

UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI
FACULTATEA DE CHIMIE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE CHIMIE

INVESTIGAȚII TEORETICE ȘI
EXPERIMENTALE ALE UNOR PEPTIDE
IMPLICATE ÎN BIOCHIMIA BOLII
ALZHEIMER

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat,

Prof. univ. dr. **Gabi DROCHIOIU**

Student-doctorand,

Chimist **Cosmin Ștefan MOCANU**

Septembrie 2022

COMISIA DE DOCTORAT

 **Prof. univ. dr. habil. Cecilia Arsene**

Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași, Iași, România

Președinte

 **Prof. univ. dr. Gabi Drochioiu**

Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași, Iași, România

Conducător științific

 **Acad. Bogdan C. Simionescu, Cercetător Științific gradul I**

Academia Română, București, România

Referent

 **Conf. univ. dr. habil. Ileana Cornelia Fărcășanu**

Universitatea din București, București, România

Referent

 **Conf. univ. dr. Robert Vasile Grădinaru**

Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași, Iași, România

Referent

Mulțumiri

Sunt pe deplin recunoscător domnului **Prof. univ. dr. Gabi Drochioiu** pentru tot sprijinul acordat în perioada studiilor doctorale, cât și pentru sfaturile pline de cunoaștere atât de mult necesare în elaborarea unui parcurs plăcut în viață.

Totodată, alese mulțumiri sunt adresate Comisiei de Îndrumare constituită din domnii **Prof. univ. dr. Costel Moldoveanu**, **Conf. univ. dr. Robert Grădinaru** și **Conf. univ. dr. Gheorghiță Zbancioc**, ce a avut un rol esențial în evaluarea corectă a fiecărui pas din cercetare pe care l-am realizat.

De asemenea, am o recunoștință deosebită față de doamna **CS III dr. Cătălina Ciobanu** de la Institutul de Cercetări Interdisciplinare – Centrul CERNESIM, Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași, și față de domnul **CS III dr. Marius Niculaua** de la Centrul de Cercetări pentru Oenologie, Academia Română – Filiala Iași, ce și-au oferit ajutorul neconținut în îndeplinirea obiectivelor doctoratului.

Mai mult decât atât, doresc să le mulțumesc colaboratorilor de la Institutul de Chimie Macromoleculară „Pentru Poni” Iași, doamnei **CS II dr. Loredana Elena Niță**, doamnei **CS III dr. Mihaela Homocianu** și doamnei **CS dr. Iuliana Stoica**, pentru tot sprijinul acordat în emiterea unor ipoteze necesare publicării rezultatelor științifice.

În același timp, o gratitudine aparte o am față de doamna **Dr. Olga Pintilie**, față de doamna **Dr. Laura Darie-Ion** și față de domnișoara **Drd. Ștefania Claudia Jitaru** ce m-au ajutat constant și mi-au fost alături de fiecare dată când am avut nevoie de sprijin.

Mulțumesc totodată proiectului **PN-III-P2-2.1-PED-2019-2484** finanțat de UEFISCDI București, coordonat de Directorul de Proiect **Conf. univ. dr. Robert Grădinaru**, pentru asistarea financiară de care am avut parte în timpul studiilor doctorale.

De asemenea, aceleași mulțumiri sunt adresate centrului **TRANSCEND** – Institutul Regional de Oncologie Iași pentru accesul la spectrometrul de masă MALDI-TOF/TOF de la Bruker, **Institutului de Chimie Macromoleculară „Pentru Poni” Iași** pentru îngăduința colaborării și **Colectivului de Chimie Organică** al Facultății de Chimie, Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași, pentru accesul la liofilizatorul Alpha 1-2 LD Plus de la MartinChrist.

Nu în cele din urmă, aș dori să aduc calde mulțumiri domnișoarei **Asist. univ. dr. Ancuța Lupăescu** și doamnei **Dr. Monica Iavorschi** de la Facultatea de Medicină și Științe Biologice, Universitatea „Ștefan cel Mare” din Suceava, pentru implicarea de care au dat dovadă în ceea ce a privit instruirea mea în laboratorul de biochimie.

Tuturor, vă mulțumesc!

CUPRINS

INTRODUCERE	1
I. STUDIU DE LITERATURĂ	10
I.1. Fiziopatologia bolii Alzheimer. Considerații teoretice	10
I.1.1. Caracteristici neuropatologice	11
I.1.2. Modificări metabolice	15
I.1.3. Influența ionilor metalici	18
I.1.4. Enzime, proteine și peptide implicate în boala Alzheimer	19
I.2. Peptide sintetice	24
I.2.1. Sinteza peptidelor în fază solidă	25
I.2.2. Suportul solid în sinteza peptidelor – Rășina	28
I.2.3. Strategia Fmoc	29
I.2.4. Monitorizarea etapelor de cuplare și de deprotejare	34
I.2.5. Reacții secundare în sinteza peptidelor în fază solidă	35
I.3. Abordări practice în izolarea peptidelor	38
I.3.1. Aspecte generale în purificarea peptidelor	38
I.3.2. Cromatografia de lichide de înaltă performanță	39
I.4. Metode de caracterizare a peptidelor	43
I.4.1. Spectrometria de masă	43
I.4.2. Metode spectrofotometrice	45
I.4.3. Metode imagistice	47
I.4.4. Dispersia dinamică a luminii	50
I.5. Biochimia computațională	52
OBIECTIVELE TEZEI	55
II. CONTRIBUȚII PERSONALE	59
II.1. Materiale și metode	59
II.1.1. Protocolul aplicat în studiul computațional al interacțiunii ionilor metalici cu structurile amiloidice în condițiile hiperpirexie II.1.2. Andocarea NAP și ASA-NAP la structura tubulinei. Dinamica moleculară a NAP și NAPPY în prezența ionului de Zn^{2+} II.1.3. Estimarea proprietăților farmacologice ale peptidelor cu potențial de împiedicare a formării conformației β -pliate	59 60 62

II.1.4.	Proiecția bioactivității peptidelor cu potențial de împiedicare a formării conformației β -pliate.....	64
II.1.5.	Protocolul de investigare a interacțiunii structurale dintre compuși cu potențial de împiedicare a formării conformației β -pliate și peptidele amiloidice.....	65
II.1.6.	Materiale, reactivi și solvenți	66
II.1.7.	Sinteza peptidelor în fază solidă	67
II.1.8.	Purificarea peptidelor.....	70
II.1.9.	Spectrometria de masă de tip MALDI-TOF	72
II.1.10.	Dicroism circular teoretic.....	73
II.1.11.	Interacțiuni structurale peptidă-peptidă.....	73
II.1.12.	Studii spectrofotometrice	74
II.1.13.	Dispersia dinamică a luminii	76
II.1.14.	Microscopia de forță atomică	77
II.1.15.	Microscopia de scanare electronică	78
II.1.16.	Programe de editare și prelucrare	78
II.2.	Studiul computațional al interacțiunii ionilor metalici cu structura peptidei amiloidice în condițiile hiperpirexiei: Implicații pentru boala Alzheimer	79
II.2.1.	Potențialul de legare al ionilor metalici	81
II.2.2.	Analiza structurală și conformațională.....	86
II.2.3.	Analiza Ramachandran	93
II.2.4.	Concluzii	95
II.3.	Interacțiunea între NAP și ASA-NAP cu tubulina. O abordare teoretică	97
II.3.1.	Andocarea moleculară.....	99
II.3.2.	Dicroism circular teoretic.....	112
II.3.3.	Concluzii	114
II.4.	Dinamica moleculară a complexului NAP/NAPY-Zn ²⁺	115
II.4.1.	Complexarea ion metalic-peptidă	117
II.4.2.	Concluzii	125
II.5.	Proiectarea inhibitorilor de natură peptidică cu potențial de împiedicare a formării conformației β -pliate în cascada amiloidă	127
II.5.1.	Analiza proprietăților farmacologice	129
II.5.2.	Proiectarea bioactivității.....	133
II.5.3.	Interacțiuni structurale și studii de andocare moleculară	136

II.5.4.	Sinteza peptidelor în fază solidă.....	141
II.5.5.	Cromatografia de lichide de înaltă performanță în fază inversă.....	141
II.5.6.	Spectrometria de masă de tip MALDI-TOF/TOF	145
II.5.7.	Dicroism circular teoretic.....	149
II.5.8.	Concluzii	150
II.6.	Sinteza și caracterizarea unei peptide cu proprietăți de auto-asamblare	153
II.6.1.	Studii teoretice.....	156
II.6.2.	Sinteza peptidei FRS.....	162
II.6.3.	Cromatografia de lichide de înaltă performanță în fază inversă.....	162
II.6.4.	Spectrometria de masă	165
II.6.5.	Studii spectrofotometrice	167
II.6.6.	Investigații prin dispersia dinamică a luminii.....	176
II.6.7.	Microscopia de forță atomică	182
II.6.8.	Microscopia de scanare electronică	184
II.6.9.	Concluzii	187
CONCLUZII GENERALE		188
BIBLIOGRAFIE.....		194
ANEXE		244
1.	Permisuni	244
2.	Date brute.....	271
3.	Lucrări științifice publicate <i>in extenso</i>	291
LISTA ABREVIERILOR		377
LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE		382
LISTA DE LUCRĂRI PREZENTATE LA MANIFESTĂRILE ȘTIINȚIFICE		384
CV – COSMIN ȘTEFAN MOCANU.....		386

INTRODUCERE

Boala Alzheimer (AD – *din engleză*: Alzheimer Disease) reprezintă o afecțiune neurodegenerativă răspândită ce provoacă tulburări cognitive amnestice în forma sa arhetipală și tulburări cognitive non-amnestice în cazurile sale mai puțin răspândite.¹ Totodată, AD generează atrofie neuronală și poate produce întreruperi a conexiunilor inter-neuronale.² Se estimează că până în anul 2050, aproximativ 107 milioane de oameni vor fi afectați de această tulburare în întreaga lume.³ Mai mult decât atât, AD este o patologie incurabilă ce pune viața în pericol și în plus, impune un cost socioeconomic semnificativ datorită naturii sale multifactoriale.⁴

Astfel, una dintre cele mai dificile sarcini în cercetarea AD este crearea unui registru concret de dovezi științifice cu privire la această tulburare, pentru o clarificare coerentă și credibilă a întregului proces patogen.⁵ În acest context, eforturile terapeutice sunt îndreptate spre descoperirea unor ținte moleculare ce pot modifica semnificativ parcursul clinic al persoanelor afectate de boala Alzheimer.¹

Printre teoriile existente ce caracterizează apariția și evoluția AD, ipoteza amiloidă a fost investigată cu prioritate datorită implicării diferitelor tipuri de peptide amiloid-beta ($A\beta$) în afectarea funcției neuronale și cognitive.⁴ Prezența unor acumulări extracelulare amiloide sub formă de plăci senile, dar și acumularea intracelulară de proteină tau hiperfosforilată sub forma neurofilamentelor, continuă să reprezinte principalul criteriu neuropatologic pentru diagnosticul acestei afecțiuni.⁶

Mai mult decât atât, în detrimentul unui număr mare de studii, mecanismele ce stau la baza inhibării procesului de formare a conformației β -pliate a peptidelor $A\beta$ rămân necunoscute. Astfel, prevenirea formării și îndepărtarea agregatelor $A\beta$ existente, ce reprezintă totodată și precursori ai fibrilelor amiloidice, rămâne o sarcină complexă în dezvoltarea unei strategii terapeutice anti-AD.⁷

De asemenea, interacțiunea peptidelor A β cu ioni metalici, precum cei de cupru, zinc, fier, mangan sau nichel, s-a dovedit a fi un factor important ce contribuie la deteriorarea neuronală.⁸⁻¹⁰ Drept urmare, este important să se înțeleagă și fenomenele ce stau la baza interacțiunii dintre ionii metalici și peptidele A β , deoarece acestea pot oferi informații prețioase cu privire la modurile prin care se poate aborda în diverse cercetări acest proces neurodegenerativ.

Mai mult decât atât, factorii de risc implicați în procesele de agregare a peptidelor A β în structurile cerebrale cu AD pot cuprinde și hiperpirexia, o creștere a temperaturii corpului de peste 41,0 °C. În consecință, o amplificare a valorii presiunii intracraniene datorită hipoxiei determinată de o insuficiență respiratorie, ar putea conduce la creșterea randamentului proceselor de formare a fibrilelor A β din creier.¹¹

Totodată, eforturile de descoperire a unor medicamente eficiente în boala Alzheimer se confruntă cu un set unic de obstacole specifice AD.¹² Astfel, în prezent, ciclul alterat biochimic al peptidelor A β reprezintă o caracteristică biologică majoră a patologiei AD și o posibilă țintă în terapia acestei boli.¹³ Ca urmare a progreselor biotehnologiei, în prezent sunt produse comercial o gamă largă de medicamente ce dețin drept substanță activă, peptide. De exemplu, acest tip de medicament-concept poate interveni în reducerea morbidității determinate de chimioterapia convențională.¹⁴

În ultimele decenii cercetările au avut drept scop investigarea, dezvoltarea și evaluarea unor compuși cu acțiune neuroprotectoare, însă a existat o lipsă în ceea ce privește platformele ce eliberează și distribuie compusul terapeutic în organism. Cu toate acestea, sunt studii care atestă faptul că eliberarea controlată a compușilor activ terapeuticii poate fi realizată și prin intermediul gelurilor ce prezintă structuri moleculare cu o capacitate înaltă de auto-asamblare.^{15,16} Astfel, peptidele ce posedă proprietăți de auto-asamblare au fost raportate pe scară largă în literatura științifică.

Prin urmare, este necesar ca studii din diverse arii ale chimiei să investigheze structurile moleculare, proteomice și celulare, din spectrul bolilor neurodegenerative pentru a oferi o privire de ansamblu asupra etiologiei și

patologiei acestor afecțiuni, dar și soluții asociate cu ameliorarea manifestărilor clinice. Astfel, prezenta teză de doctorat s-a îndreptat spre studiul arhitecturii proteomice ce stă la baza bolii Alzheimer, plecând de la sinteza unor peptide cu acțiune neuroprotectoare sub incidența unor diverse investigații de identificare a traseelor moleculare ce trebuie abordate în eficientizarea procesului terapeutic.

Mai mult decât atât, caracterul inter și transdisciplinar a coalizat diverse domenii ale chimiei, precum biochimia în studiul efectelor terapeutice ale peptidelor, chimia organică în sinteza peptidelor în fază solidă, chimia anorganică în investigarea interacțiunii ionilor metalici față de peptidele A β , chimia analitică în purificarea și studiul spectrofotometric al peptidelor, chimia teoretică în studiile computaționale, dar și chimia materialelor în investigarea unei peptide cu potențial de auto-asamblare. Totodată, metodele de cercetare au fost abordate astfel încât să fie generat cu cadru cât mai extins referitor la complexitatea informațiilor obținute, asociind datele experimentale cu cele teoretice.

Prin urmare, obiectivele principale ale acestei teze de doctorat s-au axat pe ipotezele și ideile de cercetare anterior menționate, referitoare la caracterul patologic și terapeutic al AD, acestea fiind următoarele:

- ✚ Studiul computațional al interacțiunii dintre diferiți ioni metalici, precum Cu⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Ni²⁺ și Zn²⁺ cu structura monomerului A β ₍₁₋₄₂₎, dar și cu fibrilele acestuia în condițiile hiperpirexie, pentru identificarea modelului prin care acești ioni pot influența neuropatologia AD.
- ✚ Abordarea teoretică a interacțiunii dintre structura cristalografică a tubulinei și peptida neuroprotectoare NAP (H₂N-¹NAPVSIPQ⁸-COOH) conjugată cu acidul acetilsalicilic (ASA – *din engleză*: Acetylsalicylic Acid).
- ✚ Investigarea interacțiunii dintre ionul de Zn²⁺ și peptida NAP, respectiv NAPY (H₂N-¹NAPVYIPQ⁸-COOH) prin dinamică moleculară.
- ✚ Studii teoretice ale impactului unor inhibitori de natură peptidică asupra conformației β -pliate în cascada amiloidă.
- ✚ Sinteza, purificarea și caracterizarea unor inhibitori de natură peptidică prin sinteza peptidelor în fază solidă (SPPS – *din engleză*: Solid Phase Peptide Synthesis), urmată de cromatografia de lichide de înaltă performanță în fază

inversă (RP-HPLC – *din engleză*: Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography) și de spectrometria de masă cu desorbție/ionizare asistată de o matrice (MALDI-TOF MS – *din engleză*: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry).

- ✚ Sinteza și caracterizarea peptidei FRS ($\text{H}_2\text{N-FRSAPFIE-CONH}_2$) pentru investigarea potențialului de auto-asamblare prin studii teoretice, SPPS, RP-HPLC, spectrofotometrie (UV-Viz, fluorescență), microscopie de forță atomică (AFM – *din engleză*: Atomic Force Microscopy), microscopie de scanare electronică (SEM – *din engleză*: Scanning Electron Microscopy) și prin dispersia dinamică a luminii (DLS – *din engleză*: Dynamic Light Scattering).
- ✚ Implementarea caracterului trans și interdisciplinar în investigațiile efectuate.
- ✚ Diseminarea rezultatelor obținute în jurnale internaționale cu factor de impact, dar și în conferințe internaționale.

Teza, constituită din două părți, oferă inițial o perspectivă generală în ceea ce privește spectrul AD, dar și o abordare critică asupra literaturii ce definește conceptele utilizate în abordările experimentale. Partea teoretică alcătuită din 5 capitole, caracterizează noțiunile fundamentale prezente în patologia Alzheimer, aspecte specifice alte procesului de sinteză a peptidelor în fază solidă, metode distincte de purificare și caracterizare ale acestora, precum RP-HPLC, MALDI-TOF, UV-Viz, fluorescența, AFM, SEM și DLS, dar și fundamentele computaționale utilizate.

