

UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI

FACULTATEA DE CHIMIE

ȘCOALA DOCTORALĂ DE CHIMIE

**Peptide amiloidice: sinteză, caracterizare și aplicații
biomedicale**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat,

Prof. Dr. Gabi DROCHIOIU

Student-doctorand,

Chimist Monica JURESCHI (căs. IAVORSCHI)

Septembrie 2020

Mulțumiri

Acum, la finalul stagiului cercetărilor doctorale, mă simt încărcată de sentimente de fericire și împlinire ce derivă din mulțumirea profesională și personală a unei etape duse la bun sfârșit.

*Mulțumesc în primul rând Domnului **Profesor Dr. Gabi Drochioiu**, coordonatorul științific al acestei lucrări, pentru oportunitatea oferită de a aborda un subiect interesant de cercetare și pentru discuțiile fructuoase în vederea realizării experimentelor și pentru întregul său sprijin.*

*Mulțumesc membrilor comisiei de îndrumare, Domnului **Conferențiar Dr. Robert Vasile Grădinaru**, Domnului **Conferențiar Gheorghită Zbancioc** și Doamnei **Lector Brîndușa Alina Petre**, pentru observațiile făcute, cuvintele lor de încurajare și sprijinul acordat pe parcursul acestor ani în vederea finalizării cercetărilor.*

*Mulțumesc Doamnei **Lector Brîndușa Alina Petre**, pentru o colaborare fructuoasă, pentru sfaturile științifice valoroase cât și pentru îndrumarea permanentă pe parcursul elaborării și realizării acestei teze de doctorat. De asemenea îi sunt recunoscătoare pentru oportunitatea de a utiliza spectrometrul de masă MALDI-ToF din cadrul centrului de cercetare **TRANSCEND**.*

*Mulțumesc Domnului **Conferențiar Dr. Ionel Humelnicu** și Domnului **Conferențiar Dr. Gheorghită Zbancioc** pentru sprijinul acordat în investigarea probelor prin spectroscopie FT-IR.*

*Mulțumesc colaboratorilor Domnului **Dr. Alexey Kononikhin** și doamnei **Dr. Maria Indeykina** de la Institutul Skolkovo de Știință și Tehnologie (Skoltech), Moscova, Rusia pentru sprijinul oferit în efectuarea experimentelor LTQ-FT-ICR MS.*

*Recunoștința mea sinceră se îndreaptă către: colegele mele **Dr. Ancuța Veronica Lupăescu** și **Dr. Laura Ion** pentru prietenia, discuțiile științifice și sprijinul necondiționat acordat pe parcursul acestor frumoși ani.*

*Mulțumesc deasemenea colegilor din cadrul **Laboratorului de Biochimie** pentru prietenia și încrederea acordată.*

*Mulțumesc proiectului **PN-III-P4-ID-PCE-2016-0376** și programului **Erasmus+** pentru finanțarea acordată pe parcursul studiilor doctorale.*

*Cu deosebită dragoste și respect, dedic această teză **soțului meu, Eugen și familiei mele**, care au fost alături de mine, m-au înconjurat necondiționat și m-au sprijinit cu afecțiune și răbdare în această perioadă.*

CUPRINS

INTRODUCERE	1
CAPITOLUL I. STUDIU DE LITERATURĂ	6
I.1 PEPTIDE. CONSIDERAȚII TEORETICE	6
I.1.1 Aminoacizii. Legătura peptidică.....	6
I.1.2 Producerea peptidelor în organism.....	12
I.1.3 Peptide biologice active.....	14
I.1.4 Relația peptidelor cu metalele.....	17
I.2 METODELE DE SINTEZĂ CHIMICĂ ȘI PURIFICARE ALE PEPTIDELOR	21
I.2.1 Metode de sinteză în fază lichidă.....	22
I.2.2 Metode de sinteză în fază solidă.....	23
I.2.3 Purificarea peptidelor prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC).....	28
I.3 METODE DE CARACTERIZARE A PEPTIDELOR ȘI COMPLECȘILOR ACESTORA	31
I.3.1 Spectrometria de masă.....	31
I.3.1.1 Spectrometria de masă MALDI-ToF.....	32
I.3.1.2 Spectrometria de masă ESI.....	34
I.3.1.3 Spectrometria de masă în tandem (MS/MS).....	35
I.3.2 Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR).....	36
I.3.3 Spectroscopia de dichroism circular.....	38
I.3.4 Spectroscopia UV-viz.....	38
I.3.5 Spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară.....	39
I.3.6 Electroforeza SDS-PAGE.....	40
I.4 PEPTIDELE IMPLICATE ÎN BOLILE NEURODEGENERATIVE	41
I.4.1 Boala Alzheimer (BA).....	42
I.4.2 Precursorul peptidei amiloidice (APP).....	44
I.4.3 Boala Alzheimer și stresul oxidativ.....	46
I.5 PEPTIDA β-AMILOIDICĂ (Aβ)	49

I.5.1 Peptida A β și neurotoxicitatea.....	50
I.5.2 A β de la monomeri la fibrile.....	51
I.5.3 A β și interacțiunea acesteia cu ionii metalici.....	55
I.6 OBIECTIVELE TEZEI.....	59
CAPITOLUL II CONTRIBUȚII PERSONALE.....	61
II.1 MATERIALE ȘI METODE.....	61
II.1.1 Materiale utilizate.....	61
II.1.2 Metode aplicate.....	62
II.1.2.1 Sinteza peptidelor de tip amiloidic.....	62
II.1.2.2 Purificarea peptidelor amiloidice.....	67
II.1.2.3 Formarea complexilor peptido-metalici.....	69
II.1.2.4 Spectrometria de masă de tip MALDI-ToF.....	70
II.1.2.5 Spectrometria de masă de tip ESI.....	71
II.1.2.6 Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier FT-IR.....	72
II.1.2.7 Electroforeza unidimensională - 1D.....	72
II.1.2.8 Programe aplicate în studiul peptidelor de tip amiloidic.....	74
II.2 SINTEZA, PURIFICAREA ȘI CARACTERIZAREA PEPTIDELOR DE TIP AMILOIDIC.....	75
II.2.1 Sinteza, purificarea și caracterizarea fragmentului A β ₍₉₋₁₆₎	77
II.2.2 Sinteza, purificarea și caracterizarea analogilor fragmentului peptidic A β ₍₉₋₁₆₎	81
II.2.2.1 Fragmentul de tip amiloidic A β ₍₉₋₁₆₎ F.....	81
II.2.2.2 Fragmentul de tip amiloidic A β ₍₉₋₁₆₎ G.....	83
II.2.2.3 Fragmentul de tip amiloidic A β ₍₉₋₁₆₎ GG.....	86
II.2.2.4 Fragmentul de tip amiloidic A β ₍₉₋₁₆₎ GGG.....	89
II.2.3 Sinteza, purificarea și caracterizarea peptidei amiloidice A β ₍₂₅₋₃₅₎	92
II.2.4 Sinteza, purificarea și caracterizarea peptidei amiloidice A β ₍₁₋₁₆₎	95

II.2.5 Sinteza, purificarea și caracterizarea peptidei anti-amiloidice NAP.....	96
II.2.6 Analiza conformațională a peptidelor de tip amiloidic prin spectroscopie în infraroșu.....	98
II.2.7 Concluzii.....	105
II.3 COMPLECȘI AI PEPTIDEI Aβ₍₉₋₁₆₎ ȘI AI ANALOGILOR ACESTEIA CU IONI METALICI: FORMAREA ȘI CARACTERIZAREA LOR PRIN SPECTROMETRIE DE MASĂ	107
II.3.1 Complecși peptido-metalici cu ionii Al ³⁺	109
II.3.2 Complecși peptido-metalici cu ionii Fe ²⁺ /Fe ³⁺	115
II.3.3 Complecși peptido-metalici cu ionii Zn ²⁺	123
II.3.4 Complecși peptido-metalici cu ioni de Cu ⁺ /Cu ²⁺	129
II.3.5 Complecși peptido-metalici cu ioni de Ag ⁺	137
II.3.6 Concluzii.....	145
II.4 CARACTERIZAREA COMPLECȘILOR PEPTIDO-METALICI PRIN SPECTROMETRIE DE MASĂ ÎN TANDEM (MS/MS) ȘI FT-IR.....	147
II.4.1 Interacțiunea peptidei A β ₍₉₋₁₆₎ și a analogilor acesteia cu ionii de aluminiu.....	147
II.4.2 Interacțiunea peptidei A β ₍₁₋₁₆₎ cu ioni de cupru.....	157
II.4.3 Studiu comparativ al interacțiunii ionilor metalici cu peptide amiloidice și anti-amiloidice.....	161
II.4.4 Concluzii.....	170
II.5 AGREGAREA PEPTIDELOR AMILOIDICE.....	172
II.5.1 Investigarea procesului de agregare a peptidei A β ₍₂₅₋₃₅₎ prin electroforeză unidimensională.....	173
II.5.2 Concluzii.....	177
II.6 CARACTERIZAREA TEORETICĂ A PEPTIDELOR DE TIP AMILOIDIC.....	178
II.6.1 Caracterizarea teoretică a fragmentului amiloidic nativ A β ₍₉₋₁₆₎	179
II.6.2 Caracterizarea teoretică a unor analogi ai fragmentului amiloidic nativ A β ₍₉₋₁₆₎	180

II.6.2.1 Caracterizarea teoretică a fragmentul amiloidic A β ₍₉₋₁₆₎ F.....	180
II.6.2.2 Caracterizarea teoretică a fragmentul amiloidic A β ₍₉₋₁₆₎ G.....	182
II.6.2.3 Caracterizarea teoretică a fragmentul amiloidic A β ₍₉₋₁₆₎ GG.....	184
II.6.2.4 Caracterizarea teoretică a fragmentul amiloidic A β ₍₉₋₁₆₎ GGG.....	185
II.6.3 Caracterizarea teoretică a fragmentului amiloidic nativ A β ₍₂₅₋₃₅₎	187
II.6.4 Caracterizarea teoretică a fragmentului amiloidic de tipul A β ₍₁₋₁₆₎	189
II.6.5 Caracterizarea teoretică a peptidei neuroprotectoare NAP.....	191
II.6.6 Concluzii.....	193
II.7 DISEMINAREA REZULTATELOR ȘI ACTIVITATEA ȘTIINȚIFICĂ.....	194
II.7.1 Lucrări publicate.....	194
II.7.2 Participări la conferințe.....	196
II.7.3 Participări la școli de vară.....	198
II.7.4 Participări la seminarii științifice.....	199
II.7.5 Proiecte de cercetare.....	199
CONCLUZII GENERALE.....	200
BIBLIOGRAFIE.....	205
ANEXE.....	235
LUCRĂRI <i>IN EXTENSO</i>.....	239

INTRODUCERE

Boala Alzheimer (BA), o afecțiune neurodegenerativă cronică, reprezintă cea mai comună formă de demență, fiind una dintre principalele cauze de deces în rândul persoanelor în vârstă (Atwood *et al.*, 2008; Wang și Wang, 2017; Terracciano și Sutin, 2019). Pe plan global, tulburările cognitive precum BA afectează anual milioane de oameni pentru care nu există tratament ci doar forme de ameliorare a declinului neuronal (Liu, Qu și Wang, 2018). Conform statisticilor există aproximativ 44 de milioane de oameni în întreaga lume care trăiesc cu boala Alzheimer sau cu o formă asemănătoare de demență (Rabinovici, 2019).

Acest tip de neurodegenerare este printre cele mai studiate și frecvente afecțiuni neurodegenerative, manifestându-se în general prin pierderi neuronale și sinaptice și o degradare continuă a activității cognitive (Przedborski, Vila și Jackson-Lewis, 2003; Wenk, 2003). Cele mai importante repere ale acestei boli sunt formarea și depunerea plăcilor de amiloid și prezența încurcăturilor (din engl. *tangles*) neurofibrilare la nivelul sinapselor (Castellani, Rolston și Smith, 2011; Kant, Goldstein și Ossenkoppele, 2019). Deși etiologia BA nu este înțeleasă în totalitate, dovezi semnificative au arătat că agregarea peptidei amiloidice A β reprezintă un eveniment declanșator care conduce la apariția și propagarea bolii (Panza *et al.*, 2019).

