



Raport științific sintetic

Privind implementarea proiectului de cercetare cu titlul: ***”Detectia multiplex, cu sensibilitate și selectivitate moleculară, a unor miRNAs relevante fiziologic, cu ajutorul unor xeno acizi nucleici/ Xeno nucleic acids-mediated, real-time multiplexed detection of disease relevant miRNAs, with single molecule sensitivity and selectivity”***, acronim RNANANODETECT, cod PN-III-P4-ID-PCE-2020-0011, pentru toate perioadele de execuție (2021-2023).

În acest proiect ne-am propus să folosim acizi xeno-nucleici specifici, și anume acizi peptido-nucleici (PNA), conjugați cu secvențe aminoacidice de arginină poly(Arg) de dimensiuni variabile, cu rolul de molecule probă în detectia multiplex a secvențelor de DNA similare cu miRNA țintă de interes biologi, folosind nanopori proteici ca traductori. Această metodă de detecție la nivel de singură moleculă cu ajutorul nanoporului proteic de α -hemolizină (α -HL) nu necesită marcarea sau amplificarea și este bazată pe complementaritatea dintre secvența acidului nucleic țintă și secvența acidului nucleic probă sintetizat.

Obiectivele și activitățile propuse în acest proiect au fost:

- 01.** Caracterizarea macroscopică a perechilor de baze PNA-miRNA.
- 02.** Dovada conceptului de detectare a semnăturii reproductibile a PNA-urilor, miARN-urilor și duplexurilor PNA-miARN funcționalizate cu poli(Arg) cu nanoporul a-HL.
- 03.** Specificitatea testului bazat pe nanopori a-HL în detectarea miARN-urilor. Mecanismul dielectroforetic al captării PNA-miARN poli(Arg) funcționalizat de către un singur nanopor.
- 04.** Dovada de concept pentru profilarea multiplexată a miARN-urilor distincte în tampon de electroliti.
- 05.** Demonstrarea capacității nano-senzorului bazat pe a-HL pentru detectarea directă, multiplexată a miARN-urilor în probele biologice.

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).

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

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

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



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.

A3.1 Determinarea potențialului moleculelor de poli(Arg)-PNA în detecția uni- și multi-nucleobazelor, precum și discriminarea moleculelor țintă de miRNA

A3.2 Implementarea protocolului bazat pe nanopori pentru detecția necomplementarităților de tip uni- sau multi-nucleobază în secvențe miRNA de lungimi asemănătoare, bazat pe analiza timpilor de rezidență și de desfacere a complexului PNA-miRNA în interiorul α -HL.

A3.3 Investigarea uni-moleculară a dependenței de temperatură a stabilității PNA-miRNA, pentru domenii de necomplementaritate de diferite lungimi. Corelarea cu valorile termodinamice a energiilor de hibridizare.

A3.4 Determinarea limitei de detecție a miRNA-ului și a intervalului dinamic al nanosenzorului, a curbelor doză-răspuns și a reversibilității senzorului, în soluții compatibile cu medii biologice.

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.

A4.2 Analiza cantitativă a captării duplecșilor poli(Arg)-PNA – miRNA și a timpilor de rezidenței a acestora în nanopor.

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

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

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.

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

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 funcționare al acestei abordări urmează în general această succesiune de evenimente: (a) aplicând o diferență de potențial de o parte și de alta a unui nanopor inserat în membrana lipidică, apare un curent ionic dat de ionii de K^+ și Cl^- proveniți din disocierea sării KCl din soluția electrofiziologică, măsurat de-a lungul canalului ionic; (b) câmpul electric provenit din diferența de potențial conduce macromolecula de interes către nanopor; (c) captarea tranzitorie a macromoleculei în interiorul nanoporului implică modificări ale rezistenței electrice ale nanoporului, văzute ca fluctuații în curentul ionic mediat de nanopor.

În cadrul primului studiu am analizat modul de interacțiune dintre o moleculă țintă de DNA similar cu miRNA și două molecule probă de PNA, cu ajutorul unui nanopor proteic de α -hemolizină (α -HL), în vederea obținerii unei hibridizări eficiente în soluția fiziologică. Am testat molecula țintă 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 de arginine (R)₁₀ conjugat la capătul 5' terminal (**Tabel 1**). Acest lanț polipeptidic îi conferă moleculei de RPNA o sarcină electrică pozitivă dată de aminoacizii de arginină la pH-ul utilizat în protocolul experimental (soluție electrofiziologică de KCl, în concentrație de 3M, 10 mM HEPES, pH = 7.3).

Tabel 1. Secvențele primare ale moleculelor de interes utilizate. Moleculele BPNA și RPNA au aceeași structura 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'

Am analizat semnalele date de moleculele țintă cDNA, de moleculele probă BPNA și RPNA și de complexe hibridizate cDNA-BPNA, respectiv, cDNA-RPNA. 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 (**Figura 1. I**). Moleculele de PNA nu interacționează cu nanoporul în acest protocol experimental. Atunci când moleculele țintă de DNA sunt adăugate împreună cu moleculele probă complementare, apare un semnal specific complexului hibridizat cDNA-PNA (**Figura 1. II**). Prezența sau lipsa complexului hibridizat ne indică dacă proba conține sau nu DNA-ul similar cu miRNA căutat, demonstrând specificitatea tehnicii bazate pe utilizarea nanoporului de α -HL în detecția moleculelor de DNA similare cu miRNA.

