



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI

OIPOSDRU



UNIVERSITATEA
„ALEXANDRU IOAN CUZA”
IASI

Investește în oameni !

FONDUL SOCIAL EUROPEAN

Program Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013

Axa prioritară 1 Educația și formarea profesională în sprijinul creșterii economice și dezvoltării societății bazate pe cunoaștere;

Domeniul major de intervenție 1.5 Programe doctorale și post-doctorale în sprijinul cercetării;

Titlul proiectului: „Rețea transnațională de management integrat al cercetării postdoctorale în domeniul Comunicarea Științei. Construcție instituțională (școală postdoctorală) și program de burse (CommScie)”

Numărul de identificare al contractului: POSDRU/89/1.5/S/63663

Beneficiar: Universitatea “Alexandru Ioan Cuza” Iași

RAPORT DE CERCETARE

Cod raport: ANUL I-B (luna 1-12)

Perioada de raportare: octombrie 2010 - septembrie 2011

1. DATE PERSONALE ALE CERCETATORULUI POST-DOCTORAL:

Nume:	MEREUTA
Prenume:	LOREDANA CRISTINA
Telefon:	0232201191 / 0743226439
E-Mail:	loredana.mereuta@uaic.ro

2. DATE PERSONALE ALE TUTORELUI CERCETATORULUI POST-DOCTORAL :

Nume:	LUCHIAN
Prenume:	TUDOR
Telefon:	0232201191
E-Mail:	luchian@uaic.ro

3. INSTITUȚIA GAZDĂ A CERCETĂTORULUI:

Denumire Institutie:	Universitatea Al.I.Cuza, Iasi - Institutul A.Philippide
Domeniul fundamental de cercetare :	D 1 – matematica, fizica, chimie
Facultate/ Department:	Fizica

4. TITLUL PROIECTULUI DE CERCETARE:

Investigarea corelațiilor fizico-chimice existente între structura moleculară și potențialul litic al unor peptide antimicrobiene naturale și chimerice



UNIUNEA EUROPEANĂ

GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRUFondul Social European
POS DRU 2007-2013Instrumente Structurale
2007-2013MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
ȘI SPORTULUI
OIPOSDRUUNIVERSITATEA
„ALEXANDRU IOAN CUZA”
IASI**5. OBIECTIVELE PROIECTULUI (PENTRU PERIOADA DE RAPORTARE):**

Obiective prevazute	Obiective realizate	Gradul de realizare (total/parțial/nerealizat)	Descriere/observații :
1 Stabilirea condițiilor experimentale optime necesare pentru studierea interacțiunilor dintre peptidele antimicrobiene și membranele lipidice artificiale utilizând tehnici de electrofiziologie moleculară	Elaborarea protocoalelor experimentale optime necesare pentru studierea interacțiunilor dintre peptidele antimicrobiene și membranele lipidice artificiale	total	Tehnica înregistrării la nivel de singură moleculă este adecvată nu doar studiului proprietăților canalelor ionice ci și descoperirii de noi caracteristici ale biomembranelor prin intermediul interacțiunilor care au loc între elementele constitutive ale biomembranelor și canalele ionice.
2 Efectuarea experimentelor electrofiziologice pilot pentru confirmarea activității membranare a diferitelor peptide antimicrobiene, utilizând membrane lipidice reconstituite.	Realizarea experimentelor electrofiziologice pilot pentru confirmarea activității membranare a diferitelor peptide antimicrobiene	total	Conductanța unui singur canal ionic și conductanța macroscopică obținută în urma formării de către peptidele antimicrobiene selectate a mai multor canale, vor fi înregistrate pentru a evidenția parametri ca dependența de voltaj, dependența de concentrație, gradul de oligomerizare al agregatelor peptidice și durata de viață a canalelor ionice.
3			

6. ACTIVITĂȚILE PROIECTULUI (PENTRU PERIOADA DE RAPORTARE) :

Activități prevazute	Activități realizate	Gradul de realizare	Descriere/observații :
1 Elaborarea unor protocoale experimentale de obținere în laborator a membranelor lipidice reconstituite plane, cu compoziție lipidică asemănătoare membranelor celulare microbiene	Elaborarea unor protocoale experimentale de obținere în laborator a membranelor lipidice reconstituite plane, cu compoziție lipidică asemănătoare membranelor celulare microbiene	total	S-au utilizat următoarele tipuri de lipide ce sunt analogi ai lipidelor întâlnite în mod curent în membranele biologice: EPC (phosphatidylcholine) din ou, DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), cholesterol (Ch), POPC (1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine) și DOPG (1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-[Phospho-rac-(1-glycerol)]), toate furnizate de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL).



