

UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI

Facultatea de Chimie

**ȘCOALA DOCTORALĂ DE CHIMIE ȘI ȘTIINȚE ALE VIEȚII ȘI
PĂMÂNTULUI**



***Compuși biologic activi implicați în procese
maladive: caracterizare prin spectrometrie de masă și
tehnici complementare***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat,

Prof. Dr. GABI DROCHIOIU

Student-Doctorand,

Chim. CLAUDIA ANDRIEȘ

**IAȘI
2017**

Elaborarea lucrării de doctorat a fost un drum lung, pe parcursul căruia am învățat continuu și m-am autoperfecționat. Acest drum ar fi fost imposibil de parcurs fără oamenii care mi-au oferit suportul lor necondiționat în acești ani.

*Din acest motiv, pe această cale vreau să îi mulțumesc conducătorului de doctorat, domnului **Prof. Dr. Gabi Drochioiu** pentru îndrumarea acordată în acești ani, pentru formarea mea ca cercetător și pentru ajutorul acordat în timpul elaborării tezei de doctorat.*

*Îi sunt recunoscătoare doamnei **Lector Dr. Brîndușa Alina Petre** pentru încrederea acordată și implicarea mea în proiecte de cercetare. Dr. Brîndușa Petre a fost persoana care a făcut posibil primul meu stagiu de practică în străinătate în cadrul Universității din Konstanz, Germania. Dumneaei m-a inițiat în fascinantul domeniu al proteomicii și m-a orientat către spectrometria de masă. A contribuit la formarea mea ca cercetător și mi-a fost alături ca o soră mai mare.*

*Îi mulțumesc domnului **Conf. Dr. Robert Vasile Grădinaru** pentru îndrumarea pe care mi-a oferit-o. Prima colaborare cu dumnealui a fost realizarea tezei de disertație și a continuat și după. Îi mulțumesc pentru îndrumare și pentru că întotdeauna și-a făcut timp pentru a-mi da un sfat, un ajutor. Prin intermediul dumnealui am intrat în Colectivul de Biochimie, colectiv în care m-am format și am evoluat.*

*Îi mulțumesc domnului **Conf. Dr. Costel Moldoveanu** pentru că a fost de acord să facă parte din Comisia de îndrumare și pentru sfaturile acordate la fiecare susținere de referat.*

*Le mulțumesc colegilor din **Grupul de Biochimie** pentru discuțiile interesante și prietenia acordată. În special, îi sunt recunoscătoare **Dr. Laurei Ion** pentru experimentele realizate împreună, pentru discuțiile interesante și îi mulțumesc ei și **Dr. Sabine Băncilă** pentru colaborare și prietenie.*

*Mulțumesc programului **POSDRU** (POSDRU/159/1.5/S/133652) pentru finanțarea acordată, făcând posibilă participarea la conferințe internaționale și nu numai.*

*Și nu în ultimul rând îi mulțumesc **familiei mele** pentru dragostea necondiționată, pentru încrederea în mine și pentru ajutorul nemărginit. Sunt ceea ce sunt datorită lor și am reușit datorită faptului că au fost mereu aproape de mine să mă încurajeze și să creadă în mine.*

Cuprins

Abrevieri.....	9
Introducere.....	12
Capitolul I. Stadiul actual al cunoașterii.....	17
<i>I.1. Compuși chimici cu activitate biologică. Proteinele.....</i>	<i>17</i>
I.1.1. Nivele de organizare ale proteinelor	21
I.1.2. Rolul proteinelor în organism	23
<i>I.1.2.1. Proteinele cu rol de enzimă.....</i>	<i>24</i>
<i>I.1.2.1.1. Coenzima A – cofactor în activitatea enzimatică.....</i>	<i>25</i>
I.1.3. Interacțiunea proteinelor cu ioni metalici	27
<i>I.1.3.1. Aurul.....</i>	<i>28</i>
<i>I.1.3.2. Mercurul.....</i>	<i>29</i>
I.1.4. Exemple particulare de proteine studiate și importanța acestora	30
<i>I.1.4.1. Proteina eozinofil cationică</i>	<i>30</i>
<i>I.1.4.2. Prostaciclina sintetizată</i>	<i>31</i>
<i>I.1.4.3. Proteina inhibitoare a elastazei leucocitare</i>	<i>32</i>
<i>I.1.4.4. Zeinele.....</i>	<i>32</i>
<i>I.2. Proteomica.....</i>	<i>34</i>
I.2.1. Sinteza proteinelor	34
<i>I.2.1.1. Biosinteza proteinelor</i>	<i>34</i>
<i>I.2.1.2. Sinteza chimică a proteinelor.....</i>	<i>36</i>
I.2.2. Modificări post-tranșlaționale ale proteinelor.....	38
<i>I.2.2.1. Nitrarea proteinelor</i>	<i>39</i>
<i>I.3. Metode de investigare și caracterizare a proteinelor</i>	<i>42</i>
I.3.1. Spectrometria de masă	42
<i>I.3.1.1. Scurt istoric.....</i>	<i>43</i>
<i>I.3.1.2. Aplicații ale spectrometriei de masă.....</i>	<i>45</i>
<i>I.3.1.2.1. Spectrometria de masă în studiul interacțiunii proteinelor cu ioni metalici .</i>	<i>46</i>
<i>I.3.1.2.2. Spectrometria de masă în domeniul proteomicii</i>	<i>47</i>
I.3.2. Tehnici imunoanalitice.....	49
<i>I.3.2.1. Determinări imunoanalitice prin ELISA.....</i>	<i>49</i>
<i>I.3.2.2. Biosenzor pe bază de undă acustică de suprafață cuplat cu spectrometrie de masă.....</i>	<i>50</i>

Capitolul II. Materiale și metode	53
II.1. Materiale.....	53
II.2. Metode.....	54
II.2.1. Măsurători spectrofotometrice.....	54
II.2.2. Măsurători FTIR	55
II.2.3. Teste de toxicitate utilizând drojdia <i>Pichia Pastoris</i>	55
II.2.4. Studii prin microscopia de forță atomică (AFM).....	55
II.2.5. Măsurătorile spectrometrice de masă	56
II.2.5.1. Măsurătorile spectrometrice de masă cu ionizare de tip electrospray	56
II.2.5.2. Caracterizarea peptidelor sintetizate prin spectrometrie de masă de tip MALDI-TOF.....	58
II.2.6. Sinteza automată a peptidelor	60
II.2.7. Purificare peptidelor sintetizate prin cromatografia de lichid de înaltă performanță (HPLC)	63
II.2.8. Experimentele de tip dot-blot	65
II.2.9. Măsurători de imunoafinitate ELISA	66
II.2.10. Măsurători de afinitate cu biosenzor pe bază de undă acustică de suprafață.....	67
II.2.11. Modelare moleculară	68
II.2.12. Tratamentul materialului biologic cu 2,4-dinitrofenol	70
II.2.13. Extracția proteinelor din probe biologice	71
II.2.14. Determinarea concentrației proteinelor	71
II.2.15. Pregătirea probelor de zeină pentru separarea electroforetică.....	73
II.2.16. Separarea proteinelor prin electroforeză.....	73
II.2.16.1. Separarea proteinelor prin electroforeză unidimensională	73
II.2.16.2. Separarea proteinelor prin electroforeză bidimensională	75
II.2.17. Digestia enzimatică în gel cu tripsină.....	77
II.2.18. Desalinarea și concentrarea probelor peptidice înaintea măsurătorilor prin spectrometrie de masă	79
Capitolul III. Interacțiunea Coenzimei A cu ioni metalici de tipul Au^{3+} și Hg^{2+}	80
III.1. Interacțiunea Coenzimei A cu ioni de Au^{3+}	81
III.1.1. Caracterizarea sistemului CoA-Au prin spectrofotometria UV-Vis	81
III.1.2. Caracterizarea sistemului CoA-Au prin spectroscopia de infraroșu	84
III.1.3. Studii de toxicitate pe microorganisme de <i>Pichia Pastoris</i>	86
III.1.4. Investigarea sistemului CoA-Au prin AFM	88

III.1.5. Caracterizarea sistemului CoA-Au prin spectrometria de masă.....	93
III.2. Interacțiunea Coenzimei A cu ioni de Hg^{2+}	96
III.2.1. Caracterizarea sistemului CoA-Hg prin spectrometria de masă.....	96
III.3. Concluzii.....	98
Capitol IV. Caracterizarea unor interacțiuni de tipul antigen - anticorp.....	100
IV.1. Purificarea și caracterizarea peptidelor ECP $^{26}AMRAINNYRWR^{36}$ și PCS $^{422}KDGKRLKNYSL^{432}$	102
IV.1.1. Purificarea și caracterizarea peptidei ECP $^{26}AMRAINNYRWR^{36}$ cu tirozină nemodificată, hidroxilată și nitrată	102
IV.1.1.1. Purificarea și caracterizarea peptidei ECP $^{26}AMRAINNYRWR^{36}$	103
IV.1.1.2. Purificarea și caracterizarea peptidei ECPn $^{26}AMRAINNY(NO_2)RWR^{36}$	106
IV.1.1.3. Purificarea și caracterizarea peptidei ECPh $^{26}AMRAINNY(OH)RWR^{36}$	110
IV.1.2. Purificarea și caracterizarea peptidei PCS $^{422}KDGKRLKNYSL^{432}$ cu tirozină nemodificată, hidroxilată și nitrată	111
IV.1.2.1. Purificarea și caracterizarea peptidei PCS $^{422}AMRAINNYRWR^{432}$	113
IV.1.2.2. Purificarea și caracterizarea peptidei PCSn $^{422}AMRAINNY(NO_2)RWR^{432}$..	116
IV.1.2.3. Purificarea și caracterizarea peptidei PCSH $^{422}AMRAINNY(OH)RWR^{432}$..	120
IV.2. Afinitatea anticorpului anti 3-nitrotirozină față de peptide sintetice model cu tirozina nemodificată, nitrată sau hidroxilată.....	123
IV.2.1. Specificitatea anticorpilor anti 3-nitrotirozină vizualizată prin dot-blot.....	123
IV.2.2. Specificitatea anticorpului anti 3-nitrotirozină studiată prin ELISA	125
IV.2.3. Specificitatea anticorpului anti 3-nitrotirozină studiată cu un biosenzor pe bază de undă acustică de suprafață.....	127
IV.3. Modelarea moleculară în studiul modificărilor oxidative la aminoacidul tirozină	131
IV.4. Concluzii	134
Capitol V. Studiul unor proteine din sisteme biologice printr-o abordare top down	137
V.1. Studiul toxicității 2,4-DNP asupra semințelor de grâu	138
V.2. Influența 2,4-DNP asupra expresiei proteinelor din microorganismul model <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	141
V.2.1. Determinarea concentrației totale a proteinelor.....	143
V.2.2. Acțiunea 2,4-dinitrofenolului asupra proteinelor hidrosolubile din drojdia de bere	144
V.2.2.1. Separarea proteinelor extrase din drojdia de bere prin 1D-electroforeză....	144
V.2.2.2. Analiza proteinelor de interes prin spectrometrie de masă.....	146

V.2.3. Acțiunea 2,4-dinitrofenolului asupra proteinelor totale din drojdia de bere	148
<i>V.3. Transformarea zeinelor în organism caracterizată prin electroforeză.....</i>	151
<i>V.4. Concluzii.....</i>	153
Concluzii generale	156
Bibliografie.....	161

Lucrarea cu titlul **“Compuși biologic activi implicați în procese malade: caracterizare prin spectrometrie de masă și tehnici complementare”** este însoțită de **241** indici bibliografici. Rezumatul prezintă într-o formă succintă rezultatele cercetărilor personale, concluzii generale și o bibliografie selectivă. Rezultatele experimentale fac obiectul a **13** Tabele, **59** Figuri și **4** lucrări științifice publicate în reviste cu factor de impact și alte **2** lucrări științifice în curs de publicare.