Contribuțiile personale indică modul prin care obiectivele principale ale tezei au fost atinse, fiind constituite din 6 capitole. Prin urmare, a fost realizat un studiu teoretic al interacțiunii dintre ionii metalici precum Cu^+ , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} și Zn^{2+} cu structurile cristalografice obținute din Protein Data Bank ale monomerului $\text{A}\beta_{(1-42)}$, dar și cu fibrilele acestuia în condiții hiperpiretice, pentru identificarea modelului prin care acești ioni pot influența structurile amiloidice în neuropatologia AD. De asemenea, s-a investigat teoretic interacțiunea dintre structura cristalografică a tubulinei obținută din Protein Data Bank și peptida neuroprotectoare NAP conjugată cu acidul acetilsalicilic, dar și

interacțiunea dintre ionul de Zn^{2+} și peptidele NAP și NAPY în condiții de dinamică moleculară. Mai mult decât atât, s-a realizat designul și caracterizarea unor inhibitori de natură peptidică cu privire la capacitatea acestora de a împiedica formarea conformației β -pliate în cascada amiloidă prin studii teoretice și experimentale. Totodată, s-a concretizat sinteza și caracterizarea peptidei FRS în ceea ce privește potențialul acesteia de a se auto-asambla și de a forma structuri supramoleculare, ce pot fi valorificate în investigații ulterioare pentru conceperea unor platforme de eliberare a compușilor terapeutici.

În consecință, cumulara tuturor rezultate obținute în urma acestor studii poate oferi o imagine de ansamblu asupra influenței unor peptide active din punct de vedere fiziologic, precum agregare, dezagregare, neuroprotector sau neurodegenerativ, asupra structurilor prezente în țesutul cerebral.

Prezenta teză de doctorat intitulată „Investigații teoretice și experimentale ale unor peptide implicate în biochimia bolii Alzheimer” conține 394 pagini, cu un total de 77 figuri, 13 tabele și 454 referințe bibliografice. Totodată, rezultatele prezentate în această teză de doctorat au fost valorificate prin publicarea a 5 articole științifice în jurnale indexate Web of Science, cumulând în momentul publicării un factor total de impact de 21,041.¹⁷⁻²¹ Mai mult decât atât, rezultatele obținute au fost diseminate în cadrul a 5 conferințe internaționale sub formă de 2 prezentări orale și sub formă de 5 postere.

Totodată, considerând faptul că în urma publicării lucrărilor științifice de către autorul tezei, jurnalele dețin toate drepturile asupra datelor prezentate conform reglementărilor internaționale (drepturile Copyright), a fost obținute în plus permisiunile de reutilizare a datelor în cadrul prezentei teze de doctorat, pentru a se evita eventualele conflicte de interes cu specialiștii.

În finalul tezei de doctorat au loc prezentarea concluziilor generale, a bibliografiei aferente, a anexelor, a listei cu abrevierile utilizate, a listei de lucrări publicate și diseminate, dar și CV-ul autorului.

CONTRIBUȚII PERSONALE

II.2. Studiul computațional al interacțiunii ionilor metalici cu structura peptidei amiloidice în condițiile hiperpirexiei: Implicații pentru boala Alzheimer

În acest studiu s-a recurs la o analiză comparativă teoretică cu scopul de a investiga modificările structurale ale monomerului $A\beta_{(1-42)}$ și a fibrilelor generate de $A\beta_{(1-42)}$ în prezența diferiților ioni metalici, cum ar fi Cu^+ , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} sau Zn^{2+} . Analiza s-a bazat pe diferențele conformaționale dintre aceste specii moleculare, în condiții fiziologice normale la 37,0 °C și 11 mmHg, și în condiții simptomatice specifice hiperpirexiei (până la 41,0 °C și 20 mmHg).²² Inițial, s-a studiat legarea celor nouă ioni metalici la structura peptidei $A\beta_{(1-42)}$ și la structura fibrilară a acesteia ($A\beta_{(1-42)}F$). Atât monomerul cât și fibrilele au fost preluate din baza de date PDB sub forma unor structuri validate.^{23,24} Ulterior, complexul peptidă-ion metalic a fost analizat utilizând metoda fragmentării descrisă în *Capitolul II.1.1*. În consecință, potențialul de legare al acestor ioni în funcție de structura și de scorul de legare al fiecărui lanț $A\beta$ în parte, poate fi observat în Figura II.2.1.

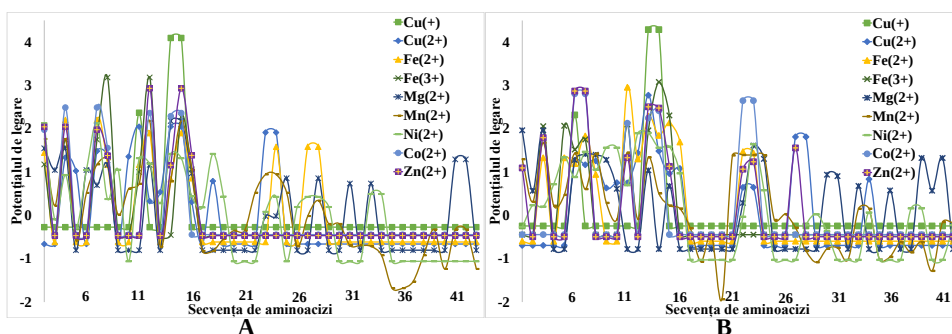


Figura II.2.1. Potențialul de legare al ionilor metalici implicați în procesele de complexare cu peptida $A\beta$, unde: **(A)** $A\beta_{(1-42)}$ și **(B)** $A\beta_{(1-42)}F$ Lanțul 1.

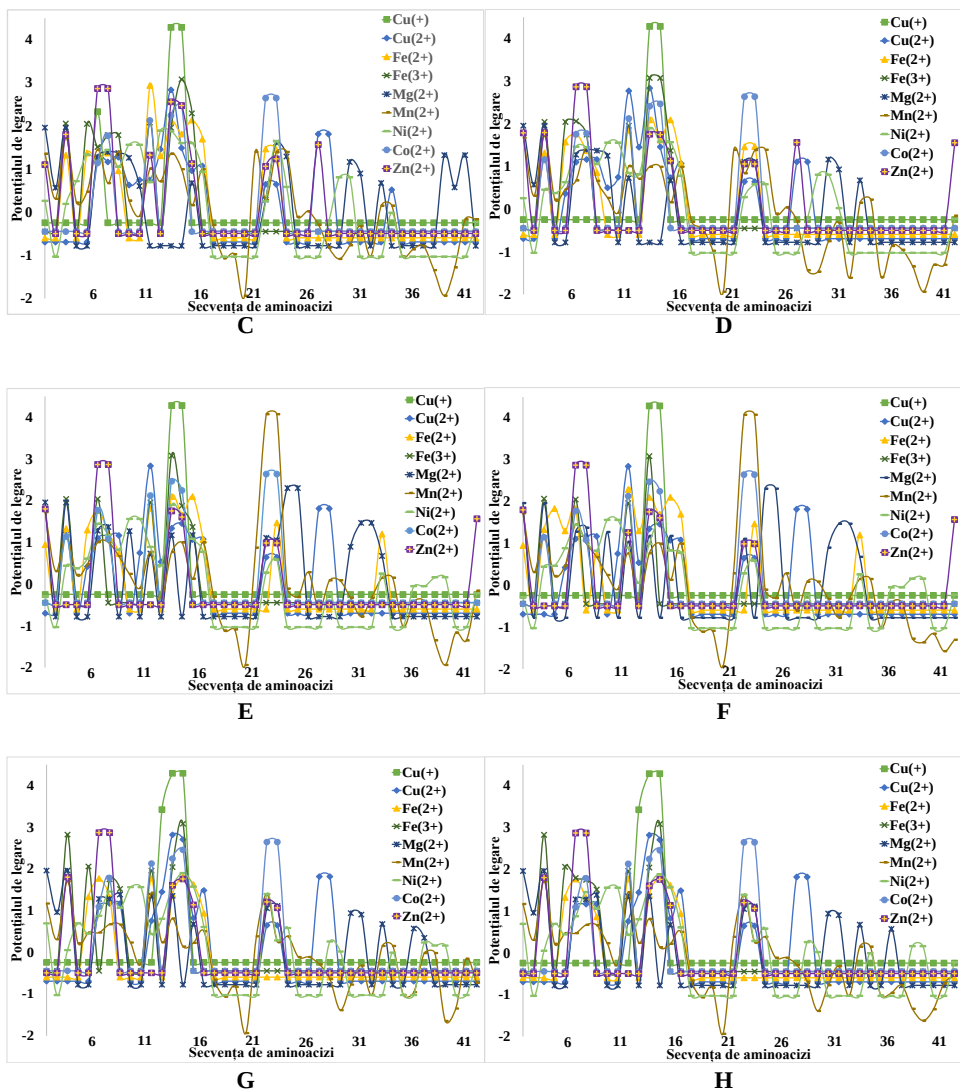


Figura II.2.1. (cont.) Potențialul de legare al ionilor metalici implicați în procesele de complexare cu peptida Aβ, unde: (C) Aβ₍₁₋₄₂₎F Lanțul 2, (D) Aβ₍₁₋₄₂₎F Lanțul 3, (E) Aβ₍₁₋₄₂₎F Lanțul 4, (F) Aβ₍₁₋₄₂₎F Lanțul 5, (G) Aβ₍₁₋₄₂₎F Lanțul 6 și (H) Aβ₍₁₋₄₂₎F Lanțul 7.

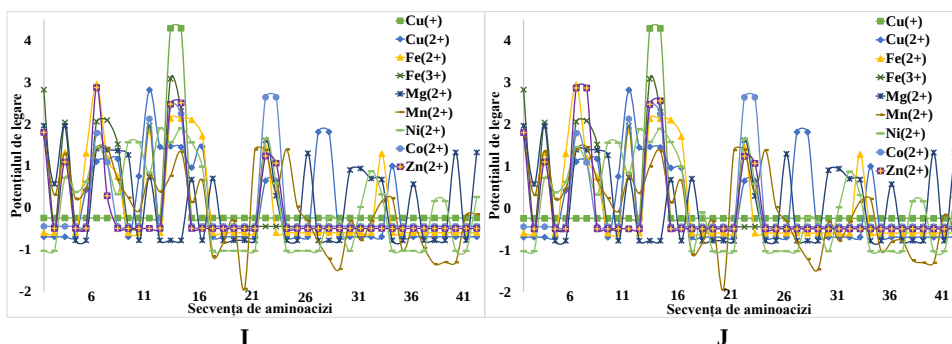


Figura II.2.1. (cont.) Potențialul de legare al ionilor metalici implicați în procesele de complexare cu peptida Aβ, unde: **(I)** Aβ₍₁₋₄₂₎F Lanțul 8 și **(J)** Aβ₍₁₋₄₂₎F Lanțul 9.

În cazul monomerului potențialul de legare este exprimat predominant în secvența 1–16, în timp ce în restul structurii acest indice tinde să fie mult mai redus. Acest aspect este influențat cel mai probabil de prezența aminoacizilor specifici, precum His, Ser sau Asp la capătul N-terminal al monomerului Aβ, ce conțin atomi de azot sau oxigen cu un rol de donatori de electroni în interacțiunile ligand (peptidă)-ion metalic. Pe de altă parte, în cazul Aβ₍₁₋₄₂₎F s-a observat faptul că potențialul de legare al ionilor metalici crește și în zona 17–42, ceea ce sugerează că în comparație cu monomerul Aβ, ionii metalici tind să se lege de întreaga structură a fibrilelor. Această proprietate este datorată cel mai probabil ca urmare a stabilității și suprafeței structurale a Aβ₍₁₋₄₂₎F. O explicație alternativă implică inhibarea structurii α-elicoidale în Aβ₍₁₋₄₂₎F în detrimentul conformației β-pliată și ghem statistic, structura α-elicoidală deținând rolul de a împiedica formarea legăturilor de hidrogen intermoleculare și în consecință, interacțiunile ion-metalic-aminoacid.

Prin urmare, analizând aceste diferențe, s-a selectat ionul de Cu⁺ în investigațiile ulterioare privind influențele termice și osmotice deoarece acesta oferă cel mai constant potențial de legare atât în ceea ce privește structura Aβ₍₁₋₄₂₎, cât și în cazul Aβ₍₁₋₄₂₎F.

Ulterior, s-a recurs la analiza structurală și conformațională. Scopul acestor investigații a fost de a studia inițial complexul Aβ₍₁₋₄₂₎-Cu⁺ utilizând protocolul de modelare moleculară descris în *Capitolul II.1.1.* pentru a analiza

influența ionului metalic asupra structurii peptidei în condițiile dinamice impuse și implicit, în hiperpirexie.

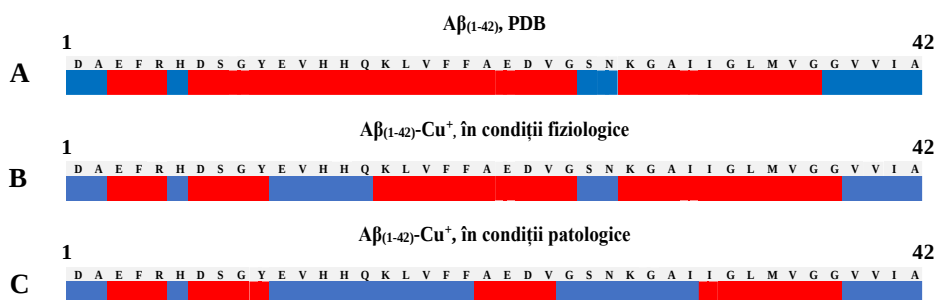


Figura II.2.4. (A) Structura monomerului Aβ₍₁₋₄₂₎. **(B)** Complexul Aβ₍₁₋₄₂₎-Cu⁺ condiționat de parametrii dinamici la 37 °C și 11 mmHg. **(C)** Complexul Aβ₍₁₋₄₂₎-Cu⁺ condiționat de parametrii dinamici la 41 °C și 20 mmHg. Cu roșu este reprezentată structura de tip α-elicoidală, iar cu albastru este reprezentată conformația incipientă de tip ghem statistic, cu progresie către cea de β-pliată.

În cazul stării fiziologice normale sub efectul ionului de cupru, este inhibată structura de tip α-elicoidală în detrimentul conformației ghem statistic în ceea ce privește secvența Glu¹¹-Gln¹⁵, iar în stare febrilă același fenomen se regăsește în cazul fragmentelor Glu¹¹-Phe²⁰ și Gly²⁵-Ile³¹. În consecință, conform literaturii științifice, conformația ghem statistic și implicit β-pliată intensifică procesele de agregare prin promovarea formării de noi legături de hidrogen intermoleculare și intramoleculare.²⁵ Acest aspect sugerează că o temperatură corporală crescută, dar și o presiune intracraniană ridicată, accelerează fenomenele de agregare a peptidelor amiloidice la nivel cortical, cu consecințe directe asupra morfologiei fiziopatologice în AD.

Ulterior, legarea ionul de Cu⁺ și influența sa asupra fibrilelor de Aβ au fost analizate în aceleași condiții. În cazul monomerului Aβ₍₁₋₄₂₎ alterările au fost identificate în conformația structurii prin inhibarea α-elicoidală în detrimentul celei de ghem statistic, în timp ce în cazul fibrilelor, modificările observate au fost corelate cu lipsa conformației α-elicoidale în structura acestora. Totodată, variații notabile au fost observate în funcție de centrii de legare și de interacțiunile dintre ionul de Cu⁺ și atomul aminoacidului corespunzător. Prin urmare, aminoacidul

implicat cel mai adesea în procesele de legare a ionului metalic a fost His(N) prin intermediul atomului de azot, urmat de Tyr, His(O) prin intermediul atomului de oxigen și Val. Din analiza acestor valori pentru distanțele dintre ionul de cupru și atomul de coordinare, Tyr și Val tind să se disocieze de Cu^+ la temperaturi și presiuni mai ridicate, în timp ce His(N), His(O), Glu și Gln măresc capacitatea de coordinare a ionului către $\text{A}\beta_{(1-42)}\text{F}$.

O mai bună înțelegere a conformațiilor peptidelor $\text{A}\beta$ poate fi realizată prin analiza unghiurilor Psi și Phi, utilizând astfel graficul Ramachandran. După aplicarea condițiilor dinamice, nu s-au observat diferențe structurale notabile în cazul $\text{A}\beta_{(1-42)}$ atât în condiții fiziologice, cât și în condiții febrile. Cu toate acestea, s-a observat o dispersie mai mare a valorilor unghiului în cadranul stânga superior specific conformației paralel β -pliată. În cazul structurii $\text{A}\beta_{(1-42)}\text{F}$, au fost observate aceleași caracteristici în zona β -pliată în ambele circumstanțe dinamice. Pe de altă parte, o diferență semnificativă a fost observată în cadranul stânga inferior (zona dreaptă α -elicoidală orientată spre dreapta). Astfel, în urma aplicării condițiilor dinamice, în cazul unei temperaturi și a unei presiuni mai ridicate, valorile unghiului devin mai dispersate sugerând o potențare a structurii ghem statistic.