UNIUNEA EUROPEANĂ

GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRUFondul Social European
POS DRU 2007-2013Instrumente Structurale
2007-2013MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
ȘI SPORTULUI
OIPOSDRUUNIVERSITATEA
„ALEXANDRU IOAN CUZA”
IASI

2	Optimizarea metodelor experimentale utilizate pentru evaluarea capacității litice a peptidelor antimicrobiene	Optimizarea metodelor experimentale utilizate pentru evaluarea capacității litice a peptidelor antimicrobiene	total	Monitorizarea canalelor voltaj dependente formate de peptide antimicrobiene în bistraturi lipidice este una din tehnicile utile de investigare a formării și stabilității porilor transmembranari induși de către peptidele antimicrobiene în membranele celulare. Amplitudinea curentului electric mediat prin porii formați de către peptidele antimicrobiene în membranele artificiale reprezintă o măsură a capacității de penetrare a biomembranelor de către aceste molecule peptidice.
3	Testarea prin metode de electrofiziologie a efectului litic asupra membranelor de tip bistrat reconstituit al unor peptide citotoxice extrase din surse naturale (de ex. <i>magaininele</i> , <i>melitinele</i>)	Testarea prin metode de electrofiziologie a efectului litic asupra membranelor de tip bistrat reconstituit al unor peptide citotoxice extrase din surse naturale (de ex. <i>magaininele</i> , <i>melitinele</i>)	total	S-a reusit insertia monomerilor de magainina 2 in membrane artificiale formate din lipide zwiterionice PC (L- α - Phosphatidylcholine) - neutre din punct de vedere electric la pH neutru și lipide anionice DOPG (1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-[Phospho-rac-(1-glycerol)]) - încărcate electric net negativ la pH neutru
4	Testarea prin metode de electrofiziologie a efectului litic asupra membranelor de tip bistrat reconstituit al unor peptide chimerice – structuri hibride realizate între peptidele magainina și cecropina (de ex. CA(1-8)MA(1-12))	Testarea prin metode de electrofiziologie a efectului litic asupra membranelor de tip bistrat reconstituit al unor peptide chimerice – structuri hibride realizate între peptidele magainina și cecropina (de ex. CA(1-8)MA(1-12))	total	S-a urmarit insertia monomerilor de CA(1-8)MA(1-12) in membrane artificiale formate din lipide zwiterionice PC (L- α -Phosphatidylcholine)

7. REZULTATE LIVRATE (ÎN PERIOADA DE RAPORTARE) :

7.1. Participări la conferințe naționale:

Titlul conferinței	Data și locul desfășurării	Organizator	Titlul lucrării prezentate	Calitate (autor, coautor etc.)



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



OIPOSDRU



UNIVERSITATEA
„ALEXANDRU IOAN CUZA”
IASI

7.2. Participări la conferințe internaționale

Titlul conferinței	Data și locul desfășurării	Organizator	Tipul prezentării invitat/oral/poster	Titlul lucrării, autorii, afilierea
ESF-EMBO Symposium Molecular Perspectives on Protein-Protein Interactions	14-19 November 2010, Hotel Eden Roc, Sant Feliu de Guixols, Spain	European Science Foundation (ESF) in partnership with the European Molecular Biology Organization (EMBO).	poster	<i>The role played by lipids packing upon the mechanisms of transmembrane translocation of α-helical antimicrobial peptides,</i> Loredana Mereuta ¹ , Yoonkynung Park ² , Kyung-Soo Hahm ² , Tudor Luchian ¹ ¹ Faculty of Physics, Laboratory of Biophysics and Medical Physics, Alexandru I. Cuza' University ² Research Center for Proteineous Materials, Chosun University, Gwangju, South Korea
Gordon Research Conference on Antimicrobial Peptides Antimicrobial Peptides in Innate Immunity - New Insights on an Ancient System	May 15-20, 2011 Il Ciocco Hotel and Resort Lucca (Barga), Italy	Gordon Research Conferences	poster	<i>The impact of asymmetric alterations of a lipid membrane dipole potential and curvature, on alamethicin kinetic and transport features,</i> Loredana Mereuta, Tudor Luchian Department of Physics, Laboratory of Molecular Biophysics and Medical Physics, Alexandru I. Cuza' University,



