

**UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI**

**FACULTATEA DE CHIMIE**

**ȘCOALA DOCTORALĂ DE CHIMIE**

**Analogi ai peptidei neuroprotectoare NAP: sinteză,  
caracterizare și interacțiune cu ionii metalici**

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat,**

**Prof. Dr. Gabi DROCHIOIU**

**Student-doctorand,**

**Chimist Ancuța-Veronica LUPĂESCU**

**Februarie 2020**



## **Mulțumiri**

*Mulțumesc coordonatorului științific, Profesor Dr. **Gabi Drochioiu** pentru sprijinul acordat în realizarea acestei lucrări, pentru îndrumările și discuțiile cu înalt conținut științific care au contribuit la finalizarea cercetărilor și integrarea mea în munca de cercetare.*

*Mulțumiri speciale se îndreaptă către membrii comisiei de îndrumare, doamnei Lector Dr. **Brîndușa Alina Petre**, domnului Conferențiar Dr. **Vasile-Robert Grădinaru** și domnului Conferențiar Dr. **Gheorghică Zbancioc** pentru sprijinul științific, sfaturile utile și încrederea acordată pe tot parcursul perioadei de doctorat.*

*De asemenea, doresc să mulțumesc cercetătorilor și profesorilor care, într-un fel sau altul au contribuit prin sfaturi sau colaborare directă la finalizarea acestei teze:*

- *Doamnei Dr. **Cătălina Ionica Ciobanu**, platformei de cercetare CERNESIM și proiectului proiectului POSCCE-O 2.2.1, SMIS-CSNR 13984-901, Nr. 257/28.09.2010, pentru sprijinul acordat în realizarea spectrelor de rezonanță magnetică nucleară;*
- *Domnilor Conferențiar Dr. **Ionel Humelnicu** și Conferențiar Dr. **Gheorghică Zbancioc** pentru ajutorul acordat în investigarea probelor prin spectroscopie FT-IR;*
- *Doamnei Lector Dr. **Brîndușa Alina Petre** și centrului de cercetare TRANSCEND pentru posibilitatea de a utiliza spectrometrul de masă MALDI ToF;*
- *Mulțumiri speciale domnului Dr. **Alexey Kononikhin** și doamnei Dr. **Maria Indeykina** de la Institutul Skolkovo de Știință și Tehnologie (Skoltech), Moscova, Rusia pentru ajutorul acordat în realizarea experimentelor LTQ-FT-ICR MS*

*Mulțumesc de asemenea colegelor Drd **Monica Iavorschi**, Dr. **Laura Ion** și Dr. **Olga Pintilie** din cadrul Laboratorului de Biochimie pentru discuțiile științifice, sfaturile utile, încrederea și prietenia acordată.*

*Mulțumesc UEFISCDI (proiect **PN-III-P4-ID-PCE-2016-0376**) pentru suportul financiar suplimentar acordat pe parcursul stagiului de pregătire a tezei de doctorat.*

*Sincere mulțumiri familiei mele pentru tot sprijinul acordat pe parcursul anilor de studiu.*

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE.....</b>	<b>1</b>
<b>PARTEA I. STUDIU DE LITERATURĂ.....</b>	<b>5</b>
<b>I.1 PEPTIDE. GENERALITĂȚI.....</b>	<b>5</b>
I.1.1 Aminoacizii.....	5
I.1.2 Legătura peptidică.....	11
I.1.3 Peptide și protein.....	13
<b>I.2 BOALA ALZHEIMER ȘI PEPTIDELE NEUROPROTECTOARE.....</b>	<b>16</b>
I.2.1 Boala Alzheimer.....	16
I.2.2 Stresul oxidativ și ionii metalici.....	17
I.2.3 Tratamente utilizate în boala Alzheimer.....	19
I.2.4 Peptidele neuroprotectoare.....	20
<b>I.3 METODE DE SINTEZĂ ALE PEPTIDELOR.....</b>	<b>28</b>
I.3.1 Biosinteza peptidelor.....	28
I.3.2 Sinteza chimică.....	31
<b>I.4 METODE DE CARACTERIZARE A PEPTIDELOR ȘI COMPLECȘILOR ACESTORA.....</b>	<b>36</b>
I.4.1 Spectrometria de masă.....	36
I.4.2 Spectroscopia în infraroșu cu Transformată Fourier.....	40
I.4.3 Spectroscopia UV-viz.....	41
I.4.4 Spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară.....	42

I.4.5 Cromatografia de lichid de înaltă performanță (HPLC).....	43
<b>I.5 OBIECTIVELE TEZEI.....</b>	<b>46</b>
<b>PARTEA II. CONTRIBUȚII PERSONALE.....</b>	<b>47</b>
<b>II.1 MATERIALE ȘI METODE.....</b>	<b>47</b>
II.1.1 Materiale.....	47
II.1.2 Metode de cercetare.....	48
<b>II.2 SINTEZA PEPTIDELOR NEUROPROTECTOARE.....</b>	<b>57</b>
II.2.1 Designul și sinteza peptidelor.....	57
II.2.2 Hidrofobicitatea peptidelor.....	60
II.2.3 Purificarea peptidelor.....	61
II.2.4 Structura spațială a peptidelor.....	66
II.2.5 Concluzii.....	69
<b>II.3 CARACTERIZAREA PEPTIDELOR NOU SINTETIZATE....</b>	<b>70</b>
II.3.1 Caracterizarea peptidelor prin spectrometrie de masă.....	70
II.3.2 Caracterizarea peptidelor prin spectroscopie în infraroșu.....	86
II.3.3 Caracterizarea peptidelor prin spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară.....	96
II.3.4 Caracterizarea peptidelor prin spectroscopia UV-vis.....	102
II.3.5 Concluzii.....	106
<b>II.4 INVESTIGAREA INTERACȚIUNII PEPTIDELOR CU DIVERȘI IONI METALICI PRIN SPECTROMETRIE DE MASĂ MALDI TOF.....</b>	<b>108</b>
II.4.1 Selectarea matricei specifice complexilor.....	108

II.4.2 Studiul interacțiunii peptidei NAP neuroprotectoare (anti-amiloidice) și analogilor săi cu ionii de argint.....	112
II.4.3 Studiul interacțiunii peptidei NAP neuroprotectoare și analogilor săi cu ionii de cupru(I).....	118
II.4.4 Studiul interacțiunii peptidei NAP neuroprotectoare și analogilor săi cu ionii de cupru(II).....	124
II.4.5 Studiul interacțiunii peptidei NAP neuroprotectoare și analogilor săi cu ionii de fier(II).....	130
II.4.6 Studiul interacțiunii peptidei NAP neuroprotectoare și analogilor săi cu ionii de fier(III).....	136
II.4.7 Concluzii.....	142
<b>II.5 CONFIRMAREA LEGĂRII IONILOR METALICI PRIN SPECTROMETRIE DE MASĂ CU ELECTROPULVERIZARE, ESI MS.....</b>	<b>144</b>
II.5.1 Studiul interacțiunii peptidelor neuroprotectoare cu ionii de aluminium.....	144
II.5.2 Studiul interacțiunii peptidelor neuroprotectoare cu ionii de zinc.....	152
II.5.3 Studiul interacțiunii peptidelor neuroprotectoare cu ionii de cupru.....	159
II.5.4 Studiul interacțiunii peptidelor neuroprotectoare cu ionii de fier.....	161
II.5.5 Concluzii.....	164
<b>II.6 SPECTROSCOPIA ÎN INFRAROȘU A PEPTIDELOR ȘI COMPLECȘILOR CU METALELE.....</b>	<b>165</b>
II.6.1 Investigarea complecșilor peptidelor NAP și NAPC cu ioni cupru(I) și argint.....	165

II.6.2 Spectroscopia ATR-FT-IR a compleșilor peptidelor de tip NAP cu ioni de aluminium.....	170
II.6.3 Spectroscopia ATR-FT-IR a compleșilor peptidelor de tip NAP cu ioni cupru(II) și ioni de fier(II).....	174
II.6.4 Concluzii.....	178
<b>II.7 DISEMINAREA REZULTATELOR ȘI ACTIVITATEA ȘTIINȚIFICĂ.....</b>	<b>179</b>
II.7.1 Lucrări publicate.....	179
II.7.2 Participări la conferințe.....	180
II.7.3 Participări la școli de vară.....	183
II.7.4 Participări la seminarii științifice.....	184
II.7.5 Proiecte de cercetare în care a fost implicat studentul doctorand..	184
<b>CONCLUZII GENERALE.....</b>	<b>185</b>
<b>BIBLIOGRAFIE.....</b>	<b>191</b>
<b>ANEXE.....</b>	<b>211</b>
<b>LUCRĂRI IN EXTENSO.....</b>	<b>226</b>

## INTRODUCERE

Bolile neurodegenerative care afectează sistemul nervos reprezintă o problemă critică la nivel mondial. Aceste patologii sunt asociate cu îmbătrânirea și implică trăsături precum: moartea neuronală selectivă, agregarea proteinelor, stresul oxidativ, disfuncția mitocondrială, acumularea de metale tranziționale și inflamația (Rivera-Mancía *et al.*, 2010).

Peptidele neuroprotectoare au fost intens studiate datorită capacității acestora de a preveni și ameliora semnificativ bolile degenerative. Tulburările neurodegenerative precum bolile Alzheimer, Parkinson și Creutzfeldt-Jacob sunt asociate cu „împachetarea” sau agregarea proteinelor (Arneson *et al.*, 2018). Modificările conformaționale sunt considerate a fi responsabile de formare a plăcilor de amiloid în bolile neurodegenerative care conduc la schimbarea morfologiei întregului creier (Karamanos *et al.*, 2015).

Studiile toxicologice preclinice au indicat faptul că octapeptida NAP (<sup>1</sup>NAPVSIPQ<sup>8</sup>), un mic fragment activ al proteinei neuroprotectoare dependente de activitate (ADNP), asigură protecția celulelor nervoase la concentrații foarte scăzute oferind o nouă perspectivă în producerea de medicamente anti-BA. Din acest motiv a crescut interesul pentru peptida NAP și în special a analogilor acesteia în vederea îmbunătățirii eficacității în protejarea neuronilor. Patologia asociată cu boala Alzheimer presupune hiperfosforilarea proteinei tau, agregarea amiloidică, instalarea stresului oxidativ și degenerarea microtubulilor poate fi investigată prin intermediul culturilor celulare neuronale și în modelele animale (Gozes *et al.*, 2006). În plus, peptida NAP imită activitatea proteinei neuroprotectoare ADNP și

poate traversa bariera hematoencefalică prezentând astfel potențial terapeutic în tratarea și prevenirea bolilor neurodegenerative.

Motivația alegerii temei „Analogi ai peptidei neuroprotectoare NAP: sinteză, caracterizare și interacțiune cu ionii metalici” a fost reprezentată de studiile realizate anterior cu această peptidă (Lupaescu, 2016), dar și de absența unor studii bine fundamentate referitoare la interacțiunile acesteia cu ionii metalici. Astfel, au fost sintetizați analogi noi ai acestei peptide pentru a înțelege mai bine influența ionilor metalici, care interacționează cu peptidele amiloidice în cursul patologiei Alzheimer, inclusiv cu peptidele neuroprotectoare de tip NAP. Intre timp, au fost realizate noi studii privind interacțiunea NAP cu aluminiu și cu alte metale (Yang *et al.*, 2019), cercetările descrise în această lucrare devenind astfel de interes pentru comunitatea științifică mondială, lucru dovedit de impactul acestora la nivel internațional.

Teza de doctorat „Analogi ai peptidei neuroprotectoare NAP: sinteză, caracterizare și interacțiune cu ionii metalici” are 226 pagini care cuprind un număr de 139 figuri, 33 tabele și 235 indici bibliografici. Rezultatele prezentate în partea de contribuții personale constituie subiectul a cinci articole științifice publicate în calitate de autor principal în jurnale cotate Web of Science a căror factor de impact cumulat este de 4,523 (Lupaescu *et al.*, 2019; Lupaescu *et al.*, 2019a; Lupaescu *et al.*, 2019b; Lupaescu *et al.*, 2019c; Jureschi, Lupaescu *et al.*, 2019) și patru articole publicate și cotate ISI (Drochioiu *et al.*, 2018; Jureschi *et al.*, 2019a; Ciobanu *et al.*, 2019; Ion *et al.*, 2019). Rezultatele obținute pe parcursul stagiului doctoral au fost diseminate la numeroase conferințe organizate pe plan național (5) și internațional (8). Dezvoltarea profesională s-a realizat și prin participări la șase școli de vară internaționale, la patru din acestea contribuind și în calitate de co-

organizator, precum și trei seminarii științifice. De asemenea, dezvoltarea profesională a fost facilitată și de implicarea în proiectul de cercetare ”Modificări conformaționale ale peptidelor în prezența ionilor metalici și a compușilor antiamiloidici, dependente de timp și de pH, implicate în bolile neurodegenerative, acronim MeticonpH”, Contract 56/2017.

Pentru realizarea prezentei teze de doctorat intitulată „Analogi ai peptidei neuroprotectoare NAP: sinteză, caracterizare și interacțiune cu ionii metalici” s-au urmărit următoarele obiective:

- Sinteza unor peptide derivate de la octapeptida nativă NAP, utilizând metoda de sinteză a peptidelor în fază solidă, SPPS.
- Caracterizarea peptidelor obținute și purificate cu metode instrumentale specifice, cum ar fi spectrometria de masă, spectroscopia în infraroșu, spectroscopia RMN și spectroscopia UV-viz.
- Studiul formării complexilor peptido-metalici cu diverși ioni metalici, cum ar fi cupru, fier, aluminiu, zinc și argint.
- Investigarea modificărilor conformaționale ale peptidelor nou sintetizate sub acțiunea ionilor metalici.
- Diseminarea rezultatelor obținute prin publicarea lor în jurnale cu factor de impact și prezentarea acestora la conferințe internaționale și naționale.

Din punct de vedere structural, teza cuprinde două părți, o parte teoretică și una în care sunt prezentate rezultatele cercetării doctorale și observațiile proprii. Astfel, prima parte a fost destinată studiului de literatură și a fost structurată în cinci subcapitole ce oferă informații importante referitoare la stadiul actual al cunoașterii în tematica aleasă. Au fost incluse aici informații legate de structura compușilor cu legături

peptidice, importanța peptidelor neuroprotectoare, metodele de sinteză ale peptidelor și principalele metode fizico-chimice utilizate în caracterizarea structurală și conformațională a compușilor peptidici. Finalul acestui capitol evidențiază principalele obiective propuse în realizarea tezei de doctorat.

