

Universitatea “Babeş-Bolyai” Facultatea de Fizică, Romania
&
Universitatea din Osnabrück, Departmentul de Fizică, Germania

Cristina-Mihaela Gruian

**Adsorbția proteinelor pe sticle bioactive – modificări
conformaționale și analiză cantitativă**

Rezumatul tezei de doctorat

Coordonatori științifici:
Prof. dr. Simon Simion
Prof. dr. Heinz-Jürgen Steinhoff

Cluj-Napoca

2011

Cuprins

1. INTRODUCERE	1
2. MATERIALE ȘI METODE	5
2.1 Pregătirea probelor	5
2.1.1 Prepararea sticlei bioactive.....	5
2.1.2 Marcarea spinilor	5
2.1.3 Adsorbția proteinelor	6
2.2 Analiza probelor.....	6
2.2.1 Măsurătorile RES în undă continuă	6
2.2.2 Măsurătorile RES în pulsuri (DEER)	7
2.2.3 Măsurătorile FT-IR	7
2.2.4 Măsurătorile XPS.....	7
2.2.5 Măsurătorile SEM	8
3. REZULTATE ȘI DISCUȚII	8
3.1 Methemoglobina cabalină.....	8
3.1.1 Imobilizarea methemoglobinei pe substratul de biosticlă	8
3.1.2 Modificări conformaționale induse în structura methemoglobinei în urma procesului de adsorbție – distanțe inter-spin	10
3.1.3 Modificări conformaționale induse în structura methemoglobinei în urma procesului de adsorbție – structura secundară	12
3.1.4 Determinarea cantității de proteină atașată	14
3.2 MnmE din <i>E.coli</i>	19
3.2.1 Imobilizarea proteinei MnmE pe substratul de biosticlă.....	19
3.2.2 Modificări conformaționale induse în structura MnmE în urma procesului de adsorbție – distanțe inter-spin	21
3.2.3 Modificări conformaționale induse în structura MnmE în urma procesului de adsorbție – structura secundară	25
3.2.4 Determinarea cantității de proteină atașată	27
4. CONCLUZII	31
Bibliografie Selectivă	33

Cuvinte cheie: adsorbția proteinei, sticlă bioactivă, marcarea de spini, RES, methemoglobina cabalină, MnmE, FT-IR, modificări conformaționale, concentrația de proteină atașată, glutaraldehida.

1. Introducere

Adsorbția de proteine și modificările conformaționale care succed acestui fenomen sunt primele evenimente biomecanice care au loc la suprafața unui implant imediat după implantare, influențând toate interacțiunile fizico-chimice ulterioare. Astfel, primul pas în evaluarea biocompatibilității unui biomaterial este studierea comportamentului său în urma interacțiunii cu proteinele. Atât cantitatea totală de proteine adsorbite, cât și aria suprafeței de contact proteină-implant, sunt primordiale ca importanță pentru biocompatibilitatea unui material.

Adsorbția moleculelor de proteine pe suprafețe solide se finalizează frecvent cu schimbări de structură și/sau de orientare în cadrul stratului adsorbit [SERVAGENT-NOINVILLE *et al.* 2000, DOUSSEAU și PEZOLET 1990]. Deoarece structurile proteice sunt relativ instabile, proteinele tind să se desfășoare, permițând regiunilor din interiorul lor să stabilească noi contacte cu suprafața [EL-GHANNAM *et al.* 1999]. Această denaturare este adesea asociată cu pierderea structurii secundare sau terțiare a proteinei și se finalizează cu adsorbția ei ireversibilă.

Deși, în ultimii ani s-a conturat o înțelegere mai profundă a multiplelor aspecte ale adsorbției proteinelor, în prezent se cunosc puține informații despre modificările conformaționale care au loc în structura proteinei după atașare. Mai mult, au rămas în mare parte necunoscute atât comportamentul proteinei în mediul ei nativ după adsorbție, cât și detaliile cu privire la dinamica ei și la cantitatea exactă de proteină adsorbită. [LATOUR 2005, GRAY 2004, WERTZ și SANTORE 2001].

Majoritatea tehnicilor, utilizate frecvent pentru a obține astfel de informații, prezintă serioase limitări și nu sunt ușor adaptabile pentru proteine adsorbite pe suprafețe solide. De exemplu, sunt dificil de obținut informațiile structurale de înaltă rezoluție cu ajutorul difracției de raze X iar dicroismul circular nu este ușor adaptabil la proteinele adsorbite pe suprafețele solide [KARLSSON *et al.* 2000, TIAN *et al.* 1998]. Deși multe studii au utilizat spectroscopia în infraroșu ca tehnică de investigare a structurii proteinei după adsorbție, această metodă nu poate să ofere informații despre dinamica proteinei sau despre structura ei terțiară. Pe lângă metodele menționate mai sus, procedeul de marcarea de spini¹ în combinație cu rezonanța electronică de spin (RES) este o alternativă promițătoare, care oferă informații atât despre structura, cât și despre dinamica proteinei [FANUCCI *et al.* 2003, HUBBELL *et al.* 2000], fiind astfel foarte utilă pentru studiul proteinelor în mediul lor nativ.

¹ engl. Site-Directed Spin Labeling (SDSL)

SDLS implică introducerea unui marker de spin (radical liber de tip nitroxilic, având ca grupare paramagnetică gruparea nitroxil =N-O•) într-o poziție specifică din secvența de aminoacizi a proteinei. Aceasta se realizează prin procedeul de substituție a aminoacidului nativ cu cisteină, urmat de modificarea grupului sulfhidric cu un radical nitroxid. Până în prezent, această metodă a fost utilizată predominant pentru investigarea structurii și dinamicii proteinelor solubile sau a proteinelor membrane reconstituite în mediul lor nativ [BORDIGNON și STEINHOFF 2007]. Studii recente au relevat însă, că metoda poate fi extinsă și în cazul proteinelor adsorbite pe o suprafață solidă [JACOBSEN *et al.* 2006, JACOBSEN *et al.* 2005, RISSE *et al.* 2003]. Totuși, în aceste studii sunt prezentate numai măsurători de rezonanță electronică de spin în undă continuă, utilizate pentru investigarea modificărilor conformaționale induse în urma adsorbției la nivelul scheletului proteinei.

Un obiectiv principal al acestei lucrări constă în utilizarea rezonanței electronice de spin în combinație cu SDSL pentru a investiga adsorbția proteinelor pe suprafața unei sticle bioactive. Pe lângă informațiile obținute din spectrele RES în undă continuă, se urmărește determinarea distanțelor interspin în proteinele adsorbite cu ajutorul rezonanței duble electron-electron² în pulsuri. Se poate astfel obține o imagine mai detaliată atât a conformației proteinei cât și a modificărilor conformaționale care au loc în structura ei în timpul procesului de adsorbție.

Un alt scop al acestui studiu este de a investiga efectul glutaraldehidei (GA) ca agent de cuplare a proteinelor cu suprafața biosticlei. În acest sens, s-a studiat interacțiunea a două proteine model: methemoglobina cabalină și MnmE (*enzima de formare a 5-metil-aminometil-uridină*), cu o sticlă bioactivă, care este utilizată ca biomaterial pentru repararea defectelor osoase (45S5 Bioglass®). S-a urmărit investigarea modificărilor conformaționale care apar în structura proteinei după adsorbție, precum și determinarea cantității de proteină adsorbită.

Ambele proteine studiate sunt de mărime medie (methemoglobina are masa moleculară 66.5 kDa, iar MnmE 50 kDa), dar aparțin unor clase diferite. Methemoglobina este o metaloproteină, alcătuită din patru lanțuri polipeptidice: două tip alpha (141aa fiecare) și două tip beta (146aa fiecare) (Figura 1). Fiecare subunitate a proteinei conține câte un grup hem al cărui patru atomi de azot sunt cuplați cu un atom de fier, dar, spre deosebire de hemoglobină, fierul este oxidat în Fe³⁺, inhibând capacitățile proteinei de lega oxigenul. Trebuie menționat faptul că studii anterioare au demonstrat că GA induce polimerizarea hemoglobinei [MACDONALD și PEPPER 1994, OKUDA *et al.* 1991, GUILLOCHON *et al.* 1986, WEETALL 1974]. Această proteină are la suprafață multe lizine, iar interacțiunea lor cu GA duce

² engl. Double Electron Electron Resonance (DEER)

la formarea unor rețele de proteine [OKUDA *et al.* 1991, WEETALL 1974], rezultând o varietate de specii cum ar fi dimeri, trimeri etc. [MACDONALD și PEPPER 1994, GUILLOCHON *et al.* 1986]. Acest amestec eterogen de specii ale hemoglobinei cu mase moleculare variate, face ca structura tetramerică a moleculei să fie mai rigidă.

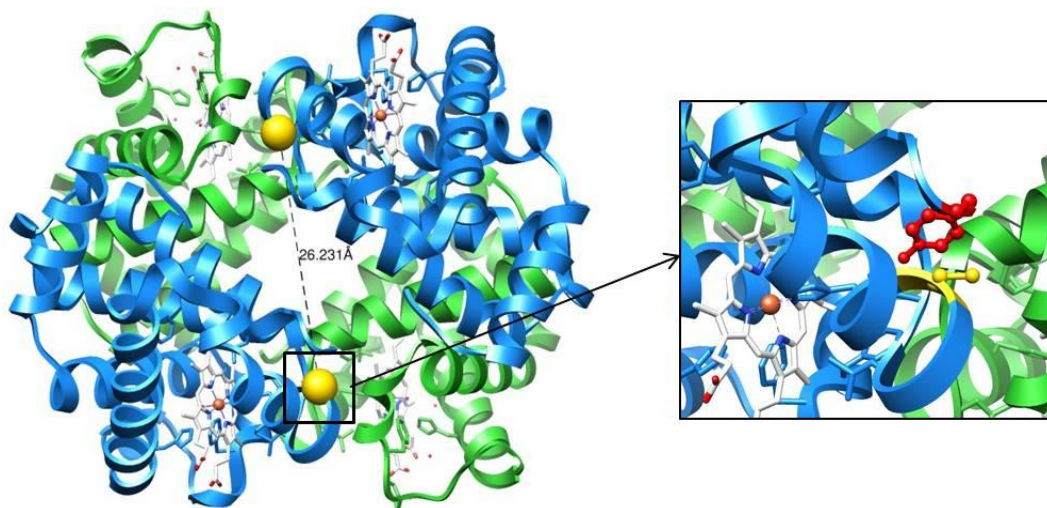


Figura 1 Stânga: Structura metemoglobinei cabaline obținută prin difracție de raze X (2ZLU din Protein Data Bank). Lanțurile α sunt colorate în verde iar lanțurile β sunt colorate în albastru; grupurile hem sunt reprezentate în modelul ball and stick. Atomii C_{β} ai cisteinelor native din poziția β -93 sunt reprezentați prin sfere galbene, iar linia punctată arată distanța dintre cei doi atomi C_{β} ai ambilor aminoacizi. **Dreapta:** Imagine detaliată a regiunii în care s-a atașat markerul de spin. Aminoacidul nativ din poziția β -93 (cisteina) este colorat în galben iar tirozina situată în apropiere de terminalul C al lanțului β este colorată în roșu.

MnmE este o proteină mult mai complexă, aparținând clasei G de proteine. Studii anterioare au relevat că domeniile G ale MnmE sunt activate prin dimerizare [GASPER *et al.* 2009], că au afinitate scăzută pentru nucleotide și că necesită hidroliza guanozin-trifosfatului³ pentru a fi funcțional active [SCRIMA și WITTINGHOFER 2006, SCRIMA *et al.* 2005]. Structura cristalină a dimerului MnmE sugerează că fiecare monomer este alcătuit din trei domenii: un domeniu terminal N, responsabil pentru constitutirea dimerizării, un domeniu central alcătuit din α helixuri și un domeniu G, specific acestui tip de proteină [SCRIMA *et al.* 2005]. S-a demonstrat faptul că, în stare liberă, fără nucleotida atașată (apo), domeniile G sunt situate față în față (Figura 2), fără a prezenta vreun contact între ele [MEYER *et al.* 2009]. În prezența guanozin-difosfatului în combinație cu AlF_x ($GDP-AlF_x$), care este starea de tranziție ce imită hidroliza GTP, domeniile G intră în contact unul cu celălalt, parcurgând o distanță de 20-30 Å [BOEHME *et al.* 2010a, BOEHME *et al.* 2010b]. Aceste modificări conformaționale care au loc în

³ engl. Guanosine Triphosphate (GTP)

timpul activării MnME fac ca această proteină să fie ideală pentru a investiga modul în care dinamica ei conformațională este influențată de interacțiunea cu substratul de biosticlă.

Pentru elucidarea modificărilor structurale care au loc în timpul adsorbției celor două proteine pe suprafața sticlei bioactive, s-a investigat dinamica markerilor de spin și s-au determinat distanțele interspin prin intermediul rezonanței electronice de spin. În acest scop, au fost introduși centri paramagnetici în ambele proteine. Astfel, cisteina nativă din poziția β -93 în methemoglobină a fost marcată cu (4-(2-iodoacetamid)-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinil-oxil) (Figura 1).

În cazul proteinei MnME, patru poziții au fost modificate în cisteină prin procedeul de mutagenză și apoi au fost marcate cu (1-oxi-2,2,5,5-tetrametil-3-pirolină-3-metil) metanetiosulfonat (MTS): Ser278 și Glu287 (ambele aflate în domeniul G al proteinei), Ile105 și Lys95 (situat în domeniul terminal N al proteinei) (Figura 2). Aceste locații au fost selectate pentru a oferi informații despre poziția celor doi monomeri unul față de celălalt după atașarea proteinei de biosticlă. Pentru a verifica funcționalitatea proteinei, măsurătorile au fost efectuate în ambele stări (apo și cu nucleotida GDP-A1F_x atașată).

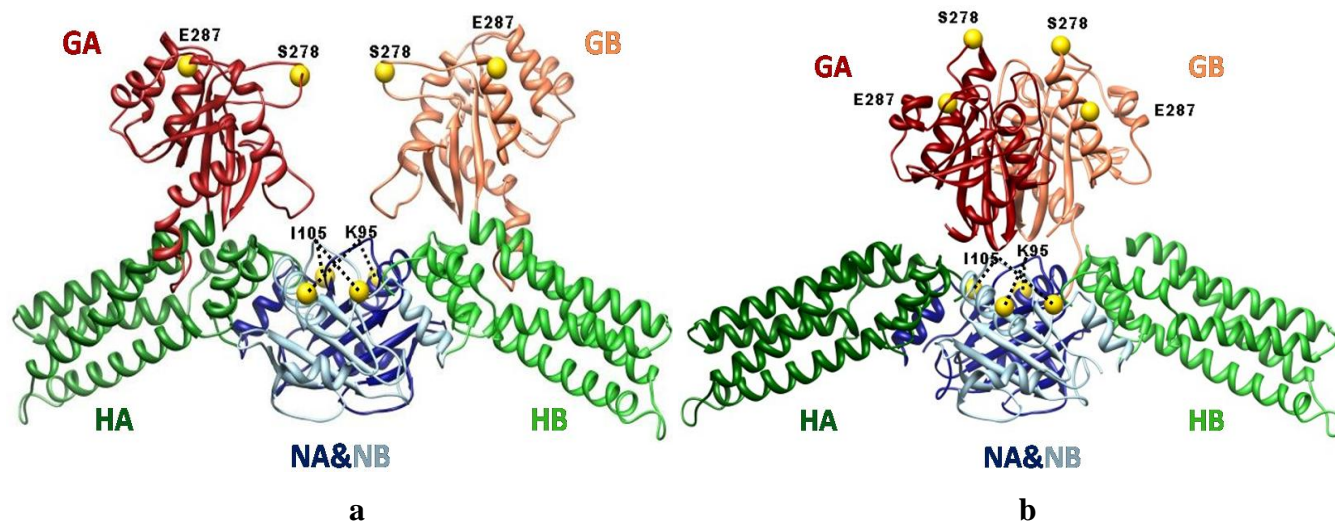


Figure 2. Mutanții MnME. Pozițiile care au fost mutate în cisteine și apoi marcate sunt reprezentate prin sfere galbene. (a) Conformația deschisă (apo) a proteinei MnME, generată cu pdb 1XZP; (b) Conformația închisă a domeniilor G [pdb 2GJ8] suprapusă peste structura cristalină a MnME. Domeniile sunt notate după cum urmează: domeniile terminale N (NA, NB), domeniile centrale formate din α helixuri (HA, HB) și domeniile G (GA,GB).

Deoarece proprietățile unui biomaterial sunt influențate și de structura secundară a proteinei de după adsorbție, s-a folosit spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR) pentru studiul ambelor proteine și, în principal, pentru studiul modificărilor care apar în structura lor secundară în urma acestui proces.

Pe lângă informațiile despre conformația proteinei după adsorbție, un rol important pentru proprietățile materialului de implant îl are și cantitatea de proteină adsorbită. În această privință, concentrația de proteină atașată pe sticla bioactivă a fost determinată prin intermediul spectroscopiei RES și a spectroscopiei FT-IR. Prin spectroscopia fotoelectronică de raze X⁴ s-au obținut informații despre un strat periferic, de câțiva nanometri, de la suprafața sticlei bioactive, pentru a cuantifica acoperirea cu proteină a suprafeței. Mai mult, morfologia suprafeței sticlei bioactive a fost vizualizată înainte și după atașarea proteinei, prin microscopie electronică⁵.

