

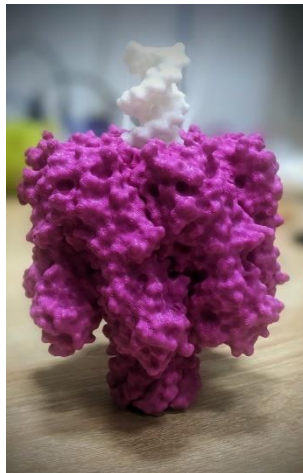


UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” din IAȘI
ȘCOALA DOCTORALĂ DE FIZICĂ



Rezumatul tezei de doctorat

**Detecția și analiza structurală cu nanopori,
la nivel de singură moleculă, a unor biomolecule relevante**



Conducător științific:
prof. univ. dr. Tudor LUCHIAN

Student doctorand:
BUCĂȚARU Ioana Cezara

IAȘI
2023

Mulțumiri

*Mulțumesc domnului coordonator științific **prof. univ. dr. Tudor Luchian** pentru sprijinul și îndrumarea acordate cu profesionalism și răbdare în parcurgerea studiilor doctorale.*

*Mulțumesc membrilor din comisia de îndrumare **CS II dr. Alina Asandei, conf. univ. dr. habil. Loredana Mereuță și CS III dr. Irina Șchiopu** pentru încrederea acordată, răbdarea și sfaturile oferite pe tot parcursul doctoratului, ce au condus la dezvoltarea mea profesională și îmbunătățirea rezultatelor.*

*Mulțumiri deosebite kolegei și prietenei mele **CS dr. Isabela Dragomir**, alături de care “cercetarea este mai frumoasă”, pentru colaborare și încurajare.*

Mulțumesc deopotrivă familiei și prietenilor că au avut încredere în mine și mi-au fost alături pe acest drum, oferindu-mi dragoste necondiționată și momente memorabile ce mi-au ridicat moralul.

*Sunt recunoscătoare de a face parte din echipele proiectelor de cercetare **PN-III-P4-ID-PCE-2020-0011 și PN-III-P1-1.1-TE-2021-0331** și mulțumesc pe această cale directorilor de proiect **prof. univ. dr Tudor Luchian**, respectiv **CS II dr. Corina Ciobănașu**, pentru colaborare și contribuirea la formarea mea profesională.*

*Mulțumesc domnului **prof. univ. dr. Marius Mihășan** din cadrul grupului de cercetare **BioActive** al Facultății de Biologie de la Universitatea “Alexandru Ioan Cuza” din Iași, pentru realizarea unui model molecular 3D al nanoporului proteic de alpha-hemolizină (regăsit în fotografia de pe coperta acestei lucrări), ce mă ajută la facilitarea explicării metodei de analiză utilizată în realizarea tezei de doctorat.*

CUPRINS

<i>Listă de abrevieri</i>	5
<i>INTRODUCERE – Motivația și importanța studiului realizat</i>	6
<i>CAPITOLUL I. Noțiuni teoretice introductive</i>	9
I. 1. Tehnici de investigare la nivel de singură moleculă utilizate în biofizica moleculară	9
I. 2. Caracteristici generale ale principiului de investigare la nivel de singură moleculă cu ajutorul nanoporilor	10
I. 3. Descrierea stohastică a principiului de detecție cu nanopori	11
I. 4. Elemente teoretice generale despre spectroscopia de forță bazată pe utilizarea nanoporilor	12
I. 5. Tipuri de nanopori	13
I. 6. Caracteristici structurale și funcționale ale porului proteic de α-hemolizină	13
<i>CAPITOLUL II. Tehnici și metode utilizate în realizarea studiului</i>	15
II. 1. Tehnica de electrofiziologie utilizată pentru studiul la nivel de singură moleculă a unor molecule de interes biologic	15
<i>CAPITOLUL III. Rezultate experimentale și discuții</i>	16
III. 1. Investigarea la nanoscală a dendrimerilor PAMAM de generație mică 16	
III. 1. 1. Caracteristici structurale și funcționale ale dendrimerilor.....	17
III. 1. 2. Investigarea unor dendrimeri PAMAM de generație mică în spații nanometrice	18
III. 1. 4. Determinări volumetrice ale PAMAM G1 în interiorul unor cavități nanometrice.....	22
III. 2. Studiul comparativ, la nivel de singură moleculă, al mecanismului de hibridizare a duplecșilor ADN-PNA și ADN-PNA conjugat cu o coadă de poliarginine	24
III. 2. 1. Caracteristici structurale și funcționale ale acizilor peptido nucleici	25
III. 2. 2. Înregistrarea la nivel de singură moleculă a amprenteii dată de interacțiunea duplecșilor ADN-PNA cu nanoporul de α -HL.....	26
III. 2. 3. Cinetica interacțiunii duplexului cDNA-PNA cu nanoporul de α -HL ..	28

