

## Titlu Faza: Investigatii privind efectul alotropilor carbonului asupra agregarii proteinelor implicate in declansarea bolii Alzheimer

**Obiective:** Obiectivul fazei este de a studia procesul de aglomerare (agregare) a proteinei amiloid A $\beta$  (1-42), pe suprafata Si si a Si acoperit cu un strat de fulerena si formarea structurilor secundare/fibrilare in functie de prezenta nanomaterialului si/sau a unui compus lipidic (colesterol).

**Rezultate estimate initial:** 1) depunerea de straturi de A $\beta$  (1-42) din solutie prin metodele Langmuir-Blodgett si drop cast pe substrat de Si; 2) depunerea de straturi de fulerena C<sub>60</sub> pe substrat de Si; 3) depunerea de straturi de A $\beta$  (1-42) din solutie, prin metodele Langmuir-Blodgett si drop cast, pe substrat de Si acoperit cu C<sub>60</sub>; 4) depunerea de straturi de A $\beta$  (1-42) continand colesterol din solutie, prin metodele Langmuir-Blodgett si drop cast, pe substrat de Si si Si acoperit cu C<sub>60</sub>; 5) caracterizarea straturilor obtinute prin metode microscopice si spectroscopice pentru identificarea prezentei structurilor secundare/fibrilare; 6) evidentierea corelatiei dintre prezenta nanoparticulei si/sau colesterolului si dezvoltarea unui anumit tip de structura in strat; 7) evidentierea conditiilor care favorizeaza cresterea neurotoxicitatii structurilor formate prin agregare.

**Rezultate obtinute:** Straturi din A $\beta$  (1-42) pure si dopate cu colesterol (Ch) au fost preparate prin metoda Langmuir-Blodgett (L-B) si drop cast (DC) pe substrat de siliciu monocristalin (Si) si pe substrat de Si acoperit cu un strat subtire de fulerena Buckminster (Si+C<sub>60</sub>) depusa prin evaporare in vid. Au fost trasate izotermele, presiunea de suprafata functie de aria moleculara medie, pentru monostraturi Langmuir din A $\beta$ (1-42), Ch si A $\beta$ (1-42)+Ch depuse pe suprafata apei si a fost evaluata presiunea de colaps a fiecarui strat. Acesta a fost transferat de pe suprafata apei pe substrat in urma unor treceri successive prin interfata apa-aer, transferul fiecarui strat fiind caracterizat de o viteza de transfer (RT) corelata cu stabilitatea si calitatea stratului. Valorile pozitive/negative ale RT sunt asociate cu procese de adsorbtie /desorbtie a moleculelor (Fig.1). Un strat uniform si stabil de A $\beta$  (1-42) a fost obtinut pe substratul de Si+C<sub>60</sub> (RT~1) (Fig.1a), iar prezenta Ch a dus la agregarea amiloidului (RT<<1)(Fig.1b).

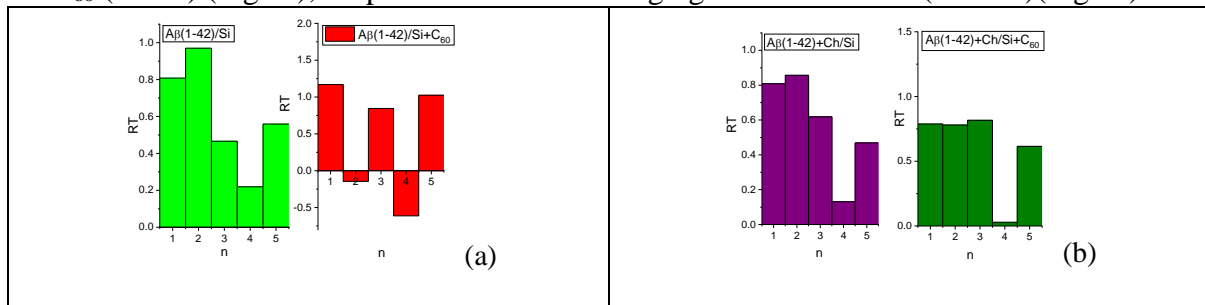


Fig.1: Rata de transfer (RT) ca o functie de numarul de cicluri de depunere (n).

Metodele SEM, AFM si FTIR au fost folosite pentru caracterizarea morfologica si spectrala a straturilor obtinute si investigarea formarii structurii secundare tip fibrila in procesul de auto-organizare a moleculelor in prezenta fulerenei si/sau colesterolului.

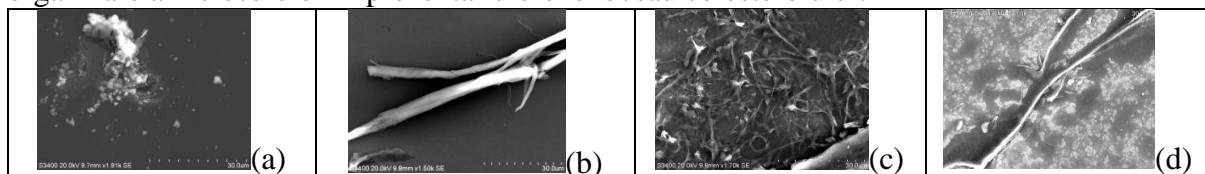


Fig.2: Imagini SEM

Imaginile SEM au evidentiat pentru stratul de A $\beta$  (1-42) depus prin L-B pe Si+C<sub>60</sub> o morfologie prezentand clusteri continand forma oligomerică a amiloidului (Fig.2a), in timp ce pentru stratul de A $\beta$  (1-42) cu Ch este dominantă o morfologie prezentand manunchiuri de fibrile

(Fig.2b). Prezenta atat a colesterolului cat si a stratului tampon de  $C_{60}$  a determinat o morfologie caracterizata de fibrile avand diferite grosimi si in cazul stratului depus prin DC (Fig.2c,d). Morfologia straturilor de amiloid este afectata mai mult de metoda de depunere decat de prezenta stratului intermediar de fulerena. Straturile depuse, atat pe Si cat si pe Si+ $C_{60}$ , prin L-B sunt mai netede (Fig.3c,d) decat cele depuse prin DC (Fig.3a,b), procesul de transfer al stratului de pe suprafata apei pe substrat favorizand procesele de adsorbție/desorbție si raspandirea moleculelor pe suprafata substratului.

