



## RAPORTARE ȘTIINȚIFICĂ

## ETAPA A III-A

2023

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

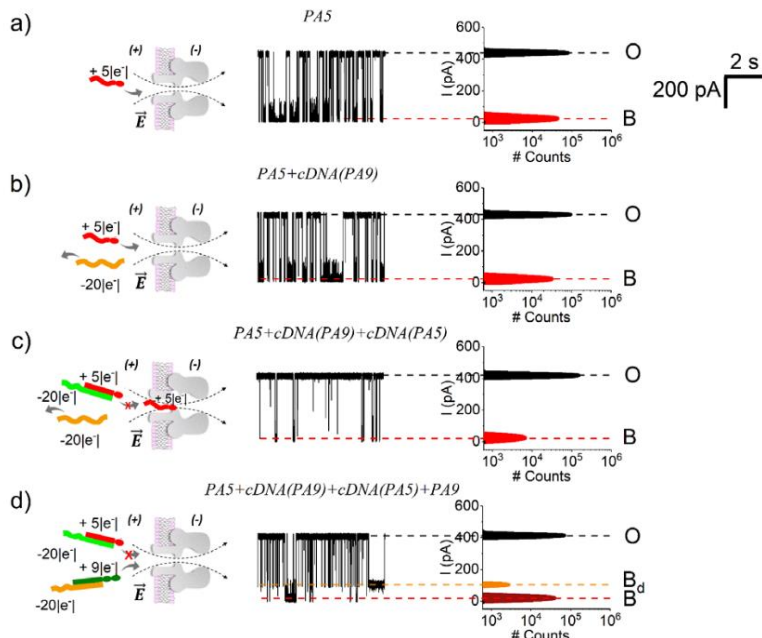
**-RNANANODETECT-**

**Etapa 3 - Analiza multiplex a profilelor diferitelor molecule de miRNAs, în soluții electrolitice. Evaluarea capacității nanosenzorului bazat pe  $\alpha$ -HL pentru detecția directă, multiplex a miRNA din probe biologice.**

În etapele anterioare am demonstrat posibilitatea detecției moleculelor de DNA monocatenar similar cu miRNA cu ajutorul unei tehnici la nivel de singură moleculă cu un biosensor nanoproteic de  $\alpha$ -HL, care nu necesită marcarea probelor sau amplificarea semnalului, bazată pe complementaritatea dintre secvența acidului nucleic țintă și secvența acid nucleic probă.

**Act 3.1 - A4.1 Optimizarea captării duplexului PNA-miRNA de către nanopor prin ajustarea lungimii polipeptidei de arginină atașate moleculelor de PNA și determinarea ulterioară a sensibilității de identificare a duplexului dintr-o soluție ce conține diferite molecule miRNA.**

Am reușit discriminarea multiplex a moleculelor țintă de DNA monocatenar similar cu miRNA folosind acizi nucleici probă, poli(Arg)-PNA, funcționalizați cu diferite lungimi polipeptidice de arginină la capătul C terminal.



**Fig. 1. O metodă directă pentru detecția multiplex a secvențelor de acizi nucleici scurte. a)** Interacțiuni reversibile ale moleculelor de PA5 (4  $\mu$ M) cu nanoporul de  $\alpha$ -HL măsurate la  $\Delta V = +140$  mV **b)** și la adăugarea secvențelor țintă necomplementare cDNA(PA9) (8  $\mu$ M), respectiv **c)** la adăugarea moleculelor țintă complementare cDNA(PA5) (8  $\mu$ M). **d)** Adăugarea ulterioară a moleculelor probă PA9 (4  $\mu$ M), complementare cu cDNA(PA9) deja prezent a generat o stare de blocare suplimentară corespunzătoare complexelor hibridizate PA9-cDNA(PA9) (Bd). Soluția electrofiziologică are 3M KCl, pH = 7. (Mereuță et al., Anal. Chem 2022, 94)

