

## RAPORT ȘTIINȚIFIC

**Privind implementarea Proiectului Nr. 64/01.10.2015, cu titlul: "Metodă bazată pe nanopori de detecție și cuantificare a bacteriilor prin interacțiunea selectivă a peptidelor antimicrobiene cu membrane bacteriene (BACTODET)", cod PN-II-RU-TE-2014-4-2388 pentru perioada octombrie 2015 - decembrie 2016**

**Etapa I: Stabilirea principalelor condiții de lucru pentru implementarea tehnicii bazate pe nanopori menite să cuantifice transportul peptidelor printr-un singur por de  $\alpha$ -hemolizină inserat într-o membrană lipidică planară, în prezența lipozomilor sau a bacteriilor**

**Activitatea I.1:** Alegerea adecvată a lipidei pentru membrana suport a porului proteic de  $\alpha$ -HL și stabilirea unor parametri esențiali pentru a obține condiții de lucru stabile, optime măsurătorilor electrofiziologice

**Activitatea I.2:** Stabilirea protocolului de lucru pentru formarea veziculelor unilamelare mici (SUVs) și gigant (GUVs) ca sisteme model care mimează membrana celulelor bacteriene

**Activitatea I.3:** Testarea și corelarea influenței unor parametri fizico-chimici ai mediului electrofiziologic (ex.: pH, tărie ionică) asupra cineticii de asociere dintre peptide și porul proteic, și a influenței lor asupra veziculelor lipidice model (ex.: agregare, alterarea adsorbției peptidelor)

**Etapa II:**

**O1: Testarea și selecția candidaților AMP optimi pentru implementarea tehnicii de detecție bazată pe nanopori propusă în acest proiect**

**Activitatea II.1:** Evaluarea selectivității unei serii de candidați AMP pentru membrane bacteriene model prin monitorizarea alterării cineticii de asociere dintre AMPs și  $\alpha$ -HL în prezența unor concentrații test, nesaturabile de vezicule lipidice (membrane model eucariote vs. bacteriene)

**Activitatea II.2:** Studiul electrofiziologic detaliat al cineticii de asociere dintre candidații selectați și porul proteic, rezultând în calibrarea ratelor de asociere în funcție de concentrația de peptidă liberă din mediul apos.

**O2: Studiul detaliat al afinității peptidelor antimicrobiene selectate pentru membrane bacteriene model și celule bacteriene**

**Activitatea II.3:** Investigarea cineticii de asociere dintre AMPs selectate și un singur por proteic de  $\alpha$ -HL, în diferite condiții ale mediului electrofiziologic (ex.: pH, tărie ionică), în prezența unor concentrații crescătoare de SUVs cu compoziție lipidică diferită (membrane model eucariote vs. bacteriene); determinarea coeficienților de partiție în membrane

**Activitatea II.4:** Investigarea cineticii de asociere dintre AMPs selectate și un singur por proteic de  $\alpha$ -HL, în diferite condiții ale mediului electrofiziologic (ex.: pH, tărie ionică), în prezența unor concentrații crescătoare de bacterii G-negative și G-pozitive selectate.

### **O3: Utilizarea unor tehnici complementare pentru validarea și cuantificarea interacțiunilor selective dintre candidații AMP și membrane bacteriene**

**Activitatea II.5:** Studiul prin microscopie confocală al interacțiunii dintre AMPs marcate fluorescent și GUVs cu compoziție lipidică diferită (membrane model eucariote vs. bacteriene)

#### **REZUMATUL ETAPEI**

În cadrul **ETAPEI I** am stabilit condițiile principale de lucru pentru implementarea tehnicii bazate pe nanopori de cuantificare a interacțiunii dintre peptide și un singur por proteic de  $\alpha$ -hemolizină inserat într-o membrană lipidică planară, în prezența veziculelor lipidice sau a celulelor bacteriene.

Pe baza experimentelor control, am ales lipida DPhPC (1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3phosphocholine) ca fiind optimă pentru realizarea bistratului lipidic suport în care va fi inserat un singur por proteic de  $\alpha$ -hemolizină, asigurând condiții de lucru stabile pentru experimentele de electrofiziologie moleculară (stabilitate în timp în prezența unor concentrații relativ mari de peptidă; absența porilor transmembranari formați de peptidele membranar active în bistratul suport sub acțiunea unui câmp electric extern; stabilitatea bistratului suport în condiții extreme de pH și tărie ionică, sau în prezența lipozomilor și a bacteriilor).

Am stabilit protocoalele de lucru pentru formarea veziculelor unilamelare mici (SUVs), a bistraturilor lipidice fixate pe suport solid (SLBs), și a veziculelor unilamelare gigant (GUVs), ce vor fi utilizate ca membrane model ce mimează membrana celulelor eucariote, respectiv bacteriene. Aceste sisteme lipidice au fost testate în cadrul unor experimente control:

- ▶ înregistrări de spectroscopie de fluorescență bazate pe deplasarea spectrului de emisie al resturilor de triptofan în urma adsorbției unor peptide test, ce conțin triptofan în structura primară, la interfața lipozomilor SUVs;
- ▶ experimente de microscopie confocală pentru monitorizarea și vizualizarea interacțiunii unor peptide nemarcate/ respectiv marcate fluorescent cu lipozomi giganti;
- ▶ înregistrări de microscopie și spectroscopie de forță atomică pentru a testa formarea SLBs pe substrat de mică, în mediu lichid.

Am testat influența exercitată de parametrii mediului fiziologic (ex.: tipul sării, tărie ionică, pH) asupra cineticii de asociere dintre peptide și porul proteic, în corelație cu influența lor asupra veziculelor care mimează celule bacteriene (ex: agregarea veziculelor, alterarea adsorbției peptidelor la interfața lipozomilor). Am ales ca mediu electrolitic pentru desfășurarea experimentelor viitoare de electrofiziologie moleculară o soluție de 0.5 M KCl, menținută la valori neutre al pH-ului cu 10 mM HEPES, respectiv valori acide ale pH-ului cu 10 mM MES.

Concentrația de sare este suficient de mare pentru a permite monitorizarea corespunzătoare și analiza fluctuațiilor de curent ionic printr-un singur por proteic de  $\alpha$ -hemolizină, însă suficient de mică pentru a evita ecranarea electrostatică semnificativă a sarcinilor electrice de la nivelul capetelor polare ale lipidelor, al lipopolizaharidelor bacteriene, al peptidelor, respectiv al porului proteic, care ar conduce la agregarea lipozomilor și a celulelor bacteriene în condițiile atenuării respingerii electrostatice, sau la reducerea interacțiunii de atracție dintre peptidele cationice și membrana încărcată electric negativ a bacteriilor sau a sistemelor lipidice biomimetice. Sistemul este stabil în condiții de pH acid, însă trebuie menționat că porul de  $\alpha$ -HL prezintă o serie de aminoacizi încărcăți la intrarea în lumenul transmembranar al proteinei care conferă acestei regiuni o sarcină electrică netă de -7 la pH = 7. Această încărcare electrică netă negativă este redusă semnificativ la valori acide ale pH-ului datorită protonării aminoacizilor bazici, și poate fi astfel folosită în scopul modulării interacțiunii dintre particule încărcate electric și nanoporul proteic.

În cadrul **ETAPEI II** am continuat investigațiile asupra asocierii peptidelor antimicrobiene la membrana sistemelor lipidice model (SUVs), prin măsurători indirecte furnizate de monitorizarea și analiza statistică a curentului ionic mediat de un nanopor proteic la nivelul căruia apar fenomene de blocaj datorate pătrunderii peptidelor libere în lumenul porului proteic și a obstrucționării acestuia. Astfel de experimente au fost realizate și utilizând celule bacteriene (*E. coli*) și a fost pusă în evidență adsorbția peptidelor pe suprafața celulelor patogene.

Într-o altă serie de experimente, am adus modificări protocolului de lucru astfel încât am pus bazele unei tehnici de detecție a bacteriilor bazate pe însăși interacțiunea reversibilă a acestora cu porul proteic. Am demonstrat potențialul unei tehnici bazate pe un singur nanopor proteic inserat într-o membrană lipidică reconstituită pentru detecția în timp real a unor bacterii Gram-negative selectate (*Pseudomonas aeruginosa* și *Escherichia coli*) aflate în suspensie apoasă în concentrație de  $1.2 \times 10^8$  cfu/mL. Sarcina electrică netă negativă prezentă pe fața externă a bacteriilor promovează migrarea electroforetică a celulelor bacteriene către un singur por proteic de  $\alpha$ -hemolizină ( $\alpha$ -HL) inserat într-o membrană planară constituită din DPhPC, sub acțiunea unui câmp electric generat în urma aplicării unor diferențe de potențial transmembranare negative. Migrarea bacteriilor înspre  $\alpha$ -HL este urmată de captura acestora la gura de intrare a porului într-o manieră modelată prin teoria clasică Kramers. Utilizând o peptidă antimicrobiană specifică ca element de biorecunoaștere moleculară pentru bacteriile utilizate, am arătat că sistemul de detecție descris are abilitatea de a combina sensibilitatea tehnicilor de detecție moleculară bazate pe nanopori cu procese de recunoaștere biologică selectivă și subliniază fezabilitatea unei astfel de platforme bazate pe nanopori pentru sisteme portabile de analiză și monitorizare a patogenilor de natură bacteriană.

De asemenea, am realizat experimente de microscopie de fluorescență la nivel de singură moleculă, pentru a investiga dinamica fosfolipidelor membranare în cadrul bistraturilor lipidice

model cu proprietăți mecanice diferite, respectiv dinamica și mecanismele de interacțiune ale unor peptide antimicrobine la nivelul membranei lipozomilor care mimează membrane bacteriene, respectiv membrane eucariote. Rezultatele experimentale au pus în evidență diferențe de mobilitate lipidică între membrane cu proprietăți mecanice diferite, formate din lipide saturate (DPPC), respectiv nesaturate (DOPC). Prezența legăturilor duble în structura cozilor hidrocarbonate ale lipidelor le conferă acestora flexibilitate și crește fluiditatea miezului hidrofob al membranei, facilitând difuzia moleculelor în planul bistratului.

