

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE CHIMIE

TEZĂ DE DOCTORAT

REZUMAT

*Sinteza de noi inhibitori pentru enzime și sisteme celulare
enzimo-defective. Aplicații în biochimie și chimia
macromoleculară*

Conducător științific,
Prof. Dr. Ion Baci

Doctorand,
Nicolau Ioana

2012

Cuprins

Listă de abrevieri

Mulțumiri

PARTEA A: Peptidil-epoxisuccinați – sonde de activitate cu aplicații în chimia macromoleculară

Capitolul 1. Bioconjugarea proteinelor.....	1
1.1. Introducere.....	1
1.2 Polimeri proteici.....	8
1.2.1. Polimerilor bioconjugăți cu proteine prin atașarea polimerilor la proteine	9
1.2.2. Polimeri bioconjugăți cu proteine prin polimerizarea biomoleculelor funcționalizate cu un inițiator.....	18
1.2.3. Polimeri supramoleculari	20
1.3. Dendrimeri proteici	22
1.4. Metode chimice de funcționalizare a proteinelor.....	25
1.4.1. Activity based profilingul și sondele de activitate	25
1.4.2. Sonde de activitate pentru cistein proteaze	31
1.4.3. Epoxisuccinați - inhibitori ai cistein proteazelor, familia papainei	39
Capitolul 2. Sinteza de noi sonde de activitate cu aplicații în chimia macromoleculară	42
2.1. Sinteza de noi polimeri și dendrimeri proteici.....	42

2.1.1. Designul sondelor de activitate	45
2.2. Sinteza sondelor de activitate	47
2.2.1. Marcarea lizinei cu biotina	49
2.2.2. Sinteza intermediarului grefat cu grupa polimerizabilă 7	50
2.2.3. Sinteza compusului 13 ce conține grupa cistein-reactivă.....	52
2.2.4. Sinteza spacerului etilenglicol 19	53
2.2.5. Sinteza pe suport solid a sondelor de activitate	54
2.2.5.1. Sinteza pe suport solid a sondelor de activitate pentru construcția de polimeri proteici	56
2.2.5.2. Sinteza pe suport solid a sondelor de activitate pentru construcția de dendrimeri proteici	59
2.2.5.3. Sinteza sondelor de activitate 32, 33 funcționalizate cu fluorofor	62
2.2.5.4. Sinteza sondelor de activitate 34-37 funcționalizate cu grupa polimerizabilă	66
2.2.5.5. Sinteza sondelor de activitate 38-40 funcționalizate cu grupa NHS	70
2.3. Reacția cistein proteazei cu sondele de activitate	73
2.3.1. Purificarea complexului peptidă-papaină	75
2.4. Sinteza polimerului proteic	77
2.5. Sinteza dendrimerului proteic	78
2.6. Concluzii.....	80

Capitolul 3. Partea experimentală.....	81
3.1. Considerații generale	81
3.2. Sinteza 2,5-dioxopirolidin-1-il-5-((3a <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,6a <i>R</i>)-3a,6a-dimetil-2-oxo-hexahidro-1 <i>H</i> -tieno[3,4- <i>d</i>]imidazol-4-il)pentanoatului 3	82
3.3. Sinteza acidului 6-metilacrilamidohexanoic 5	83
3.4 Sinteza acidului 1-(9 <i>H</i> -fluoren-9-il)-19-metil-3,11,18-trioxo-2-oxa-4,10,17-triazaicos-19-en-5-carboxi 7	83
3.5 Sinteza etil (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-trans-2,3-epoxisuccinatului 13	84
3.6 Sinteza acidului 14- <i>N</i> -[[<i>(9'</i> <i>H</i> -fluoren-9'-il)metoxi]carbonilamino]-3,6,9,12 tetraoxatetradecan-1-oic 19	85
3.7 Sinteza peptidelor pe suport solid	89
3.7.1. Procedura generală de sinteză pentru peptidele amino-terminale	90
3.7.2. Procedura generală de sinteză pentru peptidele C-carboxi-terminale	95
3.8. Procedura generală de funcționalizare a peptidelor amino-terminale cu compusul 5	96
3.9. Procedura generală de funcționalizare NHS a peptidelor carboxi-terminale 29-31	99
3.10. Procedura generală de funcționalizare a peptidelor 20, 22 cu biotina	101
3.11. Procedura generală de funcționalizare a peptidelor 20, 22 cu fluoroforii Cy3/Cy5	102
3.12. Procedura generală pentru experimentele de inhibiție a papainei cu compuși 25-28, 32-37	104
3.13. Procedura generală pentru obținerea polimerilor	105

3.14. Procedura generală de funcționalizare a proteinei cu sondele de activitate modificate NHS	105
3.15. Procedura generală de construire a dendrimerilor	105
Bibliografie	106
 PARTEA B: Glicin fluorometil cetone – sonde de activitate pentru sentrin proteaze	
Capitolul 1. Familiile de proteine SUMO și SENPs	115
1.1. Familia de proteine SUMO (small ubiquitin-like modifiers)	115
1.2. Familia de proteine SENP (sentrin proteaze).....	120
1.3. Sonde de activitate pentru USP (ubiquitin-specific proteases)	126
1.4. Metode de sinteză pentru fluorometil cetone grefate pe aminoacizi	130
 Capitolul 2. Sinteza de noi sonde de activitate selective pentru sentrin proteaze	132
2.1. Designul sondei de activitate pentru SENP-uri	132
2.2. Sinteza sondei de activitate	134
2.2.1. Abordările inițiale de sinteză	134
2.2.2. Strategia finală pentru sinteza glicin-fluorometilcetonei	135
2.3. Atașarea pe suport solid	139
2.3.1. Tentative de atașare directă a FMC 10 și 11 pe rășină.....	139
2.3.2. Protecția prin ditian a glicin-FMC 11 și atașarea pe rășina Wang	141

2.3.2.1. Studiul hidrolizei 1,3-dioxolanului 12	141
2.3.2.2. Protecția prin ditian.....	143
2.4. Deprotecția grupelor protectoare.....	143
2.5. Atașarea compusului 12 pe rășină și creșterea peptidei	144
2.6. Strategia finală de sinteză	145
2.7. Concluzii	152
Capitolul 3. Partea experimentală.....	154
3.1. Considerații generale	154
3.2. Sinteza FMC.....	154
3.3. Sinteza de peptide pe suport solid	160
3.4. Sinteza carboxi-peptidei 15	161
3.5. Sinteza (2-(fluorometil)-1,3-ditian-2-il)metanamina 16	161
3.6. Sinteza peptidei 17 obținută prin cuplarea (2-(fluorometil)-1,3-ditian-2-il)metanaminei cu carboxi-peptida 15.....	162
3.7. Sinteza peptidei FMC 1.....	163
Bibliografie.....	164
 PARTEA C: Complecși de Cu (II) – mimetici ai superoxid dismutazei 1 (SOD1)	
Capitolul 1. Superoxid Dismutaza (SOD) și stresul oxidativ	169
1.1. Superoxid dismutaza	172

1.1.1. Tipuri de SOD	174
1.1.1.1. SOD1 (Cu/Zn-SOD)	174
1.1.1.2. SOD2 (Mn/Fe-SOD)	175
1.1.1.3. Ni-SOD	177
1.2. Modificările aduse la nivel molecular de către stresul oxidativ	179
 Capitolul 2. Determinarea activității superoxid dismutaz-mimetice a unor compuși coordinativi de Cu (II) utilizând linii celulare de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> defective în Cu/Zn-Superoxid Dismutază (Sod1p)	
2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> și SOD.....	182
2.2. Combinațiile complexe ale Cu (II) utilizate	188
2.3. Teste de biochimie	193
2.3.1. Fenotipul celulelor defective în superoxid dismutază	193
2.3.2. Determinarea sensibilității celulelor de <i>S. cerevisiae</i> față de substanțe care induc stresul oxidativ	193
2.3.3. Activitatea SOD-mimetică a complexului [CuCl(acac)(tmed)]	194
2.3.4. Efectul compusului [CuCl(acac)(tmed)] asupra creșterii celulare	196
2.3.5. Compusul [CuCl(acac)(tmed)] anulează auxotrofia față de lizină a mutantului de drojdie <i>sod1Δ</i>	196
2.3.6. Compusul [CuCl(acac)(tmed)] prezintă activitate SOD-mimetică, dar modulează, de asemenea, activitatea Sod1p în interiorul celulei de drojdie	198
2.3.7. Dependența de Ccs1p a activității Sod1p modulatorie a compusului [CuCl(acac)(tmed)]	201
2.3.8. Activitatea Sod1p modulatorie a compusului [CuCl(acac)(tmed)] depinde de statusul de oxidare a celulei	203
2.3.9. Efectul EGCG asupra creșterii celulare a unor mutanți cu defecte în răspunsul față de stresul oxidativ	207

2.4. Concluzii	209
Capitolul 3. Partea experimentală	214
3.1. Considerații generale	214
3.1.1. Linii și condiții de stocare și creștere	214
3.1.2. Medii de cultură	214
3.2. Experimentele de creștere	214
3.2.1. Creșterea în mediu lichid.....	214
3.2.2. Creșterea celulară în experimentele de spotare	215
3.2.3. Experimentele de halou	215
3.3. Teste de biochimie	215
3.3.1. Screening-ul de concentrație minimă inhibitorie a complexilor Cu(II) asupra liniilor celulare	215
3.3.2. Efectul compusului [CuCl(acac)(tmed)] asupra creșterii celulare	215
3.3.3. Fenotipul celulelor defective în superoxid dismutază	216
3.3.4. Determinarea sensibilității celulelor de <i>S. cerevisiae</i> față de substanțe care induc stresul oxidativ	216
3.3.5. Compusul [CuCl(acac)(tmed)] anulează auxotrofia față de lizină a mutantului de drojdie <i>sod1Δ</i>	217
3.3.6. Determinarea activității SOD-mimetice a complexului Cu (II) testat	217
3.3.7. Testarea potențialului caracter protector al complexului Cu(II) față de celulele de <i>S.cerevisiae</i> defective în gena SOD1 aflate sub acțiunea toxică a agenților generatori de superoxid	218

3.3.8. Dependența de Ccs1p a activității Sod1p modulatorie a compusului [CuCl(acac)(tmed)]	218
3.3.9. Efectul compusului [CuCl(acac)(tmed)] asupra creșterii celulare a unor mutanți cu diferite stări de oxidare	218
3.3.10 Efectul EGCG asupra fotosensibilității unor mutanți cu defecte în răspunsul față de stresul oxidativ	219
3.3.11. Studiul lizin auxotrofiei celulelor skn7Δ, yap1Δ și ahp1Δ în raport cu [CuCl(acac)(tmed)]	219
3.3.12. Activitatea SOD	219
3.3.13. Activitatea SOD <i>in gel</i>	219
Bibliografie	221
Concluzii generale	227

CAPITOLUL 1. Bioconjugarea proteinelor

În general, polimerii sintetici au fost studiați datorită proprietăților lor structurale și au ajuns să înlocuiască, în multe aplicații, materialele naturale. Un motiv al succesului înregistrat de polimerii sintetici constă în faptul că aceștia se pot obține într-o diversitate de arhitecturi și compoziție, ceea ce conduce la obținerea unor proprietăți predictibile. Totuși, chiar și cu tehnicile de sinteză actuale, controlul asupra compoziției monomerice și a masei moleculare este limitat, un polimer sintetic fiind, cel mai adesea, un amestec de macromolecule.

Pe de altă parte, peptidele și proteinele pot fi privite ca polimeri bine definiți, ce prezintă (bio)funcții precum cele de catalizator sau de receptor. Partea problematică o reprezintă însă în sensibilitatea lor la temperatură sau la schimbările de pH. De asemenea, acestea prezintă solubilitate limitată în solvenții organici, sunt susceptibile la degradarea enzimatică, iar utilizarea lor în aplicațiile biomedicale poate fi restricționată din cauza posibilei toxicități.

Bioconjugarea reprezintă legarea covalentă a unei entități biologice (proteină, peptidă, oligonucleotidă, zahar, moleculă de ADN etc.) la un polimer sintetic sau natural pentru a forma noi macromolecule¹ (vezi figura A.1).

Începând cu munca de pionerat a lui Abuchowski și co², această arie de cercetare a înregistrat un interes tot mai crescut.

Bioconjugarea oferă oportunitatea de a modifica substanțial farmacocinetica și farmacodinamica proteinelor sau peptidelor terapeutice.

¹ Jean-Franc-ois Lutz, Hans G. Borner, *Prog. Polym. Sci.*, **2008**, 33, 1

² (a) A. Abuchowski, T. Van Es, N. C. Palczuk and F. F. Davis, *J. Biol. Chem.*, **1977**, 252, 3578; (b) A. Abuchowski, J. R. McCoy, N. C. Palczuk, T. Van Es, F. F. Davis, *J. Biol. Chem.*, **1977**, 252, 3582

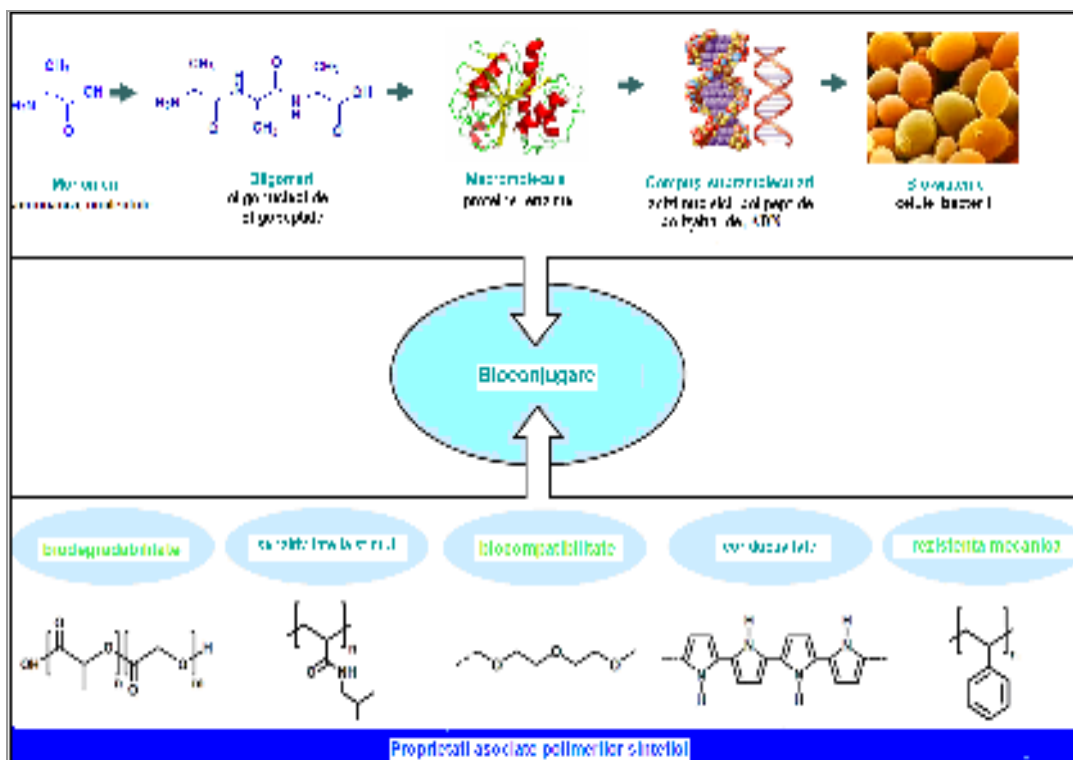


Figura A.1. Tipuri de bioconjugare

O clasă interesantă de polimeri este reprezentată de polimerii terapeutici. Aceștia includ: polimeri care sunt în mod inerent biologic activi,³ conjugați polimer-medicament, micelle polimerice⁴, conjugați polimer-proteină⁵ și polimeri acoperiți cu lipozomi⁶ (Figura A.3).