2. Materiale și Metode

2.1. Pregătirea probelor

2.1.1. Prepararea sticlei bioactive

Sistemul de biosticlă utilizat ca substrat pentru atașamentul proteinei a fost preparat prin metoda sol-gel [HENCH și WEST 1990] și este identic în compoziție cu clasică 45S5 Bioglass®: 45% SiO₂, 24.5% Na₂O, 24.5% CaO și 6% P₂O₅ (în % molare). După preparare, proba a fost mojarată și s-au obținut particule cu dimensiuni de la câțiva nm la sute de μm. Unghiul de contact static al unei picături de apă înregistrat pe suprafața biosticlei înainte de măcinare a fost de 41°, indicând faptul că suprafața are un caracter hidrofob [VERNE *et al.* 2009, TUNC *et al.* 2005]. Pentru a facilita adsorbția proteinei, suprafața sticlei bioactive a fost silanizată cu 3-aminopropil-trietoxisilan (APTS), și apoi modificată cu glutaraldehidă (GA) [CHEN *et al.* 2007, CHEN *et al.* 2006, NANJI *et al.* 1998, WILLIAMS și BLANCH 1994].

2.1.2. Marcarea spinilor

Methemoglobina cabalină. Cisteina nativă din poziția β-93 din methemoglobina cabalină a fost marcată cu (4-(2-iodoacetamid)-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxil) după următoarea procedură: oxihemoglobina a fost extrasă dintr-o probă proaspătă de sânge de cal, conform Benesch *et al.* (1972), iar apoi convertită în methemoglobină, prin adăugarea K₃Fe(CN)₆ [STEINHOFF *et al.* 1989]. Marcarea methemoglobinei cu (4-(2-iodoacetamid)-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxil) a urmat procedura lui McCalley *et al.* (1972). Eficiența la marcarea a fost de aproximativ 80%.

⁴ engl. X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)

⁵ engl. Scanning Electron Microscopy (SEM)

MnmE din *E. coli*. După introducerea cisteinei în pozițiile Glu287, Ser278, Ile105 și Lys95, proteina purificată, și fără nucleotida atașată, a fost pre-tratată cu ditio-eritritol (DTE) la 4°C, timp de 2 ore, pentru a preveni oxidarea cisteinei. După acest tratament, DTE a fost înlăturat prin gel-filtrare înainte de adăugarea markerilor, pentru a nu inhiba legarea acestora de proteină. Apoi, soluțiile de proteină au fost incubate cu 1÷5 mM (1-oxil-2,2,5,5-tetrametilpirolina-3-metil) metanetiosulfonat (MTS, Toronto Research; Alexis Biochemicals) timp de 16 ore la 4°C. Spinii nelegați au fost îndepărtați prin gel-filtrare.

2.1.3 Adsorbția proteinelor

Methemoglobina cabalină. Probele sub formă de pulbere au fost incubate timp de patru ore la temperatura camerei (298 K) în soluție de 150mg/ml (≈ 2 mM) methemoglobină în soluție tampon fosfatică (PBS) (0.01M, pH 7.4).

MnmE din *E.coli*. Probele sub formă de pulbere au fost incubate timp de patru ore la temperatura camerei (298 K) într-o soluție cu o concentrație de proteină de 10-25 mg/ml (200-500 μ M). Soluția tampon utilizată a fost 100 mM KCl, 50 mM Tris-DCI (pH 7.5), 5mM MgCl₂ în D₂O. Pentru a obține starea analoagă de tranziție GDP-AlF_x, 200-400 μ M de proteină fără nucleotidă atașată, deja adsorbită pe substratul de biosticlă, a fost incubată în 1 mM GDP, 1 mM AlCl₃ și 4 mM NaF.

Toate probele au fost stocate pentru 30 de zile, la 4°C, în eprubete eppendorf, și apoi puse în baie cu ultrasunete la temperatura camerei, timp de 45 de minute. După ultrasonare, probele au fost spălate cu soluție tampon, pentru a îndepărta proteina neatașată. În final, probele au fost transferate în capilare și măsurate la temperatura camerei, pentru a se verifica stabilitatea legării proteinei de suprafață.

2.2. Analiza probelor

2.2.1. Măsurătorile RES în undă continuă

Experimentele RES în bandă X au fost efectuate utilizând un spectrometru construit în laboratorul din Osnabrueck, echipat cu un rezonator dielectric Bruker. Puterea microundei a fost setată la 1.0mW; amplitudinea modulației câmpului magnetic a fost de 0.15 mT. Volume de probă mai mari de 15 μ l (volumul sticlei bioactive) au fost introduse în capilare RES de sticlă, cu diametrul interior de 0.9mm (volumul RES activ al tubului a fost de 10 μ l). Concentrația de proteină adsorbită pe sticla bioactivă a fost estimată prin calcularea ariei spectrului RES de adsorbție, care este direct proporțională cu concentrația de spini din probă. Concentrația proteinei a fost calculată prin compararea acestei arii cu

cea a unei probe de referință cu o concentrație cunoscută (2,2,6,6,-tetramethyl-1-piperidinyloxy (TEMPO)).

2.2.2. Măsurătorile RES în pulsuri (DEER)

Această metodă permite determinarea unei distanțe cuprinse între 2 și 8 nanometri între doi centri paramagnetici. Măsurătorile de RES în pulsuri au fost efectuate în bandă X (9.3 -9.4 GHz) cu un spectrometru Bruker Elexsys 580, echipat cu un rezonator Bruker Flexline ER 4118XMS3 și cu un criostat cu flux continuu de heliu (ESR900, Oxford Instruments) controlat de un sistem Oxford Intelligent Temperature Controller (ITC 503S).

Înainte de a îngheța proteina în tuburi RES cu diametrul interior de 3mm, s-a adăugat peste probă o cantitate suplimentară de 10% (ca volum) glicerol în cazul methemoglobinei, și 12.5% (ca volum) glicerol în cazul MnME. Măsurătorile au fost realizate prin utilizarea unei secvențe DEER, de puls quadruplu [PANNIER *et al.* 2000]:

Timpul total de măsurare pentru fiecare mostră a fost de 4÷48 h. Corecția de background și determinarea distribuției de distanțe inter-spin s-au realizat cu ajutorul programului DEERAnalysis (2010), folosind un model de spini arbitrar orientați în raport cu axa dipolară și regularizarea Tikhonov [JESCHKE *et al.* 2006].

2.2.3. Măsurătorile FT-IR

Spectrele FT-IR au fost înregistrate prin atenuarea reflexiei totale, cu un spectrometru JASCO 6200, în intervalul 4000-400 cm^{-1} , cu o rezoluție de 4 cm^{-1} . Pentru a analiza structura secundară a proteinelor înainte și după adsorbție, s-a realizat deconvoluția benzii corespunzătoare amidei I. Numărul și poziția benzilor care compun amida I au fost determinate cu ajutorul derivatei a doua [SUSI și BYLER 1986, BYLER și SUSI 1986, DONG *et al.* 1990] și corelate cu valorile găsite în studii anterioare [ARRONDO și GONI 1999, SESHADRI *et al.* 1999, HARIS și CHAPMAN 1994, GÖRNE-TSCHELNOKOW *et al.* 1993, SUSI și BYLER 1983, NATALELLO *et al.* 2005, KONG și YU 2007]. Cantitatea de proteină adsorbită a fost estimată din raportul dintre amida I și amida II, procedeu confirmat de Buchanan și El-Ghannam (2010).

2.2.4. Măsurătorile XPS

Măsurătorile XPS au fost realizate cu ajutorul unui sistem SPECS PHOIBOS 150 MCD echipat cu sursă $\text{AlK}\alpha$ monocromatică (250 W, $h\nu = 1486.6 \text{ eV}$), un analizator emisferic și un detector multicanal.

Deconvoluția spectrului XPS de înaltă rezoluție al N 1s a fost efectuată cu ajutorul programului CasaXPS, utilizând funcția gaussiană.

2.2.5. Măsurătorile SEM

SEM images were recorded using FEI Quanta 3D FEG 200/600 Scanning Electron Microscope. The sample powders were covered with platinum (Pt) in order to amplify the secondary electrons signal. This coating was performed in an Agar Automatic Sputter Coater at standard atmospheric pressure (1013 mBar).

3. Rezultate și Discuții

3.1. Methemoglobina cabalină

3.1.1. Imobilizarea methemoglobinei pe substratul de biosticlă

Pentru catenele laterale ale markerilor de spin care sunt expuse spre soluție, mobilitatea nitroxizilor este caracterizată de valori ale timpilor de rotație corelațională în domeniul nanosecundelor. În acest caz, spectrele EPR sunt caracterizate de lărgimi înguste ale liniilor centrale și de o despicare hiperfină mică. Dacă, în schimb, mobilitatea nitroxidului este restricționată de interacțiuni cu catenele laterale vecine sau cu suprafața biosticlei, are loc o creștere a lărgimii liniei spectrale și a despicii hiperfine [KLARE și STEINHOFF 2009]. La prima vedere, spectrul RES în undăcontinuu al methemoglobinei în soluție (Figura 3a) este alcătuit din două componente. Astfel de spectre “complexe” pot fi asociate cu două situații posibile: (1) un schimb conformațional între două stări diferite ale proteinei [BRIDGES *et al.* 2010], astfel încât într-o mixtură de echilibru, cu un schimb lent între stări, spectrul este suma celor două componente în proporție cu populațiile lor; (2) un echilibru rotametric, care explică forma liniilor ca rezultat al existenței catenei laterale a nitroxidului în stări rotametrice multiple. În cazul methemoglobinei, prezența punctului isosbestic la o valoare a câmpului magnetic de aproximativ 3432 G (determinată din măsurătorile RES în undăcontinuu, în intervalul de temperatură 5 – 25 grade Celsius (Figura 3b)) sugerează că originea spectrului complex este dată de echilibrul catenei laterale a markerului de spin între două stări cu mobilitate diferită. Această afirmație este în concordanță cu interpretarea lui Moffat [MOFFAT 1971], care a atribuit componentele legate de fracțiunile mobile (α) și imobile (β) ale catenei laterale, diferitelor orientări ale markerului în raport proteina. Una dintre aceste orientări este liberă în soluție la suprafața moleculei, iar cealaltă este puternic imobilizată, corespunzând

nitroxizilor care ocupă buzunarul de tirozină aflat în apropiere (Tyr HC₂(145)β) (Figure 1) [MOFFAT 1971].

Odată cu adsorbția proteinei pe sticla bioactivă, echilibrul dintre cele două conformații înclină în mod semnificativ către componenta imobilă a spectrului (Figure 3a). Aceasta indică faptul că markerii de spin interacționează cu suprafața biosticlei sau cu domenii adiacente ale proteinei. O caracteristică notabilă este creșterea lărgimii liniei observate pentru componenta imobilă de după adsorbție (Figura 3a, inset), care nu poate fi asociată numai cu nitroxizii captați în interiorul buzunarului de tirozină. Această lărgire a liniei poate fi explicată doar presupunând că mișcarea întregii proteine este restricționată ca urmare a interacțiunii cu sticla bioactivă.

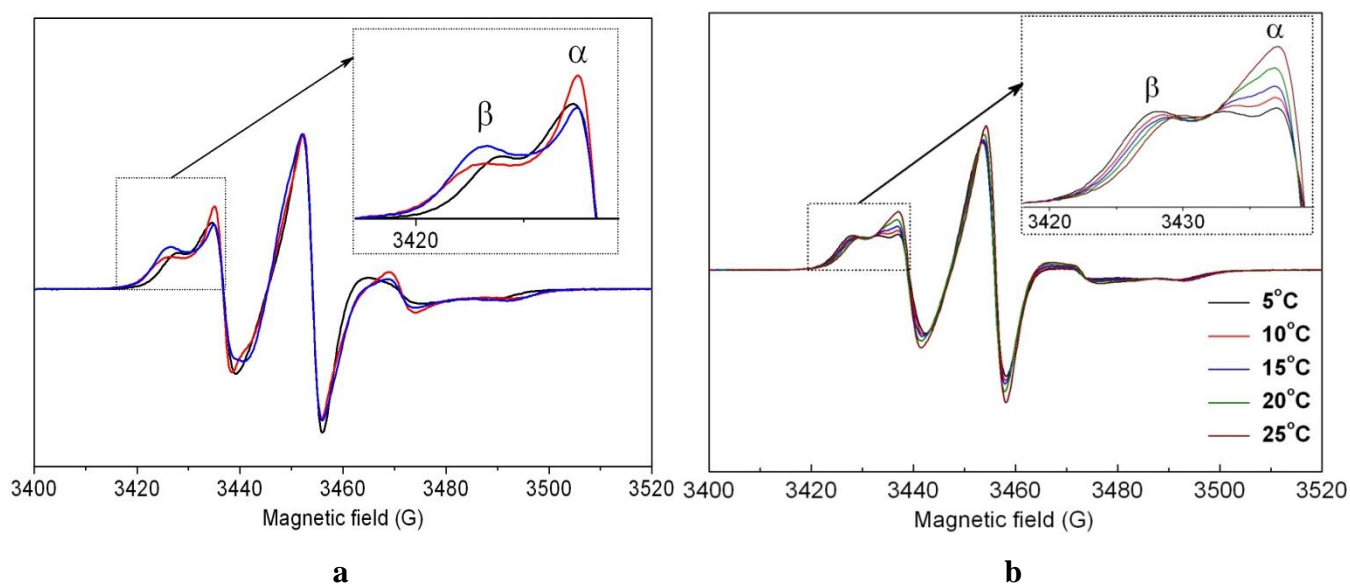


Figura 3 (a) Spectrele RES la temperatura camerei (în bandă X) ale methemoglobinei cabaline marcată în poziția β-93*, înregistrate în soluție înainte de imersie (negru) și după adsorbția sticla bioactivă, pe substratul netratat cu GA (roșu) și tratat cu GA (albastru). Inset: componenta mobilă și componenta imobilă, ambele vizibile în linia spectrală de la câmpuri joase, sunt notate cu α și respectiv β. **(b)** Spectrul RES în bandă X înregistrat pentru methemoglobina cabalină în soluție, în domeniul de temperatură cuprins între 5 și 25 grade Celsius. Inset: componenta mobilă și componenta imobilă, ambele vizibile în linia spectrală de la câmpuri joase, sunt notate cu α și respectiv β.

Pentru a examina influența GA asupra mobilității nitroxidului când proteina este atașată substratului BG, a fost analizată populația markerilor de spin imobilizați, timpii de corelare reorientațională și parametrul semi-empiric de mobilitate . Când proteina este atașată pe biosticla netratată cu GA, toți parametrii de mai sus indică un grad mai înalt de libertate de mișcare pentru markerii orientați către suprafața proteinei, sugerând că vecinătatea poziției β-93 este schimbată după adsorbție într-un mod care

permite acestei fracții de nitroxizi să evite buzunarul de tirozină și să se rotească mai puțin restrictiv decât în soluție. Ținând cont de faptul că poziția β -93 este localizată într-un helix din domeniul central al proteinei, una din posibilele explicații ar fi faptul că o parte din acest helix se desface după adsorbție și, drept urmare, mișcarea markerului de spin este mai puțin restricționată comparativ cu situația dinainte de adsorbție. În schimb, când substratul BG este funcționalizat cu GA, restricțiile în mobilitate sunt mult mai pronunțate, sugerând faptul că proteina devine mai rigidă, ca o consecință a polimerizării induse de agentul de cuplare [MACDONALD și PEPPER 1994, GUILLOCHON *et al.* 1986, WEETALL 1974].

3.1.2. Modificări conformaționale induse în structura methemoglobinei în urma procesului de adsorbție – distanțe inter-spin

SDLS în combinație cu spectroscopia DEER a fost aplicată pentru a determina distanța dintre cele două poziții β -93 din methemoglobină înainte și după adsorbția pe biosticlă. Conform informației obținute cu ajutorul difracției de raze X, distanța dintre atomii C_{β} ai celor două poziții β -93 din methemoglobină este 26.231 Å (Figura 1).

Un studiu recent a relevat o distanță de aproximativ 25.3 Å între cele două poziții β -93 din hemoglobina umană, marcate cu MTS [BANHAM *et al.* 2007]. Măsurătorile noastre DEER au relevat o distanță de 24.8 Å între pozițiile β -93 ale methemoglobinei în soluție (Figura 4), ceea ce este în acord cu distanța prezentată de Banham și colaboratorii săi, ținând cont că am utilizat un marker de spin cu o catenă laterală ușor mai lungă decât cea a MTS.

O primă observație cu privire la spectrele DEER se referă la faptul că toate spectrele înregistrate după adsorbție au o adâncime a modulației foarte mică în comparație cu spectrul înregistrat în soluție (Figura 4). Acest comportament indică o scădere a numărului de spini din probă care au interacțiuni dipolară [POLYHACH și JESCHKE 2007]. O posibilă explicație este faptul că proteina disociază în urma procesului de adsorbție. De fapt, s-a demonstrat deja că hemoglobina disociază la concentrații scăzute, la valori extreme ale pH-ului (sub 4 sau peste 10) precum și la adăugarea de detergenți [PIN și ROYER 1994, VALDES și ACKERS 1977]. Mai mult, ținând cont că între subunitățile acestei proteine au loc interacțiuni hidrofobice, este foarte probabil ca interacțiunea dintre suprafața hidrofobă a biosticlei și molecula de methemoglobină să aibă drept rezultat disocierea și denaturarea proteinei.

