

Raport științific

Rolul ionilor metalelor cu relevanță fiziologică asupra oligomerizării și neurotoxicității peptidelor amiloid-beta în condiții asemănătoare amiloidozei / The role of physiologically relevant metal ions on amyloid-beta peptide oligomerization and neurotoxicity in condition resembling amyloidosis, acronim AMYLTOX, cod PN-III-P1-1.1-PD2016-0737

O1. Identificarea factorilor care favorizează formarea oligomerilor de peptida amiloid.

O2. Implementarea tehnicilor și protocoalelor de studiu a activității de formare a porilor oligomerilor de peptida amiloid în membrane lipidice reconstituite, în condiții asemănătoare amiloidozei.

O3. Descrierea mecanismelor moleculare prin care interacțiunile de interfață dintre metalele relevante electrofiziologic și membranele lipidice reconstituite influențează afinitatea și activitatea membranară a peptidelor amiloid selectate ($A\beta$ 42, $A\beta$ 40). Caile membranare dependente de manifestare și activitate a peptidelor $A\beta$.

O4. Diseminarea rezultatelor științifice.

A1.1 Testarea interacțiunilor dintre peptidele $A\beta$ și ioniile metalelor utilizând tehnici de electrofiziologie la nivel de singură moleculă și tehnici de spectrofluorometrie, în condiții de pH neutru și acid. Identificarea riscurilor tehnice ale proiectului și propunerea de potențiale soluții.

A2.1 Studiul mecanismelor moleculare implicate în interacțiunile dintre oligomerii de peptida $A\beta$ formați în prezența metalelor și membranele lipidice formate pe suport solid.

A2.2 Reproducerea activității membranare a peptidelor $A\beta$ cu împachetare gresită, indusă de prezența metalelor, în membrane planare și lipozomi, care mimează membrana neuronală, prin tehnici de electrofiziologie și spectroscopie optică.

A3.1 Testarea prevalenței oligomerilor de peptida $A\beta$ să perturbe membranele lipidice (e.g., canale ionice, distrugerea membranei), în funcție de proprietățile fizico-chimice ale membranelor reconstituite și interacțiunea acestora cu ioniile metalelor, în condiții de pH neutru și acid.

A3.2 Studiul interacțiunii dintre oligomerii de peptida $A\beta$ și membrane lipidice formate pe suport solid imersate în soluții cu metale prin tehnici de microscopie de forță atomică.

A4.1 Publicarea articolelor științifice revizuite ISI, comunicarea rezultatelor la conferințe specializate, naționale și internaționale.

Etiologia bolilor neurodegenerative (e.g., boala Alzheimer, boala Parkinson) reprezintă un subiect de mare interes pentru cercetare, în special înțelegerea mecanismelor moleculare care generează dezvoltarea acestora. Una din direcțiile de cercetare ce vizează acest subiect are la bază ipoteza prezenței homeostaziei metalelor în creierul uman, demonstrată de studiile de histologie efectuate până în prezent pe subiecți ce sufereau de boala Alzheimer. Identificarea prezenței unei cantități semnificative de metale la nivelul creierului afectat de boala neurodegenerativă a condus la emiterea ipotezei prin care se presupune existența unei influențe a acestor metale asupra conformației peptidelor și proteinelor implicare în buna funcționare a proceselor biologice din creier. Pe scurt, interacțiunile dintre metale și peptide/proteine induc împachetări greșite („misfolding”) ale acestora ce promovează oligomerizarea, agregarea și în final, formarea de plăgi insolubile la nivelul creierului. O altă ipoteză ia în considerare și interacțiunile peptidă – membrană celulară, astfel peptidele amiloidice, găsite preponderent în creierul afectat de Alzheimer sub formă de plăgi, fac parte din clasa proteinelor ce pot adopta o structură secundară „dezordonată” (IDPs), datorită flexibilității structurii secundare a acestora.

Secvența de aminoacizi:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

Masa moleculară = 4514.1 g/mol, puritate > 95%, solubilă în apă

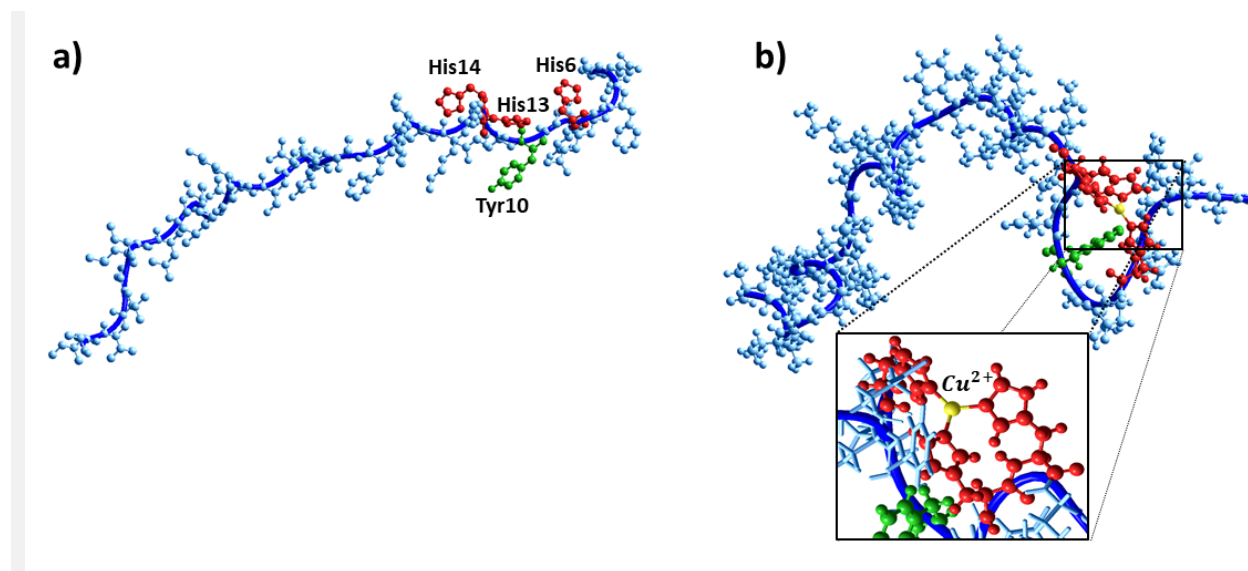


Figura 1. Structura primară a peptidei amiloidice Aβ(1-42) și caracteristicile acesteia. (a) Reprezentare 3D a structurii secundare a peptidei amiloidice în soluție. Aminoacizii His6, His13 și His14, considerați principale situsuri de legătură cu metalele sunt reprezentați cu roșu, iar aminoacidul Try10, fluorofor natural, este marcat cu verde. (b) Reprezentare 3D a structurii secundare a peptidei amiloidice în interacțiune cu un ion de cupru (galben).