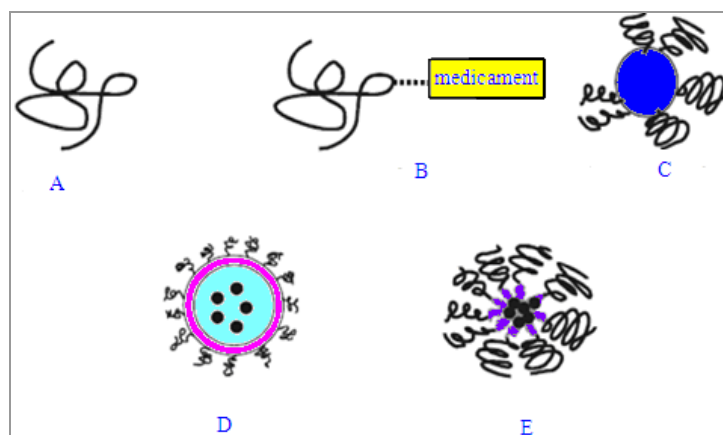


Figura A.3. Polimeri terapeutici: A- polimer medicament, B- conjugat polimer-medicament, C- conjugat polimer-proteină, D- polimer acoperit cu lipozomi, E- micelle polimerice⁷

³ Seymour, L. J. Bioact. Compat. Polym. **1991**, 6, 178

⁴ Ringsdorf, H. J. Polym. Sci. Polymer Symp. **1975**, 51, 135

⁵ Maeda, H. Adv. Drug Delivery Rev. **2001**, 46, 169

⁶ Scheule, R. K.; Cheng, S. H. Liposome delivery systems; BIOS Scientific Publishers Inc.: Oxford, **1996**

Tehnica *drug-delivery* controlată de către polimeri a evoluat foarte mult datorită necesității unei administrări prelungite și mai bine controlate a medicamentului. În plus, efectele secundare foarte toxice prezente în cazul chimioterapiei limitează frecvent nivel de dozare a medicamentelor. Diferitele modalități de prelungire a prezenței medicamentului în circulația sângelui includ conjugarea covalentă a medicamentelor la polimeri, încapsularea medicamentelor în lipozomi sau prinderea fizică a medicamentelor în particule precum miclele sau microsfele. Conjugarea agenților anti-tumorală cu polimeri a condus la apariția unei noi clase de medicamente anticancer care pot media țintirea selectivă a tumorilor, reducând și toxicitatea tratamentului. În tehnica *drug-delivery* convențională, concentrația de medicament în sânge crește la administrarea fiecărei doze, după care începe să scadă. Tehnica de eliberare controlată poate menține concentrația de medicament dorită cu o singură doză pentru o durată mult mai mare de timp, permițând, în plus, o transportare a medicamentului la locul dorit din organism.

Majoritatea agenților anti-tumorală este constituită din compuși cu masă moleculară mică ce penetrează toate țesuturile trecând prin membrana celulelor, în timp ce conjugății polimerici pot intra în celule doar prin pinocitoză. Pinocitoza reprezintă ingerarea nespecifică de către celulă a unei mase de lichid extracelular cu toate substanțele conținute de acesta și formarea unei vezicule intracelulare, care va fi treptat digerată prin fuziune cu lizozomii). Acest proces implică internalizarea membranei pentru a se genera vezicule care prind și înglobează medicamentul polimeric și îl transportă în interiorul celulei. Medicamentul polimeric circulă în corp pentru o perioadă de timp mai mare și se acumulează mai eficient în țesutul tumoral în comparație cu un compus cu masă moleculară mică. Acest fenomen a fost denumit de către Maeda și co. ca efectul de permeabilitate și retenție consolidate (*EPR effect*)⁸ Acest efect a fost atribuit tumorilor care, în general, sunt mai permeabile pentru macromolecule, dar și lipsei unui drenaj limfatic eficient în cazul tumorilor. Lipsa unui drenaj limfatic eficient împiedică repunerea rapidă în circulație a macromoleculele ce părăsesc vasele de sânge. În țesuturile tumorale, acești factori permit atingerea unei concentrații a conjugăților la un nivel de 10 - 1000 mai mare decât cel caracteristic administrării medicamentului simplu.

Masa moleculară și stabilitatea sunt factori cheie în optimizarea conjugăților polimerici; atât structura polimerică, cât și legătura polimer-medicament trebuie să fie suficient de stabile, iar dimensiunea moleculei trebuie să fie îndeajuns de mică pentru a-i permite eliminarea din organism

⁷ Duncan, R.; Dimitrijevic, S.; Evagorou, E. G. *S.T.P. Pharma Sciences*, **1996**, 6, 237

⁸ Maeda, H.; Matsumura, Y., *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.*, **1989**, 6, 193

de către rinichi. Astfel, conjugatul polimer-medicament ce nu este prins de țesutul tumoral poate fi ușor îndepărtat, evitându-se o potențială acțiune toxică față de organism.

H. Ringsdorf a fost primul cercetător care a propus un model pentru conjugării polimer-medicament. În studiile sale, acesta a folosit polimeri solubili în apă de care medicamentul este legat covalent printr-o legătură ce poate fi tăiată atunci când ajunge la ținta dorită. Mai mult, includerea în structura acestora de reziduuri ce ținesc specific celula poate crește selectivitatea livrării medicamentului¹³.

Polimerii purtători de medicamente trebuie să îndeplinească câteva cerințe ce au fost impuse în designul conjugatului polimer-medicament. Din aceste condiții fac parte biocompatibilitatea, lipsa de imunogenicitate, necesitatea de a fi inerți din punct de vedere biologic și existența unor grupe funcționale capabile să reacționeze covalent atât cu medicamentul, cât și cu reziduurile țintă. Polimerii naturali, de genul dextran sau albumină serică umană, care sunt foarte accesibili și biocompatibili prezintă o mare imunogenicitate, fapt ce reprezintă un inconvenient decisiv al acestor compuși.

Polimerii pot fi conjugați chimic sau fizic la biomolecule, obținându-se sisteme polimer-biomoleculă ce pot reacționa la stimuli fizici, chimici sau biologici. Conjugarea unui polimer sintetic cu o biomoleculă conduce la obținerea unui tip hibrid de moleculă ce combină proprietățile individuale ale celor două unități constitutive, conducând chiar la proprietăți noi.

1.1. Polimeri proteici

Bioconjugării proteină-polimer îmbină proprietățile componentilor. Astfel, proteina conferă bioconjugatului proprietățile (bio)funcționale, în timp ce componenta polimerică poate îmbunătăți stabilitatea, solubilitatea și biocompatibilitatea proteinei. Polimerul sintetic poate aduce bioconjugatului și noi proprietăți, precum capacitatea de auto-asamblare sau poate modula activitatea proteinei.

Metodele principale de sinteză a bioconjugatilor proteină-polimeri ilustrate și în figura A.4 sunt:

1. Metoda tradițională de sinteză a bioconjugatilor proteină-polimer: constă în atacul nucleofilic al unei grupe funcționale a aminoacizilor din structura proteinei asupra unui centru electrofil din structura polimerului sintetic. Această tehnică se bazează pe atașarea unui polimer deja sintetizat la proteina dorită. Cel mai adesea este utilizat un exces de polimer ce trebuie apoi îndepărtat din amestecul de reacție de conjugatul țintă. Acest lucru poate fi greu de obținut dacă polimerul și proteina au mase similare. În plus, în cazuri care nu implică o funcționalizare specifică, numărul și localizarea lanțurilor polimerice în structura conjugatului final pot fi dificil de determinat.

2. Proteinele funcționalizate cu un inițiator de polymerizare: constituie materia primă într-o tehnică recent dezvoltată de obținere a bioconjugăților. Această metodă este selectivă și, spre deosebire de metoda tradițională, permite evitarea obținerii de produși secundari.

3. Tehnici care utilizează interacțiunile supramoleculare: permit obținerea de *polimeri supramoleculari*, definit și ca “matrice polimerică de unități monomerice care sunt aduse împreună de interacțiuni reversibile, având ca rezultat proprietăți polimerice”.

4. Polymerizarea peptidelor funcționalizate cu (macro)monomeri, prin care peptidele sunt funcționalizate cu o grupă polymerizabilă care servește ca mijloc de conectare a unităților monomerice.

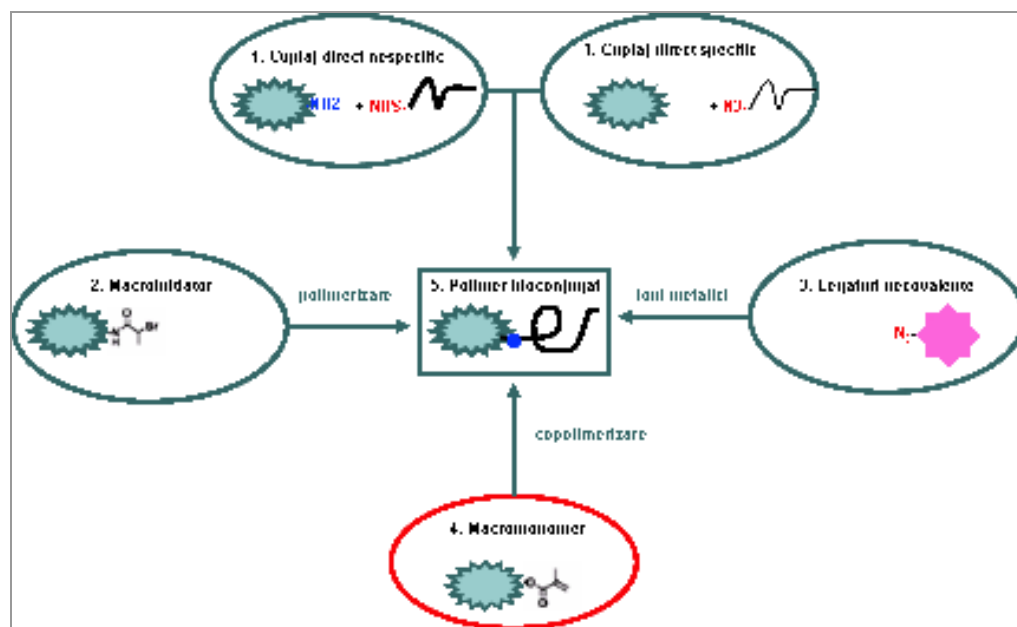


Figura A.4. Căile sintetice de obținere a bioconjugăților proteină-polimer

1.2. Dendrimeri proteici

Dendrimerii (figura A.8) sunt macromolecule sintetice, ramificate și mono-disperse de dimensiuni nanometrice. Numele vine de la grecescul "δένδρον" (dendron), care înseamnă "copac". Alt termen folosit însă destul de rar este și acela de moleculă cascadă, însă denumirea acceptată internațional este aceea de dendrimer.

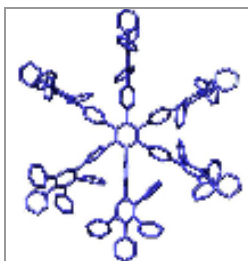


Figura A.8. Structura unui cristal de dendrimer polifenilen de prima generație raportat de Müllen și colaboratorii⁹

Un dendrimer este o moleculă simetrică față de un centru, adoptând cel mai adesea o morfologie tridimensională sferică (figura A.9).

Începând cu mijlocul anilor 1980, cercetările ce au avut ca scop metodologia de sinteză, proprietățile fizice și cele chimice ale dendrimerilor au crescut exponențial cu creșterea interesului în acest domeniu. Proprietățile asociate dendrimerilor, proprietăți precum dimensiunea uniformă, solubilitatea în apă, suprafața funcțională modificabilă sau prezența unei cavități interne, îi fac atractivi din punct de vedere biologic¹⁰ sau ca aplicații de genul drug-delivery¹¹.

