

Universitatea “Babeş-Bolyai” Cluj-Napoca
Facultatea de Fizică

Takacs István Mihály

Rezumatul tezei de doctorat

**INVESTIGAREA UNOR PROTEINE TRANSPORTOARE
DE OXIGEN PRIN SPECTROSCOPIE RES**

Conducător științific
Prof. Univ. Dr. Grigore Damian

Cluj-Napoca
2013

MULȚUMIRI

Pentru realizarea unei teze de doctorat, pe lângă fundalul științific și experiența practică, este nevoie de o conducere profesională și persistență. Totodată este necesară infrastructura pentru partea practică, precum și existența sprijinului financiar și social care susține acest efort.

Mulțumesc în mod special domnului Prof. Univ. Dr. Grigore Damian, conducătorul științific al tezei de doctorat, având în vedere că pe lângă experiența și cunoștințele domniei sale mi-a pus la dispoziție bibliografia necesară, și m-a ajutat prin înțelegere și conduită umană.

Aduc mulțumiri speciale domnului Conf. Dr. Radu Silaghi-Dumitrescu, domnului Dr. Augustin Cătălin Moț și domnișoarei Dr. Cristina Bischin de la Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică a Universității Babeș-Bolyai din Cluj, pentru sfaturile și observațiile care m-au ajutat prin completarea părții practice a acestei teze în special în domeniul biochimiei.

Comisiei de îndrumare, Prof. Dr. Viorica Șimon, Prof. Dr. Leontin David și Conf. Dr. Vasile Miclăuș, îi datorez mulțumiri deosebite pentru asigurarea fundalului practic de înaltă calitate și pentru ajutorul acordat în timpul cercetărilor. La fel, mulțumesc doamnei Dr. Laura Bolojan pentru că m-a introdus în practica realizării tezei de doctorat, și doamnei Dr. Cristina Gruian contribuind cu îndrumările în perioada petrecută în Germania.

Profesorului Dr. Heinz-Jürgen Steinhoff și echipei lui de la Universitatea din Osnabrück, Germania, îi datorez mulțumiri pentru că mi-au permis dezvoltarea profesională și realizarea experienței în perioada de mobilitate.

Siguranța materială este o condiție esențială a muncii științifice liniștite. Astfel doresc să mulțumesc în mod special pentru suportul financiar asigurat de Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013, cofinanțat prin Fondul Social European, în cadrul proiectului POSDRU/107/1.5/S/7684, cu titlul „Studii doctorale moderne: internaționalizare și interdisciplinaritate”.

Nu în ultimul rând mulțumesc familiei care în ultimii trei ani mi-a asigurat fundalul liniștit necesar muncii de calitate. În special părinților, sorei mele și soției, pentru că au avut încredere în mine și în ideea că pot obține succese prin împlinire în lumea științifică. Au acceptat faptul că dedic majoritatea timpului acestei disertații, au fost răbdători, și pe lângă încurajări m-au asigurat în permanență de dragostea lor.

CUPRINS

INTRODUCERE	4
1. CARACTERIZAREA PROTEINELOR	6
1.1. Proteinele.....	6
1.2. Hemeritrina.....	8
1.3. Hemoglobina	10
2. TEHNICI DE INVESTIGARE A STRUCTURII ȘI A DINAMICII PROTEINELOR	11
2.1. Tehnici de spectroscopie vibrațională	11
2.2. Spectroscopia RMN	12
2.3. Spectroscopia RES	12
3. DERIVATIVE DE NITRONI PRIN SPECTROSCOPIE RES	15
3.1. Radicalii nitroxidici și tehnica de marcarea de spini	15
3.2. Efectul oxigenului molecular asupra radicalilor nitroxidici	15
3.3. Detecția radicalilor liberi folosind capcane de spini	18
4. PROTEINE STUDIATE PRIN MARCAREA DE SPINI	21
4.1. Materiale și metode	21
4.2. Studiul hemeritrinei și hemoglobinei în diferite medii.....	22
4.3. Studiul de denaturare a hemeritrinei și a hemoglobinei	24
CONCLUZII	27
BIBLIOGRAFIE	28
LISTA DE PUBLICAȚII	32

Cuvinte cheie: spectroscopie RES, marcări de spini, hemeritrină, hemoglobină, denaturare proteine, dinamica proteinelor, entalpie, entropie, energia liberă Gibbs

INTRODUCERE

Evoluția biochimiei a fost explozivă în ultimul secol rivalizând cu alte discipline precum fizica și chimia. Datorită acestei evoluții știm că sistemele vii sunt bazate pe elemente organice amestecate cu elemente anorganice și că legile fizicii se aplică în același fel și în sistemele vii. Prin combinarea ideilor din chimie și fizică, complexitatea sistemelor vii pot fi studiate și înțelese mai ușor.

Proteinele au caracteristici unice între macromolecule, participă la fiecare reacție care sunt prezente în sistemele biologice și suportă o cantitate mare de activități biologice.

Studiul proteinelor reprezintă o importanță mare în comunitatea științifică modernă, deoarece studiile de genetică moleculară au arătat că mai multe boli provin din defecțiuni de proteine. Prin studierea și înțelegerea comportamentului proteinelor informațiile obținute ajută în dezvoltarea industriei farmaceutice.

Această lucrare prezintă rezultatele obținute din studiul a două proteine transportoare de oxigen, hemeritina și hemoglobina, folosind tehnica de marcarea de spini (site directed spin labeling - SDSL) combinată cu spectroscopia RES [Altenbach et al 1989, Altenbach et al 1990]. De asemenea lucrarea poate fi considerată prima marcarea de spini a hemeritrinei [Takacs et al 2013a].

Prin folosirea spectroscopiei RES în studiul proteinelor avem avantajul că probele studiate sunt proteine vii și pot fi investigate într-un mediu asemănător mediului lor nativ.

Cele două proteine, hemeritina și hemoglobina, au o importanță mare datorită capacității de a lega și de a transporta oxigen, de asemenea, recent, hemeritina a fost propusă ca o soluție alternativă ca și înlocuitor de sânge [Alayash 2004, Tsuchida et al 2009, Mot et al 2010, Fischer-Fodor et al 2011].

Lucrarea este structurată în patru capitole principale .

Capitolul 1 prezintă proteinele, o descriere generală a elementelor structurale de proteine fiind prezentate împreună cu funcția și proprietățile specifice. Sunt prezentați aminoacizii și proprietățile lor, sunt definite lanțurile polipeptidice, sunt descrise structurile secundare, terțiare și cuaternare. Pe lângă introducerea generală, sunt prezentate cele două proteine studiate, hemeritina și hemoglobina. De asemenea sunt descrise, structura detaliată, dimensiunea și aranjamentele spațiale împreună cu funcția și rolul lor în legarea și transportul de oxigen.

Capitolul 2 prezintă tehnicile care sunt utilizate în prezent în studiul proteinelor (spectroscopie IR, spectroscopie Raman, circular dichroismul și tehnica RMN), care sunt prezentate ca informații comparative cu tehnica folosită în această lucrare. Bazele spectroscopiei de rezonanță electronică de spini în undă continuă sunt descrise împreună cu spectrometrul în bandă X.

Capitolul 3 prezintă o scurtă introducere a derivatelor de nitroni, din care fac parte și marcările de spini (spin label) și compușii folosiți în detecția radicalilor liberi cu tehnica de capcane de spini (spin trap). În același timp un subcapitol descrie tehnica de marcarea de spini (site directed spin labeling), avantajele și diferite versiuni a marcărilor folosite. Rezultatele publicate sunt prezentate [Takacs et al 2011a, Takacs et al 2011b] în baza unor studii de oximetrie prin spectroscopie RES

folosind marcărul de spin TEMPO pentru detecția indirectă a cantității de oxigen din sistemele biologice mai exact în liposomi. Al treilea subcapitol prezintă rezultatele publicate [Bolojan et al 2012] din studiul de detecție a radicalilor liberi generate din superoxidul de potasiu folosind capcana de spin DEPMPO. În acelaș timp este discutată și prezentată și tehnica de spin trapping.

Capitolul 4 se concentrează pe studiul proteinelor, hemeritina și hemoglobina, prin site directed spin labeling, folosind marcărul de spin MTSSL. Prima parte a acestui capitol descrie procedura și rezultatele, eficiențele, obținute folosind marcărul de spin MTSSL, rezultate care au fost publicate [Takacs et al 2013a]. Urmează studiul de dinamică a proteinelor, [Takacs et al 2013b, Takacs et al 2013c], unde proteinele separat au fost investigate în diferite medii controlate cu glicerol, PEG-4000 și albumină. Agenții au fost selectați pentru a putea crea un mediu artificial controlat care seamănă cu mediul nativ al proteinelor. Glicerolul schimbă viscozitatea soluției dar în acelaș timp fiind o moleculă mică nu are efect asupra proteinei studiată. PEG-4000 fiind o moleculă relativ mare apar ciocnirile între proteine și mediu. De asemenea albumina este o proteină relativ mare care are proprietatea de a se atașa de alte proteine și în cazul acesta a fost studiat efectul de suprapopulație [Ellis 2001].

A doua parte a acestui capitol tratează degradarea proteinelor. S-au selectat diverși agenți care au efect de degradare, precum clorură de guanidină, pH și temperatura. Proteinele au fost studiate separat în aceleași condiții precum și determinându-se și parametrii termodinamici, energia Gibbs liberă, entalpia, entropia și căldura specifică. S-au folosit două metode, fiecare fiind descris detaliat, una se bazează pe diferența de arie a spectrului față de spectrul proteinei în stare nativă, iar cealaltă metodă se bazează pe timpul de corelare mediu a proteinei. Fiecare fiind o variabilă dependentă este folosită pentru a forma curbele de degradare pentru fiecare proces. Rezultatele obținute, urmează să fie publicate [Takacs et al 2013d], sunt conform exemplurilor din literatură demonstrând că ambele metode pot fi folosite ca și o metodă alternativă pentru calorimetrie a proteinelor. În acelaș timp rezultatele obținute justifică că metoda de marcarea de spini a proteinelor prin spectroscopie RES este o metodă importantă care poate fi folosită ca metodă alternativă în diferite studii de proteine.

1. CARACTERIZAREA PROTEINELOR

1.1. Proteinele

Acest capitol prezintă unul dintre cele mai importante componente ale unui organism viu, proteinele. Proteinele se găsesc în toate organismele vii, de la bacterii la mamiferi, reprezintă aproape 50 % a greutatei celulare, fiind prezente în cel mai mare raport comparat cu alte biomoleculi [Whitford 2005].

Proteinele pot adapta diferite funcții biologice ca și transport, receptor, transmitere semnal sau depozitare, dar în ciuda diversității mari a proteinelor toate au o structură de bază comună, ele sunt formate dintr-un lanț linear de aminoacizi numit și lanț polipeptidic. În ciuda diversității ridicate de funcții și structură a proteinelor doar 20 de aminoacizi sunt cunoscute și toate au o compoziție similară.

Aminoacizii sunt compuși care conțin un grup carboxil la un capăt și un grup amino în vecinătate legat de atomul de carbon din grupul carboxil. Grupul carboxil donează un proton grupului amino într-un fel ca în absența unui mediu acid sau bazic aminoacidul poartă o sarcină negativă și pozitivă în același timp, fenomen numit și zwitterion.

Aminoacizii se găsesc în formă solidă cristalină albă, cu proprietăți foarte atipice moleculelor organice, și cu punctul de topire între 200 - 300°C [Whitford 2005]. Sunt legate într-o rețea cristalină iar grupul încărcat este responsabil pentru conductivitatea electrică în soluții apoase și pentru momentul dipolic ridicat.