II.3. Interacțiunea între NAP și ASA-NAP cu tubulina. O abordare teoretică

În acest studiu s-a analizat andocarea NAP și ASA-NAP la centrul activ de legare a tubulinei pentru a obține informații cu privire la modificarea traseelor moleculare după cuplarea ASA la NAP. Noutatea acestor investigații unește avantajele studiilor teoretice, cu scopul de a aduce îmbunătățiri asupra structurii și biocompatibilității medicamentelor pe bază de peptide, precum ASA-NAP, îmbunătățind în cele din urmă schemele terapeutice în cazul bolii Alzheimer.

Prin urmare, a fost investigată legarea acestor doi compușilor peptidici la centrul de legare a tubulinei (Protein Data Bank: 1FFX) cu diverse tehnici de modelare moleculară.²⁶ Așadar, instrumentul de calcul *SwissDock* a fost aplicat pentru andocarea structurilor NAP și ASA-NAP la centrul de legare a paclitaxolului (Protein Data Bank: 1JFF).²⁷ Structurile cristalografice ale tubulinei și a subunităților corespunzătoare (α și β) au fost preluate din baza de date Protein Data Bank. Astfel, se oferă o andocare exactă a compușilor potențial terapeutici (NAP și ASA-NAP), prin utilizarea unor structuri confirmate și certificate. Ulterior, programul *SwissDock* a fost utilizat pentru andocarea compușilor NAP și ASA-NAP la structura rafinată a centrului de legare al tubulinei. Mai mult decât atât, o suprafață de interacțiune van der Waals a fost de asemenea utilizată pentru a analiza modul de legare a compusului peptidic la structura proteinei.

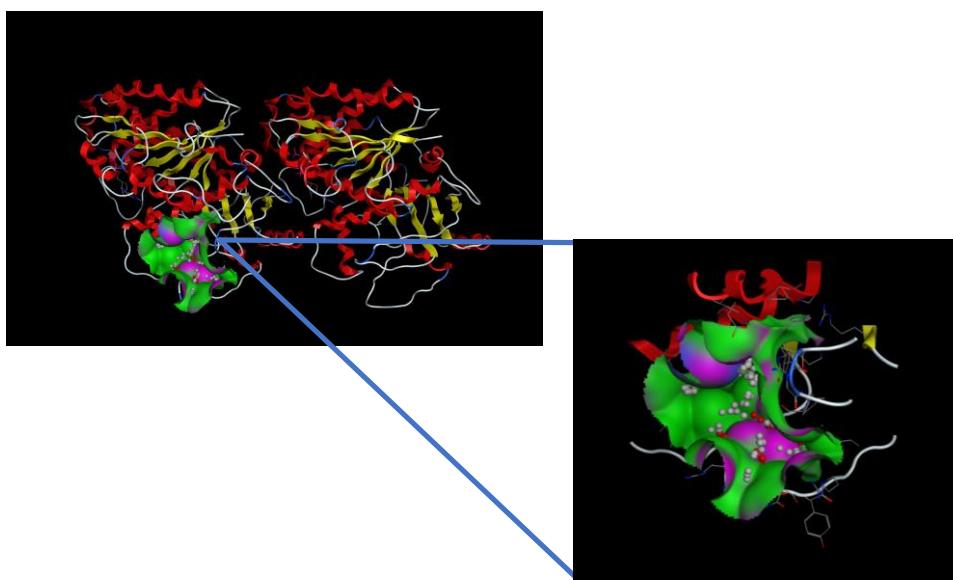


Figura II.3.2. Suprafața de interacțiune van der Waals a centrului activ 1 al structurii $\alpha\beta$ tubulinei în cazul andocării NAP, unde cu roz este reprezentată zona bogată în legături de hidrogen, cu verde zona hidrofobă, iar cu albastru zona polară.

Astfel, modul de interacțiune al peptidei cu centrul de reacție a fost predominant de interacțiuni hidrofobe care au surclasat legăturile de hidrogen (Figura II.3.2.) în cazul complexului investigat. Pentru a analiza dacă și conjugatul peptidei, ASA-NAP, utilizează un model de andocare similar, au fost utilizate

aceleași tehnici de modelare menționate anterior. Cea mai notabilă diferență dintre modul de legarea a NAP și a ASA-NAP de heterodimerul $\alpha\beta$ al tubulinei a constat în specificitatea centrului. Structura NAP se leagă de centrul caracteristic al paclitaxolului, în timp ce ASA-NAP deține specificitate pentru un alt centru activ, centrul nr. 4. Mai mult decât atât, suprafața de interacțiune dintre centrul nr. 4 cu ASA-NAP este prezentată în Figura II.3.5.

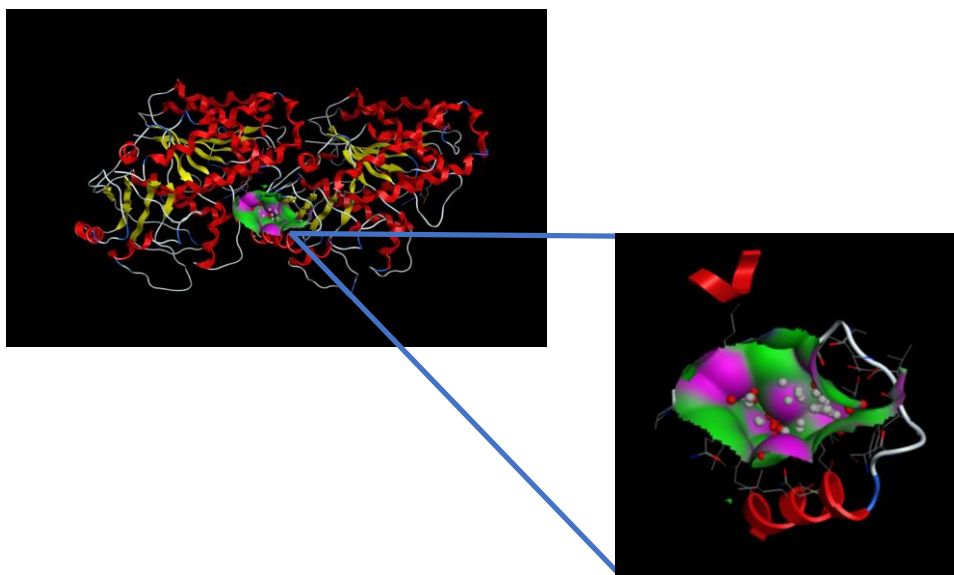


Figura II.3.5. Suprafața de interacțiune van der Waals a centrului activ 4 al structurii $\alpha\beta$ tubulinei în cazul andocării ASA-NAP, unde cu roz este reprezentată zona bogată în legături de hidrogen, cu verde zona hidrofobă, iar cu albastru zona polară.

Diferențele hidrospecificității sugerează că ASA-NAP are o tendință de legare pentru centrii mai hidrofilii. Prin urmare, datele teoretice obținute indică faptul că atât peptida NAP cât și conjugatul ASA-NAP, pot coexista într-un sistem și nu se înlocuiesc reciproc după cum se poate întâmpla în cazul paclitaxolului-NAP. În plus, efectul acestor doi compuși peptidici poate fi cumulat, îmbunătățind astfel acțiunea neuroprotectoare. În consecință, este posibil ca aceste molecule să se lege simultan de heterodimerul $\alpha\beta$ al tubulinei datorită prezenței unui centru diferit pentru ASA-NAP și astfel, efectul benefic să fie unul superior.

Totodată, un studiu publicat în anul 2017 a demonstrat că NAP poate interacționa și influența stabilitatea tubulinei prin intermediul unor proteine

specifice, precum EB1, EB3 (*din engleză*: End-Binding protein) sau tau. Prin urmare, s-a evidențiat că EB1 și EB3 reprezintă ținte ale interacțiunii cu ADNP sau NAP prin intermediul centrului de legare ⁵SIP⁷ a acestora, octapeptida deținând rol de a îmbunătăți interacțiunea dintre ADNP și EB3.²⁸ Astfel, capătul C-terminal al proteinelor EB se leagă direct de microtubuli și de proteina tau. În plus, intoxicația cu ioni de Zn²⁺ crește generarea de oligomeri tau solubili generați în urma procesului de detașare de MT. Cu toate acestea, NAP în corespondență cu ionii de zinc accelerează procesele de interacțiune a proteinelor EB cu tau și în cele din urmă, se restabilizează microtubulii prin adăugarea proteinelor EB și tau la MT.

Plecând de la aceste date, s-a analizat influența NAP și ASA-NAP asupra centrilor activi ale proteinei EB pentru a investiga modul de acțiune și totodată, dacă viabilitatea conjugatului nou sintetizat prezintă aceleași caracteristici precum cele menționate în prima etapă al studiului. Utilizând același protocol, s-a studiat andocarea celor doi compuși, NAP și ASA-NAP, la structura EB obținută din baza de date PDB (3TQ7), iar ulterior s-au determinat centrii activi ale acestuia.²⁹ Dat fiind faptul că molecula de EB este mult mai mică decât unitatea de tubulină, s-a obținut un număr mai redus de centrii activi, majoritatea situându-se în partea inferioară a structurii proteinei. Acest aspect poate fi datorat unei distribuții mai mari a configurației α -elicooidale, ce poate juca un rol de stabilizator sau cluster pentru compusul farmacologic.

Ulterior, s-a utilizat din nou programul *SwissDock* pentru andocarea compușilor NAP și ASA-NAP la structura EB, cu scopul de a investiga modificările conformaționale aduse proteinei. Astfel, peptida NAP s-a legat la proteina EB prin intermediul centrului activ nr. 1. Această interacțiune a avut loc prin intervenția fragmentului ⁵SIP⁷ al peptidei, ce a generat legături intermoleculare cu aminoacizii centrului respectiv. Totodată, s-a putut identifica faptul că interacțiunea dintre NAP cu EB nu este totală, ci parțială. Acest aspect implică ideea conform căreia peptida nu interacționează puternic cu proteina EB și prin urmare, pot interveni repercusiuni în demersul terapeutic. În ceea ce privește ASA-NAP cu EB, centrul activ ce intermediază această interacțiune a fost identificat ca fiind nr. 2. Astfel, s-a observat că de această dată, derivatul peptidic

ASA-NAP tinde să interacționeze cu o porțiune mai extinsă din structura acesteia cu proteina EB, și anume prin fragmentul ASA-¹NAPVSI⁶. Această caracteristică poate fi explicată prin natura hidrofobă a conjugatului.

Ulterior, pentru a investiga conformația proteinei EB în cele două interacțiuni, s-a recurs la analiza graficului Ramachandran. Drept urmare, conformația proteinei rămâne similară în urma cuplării ASA la NAP. Această particularitate indică faptul că structura hidrofobă nu destabilizează și nu perturbă structura proteinei. Mai mult decât atât, au fost identificate lipsa a doar două unghiuri Psi/Phi în zona caracteristică structurii anti-paralel β -pliată din cadrul interacțiunii ASA-NAP-EB din cadranul superior stânga. În consecință, acest aspect sugerează că există o stabilizare a elementelor α -elicoidale.

Astfel, conform acestor date preliminare, conjugatul peptidic poate parcurge același set de pași, precum NAP, prin implicarea directă în interacțiunea cu unitatea de tubulină după cum a fost demonstrat în cazul paclitaxolului ori indirect, prin implicarea proteinelor EB sau tau.

II.4. Dinamica moleculară a complexului NAP/NAPY-Zn²⁺

Prezentul experiment s-a concentrat în principal pe rolul grupărilor hidroxil, alcoolice și fenolice în chelarea ionilor de Zn²⁺. Este bine cunoscut faptul că fenolii posedă un caracter acid mai mare decât alcoolii deoarece sarcina negativă a ionului fenoxid nu este localizată pe atomul de oxigen, așa cum este într-un ion alcoxid, ci distribuită de întregul inel benzenic. Drept consecință, hidroxilul fenolic al tirozinei este mai capabil să piardă protoni și să coordoneze ionul metalic prin donorii de oxigen, față de hidroxilul alifatic al serinei.³⁰

Pentru a dezvolta și confirma interacțiunea ionilor de zinc cu secvența peptidei NAP și NAPY, s-a recurs la o serie de abordări teoretice. În primul rând, s-a aplicat așa-numita aliniere flexibilă folosind programul *MOE 2016.02* pentru a găsi modelul de coordonare al ionului de Zn²⁺ la nivelul structurilor NAP și NAPY.

Astfel, conform simulării prezentate în această lucrare, ionul metalic se leagă de NAP prin intermediul aminoacizilor Asn¹ sau Gln⁸, situați la capătul C-terminal sau N-terminal al peptidei (Figura II.4.1.A și B). Cu toate acestea, reprezentările sugerează faptul că interacțiunea dintre ionul de Zn²⁺ și NAP nu este bine definită, precum în cazul complexului NAPY-Zn²⁺ (Figura II.4.1.C).

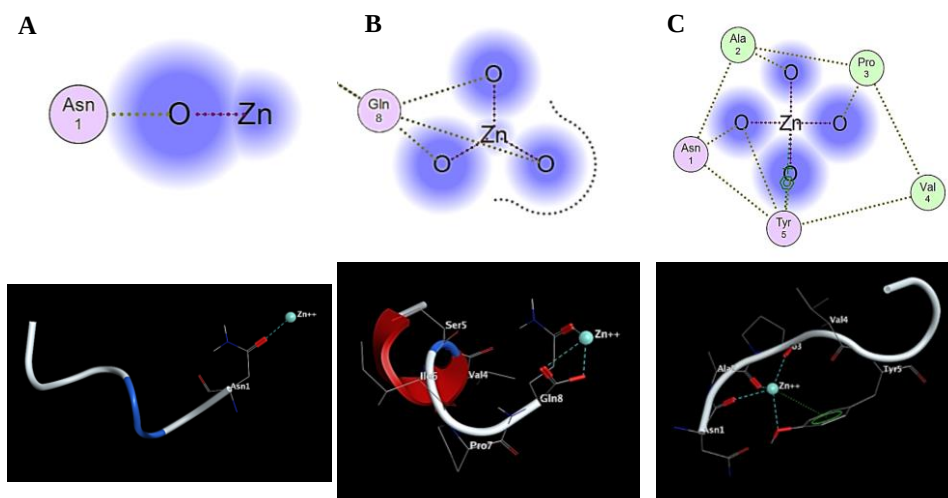


Figura II.4.1. Interacțiunile dintre ionul de Zn²⁺ cu structura peptidei (A și B) NAP și (C) NAPY.

În plus, s-a observat faptul că ionii de zinc se leagă puternic la structura peptidei NAPY printr-un cluster format din aminoacizii Asn¹, Ala², Pro³, Val⁴ și Tyr⁵. Mai mult decât atât, pe lângă atomul de oxigen, Tyr⁵ pare să contribuie cu structura inelului benzenic prin interacțiunea de tip π -cation, acționând sub formă de stabilizator al complexului NAPY-Zn²⁺. Prin urmare, în acest caz, potențialul de legare dintre ionul de zinc și analogul cu tirozină devine mult mai puternic.

De asemenea, complexul NAP/NAPY-Zn²⁺ a fost supus analizei de dinamică moleculară (MD) pentru a investiga stabilitatea și interacțiunea de legare dintre ionul de zinc și atomul de coordonare al aminoacidului corespunzător în condiții termice (temperatura corporală), utilizând programul de modelare MOE 2016.02. Așadar, scopul acestei abordări a fost de a studia influenței temperaturii de 37 °C în ceea ce privește distanțele dintre ionul de Zn²⁺ și atomul implicat în

procesul de coordinare. Conform simulărilor MD, nu există nicio modificare majoră în ceea ce privește modelul de legare al peptidelor NAP sau NAPY la 25 °C și la 37 °C. În cazul peptidei NAPY, în condițiile impuse de 37 °C, s-a observat că Tyr joacă un rol important în complexarea ionului metalic. De asemenea, s-a observat că la 37 °C legătura de coordinare este mai puternică decât la 25 °C. Acest aspect sugerează faptul că în corpul uman, complexul NAPY-Zn²⁺ devine mai stabil. Mai mult decât atât, aceste reprezentări indică totodată că peptida deține o stabilitate puternică ce nu a influențat centrul de coordinare cu ionii de zinc.

II.5. Proiectarea inhibitorilor de natură peptidică cu potențial de împiedicare a formării conformației β -pliate în cascada amiloidă

În această lucrare au fost investigate 75 de peptide noi bazate pe secvența A β _(15–20) în ceea ce privește lipofilicitatea și biocompatibilitatea diferitelor administrări (ex. administrare intranazală). Astfel, s-a conceput un set de peptido-derivați cu diferiți acizi organici, combinații ce nu au fost raportate sau studiate până în prezent în literatura de specialitate.

Multe deficiențe în proiectarea medicamentelor pot fi atribuite farmacocineticii și biodisponibilității inadecvate. De asemenea, două caracteristici farmacocinetice ce trebuie estimate în diferite etape ale procesului de elaborare a medicamentului sunt absorbția gastrointestinală și accesul substanței active la creier. Prin urmare, metoda *BOILED-Egg*, utilizată pentru a urmări permeabilitatea estimată a creierului sau a intestinului, a fost utilizată pentru a investiga proprietățile farmacologice ale compușilor prezentați în Tabelul I.1.1.

Tabelul II.1.1. Proiectarea celor 75 de substanțe active bazate pe secvența (15–20) a peptidei A β , cu potențial de împiedicare a formării conformației de tip β -pliat a fibrilelor amiloide.