Introducere

Tot ceea ce ne înconjoară, în esență, reprezintă un sistem care este fie mai simplu, fie mai complex și este alcătuit dintr-o multitudine de compuși chimici, care la rândul lor sunt caracterizați de o compoziție elementală. Astfel, organismele vii reprezintă un ansamblu complex alcătuit din numeroase molecule, fiecare dintre acestea având un rol bine definit pentru organismul viu. Lipsa unui compus din sistemul pe care îl caracterizează poate avea urmări grave pentru organism, acesta nefiind capabil fie să se dezvolte sau să se adapteze la mediul înconjurător, fie chiar să supraviețuiască. Există numeroase exemple în literatura de specialitate care vin să confirme că fiecare compus are un rol bine definit în organism și asigură dezvoltarea, viața și activitatea acestuia. Compușii biologici activi studiați în cadrul acestei teze sunt proteinele. Din punct de vedere structural, proteinele sunt polimeri biologici în care unitatea monomerică este reprezentată de un aminoacid, iar din punct de vedere funcțional, proteinele sunt bio-macromolecule ce îndeplinesc o gamă largă de activități esențiale pentru organism. Rolul proteinelor în organism variază extrem de mult.

În general, proteinele sunt implicate în numeroase procese biologice, datorită capacității lor de a cataliza un anumit tip de reacții și astfel de proteine sunt cunoscute de asemenea drept enzime [2]. Numeroase proteine cu rol de enzimă în organism nu își pot desfășura activitatea catalitică decât în prezența unor alte molecule cunoscute drept cofactor. Un exemplu de moleculă biologică cu rol de cofactor, care este necesară pentru circa 4% din enzimele din organism pentru a-și desfășura activitatea este Coenzima A. Alte proteine, imunoglobulinele joacă un rol important în menținerea stării de sănătate a organismului, fiind o parte importantă a sistemului imunitar [3-5]. De asemenea, acești biopolimeri sunt implicați în transmiterea semnalelor de la celulă la celulă [6,7]. Numeroase proteine sunt multifuncționale, îndeplinind mai multe funcții biologice simultan [8].

Modificările post-tranlaționale au loc în organism în condiții fiziologice normale și sunt o parte importantă în formarea, localizarea și funcționalitatea proteinelor. Unele modificări structurale la nivelul proteinelor au loc sau sunt intensificate în procese patofiziologice, majoritatea ca o amprentă a stresului oxidativ celular. Un exemplu în acest sens îl constituie proteinele identificate ca fiind modificate în sputa pacienților astmatici și

anume au fost depistate modificări ale proteinelor la nivelul aminoacidului tirozină prin bromurare în poziția *orto* (Br-Tyr) [10]. Bromurarea restului de tirozină din componența proteinelor, nu este singura și nici cea mai frecventă modificare ce are loc la nivelul acestui aminoacid în condiții de stres oxidativ. 3-nitrotirozina (3-NT) din structura proteinelor poate servi de asemenea drept amprentă moleculară pentru modificările oxidative în diferite condiții patologice.

Nitrarea tirozinei este o modificare post-translațională, ce are loc prin atașarea grupării nitro în poziția *orto* a aminoacidului tirozină și chiar dacă are loc în organism și în condiții fiziologice normale, acest proces este puternic intensificat cu vârsta și în diverse afecțiuni [12-14]. Un alt exemplu al implicării 3-NT în procese patofiziologice este nitrarea ce poate avea loc la aminoacidul Tyr¹⁰ din peptida amiloidă beta (A β), peptidă implicată în boala Alzheimer (AD) ce determină o accelerare a procesului de agregare. În momentul de față, încă nu este bine înțeles dacă nitrarea proteinelor le modifică funcția determinând dezvoltarea accelerată a unei afecțiuni sau este doar o consecință a bolii [16].

Astfel, proteinele sunt implicate în toate procesele din organism, atât cele normale, cât și cele patofiziologice. De asemenea, modificările la nivelul structurii proteinelor pot fi indicatori ai unei afecțiuni sau chiar pot fi modul prin care se instalează condițiile patofiziologice. Pe de altă parte, proteinele pot fi molecule cu acțiune benefică asupra organismului și sunt utilizate în scopuri terapeutice.

Datorită numeroaselor funcții biologice pe care le îndeplinesc proteinele, a implicării acestora în diverse condiții patologice, proteinele au devenit niște compuși de interes deosebit pentru cercetătorii din domeniul biochimiei și medicinei. Astfel, studiul proteinelor a determinat dezvoltarea vertiginoasă a unui nou domeniu inter-disciplinar precum proteomica. În literatura de specialitate, există numeroase articole de interes în domeniul proteomice, iar această știință a prezentat o evoluție remarcabilă odată cu punerea la punct al spectrometriei de masă și combinării acesteia cu alte tehnici complementare. Proteomica presupune studiul și caracterizarea proteinelor din sisteme biologice, dar și sinteza, purificarea și caracterizarea unor peptide model pentru a fi utilizate ulterior în studii *in vitro* pentru o mai bună înțelegere a anumitor procese.

În cadrul tezei de doctorat am studiat și caracterizat molecule cu importantă activitate biologică și anume proteinele, precum și interacțiunea acestora cu alte specii chimice cum ar fi ionii metalici. De asemenea, au fost studiate modificări ce pot avea loc la nivelul proteinelor, modificări cum ar fi nitrarea la nivelul aminoacidului tirozină. Această modificare a proteinelor este intens studiată de către cercetătorii din domeniul biochimiei și

a medicinei datorită asocierii cu stresul oxidativ, îmbătrânirea și condiții patofiziologice precum astm, alergii, infecții, etc. Deoarece proteinele sunt implicate în numeroase procese în organism și joacă un rol bine definit în mecanismul defensiv, am cercetat modificările ce au loc la nivelul expresiei proteinelor în cadrul organismului model de *Saccharomyces cerevisiae* sub acțiunea unui toxic precum 2,4-dinitrofenolul. Tot în cadrul cercetării doctorale, am investigat zeinele (care sunt și ele o clasă de proteine) printr-o abordare clasică din proteomică și anume digestie enzimatică urmată de separarea peptidelor rezultate prin electroforeză pentru a obține o vizualizarea a transformărilor chimice pe care le suferă zeinele odată ce sunt ingerate. Interesul față de acest compus proteic s-a datorat aplicabilității practice pe care o prezintă, fiind utilizat în fabricarea medicamentelor cu un comportament retard.

Astfel, principalele obiective urmărite în cadrul tezei de doctorat au fost următoarele:

- Caracterizarea interacțiunii dintre molecula de Coenzima A (cofactor necesar în activitatea enzimatică a unor proteine) cu ioni metalici precum Au^{3+} și Hg^{2+} prin spectrometrie de masă și tehnici complementare precum spectroscopia UV-Vis, IR, microscopia de forță atomică și teste de toxicitate;
- Sinteza în fază solidă a unor peptide sintetice model ce conțin aminoacidul tirozină nemodificat, hidroxilat sau nitrat pentru a fi utilizate în studiul specificității unor anticorpi anti 3-nitrotirozină;
- Purificarea peptidelor sintetice prin cromatografia lichidă de înaltă performanță și caracterizarea acestora prin spectrometrie de masă;
- Studiul specificității anticorpilor anti 3-nitrotirozină prin determinarea afinității acestora față de peptidele model prin Dot-blot, ELISA și cu ajutorul unui biosenzor pe bază de undă acustică de suprafață;
- Studiul toxicității pesticidului 2,4-dinitrofenol asupra unor sisteme biologice precum plantele și drojdie. Observarea modificărilor induse de pesticid la nivelul proteinelor extrase din drojdie;
- Studiul comportamentului unor proteine precum sunt zeinele (utilizate în fabricarea sistemelor de eliberarea controlată a medicamentelor) sub acțiunea unor enzime precum tripsina, pepsina sau sub acțiunea HCl, care ar oferi o previzualizare a transformărilor pe care le suferă această proteină odată ingerată.

Capitolul III. Interacțiunea Coenzimei A cu ioni metalici de tipul Au^{3+} și Hg^{2+}

Rezultate obținute:

III.1. Interacțiunea Coenzimei A cu ioni de Au^{3+}

III.1.1. Caracterizarea sistemului CoA-Au prin spectrofotometria UV-Vis

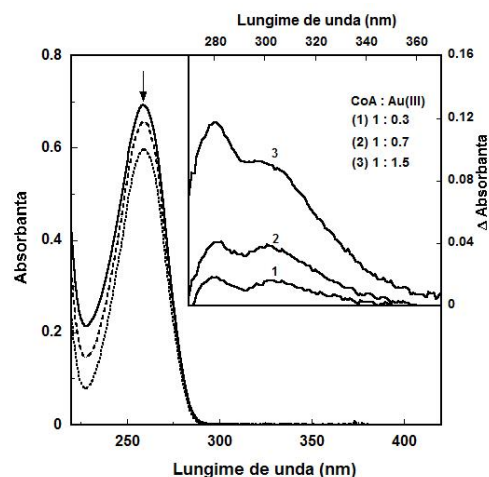


Figura III.1. Spectrul UV-Vis al CoA (57 μM) și al CoA în prezența a 1,8 și a 4,6 echivalenți de Au (III) în tampon borat, pH 10. Inserție: Spectru diferențiat la diferite rapoarte molare CoA:Au (Concentrația CoA de 250 μM)

III.1.2. Caracterizarea sistemului CoA-Au prin spectroscopia de infraroșu

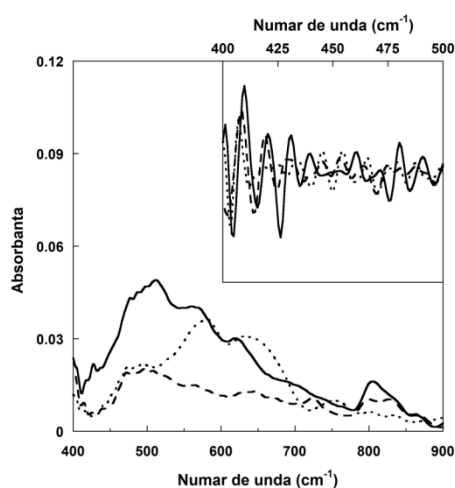


Figura III.3. Spectrul FT-IR al CoA (linie întreruptă), al $AuCl_3$ (linie punctată) și al complexului (linie continuă) în domeniul de număr de undă 400 – 900 cm^{-1} ; Inserție.