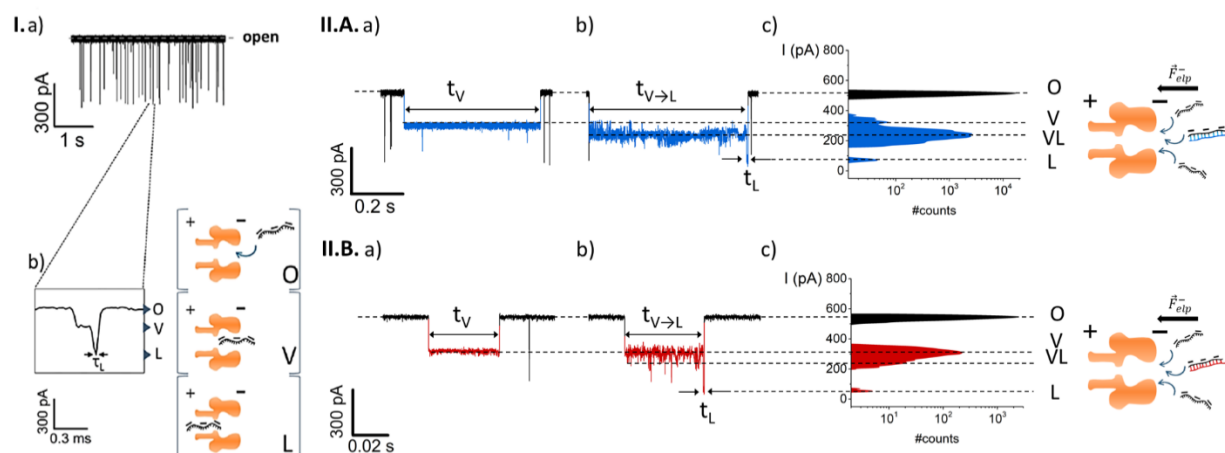


Figura 1. I. Interacțiunea moleculei țintă de DNA similară cu miRNA, cDNA, cu nanoporul proteic de α -HL: a) fluctuațiile reversibile ale curentului ionic date de molecule țintă cDNA, b) forma semnalului unui eveniment de blocaj. **II. Semnale specifice interacțiunii nanoporului proteic de α -HL cu dupecșii moleculare** A. BPNA-cDNA și B. RPNA-cDNA: a) complexul este captat în interiorul vestibulului apoi se întoarce în zona *cis* a nanoporului, b) complexul a disociat în molecula de cDNA ce va transloca mai departe prin lumen spre *trans* și în moleculele de PNA; c) histogramele de amplitudine aferente. (Dragomir et al., Anal.Chem, 2020, 92)

Odată ce complexul cDNA-PNA a pătruns în vestibulul nanoporului, acesta fie se întoarce în soluție, având t_v (**Figura 1. II, a**), fie are loc procesul de desfacere (t_{v-L}), în care doar molecula de cDNA va transloca nanoporul, în t_L (**Figura 1. II, b**).

Analizând statistic timpul mediu de interacțiune a complexelor cu nanoporul proteic de α -HL am reușit să investigăm stabilitatea complexelor PNA-DNA similar cu miRNA dublu catenari și am observat că duplexul cDNA-RPNA are o energie de asociere mai mică, respectiv energia liberă de desfacere (ΔG) mai mare, datorită structurii de dipol electric dată de sarcina electrică negativă a back-bone-ului moleculei de cDNA și sarcina electrică pozitivă a secvenței de poliarginină (**Figura 2.**).

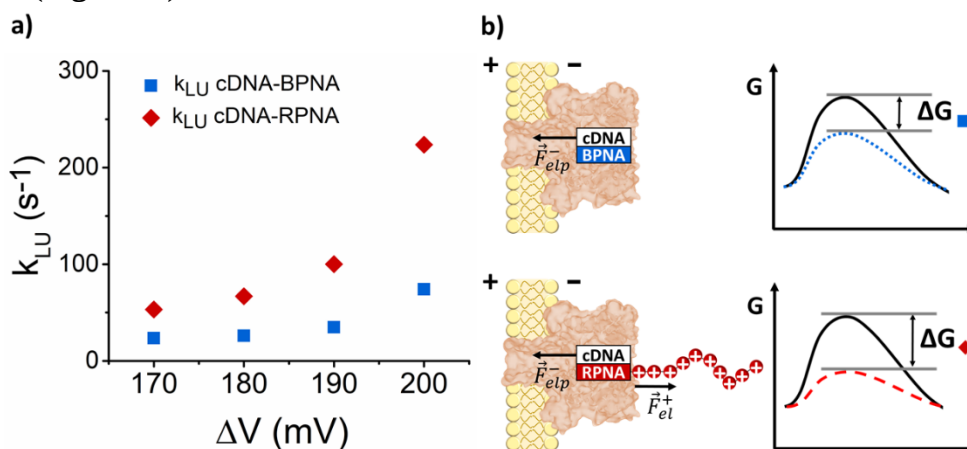


Figura 2. a) Estimarea calitativă a constantei de reacție k_{LU} ce caracterizează cinetica de desfacere completă a complexului PNA-cDNA similar cu miRNA; **b)** Evidențierea energiei libere de desfacere (ΔG) a complexului BPNA-cDNA(■) și RPNA-cDNA(♦). (Dragomir et al., Anal.Chem, 2020, 92)

Monitorizând dependența de potențial a semnalului generat de moleculele de cDNA similare cu miRNA (molecula țintă) și poli(Arg)-PNA (molecula probă) în interacțiunile reversibile cu nanoporul de α -HL s-a observat că forțele electroforetice opuse, direct proporționale cu potențialul aplicat, duc la scăderea timpului de rupere a complexului cDNA-RPNA cu structură de macrodipol.

