

UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI

FACULTATEA DE CHIMIE

ȘCOALA DOCTORALĂ DE CHIMIE

**Peptide scurte cu proprietăți de
autoasamblare: sinteză, caracterizare și
potențiale aplicații**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat,

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

Student-doctorand,

Chimist **Ștefania-Claudia Jitaru**

IASI

2025

COMPONENȚA COMISIEI DE DOCTORAT

Președinte:

Conducător de doctorat:

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

Universitatea "Alexandru Ioan Cuza" din Iași

Referenți științifici:

MULȚUMIRI

Înainte de toate, doresc să adresez sincere mulțumiri conducătorului științific, **Prof. univ. dr. Gabi Drochioiu**, pentru îndrumarea și sprijinul oferit de-a lungul parcursului studiilor de doctorat.

Totodată, doresc să le mulțumesc membrilor comisiei de îndrumare formată din **Prof. univ. dr. Aurel PUI**, **Conf. univ. dr. Robert Grădinaru** și **CS III Dr. Dana Suflet** pentru observațiile valoroase, criticile constructive și sprijinul oferit în conturarea tezei de doctorat.

Le mulțumesc cu deosebită recunoștință doamnei **Conf. univ. dr. habil. Brîndușa - Alina Petre** și domnului **Conf. univ. dr. Robert Grădinaru** pentru colaborarea strânsă, îndrumarea constantă, răbdarea și susținerea oferită în toți acești ani.

De asemenea, le mulțumesc doamnei **Dr. Laura Darie-Ion** și domnului **Dr. Cosmin Ștefan Mocanu** pentru împărtășirea cunoștințelor și instruirea acordată în cadrul Laboratorului de Biochimie. Totodată, doresc să adresez mulțumiri doamnei **Dr. Olga Pintilie** și doamnei **Chim. Elena Mihalcea** pentru suportul moral oferit.

Îi mulțumesc doamnei **Dr. Iuliana Stoica** pentru sprijinul acordat în analiza și evaluarea probelor prin AFM, care au adus un plus de valoare cercetărilor din această teză.

Doresc să le mulțumesc domnilor **Conf. univ. dr. Andrei Neamțu** și **Dr. Cornel Cojocaru** pentru colaborarea și expertiza valoroasă privind studiile in silico, care au contribuit semnificativ la obținerea unor noi perspective în raport cu rezultatele experimentale.

Le mulțumesc doamnelor **Dr. Dumitrelea Diaconu** și **Dr. Violeta Mangalagiu** pentru ajutorul oferit în cadrul achiziției de date a spectrelor de masă ESI-MS. În plus, doresc să adresez mulțumiri domnului **Chim. Alexandru Puiu** pentru generozitatea de a-mi pune la dispoziție peptida FEHNF, utilizată în studiile preliminare privind procesul de autoasamblare.

Mulțumesc totodată proiectului **POCU/993/6/13/153322** care a facilitat printr-un stagiul de practică colaborarea cu doamna **Dr. Andra-Cristina Enache** din cadrul Institutului de Chimie Macromoleculară „Pentru Poni” (ICMPP), căreia îi sunt extrem de recunoscătoare pentru implicarea de care a dat dovadă în calitate de mentor.

Nu în ultimul rând, mulțumesc colegilor de la centrul **TRANSCEND** din cadrul **Institutului Regional de Oncologie din Iași**, celor de la **Institutul de Chimie Macromoleculară „Pentru Poni” (ICMPP) din Iași** și **Centrul Integrat în Știința Mediului din Regiunea de Nord-Est – CERNESIM** pentru accesul la infrastructură.

CUPRINS

INTRODUCERE	1
PARTEA ÎNTÂI. STUDIU DE LITERARURĂ.....	4
I. PEPTIDE SCURTE CU PROPRIETĂȚI DE AUTOASAMBLARE	4
I.1. NOȚIUNI GENERALE	4
I.1.1. Aminoacizi	4
I.1.2. Proteine. Structură	6
I.1.3. Procesul de autoasamblare	7
I.2. IMPLICAȚII BIOMEDICALE.....	9
I.2.1. Peptide scurte cu potențial terapeutic.....	9
I.2.2. Secvențe peptidice amiloidogenice.....	12
I.2.3. Interacțiunea cu ioni metalici	14
I.3. FIBRILE AMILOIDICE	20
I.3.1. Structura β -încrucișată	20
I.3.2. Factorii care influențează apariția amiloidului.....	21
I.3.3. Etapele de formare.....	22
I.4. METODE DE SINTEZĂ.....	24
I.4.1. Sinteza în fază solidă a peptidelor	24
I.4.1.1. Principiul SPPS.....	25
I.4.1.2. Clasificarea SPPS.....	28
I.4.1.3. Suportul solid	29
I.5. METODE CROMATOGRAFICE DE SEPARARE ȘI PURIFICARE	30
I.5.1. Cromatografia de lichide de înaltă performanță în fază inversată	30
I.5.1.1. Faza staționară.....	30
I.5.1.2. Faza mobilă	31
I.5.2. Extracția pe suport solid în fază inversată	32
I.6. METODE DE CARACTERIZARE	32
I.6.1. Spectrometria de masă de tip MALDI-ToF	32
I.6.2. Spectrometria de masă în tandem MS/MS.....	34
I.6.2.1. Disocierea indusă de coliziune	34
I.6.2.2. Disocierea indusă de laser	35
I.6.3. Spectroscopia UV-viz.....	35
I.6.4. Spectrofluorimetria	36
I.7. TEHNICI DE ANALIZĂ MICROSCOPICĂ.....	37
I.7.1. Microscopia de forță atomică	37
I.7.2. Microscopia optică în lumină polarizată	39
PARTEA A DOUA. CONTRIBUȚII PERSONALE	41

II. PEPTIDA CU PROPRIETĂȚI DE AUTOASAMBLARE FESNF-NH₂	41
II.1. MATERIALE ȘI METODE	42
II.1.1. Reactivi	42
II.1.2. Sinteza secvenței FESNF-NH ₂	43
II.1.3. Cromatografia de lichide de înaltă performanță în fază inversată	44
II.1.4. Spectrometria de masă de tip MALDI-ToF	45
II.1.5. Spectrometria de masă de tip ESI-MS	45
II.1.6. Studii spectrofotometrice și spectrofluorimetrice	45
II.1.7. Microscopia de forță atomică	47
II.1.8. Simulări de dinamică moleculară	47
II.2. SINTEZĂ, PURIFICARE ȘI CARACTERIZARE	48
II.2.1. Analiza prin cromatografia de lichide de înaltă performanță	48
II.2.2. Analiza prin spectrometrie de masă de tip MALDI-ToF	49
II.2.2.1. Analiza prin spectrometrie de masă în tandem	50
II.2.2.2. Identificarea produsului secundar	52
II.2.3. Analiza prin spectrometrie de masă de tip ESI-MS	54
II.3. STUDII SPECTRALE	55
II.4. STUDII DE AGREGARE	58
II.5. STUDIUL PROPRIETĂȚILOR DE AUTOASAMBLARE PRIN AFM	61
II.6. STUDII IN SILICO	63
II.6.1. Simulări moleculare cu schimb de replici	63
II.6.2. Simulări moleculare cu granulație grosieră	66
II.7. INTERACȚIUNEA PEPTIDEI CU IONII DE CUPRU (II)	67
II.7.1. Studii UV-viz	67
II.7.2. Studii spectrofluorimetrice	68
II.7.3. Analiza spectrometrică de masă de tip MALDI-ToF	70
II.7.4. Microscopia optică cu lumină polarizată	71
II.8. CONCLUZII	73
III. PEPTIDE MUTANTE CU PROPRIETĂȚI DE AUTOASAMBLARE	76
III.1. ALEGEREA SECVENȚELOR PEPTIDICE MUTANTE	76
III.2. MATERIALE ȘI METODE	77
III.2.1. Reactivi	77
III.2.2. Sinteza peptidelor în fază solidă	77
III.2.3. Analiza calitativă prin cromatografie de lichide de înaltă performanță	79
III.2.4. Extracția solidă în fază inversată	80
III.2.5. Analiza prin spectrometrie de masă de tip MALDI-ToF	80

II.2.5.1. Calibrarea instrumentului.....	82
III.2.6. Analiza spectrofluorimetrică	84
III.2.7. Protocol de pregătire a probelor pentru incubare în condiții fiziologice.....	84
III.2.8. Studii in silico	85
III.3. PEPTIDA MUTANTĂ FEYNF-NH ₂	85
III.3.1. Analiza calitativă prin RP-HPLC	85
III.3.2. Separare și purificare	86
III.3.3. Analize spectrometrice de masă de tip MALDI-ToF și MS/MS.....	86
III.3.4. Analiza prin spectrometrie de masă de tip ESI-MS	89
III.3.5. Caracterizarea proprietăților de autoasamblare.....	90
III.3.5.1. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier.....	90
III.3.5.2. Studii de fluorescență	93
III.3.5.3. Analiza prin microscopie electronică de transmisie	94
III.3.5.4. Analiza prin microscopie cu lumină polarizată	96
III.3.6. Studii in silico	99
III.3.6.1. Perspective asupra mecanismului de autoasamblare	99
III.3.6.2. Studiul formării structurii β-pliate	103
III.3.6.3. Potențiale implicații în formarea poliplecșilor	106
III.4. PEPTIDA MUTANTĂ FESNY-NH ₂	111
III.4.1. Analiza calitativă prin cromatografie de lichide de înaltă performanță	111
III.4.2. Analiza prin spectrometrie de masă de tip MALDI-ToF și MS/MS	112
III.4.3. Analiza spectrometrică de masă de tip ESI-MS	115
III.4.4. Separare și purificare prin extracție în fază solidă.....	116
III.4.5. Analiza prin microscopie cu lumină polarizată	118
III.5. PEPTIDA MUTANTĂ FEHNF-NH ₂	119
III.5.1. Analiza prin spectrometrie de masă de tip ESI-MS	119
III.5.2. Analiza prin microscopie cu lumină polarizată	120
III.6. CONCLUZII	123
CONCLUZII GENERALE	125
BIBLIOGRAFIE	130
DISEMINAREA REZULTATELOR.....	149
Articole	149
Participări conferințe	149
Proiecte.....	152
ABREVIERI	153

INTRODUCERE

În ultimii ani, oligopeptidele au căpătat o importanță tot mai mare în domenii precum biologia, chimia și medicina, atrăgând atenția comunității științifice datorită caracteristicilor remarcabile, care variază de la proprietăți antibacteriene până la comportamente fotoactive (Abbas și colab., 2022; Sun și colab., 2019). Peptidele ultra-scurte, definite ca având până la 7 aminoacizi, sunt studiate în special pentru capacitatea de a facilita transportul și eliberarea țintită a medicamentelor (Apostolopoulos și colab., 2021; Yang și colab., 2023). În plus, proprietățile distincte ale peptidelor scurte le conferă un potențial ridicat pentru o gamă variată de aplicații, cum ar fi realizarea matricilor pentru culturile celulare (Restu și colab., 2020), proceselor de regenerare tisulară (Ross și colab., 2022) și dezvoltarea biosenzorilor (Sfragano și colab., 2021). Studiile recente au subliniat importanța peptidelor scurte în terapia genică avansată (Riley și Vermerris, 2017). Principalele obiective ale tezei „*Peptide scurte cu proprietăți de autoasamblare: sinteză, caracterizare și potențiale aplicații*” au fost următoarele:

O1. Selectarea unei secvențe peptidice inspirate din secvențe naturale și sinteza acestuia prin metoda în fază solidă, în vederea studiului proprietăților de autoasamblare.

O2. Realizarea sintezei unor variante mutante cu tirozină de la peptida selectată cu proprietăți de autoasamblare, în vederea evaluării influenței acestuia în mecanismul de autoasamblare.

O3. Optimizarea purificării și separării peptidelor obținute prin cromatografia de lichide de înaltă performanță în fază inversată și extracție pe suport solid în fază inversată.

O4. Caracterizarea peptidelor prin tehnici analitice avansate, cum ar fi spectrometria de masă de tip MALDI-ToF, spectrometrie de masă în tandem și spectrometria de masă de tip ESI-MS cu scopul de a confirma masa moleculară, puritatea și integritatea structurală a compușilor obținuți.

O5. Stabilirea caracteristicilor spectrale ale peptidei FESNF prin studii UV-viz și spectrofluorimetrie, precum și investigarea capacității acestuia de agregare și de formare a complexilor cu ioni de Cu(II).

O6. Investigarea procesului de autoasamblare al peptidelor nou sintetizate prin tehnici microscopice precum microscopia de forță atomică (AFM), microscopia optică în lumină polarizată (POM) și microscopia electronică de transmisie (TEM).

O7. Aprofundarea în vederea cercetărilor mecanismului de autoasamblare a peptidei FEYNF prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) și studii spectrofluorimetrice.

O8. Utilizarea unor metode complementare, cum ar fi studiile *in silico*, pentru aprofundarea înțelegerii mecanismelor de autoasamblare ale peptidelor și cercetarea potențialelor aplicații biomedicale.

O9. Diseminarea rezultatelor obținute prin publicarea acestora în jurnale științifice recunoscute, cu factor de impact, și prin participarea la conferințe internaționale și naționale.

PARTEA A DOUA. CONTRIBUȚII PERSONALE

II. PEPTIDA CU PROPRIETĂȚI DE AUTOASAMBLARE FESNF-NH₂

Pentapeptida FESNF-NH₂ a fost selectată pentru studiul proprietăților de autoasamblare, datorită potențialului său de a forma structuri organizate prin interacțiuni specifice între resturile de aminoacizi constituenți și a relevanței biologice. **Figura II.1** prezintă localizarea secvenței peptidei FESNF atât în cadrul lizozimei din albușul de ou de găină (regiunea 34–38), cât și în proteina CHAMP1 (regiunea 772–776). Lizozima din albușul de ou de găină prezintă o structură foarte similară cu cea a lizozimei umane, care are capacitatea de a se autoasambla în fibrile amiloide și este implicată în apariția bolilor amiloide. Astfel, acesta a fost utilizat frecvent *in vitro* ca proteină model pentru studiul formărilor fibrilelor (Wang și colab., 2021). În plus, mutațiile de la nivelul genei CHAMP1 au fost asociate cu o formă rară de dizabilitate intelectuală.

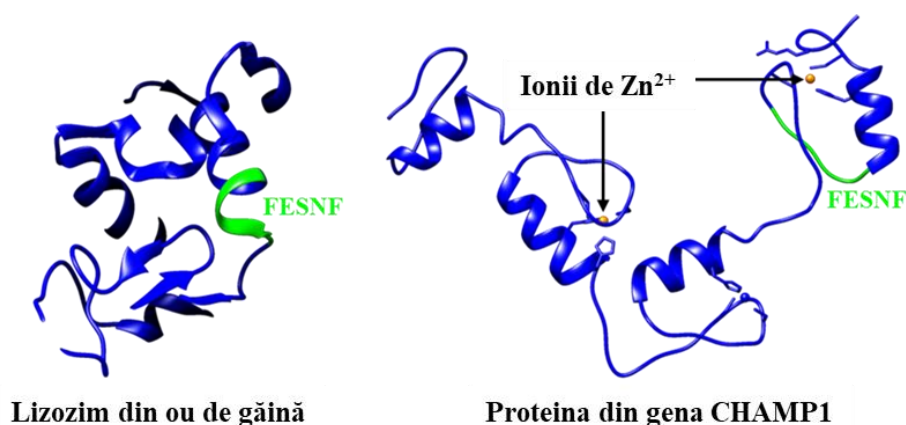


Figura II.1. Reprezentări structurale ale lizozimei din albuș de ou de găină (stânga, PDB: 1DPX) și a proteinei CHAMP1 (dreapta, F1MFQ9, SWISS MODEL) obținută utilizând UCSF Chimera versiunea 1.14. Regiunea în care se află secvența FESNF a fost marcată cu verde, iar ionii de zinc cu portocaliu.

II.2. SINTEZĂ, PURIFICARE ȘI CARACTERIZARE

II.2.1. Analiza prin cromatografia de lichide de înaltă performanță

Pentapeptida FESNF a fost obținută cu succes utilizând sinteza peptidelor în fază solidă (SPPS) și purificată prin cromatografie de lichide de înaltă performanță în fază inversată (RP-HPLC). Inițial, analiza HPLC a evidențiat doi compuși (**Figura II.2.1**, stânga), indicând prezența peptidei de interes și a unui produs de sinteză secundar (Jitaru și Drochioiu, 2023). Puritatea inițială a peptidei brute a fost estimată la 79% și, respectiv, 77% pe baza semnalelor înregistrate la 215 nm, respectiv 220 nm. Eluția produsului secundar a avut loc la aproximativ două minute

după eluția peptidei de interes, indicând un caracter hidrofob mai pronunțat. După două runde de purificare, puritatea peptidei a crescut la 96% (**Figura II.2.1**, dreapta). În continuare, greutatea moleculară a peptidei purificate și a produsului secundar au fost analizate utilizând spectrometria de masă cu timp de zbor cu desorbție/ionizare laser asistată de matrice (MALDI-ToF MS) și MALDI-ToF/ToF.

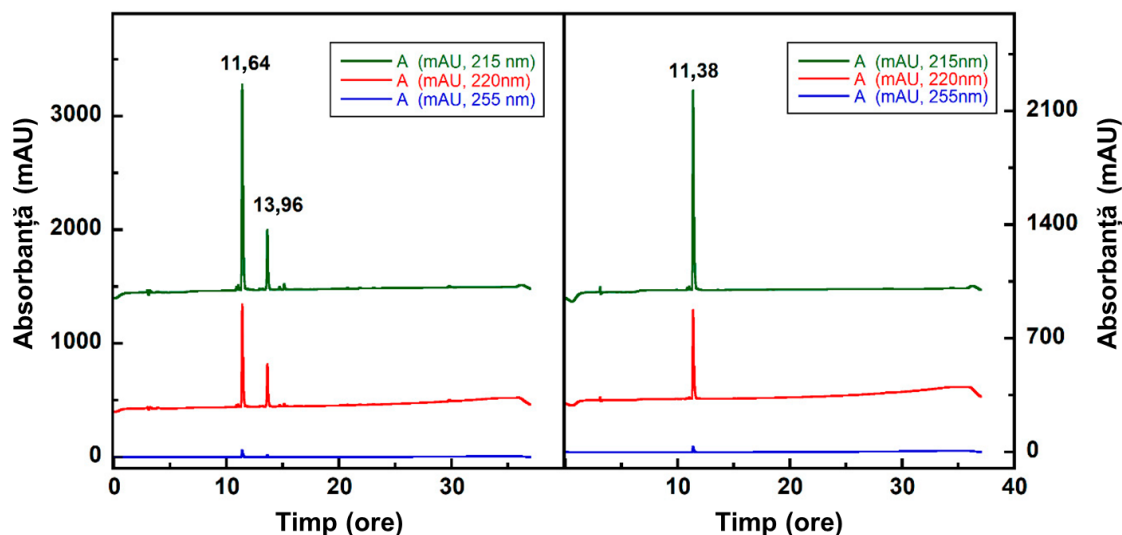


Figura II.2.1. Cromatogramele HPLC corespunzătoare peptidei brute (stânga) și peptidei FESNF purificate (dreapta) obținute prin monitorizarea la trei lungimi de undă (215, 220 respectiv 255 nm).

II.2.2. Analiza prin spectrometrie de masă de tip MALDI-ToF

Determinarea greutății moleculare și a purității peptidei s-a realizat prin spectrometrie de masă, utilizând metodele MALDI-ToF și MALDI-ToF/ToF (**Figura II.2.2**). Analiza MS a compusului eluat la timpul de retenție de 11,64 min confirmă obținerea cu succes a peptidei FESNF-NH₂. Inițial, proba a fost co-cristalizată cu matricile HCCA și DHB în scopul analizei prin MALDI-ToF. Spectrele de masă obținute au prezentat semnale mai intense în cazul utilizării matricei DHB, indicând o eficiență mai bună a ionizării. În plus, cristalele formate cu DHB au fost de dimensiuni mai mari, sugerând condiții mai favorabile analizei spectrometrice (**Figura II.2.2**).

Spectrul de masă a indicat prezența ionului molecular $[M+H]^+$ la m/z 642,48. De asemenea, au fost observați aducții de sodiu, $[M+Na]^+$, și potasiu, $[M+K]^+$, la m/z 664,46, respectiv m/z 680,44 (**Figura II.2.3**). Valorile experimentale au fost comparate cu cele teoretice calculate cu ajutorul software-ului GPMW. În plus, analiza secvenței peptidice prin MS/MS a fost folosită pentru a confirma structura primară a peptidei FESNF-NH₂.