UNIUNEA EUROPEANĂ

GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRUFondul Social European
POS DRU 2007-2013Instrumente Structurale
2007-2013MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
ȘI SPORTULUI
OIPOSDRUUNIVERSITATEA
„ALEXANDRU IOAN CUZA”
IASI

International Conference PROCESSES IN ISOTOPES AND MOLECULES 2011,	September 29- October 01 Cluj-Napoca, Romania	National Institute for Research and Development of Isotopic and Molecular Technologies - INCDTIM - Cluj- Napoca Romanian Physical Society - SRF National Authority for Scientific Research Romanian Mass Spectrometry Society	invitat	<i>Interrogation of single- molecule chemistry with protein nanopores</i> Tudor Luchian, Aurelia Apetrei, Alina Asandei, Loredana Mereuta <i>Department of Physics, Laboratory of Molecular Biophysics and Medical Physics, “Alexandru I. Cuza” University</i>
---	--	---	---------	--

7.3. Cărți publicate

Titlul cărții	Editură	An apariție	ISBN/ISSN	Număr de pagini	Calitate (autor, coautor, coordinator etc.)

7.4. Articole/Lucrări publicate:

7.4.1. Lucrări publicate în reviste cotate ISI

Autor(i)	Titlul lucrării	Revista	Data apariției	ISBN/ISSN	Pagini
Asandei A., Mereuta L. , Luchian T.	<i>The Kinetics of Ampicillin Complexation by gamma- Cyclodextrins. A Single Molecule Approach</i>	JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B	AUG 25 2011	1520-6106	10173- 10181
Loredana Mereuta , Alina Asandei and Tudor Luchian,	<i>Meet me on the other side: trans-bilayer modulation of a model voltage- gated ion channel activity by membrane electrostatics asymmetry</i>	PLoS ONE	September 27, 2011	1932-6203	6(9): e25276.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI
OIPOSDRU



UNIVERSITATEA
„ALEXANDRU IOAN CUZA”
IASI

7.4.2. Lucrări publicate în reviste indexate în BDI

Autor(i)	Titlul lucrării	Revista	Data apariției	ISBN/ISSN	Pagini

7.4.3. Lucrări publicate în BDI

Autor(i)	Titlul lucrării	BDI	Data apariției	Adresa web

7.4.4. Lucrări publicate în reviste românești recunoscute de CNCIS

Autor(i)	Titlul lucrării	Revista	Data apariției	ISBN/IS SN	Pagini	Indexarea revistei (B, B+, C)

7.4.5. Lucrări publicate în volumele unor conferințe internaționale

Autor(i)	Titlul lucrării	Volumul	Editor coordonator	Data apariției	ISBN/ ISSN	Pagini

7.4.6. Lucrări publicate în volumele unor conferințe naționale

Autor(i)	Titlul lucrării	Volumul	Coord. volum	Editura	Data apariției	ISBN/IS SN	Pagini



UNIUNEA EUROPEANĂ

GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRUFondul Social European
POS DRU 2007-2013Instrumente Structurale
2007-2013MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI
OIPOSDRUUNIVERSITATEA
„ALEXANDRU IOAN CUZA”
IASI**7.4.7. Alte publicații (de popularizare/comunicare a științei)**

Autor(i)	Titlul lucrării	Revista/ cotidian	Data apariției	ISBN/ISSN	Pagini
Tudor Luchian, Loredana Mereuta, Aurelia Apetrei	Specializarile de Biofizica și Fizica Medicală din cadrul Facultății de Fizică, Universitatea "Alexandru I. Cuza" - Iasi	Revista de Fizică EVRİKA' Nr. 5-6	mai-iunie 2011	1220-4935	12-19

7.5. Brevete omologate:**7.6. Cereri de finanțare/aplicații depuse:****8. STAGII DE CERCETARE ȘI DOCUMENTARE ÎN STRĂINĂȚATE :**

Locul (instituția: universitatea, institutul de cercetări etc.)	Perioada	Numărul de săptămâni

9. STAGII DE CERCETARE ȘI DOCUMENTARE ÎN ȚARĂ:

Locul (instituția: universitatea, institutul de cercetări etc.)	Perioada	Numărul de săptămâni