Spectrul derivatei de ordinul II

III.1.3. Studii de toxicitate pe microorganisme de *Pichia Pastoris*

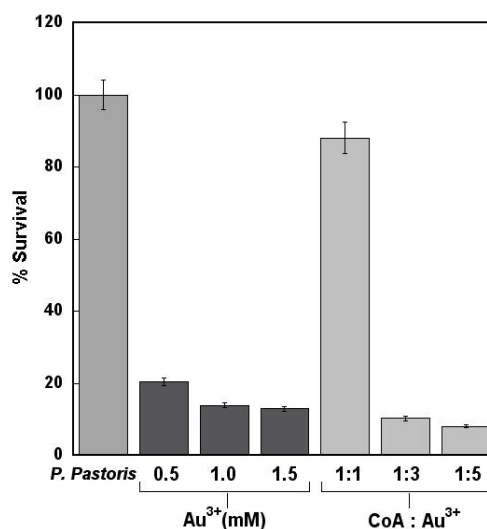


Figura III.5. Acțiunea $Au(III)$ asupra celulelor de *Pichia Pastoris* (SMD1168H) în prezența și în lipsa CoA (Concentrația CoA 0,5 mM și 1, 3, 5 echivalenți de $Au(III)$)

III.1.5. Caracterizarea sistemului CoA-Au prin spectrometria de masă

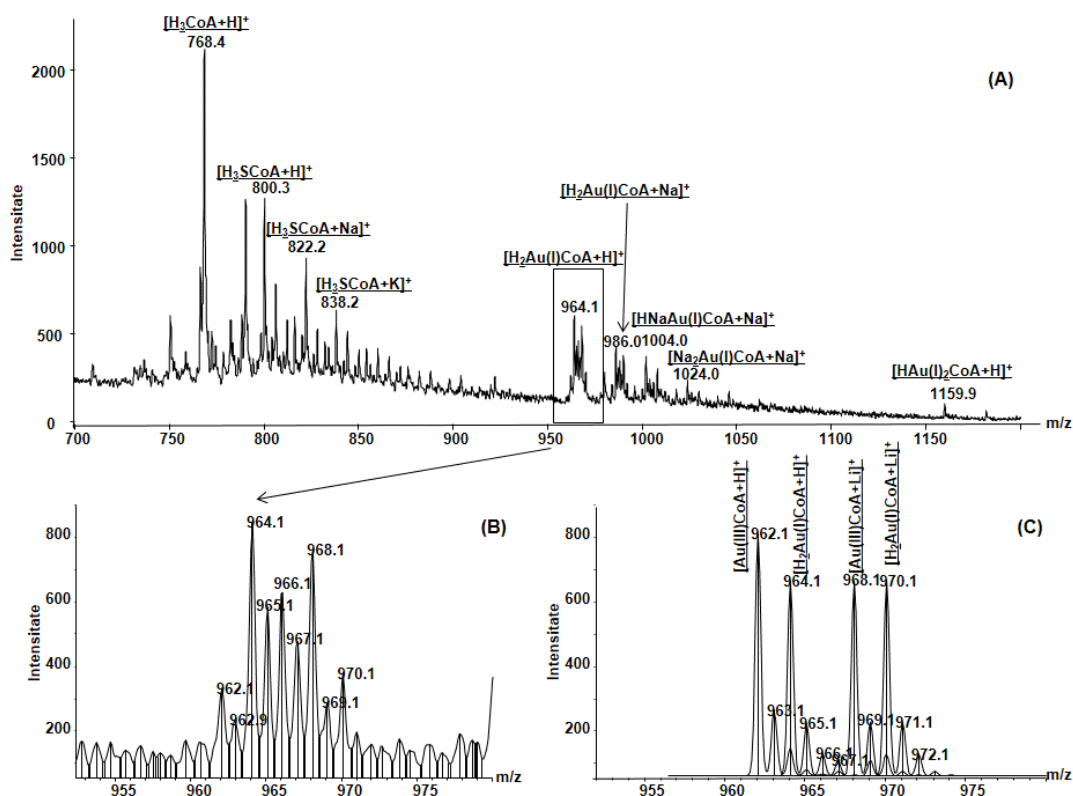


Figura III.11. Spectrul de masă al amestecului echimolar CoA:Au (III). (A) Spectrul de masă în domeniul m/z 700 – 1200; (B) Spectrul de masă detaliat în domeniul m/z 950 – 980 și (C) Spectrul de masă simulat în domeniul m/z 950 – 980

III.2. Interacțiunea Coenzimei A cu ioni de Hg^{2+}

III.2.1. Caracterizarea sistemului CoA-Hg prin spectrometria de masă

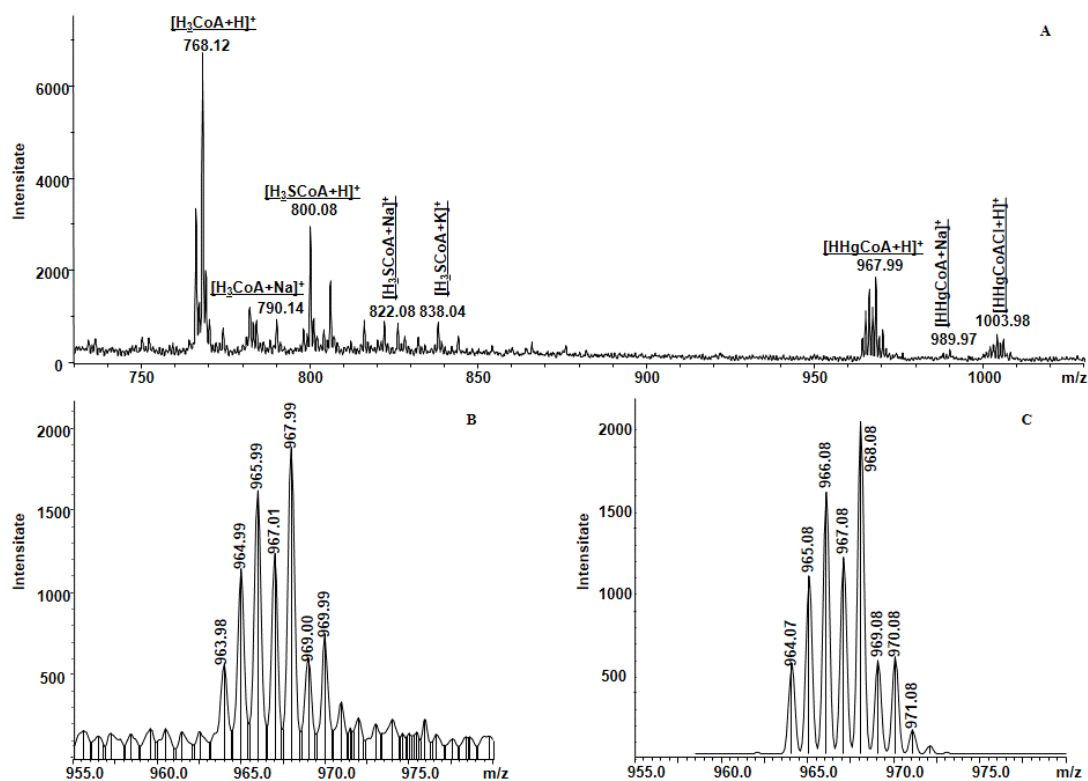


Figura III.12. Spectrul de masă (înregistrat în mod pozitiv) pentru sistemul CoA:Hg. (A) Spectrul de masă în domeniul m/z 700 – 1200; (B) Spectrul de masă detaliat în domeniul m/z 955 – 980 și (C) Spectrul de masă simulat în domeniul m/z 955 – 980

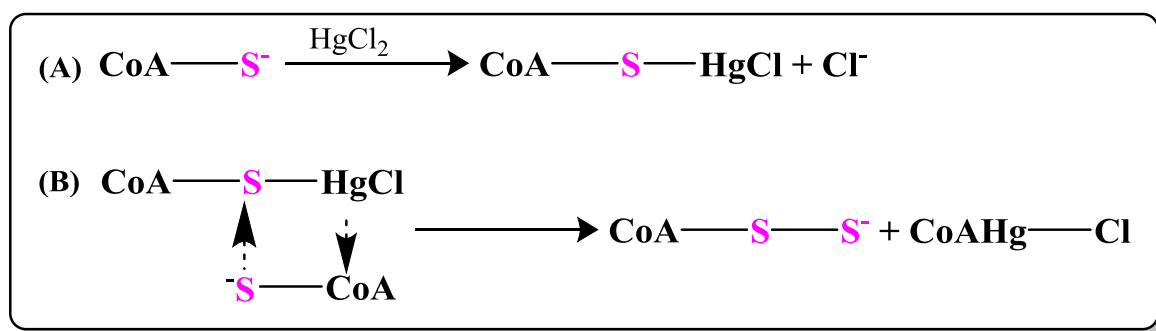


Figura III.13. Mecanismul de formare a CoA-S-Hg-Cl și a tiocoenzimei A. (A) Conversia CoA în compus organometalic și (B) conversia derivatului organometalic la tiocoenzima A

III.3. Concluzii

- i. Biomolecula de Coenzima A a fost caracterizată cu succes printr-o varietate de tehnici analitice, precum spectroscopia UV-Vis și IR, prin microscopia de forță atomică dar și prin spectrometrie de masă;
- ii. Datorită grupării funcționale tiolice, molecula de CoA prezintă o afinitate ridicată față de ionii de Au^{3+} , lucru care a determinat formarea unui complex CoA-Au care a fost pus în evidență prin studii spectroscopice UV-Vis. Formarea complexului a fost justificată prin apariția unui nou maxim de absorbție în jurul lungimii de undă $\lambda = 300$ nm în spectrul UV-Vis al sistemului CoA:Au;
- iii. Prin înregistrarea spectrului IR al complexului CoA-Au și prin compararea acestuia cu spectrul IR al CoA, s-a observat că nu doar gruparea tiolică este implicată în procesul de coordinare, dar și gruparea aminică din structura adenozinică;
- iv. Prin studiile de toxicitate, s-a demonstrat că prezența ionilor de Au^{3+} în mediul de dezvoltare a microorganismelor de *Pichia Pastoris*, determină o scădere pînă 20 % în dezvoltarea coloniilor. Prin adăugarea moleculei de CoA, alături de ionii de Au^{3+} în mediul de dezvoltare a microorganismelor, se observă o scădere a efectului inhibitor al aurului, lucru ce poate servi drept dovadă pentru formarea unui complex CoA-Au, datorită scăderii concentrației de aur liber din sistem și astfel scăderii biodisponibilității acestuia;
- v. Imaginile topografice obținute prin microscopia de forță atomică indică formarea unui complex CoA-Au, datorită modificării morfologiei de suprafață a compusului final față de compuşii de plecare;
- vi. Investigarea interacțiunii CoA cu ioni metalici de tipul Au^{3+} și Hg^{2+} prin spectrometrie de masă a evidențiat formarea unor complecși în ambele cazuri, cu o stoichiometrie de 1:1;
- vii. Prin analiza mai atentă a spectrelor de masă obținute pentru sistemele investigate, s-a observat apariția în sistem a două specii moleculare noi și anume un compus organo-metalic (intermediar) și a tiocoenzimei A. Pe baza analizei datelor obținute s-a propus un mecanism de reacție prin care se obține cel de-al doilea compus.