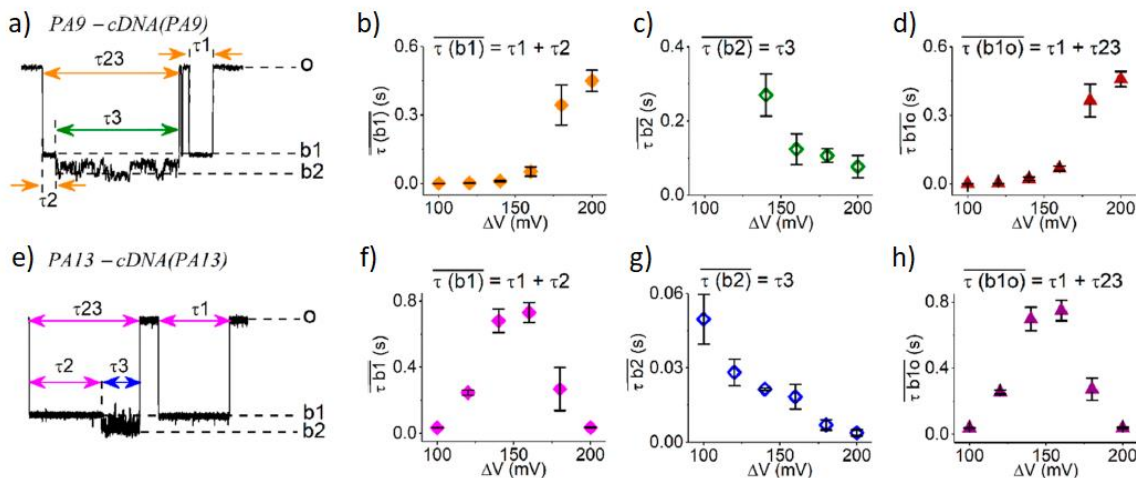


Pentru optimizarea captării duplexului PNA-DNA similar cu miRNA de către nanopor am testat două molecule probă, funcționalizate cu o polipeptidă formată din 5 aminoacizi, PA5, respectiv 9 aminoacizi de arginină, PA9. Astfel, în zona *trans* a nanoporului s-a adăugat inițial molecula probă de PA5 (**Fig. 1, a**), apoi molecula țintă necomplementară de cDNA(PA9) (**Fig. 1, b**), obținându-se un semnal specific acestor secvențe de acizi nucleici (nivelul B din histograma amplitudinilor), din cauza faptului că cele două nu sunt complementare, ele nu hibridizează. La adăugarea moleculei țintă complementară secvenței PA5 nu s-a produs schimbare în semnal (**Fig. 1, c**), semn că duplexul molecular PA5-cDNA(PA5) nu interacționează cu nanoporul. O posibilă explicație este dată de sarcina electrică negativă mare a duplexului, astfel că molecula resimte o forță electroforetică ce o îndepărtează de la gura nanoporului. La adăugarea în sistem a moleculelor probă de PA9 se observă apariția unui nivel suplimentar B<sub>d</sub> (**Fig. 1, d**), specific complexului hibridizat PA9-cDNA(PA9).

Așadar, metoda de detecție a moleculelor țintă de DNA monocatenar similar cu miRNA cu ajutorul nanoporului de  $\alpha$ -HL este una selectivă, cu o sensibilitate ridicată, având ca limită inferioară de detecție concentrații de ordinul micromolar (8  $\mu$ M). Mai putem spune, de asemenea, că sensibilitatea de identificare a duplexului dintr-o soluție ce conține diferite molecule de DNA similare cu miRNA depinde de numărul de aminoacizi din secvența atașată moleculei probă, astfel că detecția are loc când polipeptida are cel puțin 9 aminoacizi.

### Act 3.2 - A4.2 Analiza cantitativă a captării duplexelor poli(Arg)-PNA – miRNA și a timpilor de rezidență a acestora în nanopor.

Pentru a furniza informații suplimentare, utile în procesul de detecție, am analizat parametri cinetici care guvernează procesul de interacțiune a moleculelor de interes cu nanoporul, descriși în figura **Fig. 2**.



**Fig. 2. Analiza statistică a interacțiunii complexelor PA9-cDNA(PA9) și PA13-cDNA(PA13) din *trans* cu  $\alpha$ -HL.** a), e) Scurte înregistrări reprezentative obținute la  $\Delta V = +140$  mV, specifice evenimentelor de blocaj date de complexe PA9-cDNA(PA9) și PA13-cDNA(PA13) în interacțiunea cu nanoporul. Imaginile b), c), d), f), g) și h)