10. PARTICIPĂRI ÎN ECHEPE DE CERCETARE ALE ALTOR PROIECTE:

Proiectul (denumire și cod proiect/nr. contract etc.)	Programul	Valoarea proiectului	Calitatea (cercetător, asist.manager etc.)	Perioada
Elucidarea mecanismelor de interacțiune a unor peptide citotoxice selectate cu celule tumorale, și optimizarea proprietăților lor anti- tumorale', PN II nr. 62061/2008	PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE 2007-2013	916859 ron	cercetator	2008-2011



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI

OIPOSDRU



UNIVERSITATEA
„ALEXANDRU IOAN CUZA”
IASI

11. Publicațiile sau rezultatele apărute și raportate în urma cercetării finanțate prin proiectul POSDRU/89/1.5/S/63663 au menționat numele finanțatorului și numărul de contract:

DA

PRIN ACEASTA SE CERTIFICA LEGALITATEA SI CORECTITUDINEA
DATELOR CUPRINSE IN PREZENTUL RAPORT DE ACTIVITATE și în ANEXA 1 .

Data completării:
24/09/2011

Nume, prenume
Mereuta Loredana

Semnătura



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI
OIPOSDRU



UNIVERSITATEA
„ALEXANDRU IOAN CUZA”
IASI

Sectiune destinată tutorelui cercetătorului post-doctoral:

AVIZUL TUTORELUI PENTRU
CONTINUAREA ACTIVITĂȚII DE CERCETARE:

DA

AVIZUL TUTORELUI PENTRU VALIDAREA
FINALĂ A ACTIVITĂȚII DE CERCETARE:

NU ESTE CAZUL

Data avizării:
24/09/2011

Nume, prenume
Luchian Tudor

Semnătura



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI
OIPOSDRU



UNIVERSITATEA
„ALEXANDRU IOAN CUZA”
IASI

Anexa 1

RAPORT DE CERCETARE (rezumat extins)

1. Stadiul cunoașterii și cercetărilor în domeniu, la nivel internațional și național. Delimitări terminologice și conceptuale. Bibliografia relevantă în domeniul de cercetare. (max. 2 pag.)

Peptidele citotoxice reprezintă o modalitate importantă de apărare împotriva infecțiilor microbiene, fiind regasite la toate organismele evaluate, de la fungi, plante, insecte și până la vertebratele superioare și care posedă proprietăți imuno-stimulatoare, imuno-modulatoare și anti-inflamatoare. Acest tip de apărare este eficientă de exemplu și împotriva bacteriilor rezistente la antibiotice iar rezistența la acestea este mai dificil de indus. Mai mult, pe lângă rolul lor de a distruge mediul microbial, peptidele citotoxice au un rol important în modularea răspunsului inflamator asociat cu infecții, recrutând celule ale sistemului imunitar cum ar fi limfocite T la focarul infecției, asistând astfel la procesul de vindecare al leziunilor. În ciuda cercetărilor intense, mecanismele biochimice care stau la baza procesului de inserție membranară a peptidelor citotoxice sunt incomplet cunoscute, existând un interes ridicat de a dezvolta terapii cu noi modalități de acțiune, din cauza rezistenței fiziologice ce apare la produsele actuale, precum și datorită efectelor lor secundare importante. În plus față de activitatea antibacteriană și de modulare a răspunsului imun pe care o au aceste peptide, studii recente au arătat că o parte din peptidele citotoxice cationice ce exercită un efect toxic asupra bacteriilor dar nu și asupra celulelor normale de mamifer, au o activitate citotoxică importantă asupra celulelor canceroase. Cea mai mare parte a medicamentelor anticanceroase disponibile permit un control al creșterii tumorale doar la concentrații care influențează și celulele sănătoase, rezultând efecte secundare indesezirabile. Astfel, este imperativă găsirea unor noi produse cu mecanisme de acțiune inovante iar una din direcțiile actuale de cercetare este reprezentată de utilizarea peptidelor antimicrobiene citotoxice.