În contextul prezentat, ne-am propus ca în prima parte a acestui studiu să implementăm o serie de experimente în care să urmărim atât schimbările conformaționale ale peptidelor, cât și modul de organizare a acestora în membrane biomimetice.

Într-o primă etapă, am aplicat tehnici de spectroscopie de fluorescență, pentru a desluși, pe de-o parte, efectele ionilor de cupru asupra conformației peptidelor, și pe de altă parte influența asupra fluorescenței de emisie intrinseci a peptidelor a solventului utilizat pentru solubilizarea peptidei amiloidice. Pentru aceasta am utilizat o secvență trunchiată a peptidei amiloidice A β (1-42), care conține doar primii 16 aminoacizi printre care se găsesc principalele situsuri de legătură a metalelor (His6, His13, His14, N-t, C=O la Asp 1 și Ala2) precum și aminoacidul Tirozină (Tyr, Y) la poziția 10. Aminoacidul Tirozină prezintă fluorescență naturală, iar intensitatea acesteia poate fi afectată de polaritatea mediului în care se află, astfel făcându-l un candidat ideal pentru sondarea schimbărilor conformaționale suferite de peptidă în prezența ionilor de cupru din soluție. Stocul de peptidă a fost solubilizat în soluția buffer de 2 M KCl, 10 mM HEPES, la pH = 7.3 (1 mg + 51 μ L soluție buffer), având concentrația de 10 mM, din care s-a făcut diluție până la 100 μ M pentru a putea adăuga 25 μ L pentru o concentrație de 5 μ M în cuva spectrofotometrului. Soluția de sare de cupru (ClCu₂) a fost făcută în apă distilată (A.D.) la o concentrație de 0.05 mM și respectiv 0.5 mM pentru a putea fi posibilă adăugarea incrementală de sare de cupru în cuva spectrofotometrului. Astfel, în toate experimentele a fost adăugată sarea de cupru la concentrațiile: 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 10 și 15 μ M. În prima fază a fost înregistrat spectrul soluției (blank) care a fost scăzut din toate spectrele întregistrate ulterior pentru a elimina zgomotul indus de prezența acesteia. Ulterior a fost urmărit maximul de intensitate de fluorescență emis a aminoacidului tirozină din componența peptidei la lungimea de undă de excitare (λ_{ex}) de 278 nm. Spectrul de emisie a fost înregistrat între 290 și 400 nm. Adăugarea incrementală a diferitelor concentrații de cupru a indus o scădere în intensitatea de emisie a peptidei pentru concentrații mai mari de 4.5 μ M Cu²⁺ (Figura 1, panel a), și o creștere pentru restul concentrațiilor (date nereprezentate). Făcând calculul diferenței dintre maximul intensității de fluorescență emis de peptida liberă în soluție ($F_{max}^{A\beta(1-16)}$) și cel înregistrat în prezența diferitelor concentrații de cupru ($F_{max}^{xCu^{2+}}$), se observă o anomalie în ceea ce privește variația acestuia (Figura 1, panel b).

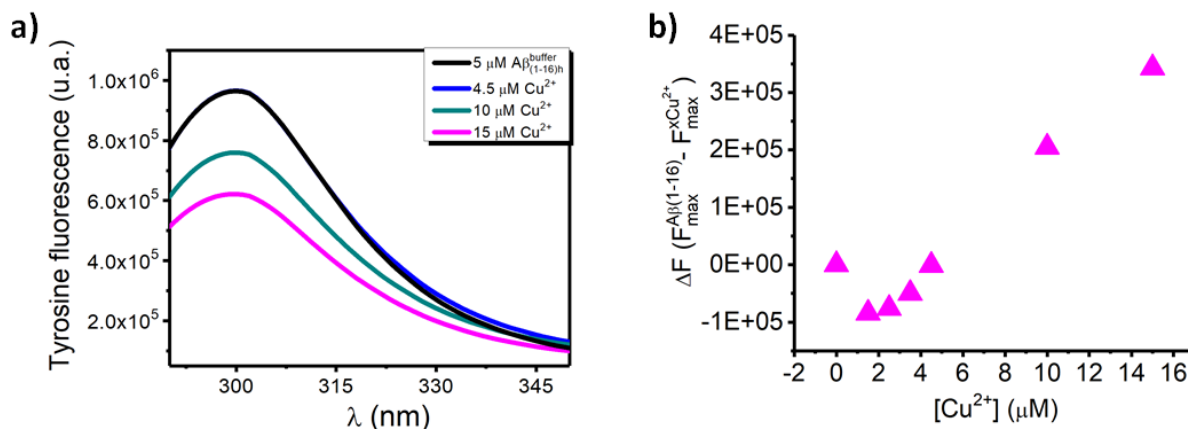


Figura 2. (a) Spectrele de emisie a aminoacidului Tirozină aflat în poziția 10 în secvența primară a peptidei amiloidice trunchiate, la o concentrație a peptidei de 5 μM (negru) adăugate din stocul solubilizat în soluția buffer și în prezența ionilor de cupru, la concentrații de: 4.5 μM (albastru), 10 μM (cyan), 15 μM (magenta). **(b)** Analiza evoluției maximului spectrului de fluorescență a aminoacidului Tirozină în prezența mai multor concentrații de ioni de cupru (1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 10 și 15 μM), raportare la maximul de fluorescență în absența lor.

La concentrații mici de sare de cupru, efectul pe care îl are acesta asupra modificării conformației peptidei și implicit a modificării micromediului aminoacidului tirozină nu este sesizabil, cel mai probabil soluția de buffer în care a fost dizolvat inițial stocul de peptidă a influențat structura secundară limitând accesul ionilor de cupru către situsurile de legătură. Ulterior, am refăcut experimentele de spectroscopie de fluorescență cu stocul de peptidă dizolvat în dimetil sulfoxid (DMSO), pentru a încerca îmbunătățirea sensibilității procedurii experimentale și a evita ecranarea de către ionii de sare a situsurilor de legătură cu metalul. Stocul de peptidă a fost solubilizat în soluția de DMSO la o concentrație de 10 mM, și diluat ulterior în A.D. până la 100 μM , din care, în cuva spectrofotometrului, s-a adăugat 5 μM peptidă. Concentrațiile sării de cupru nu au fost schimbate, nici procedura experimentală de înregistrare a spectrelor de emisie, utilizându-se același protocol ca și în cazul precedent. Adăugarea incrementală a diferitelor concentrații de sare a indus o scădere în intensitatea de emisie a peptidei și pentru concentrații mai mici (Figura 3, panel a și b), astfel obținându-se o îmbunătățire a sensibilității tehnicii.

