

Studiul efectelor galantaminei și ginkgolidei B asupra bistraturilor lipidice artificiale, prin metoda membranelor lipidice pe suport solid (SSM)

SINTEZA

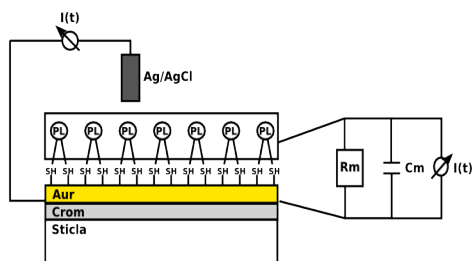
raportului de fază – aprilie 2009

Introducere

Cercetările noastre din etapa precedentă a proiectului de față au arătat că parametrii electrici ai unor membrane lipidice artificiale de tip BLM sunt afectați de prezența GAL, iar efectele sunt dependente de concentrație. Rezultatele au sugerat că mecanismele de la baza acestor modificări presupun atât inserția GAL în bistrat, cât și modificarea momentului de dipol membranar. În etapa de față ne-am propus aprofundarea acestor studii cu ajutorul unei alte metode de investigație, metoda SSM (*solid supported membrane*, membrană lipidică pe suport solid), metodă care are avantajul unei stabilități membranare sporite și care permite în plus schimbul rapid de soluții la nivelul membranei, ceea ce oferă posibilitatea studierii nu doar a fenomenelor de stare staționară, ca în cazul metodei BLM, ci și a fenomenelor tranzitorii (Seifert et al. 1993; Pintschovius & Fendler 1999; Pintschovius et al. 1999; Ganea et al., 2001). Efectele GAL și GKB au fost studiate indirect, prin evidențierea modificărilor induse de acestea asupra amplitudinii semnalelor datorate unor salturi de concentrații ale unor anioni Hofmeister versus soluție inactivă de NaCl.

Material și metodă

Metoda SSM



Metoda SSM (*solid supported membranes*) este o metodă electrofiziologică relativ nouă, care permite studiul parametrilor electrici ai membranelor fosfolipidice artificiale precum și studiul proteinelor de membrană preparate sub formă de proteolipozomi și atașate membranei lipidice. Această metodă are avantajul unei stabilități mai mari a membranelor lipidice față de BLM și a faptului că permite schimbul rapid de soluții care se aplică membranei, astfel încât membrana nu intră în contact cu soluția de studiat decât pentru un interval scurt de timp (Seifert et al. 1993, Pintschovius & Fendler 1999, Pintschovius et al. 1999, Ganea et al., 2001).

Membrana lipidică pe suport solid (SSM) se prepară în modul următor: pe o plăcuță de sticlă se evaporă un strat de crom (50 nm grosime) iar peste acesta se evaporă un strat de aur (150 nm grosime). Stratul de aur servește drept suport pentru formarea membranei lipidice și în același timp ca electrod activ. Pentru a prepara bistratul lipidic se acoperă stratul de aur cu octadecil mercaptan (ODT) care va forma un monostrat de alcantiol. Pentru a obține un dublu strat, suprafața hidrofobă a ODT va fi acoperită cu un monostrat lipidic.

Primul pas în formarea bistratului constă din incubarea timp de 6 ore a electrodului de aur proaspăt preparat cu o soluție de 1 mM octadecil-mercaptan în etanol. Pasul următor a fost efectuat chiar înaintea începerii experimentului propriu zis, prin depunerea a 3-4 microlitri de soluție lipidică de difitanol fosfatidilcolină în n-decan pe suprafața electrodului acoperit deja cu monostratul de alcantiol. Membrana lipidică formată are o arie de 1-2 mm². SSM astfel formată este introdusă într-o cuvă specială și inserată într-un circuit electric.