Cod		G ^{FO}	Cod		G ^{FO}	Cod		G ^{FO}	Cod		G ^{FO}	Cod		G ^{FO}
Peptida ↓			Peptida ↓			Peptida ↓			Peptida ↓			Peptida ↓		
1-1	1	1	2-1	2	1	3-1	3	1	4-1	4	1	5-1	5	1
1-2	1	2	2-2	2	2	3-2	3	2	4-2	4	2	5-2	5	2
1-3	1	3	2-3	2	3	3-3	3	3	4-3	4	3	5-3	5	3
1-4	1	4	2-4	2	4	3-4	3	4	4-4	4	4	5-4	5	4
1-5	1	5	2-5	2	5	3-5	3	5	4-5	4	5	5-5	5	5
1-6	1	6	2-6	2	6	3-6	3	6	4-6	4	6	5-6	5	6
1-7	1	7	2-7	2	7	3-7	3	7	4-7	4	7	5-7	5	7
1-8	1	8	2-8	2	8	3-8	3	8	4-8	4	8	5-8	5	8
1-9	1	9	2-9	2	9	3-9	3	9	4-9	4	9	5-9	5	9
1-10	1	10	2-10	2	10	3-10	3	10	4-10	4	10	5-10	5	10
1-11	1	11	2-11	2	11	3-11	3	11	4-11	4	11	5-11	5	11
1-12	1	12	2-12	2	12	3-12	3	12	4-12	4	12	5-12	5	12
1-13	1	13	2-13	2	13	3-13	3	13	4-13	4	13	5-13	5	13
1-14	1	14	2-14	2	14	3-14	3	14	4-14	4	14	5-14	5	14

unde, peptidele sunt: $^{15}\text{QKLVFF}^{20} - 1$, $^{16}\text{KLVFF}^{20} - 2$, $^{17}\text{LVFF}^{20} - 3$, $^{16}\text{KLVF}^{19} - 4$, $^{15}\text{QKLV}^{18} - 5$. Grupările funcționale organice (G^{FO}) ale acidului corespunzător utilizate pentru conjugare sunt numerotate după cum urmează: lauril – 1, hexanoil – 2, palmitoil – 3, octanoil – 4, decanoil – 5, stearoil – 6, 2-aminoetan-1-sulfonil – 7, 2-hidroxi-2-(4-hidroxi-3-metilfenil)acetil – 8, 4-(1H-indol-3-il)butanoil – 9, 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzoil – 10, 2-(naftalen-1-il)acetil – 11, piridin-3-carboxilil – 12, 2-hidroxibenzoil – 13 și 2-acetoxibenzoil – 14.

În investigarea proprietăților legate de administrarea peptidelor și a peptido-derivaților, s-a aplicat această abordare pentru fiecare compus conceput și prezentat în Tabelul I.1.1. Polaritatea și lipofilicitatea au fost luate în considerare cu scopul de a obține o histogramă de administrare eficientă a acestor compuși pentru corpul uman, indiferent de biocompatibilitatea intranasală, gastrointestinală sau BBB. În ceea ce privește polaritatea, histograma indică faptul că cea mai bună biocompatibilitate o dețin peptidele 3 ($^{17}\text{LVFF}^{20}$) și 4 ($^{16}\text{KLVF}^{19}$), în timp ce peptidele 1 ($^{15}\text{QKLVFF}^{20}$), 2 ($^{16}\text{KLVFF}^{20}$) și 5 ($^{15}\text{QKLV}^{18}$) prezintă cele mai mari valori ale tPSA/Å. În consecință, aceste diferențe notabile se pot datora proprietăților structurale. Astfel, $^{15}\text{QKLVFF}^{20}$ și $^{16}\text{KLVFF}^{20}$ fiind constituite din 6,

respectiv 5 aminoacizi, expun o suprafață moleculară mai mare, în timp ce tetrapeptida 5 ce deține glutamina, posedă o grupare amino suplimentară în comparație cu $^{17}\text{LVFF}^{20}$ și $^{16}\text{KLVF}^{19}$ și drept urmare, prezintă o polaritate ridicată. De asemenea, parametrul de lipofilicitate indică faptul că peptidele conjugate cu acidul palmitic și stearic dețin valori peste limită. Acest aspect ar putea sugera că acizii grași ce au un număr mai mare de atomi de carbon decât 16 în structură, nu sunt potriviți pentru conjugarea peptidelor în îndeplinirea acestui deziderat datorită faptului că dețin un grad de lipofilicitate extrem de ridicat și prin urmare, pot rămâne sechestrați în membranele neuronale sau gastrointestinale.

Ulterior, cele 75 de peptide și derivați ale acestora au fost supuse unei abordări teoretice alternative bazate pe 6 parametri fizico-chimici, și anume: lipofilicitate, insolubilitate, polaritate, masă moleculară, saturare și flexibilitate. Astfel, scopul principal în această investigație a fost de a examina respectivele proprietăți, pentru a obține informații cu privire la compatibilitatea biostructurală în vederea proiectării medicamentelor cu administrare orală. Drept urmare, acești parametri ai compușilor descriși în Tabelul I.1.1. sunt prezentați schematic sub formă de distribuție hexagonală în Figura II.5.3.

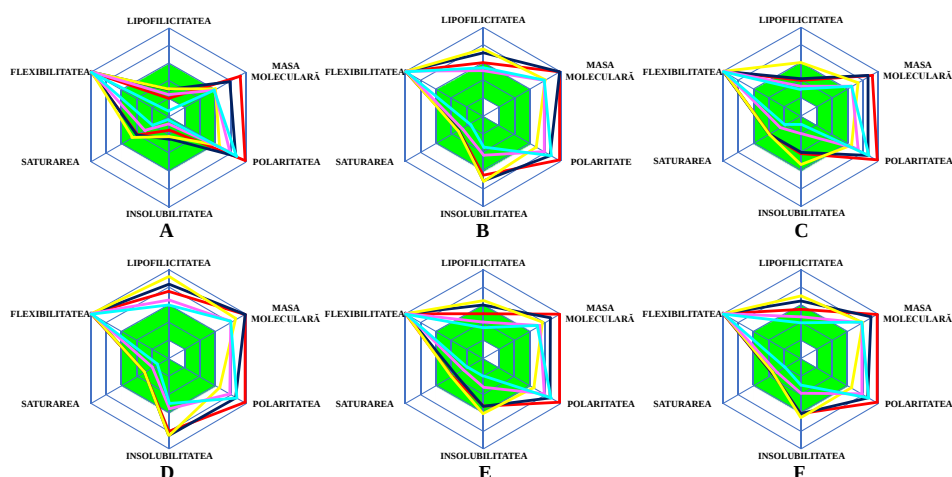


Figura II.5.3. Proprietățile fizico-chimice ale compușilor studiați în ceea ce privește administrarea medicamentelor în funcție de lipofilicitatea, masa moleculară, polaritatea, insolubilitatea, saturarea și flexibilitatea peptidei sau a derivaților: **(A)** 1, 2, 3, 4 și 5; **(B)** 1-1, 2-1, 3-1, 4-1 și 5-1; **(C)** 1-2, 2-2, 3-2, 4-2 și 5-2; **(D)** 1-3, 2-3, 3-3, 4-3 și 5-3; **(E)** 1-4, 2-4, 3-4, 4-4 și 5-4; **(F)** 1-5, 2-5, 3-5, 4-5 și 5-5.

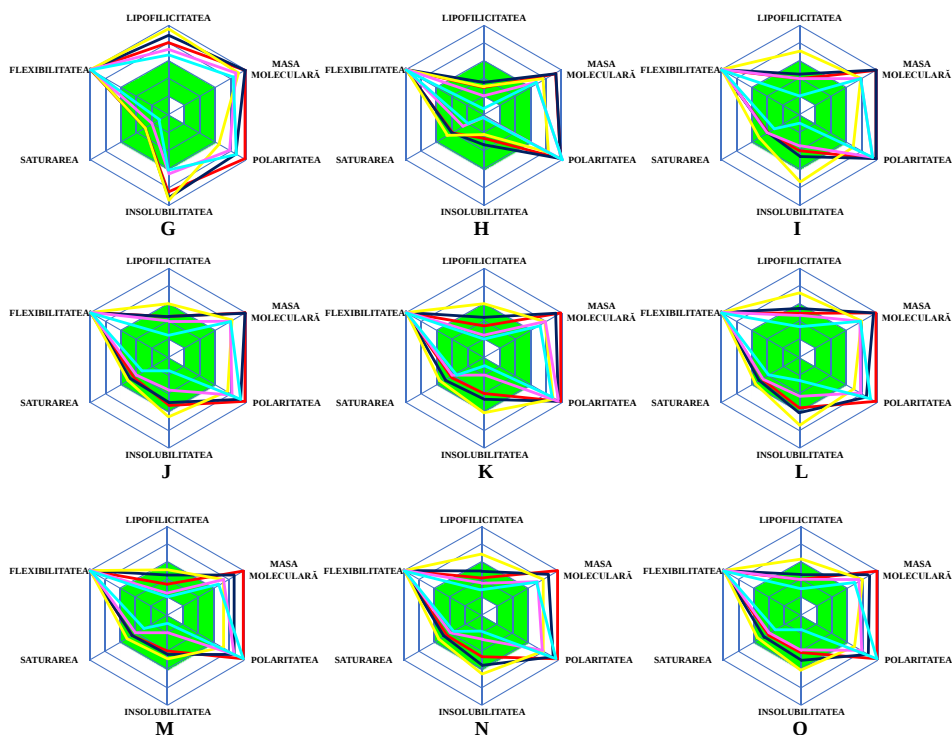


Figura II.5.3. (cont.) Proprietățile fizico-chimice ale compușilor studiați în ceea ce privește administrarea medicamentelor în funcție de lipofilitatea, masa moleculară, polaritatea, insolubilitatea, saturarea și flexibilitatea peptidei sau a derivaților: **(G)** 1-6, 2-6, 3-6, 4-6 și 5-6; **(H)** 1-7, 2-7, 3-7, 4-7 și 5-7; **(I)** 1-8, 2-8, 3-8, 4-8 și 5-8; **(J)** 1-9, 2-9, 3-9, 4-9 și 5-9; **(K)** 1-10, 2-10, 3-10, 4-10 și 5-10; **(L)** 1-11, 2-11, 3-11, 4-11 și 5-11; **(M)** 1-12, 2-12, 3-12, 4-12 și 5-12; **(N)** 1-13, 2-13, 3-13, 4-13 și 5-13; **(O)** 1-14, 2-14, 3-14, 4-14 și 5-14. Cu roșu a fost reprezentată peptida 1, albastru – peptida 2, galben – peptida 3, roz – peptida 4 și turcoaz – peptida 5. Hexagonul verde indică domeniul acceptabil.

Parametrii care sunt constanți în afara limitei stabilite pentru administrarea orală sunt flexibilitatea, greutatea moleculară și polaritatea. Cu toate acestea, datorită caracteristicilor structurale ale peptidelor, comparativ cu structura paracetamolului de exemplu, era de așteptat ca acești 3 parametri să depășească valorile stabilite. Astfel, conform Figurii II.5.3.A, cele 5 peptide au prezentat o distribuție în limitele acceptabile în cazul lipofilității, saturației și a solubilității (hexagonul verde), în timp ce derivații acestora au dispus valori variabile.

Așadar, conform rezultatelor obținute anterior, peptidele care au prezentat cea mai bună biocompatibilitate teoretică în cazul potențiale administrări a medicamentelor, au fost peptida 3 ($^{17}\text{LVFF}^{20}$) și peptida 4 ($^{16}\text{KLVF}^{19}$). Mai mult

decât atât, în ceea ce privește compușii organici utilizați pentru conjugare, s-a ales să se investigheze în continuare peptida conjugată cu acidului nicotinic (3-12 și 4-12). Dintre taurină, acidul 3,5-dinitrosalicilic și acidul nicotinic (NA), ultimul dintre acestea, cunoscut și sub numele de niacină, atenuează în plus leziunile cerebrale după stop cardiac la șobolani, conform investigațiilor efectuate de Kwon și colaboratorii săi.³¹ În consecință, acidul nicotinic este singurul compus ce deține o activitate neuroprotectivă comparativ cu ceilalți acizi utilizați pentru cuplare.

Astfel, s-a urmărit ce clasă de biomolecule active din corpul uman, precum proteine, enzime sau receptori, ar putea interacționa cu peptidele și cu derivații acestora. Drept urmare, în acest caz, scopul a fost să se analizeze posibila influență biologică asupra efectului terapeutic al compușilor 3, 3-12, 4 și 4-12. Așadar, cea mai mare probabilitate de interacțiune cu peptida $^{17}\text{LVFF}^{20}$ o au proteazele (28%), urmate de familia de proteine receptoare AG (24%). După conjugare, probabilitatea pentru derivatul peptidei ($\text{NA-}^{17}\text{LVFF}^{20}$) crește semnificativ pentru familia de proteine receptoare AG (52%), în timp ce interacțiunea cu proteazele nu se modifică. Mai mult decât atât, în cazul $^{16}\text{KLVF}^{19}$, valoarea obținută în ceea ce privește proteazele a fost de 20%, în timp ce pentru $\text{NA-}^{16}\text{KLVF}^{19}$, aceasta a crescut până la 32%. Referitor la familia de proteine receptoare, probabilitatea estimată a fost practic similară (a crescut ușor de la 32% la numai 36%). Așadar, rezultatele obținute conform acestei investigații sugerează faptul că în urma cuplării NA la secvența peptidei, crește afinitatea pentru două categorii de biomolecule, ceea ce poate reprezenta un pas important în dezvoltarea funcțiilor neuroprotectoare. Astfel, s-a demonstrat că supraexprimarea genei ce codifică această familie de proteine, determină o inhibare a toxicității oxidative din creier.³²

Pentru a investiga modul de interacțiune a $^{17}\text{LVFF}^{20}$, $\text{NA-}^{17}\text{LVFF}^{20}$, $^{16}\text{KLVF}^{19}$ și $\text{NA-}^{16}\text{KLVF}^{19}$ cu monomerul A β și fibrilele formate de acesta, s-a recurs la o metodă de aliniere flexibilă (Figura II.5.5.). Pornind de la ipoteza conform căreia unii compuși pot influența procesul de fibrilare, scopul acestui studiu teoretic a fost acela de a investiga interacțiunea tetrapeptidelor cu monomerii sau oligomerii amiloidici și astfel, să se analizeze capacitatea inhibitorie asupra formării conformațiilor de tip β -pliat deținute de aceste peptide-

medicament. În plus, prin promovarea interacțiunii dintre $^{17}\text{LVFF}^{20}$, $\text{NA-}^{17}\text{LVFF}^{20}$, $^{16}\text{KLVF}^{19}$ sau $\text{NA-}^{16}\text{KLVF}^{19}$ cu monomerul $\text{A}\beta$, poate scădea drastic probabilitatea de a se forma noi structuri fibrilare și în consecință, structuri β -pliate (Figura II.5.1.).

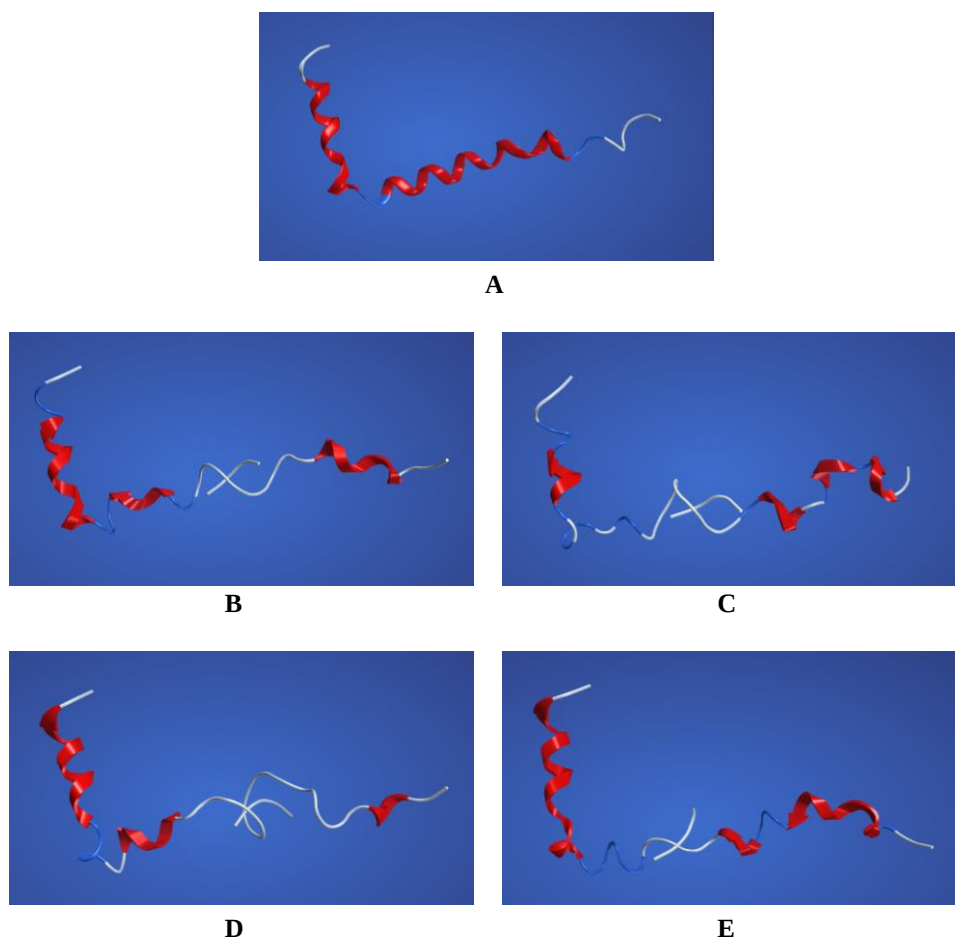


Figura II.5.5. (A) Structura cristalografică a monomerului $\text{A}\beta_{(1-42)}$ obținută din Protein Data Bank și proiectată cu programul *MOE 2016.02*. Modelul de aliniere a monomerului $\text{A}\beta_{(1-42)}$ cu: **(B)** $^{17}\text{LVFF}^{20}$, **(C)** $\text{NA-}^{17}\text{LVFF}^{20}$, **(D)** $^{16}\text{KLVF}^{19}$ și **(E)** $\text{NA-}^{16}\text{KLVF}^{19}$, structuri reprezentate prin fragmentele gri liniare.