Experimentele DEER efectuate cu methemoglobină atașată pe biosticla netratată cu GA au evidențiat faptul că o fracțiune mică de proteine își păstrează structura tetramerică după adsorbție, astfel încât, în acest caz, a fost posibilă obținerea unei distribuții de distanțe între markerii atașați în cele două poziții β -93 (Figura 4). Totuși, intensitatea curbei de distribuție este mult mai mică decât cea înregistrată pentru

proteina în stare nativă, datorită numărului redus de perechi de spini aflați la distanțe cuprinse între 2÷8 nm unul față de celălalt.

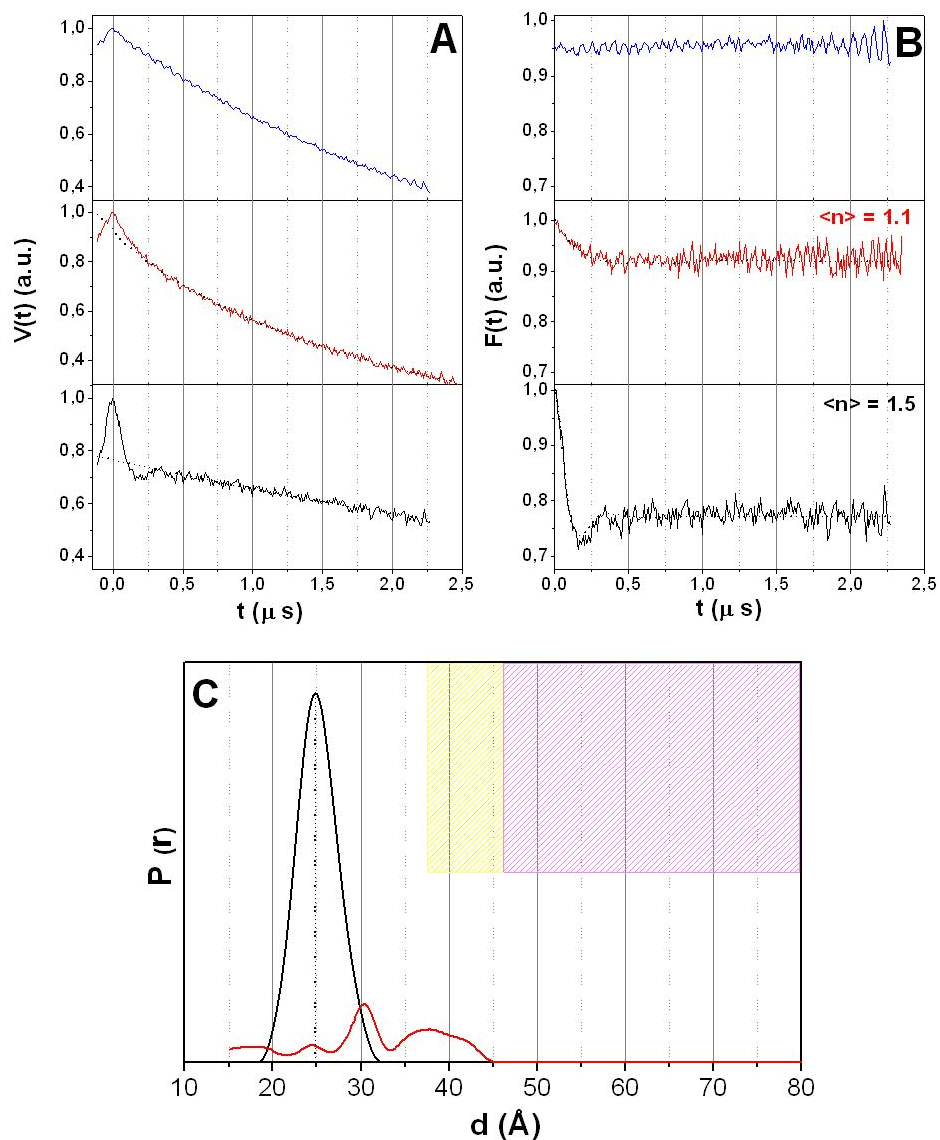


Figura 4 Caracterizarea DEER a methemoglobinei cabaline, marcată în poziția β -93 (A) funcția de evoluție dipolară fără corecția de background; (B) semnalul DEER de interacțiune dipolară, după corecția de background; (C) distribuția de distanțe obținută prin regularizarea Tikhonov. Liniile negre punctate din secțiunile (A) și (B) reprezintă simulările spectrelor, obținute în urma regularizării Tikhonov. Liniile continue corespund spectrelor înregistrate pentru methemoglobină în soluție, înainte de adsorbție (negru), și după adsorbția pe biosticla netratată cu (roșu) și tratată cu GA (albastru). În figuri este precizat și numărul de spini care interacționează per complex. Dreptunghiurile colorate indică exactitatea datelor obținute pentru distanță: alb = distanțe și distribuții corecte; galben deschis = distanțe aproximative, dar informații incorecte despre distribuția lor; magenta = predicții incorecte.

Distribuția de distanțe obținută în urma analizei cu regularizarea Tikhonov indică faptul că, după adsorbție, distanța dintre cele două poziții β -93 este mai mare decât în stare nativă (Figura 4). Acest rezultat conduce la ipoteza că cele două lanțuri β ale proteinei sunt ușor distanțate ca urmare a procesului de adsorbție. Raportat la structura proteinei, aceasta înseamnă că, după adsorbție, structura tetramerică adoptă o conformație ușor desfăcută, datorită interacțiunii cu suprafața biosticlei.

Probele tratate cu GA și funcționalizate cu methemoglobină reprezintă un caz special, din cauza lipsei totale a modulației semnalului DEER. Principalul factor care contribuie la acest comportament este polimerizarea proteinei, cauzată de prezența GA (și, în consecință, o distribuție spațială uniformă a markerilor de spin în probă).

3.1.3. Modificări conformaționale induse în structura methemoglobinei în urma procesului de adsorbție – structura secundară.

Pentru a obține informații despre modificările conformaționale care apar în structura secundară a methemoglobinei după adsorbție, s-a realizat deconvoluția amidei I (centrată la 1650 cm^{-1}) din spectrul FT-IR de absorbție al proteinei (Figura 3).

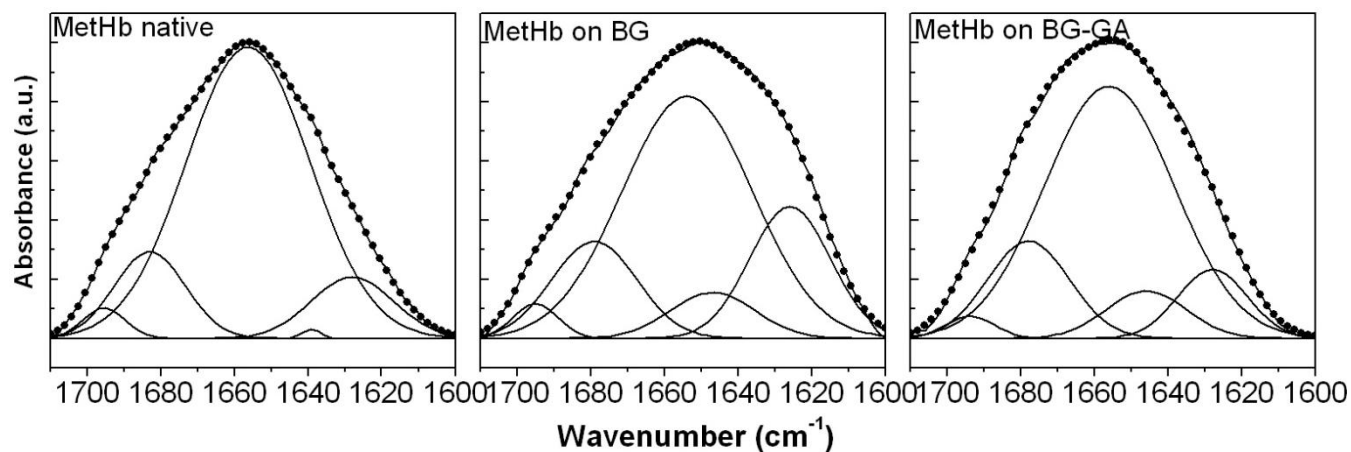
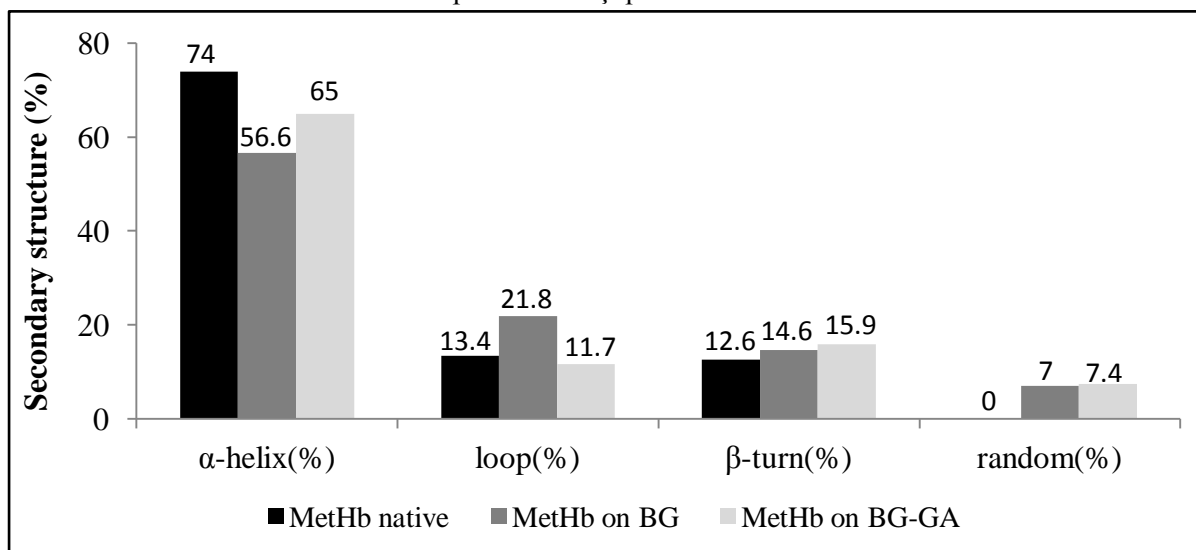


Figura 5 Deconvoluția amidei I în subbenzile componente pentru methemoglobina cabalină înainte și după adsorbția pe cele două substraturi de biosticlă (cu și fără GA) Linia punctată reprezintă suma subbenzilor componente. Erorile sunt estimate la $\pm 1\text{ cm}^{-1}$ pentru pozițiile subbenzilor și la $\pm 5\%$ pentru ariile lor.

Hemoglobina este o proteină formată în principal din α -helixuri (86% - conform rezultatelor obținute prin difracția de raze X) și nu conține structuri de tip β -sheet [CAI și SINGH 2004]. Așadar, subbenzile din jurul valorilor 1627 și 1695 cm^{-1} pot fi atribuite unor bucle scurte de interconectare între helixuri [SUSI și BYLER 1983] iar subbanda cea mai mare, înregistrată la $1654\text{--}1656\text{ cm}^{-1}$ este asociată cu α -helixuri (Figura 5). Contribuțiile date de β -turns sunt vizibile între $1679\text{--}1682\text{ cm}^{-1}$ iar subbanda de la

1648 cm^{-1} este asociată cu structuri dezordonate. Procentul de α -helix (74%) determinat pentru methemoglobina în stare nativă (Tabelul 1) este în concordanță cu valorile prezentate în alte studii [CAI și SINGH 2004, LUO *et al.* 1994].

Tabelul 1 Distribuția structurii secundare în methemoglobina cabalină înainte și după adsorbția pe sticla bioactivă. Incertitudinea datorată erorilor experimentale și procedurii de simulare este estimată la $\pm 4\%$.



Din deconvoluția amidei I se observă că după atașarea pe biosticlă methemoglobina pierde aproximativ 18% din structura de tip α -helix și crește în schimb conținutul de β -turns, bucle sau structuri dezordonate (Tabelul 1). Această denaturare a structurii secundare a proteinei apare ca urmare a unei interacțiuni puternice cu substratul de biosticlă. De altfel, studii recente au relevat un asemenea comportament al proteinelor pe acest tip de substrat [CHEN *et al.* 2007, CHEN *et al.* 2006, GRUIAN *et al.* 2011a, GRUIAN *et al.* 2011b, BUCHANAN și EL-GHANNAM 2010]. Se confirmă astfel ipoteza conform căreia helixul în care este situată poziția β -93 ar putea fi desfășurată în urma adsorbției.

Ca agent de cuplare a proteinelor, este de așteptat ca glutaraldehida să mențină aproape complet structura nativă a acestora [HEULE *et al.* 2003, WILLIAMS și BLANCH 1994, WEETALL 1985]. Într-adevăr, deconvoluția amidei I a evidențiat faptul că methemoglobina pierde un procent mai mic din structura de tip α -helix (aproximativ 11%) atunci când biosticla este tratată cu glutaraldehidă (Tabelul 1). Totuși, creșterea conținutului de structuri dezordonate și de β -turns implică o anumită denaturare a proteinei chiar și în acest caz. Astfel, se poate deduce că adsorbția methemoglobinei presupune interacțiuni puternice cu suprafața biosticlei, care pot distruge legăturile de hidrogen implicate în stabilizarea α -helixurilor localizate la suprafața proteinei.

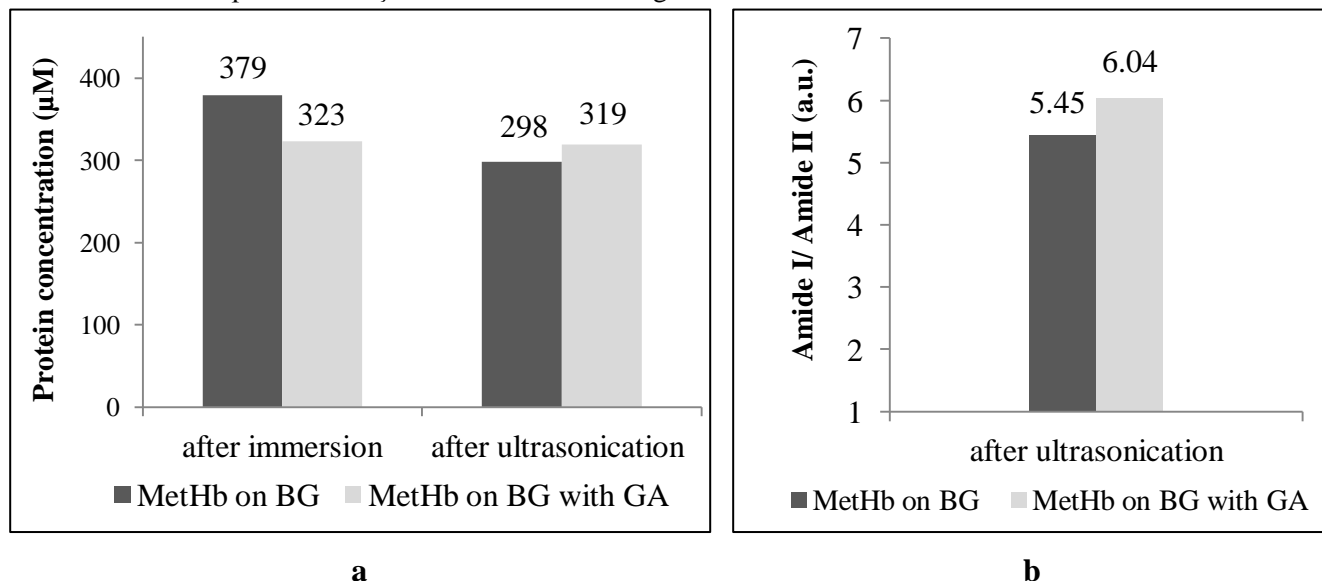
3.1.4. Determinarea cantității de proteină atașată

În cadrul acestui studiu s-au obținut informații despre cantitatea de proteină atașată pe biosticlă prin intermediul a trei tehnici spectroscopice diferite: RES, FT-IR și XPS.

Mai întâi s-a determinat cantitatea de proteină atașată pe sticla bioactivă din valoarea concentrației de spini din probă, concentrație care s-a determinat din aria spectrului RES în undă continuă înregistrat la temperatura camerei. Bineînțeles, pentru a determina concentrația reală a proteinei atașate, a trebuit luată în considerare în aceste calcule și eficiența la marcarea.

În Tabelul 2a sunt prezentate concentrațiile de methemoglobină atașată pe sticla bioactivă imediat după imersie, respectiv 30 de zile mai târziu, după ultrasonare. Valorile arată că imediat după imersie proteina prezintă o mai mare afinitate pentru sticla netratată cu GA. Cu toate acestea, spectrele RES înregistrate 30 de zile mai târziu (timp în care proba a fost incubată la 4°C), după supunerea probelor la ultrasonare și în urma pașilor de spălare, au indicat faptul că o cantitate mai mare de proteină rămâne atașată ireversibil pe biosticla tratată cu GA.