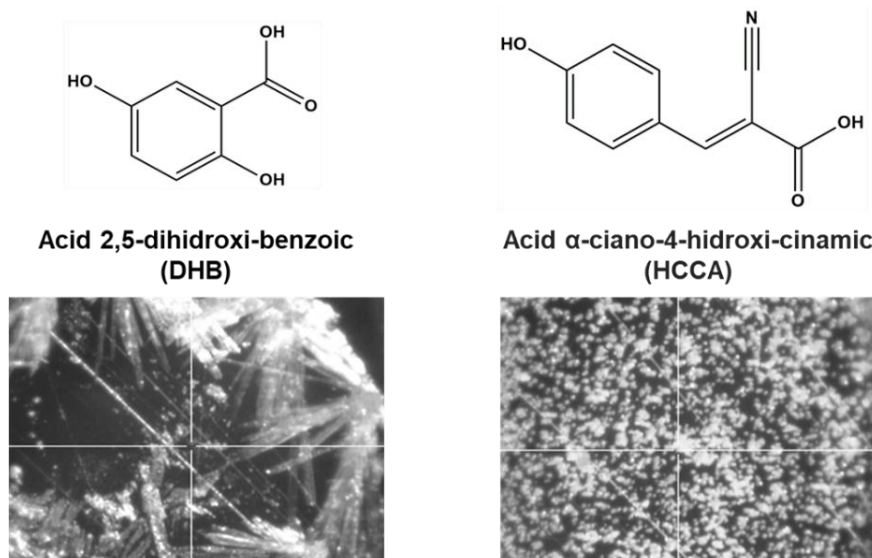


Figura II.2.2. Comparație vizuală privind co-cristalizarea peptidei FESNF-NH₂ cu două matrici diferite: DHB, respectiv, HCCA. Imagini înregistrate cu ajutorul camerei din dotarea spectrometrului de masă MALDI-ToF.

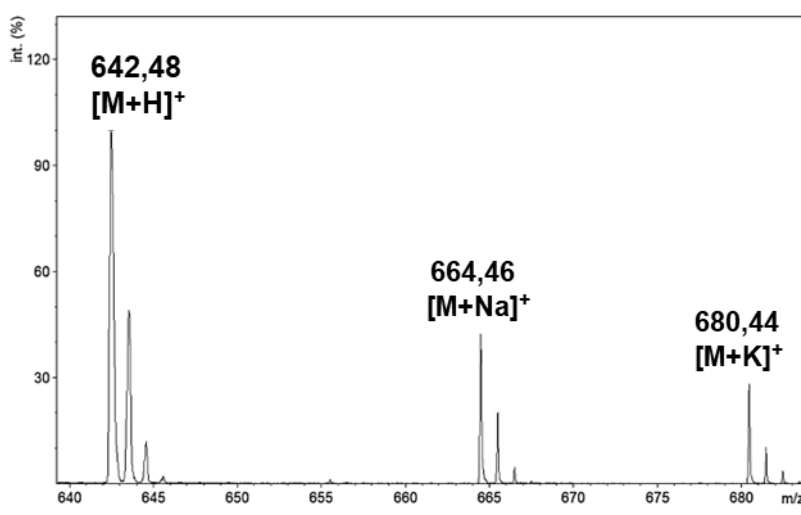


Figura II.2.3. Spectrul de masă MALDI-ToF al peptidei FESNF obținut utilizând matricea DHB.

II.2.2.1. Analiza prin spectrometrie de masă în tandem

Conform așteptărilor, fragmentarea ionului molecular al peptidei de interes, la m/z 642,48, a generat mai mulți ioni monovalenți de tip b^+ și y^+ , precum și specii rezultate prin eliminarea unor molecule neutre, precum apă (H₂O), amoniac (NH₃) și dioxid de carbon (CO₂) (**Figura II.2.4**). Modul de fragmentare structurală al peptidei FESNF poate fi observat în **Figura II.2.5**. Pierderea de apă poate fi atribuită fragmentelor de glutamat și serină, iar deviația de 17 Da asociată cu eliberarea de amoniac poate fi atribuită capătului N-terminal al pentapeptidei sau eliberării apei împreună cu un decalaj izotopic (Sun și colab., 2008). În cazul fragmentelor y_2^+ ,

y_3^+ și b_4^+ , eliminarea amoniacului ar putea proveni de la gruparea amino-liberă din lanțul lateral al asparaginei (Tabb și colab., 2006). Pe de altă parte, pierderea dioxidului de carbon, observată atât pentru ionul molecular, cât și pentru speciile sale deshidratate, poate proveni din decarboxilarea restului de glutamat (Jackson și colab., 2011).

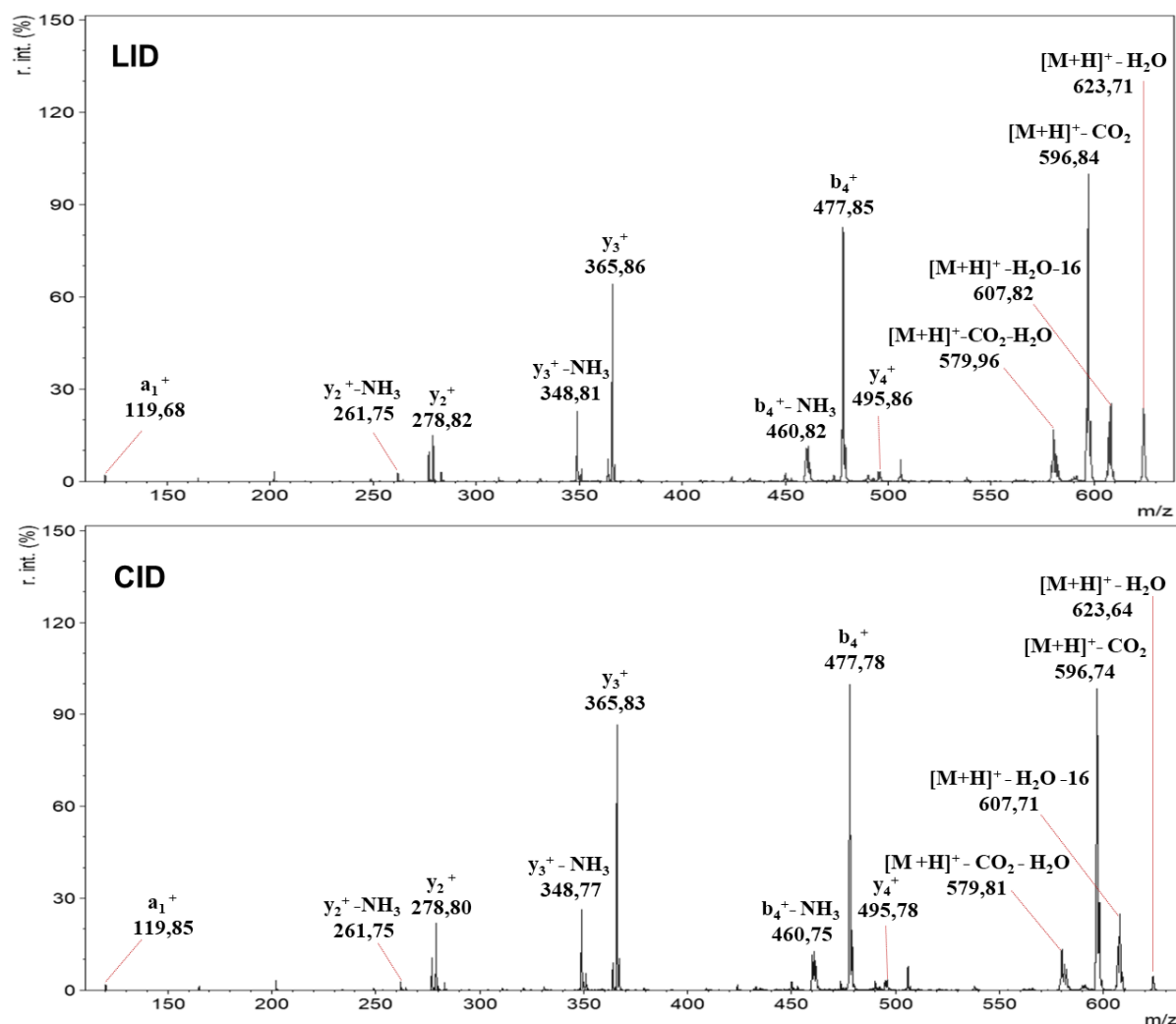


Figura II.2.4. Atribuirea semnalelor m/z rezultate din analiza prin spectrometrie de masă în tandem de tip MALDI-ToF MS/MS, utilizând matricea DHB. Fragmentarea ionului molecular $[FESNF + H]^+$ (m/z 642) s-a realizat prin disociere indusă de laser (LID), respectiv disociere indusă de coliziune (CID) (pentru fracțiunea colectată la minutul 11,64 la separarea cromatografică de tip RP-HPLC).

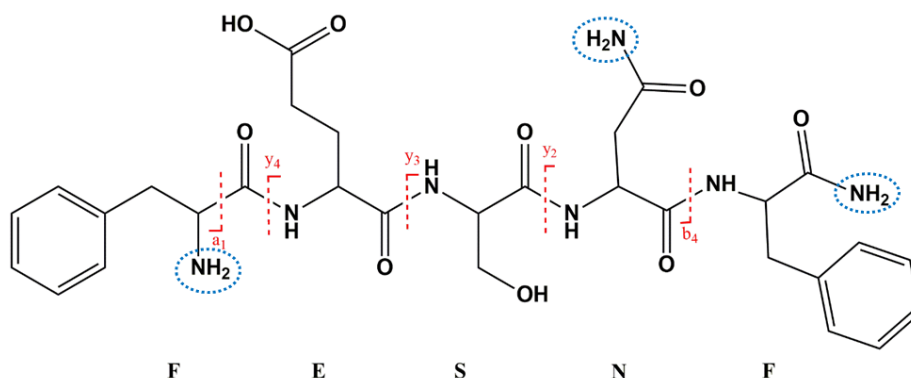


Figura II.2.5. Evidențierea tipurilor preferențiale de fragmentare observate experimental în cazul pentapeptidei FESNF-NH₂ la analiza prin spectrometrie de masă în tandem.

II.2.3. Analiza prin spectrometrie de masă de tip ESI-MS

Spectrul de masă ESI-MS (**Figura II.2.9**) confirmă identitatea peptidei FESNF-NH₂, semnalul cel mai intens corespunzând ionului molecular ([M+H]⁺), la m/z = 649,28. De asemenea, spectrul indică prezența aducților de sodiu [M+Na]⁺, la m/z = 664,26, și potasiu [M+2K-H]⁺, la m/z = 718,31. În plus, semnalul de la m/z = 1283,56 ([2M+H]⁺) indică tendința intrinsecă a peptidei de a forma dimeri (Pan, 2008).

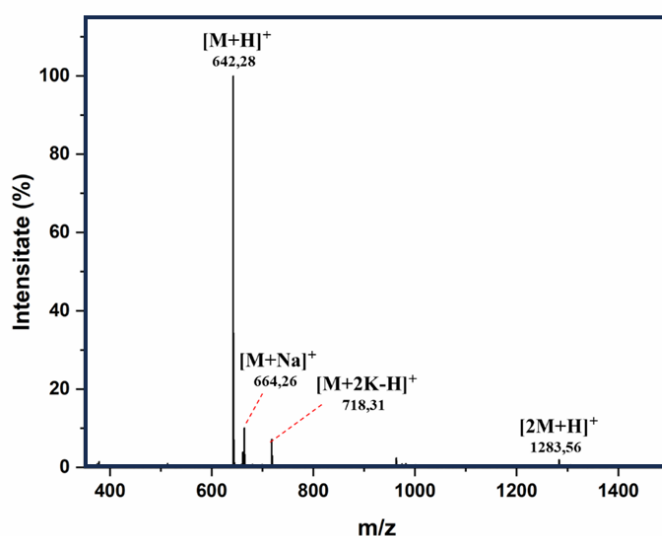


Figura II.2.9. Spectrul de masă ESI-MS al peptidei FESNF-NH₂.

II.3. STUDII SPECTRALE

Analiza spectroscopică a peptapeptidei FESNF-NH₂ evidențiază două semnale caracteristice, atribuite resturilor de fenilalanină de la extremitățile N- și C-terminale. Prezența aminoacizilor aromatici poate favoriza procesul de autoasamblare al peptidei. Pentru a evalua

potențialul de implicare al peptidei în interacțiuni cu ioni metalici, prezența și comportamentul resturilor aromatice au fost analizate prin spectroscopie UV-viz și spectrofluorimetrie.

Spectrul UV-viz al peptapeptidei a fost înregistrat în soluția tampon Tris pentru a stabili amprenta caracteristică a resturilor de fenilalanină. Astfel, vârful cel mai intens observat la 258 nm a fost însoțit de patru umeri spectrali la 247, 252, 263 și 267 nm, atât la pH 7,3, cât și la pH 7,0 (**Figura II.3.1**). Un profil spectroscopic similar a fost observat utilizând soluția tampon PIPES 30 mM, pH 6,5, la o concentrație a peptidei de 200 μ M. Aceste rezultate sunt în concordanță cu datele raportate anterior pentru peptidele ce conțin fenilalanină (Barazzouk și Daneault, 2012; Rodger, 2018). Soluția diluată de peptidă (41 μ M) prezintă o bandă spectrală, caracteristică grupării amidice, prezentă la 203 nm (A_{203} 0,97), în condiții de pH 7,3. Fenilalanina poate acționa drept intermediar pentru transferul de electroni între regiuni îndepărtate din structura peptidică (Nathanael și colab., 2018). Contribuția modestă a fenilalaninei la fluorescența intrinsecă a peptidei poate fi explicată prin randamentul său cuantic scăzut (Lakowicz, 2006).

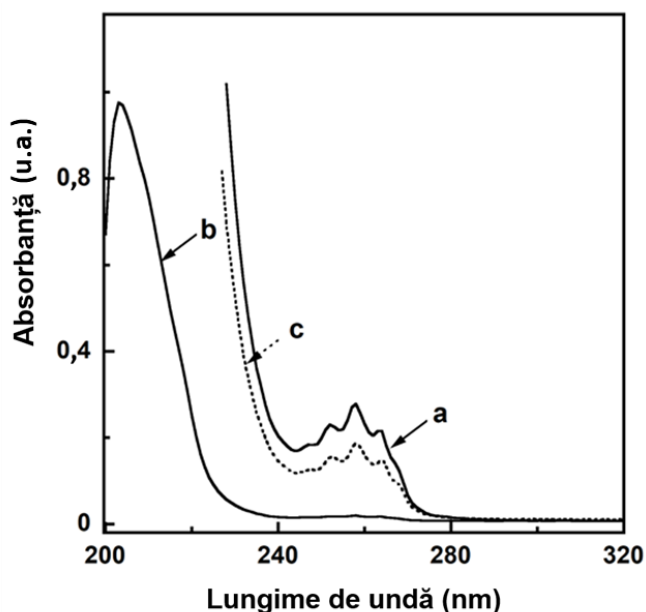


Figura II.3.1. Spectrele UV-viz ale pentapeptidei FESNF în Tris 30 mM pH 7,3 (a și b, 826 μ M și 41 μ M) și acetat 40 mM pH 7,0 (600 μ M, spectru c, punctat).

Totodată, măsurătorile spectrofluorimetrice scot în evidență trăsături spectrale specifice peptidelor care conțin resturi de fenilalanină. Spectrul de emisie al peptidei FESNF-NH₂ în soluție tampon Tris 30 mM, pH = 7,3, la lungimea de undă de excitație de 258 nm, prezintă un maxim la 282 nm și un umăr la 290 nm. Se poate observa o bună linearitate între intensitatea semnalului de fluorescență și concentrația peptidei în intervalul de concentrație 25–250 μ g/mL,

la lungimea de undă de emisie de 282 nm (**Figura II.3.2 - Inserție**). În mod analog, a fost măsurat spectrul de emisie al peptidei în acetat de sodiu 50 mM, pH = 5,05, și s-a constatat un profil asemănător. Conform așteptărilor, spectrele de excitație prezintă un maxim la 258 nm (**Figura II.3.3 – spectre punctate**).

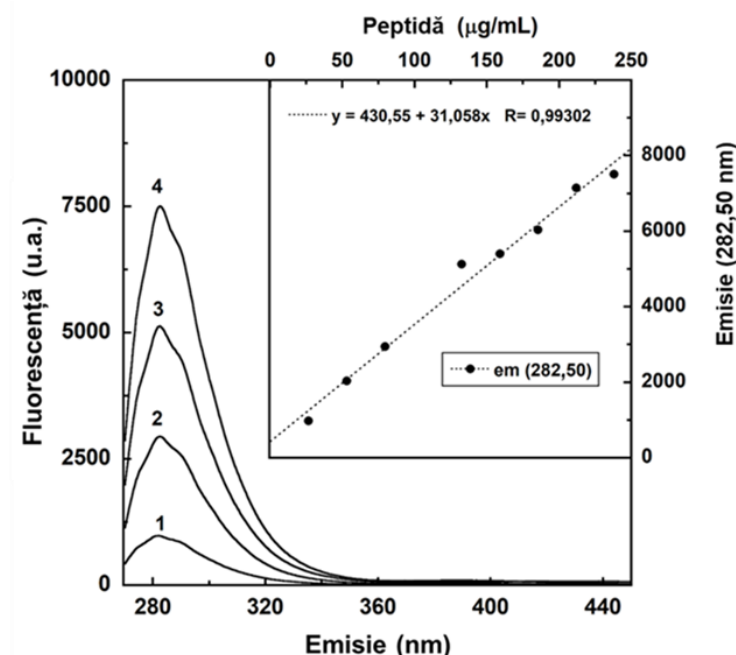


Figura II.3.2. Spectrele de emisie ale pentapeptidei FESNF-NH₂ (1, 2, 3 și 4 la 26; 80; 132 și 238 μg/mL) în soluție tampon Tris 30 mM, pH 7,3. *Inserție*: intensitatea fluorescenței în funcție de concentrația peptidei.

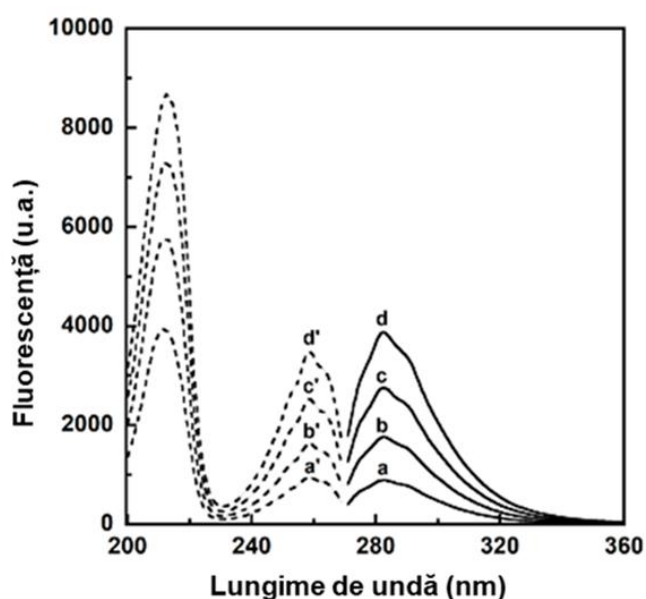


Figura II.3.3. Spectrele de emisie la patru concentrații diferite de peptidă (39, 78, 132 și 176 μM – a, b, c și d; linii continue) obținute pentru $\lambda_{\text{excitație}} = 258$ nm și spectrele de excitație corespunzătoare (a', b', c' și d'; linii discontinue) înregistrate la $\lambda_{\text{emisie}} = 282$ nm, în soluție de acetat de sodiu 50 mM, pH = 5,05.

II.4. STUDII DE AGREGARE

De obicei, stabilitatea fizică a peptidelor și proteinelor este influențată de mai mulți factori. Capacitatea unei peptide de a forma agregate poate fi influențată de secvența de aminoacizi, sarcina netă a peptidei și concentrația acesteia (Zapadka și colab., 2017).

Indicele de agregare (IA) este un parametru important care indică tendința unei peptide de a forma agregate în soluție, mai ales atunci când valoarea acestuia este mai mare de 3. S-a demonstrat că fenilalanina are capacitatea de a forma fibrile în PBS la 37°C (Anand și colab., 2017). Mai mult, prezența resturilor de fenilalanină în hexapeptide, în agregatele cu structură β -pliata încrucișată și în speciile asemănătoare amiloidului, a fost raportată anterior în literatură (Rousseau și colab., 2006), iar tendința de agregare este puternic influențată de numărul acestor resturi aminoacide în moleculă (Zaguri și colab., 2021). Pe de altă parte, asparagina și glutamina pot juca un rol important în inițierea procesului de agregare a peptidelor și proteinelor (Barrera și colab., 2021; Shattuck și colab., 2017).