III. 3. Studiul influenței tăriei ionice asupra interacțiunii moleculelor de ADN și PNA cu ajutorul tehnicii electrofiziologice la nivel de singură moleculă	32
III. 3. 1. Efectele concentrației de sare asupra interacțiunii moleculelor de poly(Arg)-PNA cu nanoporul.....	33
III. 3. 2. Efectele concentrației de sare asupra interacțiunii duplecșilor poly(Arg)-PNA-DNA cu nanoporul.....	35
III. 3. 3. Monitorizarea la nivel de singură moleculă a formării complecșilor poly(Arg)-PNA-DNA nespecifici	37
III. 4. Detecția specifică a unor secvențe monocatenare de ADN cu ajutorul unui sistem bazat pe utilizarea nanoporului proteic și nanoparticule din aur.41	41
III. 4. 1. Caracteristici și proprietăți ale nanoparticulelor de aur	41
III. 4. 2. Principiul metodei de detecție a ADN-ului și materialele utilizate	42
III. 4. 4. Detecția unor secvențe monocatenare scurte de ADN utilizând sistemul AuNP/ α -HL.....	44
III. 4. 5. Studiul selectivității și sensibilității metodei de detecție bazată pe sistemul AuNP/ α -HL.....	45
CONCLUZII GENERALE	49
BIBLIOGRAFIE.....	50
ANEXĂ. Diseminarea activității științifice din cadrul studiilor doctorale.....	67

Listă de abrevieri

- α -HL** – alfa-hemolizina
 γ -CD – gama-ciclodextrina
ADN – acid dezoxiribonucleic
AFM – microscopia de forță atomică ('Atomic Force Microscopy')
AINS – antiinflamatoare nesteroidiene
Arg – arginină
ARN – acid ribonucleic
Asp – acid aspartic
AuNP – nanoparticule de aur
BLM – bistrat lipidic membranar ('Bilayer Lipid Membrane')
CDB – descărcare electrică controlată între doi electrozi pentru perforarea unui material dielectric ('Controlled Dielectric Breakdown')
CT – computer tomograf
FLIP – pierderea fluorescenței după fotoalbire ('Fluorescence Loss In Photobleaching')
FRAP – recuperarea fluorescenței după fotoalbire ('Fluorescence Recovery After Photobleaching')
FRET – transferul de energie de rezonanță Förster ('Förster Resonance Energy Transfer')
Glu – acid glutamic
HS – ser uman ('Human Serum')
IRM – imagistică prin rezonanță magnetică
KCl – clorură de potasiu
Lys – lizină
MT – penseta magnetică ('Magnetic Tweezers')
NFS – tehnică de investigare la nivel de singură moleculă cu ajutorul nanoporiilor ('Nanopore Force Spectroscopy')
OT – penseta optică ('Optical Tweezers')
PALM – microscopia cu localizare după fotoactivare ('PhotoActivated Localization Microscopy')
PAMAM – poliamidoamină
PCR – reacția în lanț a polimerazei ('Polymerase Chain Reaction')
PNA – acid peptido nucleic ('Peptide Nucleic Acid')
poly(Arg)-PNA – PNA conjugat cu un lanț polipeptidic din arginine
PTFE – politetrafluoroetilenă
SPR – rezonanța plasmonică de suprafață ('Surface Plasmon Resonance')
ssDNA – secvențe monocatenare de ADN ('single-stranded DeoxyriboNucleic Acid')
STORM – microscopia cu reconstrucție stohastică optică ('Stochastic Optical Reconstruction Microscopy')
TEM – microscopia cu transmiere de electroni ('Transmission electron microscopy')
UV-VIS – ultraviolet-vizibil

INTRODUCERE – Motivația și importanța studiului realizat

Pentru a investiga cu acuratețe interacțiuni intermoleculare, primordiale pentru procesele biologice precum împachetarea/despachetarea proteinelor sau acizilor nucleici, replicarea ADN-ului și transcrierea genetică a ARN-ului, interacțiuni dintre acizi nucleici și proteine sau recunoaștere moleculară în general, au fost implementate tehnici de investigare la nivel de singură moleculă ca de exemplu penseta optică, penseta magnetică, spectroscopie de forță atomică, fluorescența de transfer a energiei de rezonanță (FRET) și microscopia optică de super-rezoluție.

Una dintre aceste tehnici de investigare la nivel de singură moleculă este și tehnica electrofiziologică bazată pe utilizarea unui nanopor sintetic sau biologic, al cărei principiu simplu își are rădăcinile în metoda Coulter de detectare a impulsului rezistiv pentru numărarea și măsurarea dimensiunilor particulelor suspendate în electroliți. Pe scurt, tehnica electrofiziologică presupune aplicarea unei forțe electrice externe pentru a capta molecula de interes în interiorul nanoporului inserat într-o membrană lipidică artificială și pentru a descoperi proprietăți unice ale moleculei țintă (e.g. constantele ratelor de asociere/disociere, volumul ocupat, energii de hibridizare, etc.). Astfel, această tehnică s-a dovedit a fi o platformă extrem de utilă pentru detecția, identificarea și caracterizarea biofizică a unor molecule biologice (e.g. peptide, proteine) și pentru detecția și secvențierea ADN-ului, într-o manieră necostisitoare, rapidă și cu un raport semnal-zgomot îmbunătățit.

Nanoporul proteic homo-heptameric, format de alfa-hemolizină (α -HL), o toxină secretată de patogenul *Staphylococcus Aureus*, este cel mai frecvent și mai ușor de folosit nanopor transmembranar în analiza stohastică la nivel de singură moleculă a diversilor analiți moleculari. Caracteristicile sale geometrice bine cunoscute și descrise în amănunt în cadrul tezei, proprietățile sale fizico-chimice (i.e. structura, rezistența la temperaturi, stabilitate mecanică), dar și faptul că permite reproductibilitatea experimentală, fac din nanoporul α -HL un instrument versatil utilizat în diverse studii biofizice.