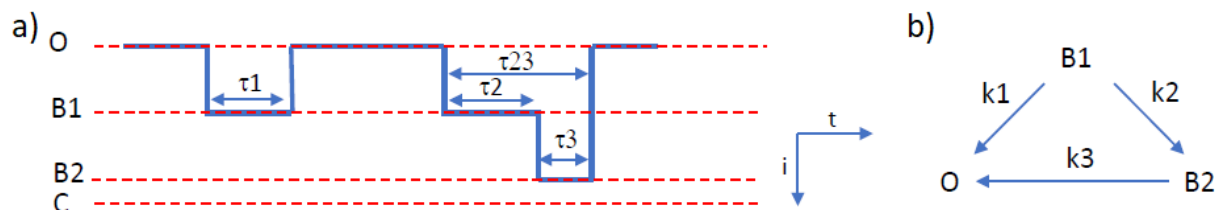
reprezintă dependența timpului mediu  $\tau_1 + \tau_2, \tau_3$  și  $\tau_1 + \tau_{23}$  de diferența de potențial aplicată. (Mereuță et al., Anal. Chem 2022, 94)

Putem observa apariția unui nivel de blocaj b1, care durează un timp  $\tau(b1)$ , dat de interacțiunea unui duplex molecular PA-cDNA(PA) (cu un diametru de  $\approx 2.3$  nm) cu vestibulul nanoporului (cu un diametru de  $\approx 2$  nm). Duplexul fie se întoarce în soluție, fie are loc procesul de dehibridizare, în care cele două molecule se despart și molecula probă PA se întoarce în soluție iar molecula țintă cDNA(PNA) traversează nanoporul în direcția opusă, producând blocajul b2, cu o durată de timp  $\tau(b2)$ . Putem observa că pentru cele două tipuri de complecși, dependențele timpilor medii de voltaj sunt aceleași la potențiale mici, modificându-se pentru potențiale mari, asta datorită sarcinilor electrice nete diferite pe care cele două le posedă.

În cazul complexului ce conține molecula probă funcționalizată cu 9 arginine încărcate electric pozitiv vedem că odată cu creșterea potențialului crește și timpul  $\tau(b1)$  petrecut ca duplex în nanopor însă scade timpul de translocare a moleculei țintă de DNA disociată din duplex prin nanopor  $\tau(b2)$ . În cazul complexului ce conține molecula probă funcționalizată cu 13 arginine observăm că există un potențial prag de 140 mV la care complexul molecular își schimbă comportamentul. În funcție de rezultatul așteptat, putem folosi aceste observații pentru a îndeplini obiectivele setate.

### Act 3.3 - A4.3 Determinarea principalilor parametri ce descriu interacțiunile de asociere a duplexului PNA-miRNA cu nanoporul de $\alpha$ -HL, în vederea caracterizării rapide și precise a moleculelor de miRNA distincte.

Unul dintre principalii parametri care descriu interacțiunile de asociere a duplexului PNA-miRNA cu nanoporul de  $\alpha$ -HL este *constantă de reacție*. Procesul de interacțiune a moleculelor cu un singur nanopor este un proces stohastic, ce poate fi modelat ca o reacție staționară Markov. Așadar, în urma calculelor realizate cu ajutorul formalismului Markov am putut determina constantele de reacție specifice procesului de interacțiune,  $k_1, k_2$  și  $k_3$ . Analizând constantele de reacție am aflat că energia de hibridizare este mai mare în cazul duplexului PNA-cDNA(PNA) care conține polipeptida de arginine cea mai scurtă, deoarece resimte o forță electroforetică de desfacere mai mică.



**Fig. 3. Descrierea cinetică generală a evoluției sistemului duplex (poli-Arg)-PNA-cDNA -nanopor**, pornind de la substarea „b1” asociată cu captarea duplex la intrarea în vestibulul nanoporului. a) Semnal idealizat b) și modelul cu trei stări care corespund tuturor căilor care duc la eliberarea unui duplex (poli-Arg)-PNA-cDNA, capturat tranzitoriu în nanopor. (Mereuță et al., Anal. Chem 2022, 94)



Un alt parametru esențial în discriminarea moleculelor de DNA similare cu miRNA este *blocajul relativ* produs de molecula de interes ( $\Delta I_{block}/I_0 = (I_0 - I_{block})/I_0$ ). Datele prezentate în tabelul următor au fost obținute în urma fitării cu o funcție Gaussiană a curbelor afișate în histogramele de amplitudine a semnalului rezultat și demonstrează că secvența de poli-Arg cu lungime variabilă atașată de molecula probă de PNA poate construi un sistem de detecție simultană a moleculelor de ssDNA bazată exclusiv pe discriminare între substările de blocaj induse de duplexul PNA-cDNA.