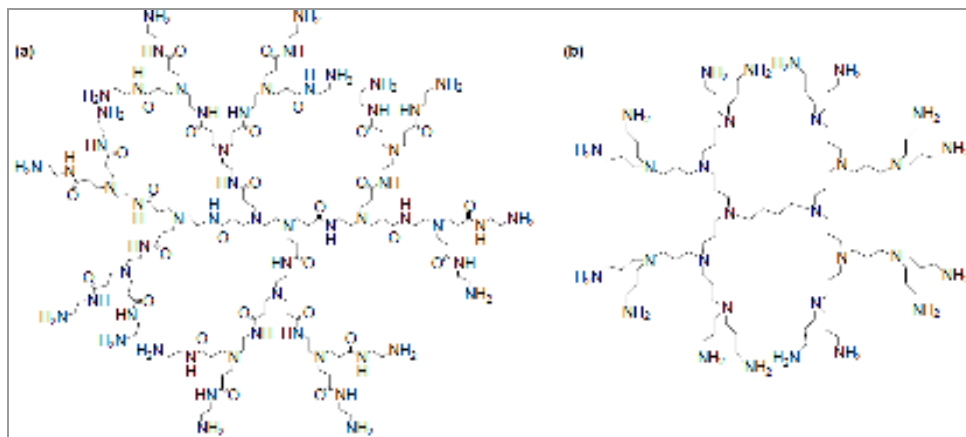


Figura A.9. Dendrimeri comerciali a) Dendrimer PAMAN de generația a II-a, b) Dendrimer poli(propilenimină) de generația a III-a¹²

⁹ Roland E. Bauer, Volker Enkelmann, Uwe M. Wiesler, Alexander J. Berresheim, Klaus Müllen, *Chemistry: A European Journal*, **2001**, 8, 3858

¹⁰ Tathagata Dutta, Minakshi Garg, N.K.Jain, *Vaccine*, **2008**, 26(27-28), 3389

¹¹ Prajapati RN, Tekade RK, Gupta U, Gajbhiye V, Jain NK, *Synthesis*, **2009**, 6, 940

¹² Mary J. Cloninger, *Current opinion in chemical biology*, **2002**, 6, 742

Conjugarea dendrimerilor cu medicamente de masă moleculară mică a prezentat un interes crescut în ultimii ani datorită îmbunătățirii farmaco-cineticii, specificității față de zona țintă și a absorbției celulare¹³.

Capitolul 2. Sinteza de noi sonde de activitate cu aplicații în chimia macromoleculară.

Specificitatea proteinelor în sistemele biologice le transformă în agenți terapeutici ideali sau în senzori moleculari⁹⁸, prin urmare ne-am propus ca utilizând tehnica de marcare prin activitate să punem la punct o nouă metodologie de construire a unor noi polimeri și dendrimeri proteici.

2.1. Sinteza de noi polimeri și dendrimeri proteici

Conjugații proteină-polimer sunt utilizați în aplicații în domeniul medicinei, biotehnologiei sau nanotehnologiei. Atașarea covalentă a polimerilor sintetici la proteine îmbunătățește stabilitatea, solubilitatea și biocompatibilitatea proteinelor.¹⁴ Mai mult, atașarea de lanțuri polimerice poate fi utilizată în vederea modulării activității proteinei.¹⁵

În acest scop, vom utiliza sonde de activitate decorate cu o grupă polimerizabilă. Reacția unei enzime cu o astfel de sondă, urmată de (co)polimerizare va conduce la obținerea de structuri polimerice regulate.

Reacția specifică a sondei de activitate cu enzima activă va conduce la obținerea enzimei inactivată funcționalizată specific la un anume aminoacid și care va prezenta în structura ei o grupă polimerizabilă (figura A.24).

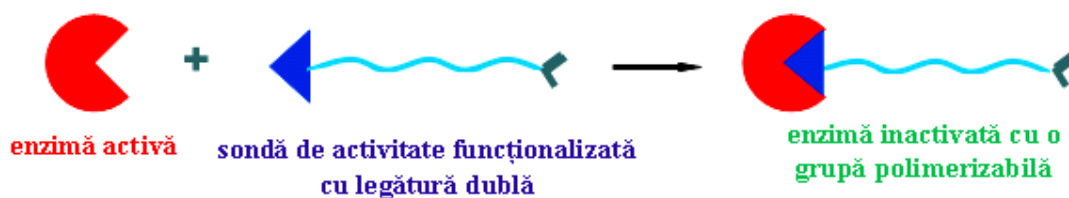


Figura A.24. Inhibarea unei enzime active cu o sondă de activitate funcționalizată cu o grupă polimerizabilă

¹³ A. Quintana, E. Raczk, L. Piehler, I. Lee, A. Myc, I. Majoros, A.K. Patri, T. Thomas, J. Mule, J.R. Baker Jr., *Synthesis*, **2002**, 19, 1310

⁹⁸ a) P. Bailon, W. Berthold, *Pharm. Sci. Technol. Today*, **1998**, 1, 352. b) R. Duncan, *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2003**, 2, 347. c) A. S.Hoffman, P. S. Stayton, *Macromol. Symp.*, **2004**, 207, 139

⁹⁹ a) P. Caliceti, F. M. Veronese, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2003**, 55, 1261. b) G. W. M. Vandermeulen, H. A. Klok, *Macromol. Biosci.*, **2004**, 4, 383

¹⁵ A. S. Hoffman, *Clin. Chem.*, **2000**, 46, 1478

După procesul de polimerizare, respectiv copolimerizare se presupune obținerea unei sfere, respectiv a unui lanț polimeric pe care sunt grefate moleculele de proteină, toate fiind atașate prin intermediul aceluiași aminoacid (figura A.25).

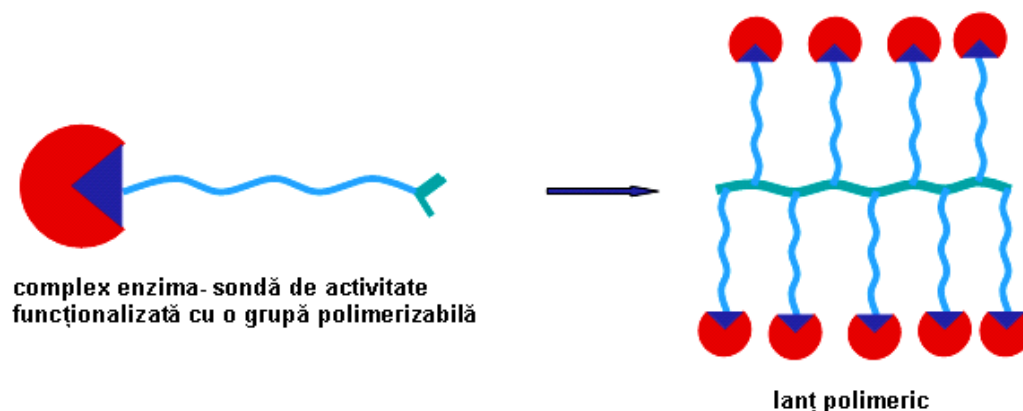


Figura A.25. Sinteza unui nou polimer proteic

De asemenea, proprietățile asociate dendrimerilor sunt precum : *i)* dimensiunea uniformă, *ii)* solubilitatea în apă, *iii)* suprafața funcțională modificabilă sau *iv)* prezența unei cavități interne îi fac atractivi din punct de vedere biologic sau ca aplicații de genul drug-delivery. Recent s-au făcut progrese importante în aplicațiile dendrimerilor biocompatibili cu tratamentul cancerului, incluzând aici utilizarea lor ca drug delivery¹⁶. Oportunitățile pentru creșterea performanței proteinelor terapeutice relativ mari, utilizând dendrimeri a fost și ea intens explorată în ultima vreme¹⁷.

Având în vedere proprietățile asociate acestui tip de conjugați, ne-am propus utilizarea tehnicilor de marcare prin activitate în vederea obținerii unei *noi metodologii* de construire a unor *dendrimeri proteici*.

Tehnica de funcționalizare chimică a proteinelor este o tehnică foarte selectivă, stabilă în soluție și nesusceptibilă de eventuale legări nespecifice, făcând-o astfel superioară metodelor convenționale de conjugare a proteinelor. Avantajele includ specificitatea reacției și controlul unic pe care îl aduce procesului de conjugare. Ne propunem astfel, utilizarea metodei de conjugare specifică a proteinelor prin intermediul grupărilor amino libere din structura lor cu un ester-NHS grefat pe o sondă de activitate. Proteinele astfel modificate sunt mai apoi reacționate cu alte molecule de proteină pentru a forma dendrimerul proteic dorit (figura A.26).

¹⁶ Gillies, E. R.; Frechet, J. M. J. *Drug Discovery Today* **2005**, 10, 35.

¹⁷ Xiangtao Wang, Rajyalakshmi Inapagolla, Sujatha Kannan, Mary Lieh-Lai, Rangaramanujam M. Kannan, *Bioconjugate Chem.*, **2007**, 18, 791

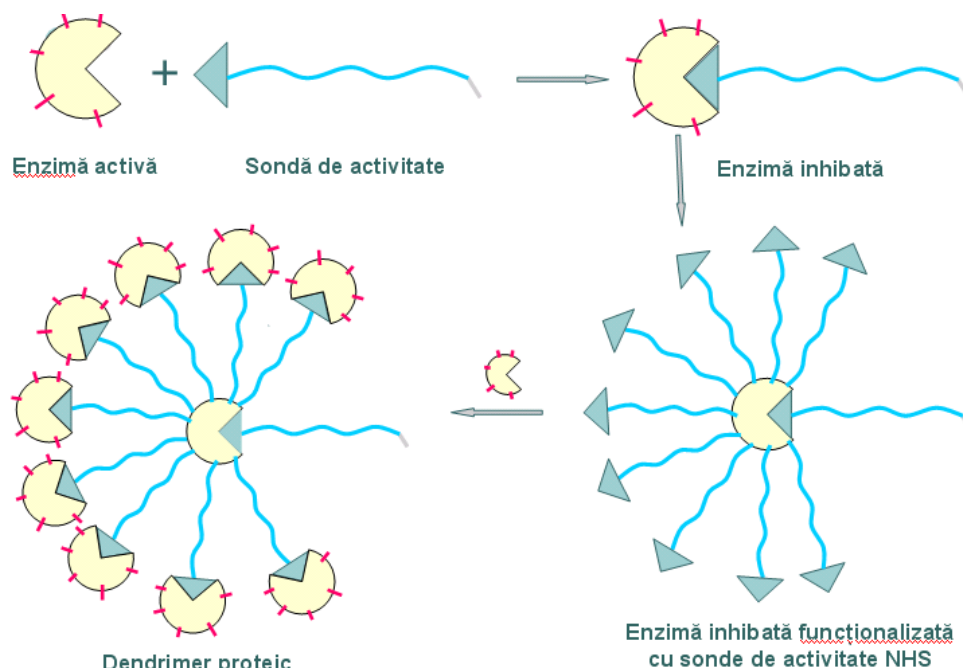


Figura A.26. Principiul general de sinteză al dendrimerilor proteici

Avantajele acestei tehnici constau în:

- Formarea de legături covalente stabile
- Controlul conjugării
- Biocompatibilitate
- Specificitate - reacționează numai cu grupările -NH_2 libere din proteină

2.1.1. Designul sondelor de activitate

Sondele de activitate pentru cistein proteaze se bazează, în general, pe prezența în structura lor a unei grupe electrofile ce alchilează ireversibil funcțiunea tiol prezentă în situsul activ al proteazelor. Ele sunt clasificate în funcție de aceste grupe electrofile, iar dintre cele mai utilizate sonde de activitate în domeniul studiilor de proteomică sunt cele de tipul epoxisuccinaților. Provocarea în alegerea unei grupe electrofile corespunzătoare apare din nevoia ca aceasta să fie suficient de reactivă pentru a se lega rapid și eficient cu aminoacizii din situsul activ, dar și de a fi suficient de stabilă pentru a nu apărea eventuale reacții secundare.

Sondele de activitate pe bază de epoxisuccinați sunt peptide sintetice scurte derivate de la inhibitorul natural E-64 (prezentat pe scurt în capitolul 1), ce conțin o funcțiune epoxid, rezultatul constând în formarea unei legături covalente între tiolul din situsul activ al cistein proteazei și carbonul electrofil din epoxid (figura A.27).

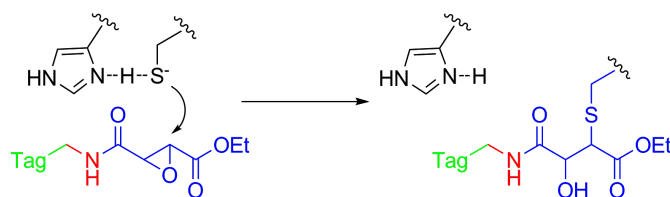


Figura A.27. Mecanismul de inhibiție al ABP

Astfel, designul sondelor de activitate pe care ni le-am propus a le sintetiza trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- (a) Să conțină o **parte de interacțiune covalentă cu enzima** - reprezentată de o grupă electrofilă ce va reacționa covalent cu funcțiune SH nucleofilă din situsul activ al cistein proteazelor.

Ne-am oprit la utilizarea unei funcțiuni **epoxisuccinat** pentru a putea mima structura părții de legătură covalentă a inhibitorului natural E-64 (în roșu în figura A.28). Din gama de grupe electrofile (halometil cetone, diazometil cetone, vinil sulfone etc.)¹⁵⁰ ce sunt cunoscute ca inhibitori ireversibili pentru cistein proteaze, epoxisuccinații prezintă câteva avantaje importante, precum:

1. Sunt relativ ușor de obținut prin sinteză¹⁸;
2. Se leagă selectiv și covalent la funcțiunea tiol prezentă în situsul activ al cistein proteazelor din familia papainei formând o legătură tioeterică după desfacerea ciclului^{6,19};
3. Reactivitatea grupei electrofile epoxid nu este afectată semnificativ de substituenții de pe ciclul oxiran²⁰, care pot fi o funcțiune carboxil liberă, un ester sau o amidă.

Ne-am oprit la utilizarea unui derivat de ester etilic pentru simplificarea procedurii de sinteză peptidică pe suport solid (SPPS- *Solid-Phase Peptide Synthesis*).