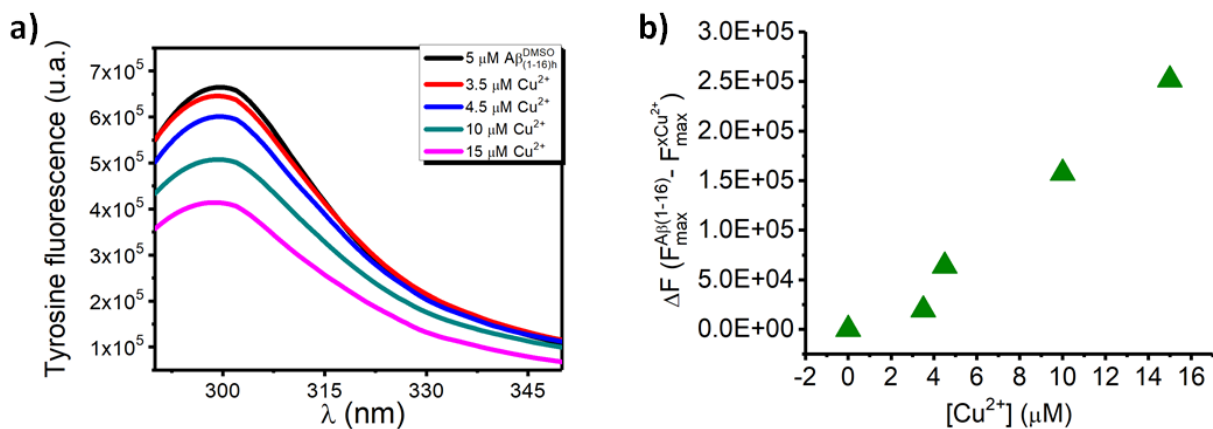


Figura 3. (a) Spectrele de emisie a aminoacidului Tirozină aflat în poziția 10 în secvența primară a peptidei amiloidice trunchiate, la o concentrație a peptidei de 5 μM (negru) adăugate din stocul solubilizat în DMSO și în prezența ionilor de cupru, la concentrații de: 3.5 μM (roșu), 4.5 μM (albastru), 10 μM (cyan), 15 μM (magenta). **(b)** Analiza evoluției maximului spectrului de fluorescență a aminoacidului Tirozină în prezența mai multor concentrații de ioni de cupru (3.5, 4.5, 10 și 15 μM), raportare la maximul de fluorescență în absența lor.

Experimentele de spectroscopie de fluorescență au evidențiat influența schimbărilor conformaționale a peptidelor induse de interacțiunile cu ionii de cupru, care prin modificările provocate au condus și la modificarea polarității, a vecinilor aminoacidului tirozină, fapt cuantificabil prin scăderea intensității de fluorescență a acestuia, devenind un prim indiciu a importanței acestora în împachetarea peptidelor. Seriile de experimente desfășurate au condus la alegerea celui mai bun solvent pentru solubilizarea peptidelor, DMSO, care va fi utilizat și în experimentele de electrofiziologie. Pentru acestea a fost efectuat un calcul precis asupra cantității de DMSO prezent în cuva experimentală, deoarece un procentaj mai mare de 1% de DMSO poate induce destabilizarea membranelor lipidice.

Tehnica la nivel de singură moleculă a fost utilizată ulterior pentru a stabili utilizarea optimă a nanoporului proteic de α-hemolizină (α-HL) pentru punerea în evidență a modificărilor conformaționale. Tehnica presupune obținerea unei membrane lipidice stabile din punct de vedere termic și mecanic, care servește ca suport pentru nanoporul proteic. Membranele lipidice au fost formate cu ajutorul metodei Montal-Mueller, din 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPhPC) dizolvate în pentan (25 mg/2.5 mL). După obținerea unui sistem lipidic stabil, am introdus în cuva experimentală monomerii de proteină (1 - 2μL α-HL din stocul solubilizat în 0.5 M KCl) care la nivelul membranei se autoorganizează formând un por ce permite ionilor de sare din soluție să treacă de o parte și de altă a membranei care izolează cele două compartimente ale

cuvei, denumite *cis* – unde electrodul este legat la masă și *trans*. Astfel, la aplicarea unui potențial transmembrantar cu ajutorul electrozilor de Ag/AgCl se va observa o creștere a curentului ionic, dacă nanoporul proteic este inserat în membrană. Conductanța nanoporului depinde atât de geometria porului utilizat, cât și de tăria ionică a soluției de sare și de pH-ul utilizat. În cazul acesta, soluția electrofiziologică utilizată a fost de 3 M KCl la un pH de 7.4 stabilizat cu o soluție de 10 mM HEPES. Prin adăugarea unui analit încărcat cu sarcină electrică (peptidă, monomer, dimer etc.) în cuvă, la aplicarea unui potențial transmembrantar, acesta poate bloca interiorul nanoporului inducând o scădere a conductanței acestuia. Interacțiunea por-analit este una reversibilă, iar parametrii care descriu cinetica de interacțiune sunt: (i) τ_{ON} – timpul dintre două evenimente de blocaj consecutive; (ii) τ_{OFF} – timpul de rezidență a analitului în por; (iii) ΔI – magnitudinea blocajului de curent indus de prezența în por a analitului.

