

UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" DIN IAȘI
ȘCOALA DOCTORALĂ A FACULTĂȚII DE FIZICĂ

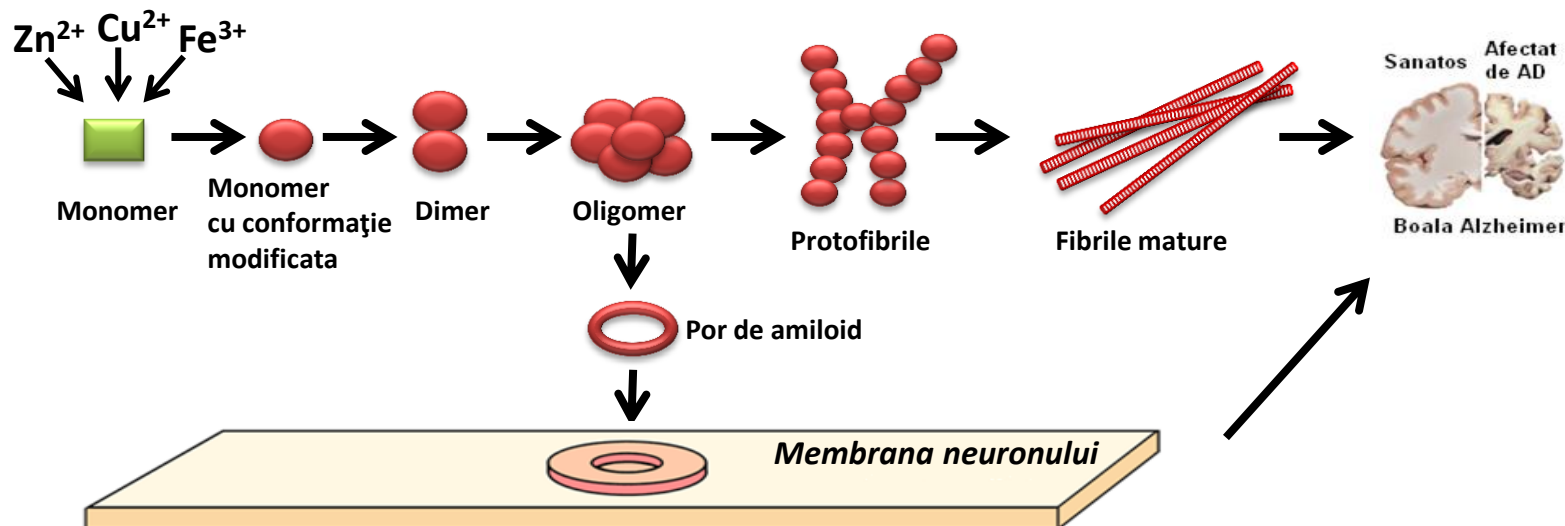
DESCRIEREA FIZICO – CHIMICĂ A INTERACȚIUNILOR UNOR PEPTIDE ANTIMICROBIENE ȘI AMILOIDICE CU SISTEME LIPIDICE BIOMIMETICE

Coordonator,
Prof. Dr. Tudor Luchian

Drd. ACS Irina ȘCHIOPU

Motivația și scopul studiului

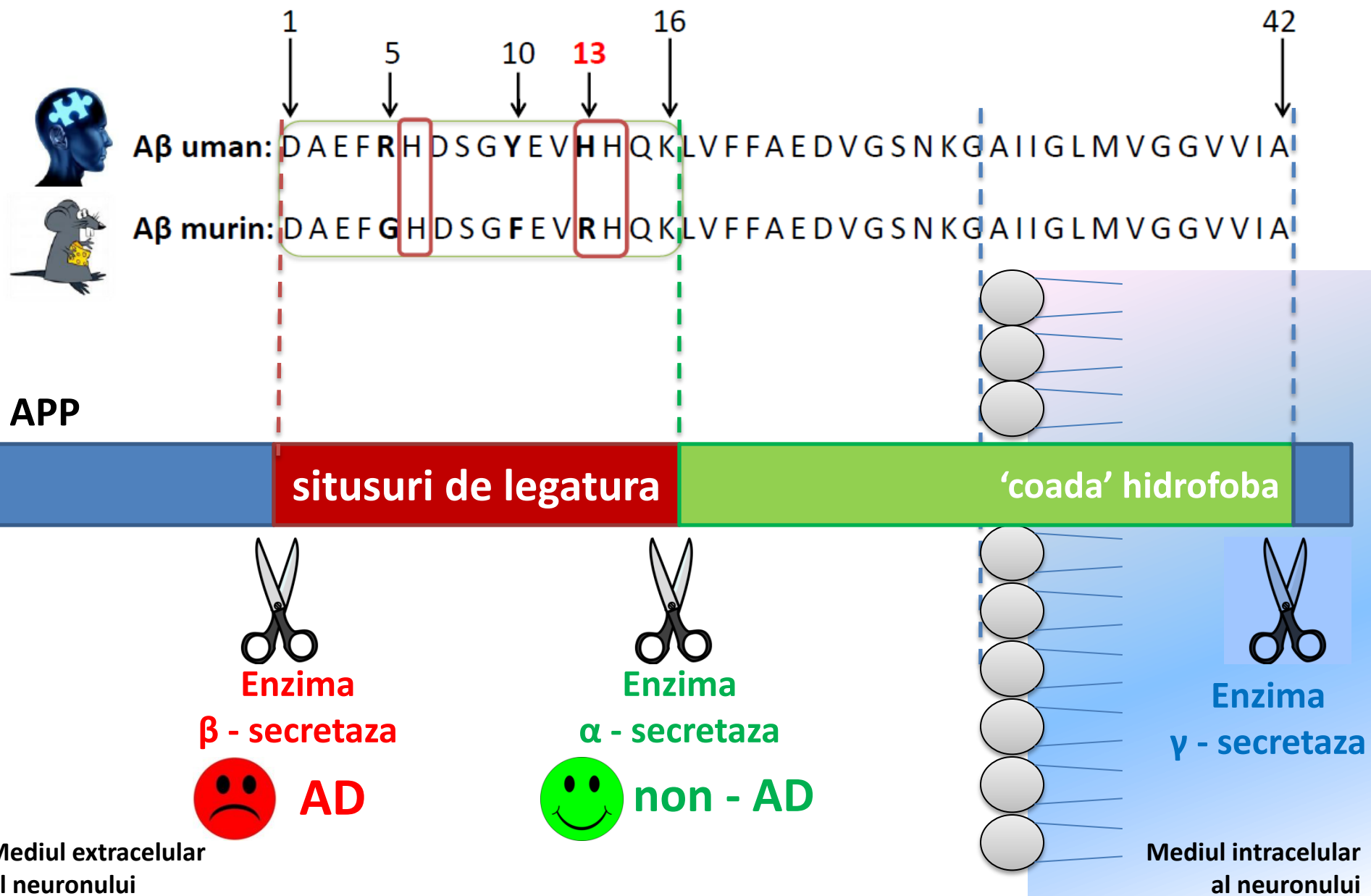
- Studiile anterioare susțin că etiologia bolii neurodegenerative **Alzheimer (AD)** ar putea fi explicată prin perturbarea homeostaziei **metalelor** (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+}) la nivelul rețelei neuronale ce favorizează, prin fixarea lor la nivelul unui situs specific din peptida **amyloid- β** , neurotoxicitatea și apariția bolii.



- **Motivația studiului:** șoarecii prezintă o predispoziție scăzută spre a dezvolta boala Alzheimer comparativ cu cea a oamenilor, cu toate că diferențele structurale și funcționale ale peptidele amiloidice regăsite în ambele cazuri sunt minore, dar probabil de o importanță majoră.
- Studiarea influenței ionilor de cupru (Cu^{2+}) asupra modului de împachetare a **peptidelor amiloid beta** de proveniență umană **Ab(1-16)_{uman}** și murină **Ab(1-16)_{murin}** prin tehnici de electrofiziologie la nivel de singură moleculă, utilizând porul proteic de α – hemolizină ca nanoreactor.