Interesul social deosebit asimilat unor asemenea investigații științifice rezidă în necesitatea de a se dezvolta terapii anti-microbiene novatoare, din cauza rezistenței fiziologice ce apare în cazul antibioticelor clasice, precum și datorită efectelor secundare ale terapiei convenționale. Ținând cont de faptul că pentru majoritatea bacteriilor, mecanismele moleculare ce stau la baza manifestării de „rezistență” la antibioticele convenționale implică interacțiuni specifice între antibiotice și receptori celulari și/sau transportori membranari (e.g., antibioticele β -lactamice inhibă funcția enzimei DD-transpeptidaza, de biosinteză a peptidoglicanului, iar alte mecanisme de apărare împotriva antibioticelor se manifestă fie prin efluxul acestora din interiorul celulei bacteriene prin intermediul unor proteine specifice, cum ar fi *AcrAB-TolC* din *E. coli*, *MexCD-OprJ* din *Pseudomonas aeruginosa*, *PmrA* din *Streptococcus pneumoniae*, fie prin alterarea căilor de permeabilitate în citoplasmă, de exemplu modificarea structurală a porinului *OmpF* localizat în membrana externă a bacteriilor Gram-negative), modul de acțiune unic al peptidelor antimicrobiene - prin aceea că ele nu necesită interacția cu receptori moleculari specifici - fac ca aceste peptide să fie insensibile la mecanismele cunoscute de rezistență antibiotică. Este general acceptat faptul că aceste peptideucid celula microbială prin „invazia” membranei celulare deși mecanismele care sunt implicate în acest proces nu sunt cunoscute în detaliu. Mecanismul prin care peptidele citotoxice sunt funcționale depinde de un număr de proprietăți fizicochimice ale acestora cum ar fi: secvența primară, structura secundară, sarcina electrică netă, amfipaticitate, hidrofobicitate precum și de concentrația acestora la nivelul biomembranei și de



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI

OIPOSDRU



UNIVERSITATEA
"ALEXANDRU IOAN CUZA"
IASI

compoziția membranei celulare. Modelul acceptat astăzi, prin care peptidele antimicrobiene își manifesta funcționalitatea, implică existența mai multor etape succesive cum sunt: asocierea peptidelor pe suprafața membranară, asamblarea peptidelor în structuri secundare definite la nivelul suprafețelor membranare, inserția peptidelor în biomembrane și în final, formarea porilor transmembranari. Schimbările de la nivelul membranei celulare au implicații majore în progresia infecțiilor deoarece ele joacă un rol cheie în răspunsul celulei la mediul ei inconjurator.

Studiul interacțiunilor între peptidele citotoxice și membrane lipidice ar putea pune în evidență atât condițiile care fac ca membranele să fie receptivă la acțiunea acestor peptide cât și posibilitățile de a eficientiza gradul de selectivitate al acestora. Factorii care influențează sunt determinați pe de o parte de caracteristicile mediului biologic în care se manifestă aceste interacțiuni și pe de altă parte caracteristicile mediului intramembranar și anume tipul moleculelor lipidice care intră în structura membranei ce influențează în mod direct profilul electric al membranei precum și fluiditatea acesteia. Înțelegerea acestor factori este esențială pentru studii de sinteză a peptidelor cu o mai bună selectivitate și specificitate. În domeniul actual de cercetare este puțin cunoscut modul de acțiune al peptidelor citotoxice și baza moleculară a acestora, actualmente fiind de interes studii necesare pentru elucidarea acestor mecanisme. Cu toate că relațiile între structura peptidelor și activitatea lor a fost întrucâtva studiată, se cunosc încă destul de puține lucruri privind bazele moleculare ale diferențelor importante de activitate antimicrobiană și de specificitate a acțiunii acestora. Înțelegerea mecanismelor de interacțiune dintre aceste peptide și membranele celulare este esențială pentru a putea concepe și dezvolta de novo peptide sintetice, mai eficiente, ce pot fi utilizate în tratamentul infecțiilor microbiene.

Bibliografie selectivă:

- [1] M. R. Yeaman, N.Y. Yount, *Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance*, *Pharmacol Rev* 55:27–55, 2003
- [2] Rana M, Chatterjee S, Kochhar S and Pereira, *Antimicrobial Peptides: a new dawn for regulating fertility and reproductive tract infections*, *BMJ J Endocrinol Reprod* 10 (2006) 2: 88-95
- [3] Margitta Dathe, Torsten Wieprecht, *Structural features of helical antimicrobial peptides: their potențial to modulate activity on model membranes and biological cells* *Biochimica et Biophysica Acta* 1462 (1999) 71^87
- [4] Tudor Luchian, Loredana Mereuță, *Phlorizin- and 6-ketocholestanol-mediated antagonistic modulation of alamethicin activity în phospholipid planar membranes*, *Langmuir* 22(20), (2006), 8452-8457
- [5] Y. Shai, *Mode of action of membrane active antimicrobial peptides*, *Biopolymers* 66 (2002) 236-248.
- [] Christopher J. Arnusch, Hilbert Branderhorst, Ben de Kruijff, Rob M. J. Liskamp, Eefjan Breukink, Roland J. Pieters, *Enhanced Membrane Pore Formation by Multimeric/Oligomeric Antimicrobial Peptides*, *Biochemistry* 2007, 46, 13437-13442
- [6] Katsumi Matsuzaki, *Control of cell selectivity of antimicrobial peptides*, *BBA - Biomembranes* (2008), doi: 10.1016/j.bbamem.2008.09.013
- [7] R. Jayaraman, *Antibiotic resistance: an overview of mechanisms and a paradigm shift*, *Current Science*, VOL. 96, NO. 11, 10 JUNE 2009
- [8] Ostroumova, O. S., Malev, V. V., Ilin, M. G. & Schagina, L. V. *Surfactin Activity Depends on the Membrane Dipole Potential*. *Langmuir* 26, 15092–15097 (2010).
- [9] Lundbæk, J. A., Koeppe, R. E. II. & Andersen, O. S. *Amphiphile regulation of ion channel function by changes in the bilayer spring constant*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 15427–15430 (2010).
- [10] Raychaudhuri, P., Li, Q., Mason, A., Mikhailova, E., Heron, A. J. & Bayley, H. *Fluorinated Amphiphiles Control the Insertion of α -Hemolysin Pores into Lipid Bilayers*. *Biochemistry* 50, 1599–1606 (2011).



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI

OIPOS DRU



UNIVERSITATEA
"ALEXANDRU IOAN CUZA"
IASI

2. Obiectivele generale ale proiectului. (max. 1/2 pag.).

Obiectivele generale ale acestui proiect se refera la studierea interaciunilor manifestate între anumite peptide citotoxice și membranele lipidice reconstituite precum și investigarea dependentei activității litice a acestor peptide antimicrobiene în funcție de proprietățile mecanice și electrice ale membranelor lipidice. Aceste studii își propun să pună în evidență atât factorii fizico-chimici care fac ca membranele celulare microbiene să fie 'ținta' favorită pentru acțiunea peptidelor citotoxice, cât și posibilitățile de a eficientiza gradul de afinitate moleculară al acestora față de membranele microbiene. Implementarea obiectivelor acestui proiect va genera rezultate științifice fundamentale ce vor contribui la următoarele:

(i) Identificarea mecanismelor care determină specificitatea acțiunii peptidelor citotoxice asupra anumitor membrane celulare, ceea ce va permite ulterior deducerea modului în care se poate amplifica și lărgi spectrul proprietăților lor litice și vor putea fi aplicate la conceperea unor peptide citotoxice mai eficiente și la ameliorarea protocoalelor de dirijare a medicamentelor către celulele microbiene.

(ii) Studierea cantitativă și calitativă a efectului unor peptide citotoxice asupra unor membrane microbiene și eucariote, prin tehnici de electrofiziologie și biologie moleculară, precum și analiza cantitativă a adsorbției membranare și a cineticii de inserție a unor astfel de peptide prin tehnici de fluorescență și tehnici 'voltage-clamp', vor permite evaluarea energiilor de interacțiune dintre peptidele citotoxice utilizate și membrane celulare, și evaluarea conductanței electrice a porilor formați de peptidele selectate.

(iii) Înțelegerea mecanismelor de formare a porilor de către peptidele citotoxice naturale și sintetice la nivelul membranelor reconstituite precum și înțelegerea relațiilor între structura și activitate biologică va permite înțelegerea funcției acestor peptide și va deschide drumul unor noi tratamente antimicrobiene.