Soluțiile sunt trimise în cuvă prin intermediul unui sistem de tuburi și valve și prin aplicarea unei presiuni de ca. 0.6 bar. (Ganea et al. 2001). Semnalele generate sunt amplificate cu ajutorul unui amplificator operațional (10⁹ V/A), filtrate și vizualizate pe osciloscop. Capacitatea și conductanța membranei se măsoară prin utilizarea sursei de voltaj U(t) (generator de funcții) conectate la electrodul de referință.

După stabilizarea membranei (proces care durează 1 h – 1,5 h) se măsoară capacitatea și conductanța membranei. Valori tipice sunt de 2-4 nF/mm² pentru capacitate și de 0,2 – 0,6 nS pentru conductanță. O măsurătoare completă implică 3 faze: 1) un flux de soluție inactivă, 2) un flux de soluție activă și 3) din nou un flux de soluție inactivă. Se verifică dacă în sistem există artefacte prin trimiterea sub presiune a soluțiilor tampon în cuva ce conține SSM-ul. În cazul în care asupra membranei sunt trimise doar soluții tampon identice în toate cele trei etape pe ecranul osciloscopului va apărea doar linia de bază, indicând faptul că nu au loc deplasări de sarcini electrice în sistem. Dacă însă printr-un salt de concentrație de soluție activă va apărea un semnal capacitiv,

acesta indică o activitate electrogenică la nivelul sistemului membrană-electrod.

Substanțe și soluții

Au fost utilizate pentru construcția membranelor patru tipuri de lipide: diphtanoilfosfatidilcolina (DPPC), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (DOPG), 1,2-di-(9Z-octadecenoyl)-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) și colesterol (col) (DOTAP se deosebește de DPPC și DOPG prin aceea că este un lipid cationic). Toate lipidele au fost procurate de la Avanti Polar Lipids. DPPC, DOPG și DOTAP au fost depozitate ca stocuri în cloroform, cu concentrații de 20 mg/ml (DPPC) și 10 mg/ml (DOPG și DOTAP). Colesterolul a fost stocat sub formă de pulbere anhidră. Soluțiile pentru construcția membranelor au fost preparate prin dizolvarea cantității corespunzătoare de lipid uscat (prin evaporarea cloroformului în atmosferă de azot) în decan. Soluțiile finale au avut concentrațiile de 1.5g/100ml DPPC, DOPG, DOTAP sau DPPC+col(10%). Pentru experimentele care au implicat GAL, soluția de DPPC a conținut și octadecilamină (Riedel-de-Haen, Hannover, Germania) în concentrație de 0.025%.

GAL (galantamina hidrobromid, Sigma) a fost dizolvată în apă ultrapură până la concentrațiile dorite.

GKB (Ginkgolida B din frunze de Ginkgo Biloba, puritate 90%, Sigma) a fost dizolvată ca stoc 100 mM în etanol (refrigerat), din care s-au realizat diluții succesive în apă ultrapură, până la concentrațiile dorite.

Au fost realizate soluții de NaCl și săruri de sodiu ale unor anioni Hofmeister: NaF, Na₂SO₄, NaCH₃COO, NaBr, NaNO₃, NaI, NaSCN și NaClO₄ în concentrații de 100 mM, în soluție 10 mM TRIS, la pH 7 ajustat cu HEPES. Toate sărurile au fost procurate de la Sigma.

Protocol de lucru

După construcția și stabilizarea membranei, s-au realizat salturi de concentrații ale anionilor Hofmeister împotriva soluției inactice de NaCl, inițial în absența GAL sau GKB. Pentru fiecare salt de concentrație în parte a fost măsurată amplitudinea curentului capacitiv rezultat. După efectuarea setului de măsurători – control, membranele au fost incubate timp de 30 minute cu 40 μl din soluția de GAL sau GKB, după care au fost spălate cu soluție inactivă de NaCl și s-a reluat setul de măsurători. Procedura a fost repetată pentru concentrații progresiv crescute de GAL sau GKB. Pentru GAL, concentrațiile studiate au fost de 0.5 μM, 1 μM, 5 μM, 10 μM și 20 μM. Pentru GKB, s-au utilizat concentrații de 0.01 μM, 0.05 μM, 0.1 μM, 0.5 μM, 1 μM, 5 μM, 10 μM, 50 μM, 100 μM și 200 μM. Fiecare set de experimente a fost repetat pe 2-4 membrane diferite, cu aceeași compoziție.

