Potențialul Zeta sugerează o soluție coloidală mai puțin stabilă de proteină 1ATU. Analiza șirurilor de proteine oferă o metodă fezabilă de explorare a interacțiunii proteine - polimeri. Structura proteinei este influențată de mediul de imobilizare. Tehnica folosită este adecvată în calcularea interacțiunilor proteinei cu medii diferite (nanostructuri de carbon, dendrimi).

Prin operarea modificărilor mici în structura proteinei (receptorului), spațiul de bioactivitate a ligandului poate fi accesat de către liganzi. Când întreaga proteină este denaturată, adică redusă la structura sa primară și secundară, spațiul de bioactivitate nu poate fi abordat. Astfel, spațiul de bioactivitate poate fi accesat numai de o structură cu arhitectură terțiară și cuaternară.

Studiu de agregare/denaturare a fost realizat în legătură cu problema aglomerării/insolubilizării particulelor GEMNS (partenerii din Polonia și Norvegia).

CONCLUZII:

1. PAMAM nu prezintă toxicitate biologică
2. Computațional PAMAM nu interacionează cu Cit P450 sau alte sisteme enzimatic
3. Modelul de solvatare în cazul PAMAM prezice cu acuratețe activitatea biologică
4. În cazul moleculelor insolubile în apă, modelul QSAR prezice cu acuratețe lipsa toxicității/ toxicitatea acestora.
Se poate construi un model computațional al GEMNS (generațiile I, II, III), ce poate fi folosit în calcularea magnetismului și toxicității, cât și a interacțiunilor (absorbția proteinelor) care pot conduce la aglomerarea/insolubilizarea GEMNS.
5. Raportul GOx : Ig 4:1 reprezintă fracția optimă pentru un efect biologic maxim
6. Sfera exterioară de grafenă este „deformată”, de nucleul metalic, fapt demonstrat atât experimental cât și computațional.
7. Compoziția nucleului metalic determină forma GEMNS, Gen I . Combinația Ni/Co determină o formă sferică și o suprafață de grafenă regulată.
8. Coordonatele Cartesiene pot fi utilizate pentru a genera o suprafață topologică.
9. Suprafața topologică este corelată cu bioactivitatea moleculară.
10. Discriminantul polynomial și operatorul Laplacian se corelează cu suprafața topologică și cu activitatea moleculară (bioactivitatea).

REFERINTE

ⁱ Synthesis of Novel Aromatic Core Zero Generation Dendrimers, Melinda-Emese Füstös, Tímea-Anita Sipos, Mircea V. Diudea, and Gabriel Katona*, Croat. Chem. Acta 88 (2) (2015) 129–132

ⁱⁱ Derivatization of synthetic polymers in mass spectrometric studies, R. S. Borisov , V. G. Zaikin, Journal of Analytical Chemistry, December 2010, Volume 65, Issue 14, pp 1423–1435

ⁱⁱⁱ Greenwood, Norman N.; Earnshaw, Alan (1997). Chemistry of the Elements(2nd ed.). Butterworth-Heinemann. p. 823. ISBN 0-08-037941-9.

^{iv} Jorgensen WL, Tirado-Rives J (1988). "The OPLS Force Field for Proteins. Energy Minimizations for Crystals of Cyclic Peptides and Crambin". J. Am. Chem. Soc. 110 (6): 1657–1666

^v Wohlfahrt, G., Witt, S., Hendle, J., Schomburg, D., Kalisz, H.M., Hecht, H.J., 1.8 and 1.9 Å resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidases as a basis for modelling substrate complexes. (1999) Acta Crystallogr., Sect. D 55: 969-977

^{vi} A. Dejoux, P. Cieplak, N. Hannick, G. Moyna, & F.-Y. Dupradeau, AmberFFC, A Flexible Program to Convert AMBER and GLYCAM Force Fields for use with Commercial Molecular Modeling Packages, J. Mol. Model., 2001, 7, 422-432