De asemenea, am studiat procesele de interacțiune dintre peptide antimicrobiene și sisteme lipidice biomimetice care mimează membrana eucariotă (PC), respectiv bacteriană (PC+PG), încărcată electric negativ. Rezultatele au arătat că afinitatea peptidelor cationice este mai mare pentru membrane care conțin PG datorită interacțiunilor de atracție electrostatică. A fost pusă în evidență formarea agregatelor peptidice (pori) în ambele tipuri de membrane. În membrane anionice (PC/PG), au putut fi detectate și peptide în stare monomerică, cu un coeficient de difuzie de aproximativ patru ori mai mare decât cel al agregatelor. Acestea nu au putut fi observate în membrane neutre (PC), datorită ratei mari de disociere a peptidelor în absența interacțiunilor de atracție electrostatică.

## DESCRIEREA ȘTIINȚIFICĂ ȘI TEHNICĂ

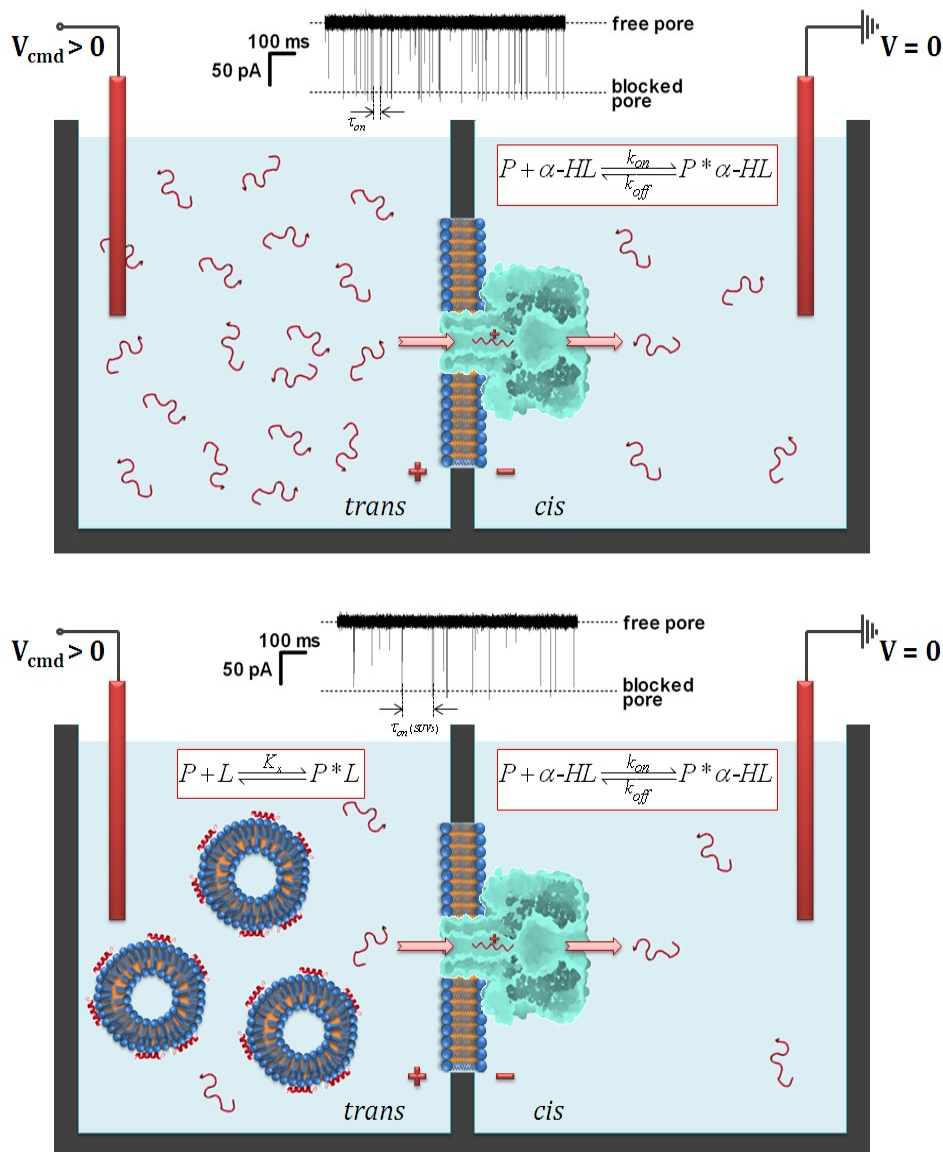
### Experimente de electrofiziologie la nivel de singură moleculă

Metoda de detecție propusă în cadrul acestui proiect se bazează pe reacția bimoleculară reversibilă dintre peptide antimicrobiene (AMPs) și un singur por de  $\alpha$ -HL inserat într-o membrană lipidică suport, a cărei rată de asociere depinde liniar de concentrația de peptidă liberă, și poate fi calibrată pentru fiecare peptidă selectată, permițând astfel extrapolarea unei concentrații de peptidă necunoscută. Astfel, prin adăugarea unui al treilea participant la reacție (lipozomi cu compoziție lipidică diferită sau bacterii) care interacționează competitiv prin legarea monomerilor de peptidă din soluție (Fig.1), echilibrul reacției peptidă-por se va deplasa spre stânga. Prin extrapolarea concentrației de peptidă liberă prezentă în sistem în urma adăugării competitorului (lipozomi, bacterii), se poate evalua în final afinitatea peptidei pentru acesta.

Astfel, pentru punerea la punct a acestui sistem, am realizat bistraturi lipidice din DPhPC (1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) prin metoda Montal & Mueller, în care s-a inserat un singur por de  $\alpha$ -HL.

În cadrul **ETAPEI I** s-au realizat experimente adăugând de partea *trans* a membranei lipidice peptida antimicrobiană P8 (HRWWRWRRH-NH<sub>2</sub>).

Peptidele interacționează cu porul conform unei reacții bimoleculare simple, așa cum este exemplificat în figura 1 pentru peptida P8, unde  $k_{on}$  și  $k_{off}$  reprezintă constantele de viteză ale reacțiilor directă, de asociere, respectiv inversă, de disociere, dintre peptidă și nanopor. În momentul pătrunderii unei peptide în lumenul porului proteic, în curentul ionic înregistrat prin canalul ionic liber apar evenimente de blocaj.  $\tau_{on}$  reprezintă intervalul de timp dintre două evenimente de blocaj succesive, iar  $\tau_{off}$  reprezintă durata unui blocaj, adică timpul de rezidență al peptidei în interiorul porului.



**Fig.1. Reprezentare schematică a principiului metodei bazate pe nanopori. Peptidele din soluție (roșu) interacționează cu porul conform unei reacții bimoleculare simple și induc blocaje în curentul ionic prin porul liber (sus). În urma adăugării în sistem a lipozomilor sau a bacteriilor, cinetica de interacțiune peptide-por se modifică datorită adsorbției peptidelor la nivelul membranei acestora.**

Viteza de asociere a reacției reversibile,  $r_{on}$ , este inversul timpului mediu  $\tau_{on}$ , iar viteza de disociere,  $r_{off}$ , este inversul timpului mediu  $\tau_{off}$ . Viteza de asociere a reacției depinde liniar de concentrația de peptidă, iar constanta de viteză de asociere,  $k_{on}$ , poate fi determinată din panta acestei

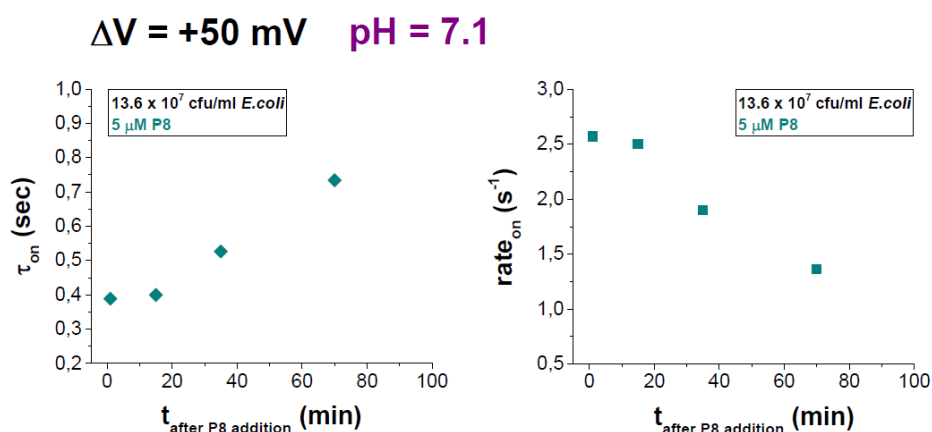
dependențe ( $\text{rate}_{\text{on}} = k_{\text{on}}[\text{P8}]$ ). Viteza de disociere a reacției nu depinde de concentrația de peptidă și este numeric egală cu constanta de viteză de disociere,  $k_{\text{off}}$  ( $\text{rate}_{\text{off}} = k_{\text{off}}$ ). Am arătat că frecvența evenimentelor de blocaj crește cu creșterea concentrației de sare și, de asemenea, blocajele sunt mai frecvente la o valoare mai mică a tăriei ionice.

La tărie ionică mai mare constanta de viteză de asociere este mai mică. Acest lucru se explică ținând cont de faptul că la intrarea în canalul proteic analizat sunt prezenți o serie de aminoacizi încărcăți din punct de vedere electric care conferă intrării în lumenul porului apos o sarcină netă de -7, la pH neutru. Astfel, scăderea vitezei de asociere la tărie ionică mai mare se datorează ecranării interacțiunilor electrostatice dintre peptida cationică și sarcina electrică netă negativă de la baza lumenului. Scăderea observată în  $\text{rate}_{\text{off}}$  și  $k_{\text{off}}$  se datorează scăderii mobilității electroforetice a peptidelor în por (creșterea intensității forței electroforetice de întârziere datorată norului de contraioni din jurul peptidei, care se opune mișcării acesteia în câmpul electric aplicat) odată cu creșterea tăriei ionice a soluției electrolitice, astfel încât, la tărie ionică mai mare, timpul de rezidență al peptidelor în interiorul porului este mai mare.