După cum era de așteptat, indicii de agregare obținuți au fost mai mari de 40 atunci când s-a utilizat absorbanta de la lungimea de undă de 280 nm la pH 6,00, 8,00 și 10,7. Aceste valori, calculate conform ecuației 1, se aplică în principal studiilor de agregare efectuate în cazul proteinelor. În schimb, au fost obținute rezultate mai relevante pentru pentapeptida studiată când IA a avut valori mici (sub 3), calculate pe baza absorbanțelor înregistrate la lungimile de undă de 258 și 350 nm. Profilul dinamic de agregare a fost prezentat în **Figura II.4.1**. Valoarea maximă a IA (2,8) a fost obținută la pH 6 după 20 de minute de incubare la 37 °C.

În mod similar, agregarea pentapeptidei a fost investigată la pH 2. În aceste condiții, s-a observat în mod interesant atingerea unui platou după 30-40 minute de incubare, folosind o soluție de peptidă de 2 mg/mL. Indicele de agregare a fost de asemenea determinat în funcție de pH, după 30 minute de incubare la 37 °C. Profilul obținut, de tip „clopot” (**Figura II.4.1**, inserție), sugerează în mod clar că peptidei FESNF îi este favorabil un mediu ușor acid pentru a iniția procesul de agregare.

Capacitatea de agregare a peptidei a fost investigată și prin testul cu ThT. Fenilalanina formează agregate, iar intensitatea fluorescenței ThT crește datorită captării colorantului de către structurile rezultate prin autoasamblare (Ziaunys și Smirnovas, 2019). În acest caz, este posibil ca rezultatele să fie influențate de sarcina electrică totală a peptidei FESNF-NH₂. Astfel, după o perioadă de incubare de 145 ore la 50 °C, s-a observat o creștere de 18% a fluorescenței la pH 8 (**Figura II.4.2**). Interacțiunea electrostatică dintre ThT, care este încărcat pozitiv, și peptida investigată, parțial negativă, poate intensifica semnalul de fluorescență. Interacțiunile

electrostatice dintre fibrile și ThT reprezintă principalul factor care determină intensitatea fluorescenței (Arad și colab., 2020).

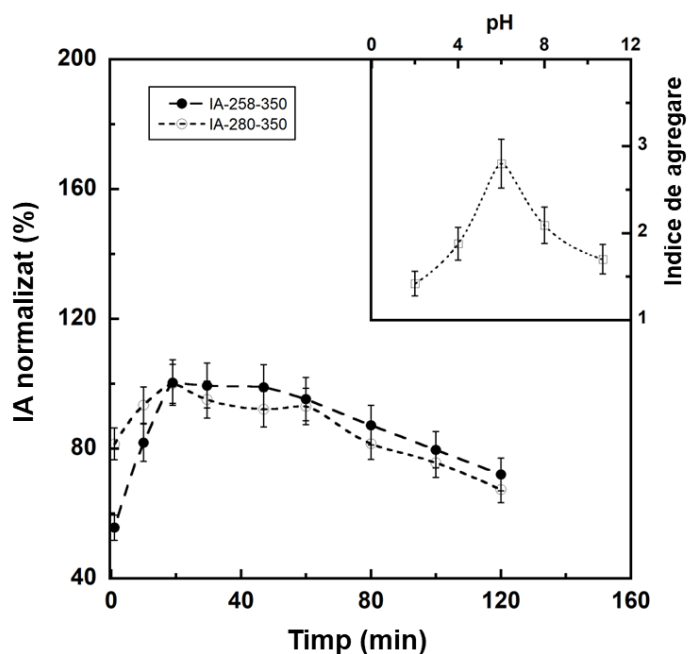


Figura II.4.1. Indicele normalizat de agregare (IA) calculat pentru pe baza valorilor absorbția absorbanțelor la 258 nm și 280 nm, respectiv 350 nm.. Valorile maxime ale IA au fost de 2,8 (puncte pline), respectiv 44 (puncte goale). *Inserție:* variația indicelui de agregare (IA) în funcție de valorile pH-ului.

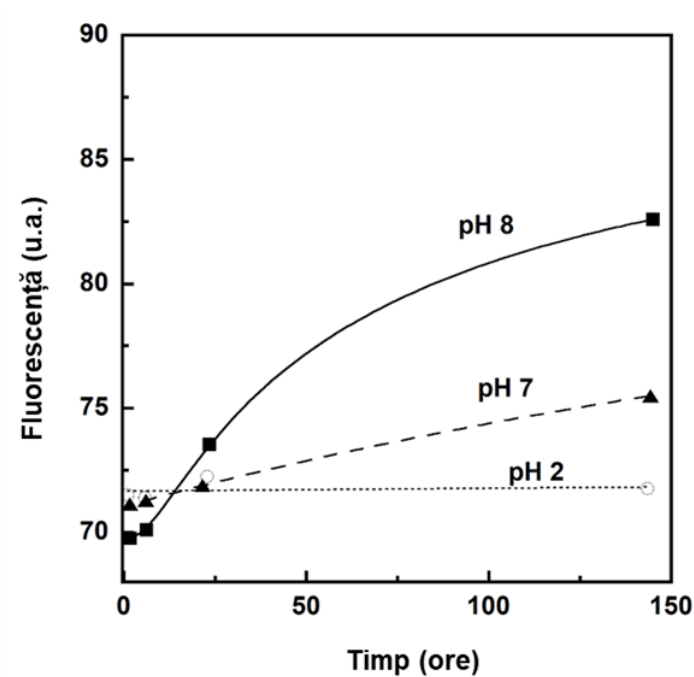


Figura II.4.2. Creșterea intensității semnalului de emisie (λ_{ex} 440 nm și λ_{em} 482 nm) a tioflavinei (40 μ M ThT) în prezența pentapeptidei la pH 8,0 (■), pH 7,0 (▲) și pH 2,0 (○), în funcție de timpul de incubare la 50 °C.

II.5. STUDIUL PROPRIETĂȚILOR DE AUTOASAMBLARE PRIN AFM

Morfologia speciilor agregate derivate din FESNF-NH₂ în diferite medii de soluții au fost analizate cu ajutorul microscopiei de forță atomică (AFM) și prezentate în **Figura II.5.1**. Soluția de acetat de amoniu cu pH 5,5 și cea de metanol (**Figura II.5.1**, A, A' și, respectiv, D, D') par să inducă un efect de aglomerare a fibrilelor. Acest efect este mai vizibil în cazul **Figurii II.5.1** D, D' și D'', ceea ce confirmă încă o dată că alcoolii cu lanț scurt induc o întârziere de formare a fibrilelor, așa cum a fost descris anterior într-un alt studiu similar (Bernson și colab., 2020). În plus, a mai fost raportat în literatura de specialitate faptul că metanolul modifică substanțial morfologia compușilor prin scăderea semnificativă a timpului de uscare (Zelenovskiy și colab., 2015).

Fibrilele observate în cazul probei obținute în prezența acetatului de amoniu, la pH 5,5 seamănă cu o rețea neuronală. În acest caz, lățimea medie a fibrilelor este de aproximativ 130 nm, în comparație cu cea a fibrilelor obținute pentru proba obținută din soluția de metanol, unde lățimea medie este mai mare, în jur de 235 nm, după cum se poate observa din măsurătorile bazate pe profilurile secțiunilor transversale din **Figura II.5.1** A'', respectiv, D''.

Punctul izoelectric (pI) teoretic al peptidei FESNF-NH₂ este 6,99, așa cum a rezultat din calculul cu ajutorul *BACHEM Peptide Calculator*. La pH fiziologic de 7,4, care este apropiată de valoarea de pH-ului corespunzător punctului izoelectric (pI), nu are loc formarea fibrilelor peptidice (Liu și colab., 2022) (**Figura II.5.1** B și B'). În schimb, s-au format clustere dense, cu dimensiuni cuprinse între 116 și 128 nm, în funcție de profilul secțiunii transversale (**Figura II.5.1** B''). Acesta este un comportament similar celui prezentat de insulina bovină atunci când este expusă la o valoare de pH apropiată de punctul său izoelectric (Bernson și colab., 2020). Mai mult, apariția fibrilelor amiloidice în cazul peptidelor din boala Alzheimer tinde să fie favorizată atunci când sarcina netă electrică este zero din cauza condițiilor de pH (Guo și colab., 2005).

Cu toate acestea, la pH 8,2, pentapeptida se autoasamblează în nanofibrile lungi, omogene și distincte (**Figura II.5.1** C și C'), cu o lățime medie de aproximativ 165 nm (a se vedea imaginea de secțiune din **Figura II.5.1** C''). Mai mult, sărurile pot facilita formarea fibrilelor la pH 8,2, ca urmare a predominanței sarcinilor negative (Hong și colab., 2004). Prin deprotonarea restului de acid glutamic, pot fi accentuate interacțiunile intra- și intermoleculare, în special legăturile de hidrogen mediate de catenele laterale ale acidului glutamic, serinei și asparaginei din structura principală a peptidei. În mod implicit, interacțiunile intermoleculare de tip π - π pot deveni mai pronunțate. În aceste condiții, pentapeptida se autoasamblează în apropierea valorii pKa a tamponului Tris, formând nanofibre lungi, omogene și distincte (**Figura**

II.5.1 C, C') cu o lăţime medie de aproximativ 165 nm (secţiunea imaginii **Figura II.5.1 C''**). Prin urmare, este important de luat în calcul contribuţia grupărilor $-NH_2$ parţial dissociate, provenite atât de la capătul N-terminal al peptidei, cât şi din soluţia tampon.

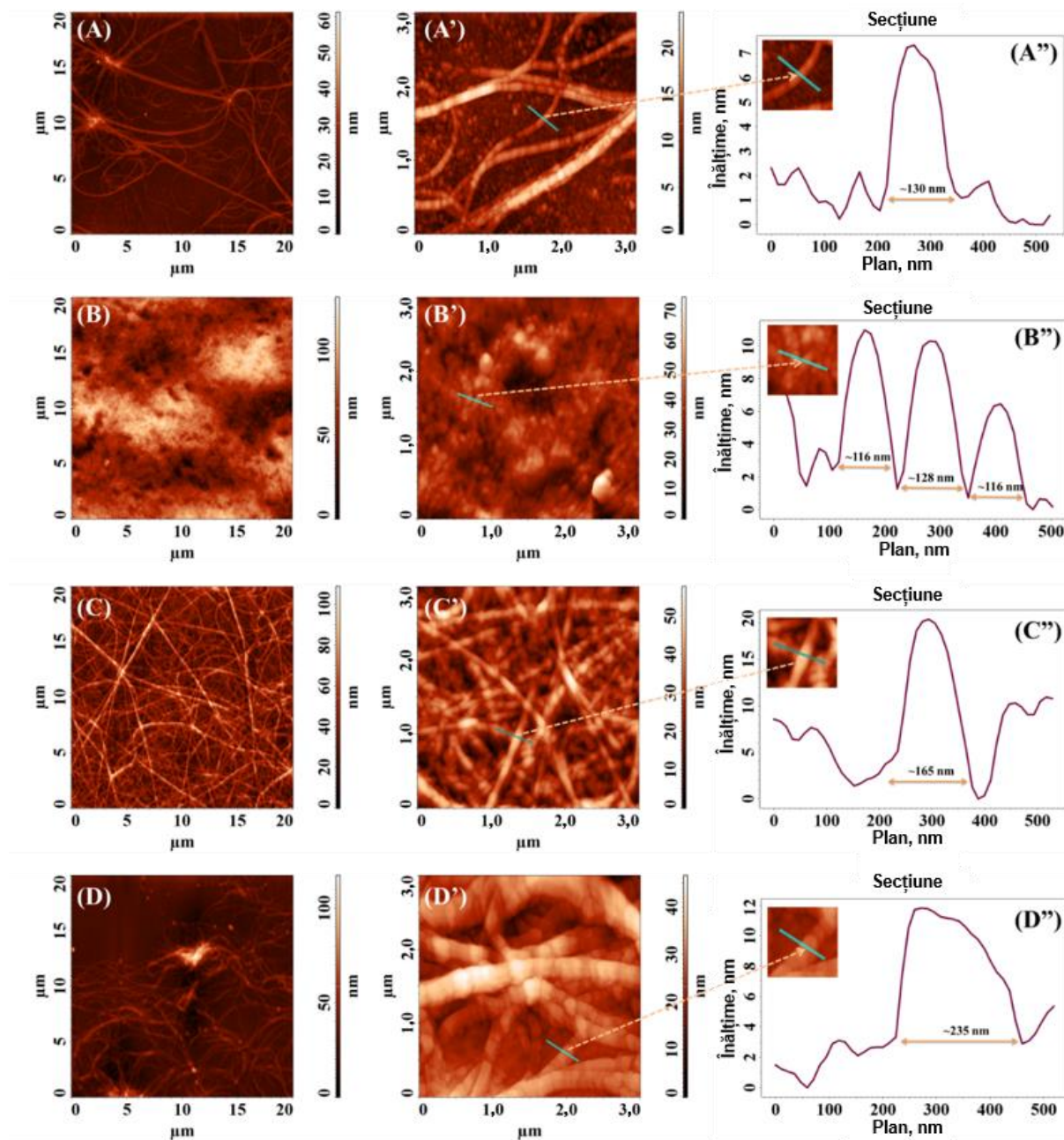


Figura II.5.1. Imagini AFM bidimensionale (2D), înregistrate pe suprafeţe de $20 \times 20 \mu m^2$, respectiv $3 \times 3 \mu m^2$, şi profilele secţiunii transversale corespunzătoare ale probelor obţinute din soluţia apoasă FESNF- NH_2 (10 mg/mL) diluată în raport 1:10 folosind (A, A', A'') acetat de amoniu 50 mM pH 5,5; (B, B', B'') Tris 50 mM pH 7,4; (C, C', C'') Tris 50 mM pH 8,2; (D, D', D'') soluţie de metanol 4,5%.

Fibrilele par a fi rezultatul mai multor structuri globulare stivuite împreună, așa cum se observă în imaginea mărită plasată în colțul profilului de înălţime (**Figura II.5.1 C''**). Aceste rezultate sunt în concordanță cu un studiu recent în care a fost dezvoltat un senzor pentru detecția

verbascosidei din diverse tipuri de ulei de măsline, prin imobilizarea peptidei FESNF-NH₂ folosind glutaraldehidă ca agent de reticulare, pe electrozi de carbon imprimați pe ecran, modificați cu oxid de grafen. Tot în acest studiu s-a observat o rețea fibrilară peptidică în cadrul senzorului (Munteanu și colab., 2022). Astfel, soluția Tris poate acționa ca factor declanșator pentru formarea unor structuri 3D mai dezvoltate. În plus, într-un alt studiu s-a observat în cazul peptidei FEFKFKFK, prin analiza AFM și TEM, o rețea regulată și densă de fibre cu diametre mici (4–5 nm) (Saiani și colab., 2008).

În concluzie, analiza AFM arată în mod clar capacitatea de autoasamblare a peptidei prin formarea speciilor agregate în funcție de pH. Corelarea dintre indicii de agregare și imaginile AFM confirmă influența semnificativă a pH-ului asupra procesului de autoasamblare.

II.6. STUDII IN SILICO

II.6.1. Simulări moleculare cu schimb de replici

Studiul din această teză s-a concentrat în principal pe investigarea posibilității ca resturile de fenilalanină aflate la capetele peptidei să participe la interacțiuni intramoleculare de tip π - π . Cercetarea a fost inițiată pe baza ipotezei că preferința pentru această conformație limitează agregarea extensivă determinată de interacțiunile hidrofobe, din cauza interferențelor sterice dintre moleculele adiacente. Rezultatele simulărilor cu schimb de replici ale peptidei izolate au arătat că, indiferent de valoarea pH-ului, peptidele adoptă predominant o conformație extinsă („deschisă”), în care catenele laterale aromatice ale resturilor de fenilalanină sunt poziționate la distanță una de cealaltă (**Figura II.6.1 A**). Din histogramele distanței dintre atomii de carbon C γ –C γ' ale resturilor Phe1 și Phe5, aflate la capetele moleculei, reiese un număr mic al „conformațiilor închise”, care implică interacțiuni intramoleculare de tip π - π (**Figura II.6.1 B**).

Simulările cu două peptide au arătat că interacțiunile de tip π - π dintre catenele laterale ale resturilor terminale de fenilalanină sunt predominante în conformația ansamblului (**Figura II.6.1 D**). Aceste interacțiuni sunt posibile deoarece capetele terminale rămân disponibile și sunt capabile să interacționeze cu celelalte molecule. Este interesant de remarcat că prezența celei de-a doua molecule influențează preferința conformațională intramoleculară a fiecărei peptide. Histograma distanței dintre capetele moleculei ale atomilor de carbon C γ –C γ' indică un al doilea vârf în jurul valorii de ~6 Å (**Figura II.6.1 C**), comparativ cu un singur vârf dominant centrat la ~12 Å în simulările cu o singură peptidă. Această tendință crescută către o conformație „închisă” poate fi explicată prin interacțiuni simultane de tip π - π , atât intra-, cât și intermoleculare (**Figura II.6.1 D**). Rezultatele sugerează că structurile de tip „deschis” favorizează agregarea, permițând

capetelor terminale să rămână libere pentru interacțiunile hidrofobe implicate în creșterea agregatelor.

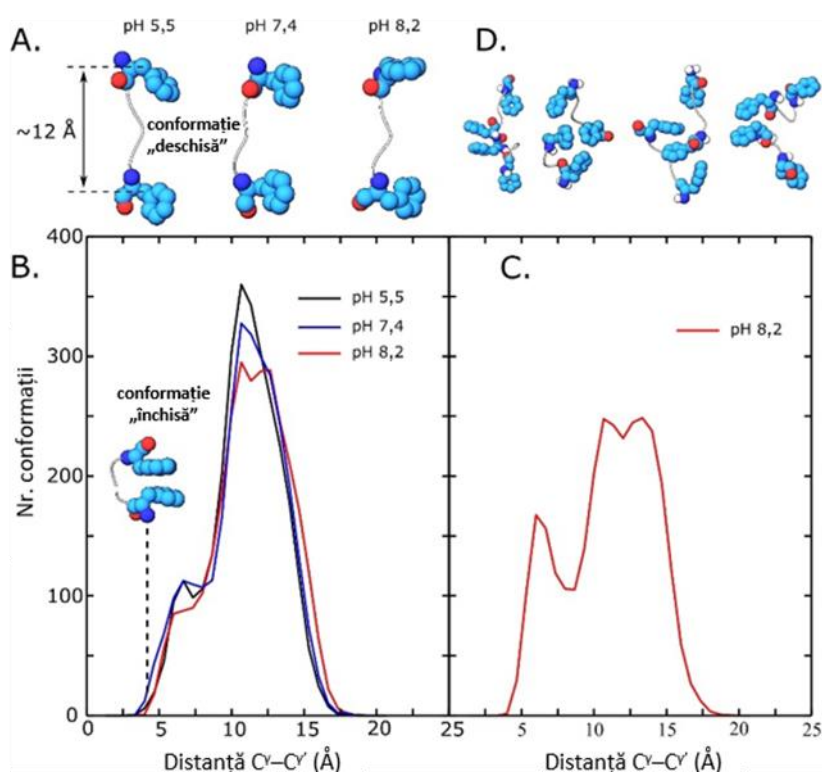


Figura II.6.1. Analiza conformațională pe baza simulărilor REST2 pentru o singură peptidă (A, B) și pentru două peptide (C, D). A – conformația dominantă extrasă din analiza pe clustere la pH acid, neutru și ușor bazic; B – histograma distribuției distanțelor dintre atomii de carbon $C^\gamma-C^\gamma'$ de la capetele lanțului (resturile terminale de fenilalanină) în simulările cu o singură peptidă; C – histogramă a distribuției distanțelor $C^\gamma-C^\gamma'$ între capetele lanțului în simulările cu două peptide; D – conformații ale dimerilor peptidici extrase din simulările cu două peptide.

II.6.2. Simulări moleculare cu granulație grosieră

Pentru a investiga mai detaliat tendința de agregare a peptidei FESNF, au fost realizate simulări moleculare cu granulație grosieră (CG, din eng. *Coarse-Grained*). În acest tip de simulări, grupările chimice formate din mai mulți atomi sunt reprezentate printr-un singur centru de interacțiune. Această metodă permite desfășurarea simulării pe perioade de timp de cel puțin 10 ori mai lungi, ceea ce oferă o imagine mai amplă a proceselor moleculare lente, cum ar fi agregarea. În **Figura II.6.2 A** se poate observa rezultatul unei simulări CG desfășurate pe o durată de 0,8 μ s, care a inclus 400 de peptide FESNF la pH 8,2. La începutul simulării, peptidele au fost distribuite aleatoriu în volumul cutiei de simulare. Pe parcursul simulării, moleculele s-au autoasamblat treptat în agregate din ce în ce mai mari, ajungând în final să formeze o structură fibrilară, ilustrată în **Figura II.6.2 B**.