Analiza datelor

Datele înregistrate au fost normalizate prin raportarea amplitudinii curentilor capacitivi, pentru fiecare anion în parte, la valoarea în absența GAL sau GKB. Rezultatele normalizate au fost mediate pentru 2-4 membrane diferite. Pentru compararea profilurilor de inserție a GAL / GKB, s-a realizat o a doua normalizare a datelor mediate, pentru a obține valori între 0 și 1 (au fost luate în considerare amplitudinile curentilor capacitivi la tot setul de concentrații de GAL / GKB testat, pentru fiecare anion în parte; valoarea normalizată a curentului i_{norm} a fost obținută prin formula:

$$i_{norm} = (i - i_{min}) / (i_{max} - i_{min})$$

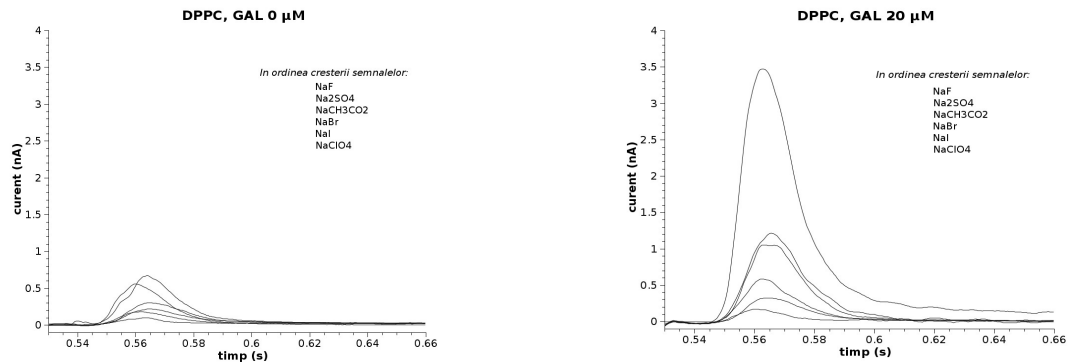
unde i_{max} și i_{min} reprezintă valorile maxime, respectiv minime ale amplitudinii curentilor obținuți pentru un anumit anion, într-un grup de date care include toate concentrațiile testate de GAL / GKB).

Analiza statistică a datelor a fost realizată cu ajutorul programelor Origin 7.5 (Microcal, licențiat Institutului Max Planck de Biofizică din Frankfurt, unde au fost realizate experimentele SSM) și QtiPlot 0.9.7.4 (Copyright 2004-2008 Ion Vasilief, licență GNU-GPL).