Experimentele ulterioare s-au realizat în soluții de 0.5 M KCl, pentru a evita ecranarea electrostatică a sarcinilor electrice ce ar conduce la reducerea interacțiunilor peptide-lipozomi/bacterii, la pH = 7.

Am adăugat în sistem vezicule unilamelare mici formate din DOPC, respectiv DOPC și DOPG (4:1) și am determinat cinetica de asociere peptide-por. Rezultatele au arătat că afinitatea peptidei P8 pentru membrane zwitterionice este mai scăzută decât cea pentru membrane anionice (care conțin DOPG).

De asemenea, am realizat experimente test de alterare a cineticii de interacțiune peptide-por în prezența unor celule bacteriene ( $13.6 \times 10^7$  cfu/mL bacterii *E. coli*) și am urmărit scăderea în timp a ratei de asociere a peptidelor cu porul proteic, datorată adsorbției peptidelor la interfața bacteriilor (Fig. 2).

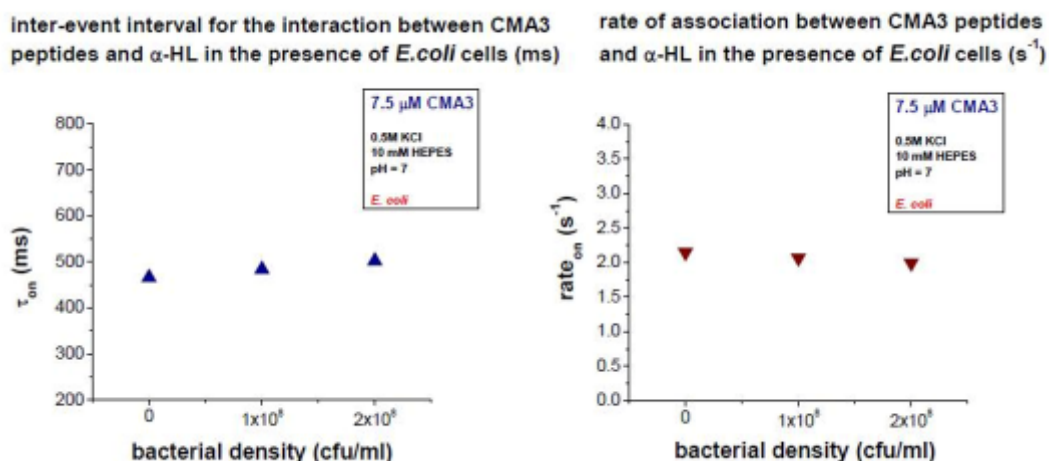


**Fig.2. Dependența de timp a intervalului de timp dintre două evenimente de blocaj succesive (stânga), respectiv a ratei de asociere peptide P8-por (dreapta).**

Se observă clar o scădere în timp a ratei de asociere peptide P8-por în prezența bacteriilor *E. coli*, datorată scăderii concentrației libere de peptide de partea *cis* a membranei, ca urmare a interacțiunii dintre peptidele cationice și membrana încărcată electric net negativ a bacteriilor.

În cadrul **ETAPEI II** am continuat investigațiile asupra asocierii peptidelor antimicrobiene la membrana sistemelor lipidice model (SUVs), prin măsurători indirecte furnizate de monitorizarea și analiza statistică a curentului ionic mediat de un nanopor proteic la nivelul căruia apar fenomene de blocaj datorate pătrunderii peptidelor libere în lumenul porului proteic și a obstrucționării acestuia. Astfel de experimente au fost realizate și utilizând celule bacteriene (*E. coli*) și a fost pusă în evidență adsorbția peptidelor pe suprafața celulelor patogene.

În figura 3 sunt ilustrate rezultatele monitorizării adsorbției peptidelor CMA3 la nivelul membranei bacteriilor *E. coli* adăugate de partea *trans* a membranei în concentrații diferite,  $1 \times 10^8$  cfu/mL, respectiv  $2 \times 10^8$  cfu/mL



**Fig.3. Dependența de concentrația de bacterii a intervalului de timp dintre două evenimente de blocaj succesive (stânga), respectiv a ratei de asociere peptide CMA3-por (dreapta).**

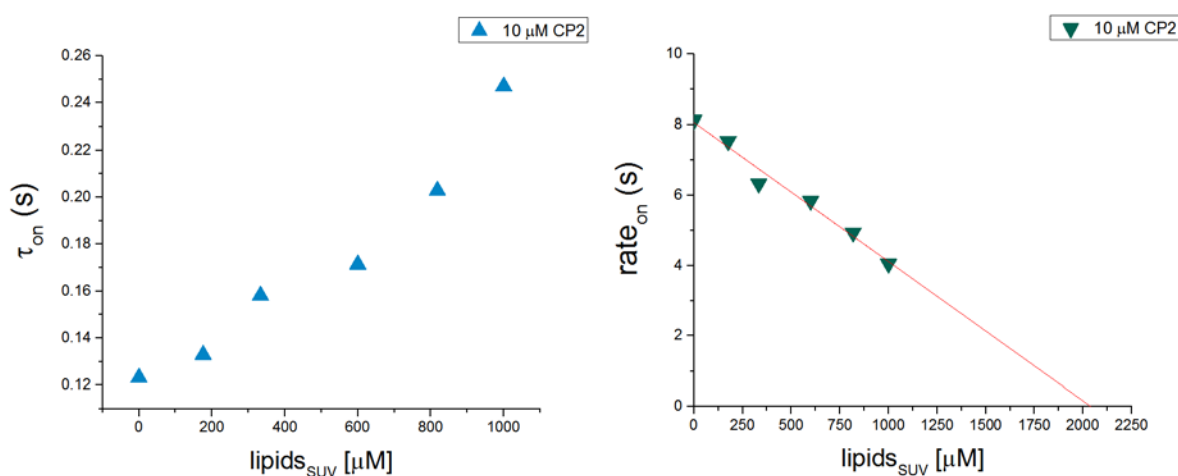
Deși asocierea peptidelor CMA3 cu membranele bacteriene și eficiența antimicrobiană a acestora este dovedită, se observă că modificările înregistrate în intervalul de timp dintre două evenimente de blocaj succesive, respectiv în rata de asociere dintre peptidele CMA3 și porul proteic sunt minore și împiedică studiul cineticii de adsorbție la nivelul membranelor bacteriene prin această metodă.

Gradul redus al acestor alterări se datorează faptului că concentrația de peptide adsorbite la nivelul membranei în aceste condiții experimentale este foarte mică în raport cu concentrația de peptidă liberă, astfel încât modificările, deși existente, sunt greu de cuantificat.

Un factor important care caracterizează selectivitatea peptidelor antimicrobiene și stă la baza afinității crescute a acestora pentru membrane bacteriene, îl reprezintă sarcina electrică netă pozitivă a acestora care interacționează electrostatic cu membranele bacteriene încărcate negativ. Un motiv pentru care afinitatea peptidei cationice P8 (+4|e-|) s-a dovedit a fi mult mai mare decât a peptidei cationice CMA3 (+8|e-|), este reprezentat de prezența în structura primară a peptidei P8 a 4 aminoacizi

aromatici de triptofan, cu caracter hidrofob, ce prezintă afinitate mare pentru mediul hidrofob al membranei și care acționează ca o ancoră la interfața bistratului.

În figura 4 sunt prezentate rezultate experimentale ale interacțiunii dintre o peptidă puternic cationică, CP2 (+13|e-|) și membranele lipozolmilor unilamelari mici ce prezintă în compoziția lor lipide încărcate negativ (DOPC:DOPG, 2:1). Se observă clar o scădere a ratei de asociere peptide CP2-por în prezența unor concentrații incrementale de lipide (SUVs), datorată scăderii concentrației libere de peptide de partea *cis* a membranei, ca urmare a interacțiunilor electrostatice puternice dintre peptidele cationice CP2 și membrana încărcată electric net negativ a lipozomilor.



**Fig.4. Dependența de concentrația de lipide (SUVs) a intervalului de timp dintre două evenimente de blocaj succesive (stânga), respectiv a ratei de asociere peptide CP2-por (dreapta).**

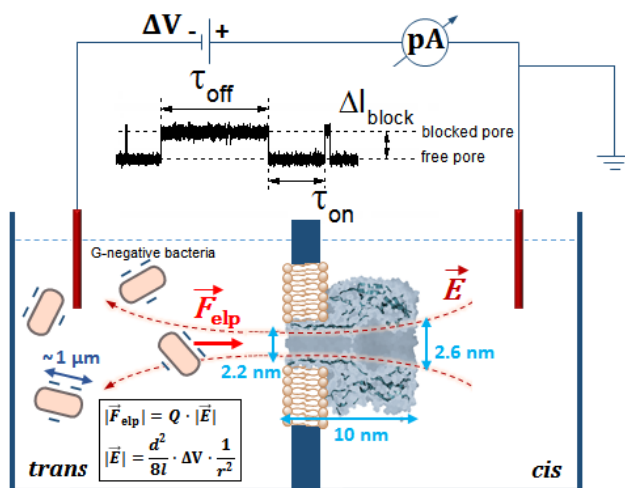
### **Experimente de electrofiziologie la nivel de singură moleculă de investigare a interacțiunilor dintre celule bacteriene și un singur nanopor proteic (metodă de detecție a bacteriilor)**

În cadrul **ETAPEI II** am dezvoltat un concept original de detecție al unor bacterii Gram-negative selectate (*Pseudomonas aeruginosa* și *Escherichia coli*) pe baza interacțiunii reversibile dintre acestea și un singur por proteic de  $\alpha$ -HL inserat într-un bistrat lipidic reconstituit. Prin exploatarea eficienței de legare a unei peptide antimicrobiene dezvoltată în colaborare cu partenerii noștri din Coreea de Sud (CMA3), am testat posibilitatea de a diferenția între cele două tipuri de bacterii cu ajutorul nanoporului de  $\alpha$ -HL. Dezvoltată în viitor, această abordare ar putea fi aplicată în scopul obținerii de nanosenzori senzori integrați pentru detecția simultană a unor tulpini bacteriene multiple.