J. Mol. Model., 2001, 7, 422-432

-
- ^{vii} J. P. K. Doye and D. J. Wales, *Chem. Phys. Lett.* 247, 339 (1995).
- ^{viii} Chung, B.C.; Zhao, J.; Gillespie, R.A.; Kwon, D.-Y.; Guan, Z.; Hong, J.; Zhou, P.; Lee, S.-Y. Crystal Structure of MraY, an Essential Membrane Enzyme for Bacterial Cell Wall Synthesis. *Science* 2013, 341, 1012–1016
- ^{ix} Abrams, L.; Fishkind, D.E.; Priebe, C.E. The generalized spherical homeomorphism theorem for digital images. *IEEE Trans. Med. Imaging* 2004, 23, 655–657
- ^x Manin, Y.I.; Panchishkin, A.A. *Introduction to Modern Number Theory*, 2nd ed.; Series: Encyclopaedia of Mathematical Sciences; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2006; Volume 49, p. 130
- ^{xi} Akritas, A.G. *Elements of Computer Algebra with Applications*; Wiley: New York, NY, USA, 1989
- ^{xii} Walsh, C. *Antibiotics: Challenges, Mechanisms, Opportunities*, 1st ed.; American Society for Microbiology (ASM) Press: Washington, DC, USA, 2016.
- ^{xiii} Takahashi, Y.; Igarashi, M.; Miyake, T.; Soutome, H.; Ishikawa, K.; Komatsuki, Y.; Koyama, Y.; Nakagawa, N.; Hattori, S.; Inoue, K.; et al. Novel semisynthetic antibiotics from caprazamycins A–G: Caprazene derivatives and their antibacterial activity. *J. Antibiot.* 2013, 66, 171–178
- ^{xiv} Mitachi, K.; Aleiwi, B.A.; Schnider, C.M.; Siricilla, S.; Kurosu, M. Stereocontrolled Total Synthesis of Muraymycin D1 Having a Dual Mode of Action against *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Am. Chem. Soc.* 2016, 138, 12975–12980
- ^{xv} Mitachi, K.; Aleiwi, B.A.; Schnider, C.M.; Siricilla, S.; Kurosu, M. Stereocontrolled Total Synthesis of Muraymycin D1 Having a Dual Mode of Action against *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Am. Chem. Soc.* 2016, 138, 12975–12980
- ^{xvi} Al-Dabbagh, B.; Henry, X.; El Ghachi, M.; Auger, G.; Blanot, D.; Parquet, C.; Mengin-Lecreulx, D.; Bouhss, A. Active site mapping of MraY, a member of the polyprenyl-phosphate N-acetylhexosamine 1-phosphate transferase superfamily, catalyzing the first membrane step of peptidoglycan biosynthesis. *Biochemistry* 2008, 47, 8919–8928

Rezultate

ARTICOLE PUBLICATE

1. **Nature of polyethylene imine-glucose oxidase interactions**, Beata Szeffler, Mircea V. Diudea, I. P. Grudziński, *Studia UBB_Chemia*, **2016**, 61(1), 249-260. (IF=0.244)
(Raportat 2016)
2. **Study of geometrical shaping of linear chained polymers stabilized as helixes**, Lorentz Jäntschi and Sorana D. Bolboacă, *Studia UBB_Chemia*, **2016**, 61(4), 123-136. (IF=0.244)
(Raportat 2016)
3. **Linear and branched PEIs (Polyethylenimines) and their properties space**, Claudiu N. Lungu, Mircea V. Diudea, Mihai V. Putz and I. P. Grudziński, *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, 17(4), 555. (IF=3.226) DOI= 10.3390/ijms17111796
(Raportat 2016)
4. **Molecular Dynamic Studies of the Complex Polyethylenimine and Glucose Oxidase**, Beata Szeffler, Mircea V. Diudea, Mihai V. Putz and I. P. Grudziński, *Int. J. Mol. Sci.*, **2016**, 17(11), 1796. (IF=3.226) DOI= 10.3390/ijms17111796
(Raportat 2016)
5. **FAD molecular adaptability among surrounding amino acids and its catalytic role in glucose oxidase and related flavoproteins**. CN Lungu, MV Diudea, MV Putz, IP Grudzinski, *Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences*, RJLBPCS **2017** 3(2) 1-28.
(Raportat 2016)
6. **Ligand Shaping in Induced Fit Docking of MraY Inhibitors. Polynomial Discriminant and Laplacian Operator as Biological Activity Descriptors**. CN Lungu, MV Diudea, MV Putz, *International journal of molecular sciences*, **2017**, 18 (7), 1377. (IF=3.226); DOI= 10.3390/ijms18071377
(Raportat 2017)