4. Prezintă o stabilitate ridicată în condițiile de mediu (timp, pH etc.)⁸.

- (b) Să conțină o **parte de recunoaștere moleculară** ce încorporează elemente specifice utilizate pentru direcționarea probei la enzima dorită. Această parte de recunoaștere, în general, ia forma unei peptide sau a unei structuri similare peptidelor, în care sunt încorporați chimic doi până la patru aminoacizi pentru a oferi o legare specifică în

¹⁸ a) D. Greenbaum, K.F. Medzihradszky, A. Burlingame, M. Bogyo, *Chem. Biol.*, **2000**, 7, 569; b) D.C. Greenbaum, W.D. Arnold, F. Lu, L. Hayrapetian, A. Baruch, J. Krumrine, S. Toba, K. Chehade, D. Bromme, I.D. Kuntz, M. Bogyo, *Chem. Biol.*, **2002**, 9, 1085

¹⁹ a) M.J. Evans, B.F. Cravatt, *Chem. Rev.*, **2006**, 106, 3279, b) J. Eppinger, D.-P. Funeriu, L. Denizot, M. Miyake, J. Miyake, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 3806

²⁰ J. P. Meara, D. H. Rich, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 3356

situsului activ al proteazelor¹⁰⁴. În cazul nostru – **o leucină și o tirozină (YL)** (în albastru în figura A.28)

- (c) Să prezinte **o parte de spacer** ce poate îndeplini mai multe roluri. Cea mai importantă funcție a sa este să ofere suficient spațiu între grupa reactivă și grupa polimerizabilă, dar și între grupa reactivă și grupa necesară purificării, astfel încât să prevină o eventuală împiedicare sterică ce ar putea bloca accesul grupei reactive în situsul activ al enzime. De asemenea, linkerul de tip alchil poate să ajute în modularea hidrofobicității permițând intrarea în celulele vii sau în țesuturi, în timp ce linkerul de tip polietilenglicol se utilizează în vederea, atât a creșterii solubilității probelor în mediul apos, cât și în vederea creșterii flexibilității sondei de activitate. (în negru în figura A.28).
- (d) Să includă **o parte de purificare** introdusă în structura sondei de activitate în vederea realizării, atât a unei purificări a probei noastre chimice, dar și a unei eventuale vizualizări prin tehnica de Western Blotting. Deoarece cea mai simplă și mai eficientă metodă de separare și vizualizare a proteinelor implică tehnica SDS-PAGE ne-am oprit la introducerea în partea de purificare a biotinei, a histidinelor sau a fluoroforilor Cy3/Cy5 (în negru în figura A.28).
- (e) Să conțină **o parte funcționalizată cu o grupă polimerizabilă** (reprezentată de un aminoacid comercial căruia i s-a atașat o funcțiune ce va permite o ulterioară (co)polimerizare a complexului sintetizat) (în verde în figura A.28).

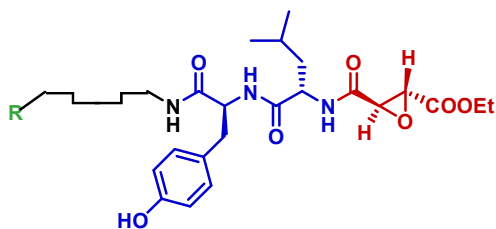


Figura A.28. Designul sondelor de activitate

În roșu: funcțiunea epoxid – grupa reactivă pentru situsul activ al cistein proteazelor; în albastru: secvența YL – partea de afinitate pentru cistein proteazele din familia papainei; în negru: partea de spacer (hexametilen sau tetraetilen glicol) și de purificare (biotina, His-Tag sau Cy_{3,5}); în verde partea funcționalizată cu grupa polimerizabilă.

2.2. Sinteza sondelor de activitate

Sinteza sondelor de activitate, inhibitori specifici pentru cistein proteaze marcate cu biotină, His-Tag sau Cy₃₍₅₎ s-a realizat pe suport solid, conform strategiei Fmoc de sinteză pe suport solid, urmărindu-se ca model general peptidele prezentate mai jos (figura A.29).

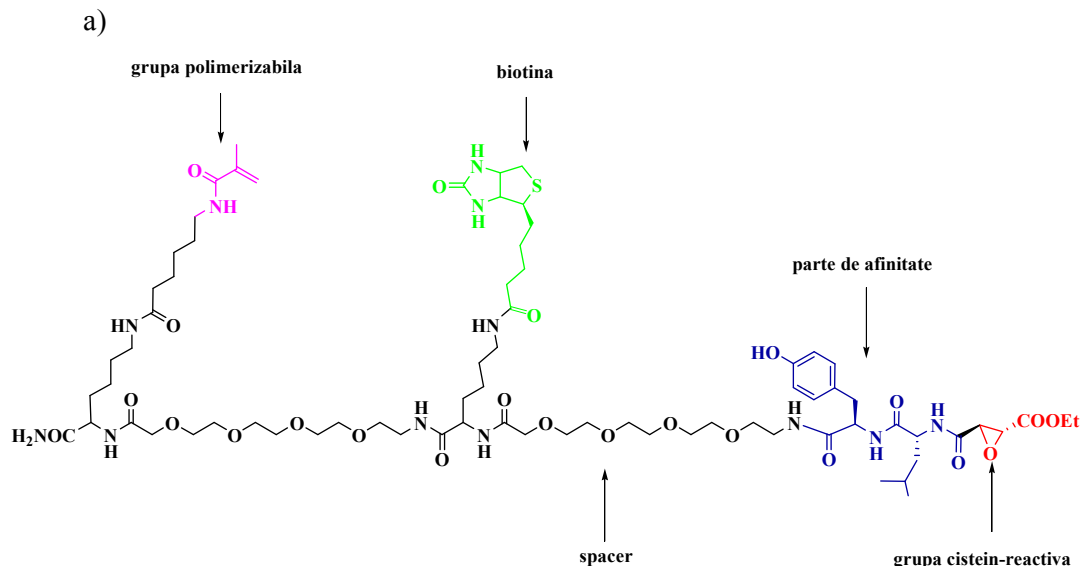


Figura A.29.: Sondă de activitate funcționalizată cu a) grupă polimerizabilă;

O parte din aminoacizii utilizați pentru sinteza de peptide pe suport solid sunt compuși comerciali, fiind astfel utilizați fără o altă modificare sau purificare, însă grupa reactivă pentru cistein proteaze, spacerul tetraetilenglicolic, aminoacidul funcționalizat cu biotina și cel funcționalizat cu grupa polimerizabilă sunt aminoacizi sintetici ce au fost într-o primă fază sintetizați în laborator.

2.6. Concluzii

În această parte, am realizat și pus la punct o nouă tehnică de obținere a bioconjugatilor proteină-polimer, tehnică care să permită atât o prindere specifică a proteinei dorite, cât și obținerea unui bioconjugat care să conțină în structura sa un polimer funcționalizat nu numai cu o singură, ci cu mai multe proteine.

De asemenea, am realizat și pus la punct un nou principiu de sinteză a dendrimerilor proteici, dendrimeri ce constau în proteine legate specific între ele prin sonde de activitate.

Astfel, am sintetizat o serie de sonde de activitate pentru cistein proteaze, 21 de sonde de activitate diferite ca structură, purificate prin HPLC semi-preparativ și caracterizate prin spectrometrie de masă ES-MS și/sau MALDI; am realizat sinteza polimerului dorit, polimer a cărui obținere a fost pusă în evidență prin SDS-PAGE, dar și a dendrimerului proteic, ce a fost pus în evidență prin spectrometria de masă de tip MALDI și prin SDS-PAGE.

PARTEA B . Glicin fluorometil cetone – sonde de activitate pentru sentrin proteaze

CAPITOLUL 1. Familiile de proteine SUMO și SENPs

1.1. Familia de proteine SUMO

Proteinele de tipul ubiquitina (ub) și ubiquitin-like (ubl/ulp) sunt implicate în apoptoză, diferențierea și dezvoltarea celulară, răspunsul la efort și la stres, dar și în ciclul celular. Proteinele ubiquitina-like cu spectrul de funcții cel mai larg și cu cele mai cunoscute substraturi sunt componentele familiei SUMO (small ubiquitin-related modifier). Reprezentarea schematică a proteinei SUMO 1 umane este ilustrată în figura B.2.

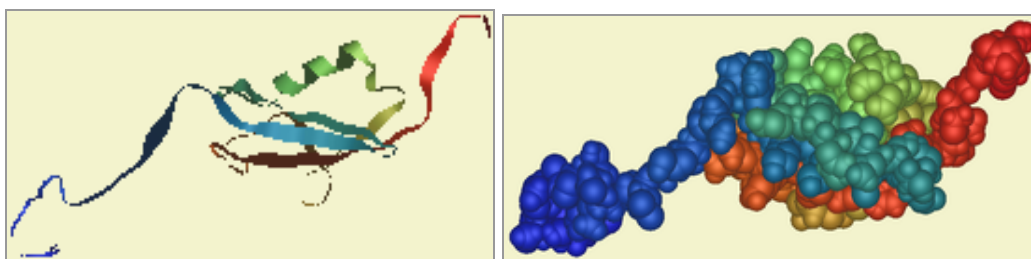


Figura B.2. Reprezentarea schematică a SUMO1 uman (imagini preluate de pe PDB)

Proteinele SUMO sunt proteine mici; majoritatea fiind de aproximativ 100 de aminoacizi ca lungime și cu o masă de circa 12 kDa. Lungimea și masa exactă variază între membrii familiei SUMO și depind în funcție de organismul din care provin proteinele. SUMO este o proteină de tipul ubiquitin-like ce se atașează covalent la un reziduu de lizină din substratul proteinelor cu modificare post-translațională.

SUMO este legată covalent cu proteina țintă printr-o legătură izopeptidică, care se formează între funcțiunea amino de la lizina proteinei țintă și capătul C-terminal al SUMO, printr-un mecanism similar celui de activare și cuplaj al proteinei de tipul ubiquitina²¹.

1.2. Familia de proteine SENP

Proteazele sau enzimele proteolitice reprezintă una dintre cele mai importante clase de enzime. Ele formează cea mai mare clasă de enzime prezentă în genomul uman și catalizează selectiv hidroliza legăturilor peptidice. Pot fi divizate în aspartic-, serin-, cistein- și metalo-proteaze. Proteazele sunt implicate în numeroase procese fiziologice importante precum

²¹ David Reverter, Christopher D. Lima, *Structure*, **2004**,12, 1519

digestia, coagularea sângelui, fertilizarea, creșterea și diferențierea celulară, răspunsul imunologic și apoptoza.

Proteazele SUMO ale familiei Ulp1 sunt enzime cu funcție dublă. Proteinele SUMO în stare nativă sunt procesate de către proteazele SUMO la forma lor matură. Aceasta implică îndepărtarea proteolitică a peptidei C-terminale cu expunerea motivului caracteristic Gly–Gly necesar conjugării. De asemenea, proteazele SUMO taie lagăturile izo-peptidazice dintre SUMO și țintele sale (figura B.6). Toate proteazele SUMO cunoscute aparțin familiei de cistein proteaze, ubiquitin like 1 (prescurtate și Ulp1), denumite astfel după membrul de bază *S. Cerevisiae*, Ulp1²².

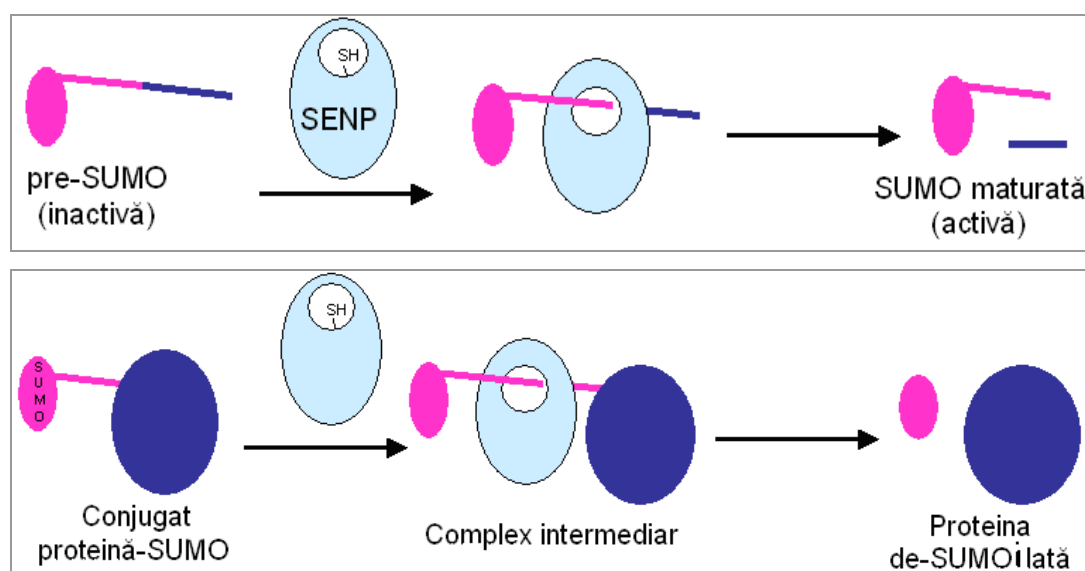


Figura B.6. Funcțiile SENPs

Acest grup de proteaze este cunoscut sub denumirea de SENPuri sau sentrin proteaze și este implicat, atât în maturarea precursorilor de SUMO (activitate endopeptidazică), cât și în deconjugarea SUMO de pe proteinele țintă (activitate izopeptidazică). Nu toate sentrin proteazele sunt specifice pentru proteinele SUMO, un exemplu fiind SENP8, care nu este o protează pentru familia SUMO. Ea acționează ca și protează asupra unei alte proteine mici, ubiquitina, cunoscută sub denumirea de Nedd8²³.

²² Li, S.J. and Hochstrasser, M., , *Nature*, **1999**, 398, 246

²³ Gan-Erdene, T., Nagamalleswari, K., Yin, L., Wu, K., Pan, Z. Q., Wilkinson, K. D., *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 28892

CAPITOLUL 2. Sinteza de FMC- inhibitor selectiv pentru sentrin proteaze

În această parte ne-am propus sinteza de noi probe de activitate cu aplicații directe în biochimie prin *obținerea unui nou tip de inhibitor ireversibil și specific pentru familia de enzime SENP*.

2.1. Designul inhibitorului

Proteinele SENP sunt cistein proteaze care transformă proteinele de tipul ubiquitina (SUMO). Acestea din urmă sunt activate de proteinele SENP prin tăierea unei scurte secvențe din domeniul lor C-terminal. O condiție a priori în sinteza unui reactiv specific este aceea de a mima structura proteinei de tip SUMO. De asemenea, ținând cont de faptul că proteinele SENP taie proteina SUMO după un motiv glicină-glicină, reactivul specific trebuie să prezinte în structura sa acest motiv, pe care să avem atașat un electrolit cât mai mic. Astfel ne-am oprit la o fluorometilcetona (FMC) prinsă pe un rest glicină.

Motivul FMC nu a fost ales la întâmplare. În literatură există în acest moment studii efectuate pe proteine modificate în partea lor C-terminală cu vinil sulfone sau cu vinil metil ester. Problema este dimensiunea mai mare a acestor funcțiuni și deci implicit împiedicarea sterică ce apare în momentul interacției între reactivul specific și SENPuri.