Compușii cum ar fi aminoacizii cu posibilitatea de a acționa atât ca acid cât și bază au o proprietate importantă, punctul izoelectric pI . Punctul izoelectric este valoarea pH-ului la care numărul de sarcini pozitive pe moleculă este egal cu numărul de sarcini negative. Punctul izoelectric este dat de pK -ul mediu în care există fenomenul de zwitterion [Buxbaum 2007].

Când mai mulți aminoacizi sunt legați între ei, ei alcătuiesc o legătură peptidică. O legătură peptidică se formează când gruparea amino a unui aminoacid ia parte într-o reacție cu gruparea carboxil a unui alt aminoacid într-o formă de condensare rezultând din eliminarea apei [Whitford 2005]. Mai mulți aminoacizi legați prin legături peptidice rezultă într-o serie numită reziduu. Versiunile mai scurte sunt reziduuri de peptide iar versiunile mai lungi și complexe sunt numite polipeptide. Diversitatea aminoacizilor servește pentru o mulțime de funcții diferite în proteine. Deși la prima vedere poate părea că proteinele sunt spirale polipeptidice întâmplătoare, ele nu sunt. Există câteva interacțiuni intermoleculare care influențează aranjarea structurală a lanțurilor polipeptidice într-o anumită structură cu scopul ca proteina finală să poată să-și desfășoare activitatea.

Aranjamentul liniar de aminoacizi [Alberts 2002] într-o secvență proteică se numește structura primară a proteinei. Structura primară este aranjamentul bi-dimensional a unei proteine care se numește și coloana vertebrală a proteinei. Structura primară începe cu grupul amino, terminalul N, și se termină cu gruparea carboxil, terminalul C.

Datorită diferitelor unghiuri de legături dintre elemente proteinele au o structură tri-dimensională, care se numește și structura secundară. Există trei

unități structurale de bază care formează structura secundară a proteinelor: helixurile α , foile β și legăturile γ ; restul structurilor sunt o combinație a acestor.

Pentru determinarea structurii secundare a unei proteine, există câteva metode disponibile, cum ar fi difracția cu raze X, microscopie electronică de proteine cristalizate sau rezonanța magnetică nucleară a proteinelor în soluții.

Prin legarea elementelor structurii secundare obținem o forma tri-dimensională, care în mare parte este stabilizat de interacțiuni noncovalente dintre aminoacizi, fiind structura terțiară a proteinei. Această structură descrie conformația globală a proteinei sau mai precis descrie aranjarea spațială a elementelor de structură secundară, Figura 1.1.1.

Structura terțiară este determinată de diferite interacțiuni ionice sau Van der Waals. O forță dominantă în formarea structurii terțiare este efectul hidrofobic, rezultând ca aminoacizii polari să se așeze pe suprafață, de ex. proteinele globulare [Whitford 2005, Alberts 2002]. Stabilitatea structurii terțiare este rezolvată de legăturile de hidrogen și punțile disulfidice (legături S - S) dintre cisteine [Buxbaum 2007].

De multe ori o proteină conține mai multe lanțuri polipeptidice, care rezultă într-o formă funcțională cu o structură cuaternară. Un exemplu simplu pentru proteină cu structură cuaternară este hemoglobina, conține patru subunități (lanțuri polipeptidice) și are o structură tetramerică. Structura cuaternară poate fi clasificată în funcție de numărul de subunități; dimer, trimer, tetramer, octamer etc. În același timp dacă subunitățile sunt identice sau diferite vorbim de homo sau hetero. Structura cuaternară este foarte similară cu structura terțiară cu diferența că interacțiunile sunt prezente între subunități [Whitford 2005].

Cum am văzut și în cazul structurii secundare, terțiare și cuaternare a proteinelor, ele sunt alcătuite din interacțiuni slabe care pot fi rupte chiar și prin schimbarea condițiilor mediului înconjurător [Buxbaum 2007].

Un factor extern important în denaturare este căldura, creșterea temperaturii într-un sistem conduce la mișcare moleculară ridicată care ulterior poate duce la ruperea legăturilor de hidrogen. Dacă aceste legături sunt rupte unele structuri devin instabile, helixurile α , care rezultă într-o slăbiciune integrală a structurii proteice. Alți agenți care au efect de denaturare asupra proteinelor sunt concentrațiile ridicate de săruri, uree, clorură de guanidină sau solvenți (etanol, acetonă). Sărurile au efect de perturbare asupra legăturile ionice, iar schimbarea în pH poate induce modificări în ionizarea aminoacizilor care poate rezulta în legături ionice rupte.

Unele proteine sunt mult mai sensibile decât altele la denaturare, câteva proteine pot fi denaturate prin căldură iar după ce sistemul a fost răcit sau denaturantul a fost îndepărtat ele revin la forma lor inițială și își reiau activitatea.

Proteinele pot fi clasificate conform funcției lor în trei categorii majore: proteine fibroase, proteine de membrană și proteine globulare.

Proteinele fibroase sunt structurale, formează filamente lungi și sunt insolubile în soluții apoase. Funcția lor majoră reiese din numele lor, ele alcătuiesc fibrele existente în corp. Au o rezistență și o rigiditate ridicată și țin structura împreună. Ei au o secvență aminoacidică individuală și nu au o structură terțiară adevărată.

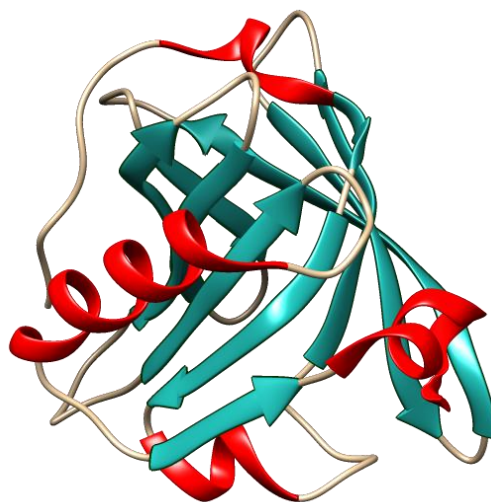


Figura 1.1.1. Reprezentarea structurii terțiare a beta-lactoglobulinei. Imaginea a fost generată folosind programul de vizualizare UCSF Chimera [Pettersen et al 2004] folosind coordonatele de la înregistrarea 2GJ5 [Yang et al 2008] din Baza de Date a Proteinelor (Protein Data Bank).

Proteinele de membrană sunt de obicei receptori, oferă canale pentru molecule încărcate pentru a trece prin membrana celulelor sau contribuie în adeziunea celulară care permite identificarea celulei. Ele dețin o cantitate ridicată de legături de hidrogen.

Proteinele globulare sunt proteine formate din lanțuri compacte de aminoacizi, care sunt adesea îndoite în forme sferice. Principala diferență dintre proteine fibroase și globulare este că proteinele globulare sunt solubile în soluții apoase. Ele pot avea mai multe funcții ca și catalizatori biologici, mecanisme de transport, rol de reglementare ca și element structural din interiorul celulelor.

1.2. Hemeritrina

Hemeritrina (Hr) este un transportor de oxigen [Kurtz 2003] cu o formă oligomerică. Este o proteină respiratorie responsabilă pentru transportul și depozitarea oxigenului în sângele nevertebratelor marine. Deși numele conține cuvântul hem, hemeritrina este lipsită de gruparea hem din grupul responsabil de legarea oxigenului, compus din doi atomi de fier [Farmer et al. 2000; Jin et al. 2002; Kryatov et al. 2005].

Hemeritrina poate fi găsită în nevertebratele marine, brachiopodi, sipunuclide și anelide. Acestea sunt viermi sedentari și mici nevertebrate găsite în apele adânci, cu o lungime de 4 – 10 cm. Cea mai studiată și utilizată este hemeritrina octamerică care provine din sipunuclidul *Phascolopsis gouldii* sau viermele de arahide. Studiile efectuate în această lucrare sunt de asemenea bazate pe această versiune a proteinei.

Hemeritrina este formată din 8 subunități identice primind structura principală homooctamerică, Figura 1.2.1, dar de asemenea poate exista și în alte forme oligomerice ca și monomer [Langeman et al 1969], dimer [Sieker et al 1981],

trimer [Smith et al 1983] sau tetramer [Sieker et al 1981]. Forma octamerică are o masă totală de 108 kDa.

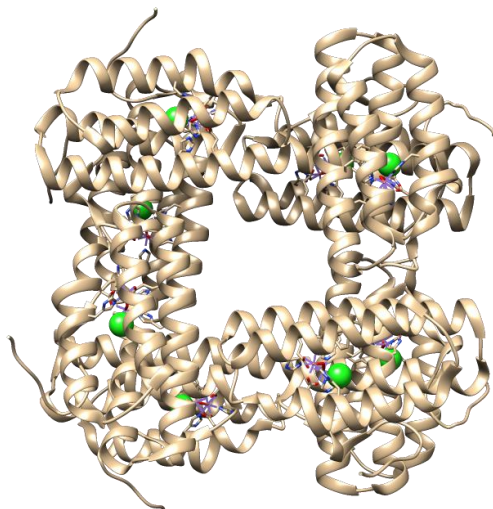


Figura 1.2.1. Reprezentarea hemeritrinei octamrice *Phascolopsis gouldii*. Imaginea a fost generată folosind programul de vizualizare UCSF Chimera [Pettersen et al 2004] folosind coordonatele de la înregistrarea 1I4Y [Farmer et al 2001] din Baza de Date a Proteinelor (Protein Data Bank).

Conform literaturii [Stenkamp 2004] subunitățile sunt cilindrice cu o dimensiune de 40 Å lungime, o lățime de 20 Å și o masă de 13.6 kDa conținând 114 aminoacizi. Subunitățile sunt compuse din patru helixuri α antiparalele având la o treime de la un capăt complexul de fier binuclear responsabil pentru legarea de oxigen [Stenkamp 2004]. Subunitățile au în lanțul aminoacidic în poziția 51C o cisteină care face proteina să fie un candidat ideal pentru studii prin spin labeling combinată cu spectroscopie RES.

Octamerul *Phascolopsis gouldii* descris de [Stenkamp 2004] are o structură cu o simetrie 422 (D₄) și o dimensiune de 60 x 60 x 40 Å cu un canal de 20 Å lat care trece prin centrul proteinei.

Complexul di-fier [Farmer et al. 2000; Jin et al. 2002; Kryatov et al. 2005] din hemeritrina pe lângă oxigen (O₂) mai poate lega și alte molecule cum ar fi azida, clorura sau oxidul de azot [Garbett et al 1969, Nocek et al 1988]. Proteina poate exista în două forme: legată (azidomet- și oxihemeritrina) sau nelegată (met- și deoxihemeritrina) când complexul de fier nu leagă o moleculă adițională. Forma este determinată de geometria centrului de fier care este diferită pentru cele două forme.

Hemeritrina nu are culoare când se află în formă deoxi dar își schimbă culoarea în roz la oxigenare. Funcția ei de a lega oxigenul printr-o procedură reversibilă [Kurtz 2003] este activitatea biologică principală a acestei proteine și ușoara schimbare structurală la punctul de legare pentru a permite intrarea oxigenului în incinta complexului.

1.3. Hemoglobina

Hemoglobina (Hb), este o proteină globulară, transportoare de oxigen care conține gruparea hem, ea se găsește în eritrocite și are ca activitatea biologică principală transportul de oxigen de la organul respiratoric la țesut. Studiile din această lucrare sunt bazate pe hemoglobina obținută din sânge de bovină, *Bos taurus*.