Caracteristici structurale ale peptidelor amiloidice de proveniență umană și murină.

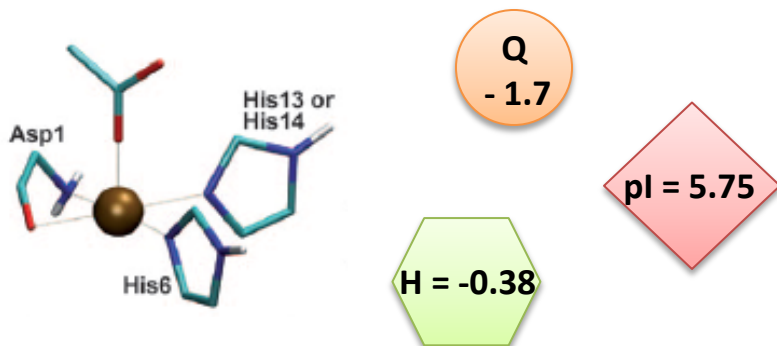
- Procesul de formare a peptidelor amiloidice beta la nivel neuronal -



Efectul cuprului asupra conformației peptidelor amiloid de proveniență umană și murină

uman $A\beta_{(1-16)}$ ($Q = -1.7$, $pI = 5.75$, $H = -0.38$)

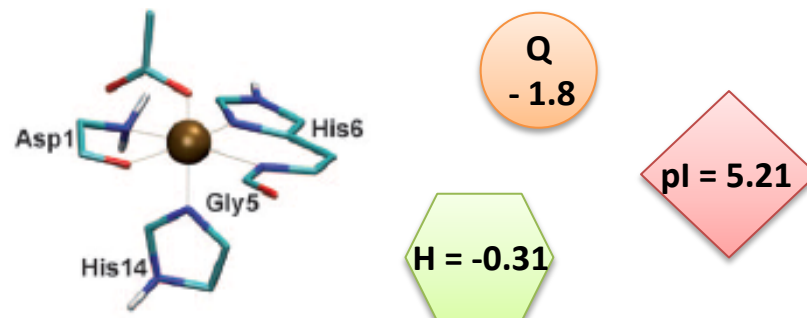
(N-T) D1A2EF RH6DS GYEV **H13**H14QK (C-T)



{(N-T)Asp1, COO-(Asp1/Ala2), N- (His6), N (His13/His14)}

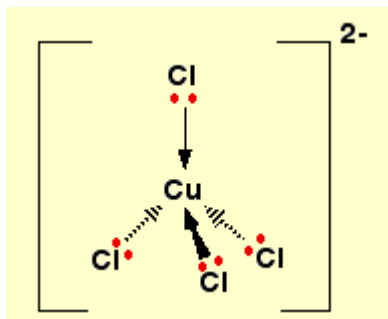
murin $A\beta_{(1-16)}$ ($Q = -1.8$, $pI = 5.21$, $H = -0.31$)

(N-T) D1A2EF GH6DS GFEV RH14QK (C-T)



{(N-T)Asp1, COO-(Asp1/Ala2), N- (His6), N-(His14/Gly5)}

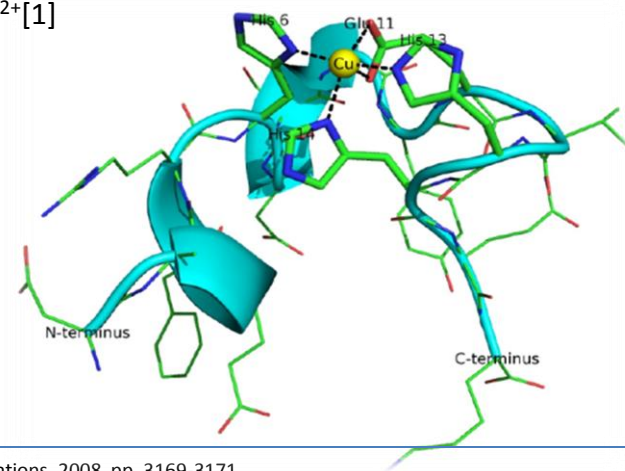
Model de complexare a unui ion de cupru Cu(II) (acceptor) cu patru molecule de clor (donor).



Număr de coordonare = 4

+ Amiloid β

Model molecular al segmentului de peptidă amiloid de proveniență umană, $A\beta(1-16)$, complexată cu un ion de cupru Cu^{2+} [1]

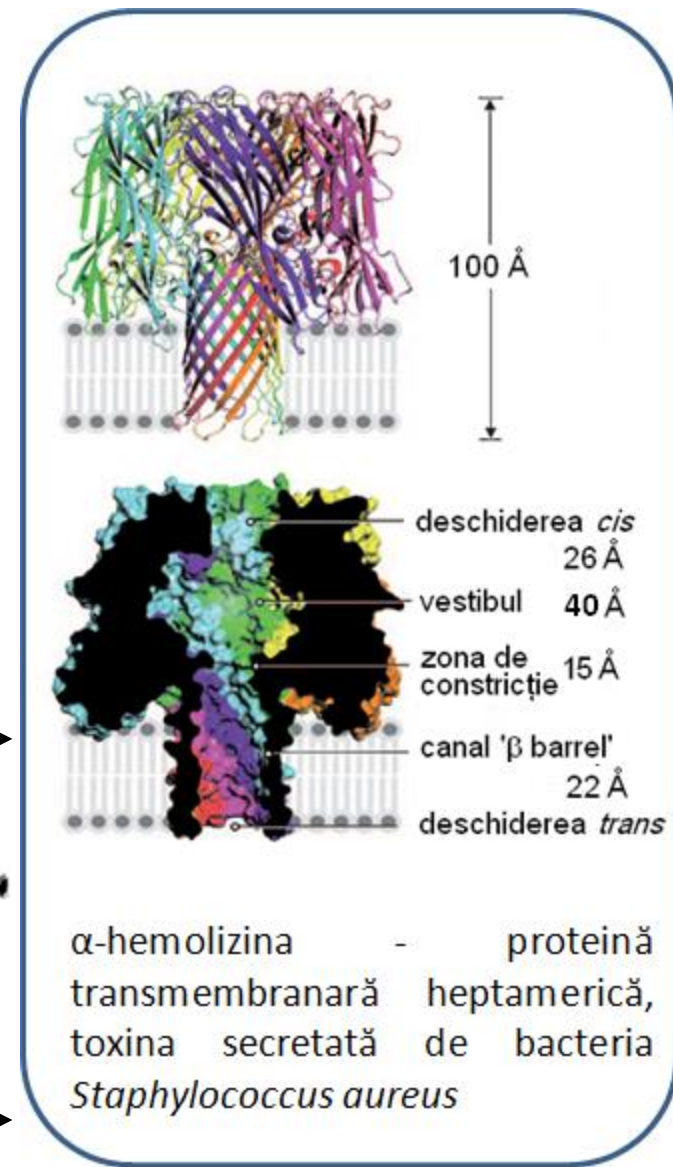
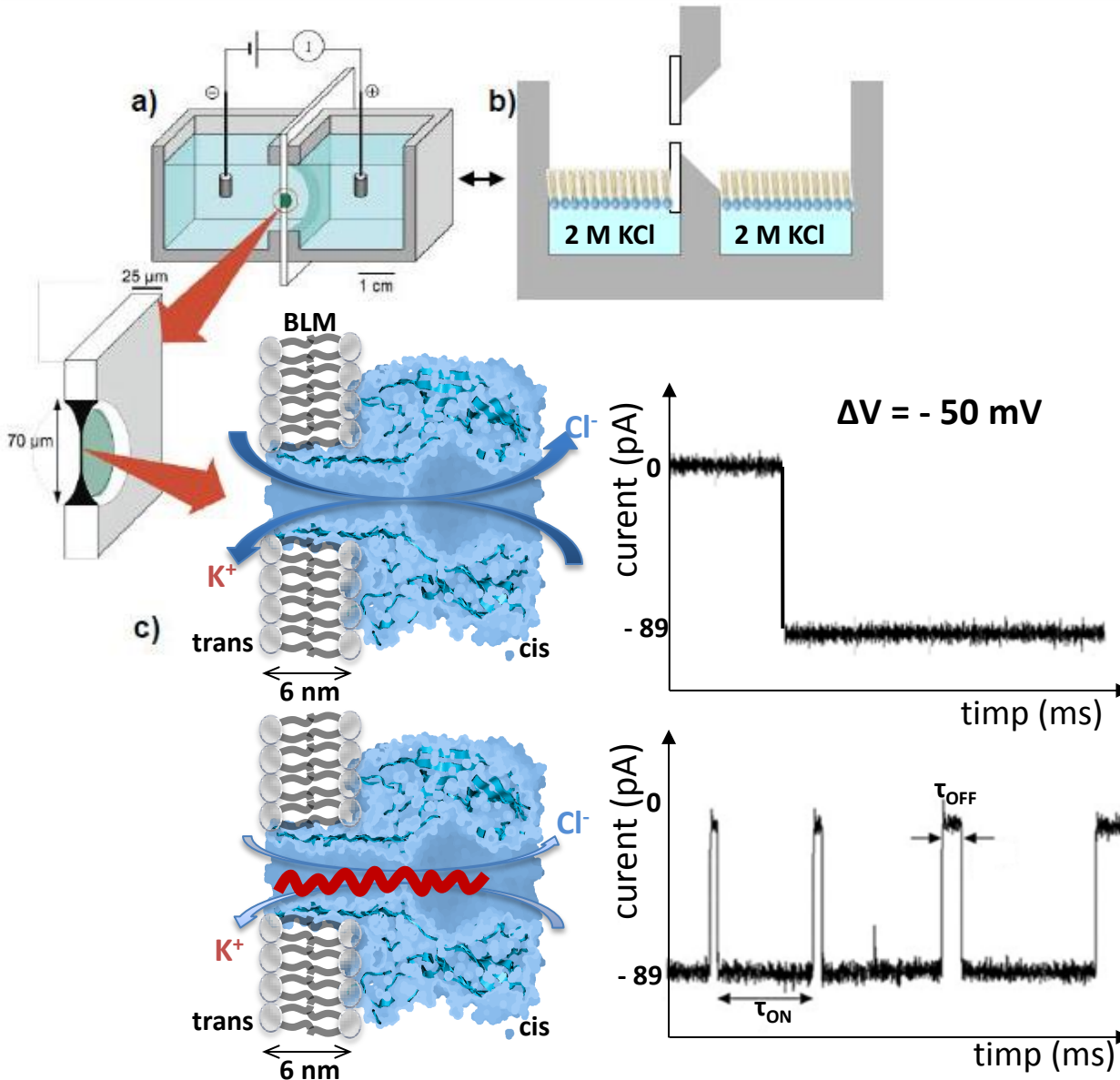