Generic, peptidele amiloidice pot fi regăsite în literatură sub denumirea de peptida A β . Neurotoxicitatea crescută a peptidei de tip β -amiloid este generată în principal de secvențele peptidice A β ₍₁₋₄₀₎ și A β ₍₁₋₄₂₎, caracterizate de conformații anormale, de tip β -pliat, identificate *post-mortem* în creierul pacienților suferinzi de boala Alzheimer (Huang și Mucke, 2012). Cea mai toxică formă de A β o reprezintă peptida A β ₍₁₋₄₂₎,

însă, nu este foarte clar care dintre resturile de aminoacizi sunt implicate direct în inițierea procesului de oligomerizare a peptidei. Dintre cei 20 de aminoacizi prezenți în peptide și proteine, doar cinci sunt electroactivi, și anume: tirozină - Y, histidină - H, metionină - M, cisteină - C și triptofan - W (Enache, Chiorcea-Paquim și Oliveira-Brett, 2018). În plus, s-a observat că peptida A β conține situsuri de legare a metalelor, în special în regiunea N-terminală 1-16 bogată în histidine, regiunea 9-16 poate fi considerată activă în legarea metalelor (Habasescu *et al.*, 2020).

Stresul oxidativ reprezintă un alt aspect important al acestei patologii fiind implicat în degradarea organismului și generarea bolii Alzheimer. În creier, speciile reactive de oxigen sunt în mod normal un produs secundar al fosforilării oxidative și a diferitelor oxidaze tisulare (Coyle și Puttfarcken, 1996). Cu toate acestea, odată cu îmbătrânirea sau în cazul dezvoltării bolii Alzheimer, condițiile care afectează funcția mitocondrială pot interfera cu transportul electronilor și pot induce creșterea concentrației radicalilor liberi (Coyle și Puttfarcken, 1996). S-a dovedit faptul că numeroși ioni metalici sunt implicați în producerea de specii reactive de oxigen (ROS), însă rolul exact al ROS în inițierea BA nu este pe deplin cunoscut (Cheignon *et al.*, 2018).

Sinteza peptidelor și a compleșilor acestora cu ionii metalici constituie un domeniu atractiv de cercetare, în principal datorită modificărilor conformaționale care pot apărea în structura peptidelor, aceste mecanisme fiind responsabile pentru apariția unor așa-numite boli conformaționale (Selkoe, 2000; Murariu *et al.*, 2018).

Prezenta teză de doctorat intitulată „*Peptide amiloidice: sinteză, caracterizare și aplicații biomedicale*” conține 239 pagini cuprinzând un număr de 141 figuri, 55 tabele și 334 indici bibliografici.

Rezultatele care stau la baza acestei teze de doctorat alcătuiesc subiectul a șase articole științifice publicate în jurnale cotate Web of Science, cu factorul de impact cumulat de 5,992. În trei dintre acestea, autoarea tezei are calitatea de autor principal (Jureschi *et al.*, 2019a; Jureschi *et al.*, 2019b; Jureschi, *et al.*, 2019c), iar în alte trei lucrări este co-autor (Lupaescu *et al.*, 2019; Murariu *et al.*, 2019; Habasescu *et al.*, 2020). Pe lângă articolele mai sus menționate au fost publicate și trei articole în volumele conferințelor cotate ISI, având la bază o parte din rezultate obținute în cadrul prezentei cercetări doctorale (Drochioiu *et al.*, 2018; Jureschi *et al.*, 2019d; Ion *et al.*, 2019).

Rezultatele obținute în perioada stagiului doctoral au fost diseminate de asemenea în cadrul a șapte conferințe internaționale și a șase conferințe naționale. Activitatea de cercetare a fost completată cu participarea la trei seminarii științifice, șase școli de vară internaționale, iar la patru din acestea autoarea tezei contribuind și în calitate de co-organizator.

Totodată, dezvoltarea profesională, acumularea cunoștințelor și formarea aptitudinilor au fost favorizate prin angajarea efectivă în proiectul de cercetare ”*Modificări conformaționale ale peptidelor în prezența ionilor metalici și a compușilor antiamiloidici, dependente de timp și de pH, implicate în bolile neurodegenerative*”, acronim MeticonpH.

Pentru realizarea tezei de doctorat intitulată „*Peptide amiloidice: sinteză, caracterizare și aplicații biomedicale*” s-au avut în vedere următoarele obiective majore cum ar fi:

- ✓ Sinteza unor peptide derivate de la peptida nativă A β ₍₉₋₁₆₎, utilizând metoda de sinteză a peptidelor în fază solidă, SPPS.

- ✓ Purificarea și caracterizarea peptidelor obținute prin metode instrumentale, cum ar fi: spectrometria de masă și spectroscopia în infraroșu.
- ✓ Studiul formării complexilor peptidici cu ioni metalici, în special de aluminiu, fier, zinc, cupru și argint.
- ✓ Investigarea modificărilor conformaționale ale peptidelor și complexilor peptido-metalici.
- ✓ Investigarea procesului de agregare a peptidelor amiloidice prin tehnici electroforetice.
- ✓ Diseminarea rezultatelor prin publicarea acestora în jurnale cu factor de impact și prezentarea acestora la conferințe internaționale și naționale.

Din punct de vedere structural, teza cuprinde două părți, o parte teoretică și una în care sunt prezentate rezultatele cercetării doctorale proprii. Astfel, în prima parte a fost realizat un studiu amplu al literaturii curente, fiind structurată în șase capitole care oferă informații despre starea actuală a cunoașterii în domeniul tematicii alese. Au fost incluse aici informații despre structura compușilor cu legături peptidice, despre peptidele biologic active, importanța peptidelor amiloidice, neuroprotectoare și producerea acestora în organism, metodele de sinteză de peptide și principalele metode fizico-chimice utilizate în caracterizarea structurală și conformațională a peptidelor. La finalul ultimului capitol sunt prezentate obiectivele propuse în realizarea tezei de doctorat.

A doua parte a tezei este originală și cuprinde contribuțiile personale, fiind alcătuită din șapte capitole. Primul dintre acestea prezintă informații despre materialele și metodele utilizate în cercetarea experimentală. Al doilea capitol cuprinde etapele urmărite în sinteza, purificarea și caracterizarea peptidelor amiloidice prin spectrometrie de

masă și spectroscopie în infraroșu. Al treilea capitol cuprinde investigarea interacțiunii peptidelor cu ioni metalici, precum: aluminiu (III), fier (III), fier (II), zinc (II), cupru (II), cupru (I), argint (I) prin spectrometrie de masă de tip MALDI-ToF. Al patrulea capitol se referă la investigarea formării complexilor peptido-metalici prin spectrometrie de masă în tandem (MS/MS). Al cincilea capitol cuprinde studiile de agregare a fragmentului amiloidic A β ₍₂₅₋₃₅₎. Al șaselea capitol descrie caracterizarea teoretică a peptidelor de tip amiloidic. Capitolul final prezintă activitatea științifică desfășurată în perioada doctorală și lista lucrărilor publicate.

În încheierea tezei sunt prezentate concluziile generale, bibliografia, precum și anexele care conțin copiile articolelor științifice publicate.

PARTEA II. CONTRIBUȚII PERSONALE

II.1 MATERIALE ȘI METODE

II.1.2 Metode de cercetare

II.1.2.1 Sinteza peptidelor de tip amiloidic

Sinteza fragmentelor de peptidelor de tip amiloidic a fost realizată prin metoda în fază solidă utilizând strategia Fmoc/t-Bu. În cazul fragmentelor derivate de la peptida A β ₍₉₋₁₆₎ s-a folosit o rășină de tipul Fmoc-Rink-Amidă cu o capacitate de legare de 0,48 mmol aminoacid/g rășină. Fragmentul A β ₍₂₅₋₃₅₎ a fost sintetizat pe o rășină având deja cuplat primul aminoacid, de tipul PS-PHB-Met-Fmoc cu o capacitate de legare de 0,78 mmol aminoacid/g rășină. Astfel, în funcție de capacitatea de legare a rășinei folosite s-au calculat cantitățile de substanțe necesare sintezei pentru a ajunge la o concentrație finală de 100 μ M peptidă.

Pe scurt, sinteza peptidelor s-a realizat pe rășină în mediu de dimetilformamidă (DMF), pornind de la capătul C-terminal la cel N-terminal printr-o serie de reacții de cuplare/deprotejare. Sinteza a fost realizată într-o seringă din material plastic prevăzută cu frită la bază, iar pentru îndepărtarea solvenților aceasta a fost conectată la o pompa de vid, instalația fiind prezentată în Figura II.1.2

Într-o primă etapă are loc umflarea rășinei în DMF timp de 30 minute. Deprotecția grupelor protectoare (Fmoc sau terț-butil) aflate pe rășină sau pe aminoacid se obține cu o soluție de 20% piperidină în dimetilformamidă. Atașarea covalentă a aminoacidului amino-protejat la suportul polimeric solid se realizează doar după activarea acestuia în prezența activatorului PyBOP în mediu bazic de N-metilmorfolină. Excesul de reactivi și aminoacizi a fost îndepărtat prin spălare cu DMF. Pentru a asigura un randament maxim, reacția de cuplare s-a repetat de

două ori pentru fiecare aminoacid inserat în structură. De asemenea, cantitățile stoichiometrice ale reactivilor de cuplare și aminoacizilor folosiți în reacție au fost mult mai mari de 1:5 și respectiv 1:2. Etapele de deprotecție și cuplare se repetă pentru fiecare aminoacid în parte, până la realizarea secvenței dorite.

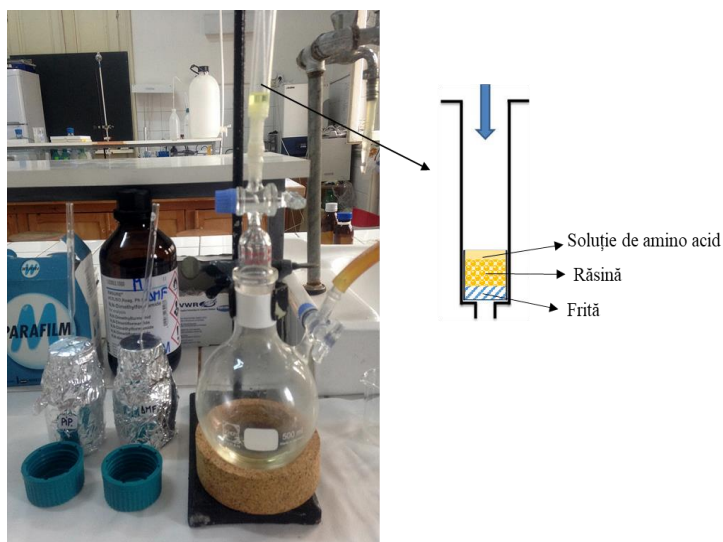


Figura II.1.2 Instalația de sinteză manuală în fază solidă a peptidelor.

II.1.2.3 Formarea complexelor peptido-metalici

Peptidele sintetizate și purificate au fost supuse interacțiunii cu diverși ioni metalici în mediu apos în vederea formării complexelor peptido-metalici. Pentru aceste studii au fost utilizate săruri ale ionilor metalici de: Al^{3+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cu^{+} și Ag^{+} . Astfel au fost realizate soluții amestec de peptidă (concentrație 8 mM) - ion metalic (concentrație 80 mM) în apă deionizată (MilliQ) la un pH 6,6 cu un raport molar final peptidă: ion metalic de 1:10. Soluțiile rezultate au fost incubate folosind un termomixer (Thermomixer Compact Eppendorf AG 22331, Germania) timp de 20 ore la 24 °C și 350 rpm. În final, probele au fost liofilizate și supuse analizelor MS și FT-IR.

II.2 SINTEZA, PURIFICAREA ȘI CARACTERIZAREA PEPTIDELOR DE TIP AMILOIDIC

Unele studii funcționale și de structură ale peptidelor presupun și înlocuirea diferiților aminoacizi cu alanina sau glicina (Grant, 2002). Însă, în cazul fragmentului nativ $A\beta_{(9-16)}$, s-au sintetizat patru analogi structurali ce au vizat importanța histidinelor și a nucleului fenolic al tirozinei. Astfel, a fost înlocuită tirozina (Tyr, Y) din poziția 10 cu fenilalanină (Phe, F), obținându-se peptida $A\beta_{(9-16)}F$ și respectiv cu glicină (Gly, G) rezultând $A\beta_{(9-16)}G$. În alte două fragmente derivate, $A\beta_{(9-16)}GG$, $A\beta_{(9-16)}GGG$, au fost modificate cele două histidine (His, H) cu glicină (Gly, G) și tirozina (Tyr, Y) din poziția 10 cu glicină (Gly, G), așa cum se poate observa și din Figura II.2.1 (Jureschi, *et al.*, 2019b). Sinteza peptidelor a fost realizată manual de la capătul C al peptidei la cel N-terminal prin metoda Fmoc/tBu de sinteză în fază solidă SPPS (din engl. *Solid Phase Synthesis*).