Tabelul 2 (a) Concentrația molară (în μM) de methemoglobină (MetHb) atașată pe sticla bioactivă⁶ înainte și după ultrasonare. (b) Raportul intensităților amida I/ amida II din spectrul FT-IR înregistrat pentru methemoglobina atașată pe biosticlă după ultrasonare. Pentru ambele metode, erorile sunt estimate la $\pm 10\%$, datorită setărilor experimentale și incertitudinii în extragerea liniei de bază.



O a doua abordare a constat în utilizarea raportului amida I/amida II din spectrele FT-IR pentru a evalua cantitatea de methemoglobină rămasă atașată de substratul de biosticlă în urma procedurii de

⁶ engl. Bioactive glass (BG)

ultrasonare. Trebuie menționat însă faptul că această metodă nu permite determinarea efectivă a concentrației de proteină din probă, fiind posibil doar un studiu comparativ al cantităților de proteină atașată pe cele două substraturi de sticlă bioactivă (cu și fără GA). Astfel, rezultatele obținute cu ajutorul spectroscopiei FT-IR (Tabelul 2b) sunt în concordanță cu rezultatele obținute prin spectroscopia RES (Tabelul 2a).

Aceleași două probe (supuse ultrasonării) au fost analizate în continuare prin spectroscopia XPS [MUIR *et al.* 2008, BROWNE *et al.* 2004] pentru a investiga acoperirea cu methemoglobină a suprafeței sticlei bioactive. Adsorbția proteinei a fost pusă în evidență utilizând fotopicul de la 400 eV, corespunzător N 1s, care apare datorită prezenței azotului în fiecare aminoacid component al proteinelor. Deși sistemul de biosticlă conține la rândul său azot, fotopicul N 1s observat înainte de imersia substratului în soluție de proteină este centrat la 408 eV (Figura 6). Acest fotopic este caracteristic pentru azotul din nitrați și apare ca o consecință a precursorilor tip nitrați utilizați în prepararea biosticlei. După tratarea substratului cu GA, fotopicul N 1s centrat la 408 eV dispare datorită disoluției nitraților în urma pașilor de spălare. Apare în schimb un nou fotopic la o energie de legătură apropiată de valoarea 400 eV, datorită azotului din gruparea amino a 3-aminopropil-trietoxisilan.

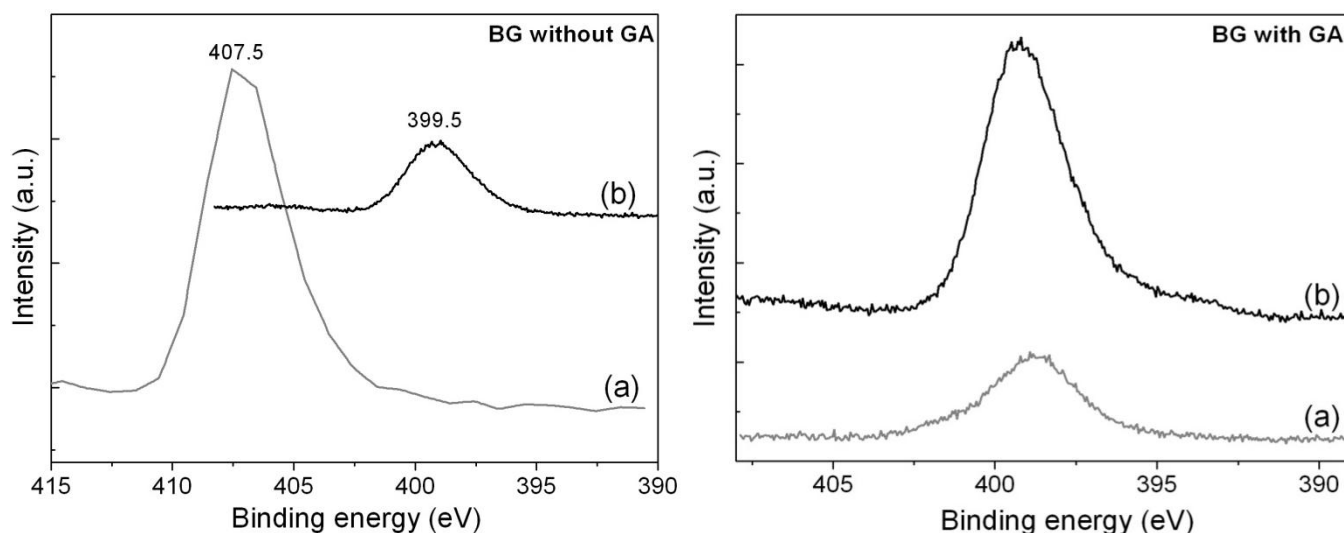


Figura 6 Spectrul XPS de înaltă rezoluție al N 1s pentru sticla bioactivă (BG) înainte (gri-a) și după imersia (negru -b) în soluție de methemoglobină cabalină. (Fotopicul N 1s înregistrat la 407.5 eV nu conține contribuții ale matricilor organice și, în consecință, înregistrarea spectrului de înaltă rezoluție a acestui fotopic nu a fost necesară pentru obiectivele acest studiu. Fotopicul prezentat în figură a fost extras din spectrul survey al biosticlei netratate cu GA).

După imersia probelor în soluția de methemoglobină, deconvoluția spectrului XPS de înaltă rezoluție a N 1s a evidențiat prezența a două componente centrate la 398,2 eV și 400 eV (Figura 7). Ambele componente sunt caracteristice grupărilor C-NH₂ dar ultima este tipică pentru azotul din matrici organice [VANEA și SIMON 2011, SERRO *et al.* 2006].

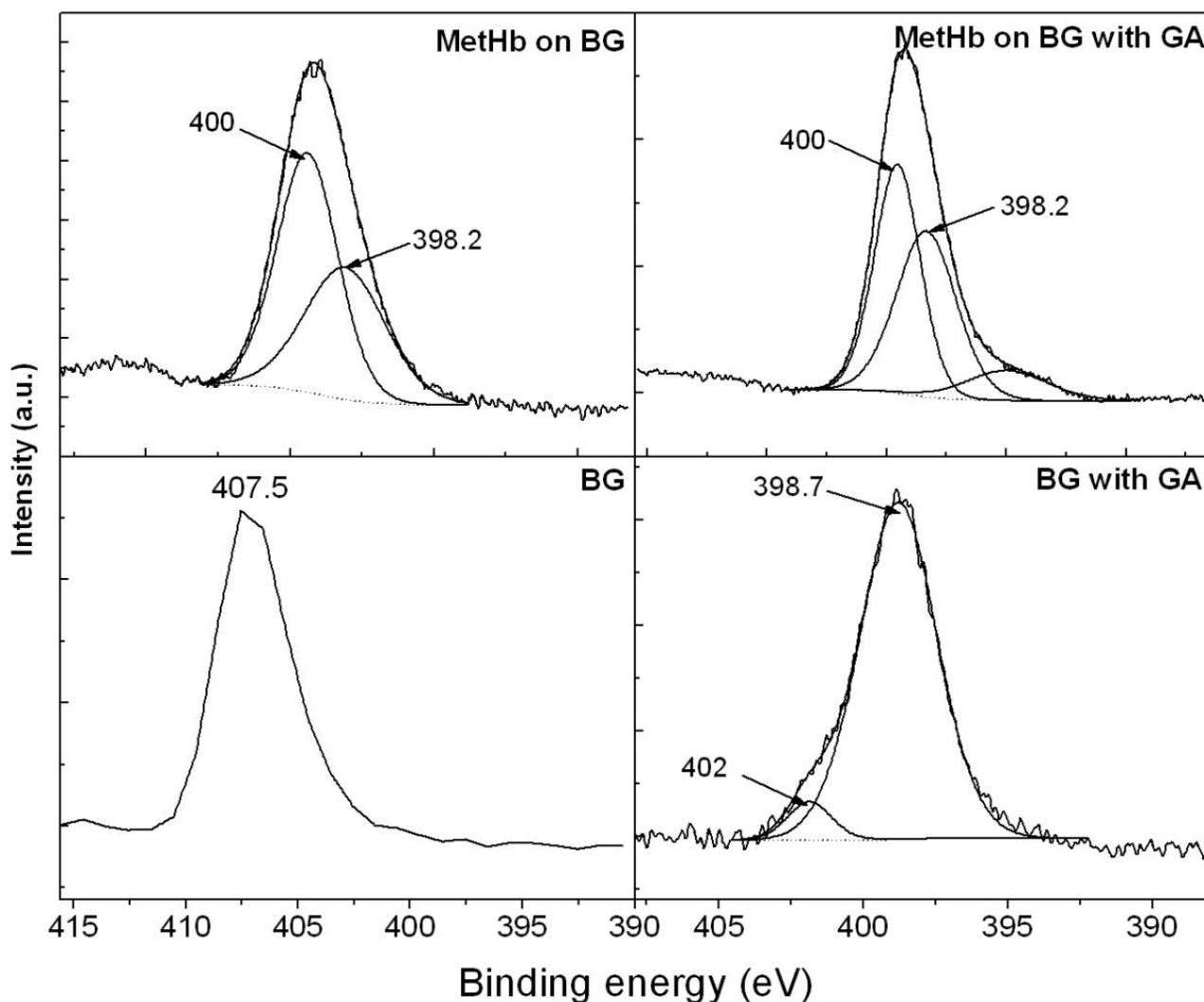
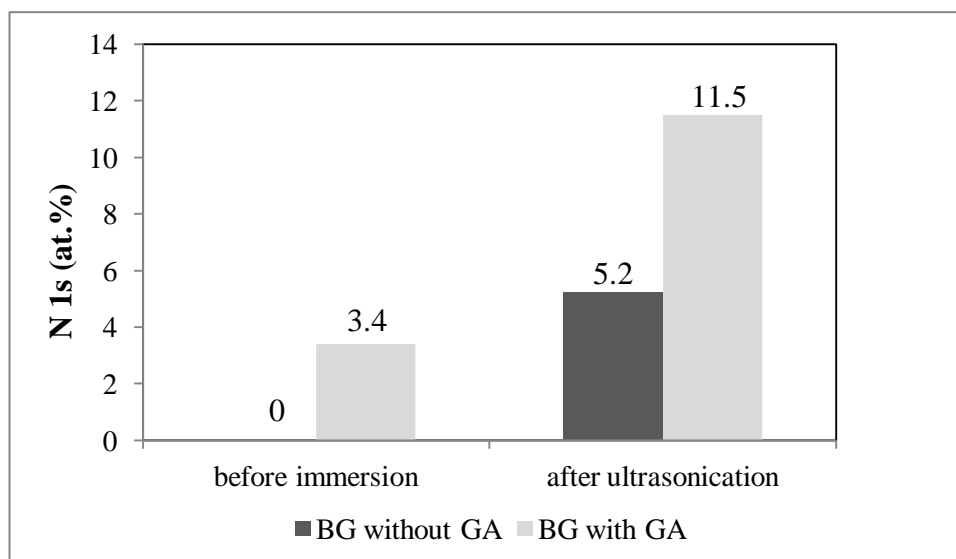


Figura 7 Deconvoluția spectrului XPS de înaltă rezoluție N 1s pentru sticla bioactivă (BG) înainte și după imersia în soluție de methemoglobină cabalină. (Fotopicul N 1s înregistrat la 407.5 eV nu conține contribuții ale matricilor organice și, în consecință, deconvoluția acestui fotopic nu a fost necesară pentru obiectivele acest studiu).

În consecință, intensitatea acestui fotopic a fost utilizată pentru a cuantifica proteina depusă la suprafața biosticlei (Tabelul 3). Astfel, intensitatea relativă a fotopicului N 1s centrat în apropiere de 400

eV evidențiază faptul că o cantitate mai mare de proteină este atașată pe biosticla tratată cu GA (Tabelul 3).

Tabelul 3 Procentele atomice relative ale foticului N1s înregistrat în jurul valorii de 400 eV înainte și după imersia în soluție de methemoglobină cabalină (spectrele au fost înregistrate pe probele ultrasonate)



În concluzie, toate cele trei tehnici spectroscopice au relevat influența pozitivă a GA în procesul de atașare a methemoglobinei pe biosticlă. Se poate afirma că, în prezența GA, distribuția proteinei pe sticla bioactivă este mai organizată și, astfel, ponderea moleculelor de methemoglobină care au puncte slabe de legătură cu suprafața este mult mai mică decât în cazul biosticlei care nu conține GA. Această afirmație este susținută și de imaginile obținute cu ajutorul microscopiei electronice (Figura 8 și Figura 9). Se poate observa o mai bună organizare a stratului de proteină la suprafața biosticlei tratată cu GA (Figura 9). Mai mult, lanțurile de proteină care sunt vizibile pe suprafața acestei probe au aproximativ 50 nm lățime, ceea ce ar corespunde unei macromolecule formate din 8-10 proteine de methemoglobină.

Această interpretare certifică ipoteza de polimerizare a proteinei în urma atașării pe biosticla tratată cu GA și este confirmată de studii anterioare care au demonstrat că GA induce polimerizarea hemoglobinei în soluție [WEETALL 1974], rezultatul fiind formarea unor macromolecule constând din 8-10 proteine [MACDONALD și PEPPER 1994, GUILLOCHON *et al.* 1986].

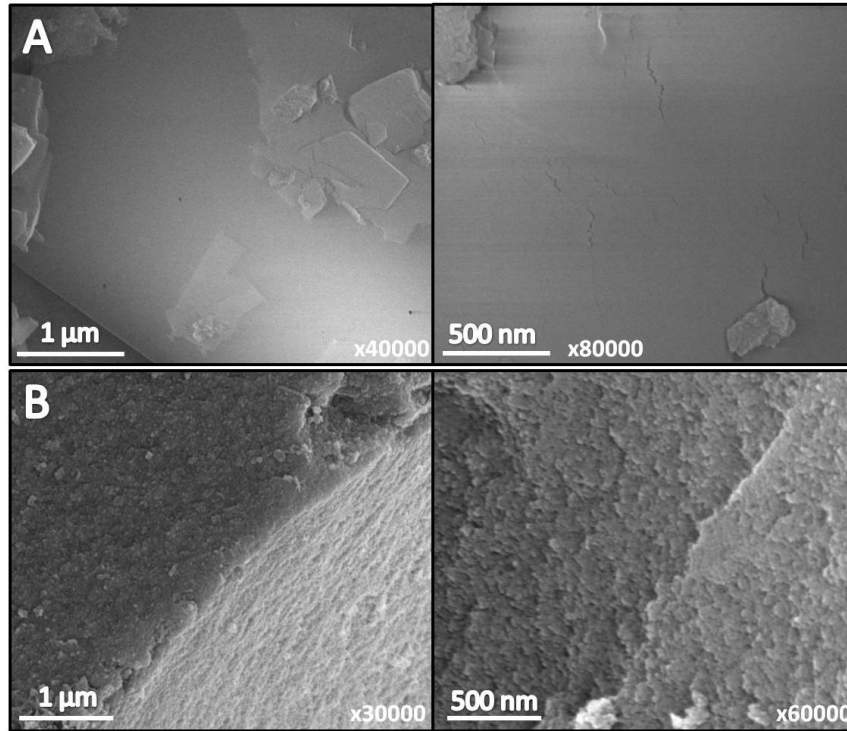


Figura 8 Imaginile SEM înregistrate pe biosticla netratată cu GA, înainte (A) și după imersie (B) în soluție de methemoglobină cabalină, la magnificări diferite.

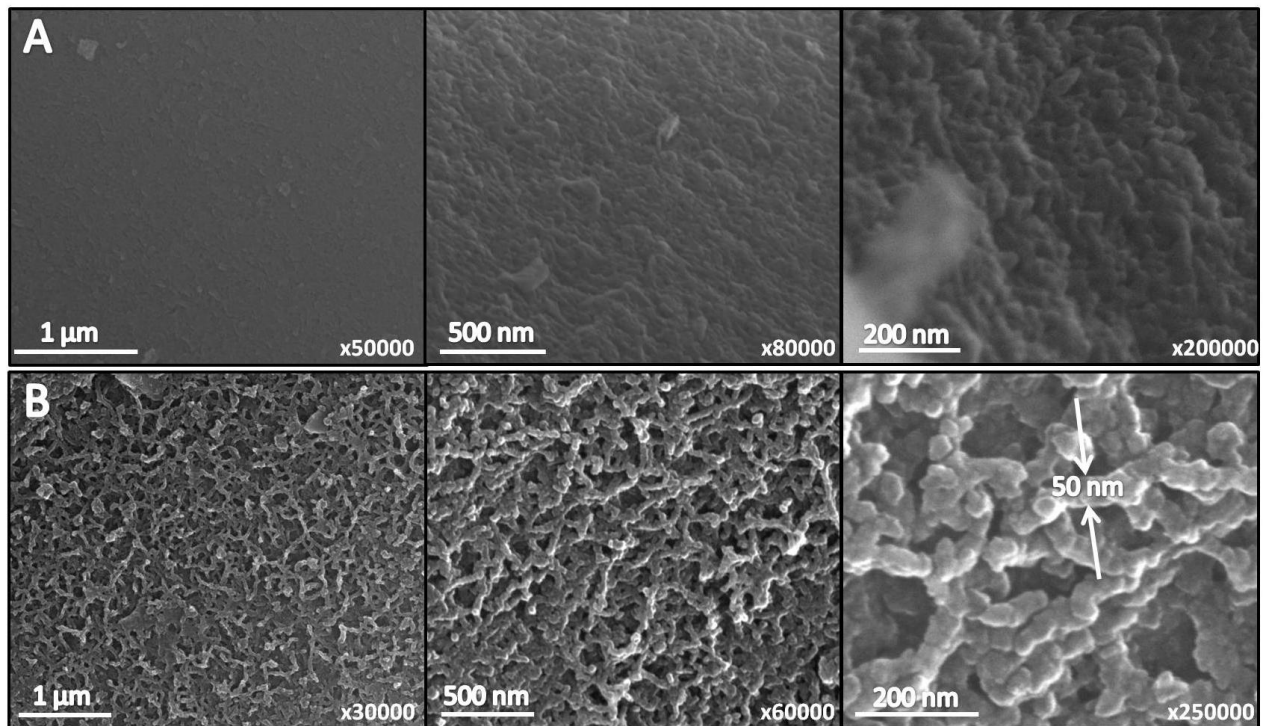


Figura 9 Imaginile SEM înregistrate pe biosticla tratată cu GA, înainte (A) și după imersie (B) în soluție de methemoglobină cabalină, la magnificări diferite.