Capitol IV. Caracterizarea unor interacțiuni de tipul antigen - anticorp

Rezultate obținute:

IV.1. Purificarea și caracterizarea peptidelor ECP²⁶AMRAINNYRWR³⁶ și PCS⁴²²KDGKRLKNYSL⁴³²

Tabel IV.1. Structura primară și masa moleculară a peptidelor ECP sintetizate

Nr.	Peptida	Secvența de aminoacizi	Masa moleculară
1	ECP	AMRAINNYRWR	1449,75
2	ECP(OH)	AMRAINNY(OH)RWR	1466,74
3	ECP(NO ₂)	AMRAINNY(NO ₂)RWR	1495,73

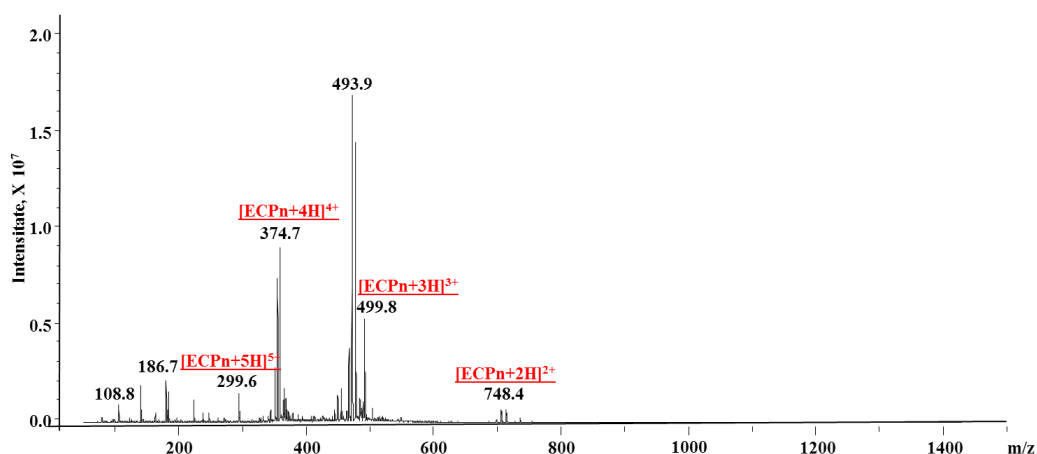


Figura IV.6. Spectrul de masă ESI-MS al peptidei ²⁶AMRAINNY(NO₂)RWR³⁶ sintetizate

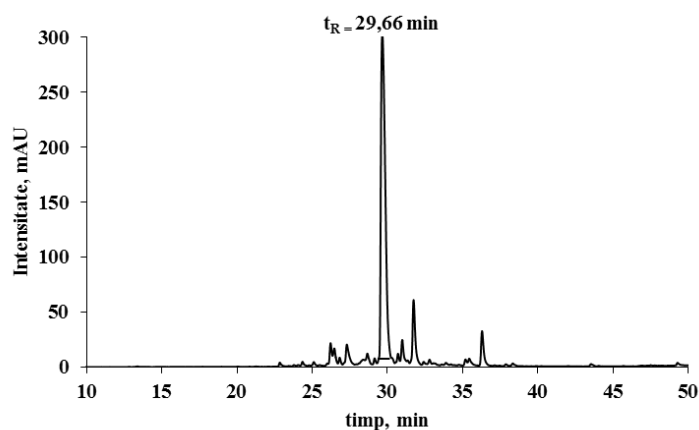


Figura IV.7. Cromatograma de purificare a peptidei ²⁶AMRAINNY(NO₂)RWR³⁶

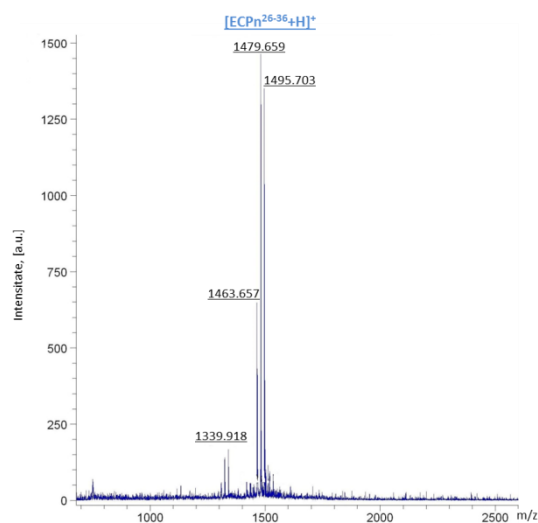


Figura IV.8. Spectrul de masă MALDI-TOF MS al peptidei $^{26}\text{AMRAINNY}(\text{NO}_2)\text{RWR}^{36}$, puritate $\geq 95\%$

Tabel IV.3. Structura primară și masa moleculară a peptidelor PCS sintetizate

Nr.	Peptida	Secvența de aminoacizi	Masa moleculară
1	PCS	KDGKRLKNYSL	1320,75
2	PCS(OH)	KDGKRLKNY(OH)SL	1336,75
3	PCS(NO ₂)	KDGKRLKNY(NO ₂)SL	1365,74

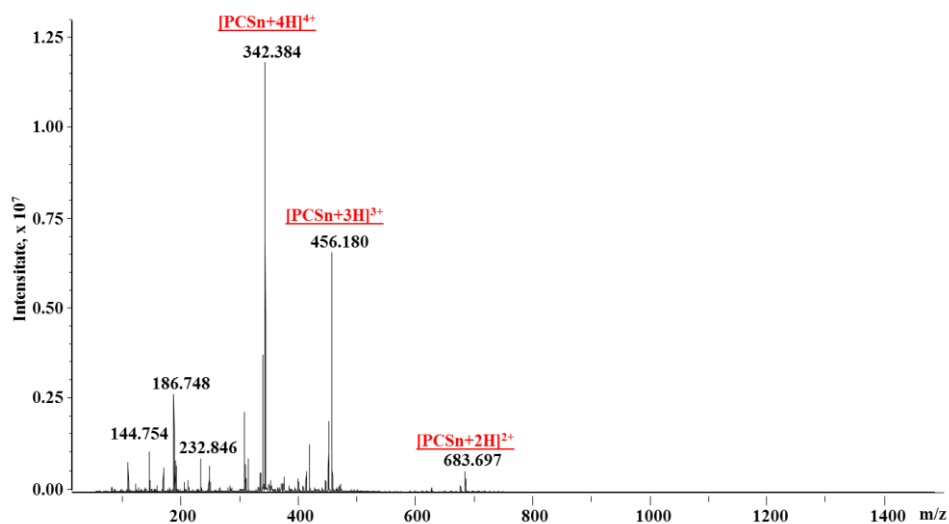


Figura IV.16. Spectrul de masă ESI-MS al peptidei $^{422}\text{KDGKRLKNY}(\text{NO}_2)\text{SL}^{432}$ sintetizate

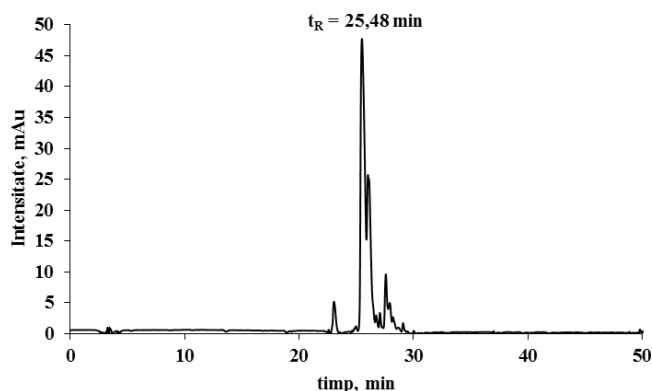


Figura IV.17. Cromatograma de purificare a peptidei $^{422}\text{KDGKRLKNY}(\text{NO}_2)\text{SL}^{432}$

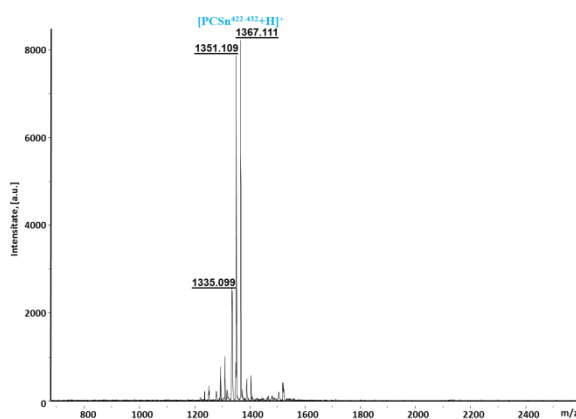


Figura IV.18. Spectrul de masă MALDI-TOF MS al peptidei $^{422}\text{KDGKRLKNY}(\text{NO}_2)\text{SL}^{432}$ pure

IV.2. Afinitatea anticorpului anti 3-nitrotirozină față de peptide sintetice model cu tirozina nemodificată, nitrată sau hidroxilată

IV.2.1. Specificitatea anticorpilor anti 3-nitrotirozină vizualizată prin dot-blot

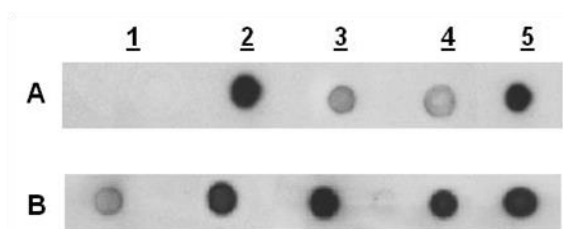


Figura IV.24. Rezultatele experimentului dot-blot. Membrana de nitroceluloză (A) a fost tratată cu anticorpul monoclonal anti-nitrotirozină de la Chemicon International (mAb1), iar membrana (B) – cu cel achiziționat de la Santa Cruz (mAb2). Prima peptidă este ECP cu tirozina nemodificată, poziția 2 și 3 corespunde peptidelor ECP cu tirozina nitrată, respectiv hidroxilată, iar poziția 4 și 5 corespunde peptidei model LEI cu tirozina oxidată

IV.2.2. Specificitatea anticorpului anti 3-nitrotirozină studiată prin ELISA

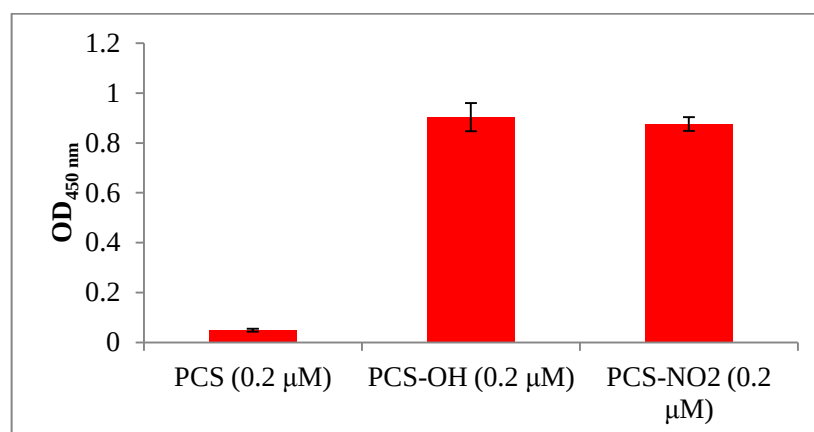


Figura IV.26. Determinarea ELISA a legării anticorpului mAb1 de peptidele PCS model ce conțin tirozină nemodificată, hidroxilată sau nitrată

IV.2.3. Specificitatea anticorpului anti 3-nitrotirozină studiată cu un biosenzor pe bază de undă acustică de suprafață