3. Metodologia utilizată (max. 1 pag.).

În implementarea acestui proiect sunt folosite tehnici recunoscute din domeniile biofizicii, electrofiziologiei moleculare (electrofiziologia canalelor ionice, tehnici de înregistrare la nivel de 'singură moleculă' (un singur canal ionic) și metoda compensării câmpului electric intern (IFCM) pentru măsurători ale potențialului de dipol membranar), spectroscopiei de fluorescență pentru a descrie pe deplin mecanismele interacțiunii dintre peptide antimicrobiene selectate și membrane lipidice reconstituite. Motivația utilizării acestor tehnici constă în faptul că, prin capabilitățile proprii bine dovedite, tehnica înregistrării la nivel de singură moleculă este adecvată nu doar studiului proprietăților canalelor ionice ci și descoperirii de noi caracteristici ale biomembranelor prin intermediul interacțiunilor care au loc între elementele constitutive ale biomembranelor și canalele ionice. Conductanța unui singur canal ionic și conductanța macroscopică obținută în urma formării de către peptidele antimicrobiene selectate a mai multor canale, sunt înregistrate pentru a evidenția parametri ca dependența de voltaj, dependența de concentrație, gradul de oligomerizare al agregatelor peptidice și durata de viață a canalelor ionice. Monitorizarea canalelor voltaj dependente formate de peptidele antimicrobiene în bistraturi lipidice este una din tehnicile utile de investigare a formării și stabilității porilor transmembranari induși de către peptidele antimicrobiene în membranele celulare. Amplitudinea curentului electric mediat prin porii formați de către peptidele antimicrobiene în membrane artificiale reprezintă o măsură a capacității de penetrare a biomembranelor de către aceste molecule peptidice.

În completarea studiilor electrofiziologice ce vizează interacțiunile manifestate între peptide antimicrobiene și membrane lipidice reconstituite artificial, s-a urmarit implementarea unor tehnici de spectroscopie de fluorescență, prin care să se poată evalua cinetica proceselor de translocare, prin



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI

OIPOS DRU



UNIVERSITATEA
„ALEXANDRU IOAN CUZA”
IASI

membranele lipidice reconstituite, a unor peptide antimicrobiene ce conțin în secvența lor primară aminoacidul triptofan. În spectroscopia de fluorescență, concentrația proteinelor în soluții apoase, poate fi corelată cu intensitatea spectrelor de fluorescență, întrucât, păstrând aceleași condiții experimentale (aceeași soluție-buffer), concentrația anumitor aminoacizi depinde proporțional cu intensitatea maximă a spectrului de emisie în fluorescență. Măsurând valoarea maximă a intensității spectrelor de emisie în fluorescență a triptofanului, utilizând un spectrofluorometru FluoroMax-4 (Horiba Jobin Yvon, USA), se poate evalua concentrația peptidei studiate (care conține în secvența primară acest aminoacid) care translocă prin intermediul porilor formați în membrana lipidică. Avantajul acestei metode este faptul că atât pentru măsurători electrofiziologice ale curenților ionici mediați de porii transmembranari inserați în membrana lipidică, cât și pentru experimentele de spectroscopie de fluorescență prin care se evaluează cantitatea de peptidă translocată prin membrană, se utilizează același tip de bistrat lipidic reconstituit. S-au testat astfel, prin metode de electrofiziologie și spectroscopie de fluorescență, protocoale experimentale prin care s-a urmărit evaluarea concentrației peptidei care transloca prin membrana lipidică reconstituită artificial, urmărindu-se optimizarea parametrilor de lucru.

Una dintre cele mai importante metode de rezolvare și caracterizare experimentală a efectelor induse de inserția peptidelor și proteinelor asupra componentei potențialului de dipol a membranelor lipidice este așa numita metodă de compensare a câmpului electric intern ('inner field compensation method', sau abreviat 'IFC'), care folosește binecunoscuta dependență dintre capacitatea membranei și diferența de potențial aplicată. Aceasta metoda este esențială pentru studiile propuse în continuare, care vizează explorarea interdependenței dintre activitatea membranară a unor peptide antimicrobiene și potențialul de dipol membranar.

4. Rezultatele obținute și diseminarea acestora (impactul, relevanța și aplicabilitatea rezultatelor) (max. 1 pag).

Un obiectiv important urmărit în cadrul acestui proiect a fost cel de a investiga modul în care activitatea membranară a unor peptide antimicrobiene este influențată de proprietățile electrice și mecanice ale monostratului lipidic opus față de cel în care are loc adsorbția și inserția acestor peptide. Paradigma nouă propusă prin prisma rezultatelor experimentale obținute, releva faptul că anumite procese intracelulare pot fi modulate și prin manipularea proprietăților electrice și mecanice ale monostratului lipidic membranar extracelular. Relevanța acestor studii are la bază faptul că anumite procese intracelulare, 'in vivo' pot fi declanșate de acțiunea unor proteine existente pe partea extracelulară a membranei iar acțiunea acestora poate fi influențată în mod decisiv de proprietățile electrice și mecanice specifice ale domeniilor lipidice membranare. Scopul specific urmărit a fost de a detalia mecanismele moleculare prin intermediul cărora, anumite molecule amfifile sau care posedă moment de dipol, inserate la nivelul membranelor lipidice, modulează activitatea membranară și potențialul litic al unor peptide antimicrobiene, influențând astfel posibilitatea prin care aceste peptide își pot exercita rolul lor toxic asupra agenților patogeni. Specific, a fost studiată influența compusilor chimici: phlorizin, RH-421 și SDS (sodium dodecyl sulfate), asupra cineticii și proprietăților de transport ale porilor transmembranari formați de monomerii peptidici de alameticina în membrane artificiale zwitterionice. Noutatea adusă de aceste studii a constat în faptul că influența exercitată de acești compusi chimici asupra activității membranare a alameticinei a fost urmărită prin intermediul unui protocol experimental în care compuşii chimici amintiți au fost adăugați pe partea membranei artificiale (partea 'trans') opusă față de cea în care se adăuga și insera inițial peptida (partea 'cis'). Rezultatele experimentale au condus la ipoteza conform căreia, alterarea potențialului de dipol membranar din