În figura 5 este prezentat principiul experimental al detecției bacteriilor pe baza unui singur nanopor de  $\alpha$ -HL. În vecinătatea porului proteic, în condițiile aplicării unei diferențe de potențial



negative (potențial negativ pe electrodul de comandă - *trans*), bacteriile încărcate electric net negativ adăugate de partea *trans* a membranei sunt atrase electroforetic înspre deschiderea *trans* a lumenului  $\alpha$ -HL, sub acțiunea liniilor de câmp electric generat de diferența de potențial transmembranară. Sarcina electrică netă negativă a bacteriilor este datorată prezenței grupărilor carboxil și fosfat în structura lanțurilor LPS de pe fața externă a bacteriilor, cu valori ale potențialului zeta – măsurat în soluții electrolitice de tărie ionică mică – variind între -22 și 55 mV pentru *E. coli*, respectiv -11 și -42 mV pentru *P. aeruginosa*. În baza principiului prezentat în figura 5, interacțiunile reversibile bacterii-nanopor, mediate astfel de liniile de câmp electric generate de diferența de potențial negativă aplicată, induc blocaje temporare în curentul ionic prin porul proteic de  $\alpha$ -HL, ce stau la baza detecției bacteriilor la nivel unicelular.



**Fig.5. Principiul metodei de detecție a bacteriilor la nivel unicelular pe baza nanoporului de  $\alpha$ -HL. Diferența de potențial negativă aplicată de o parte și de alta a unei membrane lipidice planare ce conține un singur por proteic de  $\alpha$ -HL, determină migrarea electroforetică a bacteriilor încărcate negativ spre gura porului. Considerând un formalism cu simetrie sferică, valoarea absolută a forței electroforetice ( $F_{elp}$ ) ce acționează asupra bacteriei este proporțională cu sarcina electrică de pe suprafața bacteriei ( $Q$ ), și cu intensitatea câmpului electric generat ( $E$ ) măsurat în lichid la o distanță radială ( $r$ ) de gura porului, câmp generat în urma aplicării diferenței de potențial ( $\Delta V$ ). În relațiile din figură,  $d$  reprezintă diametrul porului, iar  $l$  reprezintă lungimea porului. Coliziunile bacteriilor cu deschiderea *trans* a porului determină blocaje tranziente în curentul ionic prin nanopor. Cinetica acestor interacțiuni poate fi cuantificată prin determinarea valorilor medii ale timpilor dintre două blocaje succesive ( $\tau_{on}$ ), respectiv ale intervalelor de timp petrecute de por în stare blocată ( $\tau_{off}$ ).**

În figura 6 pot fi observate înregistrări tipice ale curentului ionic prin nanopor care arată modificările reversibile ale intensității acestuia ca urmare a interacțiunii celulelor bacteriene cu porul. Bacteriile (*Pseudomonas aeruginosa*, respectiv *Escherichia coli*) au fost adăugate de partea *trans* a membranei, într-o concentrație de  $1.2 \times 10^8$  cfu/mL, optimă pentru acest tip de înregistrări.

Experimente control au pus în evidență absența evenimentelor de blocaj în prezența bacteriilor adăugate de partea *trans* a membranei, dar la diferențe de potențial aplicate pozitive.

Curentul ionic mediat de  $\alpha$ -HL, înregistrat ca urmare a aplicării unei diferențe de potențial  $\Delta V = -80$  mV, prezintă evenimente de blocaj vizualizate ca fluctuații rapide ale intensității curentului ionic spre valori absolute mai mici ale acestuia (Fig. 6a, b) ca urmare a coliziunii bacteriilor cu deschiderea porului, de la valori de  $\sim -28 \pm 0.5$  pA (por liber) la  $\sim -3.8 \pm 0.6$  pA (por blocat). Aceste evenimente foarte scurte pot fi vizualizate în imaginile detaliate din figura Fig. 6a, b (zoom-in panels).

Pentru a modela interacțiuni, am considerat teoria clasică Kramers ca posibil mecanism care să explice procesul de asociere reversibilă dintre celulele bacteriene și  $\alpha$ -HL. Aceasta consideră modelul unei bariere energetice pe care celulele bacteriene trebuie să o depășească pentru realizarea cu succes a interacțiunii bacterie-por. În cadrul acestui model, dependența de diferența de potențial aplicată a ratei de asociere ( $rate_{on}$ ) bacterie-  $\alpha$ -HL trebuie să fie una exponențială. Așa cum poate fi observat în figura 7, rezultatele noastre sunt în acord cu modelul barierei de energie liberă conform căruia, celulele bacteriene tranzitează vecinătatea porului de mai multe ori înainte de producerea unui eveniment de blocaj indus de interacțiunea bacterie-por.

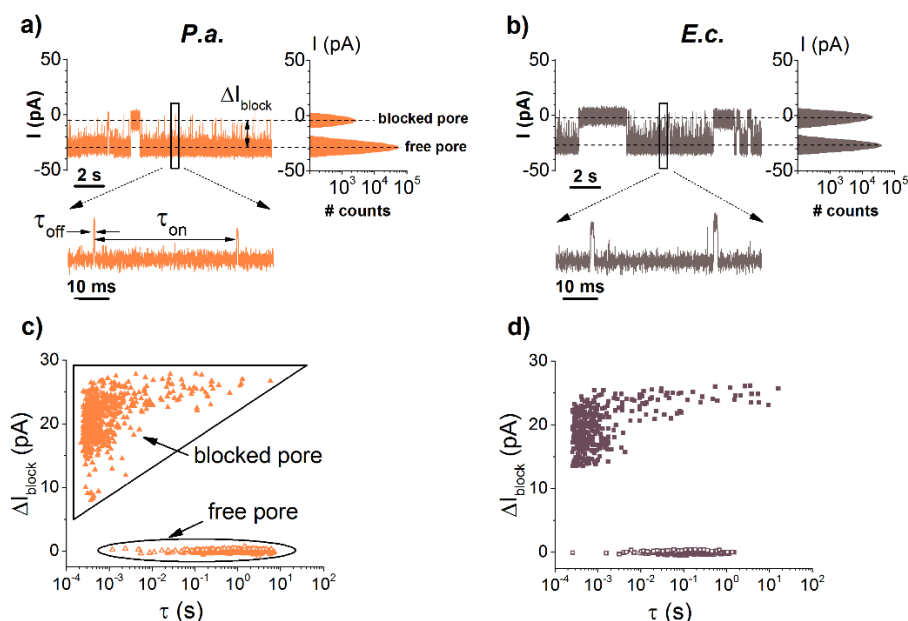


Fig. 6. Ilustrarea detecției individuale a celulelor *P. aeruginosa* (*P.a.*), respectiv *E. coli* (*E.c.*) cu ajutorul porului de  $\alpha$ -HL. Înregistrări originale de curent care arată blocajele reversibile induse în urma asocierii bacteriilor *P.a.* (a), respectiv *E.c.* (b) cu  $\alpha$ -HL. Histogramele de amplitudine din dreapta panelurilor evidențiază obstrucția aproape completă a curentului ionic prin nanopor de către bacterii. Intervale selectate care caracterizează frecvența ( $\tau_{on}$ ), respectiv durata ( $\tau_{off}$ ) proceselor de asociere sunt reprezentate în figurile detaliate de sub înregistrările de curent ionic. Diagramele scatter plot ale magnitudinii blocajelor de curent în funcție de intervalele de timp petrecute în cele două stări (por liber, respectiv por blocat) sunt figurate în panelul (c) pentru *P.a.*, respectiv în panelul (d) pentru *E.c.* Diferența de potențial aplicată a fost  $\Delta V = -80$  mV.

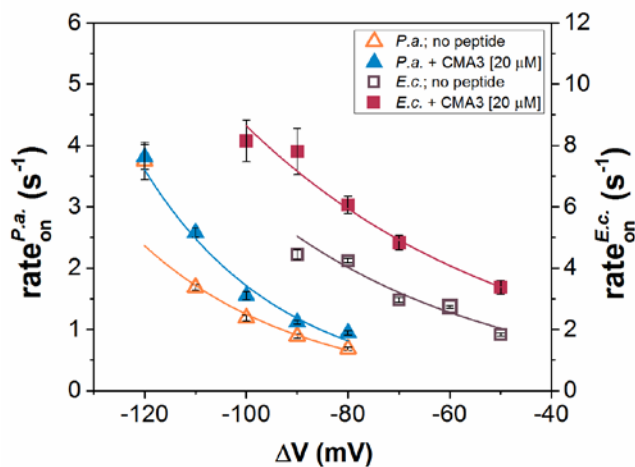


Fig.7. Dependența de diferența de potențial aplicată a ratelor de captură a bacteriilor de către nanopor ( $rate_{on}$ ), pentru *P.a.* (triunghiuri), respectiv *E.c.* (pătrate), în absența (simboluri deschise), respectiv prezența a 20  $\mu$ M peptidă CMA3 de partea *trans* a membranei (simboluri pline), la pH = 7.