Proteina este alcătuită din patru subunități cu o masă moleculară totală de 62 kDa. Conține două subunități alfa, compus din 142 aminoacizi, și două subunități beta, compus din 145 aminoacizi. Proteina are în fiecare subunitate beta o cisteină nativă în poziția $\beta 92C$, făcând proteina să fie un candidat ideal pentru studii prin spin labeling combinată cu spectroscopie RES.

Structura cristalină a fost determinată de [Perutz et al 1960, Perutz 1965] din care reiese că ambele subunități sunt formate din helixuri α , 6 mai lungi și 2 mai scurte numite de la A la H. Conform [Paoli et al 2004] structura globulară are un diametru de 50 - 55 Å și subunitățile au o dimensiune de 47 x 35 x 22 Å. Datorită grupului hem, hemoglobina are o culoare roșie.

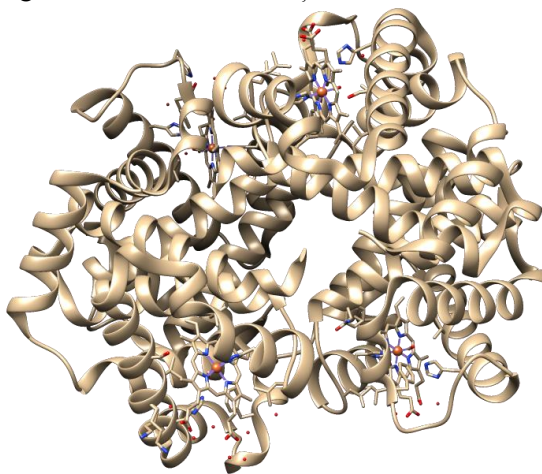


Figura 1.3.1. Reprezentarea hemoglobinei *Bos taurus*. Imaginea a fost generată folosind programul de vizualizare UCSF Chimera [Pettersen et al 2004] folosind coordonatele de la înregistrarea 2QSS [Aranda et al 2009] din Baza de Date a Proteinelor (Protein Data Bank).

Hemoglobina poate oscila între două stări cu diferențe vizibile în structura cuaternară [Perutz 1970, Perutz 1972]. Starea relaxată (R) când se schimbă în formă legată oxigen, iar starea tensă (T) când este în stare nelegată deoxigen.

Schimbarea între aceste două stări este rezultatul unei rotații de 15° între dimeri și o translație de 0.8 \AA rezultând într-o schimbare în distanța dintre centrele de fier de la 40 la 33 Å [Paoli et al 2004]. Această transformare se petrece când hemoglobina ajunge în plămâni unde concentrația de oxigen este mai ridicată pentru o legare mai ușoară.

Dioxidul de carbon eliberat din țesut se leagă diferit față de oxigen deoarece el se leagă de terminalul N a subunităților alfa [Nelson et al 2000] și formează carbaminohemoglobina [Guyton et al 2006].

2. TEHNICI DE INVESTIGARE A STRUCTURII ȘI A DINAMICII PROTEINELOR

Au fost aplicate diverse metode și abordări pentru a studia structura și dinamica proteinelor în ultimii 30 de ani, nu există o abordare exactă de a studia dinamica de proteine fiecare având avantaje și dezavantaje. Tehnicile aplicate momentan de comunitatea științifică pot fi clasificate în două categorii; tehnici de spectroscopie vibrațională (spectroscopie IR, spectroscopie Raman și dicroismul circular) și tehnici de spectroscopie de rezonanță (spectroscopie RMN și RES).

În lucrarea de față metoda aleasă pentru studiul proteinelor este spectroscopia de rezonanță electronică de spini (RES) combinată cu tehnica de marcarea de spini (SDSL) [Bordignon et al 2007], dar înainte de a prezenta metoda aleasă va fi prezentată o scurtă introducere despre celelalte metode.

2.1. Tehnici de spectroscopie vibrațională

Spectroscopia IR este bazată pe absorbția radiației, din domeniul de infraroșu a spectrului electromagnetic, de molecule la frecvențe specifice care sunt egale cu frecvențele energiilor de tranziție. Radiația din domeniul de infraroșu nu are energie așa de mare încât să inducă tranziții electronice deci absorbția de infraroșu este limită la compuși care au diferențe de energii mici și o stare vibrațională.

Spectroscopia FTIR s-a dovedit o tehnică avantajoasă pentru a studia proteine și lipide, poate fi obținută o rezoluție scăzută a structurii proteinei și tehnica permite studiul proteinelor în mediul apropiat mediului nativ.

Spectroscopia Raman este tehnica complementară a spectroscopiei IR, și exploatează dezavantajele acestuia. Această tehnică este bazată pe împrăștierea luminii de moleculele care se află în stare de vibrație.

Contrar tehnicii IR în acest caz moleculele nu trebuie să posede un moment dipolic permanent, având vibrație Raman activă când acesta cauzează schimbare în polarizabilitate. Cu această abordare obținem informații despre caracterul covalent al moleculei, și este o tehnică sensibilă la compoziție, legături, mediu și structură cristalină.

Spectrul Raman a proteinelor, acizilor nucleici și a lipidelor conține un număr ridicat de benzi discrete care este o amprentă a structurii tridimensionale, a dinamicii și a interacțiunilor. Avantajul metodei este faptul că este o tehnică noninvazivă dar în același timp costul unui spectrometru Raman este destul de ridicat.

Dicroismul circular este o altă tehnică care este aplicată în studiul proteinelor, teoria acestei tehnici se bazează pe absorbția diferențială a luminii polarizate din stânga și dreapta. Lumina polarizată circular este reprezentată ca o sumă a două lumini polarizate linear a căror amplitudine este egală dar cu o diferență de fază de $\pm\pi/2$. După ce lumina din ambele direcții trece prin probă ea rămâne polarizată dar amplitudinea vectorului electric va fi diferită pentru ambele componente, rezultând în felul acesta într-o lumină polarizată elipticală. Această elipticitate și diferența în absorbție este studiată și măsurată.

Această tehnică este folosită mai mult în determinarea structurii secundare a proteinelor aflate în soluții.

2.2. Spectroscopia RMN

Spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară (RMN) este tehnica de investigare care folosește rezonanța spinului nuclear (I) plasat într-un câmp magnetic (B_0) extern și o radiație de microunde.

Conform mecanicii cuantice spinul nuclear se aliniază paralel sau antiparalel cu un câmp magnetic extern în $2I+1$ direcții. Dacă proba este iradiată cu o radiație din domeniul undelor radio protonul va absorbe energie și o tranziție este indusă din starea de energie joasă în starea de energie ridicată. Aplicând energia corectă și prin inducerea acestor tranziții găsim spectrul de absorbție din care sunt obținute informațiile.

Instrumentele folosite prin spectroscopie RMN au un cost ridicat datorită magneților superconductor și datorită sistemului de răcire necesare acestuia. În ciuda costurilor ridicate această tehnică este una foarte populară în studii de structură a proteinelor. De obicei proteinele studiate prin RMN sunt marcate uniform cu izotopi ^{13}C și ^{15}N . Ca și toate metodele de studiu și această metodă are limitările sale, proteinele cu o masă moleculară mai mare de 35 kDa reprezintă o dificultate deoarece timpul de rotație corelațională crește împreună cu dimensiunea proteinei care duce la lărgiri de linii și scăderea raportului semnal/zgomot. Un alt aspect al proteinelor largi este faptul că conțin un număr ridicat de atomi care poate rezulta în linii spectrale suprapuse greu interpretabile.

2.3. Spectroscopia RES

Conceptul spectroscopiei de rezonanță electronică de spin (RES) este una similară rezonanței magnetice nucleare (RMN) dar în acest caz spinii electronului sunt excitați. Această tehnică s-a dovedit foarte utilă în diferite domenii și este o tehnică aplicată des în studii de dinamică a proteinelor deoarece este posibilă investigarea probei în mediul similar mediului nativ fără a avea limitări cauzate de dimensiunea sau complexitatea probei. Singurul dezavantaj al acestei tehnici provine din faptul că nu toate proteinele conțin un electron neîmperecheat care poate fi folosit pentru a obține semnal RES. Această problemă a fost rezolvată de Wayne L. Hubbell și colegii lui [Altenbach et al 1989, Altenbach et al 1990] prin dezvoltarea metodei de marcarea de spini, metodă care permite legarea unui spin marcat care conține un electron neîmperecheat, sursa de semnal RES, de proteina studiată. Acest marcă de spin (spin label) este un radical nitroxidic și conține un centru paramagnetic activ, un electron neîmperecheat pe legătura N - O (^{14}N , $I = 1$).

După ce marcă de spin, care conține electronul neîmperecheat, este atașat de proteină proba poate fi studiată prin spectroscopie RES. Plasând electronul într-un câmp magnetic omogen $B_0 = (0, 0, B_0)$ spinul electronic se va alinia paralel sau antiparalel cu direcția câmpului. Numărul cuantic de spini m_s va lua valorile $\pm 1/2$ datorită orientării de cuantificare a momentului angular iar în acest caz cele două valori descrise de ecuația 2.3.1 vor fi posibile pentru momentul magnetic.

$$\mu_{s,z} = \pm \frac{1}{2} \cdot g_e \cdot \beta_e \quad (2.3.1)$$

Dipolul magnetic $\vec{\mu}$ plasat într-un câmp magnetic are o energie descrisă de ecuația 2.3.2 și permite două nivele de energie cu o diferență dependentă de câmpul magnetic descris de ecuațiile 2.3.3 – 2.3.5.

$$E = -\vec{\mu} \cdot \mathbf{B}_0 = -\mu_z \cdot B_0 \quad (2.3.2)$$

$$E_\alpha = +\frac{1}{2} \cdot g_e \cdot \beta_e \cdot B_0 \quad (2.3.3)$$

$$E_\beta = +\frac{1}{2} \cdot g_e \cdot \beta_e \cdot B_0 \quad (2.3.4)$$

$$\Delta E = E_\alpha - E_\beta = g_e \cdot \beta_e \cdot B_0 \quad (2.3.5)$$

Pentru a obține o tranziție de la un nivel la celălalt o energie $h\nu = \Delta E$ trebuie aplicată, pentru condiția de rezonanță energia aplicată trebuie să fie egală cu diferența de energie dintre nivele și perpendiculară pe câmpul magnetic.

În cazul sistemelor de radicali nitroxidici, cu $S = 1/2$ și $^{14}NI = 1$, două mari interacțiuni sunt prezente, interacțiunea Zeeman electronică și interacțiunea de despiciere hiperfină. Interacțiunea Zeeman electronică este interacțiunea dintre câmpul extern magnetic și electronul neîmperecheat, este descrisă în termeni de mecanică cuantică de ecuația 2.3.6.

$$\hat{H}_{EZ} = \frac{\beta_e}{\hbar} \cdot g \cdot B_0 \cdot \hat{S} \quad (2.3.6)$$

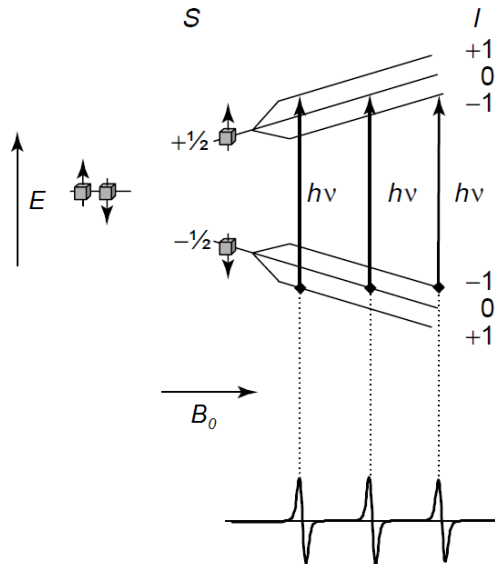


Figura 2.3.1. Interacțiunea Zeeman electronică și alinierea spinilor electronici cu câmpul magnetic extern împreună cu efectul de despiciere hiperfină și tranzițiile permise. Imagine adaptată de la [Fajer 2000].