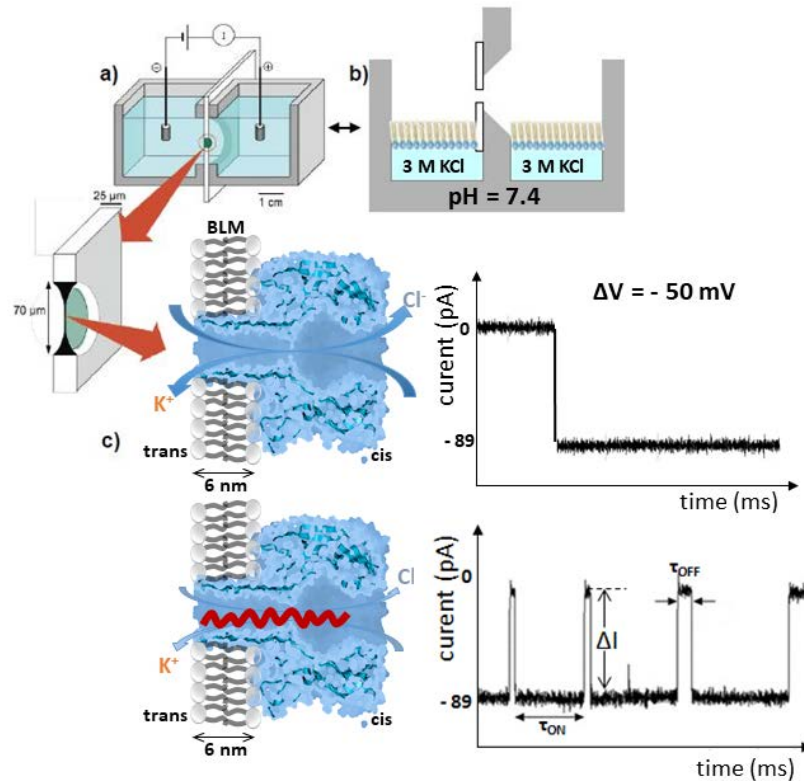


Figura 4. Set-up experimental utilizat pentru tehnica la nivel de singură moleculă pentru studiul conformației peptidelor în interiorul unui nanopor. Cuvă experimentală formată din două compartimente separate de un film de teflon cu o apertură de aproximativ 70 nm (panel a), la nivelul căreia se formează bistratul lipidic într-o soluție de 3 M KCl, 10 mM HEPES, pH = 7.4 (panel b). La aplicarea unui potențial transmembrantar de - 50 mV se înregistrează o creștere a curentului ionic (panel c). Adăugarea unei peptide induce blocaje în curentul înregistrat cu parametri (τ_{ON} , τ_{OFF} , ΔI) ce descriu cinetica de interacțiune peptidă-nanopor.

Testarea sistemului a fost efectuată utilizând un duplex molecular, complementar (denumit PNA3:DNA1) și unul necomplementar (denumit PNA3:DNA3) adăugat fie în partea *cis*, fie în partea *trans* a cuvei experimentale. Intervalul de potențiale transmembranare aplicate a fost între $\Delta V = [-100 / -200]$ mV pe electrodul *trans*, iar înregistrarea curenților mediați de nanoporul inserat în bistratul lipidic, s-a realizat în condiții de tensiune fixată ('voltage clamp'), folosind un amplificator integrat Axopatch 200 B (Molecular Device, USA) și un filtru trece jos (frecvența de tăiere de 10 kHz, filtru de tip Bessel). Achiziția datelor a fost efectuată prin intermediul unei cartele de achiziție / conversie A/D cu rezoluție de 16 biți (NI PCI 6014, National Instruments, Inc., USA), la o frecvență de eșantionare de 50 KHz, iar semnalul electric a fost monitorizat cu ajutorul mediului grafic LabView (National Instruments, Inc., USA) pe intermediul unui sistem PC cu procesor Intel Core i7 pentru asigurarea înregistrărilor rapide. Ulterior, datele au fost stocate pe HDD-uri externe datorită înregistrărilor lungi și a fișierilor de dimensiuni mari rezultate, iar analiza numerică a fost realizată cu ajutorul programelor Origin 6.0 (OriginLab Corporation, USA) și Clampfit 10.7 (Molecular Device, USA). Pentru reducerea zgomotului mecanic și electric din exterior, sistemul a fost integrat într-o cușcă Faraday (Warner Instruments, USA) stabilizată mecanic pe o masă anti-vibrații (Bench Mate 2210, Warner Instruments, USA).

În primul set de experimente au fost efectuate înregistrări control cu porul liber pentru a ne asigura că nu există fluctuații suplimentare în curent și pentru a verifica stabilitatea acestuia la aplicarea unor tensiuni mari. Ulterior, am realizat înregistrări ale blocajelor de curent induse de PNA3, adăugată la o concentrație de 3 μM în partea *cis* a porului, stabilind astfel amprenta specifică a acesteia în interacțiunea cu nanoporul. Am adăugat partea complementară (DNA1) a sistemului la o concentrație de 9 μM (1:3 raport concentrație molară), formând astfel duplexul molecular, și am observat o diminuare în activitatea înregistrată inițial: frecvența evenimentelor de blocaj a porului scăzând vizibil (τ_{ON} mai mare), dar fără a observa o amprentă specifică în curentul înregistrat ca indiciu a formării complexului molecular. La adăugarea părții necomplementare (DNA3) a sistemului la aceeași concentrație de 9 μM (1:3 raport concentrație molară), nu am observat nicio modificare a parametrilor urmăriți (frecvență de interacțiune, timp de rezidență, magnitudine a blocajului).

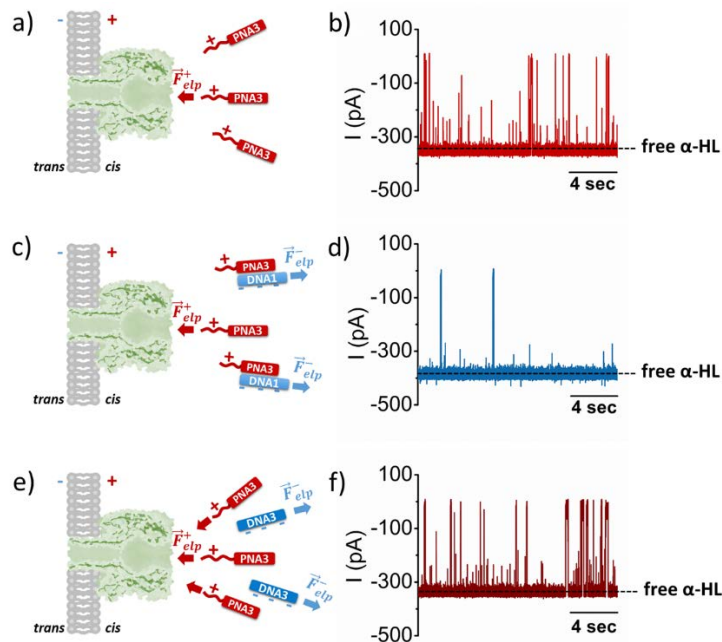


Figura 5. Înregistrări ale fluctuațiilor de curent ionic prin nanoporul proteic de α -HL la potențialul transmembrantar $\Delta V = -160$ mV aplicat în partea *trans* pentru: PNA3 simplu adăugată în partea *cis* a porului (panel a și b); pentru complexul molecular PNA3-DNA1 format la *cis* (panel c și d) și pentru complexul PNA3-DNA3 (panel e și f). Linia punctată marchează nivelul curentului ionic prin porul liber (free α -HL).

Analiții adăugați în partea *cis* a nanoporului proteic de α -HL difuzează până la gura porului, interacționează cu acesta, partiționând în interiorul lui sub acțiunea forței electroforetice (F_{elp}), generată de câmpului electric creat de potențialul aplicat. Am observat diferențe de interacțiune cu porul a moleculei simple față de complexul molecular complementar, dar nu și față de cel necomplementar. Dovada formării complexului molecular fiind dată doar de scăderea frecvenței de interacțiune cu porul a moleculei simple, datorită scăderii concentrației de moleculă simplă din cuvă. Dorind evidențierea amprentei specifice a formării complexului molecular complementar datorat schimbărilor conformaționale pe care le suferă, am efectuat seturi de experimente asemănătoare adăugând moleculele în partea *trans* a porului proteic.