[1] Streltsov, V.A. & Varghese, J.N. (2008). *Substrate mediated reduction of copper-amyloid- β complex in Alzheimer's disease*, Chemical Communications, 2008, pp. 3169-3171.

[2] H. Eury, C. Bijani, P. Faller and C. Hureau, *Copper(II) Coordination to Amyloid β : Murine versus Human Peptide*, Angew. Chem. Int. Ed. 2011, 50, 901–905

Tehnica "Montal – Muller" de realizare a bistraturilor lipidice planare.

Înregistrări electrofiziologice la nivel de singură moleculă

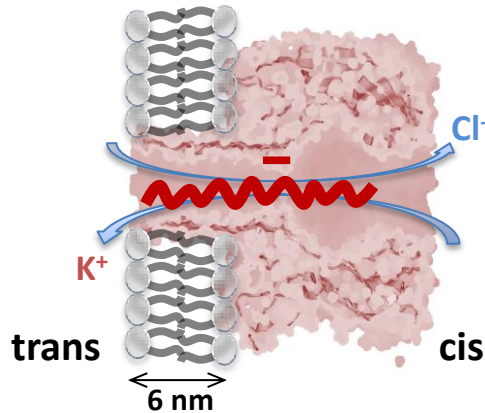


- Rezultate experimentale -

Studiul comparativ la nivel de singură – moleculă al peptidelor amiloid de proveniență umană (**uman $A\beta_{(1-16)}$**) și murină (**murin $A\beta_{(1-16)}$**)

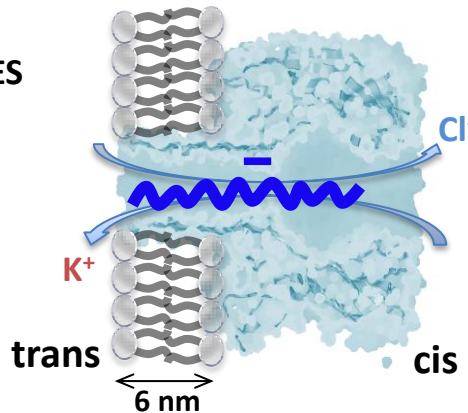
2 M KCl
10 mM HEPES
pH = 7.3

$50 \mu\text{M } A\beta_{(1-16)}^{\text{uman}}$



2 M KCl
10 mM sau 50 mM HEPES
pH = 7.3

$50 \mu\text{M } A\beta_{(1-16)}^{\text{murin}}$

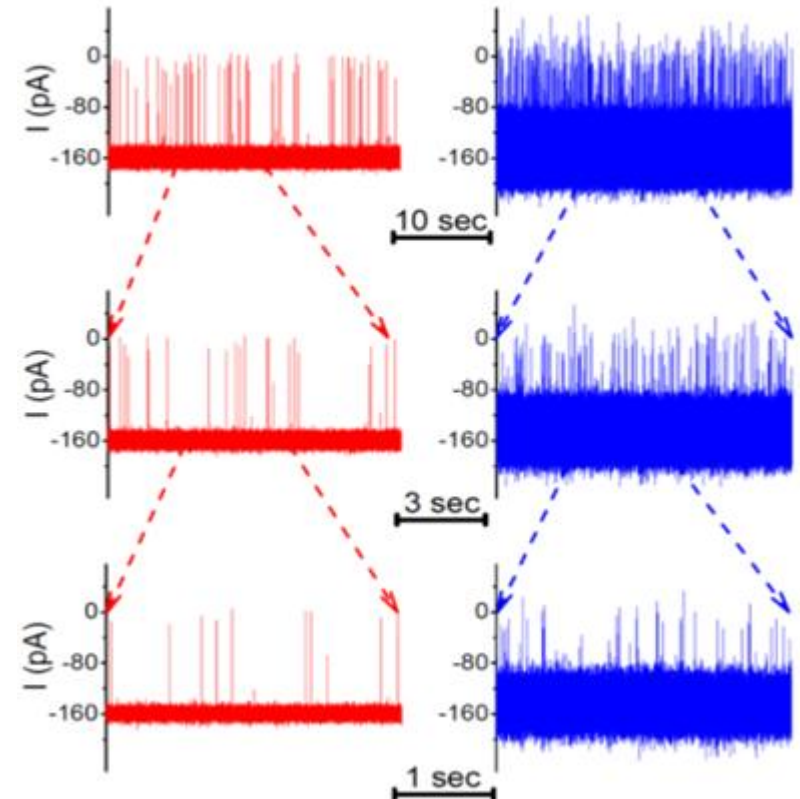


$\Delta V = -100 \text{ mV}$

$\nu_{\text{achiziție}} = 50 \text{ kHz}$

uman $A\beta_{(1-16)}$ [50 μM]

murin $A\beta_{(1-16)}$ [50 μM]



filtru 'trece-jos':