Termenul g este g -tensorul și \hat{S} este operatorul de spin. Tensorul g servește ca și o a amprenta sistemul și definește simetria ei (izotropică, axială, anizotropică).

$$\hat{H}_{\text{HF}} = \hat{S} \cdot \mathbf{A} \cdot \hat{I} \quad (2.3.7)$$

Efectul de despicare hiperfină este datorată cuplării spinului electronic cu spinul nuclear, și rezultă într-o despicare a liniei de rezonanță conform numărului cuantic magnetic al nucleului m_I . Această interacțiune este descrisă de ecuația 2.3.7, unde \mathbf{A} reprezintă tensorul hiperfin.

Regulile de selecție $\Delta m_S = \pm 1$ și $\Delta m_I = 0$ definesc tranzițiile permise între nivelele de energii care rezultă în spectrul cu forma specifică a radicalilor nitroxidici, Figura 2.3.1.

Studiile RES a proteinelor sunt caracterizate de dinamică și mișcări în domeniul nanosecundelor. Probele în soluții apoase sunt caracterizate de difuzie rotațională și mișcare, aceste fenomene sunt descrise de timpul de rotație corelațională τ_c . Timpul de rotație corelațională este definit de relația Stokes-Einstein, ecuația 2.3.8.

$$\tau_c = \frac{4 \cdot \pi \cdot \eta \cdot a^3}{3 \cdot k_B \cdot T} = V \cdot \frac{\eta}{k_B \cdot T} \quad (2.3.8)$$

În această relație a reprezintă raza moleculei, η viscozitatea soluției, T temperatura absolută și k_B este constanta Boltzmann.

3. DERIVATIVE DE NITRONI PRIN SPECTROSCOPIE RES

Spectroscopia RES are o plajă largă de aplicații studii in vivo și in vitro a diferitelor sisteme biologice și detecție de radicali liberi. Pentru a performa aceste studii pe sisteme care nu au semnal RES, au fost proiectați compuși speciali. O categorie importantă a acestor compuși este clasa de nitroni. Nitronii sunt compuși organici care conțin un N-oxid, o legătură N – O și un grup funcțional. Ele sunt categorizate în două mari subclase, radicalii nitroxidici care sunt folosiți în tehnica de marcarea de spini având posibilitatea de a lega de proteina studiată și nitronii care sunt folosiți în tehnica de capcane de spini. A doua categorie este folosită în cazul în care detecția directă nu este posibilă, capcanele de spini reacționează cu radicalii liberi cu viață scurtă formând aducți stabili care pot fi detectați prin spectroscopie RES.

3.1. Radicalii nitroxidici și tehnica de marcarea de spini

Folosind conceptul de marcarea de spini [Altenbach et al 1989, Altenbach et al 1990] combinată cu spectroscopie RES este posibilă investigarea proteinelor în mediul similar mediului nativ fără probleme în cazul sistemelor complexe sau supradimensionate [Bordignon et al 2007, Hubbell et al 1996, Hubbell et al 1998, Klug et al 2008, Fleissner et al 2009].

Radicalii nitroxidici se atașează de proteine folosind aminoacidul de cisteină deoarece conțin grupul tiol care reacționează cu gruparea funcțională a marcării de spini formând punți disulfidice [Klare et al 2009]. Există o varietate de grupuri funcționale: metanetiosulfonat [Berliner et al 1982], maleimid [Griffith et al 1966] sau iodoacetamid; toate au același lucru în comun, ele se leagă covalent de grupul sulfhidril din cisteină.

În cazul în care proteina nu conține cisteină nativă prin mutarea genetică acest aminocid poate fi introdus în poziții care nu sunt importante în termeni de structură și funcționalitate. Dacă proteina studiată conține mai multe cisteine și dorim să evităm marcarea fiecăruia, acele cisteine sunt mutate în alanină sau serină, în așa fel încât rămânem doar cu poziția dorită pentru marcarea.

Există o listă lungă de marcări de spini, pentru acest studiu a fost folosit marcarea MTSSL [Berliner et al 1982] care are cea mai mică influență asupra proteinei studiate [Klare et al 2009].

3.2. Efectul oxigenului molecular asupra radicalilor nitroxidici

Rezultatele prezentate în acest subcapitol au fost publicate [Takacs et al 2011a, Takacs et al 2011b].

Cantitatea oxigenului din sistemele vii joacă un rol important în diferite acitivități biologice iar monitorizarea acestei cantități este importantă. Una dintre tehnicile folosite pentru detecția indirectă a oxigenului din sisteme biologice este oximetria RES [Hyde et al 1989]. Tehnica se bazează pe interacțiunea oxigenului paramagnetic cu radicalul nitroxidic din probă cauzând efectul Heisenberg de lărgire a liniei spectrale [Hyde et al 1989, Seeling et al 1976].

În acest studiu a fost folosit marcărul de spin TEMPO, el fiind un radical nitroxidic neatașabil de proba studiată, acest spin marcăr a fost închis în lipozomi. Lipozomii au fost creați din lecitină 5 mg/ml în soluție tampon de 10 mM PBS la pH 7.4. Pentru a obține forma sferică ele au fost sonificate pentru 5 minute după care marcărul liber de spin a fost adăugat în concentrație de 5 mM. Amestecul a fost incubat peste noapte după care marcărul exces a fost îndepărtat prin centrifugare. Trei probe au fost create unul fiind saturat cu oxigen, unul în condiții atmosferice și unul saturat cu argon. În acelaș timp marcăr de spin liber a fost preparat în condiții identice de saturare cu oxigen, argon și condiții atmosferice pentru a obține largimea de linie de referință.

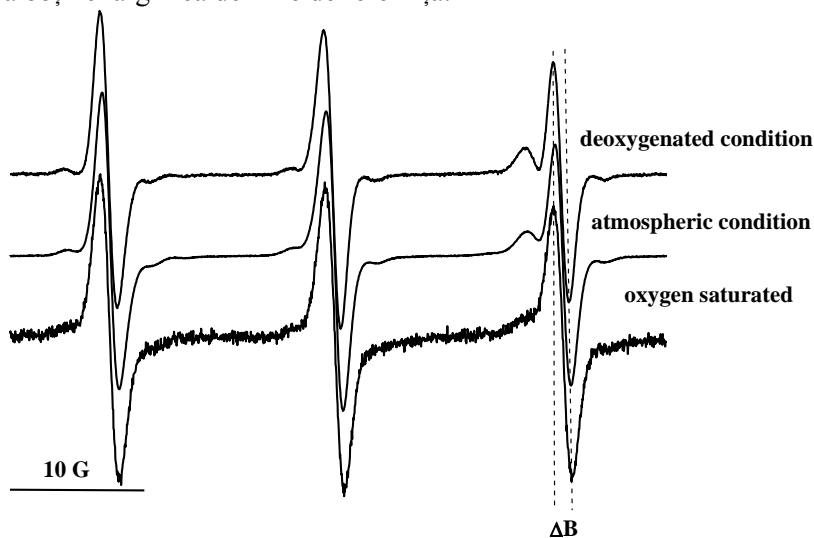


Figura 3.2.1. Spectrul RES a TEMPO-ului încapsulat în lipozomi sub diferite condiții de oxigenare. Imagine adaptată de la [Takacs et al 2011a].

Conform informațiilor descrise de [Pake et al 1959, Subczynski et al 2006] diferența de lărgire de linie este definită de ecuația 3.2.1 și este dependentă de variația concentrației de oxigen din soluție.

$$\Delta B = 4 \cdot \pi \cdot R \cdot k \cdot p \cdot \{D(O_2) + D(SL)\} \cdot ([\Delta O_2]) \quad (3.2.1)$$

Conform literaturii [Alexeeva et al 2002], concentrația de oxigen într-o soluție saturată cu oxigen la temperatura camerei, este 220 μM. Cu această informație este posibilă determinarea cantității de oxigen din sistemele studiate folosind valorile obținute pentru lărgirile de linii.

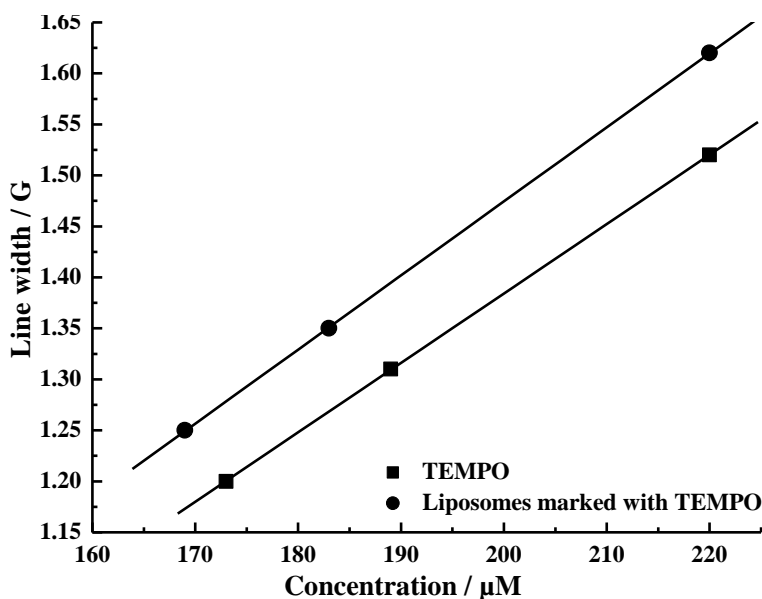


Figure 3.2.2. Variația lărgirii de linii conform creșterii cantității oxigenului din proba studiată. Imagine adaptată de la [Takacs et al 2011a].

Schimbările în lărgimile de linii sunt minore dar de observat, și este evident că liniile hiperfine sunt influențate de schimbările mediului înconjurător. Rezultatele arată că lărgirile sunt linear proporționale cu creșterea concentrației de oxigen din soluție care în acelaș timp are și un efect de schimbare asupra formei spectrului.

După cum a mai fost menționat, cantitățile de oxigen joacă un rol important în sistemele biologice iar posibilitatea de a detecta această cantitate sau de a cuantifica este un avantaj și un rol important revine spectroscopiei RES, folosind radicali nitroxidici.

3.3. Detecția radicalilor liberi folosind capcane de spini

Rezultatele prezentate în acest subcapitol au fost publicate în [Bolojan et al 2012].

În metabolismul celular este posibil ca să se formeze specii reactive ai oxigenului care ulterior pot produce diferite boli [Hallivell 1997, Freeman 1982, Fantone 1985]. Acești radicali liberi ai oxigenului au o durată de viață foarte scurtă și cea mai bună metodă de detecție a lor este prin tehnica de capcane de spini folosind nitroni ca și capcane de spin prin spectroscopie RES [Spasojevic 2010]. Prin folosirea capcanei de spini DEPMPO este posibilă monitorizarea radicalului liber de superoxid generat din superoxidul de potasiu.