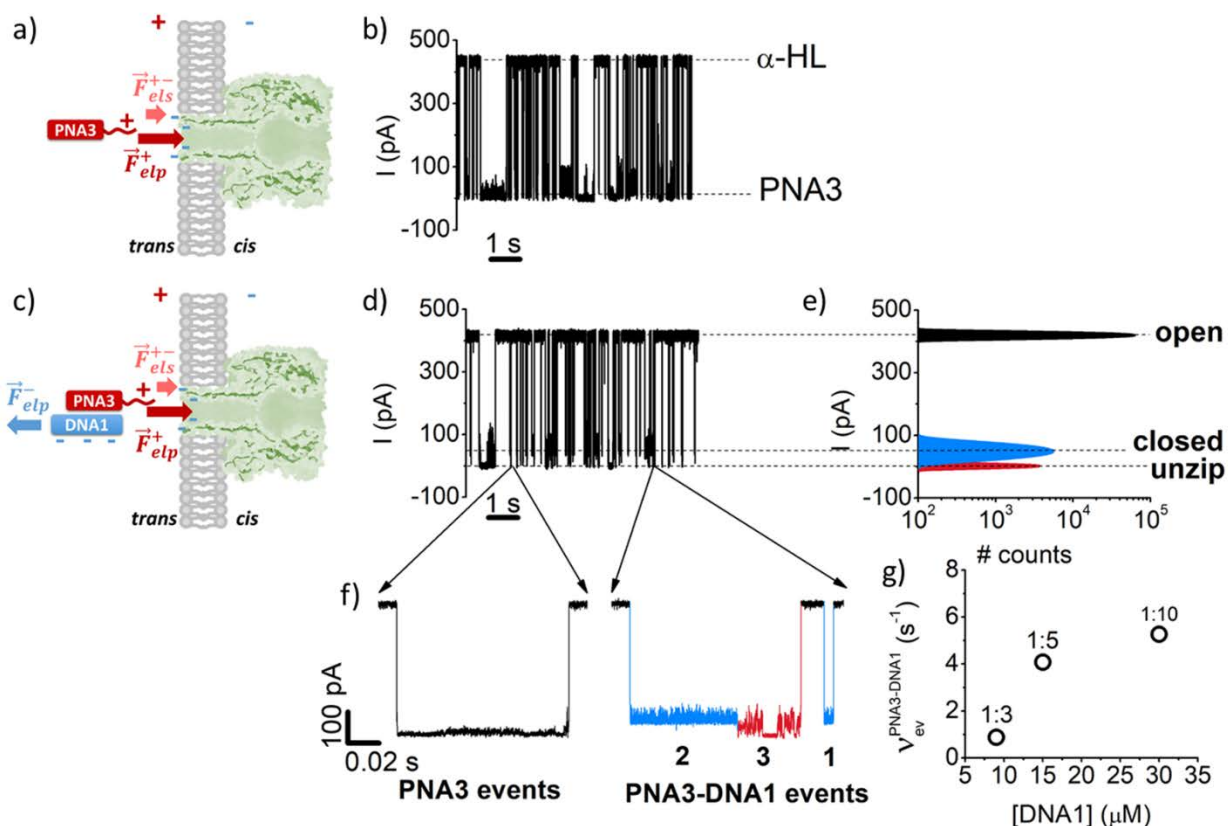


Figura 6. Înregistrări ale fluctuațiilor de curent ionic prin nanoporul proteic de α -HL la potențialul transmembranar $\Delta V = +160$ mV aplicat în *trans* pentru: PNA3 simplu adăugat în partea *trans* a porului (panel a și b); pentru complexul complementar PNA3-DNA1 adăugat la *trans* (panel c și d). Histograma de curent ionic indică trei stări ale porului: open – porul liber; closed – porul blocat de complexul molecular; unzip – porul blocat de complexul molecular modificat (panel e). Stările porului sunt datorate amplitudinilor diferite de blocaj pentru molecula simplă PNA3 și respectiv pentru complexul PNA3-DNA1 format (panel f). Creșterea concentrației moleculei complementare DNA1 induce o creștere a frecvenței evenimentelor de interacțiune a complexului molecular cu nanoporul (panel g).

La pH neutru, gura porului în partea *trans* este încărcată electric negativ, iar PNA3 este încărcată electric pozitiv, astfel că ajutându-ne și de forțele de atracție dintre sarcinile diferite ($\overrightarrow{F_{els}^{+-}}$) am reușit să vedem și să evidențiem captura complexului molecular format.

Inițial am făcut înregistrări control pentru a verifica stabilitatea porului proteic și apoi înregistrări cu molecula simplă de PNA3 la o concentrație de $3\mu\text{M}$ adăugată în partea *trans* a cuvei experimentale pentru a înregistra activitatea acestuia în interacțiune cu sistemul lipo-proteic. Adăugarea moleculei complementare DNA1 la o concentrație de $30\mu\text{M}$ tot în partea *trans* a condus la formarea complexului molecular PNA3-DNA1 cu o conformație diferită și o amprentă distinctă în curentul ionic înregistrat atunci când complexul blochează interiorul porului. Experimentele au fost efectuate la diferite rapoarte molare și anume: 1:3, 1:5 și 1:10. În cazul

ultimului raport molar, în prezența excesului de DNA1, majoritatea evenimentelor întregistrate aveau amprenta complexului molecular format. Astfel, am putut distinge, prin adăugarea analiților în partea *trans* a modificărilor conformaționale induse de formarea complexului molecular.

Aplicând același principiu, modificările conformaționale au fost monitorizate și în cazul interacțiunilor cu un metal complementar cu o constantă de afinitate mare. Analiții au fost adăugați în partea *trans* a nanoporului de α -HL. Condițiile de lucru au fost modificate corespunzător, concentrația sării utilizate a fost scăzută pentru a evita ecranarea sarcinilor electrice ale peptidei, iar concentrațiile analiților au fost crescute pentru a asigura vizibilitatea efectului interacțiunilor cu porul inclusiv la potențiale transmembranare aplicate cu valori mai mici. Suportul lipidic utilizat a fost realizat din DPhPC, în care un singur por de α -HL a fost inserat prin adăugarea monomerilor în partea *cis* a cuvei dintr-un stoc diluat ulterior în A.D. (2 μ L la 100 μ L). Concentrația soluției electrofiziologice utilizate a fost de 2 M KCl, 10 mM HEPES la pH neutru. După efectuarea înregistrărilor control (Figura 7, panel a), cu porul liber, în partea *trans* a cuvei a fost adăugată peptida amiloid la o concentrație de 30 μ M dintr-o soluție stoc de 1 mM în DMSO (Figura 7, panel b).

