



# **Teză de abilitare**

**Domeniu: Fizică**

**Transport uni-molecular prin nanopori proteici  
utilizat în recunoașterea, caracterizarea,  
secvențierea și detecția moleculelor de interes  
biologic**

**Cercetător Științific II Dr. Alina ASANDEI**

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

**Iași – 2022**



## Rezumat

Teza de abilitare intitulată ” **Transport uni-molecular prin nanopori proteici utilizat în recunoașterea, caracterizarea, secvențierea și detecția moleculelor de interes biologic**” include unele dintre cele mai importante rezultate științifice publicate de autoare de la obținerea titlului de doctor în științe. Studiile prezentate în această lucrare au pus în evidență importanța utilizării porului proteic de alfa hemolizina ( $\alpha$ -HL) în detectarea, caracterizarea secvențierea și recunoașterea moleculelor de interes fiziologic cum ar fi: antibiotice, acizi nucleici și peptide mici. Teza se imparte în trei secțiuni. În prima secțiune se prezintă contribuțiile și rezultatele științifice obținute de autoare. A doua secțiune prezintă parcursul academic și profesional al autoarei. Iar a treia secțiune cuprinde bibliografia citată de-a lungul tezei.

Progresele înregistrate de-a lungul deceniilor în nanotehnologie, științele biomoleculare și ingineria proteinelor au dus la introducerea unor tehnologii revoluționare dedicate înțelegerii modului în care se comportă materia la nivel de singură moleculă. Se poate spune că una dintre cele mai simple paradigme din punct de vedere conceptual este cea bazată pe nanopori, cu rădăcini profunde în ceea ce era cunoscut inițial sub numele de contorul Coulter, tehnica impulsurilor rezistive. Din punct de vedere istoric, un sistem de nanopori care cuprinde proteina oligomerică  $\alpha$ -hemolizina ( $\alpha$ -HL) secretată de toxina *Staphylococcus aureus* a fost aplicat pentru prima dată la detectarea polinucleotidelor, după cum au dezvăluit în 1996 John J. Kasianowicz și colaboratorii. În prezent, o mare varietate de alți nanopori în stare solidă sau pe bază de proteine au apărut ca instrumente eficiente pentru detectarea stocastică a unor analiți de dimensiuni mici, precum ionii metalici, manipularea moleculelor sau sondarea în timp real, a reacțiilor chimice la nivel de singură moleculă fără a fi marcate. În studiile realizate de noi, am utilizat doar porul proteic de  $\alpha$ -HL. Prin complexarea acestui por cu o moleculă monociclică de  $\gamma$ -ciclodextrină ( $\gamma$ -CD) s-a obținut un sistem cu ajutorul căruia s-a reușit recunoașterea și caracterizarea a trei tipuri de antibiotice din familia  $\beta$ -lactamicelor nu numai pe baza dimensiunii fizice a antibioticului, ci și a polarității medicamentului, care afectează în mod critic capacitatea acestuia de a forma complecși tranzitorii cu molecula CD prezentă într-un por proteic. Din datele experimentale obținute s-a putut estima energia liberă standard de legare între antibiotic și  $\gamma$ -CD. Mai mult, măsurarea eficientă a termodinamicii de legare a interacțiunilor dintre ciclodextrine (CD) și antibiotice rămâne o provocare în domeniul chimiei-fizice și al farmaceuticii. Investigațiile interacțiunilor reversibile dependente de pH și de voltaj



dintre ampicilină și  $\gamma$ -CD, prin monitorizarea semnăturilor de curent ionic au arătat că forțele mortice electrice și electroosmotice modifică ratele reacției reversibile ale interacțiunii ampicilinei cu  $\gamma$ -CD, și de asemenea, produce modificări ale energiei libere. pH-ul neutru facilitează apariția complexilor  $\gamma$ -CD-ampicilină mai instabili, în comparație cu complexii  $\gamma$ -CD-ampicilină care se formează la pH acid. S-a presupus că o sarcină electrică parțială dependentă de pH pe molecula de ampicilină și selectivitatea anionică a complexului  $\alpha$ -HL –  $\gamma$ -CD explică manifestările intracavitare ale antibioticului în  $\gamma$ -CD. Această abordare poate oferi alternative unice pentru caracterizarea interacțiunilor CD – analiți, utile pentru formulele farmaceutice și sistemele de eliberare prelungită a medicamentelor.