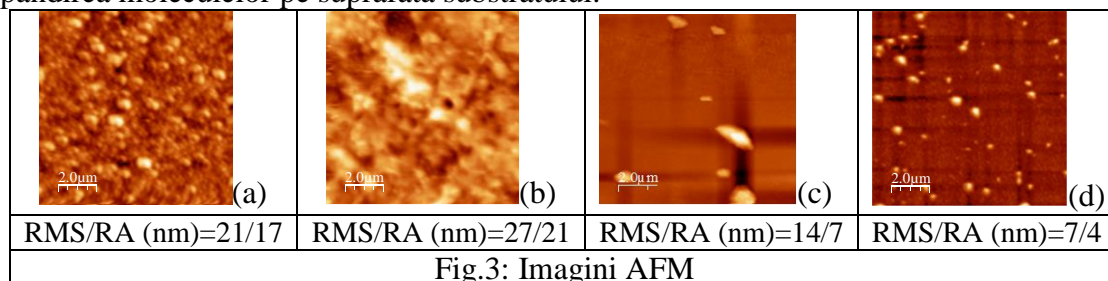


Fig.3: Imagini AFM

Prin analiza FTIR s-a putut identifica tipul de structura in corelatie cu modurile specifice de vibratie IR ale peptidelor, o anumita structura fiind caracteristica intr-un anumit interval spectral. La depunerea prin L-B a stratului de amiloid atat pe Si cat si Si+ $C_{60}$  (Fig.4a) domina forma oligomerica care este mult mai toxica decat fibrilele mature. Adaugand colesterol, forma oligomerica continua sa domine si alaturi de tendinta la fragmentare a fibrilelor este asociata cu o neurotoxicitate crescuta (Fig.4b). Chiar si in cazul straturilor depuse prin DC, in care predomina forma fibrilara indiferent de substrat, colesterolul a dus la reducerea numarului de fibrile in detrimentul formei oligomerice corelata cu o neurotoxicitate crescuta.

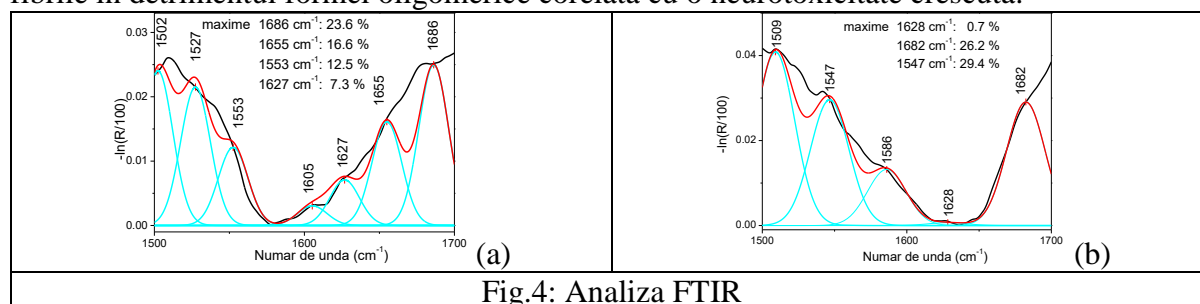


Fig.4: Analiza FTIR

**Concluzii si perspective:** Datorita structurii fibrilare rezistanta la procesele normale de degradare a proteinelor,  $A\beta(1-42)$  este asociat in mare parte cu bolile neurodegenerative cum ar fi Alzheimer, Parkinson and Creutzfeldt-Jakob. In ultima vreme, neurotoxicitatea acestei peptide a inceput sa fie corelata atat cu procesele de formare a fibrilelor cat si cu cele din fazele initiale de formare a oligomerilor considerati chiar mai neurotoxici decat fibrilele. Prin interactia cu  $A\beta(1-42)$ , formele alotrope ale carbonului pot, in anumite conditii, determina formarea unor structuri dezordonate care pot inversa procesul de formare a fibrilelor. Rezultatele mentionate confirma faptul ca, colesterolul are un efect dominant asupra structurii  $A\beta(1-42)$  ducand la preponderenta formei oligomerice si distrugerea partiala a formei fibrilare, ceea ce determina cresterea neurotoxicitatii si a probabilitatii de afectare neuronală.

Obiectivul fazei a fost atins si au fost obtinute rezultatele estimate initial, mentionate mai sus. Aceste rezultate preliminare deschid perspective pentru noi studii orientate spre: investigarea efectului altor nanomateriale (nanotuburi de carbon, grafena) asupra procesului de agregare a peptidelor si investigarea procesului de agregare a polipeptidelor pe un substrat lipidic (ca o prima aproximatie a membranei celulare).

*Articol:* C. Breazu, O. Rasoga, M. Socol, F. Stanculescu, P. Ganea, V. Grumezesc, A. Stanculescu, "The effect of carbon nanomaterials on the properties of polypeptides films" (in pregatire; va fi trimis pana in data de 10.12.2019).