Atomul electrolit cel mai mic este fluorul, deci partea care va forma o legătură covalentă cu o cisteină prezentă în situsul activ al enzimei ne-am gândit să fie o FMC, care în plus trebuie grefată pe aminoacidul cel mai mic, glicina.

În plus, pentru a asigura o interacție specifică puternică între noul reactiv și enzima țintă, partea reactivă trebuie atașată la o peptidă care conține aceeași secvență de aminoacizi ca substratul SUMO. Decisivă este păstrarea în structura sondei de activitate a interacției pi-pi din poziția 7, fiind cunoscut faptul că în cazul drojdiei de bere această modificare este letală.

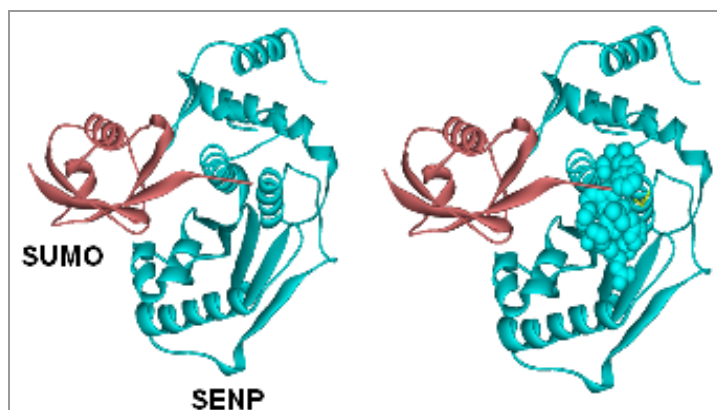


Figura B.16. Interacția SUMO-SENP

Luând în considerare toate ideile expuse mai sus, ținta sintetică pentru studiul nostru are structura următoare (unde aminoacizii sunt prezentați prin abrevierea cu o singură literă): ArXXXXG-FMC (figura B.17).

Strategia inițială de sinteză a cuprins trei etape generale:

- 1) Prepararea FMC sub o formă protejată care să fie compatibilă cu sinteza de peptide pe suport solid;
- 2) Atașarea acestei părți pe suportul solid;
- 3) Sinteza părții peptidice pe suport solid și apoi eliberarea moleculei în soluție.

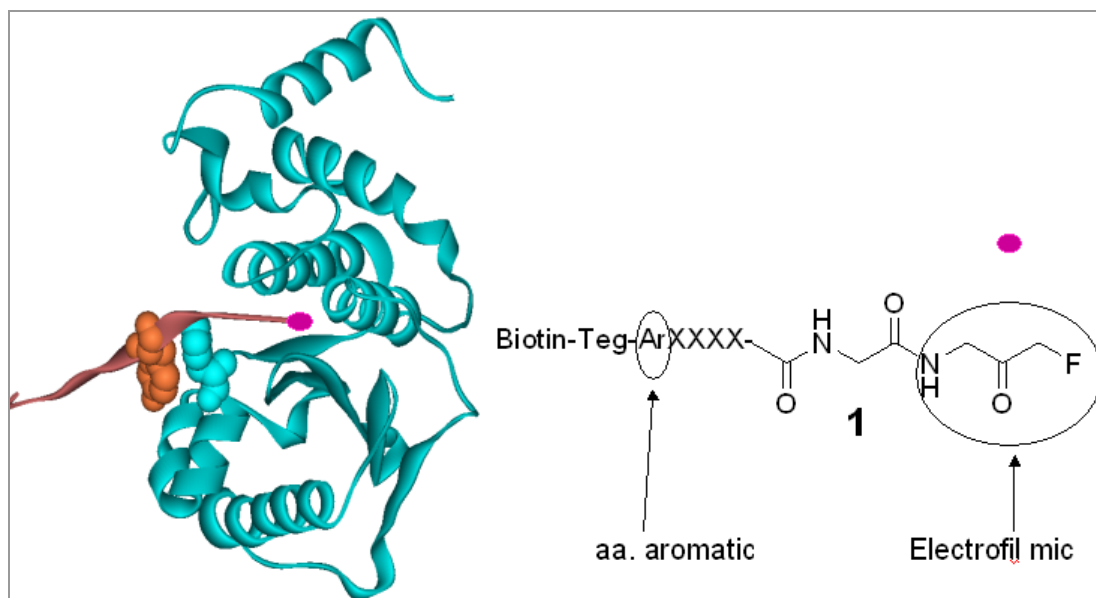
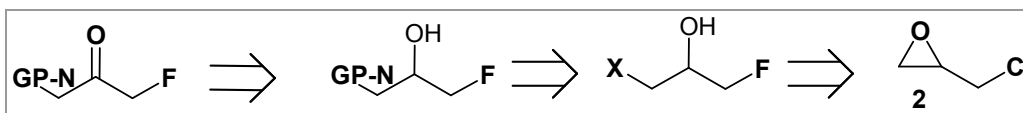


Figura B.17. Designul sondei de activitate pentru SENP

2.2. Sinteza α -fluorometilcetonei

2.2.2. Strategia finală pentru prepararea FMC pe glicină

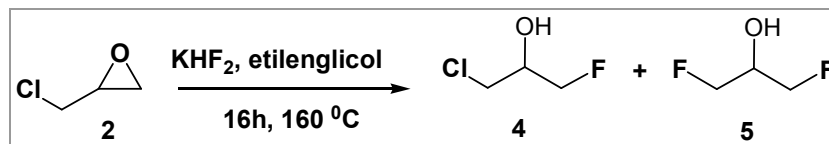
În fața problemelor impuse de tentativele de utilizare a metodelor deja descrise în literatură, ne-am dirijat spre o altă abordare, *originală*, care implică introducerea secvențială a funcțiilor necesare pentru obținerea produsului țintă. O scurtă analiză retrosintetică este prezentată în schema B.5 (unde GP = grupă protectoare) :



Schema B.5. Analiza retrosintetică pentru prepararea FMC

Am decis să plecăm de la epichlorhidrină, care poate fi substituită cu un reactiv fluorurat. Introducerea funcțiunii amino în fluoro-cloro-alcoolul obținut se va efectua prin metoda Gabriel. Transformarea ftalimidei într-o grupă protectoare Fmoc și o oxidare a alcoolului conduce la FMC dorită.

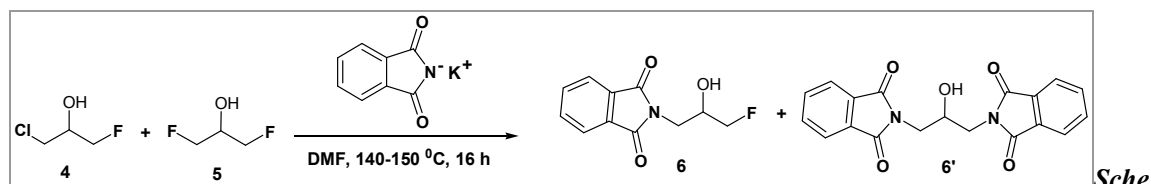
Dintre reactivii susceptibili de a introduce un atom de fluor într-o moleculă organică, ne-am decis să utilizăm hidrogenofluorura de potasiu, KHF_2 , care nu este scumpă și este foarte accesibilă. Astfel, am efectuat substituția epichlorhidrinei în condițiile descrise (schema B.6):



Schema B.6. Substituția nucleofilă a epichlorhidrinei

În ciuda faptului că randamentul raportat este de aproximativ 30% pentru fiecare din produșii principali de substituție (1-cloro-3-fluoro-propan-2-ol **4** și respectiv 1,3-difluoro-propan-2-ol **5**), nu am putut obține decât randamente de aproximativ 8% pentru acești compuși. Cei doi alcooli obținuți se pot separa corespunzător, dar am observat că este posibilă utilizarea în etapa următoare fără o purificare a fracției colectată între $127\text{--}155^\circ\text{C}$ care conține amestecul produșilor **4** și **5**.

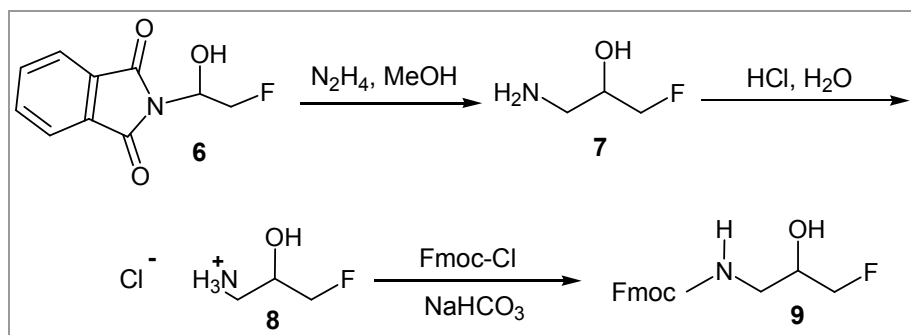
Tratarea acestui amestec cu ftalimida potasată, în suspensie, în DMF conduce în principal la doi produși: fluoro-ftalimido-isopropanolul dorit **6** și produsul de dublă substituție **6'**, care sunt separabili prin cromatografie (schema B.7).



ma B.7. Substituția fluoroalcoolilor cu ftalimida potasată

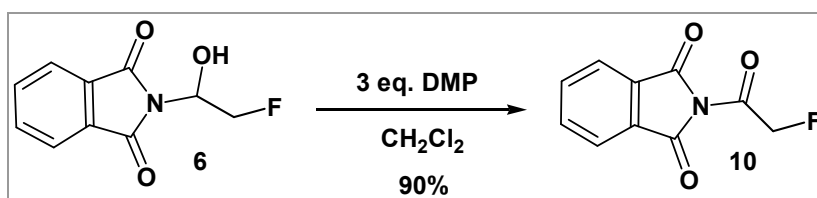
O dată fluoro-ftalimido-alcoolul obținut, l-am supus deprotecției cu hidrazină în condiții blânde. Tentativele de izolare în bune condiții a amino-fluoro-alcoolului liber **7** au eșuat din cauza volatilității acestui produs²⁴. Este posibil totuși să izolăm compusul sub formă de clorhidrat **8**, el fiind introdus astfel în etapa următoare: protecția funcțiunii amino sub formă de fluorenilmethylcarbamate (schema B.8).

²⁴ E. Cherbuliez, A. Yazgi, J. Rabinowitz - *Helv. Chim. Acta*, **1960**, 43, 1135



Schema B.8. Sinteza Fmoc-amino-fluoro-alcoolului 9

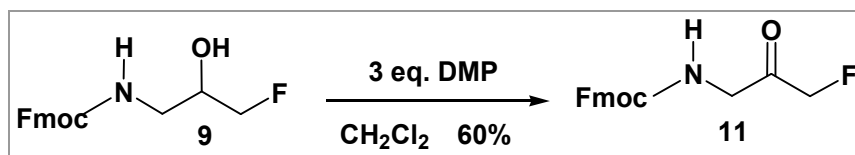
Am reușit să valorificăm fluoro-ftalimido-alcoolul **6** prin oxidarea lui utilizând reactivul Dess-Martin^{25, 26} (schema B.9).



Schema B.9. Oxidarea fluoro-ftalimido-alcoolului 6

Această reacție are loc cu randamente foarte bune (aproximativ 90%). Planul nostru era de a face deprotecția funcțiunii amino a cetonei **10** cu hidrazină, urmată de cuplajul direct al acestei noi FMC pe rășină.

În aceeași manieră, putem oxida alcoolul protejat Fmoc în condiții identice, cu randamente mai mici de această dată (60-65%), pentru a obține cetona corespunzătoare (schema B.10).



Schema B.10. Oxidarea Fmoc-fluoro-alcoolului 9

2.5. Atașarea FMC pe rășină și creșterea peptidei

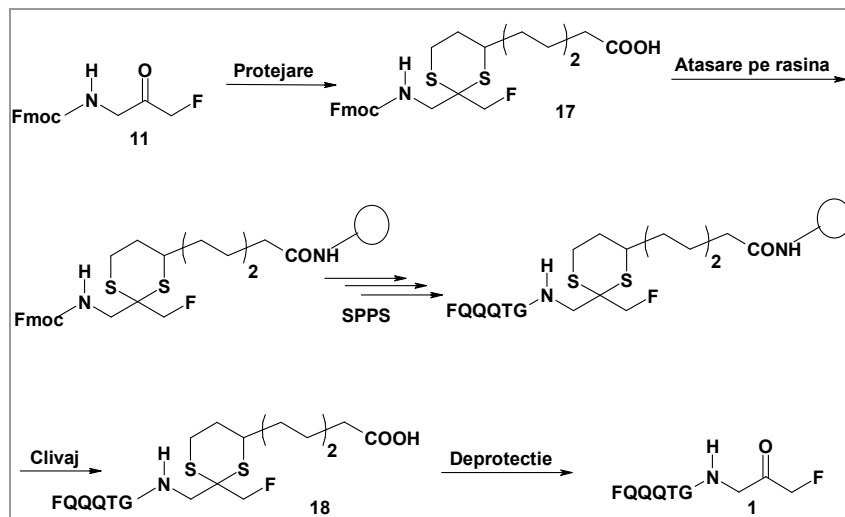
Odată având pusă la punct strategia de sinteză a FMC și a etapei de deprotecție, am recurs la atașarea FMC protejate pe o rășină de tip Rink Amide, pentru ca mai apoi să sintetizăm pe suport solid peptida cu secvența dorită. La final, peptida este tăiată de pe rășină cu

²⁵ R.E. Ireland, L. Liu – *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 2899

²⁶ R.J. Linderman, D.M. Graves – *J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 661

TFA, păstrându-se însă FMC protejată. Deprotecția acesteia se va efectua în soluție, utilizând 2 echivalenți de BTI (schema B.18).

