



RAPORTARE ȘTIINȚIFICĂ

ETAPA I

2021

Detecția multiplex, cu sensibilitate și selectivitate moleculară, a unor miRNAs relevante fiziologic, cu ajutorul unor xeno acizi nucleici

-RNANANODETECT-

Etapa 1 - Caracterizarea macroscopică a complexului PNA-miRNA hibridizat. Detecția amprentei specifice a moleculelor poli(Arg)-PNA, miRNA și a dupleșilor PNA-miRNA utilizând nanoporul de α -HL (partea I).

Unul dintre principalele obiective ale biotehnologiei și nanotehnologiei este acela de a concepe protocoale de detecție a genomului molecular fără a utiliza marcatori moleculari, de a discrimina și manipula molecule individuale de ADN/ARN în soluții apoase. *Tehnica de detecție moleculară la nivel de singură moleculă cu ajutorul nanoporilor* permite detecția directă și în timp real a unei mari varietăți de molecule, cu un cost scăzut și consum redus de materiale.

Principiul de lucru al acestei abordări urmează în general această succesiune de evenimente: (a) un câmp electric conduce o macromoleculă de interes către nanoporul inserat în membrana lipidică, (b) captarea tranzitorie a macromoleculii în interiorul nanoporului duce la deplasarea unui volum de solvent corespunzător în sistem, care implică modificări ale rezistenței electrice ale nanoporului, (c) aplicând o diferență de potențial de o parte și de alta a nanoporului, apar modificări reversibile ale curentului ionic (dat de ionii de K^+ și Cl^- proveniți din disocierea sării KCl din soluția electrofiziologică) măsurat de-a lungul nanoporului, văzute ca evenimente de blocaj ale nanoporului. Analiza statistică a amplitudinii unor astfel de evenimente de blocaj, a duratei blocajului și a frecvenței evenimentelor oferă informații importante despre caracteristicile fizice și chimice ale macromoleculii studiate, cu rezoluție temporală (microsecundă) și rezoluție spațială (scara nanometrică) ridicate.

În implementarea acestei etape, am utilizat metoda de detecție selectivă și de discriminare a secvențelor specifice ale unor secvențe DNA similare cu miRNA cu ajutorul nanosenzorului molecular de α -HL, studiind modificarea curentului ionic de blocaj dată de translocarea prin nanoporul proteic de α -HL a moleculelor de poli(Arg)-PNA, DNA similare cu miRNA și a dupleșilor PNA- DNA similare cu miRNA, în care moleculele de PNA sunt acizi peptidonucleici, analogi sintetici ai moleculelor de DNA, în care structura fosfat-dezoxiriboză este înlocuită cu un lanț polipeptidic. Inițial s-a analizat amprenta specifică a moleculelor de poli(Arg)-PNA și a celor de DNA similare cu miRNA. S-a constatat că moleculele de PNA neutre din punct de vedere electric nu interacționează cu nanoporul, indiferent de polaritatea aplicată (**Figura 1.a, b**) iar moleculele de PNA funcționalizate cu aminoacizi de Arg încărcăți electric pozitiv la $pH=7$,



poli(Arg)-PNA, sunt captate la gura porului de câmpul electric generat de o diferență de potențial transmembranară negativă atunci când sunt adăugate de partea *cis* și translocă spre *trans* (**Figura 1.c, d**).

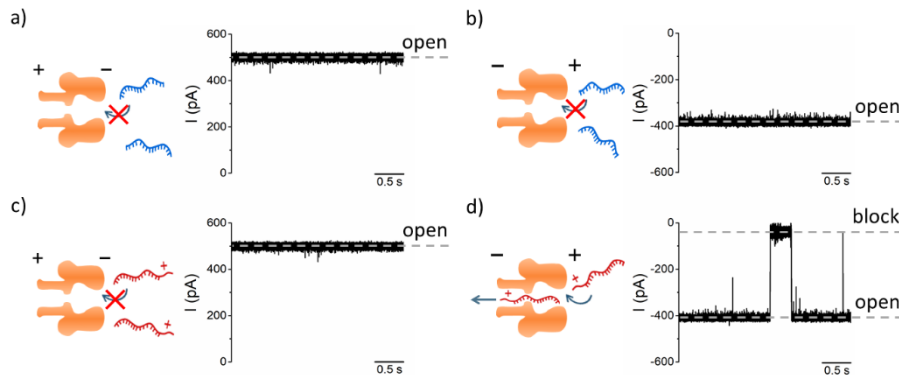


Figura 1. PNA-urile a), b) neutre și c), d) cationice interacționează distinct cu un singur nanopore α -H, în funcție de potențialul a), c) **trans pozitiv** ($\Delta V = + 180$ mV), fie b), d) **trans negativ** ($\Delta V = - 180$ mV). (Dragomir et al., *Anal.Chem*, 2020, 92)

S-a observat că moleculele de DNA similare cu miRNA care translocă prin nanopor din partea *cis* către *trans* dau un blocaj cu o formă specifică și cu o durată de ordinul 10^{-4} s pentru diferențe de potențial cuprinse între 180-200 mV, precum putem observa în **Figura 2. I**