Superoxidul de potasiu (KO_2) este folosit în echipamente respiratorice pentru a produce oxigen din dioxid de carbon și vapori de apă. Soluția de stoc de superoxidul de potasiu a fost obținut din 1 g de KO_2 dizolvat într-un volum de 1 ml de DMSO care a fost agitat timp de 5 minute după care excesul de superoxid de potasiu a fost îndepărtat prin centrifugare la 700 rpm. Trei reacții au fost pregătite prin metoda descrisă de [Reiter et al 2000, Jia et al 2008]. Reacția A a fost produsă prin adăugarea unei cantități de 1 μl de soluție stoc KO_2 la 99 μL 50 mM soluție tampon PBS conținând 10 mM de DEPMPO și 0.1 mM de DTPA. Reacția B a fost indus din 10 μl KO_2 în 90 μl 50mM PBS cu conținut de 15 mM DEPMPO și 0.1 mM DTPA. Reacția C a fost inițiat din 20 μl KO_2 la 80 μl 50 mM PBS cu conținut adițional de 20 mM DEPMPO și 0.1 mM DTPA.

Superoxidul, O_2^- este generat după dizolvarea superoxidului de potasiu în DMSO, care după contactul cu mediul apos va forma legături de hidrogen și se va transforma în HOO^- și HO^- [Afanas'ev 1989, Singh Evans 2006]. Acești radicali liberi sunt confirmați folosind capcana de spini DEPMPO prin spectroscopie RES, deoarece conform [Bacic et al 2008, Stolze et al 2000] ele formează spin aducți stabili diferențiabil.



Din simularea spectrelor, folosind programul WINSIM 2002 [Duling 1994] au fost obținute rezultatele prezentate în Tabel 3.3.1 care sunt consistente cu valorie din literatură [Frejaville et al 1995, Bacic et al 2008, Mojovic et al 2005]. Valorile constantelor hiperfine obținute pentru reacția A sunt conform literaturii [Mojovic et al 2005, Ouari et al 2011], și identifică două componente a radicalilor OH într-un raport de 15 % și 85 %. În reacția B radicalii OH sunt prezenți într-un procent de 83 % iar radicalii OOH doar într-un procent de 17 %. În reacția C radicalul OOH este identificat prin două componente într-un raport de 57 % și 35 % iar radicalul OH are o contribuție de 7% la spectrul final.

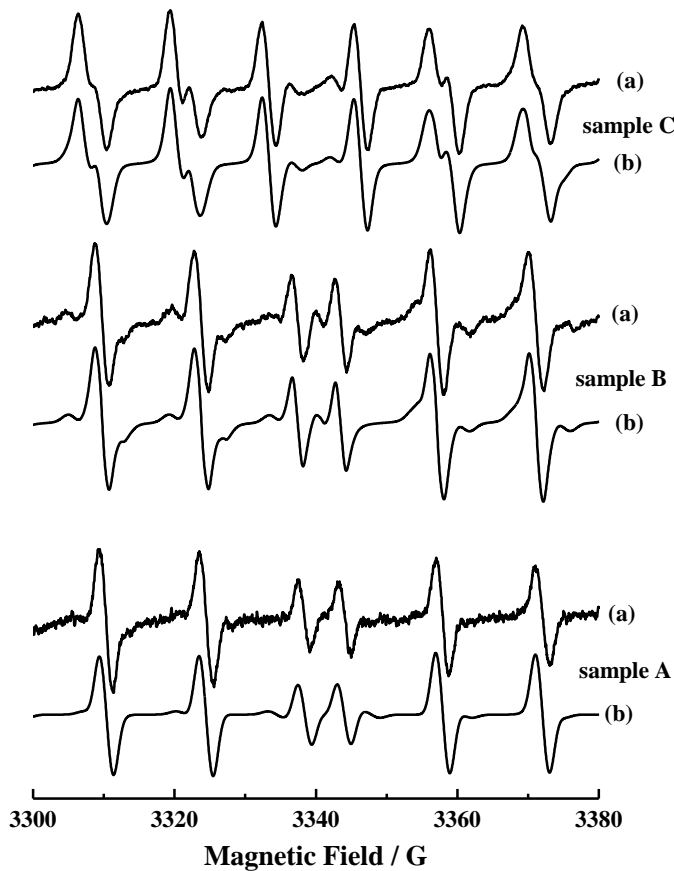


Figura 3.3.1. Reprezentarea spectrului RES experimental (a) și cel simulat (b). Imagine adaptată de la [Bolojan et al 2012].

Hyperfine (G)	DEPMPO/OH				DEPMPO/OOH			
	Sample A		Sample B	Sample C	Sample A	Sample B	Sample C	
	Conformer I	Conformer II					Conformer I	Conformer II
a_N	14.12	14.04	14.53	14.4	-	13.07	13.01	13.07
a_N^β	13.26	13.28	14.07	13.26	-	9.22	10.63	11.15
a_P	50.4	50.62	51.38	47.42	-	49.6	49.46	50.68
a_H^γ (1H)	0.89	0.96	1.07	1.01	-	0.91	0.87	0.96
a_H^γ (6H)	0.43	0.44	0.39	0.41	-	0.48	0.34	0.41

Tabel 3.3.1. Valorile constantelor hiperfine a spin aducților DEPMPO pentru cele trei reacții..

Studiul evoluției în timp a reacției A a rezultat într-o degradare rapidă de 10 min a spin aducțului DEPMPO/OH, în cazul reacției B stabilitatea aducților era mai mare și măsurabilă chiar și după 25 de minute iar reacția C are o degradare tip

DEPMPO/OOH pentru un timp de 25 min după care forma spectrului se schimbă în forma unui spectru DEPMPO/OH.

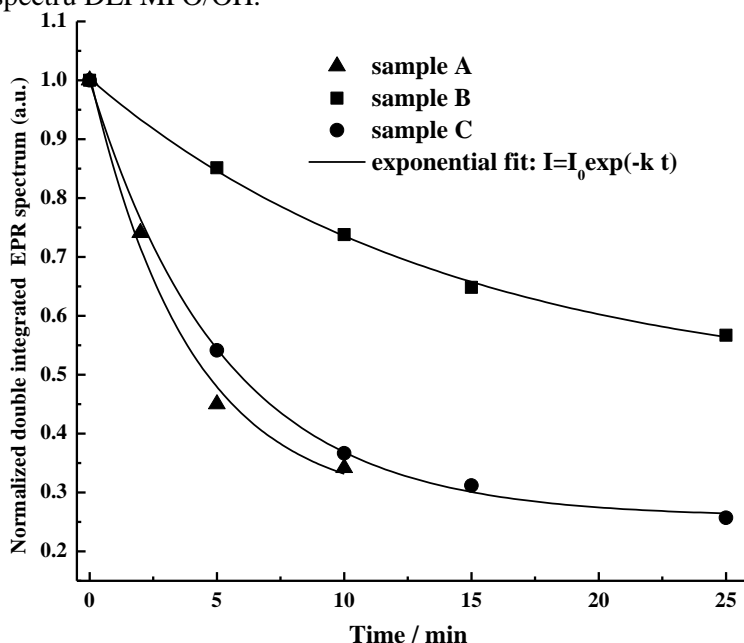


Figura 3.3.2. Curele de degradare pentru aducții de spin a superoxidului-DEPMPO. Figură adaptată de la [Bolojan et al 2012].

Curbele de degradare a celor trei reacții sunt reprezentate în Figura 3.3.2, iar timpul de înjumătățire a spin aducților DEPMPO, determinate conform [Khan et al 2003, Bilsky et al 1996], sunt următoarele: pentru reacția A 2.7 min, pentru reacția B 10 min iar pentru reacția C 3.6 min. Acești timpi de înjumătățire exprimă stabilitatea aducților generați de capcana de spin și în acelaș timp au o mare dependență de cantitatea de superoxid de potasiu și DEPMPO folosit în reacție [Singh Evans 2006].

4. PROTEINE STUDIATE PRIN MARCAREA DE SPINI

4.1. Materiale și metode

Hemeritrina folosită în acest studiu a fost preparată și purificată conform protocolului descris în articolul [Mot et al 2010]. Hemoglobina folosită a fost extrasă și purificată de Dr. Cristina Bischin. Marcărul de spin MTSSL a fost dizolvat în DMSO și a fost preparată o soluție stoc de 100 mM.

Proteinele au fost suspendate în soluție tampon PBS și spălate cu un agent de reducere, DTT cu o concentrație de 10 mM timp de 2 ore la 4°C. DTT-ul a fost eliminat din sistem prin centrifugare folosind filtre Millipore de 10 kDa. Probele au fost centrifugate cu o centrifugă Beckman J21B de 6 ori la 4°C, 5000 rpm pentru un interval de 30 de min fiecare. După eliminarea DTT-ului din sistem marcărul de spin a fost adăugat cu un exces de 10 ori la fiecare cisteină, probele au fost incubate peste noapte la 4°C. Excesul de MTSSL a fost eliminat din sistem prin centrifugare în filtre Millipore de 10 kDa la 5000 rpm, 4°C pentru 30 min de 5 ori în total. După marcarea abrevierea de R1 [Czogalla et al 2007] este folosită pentru spin label, Hr51R1 și Hb92R1.

Eficiența de marcarea a fost determinată pentru fiecare probă și rezultatele sunt următoarele: 91 % eficiență de marcarea pentru hemeritrină respectiv 82 % pentru hemeritrină în proba în care pasul cu spălarea cu DTT a fost omis, iar 97 % eficiență de marcarea în cazul hemoglobinei. Procedura de marcarea a acestor proteine și rezultatele au fost publicate [Takacs et al 2013a].

Măsurătorile RES au fost efectuate pe un spectrometru RES Bruker-Biospin EMXmicro cu un rezonator TE-102 echipat cu control de temperatură în banda X. Frecvența de microunde a fost setată la 9.45 GHz, o putere de 4 mW cu o frecvență de modulare de 100 kHz, o modulație de amplitudine de 1 G și a fost folosită o atenuare de microunde de 17 dB. Probele măsurate se aflau în capilare de cuarț într-un volum de 15 μL.

Spectrele obținute au fost simulate folosind programul RES pentru radicali nitroxidici Multi-Component EPR Fitting v2 versiunea 495, un program LabVIEW făcut de Dr. Christian Altenbach de la Universitatea din California, Los Angeles, California (<https://sites.google.com/site/altenbach/labview-programs/epr-programs/multicomponent>). Calculele și reprezentările au fost efectuate în programul OriginPro 8.0.

4.2. Studiul hemeritrinei și hemoglobinei în diferite medii

Spectrul RES a hemeritrinei marcate cu spini (Hr51R1) este reprezentat în Figura 4.2.1.a, împreună cu spectrul simulat iar spectrul hemoglobinei marcate (Hb92R1) poate fi găsit la Figura 4.2.1.b. Cum s-a mai menționat, hemeritrina poate exista în alte forme decât octamer, în stare monomerică [Langeman et al 1969], dimerică [Sieker et al 1981], trimerică [Smith et al 1983] sau tetramerică [Sieker et al 1981]. Acest lucru a fost confirmat și de datele obținute din simulare. Simularea spectrelor de hemeritrina s-a realizat cu ajutorul a 3 componente iar simularea spectrelor de hemoglobina cu ajutorul a 2 componente. Rezultatele obținute pentru parametrii RES sunt reprezentate în Tabel 4.2.1 pentru hemeritrina marcată și Tabel 4.2.2 pentru hemoglobina marcată, rezultate publicate [Takacs et al 2013a].