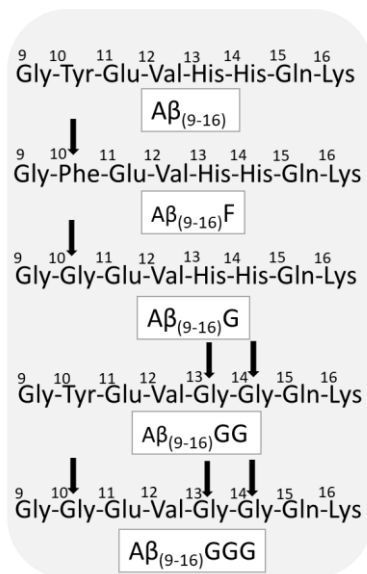


Figura II.2.1 Structura generală a peptidelor de tip amiloidic $A\beta_{(9-16)}$.

După îndepărtarea de pe suportul polimeric, peptidele sintetizate au fost supuse procesului de purificare prin cromatografie RP-HPLC pe două tipuri de coloane cromatografice: o coloană C₁₈ specifică peptidelor cu caracter hidrofilic și o coloană C₈ caracteristică peptidelor hidrofobe. Cromatogramele RP-HPLC caracteristice separărilor analitice ale peptidelor de tip amiloidic sintetizate au prezentat *peak*-uri majoritare la timpi de retenție diferiți. Acest lucru se datorează în principal caracterului mai hidrofil sau hidrofob al fiecărei peptide, caracteristică dependentă de structura acesteia. Vârfurile individuale au fost selectate și fiecare fracțiune eluată a fost colectată și analizată prin spectrometrie de masă MALDI-ToF. Determinarea masei moleculare a unei peptide este o etapă fundamentală necesară identificării compusului și confirmării reușitei sintezei.

II.2.1 Sinteza, purificarea și caracterizarea fragmentului Aβ₍₉₋₁₆₎

Obținerea fragmentului de tip amiloidic Aβ₍₉₋₁₆₎ s-a realizat prin sinteză manuală în fază solidă Fmoc/*t*-Bu. Cuplarea aminoacizilor a fost efectuată pe o rășină de tipul Fmoc-Rink-Amide, cu o capacitate de legare de 0,48 mmol aminoacid/g rășină. În Figura II.2.2 este prezentat spectrul de masă MALDI-ToF al peptidei Aβ₍₉₋₁₆₎ impure, înregistrat după sinteză. Cel mai intens semnal a fost atribuit ionului molecular [M+H]⁺ și poate fi observat la m/z 996,7.

În spectrul acestei peptide mai sunt prezente semnale la m/z 1018,7 și m/z 1034,7 ce au fost atribuite aductului cu ioni de sodiu [M+Na]⁺ și, respectiv, ioni de potasiu [M+K]⁺. De asemenea, au fost găsite semnale la o diferență de 106 unități m/z, generate de ionii moleculari ai peptidei incomplet deprotejate: [M+H+106]⁺ la m/z 1102,8 și [M+Na+106]⁺ la m/z 1124,8. Atribuirea semnalelor observate în spectrele de masă a fost

realizată prin compararea valorilor obținute experimental cu cele calculate teoretic, conform cu Tabelului II.2.1.

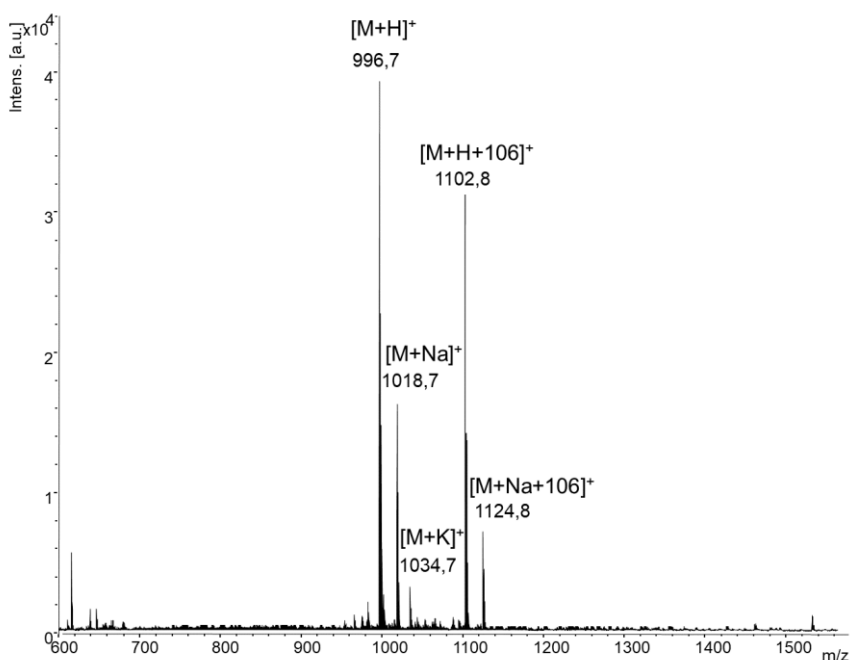


Figura II.2.2 Spectrul de masă MALDI-ToF obținut în mod reflectron pozitiv al peptidei A β ₍₉₋₁₆₎, înainte de purificare.

Tabelul II.2.1 Structura și masa moleculară a peptidei amiloidice A β ₍₉₋₁₆₎ calculată teoretic și obținută experimental prin spectrometrie de masă MALDI-ToF

Peptida	Ion molecular	Teoretic (m/z)	Experimental (m/z)
A β ₍₉₋₁₆₎ (H ₂ N-GYEVHHQK- CONH ₂) C ₄₄ H ₆₅ N ₁₅ O ₁₂	[M+H] ⁺	996,4	996,7
	[M+Na] ⁺	1018,4	1018,7
	[M+K] ⁺	1034,4	1034,7
	[M+H+106] ⁺	1102,4	1102,8
	[M+Na+106] ⁺	1124,4	1124,8

Deși spectrul de masă al peptidei prezentat în Figura II.2.2 confirmă reușita sintezei, prezența semnalelor de la m/z 1102,8 și m/z 1124,8 atribuite peptidei impure a impus realizarea unei etape de purificare. Separarea fragmentelor amiloidice de tipul $A\beta_{(9-16)}$ s-a realizat cu ajutorul unei coloane C_{18} datorită caracterului hidrofil al acesteia. În cromatograma peptidei $A\beta_{(9-16)}$ prezentată în Figura II.2.3 se observă două semnale bine definite din care primul a eluat la timpul de retenție de 13,70 min și 13,7 % solvent B, iar cel de-al doilea a fost observat la timpul de retenție de 18,83 min și 18,8 % B.

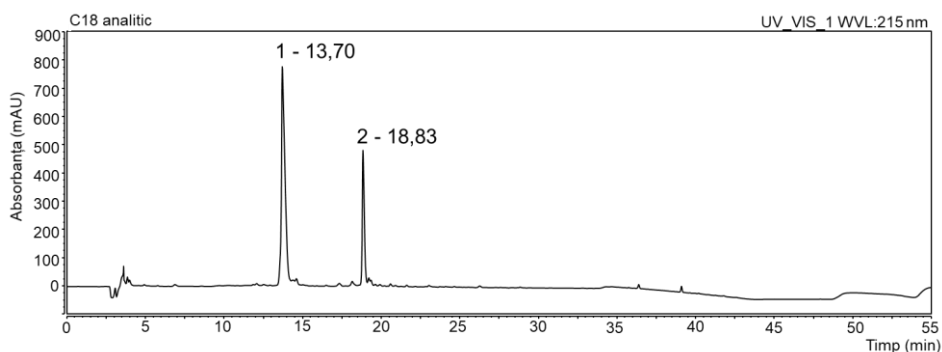


Figura II.2.3 Separarea cromatografică a peptidei $A\beta_{(9-16)}$ obținută cu ajutorul gradientului prezentat în Tabelul II.1.2.

Spectrele de masă prezentate în Figura II.2.4 au fost obținute în urma colectării separate a fracțiunilor eluate cromatografic. Figura II.2.4 (A) prezintă spectrul de masă al fracțiunii colectate la timpul de retenție de 13,70 min. Semnalele identificate la m/z 996,7, m/z 1018,7 și m/z 1034,7 au fost atribuite atât ionilor moleculari $[M+H]^+$ al peptidei $A\beta_{(9-16)}$ pure cât și aducțiilor acesteia cu sodiu și potasiu. În cazul Figurii II.2.4 (B), ce corespunde spectrului de masă al fracțiunii eluate la timpul de retenție de 18,83 min, au fost observate semnale specifice peptidei incomplet

deprotejate $[M+H+106]^+$ și a aducțiilor acestora cu Na^+ și K^+ : $[M+Na+106]^+$, respectiv, $[M+K+106]^+$.

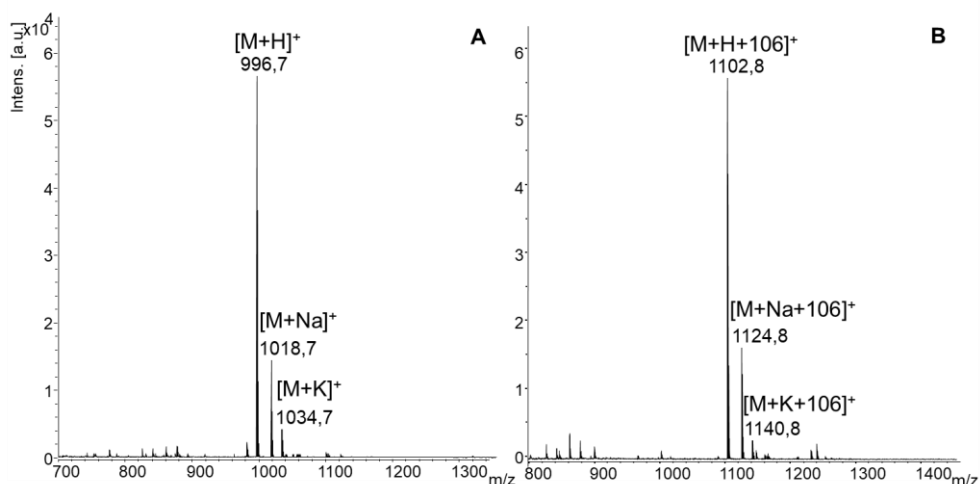


Figura II.2.4(A,B) Spectrele de masă MALDI-ToF realizate în mod reflectron pozitiv ale peptidei A β (9-16) purificate prin HPLC.

Formarea unui produs secundar majoritar la o diferență de 106 unități m/z a fost semnalată în toate spectrele de masă ale peptidelor sintetizate cu ajutorul unei rășini de tipul Rink amidă. Este cunoscut faptul că în timpul reacțiilor de deprotecție a peptidelor de pe rășină prin metoda de sinteză Fmoc/tBu cu acid trifloracetic (TFA), pot avea loc diferite reacții secundare. Acest fenomen a fost semnalat anterior în literatura de specialitate iar un studiu amplu a fost elaborat de către Stathopoulos și colaboratorii (Stathopoulos, Papas și Tsikaris, 2006). Astfel, s-a demonstrat faptul că acest semnal, cu masa moleculară 106, se datorează clivării necorespunzătoare a agentului de legătură (engl. *linker*) atașat de rășina Rink amidată care generează peptide cu capătul C-terminal amidat. Figura II.2.5 prezintă elementul structural intermediar care face conexiunea între suportul polimeric solid și peptidă. Cu culoarea roșie sunt

marcate cele două zone (1 și 2) care delimitează posibilele zone de clivare anormală conducând la formarea de ioni moleculari de tipul $[M+H+106]^+$ prin N-alchilarea capătului C-terminal. Acest fenomen are loc în etapa de clivare a peptidei de rășină sub influența amestecului de clivare. Prezența unei structuri aromatice atașată peptidelor a fost confirmată în urma investigării spectrelor de absorbță înregistrate la 280 nm, lungime de undă caracteristică structurilor aromatice, de detectorul UV al instrumentului cromatografic. Semnalul a fost vizibil chiar și în cazul peptidei care nu conține în structură resturi aromatice ($A\beta_{(9-16)}GGG$).