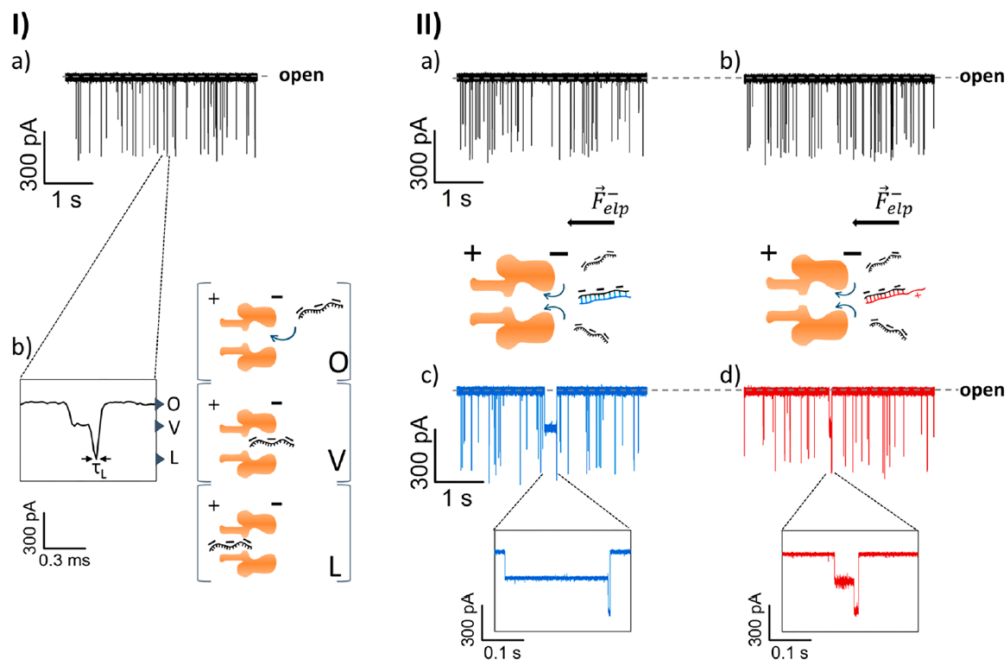


Figura 2. I. Interacțiunea moleculei țintă de DNA similar cu miRNA, cDNA, cu nanoporul proteic de α -HL: a) fluctuațiile reversibile ale curentului ionic date de moleculele țintă cDNA, b) forma semnalului specific unui eveniment de blocaj. II. Interacțiunea moleculei probă PNA și a moleculei țintă de DNA similar cu miRNA, cDNA, cu nanoporul proteic de α -HL: a), b) fluctuațiile reversibile ale curentului



ionice date de moleculă țintă cDNA; semnalul specific interacțiunii **c**) cDNA și BPNA și **d**) cDNA și RPNA. (Dragomir *et al.*, *Anal.Chem.*, 2020, 92)

În conformitate cu constatările anterioare (Asandei A. *et al.*, *ACS Sens.* 2019, 4 (6)), forma semnalului specific translocării unei singure molecule țintă de DNA similară cu miRNA prin nanopor are două trepte, prima fiind dată de pătrunderea moleculei în vestibulul mai larg (substarea V) și a doua, de trecerea prin regiunea de constricție în lumenul nanoporului (substarea L), urmată de ieșirea de partea *trans* a nanoporului.

Pentru a studia semnalul dat de duplecții PNA-DNA similar cu miRNA, în sistemul experimental în care se găsesc moleculele țintă de DNA similar cu miRNA, se adaugă moleculele probă de PNA. Dacă moleculele țintă sunt complementare cu cele probă, atunci va avea loc hibridizarea PNA-DNA similar cu miRNA, ce vor avea un semnal specific complexelor hibridizați, ușor de distins (**Figura 2.II. c, d**). Dacă cele două tipuri de molecule nu sunt complementare, vom identifica în semnalul înregistrat doar amprenta specifică fie a moleculelor de poli(Arg)-PNA și fie a celor de DNA similară cu miRNA. În felul acesta se realizează detecția cu sensibilitate și selectivitate moleculară, a unor DNA similară cu miRNAs relevante fiziologic cu ajutorul sistemului nanopor proteic de α -HL - molecule de PNA.

Act 1.1 - A1.1 Selectarea secvențelor optime a moleculelor de miRNA țintă și PNA probă în vederea obținerii unei hibridizări eficiente în soluția fiziologică. Investigarea stabilității complexelor PNA-miRNA dublu catenari și discriminarea acestora pe baza complementarității sau necomplementarității acestora prin tehnici de spectroscopie și calorimetrie de titrare izotermică (ITC).

Pentru a obține o hibridizare eficientă în soluția electrofiziologică, am testat o moleculă țintă de DNA similară cu miRNA, cDNA, complementară cu două tipuri de molecule PNA probă, și anume BPNA ce conține nucleobazele complementare și RPNA, care are în plus un lanț polipeptidic (R)₁₀ conjugat la capătul 5' terminal. Acest lanț polipeptidic îi conferă moleculei de RPNA o sarcină electrică net pozitivă dată de aminoacizii de arginină (soluție electrofiziologică 3 M KCl, și 10 mM HEPES, pH = 7.3).