ARTICOLE ACCEPTATE

1. **Rhombellanes – a new class of structures**, *International Journal of Chemical Modeling*.
(Raportat 2017)

ARTICOLE TRIMISE SPRE PUBLICARE (Raportat 2017)

1. **Magnetic Nanoparticle Morphology Explored for Bioactive Molecular Nanodevice**, Claudiu N. Lungu, Michał Bystrzejewski, Mircea V. Diudea and Ireneusz P. Grudzinski

-
2. **Water solvation clusters in assessing polymers toxicity**, Claudiu N. Lungu, Melinda E. Füstös, Anamaria Orza, Gabriel Katona, Mircea V. Diudea, Ireneusz P. Grudzinski.
 3. **Water clusters principal component analysis in Staphilococcus aureus Oxacillin resistance mechanism**, Claudiu N. Lungu, Mircea V. Diudea, Lia M. Junie.
 4. **MSCM- Multiple selective proteo nano cluster mesh coating CD's agonist/antagonist**, Claudiu Lungu, Melinda E. Füstös, Gabriel Katona, Mircea V. Diudea.
 5. **Rhombellane space filling**, Mircea V. Diudea, Csaba L. Nagy, *J. Math. Chem.* 2017.

PARTICIPĂRI LA MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE

1. **Fullerene aggregation**, M.V. Diudea, Institute of Chemical Process Fundamentals, Czech Academy of Sciences, Prague, 02.06.2017 (prezentare orală).
2. **Nano-dendrimers in early stages of crystal networks**, Cluj, 2017. GEMNS 3rd Consortium Meeting, Cluj, Romania, 26-30.06. 2017. B. Sze fler, M. Diudea (poster).
3. **The Nano Studio software**, Csaba L. Nagy, BioNanoMathChem2017, Cluj, June 26-30 (prezentare orală)
4. **Water solvation clusters in assessing polymers toxicity**, Claudiu N. Lungu, Melinda E. Füstös, Anamaria Orza, Gabriel Katona, Mircea V. Diudea, and Ireneusz P. Grudzinski, BioNanoMathChem2017, Cluj, June 26-30 (prezentare orală).
5. **Rhombellanes – a new class of structures**, Mircea V. Diudea, BioNanoMathChem2017, Cluj, June 26-30 (prezentare orală).
6. **C₆₀ aggregation and more**. M.V. Diudea, University of Florence, 08.11.2017 (prezentare orală).
7. **MSCM- Multiple selective proteo nano cluster mesh coating CD's agonist/antagonist**. C.N. Lungu, M.V. Diudea (oral presentation), 9th International Conference on Bioinformatics; November 13-15, 2017, Paris, France (prezentare orală).

4 Scurt raport despre deplasările in străinătate privind activitatea de diseminare si/sau formare profesionala

- a. **Cluj, 2017**. GEMNS 3rd Consortium Meeting, Cluj, Romania, 26-27.06. 2017. *Nano-dendrimers in early stages of crystal networks*. B. Sze fler, M. V. Diudea (poster).
- b. **Praga**, Institute of Chemical Process Fundamentals, Czech Academy of Sciences, Prague, Fullerene aggregation, Mircea Diudea (prezentare orală). 02.06.2017.
- c. **Florenta, 2017**, 8 Nov, Universitatea din Florenta: *C₆₀ aggregation and more*. Mircea V. Diudea (prezentare orală). 08.11.2017.

d. Paris. 2017. 9th International Conference and Expo on Proteomics and Molecular Medicine and 9th International Conference on Bioinformatics; November 13-15, 2017, Paris, France: *MSCM- Multiple selective proteo nano cluster mesh coating CD's agonist/antagonist*. C. Lungu, M. V. Diudea (prezentare orală).