În comparație cu modelul din Figura II.5.5.A, există diferențe semnificative în ceea ce privește conformația monomerului. Aceste rezultate indică faptul că peptida poate modula conformația $\text{A}\beta_{(1-42)}$, destructurând unul din elementele secundare de tip α -elicoidal. În consecință, monomerul își schimbă

conformațiile într-o structură de tip ghem statistic, ceea ce ar putea influența suplimentar interacțiunea cu presupusul agent de inhibiție. Mai mult decât atât, după cuplarea NA la secvența $^{17}\text{LVFF}^{20}$ și $^{16}\text{KLVF}^{19}$, s-a observat o progresie a inhibării împachetării segmentelor de tip α -elicoidal. Totodată, pentru a investiga potențialul acestor peptide de a împiedica formarea conformației β -pliate a fibrilelor A β , s-a recurs la simulări de andocare. Astfel, interacțiunea dintre peptidele luate în considerare și fibrilele A $\beta_{(1-42)}$ pare a se desfășura la limitele superioare sau inferioare a structurii β -pliate. Prin urmare, acest aspect poate indica faptul că dacă interacțiunile au loc în principal la extremitățile superioare sau inferioare ale fibrilei, nu este posibilă legarea unui alt monomer A $\beta_{(1-42)}$. În consecință, nu mai are loc procesul de extindere a fibrilei datorită acestui tip de blocaj. Așadar, dacă într-o schemă terapeutică se poate utiliza, de pildă, o combinație între $^{16}\text{KLVF}^{19}$ și NA- $^{16}\text{KLVF}^{19}$, atunci prima peptidă se poate atașa la partea superioară, iar derivatul său la partea inferioară a structurii, ceea ce ar indica faptul că procesul de extindere continuă a fibrilelor în ambele direcții poate fi împiedicat.

Pentru a investiga experimental proprietățile peptidelor $^{17}\text{LVFF}^{20}$, NA- $^{17}\text{LVFF}^{20}$, $^{16}\text{KLVF}^{19}$ și NA- $^{16}\text{KLVF}^{19}$, s-a recurs la sinteza acestora în fază solidă. Substanțele chimice de grad analitic au fost obținute din surse comerciale, iar soluțiile au fost preparate utilizând apă de tip I obținută cu un sistem de purificare de tip Millipore. În consecință, peptidele și derivații acestora cu acidul nicotinic au fost sintetizate conform protocolului experimental descris în *Capitolul II.1.7* cu ajutorul unei rășini Fmoc-Rink-Amide-(aminometil). Peptidele brute obținute prin SPPS au fost supuse purificării prin cromatografie de lichide de înaltă performanță în fază inversă pentru a selecta fracțiunile cu puritate superioară. Mai mult decât atât, fracțiunile cromatografice au fost colectate individual și reinjectate în dispozitivul Dionex UltiMate 3000 UHPLC Focused pentru a confirma puritatea peptidelor (Figura II.5.10.).

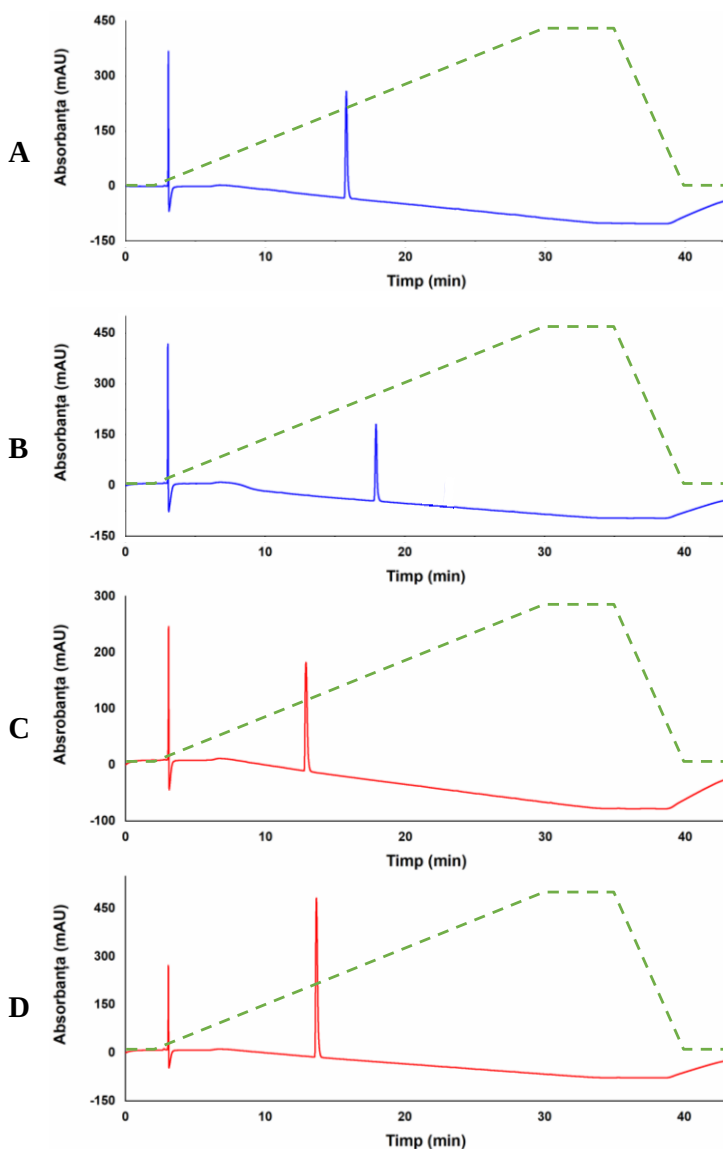


Figura II.5.10. Separarea cromatografică a peptidelor purificate prin RP-HPLC a **(A)** $^{17}\text{LVFF}^{20}$, **(B)** $\text{NA-}^{17}\text{LVFF}^{20}$, **(C)** $^{16}\text{KLVF}^{19}$ și **(D)** $\text{NA-}^{16}\text{KLVF}^{19}$. Linia verde întreruptă indică variația gradientului utilizat.

Deși puritatea inițială a peptidelor sintetizate, a fost mai mică de 85%, în urma celei de-a doua separări cromatografice RP-HPLC au rezultat fracțiuni a căror puritate a fost de 99%. Astfel, doar peptidele ce au expus o puritate adecvată (99%) au fost utilizate în investigațiile ulterioare (Figura II.5.10.).

Ca urmare a separărilor RP-HPLC, fracțiunile cu cea mai înaltă puritate (Figura II.5.10., 99%) au fost supuse analizei prin spectrometrie de masă cu

desorbție/ionizare asistată de o matrice (MALDI-TOF-MS), investigație realizată cu un spectrometru Shimadzu Axima Performance MALDI-TOF. Astfel, probele au fost co-cristalizate cu matricea α -CHCA și analizate ulterior în modul reflectron pozitiv. În consecință, spectrele MS ale peptidelor sintetizate sunt prezentate în Figura II.5.12.

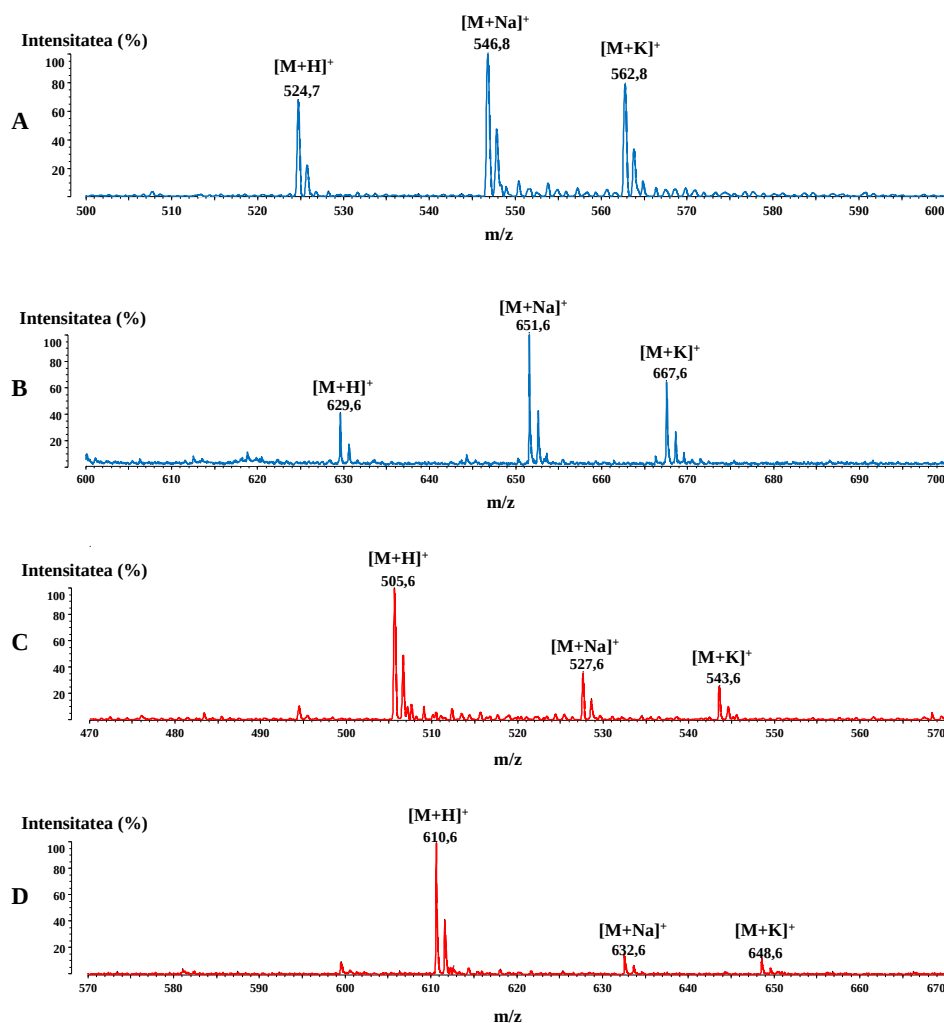


Figura II.5.12. Spectrele obținute prin MALDI-TOF/TOF ale peptidelor sintetizate, unde: **(A)** $^{17}\text{LVFF}^{20}$, **(B)** $\text{NA-}^{17}\text{LVFF}^{20}$, **(C)** $^{16}\text{KLVF}^{19}$ și **(D)** $\text{NA-}^{16}\text{KLVF}^{19}$.

Conform Figurii II.5.12., pe lângă ionul molecular identificat pentru fiecare peptidă ($[\text{M}+\text{H}]^+$: 524,7 Da – $^{17}\text{LVFF}^{20}$, 629,6 Da – $\text{NA-}^{17}\text{LVFF}^{20}$, 505,6

Da – $^{16}\text{KLVF}^{19}$ și 610,6 Da – $\text{NA-}^{16}\text{KLVF}^{19}$), s-au observat și aducții acestora cu sodiu și potasiu. În ceea ce privește conjugatul cu NA, specii similare au fost observate la 651,6 Da pentru aductul cu sodiu a $\text{NA-}^{17}\text{LVFF}^{20}$, iar la 667,6 Da a fost identificat aductul cu potasiu (Figura II.5.12.B). În cazul peptidei 4 ($^{16}\text{KLVF}^{19}$) și a conjugatului acesteia, au fost remarcate semnale asemănătoare în spectrele de masă (Figura II.5.12.C și D).

Ulterior, pentru a investiga stabilitatea structurală a acestor peptide, s-a recurs la spectrometria de masă în tandem prin disociere indusă prin coliziune în modul reflectron pozitiv. În plus, această tehnică a permis și confirmarea secvenței aminoacizilor. Drept urmare, scopul principal al acestei abordări a fost acela de a analiza cât de puternice sunt legăturile dintre aminoacizii prezenți în structurile peptidelor și derivaților acestora. Astfel, datele MS/MS ar putea consemna ce legături sunt mai predispuse la fragmentare sau ce specii ionice sunt mai stabile și prin urmare, să indice unde se poate produce clivajul acestora.^{33–36} Peptidele fiind mai stabile, există posibilitatea ca acestea să își poată exercita efectul terapeutic mai eficient.

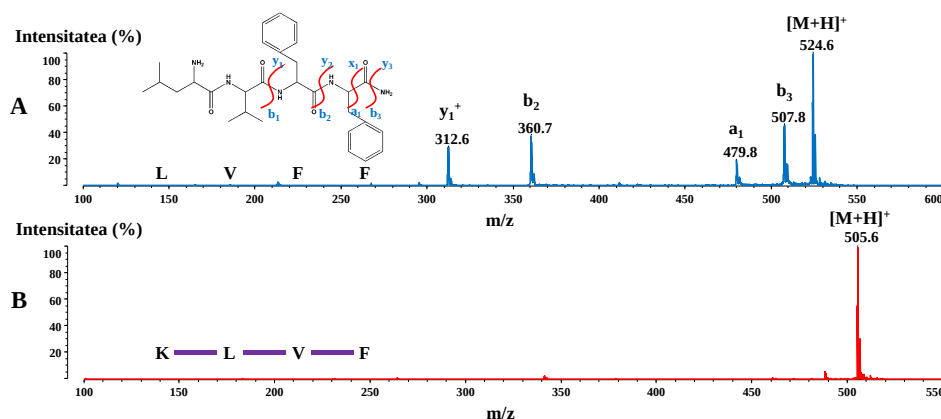


Figura II.5.13. Spectrele de masă obținute în urma disocierii induse de coliziune în modul reflectron pozitiv ale peptidelor: **(A)** $^{17}\text{LVFF}^{20}$ și **(B)** $^{16}\text{KLVF}^{19}$.

Conform Figurii II.5.13.A, au fost observate 5 semnale în cazul compusului $^{17}\text{LVFF}^{20}$, inclusiv pentru ionul molecular la 524,6 Da ($[\text{M}+\text{H}]^+$). De asemenea, în urma procesului de fragmentare, s-au evidențiat semnalele asociate

cu speciile ionice y_1^+ la 312,6 Da, b_2^+ la 360,7 Da, a_1^+ la 479,8 Da și b_3^+ la 507,8 Da. Acest aspect sugerează că în urma CID, legăturile predispuse pentru clivare sunt situate în proximitatea fenilalaninei, având drept rezultat generarea fragmentului $^{17}\text{LV}^{18}$. Cu toate acestea, în cazul peptidei $^{16}\text{KLVF}^{19}$, spectrul nu a evidențiat nici o fragmentare chiar dacă a fost utilizată cea mai mare putere per puls (20 keV) al dispozitivului MALDI-TOF (Figura II.5.13.B). Aceste date sugerează faptul că peptida deține legături foarte puternice ce îmbunătățesc biostabilitatea, aspect relevant în ceea ce privește proteoliza de la nivelul creierului.³⁷⁻³⁹

II.6. Sinteza și caracterizarea unei peptide cu proprietăți de auto-asamblare

În această etapă a doctoratului, s-a ales să se studieze secvența FRS și să se investigheze modul prin care aceasta își poate manifesta capacitatea de auto-asamblare, în funcție de condițiile date.

În primă instanță, scopul investigației teoretice a fost de a identifica modul prin care 5 peptide FRS interacționează intermolecular după aplicarea unei simulări dinamice, pentru a analiza capacitatea acestora de agregare sau de auto-asamblare. Astfel, peptida tinde să genereze o structură concavă/convexă. De asemenea, legăturile de hidrogen cu moleculele de apă sunt mai puțin vizibile, ceea ce poate indica o solubilitate ușor redusă. Prin urmare, acest aspect ar putea sugera o eventuală tendință de agregare sau de auto-asamblare în solvenți polari, proces în care peptidele analizate ar trebui să interacționeze între ele și mai puțin cu solventul. Pentru a investiga această interacțiune, 5 molecule de FRS au fost luate în considerare în mediul apos și supuse modelării moleculare pentru a identifica centrii de legare dintre acestea și totodată, care sunt stresorii implicați în acest proces de agregare (Figura II.6.2.).

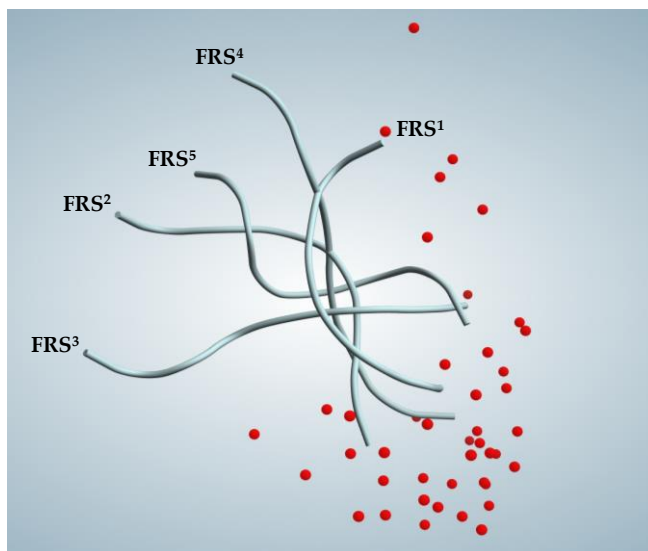


Figura II.6.2. O stare conformațională caracteristică pentru un set de 5 molecule de peptidă FRS rezultat în urma modelării moleculare. Structura primară a peptidelor este identificată prin firele alb-albastre, în timp ce moleculele de apă pot fi identificate prin reprezentarea sferelor roșii.