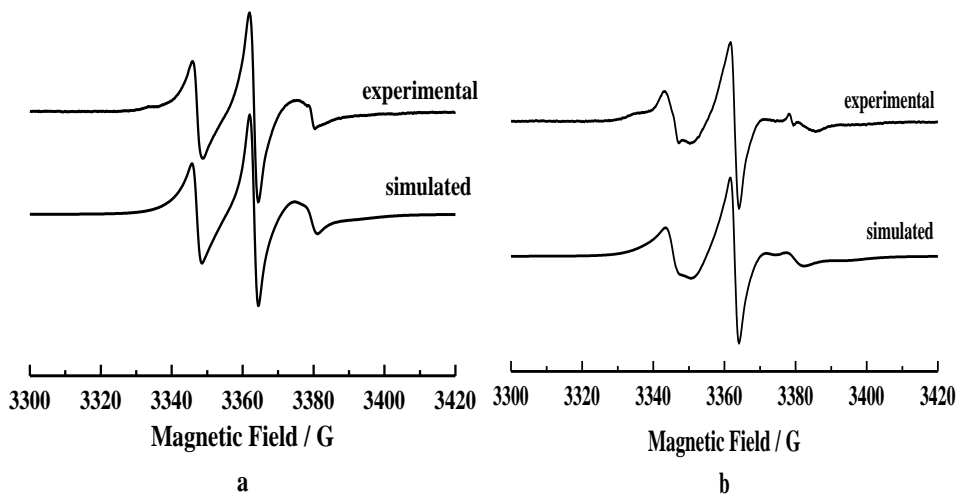


Figura 4.2.1.a. Spectrul RES experimental și simulat a hemeritrinei marcate. **b.** Spectrul RES experimental și simulat a hemoglobinei marcate.

Cele trei componente folosite în simularea spectrului de hemeritrină marcată au fost interpretate conform structurii proteinei. Componenta rapidă corespunde conformației monomerice, componenta lentă corespunde conformației native octamerice fiind prezent în cel mai mare raport iar componenta intermediară corespunde unui amestec de diferite conformații dimerice, trimerice și tetramerică.

Proteinele marcate au fost analizate în diferite medii cu vâscozitate controlată prin diferiți agenți, rezultatele acestui studiu pot fi găsite la [Takacs et al 2013b, Takacs et al 2013c]. S-a folosit 0 -85 % m/m glicerol ca agent care schimbă vâscozitatea soluției dar fiind o moleculă mică nu interacționează cu proteina, 0 – 45 % m/m PEG-4000 agent care schimbă vâscozitatea soluției și fiind o moleculă cu o dimensiune mare interacționează cu proteina prin ciocniri iar 0 – 200 mg/ml albumină bovină (BSA) a fost utilizată pentru a studia efectul de suprapopulare [Ellis 2001] în mediul înconjurător.

Analiza spectrelor de hemeritrina în prezența glicerolului prin simulare a condus la următoarele rezultate, fracțiunea structurii octamerice are o creștere de la 68.34 % la 84.03 % cu o schimbare în timpul de rotație corelațională de la 4.26 ns la 25.6 ns în timp ce fracțiunea intermediară scade de la 22.57 % la 14.82 % având

o schimbare în mobilitate de la 3.5 ns la 10.1 ns iar componenta monomerică scade de la 9.09 % la o contribuție de 1.15 % cu o schimbare în mobilitate de la 1.16 ns la 4.06 ns. În prezența PEG-4000 conformația octamerică își schimbă fracțiunea de la 68.34 % la 86.02 % în timp ce timpul de rotație corelațională se schimbă de la 4.26 ns la 18.5 ns, conformația intermediară de la 22.57 % la 13.98 % cu o schimbare în mobilitate de la 3.5 ns la 9.19 ns iar conformația monomerică are a o variație de la 9.09 % la 2.4 % și o variație în mobilitate de la 1.16 ns la 2.45 ns. În prezența BSA următoarele schimbări în conformație au fost observate: conformația octamerică își schimbă fracțiunea de la 68.34 % la 59.23% în timp ce timpul de rotație corelațională variază de la 4.26 ns la 7.54 ns; conformația intermediară variază de la 22.57 % la 21.27 % cu o schimbare în mobilitate de la 3.5 ns la 4.28 ns iar componenta rapidă crește de la 9.09 % la 19.05 % cu o schimbare în mobilitate de la 1.16 ns la 2.16 ns.

Hr51R1	Comp. fraction (%)	Rotational correlation time, τ_c (ns)	Hyperfine tensor A values			g- tensor values		
			A_x	A_y	A_z	g_x	g_y	g_z
Comp. 1	68.34	4.26	7.35	7.65	33.02	2.0087	2.0067	2.0032
Comp. 2	22.57	3.5	8.25	8.55	32.05	2.0085	2.0065	2.0045
Comp. 3	9.09	1.16	8.55	8.85	31.56	2.0085	2.0065	2.0041

Tabel 4.2.1. Valorile parametrilor RES obținute prin simulare pentru hemeritrina marcată.

Hb92R1	Comp. fraction (%)	Rotational correlation time, τ_c (ns)	Hyperfine tensor A values			g- tensor values		
			A_{xx}	A_{yy}	A_{zz}	g_{xx}	g_{yy}	g_{zz}
Comp. 1	21.21	3	9.83	10.13	33.68	2.00704	2.00504	2.00393
Comp. 2	78.79	4.73	5.9	6.2	34.76	2.00802	2.00602	2.00229

Tabel 4.2.2. Valorile parametrilor RES obținute prin simulare pentru hemoglobina marcată.

În cazul hemoglobinei marcate rezultatele obținute prin folosirea glicerolului au fost următoarele, prima componentă scade în fracțiune de la 21.21 % la 13.59 % în timp ce timpul de rotație corelațională se modifică de la 3 ns la 6.15 ns iar a doua componentă are o variație în fracțiune de la 78.79 % la 86.41 % cu o modificare în mobilitate de la 4.73 ns la 9.45 ns. În studiul unde PEG-4000 a fost folosită componenta 1 are o schimbare în fracțiune de la 21.21 % la 19.63 % în timp ce timpul de rotație corelațională se modifică de la 3 ns la 6.44 ns, iar a doua componentă se modifică în fracțiune de la 78.79 % la 80.37 % în timp ce mobilitatea este afectată cu o schimbare în timpul de rotație corelațională de la 4.73 ns la 8.61 ns. Prin prezența albuminei în sistemul studiat s-a produs o variație în fracțiunea primei componente de la 21.21 % la 18.09 % în timp ce timpul de rotație corelațională s-a schimbat de la 3 ns la 3.56 ns iar a doua componentă a fost afectată cu o schimbare de la 78.79 % la 81.91 % în fracțiune și cu o schimbare în mobilitate de la 4.73 ns la 5.34 ns.

4.3. Studiul de denaturare a hemeritrinei și a hemoglobinei

Acest capitol prezintă rezultatele obținute din studiul de denaturare a hemeritrinei și a hemoglobinei marcate cu spini. Folosind spectroscopia RES au fost determinate prin două metode parametri termodinamici, energia Gibbs liberă în absența denaturantului, entalpia, entropia și căldura specifică. Studiile de denaturare din care se pot determina acești parametri se bazează pe studiul curbelor de degradare. Aceste curbe de degradare sunt obținute prin reprezentarea unor variabile dependente împotriva efectului de denaturare [Klug et al 1995, Klug et al 1998]. Două metode au fost folosite și comparate în generarea curbelor de degradare, prima metodă fiind variabila dependentă diferența ariei dublei integrale a spectrului RES în diferite stadii de degradare față de aria dublei integrale a spectrului RES când proteinele se află în stare nativă. A doua metodă folosește ca variabilă dependentă timpul mediu de rotație corelațională, luând în considerare și fracțiunea diferitelor componente spectrale. Aceste variabile sunt reprezentate în funcție de agentul de denaturare, concentrația de clorură de guanidină, temperatură sau pH după care o sigmoidală Boltzmann este fitată la punctele reprezentate obținând astfel curbele de denaturare (f_D) pentru fiecare proces. Aceste curbe de denaturare sunt o reprezentare a fracției denaturate, f_D , pe o scală de la 0 la 1 în funcție de denaturant.

Proteinele au fost denaturate prin metodă chimică folosind clorură de guanidină care are efect similar ureei într-o concentrație de 0 – 5 M, după ce curba de denaturare a fost obținută prin ambele metode folosind ecuațiile 4.3.1 – 4.3.2 a fost determinată energia Gibbs liberă în absența denaturantului.

$$K_{eq} = \frac{f_D}{1 - f_D} \quad (4.3.1)$$

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K_{eq} \quad (4.3.2)$$

$$\Delta G = \Delta G^0 - m[\text{denaturant}] \quad (4.3.3)$$

Folosindu-ne de faptul că sistemul se află în echilibru [Pace 1986, Kellis et al 1989] când fracțiunea denaturată a proteinei este egală cu fracțiune în stare nativă (punctul de tranziție C_m) deoarece parametrul de echilibru, K_{eq} , este 1 iar energia Gibbs liberă este 0 și din restul ecuației 4.3.3 putem afla energia Gibbs liberă în absența denaturantului reprezentând stabilitatea proteinei. Datele obținute pentru cele două proteine marcate sunt reprezentate în Tabel 4.3.1 pentru hemeritrina marcată iar în Tabel 4.3.2 pentru hemoglobina marcată cu spini.

Hr51R1	ΔG^0 (kcal·mol ⁻¹)	m (kcal·mol ⁻¹ ·M ⁻¹)	C_m (M)
Method 1	6.26	2.53	2.47
Method 2	5.74	2.47	2.33

Tabel 4.3.1. Parametrii termodinamici ai hemeritrinei marcate determinate prin cele două metode.

Hb92R1	ΔG^0 (kcal·mol ⁻¹)	m (kcal·mol ⁻¹ ·M ⁻¹)	C_m (M)
Method 1	2.21	1.07	2.06
Method 2	2.68	1.28	2.08

Tabel 4.3.2. Parametrii termodinamici ai hemoglobinei marcate determinate prin cele două metode.

Curbele de denaturare determinate prin denaturare termică, pe un interval de 20 – 60 °C, pot fi analizate utilizând ecuațiile van't Hoff 4.3.4 – 4.3.5 (analiza van't Hoff), pentru a determina entalpia van't Hoff și entropia sistemului în punctul de tranziție (T_m) unde sistemul se află în echilibru pentru a folosi aceste valori împreună cu valoarea energiei Gibbs în absența denaturantului pentru a determina entalpia, entropia și căldura specifică a sistemului folosind ecuațiile 4.3.6 – 4.3.8 [Becktel and Schellman 1987].

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S = -R \cdot T \cdot \ln K_{eq} \quad (4.3.4)$$

$$\ln K_{eq} = -\frac{\Delta H}{R \cdot T} + \frac{\Delta S}{R} \quad (4.3.5)$$

Valorile obținute din analiza van't Hoff pentru cele două proteine pot fi găsite în Tabel 4.3.3 în cazul hemeritrinei și în Tabel 4.3.4 în cazul hemoglobinei.

Hr51R1	ΔH_{vHoff} (kcal·mol ⁻¹)	ΔH (kcal·mol ⁻¹) 293K	ΔS_m (cal·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)	ΔS (cal·K ⁻¹ ·mol ⁻¹) 293K	T_m (K)	ΔC_p (cal·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)
Method 1	104.70	39.26	325.81	112.62	321.36	2307.23
Method 2	107.65	26.67	335.42	71.45	320.95	2897.17

Table 4.3.3. Rezultatul analizei van't Hoff și restul parametrilor termodinamici pentru hemeritrina marcată prin ambele metode.