Rezultate și discuții

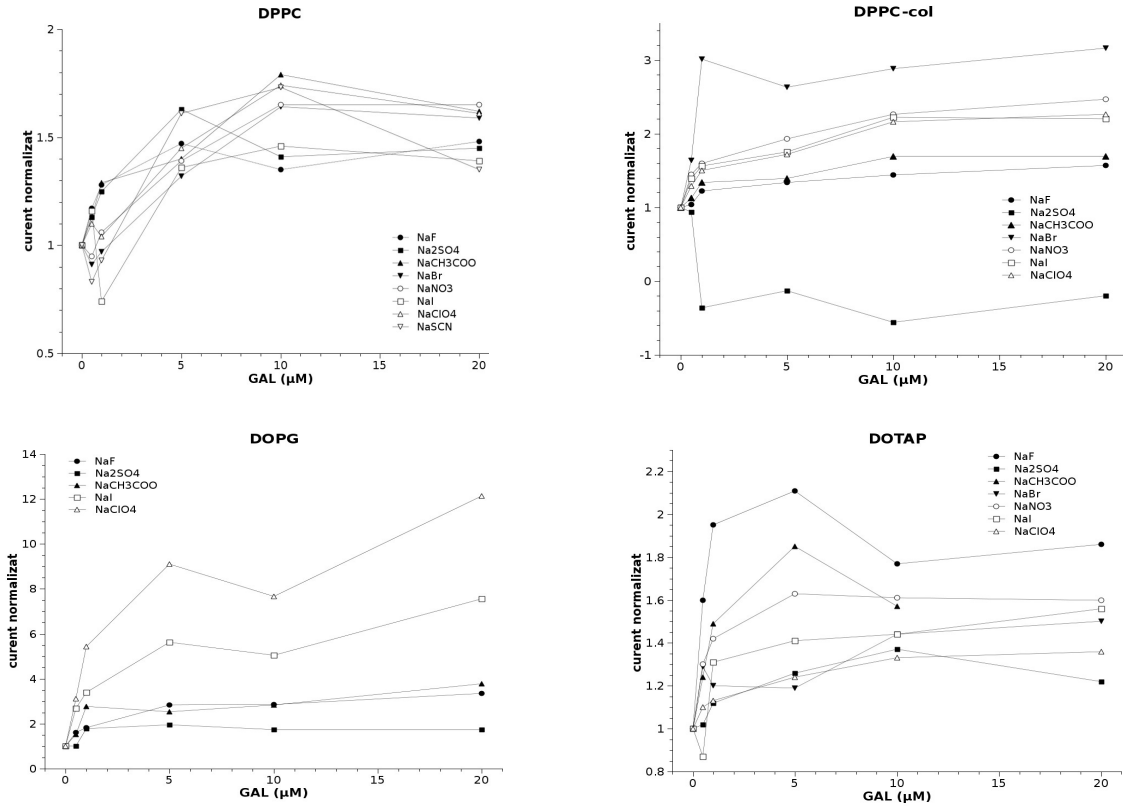
Efectele GAL asupra bistraturilor lipidice artificiale

Incubarea membranelor lipidice artificiale cu soluții de GAL duce la modificarea proprietăților fizice ale acestora, fenomen observat și la experimentele noastre precedente prin metoda BLM. Efectele sunt nelinier dependente de concentrație. Un prim aspect evident este modificarea amplitudinii semnalelor date de sărurile Hofmeister. Prin analiza acestor variații se pot obține informații asupra tipului de interacțiune dintre GAL și bistratul lipidic artificial.



Semnale capacitiv obținute în urma unor salturi de concentrație ale unor anioni Hofmeister

La aplicarea pe membrana lipidică a unor salturi de concentrație ale unor săruri de anioni Hofmeister se înregistrează semnale capacitive a căror amplitudine este proporțională cu poziția anionilor în seria Hofmeister (*articol în pregătire*). Aplicarea de GAL la nivelul membranei SSM determină creșteri ale amplitudinii acestor semnale. Amplitudinile semnalelor capacitive diferă în funcție de tipul de lipid utilizat pentru construcția membranei lipidice și variază în funcție de concentrația de GAL. Rezultatele sunt prezentate grafic în figura de mai jos (fiecare punct experimental reprezintă media rezultatelor obținute pentru 2-4 membrane diferite).



Variația amplitudinii semnalelor capacitive rezultate în urma salturilor de concentrație de anioni Hofmeister, în funcție de concentrația de GAL, pentru diferite tipuri de membrane lipidice.