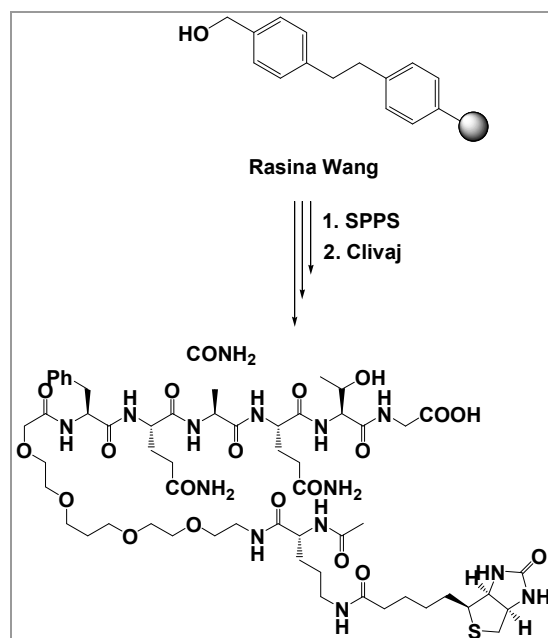
Deși această strategie de sinteză este foarte directă, la ultima etapă întâmpinăm unele dificultăți, randamentul de reacție fiind destul de scăzut, fapt ce ne-a condus la abordarea unei noi strategii, prin schimbarea tipului de rășină utilizat.



Schema B.18. Sinteza pe suport solid a peptidil-FMC

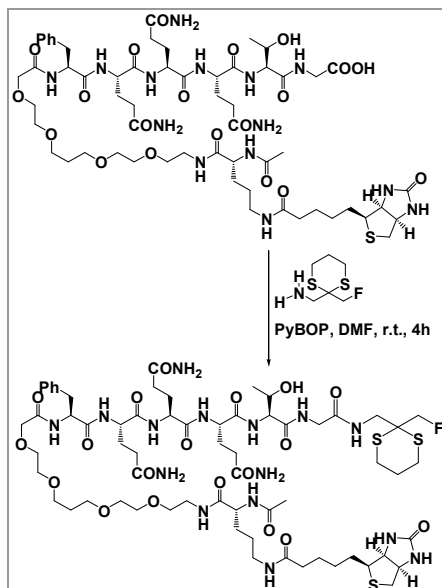
2.6. Strategia finală de sinteză

Am optat de această dată la sinteza pe suport solid a peptidei pe o rășină de tip **Wang**, rășină care după etapa de tăiere și deprotecție cu TFA prezintă o grupă funcțională carboxil liberă, capabilă să reacționeze printr-un cuplaj peptidic cu o funcțiunea amino din structura FMC (schema B.19).



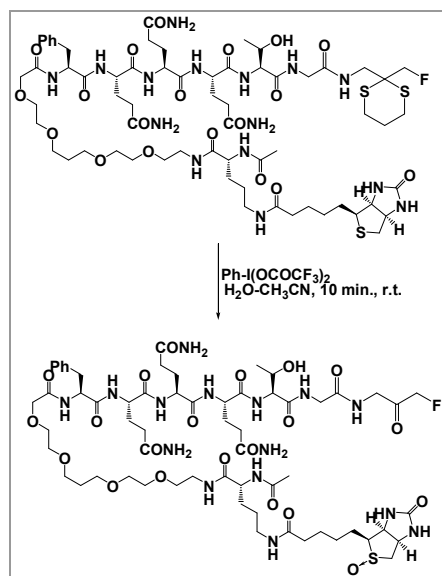
Schema 2.19. Sinteza pe rășina Wang a peptidei ce mimează structura SUMO

Cuplajul FMC protejată cu peptida ce mimează structura proteinei SUMO se realizează în soluție, în mediu anhidru, în prezență de PyBOP/DMF (schema B.20).



Schema B.20. Cuplajul în soluție al peptidei cu FMC-protejată

Într-o etapă finală, ditianul este deprotejat cu bis(trifluoroacetoxi)iodobenzen (BTI) pentru a se obține peptidul fluorometil cetone dorită (schema B.21).



Schema 2.21. Deprotecția ditianului

2.7. Teste de inhibiție

Odată obținut compusul **1**, am trecut la evaluarea caracterului de sondă de activitate față de sentrin proteaze. Am efectuat teste de inhibiție asupra SENP1 și SENP2 recombinat cu diverse concentrații ale compusului **1** (10, 20, 100 μ M) și la diferiți timpi de reacție (5, 30, 60 min). Procesul de inhibiție a fost evaluat cu ajutorul experimentelor de Western Blot

2.8. Concluzii

În această parte ne-am propus sinteza de noi probe de activitate cu aplicații directe în biochimie prin *obținerea unui nou tip de inhibitor ireversibil și specific pentru familia de enzime SENPs*.

Ne-am oprit la sinteza unei peptide ce mimează structura SUMO și care prezintă la unul dintre capete o fluorometil cetona. Astfel, s-a realizat, printr-o metodă originală, sinteza FMC pe scheletul unei glicine, sinteză constând într-o serie de șase etape, produșii de reacție fiind purificați și caracterizați prin RMN de H^1 , C^{13} , F^{19} .

Odată FMC obținută, am reușit sinteza unei noi sonde de activitate pentru sentrin proteaze, prin îmbinarea tehnicii de sinteză de peptide pe suport solid cu cuplajul în soluție al peptidei obținute cu motivul FMC.

S-a reușit, astfel, punerea la punct a unei strategii de sinteză a APBs pentru SENPs, iar inhibitorul enzimatic obținut s-a dovedit a inhiba puternic și ireversibil SENP1 și SENP2 (la 6μ M 50% inhibiție a SENP1 și SENP2, prezentând și o mare specificitate versus caspaze).

PARTEA C: Complecși de Cu (II) – mimetici ai superoxid dismutazei 1 (SOD1)

CAPITOLUL 1. Superoxid Dismutaza (SOD) și stresul oxidativ

Expunerea continuă la diferite tipuri de stres oxidativ având la bază diferite surse a condus atât celula, cât și întregul organism, să dezvolte mecanisme de apărare pentru protecția împotriva metaboliților reactivi (vezi figura C.2).

La om există trei tipuri de "super antioxidanți": peroxidazele, superoxid dismutazele (SOD) și catalazele. Dintre ele cele mai eficiente împotriva radicalilor liberi sunt superoxid dismutazele (SOD).

În prelucrarea radicalilor liber superoxizi, SOD acționează singură doar în cazuri foarte rare. Ea necesită în acest proces acțiunea enzimei numită catalază (CAT). Aceasta are rolul de a

înlătura moleculele de peroxid de hidrogen obținute ca produși secundari ai reacției efectuate de SOD. Catalaza este prezentă în toate globulele roșii, ea îndepărtând peroxidul de hidrogen din țesuturi și prevenind astfel vătămarea celulei, dar cel mai important prevenind formarea de alți radicali liberi și mai toxici.

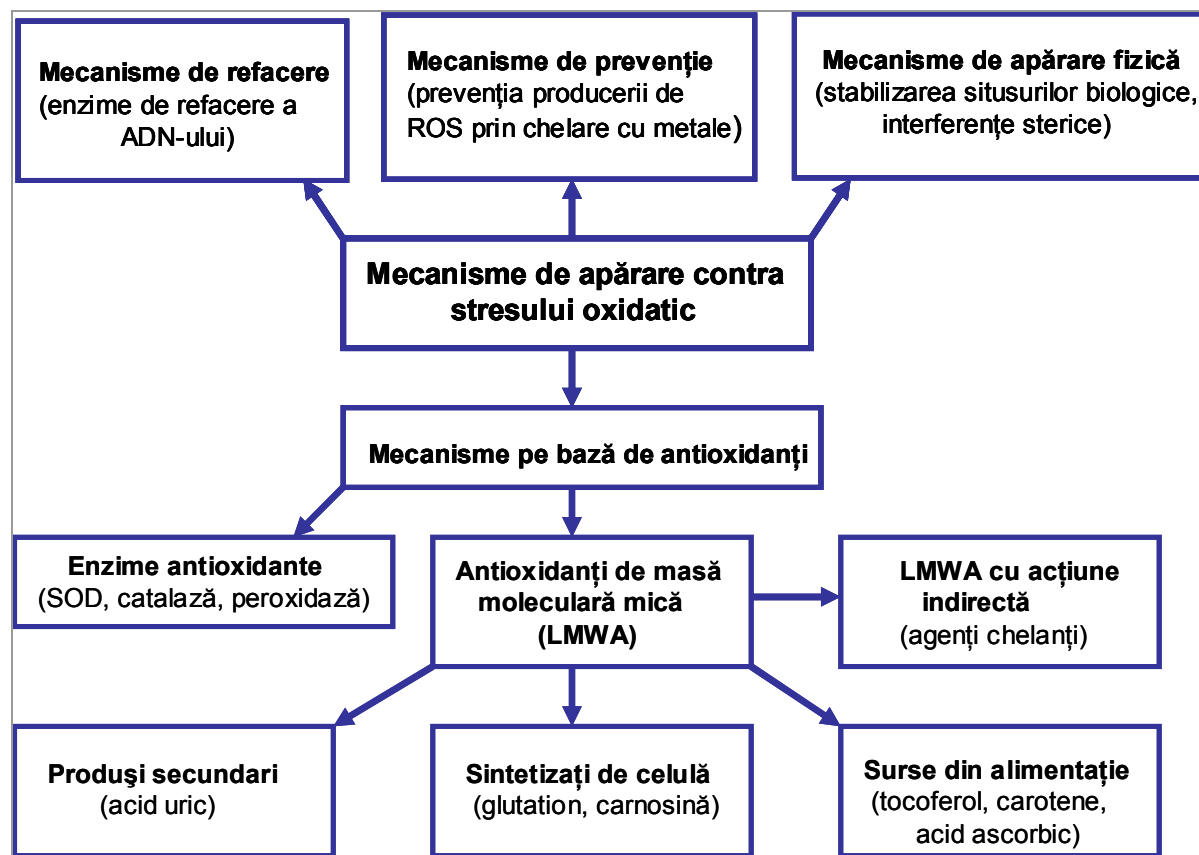


Figura C.2. Clasificarea mecanismelor celulare de apărare contra ROS și SO^{2-7}

SOD Superoxid dismutaza (figura C.3) este o enzimă care catalizează transformarea anionului radical superoxid în oxigen molecular și apă oxigenată. Acest proces reprezintă un mecanism biologic primar de apărare împotriva superoxidului. Anionul radical superoxid este una dintre cele mai reactive specii de oxigen. El este produsul diferitelor procese endogene normale, precum auto-oxidarea hemoglobinei, hidroxilarea oxidazei microzomale cu funcții mixte sau procesul de fagocitoză granulocitară. Superoxid dismutaza, se încadrează în clasa oxidoreductazelor, ea fiind o oxidază.

Oxidazele sunt *oxidoreductaze* care catalizează reacțiile anumitor substraturi precum oxigenul molecular sau peroxizii, fiind caracterizate prin transferul de hidrogen sau de electroni

²⁷ Ron Kohen, Abraham Nyska, *Toxicologic Pathology*, 2002, 30, 620

de pe un donator pe un acceptor, respectiv oxigenul molecular, ca produs de reacție formându-se apă.

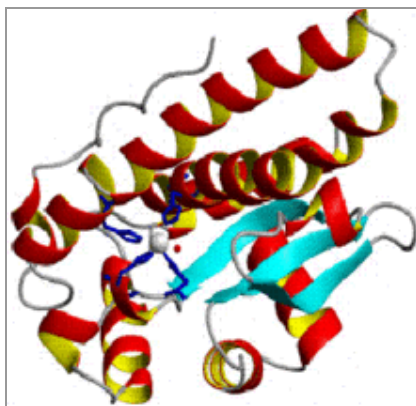


Figura C.3. Model pentru structura tridimensională a SOD.

Imagine preluată de pe www.pdb.org

Stresul oxidativ se definește ca dezechilibrul dintre oxidanți și antioxidanți în favoarea oxidanților, având potențial distructiv și patogenic. Peroxizii și radicalii liberi ce se formează în acest proces atacă toate componentele celulare, proteinele, lipidele și ADN-ul.

La om, stresul oxidativ este implicat în multe boli^{28, 29}, exemplele incluzând boala Sickle, ateroscleroza, boala Parkinson, infarctul miocardic, boala Alzheimer, schizofrenia etc. Speciile reactive de oxigen pot avea însă și un rol benefic, ele fiind utilizate de sistemul imunitar ca modalitate de apărare împotriva diverșilor factori patogenici.

Din punct de vedere chimic, stresul oxidativ este asociat cu creșterea cantității de specii oxidante sau cu scăderea considerabilă a capacității mecanismelor de apărare antioxidante, precum cel al glutatonei³⁰. Efectele stresului oxidativ depind de amploarea acestor modificări, celula fiind capabilă să depășească mici perturbări, revenind la starea ei inițială. Totuși, un stres oxidativ mai sever poate cauza necroza sau poate conduce la moartea celulei, iar un nivel moderat de oxidare poate declanșa apoptoza³¹.

²⁸ Amer, J., Ghoti, H., Rachmilewitz, E., Koren, A., Levin, C., Fibach, E., *British Journal of Haematology*, **2006**, 132, 108

²⁹ a) de Diego-Otero Y, Romero-Zerbo Y, el Bekay R, Decara J, Sanchez L, Rodriguez-de Fonseca F, del Arco-Herrera I., *Neuropsychopharmacology*, **2009**, 34, 1011, b) Gems D, Partridge L., *Cell Metab*, **2008**, 7, 200

³⁰ Schafer FQ, Buettner GR, *Free Radic. Biol. Med*, **2001**, 30, 1191

³¹ Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG, *Cell Prolif*, **1991**, 24, 203

CAPITOLUL 2. Determinare a activității superoxid dismutaz-mimetice a unor compuși coordinativi de Cu (II) utilizând linii celulare de Saccharomyces cerevisiae defective în Cu/Zn-Superoxid Dismutază (Sod1p)

2.1. Saccharomyces cerevisiae și SOD

S. cerevisiae a evoluat ca un organism model deoarece îndeplinește mai multe criterii foarte importante:

- Fiind un organism unicelular celula de *S. cerevisiae* este mică ca dimensiune și prezintă un timp de generare scurt (timpul de dublare este cuprins între 1,25–2 ore³² la o temperatură de 30 °C).
- *S. cerevisiae* pot fi transformate permițând introducerea sau deleția de gene. Mai mult, *S. cerevisiae* prezintă și avantajul de a putea fi crescute sub formă haploidă.
- Fiind un organism eucariot, *S. cerevisiae* păstrează structura celulară internă complexă a plantelor și animalelor.