Cea de-a doua parte este una originală și înglobează contribuțiile personale aduse în domeniul sintezei și caracterizării peptidelor și interacțiunii lor cu metalele. Rezultatele originale obținute au fost raportate în șapte capitole dintre care primul oferă informații legate de materialele și instrumentele folosite în cercetările experimentale, precum și metodele aplicate în obținerea și investigarea compușilor de interes pentru această cercetare. Al doilea capitol descrie pașii urmați în sinteza peptidelor de tip NAP de la proiectare până la purificare și simularea aranjamentului spațial, etape premergătoare caracterizării acestor macromolecule. Cel de-al treilea capitol este dedicat caracterizării peptidelor sintetizate prin spectrometrie de masă, spectroscopie în infraroșu, spectroscopie UV-viz și spectrometrie de rezonanță magnetică nucleară (RMN). Investigarea interacțiunii peptidelor cu diverși ioni metalici de argint(I), cupru(I), cupru(II), fier(II) și fier(III), prin spectrometrie de masă de tip MALDI ToF și compararea acestora cu cele teoretice a fost descrisă în capitolul al patrulea. Capitolul al cincilea cuprinde caracterizarea prin spectrometrie de masă cu electropulverizare (ESI) și de tip MALDI ToF a complexilor peptido-metalici cu ioni de aluminiu(III), zinc(II), cupru(I) sau cupru(II) și fier(II) sau fier(III) și compararea rezultatelor obținute. Capitolul al șaselea prezintă rezultatele obținute în cadrul cercetărilor privind modificările conformaționale suferite de peptide în prezența ionilor metalici și care au fost obținute prin

spectroscopie în infraroșu. Un ultim capitol cuprinde activitatea științifică efectuată pe parcursul anilor de doctorat și lista lucrărilor publicate.

Lucrarea de doctorat se încheie cu concluziile generale desprinse în urma rezultatelor obținute și bibliografia consultată. Teza prezintă anexe cu articolele științifice publicate, precum și unele date spectrale și tabele aferente care, deși importante prin conținutul lor științific au fost anexate pentru simplificarea prezentării în cadrul tezei a cercetărilor efectuate.

## PARTEA II. CONTRIBUȚII PERSONALE

### II.1 MATERIALE ȘI METODE

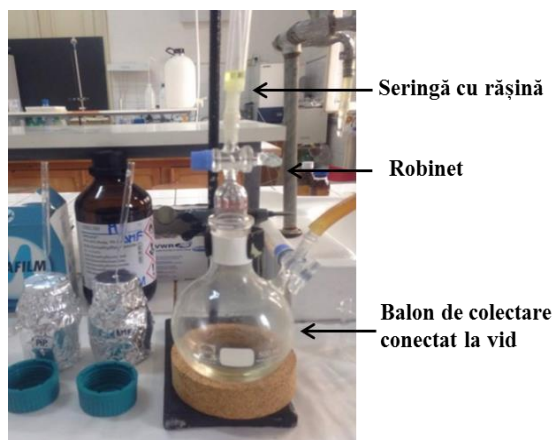
#### II.1.2 Metode de cercetare

##### *Sinteza peptidelor*

Peptidele au fost sintetizate manual, pe suport polimeric solid, prin metoda în fază solidă, strategia Fmoc/t-Bu. Pe scurt, sinteza peptidelor s-a realizat pe rășină în mediu de dimetilformamidă (DMF), pornind de la capătul C-terminal la cel N-terminal printr-o serie de reacții de cuplare/deprotejare, într-o seringă de plastic prevăzută cu frită. Rășina de tip Fmoc-Gln(Trt)-Wang utilizată la sinteza peptidelor prezintă primul aminoacid atașat pe suportul solid și generează peptide cu C-terminal carboxilic (-COOH). Instalația pentru sinteză (Figura II.1.2) necesită racordarea la o pompa de vid în vederea îndepărtării soluțiilor de spălare.

Într-o primă etapă are loc umflarea rășinei în DMF timp de 30 minute. Deprotecția grupelor protectoare (Fmoc sau terț-butil) aflate pe rășină sau pe aminoacid se obține cu o soluție de 20% piperidină în dimetilformamidă. Atașarea covalentă a aminoacidului amino-protejat la suportul polimeric solid se realizează doar după activarea acestuia în prezența activatorului HBTU în mediu bazic de N-metilmorfolină. Excesul de reactivi și aminoacizi a fost îndepărtat prin spălare cu DMF. Pentru a asigura un randament maxim, reacția de cuplare s-a repetat de două ori pentru fiecare aminoacid inserat în structură. De asemenea, cantitățile stoichiometrice ale reactivilor de cuplare și aminoacizilor folosiți în reacție au fost mult mai mari de 1:5 și respectiv 1:2. Etapele de deprotecție și cuplare se repetă pentru fiecare aminoacid în parte, până la realizarea secvenței dorite. Cuplarea aminoacizilor se poate verifica folosind o soluție de albastru de bromfenol (0,05% în DMF) în prezența căruia se obține o colorație albastră dacă cuplarea nu are loc. Această metodă se

bazează pe reacția acido-bazică dintre indicator și gruparea amino bazică a aminoacidului cu formarea unui compus de culoare albastră (Figura II.1.3).



**Figura II.1.2** Instalația utilizată la sinteza manuală a peptidelor.

### *Complecși peptido-metalici*

În experimentele realizate, peptidele sintetizate au fost supuse unei reacții de complexare în soluție cu ioni metalici de  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  sau  $\text{Zn}^{2+}$ . Au fost realizate soluții de peptide cu concentrația de 8 mM și soluții 80 mM de săruri de metale utilizând apă bidistilată de înaltă puritate. De regulă, complecșii metalici ai peptidelor de tip NAP au fost obținuți în urma amestecării soluțiilor de peptidă cu ioni metalici la pH 7 sau 6,6 și la un raport molar de 1: 10, de exemplu 4 mM peptidă: 40 mM ion metalic. Soluțiile rezultate au fost în continuare incubate peste noapte la temperatura camerei, pe un agitator cu o viteză de agitare de 350 rpm.

Experimentele ESI-MS au necesitat soluții mult mai diluate. Astfel, pentru studiul interacțiunilor metalelor cu peptidele, probele au fost dizolvate în soluție apoasă (Milli-Q  $\text{H}_2\text{O}$ ) cu un conținut de 25 mM acetat de amoniu (pH 7,4). Concentrația peptidei a fost menținută constantă la o

valoare de 12,5  $\mu\text{M}$  în timp ce ionul metalic a avut o concentrație de 1,25 mM.

## II.2 SINTEZA PEPTIDELOR NEUROPROTECTOARE

### II.2.1 Designul și sinteza peptidelor

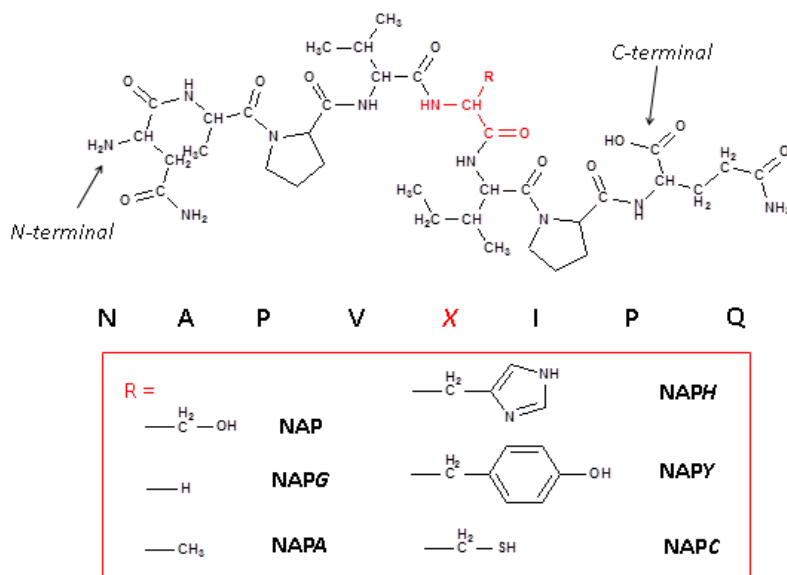
Sintezele realizate au vizat înlocuirea celui de-al cincilea aminoacid din secvența octapeptidei în vederea obținerii de peptide mutante care ar putea avea noi proprietăți terapeutice utile în bolile neurodegenerative. În acest fel, glicina conferă peptidei o structură mult mai flexibilă (Murariu *et al.*, 2017) în timp ce histidina, tirozina și cisteina, aminoacizi cunoscuți pentru afinitatea față de ioni metalici, s-au dovedit a fi aminoacizi ce imprimă proprietăți chelatante superioare (Murariu *et al.*, 2009). Serina se deosebește de alanină numai prin gruparea hidroxil; alanina în secvența noii peptide va păstra toate proprietățile structurale ale serinei cu excepția celor determinate de gruparea  $-\text{OH}$ . În principiu, sintezele au vizat secvența  ${}^5\text{SIP}^7$  (Ser-Ile-Pro) a peptidei native NAP considerată de unii cercetători drept centrul său activ (Oz *et al.*, 2014). În figura II.2.1 este redată structura primară a peptidelor de tip NAP.

După cum se observă din tabel, prin înlocuirea serinei cu glicina ( ${}^5\text{S} \rightarrow \text{G}$ ) s-a obținut o nouă peptidă cu structura  $\text{H}_2\text{N}-(\text{Asn-Ala-Pro-Val-Gly-Ile-Pro-Gln})-\text{COOH}$  (abreviat NAPG). În cazul peptidei NAPA, sinteza a fost efectuată utilizând alanină în loc de serină ( ${}^5\text{S} \rightarrow \text{A}$ ) și astfel s-a obținut peptida  $\text{H}_2\text{N}-(\text{Asn-Ala-Pro-Val-Ala-Ile-Pro-Gln})-\text{COOH}$ . Similar cu cazurile anterioare, alte două peptide au fost obținute și anume cele care conțin histidină ( ${}^5\text{S} \rightarrow \text{H}$ ) și tirozină ( ${}^5\text{S} \rightarrow \text{Y}$ ) ca substituenți pentru aminoacidul serinic (NAPH:  $\text{H}_2\text{N}-(\text{Asn-Ala-Pro-Val-His-Ile-Pro-Gln})-\text{COOH}$  și NAPY:  $\text{H}_2\text{N}-(\text{Asn-Ala-Pro-Val-Tyr-Ile-Pro-Gln})-\text{COOH}$ ). Peptida NAPC ( $\text{H}_2\text{N}-(\text{Asn-Ala-Pro-Val-Cys-Ile-Pro-Gln})-\text{COOH}$ ) obținută

prin înlocuirea aminoacidului serină cu cisteina ( $^3S \rightarrow C$ ) a fost sintetizată anterior în colectivul de biochimie.

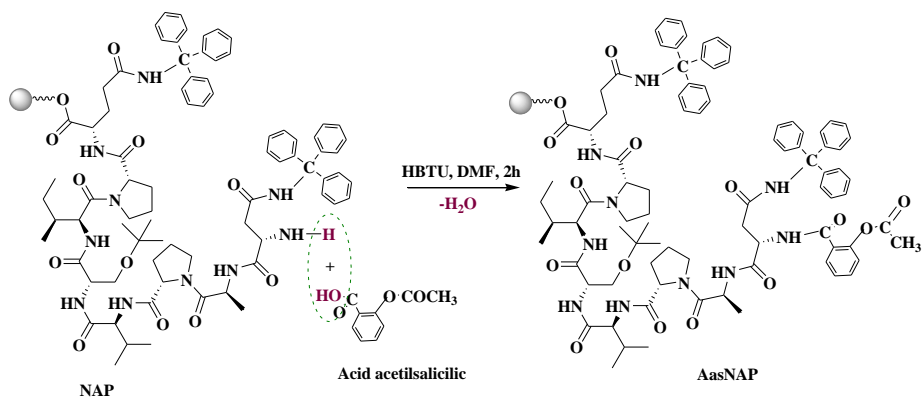
**Tabelul II.2.1** Denumirea, secvența și formula moleculară a peptidelor de tip NAP sintetizate și studiate în cadrul tezei de doctorat.

Denumire	Secvență peptidică	Formulă	Masa calculată (Da)	
			monoizotopică	medie
NAP	$H_2N$ -NAPVSIPQ-COOH	$C_{36}H_{60}N_{10}O_{12}$	824,4	824,9
NAPG	$H_2N$ -NAPVGIPQ-COOH	$C_{35}H_{58}N_{10}O_{11}$	794,4	794,9
NAPA	$H_2N$ -NAPVAIPQ-COOH	$C_{36}H_{60}N_{10}O_{11}$	808,4	808,9
NAPH	$H_2N$ -NAPVHIPQ-COOH	$C_{39}H_{62}N_{12}O_{11}$	874,5	874,9
NAPY	$H_2N$ -NAPVYIPQ-COOH	$C_{42}H_{64}N_{10}O_{12}$	900,5	901,0
NAPC	$H_2N$ -NAPVAIPQ-COOH	$C_{36}H_{60}N_{10}O_{11}S_1$	840,4	840,9
Aas-NAP	<b>Aas</b> -NAPVSIPQ-COOH	$C_{45}H_{66}N_{10}O_{15}$	986,5	987,1



**Figura II.2.1** Structura generală a peptidelor de tip NAP sintetizate.

Totodată, plecând de la structura octapeptidei NAP s-a realizat un conjugat peptidic care constă în atașarea la capătul N-terminal al peptidei NAP naturale a unui rest de acid acetyl salicilic (Aas = acid acetyl salicilic). Acidul acetilsalicilic este, fără îndoială, cel mai vechi și mai cunoscut produs farmaceutic (aspirina), cu proprietăți antiinflamatoare deosebite, anti-trombocitice, anti-piretice, antioxidante și analgezice. Proteinele asociate cu inflamația, cum ar fi citokine pro-inflamatorii, receptori de fază acută, sau factorii proteici complementari au fost co-localizate cu plăcile amiloidice (Akiyama, 2000). Medicamentele antiinflamatorii nesteroidiene, precum aspirina, au fost folosite cu succes în reducerea riscului de apariție a bolii Alzheimer (Etminan *et al.*, 2003). Cu toate acestea, nu este recomandată utilizarea lor pe termen îndelungat datorită efectelor secundare nedorite de anti agregant plachetar (inhibă funcțiile plachetare care participă la hemostază) (Pomponi și Pomponi, 2014).