Teza de doctorat intitulată '*Detecția și analiza structurală cu nanopori, la nivel de singură moleculă, a unor biomolecule relevante funcțional*' este structurată în trei capitole principale. *Primul capitol* conține noțiuni teoretice introductive, după cum îi este și numele, care oferă o trecere în revistă a tehnicilor de investigare la nivel unimolecular actuale și a aplicațiilor lor în biofizica moleculară. De asemenea, include informații teoretice generale referitoare la principiul de detecție cu nanopori și tehnica NFS ('Nanopore Force Spectroscopy') de investigare a moleculelor cu ajutorul

nanoporilor, precum și o clasificare a tipurilor de nanopori ce pot fi utilizați, punând accent pe nanoporul biologic α -HL, ce stă la baza studiilor din cadrul tezei.

Partea experimentală a tezei începe cu *al II-lea capitol*, unde sunt prezentate tehnicile și metodele utilizate pentru realizarea studiilor. Sunt incluse aici detalii despre dispozitivele experimentale și materialele implicate.

Capitolul III. Rezultate experimentale și discuții cuprinde contribuțiile personale aduse în domeniul temei și arată utilitatea nanoporului proteic transmembranar α -HL ca biosenzor molecular, evidențiind patru direcții principale de cercetare, sumarizate în cele patru subcapitole:

III. 1. Investigarea la nanoscală a unor dendrimeri PAMAM de generație mică. Având în vedere contribuțiile polimerilor dendrimerici în aplicațiile din domeniul biomedical (e.g. farmaceutică, imagistică medicală, terapie genică, terapia cancerului), cu rol în transportul unor molecule mici bioactive, studierea comportamentului acestor macromolecule nanometrice în spații restrânse ('nanoconfinement'), cum este și cazul nanoporului de α -HL liber sau modificat cu un adaptor molecular, fiind de interes actual.

III. 2. Studiul comparativ, la nivel de singură moleculă, al mecanismului de dehibridizare ('unzip') a dupleșilor ADN-PNA și ADN-PNA conjugat cu o coadă de poliarginine. În acest studiu am utilizat acizi peptido nucleici (PNA), polimeri sintetizați artificial care au o structură similară ADN-ului și pot forma dupleși complementari cu acesta, ce s-au dovedit a fi promițători pentru aplicarea în diagnosticarea moleculară și terapia genică. Prin tehnica de investigare, la nivel de singură moleculă, bazată pe utilizarea unui nanopor, cum este și nanoporul proteic de α -HL și modularea unor forțe asupra moleculei (tehnica NFS), se poate desluși procesul de desfacere a unor dupleși moleculari în timp real. Astfel, s-a urmărit diferența dintre utilizarea unui complex ADN-PNA simplu și un complex ADN-PNA conjugat cu un lanț de arginine. Studiul ajută la o mai bună înțelegere a mecanismelor ce au loc în interiorul nanoporului și conduce spre eficientizarea tehnicilor de investigare bazate pe acizi peptido nucleici.

III. 3. Studiul influenței tăriei ionice asupra detecției moleculelor de ADN cu ajutorul tehnicii electrofiziologice la nivel de singură moleculă. După demonstrarea potențialului oferit de tehnica electrofiziologică la nivel de singură moleculă, cu ajutorul nanoporului proteic α -HL, în detecția secvențelor monocatenare de ADN, am urmărit modificările în parametrii acestui proces, induse de diferiți factori, precum alegerea moleculei de sondare (o secvență complementară de PNA, conjugată cu un lanț polipeptidic de diferite dimensiuni) sau tăria ionică a mediului, cu scopul optimizării acestei tehnici pentru detecția ADN-ului în condiții fiziologice.

III. 4. Detecția specifică a unor secvențe monocatenare de ADN cu ajutorul unui sistem bazat pe utilizarea nanoporului proteic și nanoparticule din aur. În contextul pandemic actual, cauzat de COVID-19, s-a văzut răspândirea rapidă a virusului extrem de contagios în societatea de azi și impactul socio-economic pe care o astfel de boală o poate avea la nivel global. Pentru identificarea timpurie a bolilor infecțioase cauzate de răspândirea agenților patogeni precum bacteriile sau virusurile, sunt necesare tehnici de detectare a acidului nucleic care sunt rapide, accesibile financiar și ușor de utilizat. Metodele utilizate în prezent pentru diagnosticul clinic al infecțiilor virale sau bacteriene, cum ar fi tehnica PCR, necesită infrastructură și materiale costisitoare, timpul necesar pentru obținerea rezultatelor este mare, iar protocoalele laborioase implică personal specializat. Pornind de la aceste premise, am propus o metodă bazată pe utilizarea biosenzorului α -HL care împreună cu nanoparticule din aur (AuNP) și secvențe de PNA formează un sistem pentru detecția selectivă a unor fragmente monocatenare scurte de ADN cu un grad ridicat de specificitate și sensibilitate.

Teza de față se încheie cu concluziile generale reieșite din rezultatele obținute, bibliografia și anexa ce cuprinde contribuțiile științifice din perioada anilor de doctorat.

CAPITOLUL I. Noțiuni teoretice introductive

I. 1. Tehnici de investigare la nivel de singură moleculă utilizate în biofizica moleculară

Procesele biologice ce stau la baza „vieții” depind de comportamentul moleculelor implicate în reacțiile ce au loc. Metodele convenționale utilizate în biofizică descriu modul de acționare al unor ansambluri mari de molecule, bazate pe prezumția că moleculele identice reacționează simultan, când de fapt acestea funcționează în mod stohastic. În acest mod, metodele de investigație tradiționale pot omite diferite detalii conformaționale și proprietăți ale moleculelor de interes. Dezvoltarea tehnicilor de studiu la nivel de singură moleculă a permis studiul individual al unei singure molecule dintr-o mulțime, la un moment dat, ceea ce a condus la crearea unei abordări mai specifice de determinare și descriere a moleculelor biologice.