3.2. *MnmE* din *E.coli*

3.2.1. Imobilizarea proteinei *MnmE* pe substratul de biosticlă

Pentru a obține informații detaliate despre imobilizarea proteinei *MnmE* în urma adsorbției pe sticla bioactivă, s-au efectuat măsurători de rezonanță electronică de spin în undă continuă pe probele marcate în pozițiile Ser278, Glu287, Ile105 și Lys95 (mai departe, acestea vor fi notate cu S278, E287, I105 și K95) (Figura 2).

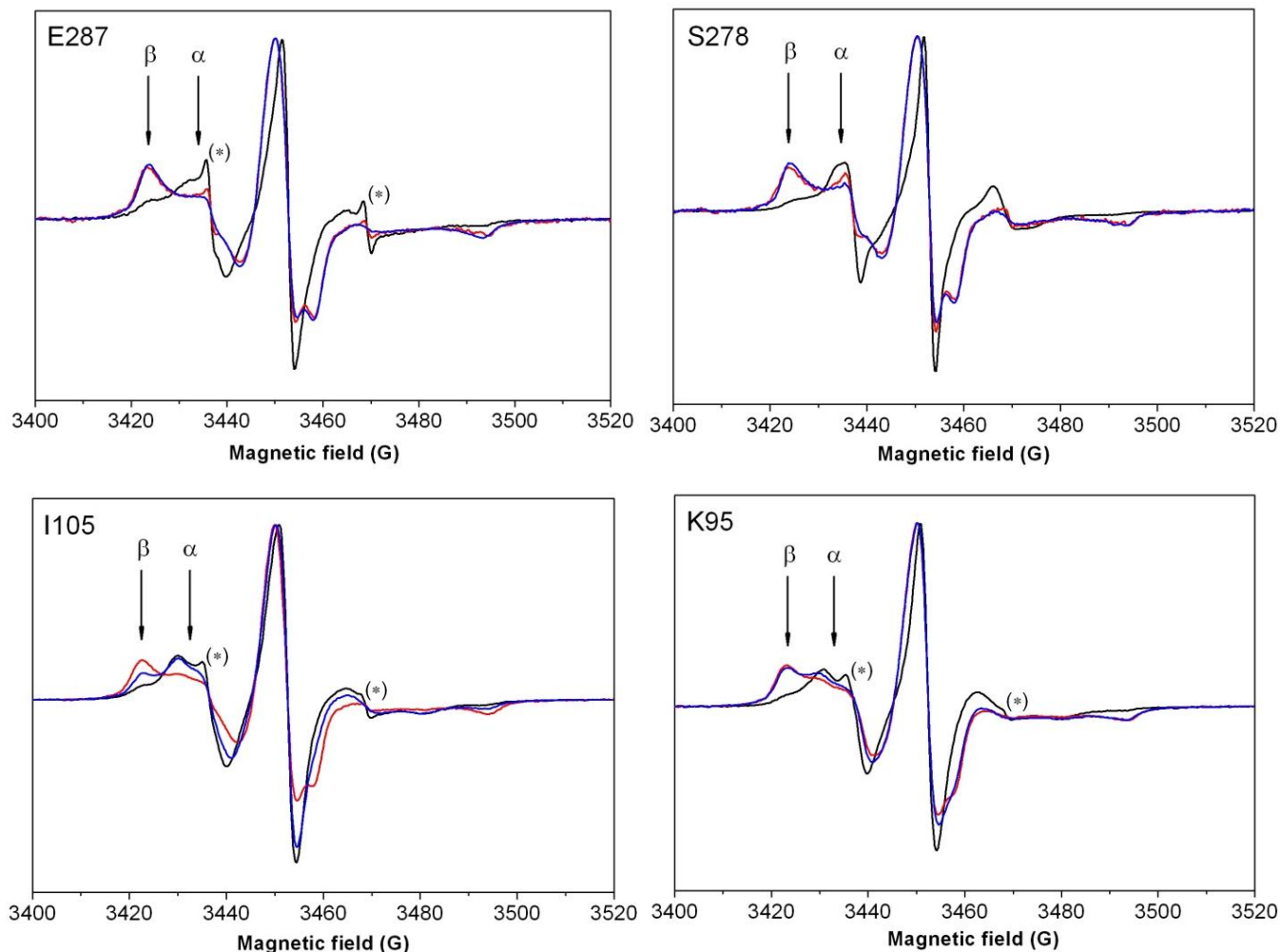
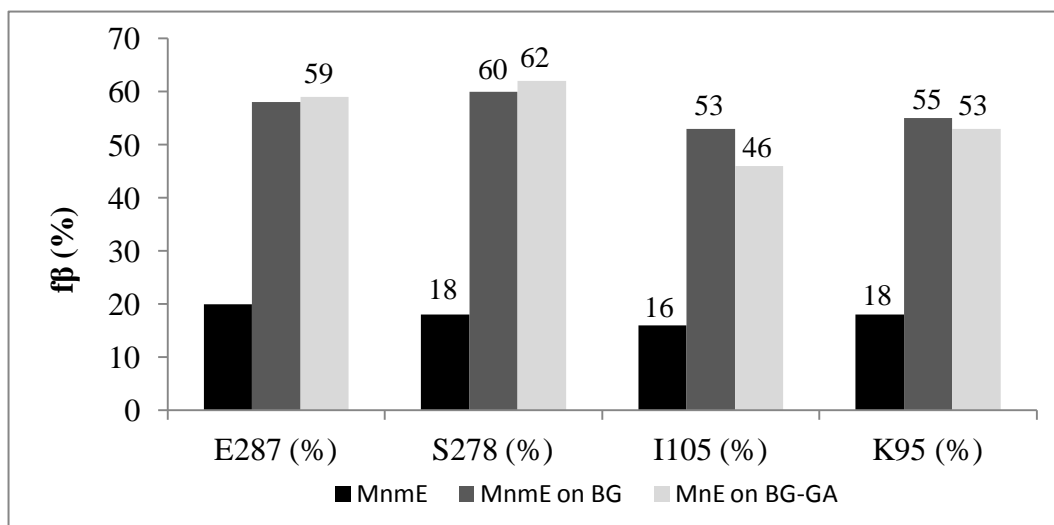


Figura 10 Spectrele RES la temperatura camerei (în bandă X) ale mutațiilor *MnmE* marcați în pozițiile E287, S278, I105 și K95, înregistrate în soluție înainte de imersie (negru) și după adsorbția sticla bioactivă, pe substratul netratat cu GA (roșu) și tratat cu GA (albastru). Spectrele prezentate în această figură au fost înregistrate în starea apo a proteinei. Componenta mobilă și componenta imobilă sunt indicate cu ajutorul săgeților α și respectiv β . Linia îngustă marcată cu simbolul (*) corespunde markerilor de spin nelegați de proteină, care se mișcă liber în soluție.

Pentru toate cele patru poziții marcate, spectrele RES înregistrate la temperatura camerei pentru MnmE înainte de adsorbție sunt caracterizate prin prezența a două componente atribuite unei fracții mobile (α), respectiv unei fracții imobile (β) de markeri de spin. (Figura 10). Componenta imobilă provine dintr-o fracțiune de markeri de spin care sunt angajați în interacțiuni secundare și terțiare, astfel libertatea lor de mișcare fiind restricționată. Componenta mobilă poate fi atribuită markerilor de spin care sunt supuși la mai puține constrângeri, dar poate apărea și datorită fluctuațiilor globale ale scheletului proteinei. Liniile de rezonanță foarte înguste care se suprapun peste spectrele înregistrate în cazul pozițiilor E287, I105 și K95 provin de la markerii de spin care nu sunt legați de proteină și se mișcă liber în soluție (marcați cu simbolul stea (*), în Figura 10).

Înainte de atașare, toate cele patru poziții prezintă o componentă mobilă mai pronunțată decât cea imobilă. În cazul poziției E287, aceasta denotă o anumită flexibilitate de mișcare a markerului de spin, ca urmare a situării sale în partea superioară a domeniului G al proteinei. Pe de altă parte, pentru poziția S278, componenta mobilă majoritară apare ca urmare a locației acestei poziții într-o buclă care are o flexibilitate a structurii foarte ridicată. Pentru cele două poziții situate în terminalul N al proteinei, componenta mobilă este generată de deviațiile celor două terminale N în soluție.

Tablelul 4 Ponderea componentei imobile determinată din simulările spectrelor RES înregistrate pentru MnmE în soluție, înainte și după adsorbția pe sticla bioactivă.



După adsorbție, toate spectrele prezintă o creștere a lărgimii liniei centrale de rezonanță, indicând o descreștere a mobilității markerilor de spin ca urmare a imobilizării proteinei pe biosticlă. Contribuția

componentei imobile a fost cuantificată prin simularea spectrelor RES și exprimată prin intermediul fracțiunilor de spini imobilizați. Astfel, imobilizarea proteinei a fost evidențiată pentru fiecare poziție marcată prin valorile obținute pentru fracțiunea componentei imobile înainte și după adsorbție (Tabelul 4).

S-a constatat că pozițiile cu cea mai mare imobilizare după adsorbție sunt cele situate în domeniul G al proteinei MnmE (E287 și S278) (Figura 10 și Tabelul 4). Această imobilizare puternică poate apărea ca urmare a unei interacțiuni directe a acestei regiuni a proteinei cu substratul de biosticlă, indicând faptul că cele două poziții ar putea fi situate în apropierea unor puncte de contact dintre proteină și suprafața biosticlei.

Efectul GA în adsorbția proteinei. Conform informațiilor structurale obținute din difracția de raze X, spre deosebire de methemoglobină, această proteină nu are multe lizine la suprafață [SCRIMA *et al.* 2005]. În consecință, este puțin probabil ca GA să inducă polimerizarea MnmE. Deși s-a așteptat o atașare mai puternică a proteinei pe substratul de biosticlă tratat cu GA, spectrele RES în undă continuă au relevat doar modificări minore în acest sens, exceptând poziția I105 din terminalul N al proteinei (Figura 10). Astfel, în cazul celor două poziții situate în domeniul G (E287 și S278), GA induce doar o ușoară creștere a componentei imobile ($1\div 2$ % în valoarea fracției de markeri de spin imobilizați) (Tabelul 4). Aceste diferențe minore indică faptul că imobilizarea acestei regiuni a proteinei este deja extrem de pronunțată pe substratul netratat cu GA, confirmând astfel prezumția că în apropierea celor două poziții există puncte de contact între proteină și biosticlă.

3.2.2. Modificări conformaționale induse în structura MnmE în urma procesului de adsorbție – distanțe inter-spin

Ca și în cazul methemoglobinei, principala caracteristică a spectrelor DEER după adsorbție este adâncimea foarte mică a modulației semnalului. Mai mult, în cazul adsorbției MnmE pe biosticla tratată cu GA, modulația semnalului este aproape inexistentă pentru trei din cele patru poziții, nefiind astfel posibilă determinarea unei distribuții de distanțe în aceste situații (Figura 11 și Figura 12). Cauzele acestei scăderi a adâncimii modulației au fost deja discutate în Secțiunea 3.1.2. Astfel, pentru proteina MnmE, o explicație a acestui comportament poate fi disocierea proteinei în urma adsorbției și, în consecință, lipsa interacțiunii dipolare între markerii de spin situați în aceeași moleculă (datorită distanțelor mai mari de 8 nm între ei). Pe de altă parte, în cazul biosticlei tratate cu GA, spectrele DEER prezintă o modulație a semnalului care a permis determinarea unei distribuții de distanțe. O posibilă explicație pentru faptul că o fracțiune mică a proteinei își păstrează structura dimerică după atașare este

faptul că GA este un agent proteic care ajută la menținerea structurii native a proteinei [HEULE *et al.* 2003].

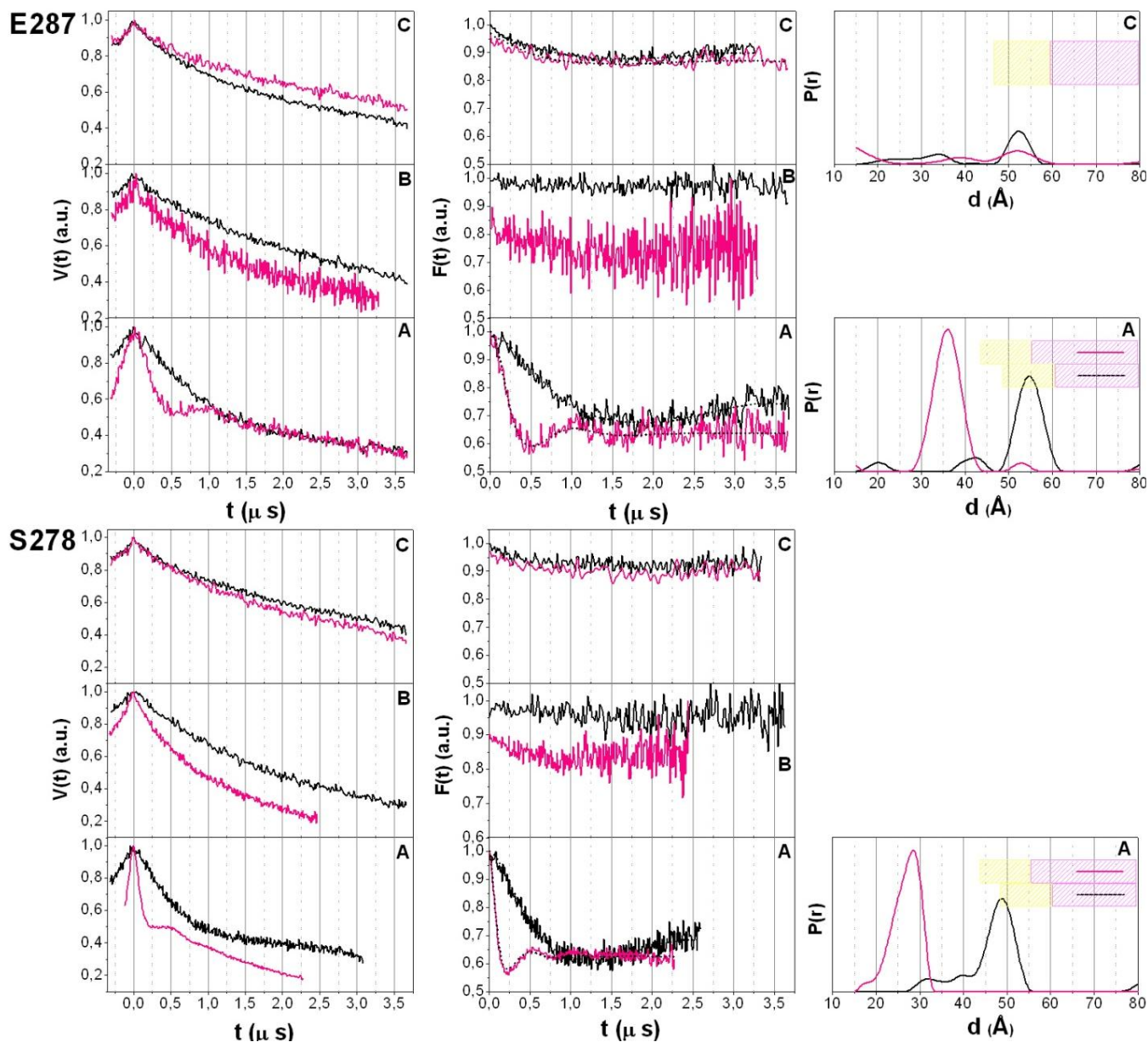


Figura 11 Compararea rezultatelor DEER obținute pentru mutații MnME E287 și S278 în cele două stări ale proteinei: starea apo (liniile negre) și starea de tranziție GDP- AlF_x (liniile roz): coloana din stânga – funcția de evoluție dipolară fără corecția de background; coloana din centru – semnalul DEER de interacțiune dipolară, după corecția de background; coloana din dreapta – distribuția de distanțe obținută prin regularizarea Tikhonov. Liniile negre punctate reprezintă simulările spectrelor, obținute în urma regularizării Tikhonov. Spectrele au fost înregistrate înainte (A) și după adsorbția pe sticla bioactivă netratată cu GA (B) și tratată cu GA (C). Dreptunghiurile colorate indică exactitatea datelor obținute pentru distanță: alb = distanțe și distribuții corecte; galben deschis = distanțe aproximative, dar informații incorecte despre distribuția lor; magenta = predicții incorecte.

