

RAPORT ȘTIINȚIFIC ȘI TEHNIC

privind implementarea proiectului de cercetare cu titlul: **„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, pentru etapa 3 a proiectului.

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

03. 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 (Aβ 42, Aβ 40). Caile membranar-dependente de manifestare și activitate a peptidelor Aβ.

04. Diseminarea rezultatelor științifice.

A2.2 Reproducerea activității membranare a peptidelor Aβ cu împachetare greșită, 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 Aβ să perturbe membranele lipidice (e.g., canale ionice, distrugerea membranei), în funcție de proprietățile fizico-chimice ale membranelor reconstituite și interacțiunea acestora cu ionii metalelor, în condiții de pH neutru și acid.

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

În contextul existenței unei cauzalități între etiologia bolii neurodegenerative Alzheimer și homeostazia metalelor de tranziție, elucidarea modului în care peptidele amiloid, specifice acestei boli, interacționează cu ionii acestor metale este esențial pentru înțelegerea apariției neurotoxicității oligomerilor de peptidă amiloid.

Studiile arată că în acest caz detaliile structurale ale peptidelor amiloid joacă un rol important în mecanismul molecular prin care în urma interacțiunilor peptidelor cu metalele, acestea își pot schimba structura secundară astfel încât să faciliteze oligomerizarea acestora, și formarea ulterioară de fibrile toxice (Maynard et al., 2005) Cuprul este unul din mineralele esențiale pentru buna funcționare a organismului uman, este absorbit în

intestinul subțire și transportat către ficat, fiind cuplat cu moleculele de albumină. Variațiile extreme a concentrației de ioni de cupru din organism pot induce diferite afecțiuni, cum ar fi sindromul Wilson, când există o supra acumulare de cupru; Menkes, când există o deficiență de cupru sau Alzheimer când există un dezechilibru a acestora la nivelul sinapselor. Concentrația normală de cupru la nivelul creierului, găsită în fanta sinaptică, este de aproximativ 15 μM , și poate ajunge la valori chiar și de cinci ori mai mari în cazul creierului afectat de boala Alzheimer. Majoritatea studiilor indică o stoichiometrie de 1:1 între Cu(II) și peptidele amiloid ($\text{A}\beta$), dar există o dezbatere asupra situsurilor de legătură ale metalului, fiind propuse mai mult configurații, din care două modele sunt susținute de literatura de specialitate. Ambele modele propun ca participanți principali la legătura metal-peptidă, aminoacizii histidină (His6, His13/His14) și ca posibili participanți secundari: oxigenul acidului glutamic (Glu11), aminoacizii alanină (Ala2) sau aspartat (Asp1), și chiar tirozina (Tyr10) (*Yako et al., 2017*).

În studiile efectuate în cadrul acestui proiect am încercat să elucidăm influența variației concentrației ionilor de cupru asupra conformației adoptate de peptidele amiloid truncate (1-16) când aminoacidul aspartat din poziția 1 (L-Asp1) este înlocuit cu enantiomerul acestuia (D-Asp1). Caracteristicile peptidelor utilizate, denumite $\text{A}\beta_1$ și $\text{A}\beta_2^{\text{D1dD}}$, în care $\text{A}\beta_2^{\text{D1dD}}$ este mutantul investigat, sunt asemănătoare: lungimea peptidelor este de 16 aminoacizi care conțin și principalele situsuri de legătura (His6, His13 și His14), sarcina electrică netă a acestora este de $-1.7 |e^-|$ la pH neutru, hidrofobicitatea are valoare de -0.38 pentru ambele molecule, iar punctul izoelectric al acestora este 8.7.

Experimentele au vizat investigarea la nivel de singură moleculă a interacțiunii celor două peptide (control și mutant) cu ionii de cupru (Cu^{2+}). Într-o primă etapă, în sistemul lipoproteic a fost adăugat o concentrație de 50 μM de peptidă și s-a monitorizat frecvența interacțiunilor cu sistemul, timpul de rezidență a peptidelor în sistemul lipoproteic, precum și modul în care este sistemul perturbat de către prezența acestora. Ulterior, a fost adăugat dintr-o soluție de CuCl_2 (20 mM) diferite concentrații de ioni de cupru (25 – 200 μM). Monitorizarea și înregistrarea fluctuațiilor de curent ionic a fost efectuată la o valoare a diferenței de potențial de -100 mV și o frecvență de achiziție de 50 kHz.