Tehnicile la nivel de singură moleculă prezintă cel puțin două avantaje de neînlocuit: (i) permit efectuarea de înregistrări în timp real, la nivel unimolecular și (ii) necesită o cantitate mică de probă. Prin monitorizarea în timp real a unei singure molecule se pot obține în mod direct traiectoriile de acțiune a moleculelor țintă, inclusiv detalii statice și structurale, chiar și în celule vii [1]. Spre deosebire de analiza tradițională a unor cantități mari, tehnicile la nivel de singură moleculă necesită un volum mic și o concentrație scăzută a probei, ceea ce este foarte important atunci când se lucrează cu materiale costisitoare [2].

În general, metodele la nivel de singură moleculă sunt împărțite în două categorii în funcție de modul de abordare: (i) cele care permit observarea moleculelor fără a induce perturbări din exterior asupra sistemului studiat, cum sunt metodele optice (e.g. FRET [3], FRAP [11], FLIP [3], PALM [4] și STORM [5]) și cele care studiază comportamentul molecular sub acțiunea unor forțe externe aplicate. Forțele fizice aplicate sunt de mai multe tipuri: mecanice (AFM [6]), optice (optical tweezers [7]), magnetice (magnetic tweezers [8]) sau electrice (Patch Clamp [9]).

Tehnicile electrofiziologice la nivel de singură moleculă bazate pe utilizarea nanoporiilor ca biosenzori stohastici pentru detecția și identificarea unei game largi de molecule (ioni, peptide, proteine sau agenți patogeni) [10]–[15]. În plus, se poate realiza investigarea modului de împachetare/despachetare a proteinelor [16]–[19]. O altă aplicație posibilă cu ajutorul nanoporiilor este detecția și investigarea acizilor nucleici (ADN, ARN, miARN), cea mai râvnită aplicație fiind secvențierea biopolimerilor [20]–[26]. De asemenea, spectroscopia de forță bazată pe nanopori constituie un alt exemplu de aplicație [27]–[29].

I. 2. Caracteristici generale ale principiului de investigare la nivel de singură moleculă cu ajutorul nanoporilor

Principiul investigării la nivel de singură moleculă bazată pe utilizarea nanoporilor este reprezentat la modul general în **Fig. I. 1**. În această metodă, un por de dimensiuni nanoscopice se află în membrana ce desparte două recipiente umplute cu soluție electrofiziologică. Acesta permite mișcarea liberă a sarcinilor electrice din soluție la aplicarea unei diferențe de potențial de o parte și alta a membranei și se înregistrează un curent ionic constant în timp, I_0 , specific pentru porul deschis (**Fig. I. 1. a**).

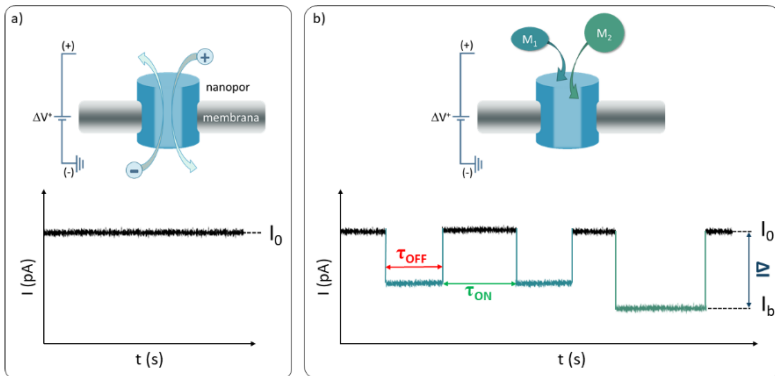


Fig. I. 1: Reprezentarea schematică a principiului detecției la nivel de singură moleculă bazat pe utilizarea nanoporilor. Metoda constă în monitorizarea curentului ionic (I_0) prin nanoporul inserat în membrană (a) și observarea modificărilor intensității curentului ionic (I_b) induse de interacțiunea moleculelor (M_1/M_2) cu nanoporul, în urma aplicării unei diferențe de potențial ΔV . Aceste evenimente de blocaj sunt caracterizate de parametrii specifici: τ_{OFF} , τ_{ON} și ΔI .

Captarea în nanopor a unei singure molecule duce la blocarea parțială a acestuia, înregistrându-se o scădere reversibilă a curentului ionic, I_b (**Fig. I. 1. b**). Această scădere se datorează dislocării unui volum de ioni din interiorul porului în prezența moleculei. Fiecare eveniment de blocaj reprezintă interacțiunea sau translocarea moleculei prin nanopor.

Parametrii ce descriu interacțiunea moleculei cu nanoporul, observabili în **Fig. I. 1. b**, sunt: i) timpul mediu de rezidență al moleculei în interiorul porului, τ_{OFF} ; ii) timpul mediu dintre două evenimente de blocaj, τ_{ON} și iii) amplitudinea blocajului ΔI , calculată ca diferența între intensitatea curentului prin porul deschis (I_0) și valoarea

curentului ionic din timpul blocajului (I_b): $\Delta I = I_b - I_0$. Analiza statistică a evenimentelor de blocaj specifice fiecărei molecule dezvăluie proprietăți chimice, modificări conformaționale sau alte caracteristici ale analiților investigați.