Conform Figurii II.6.2., atunci când cele 5 molecule sunt supuse modelării moleculare, acestea prezintă tendința de a adopta clustere. Un asemenea fenomen ar putea fi indus și de legăturile de hidrogen nou formate prin intermediul moleculelor de apă. De asemenea, s-a observat faptul că structurile peptidice transpun conformații ce accelerează procesul de încurcare fibrilară, un fenomen ce poate potența dezvoltarea rețelelor. În consecință, fragmentul principal din secvența peptidei ce este implicat în procesul de agregare sau în interacțiunile legăturilor de hidrogen, este $\text{H}_2\text{N}-^2\text{RSAPF}^6\text{-CONH}_2$, în timp ce fragmentele $\text{H}_2\text{N}-^1\text{F}$ și $\text{H}_2\text{N}-^7\text{IE}^8\text{-CONH}_2$ par a fi în exteriorul zonei de interacțiune.

Considerând datele teoretice obținute în ceea ce privește proprietățile peptidei în procesele de agregare, s-a ales să se recurgă ulterior la sinteza și investigarea acesteia prin diverse tehnici cromatografice, spectrofotometrice sau densiometrice. Astfel, octapeptida amidată $\text{H}_2\text{N}-^1\text{FRSAPFIE}^8\text{-CONH}_2$ a fost sintetizată utilizând strategia Fmoc/tBu prin SPPS, fiind ancorată pe un suport solid constituit dintr-o rășină amidată (MBHA). Randamentul sintezei a fost de aproximativ 48% pentru o cantitate teoretică de 50 μM octapeptidă, iar un

randament similar a fost observat atunci când s-a utilizat o cantitate de 6 ori mai mare, obținându-se în cele din urmă 90 mg. O explicație a randamentului scăzut poate fi atribuită atât etapelor laborioase de sinteză, cât și celor de clivare, precipitare sau purificare.

Ulterior, printr-un sistem cromatografic de lichide de înaltă performanță, peptida FRS brută sintetizată a fost eluată și detectată la un timp de retenție de 3–5 minute utilizând cromatografia de separare C18-RP Flash. Drept urmare, în urma liofilizării s-a obținut o cantitate de 90 mg peptidă pură. În plus, puritatea peptidei FRS a fost confirmată prin RP-HPLC. În acest scop, a fost folosită o coloană C18 în calitate de fază staționară în conformitate cu metoda descrisă în *Capitolul II.1.8*. Peptida FRS a prezentat un timp de retenție de 15,85 min, eluând la o concentrație a solventului B de aproximativ 37%. Puritatea peptidei FRS în urma separării prin C18-RP Flash a fost estimată la 86,68%, fiind calculată în funcție de aria semnalelor cromatogramei obținute la 220 nm raportată la aria totală. În cele din urmă, doar fracțiunile cu puritate ridicată (99%) au fost luate în considerare pentru investigațiile ulterioare.

În ceea ce privește spectrul de masă obținut în urma analizei MALDI-TOF al peptidei FRS, cel mai intens semnal observat la 965,48 Da a fost atribuit ionului mono-încărcat $[M+H]^+$. În plus, două semnale de intensitate redusă au fost observate la 987,46 Da, respectiv 1003,43 Da, ce au fost atribuite aductului cu sodiu $[M+Na]^+$ și aductului cu potasiu $[M+K]^+$ a ionului molecular. Structura primară a peptidei FRS a fost confirmată prin spectrometrie de masă în tandem (MS/MS), pe baza unui proces de disociere indus de coliziune (CID). Așadar, cel mai intens semnal din spectrul de masă, corespunzător ionului $[M+H]^+$, a fost selectat și supus fragmentării (Figura II.6.9.). Drept urmare, în spectrul MS/MS au fost identificate semnale asociate ionilor mono-încărcați precum b_2^+ (m/z 304,10 Da), b_4^+ (m/z 487,15 Da) sau y_5^+ (m/z 504,18) Da. Mai mult decât atât, au fost observate și câteva fragmente nespecifice în spectrul de masă, cum ar fi b_3-H_2O la m/z 374,10 Da, b_4-H_2O la m/z 445,12 Da și b_5-H_2O la m/z 542,15 Da, ioni moleculari rezultați prin eliminarea moleculei de apă de la capătul C-terminal al

peptidei. În plus, semnalul relativ intens al ionului b_4^+ poate explica formarea fragmentului $H_2N\text{-}^5\text{PFIE}^8\text{-H}$.

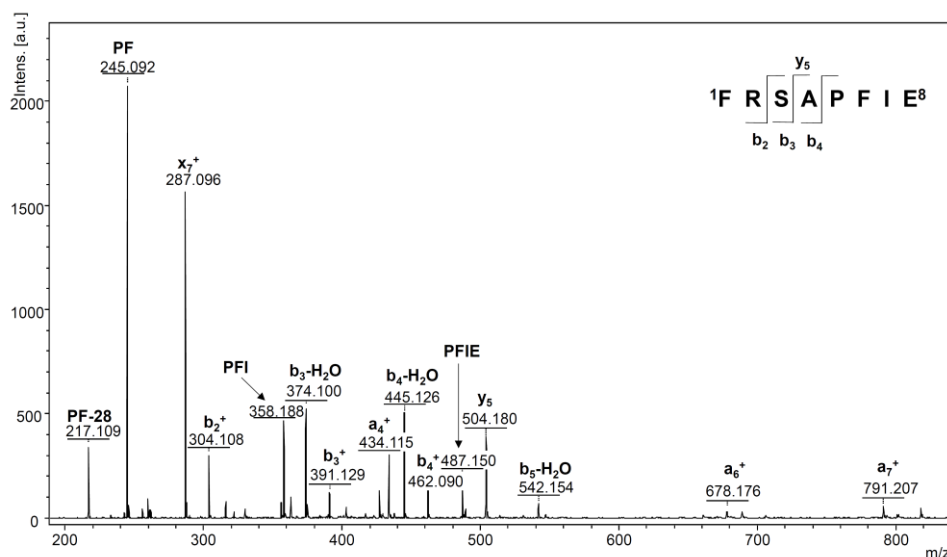


Figura II.6.9. Tiparul de fragmentare MS/MS al peptidei FRS în urma procesului de disociere indus de coliziune.

În primul rând, s-a observat o flexibilitate specifică în zona mediană a peptidei, această caracteristică fiind identificată în urma spectrometriei MS/MS cu obținerea fragmentelor asociate. Prin urmare, această proprietate a fost confirmată și de datele teoretice. Așadar, obținerea unor fragmente ce aparțin secvenței mediane a peptidei sugerează faptul că legăturile intramoleculare și, respectiv, legăturile între aminoacizi, nu sunt suficient de puternice pentru a atribui o rigiditate structurală, având drept consecință o flexibilitate a legăturilor și implicit, o disociere rapidă a acestora. În al doilea rând, secvența $H_2N\text{-}^2\text{RSAPF}^6\text{-CONH}_2$, reprezentând punctul de inflexiune al peptidei conform simulărilor efectuate, a fost confirmată și prin spectrometria de masă prin detectarea fragmentelor b_2^+ , b_3^+ , b_4^+ , și y_5^+ obținute în urma disocierii legăturilor dintre respectivii aminoacizi, ceea ce denotă o elasticitate specifică a acestui fragment.

Într-o primă etapă a studiilor spectrofotometrice, a fost înregistrat spectrul FRS pentru a stabili maximele de absorbție caracteristice ale fenilalaninei. Așa

cum era de așteptat, cel mai mare coeficient de extincție a fost înregistrat la 258 nm, dar au fost observate și două benzi pronunțate la 252 nm și 264 nm. Mai mult decât atât, au fost identificate două benzi la 247 nm, respectiv 268 nm. Conform spectrelor de fluorescență ale peptidei FRS preparată în soluție Tris (0,1 M și la 7,4), obținute în urma excitării probei la 252 nm, 258 nm și la 264 nm, au fost identificate lungimi de undă corespunzătoare benzilor observate în spectrele de absorbție, ce au constat din două benzi de emisie, un semnal maxim la 308 nm și un semnal secundar la 400 nm.

În plus, intensitatea fluorescenței a variat în funcție de lungimea de undă de excitație utilizată. Limita maximă de emisie pentru FRS a fost înregistrată la 308 nm la utilizarea unei lungimi de undă de excitație de 264 nm. Conform acestor date, atunci când lungimea de undă de excitație a crescut secvențial, intensitatea benzii de emisie prezente la 310–312 nm a crescut ușor, în timp ce banda de emisie cu un maximul de 400 nm a fost diminuată odată cu creșterea valorii lungimilor de excitație. Această emisie neobișnuită, dependentă de lungimea de undă de excitație, este cel mai probabil atribuită unui transfer de protoni fotoindus intermolecular (PPT – *din engleză*: Photoinduced Proton Transfer).⁴⁰ Este posibil ca acest proces să fie favorizat de o rețea intermoleculară produsă de peptida FRS sau de fenomenul de auto-asamblare, proces în care moleculele sunt strâns interconectate prin intermediul legăturilor de hidrogen. De asemenea, se poate observa că această nouă bandă de emisie este favorizată de creșterea energiei de excitație. Prin urmare, poate exista o corelație indirectă între fluorescență și caracterul agregant al peptidei.

În plus, testele de agregare au fost efectuate pentru a confirma capacitatea peptidei FRS de a se auto-asambla. Derivatul dipeptidic Fmoc-FF-OMe a fost utilizat sub formă de compus control pentru aceste măsurători fluorimetrice. Inițial, s-a utilizat compusul FAD cu rol de moleculă intermediară pentru a investiga fenomenele de agregare ale FRS în tampon Tris (0,1 M la pH 7,4). În consecință, s-a observat faptul că fluorescența FAD scade cu aproximativ 6400 de unități în 12,5 min în prezența octapeptidei, iar ulterior s-a stabilizat. Variația fluorescenței a fost similară pentru derivatul dipeptidic, cu o creștere constantă de 4600 de

unități după aproximativ 8 minute de monitorizare, timp de 11 minute. Corelând aceste date cu cele obținute anterior, se poate concluziona faptul că procesul de auto-asamblare este dependent de timp. Prin urmare, scăderea intensității fluorescenței a soluției de peptidă FRS are lor prin intervenția transferul de protoni fotoindus intermolecular și astfel, se pot genera structuri supramoleculare cu proprietăți de auto-asamblare.

Mai mult decât atât, în cazul dipeptidei, fluorescența tinde să se stabilizeze după un anumit timp ceea ce poate sugera că, în acest caz, nu are loc PPT. Acest aspect poate fi explicat prin natura secvenței compușilor investigați. Octapeptida prezentând o structură concavă/convexă, procesul de PPT se poate realiza mult mai ușor, pe când dipeptida, deținând o structură de dimensiune redusă, nu poate favoriza acest proces. Prin urmare, în cazul Fmoc-FF-OMe se formează structuri agregante instabile în timp, pe când FRS poate genera rețele stabile.

Totodată, s-a investigat și modul prin care concentrația FRS influențează intensitatea fluorescenței, cu scopul de observa o dependență între capacitatea peptidei de a auto-asambla și spectrul rezultat, identificându-se două dependențe. În primul rând, o dependență între concentrația FRS și intensitatea fluorescenței, iar a doua dependență este raportată între lungimea de undă excitată și concentrație. Deși inițial la 50 $\mu\text{g/mL}$ FRS, nu a existat o diferență semnificativă în ceea ce privește fluorescența la cele două lungimi de undă de excitație (240 și 258 nm), ulterior a fost înregistrat un decalaj din ce în ce mai mare între cele două semnale. Prin urmare, acest aspect poate fi explicat prin natura suprastructurilor generate de FRS în urma procesului de auto-asamblare.

În plus, un alt parametru utilizat în determinarea proprietăților de auto-asamblare a unei molecule este indicele de agregare. Acesta este folosit frecvent pentru a determina prezența agregatelor în soluție, dar ajută și la evaluarea existenței oligomerilor, oferind o primă aproximare a stării de agregare a unei probei.⁴¹ În ceea ce privește valorile indicelui de agregare, în momentul în care acesta este sub 3 proba este o soluție transparentă. O valoare între 3 și 30 denotă faptul că pot exista agregate, iar un indice peste 30 indică aspectul conform căruia eșantionul este puternic agregat.⁴¹ Astfel, peptida FRS formează agregate în soluție

în funcție de timpul de incubare, maximum regăsindu-se la 20 min, iar ulterior, indicele stabilizându-se la o valoare de aproximativ 3,5 după 40 min.

În ceea ce privește studiile prin DLS, graficul rezultat prezintă un profil de distribuție a intensității în funcție de dimensiunea particulelor formate de FRS la trei concentrații diferite (0,12%, 0,28% și 0,51%). Așa cum era de așteptat, s-a observat faptul că fenomenul de agregare este dependent de concentrația utilizată. De asemenea, procesul de polidispersitate a avut loc chiar și la concentrații mai mici. O distribuție bimodală a fost observată la o concentrație de aproximativ 0,12, respectiv 0,28%, iar o distribuție trimodală, în cazul unei concentrații mai mari. Indicele de polidispersitate al peptidei (PDI – *din engleză*: Polydispersity Index) descrie atât distribuțiile dimensiunii particulelor monodisperse, cât și polidisperse. În consecință, populația principală prezintă următoarea polidispersitate: 0,18, la concentrație de 0,13%, 0,16 la concentrație de 0,28% și 0,11 la concentrație de 0,51% peptidă FRS. Așadar, se poate concluziona că la o concentrație ridicată, peptida deține o tendință de auto-asamblare dovedită de o creștere a dimensiunii particulelor.

Mai mult decât atât, în urma investigației prin DLS s-a observat faptul că peptida adoptă diferite structuri de diferite dimensiuni în funcție de concentrația utilizată. Astfel, la concentrații crescute peptida posedă tendința de agregare, cu generarea unor particule de dimensiune mărită. Prin urmare, tendința de auto-asamblare a fost observată pornind de la o concentrație de 0,28%, însă a fost mai evidentă la o concentrație de 0,51% (Figura II.6.21.).

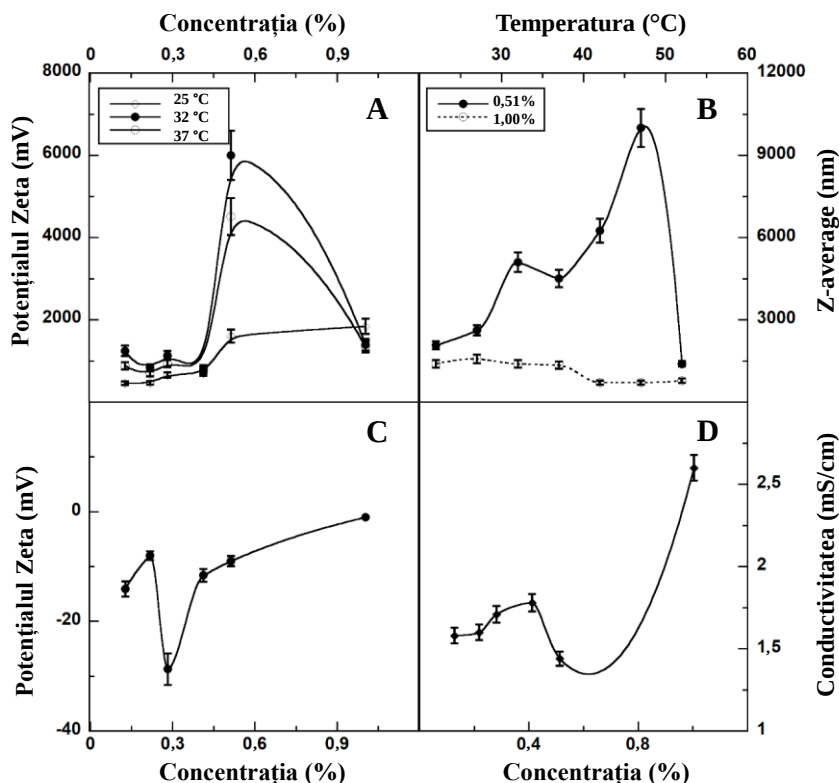


Figura II.6.21. (A) Dependența dimensiunii particulelor în funcție de concentrația peptidei FRS. **(B)** Dependența dimensiunii particulelor generate de peptida FRS în funcție de temperatură. **(C)** Potentialsul Zeta în funcție de concentrația octapeptidei. **(D)** Conductivitatea în funcție de concentrația peptidei FRS.