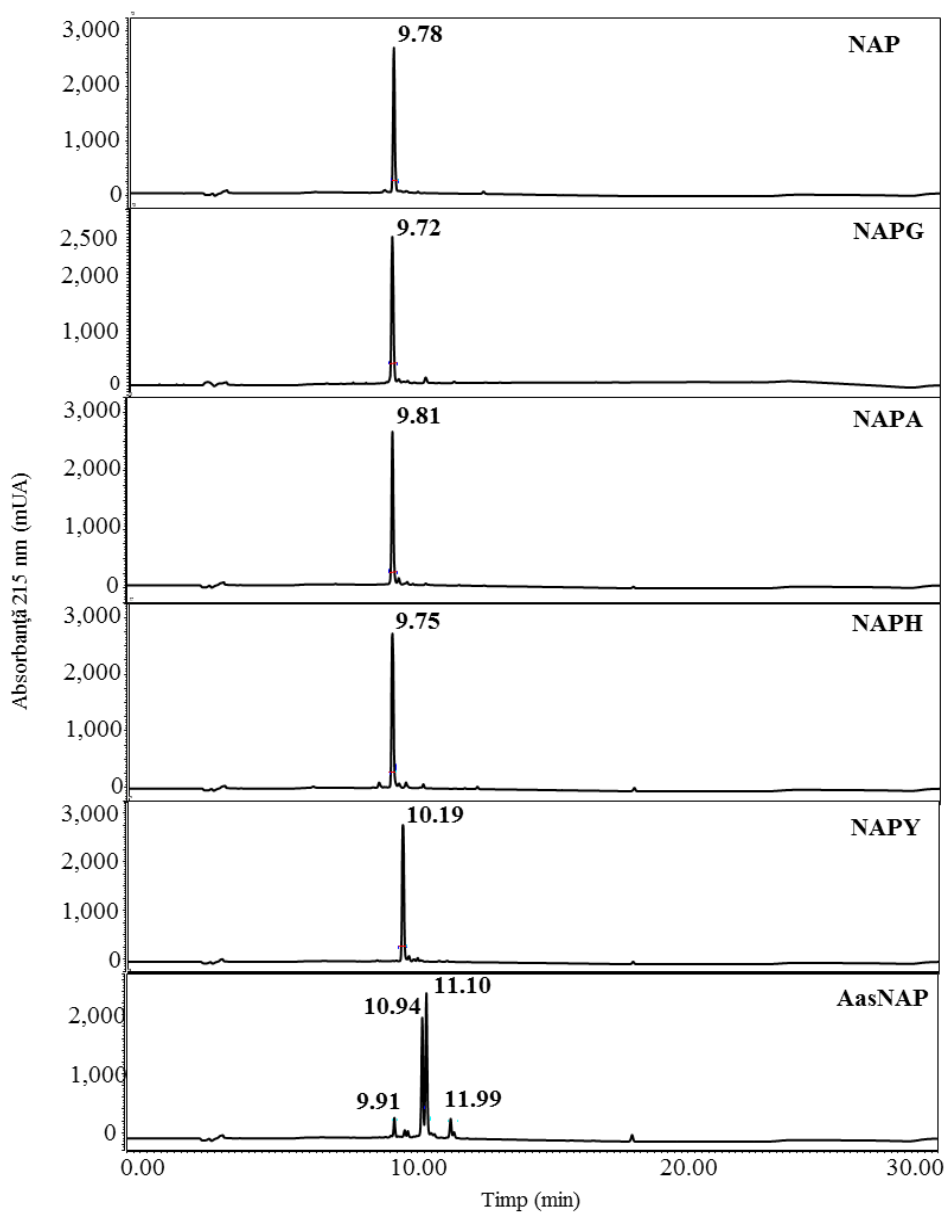


**Figura II.2.2** Reacția de cuplare a acidului acetilsalicilic cu peptida NAP.

### II.2.3 Purificarea peptidelor

Purificarea peptidelor prin cromatografie RP-HPLC a fost realizată conform metodei descrise în secțiunea experimentală. Utilizând metoda nr. 1 (Tabelul II.1.1) s-au separat peptidele de tip NAP într-un timp relativ

scurt, de 30 min. Cu excepția peptidei Aas-NAP, separarea celorlalți compuși a fost realizată cu o rezoluție satisfăcătoare. Astfel, s-au obținut profiluri cromatografice în care semnalul (*peak-ul*) majoritar a aparținut peptidei de interes.



**Figura II.2.4** Cromatogramele peptidelor sintetizate obținute utilizând metoda nr. 1.

## II.3 CARACTERIZAREA PEPTIDELOR SINTETIZATE

### II.3.1 Caracterizarea peptidelor prin spectrometrie de masă

Un prim pas după realizarea unei sintezei îl reprezintă confirmarea masei moleculare a peptidei rezultate. Spectrometria de masă reprezintă o metodă eficientă de caracterizare a biomoleculilor. Această metodă permite determinarea masei moleculare, a purității, precum și a structurii compușilor investigați. Tehnica spectrometrică de masă MALDI ToF este o metodă eficientă de analiză a proteinelor și peptidelor prin determinarea exactă a masei moleculare, caracteristică moleculelor ionizate (Marvin *et al.*, 2003). Confirmarea sintezei secvențelor peptidice dorite a fost obținută în urma comparării valorilor  $m/z$  teoretice, calculate cu ajutorul programului on-line CHEMCALC, cu semnalele înregistrate în spectrul de masă.

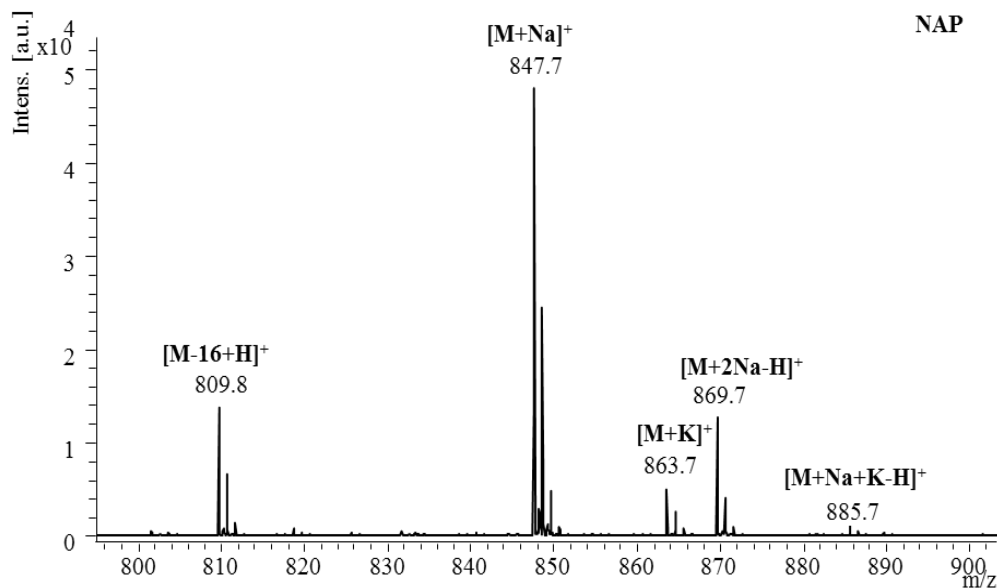
#### Peptida NAP

În Figura II.3.2 se poate observa spectrul de masă al peptidei NAP sintetizate, o peptidă de referință a cărei proprietăți au fost comparate cu cele ale peptidelor mutante. Această octapeptidă a prezentat un semnal intens la  $m/z$  847,7 corespunzător ionului  $[M+Na]^+$  și unul mai scăzut la  $m/z$  863,7 atribuit aductului cu potasiu ( $[M+K]^+$ ). Semnalul de la  $m/z$  809,8 corespunzător ionului  $[M-16+H]^+$  a fost atribuit ionului rezultat în urma fotodescompunerii peptidei sub acțiunea radiației laserului (Sarver *et al.*, 2001). Alte semnale corespunzătoare peptidei au fost identificate la  $m/z$  869,718 corespunzătoare ionului  $[M+2Na-H]^+$  și  $m/z$  885,7 specific ionului  $[M+Na+K-H]^+$ .

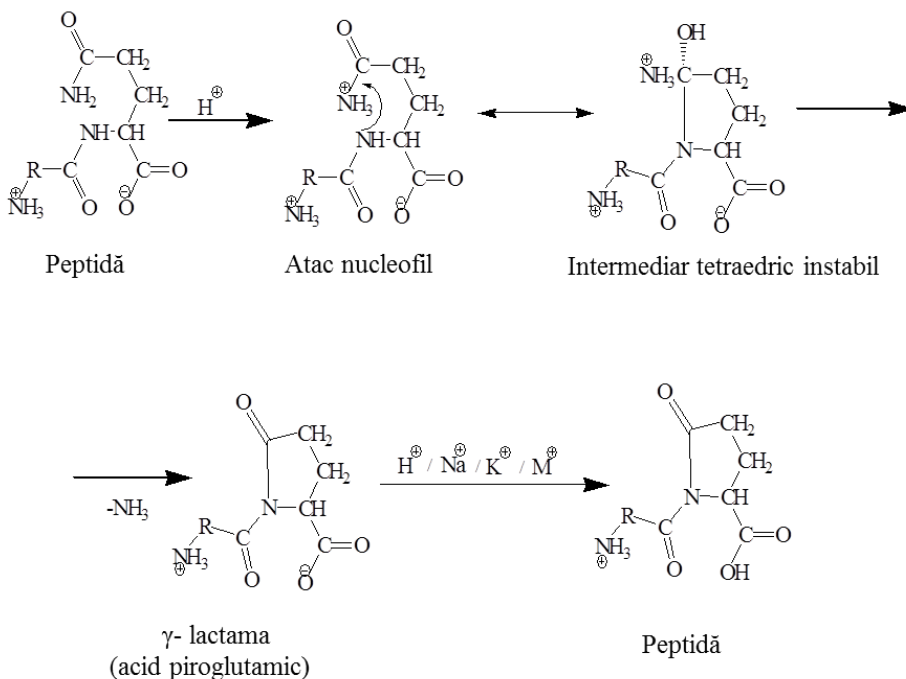
**Tabelul II.3.1** Structura primară și masa moleculară monoizotopică a peptidei NAP. Valorile au fost calculate sau determinate experimental cu ajutorul spectrometrului de masă MALDI ToF.

Secvență peptidică	Ion molecular	Teoretic (m/z)	Experimental (m/z)
<b>NAP</b> ( <i>H<sub>2</sub>N</i> -NAPVSIPQ- <i>COOH</i> ) $C_{36}H_{60}N_{10}O_{12}$	$[M-16+H]^+$	809,4	809,8
	$[M+H]^+$	825,4*	-
	$[M+Na]^+$	847,4	847,7
	$[M+K]^+$	863,4	863,7
	$[M+2Na-H]^+$	869,4	869,7
	$[M+Na+K-H]^+$	885,4	885,7

\* - valoare neobservată în spectrul de masă



**Figura II.3.2** Spectrul de masă al peptidei NAP.



**Figura II.3.3** Mecanismul de ciclizare propus pentru formarea ionului  $[M-16+H]^+$ .

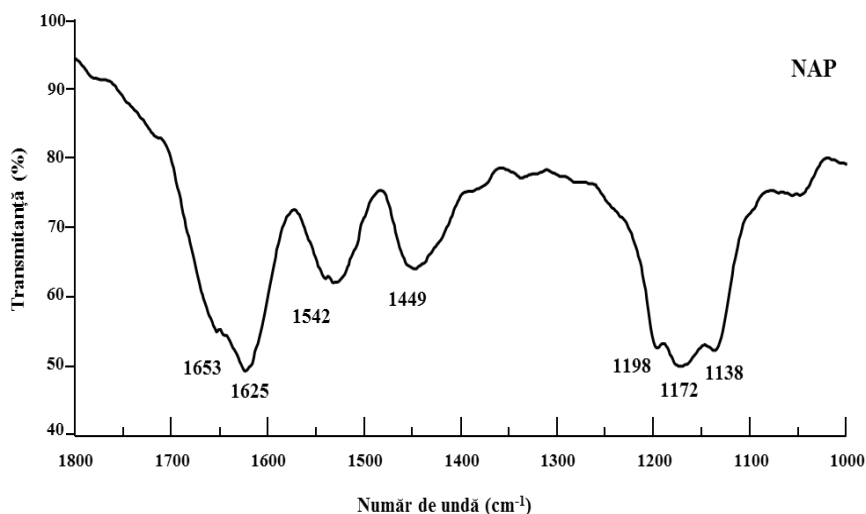
Toate spectrele MALDI ale peptidelor sintetizate au prezentat, pe lângă semnalele corespunzătoare ionilor moleculari ai peptidelor investigate și un semnal la o diferență de 16 unități  $m/z$  atribuit ionului  $[M-16+H]^+$ . Un mecanism propus pentru a descrie formarea ionului  $[M-16+H]^+$  este prezentat în Figura II.3.3. Posibilul atac nucleofil care conduce la deaminarea peptidei și formarea acidului piroglutamic este favorizată de restul de glutamină situat la extremitatea C-terminală a peptidei (Chen *et al.*, 2010). Un procedeu similar cunoscut ca regula "N-terminal Q  $\rightarrow$  Q [-17.027]" a fost observat la peptidele ce conțin un rest de glutamină la capătul N-terminal (Chen *et al.*, 2010). Mecanismul de deaminare este favorizat fotochimic de către sursa laser de lumină. Acest proces are loc în timpul ionizării peptidelor astfel că poate fi considerat ca un mecanism de descompunere post-sursă.

### II.3.2 Caracterizarea peptidelor prin spectroscopie de infraroșu

Diverse studii legate de modificările conformaționale ale compușilor peptidici utilizează regiunile spectrale amida I, amida II și amida III corespunzătoare vibrațiilor legăturilor C=O, C-N și N-H. Aceste regiuni reprezintă zone ale spectrului IR care pot furniza informații legate de caracteristica structurală a lanțului peptidic (Adochitei și Drochioiu, 2011; Murariu *et al.*, 2017). Cu toate acestea, regiunea spectrală care reflectă cel mai bine componentele structurale secundare proteice se regăsește în domeniul  $1700-1600\text{ cm}^{-1}$  caracteristic bandei amidice I și se datorează aproape în întregime vibrațiilor de întindere C=O ale legăturilor peptidice (aproximativ 80%). Astfel, frecvențele la care apar componentele benzii amidice I pot a fi asociate unui element secundar structural al proteinelor. În schimb, banda amidă II ce rezultă în principal de la vibrația de îndoire în plan a legăturii NH (40-60% din energia potențială) și de la vibrațiile de întindere CN (18-40%), prezintă o sensibilitate mai scăzută față de modificările conformaționale ale proteinei care pot fi intuite din numerele de undă caracteristice benzii amidice de tip I (Bunaciu *et al.*, 2014).