În concluzia primului studiu putem spune că metoda de detecție a moleculelor țintă de DNA similar cu miRNA cu ajutorul unor molecule probă de PNA este una cu specificitate ridicată, iar prezența secvenței de poliarginine atașată moleculei de PNA probă ne oferă posibilitatea de a controla procesul de disociere a complexului cDNA-RPNA și de a calcula energiile de asociere.

Pentru a selecta și a testa molecule probă de PNA funcționalizate cu cozi de poliarginină de diferite lungimi în vederea obținerii unui semnal specific dependent de lungimea cozii, într-un al doilea studiu am analizat interacțiunea dintre un singur nanopor de α -HL și moleculele probă de poli(Arg)-PNA adăugate în concentrație de 4 μ M de partea *cis*, respectiv *trans*, la o concentrație de 3M KCl a soluției de înregistrare și pH=7. Secvențele poli(Arg)-PNA, notate aici cu PA5, PA9 și PA13, sunt funcționalizate cu 5, 9 și respectiv 13 aminoacizi de arginină Arg la capătul C terminal (**Tabel 2.**)



Tabel 2. Structurile primare și masele moleculare corespunzătoare moleculelor probă de poli(Arg)-PNA și moleculelor țintă DNA monocatenar similar cu miRNA. Dreptunghiurile roșii ilustrează duplexurile hibridizate poli(Arg)-PNA-DNA. (Mereuță et al., Anal. Chem 2022, 94)

	(Poly-Arg)-PNA (N→C)	Mw (g/mol)	ssDNA (5'→3')	Mw (g/mol)
PA5	GTTTGTCTG-Arg5	3520.5	CAGAACAAACCCAAGGAAAT (cDNA(PA5)) CAGAACAAACCCAAGGAAAT Arg5 -GTCTTGTTTG	6122
PA9	CTTTGGTGT-Arg9	4145.3	ACACCAAAAGATCACATTGG (cDNA(PA9)) ACACCAAAAGATCACATTGG Arg9 -TGTGGTITTC	6104
PA13	GTTTGTCTG-Arg13	4770	CAGAACAAACCCAAGGAAAT (cDNA(PA13)) CAGAACAAACCCAAGGAAAT Arg13 -GTCTTGTTTG	6122

Procesul de interacțiune s-a analizat atât de partea *cis* cât și de partea *trans* a nanoporului. Într-o primă etapă s-au studiat moleculele probă de PNA (**Figura 3.**) și s-a observat că au un semnal specific în funcție de zona de adăugare, iar pentru cele cu secvențe mai mari de arginine apare un nivel suplimentar (B_{L1} și B_{L2} , respectiv B_1 și B_2). Din analiza statistică am observat că timpul mediu dintre două evenimente succesive depinde invers proporțional de lungimea fragmentului poli(Arg), datorită captării electroforetice favorizate de creșterea sarcinii electrice pozitive.

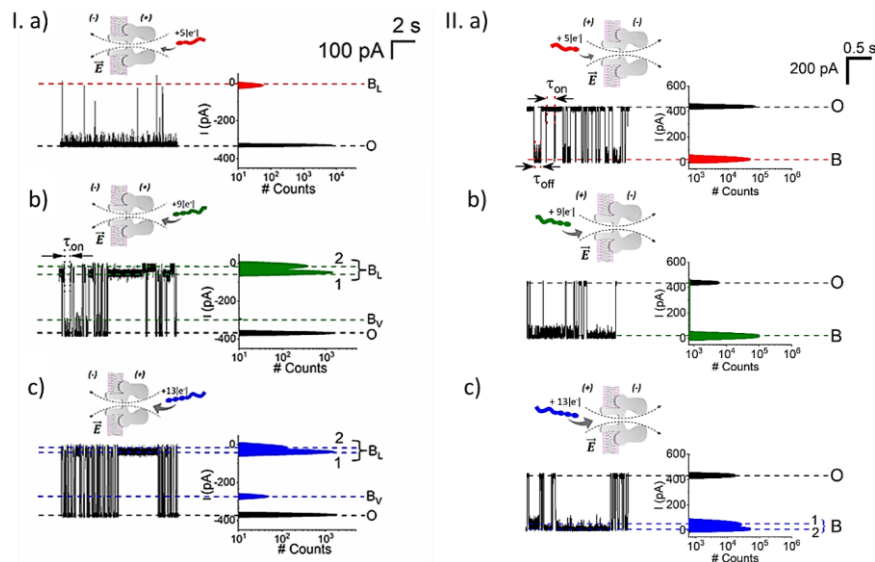


Figura 3. Detecția moleculelor probă de poli(Arg)-PNA adăugate: I. la intrarea *cis* în vestibul a nanoporului α -HL ($\Delta V = -140$ mV) II. la intrarea *trans* în lumenul nanoporului α -HL ($\Delta V = +140$ mV). Experimente tipice care arată interacțiunea reversibilă dintre nanoporul de α -HL și 4 μ M PA5 (a), PA9 (b) sau PA13 (c), într-un electrolit care conține 3M KCl, pH = 7. (Mereuță et al., Anal. Chem 2022, 94)

Adăugarea în sistem a moleculelor țintă de cDNA complementare moleculelor probă duce la o descreștere a evenimentelor datorită hibridizării moleculelor probă de PNA ce nu mai pot interacționa cu nanoporul și la apariția evenimentelor de blocaj specifice complexului hibridizat, caracterizate de un nou nivel al curentului ionic, B_d , observabil în cazul complexelor ce conțin PA9 și PA13 (**Figura 4.**). În celelalte cazuri, complexul nu este observabil datorită forței electroforetice totale resimțite care îndepărtează duplexul de la interacțiunea cu nanoporul.