O creștere suplimentară a concentrației de până la 1% nu a prezentat o influență semnificativă asupra procesului de agregare la o temperatură de 25 °C. Cu toate acestea, la temperaturi mai ridicate (32 și 37 °C), capacitatea de auto-asamblare a scăzut drastic în comparație cu soluțiile de concentrație de 0,51% (Figura II.6.21.A). Pentru concentrații mai mici de 0,4%, a fost identificată o contracție în volum a dimensiunii structurilor generate de către peptidă. Astfel, volumul agregatelor a fost diminuat la o temperatură de 25 °C, iar ulterior, a fost atins un maxim la 32 °C (Figura II.6.21.A). Așadar, toate aceste date confirmă ipoteza conform căreia procesul de agregare este dependent de temperatură. Cele mai bune condiții de agregare au fost observate la o temperatură de 32 °C și la o concentrație de 0,51% (Figura II.6.21.A). De asemenea, a fost observată o tendință

de creștere a dimensiunii particulelor în momentul în care soluția de peptidă a fost supusă tratamentului termic de peste 40 °C (Figura II.6.21.B). În schimb, soluția de 0,51% a prezentat un punct de inflexiune la 47 °C, moment în care a adoptat o stare conformațională mai relaxată. În această situație s-a observat o creștere de patru ori a volumului la temperatura respectivă, în comparație cu o creștere de doar 45% observată la 32 °C (Figura II.6.21. B). În cele din urmă, la o concentrație de 1% FRS, dimensiunea particulelor nu au fost în mod evident influențată de modificările de temperatură. Acest fenomen poate fi explicat prin faptul că un număr însemnat de legături intermoleculare și intramoleculare dictează unele constrângeri conformaționale, chiar și la temperaturi ridicate (Figura II.6.21.B).

Totodată, s-a observat o dependență între potențialul Zeta și concentrația utilizată, pornind de la o valoare de -14 mV pentru o concentrație de 0,12% și atingând o limită de -9 mV în cazul unei concentrații de 0,51%. Procesul de intensificare a acestui parametru în raport cu o creștere a concentrației, ar putea fi justificat printr-o augmentare a legăturilor intermoleculare între moleculele de FRS datorită fenomenului de agregare. De asemenea, un comportament specific a fost observat atunci când peptida a atins o concentrație de 0,28%. În acest caz, potențialul Zeta a avut tendința de a avea cea mai mică valoare. În consecință, acest fenomen poate fi încredințat, cel mai probabil, unei schimbări conformaționale.

Mai mult decât atât, conductivitatea a prezentat o dependență ascendentă până în punctul în care încep să se formeze agregatele peptidice. Drept urmare, acest fapt poate fi explicat printr-o diminuare semnificativă a grupărilor funcționale de la suprafața sistemului, moment în care asocierile intermoleculare sunt predominante. În plus, conform diametrului hidrodinamic al structurilor generate de peptida FRS la o concentrație de 1 mg/mL în soluție tampon PBS, 0,01 M la pH 7,4, acestea au manifestat schimbări conformaționale multiple în funcție de temperatură. Astfel, la 31 °C și la 40 °C peptida formează structuri globulare, în timp ce la 34 °C și la 43 °C, FRS preferă conformația cea mai relaxată.

De asemenea, investigațiile imagistice de tip AFM au indicat faptul că peptida FRS poate genera aranjamente supramoleculare bine definite la pH 5,5 (Figura II.6.23.A și B). Așadar, într-o soluție ușor acidă a fost observată

oligomerizarea peptidei. Structurile rezultate au prezentat o formă elipsoidală cu o înălțime cuprinsă între 0,62 μm și 0,68 μm , o lungime medie de $3,03 \pm 0,12 \mu\text{m}$, o lățime medie de $1,02 \pm 0,09 \mu\text{m}$ și o suprafață medie de $3,13 \pm 0,33 \mu\text{m}^2$.

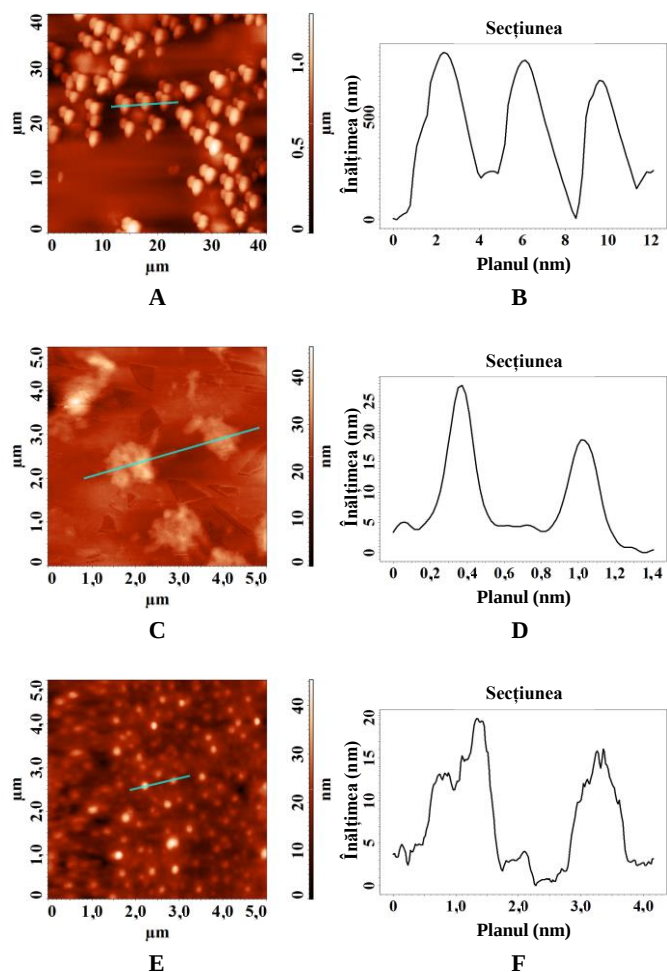


Figura II.6.23. Rezultatele imagistice obținute prin AFM pentru peptida FRS **(A)** la pH 5,5 și **(B)** secțiunea corespunzătoare, **(C)** la pH 7,4 și **(D)** secțiunea corespunzătoare, **(E)** preparată într-o soluție de metanol (4,5%) și **(F)** secțiunea corespunzătoare.

Atât organizarea structurală de care beneficiază peptida cât și orientare grupărilor laterale, poate interveni în potențarea formării unor astfel de structuri micrometrice sub formă de ansambluri ordonate. Mai mult decât atât, aceste date confirmă valorile dimensiunii particulelor estimate prin DLS. De asemenea, la pH 7,4 a fost observat un polimorfism structural, fiind evidențiat printr-un perimetru

cuprins între 4,78 μm și 8,67 μm , dar și printr-o arie ce a variat între 0,80 μm^2 și 1,99 μm^2 . În acest caz, înălțimea structurilor nu a depășit valoarea de 20–30 nm (Figura II.6.23.C și D).

Cu toate acestea, în momentul în care a fost utilizat metanolul drept solvent, peptida FRS a manifestat proprietăți de auto-asamblare sub formă globulară cu diametre cuprinse în intervalul 200–350 nm (Figura II.6.23.C). În consecință, aceste măsurători sugerează că la pH 5,5, FRS se agregă în microstructuri elipsoidale uniforme, iar prezența metanolului ar putea deține un impact semnificativ asupra procesului auto-asamblării, generând astfel nanostructuri globulare bine definite.

Totodată, în Figura II.6.24. sunt prezentate imaginile SEM ale octapeptidei FRS. Astfel, rezultatele obținute prin această tehnică au indicat faptul că peptida ar putea avea capacitatea de a se asocia în structuri globulare cu un diametru care variază la scală micrometrică, fiind cuprins între 10 μm și 90 μm .

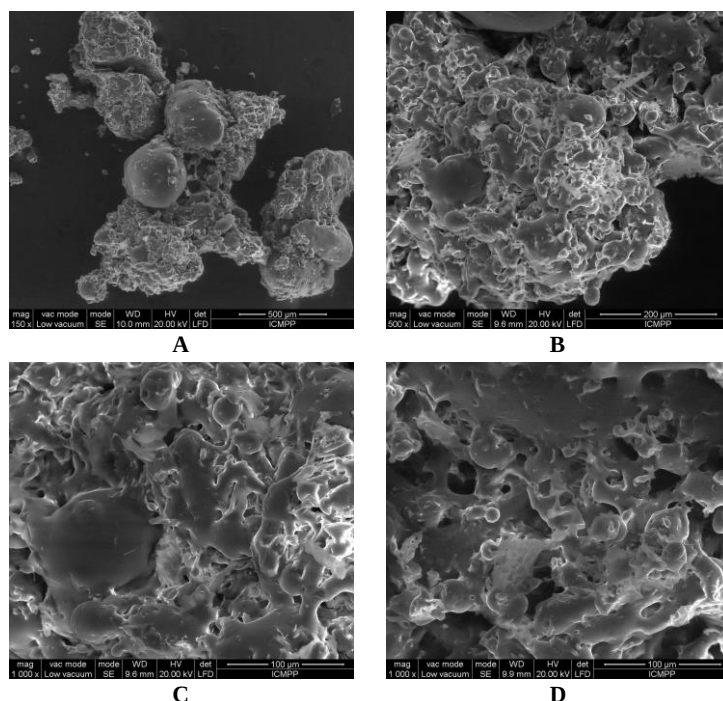


Figura II.6.24. Rezultatele imagistice obținute prin SEM ale peptidei FRS la o rezoluție de (A) 500 μm , (B) 200 μm sau (C, D) la o rezoluție de 100 μm .

După cum se poate observa din Figura II.6.24, peptida generează structuri micrometrice cu aspect poros. În plus, există posibilitatea ca aceste formațiuni să capteze diferiți compuși terapeutici ce pot fi eliberați ulterior într-un mediu controlat de pH, temperatură sau solvent. Dat fiind faptul că nano sau microstructurile prezentate sunt rezultatul auto-asamblării peptidei FRS, acest studiu poate fi premergător în definirea investigațiilor ce vor viza obținerea materialelor complexe, sub forma unor combinații cu alți compuși (ex. polimeri sau alte peptide). În acest fel, se îmbunătățesc proprietățile acestor nanostructuri, ce pot valorificate ulterior în calitate de platforme pentru eliberarea controlată a compușilor medicamentoși.

CONCLUZII GENERALE

În cadrul prezentei teze de doctorat s-a ales să se studieze arhitectura proteomică ce stă la baza bolii Alzheimer prin intermediul sintezei unor peptide cu acțiune neuroprotectoare, care au fost supuse unor diverse investigații de identificare a traseelor moleculare ce trebuie abordate în eficientizarea procesului terapeutic. Totodată, acest studiu s-a axat și pe analize computaționale, investigații ce au oferit informații prețioase din punct de vedere teoretic cu privire la comportamentul unor molecule. De asemenea, sinteza și caracterizarea unei peptide cu potențial de auto-asamblare a oferit o perspectivă de ansamblu în ceea ce privește generarea unor nanoparticule care dețin posibilitatea de a concepe platforme de eliberare controlată a substanțelor active.

Complexitatea acestei teze de doctorat a inclus un cadru amplu implicat în identificarea unor caracteristici esențiale ale modurilor prin care este abordat procesul de neurodegenerare în prezența ionilor metalici, procesul de neuro protecție cu diverse peptide, dar și conceperea unor platforme cu proprietăți de auto-asamblare ce ar putea distribui ulterior compusul terapeutic. Pe de altă parte, caracterul inter și transdisciplinar a coalizat diverse domenii ale chimiei, precum biochimia în studiul efectelor terapeutice ale peptidelor, chimia organică în sinteza peptidelor în fază solidă, chimia anorganică în investigarea interacțiunii ionilor metalici față de peptidele A β , chimia analitică în purificarea și studiul spectrofotometric al peptidelor, chimia teoretică în studiile computaționale, dar și chimia materialelor în investigarea unei peptide cu potențial de auto-asamblare. Totodată, metodele de cercetare au fost abordate astfel încât să fie generat cu context cât mai extins referitor la complexitatea informațiilor obținute, asociind datele experimentale cu cele teoretice.

Astfel, în ceea ce privește primul obiectiv în care s-a studiat teoretic interacțiunile dintre diferiți ioni metalici, precum Cu⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Ni²⁺ și Zn²⁺ cu structura monomerului A β ₍₁₋₄₂₎, dar și cu fibrilele acestuia în

hiperpirexie, rezultatele obținute susțin ipoteza conform căreia o temperatură corporală mai ridicată și o presiune intracraniană crescută pot afecta structura conformațională a peptidelor și fibrilelor amiloidice, și anume o tendință mai redusă pentru structurile secundare de tip α -elicooidale, ce poate imprima consecințe directe asupra agregării peptidice. Mai mult decât atât, datele analizate în urma dinamicii moleculare au sugerat faptul că aceste condiții pot crește procesul de agregare a peptidelor datorită formării conformațiilor secundare de tip ghem statistic și β -pliată. De asemenea, prezența ionilor metalici în structurile cerebrale cu AD cauzate de metabolismul anormal, poate determina o consecință favorabilă asupra ratei procesului de neurodegenerare. Prin urmare, având în vedere condițiile la care este supus organismul în hiperpirexie și în AD, cumulând datele teoretice obținute, acest studiu a indicat faptul că se poate manifesta o agravare a condițiilor fiziopatologiei printr-o potențare a agregării peptidelor. Astfel, peptidele amiloidice își pot exercita capacitatea de a forma noi fibrile, cu efect direct în generarea unor noi depozite de plăci senile.

Al doilea obiectiv a reprezentat o abordare teoretică a interacțiunii dintre structura cristalografică a tubulinei și peptida neuroprotectoare NAP conjugată cu acidul acetilsalicilic. Datele teoretice obținute au remarcat aspectul conform căruia atât peptida NAP, cât și conjugatul ASA-NAP, pot coexista într-un sistem și nu se înlocuiesc reciproc după cum se poate întâmpla în cazul paclitaxolului-NAP. În plus, efectul acestor doi compuși peptidici poate fi cumulat, îmbunătățind astfel acțiunea neuroprotectoare. În consecință, este posibil ca aceste molecule să se lege simultan de heterodimerul $\alpha\beta$ al tubulinei datorită prezenței unui centru diferit pentru ASA-NAP și astfel, efectul benefic să fie unul superior. Totodată, prin utilizarea dinamicii moleculare au fost obținute noi perspective cu privire la influența ionilor metalici asupra caracteristicilor structurale a peptidelor NAP și NAPY, în funcție de temperatura aplicată și aminoacidul substituit. De asemenea, s-a observat faptul că ionii de zinc se leagă puternic la structura peptidei NAPY. Mai mult decât atât, pe lângă atomul de oxigen, Tyr⁵ pare să contribuie la stabilizarea complexului cu structura inelului benzenic prin interacțiunea de tip π -cation. Prin urmare, în acest caz, potențialul de legare dintre ionul de zinc și

analogul cu tirozină devine mult mai puternic. În plus, conform acestor simulări, la o temperatură de 37 °C există o probabilitate mai mare de a se forma complexul NAP-Gln⁸-Zn²⁺ față de NAP-Asn¹-Zn²⁺. În schimb, substituția tirozinei cu serina crește stabilitatea complexului prin intermediul alaninei și prolinei. Drept urmare, această abordare ar putea avea implicații importante în proiectarea medicamentelor, considerând cerințele stabilității peptidelor. Pe de altă parte, acest design teoretic a dezvăluit modificarea structurală subiacentă a acestor molecule în condiții termice și sub acțiunea ionului de Zn²⁺.

Pentru îndeplinirea celui de al treilea obiectiv, au fost investigate 75 de peptide și derivați ale acestora cu privire la activitatea potențială de inhibare a formării conformației β -pliate a peptidelor amiloidice. Astfel, în urma analizei preliminare a diferitelor caracteristici terapeutice, peptidele cu cea mai bună biocompatibilitate în ceea ce privește administrarea intranasală, gastrointestinală și BBB au deținut în constituția acestora secvența ¹⁷LVFF²⁰ sau ¹⁶KLVF¹⁹. De asemenea, s-a ales să se investigheze derivatul peptidic cu acidul nicotinic datorită faptului că poate regla diferite forme ale activității neuroprotectoare. Totodată, conform simulărilor moleculare, NA-¹⁷LVFF²⁰ și NA-¹⁶KLVF¹⁹ accelerează procesul de interacțiune cu peptidele amiloidice și prin urmare, dețin capacitatea de a îmbunătăți mecanismul de împiedicare a formării conformației β -pliate. Ulterior, 2 peptide și 2 derivați ale acestora din gama investigată au fost sintetizate utilizând tehnica de sinteză a peptidelor în fază solidă (SPPS). Spectrometria de masă în tandem bazată pe un proces CID, a evidențiat aspectul conform căruia legăturile peptidice din vecinătatea fenilalaninei sunt mai predispuse la scindare. În cazul peptidei ¹⁶KLVF¹⁹, spectrul nu a evidențiat nicio fragmentare, o particularitate ce nu a fost identificată până în prezent în literatura științifică. Așadar, peptida ¹⁶KLVF¹⁹ se poate atașa la structura monomerului și a fibrilelor A β ₍₁₋₄₂₎, inhibând astfel procesul de extindere, concomitent cu îmbunătățirea mecanismul de împiedicare a formării conformației de tip β -pliat. Noutatea acestui studiu este reprezentată de designul unor noi combinații între peptidele A β ₍₁₅₋₂₀₎ și derivați acestora cu o serie de grupări provenite din acizi organici, precum și de o estimare computațională unică a acestor proprietăți.