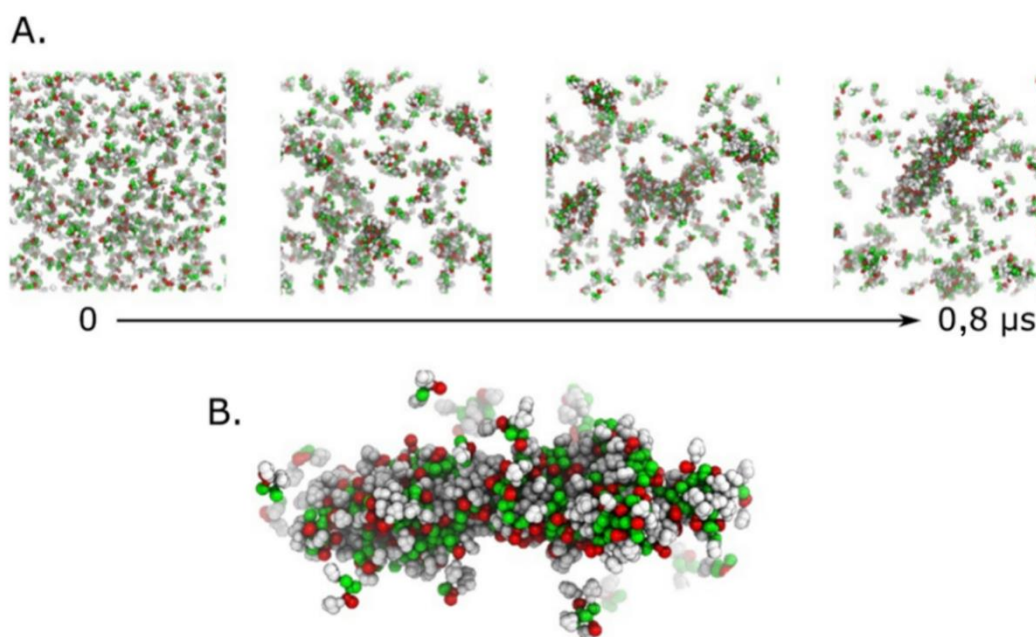


Figura II.6.2. Simularea cu granulație grosieră (CG) a autoasamblării peptidei FESNF-NH₂ la pH 8,2. A - serie cronologică a creșterii agregatelor peptidice; B - agregat fibrilar format după ~0,8 μs.

II.7. INTERACȚIUNEA PEPTIDEI CU IONII DE CUPRU (II)

II.7.1. Studii UV-viz

Spectrele UV-viz ale pentapeptidei FESNF în prezența unei soluții tampon de PIPES (acid 1,4-piperazindietansulfonic) 30 mM la pH = 6,5 indică o interacțiune distinctă cu ionii de Cu²⁺. În absența ionilor metalici, peptida prezintă două maxime de absorbție, la 220,5 nm și 258 nm, cu un raport A_{220,5}/A₂₅₈ de 12,6. Absorbția la 258 nm este atribuită predominant prezenței inelelor aromatice caracteristice, resturilor de fenilalanină (F), din secvența peptidică, în timp ce maximum de la 220,5 nm reflectă contribuția celor patru legături peptidice și a grupării amidice situate la capătul C-terminal (**Figura II.7.1**) (Prasad și colab., 2017).

Pe măsură ce concentrația echivalenților de Cu²⁺ crește (**Figura II.7.1**, spectrele b-e), se observă o creștere progresivă a absorbției în regiunea UV, însoțită de o deplasare semnificativă a maximumului de absorbție. Această modificare indică formarea unui complex între peptidă și ionii de Cu²⁺. Ionii de Cu²⁺ se leagă cel mai probabil de grupările peptidice și/sau de grupările funcționale situate în catenele laterale ale aminoacizilor componenți (cum ar fi gruparea carboxilică a acidului glutamic, grupările hidroxilice ale serinei, sau azotul amidic), interferând cu grupările cromofore (Faller, 2009).

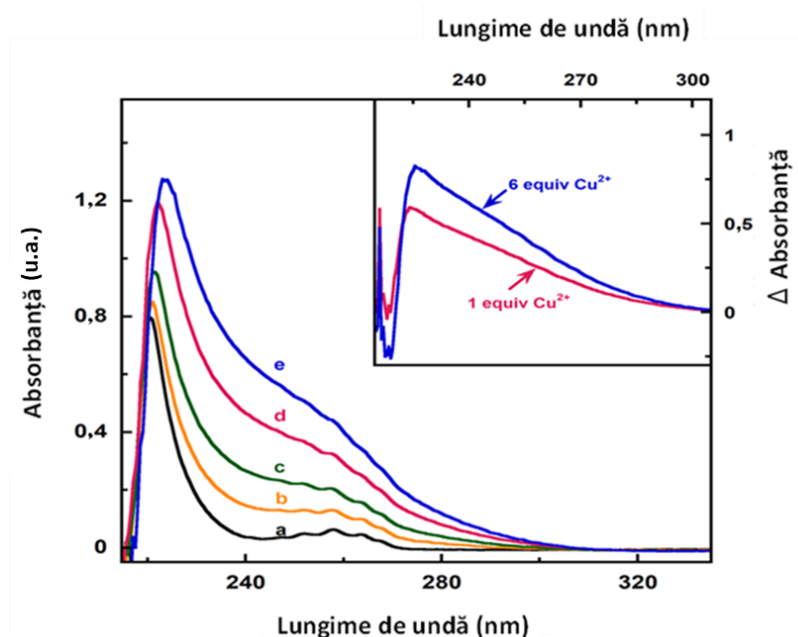


Figura II.7.1. Spectrele UV-viz ale peptidei FESNF-NH₂ în absența sau în prezența a diferite concentrații de soluții de CuSO₄. *Condiții:* 30 mM PIPES, pH= 6,5. Peptida prezintă două maxime de absorbție la 220,5, respectiv 258 nm (a-FESNF- 200 μM). Cuprul (b-0,25 echiv., c-0,5 echiv., d-1 echiv. și e-6 echiv.) a fost adăugat treptat la soluția de peptidă. *Insertie:* Spectrele diferențiale de absorbție în prezența a 1 sau 6 echivalenți de cupru.

II.7.2. Studii spectrofluorimetrice

Spectrele de fluorescență 3D au fost, de asemenea, analizate la pH 5, 6 sau 7 în soluție tampon de acetat 40 mM, la 27 °C. Peptida ca atare (156 μM) a prezentat 2 maxime de emisie la 213 și 283 nm (**Figura II.7.3** - A, C, D și E). Aceste benzi sunt caracteristice resturilor de fenilalanină (Bortolotti și colab., 2016). În prezența ionilor de cupru (10 echivalenți), intensitatea emisie a scăzut în strânsă dependență de pH-ul soluției tampon utilizate (**Figura II.7.3** - F, G și H).

În cazul valorii de pH 5 s-a menținut doar 36,5% din fluorescența inițială a peptidei atunci când s-au ales ca lungimi de undă de excitație și emisie maximele de la 258 și 283 nm. La valori de pH 6 și 7, s-a observat doar 10,15% și 2,6% din fluorescența inițială. În plus, semnalul centrat la 258/283 (ex/em) a dispărut aproape complet la pH 7 (**Figura II.7.3** - H), iar maximul de emisie de la lungimea de excitație de 213 nm s-a deplasat spre lungimi de undă mai mici. Totodată, maximul de emisie s-a deplasat spre lungimi de undă mai mari (la o valoare de 310 nm). În plus la pH 7 s-a observat un semnal cu maxim de emisie deplasat cu aproximație în zona spectrală 200/355 (ex/em), dificil de localizat cu exactitate datorită limitărilor instrumentului care operează la lungimi de excitație mai mari de 200 nm.

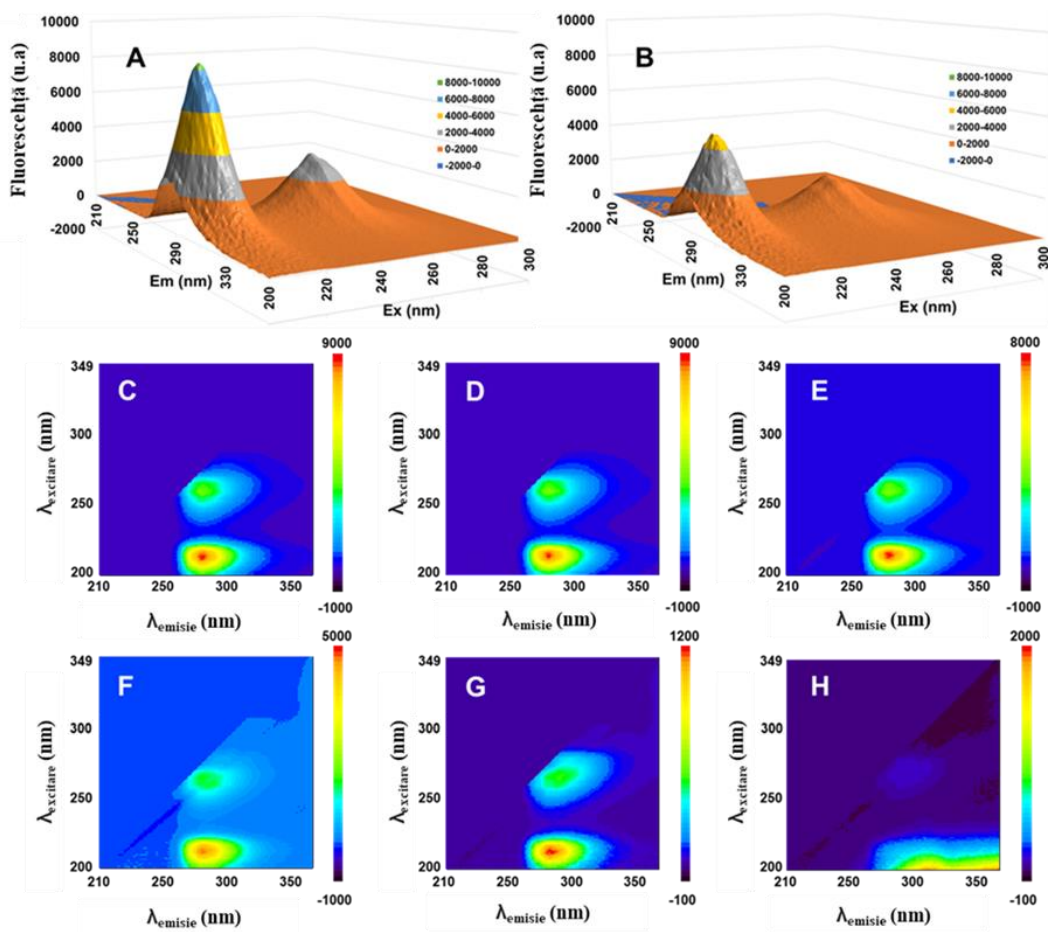


Figura II.7.3. Spectrele de fluorescență 3D și hărțile de contur ale peptidei libere sau în prezența ionilor de Cu^{2+} . *Rândul de sus:* spectrele 3D ale peptidei FESNF- NH_2 (156 μM , A) și în prezența a 0,5 echivalenți de cupru (B) în acetat de sodiu 50 mM pH 7,0. *Rândul din mijloc:* harta de contur pentru pentapeptida analizată la trei valori diferite ale pH-ului (pH 5,0; 6,0 și 7,0 - C, D și E). *Rândul de jos:* harta de contur pentru pentapeptidă în prezența a 10 echivalenți de cupru obținută la trei valori diferite ale pH-ului (pH 5,0; 6,0 și 7,0 - F, G și H).

II.7.3. Analiza spectrometrică de masă de tip MALDI-ToF

Spectrul de masă MALDI-ToF al peptidei FESNF- NH_2 , după incubarea timp de 20 de ore a unei soluții de peptidă 3 mM cu ioni de Cu(II) 30 μM la un pH fiziologic de 7,4 și o temperatură de 37 $^\circ\text{C}$, oferă o imagine detaliată a speciilor moleculare formate (**Figura II.7.4**). Ionul molecular monoprotonat $[\text{M}+\text{H}]^+$ prezent la m/z 642,33, și aductul corespunzător de sodiu $[\text{M}+\text{Na}]^+$, la m/z 664,27, indică prezența peptidei nereacționate. Semnalele de la m/z 704,25 și 726,25 corespund ionului molecular al complexului peptidă- Cu(II) , $[\text{M}+\text{Cu(II)}]^+$ și, respectiv aductului de Na, $[\text{M}+\text{Cu(II)}+\text{Na}-\text{H}]^+$.

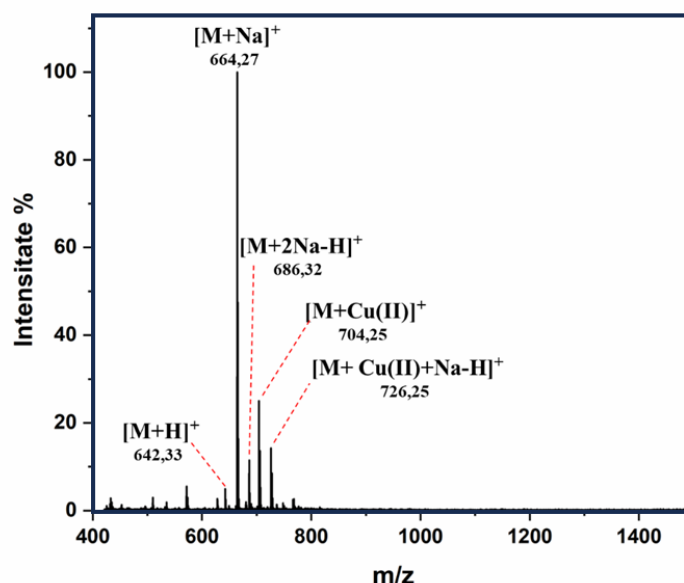


Figura II.7.4. Spectrul de masă MALDI-ToF al peptidei FESNF-NH₂ după complexarea cu ioni de Cu(II). S-a utilizat matricea DHB.

II. PEPTIDE MUTANTE CU PROPRIETĂȚI DE AUTOASAMBLARE

III.1. ALEGEREA SECVENȚELOR PEPTIDICE MUTANTE

Au fost sintetizate două peptide mutante utilizând sinteza în fază solidă pornind de la secvența unei peptide obținute anterior ale cărei proprietăți de autoasamblare au fost investigate prin studii UV-viz, spectrofluorimetrice, *in silico* și cu ajutorul microscopiei de forță atomică (AFM) la diferite valori de pH în cadrul **Capitolului II**. Astfel, s-a urmat un protocol de sinteză identic cu cel aplicat pentru obținerea formei amidate a secvenței FESNF-NH₂, unde a fost vizată înlocuirea serinei localizată în partea centrală a pentapeptidei cu tirozina, în vederea obținerii peptidei cu secvența FEYNF-NH₂. O altă peptidă mutantă a fost sintetizată înlocuind fenilalanina de la atomul de C-terminal cu tirozina rezultând secvența FESNY-NH₂. Fenilalanina este un aminoacid nepolar, pe când tirozina și serina sunt aminoacizi mai polari dat fiind faptul că au în structură o grupare hidroxil. Serina a fost studiată în contextul formării fibrilelor amiloidice. De exemplu, rolul acesteia din structura amilinei asupra procesului de agregare sub formă de amiloid s-a dovedit a fi modest comparativ cu cel al acidului 2-amino butiric, din structura peptidei mutante corespunzătoare (Akter și colab., 2020). Acest lucru susține ipoteza conform căreia hidrofobicitatea unităților de aminoacizi guvernează mecanismul de agregare.

Figura III.1.1 prezintă comparativ structurile plane ale formelor amidice ale peptidelor nou sintetizate (FEYNF, FESNY), a peptidei FESNF descrisă în **Capitolul II** și a unei peptide sintetizată anterior în cadrul grupului de biochimie, cu secvența FEHNF.

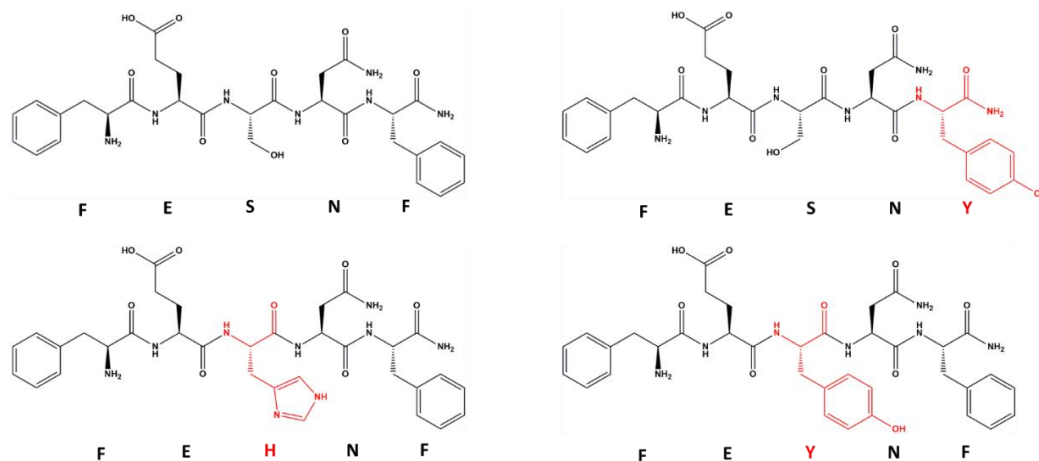


Figura III.1.1. Structurile plane ale peptidelor amidate FESNF, FEHNF, FEYNF și FESNY realizate cu ajutorul programului ChemDraw Pro 12.0. În cazul peptidelor mutante, s-au evidențiat cu roșu aminoacizii distinctivi față de peptida de referință FESNF.

III.3. PEPTIDA MUTANTĂ FEYNF-NH₂

III.3.1. Analiza calitativă prin RP-HPLC

Cromatografia lichidă de înaltă performanță în fază inversată (RP-HPLC) a fost utilizată pentru analiza și separarea amestecului brut de peptide sintetizate. Profilul HPLC al peptidei FEYNF-NH₂ este prezentat în **Figura III.3.1**. Pentru detecția specifică a legăturii peptidice, analiza s-a realizat la lungimea de undă de 215 nm. Separarea inițială a amestecului a urmat un gradient liniar de eluție, ceea ce a permis o fracționare clară și o identificare precisă a compuşilor în funcție de timpii de retenție.

În primele 5 minute de realizare a cromatogramei s-au observat prezența unor vârfuri corespunzătoare, în principal, ale acidului acetic și posibilelor reziduuri de solvenți folosiți în timpul sintezei. Totuși, un vârf distinct apărut la 9,09 minute a fost identificat ulterior prin spectrometrie de masă ca fiind peptida FEYNF-NH₂. Intensitatea acestui semnal sugerează în mod clar faptul că puritatea peptidei de interes a depășit 95%. Un al doilea vârf, detectat la 10,05 minute, deși mai slab, corespunde unui produs secundar mai hidrofob, cu un timp de retenție ușor prelungit, un fenomen des întâlnit în sinteza peptidelor în fază solidă (SPPS) (Guzmán și colab., 2023). Analiza prin spectrometrie de masă a compusului secundar de la timpul de retenție de 10,05 min nu a furnizat rezultate concludente, cel mai probabil din cauza concentrației prea mici pentru a putea fi detectat.

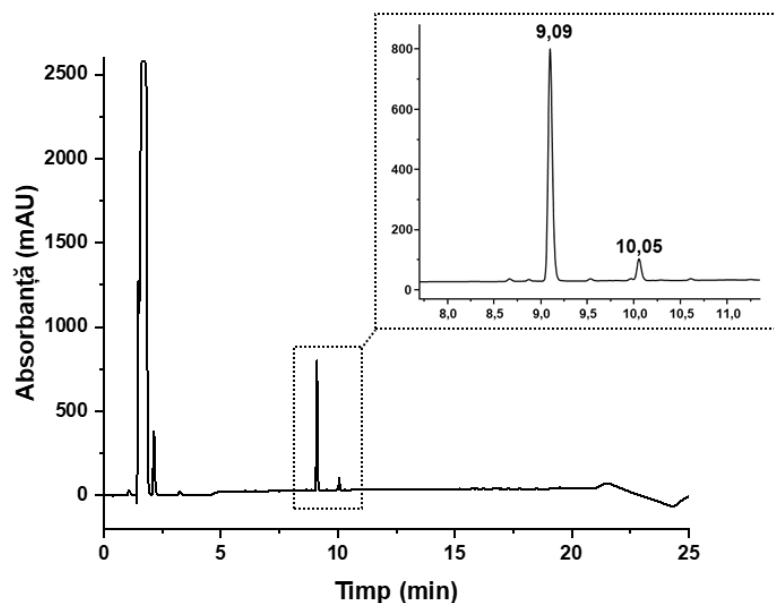


Figura III.3.1. Cromatograma HPLC a pentapeptidei FEYNF-NH₂ brute. Spectrul a fost înregistrat la lungimea de undă de 215 nm. Volumul injectat: 90 μ L.