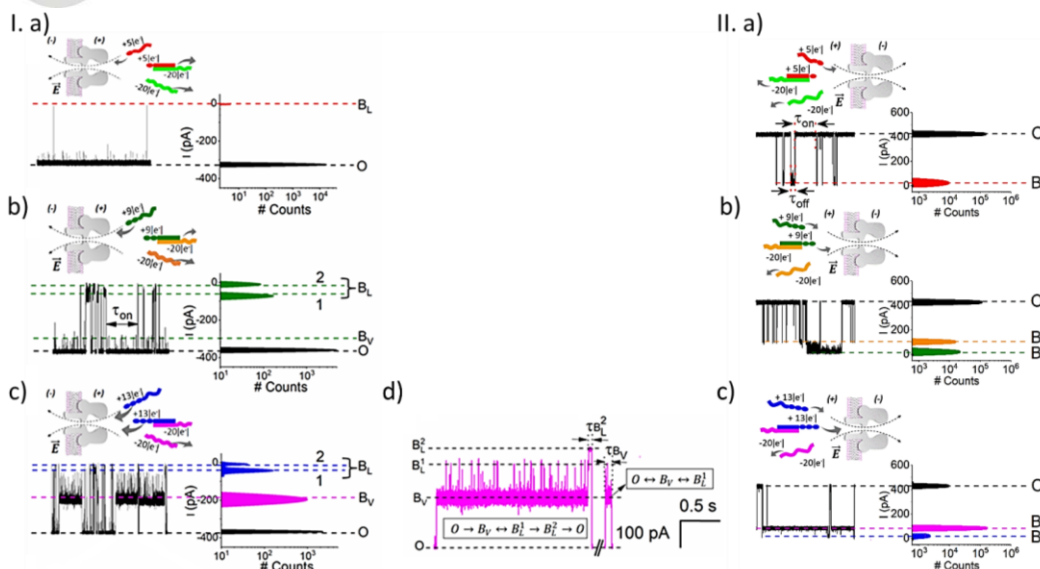


Figura 1 Detectarea moleculelor țintă de DNA similare cu miRNA în urma hibridizării cu moleculele probă de poli(Arg)-PNA cu ajutorul nanoporului proteic de α -HL, când moleculele de **a)** PA5 și cDNA(PA5), **b)** PA9 și cDNA(PA9), **c)** PA13 și cDNA(PA13) au fost adăugate **I.** la *cis* sau **II.** la *trans*, în concentrații de 4 μ M poli(ARG)-PNA și 8 μ M cDNA similar cu miRNA. **d)** Tipuri de evenimente și subnivelurile asociate ce apar când moleculele PA13 și cDNA(PA13) sunt adăugate la *cis*, pentru 3M KCl, pH = 7. (Mereuță et al., Anal. Chem 2022, 94)

Am studiat influența lungimii secvenței de poli(Arg) asupra procesului de detecție a moleculelor țintă de DNA monocatenar similar cu miRNA atunci când moleculele sunt adăugate în *trans*, pentru 3M KCl, pH = 7. Am analizat statistic valorile timpilor medii evidențiați în **Figura 5, a)** și **e)**, pentru complexele PA9-cDNA(PA9) cu 9 arginine și PA13-cDNA(PA13) cu 13 arginine: τ_1 (timpul în care duplexul poli(Arg)-PNA-DNA este captat și blochează gura lumenului), τ_2 (timpul în care are loc procesul de disociere a duplexului în moleculele constitutive) și τ_3 (timpul de translocare prin nanopor a moleculei de poli(Arg)-PNA rezultate în urma procesului de desfacere a duplexului). În urma analizei statistice am calculat constantele termodinamice de reacție aferente, k_1 , k_2 și k_3 (**Fig5**).

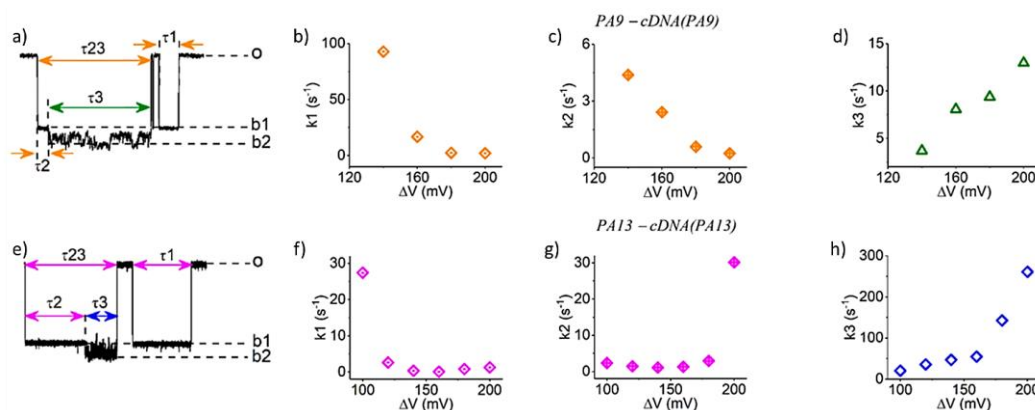


Figura 5. Constantele microscopice de rată de reacție care descriu interacțiunea duplexului cu nanoporul. Dependența de tensiune a constantelor microscopice de rată de reacție k_1 , k_2 și k_3 descriind evoluția în timp a duplexurilor PA9-cDNA(PA9) (**a-d**) și PA13-cDNA(PA13) (**e-h**) capturați la intrarea *trans* în lumenul nanoporului. (Mereuță et al., Anal. Chem 2022, 94)