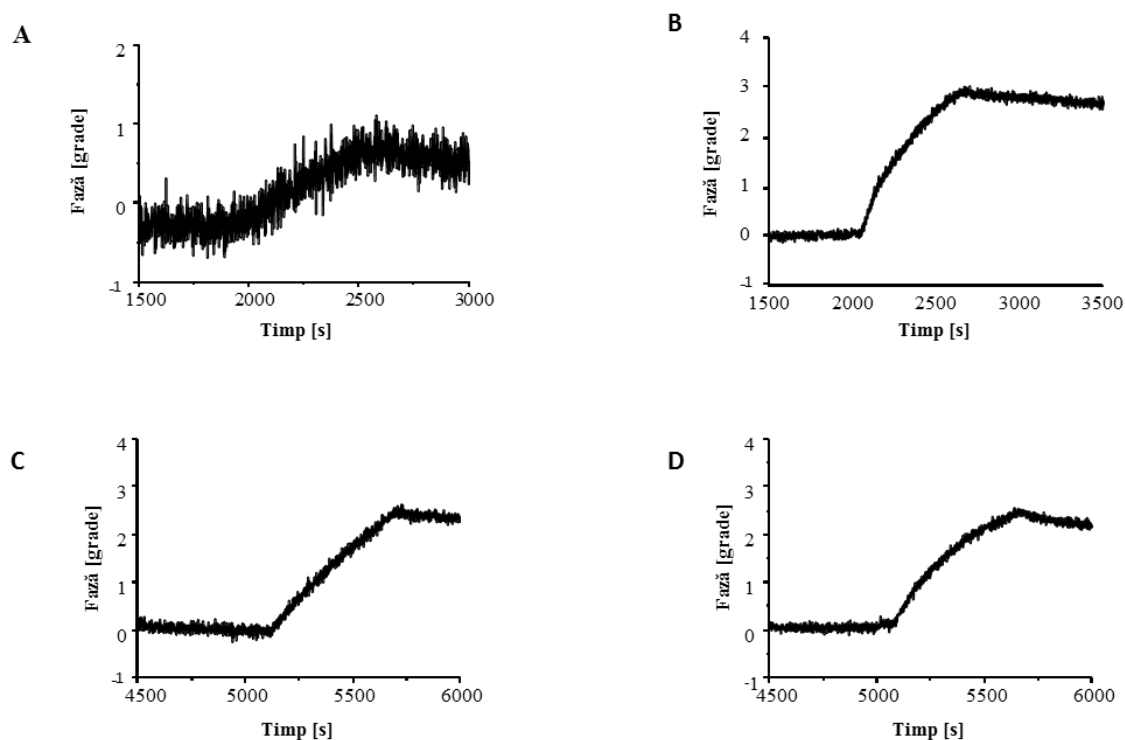


Figura IV.28. Modificările în timp ale proprietăților undei acustice ca rezultat al interacțiunii (A) peptidei ECP, (B) peptidei ECPn, (C) peptidei ECPh și (D) peptidei LEI cu hidroxitirozină cu anticorpul anti 3-nitrotirozină

Tabel IV.6. Constantele K_d determinate pentru peptidele sintetice model

Ligand - Peptida			Anticorp anti 3-nitrotirozină		
Nr.	Secvența peptidei	m/z	Ab1		Ab2
		[M+H] ⁺	Dot-blot	K_d (10^{-9}) M	Dot-blot
1.	AMRAINNYRWR	1450,95	-	-	+
2.	AMRAINNY(NO ₂)RWR	1495,73	+	5,33	+
3.	AMRAINNY(OH)RWR	1466,97	+	5,65	+
4.	FKLEESY(OH)TLNSDLAR	1801,93	+	5,39	+

IV.3. Modelarea moleculară în studiul modificărilor oxidative la aminoacidul tirozină

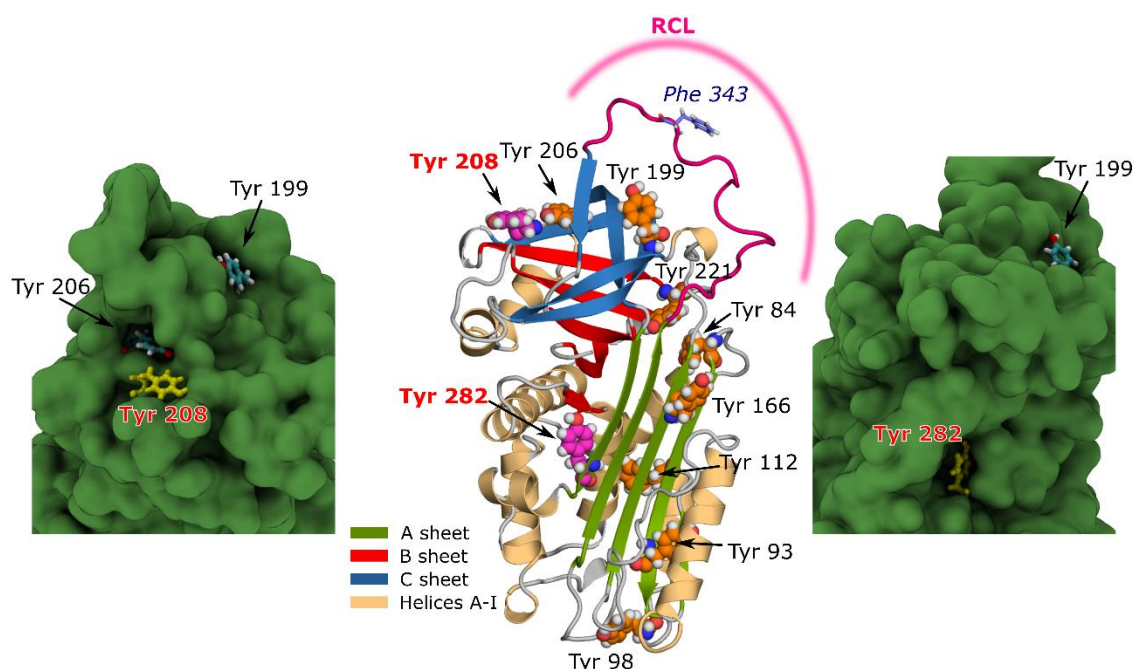


Figura IV.30. Poziția resturilor de tirozină în proteina LEI și suprafețele expuse ale resturilor Tyr206, Tyr208, Tyr199 (stânga) și Tyr282 (dreapta)

IV.4. Concluzii

- Sinteza peptidelor model ECP (AMRAINNYRWR, AMRAINNY(OH)RWR, AMRAINNY(NO₂)RWR) și PCS (KDGKRLKNYSL, KDGKRLKNY(OH)SL, KDGKRLKNY(NO₂)SL) a fost realizată cu succes, iar măsurătorile spectrometrice de masă au confirmat identitatea peptidelor sintetizate;
- În cazul sintezei peptidelor model PCS cu tirozina modificată, nitrată sau hidroxilată, pe lângă peptida dorită a fost obținută și o a doua peptidă, un produs

deshidratat, rezultat din învecinarea aminoacizilor acid aspartic și glicină. Gruparea carboxilică din lanțul lateral al aminoacidului acid aspartic suferă un atac din partea Na^+ din aminoacidul alăturat și reacția este favorizată în mediu alcalin;

- iii. Peptidele sintetizate au fost purificate cu succes prin cromatografia lichidă, puritatea peptidelor fiind confirmată prin măsurători spectrometrice de masă;
- iv. În cromatogramele obținute în purificarea peptidelor PCS model, picul principal prezenta un umăr datorat formării produsului deshidratat și rezoluția dintre cele două picuri era mai mică de 1, din cauza proprietăților fizico-chimice similare a celor doi produși;
- v. În cazul peptidelor model ce conțineau în structura primară nitrotirozină, în spectrele de masă MALDI-TOF au fost observate trei semnale intense, primul corespunzător peptidei, iar celelalte două determinate de descompunerea fotochimică a grupării nitro;
- vi. Din experimentele dot-blot s-a observat că anticorpul monoclonal anti 3-nitrotirozină (39B6) nu prezintă specificitate pentru peptidele ce conțin resturi de tirozină oxidată, acesta dând un răspuns fals pozitiv chiar și pentru peptida ECP model cu tirozină nemodificată;
- vii. Anticorpul monoclonal anti 3-nitrotirozină (MAB5404) prezintă o specificitate pentru peptidele ce conțin tirozină modificată în structura primară. Acest anticorp nu a recunoscut peptida ECP. Anticorpul recunoaște atât peptidele cu tirozina modificată prin nitrare, însă a dat un răspuns pozitiv și pentru peptidele ce conțin hidroxitirozină;
- viii. Din experimentele imunochimice de tip ELISA poate fi observat că anticorpul monoclonal anti 3-nitrotirozină nu recunoaște peptidele ce conțin tirozină nemodificată în structura lor primară, însă prezintă specificitate pentru peptidele care în secvența lor prezintă tirozină modificată oxidativ;
- ix. Din experimentele cu biosenzor pe bază de undă acustică s-a observat că anticorpul monoclonal anti 3-nitrotirozină (MAB5404) prezintă afinitatea cea mai ridicată față de peptida ECP_n (ce conține tirozină nitrată), dar poate recunoaște și ECP_h (ce conține tirozină hidroxilată);
- x. Atât experimentele de tip ELISA, cât și cele cu biosenzor pe bază de undă acustică de suprafață sugerează că anticorpul anti 3-nitrotirozină studiat nu face

diferență între peptidele ce conțin hidroxi-tirozină și nitro-tirozină, dând un răspuns pozitiv în ambele cazuri;

- xi. Anticorpul monoclonal anti 3-nitrotirozină (MAB5404) nu este specific, și cazurile de proteine care au fost identificate ca fiind cu tirozină nitrată prin experimente imunochimice în literatura de specialitate, ar putea fi de fapt și proteine în care aminoacidul tirozină a fost modificat prin hidroxilare;
- xii. Proteinele sunt macromolecule care în secvența lor prezintă mai multe resturi de tirozină ce ar putea fi modificate prin oxidare. Pentru ca reacția dintre speciile reactive de N sau O și tirozină să aibă loc, este necesar ca tirozina să fie accesibilă solventului;
- xiii. Prin modelarea moleculară a proteinei LEI (SERPIN B1) s-a observat că resturile de Tyr 208 și 199 sunt cele mai expuse solventului și probabilitatea cea mai mare este că anume aceste resturi de tirozină vor fi modificate prin nitrare sau hidroxilare.

Capitol V. Studiul unor proteine din sisteme biologice printr-o abordare top down

Rezultate obținute:

V.2.1. Determinarea concentrației totale a proteinelor

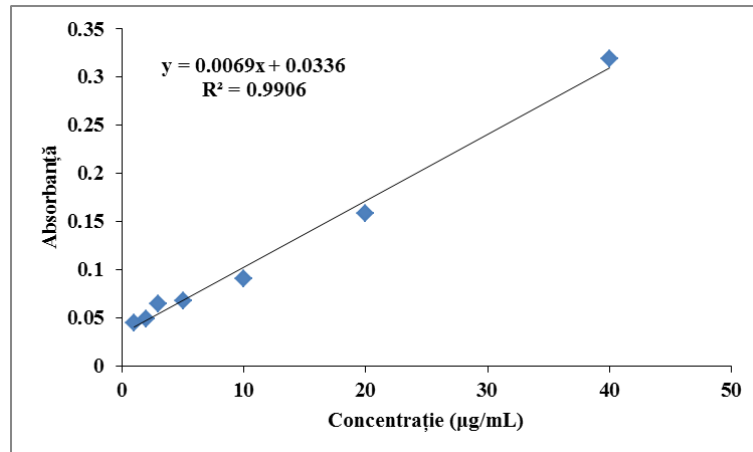


Figura V.1. Reprezentarea grafică a curbei de calibrare

V.2.2. Acțiunea 2,4-dinitrofenolului asupra proteinelor hidrosolubile din drojdia de bere

V.2.2.1. Separarea proteinelor extrase din drojdia de bere prin 1D-electroforeză

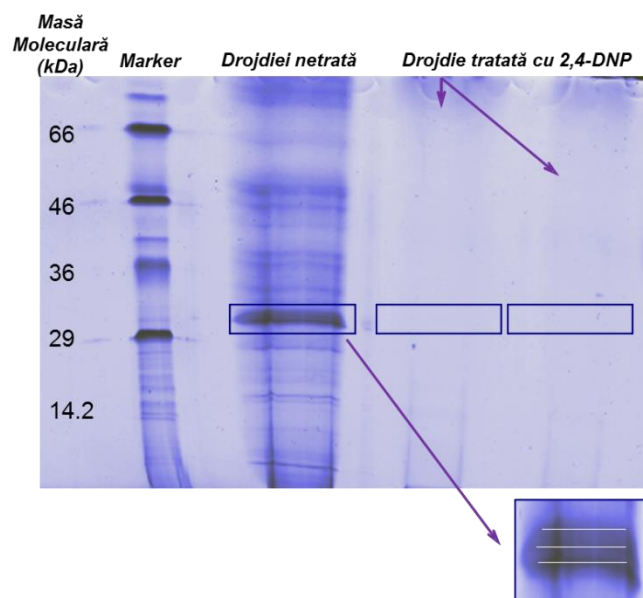


Figura V.2. Separarea proteinelor extrase din supernatantul rezultat din suspensiile de drojdie (5 mg/mL) în apă și în soluție 2 mM 2,4-dinitrofenol (DNP) prin 1D-electroforeză