III.3.3. Analize spectrometrice de masă de tip MALDI-ToF și MS/MS

În urma analizei prin spectrometrie de masă a primului vârf (din eng. *peak*), ionul molecular $[M+H]^+$ al pentapeptidei a fost identificat la m/z 718,40 cu matricea DHB (**Figura III.3.2 a**) și ușor deplasat la m/z 718,55 cu HCCA (**Figura III.3.2 b**). Pe lângă ionul molecular protonat, a fost detectată și prezența aducțiilor de sodiu ($[M+Na]^+$) la m/z 740,41, respectiv m/z 740,50, în funcție de matricea utilizată. Peptida prezintă tendința de a genera aducții de sodiu, posibil datorită interacțiunilor dintre ionii de sodiu și oxigenul carbonilic și/sau azotul amidic. Această interacțiune ar putea fi stabilizată prin nucleul aromatic al lanțului lateral al tirozinei, o ipoteză susținută anterior în cadrul altor studii (Moyer și colab., 2003). Mai mult, au fost identificați și aducții de potasiu ($[M+K]^+$) la m/z 756,51, respectiv m/z 756,58.

Analiza suplimentară prin disociere indusă de coliziune (CID) a ionului molecular $[FEYNF + H]^+$ (m/z 718,55) a generat multiple fragmente moleculare de tip b^+ și y^+ , oferind informații valoroase despre tiparele de fragmentare ale pentapeptidei FEYNF-NH₂ (**Figura III.3.2 c**). Spectrul de masă în tandem evidențiază mai multe fragmente distincte, printre care se remarcă abundența semnalelor corespunzătoare fragmentelor ionice în urma eliminării amoniacului: $y_2^+-NH_3$ la m/z 261,87, $y_3^+-NH_3$ la m/z 424,99, $b_4^+-NH_3$ la m/z 537,99 și $y_4^+-NH_3$ la m/z 553,61. De asemenea, pierderea unei molecule de apă poate fi corelată cu prezența restului de acid glutamic, în timp ce eliberarea de dioxid de carbon ar putea proveni din decarboxilarea aceluiași rest de aminoacid.

În cazul semnalului de la m/z 672,93 ($[M+H]^+ - 46$), diferența de masă de 46 Da ar putea reflecta eliminarea concomitentă a unei molecule de CO_2 și a doi atomi de H. Însă mult mai probabilă este eliminarea unei grupări carbonil și a unei molecule de apă, deoarece o moleculă de hidrogen este puțin probabil să fie eliminată din astfel de peptide. Mai mult, analiza detaliată a spectrelor MS/MS arată că distribuția uniformă a resturilor aromatice de-a lungul catenei peptidice favorizează fragmentarea la toate legăturile amidice. Acest comportament contrastează cu cel observat în cazul peptidei mutante FESNY-NH₂, unde resturile aromatice, localizate exclusiv la capetele lanțului peptidic, induc o fragmentare predominantă în regiunile terminale (Jitaru și colab., 2024). Studii anterioare au arătat că prezența resturilor cu densitate electronică ridicată, cum sunt fenilalanina și tirozina, facilitează fragmentarea în spectrometria de masă în tandem, deoarece favorizează localizarea sarcinii și crește probabilitatea de disociere a moleculei (Zhang, 2004).

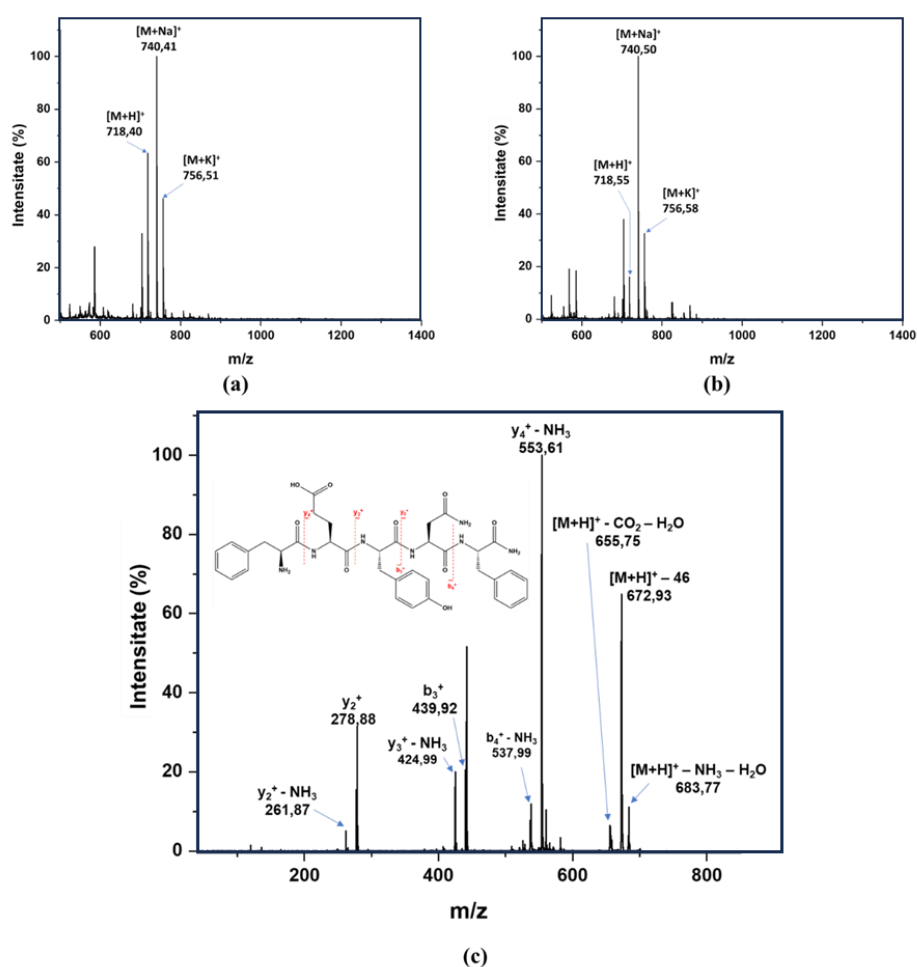


Figura III.3.2. Spectrul MS al fracțiunii eluate la timpul de 9,09 min, care confirmă m/z corespunzător FEYNF-NH₂ cu două matrici diferite: (a) DHB și (b) HCCA; (c) Atribuirea semnalelor m/z rezultate din analiza prin spectrometrie de masă în tandem MALDI-ToF MS/MS; fragmentarea ionului molecular $[FEYNF + H]^+$ (m/z 718,55) a fost realizată prin disociere indusă de coliziune (CID).

III.3.4. Analiza prin spectrometrie de masă de tip ESI-MS

Spectrul de masă pentru peptida FEYNF-NH₂ din **Figura III.3.3** confirmă existența peptidei care apare sub forma unui ion molecular $[M+H]^+$ la m/z 718,31. În spectrul de masă mai apar semnale la m/z 1436,63 care au fost atribuite ionului dimer $[2M+H]^+$ și, posibil unui ion dublu încărcat $[M+K+H]^{2+}$, la m/z 378,65. Legarea ionului de potasiu, în cazul aductului $[M+K+H]^{2+}$ are loc cel mai probabil la gruparea carboxil din catena laterală a acidului glutamic (E) (Emmert și colab., 2004).

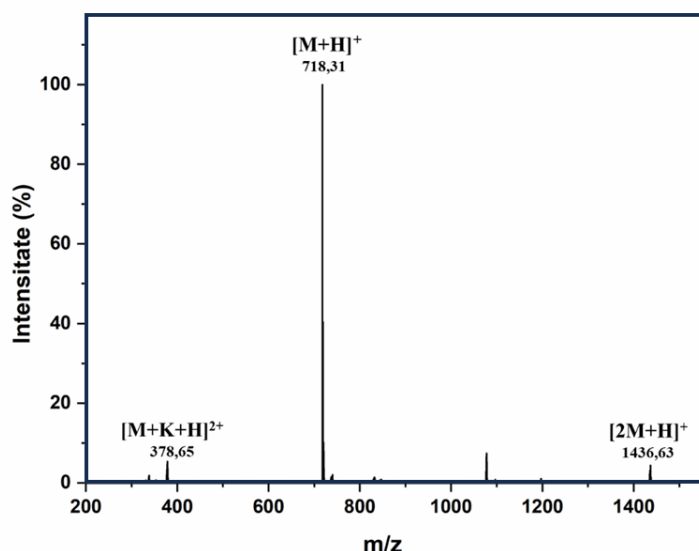


Figura III.3.3. Spectrul de masă ESI-MS al peptidei FEYNF-NH₂.

III.3.5. Caracterizarea proprietăților de autoasamblare

III.3.5.1. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier

Studiul autoasamblării peptidei și corelația acesteia cu structura secundară, în special formarea structurilor de tip β -pliată (din eng. *β -sheet*), a fost realizat utilizând spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR, din eng. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*). Pentru a evidenția structura secundară a peptidei FEYNF-NH₂, analiza s-a concentrat în special asupra benzilor amidice I.

Structura secundară a peptidei FEYNF-NH₂ a fost analizată prin deconvoluție cantitativă a benzilor FTIR, utilizând funcțiile de ajustare Gaussiene (**Figura III.3.5**). Prelucrarea datelor s-a realizat cu ajutorul programului OriginPro 8.5.0 SR1 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, SUA). Structurile corespunzătoare au fost identificate pe baza datelor din literatura de specialitate, așa cum este ilustrat în **Figura III.3.5** (Bagińska și colab., 2008; Barreto și colab., 2020; De Meutter și Goormaghtigh, 2021; Seo și colab., 2016).

Se poate observa că cele mai importante benzi de absorbție se află la numerele de undă 1633 cm^{-1} și 1672 cm^{-1} , fiind corespunzătoare structurilor de tip β -pliate (din eng. *β -sheet*), respectiv de tip β -întors (din eng. *β -turn*). Această constatare este susținută de datele prezentate în **Tabelul III.3.3**, unde se arată că vârfurile asociate structurilor de tip β -pliat și β -întors contribuie semnificativ la suprafața totală a benzilor amidice I. Deși autoasamblarea peptidei FEYNF-NH₂ este dominată de structuri β -pliate, spectrul FTIR evidențiază și semnale asociate structurilor de α -elicoidal respectiv caracteristice grupărilor sau legăturilor situate în catena laterală. Cu toate acestea, conform analizei FTIR, tiparul structural principal observat în autoasamblarea peptidei poate fi asociat cu formarea structurilor de tip β -pliat. În consecință, în subcapitolele următoare au fost prezentate rezultatele analizelor suplimentare efectuate pentru a înțelege mai bine particularitățile autoasamblării peptidei FEYNF-NH₂.

Tabelul III.3.3. Conținutul procentual (%) al structurilor secundare ale peptidei FEYNF-NH₂ evidențiat prin analiza spectrului FTIR.

Nr.	Structură	Nr. de undă (cm^{-1})	Intensitate relativă (%) [*]
1	β -pliată antiparalelă	1694	3,12
2	β -întoarsă (din eng. <i>β-turns</i>)	1672	16,12
3	α -elicoidală	1657	28,01
4	β -pliată	1633	34,53
5	Lanțuri aggregate de tip β -pliat	1613	10,56
6	Catenă laterală	1596	7,65

*Intensitatea relativă indică proporția unei anumite benzi componente în raport cu suprafața totală a regiunii amidice I.

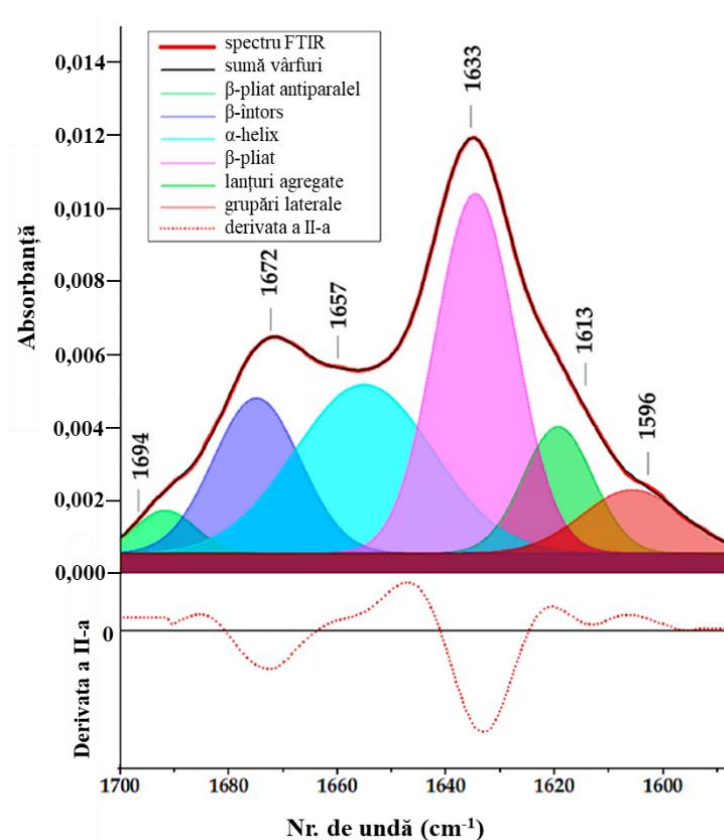


Figura III.3.5. Spectrul FTIR corespunzător regiunii amidice I, cu evidențierea structurilor secundare ale peptidei FEYNF-NH₂ în stare solidă, obținut prin deconvoluție de tip Gaussian, realizată cu ajutorul spectrului derivatei a doua a datelor inițiale.

III.3.5.3. Analiza prin microscopie electronică de transmisie

Subunitățile peptidice pot forma o serie de interacțiuni necovalente complexe atât în stare solidă, cât și în soluție, ceea ce favorizează procesul de autoasamblare în structuri bine organizate. Aceste arhitecturi supramoleculare pot continua să evolueze prin noi procese de autoasamblare, determinând apariția unei varietăți de nano- și microstructuri, cu potențiale aplicații în dezvoltarea materialelor cu proprietăți funcționale (Konda și colab., 2016).

Prin urmare, pentru a evalua caracteristicile morfologice ale peptidei nou sintetizate FEYNF-NH₂, s-a utilizat microscopia electronică de transmisie (TEM, din eng. *Transmission Electron Microscopy*) (**Figura III.3.7** a,b). În plus, cu ajutorul spectrometriei de raze X cu dispersie de energie (EDX) integrată în sistemul TEM, s-a confirmat compoziția elementală și puritatea peptidei sintetizate, prin prezența elementelor caracteristice C, N și O (**Figura III.3.7** b,c). De menționat este faptul că variațiile în intensitate a semnalului de carbon se datorează în principal utilizării grilelor de carbon pentru analiza TEM.

Imaginile TEM ale pentapeptidei, dispersată în prealabil într-o soluție tampon fosfat și dimetilsulfoxid – DMSO) sunt prezentate în **Figura III.3.7** a. Se poate observa formarea unor

structuri de tip nanobenzi (din eng. *nanotape*) extinse, cu regiuni suprapuse, rezultate din autoasamblarea peptidei. Acest fenomen ar putea fi atribuit creșterii densității legăturilor necovalente tranzitorii dintre nanostructurile autoasamblate (Gelain și colab., 2020). Mai mult, această organizare plană și extinsă este caracteristică structurilor de tip β -pliate (din eng. β -*sheet*).

Având în vedere potențialele aplicații biomedicale, peptidea a fost supusă unei incubări controlate în condiții fiziologice (la 37 °C timp de 20 de ore). Imaginea TEM corespunzătoare peptidei supuse deshidratării, este prezentată în **Figura III.3.7 b**. Comparativ cu **Figura III.3.7 a**, s-a observat că în urma procesului de incubare peptidea FEYNF are o tendință de a forma structuri de tip fibrilar, precum și unele organizări supramoleculare de tip bandă (Engl. *tape-like*).

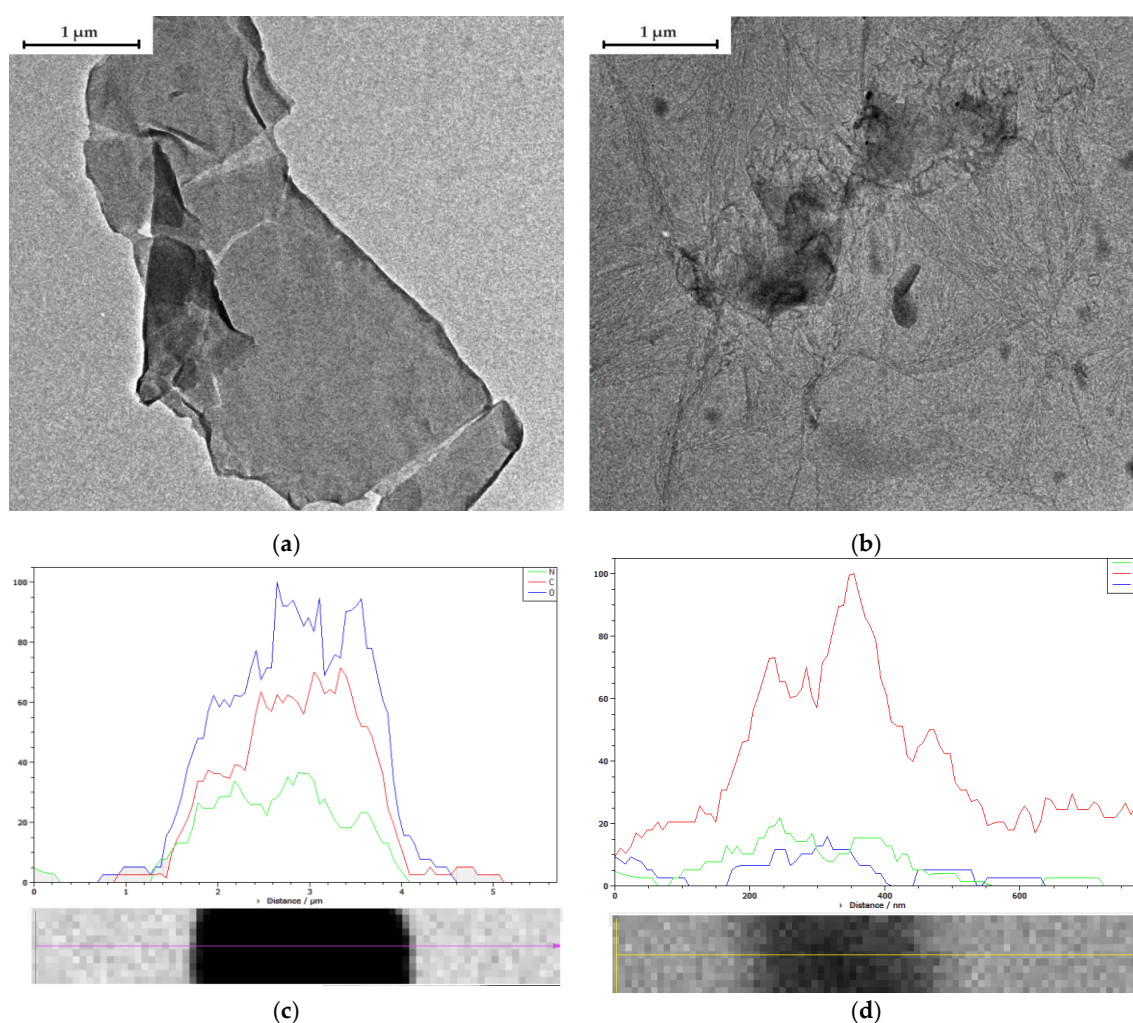


Figura III.3.7. Imagini TEM ale FEYNF-NH₂ înainte (a) și după 20 de ore de incubare la pH fiziologic de 7,4 și o temperatură de 37 °C (b); spectre EDX pentru proba de peptidă FEYNF înainte (c) și după incubare (d).