În cazul membranelor de DPPC se observă pentru anionii situați în domeniul chaotropic al seriei Hofmeister (NaBr, NaNO₃, NaI, NaClO₄ și NaSCN) o scădere a semnalelor la concentrații de GAL de 0.5 – 1 μM. Această scădere implică o scădere a dezechilibrului tranzitoriu de sarcini electrice la suprafața membranei lipidice, ca urmare a aplicării soluțiilor chaotrope, ceea ce sugerează o stabilizare electrică a membranei de către aceste concentrații de GAL. La concentrații mai mari semnalele cresc din nou, depășind cu mult valorile control, sugerând un efect de semn opus al concentrațiilor mai mari de GAL. Aceste rezultate sugerează o curbă doză-efect a GAL în formă de clopot, cu un maxim la 0.5 – 1 μM. O astfel de curbă de efect a GAL a fost raportată în literatură pentru efectele substanței de potențare allosterică (*Santos et al, 2002; Dajas-Bailador et al, 2003; Lopes et al, 2007*) și pentru influența asupra desensibilizării receptorilor nicotiniци (*Popescu et al, 2009*). În acest context, rezultatele noastre sugerează că efectele descrise asupra receptorilor nicotiniци se datorează cel puțin parțial și interferenței nespecifice, la nivel de bistrat lipidic.

Normalizând profilele de dependență prezentate la valori între 0 și 1 se observă o variabilitate extrem de mică a curbelor pentru același tip de membrană, cu independența practic a valorilor normalizate de tipul de anion cu

care s-a realizat saltul de concentrație. Dependența amplitudinii semnalelor de concentrație este sigmoidală, sugerând o cinetică modelată printr-o ecuație de tip Hill:

$$i = k_1[\text{GAL}]^n / (k_2 + [\text{GAL}]^n)$$

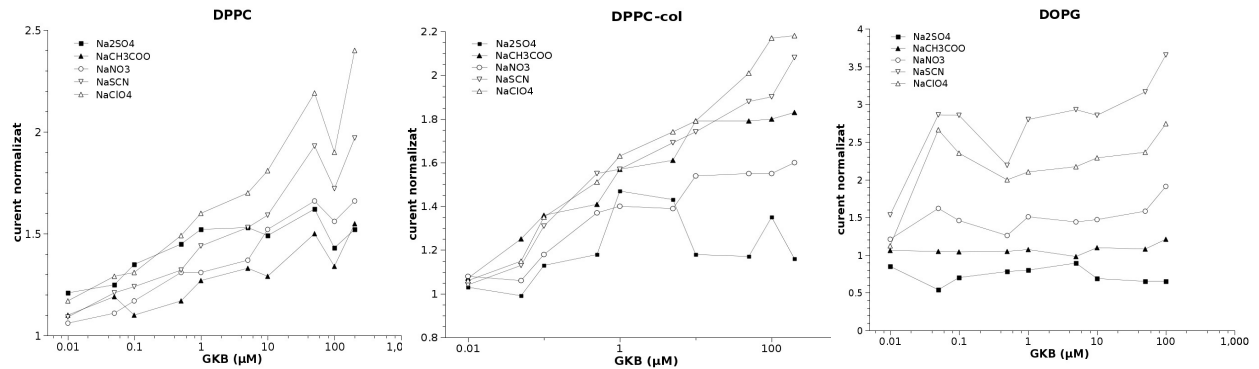
i fiind amplitudinea semnalelor capacitive, k_1 și k_2 constante ale modelului cinetic (k_2 oferă informații asupra afinității de legare a GAL) și n coeficientul Hill, care oferă informații asupra cooperativității legării GAL la bistrat. Valorile parametrilor de fitare sunt redate în tabelul de mai jos:

Parametrii de fitare ai curbelor de dependență normalizate cu o ecuație de tip Hill

	k_1	k_2	n
DPPC	0.92 +/- 0.11	2.47 +/- 1.04	1.5 +/- 0.5
DPPC-col	1.47 +/- 0.94	3.01 +/- 2.6	0.6 +/- 0.3
DOPG	0.95 +/- 0.02	0.52 +/- 0.07	2 +/- 0.2
DOTAP	0.88 +/- 0.03	0.69 +/- 0.1	1.3 +/- 0.2