În cazul ambelor complexe observăm o descreștere a constantei k_1 ce caracterizează întoarcerea complexului în mediul *trans* pe măsură ce diferența de potențial crește, datorită faptului că forța electroforetică ce se opune difuziei în soluție a complexului captat la gura nanoporului este din ce în ce mai mare (τ_1 crește deci k_1 scade). Constanta k_3 care descrie translocarea prin nanopor a fragmentului poli(Arg)-PNA rezultat în urma disocierii complexului crește odată cu diferența de potențial aplicată datorită forței electroforetice din ce în ce mai mare care acționează asupra secvenței încărcate electric, astfel că procesul de traversare a nanoporului se va desfășura din ce în ce mai rapid. Cu cât sarcina electrică a moleculei este mai mare, cu atât translocarea va fi mai rapidă. Cinetica timpului de desfacere a duplexului descris de constanta k_2 ne arată că energia de hibridizare este mai mare în cazul duplexului PA9-cDNA(PA9) care resimte o forță electroforetică de desfacere mai mică.

Am testat această metodă bazată pe nanopori pentru a detecta secvențe de acizi nucleici necomplementare și am obținut rezultate promițătoare. Pornind de la molecula probă PA13 situată în mediul *trans* (Figura 6, a), am adăugat molecula țintă necomplementară cDNA(PA9) (Figura 6, b). În semnalul înregistrat s-a observat doar nivelul de blocaj B caracteristic moleculei probă PA13, semn că nu a avut loc hibridizarea moleculelor. Moleculele de cDNA(PA9) sunt atrase în câmp electric în sens opus translocării prin nanopor, astfel că nu apar în semnalul ionic. Atunci când în sistem s-a adăugat molecula țintă cDNA(PA13) (Figura 6, c), s-a observat apariția unui nivel de blocaj B_{d1} specific complexului hibridizat PA13-cDNA(PA13). Adăugând în soluție molecula probă PA9 complementară cu molecula țintă cDNA(PA9) (Figura 6, d), am remarcat un alt nivel B_{d2} , specific duplexilor hibridizați PA9-cDNA(PA9). Concentrațiile moleculelor probă poli(Arg)-PNA și a moleculelor țintă DNA au fost de 4, respectiv 8 μM , în 3M KCl, pH = 7.

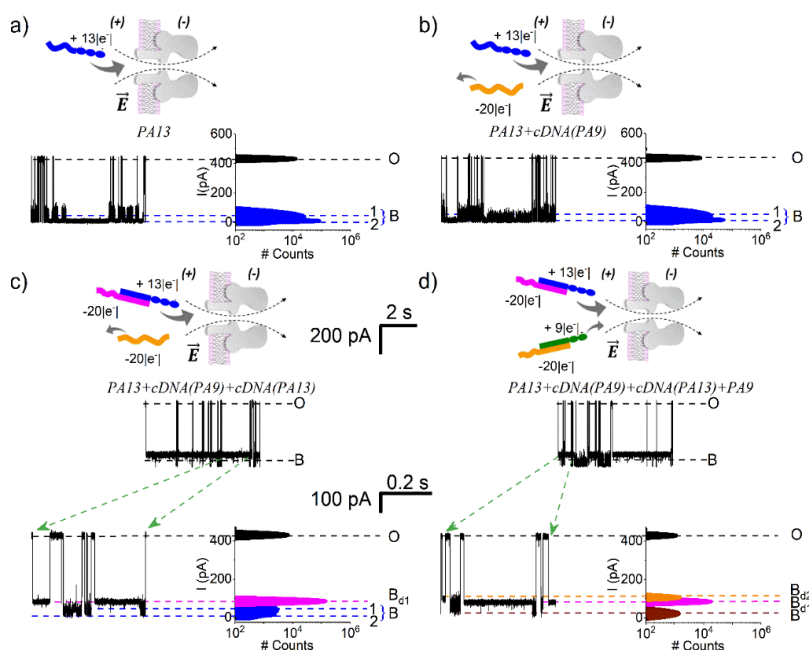


Figura 6. Detecția multiplex a moleculelor țintă de DNA prin captarea de către nanoporul de α -HL a duplexilor hibridizați poli(Arg)-PNA-cDNA. (a) Semnalul dat de interacțiunea moleculelor probă PA13- α -HL măsurat la $\Delta V = +140$ mV (b) rămâne nealterat în prezența moleculei țintă necomplementare cDNA(PA9). Adăugarea moleculelor țintă complementare cDNA(PA13) a provocat apariția nivelului de blocare B_{d1} (c). Pipetarea ulterioară a moleculei probă PA9, complementară cu cDNA(PA9) deja prezent, a generat hibridizarea duplexilor PA9-cDNA(PA9) care produc nivelul B_{d2} (d). (Mereuță et al., Anal. Chem 2022, 94)

În concluzie, datele obținute în cel de-al doilea studiu demonstrează că secvența de poli(Arg) cu lungime variabilă din structura moleculei probă PNA poate constitui baza unui sistem de detecție a moleculelor unicatenare de cDNA similar cu miRNA, bazat exclusiv pe capacitatea

de discriminare a substărilor de blocaj date de duplexul hibridizat poli(Arg)-PNA-cDNA într-un amestec eterogen. De asemenea, s-au propus doi parametri principali ce descriu interacțiunile de asociere a duplexului PNA-cDNA similar cu miRNA cu nanoporul de α -HL în vederea caracterizării rapide și precise a moleculelor de cDNA similare cu miRNA distincte, și anume constanta de reacție și valoarea blocajului relativ.