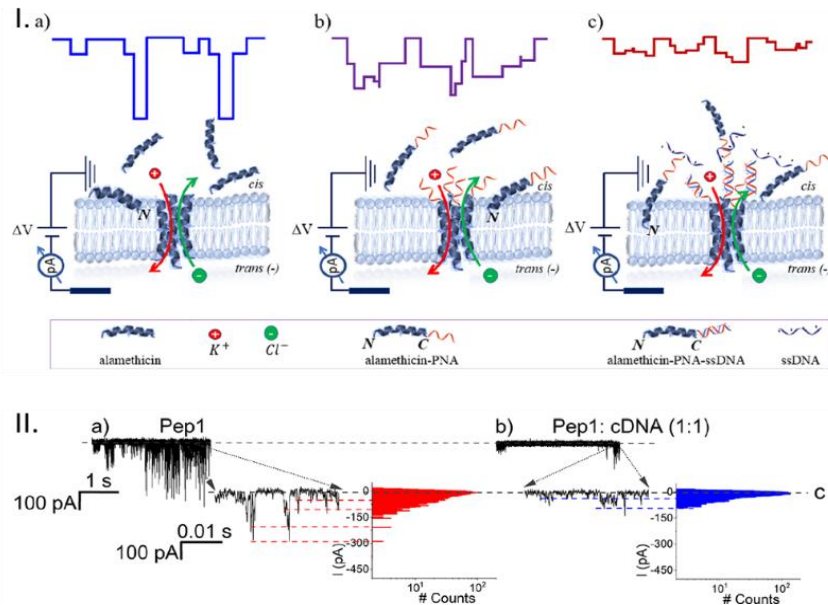
Putem observa că blocajul relativ în curentul ionic dat de blocarea reversibilă a nanoporului de  $\alpha$ -HL în urma interacțiunii cu molecula probă PA13 este asemănător cu cel produs când în sistem se adaugă consecutiv DNA necomplementar cDNA(PA9), semn că cele două molecule nu au hibridizat iar soluția nu conține DNA-ul țintă pe care îl cautăm. Când se adaugă DNA complementar cDNA(PA13), apar nivelurile de blocaj  $B_{d1}$  specifice complexului PA13-cDNA(PA13). La adăugarea moleculei probă de PA9, în semnal se poate observa nivelul  $B_{d2}$ , specific duplecșilor PA9-cDNA(PA9). Așadar, blocajul relativ al curentului ionic este un parametru asociat discriminării moleculelor de DNA similare cu miRNA (medie  $\pm$  S.E.M.)

**Tabel 1. Blocajul relativ al curentului ionic asociat discriminării moleculelor de DNA similare cu miRNA (medie  $\pm$  S.E.M.)**

$\frac{\Delta I_{block}}{I_0}$ (PA13)	$\frac{\Delta I_{block}}{I_0}$ (PA13 + cDNA(PA9))	$\frac{\Delta I_{block}}{I_0}$ (PA13 + cDNA(PA9) + cDNA(PA13))	$\frac{\Delta I_{block}}{I_0}$ (PA13 + cDNA(PA9) + cDNA(PA13) + PA9)
0.91 $\pm$ 0.002 (B1)	0.91 $\pm$ 0.009 (B1)	0.90 $\pm$ 0.001 (B1)	0.94 $\pm$ 0.004 (B)
0.97 $\pm$ 0.0004 (B2)	0.96 $\pm$ 0.001 (B2)	0.96 $\pm$ 0.002 (B2)	0.8 $\pm$ 0.001 ( $B_{d1}$ )
		0.8 $\pm$ 0.0003 ( $B_{d1}$ )	0.75 $\pm$ 0.002 ( $B_{d2}$ )

### Act 3.4 - A5.1 Testarea fezabilității strategiei de detecție a miRNA din seruri umane (spiked) în care s-a adăugat miRNA țintă.