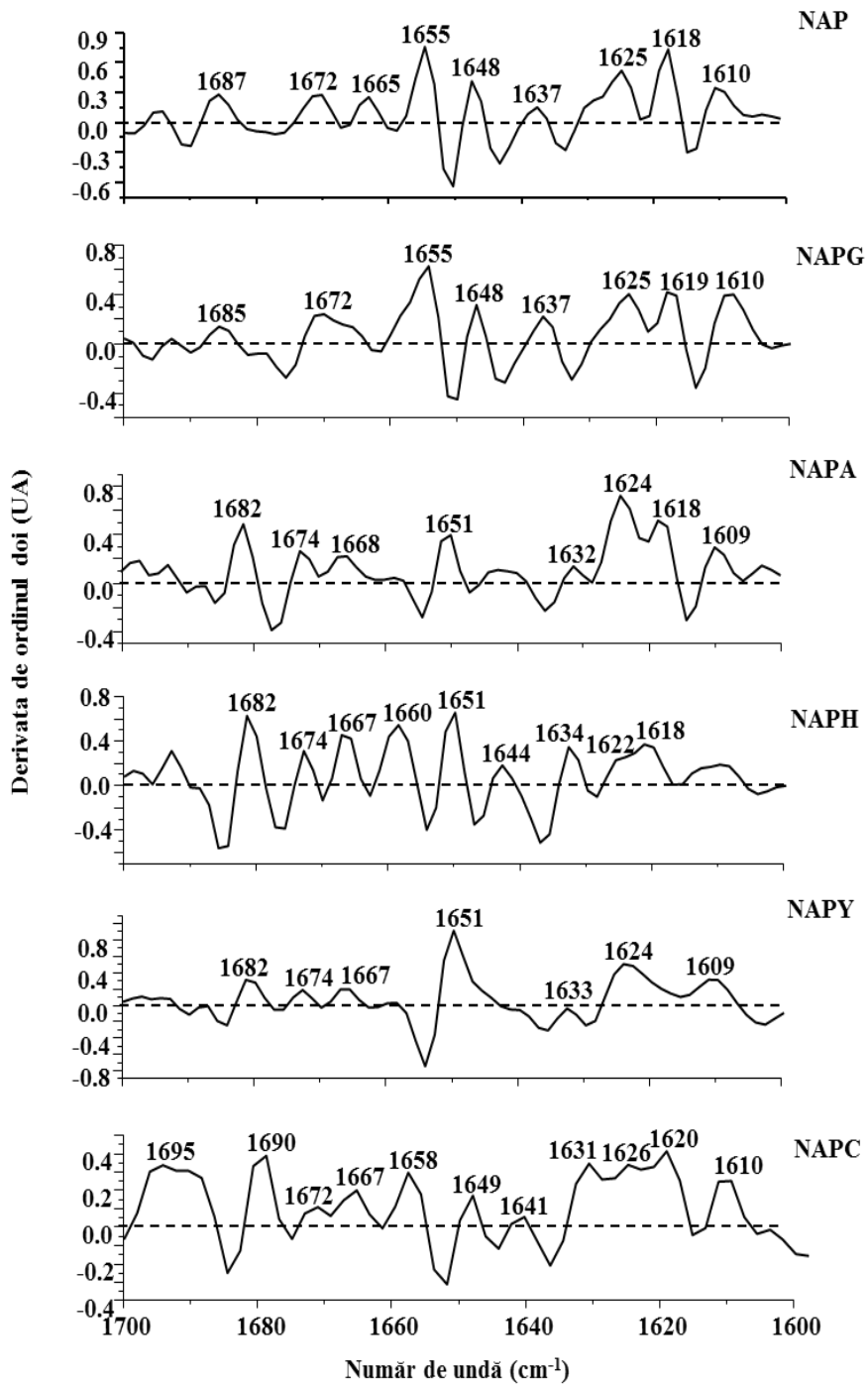
Spectrele IR ale peptidelor NAP prezintă în domeniul  $1800-1000\text{ cm}^{-1}$  patru semnale majoritare. Similitudinile dintre spectre sunt generate de lanțurile peptidice care diferă doar printr-un singur aminoacid. Cu toate acestea, diferențe privind intensitatea și valorile vârfurilor benzii pot fi ușor observate în spectrele acestor peptide. Astfel, spectrul IR al peptidei NAP (Figura II.3.19) conține trei semnale în domeniul menționat la  $1198\text{ cm}^{-1}$ ,  $1172\text{ cm}^{-1}$  și  $1138\text{ cm}^{-1}$ , în timp ce în spectrul peptidei NAPG (Figura II.3.20) *peak*-urile sunt mult mai suprapuse distingându-se doar două semnale la  $1161\text{ cm}^{-1}$  și, respectiv,  $1142\text{ cm}^{-1}$ . Valori similare pot fi

observate în spectrul peptidei NAPA (Figura II.3.21), unde, pe lângă maximul de la  $1165\text{ cm}^{-1}$ , poate fi observat și un umăr spectral la numărul de undă de  $1198\text{ cm}^{-1}$ . În cazul peptidei modificată cu histidină (NAPH, Figura II.3.22) se pot observa două maxime la  $1162\text{ cm}^{-1}$  și  $1136\text{ cm}^{-1}$ , în timp ce în spectrul IR al peptidei modificate cu tirozină (NAPY, Figura II.3.23) a fost observat un maxim la  $1167\text{ cm}^{-1}$  și, respectiv, un umăr la  $1197\text{ cm}^{-1}$ . În cazul peptidei modificate cu cisteină (NAPC, Figura II.3.24) au fost identificate două maxime la  $1204\text{ cm}^{-1}$  și respectiv  $1140\text{ cm}^{-1}$  și un umăr la  $1184\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura II.3.19** Spectrul FTIR-ATR al peptidei NAP.

În vederea obținerii unor informații mai precise, s-au calculat derivatele de ordinul doi corespunzătoare domeniului amidă I. Astfel, după cum se observă în Figura II.3.25, această metodă a permis separarea vârfurilor suprapuse și, prin urmare, a oferit o informație mai practică și mai specifică referitoare la structura secundară a peptidelor decât simpla analiză a spectrului de absorbție în infraroșu. În acest fel, vârfurile clar delimitate au putut fi mai ușor asociate cu conformațiile de tip  $\alpha$ -elicoidală,  $\beta$ -pliată sau  $\beta$ -întoarsă ale structurilor secundare.



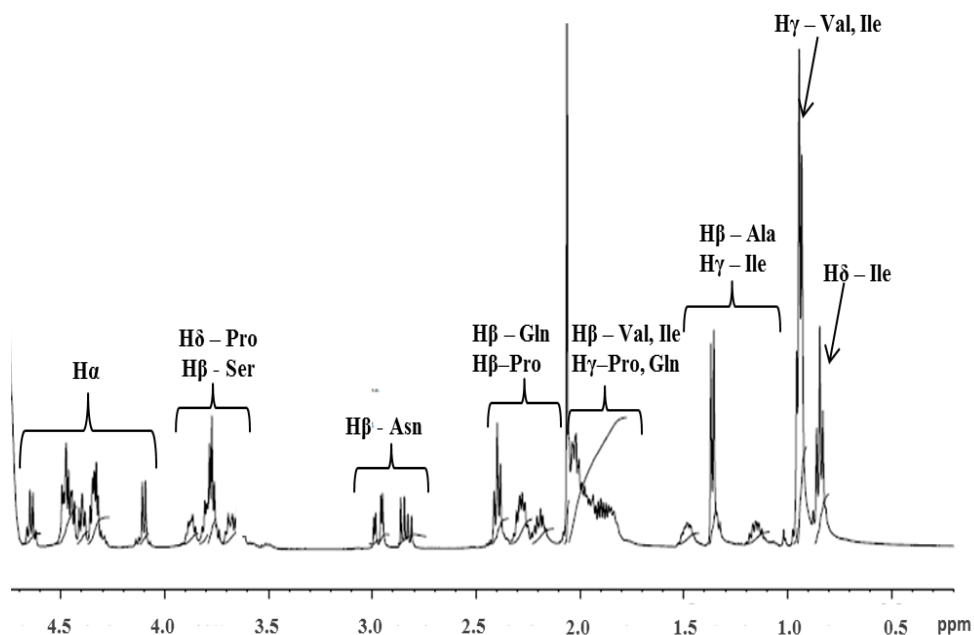
**Figura II.3.25** Derivatele de ordin doi ale spectrelor FT-IR ale peptidelor de tip NAP în domeniul 1700-1600 cm<sup>-1</sup>.

### II.3.3 Caracterizarea peptidelor prin spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară

Caracterizarea peptidelor sintetizate a fost realizată și prin spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară RMN unidimensională ( $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN, Dept-135) și bidimensională ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC).

După cum reiese din Figura II.3.28, cele mai dezecranate semnale au aparținut protonilor atașați de un carbon alfa denumit  $\text{H}\alpha$ . Astfel, semnalele regăsite la 4,64 ppm (1H), 4,47 ppm (1H), 4,46 ppm (1H), 4,43 ppm (1H), 4,39 ppm (1H), 4,33 ppm (1H), 4,32 ppm (1H) și 4,10 ppm (1H) au corespuns celor opt protoni  $\text{H}\alpha$  din structura octapeptidei. Semnalele caracteristice protonilor  $\text{H}\beta$  din structura serinei (2H) și protonilor  $\text{H}\delta$  pirolidinici (4H) specifici prolinei au fost observate în domeniul 3,6 - 3,9 ppm. Datorită aranjării spațiale a atomilor în moleculă, protonii  $\text{H}\beta$  din catena laterală a Asn au generat două semnale identificate la 2,97 ppm (1H) și 2,83 ppm (1H). Protonii atașați carbonului beta din structura nucleului pirolidinic al prolinei au fost identificați în spectrul  $^1\text{H}$ -RMN al peptidei NAP în domeniul 2,4 - 1,8 ppm (4H). În această regiune s-au aflat semnalele corespunzătoare protonilor  $\text{H}\beta$  din structura aminoacizilor Val (1H) și Ile (1H) alături de protonii  $\text{H}\gamma$  pirolidinici (4H). În cazul glutaminei, protonii  $\text{H}\beta$  au fost observați la o deplasare de 2,27 ppm (2H) în timp ce protonii  $\text{H}\gamma$  au generat semnale mai ecranate identificate la 1,85 ppm (2H). Semnalul intens observat ca dublet la 1,36 ppm a fost atribuit protonilor metilici (3H) din structura alaninei, iar semnalele regăsite la 1,47 ppm și, respectiv, 1,15 ppm au corespuns celor doi protoni  $\text{H}\gamma$  din structura izoleucinei. Cei mai ecranati protoni au fost cei ai grupărilor metilice din structura valinei ( $\text{H}\gamma$ ) și izoleucinei ( $\text{H}\gamma$ ,  $\text{H}\delta$ ) care au generat semnale în domeniul 1,5 - 0,8 ppm. Semnalul intens

observat la 2,06 ppm s-a datorat urmelor de acid acetic din probă, reactiv folosit în etapa de eluație a peptidei.



**Figura II.3.28** Detaliu al spectrul  $^1\text{H}$ -RMN al peptide NAP (NAPVSIPQ) înregistrat în domeniul alifatic (0,2 – 4,7 ppm) în  $\text{D}_2\text{O}$  cu atribuirea semnalelor.

Spectrele  $^1\text{H}$ -RMN ale peptidelor de tip NAP modificate cu alanină (NAPA), glicină (NAPG), histidină (NAPH) și (tirozină) NAPY alături de spectrul RMN al peptidei native NAP sunt prezentate în Figurile II.3.29 și II.3.30. Astfel, în spectrul peptidei NAPA, unde serina a fost înlocuită cu alanină s-a identificat un nou semnal la 1,32 ppm (3H, dublet), lângă cel de la 1,36 ppm specific atomilor de hidrogen metilenici ai alaninei din poziția 2 ( $\text{N}^2\text{APV}^5\text{AIPQ}$ ). În cazul peptidei modificate cu glicină, NAPG, cei doi atomi de hidrogen legați de atomul de carbon  $\text{C}\alpha$  au generat două semnale de tip dublet la deplasările de 3,95 ppm și, respectiv, 3,86 ppm. În spectrul peptidei NAPH, protonii atașați carbonului beta din structura

histidinei au fost identificați în spectrul  $^1\text{H}$ -RMN la 3,13 ppm (2H), iar atomii de hidrogen din nucleul imidazolic, au fost identificați în spectru (Figura II.3.29) în regiunea aromatică 8,61 ppm (1H) și 7,25 ppm (1H). Asemănător, au fost observate semnalele protonilor din nucleul fenolic al tirozinei la 7,07 ppm (2H) și respectiv, 6,78 ppm (2H) în spectrul RMN al peptidei NAPY, la deplasări chimice caracteristice mai mari. La 4,59 ppm (1H) s-a identificat semnalul dat de către protonul alfa din structura tirozinei, în timp ce semnalele protonilor H $\beta$  s-au observat în regiunea 3,03-2,77 ppm (2H), care s-au suprapus peste cele ale protonilor beta din structura asparaginei.

**Tabelul II.3.11** Principalele diferențe regăsite la nivelul spectrelor  $^1\text{H}$ -RMN ale peptidelor de tip NAP și atribuirea acestora.

Peptida	Reziduu (AA)	H $\alpha$ (ppm)	H $\beta$ (ppm)	Alte semnale (ppm)
NAP	Ser	4,47 (1H)	3,77 (1H)	-
NAPA	Ala	4,65 (1H)	1,32 (3H)	-
NAPG	Gly	3,95; 3,86 (2H)	-	-
NAPH	His	4,73* (1H)	3,13 (2H)	4H: 8,61 (1H); 2H: 7,25 (1H)
NAPY	Tyr	4,59 (1H)	2,97; 2,88 (2H)	3,5H: 7,07 (2H); 2,6H: 6,78 (2H)

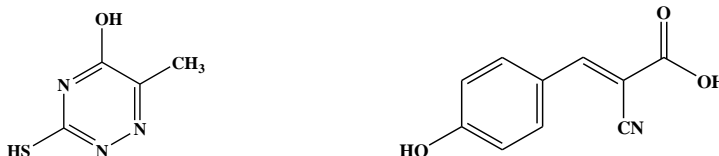
\*- valoare suprapusă peste semnalul generat de solvent  $\text{D}_2\text{O}$ , neobservată în spectrul RMN

## II.4 INVESTIGAREA INTERACȚIUNII PEPTIDELOR CU DIVERȘI IONI METALICI PRIN SPECTROMETRIE DE MASĂ MALDI TOF

Interacțiunea peptidelor față de acești ioni metalici a fost investigată la pH fiziologic normal (pH 7,4). În organismul uman și în organismele mamiferelor pH-ul variază de la un țesut la altul, de la o celulă la alta, iar pH-ul intracelular este diferit de pH-ul extracelular. De aceea, legarea metalelor poate varia mult în raport cu pH-ul unui anumit mediu biologic. În aceste experimente am ales numai pH-ul sângelui, deoarece în majoritatea cercetărilor publicate condițiile de mediu au fost similare. Complecșii obținuți au fost mai apoi analizați prin spectrometrie de masă MALDI-ToF în vederea stabilirii modului de legare și spectroscopie FT-IR pentru evidențierea modificărilor conformaționale apărute în urma complexării.