Într-un al treilea studiu s-a analizat metoda de detecție propusă și în soluții compatibile cu medii biologice. În urma experimentelor din cadrul acestui proiect s-a observat că biosenzorul de α -HL utilizat oferă rezultate corecte și la concentrații foarte mici de analit, ceea ce face limita de detecție a DNA-ului similar cu miRNA să fie de ordinul micromolar. Pentru a realiza detecția în soluții compatibile cu medii biologice, am realizat experimente în care soluția electrofizioogică de KCl are concentrații diferite: 3M, 1M și 0.5M, cea din urmă fiind cea mai apropiată de concentrația ionilor de K⁺ și Cl⁻ din organism. Am observat că hibridizarea și stabilitatea complexelor variază în funcție de concentrația sării KCl utilizate, fapt evidențiat și în modificările curentului ionic specific înregistrat (**Figura 7**).

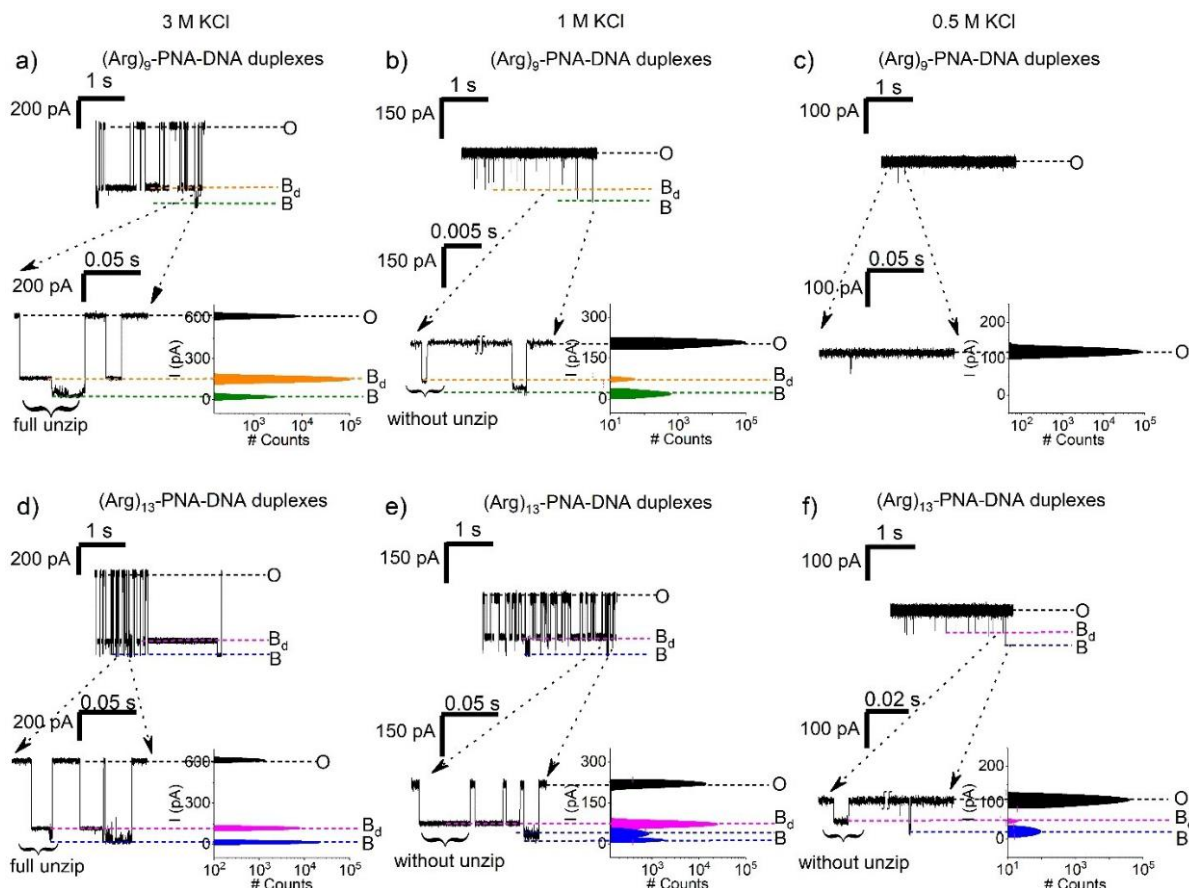


Figura 2. Detecția duplecșilor moleculari poli(Arg)-PNA-DNA cu ajutorul nanoporului de α -HL în medii cu diferite concentrații ale KCl. Frecvența și durata evenimentelor de blocaj provocate de duplecșii de PA9-cDNA(PA9) (a-c) și PA13-cDNA(PA13) (d-f), situați în zona *trans*, la $\Delta V = +200$ mV. În imaginile mărite sunt ilustrate blocaje reprezentative specifice disocierii complete a duplexului captat la intrarea în lumenul α -HL și, respectiv, evenimente de captare și eliberare a duplexului, fără desfacere. Histogramele valorilor curentului ionic înregistrat evidențiază nivelurile de blocaj. (Asandei et al., Chem. Asian J. 2022, 17)



În **Figura 2ura 7** sunt evidențiate interacțiunile reversibile dintre nanoporul proteic de α -HL și moleculele de interes, observate prin fluctuațiile curentului ionic mediat de nanopor: nivelul de blocaj B dat de moleculele de poli(Arg)-PNA și nivelul de blocaj B_d dat de interacțiunea complexului de poli(Arg)-PNA-DNA cu gura nanoporului. Remarcăm că valoarea nivelului de blocaj B_d depinde puternic de concentrația de KCl din soluția electrofiziologică de înregistrare, pe când valoarea B nu depinde. S-a observat că pe măsură ce concentrația de ioni din soluție scade și sarcinile electrice sunt din ce în ce mai puțin ecranate, numărul duplecșilor hibridizați scade datorită interacțiunii dintre sarcina electrică pozitivă a secvenței de poli(Arg) din structura PNA și sarcina electrică negativă a secvențelor de DNA, împiedicând hibridizarea complexului.