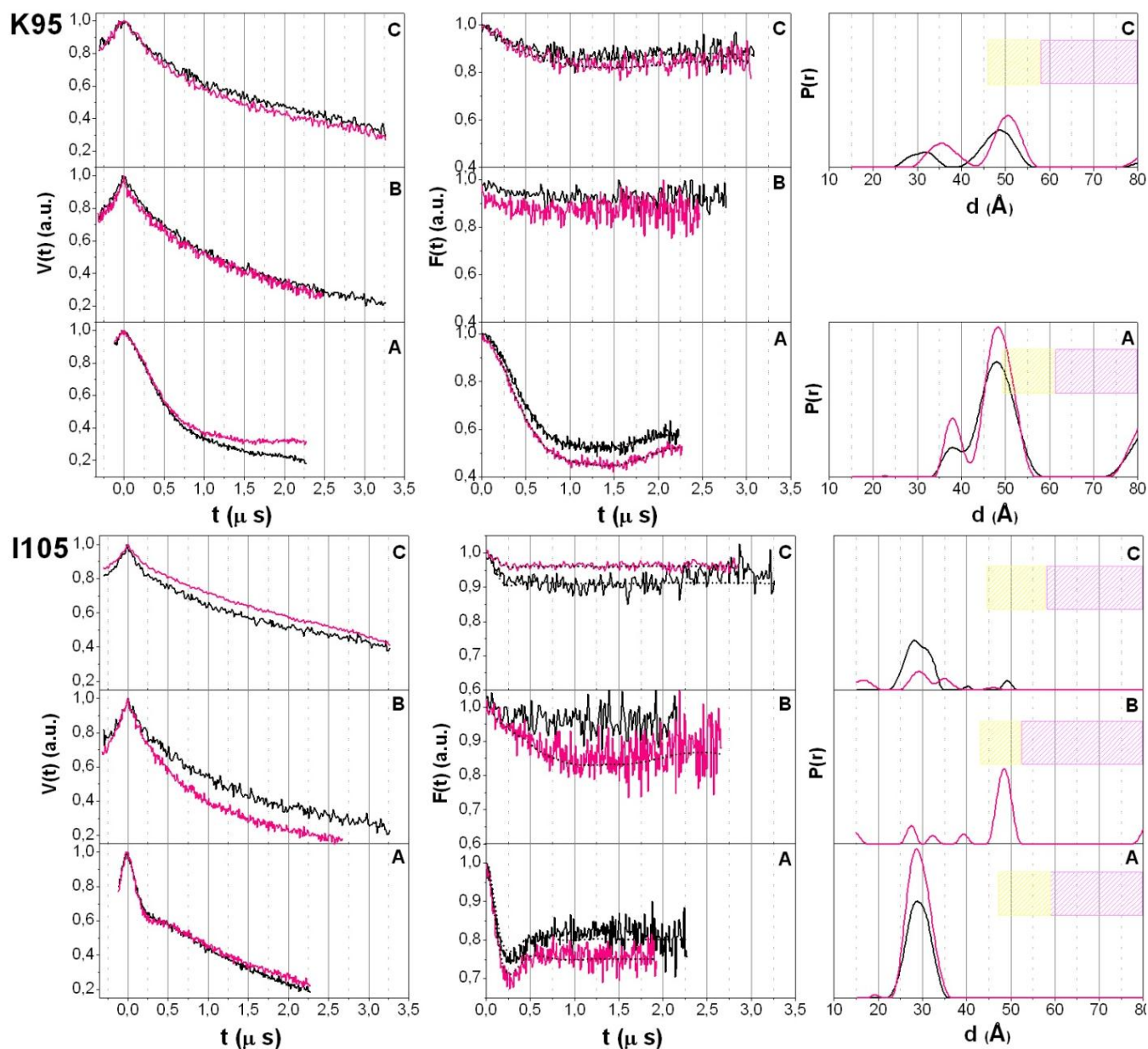


Figure 12 Compararea rezultatelor DEER obținute pentru mutații MnME I105 și K95 în cele două stări ale proteinei: starea apo (liniile negre) și starea de tranziție GDP·AlF_x (liniile roz): coloana din stânga – funcția de evoluție dipolară fără corecția de background; coloana din centru – semnalul DEER de interacțiune dipolară, după corecția de background; coloana din dreapta – distribuția de distanțe obținută prin regularizarea Tikhonov. Liniile negre punctate reprezintă simulările spectrelor, obținute în urma regularizării Tikhonov. Spectrele au fost înregistrate înainte (A) și după adsorbția pe sticla bioactivă netratată cu GA (B) și tratată cu GA (C). Dreptunghiurile colorate indică exactitatea datelor obținute pentru distanță: alb = distanțe și distribuții corecte; galben deschis = distanțe aproximative, dar informații incorecte despre distribuția lor; magenta = predicții incorecte.

De asemenea, se pare că în acest caz, spre deosebire de rezultatele obținute pentru methemoglobină, GA nu induce polimerizarea proteinei, datorită numărului mic de lizine aflate la suprafața moleculei. Această prezumție este confirmată și de imaginile SEM, care nu evidențiază formarea unor lanțuri de proteine ca în cazul imaginilor înregistrate pe probele cu methemoglobină (vezi Secțiunea 3.2.4).

Un caz special este cel al mutantului S278: se pare că pe ambele tipuri de substrat (cu și fără GA), markerii de spin atașați în această poziție sunt prea distanțați pentru a se putea obține un semnal DEER (Figura 11). De fapt, locația acestei poziții în regiunea de bucle a domeniului G este caracterizată de o flexibilitate ridicată care poate explica faptul că cei doi markeri de spin ajung să fie separați de o distanță mai mare de 8 nm după atașarea proteinei pe biosticlă. Astfel, înainte de adsorbția proteinei, distribuția de distanțe a poziției S278 prezintă o contribuție majoră (aproximativ 80 % – valoare calculată din aria de sub curba de distribuție a distanței) dată de markerii de spin aflați la o distanță de 4,9 nm între ei. După adsorbție, disocierea proteinei ar putea duce la o distanțare cu mai mult de 3 nm a celor două poziții, fiind astfel imposibilă detectarea distanței între cei doi markeri de spin cu ajutorul experimentului DEER.

Analiza mobilității domeniilor G ale proteinei MnmE. Modificările conformaționale care apar în structura MnmE în timpul ciclului GTP au fost studiate de Meyer *et al.* (2009). După cum s-a menționat în Secțiunea 1, domeniile G sunt situate față în față atunci când proteina nu are nucleotide atașate, dar după adăugarea GDP·AlF_x se apropie cu o distanță de aproximativ 30 Å [MEYER *et al.* 2009, BOEHME 2010, SCRIMA și WITTINGHOFER 2006] (vezi Figura 2). După adsorbție însă, maximele majoritare înregistrate în distribuția de distanțe pentru cele două poziții atunci când proteina este în starea de tranziție (GDP-AlF_x) sunt similare cu cele obținute în starea apo (Figura 11), sugerând faptul că cele două domenii G rămân în conformația inițială. Acest rezultat confirmă ipoteza înaintată de măsurătorile în undă continuă, conform căreia, după adsorbție, proteina „îngheață” în stare deschisă datorită imobilizării pe suprafața biosticlei.

Pe de altă parte, contribuțiile majore înregistrate pentru pozițiile I105 și K95, atunci când proteina este adsorbită pe biosticla tratată cu GA, sunt similare cu cele obținute înainte de atașare: 29 Å (pentru poziția I105) și 48 Å (pentru poziția K95) (Figura 12). Proba marcată în poziția I105 a fost singura pentru care s-a putut obține o distribuție de distanțe după atașarea pe biosticla netratată cu GA, obținându-se un maxim la valoarea de 48 Å (cu 20 Å mai mult decât în soluție sau în cazul sticlei tratate cu GA). Această creștere a distanței dintre cele două poziții (care implică o distanțare a celor două terminale N ale proteinei) explică creșterea în mobilitate a markerilor de spin atunci când proteina este

atașată pe biosticla fără GA. De asemenea, confirmă ipoteza disocierii proteinei în cei doi monomeri constituenți în urma procesului de adsorbție (Figura 13).

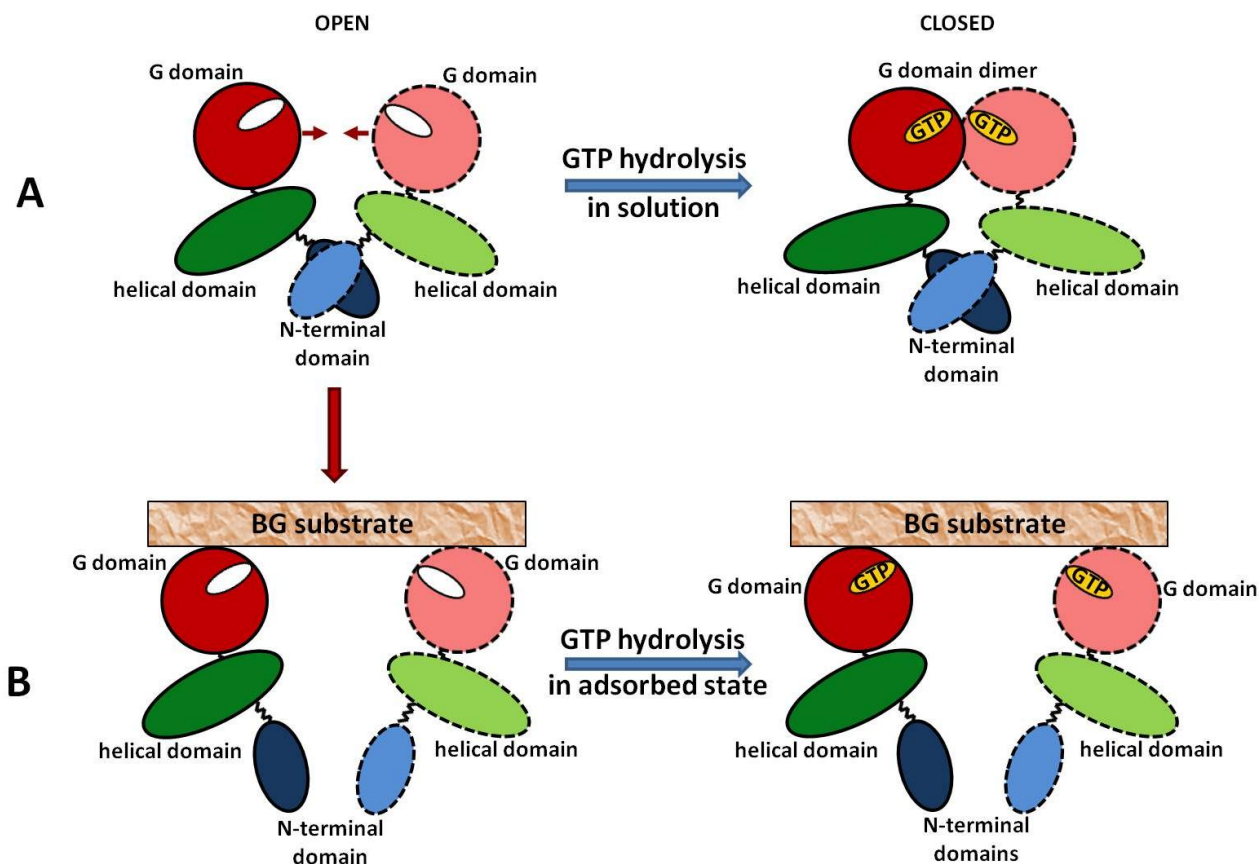


Figura 13 Ilustrare schematică a activării proteinei MnME ca urmare a hidrolizei GTP înainte („in solution”) și după adsorbția proteinei pe sticla bioactivă („in adsorbed state”). **A.** În soluție, domeniile G adoptă o conformație deschisă în starea apo și o conformație închisă în starea de tranziție GDP·AlF_x; **B.** După adsorbție, domeniile G reprezintă regiunea de contact cu suprafața biosticlei și astfel proteina rămâne în conformație deschisă și după atașarea nucleotidei. Figură adaptată din [SCRIMA și WITTINGHOFER 2006].

3.2.3. Modificări conformaționale induse în structura MnME în urma procesului de adsorbție – structura secundară

Deconvoluția amidei I din spectrul FT-IR al MnME indică faptul că interacțiunea cu ambele tipuri de substrat (cu și fără GA) induce modificări conformaționale în structura secundară a proteinei (Figura 14). Trebuie precizat că asocierea subbenzilor cu elemente ale structurii secundare s-a efectuat ținându-se cont de faptul că solventul folosit în cazul acestei proteine a fost D₂O (vezi Secțiunea 2.1). Astfel, subbanda de adsorbție atribuită structurii de tip α -helix, care apare la 1657,5 cm⁻¹ în proteina nativă, este

ușor deplasată după adsorbție (1659 cm^{-1}). Această poziție corespunde unor legături mai slabe de hidrogen [TATULIAN 2001], indicând o creștere a flexibilității helixurilor după adsorbție, ca o consecință a interacțiunii proteinei cu suprafața biosticlei.

Tabelul 5 Asocierea frecvențelor corespunzătoare amidei I cu elemente ale structurii secundare pentru MnmE înainte și după adsorbția pe sticla bioactivă.

	Frecvențele medii (cm^{-1})				
	α -helix	β -sheet	β -turn	random	agregate
MnmE	1657.5	1624, 1639,1695	1680	-	-
MnmE pe sticla bioactivă	1659	1638	1678	1648	1620

Subbenzile de la 1624 și 1695 cm^{-1} care corespund structurii tip β -sheet în structura nativă a proteinei MnmE sunt de asemenea deplasate după adsorbția pe biosticlă, spre 1620 și respectiv 1692.5 cm^{-1} , schimbându-și astfel atribuirea (Tabelul 5). Componenta de la 1620 cm^{-1} poate fi asociată cu vibrații ale catenelor laterale sau ale unor structuri agregate [ARRONDO și GONI 1999, SESHADRI *et al.* 1999], iar componenta de la 1692 cm^{-1} poate fi asociată cu structuri tip β -turns [KONG și YU 2007, NATALELLO *et al.* 2005, SUSI și BYLER 1983].

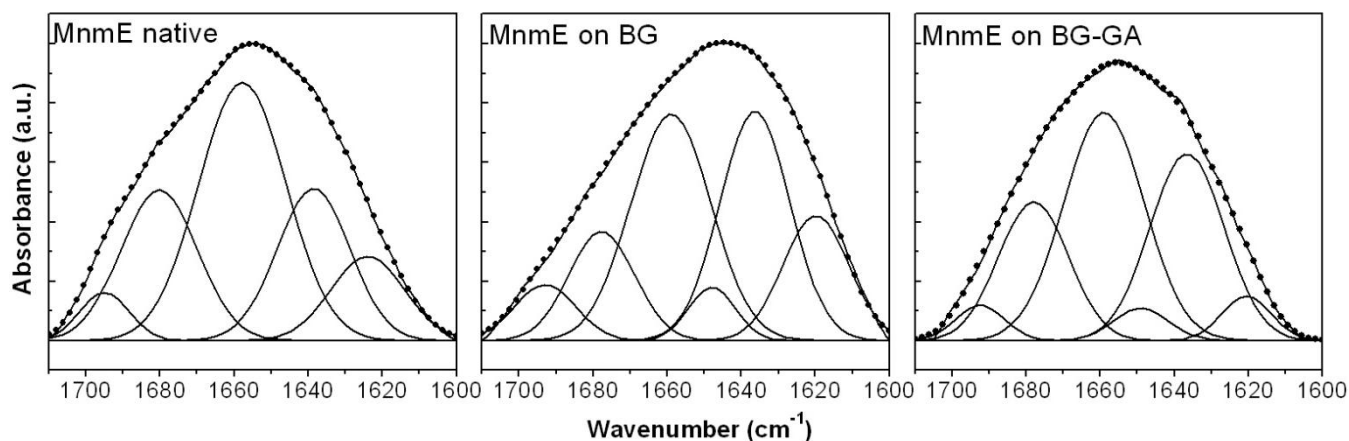
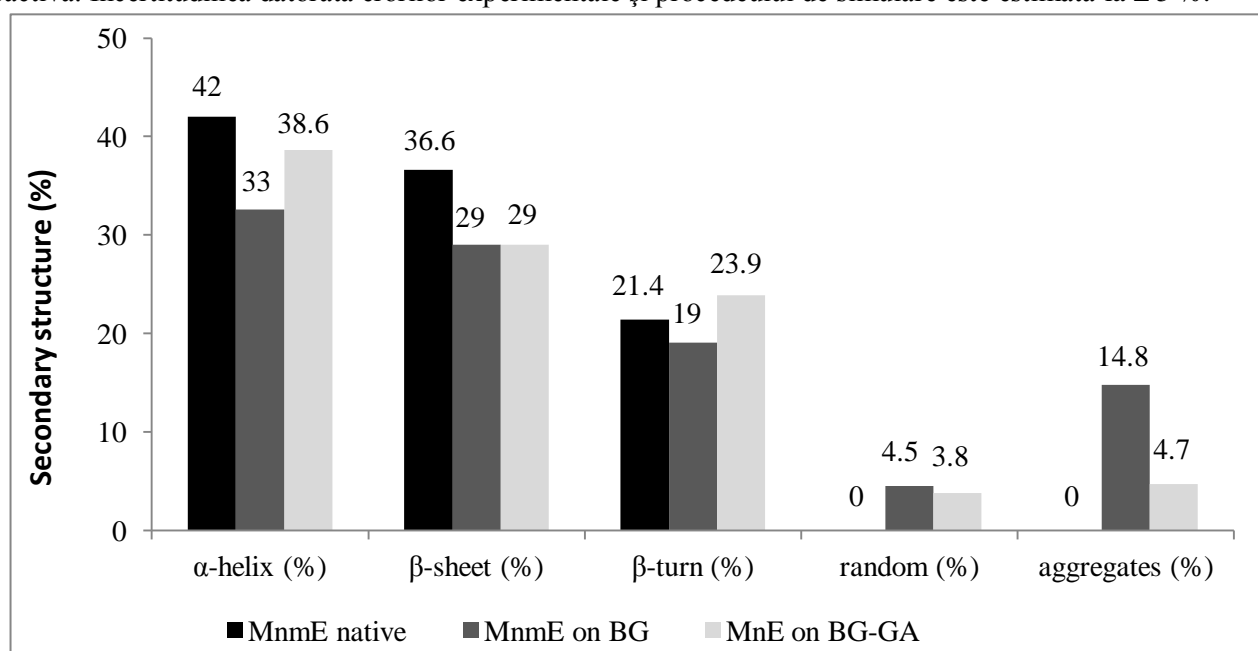


Figura 14 Deconvoluția amidei I în subbenzile componente pentru MnmE înainte și după adsorbția pe cele două substraturi de biosticlă (cu și fără GA). Linia punctată reprezintă suma subbenzilor componente. Erorile sunt estimate la $\pm 1\text{ cm}^{-1}$ pentru pozițiile subbenzilor și $\pm 5\%$ pentru ariile lor.