$\nu_{\text{filtrare}} = 10 \text{ kHz}$

filtru 'trece-jos':

$\nu_{\text{filtrare}} = 20 \text{ kHz}$

- Rezultate experimentale -

Studiul la nivel de singură – moleculă a influenței ionilor de cupru asupra conformației peptidei amiloid **uman $A\beta_{(1-16)}$**

uman $A\beta_{(1-16)}$ [50 μM]

+ 50 μM Cu^{2+}

+ 100 μM Cu^{2+}

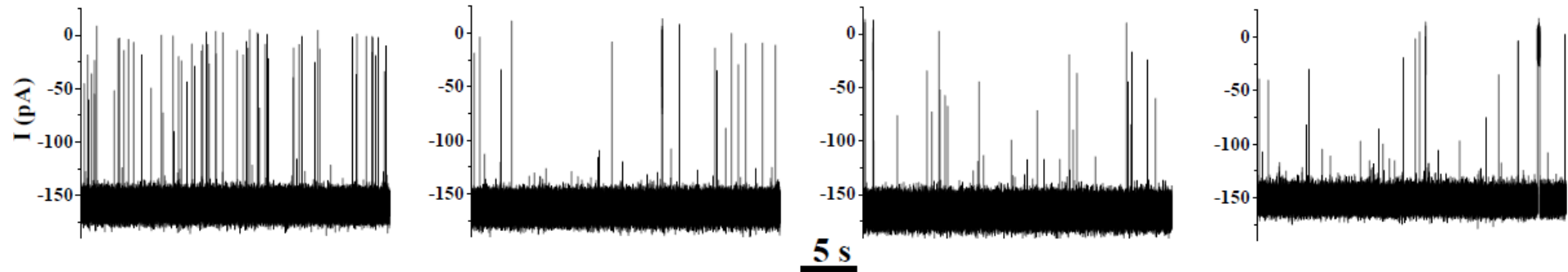
+ 200 μM Cu^{2+}

(a)

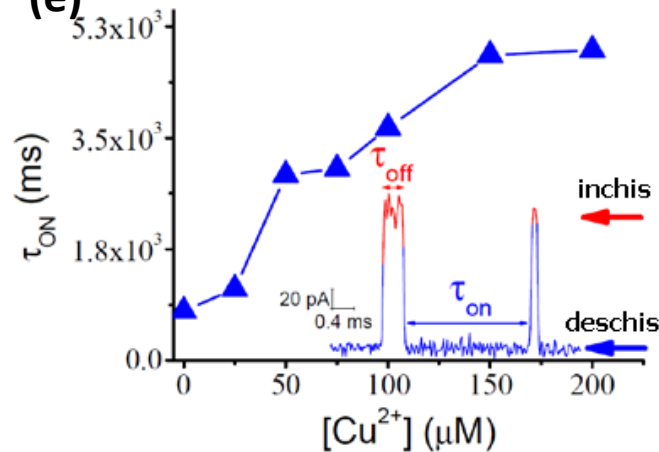
(b)

(c)

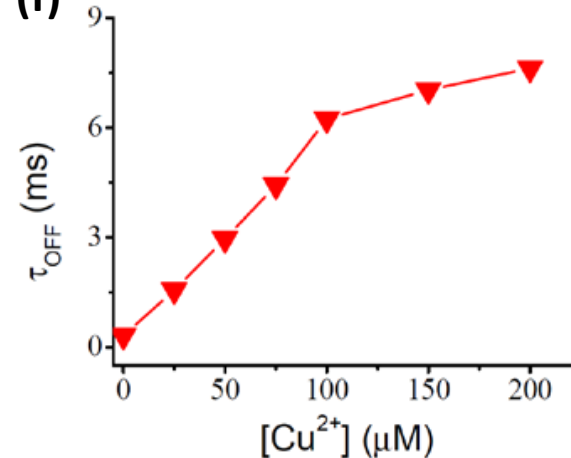
(d)



(e)



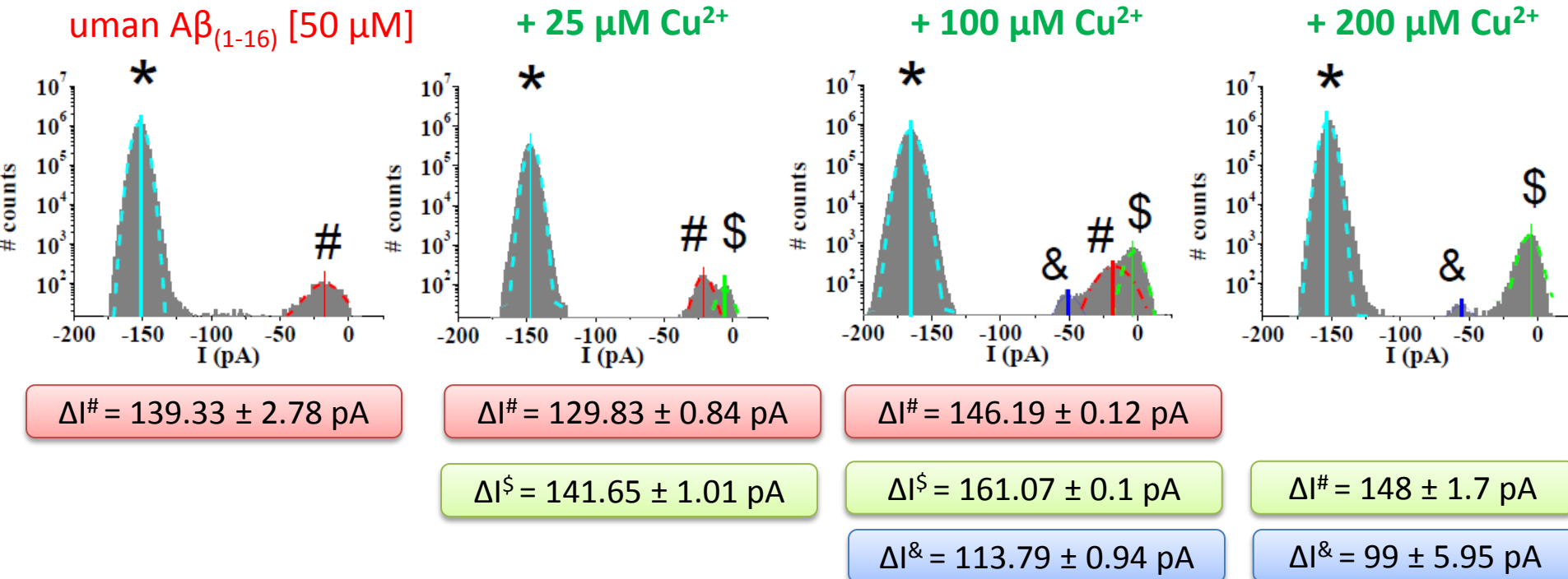
(f)



Adiția ionilor de cupru induce schimbări conformaționale ale peptidei amiloid uman $A\beta_{1-16}$ reflectate în cinetica de partiționare a peptidei în interiorul porului de α – hemolizină. Aceste schimbări sunt cu atât mai vizibile cu cât concentrația de cupru adăugată este mai mare, ajungându-se la un prag de saturație, la care se consideră că toată peptidea este complexată cu ioni de cupru.