Atât în cazul bacteriilor *P. aeruginosa*, cât și în cazul *E. coli*, dependența  $rate_{on} = f(\Delta V)$  a fost astfel fitată cu o curbă exponențială în baza legii Van't Hoff-Arrhenius, exprimată prin ecuația:  $rate_{on} = A \cdot \exp\left(\frac{q\Delta V - U^*}{k_B T_m}\right)$ , unde  $q$  reprezintă sarcina electrică efectivă a celulei bacteriene care trebuie să depășească bariera energetică  $U^*$  întâmpinată la intrarea porului,  $\Delta V$  reprezintă diferența de potențial aplicată,  $k_B$  constanta lui Boltzmann, iar  $T_m$  temperatura absolută a mediului. Constanta  $A$  depinde de concentrația bacteriilor, de coeficientul de difuzie al acestora și de geometria porului. Considerând dimensiunile similare ale *P. aeruginosa* și *E. coli*, am aproximat-o ca fiind aceeași pentru cele două tipuri de bacterii. Expresia de mai sus poate fi scrisă ca  $rate_{on} = r_0 \cdot \exp\left(\frac{q\Delta V}{k_B T_m}\right)$ , unde termenul constant  $r_0 = A \cdot \exp\left(-\frac{U^*}{k_B T_m}\right)$  reprezintă rata de asociere în absența unui câmp electric aplicat. Termenul corespunzător barierei energetice  $U^*$  conține contribuții ale interacțiunilor de respingere electrostatică manifestate între sarcina netă negativă de pe suprafața bacteriei și intrarea în lumenul nanoporului care este compus din 14 aminoacizi aspartat (D127 and D128) și 7 lizine (K131) care, la pH neutru prezintă o sarcină electrică netă negativă ( $-7|e^-|$ ). Pentru suprafața încărcată negativ a bacteriilor, sarcina electrică  $q$  este egală cu  $-z|e^-|$ , unde  $z$  reprezintă valența electrică efectivă, iar  $e^-$  sarcina elementară a electronului. Valorile obținute pentru  $r_0$  și  $z$ , determinate în urma fitării datelor experimentale, sunt sumarizate în tabelul 1.

**Tabelul 1. Valorile  $r_0$  și  $z$  pentru *P.a.*, respectiv *E.c.*, în absența, respectiv prezența a 20  $\mu\text{M}$  peptidă CMA3 de partea *trans* a membranei, la pH = 7.**

	no peptide		+ CMA3 [20 $\mu\text{M}$ ]	
	P.a.	E.c.	P.a. + CMA3	E.c. + CMA3
$r_0$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$0.04 \pm 0.02$	$0.66 \pm 0.17$	$0.05 \pm 0.02$	$1.33 \pm 0.14$
$z$	$0.95 \pm 0.10$	$0.58 \pm 0.09$	$0.82 \pm 0.10$	$0.48 \pm 0.04$

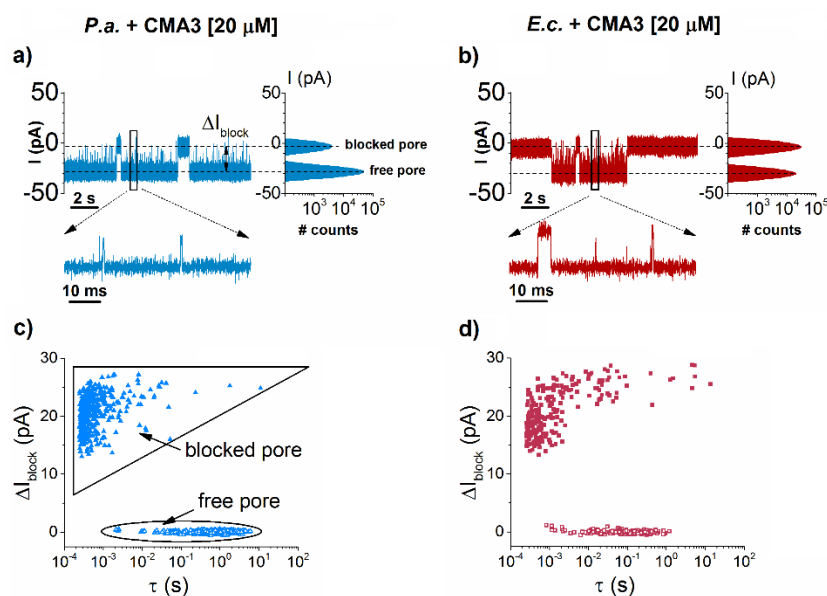
Deși sarcina electrică netă a suprafeței bacteriilor este mult mai mare, valorile obținute sunt în concordanță cu faptul că sarcina electrică efectivă care contribuie la interacțiunea bacteriei cu porul este de ordinul unei sarcini elementare, întrucât dimensiunile bacteriilor sunt de ordinul micrometrilor, iar cea a porul de ordinul nanometrilor. Astfel, câmpul electric generat la nivelul nanoporului în urma aplicării unei diferențe de potențial transmembranre acționează asupra unui număr limitat de sarcini electrice prezente pe suprafața bacteriei, aflate în imediata vecinătate a nanoporului. De asemenea, trebuie considerat faptul că lungimea debye pentru o soluție de 0.5 M KCl este aproximativ 0.4 nm, astfel încât doar un număr limitat de sarcini aflate la extremitățile lanțurilor LPS vor interacționa electrostatic cu inelul de sarcină negativă de la gura porului.

Rezultatele au arătat că această sarcină electrică efectivă care contribuie la interacțiunea bacterie-por este mai mică pentru *E. coli* decât pentru *P. aeruginosa*. Acest rezultat creează un paradox aparent, ținând cont că rata de asociere a *E. coli* este mai mare decât cea a *P. aeruginosa* (Fig. 7). Rezultatele se explică considerând interacțiunile de respingere electrostatică între sarcina electrică negativă de pe suprafața bacteriei și inelul de sarcină negativă de la gura porului care creează o barieră energetică mai

mare ( $U^*$ ) pentru *P. aeruginosa* decât pentru *E. coli*. Astfel, bacterii cu sarcină netă negativă mai redusă se vor asocia mai ușor cu nanoporul de  $\alpha$ -HL.

În continuare, am utilizat o peptidă antimicrobiană cationică cu eficacitate dovedită (CMA3), care se acumulează pe suprafața bacteriilor reducând sarcina netă negativă a acestora, ca un potențial element de recunoaștere moleculară menit să moduleze specific interacțiunile bacteie-por.

În figura 8 sunt prezentate înregistrări originale ale curentului ionic prin nanopor și blocajele induse în urma interacțiunilor reversibile bacterie-  $\alpha$ -HL în prezența unei concentrații optime de 20  $\mu$ M peptidă CMA3 adăugată de partea *trans* a membranei, atât în cazul *P. aeruginosa*, cât și în cazul *E. coli*.



**Fig. 8.** Înregistrări originale de curent care arată blocajele reversibile induse în urma asocierii bacteriilor *P.a.* (a), respectiv *E.c.* (b) cu  $\alpha$ -HL în prezența a 20  $\mu$ M peptidă CMA3 de partea *trans* a membranei. Histogramele de amplitudine din dreapta panelurilor evidențiază obstrucția aproape completă a curentului ionic prin nanopor de către bacterii. Intervale selectate care caracterizează frecvența ( $\tau_{on}$ ), respectiv durata ( $\tau_{off}$ ) proceselor de asociere sunt reprezentate în figurile detaliate de sub înregistrările de curent ionic. Diagramele scatter plot ale magnitudinii blocajelor de curent în funcție de intervalele de timp petrecute în cele două stări (por liber, respectiv por blocat) sunt figurate în panelul (c) pentru *P.a.*, respectiv în panelul (d) pentru *E.c.* Diferența de potențial aplicată a fost  $\Delta V = -80$  mV.

Adsorbția peptidelor cationice pe suprafața bacteriilor determină reducerea sarcinii electrice nete negative a acestora și micșorează astfel forța electroforetică care mediază captura bacteriilor de către nanopor. Analiza scatter plot evidențiază o scădere a timpului de asociere bacterie-por în prezența CMA3, iar creșterea ratei de asociere în urma adsorbției peptidelor poate fi observată în figura 7. Timpul mediu de asociere bacterie-por ( $\tau_{on}$ ) scade cu aproximativ  $26.5 \pm 6.2\%$  pentru *P. aeruginosa*, respectiv  $39.3 \pm 6.9\%$  pentru *E. coli*, în urma adăugării în sistem a peptidelor. Așa cum a fost discutat anterior, și cum este ilustrat în figura 9, acest lucru se datorează scăderii interacțiunilor de respingere electrostatică la gura porului, ca urmare a reducerii sarcinii negative de pe suprafața bacteriei.

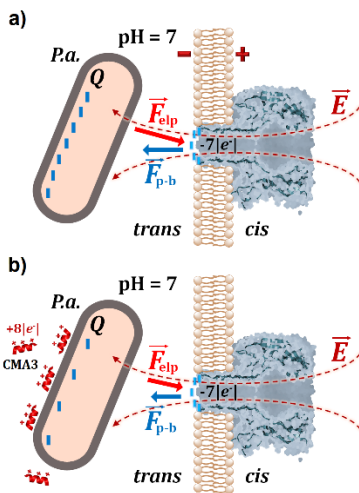


Fig. 9. Reprezentare schematică a interacțiunilor manifestate între bacterie și  $\alpha$ -HL la gura porului, care evidențiază efectul adsorbției peptidelor CMA3 pe suprafața bacteriilor asupra evenimentelor de captură a bacteriilor. Sarcina electrică netă a peptidelor CMA3 este de  $+8|e^-|$  la  $\text{pH} = 7$ . Contribuția acestor sarcini compensează sarcina electrică netă negativă de pe suprafața bacteriei conducând la scăderea forței electroforetice dar și, totodată, la scăderea barierei energetice ce trebuie depășită pentru captura bacteriei de către nanopor. Sarcina electrică netă a intrării în lumenul porului proteic este de  $-7|e^-|$  la  $\text{pH} = 7$ .