Tabel 1. Secvențele primare ale moleculelor de interes. Moleculele BPNA și RPNA au aceeași structură primară, complementară moleculei de cDNA, însă molecula de RPNA prezintă o polipeptidă (R)₁₀.

Secvența primară a moleculelor de interes	
cDNA	3'- CACTATATGCCACTA - 5'
RPNA	Ac-(R) ₁₀ -5'- GTGATATACGGTGAT - 3'
BPNA	5'- GTGATATACGGTGAT - 3'

S-au adăugat în zona *cis* a nanoporului proteic moleculele de cDNA în concentrație de 0.5 μ M, după care s-au adăugat moleculele de PNA în concentrație de 5 μ M. Odată adăugate la *cis*,



moleculele probă de PNA vor hibridiza cu moleculele țintă de DNA similare cu miRNA, procesul fiind vizibil în curentul ionic mediat de nanoporul proteic. Complexul hibridizat BPNA-cDNA are o sarcină electrică netă negativă dată de grupările fosfat ale cDNA-ului de -15 e^- , molecula de BPNA fiind neutră. Complexul RPNA-cDNA are o structură de dipol electric, dată de secvența polipeptidică $(R)_{10}$ pozitivă cu o sarcină electrică de 10 e^- și sarcina negativă a grupărilor fosfat ale cDNA-ului de -15 e^- , complexul având o sarcină electrică netă de -5 e^- . Complecșii cu sarcini electrice nete negative vor fi dirijați în sensul *cis-trans* de către forța electroforetică \vec{F}_{elp}^- și vor putea fi discriminați în funcție de amprenta specifică a fiecăruia în curentul ionic mediat de nanopor.

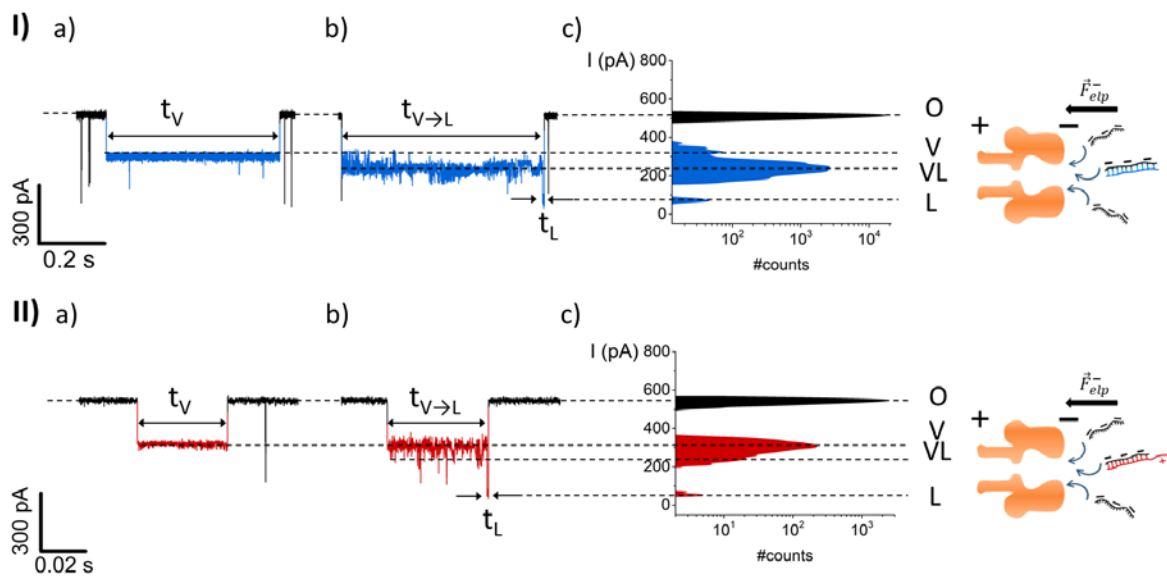


Figura 3. Ilustrarea tipurilor de evenimente rezultate în urma interacțiunii dintre nanoporul proteic de α -HL și complecșii moleculari: I. BPNA-cDNA și II. RPNA-cDNA. Se observă două tipuri de evenimente: **I.a)** și **II.a)** complexul este captat în interiorul vestibulului apoi se întoarce în zona *cis* a nanoporului, respectiv evenimentele în care complexul a disociat în molecula de cDNA ce va transloca mai departe prin lumen spre *trans* și în moleculele de BPNA **I.b)**, respectiv RPNA **II.b)**, care se întorc în zona *cis*. Histogramele din dreapta ilustrează amplitudinea evenimentelor de blocaj produse de BPNA-cDNA **I.c)** și RPNA-cDNA **II.c)**. (Dragomir et al., Anal.Chem, 2020, 92)

Din motive sterice și de volum, complexul PNA-cDNA cu un diametru de 2 nm pătrunde în vestibul cu diametru interior de 2,6 nm dar nu poate transloca mai departe prin zona de constricție ce măsoară 1,4 nm în diametru. Astfel, s-au observat că în urma interacțiunii dintre complecșii moleculari PNA-cDNA și nanoporul proteic de α -HL rezultă două tipuri de evenimente: cele corespunzătoare întoarcerii în zona *cis* a complexului aflat în vestibul, fără a se produce desfacerea complexului, ca în **Figura 3. I.a)** și **II.a)**, respectiv evenimentele în care complexul a disociat în molecula de cDNA ce va transloca mai departe prin lumen spre *trans* și moleculele de BPNA (**Figura 3. I.b)**, respectiv RPNA (**Figura 3. II.b)**, care se întorc în zona *cis*.