- Rezultate experimentale -

Histogramele amplitudinilor curenților ionici pentru peptidele amiloid
în absența și în prezența ionilor de cupru



$$\Delta I^{\#} = I^* - I^{\#}$$

$$\Delta I^{\$} = I^* - I^{\$}$$

$$\Delta I^{\&} = I^* - I^{\&}$$

I^* - curenul ionic prin porul liber (albastru deschis)

$I^{\#}$ - curenul ionic prin porul blocat de peptida liberă (roșu)

$I^{\$}$ - curenul ionic prin porul blocat de peptida complexată
cu ioni de cupru (verde)

$I^{\&}$ - curenul ionic dat de interacțiuni ale peptidei
complexate cu 'gura' porului (albastru închis)

- Rezultate experimentale -

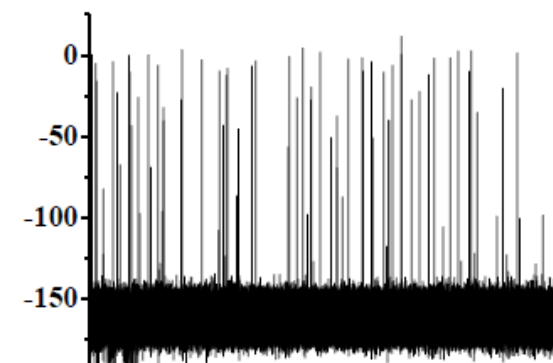
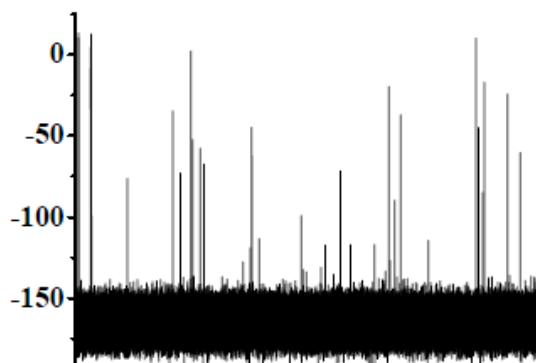
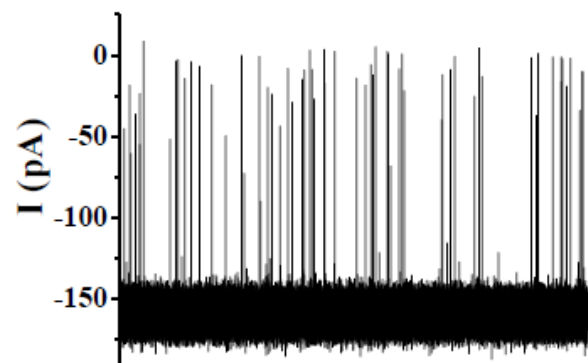
Studiul la nivel de singură – moleculă a influenței ionilor de cupru asupra conformației peptidei amiloid **uman $A\beta_{(1-16)}$**

Reversibilitatea procesului de complexare

a) **uman $A\beta_{(1-16)}$ [50 μM]**

b) **+ 100 μM Cu^{2+}**

c) **+ 200 μM EDTA**

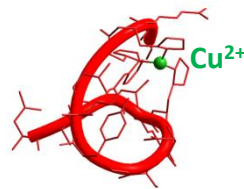


$\Delta V = -100 \text{ mV}$

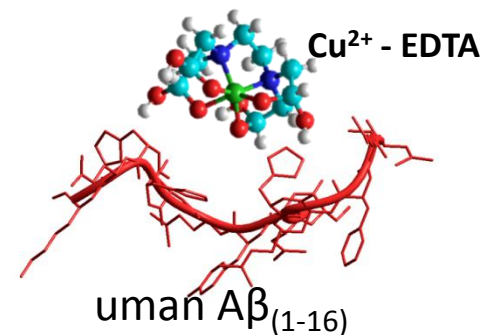
5 s



uman $A\beta_{(1-16)}$



Cu^{2+} - uman $A\beta_{(1-16)}$

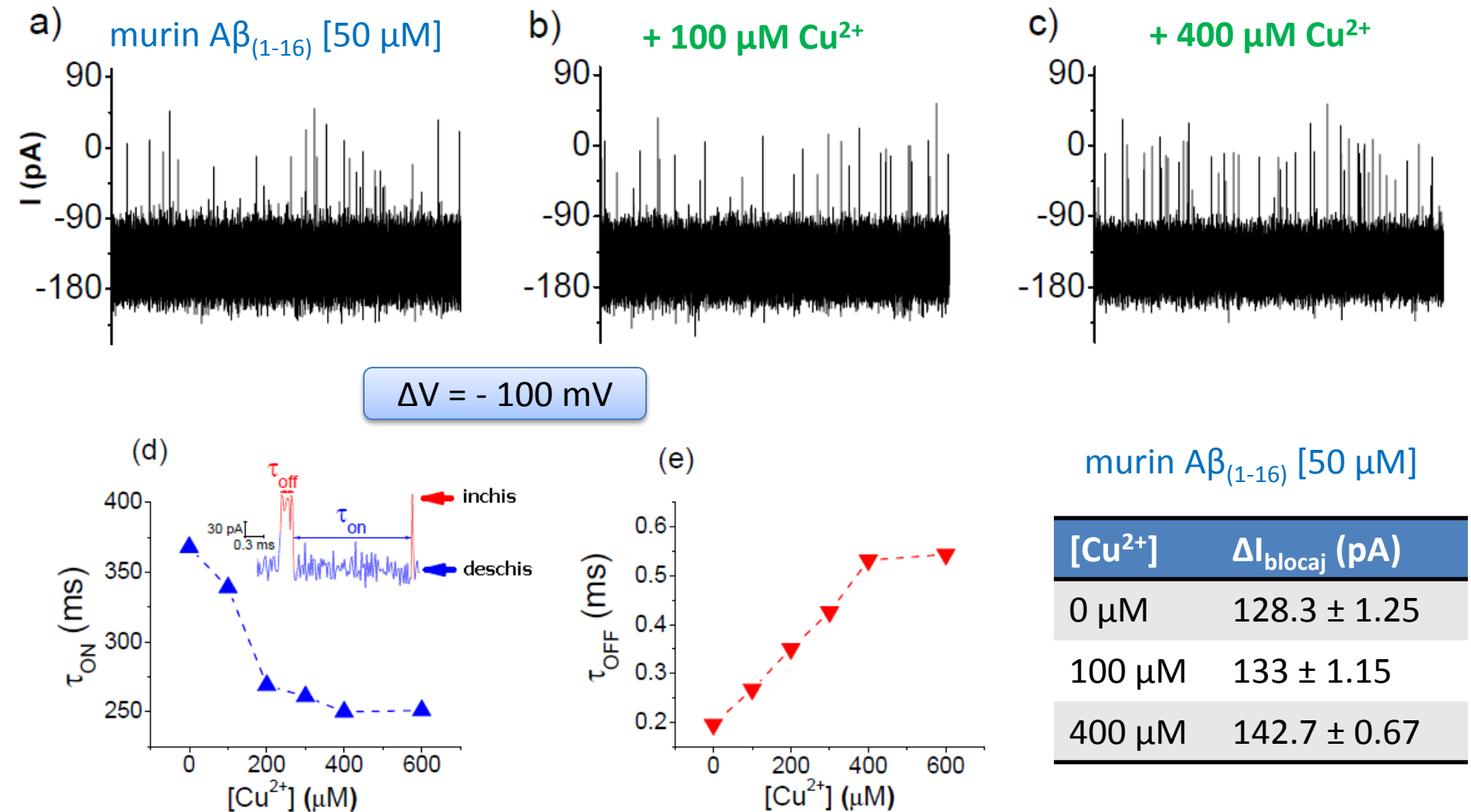


uman $A\beta_{(1-16)}$

Reversibilitatea procesului de complexare a peptidei amiloid cu ioni de cupru poate fi demonstrat prin adăugarea unui agent de chelare (e.i. EDTA) la o concentrație dublă (200 μM) față de cea a ionilor de cupru adăugați (100 μM). Restabilirea fluctuațiilor de curent ionic la frecvența inițială indică revenirea peptidei amiloid de origine umană la conformația corespunzătoare situației în care peptida era liberă în soluție.