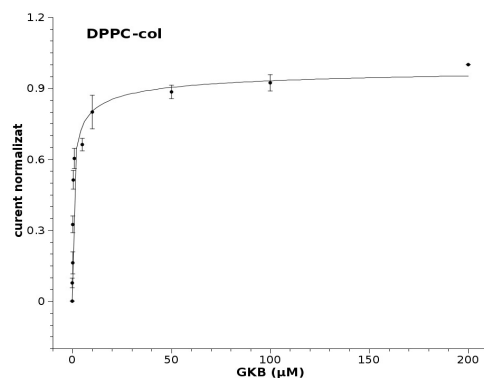
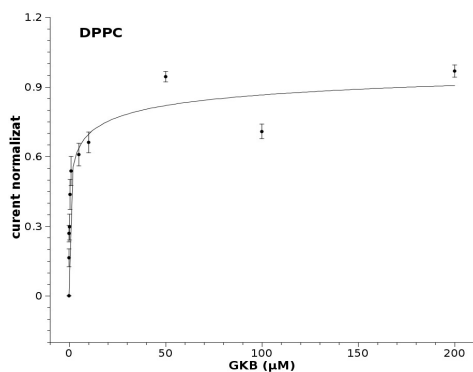
Efectele GKB asupra bistraturilor lipidice artificiale

Ca și în cazul GAL, prezența GKB accentuează efectele Hofmeister asupra membranelor lipidice, fapt evidențiat prin creșterea, dependent de concentrația de GKB, a amplitudinii semnalelor capacitive datorate salturilor de concentrație ale soluțiilor de anioni.



Variația amplitudinii semnalelor capacitive rezultate în urma salturilor de concentrație de anioni Hofmeister, în funcție de concentrația de GKB, pentru diferite tipuri de membrane lipidice.

Pentru membranele de DPPC și DPPC-col se poate observa însă o dependență amplitudine curent – concentrație de GKB neinfluențată de tipul de anion Hofmeister aplicat. Asemănător grupului de experimente cu GAL, prin fitarea datelor experimentale cu o curbă Hill se obțin informații referitoare atât la afinitatea, cât și la cooperativitatea legării GKB de bistratul lipidic artificial pe suport solid.

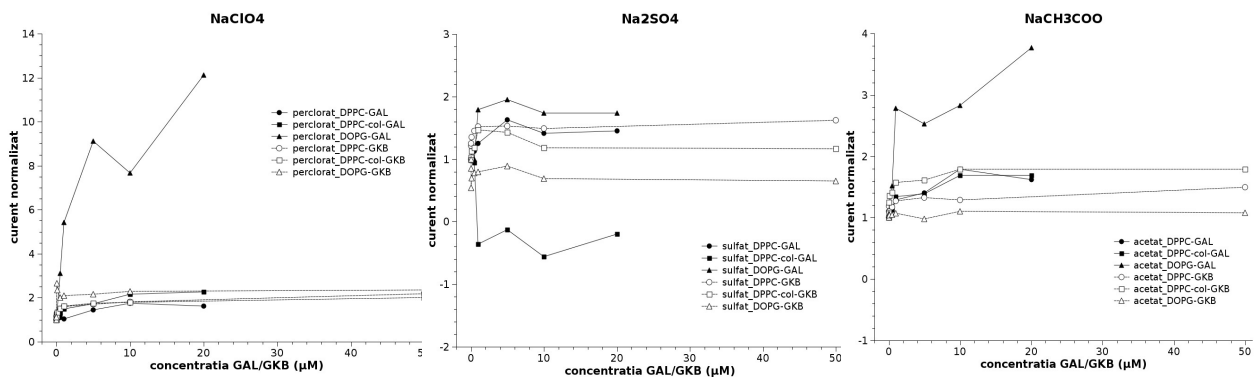


Profile de inserție a GKB în diferite tipuri de membrane lipidice artificiale. Punctele reprezintă datele experimentale, iar liniile continue curbele de fitare cu o ecuație de tip Hill

	k_1	k_2	n
DPPC	1.12 +/- 0.28	1.27 +/- 0.68	0.3 +/- 0.1
DPPC-col	1 +/- 0.06	0.8 +/- 0.16	0.5 +/- 0.07