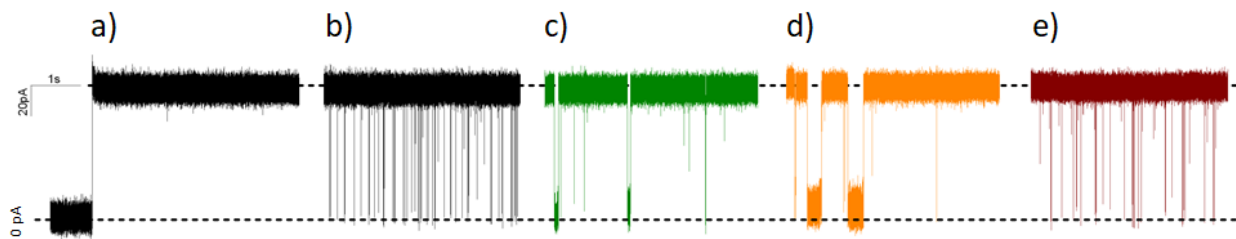


Figura 7. Fluctuații ale curentului ionic prin porul de α -HL pentru: (a) porul liber – înregistrare control a curentului printr-un singur por la un potențial transmembranar de + 60 mV; (b) porul ocupat de peptida amiloid la o concentrație de 30 μ M adăugată în partea *trans* a cuvei; fluctuațiile de la linia curentului ionic corespunzător porului liber reprezentând interacțiunea reversibilă dintre o singură peptidă și porul proteic; (c) porul ocupat de peptida amiloid în interacțiune cu ionii de cupru aflați la o concentrație de 200 μ M CuCl_2 în soluție, adăugați în partea *trans*; (d) porul ocupat de peptida amiloid în interacțiune cu ionii de fier aflați la o concentrație de 300 μ M CuFe_3 în soluție, adăugați în partea *trans*; (e) interacțiunile peptidă-por după adăugarea chelatorului EDTA la o concentrație de 300 μ M în partea *trans*.

Au fost preparate soluții de sare de metal la o concentrație a stocului de 20 mM în A.D. de clorură de cupru (CuCl_2) și respectiv, clorură de fier (FeCl_3). Din soluțiile stoc s-au adăugat în cuvă incremental diferite concentrații de clorură de cupru până s-a observat o modificare în amprenta curentului ionic întregistrat prin porul blocat, și anume modificarea timpului de rezidență în por a

complexului peptidă-cupru față de cel dat de peptida simplă. Concentrația de clorură de cupru la care efectul a fost cel mai vizibil a fost de 200 μM CuCl_2 adăugată în *trans*, aceeași parte în care am adăugat și peptida (Figura 7, panel c). Ulterior, a fost adăugată clorura de fier la o concentrație de 300 μM FeCl_3 tot în partea *trans* a cuvei experimentale (Figura 7, panel d), înregistrându-se timpi de rezidență a complexului peptidă-fier, observabil mult mai mari. La final, pentru a verifica și arăta faptul că fluctuațiile de curent ionic din por sunt date de complecșii peptidă amiloid – metal și nu reprezintă artefacte, am adăugat tot în partea *trans* un chelator, acid etilendiamintetracetic (300 μM EDTA), compus chimic care este capabil să formeze structuri ciclice stabile cu metalele, având o constantă de stabilitate mare, ($\log K$, unde K este constanta de echilibru a reacției) de 18.8 pentru cupru, și respectiv, 25.1 pentru fier. Am observat că după adăugarea chelatorului frecvența evenimentelor și timpii de rezidență au fost restaurați la valorile inițiale specifice peptidei amiloidice simple. Toate înregistrările fluctuațiilor prin porul de $\alpha\text{-HL}$ au fost efectuate la potențiale transmembranare între -50 mV și -100 mV. În urma interacțiunilor peptidă – ion de metal, conformația peptidei se schimbă, flexibilitatea complexului format se reduce și implicit, volumul ocupat de acesta în interiorul porului devine mai mare, generând astfel blocaje a curentului ionic cu durate mai mari, dar și o scădere a frecvenței de interacțiune a acestora cu porul.

Într-un alt set de experimente am dorit observarea interacțiunii peptidei amiloidice $\text{A}\beta(1-42)$ cu sisteme lipidice biomimetice formate din fosfatidilcholină (PC). Membranele lipidice (BLM) au fost formate cu ajutorul tehnicii Montal-Mueller în cuva experimentală într-o soluție de 0.1 M NaCl, 10 mM HEPES, pH 7. Am efectuat înregistrări control, doar cu membrana lipidică la diferite potențiale transmembranare pentru a verifica stabilitatea acesteia (Figura 8, panel a). Stocul de peptidă amiloid a fost făcut în DMSO la o concentrație de 22 mM, din care a fost adăugat 1 μM în partea *cis* a cuvei experimentale, după care, incremental s-a ajuns la o concentrație de 4 μM . Am identificat concentrația prag după care peptida începe să aibă activitate în membrana lipidică (e.i. 1.5 μM), pentru un potențial electric aplicat de + 180 mV. Fluctuațiile de curent ionic au fost înregistrate cu același sistem de amplificare și digitizare descris anterior, la o frecvență de eșantionare de 30 kHz și filtrate cu o frecvență de 1 kHz (filtru trece-jos).

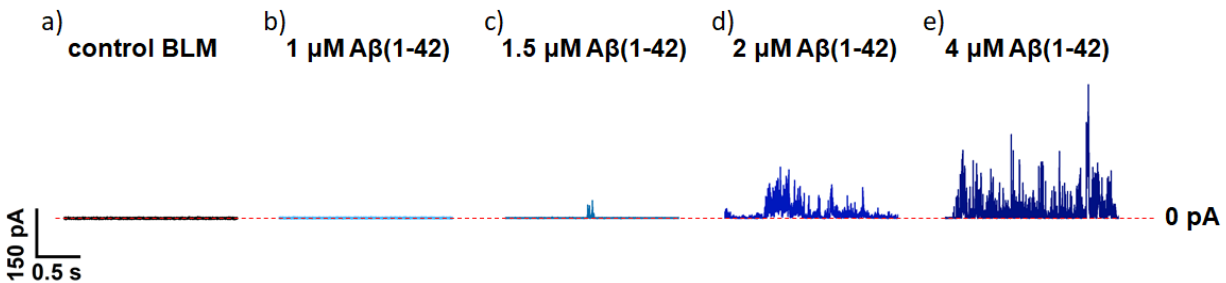


Figura 8. Fluctuații ale curentului ionic induse de peptida A β (1-42) în membrana lipidică formată din PC. Înregistrare control pentru membrana lipidică simplă (panel a) și înregistrări ale fluctuațiilor de curent ionic după adăugarea peptidei în partea *cis*, la diferite concentrații: 1 μ M (panel b), 1.5 μ M (panel c), 2 μ M (panel d) și 4 μ M (panel e). Linia roșie punctată reprezintă nivelul curentului la valoarea de 0 pA. Toate înregistrările au fost efectuate la potențialul transmembranar de +180 mV.