- Rezultate experimentale -

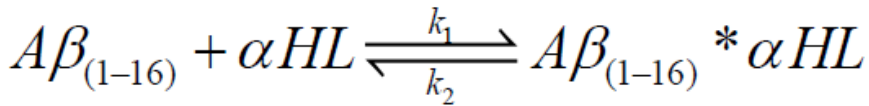
Studiul la nivel de singură – moleculă a influenței ionilor de cupru asupra conformației peptidei amiloid **murin A $\beta_{(1-16)}$**



Contrar cazului peptidei amiloid umane A $\beta_{(1-16)}$, se observă o scădere a timpului mediu dintre evenimentele de blocare a porului de α – hemolizină de către peptidă, o dată cu creșterea concentrației ionilor de cupru din soluție. Pentru a obține un efect vizibil al ionilor de cupru asupra peptidei amiloid murin A $\beta_{(1-16)}$, a fost necesare concentrații de până la 3 ori mai mari de cât în cazul peptidei amiloid umane A $\beta_{(1-16)}$.

- Rezultate experimentale -

Descrierea cantitativă a interacțiunii peptidelor amiloid **uman $A\beta_{(1-16)}$** și **murin $A\beta_{(1-16)}$** cu porul de α - Hemolizina



$$rata_{ON} = k_1^{ON} [A\beta_{(1-16)}]$$

$$rata_{OFF} = k_2^{OFF}$$

uman $A\beta_{(1-16)}$

$$k_1 = 32 \times 10^3 M^{-1} s^{-1}$$

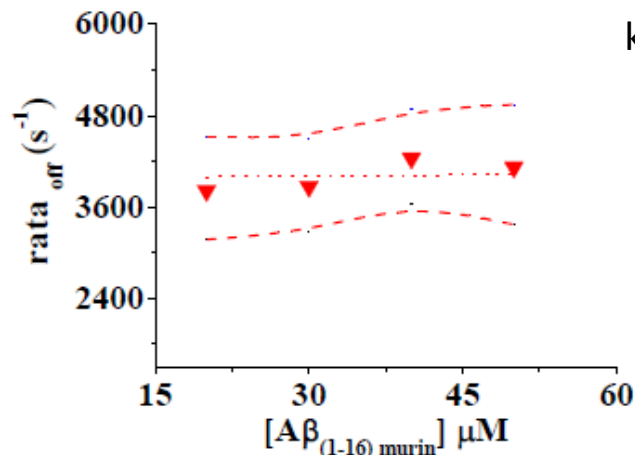
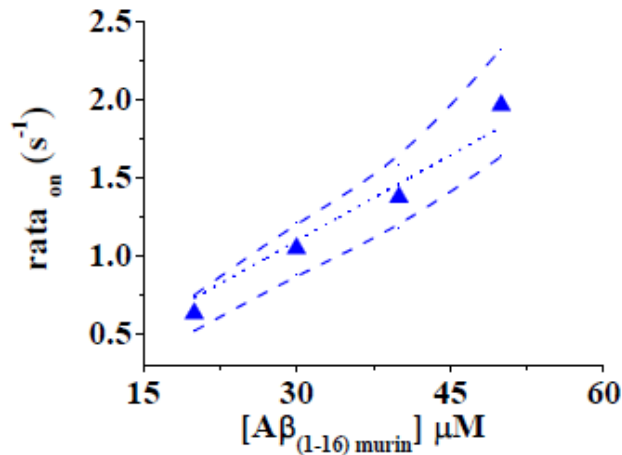
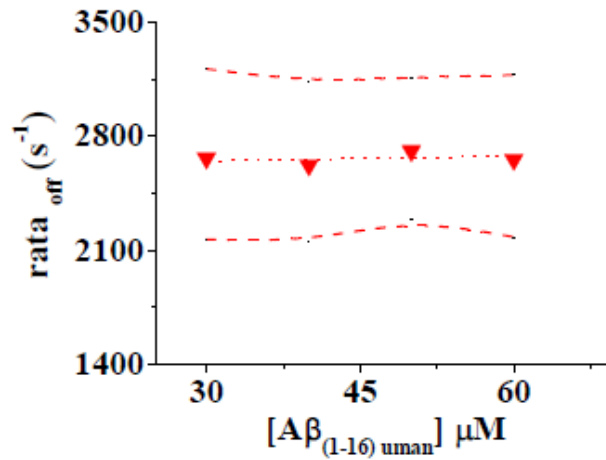
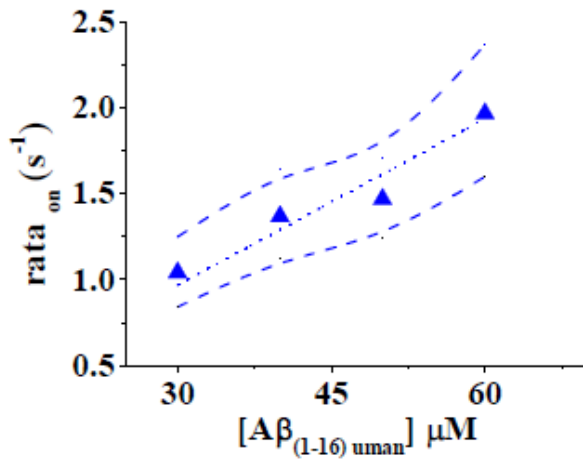
$$k_2 = 2.6 \times 10^3 s^{-1}$$

k_1 - constanta de asociere a reactiei
 k_2 - constanta de disociere a reactiei

murin $A\beta_{(1-16)}$

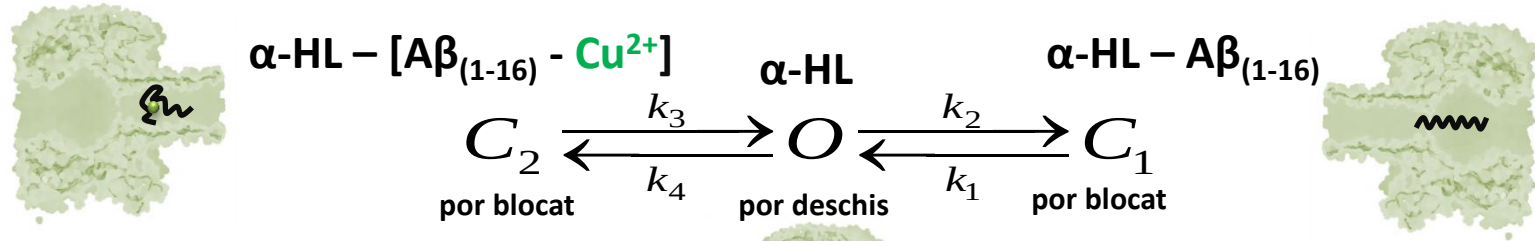
$$k_1 = 36.6 \times 10^3 M^{-1} s^{-1}$$

$$k_2 = 3.9 \times 10^3 s^{-1}$$



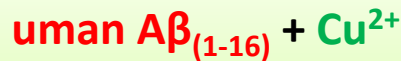
- Rezultate experimentale -

Model matematic utilizat pentru descrierea cantitativă a cineticii interacțiunii cu porul de α - Hemolizină a peptidelor amiloid complexate de ioni de cupru



$$k_3 = 1.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_4 = 58.4 \text{ s}^{-1}$$



$$K_D = 8.5 \times 10^{-6} \text{ M}$$



$$k_1 = 32 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_2 = 2.6 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$$

k_3 - constanta de asociere

k_4 - constanta de disociere

k_1 - constanta de asociere

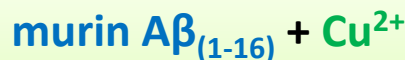
k_2 - constanta de disociere

K_D - constanta de disociere
peptida - ioni de cupru



$$k_3 = 82.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_4 = 2223.9 \text{ s}^{-1}$$