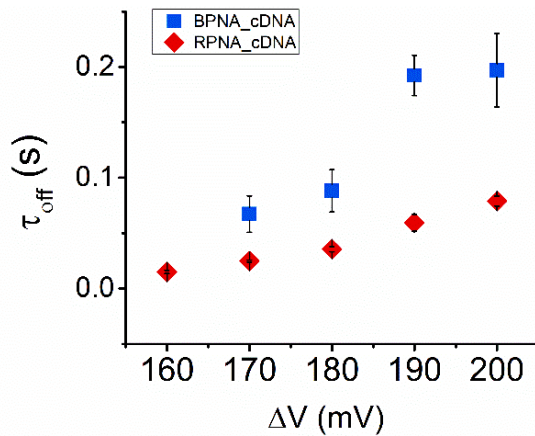


Figura 4. Dependența timpilor medii ai evenimentelor de blocaj de diferența de potențial în cazul complexului BPNA-cDNA (■) și cel de RPNA-cDNA (♦). Valorile timpului mediu corespunzător evenimentelor de blocaj date de complexul BPNA-cDNA sunt mai mari decât cele date de complexul cDNA-RPNA. În ambele cazuri, durata blocajelor crește odată cu diferența de potențial transmembranar aplicată.

S-a observat că timpul mediu al unui blocaj dat de BPNA-cDNA ($\tau_{off \text{ BPNA-cDNA}} = 0.196 \pm 0.033$ s la $\Delta V = +200$ mV) este mai mare față de cel dat de RPNA-cDNA ($\tau_{off \text{ RPNA-cDNA}} = 0.078 \pm 0.004$ s la $\Delta V = +200$ mV), asta pentru că în cazul structurii moleculare de tip macrodipol BPNA-cDNA acționează două forțe electroforetice în sens opus asupra componentelor încărcate ale complexului, ce duc la ruperea acesteia într-un timp mai scurt, spre deosebire de complexul BPNA-cDNA negativ, asupra căruia acționează o singură forță electroforetică, spre *trans*.

Analizând timpul mediu de interacțiune a complecșilor cu nanoporul proteic de α -HL (**Figura 4.**) putem investiga stabilitatea complecșilor PNA-DNA similar cu miRNA dublu catenari fără a folosi tehnici precum tehnici de spectroscopie și calorimetrie de titrare izotermică (ITC), care necesită o concentrație mult mai mare de molecule, datele obținute din experimentele de electrofiziologie (constantele de reacție) fiind corelate cu rezultatele pe care le-am fi obținut utilizând tehnicile menționate. Observăm că este mai stabil complexul BPNA-cDNA față de cel RPNA-cDNA cu structură de macrodipol.

Act 1.2 - A1.2 Analiza termodinamică a influenței funcționalizării moleculelor de PNA cu polipeptide de arginină, de diferite lungimi, asupra energiei de asociere a complecșilor PNA-miRNA.

Pe baza rezultatelor obținute s-a realizat un model cinetic care descrie interacțiunea stohastică dintre nanoporul proteic de α -HL și complecșii moleculari PNA-DNA similar cu miRNA (**Figura 5.**), util în analiza energiei de asociere a acestora.

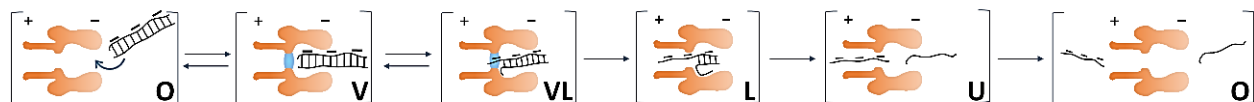


Figura 5. Modelul cinetic care descrie interacțiunea dintre nanoporul proteic de α -HL și complecșii moleculari PNA-cDNA: starea "O" este dată de porul liber; starea "V" dată de duplexul ce pătrunde în interiorul vestibulului; procesul de desfacere a complexului PNA-cDNA (*unzipping*) începe cu captarea în lumen a secvenței cDNA din complexul aflat în vestibul, starea "VL"; pe măsură ce molecula de cDNA translocă prin lumen în starea "L", complexul se desface treptat, până când cele două molecule se desprind



în totalitate una de cealaltă, starea "U", iar molecula de cDNA translocă de partea *trans* și molecula de PNA difuzează în partea *cis*, sistemul revenind la starea "O". (Dragomir et al., *Anal. Chem*, 2020, 92)