Histogramele de amplitudine a fluctuațiilor ionice induse de partiționarea peptidei A β (1-42) din mediul apos al soluției electrofiziologice în mediul lipidic al membranei biologice formate din PC indică faptul că o dată cu creșterea concentrației de peptidă din soluție și palierul de amplitudini a fluctuațiilor se lărgeste.

Am observat că pentru concentrații foarte mici de peptidă histogramele de amplitudine nu se pot distinge de cea realizată pentru control, când doar bistratul lipidic este prezent, care se comportă ca un izolator electric, astfel că variația curentului este în jurul valorii de 0 pA. Cu toate că, este posibil ca peptidele să fie în prima fază de interacțiune, și anume, adsorbite la interfața dintre mediul apos – mediu lipidic, concentrația minimă necesară pentru ca aceasta să partiționeze în interiorul membranei și să formeze pori nu a fost atinsă încă. Astfel că, detectăm o concentrație prag de la care peptidele încep să pătrundă de-a lungul membranei și să formeze pori transmembranari.

Analiza cantitativă a variației curentului ionic mediat de porii transmembranari formați de monomerii de peptidă amiloid cu concentrația acestora indică o creștere semnificativă pentru 2 μ M și respectiv, 4 μ M.

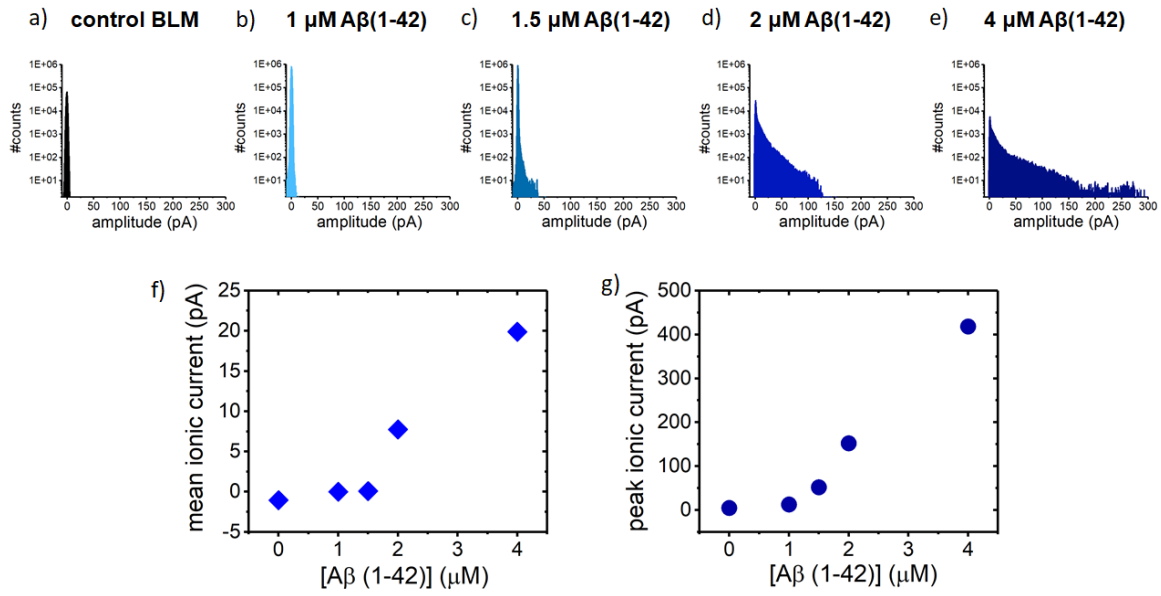


Figura 9. Histogramele de amplitudine pentru fluctuațiile ionice la aplicarea unui potențial de +180 mV pentru experimentul control, fără peptidă (panel a) și după adăugarea peptidei Aβ(1-42) în partea *cis*, la concentrații de: 1 μM (panel b), 1.5 μM (panel c), 2 μM (panel d) și 4 μM (panel e). Variația curentului ionic mediu cu concentrația de peptidă adăugată (panel f). Variația maximului de curent ionic cu concentrația de peptidă adăugată (panel g).

Deasemenea, și analiza curentului ionic maxim pe care porii transmembranari formați îl lasă să treacă prin membrana izolatoare arată o creștere semnificativă între concentrațiile de peptidă adăugate, curentul ajungând la aproximativ 400 pA pentru ultima concentrație de 4 μM. Având în vedere că nu dorim destabilizarea totală a membranei lipidice, sau perpeția acesteia, concentrația optimă pentru monitorizarea activității peptidei nu trebuie să depășească 4 μM.

Experimentele de electrofiziologie implementate ulterior au vizat interacțiunea peptidei amiloid Aβ(1-42) într-un sistem lipidic format dintr-un amestec de fosfatidilcholină (PC) și fosfatidilglicerol (PG) într-un raport molar de 85:15. Membranele lipidice (BLM) au fost formate tot cu ajutorul tehnicii Montal-Mueller în cuva experimentală într-o soluție de 0.1 M NaCl, 10 mM HEPES, pH 7. După efectuarea experimentelor control (Figura 10, panel a), am adăugat 1 μM Aβ(1-42) din stocul de peptidă de 22 mM solubilizat în DMSO în partea *trans* a cuvei și am înregistrat fluctuațiile de curent ionic la diferite potențiale transmembranare aplicate (Figura 10, panel b-e).