$$K_D = 0.54 \times 10^{-6} \text{ M}$$

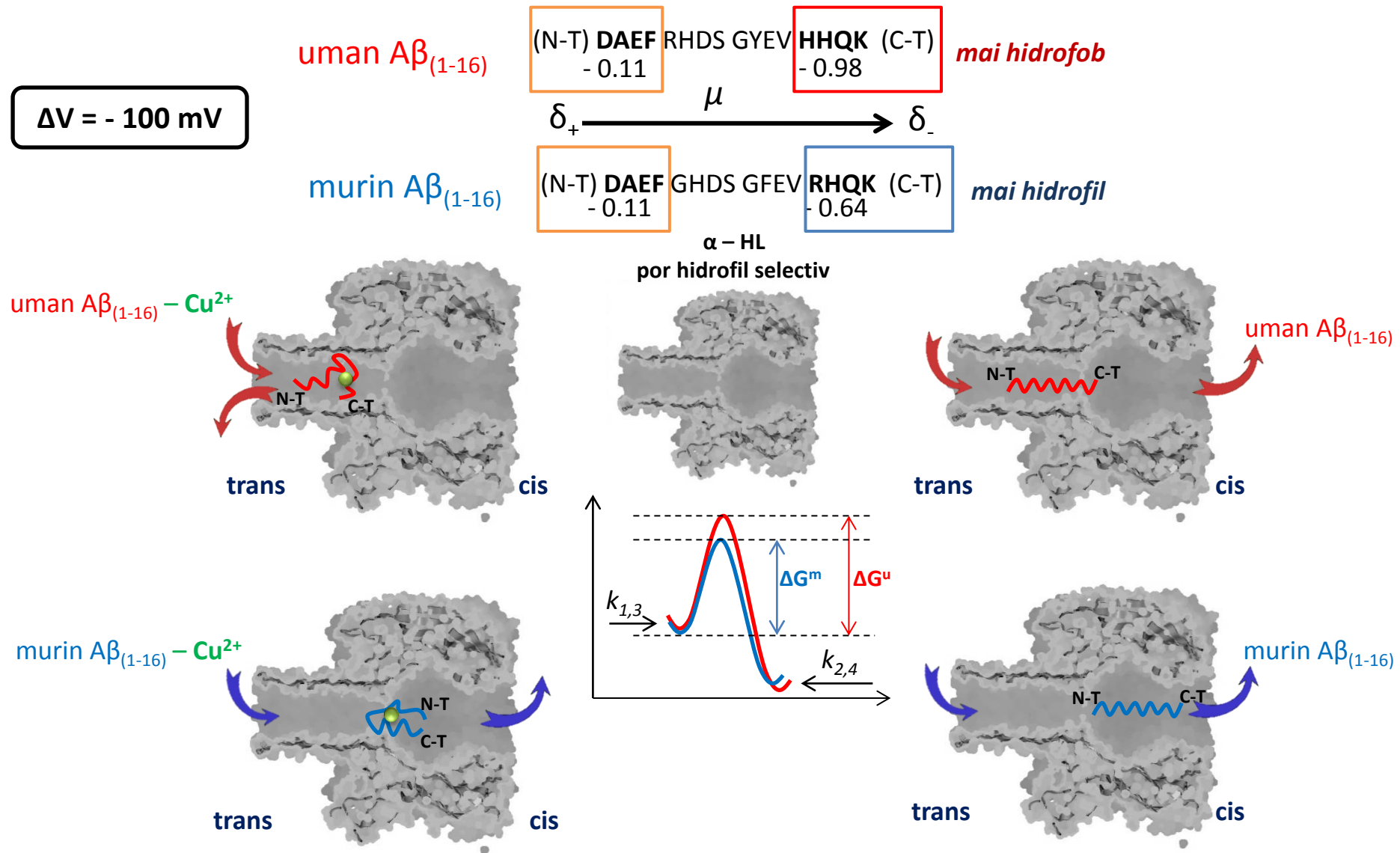


$$k_1 = 36.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_2 = 3.9 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$$

- Rezultate experimentale -

Procesul favorabil de interacțiune cu porul de α - Hemolizină a peptidei murin $A\beta_{(1-16)}$ comparativ cu cel al peptidei uman $A\beta_{(1-16)}$



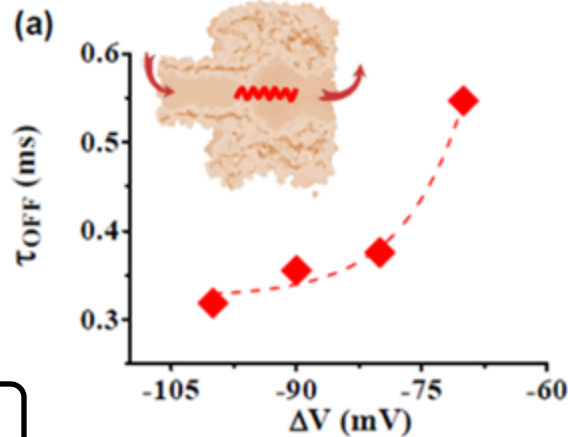
- Rezultate experimentale -

Dependența de diferența de potențial aplicată a timpilor de rezidență a peptidelor amiloid în porul de α -Hemolizină în absența și prezența ionilor de cupru la concentrație maximă

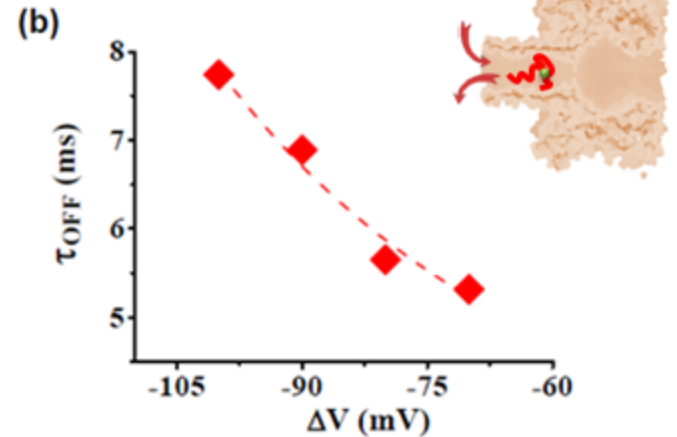
$$Q_{\text{uman A}\beta} = -1.7$$

$$\Delta V = -100 \text{ mV}$$

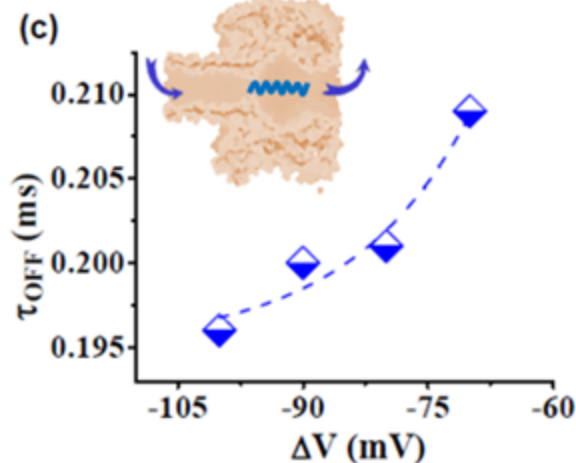
50 μM UMAN $\text{A}\beta_{(1-16)}$



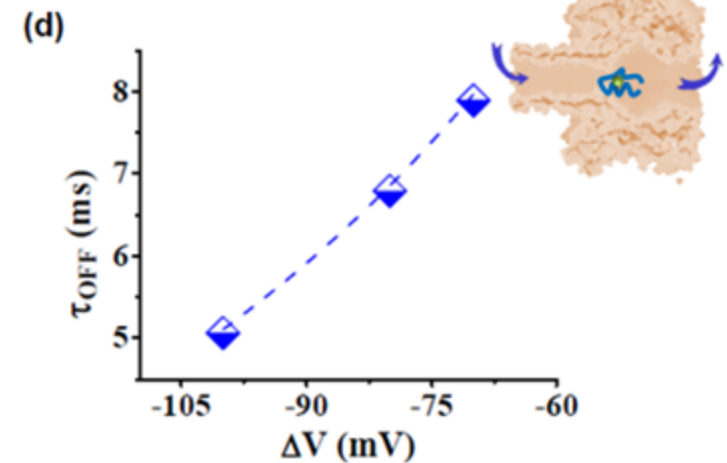
50 μM UMAN $\text{A}\beta_{(1-16)}$ + 200 μM Cu^{2+}



