



Teză de abilitare

Domeniu: Fizică

**Investigarea interacțiunilor uni - moleculare
la nivel biomembranar cu relevanță în evoluția unor
patologii actuale.**

Conf. Univ. Dr. Loredana Cristina MEREUȚĂ

Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași, Facultatea de Fizică

Iași – 2022



REZUMAT

Teza de abilitare intitulată *‘Investigarea interacțiunilor uni - moleculare la nivel biomembranar cu relevanță în evoluția unor patologii actuale’* detaliază principalele cercetări științifice ale autoarei, după obținerea titlului de doctor. Teza cuprinde două secțiuni, prima secțiune fiind dedicată realizărilor științifice în subdomeniul specific din biofizica moleculară (detaliate în trei subcapitole distincte) iar cea de a doua secțiune sumarizează implementarea didactică a activității de cercetare a autoarei precum și propunerea planurilor de viitor în cariera profesională, atât didactică cât și de cercetare.

În primul capitol intitulat *‘Contribuții științifice relevante pentru înțelegerea potențialului litic al unor peptide citotoxice antimicrobiene, considerate antibioticele viitorului’*, după o introducere în contextul actual științific (necesitatea de a dezvolta terapii cu noi modalități de acțiune, impuse de rezistența fiziologică ce apare la produsele farmaceutice actuale, precum și de efectele secundare importante asociate acestora), sunt detaliate studiile implementate cu ajutorul unor tehnici și tehnologii inovante în domeniile biofizicii și electrofiziologiei moleculare, care au pus 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. O abordare în acest sens a fost implementarea unui model molecular alternativ de a explora cantitativ influența exercitată de profilul asimetric biomembranar asupra funcționalității unor proteine și peptide membranare active. 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. Printr-o altă abordare, am inițiat studiul mecanismelor prin intermediul cărora, existența în structura primară a peptidelor antimicrobiene a anumitor aminoacizi, determină funcționalitatea acestora. Astfel un prim pas în identificarea unor noi



structuri peptidice antimicrobiene este acela de a stabili poziția specifică în structura primară a unor astfel de aminoacizi (triptofanul) esențiali pentru potențialul litic asupra membranelor bacteriene. Cercetările realizate în colaborare cu parteneri internaționali (contract cu finanțare internațională România-Coreea, 2015-2022, ‘*Design and Development of Therapeutic AMPs against Epidemic Superbugs*’), au avut rezultate promițătoare în ceea ce privește potențialul citotoxic pe care îl are un nou posibil antibiotic (HPA3NT3-A2) împotriva bacteriilor rezistente la antibioticele clasice cum ar fi *P. aeruginosa*. Cu aceste considerente, studiile sumarizate în acest prim subcapitol, subliniază și evidențiază odată în plus posibilitatea practică prin care, modificând controlabil condițiile fiziologice în care au loc procesele de inserție membranară, pH-ul, temperatura, taria ionică, compoziția bistratului lipidic, putem obține detalii precise privind mecanismele moleculare ce determină efectul litic al unor peptide citotoxice selectate, și permit construcția de novo și predicția activității unor noi peptide antimicrobiene sintetice care să fie lipsite de toxicitatea agenților antibiotici clasici, și care să nu fie afectate de mecanismele obișnuite de rezistență.

Ultimele decenii de dezvoltare în domeniul științelor biomoleculare au pus bazele implementării unor tehnologii dedicate să descifreze comportamentul materiei la nivel unimolecular, ceea ce reprezintă un standard actual de calitate și relevanță în biofizica, fiziologia și biochimia moleculară. În cel de-al doilea subcapitol al primei secțiuni din cadrul acestei teze de abilitare, intitulat ‘*Contribuții științifice relevante în domeniul studierii interacțiunilor fizico-chimice la nivel uni-molecular, cu ajutorul nanoporilor biologici izolați în membrane lipidice artificiale*’ am demonstrat utilitatea nanoporului transmembranar format de proteina oligomerică α -hemolizina (α -HL, sintetizată de agentul patogen *Staphylococcus aureus*) ca biosenzor molecular, sumarizând trei direcții principale de cercetare:

(i) *investigațiile interacțiunilor dintre metalele cationice și peptide amiloidice care stau la baza identificării precoce a unor boli neurologice*. Ținând cont de faptul că ionii metalici joacă un rol crucial în neurotoxicitatea peptidelor amiloidice, studierea interacțiunilor dintre metale și agregatele amiloidice sunt de interes actual iar implementarea unor tehnici eficiente de investigare a acestora poate ajuta la o mai bună înțelegere a mecanismelor ce stau la baza declanșării bolii



Alzheimer și astfel la identificarea unor posibile tratamente clinice care să stopeze evoluția unei asemenea patologii.

(ii) *identificarea strategiilor experimentale care să eficientizeze sistemele de detecție a structurilor peptidice.* Prin potențialul oferit de tehnica înregistrării la nivel uni-molecular cu ajutorul nanoporilor proteici, în identificarea etapelor distincte succesive asociate interacțiunilor dintre peptide și domenii distincte din interiorul nanoporului proteic, am demonstrat posibilitatea de a crește într-o manieră controlată timpul de rezidență în por a macromoleculor gazdă și de a discretiza astfel calea de permeație a acestora corespunzătoare trecerii lor prin compartimentele distincte ale porului, conducând la o înțelegere detaliată a acestor procese complexe de interacțiune. Prin tehnica utilizării biosenzorilor capabili să detecteze procese temporale de ordinul microsecundelor, cum este nanoporul proteic de α -HL, se pot studia modificări foarte rapide în procesele de împachetare structurală a peptidelor de interes biologic induse de diferiți factori chimici sau fizici (agenți de denaturare, temperatură, pH-ul și tăria ionică ale mediului fiziologic), modificări care nu ar putea fi detectate cu sistemele obișnuite de monitorizare. Cercetările colectivului nostru demonstrează posibilitatea practică prin care utilizarea biosenzorilor moleculari poate deveni un element cheie în tehnicile de secvențiere proteică, cu impact major în identificarea rapidă și precoce a unor patologii.