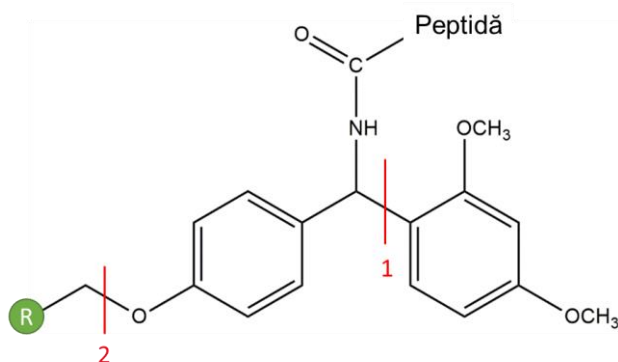


Figura II.2.5 Reprezentarea elementului structural de legătură al rășinii de tip Rink amidă și posibilele *site*-uri de clivare ce conduc la N-alchilarea C-terminală.

II.2.6 Analiza conformațională a peptidelor de tip amiloidic prin spectroscopie în infraroșu

Spectroscopia în infraroșu oferă informații structurale importante ce sunt utilizate pe scară largă pentru a caracteriza structura secundară a peptidelor și proteinelor (Bakshi *et al.*, 2014)..

Spectrele IR ale fragmentelor amiloidice de tipul A β (9-16) au fost înregistrate cu ajutorul unui spectrometru în infraroșu cu transformată Fourier și reflexia totală atenuată (FTIR-ATR). În regiunea 1100-1200 cm⁻¹ caracteristică atât vibrațiilor de îndoire a legăturii C-C-N cât și vibrațiilor de întindere a legăturii C-N, s-au remarcat în toate spectrele prezența a două benzi de absorbție. Cu excepția peptidei native, care a prezentat un maxim la 1134 cm⁻¹ și altul la 1200 cm⁻¹ precedat de un umăr spectral la aproximativ 1180 cm⁻¹, restul peptidelor modificate au afișat un semnal scindat cu două valori maxime, mai mult sau mai puțin definite, la aproximativ 1200 cm⁻¹ și 1183 cm⁻¹, cel de-al doilea semnal menținându-și valoarea maximă la aproximativ 1134 cm⁻¹. Semnalul identificat în regiunea 1400-1450 cm⁻¹ în toate cele cinci spectre se datorează atât vibrației de întindere asimetrică a grupării CH₃ din componența valinei, cât și vibrației de deformare în plan a grupării CH₂ din componența acidului glutamic, lizinei, glutaminei și histidinei, precum și vibrației de întindere a legăturii C-N din nucleului imidazolic și din componența glutaminei (Barth, 2000; Ouasri *et al.*, 2002).

Peptidele care prezintă în componență un rest de tirozină, au determinat apariția unui semnal la 1518 cm⁻¹ parțial suprapus peste domeniul amidei II și care poate fi atribuit vibrației de întindere a legăturii C=C din structura nucleului fenolic. În plus, spectrele IR ale peptidelor bogate în glicină (A β (9-16)GG - Figura II.2.28 și A β (9-16)GGG - Figura II.2.29) prezintă o absorbție la aproximativ 1240 cm⁻¹ asociată reziduurilor

de glicină care pot fi parte integrantă a elementelor de tip β -întors sau structurilor dezordonate (Maté *et al.*, 2011). Semnalele caracteristice benzii amidice de tip II identificate în domeniul spectral 1510-1580 cm^{-1} . Peptida nativă $A\beta_{(9-16)}$ al cărui spectru este prezentat în Figura II.2.25, a prezentat un maxim la 1535 cm^{-1} caracteristic unei conformații de tip β -pliat. Valori asemănătoare au fost identificate și în cazul peptidelor modificate unde s-au remarcat valori maxime la 1534 cm^{-1} ($A\beta_{(9-16)}F$, Figura II.2.26 și $A\beta_{(9-16)}GGG$, Figura II.2.29) și, respectiv, 1536 cm^{-1} ($A\beta_{(9-16)}GG$, Figura II.2.28). În schimb, în cazul peptidei $A\beta_{(9-16)}G$ (Figura II.2.27) influența conformerilor de tip β -întors a determinat apariția unui semnal la 1529 cm^{-1} .

Existența unei conformații de tip β în structura peptidelor $A\beta_{(9-16)}$, $A\beta_{(9-16)}F$ și $A\beta_{(9-16)}G$ a fost confirmată și de domeniul benzii amidă I (1600-1700 cm^{-1}). Astfel, prezența unui semnal intens la aproximativ 1631 cm^{-1} denotă prezența unei structuri de tip β -pliat în timp ce maximum observat la 1665 cm^{-1} corespunde unei conformații de tip β -întors. În cazul peptidelor glicil-îmbogățite ($A\beta_{(9-16)}GG$ și $A\beta_{(9-16)}GGG$) spectrele IR au prezentat un semnal intens la 1650 cm^{-1} , respectiv 1655 cm^{-1} , specific unei structuri α -elicoidale.

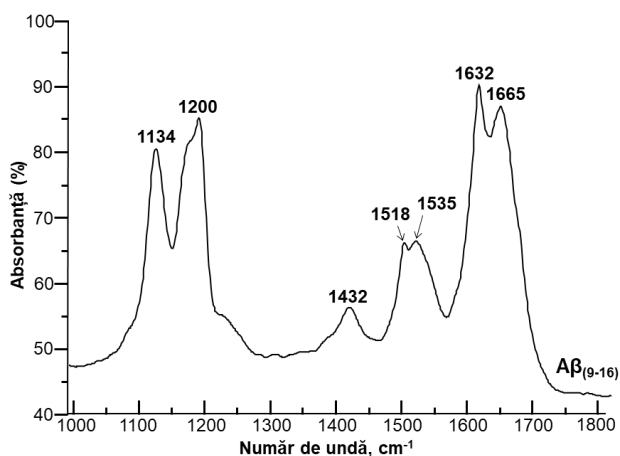


Figura II.2.25 Spectrul în infraroșu al peptidei $A\beta_{(9-16)}$.

II.3 COMPLECȘI AI PEPTIDEI A β (9-16) ȘI AI ANALOGILOR ACESTEIA CU IONI METALICI: FORMAREA ȘI CARACTERIZAREA LOR PRIN SPECTROMETRIE DE MASĂ

Ionii metalici îndeplinesc numeroase roluri esențiale în organism în special în menținerea funcției cognitive (Scott și Orvig, 2009). Astfel, întreținerea homeostaziei ionilor metalici în creier este necesară pentru o bună funcționare a activităților neurologice. S-a observat că metalele de tranziție, precum: Cu, Zn și Fe, se găsesc în diferite concentrații în plăcile generate de către peptidele amiloide: aproximativ 0,4 mM pentru Cu, 1 mM pentru Zn și 0,9 mM pentru Fe (De Toma *et al.*, 2012). Prezența acestor ioni metalici poate lansa ipoteza implicării lor într-o serie de reacții de dezechilibru la nivelul creierului pacienților cu BA.

În ultimii ani, au fost întreprinse numeroase eforturi pentru a putea determina modul în care diverși ioni metalici interacționează cu peptida amiloidică A β . Totuși, capacitatea acestei peptide de a-și schimba forma în funcție de proprietățile electronice și structurale ale cationului metalic au îngreunat această sarcină (Poulson *et al.*, 2019).

În acest capitol sunt prezentate rezultatele obținute în urma incubării fragmentelor amiloidice de tip A β (9-16) sintetizate și caracterizate anterior cu diverși ioni metalici precum: Al³⁺, Fe³⁺, Fe²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Cu⁺ și Ag⁺. Interacțiunea peptido-metalică s-a desfășurat în mediu apos, probele fiind incubate 20 de ore la o valoare de pH de 6,6, care este în domeniul fiziologic și care se manifestă mai ales în procesele inflamatorii, similare cu acelea din corpul bolnavilor de BA. În vederea investigării prin spectrometrie de masă și ionizare de tip MALDI, probele au fost depuse pe suportul metalic al instrumentului și cocristalizate cu o soluție suprasaturată de HCCA conform protocolului descris în Capitolul II.1.2, spectrele obținute evidențiind formarea complexilor peptido-metalici.

II.3.4 Complecși peptido-metalici cu ioni de $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$

Legarea metalelor modulează formarea protofibrilelor și fibrilelor care sunt principalul constituent al plăcilor amiloide (Roychaudhuri *et al.*, 2009). Este cunoscut faptul că ionii de cupru reprezintă un factor critic al patogenezei BA, datorită implicării acestora în agregarea peptidei A β și, respectiv, în neurotoxicitate (Rajendran *et al.*, 2009). În plus, funcția redox activă a ionului metalic favorizează apariția stresului oxidativ prin producerea directă a ROS. Astfel, formarea complexelor Cu-A β este văzută ca o reacție anormală, acest tip de compuși peptido-metalici fiind detectați doar în BA, nu și organismele sănătoase (Adlard și Bush, 2006).

Cele trei resturi de histidină din structura peptidei sunt capabile să coordoneze ionul de cupru(II). Astfel, acest complex asemănător metaloenzimelor a fost propus pentru catalizarea reacției Fenton. Un al doilea centru pentru chimia redox este Met³⁵ (Roychaudhuri *et al.*, 2009). Generarea speciilor de oxigen reactiv cu A β necesită reducerea Cu^{2+} sau Fe^{3+} , reacție care poate continua prin oxidarea Tyr¹⁰ sau Met³⁵ până la cationul radicalic corespunzător. Ionii Cu^+ sau Fe^{2+} produși în acest fel pot reacționa cu oxigenul molecular și agenții de reducere biologică (de exemplu, colesterolul, vitamina C sau catecolamina) pentru a produce H_2O_2 și cationul inițial (Yang *et al.*, 2017).

Pentru studiul interacțiunii fragmentelor amiloidice de tip A $\beta_{(9-16)}$ cu ionii de cupru s-au folosit atât săruri de Cu^{2+} cât și de Cu^+ . Analiza spectrometrică de masă realizată a subliniat existența unei legături între peptidele investigate și ionul de cupru(I), semnalele corespunzătoare complexului peptidă- Cu^+ fiind regăsite în ambele cazuri. Similar probelor incubate cu ionii Fe^{3+} , s-a remarcat absența unor semnale atribuite complexului peptidă- Cu^{2+} , ionii de Cu^{2+} suferind inițial un fenomen de reducere sub influența sursei laser a instrumentului de masă.

În spectrul de masă al peptidei native $A\beta_{(9-16)}$ incubate în prezența ionilor Cu^+ (Figura II.3.17(A)) se poate observa legarea ionilor de cupru(I) la peptida amiloidică. Astfel, în acest spectru s-a putut identifica un semnal intens atribuit ionului molecular $[M+H]^+$ la m/z 996,4, un altul la m/z 1018,3 corespunzător aductului cu sodiu $[M+Na]^+$, precum și unul redus în intensitate la m/z 1034,3 caracteristic aductului cu potasiu la $[M+K]^+$. Semnalul specific complexului cu ioni de cupru $[M+Cu(I)]^+$ a fost remarcat la m/z 1058,2, în timp ce semnalul pentru complexul $[M+Cu(I)+Na-H]^+$ a fost identificat la m/z 1080,2. În spectrul de masă generat în prezența ionilor Cu^{2+} (Figura II.3.17(B)), s-a observat reducerea ionului Cu^{2+} la Cu^+ urmată de legarea acestuia de peptida amiloidică. Practic, din spectru MS s-au putut identifica semnale corespunzătoare ionului molecular $[M+H]^+$ la m/z 996,4 și complexul cu ioni de cupru $[M+Cu(I)]^+$ la m/z 1058,4.