Analizând constanta de disociere completă a complexelor moleculare PNA-cDNA aflați în zona vestibulului nanoporului (k_{LU}), s-a observat că disocierea complexelor de tip macrodipol RPNA-cDNA este mai rapidă decât cea a complexelor BPNA-cDNA (**Figura 6, a**), ceea ce înseamnă că energia de asociere este mai mare în cazul complexului BPNA-cDNA fără lanțul poli(Arg) conjugat. Prezența cozii de poliarginine în cazul complexului RPNA-cDNA contribuie la existența a două forțe electroforetice de sens opus ce acționează asupra complexului (F_{el} care acționează asupra poli(Arg) încărcată electric pozitiv și F_{elp} care acționează asupra moleculei de cDNA încărcată electric negativ), ca în **Figura 6, b**), apărute în urma aplicării unei diferențe de potențial electric transmembrantar, ΔV . Această configurație duce la scăderea energiei libere de desfacere a duplexului RPNA-cDNA (ΔG_{\blacklozenge}) în comparație cu cea a duplexului BPNA-cDNA (ΔG_{\blacksquare}), conferindu-i celui din urmă o stabilitate mai ridicată (**Figura 6. b**).

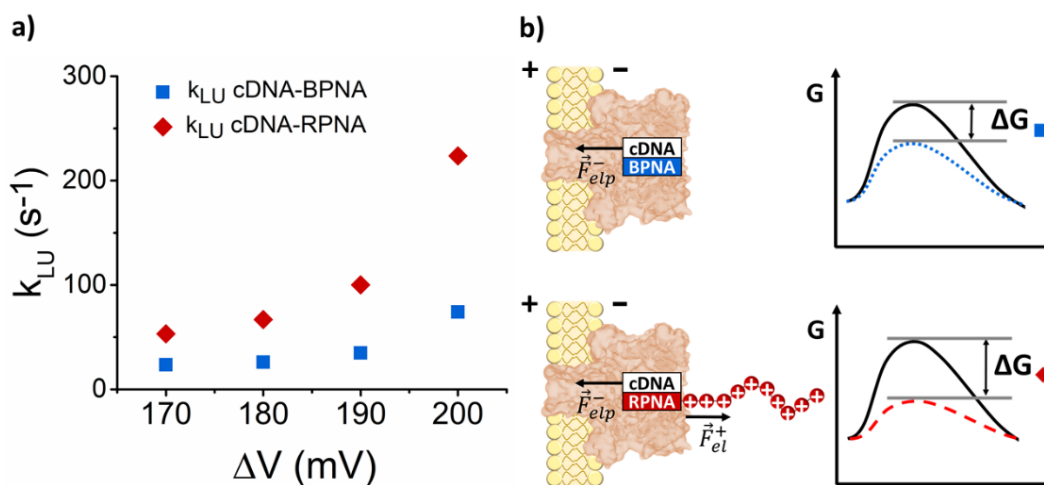


Figura 6. a) Estimarea calitativă a constantei de reacție k_{LU} ce caracterizează cinetica de desfacere completă a complexului PNA-cDNA similar cu miRNA; **b)** Evidențierea energiei libere de desfacere (ΔG) a complexului BPNA-cDNA(\blacksquare) și RPNA-cDNA(\blacklozenge). (Dragomir et al., *Anal. Chem*, 2020, 92)

Act 1.3 - A.2.1 Monitorizarea dependenței de concentrație și potențial a semnalului generat de miRNA (molecula țintă) și poli(Arg)-PNA (molecula probă) în interacțiunile reversibile cu nanoporul de α -HL

În urma mai multor experimente, s-a constatat că utilizarea unui raport molar de 1:10 cDNA:PNA, moleculele de PNA fiind în exces, este mai adecvată deoarece crește probabilitatea de hibridizare. Astfel că s-au adăugat de partea *cis* a nanoporului proteic de α -HL moleculele de cDNA în concentrație de 0.5 μ M și moleculele de PNA în concentrație de 5 μ M.

S-a analizat dependența de potențialul aplicat a intervalelor de timp necesare translocării prin lumen a fragmentelor de cDNA adăugate în partea *cis* a nanoporului și cele provenite în urma



desfacerii complexelor BPNA-cDNA și RPNA-cDNA aflați în vestibul (**Figura 7. a**) și s-a observat că timpurile de translocare scad odată cu creșterea potențialului aplicat, așa cum ne-am fi așteptat, datorită creșterii forței electrice care acționează asupra moleculelor.

De asemenea, putem vedea că timpul de translocare a unei molecule de cDNA individuale este cu două ordine de mărime mai mare decât cel al unei molecule provenite din duplexul PNA-cDNA aflat în vestibulul nanoporului de α -HL. O altă observație este faptul că timpul de translocare a cDNA-ului provenit din complexul mai stabil BPNA-cDNA este aproximativ dublu față de cel specific cDNA-ului provenit din duplexul cDNA-RPNA, datorită forței electrice suplimentare resimțită de poli(Arg) din complexul RPNA-cDNA care duce la ruperea mai rapidă a complexului, deci la o translocare mai rapidă a moleculei de cDNA prin lumen.