Astfel, tendința generală este descreșterea cantității de α -helixuri și β -sheet și creșterea cantității de structuri mai puțin ordonate (β -turns, random coils, agregate) după adsorbție. Aceste modificări sunt mai pronunțate pe biosticla netratată cu GA (Tabelul 6). Concluzia este că, deși pierderea în structuri tip β -sheet este similară pe ambele substraturi, GA ajută la păstrarea unei cantități mai mari de α -helixuri în structura MnmE după adsorbție. Mai mult, procentul de structuri agregate este mult mai mic atunci când biosticla este tratată cu GA, indicând un grad mai mic de denaturare a proteinei pe acest tip de substrat (Tabelul 6).

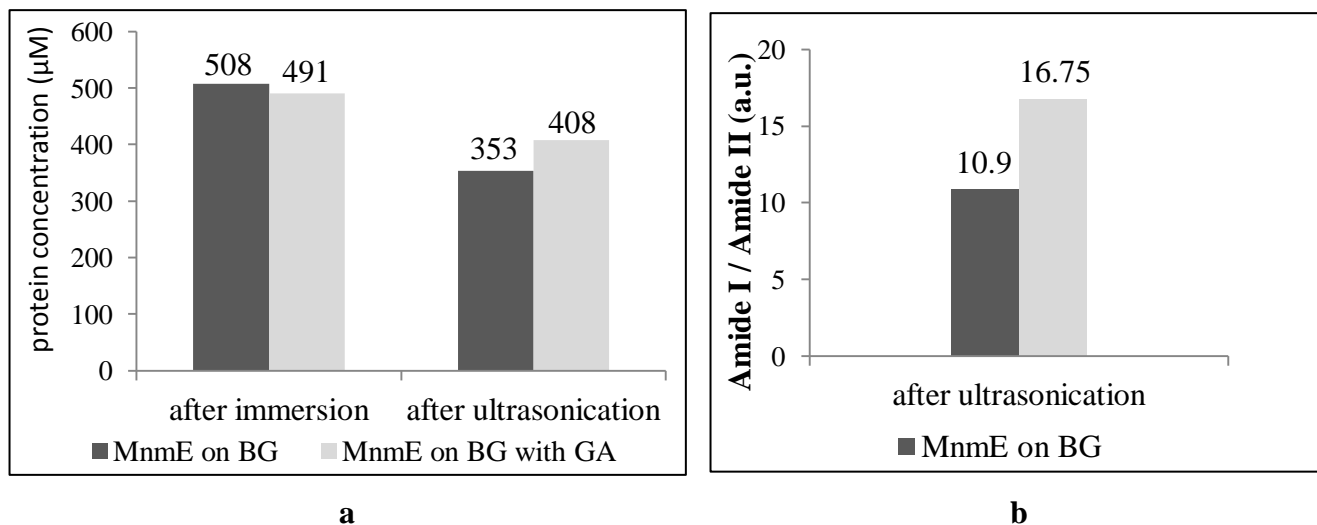
Tabelul 6 Distribuția structurii secundare în methemoglobina cabalină înainte și după adsorbția pe sticla bioactivă. Incertitudinea datorată erorilor experimentale și procedurii de simulare este estimată la $\pm 5\%$.



3.2.4. Determinarea cantității de proteină atașată

Cantitatea de proteină atașată pe sticla bioactivă a fost estimată din spectrele RES înregistrate la temperatura camerei. Imediat după imersie s-au obținut valori similare pentru ambele tipuri de substrat, însă procesul de ultrasonare duce la desprinderea unei cantități mai mari de proteină de pe biosticla netratată cu GA. Se confirmă astfel ipoteza emisă în Secțiunea 3.1.4, că GA duce la o atașare mai puternică a proteinei pe biosticlă (Tabelul 7a). Aceste rezultate sunt confirmate și de valorile raportului amida I/amida II din spectrele FT-IR ale proteinei, înregistrate după ultrasonarea probelor (Tabelul 7b).

Tabelul 7 (a) Concentrația molară (în μM) de MnmE atașată pe sticla bioactivă (BG) înainte și după ultrasonare. Erorile sunt estimate la $\pm 10\%$, datorită setărilor experimentale și incertitudinii în realizarea liniei de bază. **(b)** Raportul intensităților amida I/ amida II din spectrul FT-IR înregistrat pentru methemoglobina atașată pe biosticlă după ultrasonare. Erorile sunt estimate la $\pm 15\%$, datorită setărilor experimentale și incertitudinii în extragerea liniei de bază.



În continuare, suprafața sticlei bioactive a fost analizată înainte și după adsorbție cu ajutorul spectroscopiei XPS. Intensitatea relativă a foticului N 1s centrat în apropiere de 400 eV (Figura 15) a fost utilizată pentru a monitoriza cantitatea de MnmE atașată pe suprafața biosticlei (Tabelul 8).

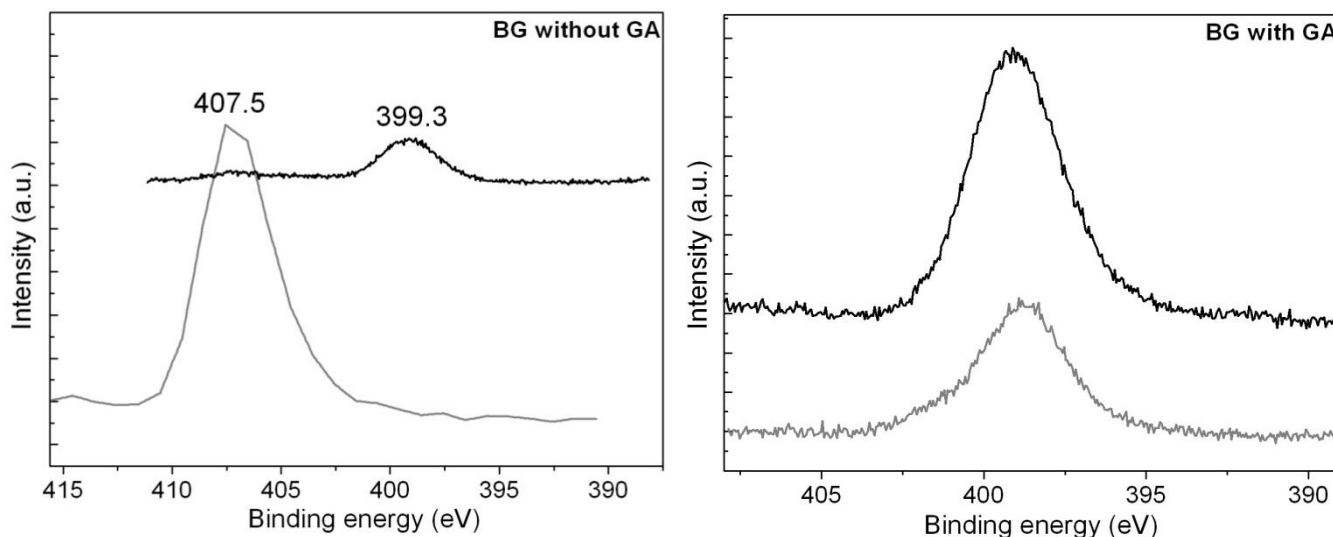
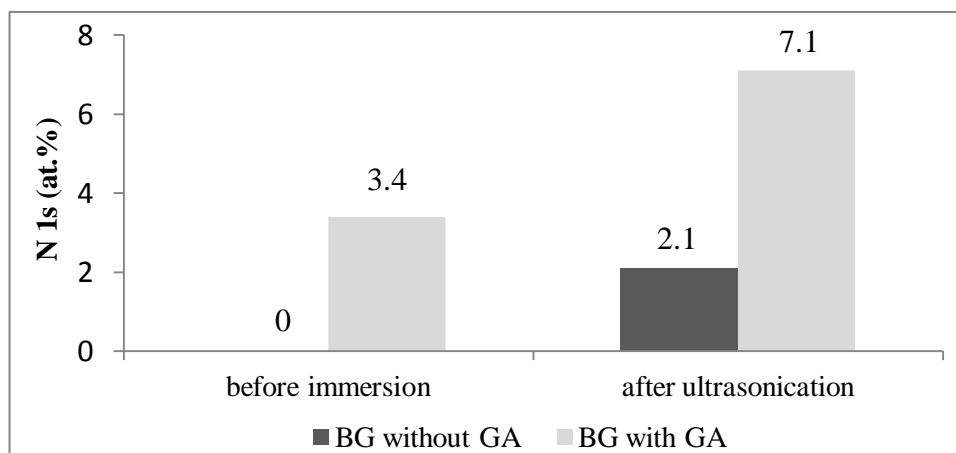


Figura 15 Spectrul XPS de înaltă rezoluție al N 1s pentru sticla bioactivă (BG) înainte (gri-a) și după imersia (negru -b) în soluție de MnmE. (Foticul N 1s înregistrat la 407.5 eV nu conține contribuții ale matricilor organice și, în consecință, înregistrarea spectrului de înaltă rezoluție a acestui fotic nu a fost necesară pentru obiectivele acestui studiu. Foticul prezentat în figură a fost extras din spectrul survey al biosticlei netratate cu GA).

Deconvoluția spectrului XPS de înaltă rezoluție a N 1s a evidențiat, la fel ca în cazul methemoglobinei cabaline, prezența a două componente centrate la 398,2 și 400 eV, ultimul fiind caracteristic azotului în matrici organice [VANEA și SIMON 2011, SERRO *et al.* 2006]. Rezultatele sunt în concordanță cu cele obținute prin spectroscopia RES și FT-IR, indicând faptul că biosticla tratată cu GA prezintă o mai bună acoperire cu proteină a suprafeței (Tabelul 8).

Tabelul 8 Procentele atomice relative ale foticului N1s înregistrat în jurul valorii de 400 eV înainte și după imersia în soluție de MnmE (spectrele au fost înregistrate pe probele ultrasonate)



Imaginile SEM arată faptul că după imersia biosticlei în soluție de MnmE se formează un strat uniform de proteină pe ambele tipuri de substrat (Figura 16 și Figura 17), dar glutaraldehida induce o mai bună organizare a stratului de proteină. Spre deosebire însă de imaginile înregistrate pe biosticla imersată în methemoglobină, nu se distinge formarea unor lanțuri de proteine, indicând faptul că este puțin probabil să se producă polimerizarea MnmE. Această afirmație este susținută, de altfel, și de rezultatele obținute cu ajutorul spectroscopiei DEER (vezi Secțiunea 3.2.2).

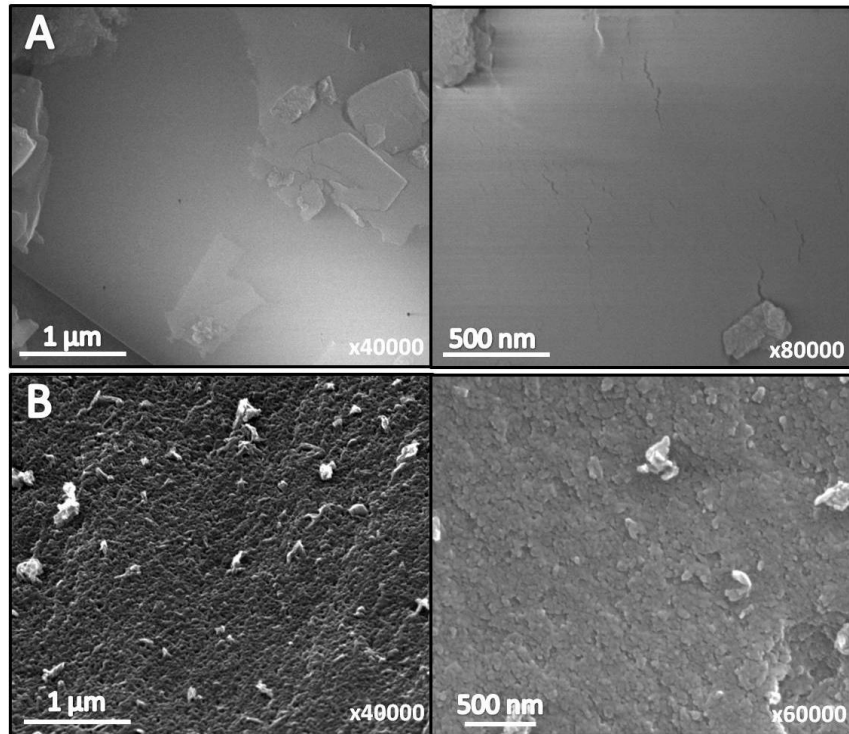


Figura 16 Imaginile SEM înregistrate pe biosticla netratată cu GA, înainte (A) și după imersie (B) în soluție de MnME, la magnificări diferite.

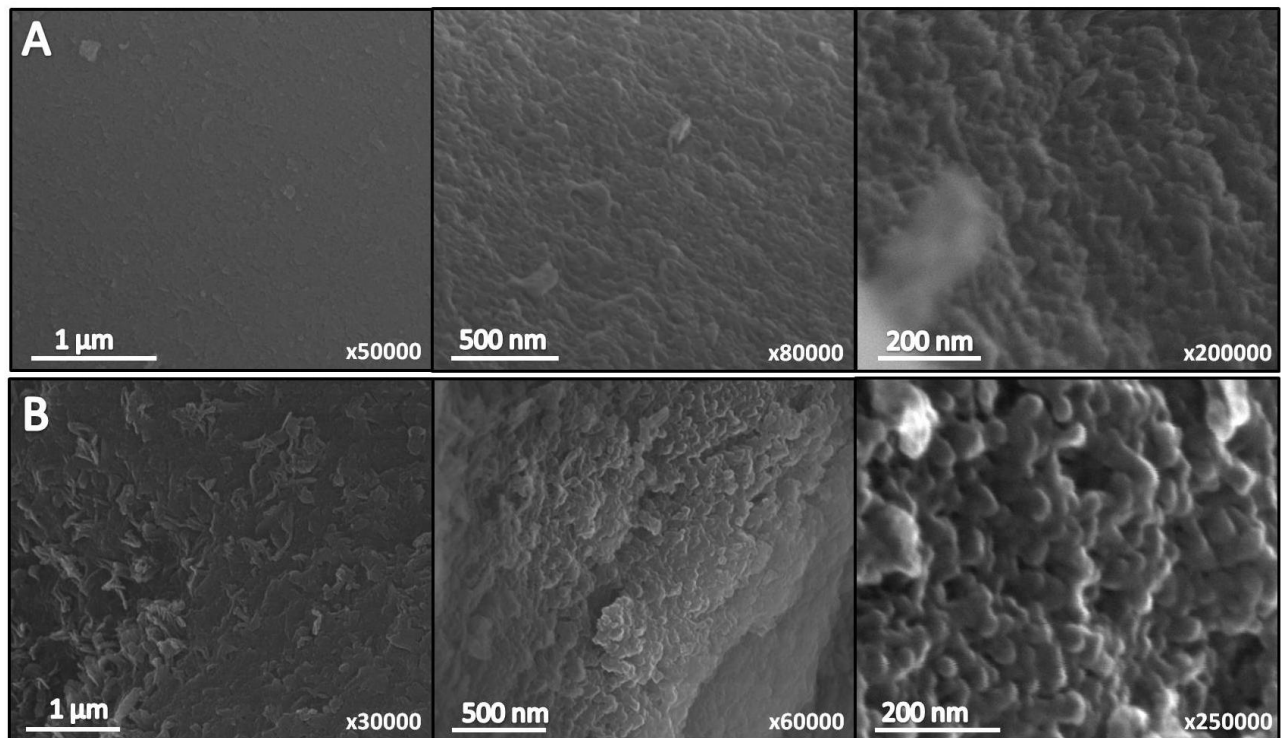


Figura 17 Imaginile SEM înregistrate pe biosticla tratată cu GA, înainte (A) și după imersie (B) în soluție de MnME, la magnificări diferite.