Hr51R1	ΔH_{vHoff} (kcal·mol ⁻¹)	ΔH (kcal·mol ⁻¹) 293K	ΔS_m (cal·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)	ΔS (cal·K ⁻¹ ·mol ⁻¹) 293K	T_m (K)	ΔC_p (cal·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)
Method 1	33.46	13.18	103.23	37.47	324.11	651.72
Method 2	35.21	23.23	109.10	70.16	322.80	401.98

Table 4.3.4. Rezultatul analizei van't Hoff și restul parametrilor termodinamici pentru hemoglobina marcată prin ambele metode

$$\Delta H = \Delta H^0 + \Delta C_p \cdot (T - T_0) \quad (4.3.6)$$

$$\Delta S = \Delta S^0 + \Delta C_p \cdot \ln \frac{T}{T_0} \quad (4.3.7)$$

$$\Delta G(T) = \Delta H^0 - T \cdot \Delta S^0 + \Delta C_p \cdot (T - T_0 - T \cdot \ln \frac{T}{T_0}) \quad (4.3.8)$$

Proteinele au fost investigate în diferite medii cu o varietate de pH a soluției tampon. Zona acidică, pH 3, 4, 5, 6 a fost realizată folosind soluție de tampon de citrat; pentru pH 7, 7.2, 7.6, 7.8 fosfat de sodiu s-a folosit ca și soluție tampon iar pentru pH 8, 9, 10, 12 soluție de tampon de borat a fost folosit. Conform literaturii [Bhadresh and Jayant 2001] în jurul punctului de tranziție, pH_m , logaritmul parametrului de echilibru este linear dependentă de pH și dependentă de protonarea și deprotonarea soluției în care se află.

$$\log K_{eq} = \Delta v \cdot (pH - pH_{ref}) \quad (4.3.9)$$

Parametrul Δv este numărul de protoni schimbați prin intermediul procesului de denaturare și poate fi determinat folosind ecuația 4.3.10 [Ibarra-Molero et al 1999].

$$\Delta G(pH) = \Delta G^0 + (\ln 10) \cdot R \cdot T \cdot \Delta v \cdot (pH - pH_{ref}) \quad (4.3.10)$$

Folosind cele două metode au fost determinate curbele de denaturare separat pentru zona acidică și pentru zona bazică a scalei de pH. Rezultatele obținute pentru protonarea și deprotonarea hemeritrinei maracte se găsesc în Tabel 4.3.5 iar pentru hemoglobina marcată în Tabel 4.3.6.

$\Delta\nu$	Method 1	Method 2
Acidic Range	7.33	8.12
Basic Range	-1.80	-3.51

Tabel 4.3.5. Schimbul de protoni în denaturarea cu pH pentru hemeritrina marcată.

$\Delta\nu$	Method 1	Method 2
Acidic Range	0.857	1.44
Basic Range	-2.42	-2.39

Tabel 4.3.6. Schimbul de protoni în denaturarea cu pH pentru hemoglobina marcată.

Rezultatele și procedurile prezentate în acest capitol urmează să fie publicate în [Takacs et al 2013d].

CONCLUZII

Spectroscopia RES s-a dovedit a fi un instrument foarte important în analiza sistemelor biologice datorită sensibilității și a acurateței. Prin utilizarea tehnicii de marcarea de spini în combinație cu spectroscopia RES a hemeritrinei și a hemoglobinei în diferite medii am obținut rezultatele așteptate. Fiecare schimbare de mediu a fost reflectat în forma spectrului și în același timp în valorile obținute din simulare.

Radicalii nitroxidici și capcanele de spini au o gamă largă de aplicație ele pot fi folosite pentru diferite detecții directe dacă acest lucru este posibil cum ar fi în cazul proteinelor dar în același timp și în detecția indirectă, de exemplu oximetria sau detecția radicalilor liberi cu viață foarte scurtă.

Studiul de marcarea a hemeritrinei este primul studiu de acest gen, fiind prima marcarea a acestei proteine. De asemenea există posibilitatea de a studia o proteină importantă, datorită capacității de legare de oxigen, propus ca soluție alternativă pentru înlocuitori de sânge [Alayash 2004, Tsuchida et al 2009, Mot et al 2010, Fischer-Fodor et al 2011], printr-o tehnică alternativă poate fi considerat un avantaj.

Studiul de denaturare prezintă două metode care pot fi folosite pentru a determina parametri termodinamici pentru proteine, și în același timp poate fi determinată stabilitatea proteinelor. Prin ambele metode au rezultat valori apropiate, o dovadă ca ambele metode sunt bune și pot fi folosite. În același timp valorile obținute în această lucrare sunt conform valorilor aflate în literatură.

Câteva exemple din literatură pentru hemoglobina umană [Ip and Ackers 1977, Valdes and Ackers 1977a, Valdes and Ackers 1977b] entalpia a fost determinată să fie $23.5 - 24.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, iar entropia $40.4 - 46.1 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}$, aceste valori sunt valori apropiate de valorile obținute în această lucrare pentru hemoglobina bovină. Energia Gibbs în absența denaturantului este puțin mai scăzută decât cea determinată de [Haynie 2001] fiind între $3.6 - 5.1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ pentru hemoglobina umană. Diferența poate fi rezultatul diferențelor între cele două tipuri de proteine și a altor numeroase factori.

Entalpia determinată de [Pace et al 1998] pentru diferite versiuni a ribonucleozei au fost găsite între $68 - 126 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, iar entropia a fost determinată între $218 - 388 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}$, căldura specifică a acestor proteine este între $1.3 - 1.9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ iar energia Gibbs liberă $2.8 - 9.3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Datele obținute pentru energia Gibbs în absența denaturantului de [BinSheng 2011, Halim et al 2008, Kumar et al 2005, Greene and Pace 1974] pentru β - lactoglobulină arată o stabilitate de $11.7 - 12.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, iar pentru α - chymotrypsin $8.3 - 8.7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, și albumina umană (HSU) $5.98 - 6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, și BSA $4.04 - 4.6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, din faptul că ultimele două proteine fiind mult mai mari decât primele două reiese că nu întotdeauna proteinele mai mari au o energie Gibbs mai mare, așa cum am văzut și în cazul hemoglobinei.

BIBLIOGRAFIE

- [**Alayash 2004**] Alayash AI, Oxygen therapeutics: can we tame haemoglobin?, *Nat. Rec. Drug Discov.*, 2004, 3: 152-159
- [**Alberts 2002**] Alberts B, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter: *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition, New York: Garland Science, 2002
- [**Alexeeva et al 2002**] Alexeeva S, Hellingwerf KJ, Teixeira de Mattos MJ, Quantitative Assessment of Oxygen Availability: Perceived Aerobiosis and Its Effect on Flux Distribution in the Respiratory Chain of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 2002, 184(5): 1402–1406.
- [**Afanas'ev 1989**] Afanas'ev IB, Superoxide ion: chemistry and biological implication, CRC Press Inc, Boca Raton, 1989.
- [**Altenbach et al 1989**] Altenbach C, Flitsch SL, Khorana HG, Hubbell WL, Structural studies on transmembrane proteins. 2. Spin labelling Bacteriorhodopsin mutants at unique cysteines, *Biochemistry*, 1989, 28:7806-7812.
- [**Altenbach et al 1990**] Altenbach C, Marti T, Khorana HG, Hubbell WL, Transmembrane protein structure: spin labelling of Bacteriorhodopsin mutants, *Science*, 1990, 248:1088-1092.
- [**Bacic et al 2008**] Bac'ic' G, Spasojevic' I, S'ec'erov B, Mojovic' M, *Spectrochim. Acta Part A*, 2008, 69, 1354.
- [**Berliner et al 1982**] Berliner LJ, Grunwald J, Hankovszky HO, Hideg K, A novel reversible thiol-specific spin label: papain active site labelling and inhibition, 1982, *Anal. Biochem.*, 119:450-455.
- [**Bolojan et al 2011**] Bolojan L, **Takaacs IM**, Miclaus V, Damian G, An EPR Study of Superoxide Radicals from Potassium Superoxide Solutions, *Appl. Magn. Reson.*, 2012, 42:333-341.
- [**Bordignon et al 2007**] Bordignon E, Steinhoff HJ, Membrane protein structure and dynamics studied by site-directed spin labelling ESR. In: M.A. Hemminga, L.J. Berliner (eds) *ESR spectroscopy in membrane biophysics*, 2007, Springer Science and Business Media, New York, pp 129-164.
- [**Becktel and Shellman 1987**] Becktel WJ, Schellman JA, Protein stability curves, *Biopolymers - Peptide Science Section Volume 26, Issue 11, November 1987, Pages 1859-1877.*
- [**Bhadresh and Jayant 2001**] Bhadresh RR, Jayant BU, pH-Jump-Induced Folding and Unfolding Studies of Barstar: Evidence for Multiple Folding and Unfolding Pathways *Biochemistry*, 2001, 40:15267-15279.
- [**Bilsky et al 2003**] Bilsky P, Reszka K, Bilska M, Chignell CF, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118, 1330.
- [**Buxbaum 2007**] Buxbaum E: *Fundamentals of protein structure and function*, Springer, New York, USA, 2007.
- [**Czogalla et al 2007**] Czogalla A, Pieciul A, Jezierski A, Sikorski AF, Attaching a spin to a protein – site-directed spin labelling in structural biology, *Acta Biochemica Polonica*, 2007, 54(2): 235-244.
- [**Duling 1994**] Duling DR, *J. Magn. Reson. Ser. B*, 1994, 104, 105.
- [**Ellis 2001**] Ellis RJ, Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment; *Current Opinion in Structural Biology*, 2001, 11:114-119.
- [**Fantone 1985**] Fantone JC, Ward PA, *Hum. Pathol.*, 1985, 16, 973.
- [**Farmer et al 2000**] Farmer CS, Kurtz DM Jr, Phillips RS, Ai J, Sanders-Loeber J, A leucine residue “Gates” solvent but not O₂ access to binding pocket of *Phascolopsis gouldii* hemerythrin, *J. Biol. Chem.*, 2000, 275: 17043-17050.