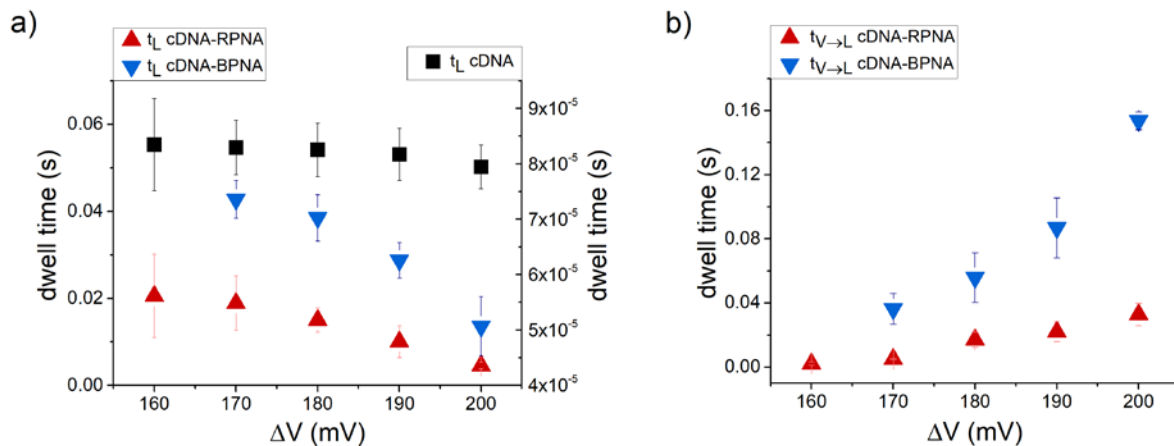


Figura 7. Dependența de potențial a intervalelor de timp asociate cu interacțiunea moleculelor probă de poli(Arg)-PNA și a moleculelor țintă cDNA similar cu miRNA cu α -HL. (a) Timpul mediu corespunzător stărilor moleculare în care fragmentele de cDNA adăugate în partea *cis* (■) și cele provenite în urma desfacerii complexelor aflați în vestibul BPNA-cDNA (▼) și RPNA-cDNA (▲) translocă prin lumenul nanoporului. (b) Duratele medii corespunzătoare tranzițiilor vestibul-lumen întreprinse de BPNA-cDNA (▼) sau RPNA-cDNA (▲), captate inițial în interiorul vestibulului nanoporului. (Dragomir *et al.*, *Anal.Chem.*, 2020, 92)

Duratele medii corespunzătoare tranzițiilor vestibul-lumen ale complexelor BPNA-cDNA și RPNA-cDNA (**Figura 7. b**) cresc odată cu creșterea potențialului aplicat, lucru surprinzător. O posibilă explicație este aceea că la diferențe de potențial ridicate, interacțiunea dintre complex și zona de constricție este mai puternică iar molecula de cDNA reușește mai greu să ajungă într-o conformație favorabilă pătrunderii în zona de constricție de 1,5 nm, ca apoi să transloce prin lumen. Astfel complexul zăbovește un timp $t_{V \rightarrow L}$ mai lung în vestibul la potențiale mari, până când molecula de cDNA găsește o poziție favorabilă începerii procesului de desfacere.

Așadar, în interacțiunea dintre nanoporul de α -HL și complexe PNA-DNA similar cu miRNA, forțele electroforetice opuse, direct proporționale cu potențialul aplicat, duc la scăderea timpului de rupere a complexului cDNA-RPNA, care are o structură de macrodipol dată de sarcina negativă a back-bone-ului cDNA și de polipeptida conjugată secvenței de PNA complementară.



Act 1.4 - A2.2 Identificarea condițiilor optime pentru îmbunătățirea captării de către nanopor a moleculelor de interes și creșterea sensibilității de detecție a duplecșilor PNA-miRNA

În studiile descrise mai sus, în care s-au folosit ca molecula țintă cDNA și ca moleculă probă BPNA și RPNA, zona de adăugare a fost aleasă *cis* pentru a servi mai bine scopului experimentului și s-au aplicat potențiale pozitive datorită faptului că molecula de DNA similară cu miRNA are o sarcină electrică netă negativă și astfel se va îndrepta dinspre *cis* către *trans* în câmpul electric derivat din diferența de potențial transmembrantar, facilitând interacțiunea și translocarea prin nanoporul proteic.

Am testat alte două tipuri de molecule țintă (DNA_i) și probă (pb_i) pentru a determina condițiile optime tipului de experiment și am folosit diverse configurații experimentale în care am modificat zona de adăugare a moleculelor de interes (*cis* sau *trans*) și polaritatea potențialului transmembrantar aplicat (+ sau -).