Celulele de drojdie prezintă cele mai multe dintre caracteristicile structurale și funcționale ale eucariotelor (organisme care prezintă celule cu structură complexă, în care materialul genetic este localizat în nucleul sau nucleii celulelor) superioare, ceea ce transformă drojdia într-un model ideal pentru biologia celulelor eucariote. Spre deosebire de celulele mamiferelor, celulele de drojdie sunt înconjurate de un perete celular rigid care favorizează dezvoltarea cicatricilor de naștere în timpul diviziunii celulare. O altă deosebire este aceea că vacuola înlocuiește lizozomii din celulele superioare.

Celulele de *Saccharomyces cerevisiae* (drojdia de bere) pot fi utilizate în conceperea unor sisteme celulare utile în studiul antioxidantilor. Deoarece, în mod natural, celulele de *S. cerevisiae* trăiesc în medii bogate în oxigen, este de așteptat ca aceste celule să aibă nevoie, pentru o bună dezvoltare, și de antioxidanți exogeni. Celulele de *S. cerevisiae* reprezintă un bun model pentru studiul *in vivo* a diferitelor sisteme antioxidante și o alternativă atrăgătoare față de culturile de celule provenite din organisme superioare, precum cele de la mamifere.

Celulele aerobe și-au dezvoltat mecanisme de apărare împotriva efectelor de distrugere cauzate de stresul oxidativ, denumite generic ***mecanisme de răspuns la stresul oxidativ***. În ciuda rolului pe care îl au mecanismele de răspuns la stresul oxidativ în menținerea homeostaziei celulare (proprietatea unui organism de a menține, în limite foarte apropiate, constantele mediului său intern), se știe foarte puțin despre modul în care aceste mecanisme acționează sau despre modul cum sunt ele reglate.

³² T. Boekhout, V. Robert, ed (2003). [*Yeasts in food*](#). p.322.

Celulele de *S. cerevisiae* răspund la stresul oxidativ prin activarea multor gene implicate în protecția acestui organism unicelular față de acțiunea dăunătoare a oxidanților. Printre aceste gene se numără și genele care codifică cele două superoxid-dismutaze, *SOD1* și *SOD2*. Superoxide dismutaza este o enzimă antioxidantă prezentă în toate organismele aerobe, catalizând dismutarea superoxidului la O_2 și H_2O_2 . Anionul radical superoxid este un ROS important din punct de vedere biologic, care se obține din variate surse, inclusiv respirația mitocondrială normală sau din activitatea unor enzime, precum xantin oxidaza³³. La om, o cantitate prea mare de superoxid se presupune că este implicată în apariția inflamațiilor, infarcturilor, bolilor cardiovasculare sau cancerului³⁴.

Rolurile benefice și protectoare ale SOD au fost demonstrate într-o gamă largă de boli, atât în stadiul preclinic, cât și clinic³⁵. Deși s-au făcut încercări de utilizare a SOD ca agent terapeutic, efectele au fost modeste³⁶. Astfel a crescut, în mod semnificativ, interesul pentru compușii organici care modulează răspunsul SOD sau care mimează activitatea SOD³⁷.

În particular, Cu,Zn-SOD a fost propusă spre uzul clinic³⁸, dar această enzimă are unele limitări farmacologice, precum costul ridicat, solubilitate lipidică mică, penetrare scăzută în celule, imunogenicitate, labilitate față de acțiunea proteazelor gastrice și intestinale³⁹. Pentru a depăși aceste probleme, complecși metalici cu masă moleculară mică pot fi utilizați ca SOD mimetici, cu potențial de agenți farmacologici⁴⁰. În timp ce mulți complecși ai Cu(II) sau Mn (III) cu activitate SOD-mimetică au fost raportați⁴¹, studiile *in vivo* au demonstrat că activitatea lor este nesatisfăcătoare. Mai mult, majoritatea compușilor SOD-mimetici nu este tolerată de organisme, compușii fiind mai mult sau mai puțin toxici⁴².

³³ Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H, *Free Radic Biol Med*, **2007**, 43, 477

³⁴ a) Finkel T, *Curr Opin Cell Biol*, **2003**, 15, 247; b) Liu H, Colavitti R, Rovira II, Finkel T, *Circ Res*, **2005**, 97, 967; c) McCord JM, Edeas MA, *Biomed Pharmacother*, **2005**, 59, 139

³⁵ a) McCord JM, *Science*, **1974**, 185, 529; b) Maxwell SR, *Drugs*, **1995**, 49, 345

³⁶ a) Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A, *Joint Bone Spine*, **2007**, 74, 324; b) Levin ED, *Curr Alzheimer Res*, **2005**, 2, 191

³⁷ a) Pong K, *Expert Opin Biol Ther*, **2003**, 3, 127; b) Muscoli C, Cuzzocrea S, Riley DP, Zweier JL, Thiemermann C, Wnag ZQ, Salvemini D, *Br J Pharmacol*, **2003**, 140, 445

³⁸ Emerit J, Pelletier S, Likforman J, Pasquier C, Thuillier A, *Free Radic Res Commun*, **1991**, 12-13, 563

³⁹ Rao VS, Goldstein S, Czapski G, *Free Radic Res Commun*, **1991**, 12-13, 67

⁴⁰ [Batinic-Haberle I, Rebouças JS, Spasojević I, *Antioxid Redox Signal*, **2010**, 13, 877](#)

⁴¹ a) Saczewski F, Dziemidowicz-Borys E, Bednarski PJ, Gdaniec M, *Arch Pharm*, **2007**, 340, 333; b) Barik A, Mishra B, Kunwar A, Kadam RM, Shen L, Dutta S, Padhye S, Satpati AK, Zhang HY, Priyadarsini KI, *Eur J Med Chem*, **2007**, 42, 431; c) Fujimori T, Yamada S, Yasui H, Sakurai H, In Y, Ishida T, *J Biol Inorg Chem*, **2005**, 10, 831; d) Schepetkin I, Potapov A, Khlebnikov A, Korotkova E, Lukina A, Malovichko G, Kirpotina L, Quinn MT, *J Biol Inorg Chem*, **2006**, 11, 499; e) Pettinari C, Pettinari R, *Coord Chem Rev*, **2005**, 249, 663; f) Gao F, Chao H, Zhou F, Yuan YX, Peng B, Ji LN, *J Inorg Biochem*, **2006**, 100, 1487; g) Annaraj J, Srinivasan S, Ponvel KM, Athappan P, *J Inor Biochem*, **2005**, 99, 669; h) Egner PA, Kensler TW, *Carcinogenesis*, **1985**, 6, 1167; i) Safavi M, Foroumadi A, Nakhjiri M, Abdollahi M, Shafiee A, Ilkhani H, Ganjali MR, Hosseinimehr SJ, Emami S., *Bioorg Med Chem Lett*, **2010**, 20, 3070; j) Miriyala S, Spasojevic I, Tovmasyan A, Salvemini D, Vujaskovic Z, St Clair D, Batinic-Haberle I., *Biochim Biophys Acta*, **2012**, 1822, 794

⁴² Potapov AS, Nudnova EA, Domina GA, Kirpotina LN, Quinn MT, Khlebnikov AI, Schepetkin IA., *Dalton Trans*, **2009**, 23, 4488

Cu toate acestea, sinteza de structuri mimetice pentru metaloenzyme, iar recent, interesul față de complexii inorganici ca mimetici ai superoxid dismutazei (SOD) au crescut enorm ca volum de muncă⁴³. Sinteza de sisteme de masă moleculară mică, SOD-mimetice prezintă un potențial ridicat în domeniul farmaceutic⁴⁴. Diverși complexi metalici de cupru(II)⁴⁵, fier(II)⁴⁶, mangan(II)⁴⁷ sau mangan(III)⁴⁸ au fost caracterizați și s-au dovedit a fi SOD -mimetici. Structurile SOD-mimetice cele mai frecvent utilizate ca medicamente sunt cele pe bază de mangan, deoarece descompunerea catalizatorului conduce la obținerea *in vivo* a ionului metalic liber, acesta fiind cel mai puțin toxic⁴⁹ dintre toți cei enumerați mai sus.

Scopul acestui studiu a fost acela de a examina posibilitățile de a utiliza celulele de *S. Cerevisiae*, care nu exprimă gena *SOD1*, pentru testarea potențialei activități SOD-mimetice a unor complexi ai cuprului(II) sau a activității Sod1p-modulatoare, încercând, de asemenea, să înțelegem condițiile în care un compus cu potențial bun devine toxic pentru celule. Drojdia s-a dovedit a fi un model eucariot foarte util în studiul efectelor moleculelor mici la nivel celular și o alternativă atractivă la liniile celulare ale mamiferelor și în special la controversatele experimente efectuate pe animale. Aceste studii, nu numai că verifică, *in vitro*, rezultatele experimentelor asupra efectelor protectoare, dar scoate, de asemenea, în evidență posibilele efecte secundare și produșii de metabolism ce se obțin. Se consideră că celule de drojdie generează ROS prin același mecanism ca și celulele mamiferelor și exprimă mulți factori antioxidanți similari⁵⁰.

2.2. Combinațiile complexe ale Cu (II) utilizate

În acest studiu, a fost testată o serie de șase compuși coordinativi mononucleari cu liganzi micști ai ionului de Cu (II): Cu(acac)(tmen)Cl, Cu(acac)(phen)Cl și Cu(acac)(2,2'-bipy)Cl (în care acac⁻ = anionul acetilacetonat, tmen = N,N,N',N',-tetrametil-etilendiamină, phen =1,10-fenantrolina și 2,2'-bipy = 2,2'-bispiridil), respectiv Cu(acac)(tmen)SCN, Cu(acac)(phen)SCN și Cu(acac)(2,2'-bipy)SCN (tabelul C.2).

⁴³ a) Riley, P. D. *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2573, b) Munroe, W.; Kingsley, C.; Durazo, A.; Gralla, E. B.; Imlay, J. A.; Srinivasan, C.; Valentine, J. S., *J. Inorg. Biochem.*, **2007**, 101, 1875.

⁴⁴ Doggrell, S. A. *Drugs of the Future* **2002**, 27, 385

⁴⁵ Fernandes, A. S.; Gaspar, J.; Cabral, M. F.; Caneiras, C.; Guedes, R.; Ruef, J.; Castro, M.; Costa, J.; Oliveira, N. G., *J. Inorg. Biochem.*, **2007**, 101, 849

⁴⁶ Liu, G. F.; Filipovic, M.; Heinemann, F. W.; Ivanovic-Burmazovic, I., *Inorg. Chem.*, **2007**, 46, 8825

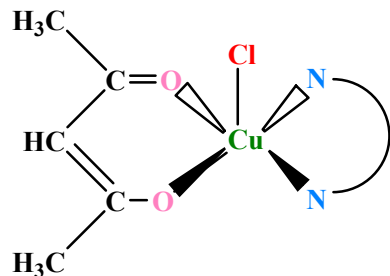
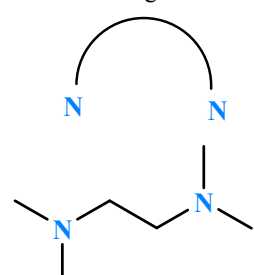
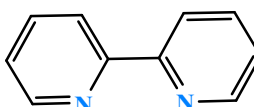
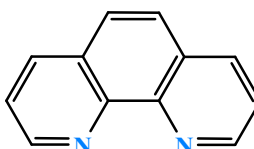
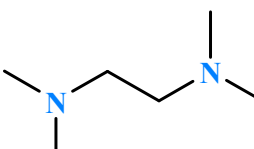
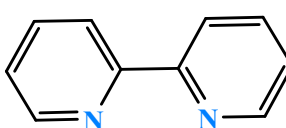
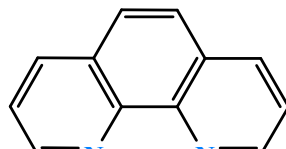
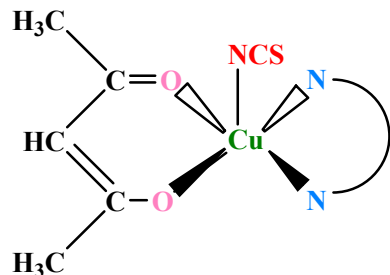
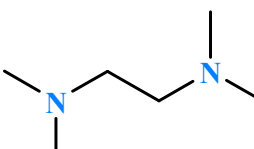
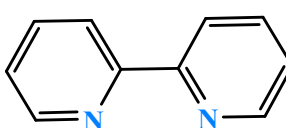
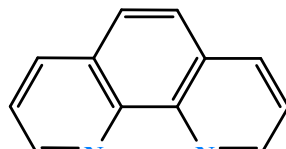
⁴⁷ D'Agata, R.; Grasso, G.; Iacono, G.; Spoto, G.; Vecchio G., *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, 4, 610

⁴⁸ Doctrow, S.; Huffman, K.; Marcus, C. B.; Musleh, W.; Bruce, A.; Baudry, M.; Malfroy, B. Adv., *Pharmacol.*, **1997**, 38, 247

⁴⁹ Riley, P. D., *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2573

⁵⁰ a) Jamieson DJ, *Yeast*, **1998**, 14, 1511-1527; b) Carmel-Harel O, Storz G, *Annu Rev Microbiol*, **2000**, 54, 439

Tabelul C.2. Compuși coordinativi mononucleari de Cu (II) testați

Structură compuși testați	Structura ligandului
	 tmed = N,N,N',N'-tertametiletilen diamină  2,2'-bpy = 2,2' - bibpiridil  1,10 -phen = 1, 10 -fenantrolină  tmed = N,N,N',N'-tertametiletilen diamină  2,2'-bpy = 2,2' - bibpiridil  1,10 -phen = 1, 10 -fenantrolină
	 tmed = N,N,N',N'-tertametiletilen diamină  2,2'-bpy = 2,2' - bibpiridil  1,10 -phen = 1, 10 -fenantrolină

Deoarece rezultate interesante și reproductibile, în direcția de cercetare urmată, au fost obținute pentru compusul $[CuCl(acac)(tmed)]$, în continuare s-au efectat teste de biochimie doar asupra acestui compus.