Continuând studiile cu nanoporul proteic de  $\alpha$ -HL liber – fără adaptor molecular – s-a observat că, călcâiul lui Ahile al acestei abordări este timpul de rezidență relativ scurt al analiților în interiorul nanoporului. Acest lucru împiedică colectarea de date suficiente necesare pentru a desprinde concluzii semnificative din punct de vedere statistic cu privire la starea fizică sau chimică a analitului studiat. Pentru a atenua acest aspect, s-au propus două strategii de frânare a analiților ce traversează porul proteic. Prima strategie exploatează **fluxul electroosmotic** pentru a controla timpul de rezidență, direcția și secvența dinamicii spațio-temporale a unei singure peptide de-a lungul nanoporului. Acest lucru a permis, de asemenea, identificarea traiectoriei mezoscopice a unei peptide care iese din nanopor, fie prin vestibul, fie prin lumen. A doua strategie are la bază principiile unei abordări denumite „*nanopore tweezing*” – **penseta cu nanopori** – care permite creșterea simultană a ratei de captare și scăderea simultană a ratei de evadare a unei peptide din  $\alpha$ -HL, în funcție de tensiunea aplicată. În esența sa, această metodă necesită crearea unui dipol electric pentru o peptidă studiată, prin intermediul unor reziduuri de aminoacizi pozitivi și negativi la cele două capete ale peptidei. Separarea reglabilă a sarcinilor, realizată la ambele capete ale unei macromolecule, modulează eficient dinamica captării și a traficului de macromolecule prin porul de dimensiuni nanometrice. Aplicațiile raportate ale acestei abordări sugerează o soluție care sporește rezoluția temporală a detecției nanoporilor și care dovedește capacitatea sistemului de a distinge între grupuri de aminoacizi diferiți din polipeptidele studiate și propun o strategie pentru a transpune astfel de senzori în dispozitive adecvate pentru secvențierea polipeptidelor la nivel unimolecular. De asemenea, utilizând *nanopore tweezing* și acizi petido nucleici (PNA – analogi artificiali ai oligonucleotidelor, în care catena de zahăr-fosfat a fost înlocuită cu o



catenă peptidică de tip N-(2-aminoetil)glicină.) funcționalizați cu aminoacizi s-a reușit detectarea bazelor distincte dintr-un PNA homopolimeric sau a unui grup de 3 baze dintr-un PNA heteropolimeric, și s-au obținut informații despre dinamica conformațională a PNA-ului prins în nanopor, relevante pentru perfecționarea capacității de recunoaștere a bazelor azotate prezente în acizii nucleici. Utilizând *nanopore tweezing* s-a estimat și energia de hibridizare necesară unui duplex. Astfel, s-au utilizat acizii peptido nucleici care au fost funcționalizați cu catene polipeptidice cu sarcină pozitivă care în prezența ADN-urilor complementare formează duplecși PNA-DNA. Sarcina opusă de la extremitățile duplexului PNA-DNA a facilitat ruperea acestuia la aplicarea unei diferențe de potențial, urmată de translocarea monomerilor prin por. Prin utilizarea unei descrieri cinetice în cadrul teoriei proceselor Markov discrete, s-a propus un model cinetic minimalist pentru a calcula energia de separare a lanțurilor din duplex indusă de forța electrică. În continuare, au fost detectate selectiv șiruri individuale de ssDNA în vestibulul nanoporului proteic de  $\alpha$ -hemolizină ( $\alpha$ -HL). Mecanismul de detecție s-a bazat pe determinarea modificărilor topologice intrinseci a moleculelor țintă de ssDNA după hibridizarea cu fragmente complementare de PNA. Semnăturile de curent ușor de distins ale asocierii reversibile a duplecșilor PNA- DNA cu vestibulul  $\alpha$ -HL, din punct de vedere al amplitudinilor de blocare și al caracteristicilor cinetice, permit detectarea specifică a hibridizării acizilor nucleici.

Detectarea în timp real și ușor de utilizat a acizilor nucleici este crucială pentru multe aplicații, inclusiv pentru diagnosticul medical, screeningul genetic, știința criminalistică sau monitorizarea apariției și progresului diferitelor boli. În acest context, autoarea a prezentat o abordare exploratorie la nivel de singură moleculă pentru discriminarea multiplexă între ADN-uri monocatenare (ssDNA) de dimensiuni similare. Strategia de bază a combinat (i) o metodă bazată pe marcarea cu lanțuri de arginină (poli-Arg) cu lungime variabilă, atașate catenelor PNA, care vor hibridiza cu regiuni selectate din ținte complementare de ssDNA (cDNA) în soluție și (ii) formarea și detectarea ulterioară cu nanoporul  $\alpha$ -hemolizină a duplecșilor (poli-Arg)-PNA-cDNA. Am descoperit că lanțul poly-Arg, variabil în lungime, a marcat distinct procesele moleculare asociate cu capturarea, prinderea și dehibridizarea duplecșilor mediate de nanopor. Acest lucru a permis detectarea țintelor de ssDNA prin intermediul semnăturilor specifice a evenimentelor de blocare a (poli-Arg)-PNA-cDNA. Prin modificarea tăriei ionice se observă că și cinetica duplecșilor variază astfel că interacțiunea dintre complecși și nanopor