Tabel 2. Secvențele primare ale moleculelor de interes: moleculele probă pb3 respectiv pb4 sunt complementare cu moleculele țintă DNA1 respectiv DNA2,

pb3	CTT TTG GTG T RRRRRRRRR
pb4	GTT TGT TCT G RRRRR
DNA1	ACA CCA AAA G ATCACATTGG (5 → 3)
DNA2	CAG AAC AAA C CCAAGGAAAT (5 → 3)

Captarea moleculelor de interes de către nanopor este guvernată de câteva efecte concurente, cele mai importante fiind: electroforeza, penalizarea entropică dată de limitarea fizică, contribuția entalpică asociată interacțiunilor specifice dintre peptide și intrarea în por și electroosmoza. Nanoporul proteic heptameric de α -HL este asimetric din punct de vedere geometric și electric, astfel că cele patru efecte menționate mai sus vor altera diferit rata de captură a analitului de fiecare parte a nanoporului.

În urma experimentelor s-a constatat că pentru a atinge obiectivul propus este necesară configurația experimentală în care moleculele de interes sunt adăugate în partea *trans* a nanoporului molecular și sunt aplicate diferențe de potențial transmembrantar pozitive. În cazul celorlalte configurații, complexul nu a putut fi detectat.

O posibilă explicație este dată de efectul interacțiunii electrostatice de atracție dintre moleculele încărcate electric pozitiv din constituența duplecșilor moleculari (molecule de DNA similare cu miRNA, denumite aici pb_i) și aminoacizii încărcăți negativ de la gura lumenului ($q_{ring} = -7e^{-}$). O altă explicație este dată de faptul că forța electroforetică este mai intensă de partea *trans* a nanoporului, la intrarea în lumenul β -barrel, față de intrarea în vestibulul nanoporului, de partea *cis*. La o primă aproximație, considerând nanoporul și membrana izolatori perfecți, în cazul de staționaritate, câmpul electric este mai intens în zona mai îngustă a canalului ionic. În consecință,



câmpul electric la intrarea în lumen este mai mare decât cel de la intrarea în vestibulul porului, ceea ce duce la o probabilitate de captare crescută a complexului în zona *trans*.

Act 1.5 - A.2.3 Selectarea și testarea unor molecule PNA funcționalizate cu cozi de poliarginină de diferite lungimi în vederea obținerii unui semnal specific, dependent de lungimea cozii, la interacțiunea cu un singur por de α -HL (partea I).

Pentru a crește eficiența metodei și a controla diferiți parametri precum stabilitatea duplexului PNA-miRNA, am testat molecule PNA funcționalizate cu cozi de poliarginină de diferite lungimi și am analizat semnalele date de acestea în urma interacțiunii cu un nanopor proteic de α -HL. Moleculele de PNA utilizate sunt: **pb3** – **CTT TTG GTG T** – (R)₉ ce conțin 9 aminoacizi de arginine și **pb4** – **GTT TGT TCT G** – (R)₅ cu 5 aminoacizi de arginine.

Moleculele de PNA au fost adăugate în compartimentul *trans*, într-o concentrație de 4 μ M, și s-au aplicat diferențe de potențial transmembranar pozitive, astfel că moleculele difuzate în zona lumenului, sunt captate electroforetic de către nanopor și translocă prin canalul ionic, ajungând în final în compartimentul *cis*. Modul de interacțiune cu nanoporul de α -HL (τ_{on}) și timpul de translocare (τ_{off}) diferă pentru pb3 și pb4 după cum se observă în **Figura 8**.

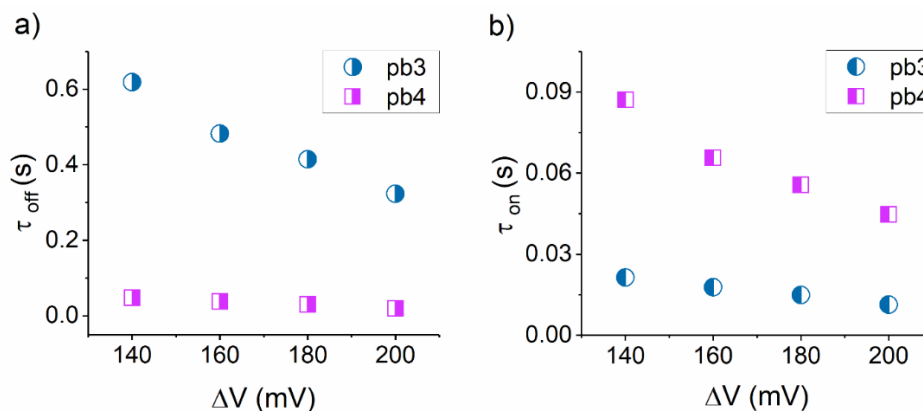


Figura 8. Cinetica de interacțiune a nanoporului proteic de α -HL și a moleculelor probă, pb3 și pb4, adăugate în concentrație de 4 μ M în compartimentul *trans*: a) τ_{off} este timpul de translocare a moleculei prin nanopor, b) τ_{on} reprezintă intervalul de timp dintre două evenimente succesive.