Proprietățile fizice ale moleculelor studiate pot fi corelate cu amplitudinea blocajului curentului ionic prin nanopor, utilizând legea lui Ohm, bazată pe dislocarea unui volum de soluție electrolică din por. Se obține astfel un model din care se poate determina volumul moleculei:

$$\delta = \frac{\Delta I (l_p + 0.8d_p)^2}{\gamma \sigma \Delta V} \quad (I.8)$$

I. 3. Descrierea stohastică a principiului de detecție cu nanopori

Tehnicile electrofizice la nivel de “singură moleculă” permit înregistrarea fluctuațiilor de curent electric printr-un singur por, astfel fiind posibilă observarea vizuală a fenomenului de tranziție dintre stările conductive diferite. Pentru a descrie comportamentul molecular al acestor pori este important de estimat numărul exact de stări prin care poate trece un canal ionic, de a determina ratele de tranziție între aceste stări și de a studia transportul moleculelor prin por.

Schema de reacție următoare (**Fig. I. 2**), descrie cel mai simplu model cinetic în care un canal ionic face tranziția doar între două stări moleculare, “deschis” (O = “open”), respectiv “închis” (C = “closed”), având parametrii descriptivi dați de constantele de reacție α și β [34].

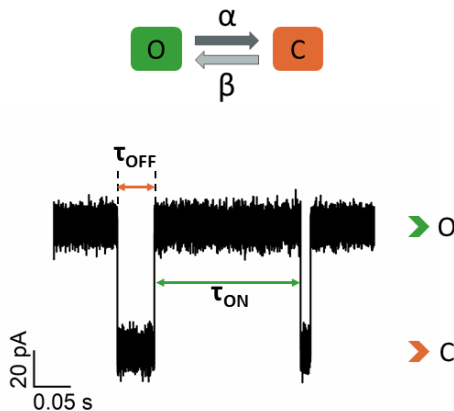


Fig. I. 2: Modelul cinetic de tranziție între două stări moleculare: deschis = O ('open'), respectiv închis = C ('closed'), descris de constantele de reacție α și β , însoțit

de **fluctuațiile curentului ionic mediat de canalul ionic**. Parametrii τ_{ON} și τ_{OFF} reprezintă intervalele de timp în care nanoporul se află în substarea O, respectiv C.

Aceste procese reversibile sunt stochastice, astfel că intervalele de timp petrecute de nanopor în una din cele două stări (τ_{ON} , τ_{OFF}) sunt mărimi aleatorii pentru care se poate determina funcția de densitate de probabilitate (*pdf*).

Cunoscând aceste funcții de distribuție exponențială care descriu mărimile stochastice τ_{on} și τ_{off} , putem afla cantitativ valoarea medie a acestora:

$$\overline{\tau_{OFF}} = \int_0^{\infty} t(pdf_c)dt = \int_0^{\infty} t(\beta e^{-\beta t}) dt = \frac{1}{\beta} \quad (I.15)$$

$$\overline{\tau_{ON}} = \int_0^{\infty} t(pdf_o)dt = \int_0^{\infty} t(\alpha e^{-\alpha t}) dt = \frac{1}{\alpha} \quad (I.16)$$

Utilizând tehnica de electrofiziologie la nivel de singură putem înregistra valori discrete ale intervalelor de timp cât nanoporul se află în una din stările conductive O (τ_{ON}), respectiv C (τ_{OFF}). Din calculul mediilor aritmetice ale acestor valori înregistrate rezultă valori estimative ale mărimilor: $\overline{\tau_{ON}}$, respectiv $\overline{\tau_{OFF}}$. Inversul acestor valori medii determină parametrii descriptivi ai reacției: α și β , unde α reprezintă constanta de asociere k_{ON} , iar β reprezintă constanta de disociere k_{OFF} . Precizia acestor determinări este cu atât mai mare cu cât se vor înregistra mai multe valori ale acestor intervale de timp [34], [35].

I. 4. Elemente teoretice generale despre spectroscopia de forță bazată pe utilizarea nanoporilor

Datorită descoperirilor și progreselor remarcabile din domeniul tehnicilor de investigare la nivel de singură moleculă este posibilă măsurarea în timp real a forțelor și tensiunilor dezvoltate în timpul unor procese biologice. Mai mult decât atât, exercitarea controlată a unor forțe externe asupra sistemului biologic și înregistrarea răspunsului dat de biomolecule, constituie un instrument pentru studiul proprietăților acestora, a interacțiunilor inter sau intra-moleculare, a structurii, precum și a funcțiilor biologice.

În această tehnică la nivel unimolecular se exercită o forță locală, F , asupra biomoleculii care trece printr-un singur nanopor, generată de sarcina electrică efectivă, intrinsecă moleculei (Q_{ef}), fiind direct proporțională cu diferența de potențial aplicată (ΔV).

Dacă în timpul translocării prin nanopori, apare un obstacol din cauza constrângerilor geometrice, de exemplu secțiunea transversală a moleculei este mai mare decât diametrul porului, atunci va apărea o forță mecanică, egală și de sens opus, F_m . Astfel, are loc o forfecare localizată produsă de acțiunea celor două forțe asupra moleculei, ce destabilizează structura sau legăturile biomoleculare, ducând ulterior la o rupere sau tranziție moleculară, de exemplu disocierea dintre un ligand și receptorul său, despachetarea unei proteine sau desfacerea acizilor nucleici.