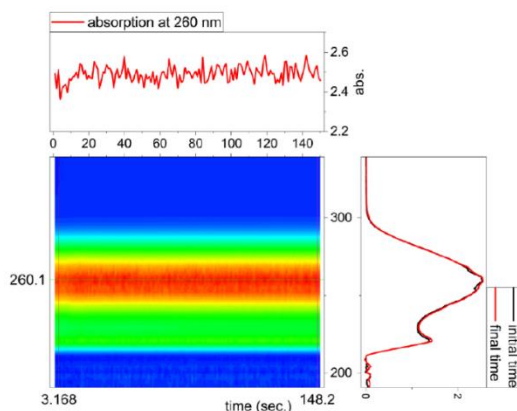
Am testat strategia de detecție a moleculelor de DNA monocatenare similare cu miRNA care se bazează pe nanopori proteici și pe proprietatea de hibridizare între o secvență probă de PNA și o secvență țintă de DNA, folosind porii proteici de alameticină, împreună cu perechea: moleculă țintă de DNA și moleculă probă de PNA. Porii de alameticină își pot modifica numărul de monomeri din componență (nanoporul poate avea între 4 și 12 monomeri), astfel că pot avea mai multe stări conductive ce se poate observa în semnalul ionic (**Fig. 4. Ia**). Când monomerii de alameticină sunt funcționalizați cu o moleculă probă de acizi nucleici PNA, stările conductive sunt modificate datorită blocajului canalului de către PNA (**Fig. 4. Ib, IIa**). La adăugarea în sistem a moleculelor țintă complementare de DNA similar cu miRNA, cele două secvențe nucleotidice vor hibridiza, reducând mobilitatea monomerilor de alameticină, iar acest proces va fi observat în semnalul ionic înregistrat, permițând detecția (**Fig. 4. Ic, IIb**).



**Fig. 4. Detecția moleculelor țintă cu ajutorul moleculelor probă și a nanoporului de alameticină. I.** Reprezentarea schematică a principiului de detecție. **a)** porii de alameticină au diferite stări conductive, în funcție de numărul de monomeri constituenți, **b)** monomerii de alameticină funcționalizați cu molecule probă de PNA produc un semnal diferit, **c)** când în sistem se adaugă molecule țintă de DNA complementare, are loc hibridizarea acizilor nucleici, observabilă în semnal. **II. a)** Semnal original dat de nanoporii de alameticină funcționalizați cu moleculele probă de PNA denumite Pep1, **b)** La adăugarea în sistem a moleculelor probă de cDNA, are loc hibridizarea acizilor nucleici, proces observat în semnalul ionic. (Mereuță et al., *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2023, 15)

### Act 3.5 - A5.2 Testarea reproductibilității strategiei de detecție și trasare a profilului de expresie a miRNA bazată pe nanopori, precum și corelarea datelor cu testele qRT-PCR.

Pentru a testa strategia de detecție, am comparat rezultatele obținute în urma experimentelor de electrofiziologie ce implică nanoporii proteici cu rezultatele obținute în urma înregistrărilor spectrelor UV-VIS de absorbție. Testele qRT-PCR sunt costisitoare ca preț și necesită un timp îndelungat de procesare, de aceea am apelat la o metodă mai rapidă și ușor de folosit, și anume spectroscopia UV-VIS. Din literatură se cunoaște că duplecșii hibridizați de acizi nucleici au un maxim de absorbție la 260 nm, la pH neutru, ceea ce am observat și noi în analiza spectrului.



**Fig. 5. Reprezentarea bidimensională a spectrului UV-VIS asociat cu prezența în soluție a complexelor hibridizate PA13-cDNA(PA13), aflate în soluție de 3 M KCl. Spectrul din partea dreaptă ilustrează datele adunate la timpul inițial și final al testului, în timp ce reprezentarea de sus afișează dependența de timp a datelor de absorbție colectate la 260 nm. (Asandei et al., *Chem. Asian J.* 2022, 17)**