Se observă cum prezența colesterolului nu influențează semnificativ nici afinitatea GKB pentru membrane, nici cooperativitatea legărilor, ceea ce sugerează faptul că legarea GKB are loc predominant la DPPC și interacțiunea GKB cu moleculele de colesterol este minimă. Coeficienții Hill subunitari sugerează legarea unei molecule de GKB de mai multe molecule de DPPC, fenomen de așteptat de altfel ținând cont de dimensiunea mare a moleculei de GKB și structura sa spațială complexă. Tot structura spațială complexă a GKB poate fi o explicație și pentru labilitatea legării terpenoidului la DOPG.

Efecte comparative



Efectele comparative ale GAL și GKB pe diferite tipuri de membrane

În cazul acetatului se observă creșterea accentuată, comparativ cu restul situațiilor, a semnalelor datorate percloratului pe membrane de DOPG, în prezența GAL. Legarea GAL de DOPG potențează extrem de mult acțiunea chaotropă a anionului, ceea ce se traduce în dezorganizare membranară masivă cu deplasări mari de sarcini la aplicarea de perclorat. Acest fenomen nu se întâlnește în cazul GKB, care dovedește astfel un efect de stabilizare a bistratului de DOPG, comparativ cu GAL.

Concluzii

Efectele GAL asupra bistraturilor lipidice artificiale

- GAL crește amplitudinea semnalelor capacitive produse de salturi de concentrație de anioni Hofmeister la nivelul membranelor lipidice artificiale, prin metoda SSM
- singura excepție de la această regulă este constituită de semnalele generate de salturi de concentrație de sulfat pe membrane de DPPC-colesterol, unde profilul de dependență este imaginea în oglindă a celorlalte profile
- anionii chaotropici prezintă o scădere locală a amplitudinii semnalelor, pentru membrane de DPPC, la concentrații de 0.5 – 1 μ M GAL adăugată membranei, scădere ce poate fi datorată unui efect stabilizator membranar al GAL la aceste concentrații
- efectul stabilizator maxim al GAL pe membranele de DPPC apare la aceleași concentrații unde efectul său de potențare allosterică și de influențare a desensibilizării receptorilor nicotnici este maxim, sugerând că în aceste ultime cazuri sunt implicate și mecanisme nespecifice de acțiune a GAL, prin intervenție la nivel de membrană celulară și nu neapărat de receptor
- GAL induce o dezorganizare structurală mare a membranelor de DOPG, tradusă experimental prin amplitudini mult crescute, dependent de concentrația de GAL, a semnalelor generate de ionii Hofmeister
- legarea GAL la membranele de DPPC și DOPG este un fenomen cooperativ, cu coeficienți Hill de 1.5 respectiv 2
- în cazul membranelor de DPPC-colesterol, legarea GAL are loc probabil la un complex supramolecular (o moleculă de GAL interacționează atât cu o moleculă de DPPC cât și cu una de colesterol), lucru sugerat de coeficientul Hill subunitar
- afinitatea GAL la DPPC nu este influențată semnificativ de prezența colesterolului
- afinitatea GAL pentru membranele de DOPG și DOTAP este similară și semnificativ mai mare față de membranele care conțin DPPC

Efectele GKB asupra bistraturilor lipidice artificiale

- GKB potențează efectele anionilor Hofmeister la nivelul membranelor lipidice de DPPC, DPPC-colesterol și DOPG
- la 100 μ M GKB aplicat membranelor de DPPC se înregistrează o scădere locală a amplitudinii semnalelor, indiferent de anionii Hofmeister aplicați, scădere corelată probabil cu un maxim de stabilitate a membranei
- scăderea locală a semnalelor dispare atunci când colesterolul este adăugat membranelor
- stabilitatea legării GKB la membranele de DOPG este mică, legarea fiind sensibilă la interacțiunea cu anionii Hofmeister (efecte mai evidente pentru anionii mai chaotropi)
- legarea GKB la membranele de DPPC nu este influențată de prezența colesterolului, și presupune probabil legarea unei molecule de GKB la mai multe molecule de DPPC, după cum este sugerat de coeficienții Hill subunitari; ipoteza acestui mecanism este susținută și de dimensiunea mare și complexitatea spațială a moleculei de GKB