V.2.3. Acțiunea 2,4-dinitrofenolului asupra proteinelor totale din drojdia de bere

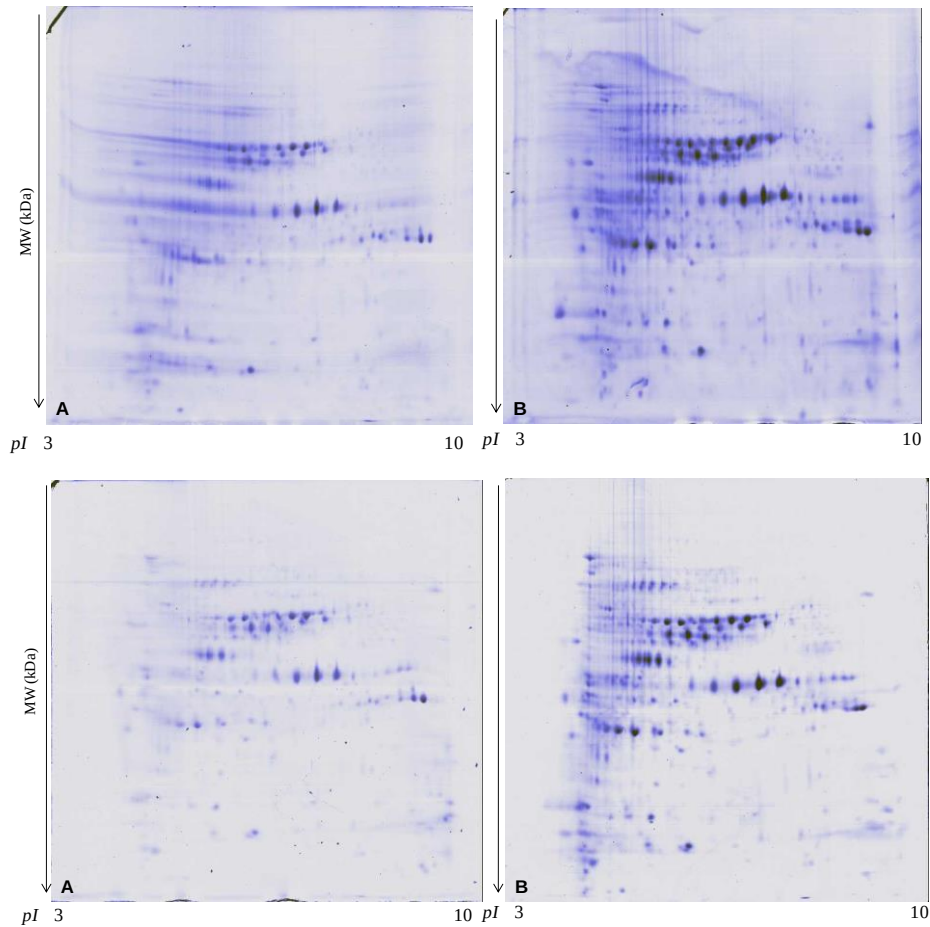


Figura V.6. 2D-geluri realizate în duplicat pentru (A) proteinele extrase din drojdie netratată și (B) proteinele extrase din drojdia tratată cu soluție 2 mM 2,4-DNP

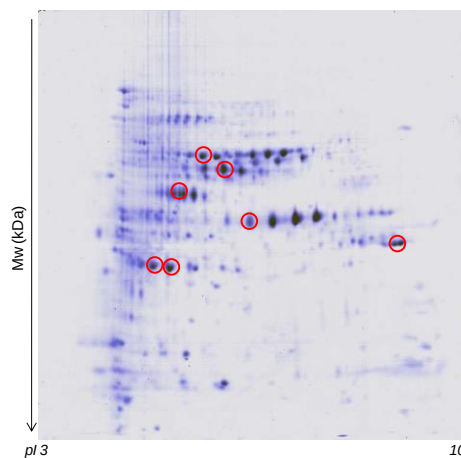


Figura V.8. 2D-gelul obținut pentru proteinele extrase din drojdia tratată cu 2,4-DNP, cu roșu fiind marcate spoturile care au fost identificate ca fiind modificate față de spoturile din 2D-gelul obținut pentru proteinele extrase din drojdia netratată

V.3. Transformarea zeinelor în organism caracterizată prin electroforeză

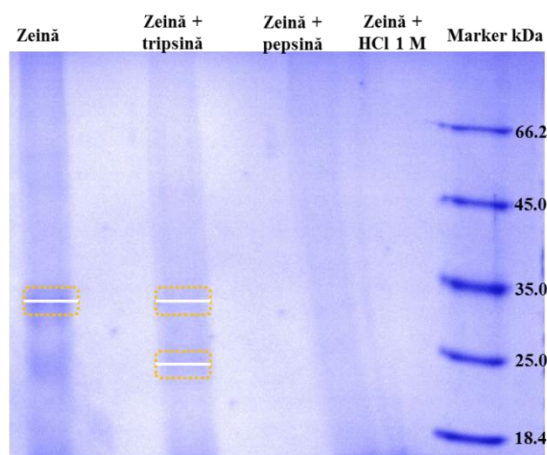


Figura V.9. 1D-gelul obținut pentru zeină ca atare, dar și pentru fragmentele rezultate în urma digestiei zeinei cu tripsină, pepsină sau în urma hidrolizei cu HCl 1 M

V.4. Concluzii

- i. 2,4-dinitrofenolul prezintă o acțiune toxică asupra organismelor vii, lucru discutat pe larg în literatura de specialitate, dar și confirmat prin intermediul testelor de germinație realizate pe semințele de grâu tratate cu acest pesticid, comparativ cu semințele de grâu netratate;
- ii. 2,4-dinitrofenolul determină o creștere a numărului de semințe moarte în cazul testelor de germinație pe semințele tratate și chiar dacă a permis dezvoltarea plantulelor (în număr mai mic), toxicul a prezentat un efect inhibitor asupra dezvoltării plantulelor, acestea prezentând o masă și înălțime medie sub valorile corespunzătoare plantulelor dezvoltate din semințe netratate;
- iii. Printr-o abordare clasică din domeniul proteomicii, s-a studiat influența 2,4-dinitrofenolului asupra distribuției proteinelor hidrosolubile și totale extrase din drojdia alimentară tratată cu 2,4-DNP versus drojdie netratată;
- iv. Din electroforeza unidimensională s-a observat că prin tratarea drojdiei cu 2,4-dinitrofenol, acest microorganism nu mai eliberează proteine în spațiul extracelular. S-a presupus că printr-un mecanism de protecție, celula se închide față de spațiul extracelular și este inhibat transportul de proteine din interior spre exterior;

- v. Prin electroforeza bidimensională s-a pus în evidență faptul că sub acțiunea 2,4-dinitrofenolului asupra *Saccharomyces cerevisiae* au loc o serie de modificări la nivelul expresiei proteinelor. În jur de 7 proteine au fost identificate ca fiind modificate în drojdia tratată cu DNP. Modificările observate la nivelul proteinelor pot fi rezultatul acțiunii toxice a DNP-ului asupra microorganism, sau unele proteine pot fi modificate ca rezultat al unui mecanism de apărare a organismului investigat;
- vi. În urma experimentelor de electroforeză unidimensională, din cauza lipsei proteinelor în supernatantul rezultat în urma tratamentului drojdiei cu soluție 2 mM 2,4-DNP s-au formulat două ipoteze. Prima a fost că DNP-ul a determinat inhibarea producției de ATP și printr-o reacție în lanț, a biosintezei de proteine. A doua ipoteză a fost că DNP-ul a determinat o blocare a transportului de proteine din interiorul celulei spre exterior. Electroforeza bidimensională a proteinelor extrase din drojdie infirmă ipoteza blocării biosintezei de proteine, întrucât în 2D gel poate fi observată prezența unui număr mare de proteine extrase din drojdia tratată. Astfel, a fost confirmată ipoteza că sub acțiunea toxicului, ca mecanism de apărare celula se închide și blochează transportul bidirecțional dintre spațiul intra- și extracelular;
- vii. Din cauza concentrației mari de săruri din amestecul triptic rezultat din digestia enzimatică a spoturilor de interes din 2D-gelul corespunzător proteinelor extrase din drojdia tratată, nu au putut fi măsurate peptidele triptice și nu a fost posibilă identificarea proteinelor. Concentrația mare de săruri a determinat supresia semnalelor în măsurătorile spectrometrice de masă. Ca perspectivă, se va lucra la îmbunătățirea protocolului de digestie enzimatică;
- viii. Transformările pe care le suferă zeina odată ingerată în organism au fost vizualizate prin 1D-electroforeză. Sub acțiunea tripsinei a avut loc o digestie parțială a α -zeinei, și în gel a putut fi identificat un fragment triptic cu masa moleculară mai mică de 20 kDa;
- ix. Zeina a suferit o transformare completă sub acțiunea pepsinei, iar fragmentele enzimatice rezultate prezentau o masa moleculară foarte mică și din acest motiv nu au putut fi evidențiate în gel. Sub acțiunea HCl, zeina a suferit o hidroliză completă până la nivel de aminoacid.

Concluzii generale

I. Astfel, un aspect de interes urmărit în cadrul tezei de doctorat a fost interacțiunea proteinelor cu ioni metalici. Numeroase proteine joacă rol de enzimă în organism, care pentru funcționare necesită prezența altor biomolecule cu rol de cofactor. Din acest motiv, în primă instanță s-a studiat interacțiunea Coenzimei A, cu rol de cofactor obligator pentru circa 4% din enzime, cu ioni metalici precum Au^{3+} și Hg^{2+} . Din studiul acestor interacțiuni prin spectrometrie de masă și tehnici complementare, s-au concluzionat următoarele:

- Între molecula de CoA și ionii de Au^{3+} există o interacțiune în urma căreia se formează un compus coordinativ, a cărui existență a fost pusă în evidență prin apariția unui maxim de absorbție la 300 nm în spectrul UV-Vis al soluției ce conține atât CoA, cât și ioni de Au^{3+} ;
- Legarea cu ionilor de Au^{3+} de către molecula de CoA este realizată prin atomul de S- din gruparea tiolică, dar și prin atomul de N- din gruparea adenozinică din structura CoA, fapt confirmat din studiul comparativ al spectrului IR al complexului CoA-Au față de spectrul IR al CoA necomplexate;
- Prin adăugarea ionilor de Au^{3+} în mediul de dezvoltare a microorganismelor de *Pichia Pastoris*, s-a observat o scădere pînă 20 % în dezvoltarea coloniilor. Prin adăugarea moleculei de CoA în același mediu de cultură, s-a observat o dezvoltare normală a coloniilor de microorganisme, datorită interacțiunii dintre CoA și Au^{3+} și prin urmare datorită scăderii biodisponibilității Au^{3+} ;
- Studiile prin microscopia de forță atomică (AFM) indică o modificare a morfologiei de suprafață a moleculei de CoA în prezența ionilor de Au^{3+} , ceea ce servește drept dovadă a formării unui complex CoA-Au;
- Investigarea interacțiunii CoA cu ioni metalici de tipul Au^{3+} și Hg^{2+} prin spectrometrie de masă a evidențiat formarea unor complecși în ambele cazuri, cu o stoichiometrie de 1:1;
- Prin spectrometria de masă s-a pus în evidență existența a doi compuși intermediari și anume un compus organo-metalic (intermediar) și a tiocoenzimei A, pe baza cărora a fost propus un mecanism de reacție.