În ceea ce privește obiectivul numărul 4, octapeptida FRS a fost sintetizată și caracterizată din punct de vedere al proprietăților de auto-asamblare utilizând diverse tehnici, precum MALDI-TOF, UV-Viz, fluorescență, DLS, AFM, SEM sau simulări dinamice. Astfel, simularea moleculară a fost menită să descopere conformațiile cele mai favorabile energetic ale clusterului peptidic și totodată, să analizeze capacitatea acestora de a forma asocieri structurale. De asemenea, secvența $\text{H}_2\text{N}-^2\text{RSAPF}^6-\text{CONH}_2$, reprezentând punctul de inflexiune al peptidei conform simulărilor efectuate, a fost confirmată și prin spectrometria de masă prin detectarea fragmentelor b_2^+ , b_3^+ , b_4^+ , și y_5^+ obținute în urma disocierii legăturilor dintre respectivii aminoacizi, ceea ce denotă o elasticitate specifică a acestui fragment. În plus, este posibil ca transfer de protoni fotoindus intermolecular identificat în urma investigațiilor spectrofotometrice, să fie favorizat de o rețea produsă de peptida FRS sau de fenomenul de auto-asamblare, proces în care moleculele sunt strâns interconectate prin intermediul legăturilor de hidrogen. Pe de altă parte, prin DLS s-a observat că peptida adoptă diferite structuri de diferite dimensiuni în funcție de concentrația utilizată. Așadar, aminoacizii încărcăți negativ au fost relevați pentru monitorizarea potențialului Zeta. De asemenea, s-a remarcat faptul că procesul de auto-asamblare al FRS este dependent de temperatură și de concentrația peptidei. Totodată, investigațiile imagistice prin AFM au indicat că peptida FRS poate genera aranjamente supramoleculare bine definite la pH 5,5. În plus, prin SEM s-a observat că peptida deține capacitatea de a se asocia în structuri globulare cu un diametru care variază la scală micrometrică, fiind cuprins între 10 μm și 90 μm . În consecință, aceste tipuri de ansambluri supramoleculare cu dimensiuni nanometrice reprezintă arhitecturi atractive pentru conceperea unor platforme de livrare a unor molecule cu activitate biochimică.

În același timp, caracterul trans și interdisciplinar, reprezentând penultimul obiectiv, a apelat la diverse tehnici experimentale și teoretice. Prin urmare, sinteza peptidelor a fost realizată conform metodologiei implementate de Merrifield și dezvoltată ulterior de numeroși cercetători, fiind adaptată la secvențele structurale ale peptidelor dorite.⁴² De asemenea, în urma sintezei, aceste peptide au fost purificate prin RP-HPLC cu scopul de a obține și utiliza fracțiunile

de cea mai ridicată puritate (>99%). Ulterior, caracterizarea acestora a fost efectuată utilizând metode de determinare a maselor moleculare (spectrometria de masă de tip MALDI-TOF, MS/MS) și tehnici spectroscopice pentru a analiza structural peptidele sub acțiunea fasciculului de lumină (UV-Viz, fluorescență). Totodată, proprietățile de auto-asamblare și de formare a nanostructurilor au fost determinate prin AFM, SEM și DLS. În plus, investigațiile computaționale prezente în îndeplinirea fiecărui obiectiv în parte au completat datele experimentale în vederea generării unui cadru extins al comportamentului molecular al peptidelor.

Mai mult decât atât, ultimul obiectiv a fost îndeplinit prin publicarea a 5 articole științifice cu rezultatele prezentate în această teză de doctorat, în jurnale indexate Web of Science, cumulând în momentul publicării un factor total de impact de 21,041.¹⁷⁻²¹ De asemenea, autorul acestei teze de doctorat deține calitatea de autor principal în 4 articole, iar într-o singură publicație, cel de co-autor. Totodată, rezultatele obținute au fost diseminate în cadrul a 5 conferințe internaționale sub formă de 2 prezentări orale și sub formă de 5 postere.

În consecință, cumularea tuturor rezultatele obținute în urma acestor studii poate oferi o imagine de ansamblu asupra influenței unor peptide active din punct de vedere fiziologic asupra structurilor țesutului cerebral, cât și modul prin care pot fi administrate acestea în ameliorarea simptomatologiei AD.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, Chételat G, Holtzman DM, Hyman BT, și colab. Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Primer.* 2021;7(1):1–21.
2. Behl T, Kaur I, Fratila O, Brata R, Bungau S. Exploring the potential of therapeutic agents targeted towards mitigating the events associated with amyloid- β cascade in Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci.* 2020;21(20):E7443.
3. Li F, Qin W, Zhu M, Jia J. Model-based projection of dementia prevalence in China and worldwide: 2020–2050. *J Alzheimers Dis.* 2021;82(4):1823–31.
4. Vijayan D, Chandra R. Amyloid beta hypothesis in Alzheimer's disease: major culprits and recent therapeutic strategies. *Curr Drug Targets.* 2020;21(2):148–66.
5. Selkoe DJ. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid β -protein. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;924(1):17–25.
6. Long JM, Holtzman DM. Alzheimer Disease: an update on pathobiology and treatment strategies. *Cell.* 2019;179(2):312–39.
7. Razzokov J, Yusupov M, Bogaerts A. Oxidation destabilizes toxic amyloid beta peptide aggregation. *Sci Rep.* 2019;9(1):5476.
8. Jureschi M, Lupaescu AV, Ion L, Petre BA, Drochioiu G. Stoichiometry of heavy metal binding to peptides involved in Alzheimer's disease: mass spectrometric evidence. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1140:401–15.
9. Drochioiu G, Manca M, Dragusanu M, Murariu M, Dragan ES, Petre BA, și colab. Interaction of beta-amyloid(1-40) peptide with pairs of metal ions: An electrospray ion trap mass spectrometric model study. *Biophys Chem.* 2009;144(1–2):9–20.
10. Sciacca MFM, Di Natale G, Tosto R, Milardi D, Pappalardo G. Tau/A β chimera peptides: Evaluating the dual function of metal coordination and membrane interaction in one sequence. *J Inorg Biochem.* 2020;205:110996.
11. Gattinoni L, Coppola S, Cressoni M, Busana M, Rossi S, Chiumello D. COVID-19 does not lead to a „typical” acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020;201(10):1299–300.
12. Jobke B, McBride T, Nevin L, Peiperl L, Ross A, Stone C, și colab. Setbacks in Alzheimer research demand new strategies, not surrender. *PLOS Med.* 2018;15(2):e1002518.
13. Ma C, Hong F, Yang S. Amyloidosis in Alzheimer's Disease: pathogeny, etiology, and related therapeutic directions. *Molecules.* 2022;27(4):1210.
14. Gilad Y, Firer M, Gellerman G. Recent Innovations in peptide based targeted drug delivery to cancer cells. *Biomedicines.* 2016;4(2):11.
15. Martí-Centelles R, Dolz-Pérez I, De la O J, Ontoria-Oviedo I, Sepúlveda P, Nebot VJ, și colab. Two-component peptidic molecular gels for topical drug delivery of naproxen. *ACS Appl Bio Mater.* 2021;4(1):935–44.
16. Sis MJ, Webber MJ. Sis MJ, Webber MJ. Drug Delivery with designed peptide assemblies. *Trends Pharmacol Sci.* 2019;40(10):747–62.

17. **Mocanu CS**, Drochioiu G. The Interaction of possible anti-AD ASA-NAP peptide conjugate with tubulin: A theoretical and experimental insight. *Int J Pept Res Ther*. 2021;27(4):2487–503.
18. Lupaescu AV, **Mocanu CS**, Drochioiu G, Ciobanu CI. Zinc binding to NAP-type neuroprotective peptides: Nuclear magnetic resonance studies and molecular modeling. *Pharmaceutics*. 2021;14(10):1011.
19. **Mocanu CS**, Petre BA, Darie-Ion L, Drochioiu G, Niculaua M, Stoica I, și colab. Structural characterization of a new collagen biomimetic octapeptide with nanoscale self-assembly potential: Experimental and theoretical approaches. *ChemPlusChem*. 2022;87(2):e202100462.
20. **Mocanu CS**, Niculaua M, Zbancioc G, Mangalagiu V, Drochioiu G. Novel design of neuropeptide-based drugs with β -sheet breaking potential in amyloid-beta cascade: Molecular and structural deciphers. *Int J Mol Sci*. 2022;23(5):2857.
21. **Mocanu CS**, Darie-Ion L, Petre BA, Gradinaru VR, Drochioiu G. A computational study of metal ions interaction with amyloid- β 1-42 peptide structure in the presence of hyperpyrexia: Implications for alzheimer disease. *J King Saud Univ - Sci*. 2022;102184.
22. Ghajar J. Traumatic brain injury. *Lancet Lond Engl*. 2000;356(9233):923–9.
23. Crescenzi O, Tomaselli S, Guerrini R, Salvadori S, D’Ursi AM, Temussi PA, și colab. Solution structure of the Alzheimer amyloid beta-peptide (1-42) in an apolar microenvironment. Similarity with a virus fusion domain. *Eur J Biochem*. 2002;269(22):5642–8.
24. Gremer L, Schölzel D, Schenk C, Reinartz E, Labahn J, Ravelli RBG, și colab. Fibril structure of amyloid- β (1–42) by cryo–electron microscopy. *Science*. 2017;358(6359):116–9.
25. Nowick JS. Exploring β -sheet structure and interactions with chemical model systems. *Acc Chem Res*. 2008;41(10):1319–30.
26. Gigant B, Curmi PA, Martin-Barbey C, Charbaut E, Lachkar S, Lebeau L, și colab. The 4 Å X-ray structure of a tubulin:stathmin-like domain complex. *Cell*. 2000;102(6):809–16.
27. Löwe J, Li H, Downing KH, Nogales E. Refined structure of $\alpha\beta$ -tubulin at 3.5 Å resolution. *J Mol Biol*. 2001;313(5):1045–57.
28. Oz S, Kapitansky O, Ivashco-Pachima Y, Malishkevich A, Giladi E, Skalka N, și colab. The NAP motif of activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) regulates dendritic spines through microtubule end binding proteins. *Mol Psychiatry*. 2014;19(10):1115–24.
29. Peris L, Thery M, Fauré J, Saoudi Y, Lafanechère L, Chilton JK, și colab. Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *J Cell Biol*. 2006;174(6):839–49.
30. Yamauchi O, Odani A, Takani M. Metal–amino acid chemistry. Weak interactions and related functions of side chain groups. *J Chem Soc Dalton Trans*. 2002;(18):3411–21.
31. Kwon WY, Suh GJ, Kim KS, Lee HJ, Jeong KY, Kwak YH, și colab. Niacin suppresses the mitogen-activated protein kinase pathway and attenuates brain injury after cardiac arrest in rats. *Crit Care Med*. 2013;41(9).

32. Liu SB, Han J, Zhang N, Tian Z, Li XB, Zhao MG. Neuroprotective effects of oestrogen against oxidative toxicity through activation of G-protein-coupled receptor 30 receptor. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2011;38(9):577–85.
33. Fuller DR, Conant CR, El-Baba TJ, Zhang Z, Molloy KR, Zhang CS, și colab. Monitoring the stabilities of a mixture of peptides by mass-spectrometry-based techniques. *Eur J Mass Spectrom Chichester Engl*. 2019;25(1):73–81.
34. Cook SL, Zimmermann CM, Singer D, Fedorova M, Hoffmann R, Jackson GP. Comparison of CID, ETD and metastable atom-activated dissociation (MAD) of doubly and triply charged phosphorylated tau peptides. *J Mass Spectrom*. 2012;47(6):786–94.
35. Medzihradszky KF, Campbell JM, Baldwin MA, Falick AM, Juhasz P, Vestal ML, și colab. The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. *Anal Chem*. 2000;72(3).
36. Qiu Y, Hemu X, Liu DX, Tam JP. Selective bi-directional amide bond cleavage of N-methylcysteinyl peptide. *Eur J Org Chem*. 2014;2014(20):4370–80.
37. Hegde AN, van Leeuwen FW. Editorial: Ubiquitin and the brain: Roles of proteolysis in the normal and abnormal nervous system. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:220.
38. Lo EH, Wang X, Cuzner ML. Extracellular proteolysis in brain injury and inflammation: Role for plasminogen activators and matrix metalloproteinases. *J Neurosci Res*. 2002;69(1):1–9.
39. Okamoto A, Hosoda N, Hoshino S ichi. Proteolysis: a double-edged sword for the development of amyloidoses. *Prion*. 2018;12(5–6):273–9.
40. Gusev A, Shul'gin V, Braga E, Zamnius E, Starova G, Lyssenko K, și colab. Luminescent properties of zinc complexes of 4-formylpyrazolone based azomethine ligands: Excitation-dependent emission in solution. *J Lumin*. 2018;202:370–6.
41. Pignataro MF, Herrera MG, Doderio VI. Evaluation of peptide/protein self-assembly and aggregation by spectroscopic methods. *Molecules*. 2020;25(20):4854.
42. Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc*. 1963;85(14):2149–54.

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE

Rezultatele prezentate în această teză de doctorat au fost valorificate prin publicarea a 5 articole științifice în jurnale indexate Web of Science, cumulând în momentul publicării un factor total de impact de 21,041, după cum urmează:

1. **Cosmin Stefan Mocanu**, Gabi Drochioiu. The interaction of possible anti-AD ASA-NAP peptide conjugate with tubulin: A theoretical and experimental insight. International Journal of peptide Research and Therapeutics 2021, 1-17. IF = 1,931
<https://doi.org/10.1007/s10989-021-10267-z>
2. Ancuta-Veronica Lupaescu, **Cosmin Stefan Mocanu**, Gabi Drochioiu, Catalina Ionica Ciobanu. Zinc Binding to NAP-type neuroprotective peptide: Nuclear magnetic resonance studies and molecular modeling. Pharmaceuticals 2021, 14(10), 1011 . IF = 5,863
<https://doi.org/10.3390/ph14101011>
3. **Cosmin Stefan Mocanu**, Brindusa Alina Petre, Laura Darie-Ion, Gabi Drochioiu, Marius Niculaua, Iuliana Stoica, Mihaela Homocianu, Loredana Elena Nita, Robert Gradinaru. Structural characterization of a new collagen biomimetic octapeptide with nanoscale self-assembly potential: Experimental and theoretical approaches. ChemPlusChem 2022 87(2), e202100462. IF = 3,210
<https://doi.org/10.1002/cplu.202100462>
4. **Cosmin Stefan Mocanu**, Marius Niculaua, Gheorghiță Zbancioc, Violeta Mangalagiu, Gabi Drochioiu. Novel design of neuropeptide-based drugs with β -sheet breaking potential in amyloid-beta cascade: Molecular and structural deciphers. International Journal of Molecular Sciences 2022, 23(5), 2857. IF = 6,208
<https://doi.org/10.3390/ijms23052857>

5. **Cosmin Stefan Mocanu**, Laura Darie-Ion, Brindusa Alina Petre, Vasile Robert Gradinaru, Gabi Drochioiu. A computational study of metal ions interaction with amyloid- β 1-42 peptide structure in the presence of hyperpyrexia: Implications for Alzheimer disease. Journal of King Saud University – Science 2022, 102184. IF = 3,829
<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102184>

LISTA DE LUCRĂRI PREZENTATE LA MANIFESTĂRILE ȘTIINȚIFICE

O parte din rezultatele obținute în cadrul cercetărilor doctorale au fost diseminate în cadrul a 5 conferințe internaționale sub formă de 2 prezentări orale și 5 postere, după cum urmează:

Prezentări orale

1. **Cosmin Stefan Mocanu**, Gabi Drochioiu. A theoretical and experimental perspective on the involvement of amyloid-beta peptide in Alzheimer disease, Abstract in Young Researchers international Conference on Chemistry and Chemical Engineering III, Cluj, Romania, 2021.
<http://www.chem.ubbcluj.ro/~schr/yricc2020/index.html>
2. Vasile Robert Gradinaru, **Cosmin Stefan Mocanu**, Brindusa Alina Petre, Laura Darie Ion, Gabi Drochioiu, Mihaela Homocianu, Loredana Elena Nita. A new bioinspired peptide with potential self-assembly properties, Abstract in International Conference of Bulgarian peptide Society, Velingrad, Bulgaria, 2021.
http://bulpepsoc.info/?page_id=717

Postere

1. Laura Ion, Jureschi Monica, **Cosmin Stefan Mocanu**, Ancuta Lupaescu, Brindusa Alina Petre, Gabi Drochioiu. Heavy metal ions binding to beta-amyloid and anti-amyloid peptides, Abstract in ICMS XXIII Proceedings Book, 23rd International Conference on Multidisciplinary Studies: “Resilience for Survival”, Vol 2, pp. 366, 2020.

https://books.revistia.com/files/proceedings/icms23_proceedings_v2_ISBN_9781649991584.pdf

2. **Cosmin Stefan Mocanu**, Gabi Drochioiu. Structural and biocompatibility improvements of NAP peptide-based drugs: A neuroprotective pathway, Abstract in Young Researchers international Conference on Chemistry and Chemical Engineering III, Cluj, Romania, 2021.

<http://www.chem.ubbcluj.ro/~schr/yriccce2020/index.html>

3. Laura Darie-Ion, Gabi Drochioiu, Stefania Claudia Jitaru, **Cosmin Stefan Mocanu**, Brindusa Alina Petre. Drug-peptide conjugates: Solid phase synthesis and mass spectrometric characterization, Abstract in 21st International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM, Albena, Bulgaria, 2021.

<https://www.sgem.org/>

4. **Cosmin Stefan Mocanu**, Gabi Drochioiu. A systematic approach of molecular neurodegeneration and neuroprotective pathways through Protein Data Bank structures: A theoretical study of Alzheimer's disease, EMBL Conference: Bringing Molecular Structure to Life: 50 Years of the PDB, Heidelberg, Germany, 2021.

<https://www.embl.org/about/info/course-and-conference-office/events/pdb21-01/>

5. **Cosmin Stefan Mocanu**, Vasile Robert Gradinaru, Gabi Drochioiu. Metal ions interaction with amyloid-beta monomer and fibril, a theoretical and experimental approach: Implications for Alzheimer disease progression, Abstract in International Conference of Bulgarian peptide Society, Velingrad, Bulgaria, 2021.

http://bulpepsoc.info/?page_id=717