4. Concluzii

În conformitate cu primul obiectiv al acestui studiu, s-a demonstrat că spectroscopia RES, în combinație cu procedeul de marcarea de spini, poate fi utilizată pentru a investiga adsorbția proteinelor pe suprafețe solide.

Rezultatele obținute prin măsurători RES în undă continuă au arătat că mobilitatea markerilor de spin este puternic afectată după adsorbție, indicând faptul că mișcarea întregii proteine este restricționată ca urmare a interacțiunii cu substratul de biosticlă. În cazul methemoglobinei cabaline, măsurătorile RES în undă continuă au evidențiat faptul că regiunea din jurul poziției β -93 este desfășurată după adsorbție. Într-adevăr, măsurătorile FT-IR au confirmat faptul că aproximativ 18 % din structura de tip α -helix a proteinei se desface ca urmare a procesului de adsorbție, iar rezultatele obținute prin spectroscopia DEER au relevat o creștere a distanței dintre cele două poziții β -93. În consecință, se poate concluziona faptul că helixul în care este localizată poziția β -93 este desfăcut după atașarea proteinei pe biosticlă.

În cazul proteinei MnmE, din analiza spectrelor RES în undă continuă s-a dedus că pozițiile situate în domeniul G al proteinei (E287 și S278) sunt extrem de afectate de interacțiunea cu substratul de biosticlă, indicând faptul că proteina se leagă cu această regiune de suprafața sticlei bioactive (vezi Figura 13). Această afirmație este susținută și de măsurătorile DEER, care au demonstrat că domeniile G ale proteinei rămân în stare deschisă și după atașarea nucleotidei GDP·AlF_x, confirmând imobilizarea celor două domenii pe suprafața biosticlei.

Unul dintre cele mai importante aspecte al acestui studiu este ipoteza conform căreia ambele proteine disociază în urma interacțiunii cu substratul de biosticlă. Această ipoteză este susținută de o scădere semnificativă a adâncimii modulației semnalului DEER după adsorbție. În cazul proteinei MnmE a avut loc o reducere atât de drastică a adâncimii modulației încât nu a fost posibilă obținerea unei distribuții de distanțe. În concluzie, se poate spune că funcționalitatea acestei proteine este drastic afectată în urma atașării pe sticla bioactivă. Acest aspect nu este însă o caracteristică definitivă în evaluarea biocompatibilității unui biomaterial. Studii recente au relevat că atașarea celulelor pe suprafața unui material depinde în principal de cantitatea de proteină adsorbită [XIE *et al.* 2001, ZENG *et al.* 1999] și de orientarea moleculei de proteină la suprafața materialului [BUCHANAN și EL-GHANNAM 2010, CHITTUR 1998]. Mai mult, s-a demonstrat că o conformație a proteinei bogată în structuri dezordonate, flexibile, intensifică atașarea celulelor și răspândirea lor pe suprafața unei sticle bioactive [BUCHANAN și EL-GHANNAM 2010].

Un alt obiectiv al acestui studiu a fost investigarea efectului glutaraldehidei în atașarea proteinelor. Măsurătorile cantitative au evidențiat faptul că GA influențează pozitiv adsorbția celor două proteine (methemoglobina cabalină și MnmE) pe suprafața sticlei bioactive. Se poate concluziona că GA oferă puncte specifice și stabile de atașare a proteinei, astfel încât distribuția stratului de proteine de la suprafața biosticlei este mai organizată. În cazul în care biosticla nu este tratată cu GA, proteina acoperă tot spațiul pe care îl are la dispoziție, astfel încât unele molecule au doar puncte slabe de atașament și pot fi ușor îndepărtate prin spălare sau ultrasonare. Această ipoteză este confirmată și de imaginile SEM înregistrate pe sticla bioactivă înainte și după imersia în proteină.

În privința efectului pe care îl are GA în păstrarea structurii native a proteinei, măsurătorile FT-IR au arătat că, într-adevăr, în cazul ambelor proteine, un procent ridicat de structură ordonată (α -helix și β -sheet) rămâne intact după adsorbție. La nivelul structurii terțiare, măsurătorile DEER au demonstrat că, în cazul proteinei MnmE, numai pe biosticla tratată cu GA a rămas o fracțiune de proteină care a reușit să-și păstreze structura de dimer. Aceste rezultate confirmă faptul că GA are un rol în menținerea structurii native a ambelor proteine după adsorbție, dar efectul la nivelul structurii terțiare este mult mai slab decât în cazul structurii secundare.

Methemoglobina reprezintă un caz special, deoarece s-a arătat deja că hemoglobina polimerizează în prezența glutaraldehidei [MacDONALD și PEPPER 1994, GUILLOCHON *et al.* 1986, WEETALL 1974]. În consecință, absența totală a modulației observată pentru spectrele DEER confirmă faptul că tratarea suprafeței sticlei bioactive cu GA induce polimerizarea methemoglobinei după adsorbție. Mai mult, imaginile SEM au arătat că GA duce la formarea unor lanțuri de methemoglobină, constând în macromolecule formate din 8÷10 proteine.

Toate rezultatele prezentate mai sus evidențiază faptul că rezonanța electronică de spin în combinație cu procedeul de marcarea a spinilor, reprezintă o metodă puternică pentru studiul structurii și dinamicii proteinelor după adsorbția lor pe suprafețe solide. Principalul avantaj al acestei metode este faptul că proteinele pot fi investigate în mediul lor fiziologic, permițând astfel să se obțină informații despre dinamica și funcționalitatea lor după adsorbție. În plus, măsurători efectuate cu trei tehnici diferite au certificat faptul că spectroscopia RES poate fi utilizată pentru a obține informații despre cantitatea de proteină adsorbită pe un substrat solid. Acest tip de informație este de o importanță majoră în domeniul biomaterialelor și ajută la înțelegerea comportamentului proteinelor în timpul interacțiunii cu medii solide.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. [ANTONINI și BRUNORI 1971] Antonini E and Brunori M in *Myoglobin and Hemoglobin in their Reactions with Ligands*, eds. Neuberger, A. & Tatum, EL (North-Holland, Amsterdam), Vol. 21. (1971).
2. [ARRONDO și GONI 1999] Arrondo JLR and Goni FM, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 72 (1999) 367–405.
3. [BANHAM *et al.* 2007] Banham JE, Jeschke G, Timmel CR, *Molecular Physics* 105 (2007) 2041-47.
4. [BOEHME 2010] Boehme S, *Structural and functional analysis of the MnmE/ Gid A protein complex studied by EPR spectroscopy*, 2010. Department of Biology, University of Osnabrueck, Germany. Ref Type: Thesis/Dissertation.
5. [BOEHME *et al.* 2010a] Böhme Sabine, Simon Meyer, André Krüger, Heinz-Jürgen Steinhoff, Alfred Wittinghofer, Johann P. Klare, *J. Biol. Chem.*, 285 (2010) 16991-17000.
6. [BOEHME *et al.* 2010b] Sabine Böhme, Heinz-Jürgen Steinhoff and Johann P. Klare, *Spectroscopy*, 2010, 24 (3-4), 283-288
7. [BORDIGNON și STEINHOFF 2007] Bordignon E, Steinhoff HJ, *Membrane protein structure and dynamics studied by side-directed spin labeling ESR*, in: Hemminga MA, Berliner LJ (Eds), *ESR Spectroscopy in Membrane Biophysics*, Springer Science and Business Media, New York, 2007, pp. 129-164.
7. [BRIDGES *et al.* 2010] Bridges MD, Hideg K, Hubbell WL, *Appl Magn Reson* 37 (2010) 363–390.
8. [BROWNE *et al.* 2004] Browne MM, Lubarsky GV, Davidson MR, Bradley RH, *Surf. Sci.* 553 (2004) 155–167.
9. [BUCHANAN și EL-GHANNAM 2010] Buchanan LA, El-Ghannam A, *J. Biomed. Mater. Res. A* 93 (2010) 537-546.
10. [BYLER și SUSI 1986] Byler DM and Susi H, *Biopolymer* 25 (1986) 469–487.
11. [CAI și SINGH 2004] Cai S and Singh BR, *Biochemistry* 43 (2004) 2541-2549.
12. [CHEN *et al.* 2006] Chen QZ, Rezwan K, Armitage D, Nazhat SN, Boccaccini AR, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 17 (2006) 979-87.
13. [CHEN *et al.* 2007] Chen QZ, Rezwan K, Françon V, Armitage D, Nazhat SN, Jones FH, Boccaccini AR, *Acta Biomaterialia* 3 (2007) 551-62.
14. [CHITTUR 1998] Chittur K, *Biomaterials* 19 (1998) 357–369.
15. [DONG *et al.* 1994] Dong A, Caughey WS, Du Clos TW, *J. Biol. Chem.* 269 (9) (1994) 6424–6430.
16. [DOUSSEAU și PEZOLET 1990] Dousseau F, Pezolet M, *Biochemistry* 29 (1990) 8771-8779.
17. [EL-GHANNAM *et al.* 1999] El-Ghannam A, Ducheyne P, Shapiro IM, *J. Orthop. Res.* 17 (1999) 340-345.
18. [FANUCCI *et al.* 2003] Fanucci GE, Coggsall KA, Cadieux N, Kim M, Kadner RJ, Cafiso DS, *Biochemistry* 2003, 42, 1391.
19. [GASPER *et al.* 2009] Gasper R, Meyer S, Gotthardt K, Sirajuddin M, and Wittinghofer A, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (2009) 423–429
21. [GRAY 2004] Gray JJ, *Current Opinion in Structural Biology* 14 (2004) 110–115.

22. [GRUIAN *et al.* 2011a] Gruian C, Steinhoff HJ, Simon S, Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures 6 (2011) 373-83.
23. [GRUIAN *et al.* 2011b] Gruian C, Steinhoff HJ, Simon S, Studia Chemia 2 (2011) (accepted)
24. [GUILLOCHON *et al.* 1986] Guillochon D, Vijayakshmi M W, Thiam-Sow A, Thomas D, Biochem. and Cell. Biol. 64 (1986) 29-37.
25. [HENCH și WEST 1990] Hench LL, West JK, Chem Rev 90 (1990) 33-72.
26. [HEULE *et al.* 2003] Heule M, Rezwan K, Cavalli L, Gauckler LJ, Advanced Materials. 15 (2003) 1191–1194.
27. [HUBBELL *et al.* 2000] Hubbell WL, Cafiso DS, Altenbach C, Nat. Struct. Biol. 2000, 7, 735.
28. [JACOBSEN *et al.* 2005] Jacobsen K, Oga S, Hubbell WL, Risse T, Biophys. J. 88 (2005) 4351-4365.
29. [JACOBSEN *et al.* 2006] Jacobsen K, Hubbell WL, Ernst OP, Risse T, Angew. Chem. Int. Ed., 45 (2006) 3874-3877.
30. [JESCHKE *et al.* 2006] Jeschke G, Chechik V, Ionita P, Godt A, Zimmermann H, Banham J, Timmel CR, Hilger D, Jung H, Appl Magn Reson, 30 (2006) 473-498
31. [KARLSSON *et al.* 2000] Karlsson M, Martensson LG, Jonsson BH, Carlsson U, Langmuir 2000, 16, 8470.
32. [KLARE și STEINHOFF 2009] Klare JP, Steinhoff HJ, Photosynth Res. 102 (2009) 377-90.
33. [KONG și YU 2007] Kong J and Yu S, Acta Biochimica et Biophysica Sinica 39 (2007) 549–559.
34. [LATOUR 2005] Latour RA Jr., *Biomaterials: Protein-Surface Interactions*, in: Taylor & Francis (Eds) Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering, Informa Healthcare, New York 2005, pp.1-15.
35. [LUO *et al.* 1994] Luo S, Huang CYF, McClelland JF, Graves DJ, Analytical Biochemistry 216 (1994) 67-76.
36. [MACDONALD și PEPPER 1994] MacDonald SL, Pepper DS, Methods Enzymol. 231 (1994) 287-308.
37. [MCCALLEY *et al.* 1972] McCalley RC, Shimshick EJ, McConell HM, Chem. Phys. Lett. 13 (1972) 115-119
38. [MEYER *et al.* 2009] Meyer S, Böhme S, Krüger A, Steinhoff HJ, Klare JP, Wittinghofer A, PLoS Biology 7 (2009) e1000212.
39. [MOFFAT 1971] Moffat JK, J. Mol. Biol. 55 (1971) 135-46.
40. [MUIR *et al.* 2008] Muir BW, Tarasova A, Gengenbach TR, Menzies DJ, Meagher L, Rovere F, Fairbrother A, McLean KM, Hartley PG, Langmuir 24 (2008) 3828–3835.
41. [NATALELLO *et al.* 2005] Natalello A, Ami D, Brocca S, Lotti M, Doglia SM, Biochem. J 385 (2005) 511–517.
42. [OKUDA *et al.* 1991] Okuda K, Urabe I, Yamada Y, Okada H, J. Ferment. Bioeng. 71 (1991) 100-5.
43. [PANNIER *et al.* 2000] Pannier M, Veit S, Godt A, Jeschke G, Spiess HW, Journal of Magnetic Resonance 142 (2000) 331–340.
44. [PIN și ROYER 1994] Pin S and Royer CA, Methods Enzymol. 232 (1994) 42–55.
45. [POLYHACH și JESCHKE 2007] Polyhach Ye, Jeschke G, Physical Chemistry Chemical Physics, 9 (2007) 1895–1910.

46. [RISSE *et al.* 2003] Risse T, Hubbell WL, Isas JM, Haigler HT, Phys. Rev. Lett. 91 (2003) 188101-188105.
47. [SCRIMA *et al.* 2005] Scrima A, Vetter IR, Armengod ME, Wittinghofer A, EMBO J, 24 (2005) 23-33.
48. [SCRIMA și WITTINGHOFER 2006] Scrima A and Wittinghofer A, EMBO J, 25 (2006) 2940-2951.
49. [SERRO *et al.* 2006] Serro AP, Gispert MP, Martins MCL, Brogueira P, Colaco R, Saramago B, Biomed. Mater. Res. 78A (2006) 581–589.
50. [SERVAGENT-NOINVILLE *et al.* 2000] Servagent-Noinville S, Revault M, Quiquampoix H, Baron M, J. Colloid. Interface Sci. 221 (2000) 273-283.
51. [SESHADRI *et al.* 1999] Seshadri S, Khurana R, Fink AL, Methods Enzymol 309 (1999) 559–576.
52. [STEINHOFF *et al.* 1989] Steinhoff HJ, Lieutenant K, Redhardt A, Biochimica et Biophysica Acta 996 (1989) 49-56.
53. [SUSI și BYLER 1983] Susi H and Byler DM, Biochemical and Biophysical Research Communications, 115 (1983) 391-397.
54. [TIAN *et al.* 1998] Tian MH, Lee WK, Bothwell MK, McGuire J, J. Colloid Interface Sci. 1998, 200, 146.
55. [TUNC *et al.* 2005] Tunc S, Maitz MF, Steiner G, Vazquez L, Pham MT, Salzer R, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 42 (2005) 219–225.
56. [VALDES și ACKERS 1977] Valdes RJ and Ackers GK, J. Biol. Chem. 252, (1977) 74–81.
57. [VANIA și SIMON 2011] Vanea E and Simon V, Applied Surface Science 257 (2011) 2346–2352
58. [VERNE *et al.* 2009] Verne E, Vitale-Brovarone C, Bui E, Bianchi CL, Boccaccini AR, Journal of Biomedical Materials Research Part A 90 (2009) 981-992.
61. [WEETALL 1974] Weetall HH, Anal. Chem. 46 (1974) 602-615a.
62. [WEETALL 1985] Weetall HH, Trends Biotechnol. 3 (1985) 276-280.
63. [WERTZ și SANTORE 2001] Wertz CF, Santore MM, Langmuir 17 (2001) 3006-3016.
64. [WILLIAMS și BLANCH 1994] Williams RA, Blanch HW, Biosens. Bioelectron. 9 (1994) 159-167.
59. [XIE *et al.* 2001] Xie J, Riley C, Chittur K, J Biomed Mater Res 57 (2001) 357–365.
60. [ZENG *et al.* 1999] Zeng H, Chittur KK, Laceyfield WR, Biomaterials 20 (1999) 377–384.