În urma acestei etape a studiului am concluzionat că molecula probă de poli(Arg)-PNA ce conține un număr mai mare de aminoacizi este potrivită pentru o paletă largă de concentrații ale soluției de înregistrare, oferind sistemului o stabilitate ridicată. O altă concluzi importantă este că strategia de detecție este fezabilă și în soluții asemănătoare probelor biologice.

Am testat în studiul al patrulea 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 (**Tabel 3**). Aceștia 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 (**Figura 8. Ia**).

Când monomerii de alameticină sunt funcționalizați cu o moleculă probă de acizi nucleici PNA, stările conductive sunt modificate datorită interacțiunii PNA cu nanoporii (**Figura 8. 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 (**Figura 8. Ic, IIb**).

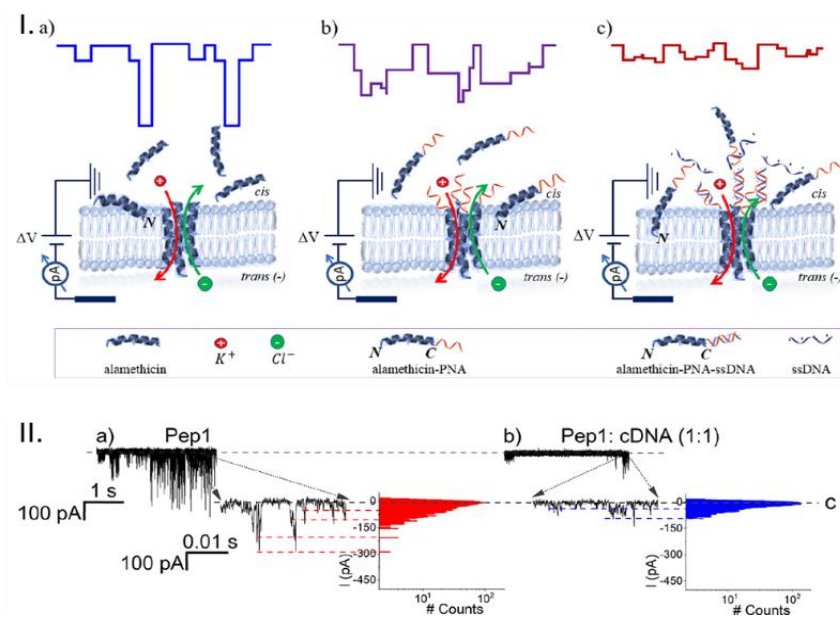


Figura 8. Detecția moleculelor DNA țintă cu ajutorul moleculelor PNA probă și a nanoporilor de alameticină. I. Schema principiului de detecție: **a)** nanoporii de alameticină au diferite stări conductive, **b)** monomerii de alameticină funcționalizați cu molecule probă de PNA produc un semnal diferit; **c)** când în sistem se adaugă DNA țintă complementar, are loc hibridizarea acizilor nucleici, observabilă în semnal. **II. a)** Semnal original dat de nanoporii de alameticină funcționalizați cu molecule probă denumite Pep1, **b)** împreună cu molecule țintă de cDNA (Mereuță et al., *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2023, 15)

**Tabel 3.** Structuri primare ale peptidelor utilizate. (Mereuță et al., ACS Appl. Mater. Interfaces 2023, 15)

Name	Primary sequence
Alamethicin	Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Pho
Pep1	Ac-Leu-Pro-Leu-Ala-Leu-Ala-Gln-Leu-Val-Leu-Gly-Leu-Leu-Pro-Val-Leu-Leu-Glu-Gln-(A-T-T-T-C-C-T-T-G-G)

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 alameticină funcționalizați cu molecula probă, Pep1 (**Figura 9. a**), aflați într-o soluție de KCl cu o concentrație de 3 M. La adăugarea în sistem a moleculelor țintă complementare de cDNA (raport molar de 1:1), putem observa cum semnalul generat de nanoporii de alameticină este redus datorită faptului că acțiunea monomerilor de alameticină este restricționată de complexul de acizi nucleici format (**Figura 9. b**). La adăugarea unei secvențe ținte necomplementare, nDNA, observăm că semnalul rezultat se aseamănă cu cel dat de monomerii de alameticină 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 **Figura 9**.