Metoda NFS se utilizează pentru investigarea cineticii procesului de desfacere a moleculelor de ADN, oferind informații despre energia liberă și constanta ratei de desfacere a acestora [37], [38], pentru a măsura constantele ratelor de asociere și disociere ale unui sistem biomolecular format între molecule de ADN și proteine [39] sau pentru studiul interacțiunilor dintre molecule mici bioactive și secvențe de ADN [40].

I. 5. Tipuri de nanopori

Tehnica de investigare la nivel de singură moleculă bazată pe nanopori implică utilizarea fie a unor pori proteici ce se formează în mod natural în membrana lipidică [41], fie a unor pori solizi fabricați în materiale sintetice (e. i. silicon [42], cuarț [43], metale [44], filme polimerice [45] sau materiale 2D precum grafenul [46]). Fiecare sistem prezintă avantaje specifice.

Cei mai utilizați nanopori proteici în tehnologiile de singură moleculă, sunt împărțiți în două categorii, în funcție de structura transmembranară ce poate fi în formă de ‘ β -barrel’, cum sunt MspA [51], [52], OmpG [53] și OmpF [54], [55], alfa-hemolizina (α -HL) [20], [56] și aerolizina (AeL) [57]–[59] sau ‘ α -helix’, din care fac parte toxinele formatoare de pori citolizina (ClyA) [60] și actinoporina FraC [61], precum și proteina motoare de împachetare al ADN-ului bacteriofagului *Bacillus subtilis* ϕ 29 [62].

Nanopori formați de canale ionice proteice sunt unici și versatili întrucât permit atașarea unui receptor în interiorul acestora, ce face posibilă recunoașterea specifică a moleculelor țintă studiate. Această funcționalitate crește selectivitatea porului. Mai mult decât atât, datorită dimensiunilor fixe ale porului, rezultatele studiilor bazate pe nanopori proteici sunt foarte reproductibile [64].

I. 6. Caracteristici structurale și funcționale ale porului proteic de α -hemolizina

Proteina α -hemolizina (α -HL) se utilizează cu succes pentru înregistrările electrofiziologice la nivel de singură moleculă datorită proprietăților sale bine

cunoscute. α -HL este o toxină secretată de bacteria Gram-pozitivă *Staphylococcus aureus* [65]. Monomerul solubil în apă Error! Reference source not found.. a), este adsorbit la nivelul membranei lipidice unde oligomerizează cu alți șase monomeri identici pentru a forma canale ionice heptamerice, de dimensiuni nanoscopice, cu o lungime și un diametru de aproximativ 10 nm [56].

Geometria nanoporului prezintă o regiune transmembranară cu deschiderea “*trans*” spre interiorul celulei. Această structură de “ β -barrel” are diametrul interior de 2,6 nm și lungimea de 5,2 nm. Regiunea extramembranară a proteinei, cu lungimea de 7 nm, prezintă o nanocavitate mai largă numită vestibul, cu diametrul variabil între ~1,5 nm și 4,6 nm. Aceasta are o deschidere “*cis*” spre mediul extracelular, cu diametrul de 2,6 nm. Cele două regiuni sunt conectate prin zona de constricție, cu diametrul de 1,5 nm, fiind cea mai îngustă parte a porului [56] (**Fig. I. 3**).

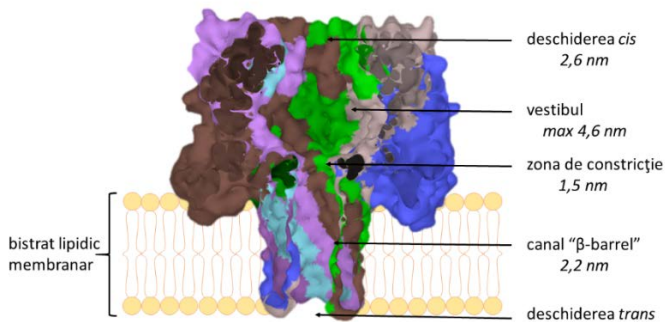


Fig. I. 3: Componentele și caracteristicile geometrice (diametrul) nanoporului α -HL inserat într-un bistrat lipidic membrantar.

Nanoporul proteic format de α -hemolizină se poate insera în diferite membrane lipidice, biologice sau sintetice, iar mecanismul de autoasamblare este spontan și nu necesită condiții ionice specifice [69]. Porul α -HL este stabil într-o serie de situații în condiții de pH și temperaturi diferite, iar canalul transmembranar este deschis în mod obișnuit [71].

Toate aceste proprietăți fac ca nanoporul proteic format de α -hemolizină să fie potrivit pentru utilizarea sa în numeroase aplicații biotehnologice, precum cele menționate în subcapitolul I. 1.

CAPITOLUL II. Tehnici și metode utilizate în realizarea studiului

II. 1. Tehnica de electrofiziologie utilizată pentru studiul la nivel de singură moleculă a unor molecule de interes biologic

Principala tehnică utilizată în cadrul acestei lucrări pentru detecția și investigarea la nivel uni-molecular a unor molecule de interes biologic este tehnica de electrofiziologie moleculară. Aceasta este bazată pe înregistrarea curentului ionic mediat de un singur canal ionic transmembranar format de proteina α -HL și analiza fluctuațiilor apărute în semnalul electric ca urmare a interacțiunilor moleculă – nanopor.

Dispozitivul experimental, necesar pentru implementarea acestei tehnici de studiu la nivel de singură moleculă, este ilustrat în **Fig. II. 1. A)**.