II. Un alt aspect de interes urmărit în cadrul lucrării de doctorat a fost studiul specificității anticorpilor anti 3-nitrotirozină, proteine ale sistemului imunitar cu rol de

recunoaștere , în acest caz a altor proteine, modificate la nivelul aminoacidului tirozină prin nitrare. Pe parcursul acestui studiu au fost formulate următoarele concluzii:

- Pentru a studia specificitatea anticorpilor anti 3-nitrotirozină, au fost sintetizate o serie de peptide model cu tirozina nemodificată sau cu aminoacidul tirozină ce prezenta în poziția 3 o grupare nitro sau hidroxi și anume peptidele model ECP (AMRAINNYRWR, AMRAINNY(OH)RWR, AMRAINNY(NO₂)RWR) și peptidele model PCS (KDGKRLKNYSL, KDGKRLKNY(OH)SL, KDGKRLKNY(NO₂)SL). Sinteza a fost realizată cu succes, lucru confirmat de spectrele de masă ale peptidelor sintetizate;
- În cazul sintezei peptidelor model PCS cu tirozina modificată, nitrată sau hidroxilată, pe lângă peptida dorită a fost obținută și o a doua peptidă, un produs deshidratat, rezultat din învecinarea aminoacizilor acid aspartic și glicină;
- Deoarece nici o sinteză nu decurge cu un randament de 100%, peptidele sintetizate au fost purificate cu succes prin cromatografia lichidă de înaltă performanță, iar puritatea peptidelor a fost confirmată prin măsurători spectrometrice de masă;
- În cazul spectrelor de masă ale peptidelor model ce conțineau în structura primară nitrotirozină, a fost observată prezența a trei semnale intense, primul corespunzător peptidei, iar celelalte două semnale au fost puse pe seama descompunerii fotochimice a grupării nitro în sursa de ionizare;
- Prin experimentul dot-blot s-a pus în evidență că anticorpul monoclonal anti 3-nitrotirozină (39B6) nu prezintă specificitate pentru peptidele modificate prin nitrare, deoarece a returnat un răspuns fals pozitiv chiar și pentru peptida ECP model cu tirozină nemodificată;
- Anticorpul monoclonal anti 3-nitrotirozină (MAB5404) prezintă o specificitate pentru peptidele ce conțin tirozină modificată în structura primară. Anticorpul recunoaște atât peptidele cu tirozina modificată prin nitrare, însă a dat un răspuns pozitiv și pentru peptidele ce conțin hidroxitirozină;
- Experimentele imunochimice de tip ELISA au confirmat că anticorpul monoclonal anti 3-nitrotirozină nu recunoaște peptidele ce conțin tirozină nemodificată în structura lor primară, însă prezintă specificitate pentru peptidele care în secvența sa prezintă tirozină modificată oxidativ;
- Din experimentele cu biosenzor pe bază de undă acustică s-a observat că anticorpul monoclonal anti 3-nitrotirozină (MAB5404) prezintă afinitatea cea mai ridicată față

de peptida ECPn (ce conține tirozină nitrată), dar poate recunoaște și ECPh (ce conține tirozină hidroxilată);

- Atât experimentele de tip ELISA, cât și cele cu biosenzor pe bază de undă acustică de suprafață sugerează că anticorpul anti 3-nitrotirozină studiat nu face diferență între peptidele ce conțin hidroxi-tirozină și nitro-tirozină, dând un răspuns pozitiv în ambele cazuri;
- Anticorpul monoclonal anti 3-nitrotirozină (MAB5404) nu este specific, și cazurile de proteine care au fost identificate ca fiind cu tirozină nitrată prin experimente imunochimice în literatura de specialitate, ar putea fi de fapt și proteine în care aminoacidul tirozină a fost modificat prin hidroxilare;
- Proteinele sunt macromolecule care în secvența lor prezintă mai multe resturi de tirozină ce ar putea fi modificate prin oxidare. Pentru ca reacția dintre speciile reactive de N sau O și tirozină să aibă loc, este necesar ca tirozina să fie accesibilă solventului;
- Prin modelarea moleculară a proteinei LEI (SERPIN B1) s-a observat că resturile de Tyr 208 și 199 sunt cele mai expuse solventului și probabilitatea cea mai mare este că anume aceste resturi de tirozină vor fi modificate prin nitrare sau hidroxilare.

III. Un ultim aspect urmărit în cadrul tezei de doctorat a constat în depistarea unor modificări la nivelul expresiei proteice din microorganismul *Saccharomyces cerevisiae* sub acțiunea unui toxic precum 2,4-dinitrofenolul. Proteinele identificate ca fiind modificate printr-o strategie clasică din domeniul proteomicii, și anume strategia *de sus în jos*, ar putea fi implicate fie în mecanismul de toxicitate a pesticidului, fie în mecanismul de apărare a organismului împotriva toxicului. Suplimentar, printr-o abordare clasică din domeniul proteomicii s-a simulat comportarea zeinelor (proteine utilizate în fabricarea unor sisteme de eliberare controlată a medicamentelor) odată ingerate în organism. Pe parcursul studiului, s-au formulat următoarele concluzii:

- 2,4-dinitrofenolul prezintă o acțiune toxică asupra organismelor vii, lucru discutat pe larg în literatura de specialitate, dar și confirmat prin intermediul testelor de germinație realizate pe semințele de grâu tratate cu acest pesticid, comparativ cu semințele de grâu netratate;

- Printr-o abordare clasică din domeniul proteomicii, s-a studiat influența 2,4-dinitrofenolului asupra distribuției proteinelor hidrosolubile și totale extrase din drojdia alimentară tratată cu 2,4-DNP versus drojdie netratată;
- Din electroforeza unidimensională s-a observat că prin tratarea drojdiei cu 2,4-dinitrofenol, acest microorganism nu mai eliberează proteine în spațiul extracelular. S-a presupus că printr-un mecanism de protecție, celula se închide față de spațiul extracelular și este inhibat transportul de proteine din interior spre exterior;
- Prin electroforeza bidimensională s-a pus în evidență faptul că sub acțiunea 2,4-dinitrofenolului asupra *Saccharomyces cerevisiae* au loc o serie de modificări la nivelul expresiei proteinelor. În jur de 7 proteine au fost identificate ca fiind modificate în drojdia tratată cu DNP. Modificările observate la nivelul proteinelor pot fi rezultatul acțiunii toxice a DNP-ului asupra microorganism, sau unele proteine pot fi modificate ca rezultat al unui mecanism de apărare a organismului investigat;
- În urma experimentelor de electroforeză unidimensională, din cauza lipsei proteinelor în supernatantul rezultat în urma tratamentului drojdiei cu soluție 2 mM 2,4-DNP s-au formulat două ipoteze. Prima a fost că DNP-ul a determinat inhibarea producției de ATP și printr-o reacție în lanț, a biosintezei de proteine. A doua ipoteză a fost că DNP-ul a determinat o blocare a transportului de proteine din interiorul celulei spre exterior. Electroforeza bidimensională a proteinelor extrase din drojdie infirmă ipoteza blocării biosintezei de proteine, întrucât în 2D gel poate fi observată prezența unui număr mare de proteine extrase din drojdia tratată. Astfel, a fost confirmată ipoteza că sub acțiunea toxicului, ca mecanism de apărare celula se închide și blochează transportul bidirecțional dintre spațiul intra- și extracelular;
- Transformările pe care le suferă zeina odată ingerată în organism au fost vizualizate prin 1D-electroforeză. Sub acțiunea tripsinei a avut loc o digestie parțială a α -zeinei, și în gel a putut fi identificat un fragment triptic cu masa moleculară mai mică de 20 kDa;
- Zeina a suferit o transformare completă sub acțiunea pepsinei, iar fragmentele enzimatice rezultate prezentau o masa moleculară foarte mică și din acest motiv nu au putut fi evidențiate în gel. Sub acțiunea HCl, zeina a suferit o hidroliză completă până la nivel de aminoacid.

Bibliografie selectivă

- [2] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts și P. Walter. *Molecular Biology of the Cell. Protein Function*, 4th edition New York: Garland Science, **2002**
- [3] A. Strasser. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 5(3):189–200, **2005**
- [4] R. P. Wallin, A. Lundqvist, S. H. Moré, A. von Bonin, R. Kiessling și H.-G. Ljunggren. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol.* 23(3):130–135, **2002**
- [5] G. F. H. Diercks și P. M. Kluin. Basic Principles of the Immune System and Autoimmunity. *Autoimmune Bullous Diseases*, Springer International Publishing 3–12, **2016**
- [6] J. D. Scott și T. Pawson, Cell Signaling in Space and Time: Where Proteins Come Together and When They're Apart. *Science* 326(5957):1220–1224, **2009**
- [7] L. M. Iakoucheva, C. J. Brown, J. D. Lawson, Z. Obradović și A. K. Dunker. Intrinsic Disorder in Cell-signaling and Cancer-associated Proteins. *J. Mol. Biol.* 323(3):573–584, **2002**
- [8] C. E. Chapple, B. Robisson, L. Spinelli, C. Guien, E. Becker și C. Brun. Extreme multifunctional proteins identified from a human protein interaction network. *Nat. Commun.* 6:7412, **2015**
- [9] R. G. Krishna și F. Wold. Post-Translational Modifications of Proteins. *Methods in Protein Sequence Analysis*, Boston, MA: Springer US, 167–172, **1993**
- [10] R. E. Aldridge, T. Chan, C. J. van Dalen, R. Senthilmohan, M. Winn, P. Venge, G. I. Town și A. J. Kettle. Eosinophil peroxidase produces hypobromous acid in the airways of stable asthmatics. *Free Radic. Biol. Med.* 33(6): 847–856, **2002**
- [12] J. A. Imlay. Pathways of Oxidative Damage. *Annu. Rev. Microbiol.* 57(1):395–418, **2003**
- [13] R. Radi. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101(12):4003–4008, **2004**
- [40] A. Beck, T. Wurch, C. Bailly și N. Corvaia. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat. Rev. Immunol.* 10(5):345–352, **2010**
- [48] J. Baddiley, E. M. Thain, G. D. Novelli și F. Lipmann. Structure of Coenzyme A. *Nature* 171(4341):76, **1953**
- [59] B. Sarkar. Metal protein interactions. *Prog. Food Nutr. Sci.* 11(3–4):363–400, **1987**
- [82] V. A. Salazar, J. Rubin, M. Moussaoui, D. Pulido, M. V. Nogués, P. Venge și E. Boix. Protein post-translational modification in host defense: the antimicrobial mechanism of action of human eosinophil cationic protein native forms. *FEBS J.*