### II.4.1 Selectarea matricei specifice complecșilor

O serie de matrici dezvoltate recent și utilizate pentru investigarea probelor prin spectrometrie de masă MALDI ToF sunt prezentate în tabelul de mai jos (Tabelul II.4.1). Studii anterioare au demonstrat eficiența utilizării 6-aza-2-tiotiminei în detectarea complexelor proteice ne-covalente (Glocker *et al.*, 1996). Ulterior, au fost investigate soluții de matrice pe bază de ATT în analiza complecșilor peptido-metalici (Lehmann *et al.*, 1999).

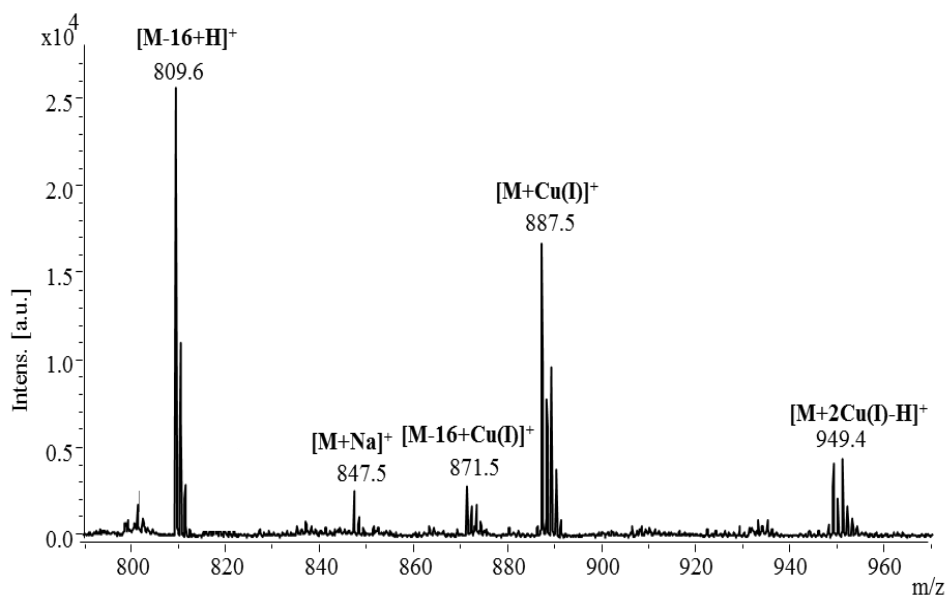


**Figura II.4.1** Structurile chimice ale matricilor: (stânga) 6-aza-2-tiotimina (ATT) și (dreapta) acidului  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinamic (HCCA).

**Tabelul II.4.1** Denumirea și conținutul soluțiilor de matrice utilizate în analiza complexelor peptido-metalici.

Denumire	Conținut
Matrice 1	Soluție saturată de HCCA în ACN: 0,1% TFA (2:1)
Matrice 2	Soluție saturată de ATT în ACN: 0,1% TFA (2:1)
Matrice 3	Soluție saturată de ATT în EtOH:H <sub>2</sub> O (1:1)
Matrice 4	10 mg/mL ATT în ACN:0,1% TFA (2:1)
Matrice 5	10 mg/mL ATT în EtOH:H <sub>2</sub> O (90:10)

În urma analizei spectrelor de masă înregistrate în prezența soluțiilor matricilor 1-5 (Tabelul II.4.1), semnale generate ca urmare a ionizării probei au putut fi observate doar în cazul probelor cocristalizate cu soluțiile de matrice 1-3. Semnale caracteristice complexului peptido-metalic NAP-Cu<sup>+</sup> ([M+Cu(I)]<sup>+</sup> și [M+2Cu(I)-H]<sup>+</sup>) au fost identificate în toate cele trei spectre de masă (Figura II.4.2-4). Cel mai intens semnal obținut în urma cocristalizării probei cu HCCA, observat la m/z 809,6, a fost atribuit ionului molecular al peptidei deamidate nereacționate cu ionii de Cu<sup>+</sup>, [M-16+H]<sup>+</sup>. În cazul probelor cocristalizate cu ATT, cel mai intens semnal înregistrat în spectru a corespuns aductului cu potasiu [M+K]<sup>+</sup>. Întrucât între ionii de potasiu și ionii de cupru poate exista o competiție pentru ocuparea *situs*-ului de legare, se recomandă utilizarea matricii HCCA în investigarea complexelor peptido-metalici în defavoarea soluției de ATT.



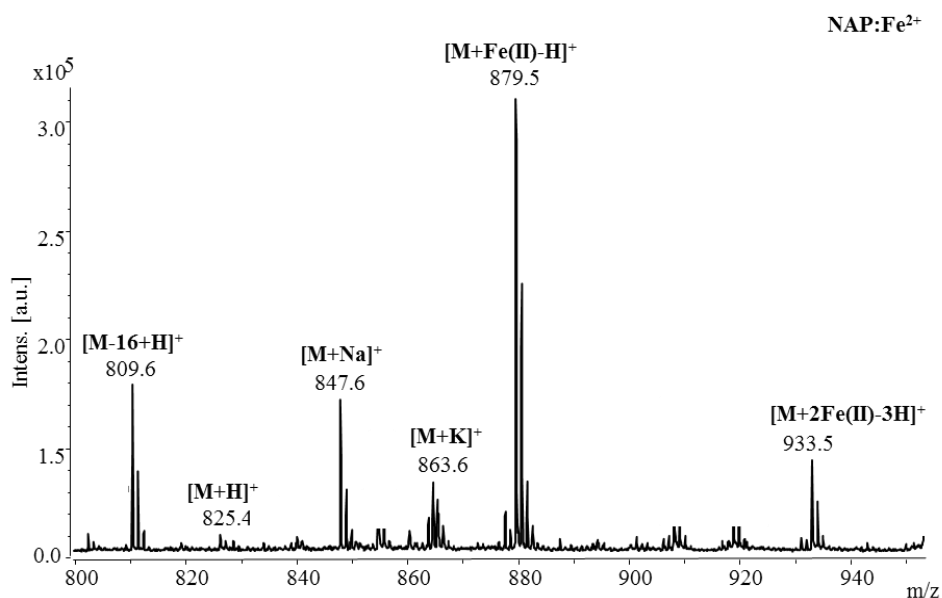
**Figura II.4.2** Spectrul de masă al peptidei NAP incubate cu ioni de cupru la un raport molar peptidă: ion metallic de 1: 10 înregistrată în prezența soluției de matrice 1.

#### II.4.5 Studiul interacțiunii peptidei NAP neuroprotectoare și a analogilor săi cu ionii de fier(II)

Formarea plăcilor senile ca urmare a agregării peptidelor amiloidice este stimulată de prezența ionilor metalici precum cupru, fier sau zinc (Viles, 2012). Peptida amiloidică A $\beta$  poate coordina ionii de fier(II), locul de legare al acestora fiind localizat în primele 16 reziduuri (resturi) de aminoacizi (Bousejra-ElGarah *et al.*, 2011). Din acest motiv, compușii capabili să capteze ionii de fier(II) aflați în exces, prevenind astfel agregarea amiloidică, prezintă un potențial enorm în tratarea bolilor neurodegenerative.

Rezultatul obținut în urma analizei amestecului peptidei cu ionii metalici prin spectrometrie de masă a reliefat interacțiuni între moleculele

de peptidă NAP și ionii de fier(II) la un raport molar de 1:10 peptidă: ion metalic, după cum se poate observa în Figura II.4.14. Spectrul obținut evidențiază legarea ionilor  $\text{Fe}^{2+}$  la peptidă cu formarea la  $m/z$  879,5 ca specie majoritară,  $[\text{M}+\text{Fe(II)}-\text{H}]^+$ . În plus, în spectrul peptidei, la  $m/z$  933,5 apar semnale caracteristice unor compuși formați dintr-o moleculă de peptidă și doi ioni  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $[\text{M}+2\text{Fe(II)}-3\text{H}]^+$ .



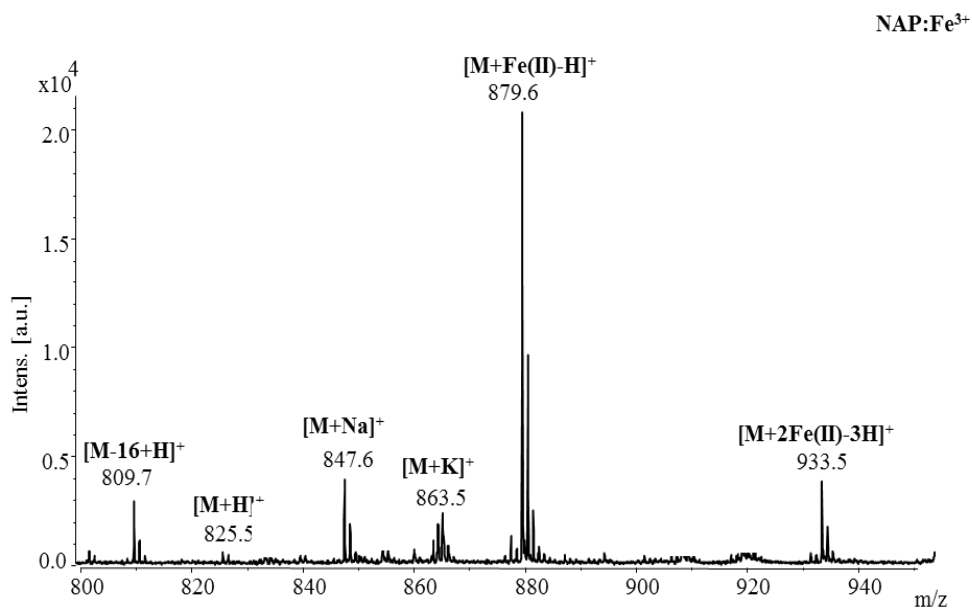
**Figura II.4.14** Spectrul de masă al peptidei NAP obținut în prezența ionilor de fier(II) la un raport molar peptidă: ion metalic de 1: 10.

#### II.4.6 Studiul interacțiunii peptidei NAP neuroprotectoare și a analogilor săi cu ionii de fier(III)

Eliberarea fierului din feritină în condiții patologice poate favoriza interacțiunea acestuia cu peptida amiloidică și stimula producerea radicalilor liberi, cum ar fi formarea ionului superoxid. În starea metabolică normală, superoxidul favorizează oxidarea  $\text{Fe}^{2+}$  la  $\text{Fe}^{3+}$ . Cu toate acestea, dacă concentrația intracelulară a superoxidului este crescută,

reacția favorizează reducerea ionilor  $\text{Fe}^{3+}$  la forma sa dăunătoare ( $\text{Fe}^{2+}$ ) capabilă să genereze reacții de tip Fenton prin elaborarea radicalilor hidroxilici (Yang *et al.*, 1999).

În Figura II.4.17 este prezentat spectrul de masă al peptidei native NAP realizat în urma incubării cu ioni de fier(III) la un raport molar peptidă: ion metalic de 1: 10. Astfel, din spectrul de masă s-a observat reducerea ionului  $\text{Fe}^{3+}$  la  $\text{Fe}^{2+}$  și legarea acestuia din urmă de moleculele de peptidă. Semnalul mai intens observat la  $m/z$  879,6 a corespuns ionului  $[\text{M}+\text{Fe}(\text{II})-\text{H}]^+$ . Legarea celui de-al doilea ion  $\text{Fe}^{2+}$  a fost mai puțin semnificativă, după cum se observă din semnalul de la  $m/z$  933,5. De asemenea, în spectrul de masă s-au distins și semnalele de la  $m/z$  809,7 și  $m/z$  825,5 corespunzătoare ionilor moleculari ai peptidei necomplexate:  $[\text{M}-16+\text{H}]^+$  și  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Semnale caracteristice aducțiilor cu sodiu și potasiu s-au putut observa la  $m/z$  847,6 și, respectiv,  $m/z$  863,5.



**Figura II.4.17** Spectrul de masă al peptidei NAP obținut în prezența ionilor de fier(III) la un raport molar peptidă: ion metalic de 1: 10.

## **II.5 CONFIRMAREA PRIN SPECTROMETRIE DE MASĂ CU ELECTROPULVERIZARE, ESI MS A LEGĂRII IONILOR METALICI**

În vederea confirmării existenței unei legături între peptidele de tip NAP investigate și diverși ioni metalici, s-a făcut apel la spectrometria de masă de tip ESI care folosește metode mai blânde de ionizare precum cea de electropulverizare. Cu această ocazie, rezultatele obținute prin spectrometrie de masă de tip MALDI ToF au fost comparate cu cele înregistrate de spectrometrul de masă cu rezonanță ciclotronică și transformată Fourier (ICR-FT). Procesul de ionizare a fost realizat cu ajutorul unei surse nanoESI. Spectrele de fragmentare *top-down* au fost obținute folosind metoda de disociere indusă prin coliziune (CID).

### **II.5.1 Studiul interacțiunii peptidelor neuroprotectoare cu ionii de aluminiu**

Aluminiul este cunoscut de mult timp ca agent neurotoxic, fiind invocat și ca factor agravant în boala Alzheimer (BA) (Zatta *et al.*, 2003). Concentrații mari de aluminiu au fost găsite atât la nivel intracelular unde sunt asociate cu moartea neuronală, cât și extracelular sub forma unor depuneri mari, difuze, aflate în țesutul cerebral al unor donatori cu BA (Mirza *et al.*, 2017).

Legarea ionilor  $Al^{3+}$  de peptidele NAP a fost investigată atât prin spectrometrie de masă MALDI ToF, cât și prin FT-ICR MS. În plus, pentru a înțelege regiunile din secvențele peptidice implicate în interacțiuni peptido-metalice, a fost realizată disocierea indusă prin coliziune (CID). Spectrele de masă ale peptidelor au indicat tendința acestora de a capta ionii de aluminiu și de a genera semnale specifice ionilor moleculari  $[M+Al-2H]^+$ . Semnale specifice unui compus format

dintr-o moleculă de peptidă și doi ioni de aluminiu au fost observate doar în spectrul de masă MALDI ToF al peptidei native, NAP.