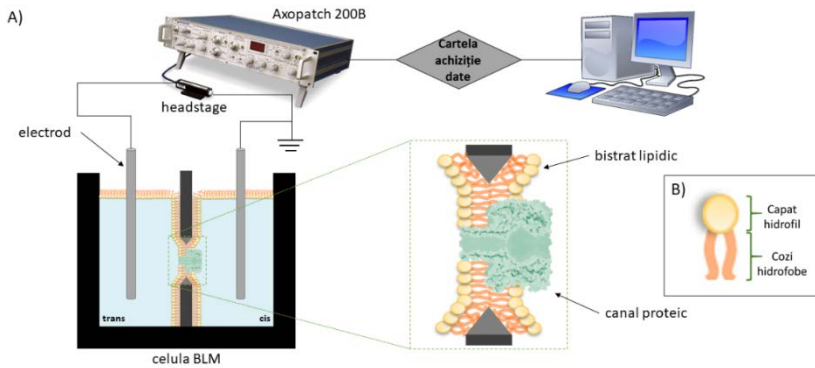


Fig. II. 1: A) *Reprezentare schematizată a dispozitivului experimental implementat în tehnica de electrofiziologie moleculară la nivel de singură moleculă.* B) *Structura unei fosfolipide, a cărei caracter amfipatic stă la baza principiului de formare a bistraturilor.*

Acesta prezintă mai multe componente constitutive. O cuvă, denumită ‘*celula BLM*’ (Bilayer Lipid Membrane) care este realizată din policarbonat, ce permite curățarea temeinică și decontaminarea între experimente. Celula BLM este compartimentată în două recipiente cu volumul ~ 1 ml fiecare, denotate de electrozii ce asigură conexiunile electrice din instalația experimentală astfel: ‘*cis*’, cu electrodul legat la masă, respectiv ‘*trans*’, electrodul de comandă. Acestea sunt despărțite de un film subțire de Teflon, în centrul căruia se află o apertură cu diametrul ~ 120 μ m, la nivelul căreia se va forma o membrană lipidică artificială, ce va servi ca suport pentru nanoporul proteic (**Fig. II. 1. A**), zoom in). Pentru a spori coeficientul de hidrofobicitate

al filmului de Teflon, cât și pentru a diminua deformările mecanice rezultate din generarea orificiului, acesta este pre-tratat pe fiecare latură cu o picătură de soluție hexadecan-pentan (10%, v/v), înainte de fiecare experiment.

Membrana lipidică artificială se realizează utilizând metoda Montal-Mueller [72], al cărei principiu de formare are la bază caracterul amfifatic al fosfolipidelor din care este alcătuit bistratul, fiind constituite dintr-un capăt polar hidrofil și două cozi hidrofobe (**Fig. II. 1. B**).

După obținerea unui bistrat lipidic stabil, protocolul experimental se continuă prin adăugarea, în partea '*cis*', a unui volum mic (~ 0,5 - 2 μ l) din soluția monomerică de proteină α -HL (Sigma-Aldrich, Germania) de concentrație controlată, stocul fiind realizat în 0,5 M KCl. Inserția ulterioară în membrana lipidică și formarea unui singur nanopor proteic de α -HL este observată prin creșterea intensității curentului ionic transmembranar, ce apare ca urmare a aplicării unei diferențe de potențial.

Moleculele de interes biologic studiate în cadrul acestei lucrări, detaliate în secțiunile următoare aferente studiului, au fost adăugate fie în partea '*cis*', fie în partea '*trans*' a membranei și s-au monitorizat fluctuațiile curentului ionic apărute datorită interacțiunii analitului cu nanoporul de α -HL inserat în bistratul lipidic, în urma aplicării diferențelor de potențial de diferite valori.

CAPITOLUL III. Rezultate experimentale și discuții

III. 1. Investigarea la nanoscală a dendrimerilor PAMAM de generație mică

Necesitatea de a îmbunătăți eficacitatea medicamentelor utilizate pentru a trata o varietate de boli (infecții, cancere etc.) și de a facilita transportul moleculelor terapeutice către celulele țintă (peptide, anticorpi, ADN etc.) a condus la dezvoltarea unor sisteme de transport care să permită un control mai mare asupra concentrației substanței active eliberate și o localizare mai precisă a țintei acesteia, precum și limitarea nivelului de toxicitate la minimum.

Unele dintre cele mai studiate macromolecule în acest sens, din ultimul timp, sunt dendrimerii. Dendrimerii sunt configurații nanopolimerice sintetice, cu o structură tridimensională globulară. Reacția de sinteză a acestor molecule permite crearea unei structuri ramificate cu plasarea precisă a unor grupări funcționale la capetele acestora. [74] Polimerii dendrimerici fac parte dintr-o categorie relativ nouă de sisteme de transport a medicamentelor cu multiple aplicații în domeniul biomedical, iar una dintre contribuțiile majore ale acestor molecule vizează îmbunătățirea solubilității medicamentelor. [75]

Scopul acestui studiu este investigarea la nanoscală a unor dendrimeri PAMAM de generație mică cu ajutorul unui nanopor proteic de α -HL. Mai mult decât atât, pentru a studia comportamentul dendrimerilor în spații mult mai mici, am propus utilizarea unui adaptor molecular (e.i., γ -ciclodextrina, notat γ -CD) care are rolul de a micșora diametrul nanoporului.