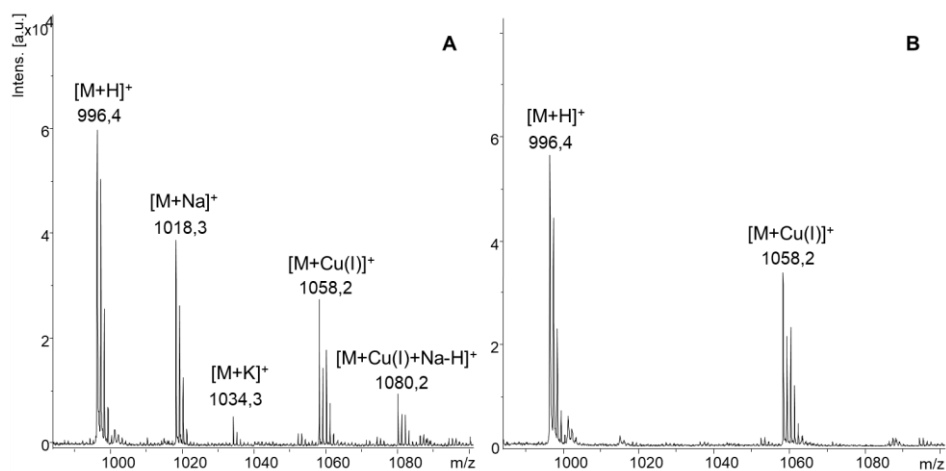


Figura II.3.17(A,B) Spectrul de masă MALDI-ToF al peptidei $A\beta_{(9-16)}$ în prezența ionilor de Cu^+ (A) sau Cu^{2+} (B), măsurat în mod reflectron pozitiv.

Datele rezultate în studiul experimental al ionilor de Cu^{+2+} au fost comparate cu cele teoretice confirmându-se astfel producerea complexului

dorit. Astfel, în Tabelul II.3.16 sunt prezentate pentru peptida A β ₍₉₋₁₆₎ în prezența ionilor de cupru (Cu⁺²⁺) valorile maselor teoretice și experimentale. Din acest tabel se observă că valorile calculate teoretic sunt foarte apropiate de cele experimentale, obținute prin spectrometria MALDI. În plus, complexul peptido-metalic cu ioni de Cu²⁺, [M+Cu(II)-H]⁺, nu a putut fi observat în spectrele de masă. Mai mult, s-a putut observa afinitatea ridicată a complexului pe bază de cupru(I) față de ionii de sodiu, formând aducți de tipul [M+Cu(I)+Na-H]⁺ prezenți în spectru la m/z 1080,4.

Tabelul II.3.16 Masa moleculară (teoretică și experimentală) a peptidei A β ₍₉₋₁₆₎, și a complexului acesteia cu ionii de cupru (Cu⁺²⁺)

Peptida	Ion molecular	Teoretic (m/z)	Experimental (m/z)	
			Cu ⁺	Cu ²⁺
A β ₍₉₋₁₆₎ (H ₂ N- GYEVHHQK- CONH ₂) C ₄₄ H ₆₅ N ₁₅ O ₁₂	[M+H] ⁺	996,4	996,4	996,4
	[M+Na] ⁺	1018,4	1018,3	-
	[M+K] ⁺	1034,4	1034,3	-
	[M+Cu(II)-H] ⁺	1057,6	-	-
	[M+Cu(I)] ⁺	1058,6	1058,2	1058,2
	[M+Cu(I)+Na-H] ⁺	1080,4	1080,2	-

II.4 CARACTERIZAREA COMPLECȘILOR PEPTIDO-METALICI PRIN SPECTROMETRIE DE MASĂ ÎN TANDEM (MS/MS) ȘI FT-IR

Metoda de fragmentare MS/MS permite identificarea *situs*-urilor de chelatare în timp ce modificările conformaționale generate de prezența ionilor metalici pot fi identificate prin spectroscopia FT-IR. Astfel, după evidențierea interacțiunilor peptido-metalice generatoare de complecși prezentată în capitolul anterior, probele au fost investigate prin spectrometrie de masă în tandem și spectroscopie în infraroșu.

II.4.1 Interacțiunea peptidei A β ₍₉₋₁₆₎ și a analogilor acesteia cu ionii de aluminiu

În timp ce un spectrometria de masă simplă determină masa moleculară a unui ion molecular, pe baza raportului masă/sarcină electrică, spectrometria de masă în tandem (MS/MS) este utilizată pentru a selecta un anumit ion molecular și, după fragmentarea sa, pentru a determina masa ionilor fragment rezultați, fiecare peptidă având un anumit model de fragmentare. Dacă este fragmentat un ion molecular al unui complex cu ionii metalici se poate stabili fragmentul ce interacționează mai puternic cu ionul metalic și astfel și existența centrilor de coordinare ai peptidei. Această metodă oferă informații suplimentare cu privire la diferiți ioni generați în spectrul de masă și presupune fragmentarea unui ion parental în ioni de produs prin disociere indusă colizional (CID). Concret, ionii $[M+Al-2H]^+$ au fost selectați drept ioni precursori (parentali) și supuși fragmentării prin CID. Fragmentele obținute sub formă de ioni secundari au permis identificarea *situs*-urilor de legare a ionilor metalici, prin aceea că s-au identificat fragmentele rezultate ce conțin aluminiu. Atribuirea semnalelor observate în spectrele MS/MS al ionilor $[M+Al-2H]^+$ a fost

realizată prin compararea maselor moleculare teoretice ale ionilor ce rezultă în urma fragmentării CID cu valorile înregistrate experimental. Astfel, prezența ionului de aluminiu pe un anumit fragment a condus la apariția unei diferențe m/z de 27 unități între valoarea obținută experimental și cea teoretică.

Valoarea teoretică a ionilor rezultați în urma fragmentării speciei $[M+Al-2H]^+$ a fost estimată cu ajutorul programul GPMAW și poate fi observată în Tabelul II.4.2 alături de mase obținute experimental în cazul celor 5 complecși peptidici. Astfel, a fost remarcată legarea ionului de aluminiu de anumite secvențe aparținând peptidei (Figura II.4.4). De exemplu, peptidele ce conțin resturi de histidină în structură au generat semnale de intensitate înaltă, caracteristice fragmentelor ionice $a6$, $b6$, $x6$, $y5$ și $z6$, acceptoare de ioni metalici. În cazul peptidelor glicil-îmbogățite, s-a observat o reducere a fragmentării ca urmare a semnalului scăzut a ionului parental, fragmentele $y4$ și $y5$ sugerând o interacțiune slabă cu ionii de aluminiu. Totodată în spectrele MS/MS s-a observat apariția unor semnale de tipul $b4-NH_2$ și $b5-NH_2$, în cazul peptidei $A\beta_{(9-16)}$, și $c5-NH_2$ în cazul peptidei $A\beta_{(9-16)}GG$, cel mai probabil datorate ciclizării prin eliminarea unui radical NH_2 . În consecință, ionii de aluminiu formează legături necovalente în principal cu resturile de histidină, lipsa acestora evidențiind și o posibilă interacțiune scăzută cu grupările laterale ale tirozinei sau glutaminei.

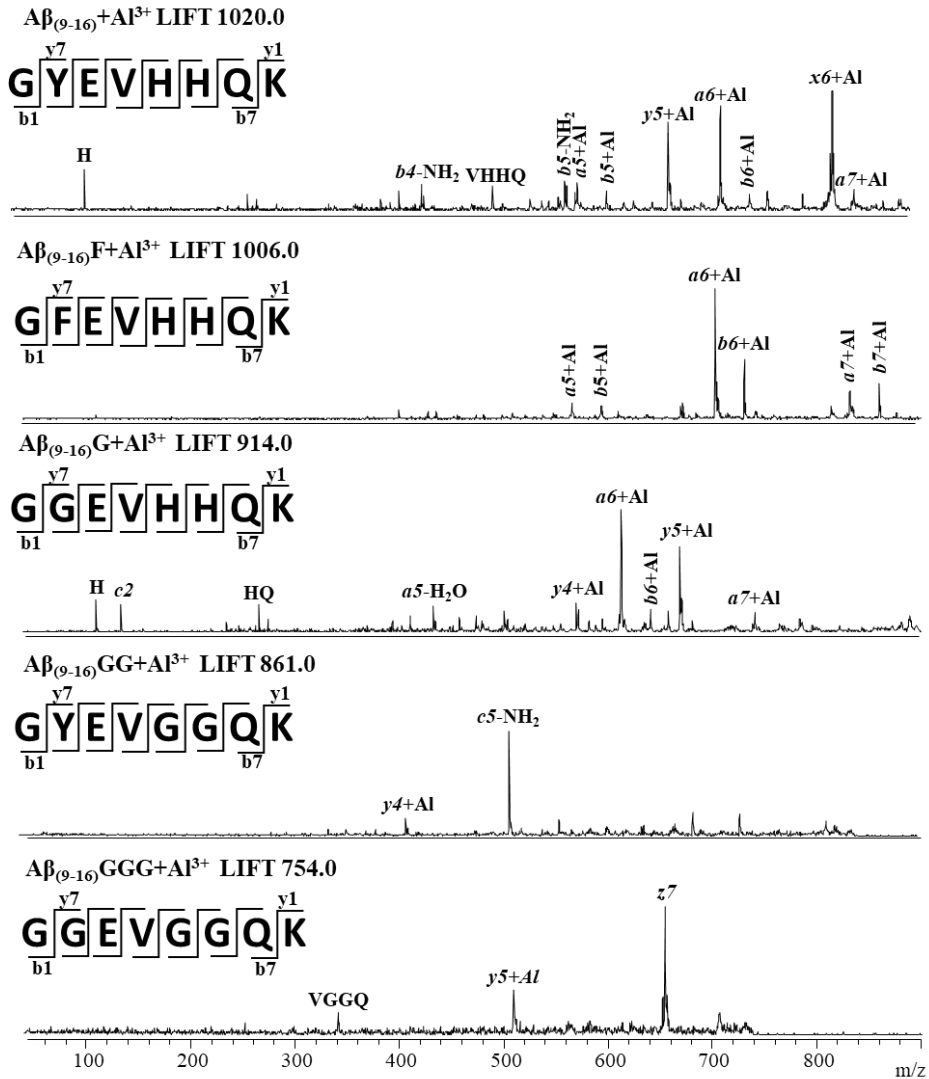


Figura II.4.4 Spectrele de masă MALDI ToF tandem (MS/MS) ale peptidelor amiloide obținute în urma disocierii induse prin coliziune (CID) a ionilor $[M+Al-2H]^+$.

II.5 AGREGAREA PEPTIDELOR AMILOIDICE

Cele mai cunoscute boli - asociate cu tulburările induse de agregarea proteică sunt bolile neurodegenerative, inclusiv boala Alzheimer, boala Huntington, boala Parkinson, bolile prionice etc (Ross și Poirier, 2004). Agregarea peptidelor amiloidice este una dintre principale caracteristici patologice ale BA, având un rol cheie în acest tip de neurodegenerare. În același timp, agregarea proteinelor poate avea și un rol pozitiv. De exemplu, coagularea sângelui și în consecință, vindecarea rănilor are la bază agregarea unei proteine specifice (trombină) (Mezzenga și Fischer, 2013).

II.5.1 Investigarea procesului de agregare a peptidei $A\beta_{(25-35)}$ prin electroforeză unidimensională

Electroforeza este una dintre cele mai utilizate metode utilizate în separarea sau izolarea anumitor macromolecule. SDS-PAGE sau electroforeza pe gel de dodecil sulfat de sodiu-poliacrilamidă, este o metodă des folosită în biochimie pentru a realiza separarea proteinelor în funcție de mobilitatea lor electroforetică. Gelul de poliacrilamidă separă moleculele de proteine în funcție de mărime, dar și în funcție de încărcarea acestora. Acesta este un gel sintetic termostabil, transparent și relativ inert chimic. Mai mult, acesta poate rezista gradientelor de tensiune înaltă și permite folosirea unor tehnici diferite de colorare a acestora.

În acest capitol sunt prezentate rezultatele obținute în urma incubării fragmentului amiloidic $A\beta_{(25-35)}$ la o temperatură de 37 °C. Acest fragment peptidic a fost resintetizat și caracterizat pentru scopul acestui experiment de agregare. Masa sa moleculară este de 1059 Da, iar oligomerii ar trebui să prezinte o masă de 1059·n daltoni. Agregarea a fost

realizată în condiții asemănătoare serului fiziologic la un $\text{pH} = 7,4$. Vizualizarea peptidelor s-a efectuat la intervale diferite de timp în scopul surprinderii etapelor ce stau la baza formării agregatelor. Astfel, s-au analizat probele la 1 zi, 2 zile, 5 zile, 7 zile și, respectiv, 14 zile de la momentul incubării, iar electroforegramele au fost prezentate în Figurile II.5.2 - II.5.6. Studiile de agregare s-au realizat cu ajutorul unui sistem electroforetic folosind protocolul descris în Capitolul II.1.2.

Înfluența timpului de incubare asupra formării de oligomeri poate fi observată și în cazul probei incubate pentru 7 zile la $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ unde s-a remarcat apariția unor oligomeri cu masa cuprinsă între 10-15 kDa (Figura II.5.5). Așadar, în următoarele două zile de experiment, au apărut mai multe tipuri de oligomeri, în timp ce masa celui mai mare dintre aceștia a crescut.