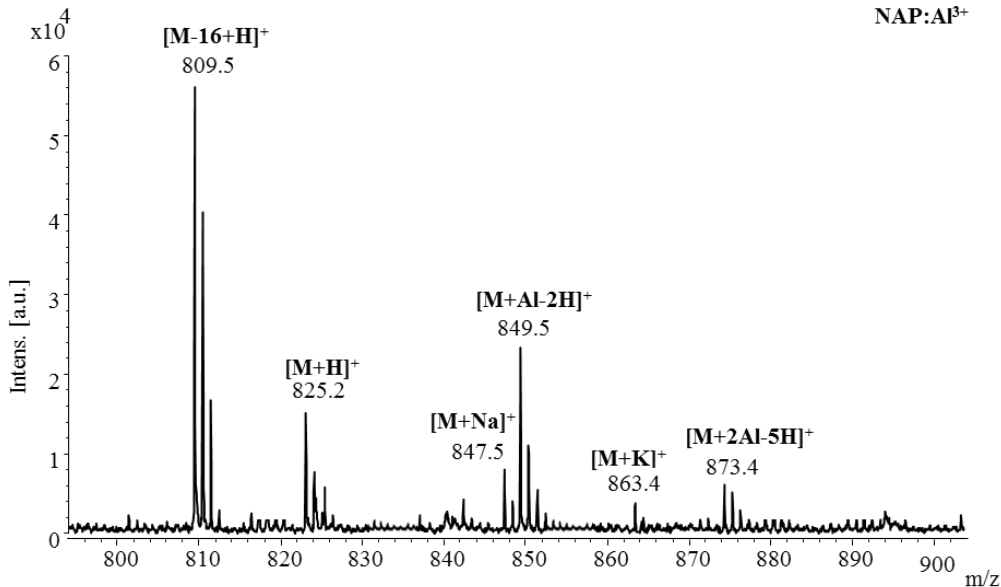
**Tabelul II.5.1** Structura generală și masa moleculară monoizotopică a peptidei native NAP în prezența ionilor de aluminiu ( $Al^{3+}$ ), calculate cu ajutorul programului online CHEMCALC și determinate experimental cu ajutorul spectrometrelor de masă MALDI ToF și ESI FT-ICR.

Secvența peptidică	Ion molecular	Teoretic (m/z)	Experimental (m/z)	
			MALDI ToF	ESI FT-ICR
NAP ( $H_2N$ - NAPVSIPQ- COOH) $C_{36}H_{60}N_{10}O_{12}$	$[M-16+H]^+$	809,4	809,5	809,5
	$[M+H]^+$	825,4	825,2	825,4
	$[M+Na]^+$	847,4	847,5	847,4
	$[M+K]^+$	863,4	863,4	863,4
	$[M+Al-2H]^+$	849,4	849,5	849,4
	$[M+2Al-5H]^+$	873,4*	873,4	-
	$[M+H+2NH_3]^+$	859,5#	-	859,4
	$[M+H+3NH_3]^+$	876,5#	-	876,4
	$[M+Al(OH)-H]^+$	867,4#	-	867,5
	$[M+Al(OH)_2]^+$	885,4#	-	885,4

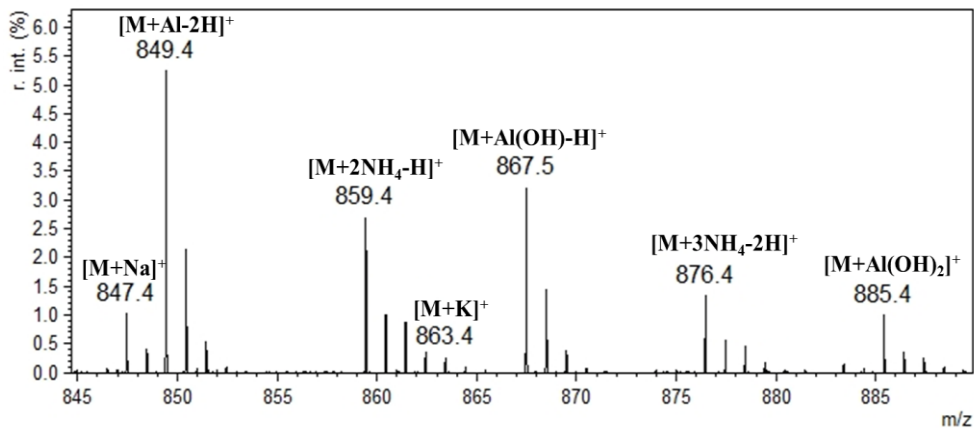
\* - valoare neobservată în spectrul de masă ESI FTICR

# - valoare neobservată în spectrul de masă MALDI ToF

Valorile teoretice ale maselor moleculare ce corespund ionilor observați în spectrele de masă sunt prezentate în tabelul de mai jos (Tabelul II.5.1). Atribuirea semnalelor din spectrele de masă s-a realizat prin compararea valorilor teoretice ale posibililor ioni formați cu valorile obținute experimental. Astfel, Figura II.5.5 prezintă spectrele distribuției isotopice a ionului  $[M+Al-2H]^+$ , obținute experimental sau simulate. Aceste date confirmă existența formării unei interacțiuni între moleculele de peptidă și ionii  $Al^{3+}$ .



**Figura II.5.1** Spectrul de masă MALDI ToF al peptidei NAP ( $H_2N - NAPVSIPQ - COOH$ ) în prezența ionilor de aluminiu înregistrat în domeniul  $m/z$  800-900.



**Figura II.5.3** Spectrul de masă ESI FT-ICR MS al peptidei native NAP obținut în prezența ionilor de aluminiu înregistrat în domeniul  $m/z$  845-900.

Tabelul II.5.2 prezintă valoarea  $m/z$  teoretică calculată cu ajutorul programului GPMAV și cea obținută experimental corespunzătoare

fragmentelor rezultate prin scindarea ionului  $[M+Al-2H]^+$ . Astfel, se poate remarca faptul că valorile  $m/z$  experimentale ale fragmentelor etichetate au fost asemănătoare datelor teoretice. Mai mult, similitudinile observate în spectrele de masă în tandem (MS/MS) obținute atât prin spectrometrie de masă MALDI ToF, cât și ESI evidențiază formarea complexului NAP- $Al^{3+}$  și sugerează fără echivoc o interacțiune a peptidei cu ionii  $Al^{3+}$ .

**Tabelul II.5.2** Valoarea  $m/z$  calculată și cea observată în spectrele de masă în tandem (MS/MS) ale fragmentelor obținute prin disociere indusă prin coliziune (CID) a ionilor  $[M+Al-2H]^+$  identificați în spectrele de masă MALDI ToF și ESI FT-ICR ale peptidelor NAP.

Ion precursor	Fragment	Teoretic (m/z)	Experimental (m/z)	
			MALDI ToF	ESI FT-ICR
$[M+Al-2H]^+$ (m/z 849,4)	y2	244,1*	244,4	-
	a5+Al (a5+Al-3H)	465,2	465,7	465,2
	c5	488,3*	488,4	-
	z5+Al (z5+Al-3H)	548,3*	548,8	-
	a6+Al (a6+Al-3H)	578,3	578,8	578,3
	b6+Al (b6+Al-3H)	606,3	606,9	606,3
	y6+Al (y6+Al-3H)	664,4	664,9	664,3
	c7+Al (c7+Al-3H)	722,4*	721,9	-

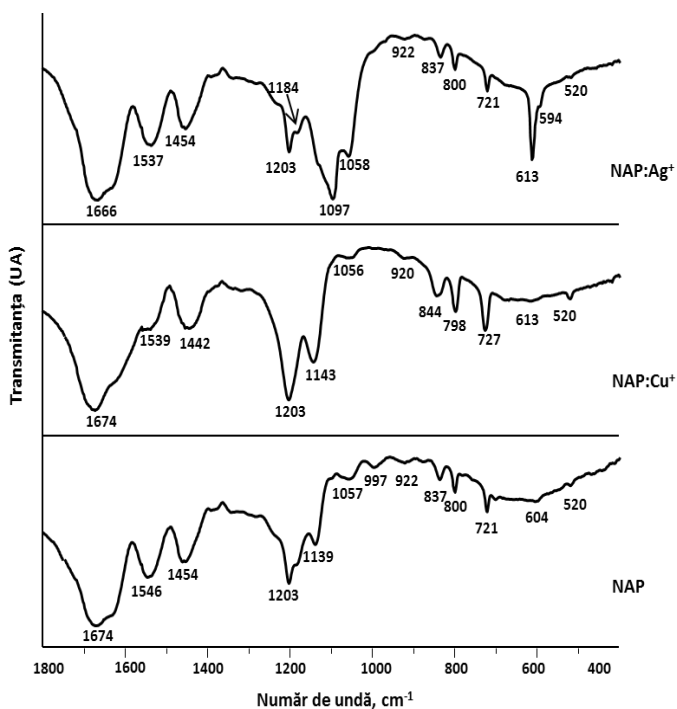
\* - valoare neobservată în spectrul de masă ESI FTICR

Rezultatele spectrelor de masă prezentate în Figura II.5.7 și Figura II.5.8 sugerează că ionii de aluminiu se leagă de preferință la secvența de aminoacizi care se găsește la intersecția fragmentului NAPVS cu fragmentul PVSIPQ din peptida nativă NAP. Prin urmare, cele mai probabile situsuri de legare sunt fragmentele PVSİ și PVS aflate în mijlocul moleculei NAP.

## II.6 SPECTROSCOPIA ÎN INFRAROȘU A PEPTIDELOR ȘI COMPLECȘILOR CU METALELE

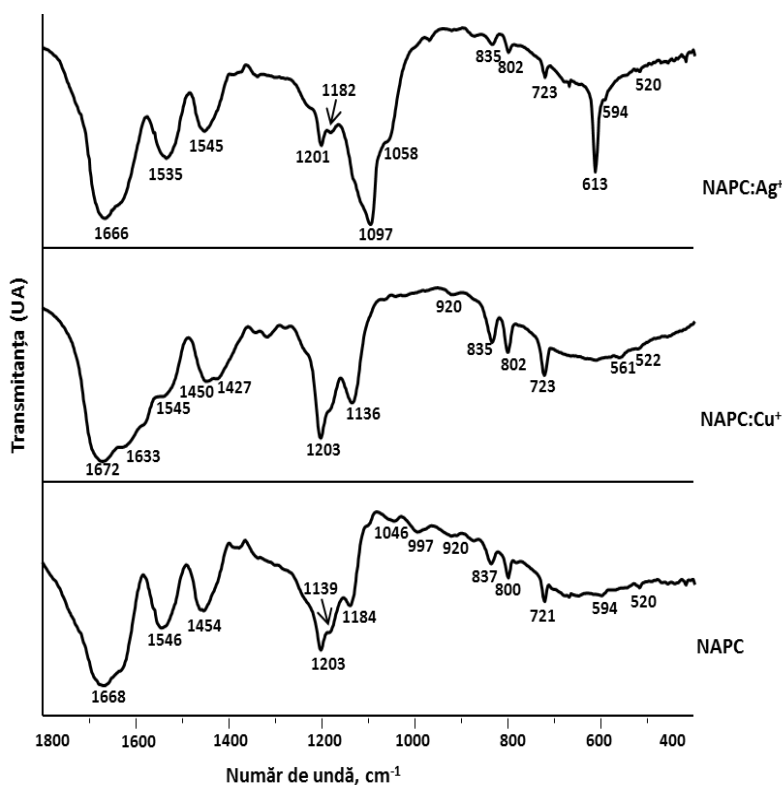
### II.6.1 Investigarea complexelor peptidelor NAP și NACP cu ioni cupru(I) și argint

Cea mai intensă bandă identificată în domeniul amidă I, 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$ , a fost asociată cu vibrația de întindere C=O. Maximele benzii amidă I au fost observate la 1674  $\text{cm}^{-1}$  în spectrul de infraroșu al peptidei NAP în absența ionilor metalici, la 1674  $\text{cm}^{-1}$  și 1666  $\text{cm}^{-1}$ , în spectrele FT-IR ale peptidei NAP în prezența ionilor de cupru și, respectiv, argint și au indicat o posibilă conformație de tip  $\beta$ -întors.



**Figura II.6.1** Spectrele FT-IR ale peptide native NAP în prezența și absența ionilor de argint și cupru la un raport molar peptidă: ion metallic de 1:1 și, respectiv, 1:10. Măsurătorile de transmittanță au fost realizate convențional cu CsI (Lupaescu et al., 2019c).

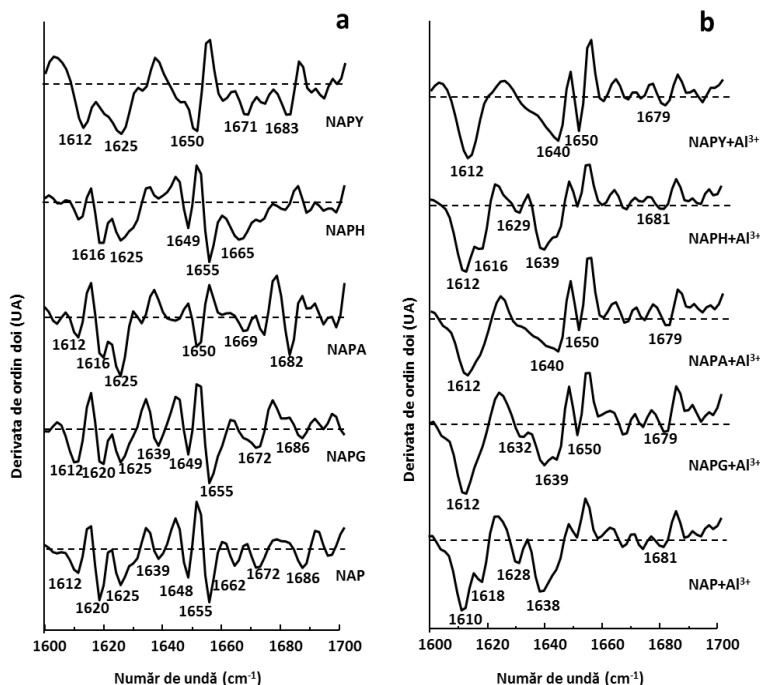
În cazul peptidei modificate cu cisteină, maximul benzii, caracteristice vibrației de întindere C=O, identificat la  $1668\text{ cm}^{-1}$  în spectrul de infraroșu al peptidei NAPC în absența ionilor metalici, s-a deplasat la  $1672\text{ cm}^{-1}$  și, respectiv,  $1666\text{ cm}^{-1}$ , în spectrele FT-IR ale peptidei NAPC în prezența ionilor de cupru și, respectiv argint, sugerând prezența unei conformații de tip  $\beta$ -întors. În plus, lanțurile laterale de asparagină și glutamină absorb relativ puternic în apropierea benzii amidei I datorită vibrațiilor de întindere a grupării C=O identificate la  $1670\text{ cm}^{-1}$  și vibrației de deformare în plan a grupării  $\text{NH}_2$  specifice regiunii  $1610\text{ cm}^{-1}$  (Barth, 2000).