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI

OIPOSDRU



UNIVERSITATEA
„ALEXANDRU IOAN CUZA”
IASI

partea ,trans', în prezența moleculelor de phlorizin sau RH – 421, poate fi echivalentă cu modificarea potențialului electric transmembranar impus de o parte și de cealaltă a membranei artificiale pentru a facilita inserția și formarea porilor de către peptida antimicrobiană alameticina, în condițiile în care nici un agent chimic nu este adăugat. Utilizând reprezentările grafice ale fluctuațiilor de curent ionic mediat de porii de alameticina în funcție de valoarea potențialului electric aplicat membranei, în absența și în prezența agenților chimici phlorizin și RH-421, se pot deduce valorile cantitative ale modificărilor impuse profilului electric transmembranar de prezența acestor molecule. Cu ajutorul acestor valori, se pot calcula ulterior valorile diferenței dintre energia liberă corespunzătoare orientării paralele interfaciale și cea corespunzătoare orientării perpendiculare transmembranare a monomerilor peptidici de alameticina, determinându-se astfel măsura în care alterarea potențialului de dipol ,trans' alterează diferența de energie liberă asociată proceselor de inserție membranară a alameticinei. Printr-un formalism similar, s-a determinat și diferența de energie liberă asociată proceselor de inserție membranară a alameticinei, în prezența moleculelor amfifile de SDS, fie în partea ,cis' sau , trans' a membranei lipidice. S-a demonstrat astfel că, alterarea potențialului electric de suprafață concomitent cu a curburii membranare indusă de moleculele amfifile de SDS, modifică cinetica de inserție a alameticinei, în funcție de partea membranară în care se adsorbe acest compus chimic.

În paralel, s-a abordat un studiu asupra interacțiunilor care au loc între antibiotice și anumiți pori proteici transmembranari, în scopul ulterior de a eficientiza modalitățile de interacțiune dintre peptide antimicrobiene și acest tip de pori proteici inserați în membrane lipidice. Astfel s-a studiat cu ajutorul tehnicilor de electrofiziologie celulară la nivel de ,singură moleculă', influența pH-ului mediului fiziologic și a diferenței de potențial transmembranar, asupra interacțiunilor reversibile dintre ampicilina și gama-ciclodextrina (γ CD) inserată în interiorul unui por proteic transmembranar de α -hemolizina (α HL). Rezultatele experimentale au demonstrat faptul că sarcina electrică parțială a moleculelor de ampicilina, dependentă de pH, precum și selectivitatea anionică a complexului proteic transmembranar γ CD – α HL, au un rol determinant în manifestarea interacțiunilor dintre antibiotice și interiorul cavității gama-ciclodextrinei. Aceste studii vizează eficientizarea modalităților de dirijare și eliberare a medicamentelor la nivelul celulelor țintă.

Rezultatele obținute până în acest stadiu al proiectului au fost diseminate prin comunicarea lor în cadrul a patru conferințe internaționale precum și prin publicarea în două articole în reviste cotate ISI. Ca și activitate de comunicare a științei pentru nespecialiști, s-a elaborat de către colectivul didactic al Laboratorului de Biofizică Moleculară și Fizică Medicală (prof. univ. dr. Tudor Luchian, asist. univ. dr. Loredana Mereuta, doctoranda Aurelia Apetrei), un material cu caracter de divulgare a științei, care a fost publicat în ,Revista de Fizică EVRIKA', Nr. 5-6, mai-iunie 2011, pag.12-19.