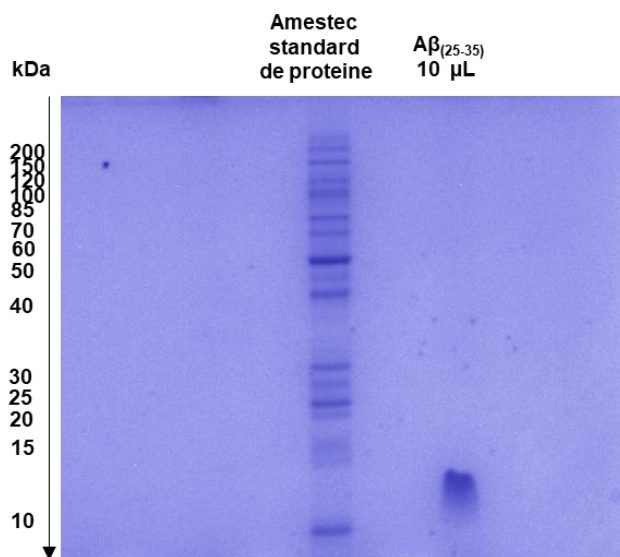


Figura II.5.5 Separarea electroforetică a peptidei amiloidice $\text{A}\beta_{(25-35)}$ după 7 zile de incubare la $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

II.6 CARACTERIZAREA TEORETICĂ A PEPTIDELOR DE TIP AMILOIDIC

Depunerea intracerebrală de peptidă amiloidă A β caracterizează neurodegenerarea de tip Alzheimer (Barage și Sonawane, 2015). A β este o peptidă lungă ce prezintă între 38 și 43 de aminoacizi și este generată prin clivajul proteolitic secvențial al proteinei precursoră amiloide (APP) de către β și γ -secretase (Chow *et al.*, 2010). Dintre acestea, cele mai proeminente izoforme ale peptidei β -amiloidice sunt A β ₍₁₋₄₀₎ și A β ₍₁₋₄₂₎, cea din urmă prezentând două reziduuri hidrofobe suplimentare la capătul C-terminal. Creșterea concentrației de peptide amiloidice A β ₍₁₋₄₀₎ și A β ₍₁₋₄₂₎ la nivelul sinapselor determină instalarea unor conformații anormale de tip β -pliă favorizând astfel dezvoltarea procesului pathologic.

Studii de agregare realizate pe diferite fragmente ale peptidei amiloidice au evidențiat existența unei corelații între prezența regiunilor hidrofobe KLVFF (A β ₍₁₆₋₂₀₎) și IIGLMVGGVV (A β ₍₃₁₋₄₀₎) din structura primară a peptidei A β (Figura II.6.1.) și capacitatea acestuia de a se agrega și forma fibrile (Enache, Chiorcea-Paquim și Oliveira-Brett, 2018). Pe de altă parte, afinitatea ridicată a peptidei față de ionii metalici a fost pusă pe seama resturilor de histidină electroactivă regăsite în domeniului VHHQ (A β ₍₁₂₋₁₅₎) prezentat în Figura II.6.1. (Habasescu *et al.*, 2020).

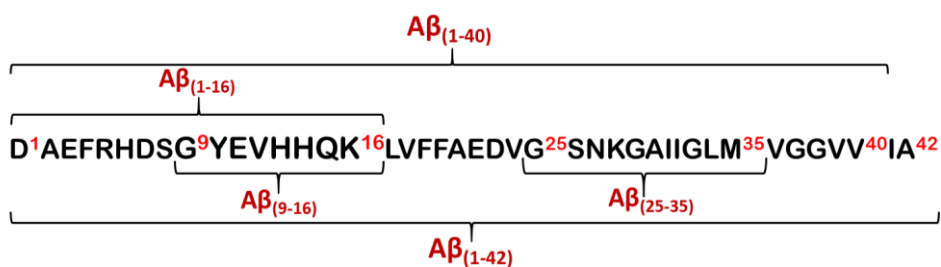


Figura II.6.1 Structura generală a peptidei amiloidice.

II.6.1 Caracterizarea teoretică a fragmentului amiloidic nativ A β (9-16)

Fragmentul amiloidic A β (9-16) a fost caracterizat teoretic, secvența sa primară a acesteia fiind prezentată în Figura II.6.2, în timp ce, structură tridimensională se poate observa în Figura II.6.3.

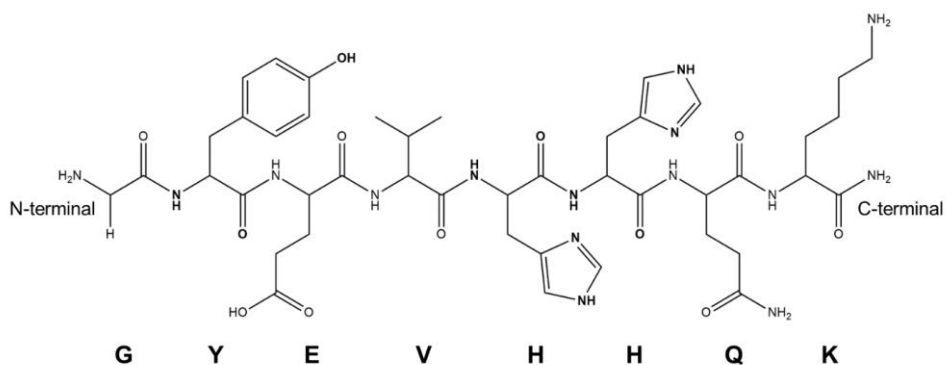


Figura II.6.2 Structura chimică a peptidei A β (9-16).

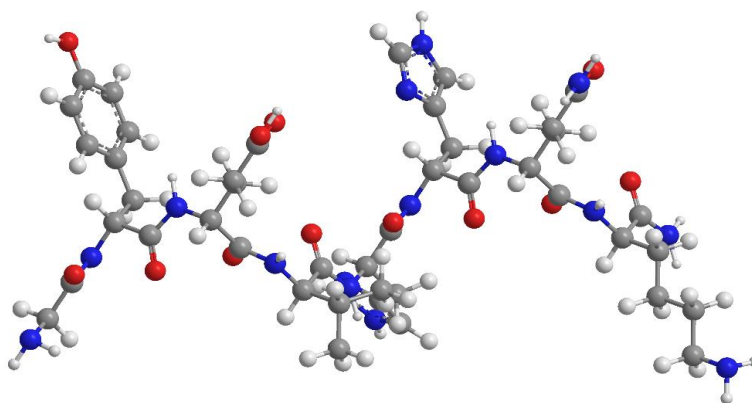


Figura II.6.3 Structura tridimensională a peptidei A β (9-16).

În același timp, peptida amiloidică de tipul A β (9-16) a fost caracterizată teoretic cu ajutorul ChemCalc și a programul ChemDraw Ultra 12, iar caracteristicile acesteia sunt prezentate în Tabelul II.6.1.

Tabelul II.6.1 Valori teoretice ale peptidei A β ₍₉₋₁₆₎ (⁹GYEVHHQK¹⁶)

Formulă chimică brută		C ₄₄ H ₆₅ N ₁₅ O ₁₂
Masa moleculară	monoizotopică	995,5 Da
	medie	996,1 Da
Analiza elementală		C, 53,06%; H, 6,58%; N, 21,09%; O, 19,27%

Din Figura II.6.4 se poate observa că peptida nativă A β ₍₉₋₁₆₎ prezintă un caracter hidrofil pronunțat, în principal datorită prezenței tirozinei în secvență, aminoacid a cărui grupare hidroxil fenolică (–OH) mărește caracterul hidrofil, dar și datorită celor două nucleole imidazolice specifice histidinelor din pozițiile 13 și 14.

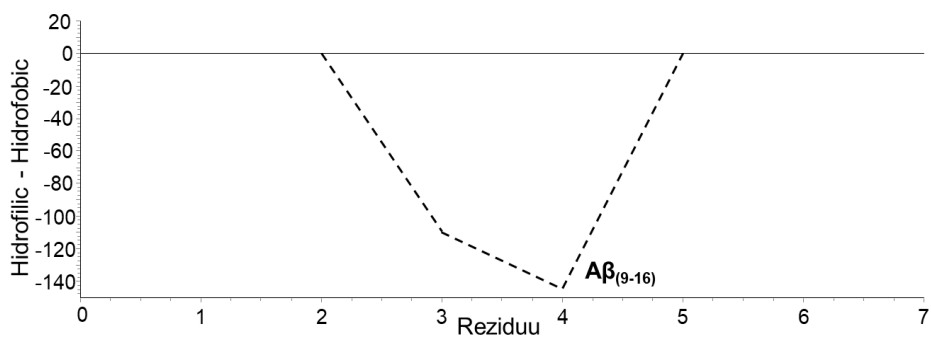


Figura II.6.4 Evaluarea caracterului hidrofil al fragmentului amiloidic A β ₍₉₋₁₆₎ obținut cu programul GPMAW.

CONCLUZII GENERALE

Teza de doctorat intitulată ”*Peptide amiloidice: sinteză, caracterizare și aplicații biomedicale*” a vizat în partea teoretică analiza relației dintre peptidele β -amiloidice și boala Alzheimer, precum și efectul ionilor metalici în oligomerizarea peptidelor $A\beta$ cu formare de fibrile și plăci amiloidice implicate în neurodegenerescență.

În cadrul cercetărilor experimentale, au fost studiate diferite fragmente de peptide de tip amiloidic native, dar și secvențe nou sintetizate și interacțiunea lor cu ionii metalici implicați direct în patologia Alzheimer, precum: Al^{3+} , $Fe^{2+/3+}$, Zn^{2+} , $Cu^{+/2+}$, Ag^+ . În plus, au fost realizate diferite studii comparative și cu peptide sintetizate anterior în cadrul Grupului de Biochimie: fragmentul amiloidic $A\beta_{(1-16)}$ și peptida neuroprotectoare NAP.

Astfel, au fost urmărite și îndeplinite în totalitatea obiectivele prevăzute la demararea cercetărilor doctorale, rezultatele obținute furnizând informații importante referitoare la legătura peptidelor de tip amiloidic cu ionii metalici.

Cercetările realizate au permis formularea următoarelor concluzii:

1) Au fost sintetizate patru noi peptide, variante ale peptidei $A\beta_{(9-16)}$, precum și două peptide fragment native $A\beta_{(9-16)}$ și $A\beta_{(25-35)}$, utilizate în studii de complexare cu ioni metalici sau studii de agregare. A fost aplicată tehnica de sinteză a peptidelor în fază solidă, metoda Fmoc/*t*-Bu, care s-a dovedit oportună în obținerea următoarelor noi secvențe peptidice: $A\beta_{(9-16)}F$ ce prezintă un rest de fenilalanină în loc de tirozină, $A\beta_{(9-16)}G$ care a constat în înlocuirea restului de tirozină cu glicină, $A\beta_{(9-16)}GG$ care a condus la înlocuirea resturilor de histidină (H^{13} , H^{14}) cu glicină și $A\beta_{(9-16)}$.

¹⁶)GGG ce conține trei resturi de glicină ca substituenți ai aminoacizilor electroactivi (Y¹⁰, H¹³, H¹⁴).

Sinteza peptidei native A β ₍₉₋₁₆₎ și a celor patru derivați s-a realizat pe o rășină de tipul Rink amidă, generând la final peptide amidate, iar sinteza fragmentului peptidic A β ₍₂₅₋₃₅₎ s-a desfășurat pornind de la o rășină metionin-cuplată ce a permis obținerea peptidei cu capătul C-terminal liber.

2) Compușii sintetizați au fost purificați prin cromatografie de lichide de înaltă performanță utilizând metoda în fază inversă. Astfel, s-a folosit o fază mobilă cu un gradient de 80% acetonitril în apă distilată cu 0,1% TFA pe două coloane diferite: C₁₈ pentru peptidele de tipul A β ₍₉₋₁₆₎, A β ₍₁₋₁₆₎ și C₈ pentru peptidele A β ₍₂₅₋₃₅₎ și NAP.

Profilul cromatogramelor peptidelor A β ₍₉₋₁₆₎ au prezentat două fracțiuni distincte care au fost atribuite atât peptidei pure sintetizate cât și celei incomplet deprotejate. În cazul peptidelor A β ₍₁₋₁₆₎, A β ₍₂₅₋₃₅₎ și NAP, cromatogramele au prezentat un singur semnal atribuit peptidei pure.