**Figura II.6.2** Spectrele FT-IR ale peptidei modificate cu cisteină, NAPC, în prezența și absența ionilor de argint și cupru la un raport molar peptidă: ion metalic de 1: 1 și, respectiv, 1: 10. Măsurătorile de transmitanță au fost realizate convențional cu CsI (Lupaescu et al., 2019c).

## II.6.2 Spectroscopia ATR-FT-IR a complexelor peptidelor de tip NAP cu ionii de aluminiu

După cum se observă din Figura II.6.6(a), spectrele derivatelor de ordinul doi au confirmat prezența conformației de tip  $\alpha$ -helix în structura peptidelor necomplexate. Astfel, un semnal intens observat la  $1655\text{ cm}^{-1}$  atribuit structurilor de tip  $\alpha$ -helix a fost identificat în spectrele peptidelor NAP, NAPG și NAPH. Figura II.6.6(b) conține spectrele derivatelor de ordin doi ale complexelor peptido-metalici. Cele mai intense semnale au fost observate în toate spectrele în jurul valorilor  $1610\text{ cm}^{-1}$  și  $1639\text{ cm}^{-1}$ . Pe lângă semnalele caracteristice agregatelor proteice și structurilor neordonate, un semnal de intensitate redus care poate fi atribuit structurilor  $\alpha$ -elicoidale a fost observat la complexii peptidelor NAPA, NAPG și NAPH la  $1650\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura II.6.6** Derivatele de ordin doi ale spectrelor FT-IR din domeniul  $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  ale peptidelor de tip NAP în absența (a) și în prezența  $\text{AlCl}_3$  (b).

## CONCLUZII GENERALE

În cadrul tezei de doctorat ”Analogi ai peptidei neuroprotectoare NAP: sinteză, caracterizare și interacțiune cu ionii metalici” au fost sintetizate și caracterizate patru noi peptide derivate de la octapeptida nativă NAP, precum și un conjugat al acesteia cu acidul acetilsalicilic. Datorită potențialului neuroprotector al peptidelor sintetizate, a fost investigată, prin metode fizico-chimice moderne, interacțiunea lor cu diverși ioni metalici cu rol posibil în bolile neurodegenerative.

Rezultatele obținute în cadrul acestei teze de doctorat au evidențiat posibilitatea obținerii de noi analogi ai peptidei NAP, cunoscută a avea un rol neuroprotector bine definit, iar studiul acestora a condus la dovezi experimentale referitoare la relația peptidelor cu ionii metalici și s-a concentrat pe următoarele direcții:

### ❖ *Sinteza peptidelor de tip NAP prin metoda de sinteză în fază solidă, strategia Fmoc/t-Bu*

- Patru sinteze au vizat înlocuirea celui de-al cincilea aminoacid din secvența octapeptidei, serina, cu alanină (NAPA), glicină (NAPG), histidină (NAPH) și tirozină (NAPY). Cea de-a cincea peptidă modificată, denumită Aas-NAP, a fost realizată în urma cuplării capătului N-terminal al peptidei NAP cu acidul acetilsalicilic, medicament cunoscut pentru proprietățile sale antiinflamatoare.
- Sintezele au fost realizate pe o rășină de tip Wang ce permite sinteza de peptide cu capătul C-terminal liber de tip carboxilic.

**NAP:**  $H_2N$ -NAPVSIPQ-COOH (nativă)

**NAPG:**  $H_2N$ -NAPVGIPQ-COOH (necunoscută în literatură)

**NAPA:**  $H_2N$ -NAPVAIPQ-COOH (necunoscută în literatură)

**NAPH:**  $H_2N$ -NAPVHIPQ-COOH (necunoscută în literatură)

**NAPY:**  $H_2N$ -NAPVYIPQ-COOH (necunoscută în literatură)

**NAPC:**  $H_2N$ -NAPVCIPQ-COOH (necunoscută în literatură)\*

**Aas-NAP:** **Aas-HN** -NAPVSIPQ-COOH (necunoscută în literatură)

\*-peptidă sintetizată anterior în grupul de Biochimie (unde C = cisteină)

❖ ***Purificarea peptidelor de tip NAP prin tehnica cromatografică de lichid de înaltă performanță***

- Purificarea peptidelor s-a realizat prin cromatografie de lichide de înaltă performanță în fază inversă (RP-HPLC) pe o coloană C<sub>18</sub> în sistem omogen ACN - 0,1% TFA în H<sub>2</sub>O;
- Modificarea restului de serină din structura peptidei NAP native cu glicină, alanină, histidină și tirozină a condus la schimbări importante în ceea ce privește hidrofobicitatea peptidelor;
- Cromatogramele peptidelor NAP, NAPG, NAPA, NAPH și NAPY au prezentat un semnal intens caracteristic peptidelor cu timpi de retenție specifici, demonstrând o puritate ridicată a acestor peptide;
- Cromatograma peptidei Aas-NAP a fost mai complexă evidențiind un amestec de produși rezultați în urma sintezei. Astfel că pe lângă semnalul scăzut al peptidei Aas-NAP conjugate s-au observat semnale care au fost atribuite: (i) peptidei conjugate Aas-NAP+tBu ce prezintă radicalului terț-butil, grupare protectoare a hidroxilului serinic, atașată de secvență; (ii) peptidei As-NAP formată în urma deprotejării grupării acetyl din structura moleculei conjugate; (iii) peptidei NAP libere.

❖ *Caracterizarea peptidelor nou sintetizate utilizând tehnici de spectrometrie de masă, spectroscopie în infraroșu, spectroscopie UV-vis și spectrometrie de rezonanță magnetică nucleară*

- Spectrele de masă au fost înregistrate utilizând un spectrometru de masă de tip MALDI ToF și au prezentat pe lângă semnalele caracteristice ionilor moleculari și un semnal la o diferență de 16 unități  $m/z$  care a fost atribuit ionului molecular al peptidei deaminate.
- A fost discutat un mecanism de deaminare a glutaminei care constă în formarea acidului piroglutamic la capătul C-terminal al peptidei sub acțiunea radiației laser, fenomen cunoscut în literatură numai pentru glutaminele situate la capătul N-terminal.
- În cazul conjugatului cu acid acetilsalicilic, Aas-NAP, cel mai intens semnal din spectru MS a fost atribuit peptidei Aas-NAP+tBu în timp ce semnalele specifice conjugatului au prezentat o intensitate mai redusă.
- Spectrele în infraroșu au prezentat semnale bine delimitate caracteristice benzilor amidă I (între 1700 și 1600  $\text{cm}^{-1}$ ) și amidă II (între 1580 și 1510  $\text{cm}^{-1}$ ), fapt ce a direcționat cercetările spre investigarea conformațiilor adoptate de moleculele peptidice.
- Din analiza maximelor de absorbție din banda amidă I, s-a observat că peptidele au prezentat maxime la valori corespunzătoare structurilor  $\alpha$ -elicoidale și  $\beta$ -pliate, cu excepția peptidei NAPA, care prezintă doar o structură de tip  $\beta$ -pliat și a celei modificate cu cisteină (NAPC), caracterizată de o conformație de tip  $\beta$ -întors.
- Investigarea regiunii benzii amidei II (1580-1510  $\text{cm}^{-1}$ ) a sugerat o structură de tip  $\alpha$ -helix în cazul peptidelor NAP, NAPG, NAPH și

NAPC, în timp ce peptidele NAPA și NAPH au prezentat semnale caracteristice unei conformații de tip  $\beta$ -pliat.

- Derivata de ordinul 2 a domeniului amidic de tip I a confirmat structurile peptidelor de tip NAP sintetizate.
- Au fost înregistrate spectrele RMN unidimensionale ( $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN) și bidimensionale de tipurile ( $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ )-COSY, ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ )-HMQC și DEPT-135 care au ajutat la atribuirea semnalelor observate și confirmarea structurilor peptidelor nou sintetizate.
- Spectrele de absorbție ale peptidelor au prezentat maxime de absorbție în domeniul ultraviolet, domeniu caracteristic legăturii peptidice. Peptidele ce au prezentat în secvență aminoacizi aromatici au generat un maxim specific de absorbție la 275 nm, vizibil în spectrul de absorbție al peptidei modificate cu tirozină, NAPY.

❖ *Investigarea prin spectrometrie de masă de tip MALDI ToF a interacțiunii peptidei NAP și a analogilor săi cu ionii metalici*

- Reacțiile de complexare au fost realizate la o valoare a pH-ului apropiat celui fiziologic, pH 6,6-7,0;
- Au fost studiate mai multe matrici, iar cea mai eficientă în ionizarea probelor s-a dovedit a fi soluția saturată de HCCA dizolvată în ACN:0,1% TFA la un raport 1:1;
- Spectrele de masă ale peptidelor de tip NAP înregistrate în prezența ionilor de argint au prezentat semnale intense, care au fost atribuite complexelor peptido-metalici, ceea ce sugerează o afinitate ridicată față de acești ioni metalici. Interacțiunea cea mai intensă a fost observată în spectrul peptidei modificate cu cisteină;

- În prezența ionilor  $\text{Cu}^+$  și  $\text{Cu}^{2+}$ , spectrele de masă ale peptidelor au conținut doar semnalele caracteristice complexului  $\text{NAP-Cu}^+$ . Cele mai intense semnale, atribuite ionilor moleculari ai complexului peptido-metalic, au fost observate în spectrele de masă înregistrate în prezența ionilor  $\text{Cu}^{2+}$ , în special în spectrele de masă ale peptidelor modificate cu cisteină și histidină;
- În spectrele de masă înregistrate în prezența oxidului cupros ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ), folosit ca sursă de ioni  $\text{Cu}^+$ , semnalele caracteristice complexilor au avut o intensitate mai redusă, probabil datorită insolubilității acestui oxid. În schimb, prezența ionilor de cupru a favorizat dimerizarea peptidei modificate cu cisteină (NAPC);
- Spectrele înregistrate în urma interacțiunii peptidelor de tip NAP cu ionii  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  au prezentat numai semnalele caracteristice complexilor peptido-metalici cu ionii  $\text{Fe}^{2+}$ , nu și cu  $\text{Fe}^{3+}$ .
- Reducerea ionilor  $\text{Cu}^{2+}$  și  $\text{Fe}^{3+}$  la  $\text{Cu}^+$  și, respectiv,  $\text{Fe}^{2+}$ , observată în spectrele de masă de tip MALDI ToF, fiind cauzată cel mai probabil de acțiunea laserului folosit.

❖ ***Confirmarea interacțiunii peptidei native NAP cu ionii metalici prin spectrometrie de masă de tip ESI FT-ICR și MALDI ToF și identificarea situs-urilor de legare***

- Spectrele de masă înregistrate în urma interacțiunii peptidelor cu ionii de aluminiu au generat semnale caracteristice complexilor  $\text{NAP-Al}^{3+}$ ;
- Intensitatea semnalelor corespunzătoare complexilor peptido-metalici a fost mult mai redusă în spectrele de masă de tip ESI comparativ cu MALDI ToF. Acest lucru se poate datora concentrației scăzute a ligandului (peptidei) și a ionului metalic,

înaintea introducerii lor în sistem, fapt care a condus la disocierea complexilor și precipitarea ionului de aluminiu;

- Spectrele de masă ale peptidelor în prezența ionilor de zinc au prezentat semnale caracteristice. Intensitatea semnalelor observate în spectrele de masă de tip MALDI ToF a fost mai redusă comparativ cu cele ale complexilor cu ioni de aluminiu.
- Determinările spectrometrice de masă de tip ESI au indicat formarea complexilor cu ionii  $\text{Cu}^{2+}$ . Interesant este faptul că în prezența ionilor  $\text{Fe}^{2+}$ , aceștia s-au oxidat și s-au legat la peptide numai sub formă de  $\text{Fe}^{3+}$ , dar intensitatea semnalelor a fost redusă.
- Rezultatele MS/MS au sugerat că ionii metalici ( $\text{Al}^{3+}$  și  $\text{Zn}^{2+}$ ) se leagă de preferință la secvența de aminoacizi care se găsește la intersecția fragmentului NAPVSI cu fragmentul PVSIPQ din peptida nativă NAP. Prin urmare, cele mai probabile situsuri de legare sunt secvențele aminoacide PVSI și PVS din mijlocul moleculei de octapeptidă NAP și secvențele echivalente din moleculele peptidelor analoge.

❖ *Evidențierea prin spectroscopie în infraroșu a modificărilor conformaționale suferite de peptide în urma interacțiunii lor cu ionii metalici*

- Spectrele obținute în prezența ionilor de cupru(I) și argint(I) au sugerat prezența conformerilor de tip  $\beta$ -întors și  $\alpha$ -elicoidali în structura peptidelor NAP și NAPC;
- În cazul complexilor cu aluminiu, semnalele intense caracteristice agregatelor peptidice și structurilor neordonate, observate în spectrele IR ale complexilor peptido-metalici, au sugerat o proporție redusă de conformeri de tip  $\alpha$ -helix și  $\beta$ -întors;

- Structuri de tip  $\beta$ -întors au fost identificate în prezența ionilor  $\text{Cu}^{2+}$  în spectrele peptidei native NAP și a peptidelor modificate cu glicină, alanină și histidină, în timp ce peptida NAPPY a adoptat mai degrabă o conformație de tip  $\alpha$ -elicoidal.
- În cazul complexilor cu  $\text{Fe}^{2+}$ , semnalele observate în spectrul IR evidențiază existența unei structuri predominante de tip  $\alpha$ -helix, iar în proporție mică a conformerilor de tip  $\beta$ -întors în cazul peptidei NAPG și a structurilor secundare de tip agregat în cazul peptidei NAPA.

***❖ Activitățile de diseminare a rezultatelor și dezvoltarea profesională***

- Au fost publicate cinci articole științifice în jurnale cotate Web of Science cu factor de impact total de 6,196 din care 4,523 sunt alocate doctorandului și patru articole în volumele unor conferințe internaționale cotate ISI.
- Au fost prezentate lucrări științifice la cinci conferințe științifice naționale și opt conferințe internaționale;
- Au fost urmate cursurile a șase școli de vară internaționale și trei seminarii științifice.
- Cercetările au fost realizate concomitent și în cadrul proiectului de cercetare ” MeticonpH” PN-III-P4-ID-PCE-2016-0376 Contract de finanțare nr. 56/12.07.2017, în calitate de membru doctorand în proiect.