este mai favorabilă la o concentrație mai mare de sare. O altă observație este că, o concentrație mai mică de sare duce la reducerea volumului efectiv al poli(Arg)-PNA libere crescând mobilitatea electroforetică a acestora în timp ce traversează nanoporul. Un alt rezultat interesant arată că hibridizarea specifică a PNA-urilor care conțin fracțiuni cationice cu ssDNA-uri complementare cu sarcină negativă la o concentrație de sare mică este împiedicată în mod dramatic. S-a propus un scenariu în care ecranarea redusă a sarcinilor de către contraioni în electroliții cu conținut scăzut de sare permite interacțiuni electrostatice nespecifice cu catena anionică a polinucleotidelor, ducând la apariția complexilor colapsați. În condiții experimentale similare cu cele fiziologice au fost prezentate dovezi care sugerează, în timp real, formarea unor complecși poli(Arg)-PNA-ADN prin întâlnirea moleculelor în interiorul vestibulului atunci când acestea intră în nanopor din direcții opuse. Cu ajutorul unor perfecționări ulterioare, metoda ar putea evolua într-un instrument care să permită noi posibilități de investigare și control al asocierii la nivel de singură moleculă a unor reacțiuni chimice și mai complicați în interiorul nanovolumelor.

Datorită nevoii stringente de a genera medicamente sau vaccinuri specifice pentru COVID-19 și gestionarea focarului acestuia, cunoștințele detaliate cu privire la intrarea SARS-CoV-2 în celulele gazdă și metodele de detectare în timp util, ieftine și ușor de utilizat sunt de o importanță critică pentru limitarea epidemiei SARS-CoV-2. Deși legarea SARS-CoV-2 de receptorii ACE2 este recunoscută pe scară largă ca fiind principala etapă care mediază patogeneza COVID-19, totuși proteina S1 a SARS-CoV-2 în interacțiunea cu membranele lipidice și celule epiteliale pulmonare nu necesită medierea receptorilor ci, declanșează formarea căilor de permeație și trecerea ionilor prin acestea. Spre deosebire de sistemul membrană lipidică suprasimplificată folosit aici, celulele umane posedă o bogată diversitate compozițională și chimică a lipidelor membranare; totuși, în virtutea asimetriei lor și a capacității demonstrate de a modula funcția proteinelor, este posibil să nu se excludă căi suplimentare de infectare a virusului în mediu biologic. În timp ce ramificațiile fiziologice ale descoperirilor noastre care dezvăluie activitatea asupra membranei lipidice a subunității libere S1 a SARS-CoV-2 sunt încă discutabile pentru patogeneza SARS-CoV-2, subliniem faptul că o caracteristică specială a monomerului S a SARS-CoV-2 este existența unui nou loc de clivaj a furinei între subunitățile S1 și S2, iar disocierea subunității S1 pregătește spikul pentru infecție. Apoi, s-a demonstrat capacitatea unui nanopor proteic  $\alpha$ -HL de a detecta reacțiile



imunologice dintre domeniul proteic RBD (*receptor-binding domain*) din subunitatea proteică S1 a proteinei ‘spike’ a virusului SARS-CoV-2 și un anticorp specific, ceea ce poate fi util în dezvoltarea unor noi tehnologii de diagnostic clinică a altor patogeni și pot oferi noi perspective în înțelegerea patogeniei infecției cu SARS-CoV-2, a tratamentului și a detectării în timp real a acesteia. Încurajați de rezultatele obținute, am propus o metodă simplă și eficientă pentru a detecta în mod specific și în timp real, subunitatea proteică S1 a SARS-CoV-2 în soluție apoasă și în prezența moleculelor relevante din punct de vedere fiziologic. Utilizând atât anticorpi monoclonali, cât și receptorul ACE2, ca substraturi de legare specifice, am crescut capacitatea de detectare a S1. Metoda deschide perspectiva detectării rapide și ieftine a altor mutații ai proteinei S1, anticorpi artificiali sau naturali în proba apoasă (de exemplu, IgG și IgM), testarea eficacității terapiei cu inhibitori peptidici pentru proteina S a SARS-CoV sau a virusurilor înrudite sau folosirea cu costuri minime a unor echipamente alternative pentru monitorizarea interacțiunii antigenelor virale cu ținte proteice selectate, relevante pentru descoperirea proteinelor terapeutice.

În cea de-a doua secțiune se descrie parcursul academic și profesional al autoarei, aducând în discuție contribuțiile referitoare la activitatea de cercetare și cea didactică. Autoarea este implicată în îndrumarea studenților în calitate de coordonator al lucrărilor de licență, precum și ca membru în comisiile de îndrumare ale doctoranzilor, folosindu-și capacitatea de a gestiona cercetarea interdisciplinară ce implică fizica, chimia și biologia. De asemenea, fiind coordonator sau persoana cheie a proiectelor de cercetare, a implicat studenții doctoranzi în realizarea obiectivelor propuse.