III.3.5.4. Analiza prin microscopie cu lumină polarizată

Un factor definitoriu care determină proprietățile fizice și chimice ale peptidelor (și aminoacizilor) cu proprietăți de autoasamblare este orientarea moleculară (Zhou și colab., 2022). Analiza optică bazată pe polarizare s-a dovedit a fi extrem de utilă în studiul molecular, în special atunci când este vorba despre orientarea moleculelor. Astfel, în **Figura III.3.8** sunt prezentate imaginile obținute la două unghiuri de polarizare diferite (0° și 90°), precum și la două scări de magnificare diferite. Se poate observa că peptida FEYNF formează prin autoasamblare o arhitectură complexă, hiper-ramificată, caracterizată prin modele dendritice extinse. În **Figura III.3.8** c sunt vizibile mai clar ramificațiile scurte, orientate aproape perpendicular față de axa nanofibrelor. Acest tip de organizare a fost evidențiat și de alți cercetători care au menționat prezența unor fibrile „încurcate” (din eng. *entangled*) apărute în urma procesului de gelifiere, un aspect specific hidrogelurilor supramoleculare (Chakraborty și colab., 2020).

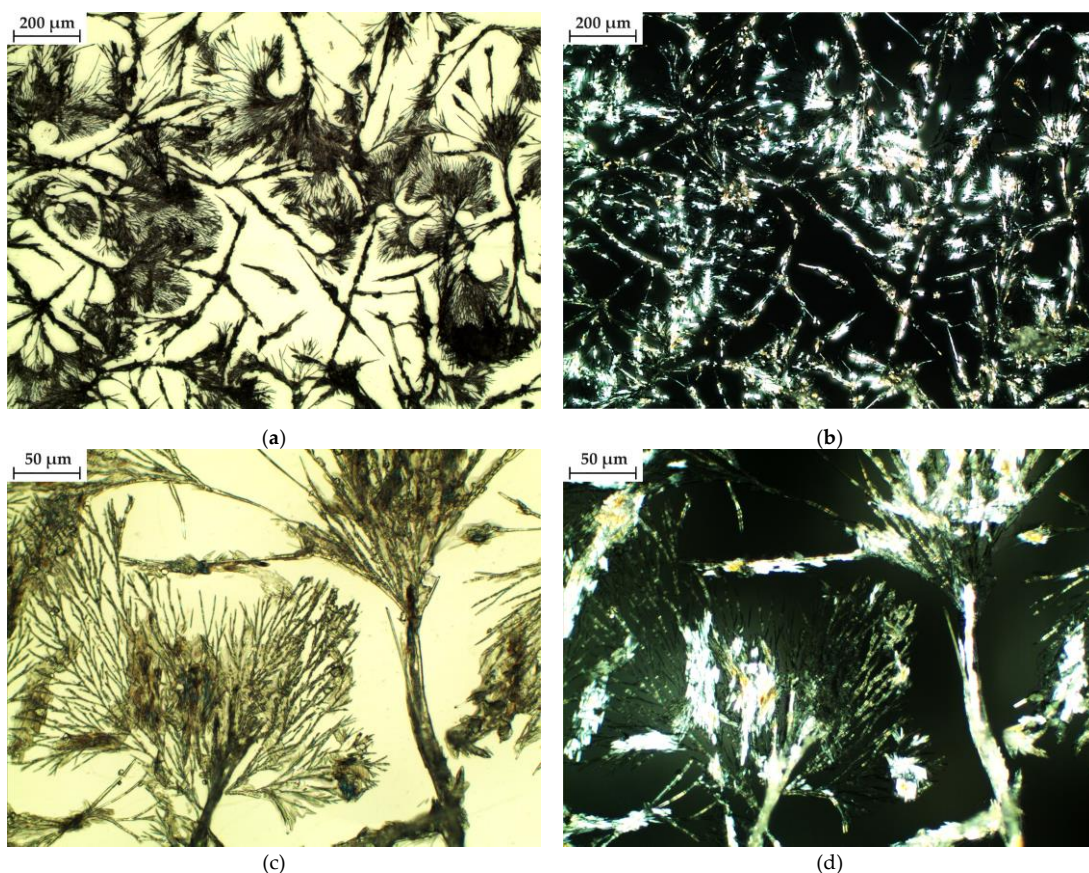


Figura III.3.8. Imagini microscopice ale probelor deshidratate provenite din soluții incubate de FEYNF-NH₂ (3 mM) la pH fiziologic de 7,4 și temperatură de 37 °C, înregistrate sub două unghiuri de polarizare: 0 grade (a, c) și 90 grade (b, d) și la scări de magnificare diferite.

Morfologia FEYNF poate fi atribuită în principal prezenței restului de tirozina. Este bine cunoscut faptul că, la pH fiziologic 7,4, restul de tirozină rămâne predominant în stare neutră,

determinând interacțiuni ce favorizează inițierea fibrilogenezei (DiCostanzo și colab., 2012). În comparație cu peptida studiată anterior (FESNF-NH₂) și analizată în condiții similare de pH (Jitaru și colab., 2023), introducerea tirozinei pare a fi principalul factor care determină diferențele morfologice observate. Această modificare structurală poate fi explicată în special prin prezența nucleului aromatic și a grupării hidroxil din tirozină. Pe lângă rolul resturilor de fenilalanină, recunoscute pentru promovarea interacțiunilor de tip π - π și a celor hidrofobe, tirozina poate influența semnificativ procesul de autoasamblare al unei peptide. Un aspect notabil este faptul că punctul izoelectric calculat teoretic pentru peptida FEYNF (6,94) este foarte apropiat de cel al peptidei FESNF (6,99). În plus, peptida FEYNF-NH₂ prezintă trăsături de formare a fibrilelor asemănătoare cu cele ale peptidei beta-amiloidice (A β), în apropierea punctului său izoelectric (Tian și Viles, 2022).

Figurile III.3.8 b,d înregistrate la un unghi de polarizare de 90°, confirmă faptul că speciile autoasamblate provenite de la peptida FEYNF-NH₂ prezintă birefringență în lumină polarizată. Acest lucru a indicat prezența structurilor de tip β -pliat în arhitectura autoasamblată, ceea ce a condus la formarea de structuri cristaline bine organizate. Alte cercetări au arătat că temperatura poate afecta modul în care peptidele se autoasamblează, conducând la formarea unor fascicule de nanofibre peptidice bine aliniate, care pot crea zone birefringente vizibile cu ochiul liber, de dimensiunea zecilor de milimetri (Accardo și Handelman, 2022; S. Zhang și colab., 2010).

III.3.6. Studii *in silico*

III.3.6.2. Studiul formării structurii β -pliate

În conformația reprezentată în **Figura III.3.11**, peptida FEYNF-NH₂ prezintă capacitatea de a adopta o structură de tip β -pliată, fenomen ce facilitează extinderea benzilor de tip β , pe măsură ce are loc creșterea oligomerilor, indicând astfel tendința de a forma fibrile.

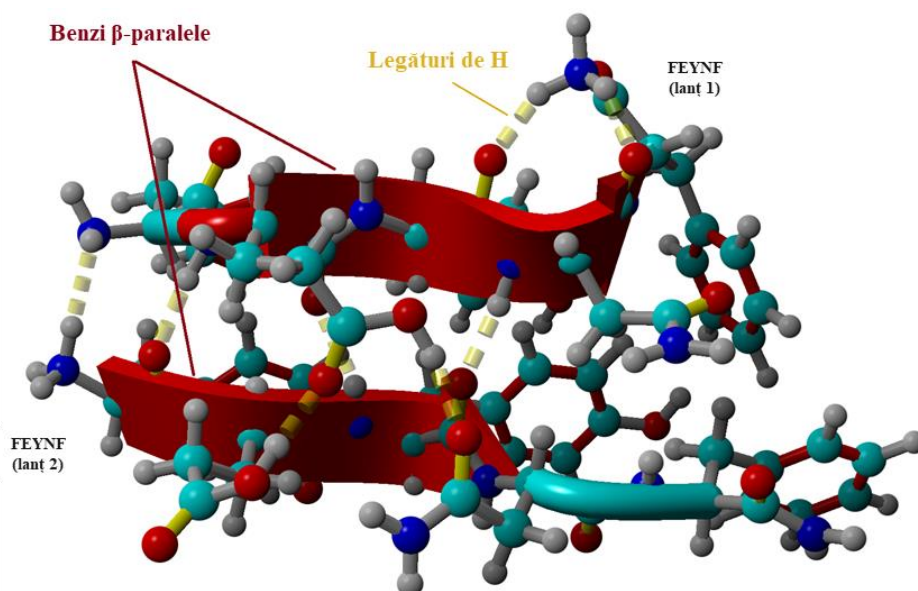


Figura III.3.11. Conformația optimă a dimerului protonat (FEYNF@FEYNF(+2)), calculată la nivelul câmpului de forțe YASARA, sugerează mecanismul de autoasamblare și gelificare a peptidei FEYNF într-o structură de tip β -pliat. Semnificația culorilor atomice: cian – carbon, albastru – azot, roșu – oxigen, gri – hidrogen.

III.3.6.3. Potențiale implicații în formarea poliplecșilor

Vectorii nevrali pe bază de peptide sunt considerați candidați ideali pentru terapia genică, în principal datorită capacității acestora de a străbate membranele celulare (Yang și Luo, 2023). În acest context, a fost investigată prin studii *in silico* capacitatea peptidei FEYNF de a forma poliplecși, apelând la simulări de andocare moleculară.

Astfel, dimerul protonat FEYNF@FEYNF, prezentat în **Figura III.3.11**, a fost utilizat într-un al doilea studiu de andocare moleculară, având ca receptor o secvență oligonucleotidică de ADN. În acest scop, a fost folosit dodecamerul Drew–Dickerson d(CGCGAATTCGCG)₂, ca model pentru simularea unui helix scurt de ADN (Cojocaru și colab., 2021).

Poziția optimă de andocare dintre complexul dimeric protonat (FEYNF@FEYNF(+2)) și secvența oligonucleotidei de ADN (DDD (–25)) este prezentată în **Figura III.3.15**. Această configurație este cea mai favorabilă din punct de vedere al valorii scăzute a energiei de legare ($E_b = -12,49$ kcal/mol). Mai mult, valoarea extrem de redusă a constantei de disociere ($K_d = 0,694$ nM), la scară nanometrică, caracteristică unui complex stabil, confirmă formarea poliplexului de interes. Așa cum se observă în **Figura III.3.15**, formarea poliplexului este guvernată de interacțiuni necovalente, precum cele hidrofobe, legăturile de hidrogen inter- și intramoleculare, interacțiunile de tip π - π și cele de tip cation- π .

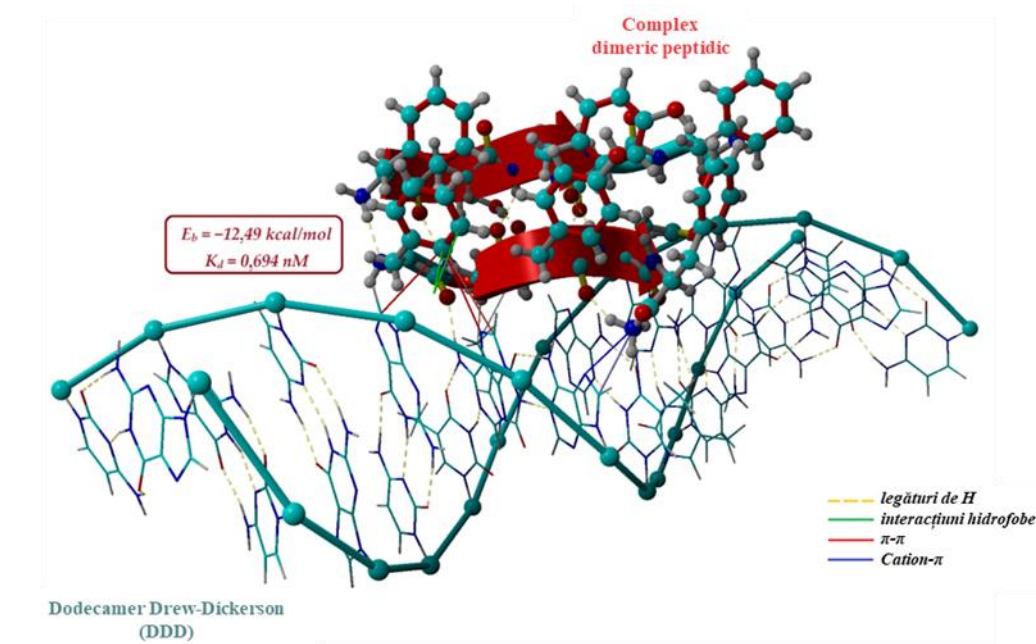


Figura III.3.15. Cea mai bună conformație a poliplexului rezultată din simularea de andocare moleculară, care arată interacțiunile necovalente dintre dimerul protonat (FEYNF@FEYNF), ca ligand, și dodecamerul Drew–Dickerson d(CGCGAATTCGCG)2, ca receptor.

Peptida FEYNF formează ansambluri supramoleculare capabile să compacteze acizii nucleici, transformând ADN-ul de formă B într-o structură mai densă, specifică poliplecșilor. Acest proces este esențial în terapia genică. Compactarea ADN-ului îndeplinește un dublu rol: oferă protecție împotriva degradării premature și facilitează traversarea membranei celulare, în special prin mecanisme precum endocitoza. Acest lucru duce la o absorbție celulară mai eficientă.

III.4. PEPTIDA MUTANTĂ FESNY-NH₂

III.4.1. Analiza calitativă prin cromatografie de lichide de înaltă performanță

În **Figura III.4.1** a se poate observa apariția a două semnale principale, la 7,05 și 8,25 minute rezultate în urma separării cromatografice a peptidei brute, cu secvența FESNY-NH₂, rezultată după etapele de sinteză, precipitare și redizolvare. Prezența unui număr redus de semnale în amestecul „crud” obținut după eluție indică obținerea relativ pură a compusului dorit. Aceste semnale au fost analizate prin spectrometrie de masă. Semnalele intense de la începutul cromatogramei se datorează cel mai probabil prezenței acidului acetic glacial și o suprapunere a semnalului creat de injectarea probei în sistem.

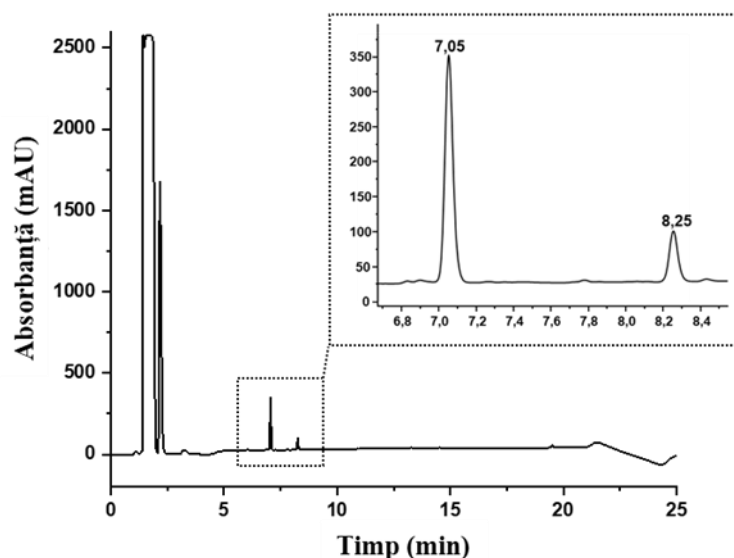


Figura III.4.1. Cromatograma HPLC a uneia dintre fracțiuni rezultate la redizolvarea cu acid acetic 5% pentru secvența FESNY. Spectrul a fost înregistrat la 215 nm. Volum injectat: 150 μ L.

III.4.2. Analiza prin spectrometrie de masă de tip MALDI-ToF și MS/MS

Spectrele de masă prezentate în **Figura III.4.2** confirmă structura peptidei de interes la timpul de retenție 7,05 min, atât prin utilizarea matricii DHB, cât și HCCA. Spectrul MS a indicat un raport masă/sarcină la m/z 658,32, corespunzătoare ionului molecular $[M+H]^+$. În plus, s-au observat aducții de sodiu ($[M+Na]^+$) și potasiu ($[M+K]^+$) la m/z 680,28, respectiv, m/z 696,28. Comparând spectrul de masă al compusului de interes din **Figura III.4.2 B** cu spectrul de referință al matricii HCCA din **Figura III.2.5 B**, se constată prezența unor semnale intense care sunt atribuite matriciei, și nu analitului. Se poate constata faptul că. Totodată, produsul secundar de sinteză de la timpul de retenție de 8,25 min nu a putut fi identificat prin spectrometrie de masă din cauza faptului că proba de analit colectată a fost prea diluată.

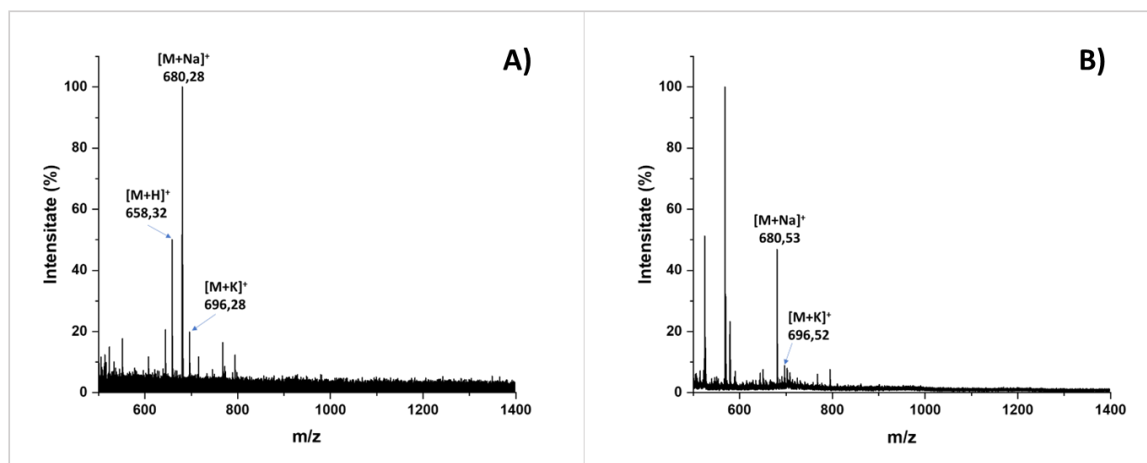


Figura III.4.2. Spectrul MS al fracțiunii eluate la 7,05 min care confirmă m/z corespunzător FESNY cu două matrici diferite: A) DHB; B) HCCA.

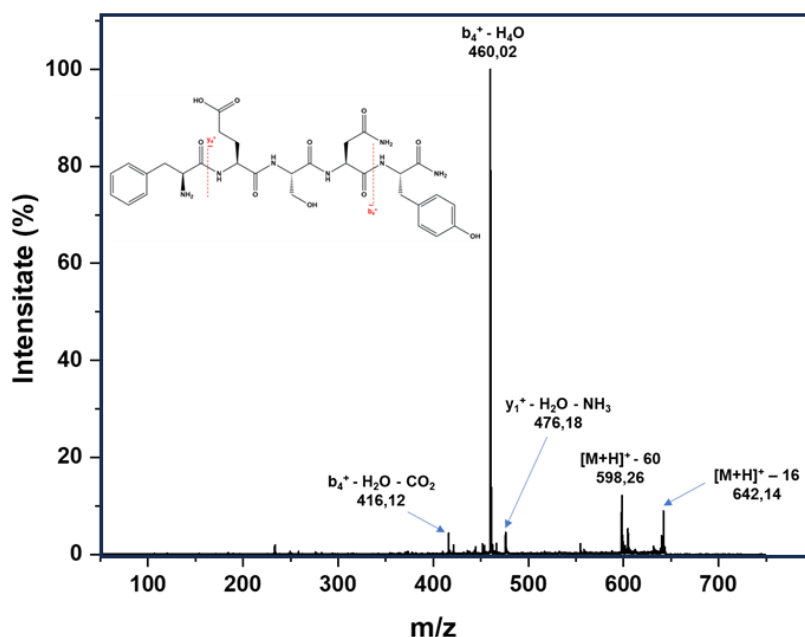


Figura III.4.3. Atribuirea semnalelor m/z rezultate în urma analizei prin spectrometrie de masă în tandem de tip MALDI-ToF MS/MS. Fragmentarea ionului molecular $[FESNY + H]^+$ (m/z 658,32) s-a realizat prin disociere indusă de coliziune (CID) pentru fracțiunea colectată la minutul 7,05.