(iii) *detecția moleculară în timp real a fragmentelor scurte monocatenare de ADN.* Identificarea rapidă, ieftină și precisă a fragmentelor (endogene sau exogene) scurte de acizi nucleici monocatenari (ssDNA) permite depistarea precoce a diferitelor boli și identificarea prezenței agenților patogeni virali sau microbieni. Studiile noastre au validat utilitatea biosenzorului α -HL, care împreună cu secvențe de acizi nucleici artificiali (peptide nucleic acids – PNA) nefuncționalizați sau funcționalizați cu polipeptide cationice, poate fi folosit eficient pentru a detecta în mod direct sau indirect fragmente scurte monocatenare de ADN, fără a fi necesară modificarea chimică, amplificarea sau adsorbția pe diferite suprafețe. Abordările strategice propuse, au demonstrat gradul mare de sensibilitate al biosenzorului molecular de α -HL, capabil să distingă detalii cinetice care descriu la nivel unimolecular interacțiuni reversibile dintre nanopor și complecși hibridizați, având astfel potențialul de a identifica o singură bază necomplementară din secvența fragmentelor scurte monocatenare de ADN. În plus, utilizând



sistemul nanopor – AuNP (nanoparticule de aur) - PNA ca transductor molecular pentru detecția individuală a fragmentelor scurte monocatenare de ADN (ssDNA), am obținut un grad ridicat de specificitate (prin contaminarea probei de ssDNA complementar cu alte secvențe necomplementare) și sensibilitate (prin detecția fragmentelor ssDNA la concentrații în domeniul nanomolar) pentru identificarea în timp real a secvențelor de ADN. Beneficiile sociale ale acestor studii constau în dezvoltarea în viitor a medicinei personalizate, bazată pe profilul unic de boală extras din ADN și implementarea facilă a testelor în timp real de analiză a fragmentelor scurte de ADN monocatenar (ssDNA) din sistemul circulator și din probe fiziologice de biopsie.

Un ultim subcapitol al primei secțiuni a tezei, intitulat ‘**Contribuții științifice relevante pentru identificarea mecanismelor de acțiune celulară a virusului SARS-CoV-2**’, face referire la cele mai recente cercetări implementate în contextul pandemiei actuale, declanșată în decembrie 2019 de răspândirea extrem de rapidă a bolii *COVID-19*, care a propulsat în centrul atenției cercetările științifice din domeniul biofizicii, identificându-se astfel noul coronavirus-2 al sindromului respirator acut sever (*SARS-CoV-2*). Numeroase studii au fost inițiate atât pentru detecția rapidă și precisă a noului patogen, cât și pentru a înțelege mecanismele moleculare și celulare care îi conferă acestuia virulența și gradul mare de transmisibilitate. Diagnoza bolii *COVID-19* se realizează în prezent cu tehnici care implică protocoale laborioase, provocări tehnice și costuri substanțiale (RT-PCR, secvențiere genomică, CT, etc.). Astfel că, în contextul răspândirii globale extrem de rapide a noului coronavirus *SARS-CoV-2*, există o necesitate fără precedent de a dezvolta tehnologii portabile și eficiente economic care să permită detecția în scurt timp (de ordinul minutelor) și cu precizie a acestui patogen. Pornind de la aceste premise, am reușit să demonstrăm eficiența biosenzorului molecular de α -hemolizină de a detecta reacțiile imunologice dintre domeniul proteic RBD (*receptor-binding domain*) din subunitatea proteică S1 a proteinei ‘*spike*’ din componența virusului SARS-CoV-2 și un anticorp specific, ceea ce poate fi util în dezvoltarea unor noi tehnologii de diagnoză clinică a unor astfel de patogeni. În plus, cercetările noastre au dovedit științific faptul că astfel de subunități proteice din constituența unor patogeni virali, având rolul binecunoscut de a interacționa specific cu proteine receptoare localizate în membrana celulelor gazdă, pot exercita totodată și un efect relevant fiziologic de permeabilizare a structurilor lipidice membranare, așa cum este efectul atribuit peptidelor antimicrobiene sau



citotoxice. Suplimentar, am abordat un nou concept de implementare a unei metode simple care poate facilita detecția în vitro din mediul fiziologic a subunității proteice *S1* a proteinei ‘*spike*’ din componența virusului *SARS-CoV-2*. Metoda abordată deschide noi perspective de identificare a unor structuri proteice din componența unor agenți virali sau a unor anticorpi specifici, oferind o alternativă rapidă și cu costuri reduse, prin implementarea în platforme de biodetecție portabile, utilizabile complementar cu tehnicile serologice actuale.

În cea de-a doua secțiune a tezei, intitulată ‘*Implementarea expertizei științifice în activitatea didactică. Planuri de evoluție și dezvoltare a carierei*’, autoarea descrie parcursul academic și profesional, implicarea în implementarea tezelor de licență și disertație a studenților pe care i-a coordonat, colaborarea în finalizarea studiilor de doctorat a unor studenți prin implicarea lor în proiecte de cercetare, precum și propunerile de dezvoltare în paralel a celor două direcții ale profesiei de cadru didactic universitar: *cercetare științifică* și *activitate didactică*.