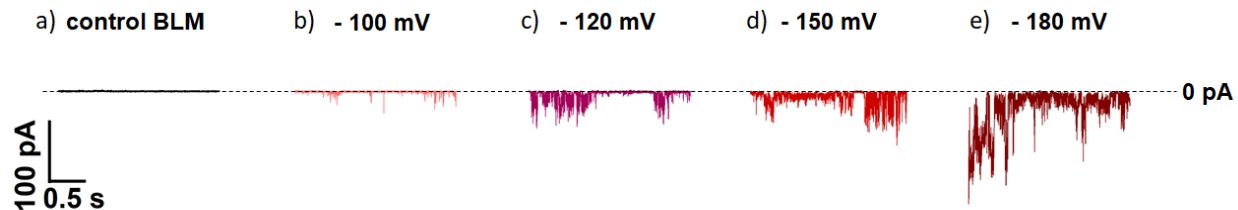


Figura 10. Fluctuații ale curentului ionic induse de peptida A β (1-42) în membrana lipidică formată din PC:PG (85:15). Înregistrare control pentru membrana lipidică simplă (panel a) și înregistrări ale fluctuațiilor de curent ionic după adăugarea peptidei în partea *trans* la o concentrație de 1 μ M, pentru mai multe diferențe de potențial: -100 mV (panel b), -120 mV (panel c), -150 mV (panel d) și -180 mV (panel e). Linia neagră punctată reprezintă nivelul curentului la valoarea de 0 pA.

Curenții ionici mediați de porii formați de peptide au fost înregistrați la o frecvență de achiziție de 30 kHz, și filtrați la o frecvență de 2 kHz, după care în etapa de procesare a datelor a fost aplicat un filtru adițional de tip Bessel (1020 Hz, cu 1.5 lărgime) pentru a elimina zgomotul suplimentar din sistem și pentru a evidenția stările conductive existente.

Până la valoarea potențialului de -100 mV nu s-a observat nicio fluctuație în curentul ionic (date neprezentate), dar o dată cu creșterea potențialului transmembranar aplicat am putut evidenția o activitate a peptidei din ce în ce mai amplă.

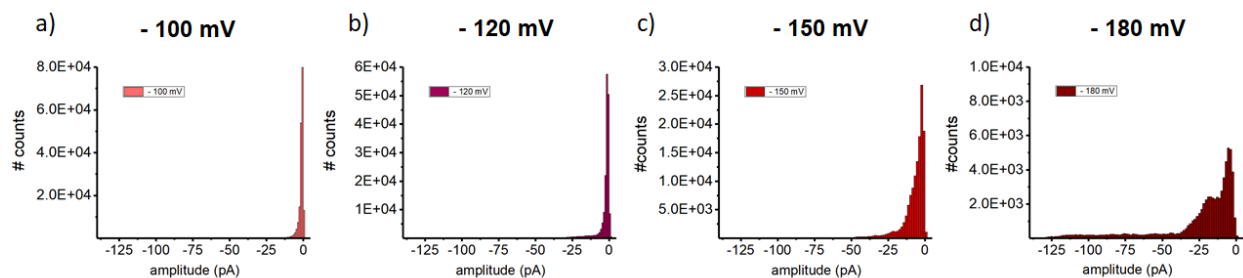


Figura 11. Histogramele de amplitudine corespunzătoare fluctuațiilor ionice înregistrate după adăugarea în partea *trans* a unei concentrații de 1 μ M A β (1-42) la valori ale potențialului transmembranar de: -100 mV (panel a), -120 mV (panel b), -150 mV (panel c) și -180 mV (panel d).

Analiza histogramelor de amplitudine arată apariția unor substări, cel mai vizibile fiind atunci când sunt aplicate potențiale electrice mari. Aceste substări urmează a fi indentificate și analizate în etapa următoare a proiectului, fiind un indiciu a mecanismului molecular de formare a porilor transmembranari de peptida amiloid.

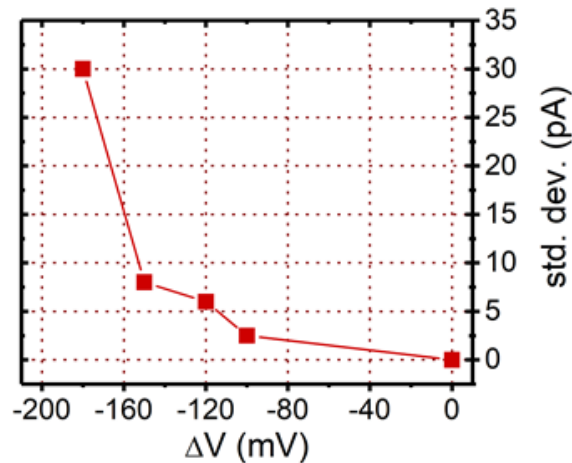


Figura 12. Variația deviației standard (std. dev.) a curentului ionic mediat de porii transmembranari formați de monomerii de peptidă A β (1-42) la diferite valori ale potențialului aplicat.

Analiza cantitativă a variației deviației standard cu diferențele de potențial aplicate asupra sistemului lipidic indică cât de mult variază curentului ionic față de linia de bază ($I = 0$ pA), atunci când sistemul lipidic se comportă ca un izolator electric. Creșterea acestei variații, a curentului global pentru toate substările prezente, cu potențialul transmembranar aplicat indică faptul că acest potențial electric generează un câmpul electric care cu cât este mai mare cu atât favorizează mai mult partiționarea peptidelor în membrana lipidică, și promovează formarea porilor transmembranari ce permit trecerea unui curent electric din ce în ce mai mare.

Studiile efectuate până în prezent stabilesc modul optim de implementare a protocoalelor experimentale atât pentru tehnicile de spectroscopie, cât și pentru cele de electrofiziologie, și indică existența unui mecanism molecular complex de interacțiune peptidă-membrană lipidică de tip por clasic, cu substări bine definite, până la o concentrație dată, după care se sesizează prezența unui mecanism de 'carpetare' a membranei de către peptide.

O parte din datele obținute au fost publicate în articole științifice ISI și prezentate în cadrul unor conferințe de specialitate naționale:

Articole:

1. Andrei Ciuca, Alina Asandei, **Irina Schiopu**, Aurelia Apetrei, Loredana Mereuta, Chang Ho Seo, Yoonkyung Park, and Tudor Luchian, **Anal. Chem.**, **2018**, 90 (12), pp 7682–7690 (FI = 6,042)

Conferințe:

1. **Irina Schiopu**, Alina Asandei, Andrei Ciuca, Aurelia Apetrei, Loredana Mereuta, Chang-Ho Seo, Yoonkyung Park and Tudor Luchian, Study of pH Mediated Nanoscale Confinement of Small Generation Dendrimers with Protein Nanopores, **15th National Conference of Biophysics with international participation**, September 7 – 10, **2018**, Bucharest, Romania
2. Andrei Ciuca, Alina Asandei, **Irina Schiopu**, Aurelia Apetrei, Loredana Mereuta, Chang-Ho Sea, Yoonkyung Park and Tudor Luchian, Breaking Apart Molecular Dimers with Nanopores, **15th National Conference of Biophysics with international participation**, September 7 – 10, **2018**, Bucharest, Romania

Director de proiect,

Irina ȘCHIOPU