2.4. Concluzii

Teste inițiale au fost efectuate pe o serie de șase combinații complexe de cupru(II): Cu(acac)(tmen)Cl, Cu(acac)(phen)Cl și Cu(acac)(2,2'-bipy)Cl (în care acac⁻ = anionul acetilacetat, tmen = N,N,N',N',-tetrametil-etilendiamină, phen = 1,10-fenantrolina și 2,2'-bipy = 2,2'-bispiridil), respectiv Cu(acac)(tmen)SCN, Cu(acac)(phen)SCN și Cu(acac)(2,2'-bipy)SCN. Screeningul acestor complecși, pentru concentrația minimă de inhibiție asupra a treizeci și șase de linii celulare a scos în evidență modificări substanțiale în cazul liniei nulumutante *sod1Δ* în combinație cu compusul [CuCl(acac)(tmed)]. Deoarece aceste rezultate s-au dovedit a fi reproductibile, am continuat o serie de teste mai ample pe acest compus.

Noi am descoperit că [CuCl(acac)(tmed)], un complex Cu(II) cu liganzi micști, prezintă, la celulele de drojdie, activitate SOD mimetică, dar și SOD modulatorie. Pe parcursul experimentelor, ne-am întrebat dacă nu cumva activarea Sod1p de către [CuCl(acac)(tmed)] se datorează disocierii complexului din cauza mediului relativ acid al drojdiilor. Deși această îngrijorare nu poate fi complet îndepărtată, datele noastre demonstrează o activare a Sod1p mult mai puternică în cazul complexului, decât în cazul ionilor de cupru.

Compusul acționează ca un SOD mimetic *in vivo*, atunci când celulele de drojdie au fost private de enzima nativă Cu,Zn-SOD, Sod1p, deoarece compusul îmbunătățește atât creșterea celulară, dar are, de asemenea, abilitatea de a inversa fenotipurile asociate superoxidului, precum auxotrofia față de lizină sau sensibilitatea la PQ. Totuși, în prezența Sod1p nativ, comportarea complexului este diferită, acționând mai degrabă ca un modulator al activității Sod1p, modulare ce a fost mult mai ușor de observat în prezența enzimei funcționale Ccs1p. Astfel, [CuCl(acac)(tmed)] enhanced activitatea Sod1p, sugerând faptul că acest compus pătrunde efectiv în celulă. Rămâne însă de cercetat cum anume complexul stimulează activitatea Sod1p în celulele de drojdie.

O posibilitate o reprezintă legarea nespecifică a complexului la biomolecule (inclusiv Sod1p) care posedă grupări Lewis capabile să atace centrul metalic de coordonare al compusului. Dacă acesta este mecanismul, creșterea activității Sod1p detectată de testele efectuate *in gel* poate fi rezultatul cumulativ al activității Sod1p și a compusului. Acest lucru este însă destul de improbabil, deoarece o legare nespecifică ar fi generat numeroase alte benzi ale activității SOD în testele efectuate *in gel*, fapt ce nu a fost observat în niciuna dintre determinări.

O altă posibilitate mai atractivă este că acest compus leagă Sod1p inactiv (*apo-Sod1p*) din celulele de drojdie, oferind Cu(II) în vederea activării Sod1p, similar enzimei Ccs1p⁵¹. Și

⁵¹ Culotta VC, Klomp LW, Strain J, Casareno RL, Krems B, Gitlin JD, *J Biol Chem*, **1997**, 272, 23469

această posibilitate este însă destul de improbabilă, deoarece activarea Sod1p a fost destul de slabă în cazul celulelor *ccs1Δ*.

Este mai plauzibil că [CuCl(acac)(tmed)] activează Sod1p într-o manieră Ccs1p-dependentă prin simpla modificare a stării de oxidare a mediului în care se găsește enzima Sod1p. În mod normal, nivelul de Sod1p activ este păstrat la un minim ce-i permite celulei să se adapteze într-un mod optim la permanenta schimbare a stării de oxidare. Activitatea SOD mimetică intrinsecă a compusului [CuCl(acac)(tmed)] generează O₂ și H₂O₂, conducând la activarea inutilă a Sod1p, care în unele cazuri poate fi dăunătoare. Într-adevăr, stimularea activității Sod1p nu a fost în mod necesar benefică celulelor, singura linie a cărei creștere celulară a fost îmbunătățită de stimularea Sod1p (în afară de *ahp1Δ*, care a prezentat o enzimă Sod1p super-activă) a fost *skn7Δ*. În ceea ce privește celelalte linii celulare, compusul a stimulat activitatea Sod1p, dar nu a îmbunătățit-o precum în cazul liniei sălbatice sau a liniei *yap1Δ*. Efectul dăunător al [CuCl(acac)(tmed)] a fost cel mai bine observat în cazul celulelor *sod2Δ*, a căror sensibilitate față de compușii generatori de superoxid a fost crescută de compusul [CuCl(acac)(tmed)], în ciuda unei activități Sod1p. Acest lucru a fost surprinzător, luând în considerație faptul că în aceleași condiții, compusul anulează toxicitatea PQ față de celulele *sod1Δ*. Această observație sugerează că [CuCl(acac)(tmed)] nu doar neutralizează superoxidul generat în mediu de PQ, dar își și exercită funcția sa în cadrul celulei, unde acționează diferit în funcție de starea de oxidare a celulei. În celulele *sod2Δ*, Sod1p care este localizată în spațiul intermembranar mitocondrial este probabil expusă, din cauza lipsei Sod2p mitocondrial, la atacuri oxidative mult mai importante. Este cunoscut faptul că Sod1p imatur este mai susceptibil la stresul oxidativ și la agregare, iar lipsa Sod2p poate cauza acumularea de forme toxice ale Sod1p în spațiul intermembranar mitocondrial, luând în calcul toxicitatea crescută a [CuCl(acac)(tmed)] față de celulele *sod2Δ*, în prezența agenților generatori de superoxid.

Astfel, cea mai plauzibilă explicație pentru activarea Sod1p este aceea că [CuCl(acac)(tmed)] acționează indirect asupra Sod1p, prin schimbarea redox a mediului intracelular prin intermediul ionului metalic. Nivelele diferite ale activității Sod1p observate la unii nuli mutanți cu stări de oxidare modificate susțin această ipoteză. De luat în considerare este și faptul că cel mai ridicat nivel al Sod1p activ a fost observat la celulele *ahp1Δ* și *tsa1Δ*. Atât *AHP1*, cât și *TSA1* codifică cele două peroxiredoxine citosolice care controlează nivelele alchilhidoperoxizilor și respectiv H₂O₂. La nuli mutanții individuali, nivelul de ROS cel mai probabil crește, conducând la activarea Sod1p printr-un mecanism care nu este încă elucidat. Enzimele SOD1 necesită unele modificări posttrnslacionale pentru a se forma o molecula activă. În afară de cupru și zinc, pentru activarea enzimei este nevoie și de o legătură intramoleculară disulfurică care se formează între două reziduuri cisteină conservate. Când sunt

prezenți în exces, alchilhidoperoxizii și/sau H_2O_2 se pot lega direct la enzima Sod1p inactivă redusă, oxidând cele două cisteine la forma activă. Într-adevăr, am constatat că H_2O_2 exogen poate conduce la activarea Sod1p. Se poate, de asemenea, specula că Hyr1p simte nivelele modificate ale hidroperoxizilor din citosolul celulelor *ahp1Δ* sau *tsa1Δ* și transmite mai departe semnalul pentru activarea Sod1p, celulele *hyr1Δ* prezentând nivele foarte scăzute ale activității Sod1p. La Ahp1p, Tsa1p și Hyr1p defecte în oricare dintre ele poate schimba starea de oxidare a altor proteine ce conțin cisteină, inclusiv Sod1p. Această ipoteză poate fi susținută de observația că nivele subtoxice de Cd^{2+} , inhibă puternic activarea Sod1p, similar agenților reducători precum ascorbatul sau N-acetilcisteina.

Întrebarea care se pune este dacă celulele cu posibile nivele ridicate de hidroperoxizi liberi, necesită cu adevărat activarea Sod1p. În celulele *ahp1Δ*, acest tip de activare a părut benefică și adăugarea de $[CuCl(acac)(tmed)]$ cu activitatea sa SOD intrinsecă extra nu a fost dăunătoare. În celulele *tsa1Δ*, Sod1p hiperactivă observată poate fi corelată cu creșterea celulară deficitară. Totuși, deoarece antioxidanții exogeni, precum ascorbatul sau N-acetilcisteina au omorât celulele *tsa1Δ* în mediul SD, este mai probabil că, în efortul de a rezista stresului oxidativ, celulele *tsa1Δ* recurg la strategii neconvenționale, de tipul activării Sod1p.

Este interesant faptul că deși mutații cu defecte în anihilarea alchilhidroperoxizilor (*ahp1Δ*) sau a H_2O_2 (*tsa1Δ*) din citosol prezintă o activată Sod1p ridicată, celulele fără un important factor de transcripție implicat în răspunsul la stresul oxidativ (*skn7Δ* și *yap1Δ*) preferă să adopte o situație de așteptare cu o formă inactivă apo-Sod1p pregătită pentru a fi folosită doar la nevoie. Acest fapt se datorează probabil prezenței Ahp1p, Tsa1p și Hyr1p constitutivi, care mențin sub control, în condiții normale de creștere, nivelul de hidroperoxizi. Cu toate acestea, Sod1p suferă o activare în prezența compusului $[CuCl(acac)(tmed)]$, atât în celulele *skn7Δ*, cât și în celulele *yap1Δ*, deși în măsuri diferite.

Sod1p activată ar trebui să aibă un rol benefic în creșterea celulară (*ahp1Δ*, *skn7Δ*), totuși există multe indicații că o hiperactivitate a Sod1p poate fi dăunătoare. Acest lucru este știut, fiind raportat faptul că hiperexprimarea Cu,Zn-Sod produce creșterea nivelelor de oxidare al lipidelor și proteinelor⁵², al apoptozei și al activării caspazei 3⁵³, spre deosebire de alte date care demonstrează rolul benefic al hiperexprimării Cu,Zn-SOD.

Prin acest studiu s-a demonstrat că drojdiile pot asigura un model rapid pentru investigarea influențelor modificării nivelului activității SOD asupra celulei și cum diverse condiții celulare pot modula activitatea SOD, furnizând un instrument util pentru studiul complet al potențialilor mimetici sau modulatori ai activității SOD. Mai mult, deoarece

⁵² Lee M, Hyun D, Halliwell B, Jenner P, *J Neurochem*, **2001**, 76, 998

⁵³ Pias EK, Ekshyyan OY, Rhoads CA, Fuseler J, Harrison L, Aw TY, *J Biol Chem*, **2003**, 278, 13294

asocierea unor antioxidanți cunoscuți, precum ascorbatul, cu compusul $[\text{CuCl}(\text{acac})(\text{tmed})]$ ar putea fi, în anumite condiții, dăunătoare creșterii celulare, această combinație poate servi ca punct de plecare în înțelegerea *in vivo* a efectelor toxice a multor SOD mimetici puternici cu activitate *in vitro* demonstrată.

Rezultatele obținute s-au concretizat in următoarele articole si conferințe:

1. Ioana Dumitru, Cristian D. Ene, Codruța C. Paraschivescu, Augustin M. Ofițeru, Augustin M. Mădălan, Baci Ion, Ileana C. Fărcășanu, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 17 (6), **2012**, 961-974
2. Radu Mitrică, Ioana Dumitru, Lavinia L. Ruță, Ileana C. Fărcășanu, *Molecules*, **2012**, 17,
3. Cristian Dobrotă, Domenico Fasci, Niculina D. Hădade, Gheorghe-Doru Roiban, Cristina Pop, Veronika M. Meier, Ioana Dumitru, Mihaela Matache, Guy S. Salvesen, Daniel P. Funeriu, *ChemBioChem*, 13(1), **2011**, 80-84
4. Ioana Dumitru, *Synlett.*, 3, **2011**, 0432-0433
5. Dobrotă Cristian, Bogdan Niculina, Dumitru Ioana, Funeriu Daniel, 2nd EuCheMS Chemistry, Congress, poster, *Torino*, Italia, **2008**
6. Ioana Dumitru, Mihaela Matache, Niculina D. Bogdan, Ion Baci, Daniel P. Funeriu, 2nd International Colloquim on “Physics of Materials”, poster, *Bucuresti*, **2010**
7. Comunicări orale la Sesiunile de Comunicări Științifice Studentești ale Facultății de Chimie, Universitatea din București, în anii 2009 (premiul II), 2010 (III) și 2011 (mențiune)

Alte articole publicate:

1. *Overexpression of the PHO84 gene causes heavy metal accumulation and induces Ire1p-dependent unfolded protein response (UPR) in Saccharomyces cerevisiae cells*, Augustin Ofițeru, Lavinia Ruta, Codruta Rotaru, Ioana Dumitru, Cristian Ene, Aurora Neagoe, Ileana Farcasanu, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94 (2), **2012**, 425-435
2. *Exogenous oxidative stress induces Ca²⁺ release in the yeast Saccharomyces cerevisiae cells*, Popa Claudia; Dumitru, Ioana; Ruta, Lavinia; Danet, Andrei; Farcasanu, Ileana, *FEBS*, 227 (19), **2010**, 4027-4038
3. *Expedient access to fused quinoxalines via Dess-Martin periodinane-mediated cascade cyclizations of unsymmetrical homoallylic phenylenediamides derivatives*, Cristian Dobrota, Jonathan Graeupner, Ioana Dumitru, Mihaela Matache, Codruta C. Paraschivescu, *Tetrahedron Letters*, 51 (9), **2010**, 1262-1264
4. *Protein-Inorganic Array Construction: Design and Synthesis of the Building Blocks*, Niculina Bogdan, Mihaela Matache, Veronika Meier, Cristian Dobrota, Ioana Dumitru,

Gheorghe Roiban, Daniel Funeriu, *Chemistry - A European Journal*, 16 (7), **2010**, 2170-2180

5. *Synthesis of fused dihydro-pyrimido[4,3-d]coumarins using Biginelli multicomponent reaction as key step*, Mihaela Matache, Cristian Dobrotă, Niculina Bogdan, Ioana Dumitru, Lavinia Ruță, Codruța Paraschivescu, Ileana Fărcăsanu, Ion Baci, Daniel Funeriu, *Tetrahedron*, 65 (31), **2009**, 5949-5957
6. *Convenient preparation of unsymmetrical 2,5-disubstituted 1,3,4-oxadiazoles promoted by Dess-Martin reagent*, Cristian Dobrotă, Codruța Paraschivescu, Ioana Dumitru, Mihaela Matache, Ion Baci, Lavinia Ruță, *Tetrahedron Letters*, 50 (17), **2009**, 1886-1888