- [Farmer et al 2001]** Farmer CS, Kurtz DM Jr, Liu ZJ, Wang BC, Rose J, Ai J, Sanders-Loehr J, The crystal structures of *Phascolopsis gouldii* wild type and L98Y methemerythrins: structural and functional alterations of the O₂ binding pocket, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2001, 6:418-429.
- [Fischer-Fodor et al. 2011]** Fischer-Fodor E, Mot A, Deac F, Arkosi M, Silaghi-Dumitrescu R, Towards hemerythrin-based blood substitutes: Comparative performance to hemoglobin on human leukocytes and umbilical vein endothelial cells, *J. Biosci.*, 2011, 36: 215-221.
- [Fleissner et al 2009]** Fleissner MR, Brustad EM, Kalai T, Altenbach C, Cascio D, Peters F, Hideg K, Peuker S, Schultz P, Hubbell W, Site-directed spin labeling of genetically encoded unnatural amino acid, *PNAS*, 2009, 106(51):21637-21642.
- [Freeman et al 1982]** Freeman BA, Crapo JD, *Lab. Invest.*, 1982, 47, 412.
- [Frejaville et al 1995]** Frejaville C, Karoui H, Tuccio B, Le Moigne F, Culcasi M, Pietri S, Lauricella R, Tordo P, *J. Med. Chem.*, 1995, 38, 258.
- [Garbet et al 1969]** Garbett K, Darnall DW, Klotz IM, Williams RJP, *Arch Biochem Biophys*, 1969, 103, 419-34.
- [Griffith et al 1966]** Griffith OH, McConnell HM, A nitroxide-maleimide spin label., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1966, 55:8-11.
- [Guyton et al 2006]** Guyton AC, John E. Hall, *Textbook of Medical Physiology*, 11th edition, Philadelphia: Elsevier Saunders, p. 511, 2006.
- [Hallivell 1997]** Halliwell B, in *Oxygen Radicals and Disease Process*, ed. by C.E. Thomas, B. Kalyanaraman, Hardwood Academic Publishers, The Netherlands, pp. 1-14, 1997.
- [Hubbell et al 1996]** Hubbell WL, Mchaourab HS, Altenbach C, Lietzow MA, Watching proteins move using site-directed spin labelling, 1996, *Structure*, 4:779-783.
- [Hubbell et al 1998]** Hubbell WL, Gross A, Langen R, Lietzow MA, Recent advances in site-directed spin labelling of proteins, 1998, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8:649-656.
- [Hyde et al 1989]** Hyde JS, Subczynski WK, Spin label oxymetry, In *Biological Magnetic resonance. Vol. 8. Spin labeling: Theory and application.* L.J. Berliner and J. Reubens, editors. Plenum Press, New York, 1989, 399-425.
- [Ibarra-Molero et al 1999]** Ibarra-Molero B, Loladze VV, Makhatadze GI, Sanchez-Ruiz JM, Thermal versus Guanidine-Induced Unfolding of Ubiquitin. An Analysis in Terms of the Contributions from Charge-Charge Interactions to Protein Stability *Biochemistry*, 1999, 38:8138-8149.
- [Jin et al 2002]** Jin S, Kurtz DM Jr, Liu ZJ, Rose J, Wang BC, X-ray crystal structures of reduced rubrerythrin and its azide adduct: a structure-based mechanism for non-heme diiron peroxidase. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124: 9845-9855.
- [Jia et al 2008]** Jia Z, Zhu H, Misra BR, Mahaney JE, Li Y, Misra HP, *Mol. Cell. Biochem.*, 2008, 313, 187.
- [Kellis et al 1989]** Kellis JT Jr, Nybeg K, Fersht AR, Energetics of complementary sidechain packing in a protein hydrophobic core. *Biochemistry*, 1989, 28:4914-4922.
- [Khan et al 2003]** Khan N, Wilmot CM, Rosen GM, Demidenko E, Sun J, Joseph J, O'Hara J, Kalyanaraman B, Swartz HM, *Free Radic. Biol. Med.*, 2003, 34(11), 1473.
- [Klare et al 2009]** Klare JP, Steinhoff HJ, Spin labelling EPR, *Photosynth. Res.*, 2009, Volume 102, 2-3:377-390.
- [Klug et al 1995]** Klug CS, Su W, Liu J, Klebba PE, Feix JB, Denaturant unfolding of the ferric enterohactin receptor and ligand-induced stabilization studied by sitedirected spin labeling, *Biochemistry*, 1995, 34:14230-14236.
- [Klug et al 1998]** Klug CS, Feix JB, Guanidine hydrochloride unfolding of a transmembrane P-strand in FepA using site-directed spin labeling, *Protein Science*, 1998, 7:1469-1476.

- [Klug et al 2008]** Klug CS, Feix JB, Methods and applications of site-directed spin labelling EPR spectroscopy, In: J.J. Correia, H.W. Detrich (eds), *Methods in cell*
- [Kryatov et al 2005]** Kryatov SV, Rybak-Akimova EV, Schindler S, Kinetics and mechanisms of formation and reactivity of non-heme iron oxygen intermediates., *Chem. Rev.*, 2005, 105: 2175-2226.
- [Kurtz 2003]** Kurtz DM Jr, Dioxygen-binding Proteins, *Comprehensive Coordination Chemistry II*, 2003, 8: 229-260.
- [Langeman et al 1969]** Langeman NR, Klotz IM, *Biochemistry*, 1969, 8 (12):4746-4752.
- [Mojovic et al 2005]** Mojovic M, Vuletic M, Bacic GG, *Ann. NY Acad. Sci.*, 2005, 1048, 471.
- [Mot et al. 2010]** Mot AC, Roman A, Lupan I, Kurtz DM Jr, Silaghi-Dumitrescu R, Towards the Development of Hemerythrin-Based Blood Substitutes, *Protein J.*, 2010, 29:387-393.
- [Nelson et al 2000]** Nelson DL, Cox MM, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3rd edition, New York, NY: Worth Publishers p 217, 2000.
- [Nocek et al 1988]** Nocek JM, Kurtz DM Jr, Sage JT, Xia Y-M, Debrunner P, Shiemke AK, Sanders-Loehr J, Loehr TM, *Biochemistry*, 1988, 27, 1014-24.
- [Pace 1986]** Pace N, *Methods Enzymol.* 1986, 131, 266-280.
- [Pake et al 1959]** Pake GE, Tuttle TR, Anomalous loss of resolution of paramagnetic resonance hyperfine structure in lipids, *Phys. Rev. Lett.*, 1959, 3:423-425.
- [Paoli et al 2004]** Paoli M, Nagai K, Chapter: Hemoglobin in *Handbook of metalloproteins Volume 3*, Meserschmidt A, Bode W, Cygler M, Wiley, 2004
- [Perutz et al 1960]** Perutz MF, Rossman MG, Cullis AF, Muirhead H, Will G, North AC, Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis, *Nature*, 1960,185(4711):416-22.
- [Perutz 1965]** Perutz MF, *Jmol. Biol*, 1965, 13:646-68.
- [Perutz 1970]** Perutz MF, *Nature*, 1970, 228:726-39.
- [Perutz 1972]** Perutz MF, *Nature*, 1972, 237:495-9.
- [Ouari et al 2011]** Ouari O, Hardy M, Karoui H, Tordo P, in *Electron Paramagnetic Resonance*, vol. 22, ed. by B.C. Gilbert, D.M. Murphy, V. Chechik, Royal Society of Chemistry, pp. 1–40, 2011.
- [Reiter et al 2000]** Reiter CD, Teng RJ, Beckman JS, *J. Biol. Chem.*, 2000, 275(42), 32460.
- [Seelig et al 1976]** Seelig J, Smith ICP, Butler KW, Griffith OH, Jost PC, McConnell HM, In *Spin labeling: Theory and Applications*; L.J. Berliner, Ed. Academic Press, New York, Chapters 10-13, 1976.
- [Sieker et al 1981]** Sieker LC, Bolles S, Stenkamp RE, Jensen LH, Appleby CA, Preliminary X-ray study of a dimeric form of hemerythrin from *Phascolosoma arcuatum*, *J. Mol. Biol.*, 1981, 148(4):493-496.
- [Singh Evans 2006]** Singh PS, Evans DH, *J. Phys. Chem. B*, 2006, 110, 637.
- [Smith et al 1983]** Smith JL, Hendrickson WA, Addison AW, Structure of trimeric haemerythrin, *Nature*, 1983, 303(5912):86-93.
- [Spasojevic 2010]** Spasojevic I, *J. Med. Biochem.*, 2010, 29, 175.
- [Stenkamp 2004]** Stenkamp RE, Chapter: Hemerythrin in *Handbook of metalloproteins Volume 3*, Meserschmidt A, Bode W, Cygler M, Wiley, 2004
- [Stolze et al 2000]** Stolze K, Udilova N, Nohl H, *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, 29(10), 1005.
- [Subczynski et al 2006]** Subczynski WK, Swartz HM, EPR Oximetry in Biological and Model Samples, In *Biomedical EPR, Part A: Free Radicals, Metals, Medicine, and Physiology*, Ed. Springer, Chapter 10, 2006.

- [**Takacs et al 2011a**] **Takacs IM**, Dragota M, Bischin C, Bolojan L, Damian G, Epr study of molecular oxygen effect upon nitroxide radicals, *Studia UBB Physica*, 2011, LVI, 1:73-79.
- [**Takacs et al 2011b**] **Takacs IM**, Dragota M, Bischin C, Bolojan L, Damian G, EPR studied of phospholipid membranes, *Spectroscopies on Biomedical and Nanostructured Systems*, Cluj-Napoca, 2011.
- [**Takacs et al 2013a**] **Takacs IM**, Mot A, Silaghi-Dumitrescu R, Damian G, Site Directed Spin Labeling of Hemerythrin and Hemoglobin, *Studia UBB Chemia*, 2013, LVIII, 2:61-69.
- [**Takacs et al 2013b**] **Takacs IM**, Mot A, Silaghi-Dumitrescu R, Damian G, Study of Mobility Hemoglobin Side Chains by Spin Labeled EPR Spectroscopy, *Studia UBB Physica*, 2013, Vol 58 (LVIII),1:49-58.
- [**Takacs et al 2013c**] **Takacs IM**, Mot A, Silaghi-Dumitrescu R, Damian G, EPR investigation of librational motion of spin labeled hemerythrin, *Journal of Biological Physics* – submitted.
- [**Takacs et al 2013d**] **Takacs IM**, Mot A, Silaghi-Dumitrescu R, Damian G, Unfolding pathway hemerythrin induced by temperature, GuHCl and pH using site directed spin labeling (SDSL), *Protein Science* – in preparation.
- [**Tsuchida et al. 2009**] Tsuchida E, Sou K, Nakagawa A, Sakai H, Komatsu T, Kobayashi K, Artificial oxygen carriers, hemoglobin vesicles and albumin-hemes, based on bioconjugate chemistry, *Bioconjug. Chem.*, 2009, 20:1419-1440.
- [**Whitford 2005**] Whitford D: *Proteins: Structure and Function*, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England, 2005.
- [**Yang et al 2008**] Yang MC, Guan HH, Liu MY, Lin YH, Yang JM, Chen WL, Chen CJ, Mao SJ, Crystal structure of a secondary vitamin D3 binding site of milk beta-lactoglobulin, *Proteins*. 2008 May 15;71(3):1197-210.

LISTA DE PUBLICAȚII

A. Reviste cotate ISI:

1. **Takacs IM**, Mot A, Silaghi-Dumitrescu R, Damian G, Site Directed Spin Labeling of Hemerythrin and Hemoglobin, *Studia UBB Chemia*, 2013, LVIII, 2:61-69.
2. Bolojan L, **Takacs IM**, Miclaus V, Damian G, An EPR Study of Superoxide Radicals from Potassium Superoxide Solutions, *Appl. Magn. Reson.*, 2012, 42:333-341.
3. **Takacs IM**, Mot A, Silaghi-Dumitrescu R, Damian G, EPR investigation of librational motion of spin labeled hemerythrin, *Journal of Biological Physics – trimis*.
4. **Takacs IM**, Mot A, Silaghi-Dumitrescu R, Damian G, Unfolding pathway hemerythrin induced by temperature, GuHCl and pH using site directed spin labeling (SDSL), *Protein Science – în preparare*.

B. Reviste cotate CNCS B+:

1. **Takacs IM**, Mot A, Silaghi-Dumitrescu R, Damian G, Study of Mobility Hemoglobin Side Chains by Spin Labeled EPR Spectroscopy, *Studia UBB Physica*, 2013, Vol 58 (LVIII),1:49-58.
2. **Takacs IM**, Dragota M, Bischin C, Bolojan L, Damian G, Epr study of molecular oxygen effect upon nitroxide radicals, *Studia UBB Physica*, 2011, LVI, 1:73-79.

C. Participări cu lucrări la conferințe:

1. **Takacs IM**, Dragota M, Bischin C, Bolojan L, Damian G, EPR studied of phospholipid membranes, *Spectroscopies on Biomedical and Nanostructured Systems*, Cluj-Napoca, 2011. – Poster
2. Damian G, Bolojan L, Miclăuș V, **Takacs IM**, Csillag I, EPR investigation of gamma irradiated metformin, *Spectroscopies on Biomedical and Nanostructured Systems*, Cluj-Napoca, 2011. – Poster
3. **Takacs IM**, Osmolyte perturbation study on the Sensory RhodopsinII/TransducerII Complex as seen by EPR spectroscopy, *Conferința Națională de Fizică, Iași*, 2010. – Prezentare orală