Putem observa că timpul de translocare prin nanopor, τ_{off} , este mai mare în cazul pb3 - (R)₉ față de pb4 - (R)₅, și, de asemenea, variația cu potențialul aplicat este mai rapidă. Având un număr mai mare de aminoacizi încărcăți electric pozitiv, interacțiunea electrostatică de atracție dintre aceștia și sarcinile electrice negative ale reziduurilor aminoacidice de pe suprafața internă a canalului ionic duce la o translocare mai lentă a moleculei pb3 prin nanopor. Odată cu creșterea diferenței de potențial transmembranar aplicată, lanțul de poliarginine din pb3 va simți o forță electroforetică mai puternică, ceea ce va duce la înalțarea de-a lungul câmpului electric și la o translocare din ce în ce mai rapidă. În cazul intervalului de timp dintre două evenimente succesive, τ_{on} , observăm că interacțiunea dintre pb3 - (R)₉ și nanoporul proteic este mai rapidă față de cea cu



pb4 - (R)₅, datorită atracției electrostaice augmentate dintre cele nouă arginine și aminoacizii negativi de la intrarea în lumen și a faptului că pb3 - (R)₉ este liniarizată în măsură mai mare față de pb4 - (R)₅ în câmpul electric resimțit de molecule .

Pentru a studia comportamentul celor două molecule probă de PNA funcționalizate cu cozi de poliarginină de diferite lungimi în interiorul canalului ionic al nanoporului proteic de α -HL, am calculat amplitudinea blocajului relativ corespunzătoare curentului ionic rezidual I_{block} astfel:

$$\frac{\Delta I_{block}}{I_{open}} = \frac{I_{block} - I_{open}}{I_{open}}$$

unde I_{open} reprezintă intensitatea curentului ionic măsurată prin porul liber de α -HL iar I_{block} corespunde intensității de blocaj dat de interacțiunea moleculei cu nanoporul proteic.

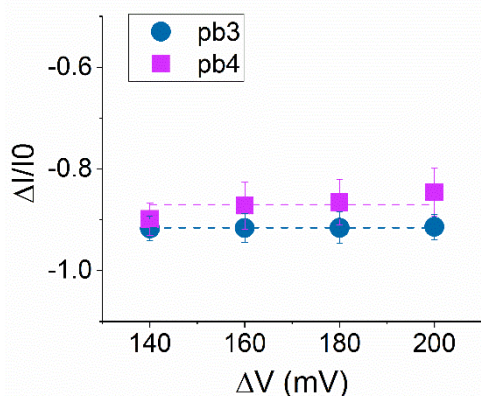


Figura 9. Variația amplitudinii blocajului relativ corespunzător interacțiunii moleculelor PNA cu nanoporul proteic de α -HL. Cu albastru sunt reprezentate valorile pentru moleculele de pb3 iar cu magenta sunt reprezentate valorile pentru moleculele de pb4. Liniile punctate reprezintă fitarea liniară a valorilor cu pantă constantă fixată la valoarea 0.

Ținând cont de faptul că amplitudinea blocajului relativ în curentul ionic are valori negative, în **Figura 9**, observăm că moleculele de pb3 - (R)₉ blochează canalul ionic într-o măsură mai mare ($|\Delta I_{block}/I_{open} \text{ pb3}| = 0.9156 \pm 0.0007$) față de moleculele de pb4 - (R)₅ ($|\Delta I_{block}/I_{open} \text{ pb4}| = 0.8705 \pm 0.0109$), posibil datorită dimensiunilor mai mari și a interacțiunii celor 9 arginine cu aminoacizii de pe suprafața interioară a nanoporului.

Am reușit astfel să îndeplinim obiectivele pe care le-am propus și să demonstrăm viabilitatea tehnicii, urmând ca în etapele următoare să eficientizăm detecția multiplex, cu sensibilitate și selectivitate moleculară, a unor molecule de DNA similare cu miRNAs relevante fiziologic, cu ajutorul sistemului nanopor biologic – molecule de poli(Arg)-PNA.



Rezultatele și modul de diseminare a rezultatelor.

În această etapă au fost publicate un număr de 4 articole cu factor de impact, trei din acestea fiind în zona roșie (Q1):

1. Schiopu Irina, Asandei Alina, Mereuta Loredana, Dragomir Isabela, Bucataru Ioana Cezara, Luchian Tudor. Single-molecule detection and manipulation with biological nanopores. *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Chemia* . **2021**, 66 161-174.
2. Alina Asandei, Loredana Mereuta, Irina Schiopu, Yoonkyung Park, Tudor Luchian. Teaching an old dog new tricks: A lipid membrane-based electric immunosensor for real-time probing of the spike S-1 protein subunit from SARS-CoV-2. *Proteomics*, **2021**, e2100047.
3. Tudor Luchian, Loredana Mereuta, Yoonkyung Park, Alina Asandei, Irina Schiopu. Single-molecule, hybridization-based strategies for short nucleic acids detection and recognition with nanopores. *Proteomics*, **2021**, e2100046.
4. Isabela S Dragomir, Alina Asandei, Irina Schiopu, Ioana C Bucataru, Loredana Mereuta, Tudor Luchian. The Nanopore-Tweezing-Based, Targeted Detection of Nucleobases on Short Functionalized Peptide Nucleic Acid Sequences. *Polymers*, **2021** 13, 1210.

15.11.2021

Director de proiect,

Prof. Univ. Dr. Tudor LUCHIAN