Înregistrările fluctuațiilor de curent ionic pentru ambele peptide amiloid sunt reprezentate în figura 1, unde se poate observa că o dată cu adăugarea incrementală a ionilor

de cupru în sistem, frecvența fluctuațiilor de curent scade, indicând cuplarea peptidelor amiloid cu ionii de cupru și schimbarea conformațiilor acestora în urma interacțiunii.

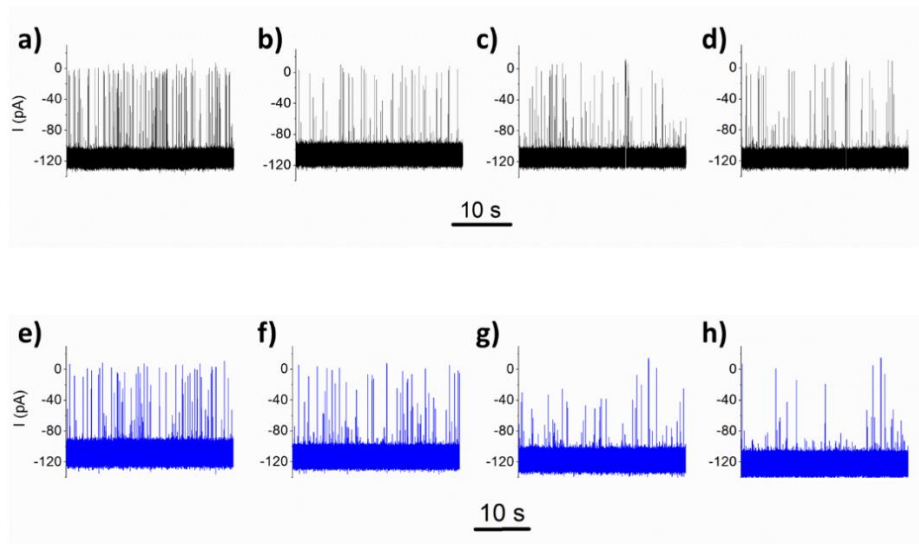


Fig. 1 Înregistrări ale fluctuațiilor de curent ionic mediate de către porul de α -hemolizină (α -HL) la un potențial transmembranar negativ de -100 mV pentru peptidele amiloid- β truncate $A\beta_1$ (negru, panel a-d) și $A\beta_2^{D1dD}$ (albastru, panel e-h), pentru diferite concentrații de ioni de cupru (Cu^{2+}): 0 μ M (panel a și e), 25 μ M (panel b și f), 100 μ M (panel c și g) și 200 μ M (panel d și h). Înregistrările au fost efectuate la o tărie ionică de 2 M KCl, 10 mM HEPES, la pH neutru.

Analiza statistică a timpilor dintre două interacțiuni (τ_{ON} , Fig.2, panel a) și a timpilor de rezidență a peptidelor în sistemul lipoproteic (τ_{OFF} , Fig.2, panel b) arată că: (i) există o diferență semnificativă a creșterii timpilor dintre interacțiuni înainte și după adăugarea ionilor de cupru pentru ambele peptide, creșterea fiind chiar și de trei ori mai mare în cazul peptidei amiloid mutant ($A\beta_2^{D1dD}$) față de control ($A\beta_1$); (ii) deasemenea, se observă o creșterea a valorilor timpilor de rezidență a peptidelor amiloid în sistemul lipoproteic înainte și după adăugarea ionilor de cupru, diferența de timpi dintre cele două peptide amiloid (control și mutant) devenind semnificativă doar la concentrații ce depășesc 100 μ M cupru. Timpii de rezidență a peptidelor în interiorul sistemului lipoproteic reprezintă o măsură indirectă a rezistenței pe care o poate întâmpina o moleculă de-a lungul sistemului, cu cât o moleculă este mai mare, are o configurație mai dezordonată, cu atât timpul necesar parcurgerii sistemului va fi mai mare. Astfel că, timpii de rezidență indică faptul că, în urma interacțiunii peptidelor cu ionii de cupru, acestea își schimbă conformația dintr-una

aproximativ liniară într-una dezordonată și mult mai rigidă, acest efect fiind mai preponderent în cazul peptidei amiloid control ($A\beta_1$).