Pentru a investiga mai departe importanța interacțiunilor electrostatice manifestate între bacterii și intrarea în lumenul  $\alpha$ -HL, am realizat experimente la o valoare acidă a  $\text{pH}$ -ului soluției electrofiziologice,  $\text{pH} = 4$ , pentru *P. aeruginosa*. În aceste condiții, cei 14 aminoacizi aspartat ( $\text{pK}_a \sim 3.9$ ) de la gura porului sunt parțial protonați și, ca urmare, sarcina netă negativă de la gura porului este mult diminuată. În contextul descris mai sus, dacă interacțiunea bacterie-por este controlată de interacțiunile de respingere electrostatică dintre sarcina superficială a bacteriei și inelul de sarcină negativă de la gura porului, diminuarea magnitudinii acestora din urmă ar conduce la o creștere semnificativă a ratei de asociere bacterie-por. Rezultatele experimentale au fost în deplin acord cu acest raționament, așa cum poate fi observat în figura 10 și figura 11. Ratele de asociere bacterie-por la  $\text{pH} = 4$  sunt două ordine de mărime mai mari decât cele la  $\text{pH}$  neutru.

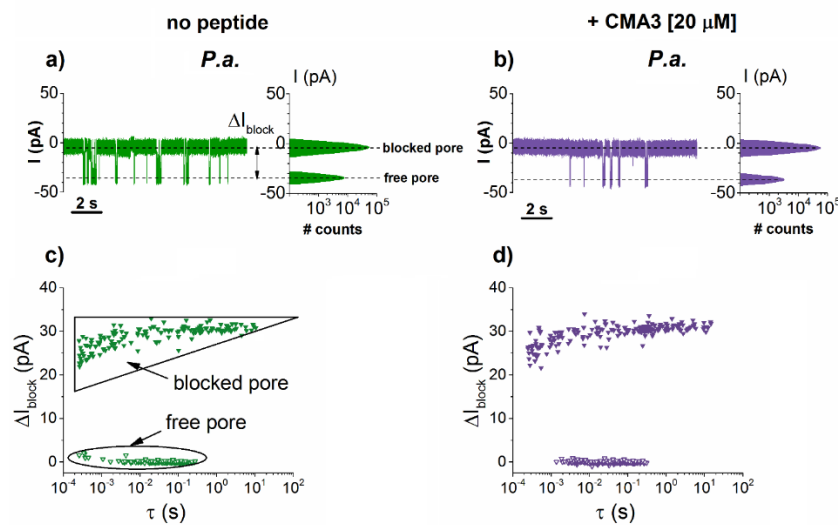


Fig. 10. Înregistrări originale de curent care arată blocajele reversibile induse în urma asocierii bacteriilor *P.a.* în absența (a), respectiv prezența (b) peptidelor CMA3 adăugate de partea *trans* a membranei, cu porul de  $\alpha$ -HL, la  $\text{pH} = 4$ . Histogramele de amplitudine din dreapta panelurilor evidențiază obstrucția aproape completă a curentului ionic prin nanopor de către bacterii. Diagramele scatter plot ale magnitudinii blocajelor de curent în funcție de intervalele de timp petrecute în cele două stări (por liber, respectiv por blocat) sunt figurate în panelurile de jos.

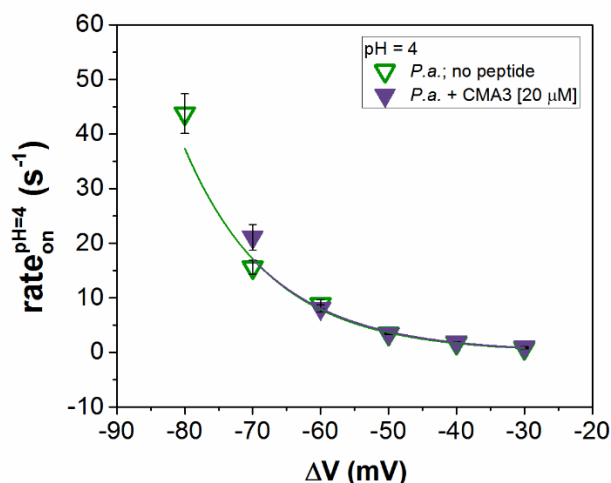


Fig.11. Dependența de diferența de potențial aplicată a ratelor de captură a bacteriilor de către nanopor ( $rate_{on}$ ), pentru *P.a.* în absența (simboluri goale), respectiv prezența (simboluri pline), a 20  $\mu$ M peptidă CMA3 de partea *trans* a membranei, la pH = 4.

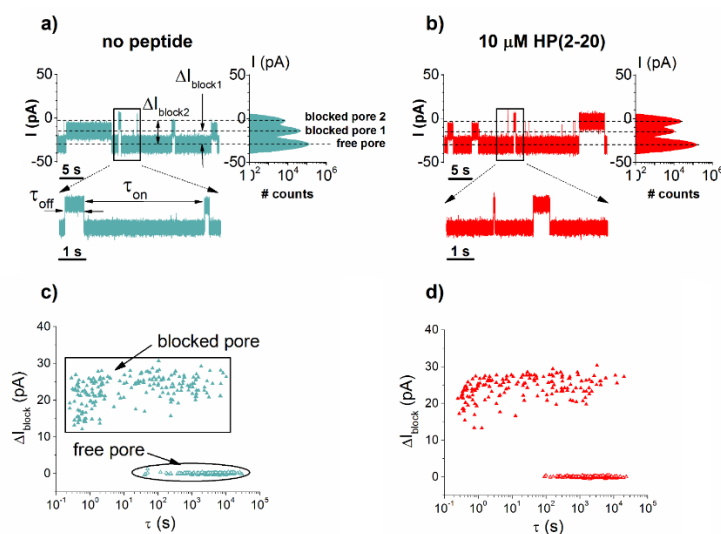
## Concluzii

În urma experimentelor realizate în cadrul **ETAPEI II** a proiectului și a rezultatelor obținute, am demonstrat pentru prima dată un nou principiu de detecție al celulelor bacteriene cu ajutorul nanoporilor proteici. Am reușit să detectăm și să distingem între două bacterii Gram-negative diferite: *P. aeruginosa*, respectiv *E. coli*, pe baza interacțiunilor reversibile dintre acestea și un singur por proteic de  $\alpha$ -HL. Am evidențiat potențialul unei peptide antimicrobiene selectate (CMA3) de a interacționa specific cu membranele bacteriene și de a altera în manieră diferită sarcina netă negativă de pe suprafața membranei, și impactul acetei alterări asupra detecției bacteriilor de către  $\alpha$ -HL.

Rezultatele obținute la pH acid au evidențiat o posibilă abordare de creștere a sensibilității metodei, prin creșterea ratei de asociere bacterie-por și posibilitatea detecției la valori mai mici ale concentrației de bacterie.

Am realizat de asemenea o serie de experimente similare utilizând bacteria Gram-pozitivă *Staphylococcus aureus* în concentrație de  $5 \times 10^7$  cfu/mL, la valori neutre ale pH-ului. Blocajele de curent (Fig. 12) ce indică asocierea bacterie-por au putut fi înregistrate și prelucrate statistic la o concentrație mai mică decât în cazul bacteriilor Gram-negative. Acest fapt poate fi datorat mobilității crescute a bacteriei *S. aureus* care are dimensiuni mai mici decât cele Gram-negative investigate.

De asemenea, se observă că durata blocajelor – timpul de rezidență al bacteriilor în contact cu porul – este mai mare în cazul bacteriei Gram-pozitive, fapt ce poate contribui la rafinarea unor metode de detecție care să discrimineze între bacterii Gram-negative și Gram-pozitive. Mai mult decât atât, analiza blocajelor a revelat și alte diferențe majore, cum ar fi prezența a două niveluri de blocaj pentru *S. aureus*, așa cum poate fi observat în histogramele de amplitudine din figura 12.



**Fig. 12.** Înregistrări originale de curent care arată blocajele reversibile induse în urma asocierii bacteriilor *S. aureus* în absența (a), respectiv prezența (b) a peptidelor HP(2-20) adăugate de partea *trans* a membranei, cu porul de  $\alpha$ -HL, la pH = 7. Histogramele de amplitudine din dreapta panelurilor evidențiază două niveluri de blocaj a curentului ionic prin nanopor de către bacterii. Diagramele scatter plot ale magnitudinii blocajelor de curent în funcție de intervalele de timp petrecute în cele două stări (por liber, respectiv por blocat) sunt figurate în panelurile de jos.

De asemenea, în cadrul experimentelor pe bacterii G-pozitive, am utilizat o altă peptidă antimicrobiană cu eficiență dovedită, HP(2-20). În funcție de selectivitatea și specificitatea peptidelor antimicrobiene față de diferite tipuri de bacterii, aceste molecule au un potențial crescut de a fi utilizate ca element de biorecunoaștere moleculară pentru celule bacteriene specifice, măbind sensibilitatea tehnicilor de detecție moleculară bazate pe nanopori.

## Experimente de microscopie de fluorescență

Ca sistem biomimetic pentru membrana celulară am folosit veziculele unilamelare gigant (GUVs) întrucât dimensiunile lor permit observarea microscopică. Lipidele utilizate pentru a genera GUV-uri au fost alese în funcție de compoziția membranei celulare. Lipidele folosite sunt: dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolină (DOPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamină (POPE) și dioleoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac(1-glicerol)] (DOPG). GUV-urile au fost pregătite prin metoda electroformării descrisă de Angelova et al. [Angelova, M.I., Dimitrov, D.S., *Liposome electroformation*. Faraday Discuss. Chem. Soc., 1986. **81**: p. 303-311]. Astfel, lipidele dizolvate în cloroform sau amestec cloroform:metanol 1:1 într-o concentrație de 1mg/ml au fost depuse pe lamele de sticlă acoperite cu un strat de ITO (Indium tin oxide). Solventul a fost evaporat sub vid iar filmul lipidic a fost rehidratat într-o soluție de zaharoză 250 mM timp de 3 ore. Pentru observarea la microscopul confocal inversat Nikon Ti-E, aproximativ 100  $\mu$ l soluție GUVs a fost diluată în 250 mM glucoză.