Timpul de retenție al fragmentelor de tip A β ₍₉₋₁₆₎ a variat în funcție de caracterul hidrofob al aminoacizilor componenți, cum ar fi cel determinat de gruparea fenolică a tirozinei. Astfel, prin înlocuirea cu glicină a aminoacizilor hidrofilii s-au obținut peptide cu un caracter hidrofil mai scăzut, cum sunt peptidele glicil-modificate (A β ₍₉₋₁₆₎G și A β ₍₉₋₁₆₎GGG).

3) Peptidele obținute au fost caracterizate prin tehnici de spectrometrie de masă și spectroscopie de infraroșu.

Prin măsurători spectrometrice de masă de tip MALDI ToF, realizate înainte și după purificare, a fost confirmată sinteza peptidelor,

puritatea lor, dar și prezența unor peptide parțial deprotejate de grupările protectoare.

În cazul sintezelor realizate pornind de la o rășină de tip Rink amidă s-a remarcat formarea în proporție semnificativă a unei cantități de peptidă cu capătul C-terminal N-alchilat generată ca urmare a clivării incomplete a agentului de legătură a suportului polimeric și care a fost regăsit în spectru la o diferență de 106 unități m/z față de valoarea peptidei pure. Mai mult, prin tehnica cromatografică de purificare s-a reușit o bună separare a celor două fracțiuni, și anume peptida liberă și peptida cu capătul N-alchilat.

Spectrele în infraroșu ale peptidelor amiloidice $A\beta_{(9-16)}$ au prezentat patru semnale majoritare în regiunea $1000-1800\text{ cm}^{-1}$, iar deplasarea maximelor numerelor de undă a fost corelată cu tipul aminoacizilor constituenți.

Informațiile referitoare la structurile secundare adoptate de peptide au fost obținute în urma investigării regiunii specifice benzii amidă I ($1700-1600\text{ cm}^{-1}$) și benzii amidă II ($1580-1510\text{ cm}^{-1}$). Regiunea amidă II a indicat prezența unei conformații de tip β -pliat în structurile peptidelor amiloidice, excepție făcând peptida $A\beta_{(9-16)}G$ caracterizată de o structură de tip β -întors.

Investigarea domeniului benzii amidă I a sugerat prezența atât a conformerilor de tip β -pliat, cât și a conformerilor de tip β -întors în structura peptidelor $A\beta_{(9-16)}$, $A\beta_{(9-16)}F$ și $A\beta_{(9-16)}G$, structura de tip α -elicoidală fiind remarcată doar în cazul peptidelor $A\beta_{(9-16)}GG$ și $A\beta_{(9-16)}GGG$.

Derivata de ordinul doi a spectrelor FT-IR în domeniul amidă I a sugerat prezența unor conformeri de tip α -elicoidal în populația de molecule aparținând peptidelor $A\beta_{(9-16)}GG$ și $A\beta_{(9-16)}GGG$, în timp ce

derivata spectrelor peptidelor $A\beta_{(9-16)}$, $A\beta_{(9-16)}F$ și $A\beta_{(9-16)}G$ a indicat o proporție semnificativă de conformeri de tip β -pliat.

4) Formarea complexelor peptido-metalici ai peptidei amiloidice $A\beta_{(9-16)}$ și a analogilor acesteia a fost investigată prin spectrometrie de masă de tip MALDI ToF. Astfel, prezența ionilor de aluminiu a favorizat formarea unui complex peptido-metalic de tipul $Al-A\beta_{(9-16)}$. S-a observat scăderea în intensitate a semnalului atribuit complexului peptido-metalic odată cu substituirea resturilor de histidină și respectiv de tirozină din fragmentul nativ cu fenilalanină și glicină.

Spectrele peptidelor amiloidice înregistrate în prezența ionilor de fier trivalent, $Fe(III)$, au evidențiat reducerea ionilor de Fe^{3+} la Fe^{2+} și formarea complexului peptido-metalic numai cu Fe^{2+} . Lipsa aminoacizilor His și Tyr din secvența peptidică a determinat o micșorare a interacțiunilor peptido-metalice, interacțiuni ce pot fi pe viitor investigate și apelând la alte metode, cum ar fi rezonanța magnetică nucleară, spectrofotometria UV-viz, etc.

Ionii de zinc au generat semnale mai reduse ca intensitate aferente complexului peptido-metalic ceea ce sugerează o afinitate mai scăzută a zincului față de peptidele studiate. Acest fenomen a fost mai evident odată cu înlocuirea resturilor aminoacide histidină și tirozină.

Interacțiunea peptidelor cu ionii Cu^{2+} a determinat formarea complexului peptido-metalic cu ionii de $Cu(I)$ ca urmare a reducerii cuprului de la starea de oxidare (II) la (I), urmată de interacțiunea acestuia din urmă cu peptida. Drept centri de chelatare pot fi considerați resturile de histidină, deoarece înlocuirea acestora cu resturi de glicină a determinat o scădere a intensității semnalelor complexelor cu ionii de cupru.

Ionii de argint au generat un complex peptido-metalic ale cărui semnale au fost observate în spectrele de masă, în timp ce înlocuirea unor resturi de aminoacizi cu glicină a redus intensitatea acestor semnale.

5) Spectrometria de masă în tandem (MS/MS) a permis identificarea centrilor de legare a ionilor metalici. Astfel, în cazul interacțiunii peptidelor de tip $A\beta_{(9-16)}$ cu ionii de aluminiu, spectrele de masă MALDI ToF au conținut semnale caracteristice ionilor moleculari $[M+Al-2H]^+$. Cele mai intense semnale au fost identificate în spectrul peptidei modificate $A\beta_{(9-16)}F$ și a celei native $A\beta_{(9-16)}$. Fragmentarea ionilor corespunzători complexului peptido-metalic au arătat că resturile imidazolice ale histidinelor sunt implicate în chelatarea ionilor metalici.

Spectroscopia de infraroșu a evidențiat modificările conformaționale suferite de peptide sub influența ionilor de aluminiu, informațiile fiind obținute în urma comparării spectrelor peptidelor libere cu cele înregistrate în prezența ionilor metalici. Astfel, s-a constatat adoptarea unei structuri predominante de tip β -pliat în domeniul amidă I. La nivelul benzii amidă II s-a evidențiat prezența unor structuri neordonate, tendințe spre structurile α -elicooidale existând numai în spectrele peptidelor modificate cu glicină. Derivata de ordinul doi a spectrelor de infraroșu a indicat prezența posibilă a structurilor de tip agregat.

Peptida amiloidică $A\beta_{(1-16)}$ incubată în prezența ionilor de cupru la diferite valori de pH (6,0 și 7,4) a fost analizată prin spectrometrie de masă de tip ESI. S-a constatat formarea unor complecși prin substituirea protonilor cu ioni metalici. În plus, legarea celui de-al doilea ion metalic a fost observată numai în probele incubate la pH 6,0. Experimentele ESI MS/MS au indicat afinitatea ridicată a peptidei $A\beta_{(1-16)}$ față de ionii de

cupru, datorită cel mai probabil prezenței resturilor de histidină (His⁶, His¹³ și His¹⁴).

Comportamentul peptidelor amiloidice și a celor anti-amiloidice (neuroprotectoare) în prezența ionilor metalici a fost studiat cu ajutorul spectrelor de masă MALDI ToF. Astfel, s-a observat formarea de complecși peptido-metalici cu ionii de argint și ionii de cupru monovalent atât în cazul fragmentului amiloidic A β ₍₉₋₁₆₎ cât în cazul peptidei NAP, cele mai intense semnale fiind observate la complecșii obținuți cu ionii de argint.

De asemenea, a fost studiată prin experimente ESI-MS competiția dintre cele două peptide pentru ionii metalici. Amestecul omogen de peptide imersat în prezența ionilor metalici de Cu²⁺ și Zn²⁺ a generat semnale specifice complecșilor peptido-metalici. S-a remarcat o afinitate mai ridicată a peptidelor față de ionii de cupru evidențiată în legarea celui de-al doilea ion de cupru și intensitatea semnalelor corespunzătoare complexului. Analiza distribuției izotopice a ionilor peptido-metalici a indicat formarea complexului A β -Cu⁺²⁺, având atât ioni de cupru(II) cât și ioni de cupru(I). Peptida NAP a prezentat o afinitate foarte ridicată față de ionii Cu²⁺.

6) Studiul agregării a fragmentului amiloidic A β ₍₂₅₋₃₅₎ s-a realizat prin metoda electroforetică unidimensională. Soluțiile de peptidă amiloidică A β ₍₂₅₋₃₅₎ incubate la 37 °C au fost supuse separării electroforetice în momente diferite în vederea captării diferitelor etape existente în formarea agregatelor. S-a observat formarea unor oligomeri cu masa de aproximativ 10 kDa la 5 zile de la incubare, masa acestora crescând la aproximativ 13 kDa după 7 zile de incubare. După 14 zile de incubare s-a pus în evidență formarea unor agregate insolubile. Astfel,

peptida $A\beta_{(25-35)}$ agregă destul de rapid ajungând după 7 zile de la stadiul de monomer la cel de agregat oligomer insolubil.

7) Caracterizarea peptidelor nou sintetizate în raport cu cele cunoscute în literatură a fost realizată teoretic cu ajutorul programului GPMAW. S-a constatat o scădere a caracterului hidrofil al peptidei native $A\beta_{(9-16)}$ odată cu îmbogățirea sa cu resturi de glicină, datorită dispariției grupărilor polare de la tirozină și histidină și înlocuirea acestora cu radicali nepolari. Peptida $A\beta_{(9-16)F}$ a prezentat un caracter hidrofil mai redus datorită înlocuirii tirozinei hidrofile cu fenilalanină hidrofobă.

Caracterul puternic hidrofil observat în cazul fragmentului amiloidic $A\beta_{(1-16)}$ s-a datorat structurilor polare ale aminoacizilor hidrofilii. În schimb, gradul crescut de hidrofobicitate al peptidelor $A\beta_{(25-35)}$ și NAP s-a datorat resturilor de aminoacizi nepolari ce predomină în structura peptidică.

Separat, cu programul Chem3D Ultra 12.0 s-au simulat structurile spațiale ale peptidelor, acestea având tendința de torsiune.

8) Diseminarea rezultatelor originale.

Din cadrul prezentei teze de doctorat au fost publicate în jurnale cotate Web of Science șase lucrări științifice cu factorul de impact cumulat de 5,992.

Pe parcursul perioadei doctorale au fost prezentate șapte lucrări la conferințe internaționale și șase lucrări la conferințe naționale. Activitatea de cercetare a fost completată și de participarea la șase școli de vară internaționale și trei seminarii științifice. De asemenea, o parte din rezultatele originale au fost raportate la Proiectul PCE 56/2017.

BIBLIOGRAFIE (SELECTIVĂ)

Adlard, P. A., Bush, A. I., Metals and Alzheimer's disease, *Journal of Alzheimer's Disease*, 10, 145-163, **2006**.

Adochitei, A., Drochioiu, G., Rapid characterization of peptide secondary structure by FT-IR spectroscopy, *Revue Roumaine de Chimie*, 56, 783-791, **2011**.

Aguzzi, A., O'Connor, T., Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives, *Nature Reviews Drug Discovery*, 9, 237-248, **2010**.

Atwood, C. S., Scarpa, R. C., Huang, X., Moir, R. D., Jones, W. D., Fairlie, D. P., Tanzi, R. E., Bush, A. I., Characterization of Copper Interactions with Alzheimer Amyloid β Peptides, *Journal of Neurochemistry*, 75, 1219-1233, **2008**.

Bakshi, K., Liyanage, M., R., Volkin, D. B., Middaugh, C. R., Fourier Transform Infrared Spectroscopy of Peptides, *Therapeutic Peptides: Methods and Protocols*, 1088, 255-269, **2014**.

Barage, S. H., Sonawane, K. D., Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease, *Neuropeptides*, 52, 1-18, **2015**.

Barth, A., The infrared absorption of amino acid side chains, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 74, 141-173, **2000**.

Castellani, R. J., Plascencia-Villa, G., Perry, G., The amyloid cascade and Alzheimer's disease therapeutics: theory versus observation, *Laboratory Investigation*, 99, 958-970, **2019**.

Castellani, R. J., Rolston, R. K., Smith, M. A., Alzheimer Disease, *Disease-a-Month*, 56, 484-546, **2011**.