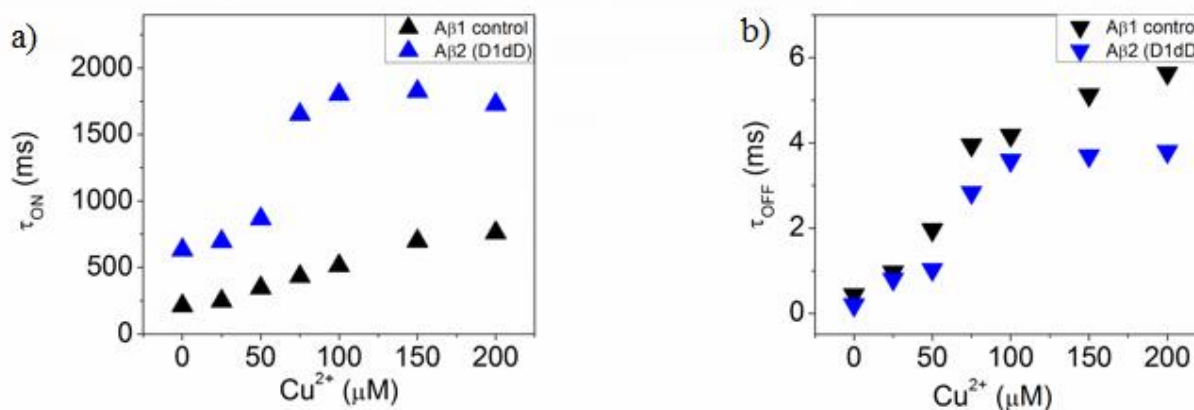


Fig. 2 Variația timpilor τ_{ON} (panel a) și τ_{OFF} (panel b) cu concentrația de ioni de cupru (Cu^{2+}). Timpii τ_{ON} , dintre două evenimente de interacțiune consecutive sunt reprezentați cu triunghiuri cu vârful în sus, iar timpii τ_{OFF} , de rezidență a peptidelor amiloid în sistemul lipoproteic cu triunghiuri cu vârful în jos, negre pentru peptida amiloid control ($A\beta_1$) și albastre pentru peptida amiloid mutant ($A\beta_2^{D1dD}$).

Blocajul în curent ionic dat de interacțiunea peptidă-sistem lipoproteic este direct proporțională cu volumul ocupat de peptidă în sistem. Astfel că, putem utiliza formula:

$$\Delta I = \frac{\sigma \cdot \Delta V \cdot \delta w}{2 \cdot (l_p + 0.8 \cdot d_p)^2}$$

pentru a determina volumele (δw) peptidelor amiloidice control ($A\beta_1$) și mutant ($A\beta_2^{D1dD}$). Formula conține o serie de parametri specifici sistemului lipoproteic: conductivitatea (σ), a cărei valori a fost determinată dintr-un set separat de experimente în care s-a înregistrat curentul ionic prin sistem a unei concentrații de 2 M clorură de potasiu (KCl) la mai multe diferențe de potențial aplicate; d_p și l_p reprezintă diametrul și, respectiv, lungimea sistemului lipoproteic, iar ΔV reprezintă diferența de potențial la care s-au efectuat măsurătorile.

Parametri sistemului fiind: σ (2M, KCl) = 169 mS/cm, d_p = 1.5 nm, l_p = 5.2 nm, ΔV = - 70 mV.