## BIBLIOGRAFIE (SELECTIVĂ)

- Adochitei, A., Drochioiu, G. Rapid characterization of peptide secondary structure by FT-IR spectroscopy, *Revue Roumaine de Chimie*, 56, 783–791, **2011**.
- Akiyama, H. Inflammation and Alzheimer's disease, *Neurobiology of Aging*, 21, 383–421, **2000**.
- Ashur-Fabian, O., Segal-Ruder, Y., Skutelsky, E., Brenneman, D.E., Steingart, R.A., Giladi, E., Gozes, I. The neuroprotective peptide NAP inhibits the aggregation of the beta-amyloid peptide, *Peptides*, 24, 1413–1423, **2003**.
- Baig, M.H., Ahmad, K., Rabbani, G., Choi, I. Use of Peptides for the Management of Alzheimer's Disease: Diagnosis and Inhibition, *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10, 1-6, **2018**.
- Blaikie, L., Kay, G., Kong Thoo Lin, P. Current and emerging therapeutic targets of alzheimer's disease for the design of multi-target directed ligands, *Medicinal Chemistry Communications*, online, **2019**.
- Busciglio, J., Pelsman, A., Helguera, P., Ashur-Fabian, O., Pinhasov, A., Brenneman, D.E., Gozes, I. NAP and ADNF-9 Protect Normal and Downs Syndrome Cortical Neurons from Oxidative Damage and Apoptosis, *Current Pharmaceutical Design*, 13, 1091–1098, **2007**.
- Bush, A.I. Tanzi, R.E. Therapeutics for Alzheimer's disease based on the metal hypothesis, *Neurotherapeutics*, 5, 421–432, **2008**.
- Ciobanu, C.I., **Lupaescu, A.V.**, Drochioiu., G. Study of zinc binding to neuroprotective peptides, *19th International Multidisciplinary GeoConference SGEM 2019, Conference proceedings, Advances in Biotechnology*, 19, 905-912, **2019**.
- Ciobanu, C.I., Stefanescu, R., Niculaua, M., Teslaru, T., Gradinaru, R., Drochioiu, G. Letter: Mass Spectrometric Evidence for Iron Binding to the Neuroprotective Peptide NAP and its Cys 5 Mutant, *European Journal of Mass Spectrometry*, 22, 97–104, 2016.
- Crichton, R.R., Dexter, D.T., Ward, R.J. Metal based neurodegenerative diseases-From molecular mechanisms to therapeutic strategies, *Coordination Chemistry Reviews*, 252, 1189–1199, **2008**.
- Deshayes, S., Morris, M.C., Divita, G., Heitz, F. Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 1839–1849, **2005**.

- Drochioiu, G., Murariu, M., Ion, L., Habasescu, L. Iron and aluminum interaction with amyloid-beta peptides associated with Alzheimer's disease, *International Conference of Computational Methods in Sciences and Engineering*, 99–100, **2014**.
- Drochioiu, G., Murariu, M., Jureschi, M., **Lupaescu, A.V.**, Closca, M.C. Heavy metal binding to peptides at higher pH: Novel ESI-MS approach, *18th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2018 - Conference proceedings, Advances in Biotechnology*, 18, 361–368, **2018**.
- Drochioiu, G., Tudorachi, L., Murariu, M. NOSH aspirin may have a protective role in Alzheimer's disease, *Medical Hypotheses*, 84, 262–267, **2015**.
- Dumont, M., Beal, M.F. Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease, *Free Radical Biology and Medicine*, 51, 1014–1026, 2011.
- Giampietro, R., Spinelli, F., Contino, M., Colabufo, NA. The Pivotal Role of Copper in Neurodegeneration: A New Strategy for the Therapy of Neurodegenerative Disorders, *Molecular Pharmaceutics*, 15, 808–820, **2018**.
- Gozes, I., Giladi, E., Pinhasov, A., Bardea, A., Brenneman, D.E. Activity-dependent neurotrophic factor: intranasal administration of femtomolar-acting peptides improve performance in a water maze, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 293, 1091–8, **2000**.
- Gozes, I., Morimoto, B.H., Tiong, J., Fox, A., Sutherland, K., Dangoor, D., Holser-Cochav, M., Vered, K., Newton, P., Aisen, P.S., Matsuoka, Y., van Dyck, C.H., Thal, L. NAP: Research and Development of a Peptide Derived from Activity-Dependent Neuroprotective Protein (ADNP), *CNS Drug Reviews*, 11, 353–368, **2006**.
- Gozes, I. Activity-dependent neuroprotective protein: From gene to drug candidate, *Pharmacology and Therapeutics*, 114, 146–154, **2007**.
- Gozes, I., Stewart, A., Morimoto, B., Fox, A., Sutherland, K., Schmeche, D. Addressing Alzheimer's disease tangles: from NAP to AL-108, *Current Alzheimer research*, 6, 455–460, **2009**.
- Gozes, I. NAP (davunetide) provides functional and structural neuroprotection, *Current Pharmaceutical Design*, 17, pp. 1040–1044, **2011**.
- Gozes, I., Schirer, Y., Idan-Feldman, A., David, M., Furman-Assaf, S. NAP alpha-aminoisobutyric acid (IsoNAP), *Journal of Molecular Neuroscience*, 52, 1–9, **2014a**.

- Gozes, I., Iram, T., Maryanovsky, E., Arviv, C., Rozenberg, L., Schirer, Y., Giladi, E., Furman-Assaf, S. Novel tubulin and tau neuroprotective fragments sharing structural similarities with the drug candidate NAP (Davunetide), *Journal of Alzheimer's disease*, 40, 23-36, **2014**.
- Gozes, I., Divinski, I., Piltzer, I. NAP and D-SAL: neuroprotection against the  $\beta$  amyloid peptide (1–42), *BMC Neuroscience*, 9, S3, **2008**.
- Ion, L., Drochioiu, G., **Lupaescu, A.-V.**, Jureschi, M., Petre, B.A. Amyloid- $\beta$  and anti-amyloid peptides involved in Alzheimer's disease: Interactions with metal ions. *19th International Multidisciplinary GeoConference SGEM 2019, Conference proceedings, Advances in Biotechnology*, 19, 515-522, **2019**.
- Jouroukhin, Y., Ostritsky, R., Assaf, Y., Pelled, G., Giladi, E., Gozes I. NAP (davunetide) modifies disease progression in a mouse model of severe neurodegeneration: Protection against impairments in axonal transport, *Neurobiology of Disease*, 56, 79–94, **2013**.
- Jureschi, M., Drochioiu, G., **Lupaescu, A.V.**, Petre, B.A., Ciobanu, C.I. Binding of heavy metal ions to amyloid- $\beta$  peptides: interactions with NAP peptides, *19th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2019, Conference proceedings, Advances in Biotechnology*, 583–590, **2019a**.
- Jureschi, M., **Lupaescu, A.V.**, Ion, L., Petre, B.A., Drochioiu G. Stoichiometry of Heavy Metal Binding to Peptides Involved in Alzheimer's Disease: Mass Spectrometric Evidence, *Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research*, 1140, 401–415, **2019**.
- Kenche, V.B., Barnham, K.J. Alzheimer's disease & metals: therapeutic opportunities, *British Journal of Pharmacology*, 163, 211–219, **2011**.
- Lupaescu, A.V.** Inhibitori proteazici și peptide anti-amiloidice: Tehnici de detecție și caracterizare, *Lucrare de disertație* coordonată de Drochioiu G., Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași Facultatea de Chimie, **2016**.
- Lupaescu, A.V.**, Humelnicu, I., Petre, B.A., Ciobanu, C.I., Drochioiu, G. Direct evidence for binding of aluminum to NAP anti-amyloid peptide and its analogs, *European Journal of Mass Spectrometry*, 146906671987771, **2019**.
- Lupaescu, A.V.**, Sandu, I., Petre, B.A., Ion, L., Ciobanu, C.I., Drochioiu G. NAP Neuroprotective Peptide and its Analogs : Simultaneously Copper and Iron Binding and Reduction, *Revista de Chimie*, 70, 1784–1790, **2019a**.
- Lupaescu, A.V.**, Ciobanu, C. I., Humelnicu, I., Petre, B.A., Murariu, M., Drochioiu G.

- Design and synthesis of new anti-amyloid NAP-based/like peptides, *Revue Roumaine de Chimie*, 64, 535–546, **2019b**.
- Lupaescu, A.V.**, Jureschi, M., Ciobanu, C.I., Ion, L., Zbancioc, G., Petre, B.A., Drochioiu G. FTIR and MS Evidence for Heavy Metal Binding to Anti-amyloid NAP-Like Peptides, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 25, 303–309, **2019c**.
- Magen, I., Gozes, I. Davunetide: Peptide therapeutic in neurological disorders, *Current medicinal chemistry*, 21, 2591–2598, **2014**.
- Mirza, A., King, A., Troakes, C., Exley, C. Aluminium in brain tissue in familial Alzheimer's disease, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 40, 30–36, **2017**.
- Patocka, J., Slaninova, J., Kunesova, G. Neuroprotective peptides as drug candidates against Alzheimer's disease, *Journal of Applied Biomedicine*, 3, 67–73, **2005**.
- Pomponi, M., Pomponi, M.F.L. Alzheimer's disease prevention & acetyl salicylic acid: A believable story, *Indian Journal of Medical Research*, 139, 1–3, **2014**.
- Robert, A., Liu, Y., Nguyen, M., Meunier, B. Regulation of Copper and Iron Homeostasis by Metal Chelators: A Possible Chemotherapy for Alzheimer's Disease, *Accounts of Chemical Research*, 48, 1332–1339, **2015**.
- Smith-Swintosky, V.L., Gozes, I., Brenneman, D.E., D'Andrea, M.R., Plata-Salaman C.R. Activity-Dependent Neurotrophic Factor-9 and NAP Promote Neurite Outgrowth in Rat Hippocampal and Cortical Cultures, *Journal of Molecular Neuroscience*, 25, 225–238, **2005**.
- Yang, M.-H., Chen, S.C., Lin, Y.F., Lee, Y.C., Huang, M.Y., Chen, K.C., Wu, H.Y., Lin, P.C., Gozes, I., Tyan, Y.C. Reduction of aluminum ion neurotoxicity through a small peptide application – NAP treatment of Alzheimer's disease, *Journal of Food and Drug Analysis*, 27, 551-564, **2019**.
- Zatta, P., Drago, D., Bolognin, S., Sensi, S.L. Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy, *Trends in Pharmacological Sciences*, 30, 346–355, **2009**.
- Zemlyak, I., Furman, S., Brenneman, D.E., Gozes, I. A novel peptide prevents death in enriched neuronal cultures, *Regulatory peptides*, 96, 39–43, **2000**.
- Zheng, H., Blat, D., Fridkin, M. Novel neuroprotective neurotrophic NAP analogs targeting metal toxicity and oxidative stress: potential candidates for the control of neurodegenerative diseases, in *Oxidative Stress and Neuroprotection*, *Journal of Neural Transmission*, 71, 163–172, **2006**.

## LISTA DE LUCRĂRI PUBLICATE DIN TEZĂ

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

- 1) **Lupaescu, A.V.**, Jureschi, M., Ciobanu, C.I., Ion, L., Zbancioc, G., Petre, B.A., Drochioiu G., FTIR and MS evidence for heavy metal binding to anti-amyloid NAP-like peptides, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, no. 25(1), p. 303-309, **2019**. DOI:10.1007/s10989-018-9672-2, **Factor de impact = 1,219**
- 2) **Lupaescu, A.V.**, Ciobanu, C.I., Humelnicu, I., Petre, B.A., Murariu, M., Drochioiu G., Design and synthesis of new anti-amyloid NAP-based/like peptides, *Revue Roumaine de Chimie*, no. 64(6), p. 535-546, **2019**. **Factor de impact = 0,395**
- 3) **Lupaescu, A.V.**, Sandu, I., Petre, B.A., Ion, L., Ciobanu, C.I., Drochioiu G., NAP neuroprotective peptide and its analogs: Copper and iron binding and reduction, *Revista de Chimie*, no. 70(5), p. 1784-1790, **2019**. **Factor de impact = 1,605**
- 4) **Lupaescu, A.V.**, Humelnicu, I., Petre, B. A., Ciobanu, C.I., Drochioiu, G., Direct evidence for binding of aluminum to NAP anti-amyloid peptide and its analogs, *European Journal of Mass Spectrometry*, 146906671987771, **2019**. DOI:10.1177/1469066719877714, **Factor de impact = 0,851**
- 5) Jureschi, M., **Lupaescu, A.V.**, Ion, L., Petre, B.A., Drochioiu G., Stoichiometry of heavy metal binding to peptides involved in Alzheimer's disease: mass spectrometric evidence, *Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research*, 1140, 401-415, **2019**. DOI: 10.1007/978-3-030-15950-4\_23 **Factor de impact = 2,126**

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

- 1) Ciobanu, C., **Lupaescu, A.-V.**, Drochioiu, G., Study of zinc binding to neuroprotective peptides, 19<sup>th</sup> International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2019 - *Conference proceedings, Advances in Biotechnology 19*, 905-912, **2019**. DOI: 10.5593/sgem2019/6.1/S25.117
  
- 2) Jureschi, M., Drochioiu, G., **Lupaescu, A.-V.**, Petre, B.A., Ciobanu, C.I., Binding of heavy metal ions to amyloid- $\beta$  peptides: interactions with NAP peptides., 19<sup>th</sup> International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2019 - *Conference proceedings, Advances in Biotechnology 19*, 583-590, **2019**. DOI: 10.5593/sgem2019/6.1/S25.075
  
- 3) Ion, L., Drochioiu, G., **Lupaescu, A.-V.**, Jureschi, M., Petre, B.A., Amyloid- $\beta$  and anti-amyloid peptides involved in Alzheimer`s disease: Interactions with metal ions. 19th International Multidisciplinary GeoConference SGEM 2019 - *Conference proceedings, Advances in Biotechnology 19*, 515-522, **2019**. DOI: 10.5593/sgem2019/6.1
  
- 4) Drochioiu, G., Murariu, M., Jureschi, M., **Lupaescu, A.-V.**, Closca, M-C., Heavy metal binding to peptides at higher pH: Novel ESI-MS approach, 18<sup>th</sup> International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2018 - *Conference proceedings, Advances in Biotechnology 18*, 361-368, **2018**. DOI: 10.5593/sgem2018/6.2