Chandrudu, S., Simerska, P., Toth, I., Chemical methods for peptide and protein production, *Molecules*, 18, 4373-4388, **2013**.

Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., Collin, F., Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease, *Redox Biology*, 14, 450-464, **2018**.

Chow, V. W., Mattson, M. P., Wong, P. C., Gleichmann, M., An overview of APP processing enzymes and products, *Neuromolecular medicine*, 12, 1-12, **2010**.

Coyle, J. T., Puttfarcken, P., Oxidative Stress, Glutamate, and Neurodegenerative Disorders, *Pathologie*, 17, 219-221, **1996**.

Drochioiu, G., Murariu, M., **Jureschi, M.**, Lupaescu, A., Closca, M. C., Heavy metal binding to peptides at higher pH: Novel ESI-MS approach, *International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2018 - Conference proceedings, Advances in Biotechnology*, 361-368, **2018**.

Enache, T. A., Chiorcea-Paquim, A.-M., Oliveira-Brett, A. M., Amyloid Beta Peptide VHHQ, KLVFF, and IIGLMVGGVV Domains Involved in Fibrilization: AFM and Electrochemical Characterization, *Analytical Chemistry*, 90, 2285-2292, **2018**.

Glenner, G. G., Wong, C. W., Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 120, 885-890, **1984**.

Grant, G. A., Synthetic peptides: a user's guide, *Oxford University Press*, 294-295, **2002**.

Haass, C., Selkoe, D. J., Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 101-112, **2007**.

Habasescu, L., **Jureschi, M.**, Petre, B.-A., Mihai, M., Gradinaru, R.-V., Murariu, M., Drochioiu, G., Histidine-Lacked $A\beta(1-16)$ Peptides: pH-Dependent Conformational Changes in Metal Ion Binding, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, **2020**.

Hardy, J., Selkoe, D. J., The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics, *Science*, 297, 353-356, **2002**.

Huang, Y., Mucke, L., Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies, *Cell*, 148, 1204-1222, **2012**.

Ion, L., Drochioiu, G., Lupaescu, A.-V., **Jureschi, M.**, Petre, B.-A., Amyloid- β and anti-amyloid peptides involved in Alzheimer's disease: Interactions with metal ions,

International Multidisciplinary GeoConference SGEM 2019 - *Conference proceedings, Advances in Biotechnology 19*, 515-522, **2019**.

Isidro-Llobet, A., Kenworthy, M. N., Mukherjee, S., Kopach, M. E., Wegner, K., Gallou, F., Smith, A. G., and Roschangar, F., Sustainability Challenges in Peptide Synthesis and Purification: From R&D to Production, *Journal of Organic Chemistry*, 84, 4615-4628, **2019**.

Jureschi, M., Drochioiu, G., Lupaescu, A. V., Petre, B.-A., Ciobanu, C. -I., Binding of heavy metal ions to amyloid- β peptides: interactions with NAP peptides, *International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2019 - Conference proceedings, Advances in Biotechnology*, 583-590, **2019d**.

Jureschi, M., Humelnicu, I., Petre, B.-A., Ciobanu, C.-I., Murariu, M., Drochioiu, G., Solid phase synthesis of four analogs of amyloid- β (9-16) peptide: MS and FT-IR characterization, *Revue Roumaine de Chimie*, 64, 433-443, **2019b**.

Jureschi, M., Lupaescu, A. V., Ion, L., Petre, B.-A., Drochioiu, G., Stoichiometry of Heavy Metal Binding to Peptides Involved in Alzheimer's Disease: Mass Spectrometric Evidence, *Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research*, 401-415, **2019a**.

Jureschi, M., Petre, B.-A., Ion, L., Ciobanu, C.-I., Sandu, I., Drochioiu, G., Synthesis of Different Analogs of A β (9-16) Peptide Mass spectrometric evidence for heavy metal binding, *Revista de Chimie*, 70, 3348-3353, **2019c**.

Van der Kant, R., Goldstein, L. S. B., Ossenkoppele, R., Amyloid- β -independent regulators of tau pathology in Alzheimer disease, *Nature Reviews Neuroscience*, **2019**.

Kepp, K. P., Alzheimer's disease: How metal ions define β -amyloid function, *Coordination Chemistry Reviews*, 351, 127-159, **2017**.

Laemmli, U. K., Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 228, 726-734, **1970**.

Liu, H., Qu, Y., Wang, X., Amyloid β -targeted metal complexes for potential applications in Alzheimer's disease, *Future Medicinal Chemistry*, 10, 697-701, **2018**.

Lupaescu, A.-V., Humelnicu, I., Petre, B.-A., Ciobanu, C.-I., Drochioiu, G., Direct

evidence for binding of aluminum to NAP anti-amyloid peptide and its analogs, *European Journal of Mass Spectrometry*, **2019**.

Lupaescu, A.-V., **Jureschi, M.**, Ciobanu, C.-I., Ion, L., Zbancioc, G., Petre, B.-A., Drochioiu, G., FTIR and MS Evidence for Heavy Metal Binding to Anti-amyloid NAP-Like Peptides, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, *25*, 303-309, **2019**.

Ma, Q.-F., Li, Y.-M., Du, J.-T., Kanazawa, K., Nemoto, T., Nakanishi, H., Zhao, Y.-F., Binding of copper (II) ion to an Alzheimer's tau peptide as revealed by MALDI-TOF MS, CD, and NMR, *Biopolymers*, *79*, 74-85, **2005**.

Maté, B., Rodriguez-Lazcano, Y., Gálvez, Ó., Tanarro, I., Escribano, R., An infrared study of solid glycine in environments of astrophysical relevance, *Physical Chemistry Chemical Physics*, *13*, 12268-12276, **2011**.

Merrifield, R. B., Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide, *Journal of the American Chemical Society*, *85*, 2149-2154, **1963**.

Mezzenga, R., Fischer, P., The self-assembly, aggregation and phase transitions of food protein systems in one, two and three dimensions, *Reports on Progress in Physics*, *76*, 046601, **2013**.

Murariu, M., Habasescu, L., Ciobanu, C.-I., Gradinaru, R. V., Pui, A., Drochioiu, G., Mangalagiu, I., Interaction of Amyloid A β (9–16) Peptide Fragment with Metal Ions: CD, FT-IR, and Fluorescence Spectroscopic Studies, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, **2018**.

Panza, F., Lozupone, M., Logroscino, G., Imbimbo, B. P., A critical appraisal of amyloid- β -targeting therapies for Alzheimer disease, *Nature Reviews Neurology*, *15*, 73-88, **2019**

Poulson, B. G., Szczepski, K., Lachowicz, J. I., Jaremko, L., Emwas, A.-H., Jaremko, M., Aggregation of biologically important peptides and proteins: Inhibition or acceleration depending on protein and metal ion concentrations, *RSC Advances*, *10*, 215-227, **2019**.

Przedborski, S., Vila, M., Jackson-Lewis, V., Neurodegeneration: what is it and where are we?, *The Journal of clinical investigation*, *111*, 3-10, **2003**.

- Rabinovici, B. G. D., Late-onset Alzheimer Disease, *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, 25, 14-33, **2019**.
- Rajendran, R., Minqin, R., Ynsa, M. D., Casadesus, G., Smith, M. A., Perry, G., Watt, F., A novel approach to the identification and quantitative elemental analysis of amyloid deposits-Insights into the pathology of Alzheimer's disease, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 382, 91-95, **2009**.
- Selkoe, D. J., Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 924, 17-25, **2000**.
- Stathopoulos, P., Papas, S., Tsikaris, V., C-terminal N-alkylated peptide amides resulting from the linker decomposition of the Rink amide resin. A new cleavage mixture prevents their formation, *Journal of Peptide Science*, 12, 227-232, **2006**.
- Terracciano, A., Sutin, A. R., Personality and Alzheimer's disease: An integrative review, *Personality Disorders: Theory, Research, and Treatment*, 10, 4-12, **2019**.
- DeToma, A. S., Salamekh, S., Ramamoorthy, A., Lim, M. H., Misfolded proteins in Alzheimer's disease and type II diabetes. *Chem. Soc. Rev.*, 41, 608-621 **2012**.
- Tōugu, V., Karafin, A., Palumaa, P., Binding of zinc(II) and copper(II) to the full-length Alzheimer's amyloid- β peptide, *Journal of Neurochemistry*, 104, 1249-1259, **2008**.
- Wang, P., Wang, Z.-Y., Metal ions influx is a double edged sword for the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Ageing Research Reviews*, 35, 265-290, **2017**.
- Wang, X., Wang, X., Guo, Z., Metal-involved theranostics: An emerging strategy for fighting Alzheimer's disease, *Coordination Chemistry Reviews*, 362, 72-84, **2018**.
- Wenk, G. L., Neuropathologic changes in Alzheimer's disease, *Journal of Clinical Psychiatry*, 64, 7-10, **2003**.
- Zhu, X., Lee, H., Perry, G., Smith, M. A., Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: An update, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1772, 494-502, **2007**.

LISTA DE LUCRĂRI PUBLICATE DIN TEZĂ

A. Articole științifice publicate in extenso în reviste cotate Web of Science cu factor de impact:

1) **Jureschi, M.**, Lupaescu, A.V., Ion, L., Petre, B.A., Drochioiu G., Stoichiometry of heavy metal binding to peptides involved in Alzheimer's disease: mass spectrometric evidence, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1140, 401-415, **2019**. DOI: 10.1007/978-3-030-15950-4_23

Factor de impact = 2,450

2) **Jureschi. M.**, Humelnicu, I., Petre, B.A., Ciobanu, C.I., Murariu, M., Drochioiu G., Solid phase synthesis of four analogs of amyloid- $\beta_{(9-16)}$ peptide: MS and FT-IR characterization, *Revue Roumaine de Chimie*, no. 64(5), p. 433-443, **2019**. **Factor de impact = 0,381**

3) **Jureschi, M.**, Petre, B.A., Ion, L., Ciobanu, C.I., Sandu, I., Drochioiu G., Synthesis of Different Analogs of A $\beta_{(9-16)}$ Peptide Mass spectrometric evidence for heavy metal binding, *Revista de Chimie*, no. 70(9), p. 3348-3353, **2019**. **Factor de impact = 1,755**

4) Lupaescu, A.V., **Jureschi, M.**, Ciobanu, C.I., Ion, L., Zbancioc, G., Petre, B.A., Drochioiu G., FTIR and MS evidence for heavy metal binding to anti-amyloid NAP-like peptides, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, no. 25(1), p. 303-309, **2019**. DOI:10.1007/s10989-018-9672-2, **Factor de impact = 1,500**

5) Habasescu, L., **Jureschi, M.**, Petre, B.A., Mihai, M., Gradinaru R.V., Murariu, M., Drochioiu, G., Histidine-Lacked A $\beta_{(1-16)}$ Peptides: pH-Dependent Conformational Changes in Metal Ion Binding,

International Journal of Peptide Research and Therapeutics, **2020**. DOI: 10.1007/s10989-020-10048-0, **Factor de impact = 1,500**

6) Murariu, M., Ciobanu, C.I., Habasescu, L., **Jureschi, M.**, Drochioiu G., Solid phase synthesis and characterization of A β (9-16) peptide: its interaction with some metal ions, *Revue Roumaine de Chimie*, accepted, **2019**. **Factor de impact = 0,381**

B. Articole științifice publicate in extenso în volumele conferințelor cotate ISI:

- 1) **Jureschi, M.**, Drochioiu, G., Lupaescu, A.-V., Petre, B.A., Ciobanu, C.I., Binding of heavy metal ions to amyloid- β peptides: interactions with NAP peptides., 19th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2019 - *Conference proceedings, Advances in Biotechnology 19*, 583-590, **2019**. DOI: 10.5593/sgem2019/6.1/S25.075
- 2) Ion, L., Drochioiu, G., Lupaescu, A.-V., **Jureschi, M.**, Petre, B.A., Amyloid- β and anti-amyloid peptides involved in Alzheimer`s disease: Interactions with metal ions. 19th International Multidisciplinary GeoConference SGEM 2019 - *Conference proceedings, Advances in Biotechnology 19*, 515-522, **2019**. DOI: 10.5593/sgem2019/6.1
- 3) Drochioiu, G., Murariu, M., **Jureschi, M.**, Lupaescu, A.-V., Closca, M-C., Heavy metal binding to peptides at higher pH: Novel ESI-MS approach, 18th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2018 - *Conference proceedings, Advances in Biotechnology 18*, 361-368, **2018**. DOI: 10.5593/sgem2018/6.2