Spectrul de masă în tandem (MS/MS), obținut prin disocierea indusă de coliziune (CID) a ionului molecular de interes $[FESNY + H]^+$ (m/z 658,32), se regăsește în **Figura III.4.3**. Aceste fragmente au suferit diverse procese, precum deshidratare, dezaminare sau decarboxilare, conducând la apariția în spectru a semnalelor la valori m/z corespunzătoare. Astfel, m/z 416,12 corespunde fragmentului b_4^+ cu pierderea unei molecule de apă (H_2O) și a unei molecule de dioxid de carbon (CO_2), m/z 460,02 reprezintă fragmentul b_4^+ cu pierderea unei molecule de apă (H_2O), iar m/z 476,18 corespunde fragmentului y_4^+ cu pierderea unei molecule de apă (H_2O) și a unei molecule de amoniac (NH_3). În plus, la m/z 598,26 ($[M+H]^+ - 60$), diferența de 60 Da ar putea corespunde eliminării unei molecule de CO_2 și a unui atom de oxigen sau a unei grupări $-NH_2$. În mod similar, la m/z 642,14 ($[M+H]^+ - 16$), pierderea neutră de 16 Da ar putea corespunde eliminării grupării $-NH_2$.

Mai mult, spectrele rezultate din analiza prin spectrometrie de masă în tandem (**Figura III.4.3**) au sugerat faptul că peptida este mai predispusă să se fragmenteze la extremități, unde se află resturile aromatice decât în partea centrală a lanțului peptidic. Prezența resturilor de fenilalanină și tirozină, datorită densității electronice relativ ridicate în special pe nucleele aromatice, poate facilita fragmentarea prin promovarea localizării sarcinii și creșterea susceptibilității la procesele de disociere în spectrele de masă în tandem (Zhang, 2004).

III.4.3. Analiza spectrometrică de masă de tip ESI-MS

Spectrul de masă prezentat în **Figura III.4.4** indică trei semnale principale: ionul molecular protonat $[M+H]^+$, la m/z 658,28, un aduct de sodiu $[M+Na]^+$, la m/z 680,26, și un ion dublu protonat $[M+K+H]^{2+}$, la m/z 348,38. Mai mult, se remarcă faptul că peptida FESNY care conține un rest acid în poziția 2 a secvenței, este susceptibilă la formarea de aducți multipli cu ioni ai metalelor alcaline, atât ca agenți de ionizare, cât și ca înlocuitori ai protonilor acizi. În acest context, formarea ionului $[M+K+H]^{2+}$ este un exemplu relevant al acestei tendințe, unde potasiul participă alături de un proton la dubla încărcare a peptidei (Emmert și colab., 2004).

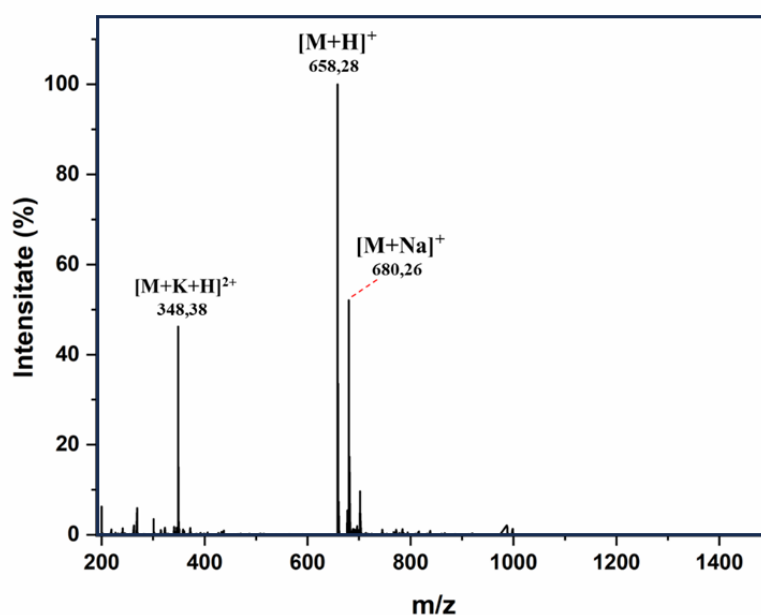


Figura III.4.4. Spectrul de masă ESI-MS al peptidei FESNY-NH₂.

III.4.5. Analiza prin microscopie cu lumină polarizată

Imaginile obținute prin microscopia în lumină polarizată arată că peptida FESNY-NH₂ se autoasamblează în condiții fiziologice în structuri hiper-ramificate, caracterizate prin modele dendritice extinse (**Figura III.4.7**) (Tomalia, 2024). Capătul amidat al peptidei poate contribui la reducerea sarcinii globale, ceea ce poate implica o scădere a solubilității. Pe de altă parte, această modificare poate spori stabilitatea peptidei, făcând-o mai asemănătoare cu proteinele native, care se află în organism. Aceste considerente ar putea amplifica semnificația biologică a activității peptidei (Arispe și colab., 2008).

Valoarea teoretică a punctului izoelectric al peptidei FESNY-NH₂ este de 6,94 (Peptide Bachem Calculator). În condiții fiziologice (pH 7,4), restul de tirozină rămâne cel mai probabil într-o stare neutră. Această neutralitate a tirozinei îi permite să medieze interacțiunile necesare pentru inițierea formării fibrelor (DiCostanzo și colab., 2012). În comparație cu peptida studiată

anterior (FESNF-NH₂) în aceleași condiții de pH, prezența tirozinei la capătul C-terminal din secvența FESNY-NH₂ diferă foarte puțin față de peptida nativă. Modificarea structurală se datorează în principal grupării hidroxil, situată în poziția 4 pe nucleul aromatic.

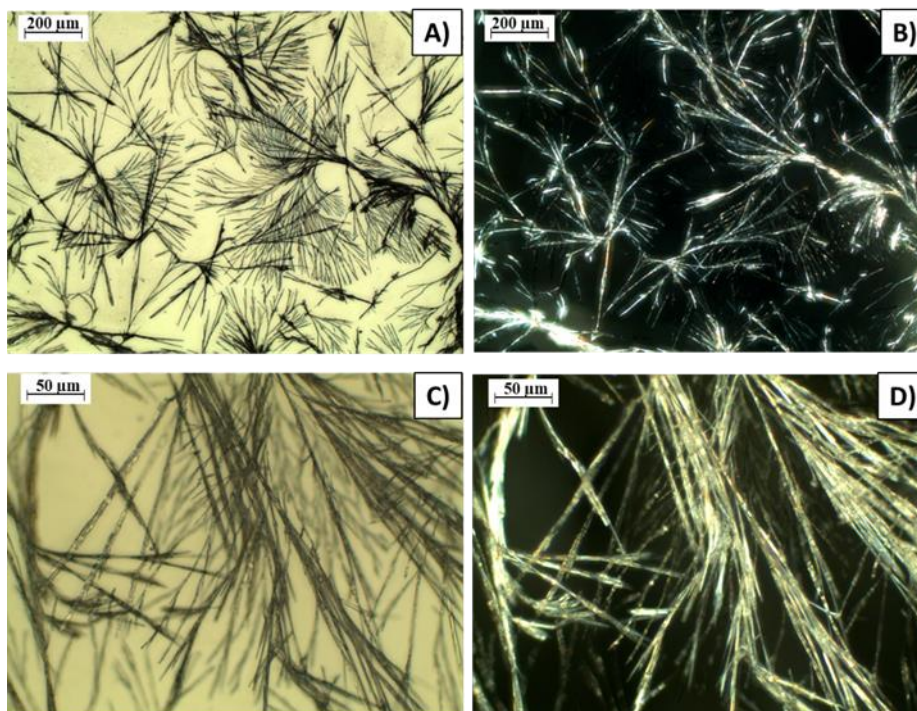


Figura III.4.7. Imagini microscopice ale specimenelor deshidratate provenite din soluții incubate de FESNY-NH₂ la un pH fiziologic de 7,4 și o temperatură de 37 °C, capturate sub două unghiuri de polarizare: a) 0° (A, C) și b) 90° (B, D). Scară: i) 200 μm (A, B); ii) 50 μm (C, D).

Este important de menționat că valorile punctelor izoelectrice teoretice ale celor două peptide, FESNF și FESNY, sunt foarte apropiate (6,99, respectiv 6,94). Totuși, comportamentul peptidei FESNY-NH₂ pare să semene cu cel al peptidei beta-amiloidice (Aβ) în ceea ce privește formarea fibrilelor, mai ales în condiții de pH apropiate de cele ale punctului izoelectric (Tian și Viles, 2022).

III.5. PEPTIDA MUTANTĂ FEHNF-NH₂

III.5.1. Analiza prin spectrometrie de masă de tip ESI-MS

Pentru caracterizarea peptidei FEHNF-NH₂, sintetizată anterior în Grupul de Biochimie, s-a utilizat spectrometria de masă de tip ESI-MS. În spectrul de masă (**Figura III.5.1**), se pot observa semnalele caracteristice ionilor moleculari mono- și divalenți, $[M+H]^+$ și $[M+2H]^{2+}$, la m/z 692,31, respectiv m/z 346,66, valori aflate în concordanță cu valorile teoretice. De asemenea, prezența ionului $[M+2H-NH_3]^{2+}$ la m/z 338,34 sugerează pierderea unei molecule de amoniac, un fenomen prezent de multe ori în condiții de ionizare blândă.

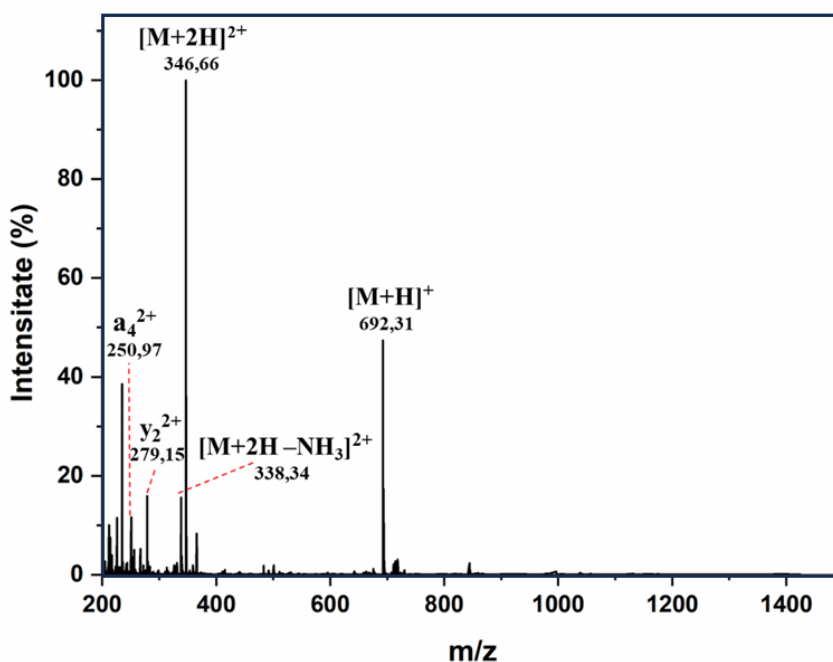


Figura III.5.1. Spectrul de masă ESI-MS al peptidei FEHNF-NH₂.

III.5.2. Analiza prin microscopie cu lumină polarizată

În comparație cu structurile fibrilare observate în cazul peptidelor FESNF, FEYNF și FESNY, imaginile obținute pentru peptida mutantă FEHNF cu ajutorul microscopului cu lumină polarizată după incubarea la 37 °C și pH 7,4 au indicat obținerea de microstructuri sferice, cu proiecții radiale.

Prezența histidinei (H) în secvența FEHNF, comparativ cu serina (S) sau tirozina (Y) la poziția a treia din mutantul studiat anterior, a fost importantă pentru înțelegerea mecanismului de autoasamblare. Histidina este un aminoacid cu o catenă laterală imidazolică care poate fi protonată sau deprotonată în funcție de pH-ul mediului. La pH 7,4, care este aproape de pKa al grupării imidazol a histidinei (aproximativ 6,0), o proporție semnificativă de resturi de histidină vor fi neutre, dar o parte ar putea fi încă protonate, purtând o sarcină pozitivă (Chen și colab., 2022). Proprietatea amfoteră a histidinei poate influența decisiv interacțiunile intermoleculare și, implicit, procesul de autoasamblare.

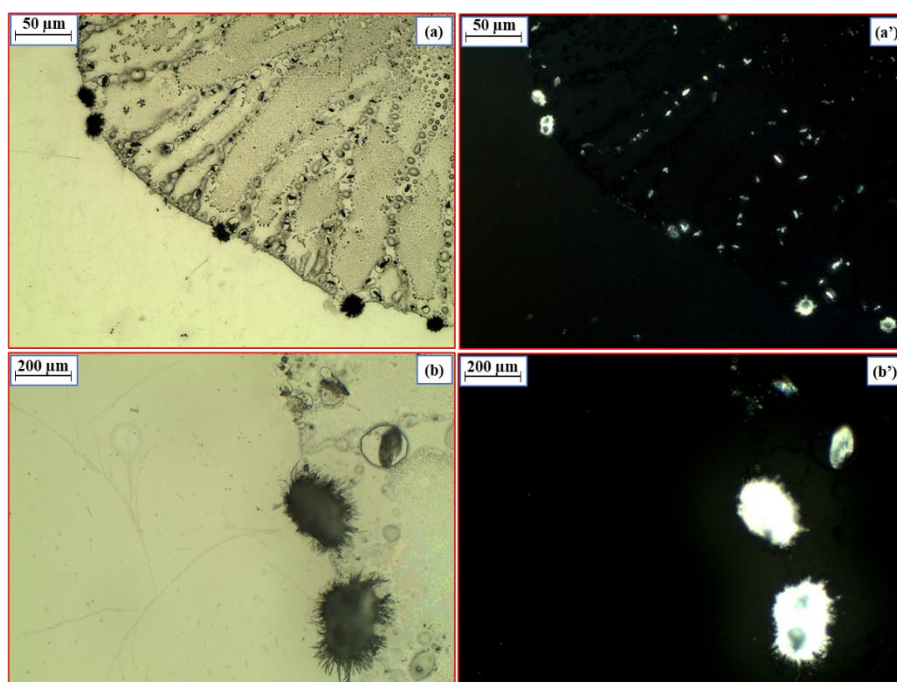


Figura III.5.2. Imagini microscopice ale specimenelor deshidratate provenite din soluții incubate de peptidă FEHNF-NH₂ la un pH fiziologic de 7,4 și o temperatură de 37 °C, capturate sub două unghiuri de polarizare: a) 0° (a, b) și b) 90° (a', b'). Scară: i) 200 μm (a, a'); ii) 50 μm (b, b').

CONCLUZII GENERALE

Prezenta teză de doctorat, intitulată „*Peptide scurte cu proprietăți de autoasamblare: sinteză, caracterizare și potențiale aplicații*”, a urmărit înțelegerea mecanismelor de autoasamblare ale peptidelor de mici dimensiuni care conțin resturi aromatice. Astfel, am urmărit printr-o abordare cuprinzătoare care corelează datele din literatura de specialitate cu observațiile experimentale proprii și aduce elemente de noutate în înțelegerea acestui proces.

Partea teoretică a tezei s-a concentrat pe analiza literaturii de specialitate actuale cu privire la proprietățile de autoasamblare ale peptidelor scurte. Referitor la contribuțiile personale, cercetările doctorale au respectat direcțiile de cercetare propuse inițial, toate obiectivele formulate fiind atinse în întregime. Pe baza rezultatelor obținute, pot fi enunțate următoarele concluzii:

O1. Sinteza unei secvențe peptidice din natură pentru studiul autoasamblării Plecând de la structura primară a lizozimei prezentă în albușul de ou de găină a fost selectată o secvență peptidică cu potențial de autoasamblare, FESNF, care a fost ulterior obținută prin sinteza de peptide în fază solidă (SPPS), folosind strategia Fmoc/tBu. Utilizarea suportului solid de Rinkamidă a permis obținerea peptidei amidate la C-terminal, în concordanță cu forma nativă a multora dintre peptidele endogene. Astfel, s-a ținut cont de compatibilitatea cu sistemele biologice naturale și de reducerea repulsiilor electrostatice care pot împiedica procesul de autoasamblare din studiile următoare.

O2. Sinteza de analogi cu tirozină pentru a analiza impactul asupra procesului de autoasamblare

Au fost selectate pentru studiu două peptide mutante, cu secvențele FEYNF-NH₂ și FESNY-NH₂, derivate din peptida nativă FESNF-NH₂. În prima variantă, fenilalanina a fost înlocuită cu tirozina, ținând cont de asemănarea structurală dintre cei doi aminoacizi. Ambii sunt aromatici și pot participa la interacțiuni hidrofobe și de tip π - π , având un rol important în formarea structurilor autoasamblate. În plus, gruparea hidroxilică specifică tirozinei oferă un potențial suplimentar de formare a legăturilor de hidrogen, care pot influența stabilitatea acestor structuri. Pe de altă parte, înlocuirea serinei cu tirozina a vizat adăugarea unui nucleu aromatic într-o zonă inițial polară și lipsită de astfel de grupări, pentru a evalua efectul asupra capacității de organizare. Cele două peptide mutante au fost obținute prin SPPS, având capătul C-terminal amidat.

O3. Optimizarea purificării și separării peptidelor prin RP-HPLC și RP-SPE

Cromatogramele obținute prin RP-HPLC pentru amestecurile brute de peptide nou sintetizate au evidențiat, în fiecare dintre cele trei sinteze, prezența unor compuși secundari. Aceștia au avut un caracter hidrofob mai pronunțat decât peptidele de interes, fiind eluați la timpi de retenție mai mari. Separarea analiților a fost realizată cu o rezoluție bună, permițând colectarea individuală a fiecărui vârf cromatografic și analiza acestora prin spectrometrie de masă. În cazul peptidelor FEYNF și FESNY a fost aplicat un protocol de extracție pe suport solid în fază inversată (RP-SPE) adaptat din literatura de specialitate. Optimizarea metodei de purificare a constat în ajustarea pH-ului

fracțiunilor eluate cu soluții de acid acetic glacial, obținute prin eluția peptidelor, la un pH de lucru de 4,5, compatibil cu specificațiile tehnice ale fazei staționare. Această modificare a facilitat excluderea unei etape adiționale de liofilizare.

O4. Analiza peptidelor prin spectrometrie de masă pentru confirmarea maselor, structurilor moleculare și a purității

Pentru caracterizarea completă a peptidelor sintetizate, s-au utilizat tehnici analitice avansate complementare, precum MALDI-ToF MS, spectrometria de masă în tandem și ESI-MS. Astfel, analiza peptidei FESNF prin MALDI-ToF și ESI-MS a confirmat masa și nu în ultimul rând structura acesteia, susținută de prezența fragmentelor caracteristice obținute în MS/MS. În plus, a fost caracterizat și produsul secundar N-alchilat, cu excesul de masă de 106 Da care provine din clivarea inadecvată a peptidei de pe rășină. Celelalte peptide sintetizate FEYNF-NH₂ și FESNY-NH₂ au fost caracterizate cu succes, evidențiind masa moleculară și tiparele de fragmentare ale acestora. FEYNF-NH₂ a prezentat capacitatea de formare a unor aducți și dimeri, în timp ce FESNY-NH₂ a s-a distins printr-o tendință de fragmentare preferențială la extremități. Totodată, peptida FEHNF, sintetizată anterior în cadrul Grupului de Biochimie și utilizată în studii preliminare de autoasamblare, a fost analizată prin ESI-MS, evidențiind semnale m/z caracteristice structurii, precum și o susceptibilitate ridicată la fragmentare, confirmată de prezența ionilor de tip y₂²⁺ și a₄²⁺.

O5. Caracterizarea peptidei FESNF prin spectroscopie UV-Viz, spectrofluorimetrie, investigarea capacității de agregare și a formării de complecși cu ionii de Cu(II)

Peptida FESNF-NH₂ a fost caracterizată spectroscopic prin UV-Viz și spectrofluorimetrie, evidențiindu-se absorbția specifică fenilalaninei la 258 nm și a legăturilor amidice la 203 nm. Intensitatea fluorescenței la 282 nm, care variază proporțional cu concentrația probei, sugerează menținerea unei stări coloidale stabile pentru concentrații cuprinse între 25 și 250 μg/mL. Capacitatea de agregare a fost analizată prin indicii de agregare, care a evidențiat o tendință de creștere în mediu ușor acid, și prin testul cu ThT, care a sugerat formarea unor structuri ordonate, de mici dimensiuni, greu detectabile spectroscopic. Legarea ionilor de Cu²⁺ la peptida FESNF a fost evidențiată prin studii UV-Viz, spectrofluorimetrice și spectrometrie de masă MALDI-ToF. Totodată, La pH 6,5 s-a observat creșterea absorbției, iar la pH 7 stingerea fluorescenței, sugerând formarea unui complex peptido-metalic. Analiza prin spectrometrie de masă a confirmat prezența complexului FESNF-Cu(II), iar microscopia cu lumină polarizată a indicat faptul că ionii Cu²⁺ favorizează autoasamblarea în structuri mai bine organizate comparativ cu peptida de una singură.