- 281(24):5432–5446, **2014**
- [110] S. B. H. Kent. Chemical Synthesis of Peptides and Proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 57(1):957–989, **1988**
- [117] J. Seo și K.-J. Lee. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. *J. Biochem. Mol. Biol.* 37(1):35–44, **2004**
- [127] B.-A. Petre, M. Ulrich, M. Stumbaum, B. Bernevic, A. Moise, G. Döring și M. Przybylski. When is mass spectrometry combined with affinity approaches essential? A case study of tyrosine nitration in proteins. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 23(1):1831–1840, **2012**
- [143] B.-A. Petre. Affinity-Mass Spectrometry Approaches for Elucidating Structures and Interactions of Protein-Ligand Complexes. in *Advancements Of Mass Spectrometry in Biomedical Research*, 129–151, **2014**
- [160] M. Drăgușanu, B.-A. Petre și M. Przybylski. Epitope motif of an anti-nitrotyrosine antibody specific for tyrosine-nitrated peptides revealed by a combination of affinity approaches and mass spectrometry. *J. Pept. Sci.* 17(3):184–191, **2011**
- [181] Y. Zhang, B. R. Fonslow, B. Shan, M.-C. Baek și J. R. Yates. Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. *Chem. Rev.* 113(4):2343–2394, **2013**
- [190] R. Gradinaru, A. Ionas, A. Pui, G. Zbancioc și G. Drochioiu. Interaction of inorganic mercury with CoA-SH and acyl-CoAs. *Biometals* 24(6):1115–1121, **2011**
- [207] I. Torres-Cuevas, J. Kuligowski, M. Cárcel, C. Cháfer-Pericás, M. Asensi, R. Solberg, E. Cubells, A. Nuñez, O. D. Saugstad, M. Vento și J. Escobar. Protein-bound tyrosine oxidation, nitration and chlorination by-products assessed by ultraperformance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 913:104–110, **2016**
- [216] A.-S. Petersson, H. Steen, D. E. Kalume, K. Caidahl și P. Roepstorff. Investigation of tyrosine nitration in proteins by mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 36(6):616–625, **2001**
- [226] K. A. Resing și N. G. Ahn. Proteomics strategies for protein identification. *FEBS Lett.* 579(4):885–889, **2005**
- [237] O. Pintilie, C. Andries, A. Cosma, M. Zaharia, G. Drochioiu, V. Vasilache și I. Sandu. The influence of dinitrophenolic pesticides on the viability of plants. *Rev. Chim.* 66(9):1321–1326, **2015**
- [241] G. Drochioiu, C. I. Ciobanu, S. Bancila, L. Ion, B. A. Petre, C. Andries, R. V. Gradinaru și M. Murariu. Ultrasound-based protein determination in maize seeds. *Ultrason. Sonochem.* 29:93–103, **2016**

Rezultatele obținute în cadrul cercetărilor din cadrul tezei de doctorat au fost raportate parțial prin publicarea unor articole. O altă parte din rezultate au fost diseminate în cadrul unor conferințe naționale și internaționale sub formă de comunicări orale sau postere. De asemenea, unele rezultate pot fi găsite publicate în volumele conferințelor.

Lucrări științifice publicate în reviste cu factor de impact:

1. **Andries, C.**, Manea, M., Pocanschi, C. L., Pui, A., Drochioiu, G., Grădinaru, R. V., “Coordination behavior of coenzyme A towards gold ions: Spectroscopic, mass spectrometric and microbiological studies”, *Bulgarian Chemical Communications* 49(2), **2017**. **IF_{2015/2016} = 0.229**
2. Drochioiu, G., Ciobanu C., Bancila S., Ion L., Petre B.A., **Andries, C.**, Gradinaru, V.R., and Murariu, M. “Ultrasound-based protein determination in maize seeds”. *Ultrason. Sonochem.*, 29: 93-103, **2016**. DOI:10.1016/j.ultsonch.2015.09.007 **IF₂₀₁₅ = 4.556**
3. **Andries, C.**, Manea, M., Drochioiu, G, and Gradinaru, R. „New insights into coenzyme A interaction with mercury ions provided by mass spectrometric and circular dichroism spectroscopic approaches”. *Eur. J. Mass Spectrom.*, 21(2): 97-102, **2015**. DOI: 10.1255/ejms.1361. **IF₂₀₁₅ = 1.00**
4. Pintilie, O., **Andries, C.**, Cosma, A., Zaharia, M., Drochioiu, G., Vasilache, V., Sandu, I. „The influence of dinitrophenolic pesticides on the viability of plants”. *Rev. Chim.(Bucharest)*, 66(9): 1321-1326, **2015**. **IF₂₀₁₅ = 0.81**

Factorul de impact total: $1.0+4.556/3+0.81/2+0.229=3.153$

Lucrări științifice în curs de publicare:

1. **Claudia Andrieș**, Laura Ion, Ștefan Slămnoiu, Brîndușa Alina Petre, “Cross reactivity of anti nitro-tyrosine antibodies to oxidative modified tyrosine containing peptides by using a SAW-Biosensor assay” – în lucru.
2. **Claudia Andrieș**, Laura Ion, Gabi Drochioiu, Brîndușa Alina Petre, “Eosinophil peroxidase mapping by mass spectrometry” – în lucru.

Lucrări științifice publicate în reviste de popularizare:

1. **Andries, C.**, Laura, I., Petre, B. A., Drochioiu, G, Sandu, I. „Spectrometria de masă. Evoluție și rolul în cercetarea modernă”, *Tehnocopia* 1(12): 14-24, **2015**;
2. Ion, L., **Andries, C.**, Petre, B. A., Drochioiu, G, Sandu, I. „Modificări oxidative ale proteinelor: efectul asupra organismului uman”, *Tehnocopia* 1(12): 14-24, **2015**.

Participări la conferințe interanationale:

1. **Claudia Andrieș**, Ștefan Slămnoiu, Laura Ion, Andrei Neamțu, Michael Przybylski, Brîndușa Alina Petre, “Oxidative Modification in Proteins: Cross Reactivity of Anti-Nitrotyrosine Antibodies to Oxidative Modified Tyrosine containing Peptides”, poster și prezentare orală, 2nd Circular of International Workshop on “Affinity – Mass Spectrometry – New Methods and Application to Protein Therapeutics Development”, Russelsheim, Germania, 14 – 16 noiembrie, 2016;
2. **Claudia Andrieș**, Adriana Surleva, Aurel Pui, Marius Zaharia, Robert Grădinaru, Manuela Murariu, Ioan Marian Risca, Gabi Drochioiu, “Impact of Heavy Metal Accumulation on Tarnița Forestry Ecosystem”, poster, 19th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, RICCE 19, Sibiu, România, 2 – 5 septembrie, 2015;
3. Brîndușa Alina Petre, Laura Ion, **Claudia Andrieș**, Brian Gau, Michael Gross, “Molecular Characterization of Neuronal Protein Aggregates by New Mass Spectrometric Approach”, prezentare orală, 19th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, RICCE 19, Sibiu, România, 2 – 5 septembrie, 2015;
4. **Claudia Andrieș**, Laura Ion, Brian Gau, Michael Gross, Gabi Drochioiu, Alina Brîndușa Petre, “Mass spectrometric based approaches for studying aggregation of β -amyloid peptide”, poster, 48.Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Wuppertal, Germania, 1 – 4 martie, 2015;
5. **Claudia Andrieș**, Laura Ion, Brian Gau, Michael Gross, Gabi Drochioiu, Alina Brîndușa Petre, “Molecular characterization of neuronal protein aggregates by mass spectrometry-based footprinting methods”, poster, 47.Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Frankfurt, Germania, 3 – 5 martie, 2014;

6. Laura Ion, Claudia Cozma, **Claudia Andrieș**, Michael Przybylski, Alina Brîndușa Petre, “Specific lysosomal diagnostic for MPS II / MPS VI patients by fluorimetry and mass spectrometry”, poster, 47.Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Frankfurt, Germania, 3 – 5 martie, 2014;
7. **Claudia Andrieș**, Mihaela Stumbaum, Gabi Drochioiu, Michael Przybylski și Brîndușa Alina Petre, “Mass spectrometric based method for rigorous characterization of antibody-antigen interaction”, prezentare orală, 18th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, Sinaia, Romania, 4 – 7 septembrie 2013;
8. Brîndușa Alina Petre, Laura Ion, **Claudia Andrieș**, Brian Gau, Gabi Drochioiu, Michael Gross, “Hydrogen/deuterium exchange – mass spectrometry for molecular characterization of neuronal protein aggregates”, prezentare orală, 18th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, Sinaia, Romania, 4 – 7 septembrie 2013.

Participări la conferințe naționale:

1. **Claudia Andrieș**, Gabi Drochioiu, Michael Przybylski, Brîndușa Alina Petre, “Molecular characterization of eosinophil peroxidase peptide by mass spectrometry”, prezentare orală, ZILELE Universității „Alexandru Ioan Cuza” din Iași, Conferința FACULTĂȚII DE CHIMIE, 31 octombrie – 1 noiembrie, 2014;
2. Laura Ion, Claudia Cozma, **Claudia Andrieș**, Gabi Drochioiu, Michael Przybylski, Brîndușa Alina Petre, “Lysosomal storage disease. Characterization and diagnostics of MPS II and MPS IV”, prezentare orală, ZILELE Universității „Alexandru Ioan Cuza” din Iași, Conferința FACULTĂȚII DE CHIMIE, 31 octombrie – 1 noiembrie, 2014;
3. **Claudia Andrieș**, Gabi Drochioiu, Michael Przybylski, Brîndușa Alina Petre, “Eosinophil peroxidase peptide mapping by mass spectrometry”, poster, A XXXIII-a Conferință Națională de Chimie, Căciulata, Vâlcea, România, 01 – 03 octombrie, 2014;
4. **Claudia Andrieș**, Laura Ion, Ștefan Slămnou, Michael Przybylski, Brîndușa Alina Petre, “Mass spectrometric based methods for rigorous characterization of antibody-antigen interaction”, prezentare orală, ZILELE Universității „Alexandru

Ioan Cuza”din Iași, Conferința FACULTĂȚII DE CHIMIE, 31 octombrie – 2 noiembrie 2013, **Premiu pentru cea mai bună prezentare orală.**

Participări la workshop-uri:

6 - 8 decembrie 2013 - Workshop „Interdisciplinaritatea și managementul cercetării în studiile doctorale”, Amfiteatrul P3, Facultatea de Chimie, Universitatea „Alexandru Ioan Cuza”;

27 noiembrie 2013 – Seminar „Aplicații ale spectrometriei de masă în cercetare” susținut de Volker Kruft, *Application Proteomics Specialist AB Sciex*, Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”;

4 octombrie 2013 – Seminar „Levels. Chemistry and life sciences” susținut de Prof. Dr. Gabi Drochioiu, Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”;

1 octombrie 2013 – Seminar „Affinity-Mass Spectrometry and Ion Mobility-Mass Spectrometry: New Tools for elucidating structures, reaction pathways and interactions of „misfolding”-aggregating proteins” susținut de Prof. Dr. h. c. Michael Przybylski, Universitatea „Alexandru Ioan Cuza”.

Membru în proiecte de cercetare:

- 1. 11/2015 – prezent** – Asistent de cercetare în proiectul de Tinere Echipe PN-II-RU-TE-2014-4-0920. Director de proiect: Lect. Dr. Brîndușa Alina Petre;
- 2. 10/2012 – 08/2014** – Asistent de cercetare în proiectul de Tinere Echipe PN-II-RU-TE-2011-3-0038. Director de proiect: Lect. Dr. Brîndușa Alina Petre.

Stagii de practică care au contribuit la formarea profesională:

03/2013 – 05/2013 – Bursă Erasmus în cadrul Laboratorului de Chimie Analitică și Analiză a Structurii Biopolimerilor, Universitatea din Konstanz, Germania;

08/2012 – Bursă DAAD în cadrul Laboratorului de Chimie Analitică și Analiză a Structurii Biopolimerilor, Universitatea din Konstanz, Germania.