Efectele comparative ale GAL și GKB

- pe bistraturile de DOPG, GKB prezintă un efect stabilizator, contrar acțiunii GAL care potențează foarte mult efectele chaotrope (cu creșteri ale semnalelor de mai mult de 10 ori, la concentrații de GAL de 10-20 μM)
- stabilizarea bistraturilor de DOPG de către GKB (efect opus față de GAL) este cel mai vizibilă pentru ionii neutrii-chaotropi, ale căror semnale nu variază semnificativ cu concentrația de GKB (fenomen neîntâlnit pentru membranele tratate cu GKB)
- afinitatea GKB pentru bistraturile lipidice este mai mare decât afinitatea GAL, pentru toate tipurile de lipide studiate
- stabilizarea la o valoare de platou similară a semnalelor datorate anionilor chaotropi (perclorat), indiferent de tipul de lipid sau de substanța aplicată (GAL / GKB) – cu excepția bistraturilor de DOPG tratate cu GAL – sugerează că în apariția semnalelor capacitive rolul dominant îl joacă interacțiunea anion Hofmeister – moleculă lipidică, și mult mai puțin (nesemnificativ) interacțiunea anionilor cu GAL sau GKB

Tinând cont de toate aceste observații, rezultatele obținute în această etapă a proiectului nostru aduc dovezi semnificative în favoarea existenței unei acțiuni nespecifice, la nivel de membrană celulară, atât a GAL cât și a GKB. De această acțiune trebuie ținut cont în interpretarea informațiilor referitoare la acțiunea acestor substanțe asupra receptorilor celulari (membranari), întrucât orice modificare de proprietăți fizice ale membranei induce modificări ale comportamentului cinetic al proteinelor inserate în bistratul lipidic.

Bibliografie selectivă

1. Dajas-Bailador F.A. et al, The allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors by galantamine is transduced into cellular responses in neurons: Ca^{2+} signals and neurotransmitter release, *Mol. Pharmacol.*, **64**:1217-1226, 2003.
2. Dos Santos-Neto L.L. et al, The use of herbal medicine in Alzheimer's disease – A systematic review, *eCAM* **3**(4):441-445, 2006
3. **Ganea, C.**, Pourcher, T., Leblanc, G., Fendler, K., Evidence for Intraprotein Charge Transfer during the Transport Activity of the Melibiose Permease from *Escherichia Coli*, *Biochemistry*, 2001, **40**:13744 – 13752.
4. Pintschovius, J., and Fendler, K., Charge Translocation by the Na^+/K^+ -ATPase Investigated on Solid Supported Membranes: Rapid Solution Exchange with a New Technique, *Biophys. J.*, 1999, **76**:814-826.
5. Pintschovius, J., Fendler, K., and Bamberg, E., Charge translocation by the Na^+/K^+ -ATPase investigated on solid supported membranes: cytoplasmic cation binding and release, *Biophys. J.*, 1999, **76**:827-36.
6. **Popescu, Anca, C. Ganea,** T. Moura, A. Bicho, Galantamine modulates the recovery from desensitization of nicotinic receptors in TE 671 cells, *Rom. Biotechnological Letters*, **14**(1):4104-4118, 2009.
7. Seifert, K., Fendler, K., and Bamberg, E., Charge transport by ion translocating membrane proteins on solid supported membranes, *Biophys. J.*, 1993, **64**:384-391.
8. Woodruff-Pack D. et al, Galantamine: Effect on nicotinic receptor binding, acetylcholine esterase inhibition, and learning, *PNAS*, **98**:2089-2094, 2001.