O6. Analiza structurilor peptidelor autoasamblate prin microscopie AFM, TEM și/sau POM

Imaginile AFM ale agregatelor peptidei FESNF arată o dependență clară de pH în procesul de autoasamblare, în concordanță cu datele spectroscopice. Astfel, în funcție de pH-ul soluției tampon TRIS, ansamblurile structurale prezintă morfologii diferite: la pH 7,4 se formează clustere poroase, iar la pH 8,2 apar nanofibrile compacte. Studiile prin tehnici microscopice precum TEM și

POM au arătat că peptidele FEYNF-NH₂ și FESNY-NH₂ prezintă tendințe puternice de autoasamblare la pH fiziologic, formând nanostructuri fibrilare însoțite de hiper-ramificații. Tirozina din secvența peptidei FEYNF favorizează formarea unor ansambluri structurale dense, asemănătoare hidrogelurilor supramoleculare, în timp ce secvența FESNY conduce la apariția unor structuri similare, dar mai rarefiate. Pe de altă parte, peptida FEHNF prezintă o morfologie distinctă, având un aspect de miceli cu proiecții radiale, care evidențiază influența aminoacizilor din secvență asupra mecanismului de autoasamblare.

O7. Cercetarea procesului de autoasamblare a peptidei FEYNF prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) și analiza fluorescenței

Studiile efectuate în condiții fiziologice asupra mecanismului de autoasamblare al peptidei FEYNF au evidențiat, prin analiza FTIR în regiunea amidică I, faptul că structura predominantă formată este de tip β -pliată (din eng. *β -sheet*). În plus, a fost observat un fenomen de stingere a fluorescenței după 10, respectiv 20 de minute, pentru două concentrații diferite ale peptidei FEYNF-NH₂, la 27 μ M și 0,5 mM, în regiunea spectrală pentru violet-albastru (390–450 nm). Aceste rezultate sugerează proprietățile de gelifiere ale peptidei FEYNF.

O8. Aprofundarea studiului mecanismelor de autoasamblare și cercetarea aplicațiilor biomedicale prin studii *in silico*

Studiile *in silico* au arătat că la pH 8,2 interacțiunile intra- și intermoleculare de tip π - π sunt esențiale pentru autoasamblarea peptidei FESNF. Această peptidă preferă o conformație „deschisă” care favorizează agregarea, iar simulările cu granulație grosieră au confirmat formarea fibrilelor la pH ușor bazic. În plus, în cazul peptidei FEYNF, studiile de andocare moleculară au evidențiat rolul tirozinei în formarea structurilor hiper-ramificate prin interacțiuni π - π cu fenilalanina C-terminală. Astfel, dimerul protonat (FEYNF@FEYNF(+2)) tinde să adopte structuri β -pliate, favorizând creșterea oligomerilor și formarea fibrilelor. În plus, simulările *in silico* au arătat că peptida FEYNF poate forma poliplecși, relevanți din punct de vedere medical pentru terapia genică.

O9. Diseminarea rezultatelor prin publicații și participări la conferințe științifice

Activitatea de cercetare desfășurată în cadrul acestei teze de doctorat s-a concretizat prin publicarea a 3 articole științifice în jurnale indexate Web of Science, însumând un factor de impact total de 10,8. De asemenea, datele obținute au fost diseminate prin prezentarea a 9 lucrări la conferințe internaționale și a altor 7 lucrări în cadrul conferințelor naționale.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Abbas, M., Ovais, M., Atiq, A., Ansari, T. M., Xing, R., Spruijt, E., Yan, X. (2022). Tailoring supramolecular short peptide nanomaterials for antibacterial applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 460, 214481.
- Accardo, A., Handelman, A. (2022). Optical Polarization-Based Measurement Methods for Characterization of Self-Assembled Peptides' and Amino Acids' Micro- and Nanostructures. *Molecules*, 27(6), 1802.
- Akter, R., Zou, J., Raleigh, D. P. (2020). Differential effects of serine side chain interactions in amyloid formation by islet amyloid polypeptide. *Protein Science*, 29(2), 555-563.
- Anand, B. G., Dubey, K., Shekhawat, D. S., Kar, K. (2017). Intrinsic property of phenylalanine to trigger protein aggregation and hemolysis has a direct relevance to phenylketonuria. *Scientific Reports*, 7(1), 1–9.
- Apostolopoulos, V., Bojarska, J., Chai, T. T., Elnagdy, S., Kaczmarek, K., Matsoukas, J., New, R., Parang, K., Lopez, O. P., Parhiz, H., Perera, C. O., Pickholz, M., Remko, M., Saviano, M., Skwarczynski, M., Tang, Y., Wolf, W. M., Yoshiya, T., Zabrocki, J., Zielenkiewicz, P., AlKhazindar, M., Barriga, V., Kelaidonis, K., Sarasia, E. M., Toth, I. (2021). A Global Review on Short Peptides: Frontiers and Perspectives. *Molecules*, 26(2), 430.
- Arad, E., Green, H., Jelinek, R., Rapaport, H. (2020). Revisiting thioflavin T (ThT) fluorescence as a marker of protein fibrillation – The prominent role of electrostatic interactions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 573, 87–95.
- Arispe, N., Diaz, J. C., Flora, M. (2008). Efficiency of histidine-associating compounds for blocking the Alzheimer's A β channel activity and cytotoxicity. *Biophysical Journal*, 95(10), 4879–4889.
- Bagińska, K., Makowska, J., Wicz, W., Kasprzykowski, F., Chmurzyński, L. (2008). Conformational studies of alanine-rich peptide using CD and FTIR spectroscopy. *Journal of Peptide Science*, 14(3), 283–289.
- Barazzouk, S., Daneault, C. (2012). Amino Acid and Peptide Immobilization on Oxidized Nanocellulose: Spectroscopic Characterization. *Nanomaterials*, 2(2), 187–205.
- Barrera, E. E., Zonta, F., Pantano, S. (2021). Dissecting the role of glutamine in seeding peptide aggregation. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 1595–1602.
- Barreto, M. S. C., Elzinga, E. J., Alleoni, L. R. F. (2020). The molecular insights into protein adsorption on hematite surface disclosed by in-situ ATR-FTIR/2D-COS study. *Scientific Reports*, 10(1), 1–13.
- Bernson, D., Mecinovic, A., Abed, M. T., Limé, F., Jageland, P., Palmlöf, M., Esbjörner, E. K. (2020). Amyloid formation of bovine insulin is retarded in moderately acidic pH and by addition of short-chain alcohols. *European Biophysics Journal*, 49(2), 145–153.
- Bortolotti, A., Wong, Y. H., Korsholm, S. S., Bähring, N. H. B., Bobone, S., Tayyab, S., Van De Weert, M., Stella, L. (2016). On the purported “backbone fluorescence” in protein three-dimensional fluorescence spectra. *RSC Advances*, 6(114), 112870–112876.
- Chakraborty, P., Tang, Y., Yamamoto, T., Yao, Y., Guterman, T., Zilberzwige-Tal, S., Adadi, N., Ji, W., Dvir, T., Ramamoorthy, A., Wei, G., Gazit, E. (2020). Unusual Two-Step Assembly of a Minimalistic Dipeptide-Based Functional Hydrogelator. *Advanced Materials*, 32(9), 1906043.

- Chen, Y., Tao, K., Ji, W., Kumar, V. B., Rencus-Lazar, S., Gazit, E. (2022). Histidine as a key modulator of molecular self-assembly: Peptide-based supramolecular materials inspired by biological systems. *Materials Today*, 60, 106–127.
- Cojocaru, C., Neamtu, A., Vasiliu, T., Isac, D. L., Pinteala, M. (2021). Molecular Dynamics Simulations and in silico Analysis of Supramolecular Self-assembled Structures. *New Trends in Macromolecular and Supramolecular Chemistry for Biological Applications*, 357–371.
- De Meutter, J., Goormaghtigh, E. (2021). Amino acid side chain contribution to protein FTIR spectra: impact on secondary structure evaluation. *European Biophysics Journal*, 50(3–4), 641–651.
- DiCostanzo, A. C., Thompson, J. R., Peterson, F. C., Volkman, B. F., Ramirez-Alvarado, M. (2012). Tyrosine residues mediate fibril formation in a dynamic light chain dimer interface. *Journal of Biological Chemistry*, 287(33), 27997–28006.
- Emmert, J., Pfluger, M. and Wahl, F. (2004). Influence of Na and K Concentration in Solvents on mass spectra of peptides in LC/ESI-MS, *Spectroscopy*, 17(12), 646–649.
- Faller, P. (2009). Copper and Zinc Binding to Amyloid- β : Coordination, Dynamics, Aggregation, Reactivity and Metal-Ion Transfer. *ChemBioChem*, 10(18), 2837–2845.
- Gelain, F., Luo, Z., Zhang, S. (2020). Self-Assembling Peptide EAK16 and RADA16 Nanofiber Scaffold Hydrogel. *Chemical Reviews*, 120(24), 13434–13460.
- Guo, M., Gorman, P. M., Rico, M., Chakrabartty, A., Laurents, D. V. (2005). Charge substitution shows that repulsive electrostatic interactions impede the oligomerization of Alzheimer amyloid peptides. *FEBS Letters*, 579(17), 3574–3578.
- Guzmán, F., Aróstica, M., Román, T., Beltrán, D., Gauna, A., Albericio, F., Cárdenas, C. (2023). Peptides, solid-phase synthesis and characterization: Tailor-made methodologies. *Electronic Journal of Biotechnology*, 64, 27–33.
- Hong, Y., Lau, L. S., Legge, R. L., Chen, P. (2004). Critical self-assembly concentration of an ionic-complementary peptide EAK16-I. *Journal of Adhesion*, 80(10–11), 913–931.
- Insuasty Cepeda, D. S., Pineda Castañeda, H. M., Rodríguez Mayor, A. V., García Castañeda, J. E., Maldonado Villamil, M., Fierro Medina, R., Rivera Monroy, Z. J. (2019). Synthetic Peptide Purification via Solid-Phase Extraction with Gradient Elution: A Simple, Economical, Fast, and Efficient Methodology. *Molecules*, 24(7), 1215.
- Jackson, P., Fisher, K. J., Attalla, M. I. (2011). Tandem Mass Spectrometry Measurement of the Collision Products of Carbamate Anions Derived from CO₂ Capture Sorbents: Paving the Way for Accurate Quantitation. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 22(8), 1420.
- Jayawarna, V., Richardson, S. M., Hirst, A. R., Hodson, N. W., Saiani, A., Gough, J. E., Ulijn, R. V. (2009). Introducing chemical functionality in Fmoc-peptide gels for cell culture. *Acta Biomaterialia*, 5(3), 934–943.
- **Jitaru, S. C., Drochioiu, G. (2023). Mass spectrometric characterization of some gel-forming peptides. *Revue Roumaine De Chimie*, 68(5), 285–295.**
- **Jitaru, S. C., Enache, A. C., Drochioiu, G., Petre, B. A., Gradinaru, V. R. (2024). Dendritic-Like Self-assembling Pentapeptide with Potential Applications in Emerging Biotechnologies. *IFMBE Proceedings*, 111, 163–170.**
- **Jitaru, S. C., Neamtu, A., Drochioiu, G., Darie-Ion, L., Stoica, I., Petre, B. A., Gradinaru, V. R. (2023). A Diphenylalanine Based Pentapeptide with Fibrillating Self-Assembling Properties. *Pharmaceutics*, 15(2), 371.**

- Klose, D., Vemulapalli, S. P. B., Richman, M., Rudnick, S., Aisha, V., Abayev, M., Chemerovski, M., Shviro, M., Zitoun, D., Majer, K., Wili, N., Goobes, G., Griesinger, C., Jeschke, G., Rahimipour, S. (2022). Cu²⁺-Induced self-assembly and amyloid formation of a cyclic D,L- α -peptide: structure and function. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 24(11).
- Konda, M., Bhowmik, S., Mobin, S. M., Biswas, S., Das, A. K. (2016). Modulating Hydrogen Bonded Self-assembled Patterns and Morphological Features by a Change in Side Chain of Third Amino Acid of Synthetic γ - Amino Acid Based Tripeptides. *ChemistrySelect*, 1(11), 2586–2593.
- Lakowicz, J.R. (2006). Principles of fluorescence spectroscopy. Boston, MA: springer US., 27–61.
- Moyer, S. C., VonSeggern, C. E., Cotter, R. J. (2003). Fragmentation of cationized phosphotyrosine containing peptides by atmospheric pressure MALDI/Ion trap mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 14(6), 581–592.
- Munteanu, I. G., Grădinaru, V. R., Apetrei, C. (2022). Development of a Chemically Modified Sensor Based on a Pentapeptide and Its Application for Sensitive Detection of Verbascoside in Extra Virgin Olive Oil. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 15704.
- Nathanael, J. G., Gamon, L. F., Cordes, M., Rablen, P. R., Bally, T., Fromm, K. M., Giese, B., Wille, U. (2018). Amide Neighbouring-Group Effects in Peptides: Phenylalanine as Relay Amino Acid in Long-Distance Electron Transfer. *ChemBioChem*, 19(9), 922–926.
- Pan, H. (2008). A non-covalent dimer formed in electrospray ionisation mass spectrometry behaving as a precursor for fragmentations. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22(22), 3555–3560.
- Peptide Calculator and Amino Acid Calculator | Bachem. Accesat la 3 iulie 2025: <https://www.bachem.com/knowledge-center/peptide-calculator/>
- Prasad, S., Mandal, I., Singh, S., Paul, A., Mandal, B., Venkatramani, R., Swaminathan, R. (2017). Near UV-Visible electronic absorption originating from charged amino acids in a monomeric protein. *Chemical Science*, 8(8), 5416–5433.
- Restu, W. K., Yamamoto, S., Nishida, Y., Ienaga, H., Aoi, T., Maruyama, T. (2020). Hydrogel formation by short D-peptide for cell-culture scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*, 111, 110746.
- Riley, M. K., Vermerris, W. (2017). Recent Advances in Nanomaterials for Gene Delivery—A Review. *Nanomaterials*, 7(5), 94.
- Rodger, A. (2018). UV absorbance spectroscopy of biological macromolecules. *Encyclopedia of Biophysics*, 1–5.
- Ross, A., Sauce-Guevara, M. A., Alarcon, E. I., Mendez-Rojas, M. A. (2022). Peptide Biomaterials for Tissue Regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 893936.
- Rousseau, F., Schymkowitz, J., Serrano, L. (2006). Protein aggregation and amyloidosis: confusion of the kinds? *Current Opinion in Structural Biology*, 16(1), 118–126.
- Saiani, A., Mohammed, A., Frielinghaus, H., Collins, R., Hodson, N., Kielty, C. M., Sherratt, M. J., Miller, A. F. (2008). Self-assembly and gelation properties of α -helix versus β -sheet forming peptides. *Soft Matter*, 5(1), 193–202.

- Seo, J., Hoffmann, W., Warnke, S., Huang, X., Gewinner, S., Schöllkopf, W., Bowers, M. T., Von Helden, G., Pagel, K. (2016). An infrared spectroscopy approach to follow β -sheet formation in peptide amyloid assemblies. *Nature Chemistry*, 9(1), 39–44.
- Sfragano, P. S., Moro, G., Polo, F., Palchetti, I. (2021). The Role of Peptides in the Design of Electrochemical Biosensors for Clinical Diagnostics. *Biosensors*, 11(8), 246.
- Shattuck, J. E., Waechter, A. C., Ross, E. D. (2017). The effects of glutamine/asparagine content on aggregation and heterologous prion induction by yeast prion-like domains. *Prion*, 11(4), 249–264.
- Sun, B., Tao, K., Jia, Y., Yan, X., Zou, Q., Gazit, E., Li, J. (2019). Photoactive properties of supramolecular assembled short peptides. *Chemical Society Reviews*, 48(16), 4387–4400.
- Sun, S., Yu, C., Qiao, Y., Lin, Y., Dong, G., Liu, C., Zhang, J., Zhang, Z., Cai, J., Zhang, H., Bu, D. (2008). Deriving the probabilities of water loss and ammonia loss for amino acids from tandem mass spectra. *Journal of Proteome Research*, 7(1), 202–208.
- Tian, Y., Viles, J. H. (2022). pH Dependence of Amyloid- β Fibril Assembly Kinetics: Unravelling the Microscopic Molecular Processes. *Angewandte Chemie - International Edition*, 61(48), e202210675.
- Wang, M., Wang, S., Li, B., Tian, Y., Zhang, H., Bai, L., Ba, X. (2021). Synthesis of linear polyglucoside and inhibition on the amyloid fibril formation of hen egg white lysozyme. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166, 771–777.
- Yang, J., Luo, G. F. (2023). Peptide-Based Vectors for Gene Delivery. *Chemistry*, 5(3), 1696–1718.
- Yang, S., Wang, M., Wang, T., Sun, M., Huang, H., Shi, X., Duan, S., Wu, Y., Zhu, J., Liu, F. (2023). Self-assembled short peptides: Recent advances and strategies for potential pharmaceutical applications. *Materials Today Bio*, 20, 100644.
- Zaguri, D., Zimmermann, M. R., Meisl, G., Levin, A., Rencus-Lazar, S., Knowles, T. P. J., Gazit, E. (2021). Kinetic and Thermodynamic Driving Factors in the Assembly of Phenylalanine-Based Modules. *ACS Nano*, 15(11), 18305–18311.
- Zapadka, K. L., Becher, F. J., Gomes dos Santos, A. L., Jackson, S. E. (2017). Factors affecting the physical stability (aggregation) of peptide therapeutics. *Interface Focus*, 7(6), 20170030.
- Zelenovskiy, P. S., Shur, V. Y., Nuraeva, A. S., Vasilev, S. G., Vasileva, D. S., Alikin, D. O., Chezganov, D. S., Krasnov, V. P., Kholkin, A. L. (2015). Morphology and Piezoelectric Properties of Diphenylalanine Microcrystals Grown from Methanol-Water Solution. *Ferroelectrics*, 475(1), 127–134.
- Zhang, S., Greenfield, M. A., Mata, A., Palmer, L. C., Bitton, R., Mantei, J. R., Aparicio, C., De La Cruz, M. O., Stupp, S. I. (2010). A self-assembly pathway to aligned monodomain gels. *Nature Materials*, 9(7), 594–601.
- Zhang, Z. (2004). Prediction of Low-Energy Collision-Induced Dissociation Spectra of Peptides. *Analytical Chemistry*, 76(14), 3908–3922.
- Zhou, P., Yuan, C., Yan, X. (2022). Computational approaches for understanding and predicting the self-assembled peptide hydrogels. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 62, 101645.
- Ziaunys, M., Smirnovas, V. (2019). Emergence of visible light optical properties of L-phenylalanine aggregates. *PeerJ*, 2019(2), e6518.
-

DISEMINAREA REZULTATELOR

Articole

Articole științifice publicate *in extenso* în reviste cotate web of science (WoS) cu factor de impact (actualizat 2025):

1. **Jitaru, S.C.**, Enache, A.C., Cojocaru, C., Drochioiu, G., Petre, B.A., Gradinaru, V.R. (2024) Self-Assembly of a Novel Pentapeptide into Hydrogelated Dendritic Architecture: Synthesis, Properties, Molecular Docking and Prospective Applications, *Gels*, 10(2), 86. DOI: 10.3390/gels10020086; **Factor de impact 5,5**, Zona roșie (Q1 – JIF/AIS)
2. **Jitaru, S.C.**, Neamtu, A., Drochioiu, G., Darie-Ion, L., Stoica, I., Petre, B.A., Gradinaru, V.R. (2023) A diphenylalanine based pentapeptide with fibrillating self-assembling properties, *Pharmaceutics*, 15(2), 371. DOI: 10.3390/pharmaceutics15020371; **Factor de impact: 4,9**, Zona galbenă/roșie (Q1 – JIF, Q2 - AIS).
3. **Jitaru, S.C.**, Drochioiu, G. (2023) Mass spectrometric characterization of some gel-forming peptides, *Revue Roumaine de Chimie*, 68(5-6), 285-295. DOI: 10.33224/rrch.2023.68.5-6.12; **Factor de impact: 0,4**, Zona gri (Q4 - JIF/AIS).

Factor de impact total: 10,8

Articole științifice publicate *in extenso* în volumele conferințelor:

1. **Jitaru, S.C.**, Enache, A.C., Drochioiu, G., Petre, B.A., Gradinaru, V.R. (2024) Dendritic-like self-assembling pentapeptide with potential applications in emerging biotechnologies, *Advances in Digital Health and Medical Bioengineering, IFMBE Proceedings Springer*, Cham, 111, 105-114,. DOI: 10.1007/978-3-031-62523-7_18