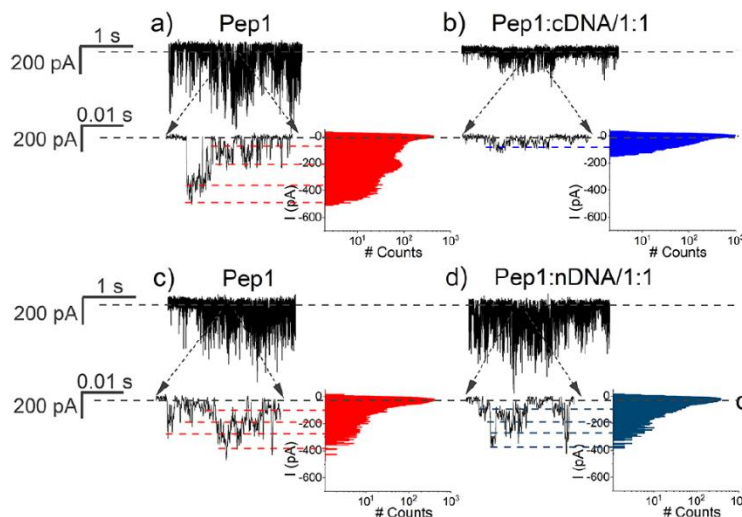




Astfel, profilul de formare a duplecșilor de acizi nucleici PNA-DNA ca punct cheie în detecția moleculelor de DNA similare cu miRNA se poate observa atât prin experimente de electrofiziologie cât și prin analiza spectrelor UV-VIS.

### Act 3.6 - A5.3 Analiza multiplex a profilelor de detecție a miR-N21, miR-148b, miR-221 și miR-155 din serul uman.

Folosind procesul de hibridizare între molecula probă de PNA și molecula țintă de DNA, observabil cu ajutorul nanoporiilor proteici, am reușit să determinăm profilele de detecție multiplex a unor secvențe de DNA similare moleculelor de miRNA (precum miR-N21, miR-148b, miR-221 și miR-155 din serul uman). Am pornit de la semnalul dat de monomerii de alamecicină funcționalizați cu molecula probă, Pep1 (**Fig. 6. a**), aflați într-o soluție de KCl cu o concentrație de 3 M, apropiată de concentrația de KCl din serul uman. La adăugarea în sistem a moleculelor țintă complementare de cDNA (raport molar de 1:1), putem observa cum semnalul generat de nanoporii de alamecicină este redus datorită faptului că acțiunea monomerilor de alamecicină este restricționată de complexul de acizi nucleici format (**Fig. 6. b**). La adăugarea unei secvențe ținte necomplementare, nDNA, observăm că semnalul rezultat se aseamănă cu cel dat de monomerii de alamecicină funcționalizați cu molecula probă, semn că cei doi acizi nucleici nu hibridizează. Aceste observații sunt vizibile și pe histogrammele de amplitudine a semnalului din figura **Fig. 6**.



**Fig. 6.** Înregistrări originale care evidențiază procesul de detecție a moleculelor de DNA similare cu miRNA utilizând nanoporii proteici de alamecicină funcționalizați cu molecule probă. **a), c)** semnal dat de nanoporii de alamecicină formați din monomeri funcționalizați cu molecule probă, Pep 1; **b)** semnalul ionic se schimbă la adăugarea secvențelor țintă complementare, **d)** însă rămâne neschimbat când se adaugă molecule țintă necomplementare. Toate experimentele au fost efectuate în 3 M KCl,  $\Delta V = -140$  mV și pH = 7. (Mereuță et al., ACS Appl. Mater. Interfaces 2023, 15)

Am reușit astfel să îndeplinim obiectivele pe care le-am propus și să demonstrăm posibilitatea de analiza multiplex a profilelor diferitelor molecule de DNA similar cu miRNAs, în soluții electrolitice și soluții similar probelor biologice.



### Rezultatele și modul de diseminare a rezultatelor.

În această etapă au fost publicate un număr de **2 articole** cu factor de impact, situate în **zona roșie (Q1)**:

1. *Synthetic Receptor Based on a Peptide Antibiotic-Functionalized Chimera for Hybridization-Based Polynucleotide Detection*, Mereuta, Loredana; Asandei, Alina; Schiopu, Irina; Park, Jonggwan; Park, Yoonkyung; Luchian, Tudor, ACS APPLIED MATERIALS & INTERFACES 2023, 15 (27), 33159-33168, DOI:10.1021/acsami.3c06086

2. *Considerable slowdown of short DNA fragment translocation across a protein nanopore using pH-induced generation of enthalpic traps inside the permeation pathway*, Mereuta, Loredana; Asandei, Alina; Andricioaei, Ioan; Park, Jonggwan; Park, Yoonkyung; Luchian, Tudor, NANOSCALE 2023, 15(36), 14754-14763. DOI: 10.1039/d3nr03344a.

Data

15.11.2023

Director de proiect,

Prof. Univ. Dr. Tudor LUCHIAN