În urma analizei statistice efectuate asupra fluctuațiilor de curent ionic date de peptidele amiloidice, în absența și în prezența ionilor de cupru, au fost determinate valorile medii ale blocajului în curent ionic (ΔI) și valorile volumelor ocupate de către acestea în sistemul lipolipidic (Tabel 1 și 2). Pentru determinarea valorilor medii ΔI s-au luat în

considerare următorii parametri: I_{open} , curentul ionic în lipsa oricărei perturbații, și I_{block} , curentul ionic înregistrat după ce a fost adăugată peptida $A\beta_1$ (tabel 1) și, respectiv, $A\beta_2^{D1dD}$ (tabel 2), precum și după adăugarea unei concentrații de 200 μM de Cu^{2+} .

Tabel 1. Valorile parametrilor sistemului determinate înainte și după adăugarea ionilor de cupru (Cu^{2+}) în cazul peptidei control ($A\beta_1$).

$A\beta_1^{\text{control}}$	I_{open} (pA)	I_{block} (pA)	ΔI (pA)	Δw (nm^3)
+ 0 μM Cu^{2+}	- 116.54	- 15.86	100.68	0.697
+ 200 μM Cu^{2+}	- 116.25	- 8.69	107.56	0.744

Se observă că valoarea obținută pentru volumul ocupat de peptida amiloid control, în care aminoacidul aspartat (Asp1) se află în forma L-, în prezența unei concentrații de 200 μM de ioni de cupru, este mai mare decât valoarea volumului când peptida este liberă în soluție și aceasta nu interacționează cu ioni de cupru.

Tabel 2. Valorile parametrilor sistemului determinate înainte și după adăugarea ionilor de cupru (Cu^{2+}) în cazul peptidei mutant ($A\beta_2^{D1dD}$).

$A\beta_2^{D1dD}$	I_{open} (pA)	I_{block} (pA)	ΔI (pA)	Δw (nm^3)
+ 0 μM Cu^{2+}	- 112.11	- 13.01	99.10	0.686
+ 200 μM Cu^{2+}	- 106.03	- 15.02	91.01	0.629

În cazul peptidei mutant, în care aminoacidul aspartat a fost înlocuit cu enantiomerul acestuia (D-Asp1), adăugarea ionilor de cupru în sistem induce o scădere a valorii volumului ocupat de peptida amiloid truncată. Comparând volumul ocupat de peptida control în prezența ionilor de cupru cu cel ocupat de peptida mutant, tot în prezența ionilor de cupru, observăm că acesta este mai mare în primul caz. Aceste rezultate sunt în concordanță cu cele obținute anterior, referitoare la timpii de rezidență a peptidelor în interiorul sistemului lipoproteic, deoarece o moleculă cu un volum mai mare va întâmpina o rezistență de traversare a sistemului mai mare rezultând într-un timp de tranzit mai mare, cum este cazul și în studiul nostru pentru peptida amiloid control.

În concluzie, luând în considerare valorile obținute pentru parametrii ce descriu conformația peptidelor studiate, volumul ocupat și timpii de rezidență, precum și timpii dintre două interacțiuni, putem spune că doar prin inducerea unei mici modificări de orientare a aminoacidului aspartat aflat în poziția 1 a peptide amiloid se pot induce modificări semnificative în conformația pe care peptida o adoptă atunci când aceasta interacționează cu ionii de cupru. Astfel că, am observat că aminoacidul aspartat joacă un rol important în stabilizarea conformației peptidelor amiloid în interacțiunea acestora cu ionii de cupru.

DISEMINAREA REZULTATELOR

Articole:

1. Alina Asandei, Giovanni Di Muccio, **Irina Schiopu**, Loredana Mereuta, Isabela S. Dragomir, Mauro Chinappi, Tudor Luchian, *Nanopore-Based Protein Sequencing Using Biopores: Current Achievements and Open Challenges*, Small Methods, 2020.
2. Isabela Dragomir, Cezara Ioana Bucataru, **Irina Schiopu**, Tudor Luchian, *Unzipping mechanism of free- and polyarginine-conjugated DNA-PNA duplexes, preconfined inside the α -hemolysin nanopore*, ANALYTICAL CHEMISTRY, 2020 (in evaluare)

Aprilie, 2020

Director de proiect,
Irina ȘCHIOPU