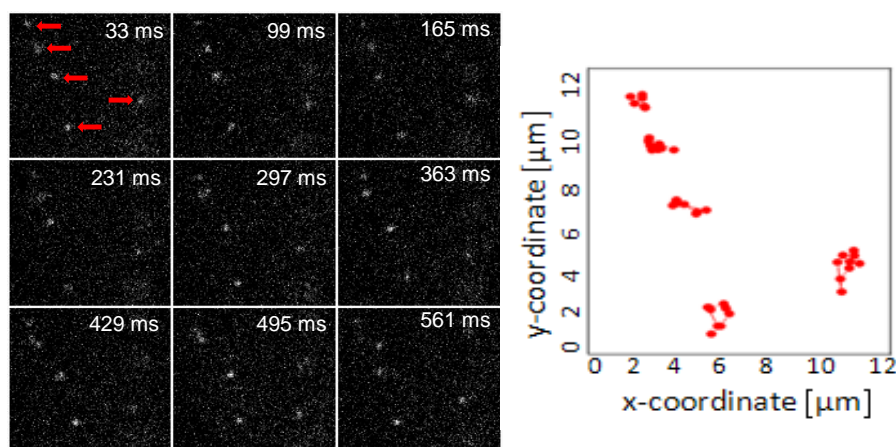
În cadrul **ETAPEI I**, formarea porilor membranari de către peptide antimicrobiene a fost pusă în evidență prin internalizarea în timp a soluției de fluoresceină în interiorul GUVs. Pentru a vizualiza

acumularea sau internalizarea peptidelor în GUVs, peptidele au fost marcate fluorescent cu AlexaFluor 488. Peptidele se adsorb la interfața lipozomilor giganti și apar în imagini sub forma unui inel luminos fluorescent.

În cadrul **ETAPEI II** am continuat investigațiile prin tehnici de microscopie de fluorescență, prin studierea dinamicii moleculare a lipidelor din membrane biomimetice model și a peptidelor asociate cu acestea. Membrana celulară este alcătuită în principal din molecule fosfolipidice constituite dintr-un cap polar hidrofil și două cozi hidrocarbonate hidrofobe, ce le conferă un caracter amfipatic, esențial în procesul de autoorganizare al lipidelor membranare sub formă de bistrat. Diferențe în structura moleculelor fosfolipidice (încărcarea electrică netă sau momentul dipolar al capetelor polare, forma geometrică a moleculei: cilindrică, conică sau con inversat, lungimea sau gradul de saturare al cozilor hidrocarbonate, etc.) afectează proprietățile fizico-chimice ale membranelor biologice.

În cadrul acestui studiu am investigat modul în care compoziția lipidică, în particular gradul de saturare al cozilor hidrofobe, influențează proprietățile unor membrane celulare reconstituite sub formă de lipozomi giganti (Giant Unilamellar Vesicles - GUVs). Astfel, prin **tehnici de microscopie de fluorescență la nivel de singură moleculă**, am determinat coeficientul de difuzie al lipidelor în planul membranei lipozomilor.

GUV-urile au fost obținute prin tehnica electroformării, având două compoziții lipidice diferite: dioleoilfosfatidilcolină (DOPC), lipide cu cozi hidrocarbonate nesaturate, respectiv dipalmitoilfosfatidilcolină (DPPC), lipide cu cozi hidrocarbonate saturate. Un procent foarte mic din fosfolipidele constitutive, astfel încât să permită urmărirea moleculelor individuale, a fost reprezentat de lipide marcate fluorescent cu TexasRed-DHPE. Dinamica membranei a fost urmărită ulterior cu ajutorul microscopiei de fluorescență la nivel de singură moleculă. Microscopia de fluorescență la nivel de singură moleculă permite observarea semnalelor luminoase emise de molecule individuale marcate fluorescent. Această tehnică a fost folosită cu succes pentru a urmări mobilitatea proteinelor, peptidelor sau a lipidelor într-o membrană citoplasmatică.



**Fig. 13.** Imagini succesive înregistrate cu o frecvență de 30 Hz ale moleculelor TexasRed-DHPE, într-un bistrat lipidic DPPC; field (12 μm)<sup>2</sup>.



Rezultatele experimentale au pus în evidență diferențe între cele două tipuri de membrane, pentru DOPC obținându-se un coeficient de difuzie ( $D_{\text{DOPC}} = 3,46 \pm 0,04 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) mai mare decât pentru DPPC ( $D_{\text{DPPC}} = 0,98 \pm 0,01 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ). Prezența legăturilor duble în structura cozilor hidrocarbonate ale lipidelor le conferă acestora flexibilitate și crește fluiditatea miezului hidrofob al membranei, facilitând difuzia moleculelor în planul bistratului.

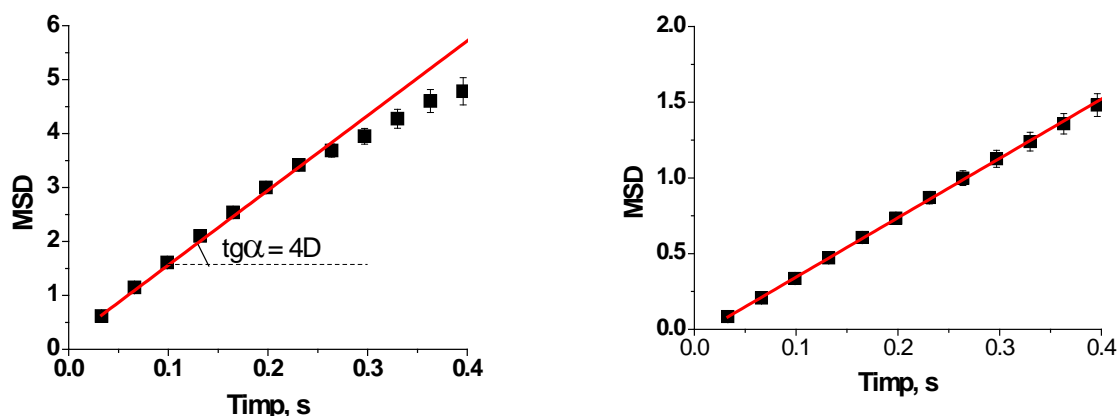


Fig. 14. Dependența de timp a deplasării pătratice medii (MSD) a fosfolipidelor marcate fluorescent în membrana lipozomilor giganti cu compoziție lipidică diferită: (a) DOPC, (b) DPPC. Din panta acestor dependențe liniare se obțin coeficienții de difuzie ai lipidelor în membrana GUV-urilor, conform relației:  $\text{MSD} = 4Dt$ , unde  $D$ =coeficientul de difuzie,  $t$ = timpul (s).

Peptidele antimicrobiene fac parte din sistemul imunitar înnăscut sau nespecific și oferă protecție împotriva unei game largi de microorganisme patogene. Aceste peptide acționează selectiv împotriva celulelor bacteriene conducând la distrugerea lor. Mecanismele de interacțiune presupun atracția electrostatică dintre peptidele cationice și suprafața încărcată electric negativ a bacteriilor, inserția în membrană a peptidelor, formarea de pori transmembranari și internalizarea peptidelor în spațiul citoplasmatic.

Având ca referință dinamica membranei, studiul nostru a vizat în continuare interacțiunea peptidelor antimicrobiene LL-37 marcate fluorescent cu AlexaFluor 488 cu membrane celulare biomimetice ale bacteriei Gram-negativ *Escherichia coli*. Un parametru care reflectă în mod direct formarea agregatelor peptidice sub formă de pori sau micle este mobilitatea peptidelor pe suprafața GUVs, studiată prin microscopia de fluorescență la nivel de singură moleculă, folosind camere video EM-CCD de mare viteză.

Peptida LL-37 face parte din familia cathelicidinelor care au rol în apărarea organismului, acționând împotriva inflamațiilor bacteriene. Ca sistem biomimetic am utilizat lipozomi gigant- *giant unilamellar vesicles* (GUVs) constituiți din lipide neutre din punct de vedere electric, fosfatidilcolină (PC), respectiv lipide încărcate electric negativ, fosfatidilglicerol (PG), în proporții variate.

În urma analizei datelor achiziționate, am evaluat mobilitatea peptidelor LL-37 în membranele biomimetice cu compoziție variată, determinând coeficientul de difuzie al acestora.

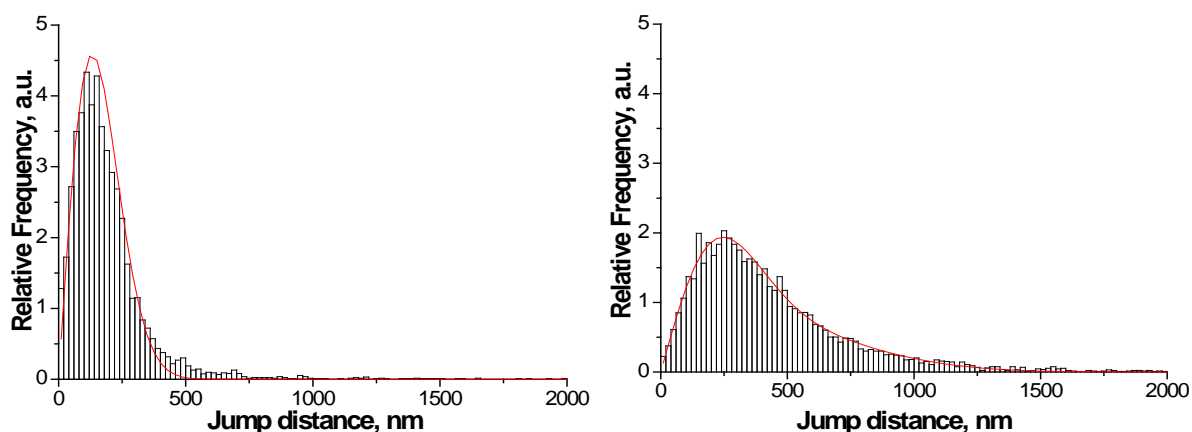


Fig. 15. Histogramele traiectoriilor peptidelor LL-37 în membranele lipozomilor lipidici giganți cu compoziție lipidică diferită. Din analiza acestora se obțin coeficienții de difuzie ai peptidelor în membrana lipidică a GUV-urilor, conform relației coeficientului de difuzie pentru mobilitati multiple:

$$p'(r,t)dr = \sum_{j=1}^2 \frac{M f_j}{2D_j t} e^{-r^2/4D_j t} r dr$$

Rezultatele obținute au oferit informații despre modul de acțiune al peptidelor LL-37 asupra lipozomilor giganti, în funcție de compoziția lipidică a acestora, conducând la o mai bună înțelegere a mecanismelor de interacțiune dintre peptide antimicrobiene și membranele bacteriene. Astfel, în cazul lipozomilor giganți alcătuiți din PC se obține un coeficient de difuzie al peptidei LL-37, corespunzător agregatelor peptidice formate în urma interacțiunii peptide-bistrat lipidic ( $D = 0,87 \pm 0,01 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ), iar în cazul lipozomilor giganți alcătuiți din PC/PG 40% se obțin doi coeficienți de difuzie ai peptidei LL-37,  $D_1$  corespunzător agregatelor peptidice formate ( $D_1 = 0,75 \pm 0,03 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , 54%), respectiv  $D_2$  corespunzător peptidelor individuale care interacționează cu bistratul lipidic ( $D_2 = 3,1 \pm 0,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , 46%).

În concluzie:

- Afinitatea peptidelor cationice LL-37 este mai mare pentru membrane care conțin PG datorită interacțiunilor de atracție electrostatică.
- A fost pusă în evidență formarea agregatelor peptidice (pori) în ambele tipuri de membrane.
- În membrane anionice (PC/PG), au putut fi detectate și peptide în stare monomerică, cu un coeficient de difuzie de aproximativ patru ori mai mare decât cel al agregatelor. Acestea nu au putut fi observate în membrane neutre (PC), datorită ratei mari de disociere a peptidelor în absența interacțiunilor de atracție electrostatică.

\*\*\*\*\*

## DISEMINAREA REZULTATELOR

Rezultatele științifice obținute în cadrul acestui proiect în perioada octombrie 2015 – decembrie 2016 au fost diseminate prin publicarea a două articole științifice în reviste indexate Thomson Reuters (factor de impact cumulativ 9.729), prin 5 prezentări în cadrul unor conferințe internaționale și 8 prezentări în cadrul unor conferințe naționale.

În cadrul acestor manifestări științifice, 3 dintre lucrările prezentate au obținut 4 premii.

### Articole:

1. **Aurelia Apetrei, Andrei Ciucă**, Jong-kook Lee, Chang Ho Seo, Yoonkyung Park, Tudor Luchian, *A Protein Nanopore-Based Approach for Bacteria Sensing*, 2016, **Nanoscale Research Letters** 11:501 ([Springer Open - NANO EXPRESS Open Access](#))
2. **Alina Asandei, Irina Şchiopu**, Mauro Chinappi, Chang Ho Seo, Yoonkyung Park, Tudor Luchian, *Electroosmotic Trap Against the Electrophoretic Force Near a Protein Nanopore Reveals Peptide Dynamics During Capture and Translocation*, 2016, **ACS Appl. Mater. Interfaces** 8(20), 13166 - 13179

### Conferințe:

#### Internaționale:

1. **Aurelia Apetrei, Andrei Ciucă**, Jong-kook Lee, Chang Ho Seo, Yoonkyung Park, Tudor Luchian, *Tuning the interaction environment for single nanopore-based sensing of Gram-negative bacterial cells*, **International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences - IC-ANMBES 2016**, June 29 - July 1, 2016, Braşov, Romania (**poster presentation**)
2. **Aurelia Apetrei**, Tudor Luchian, *Indirect assessment of antimicrobial peptides binding affinity to lipid bilayers via a single nanopore sensing technique*, **International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences - IC-ANMBES 2016**, June 29 - July 1, 2016, Braşov, Romania (**poster presentation**)
3. **Irina Şchiopu**, Sorana Iftemi, Tudor Luchian, *Probing the key metal binding residues in mutant amyloid peptides*, **International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences - IC-ANMBES 2016**, June 29 - July 1, 2016, Braşov, Romania (**poster presentation**)
4. **Andrei Ciucă, Aurelia Apetrei**, Jong-kook Lee, Chang Ho Seo, Yoonkyung Park, Tudor Luchian, *Nanopore-based detection of selected Gram-negative bacterial cells*, **41st FEBS Congress\***, September 3-8, 2016, Kuşadası, Turkey (**poster presentation**)
5. **Irina Şchiopu, Alina Asandei**, Mauro Chinappi, Chang Ho Seo, Yoonkyung Park, Tudor Luchian, *A stop-motion picture of a trapped peptide inside a protein nanopore: electroosmotic flow versus electrophoretic force*, **41st FEBS Congress\***, September 3-8, 2016, Kuşadası, Turkey (**poster presentation**)

\*The Congress was cancelled by FEBS. An optional closed online presentation opportunity of short duration on the Congress website was offered after Congress cancellation.

[The FEBS Journal 283 \(Suppl. 1\) \(2016\) 127-128 DOI: 10.1111/febs.13808](#)

#### Naționale:

1. **Aurelia Apetrei, Andrei Ciucă**, Jong-kook Lee, Chang Ho Seo, Yoonkyung Park, Tudor Luchian, *Assessing antimicrobial peptides interaction with Gram-negative bacterial cells using a protein nanopore sensor*, **14th National Conference of Biophysics**, June 2-4, 2016, Cluj-Napoca, Romania (**oral presentation**)
2. **Irina Şchiopu, Alina Asandei**, Loredana Mereuță, Sorana Iftemi, Tudor Luchian, *Effect of Copper on Amyloid like peptides misfolding*, **14th National Conference of Biophysics**, June 2-4, 2016, Cluj-Napoca, Romania (**poster presentation**)
3. **Corina Ciobănaşu** and Ulrich Kubitscheck, *The N-terminal  $\alpha$ -helix of the antimicrobial peptide NKCS, a mutant of NK-2, is a determinant of pore formation in bacterial membranes*, **14th National Conference of Biophysics**, June 2-4, 2016, Cluj-Napoca, Romania (**poster presentation**)
4. Isabela Dragomir, Diana Teodorescu-Perijoc, **Aurelia Apetrei, Corina Ciobănaşu**, *Studiul interacțiunii dintre peptide LL-37 și membrane biomimetice prin microscopie de fluorescență la nivel de*

singură moleculă, **Conferința Națională "Fizica și Tehnologiile Educaționale Moderne" - FTEM 2016**, May 13-14, 2016, Iași, Romania (**poster presentation**)

5. Isabela Dragomir, Aurelia Apetrei, Corina Ciobănașu, *Microscopia de fluorescență la nivel de singură moleculă aplicată în studiul peptidelor membranar active*, **Conferința Națională "Fizica și Tehnologiile Educaționale Moderne" - FTEM 2016**, May 13-14, 2016, Iași, Romania (**oral presentation**)
6. Alexandra Beșleagă, Florentina Samoilă, Aurelia Apetrei, Lucel Sîrghi, *Lifetime of tethered lipid nanotubes*, **Conferința Națională "Fizica și Tehnologiile Educaționale Moderne" - FTEM 2016**, May 13-14, 2016, Iași, Romania (**poster presentation**)
7. Diana Teodorescu, Cezar Murgoci, Aurelia Apetrei, Corina Ciobănașu, *Determinarea coeficientului de difuzie al lipidelor în membrane biomimetice prin microscopie de fluorescență la nivel de singură moleculă*, **FARPHYS 2016 - Sesiune de comunicări științifice studențești**, October 24, 2015, Iași, Romania (**poster presentation**)
8. Isabela Dragomir, Andrei Ciucă, Aurelia Apetrei, Corina Ciobănașu, *Studiul interacțiunii dintre peptide antimicrobiene marcate fluorescent și membrane biomimetice bacteriene*, **FARPHYS 2015 - Sesiune de comunicări științifice studențești**, 24 octombrie 2015, Iași, România (**poster presentation**)

#### Premii:

- Irina Șchiopu et al. – Premiu pentru cel mai bun poster în cadrul *International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences - ICANMBES 2016*, 29 iunie – 1 iulie, 2016, Brașov, Romania, acordat de Societatea Română de Biofizică Pură și Aplicată, pentru lucrarea "Probing the key metal binding residues in mutant amyloid peptides"
- Irina Șchiopu et al. – Premiu pentru cel mai bun poster în cadrul *International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences - ICANMBES 2016*, 29 iunie – 1 iulie, 2016, Brașov, Romania, acordat de Filiala română a ACS – American Chemical Society, pentru lucrarea "Probing the key metal binding residues in mutant amyloid peptides"
- Corina Ciobănașu - Premiu pentru cel mai bun poster în cadrul *14th National Conference of Biophysics - CNB 2016*, 2-4 iunie, 2016, Cluj-Napoca, Romania, acordat de Societatea Română de Biofizică Pură și Aplicată, pentru lucrarea "The N-terminal  $\alpha$ -helix of the antimicrobial peptide NKCS, a mutant of NK-2, is a determinant of pore formation in bacterial membranes"
- Isabela Dragomir - Premiul I în cadrul conferinței naționale *"Fizica și Tehnologiile Educaționale Moderne" - FTEM 2016*, 13-14 mai, 2016, Iași, Romania, pentru lucrarea "Microscopia de fluorescență la nivel de singură moleculă aplicată în studiul peptidelor membranar active"

Decembrie, 2016

Director de proiect,

Asist.univ.dr. Aurelia APETREI