50 μM MURIN $\text{A}\beta_{(1-16)}$



50 μM MURIN $\text{A}\beta_{(1-16)}$ + 600 μM Cu^{2+}



$$Q_{\text{murin A}\beta} = -1.8$$

Concluziile studiului



uman $A\beta_{(1-16)}$ și cupru:

- ionii de cupru induc schimbări conformaționale asupra peptidei, vizibile și cuantificabile cu ajutorul porului proteic de α - **hemolizină**. Procesul de complexare a peptidei cu ionii de cupru este unul **reversibil**.

murin $A\beta_{(1-16)}$ și cupru:

- adiția ionilor de cupru duce la creșterea afinității peptidei pentru porul α - hemolizină, ceea ce se datorează schimbării conformației peptide într-o astfel de manieră încât costul energetic necesar inserției peptidei în lumenul porului este diminuat, **favorizând astfel interacțiunea între porul de α -HL și murin $A\beta_{(1-16)}$ - Cu^{2+} .**



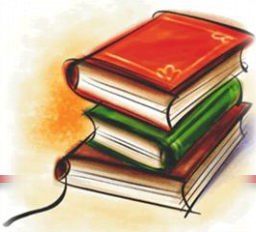
uman $A\beta_{(1-16)}$ vs. murin $A\beta_{(1-16)}$



- afinitatea peptidei **murin $A\beta_{(1-16)}$** pentru porul de α -hemolizină este mult mai mare decât al peptidei **uman – $A\beta_{(1-16)}$** deoarece aceasta din urmă este energetic defavorizată în interacțiunea ei cu porul tocmai din cauza diferențelor existente în structura primară a acesteia (prezența **His13**).



Tehnica utilizării **porului proteic de α - hemolizină ca nanoreactor** pentru studierea la nivel de singură - moleculă a peptidelor amiloid reprezintă un 'instrument' nou și ușor de utilizat ce permite investigarea sau chiar identificarea și a altor compuși moleculari.



Bibliografie

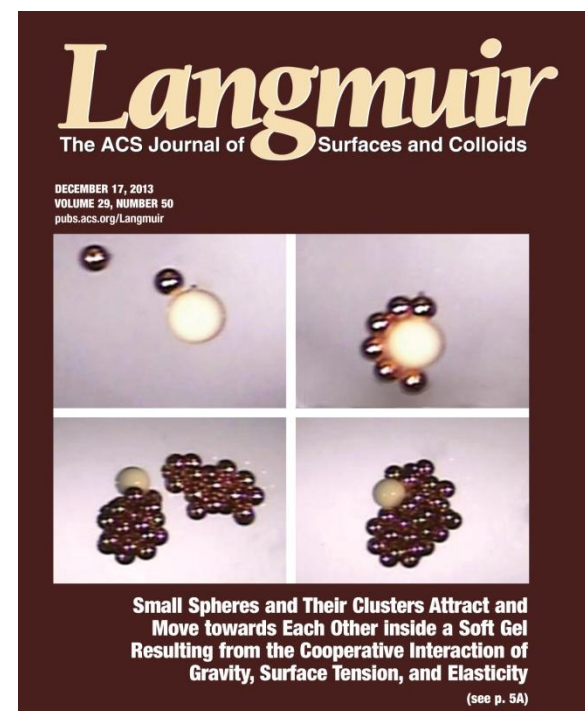
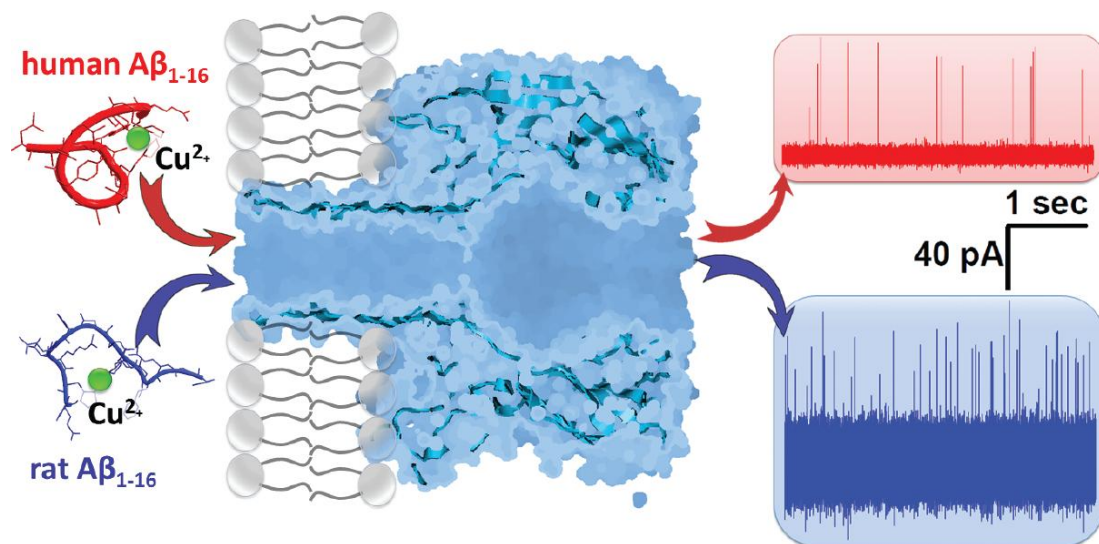
1. S.-H. Shin et al, Kinetics of a reversible covalent-bond forming reaction observed at the single molecule level., 2002, Angew. Chem. Int. Edit. 41, 3707-3709
2. A. Meller et al., Rapid nanopore discrimination between single polynucleotide molecules., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 1079-1084
3. C. James et al., Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing., 2009, Nature Nanotechnology 4, 265-270
4. Lovell, M.A., Robertson, J.D., Teesdale, W.J., Campbell, J.L., Markesbery, W.R. (1998). Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques, *Journal of the Neurological Sciences*, 158, pp. 47–52.
5. Streltsov, V.A., Titmuss, S.J., Epa, V.C., Barnham, K.J., Masters, C.L. & Varghese, J.N. (2008). The Structure of the Amyloid- β Peptide High-Affinity Copper II Binding Site in Alzheimer's Disease, *Biophysical Journal*, 95, pp. 3447-3456.

Activitate științifică

Articole publicate în reviste indexate ISI:

Alina Asandei, **Irina Schiopu**, Sorana Iftemi, Loredana Mereuta, and Tudor Luchian

*Investigation of Cu^{2+} binding to human and rat amyloid fragments Ab (1-16) with a protein nanopore, **Langmuir** 29(50), 2013.*



ACS Publications
MOST TRUSTED. MOST CITED. MOST READ.

www.acs.org

FI: 4.187
AIS: 1.1824



Vă
mulțumesc
pentru
atenție!

Acknowledgements:

Sprijinul financiar a fost acordat de Departamentul de Cercetare Interdisciplinar - Domeniul Științe și de Laboratorului de Biofizică și Fizică Medicală, prin contractele de cercetare: PN-II-ID-PCCE-2011-2-0027, PN-II-PT-PCCA-2011-3.1-0595.