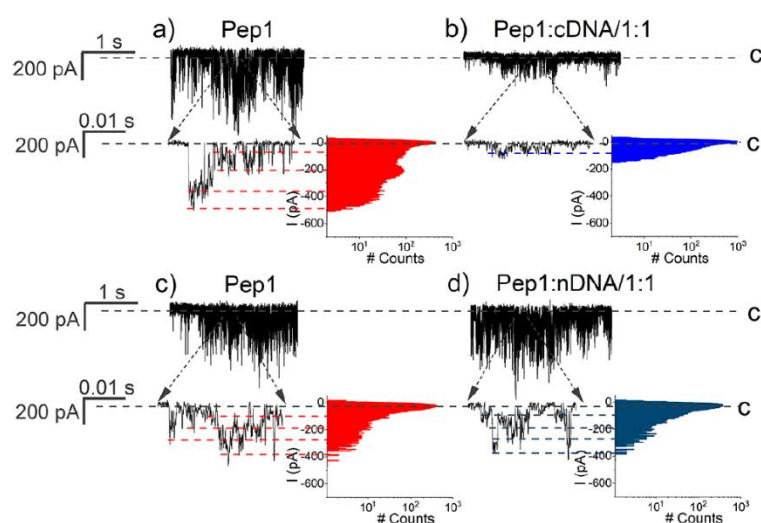


Figura 9. Înregistrări originale care evidențiază procesul de detecție a moleculelor de DNA similare cu miRNA utilizând nanoporii proteici de alameticină funcționalizați cu molecule probă. **a), c)** semnal dat de nanoporii de alameticină formați din monomeri funcționalizați cu molecule probă, Pep 1; **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 miRNA, în soluții electrolitice și soluții similare probelor biologice utilizând metoda de detecție bazată pe nanopori proteici și procesul de hibridizare între moleculele țintă de DNA și moleculele probă de PNA funcționalizate cu secvențe de poliarginine de diferite lungimi. De asemenea, am reușit să obținem cu această metodă o limita de detecție a DNA-ului similar cu miRNA de ordinul micromolar. Rezultatele prezentate demonstrează utilitatea și fezabilitatea metodelor de detecție a moleculelor de interes biologic cu ajutorul nanoporiilor proteici și subliniază importanța bionanotehnologiilor în dezvoltarea metodelor de diagnostic și tratament moderne.



Sumar al progresului (livrabile realizate, indicatori de rezultat, diseminarea rezultatelor, justificare diferențe, dacă e cazul).

Rezultate verificabile ale activității	Estimate	Realizate
Articole	2	9
Participări la conferințe	2	2
Pagină web	1	1
Protocol de lucru	1	4

Rezultatele și modul de diseminare a rezultatelor

În acest proiect au fost publicate un număr de **9 articole** cu factor de impact, din care **7 situate în zona roșie (Q1)** și **1 situat în zona galbenă (Q2)**.

1. Mereuta, Loredana; Asandei, Alina; Schiopu, Irina; Park, Jonggwan; Park, Yoonkyung; Luchian, Tudor Synthetic Receptor Based on a Peptide Antibiotic-Functionalized Chimera for Hybridization-Based Polynucleotide Detection, ACS APPLIED MATERIALS & INTERFACES **2023**, 15 (27), 33159-33168, DOI:10.1021/acsami.3c06086, **Q1**
2. Mereuta, Loredana; Asandei, Alina; Andricioaei, Ioan; Park, Jonggwan; Park, Yoonkyung; Luchian, Tudor, Considerable slowdown of short DNA fragment translocation across a protein nanopore using pH-induced generation of enthalpic traps inside the permeation pathway, NANOSCALE **2023**, 15(36), 14754-14763. DOI: 10.1039/d3nr03344a. **Q1**
3. Loredana Mereuta, Alina Asandei, Isabela Dragomir, Jonggwan Park, Yoonkyung Park, and Tudor Luchian. *A Nanopore Sensor for Multiplexed Detection of Short Polynucleotides Based on Length-Variable, Poly-Arginine-Conjugated Peptide Nucleic Acids*. Analytical Chemistry **2022**, 94 (24), 8774-8782, DOI: 10.1021/acs.analchem.2c01587, **Q1**
4. Alina Asandei, Loredana Mereuta, Ioana C. Bucataru, Yoonkyung Park, Tudor Luchian. *A Single-Molecule Insight into the Ionic Strength-dependent, Cationic Peptide Nucleic Acids-Oligonucleotides Interactions*. Chemistry An Asian Journal **2022**, e202200261, DOI: 10.1002/asia.202200261, **Q2**
5. Ioana C. Bucataru, Isabela Dragomir, Alina Asandei, Ana-Maria Pantazica, Alina Ghionescu, Norica Branza-Nichita, Yoonkyung Park, Tudor Luchian. *Probing the Hepatitis B virus e-antigen with a nanopore sensor based on collisional events analysis*. Biosensors **2022**, 12 (8), 596. **Q1**
6. Schiopu Irina, Asandei Alina, Mereuta Loredana, Dragomir Isabela, Bucataru Ioana Cezara, Luchian Tudor. Single-molecule detection and manipulation with biological nanopores. Studia Universitatis Babes-Bolyai, Chemia . **2021**, 66 161-174 **Q4**
7. 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, **Q1**



8. 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. **Q1**
9. 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, **Q1**

Rezultatele obținute în cadrul acestei etape au fost prezentate la **1 conferință internațională** și **1 conferință națională**:

1. Sixth Edition of International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences, "IC-ANMBES 2022", June 8-10, 2022, Brasov, Romania

- *Detection of nucleobases on short functionalized peptide-nucleic acid sequences using nanopore-tweezing method*, Isabela S. Dragomir, Alina Asandei, Irina Schiopu, Ioana C. Bucataru, Loredana Mereuta, Tudor Luchian
- *Protein nanopore-based method for sequence specific detection of single-stranded DNA using gold nanoparticles and peptide nucleic acids*, Ioana Cezara Bucataru, Loredana Mereuta, Alina Asandei, Isabela Dragomir, Tudor Luchian

2. A XVII-a Conferință Națională de Biofizică, CNB 2022, 23-25 Septembrie 2022, Târgu Mureș, România

- *A tug-of-war between electric forces: The nanopore-tweezing method applied in molecular sensing*, Isabela S. Dragomir, Alina Asandei, Irina Schiopu, Ioana C. Bucataru, Loredana Mereuta, Tudor Luchian

Data

15.11.2023

Director de proiect,

Prof. Univ. Dr. Tudor LUCHIAN