III. 1. 1. Caracteristici structurale și funcționale ale dendrimerilor

Structura generală, metode de sinteză și proprietăți fizico-chimice ale dendrimerilor

Dendrimerii PAMAM sunt macromolecule sferice de dimensiuni nanometrice sintetizate în laborator [74] ce prezintă trei componente structurale (**Fig. III. 1. 1**): (1) un nucleu central multifuncțional compus o moleculă de etilendiamină; (2) structura dendritică internă formată din straturi concentrice ramificate constituite din unități chimice repetitive (amidoamine) și (3) grupări funcționale terminale (amine terțiare), aflate la suprafața exterioră a structurii polimerilor. Aceste componente arhitecturale sunt foarte importante pentru stabilirea proprietăților macromoleculilor dendritice, inclusiv caracterul de monodispersitate, dimensiunile nanometrice, forma, masa molară și stabilitate. [76]

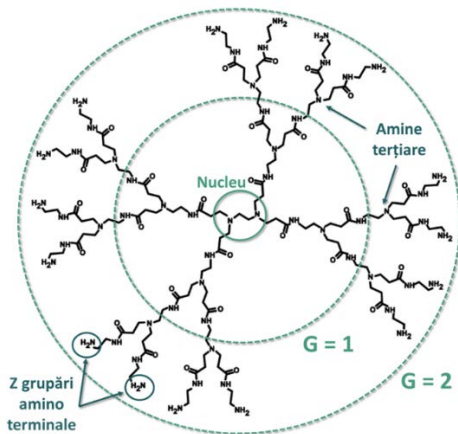


Fig. III. 1. 1: Reprezentarea elementelor structurale ale unui dendrimer PAMAM ce conține un nucleu central de etilendiamină, care apoi se ramifică în amine terțiare, dând naștere unor generații superioare (G1, G2). La suprafața sa, molecula dendrimerică conține un anumit număr Z de grupări amino terminale.

Aplicații biotehnologice

Dendrimerii sunt explorați pentru potențiale aplicații medicale, aceștia putând fi utilizați ca și sisteme de livrare versatile a unor molecule bioactive (medicamente, gene, agenți de contrast pentru imagistică ș.a.) datorită proprietăților unice precum structura ramificată, suprafața multifuncțională, dimensiunile reduse, un grad mare de solubilitate în apă, polivalența și masa moleculară precisă. Alte caracteristici ale dendrimerilor ce au fost luate în considerare pentru dezvoltarea aplicațiilor biotehnologice sunt: o mare capacitate de captare a medicamentelor, interacțiunea cu bistratul lipidic, potențial de livrare țintită, timpul de retenție în sânge, filtrare, internalizare intracelulară, biodistribuire și o bună stabilitate biologică.

III. 1. 2. Investigarea unor dendrimeri PAMAM de generație mică în spații nanometrice

În cadrul acestui studiu, în partea *trans* a cuvei experimentale, ce conține soluția electrofiziologică 2 M KCl menținută la $\text{pH} = 7$ cu soluție buffer 10 mM HEPES, am adăugat diferite concentrații (300-1200 μM) din soluția stoc de dendrimeri PAMAM G1 (20 mM), solubilizați în metanol. Aceste molecule prezintă la periferie opt grupări funcționale amino ce dau o sarcină electrică netă pozitivă, în soluție la pH neutru. Măsurătorile au fost efectuate prin aplicarea unor diferențe de potențial pozitive de o parte și cealaltă a membranei, ceea ce va determina transportul mediat electroforetic a dendrimerilor prin nanopori.

Investigarea moleculelor în spații nanometrice are o importanță deosebită pentru elucidarea mecanismelor de transport prin nanopori, întrucât prezintă mai multe constrângeri de natură fizică decât mișcarea în volumul soluției. Mai mult decât atât, diametrul și implicit conductanța porului α -HL poate fi modificată prin adăugarea unui adaptor molecular numit gama-ciclodextrină (γ -CD) ce blochează temporar nanoporul în zona de constricție, reducând totodată interacțiunile electrostatice dintre aminoacizii încărcăți electric din această zonă și moleculele aflate în vecinătate. [10], [77] Structura moleculară și dimensiunile adaptorului molecular utilizat sunt expuse în **Fig. III. 1. 2.**

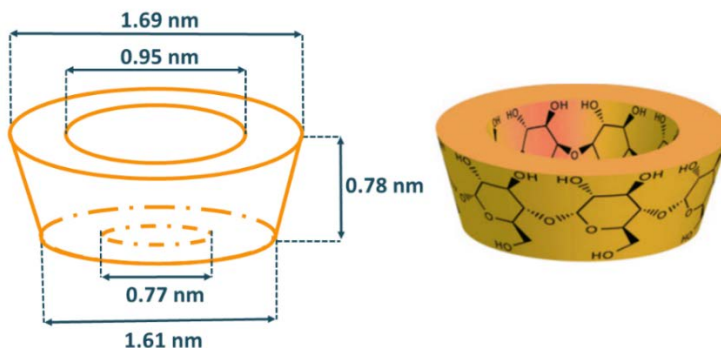


Fig. III. 1. 2: Structura moleculară și caracteristicile dimensionale ale adaptorului molecular gama ciclodextrina.

III. 1. 3. Cinetica de interacțiune a dendrimerilor PAMAM G1 cu nanoporul de α -HL și un adaptor molecular γ -CD

După adăugarea în regiunea *trans* a 30 μ M γ -CD, se observă blocarea reversibilă a curentului ionic prin nanopor datorită captării adaptorului molecular în interiorul lumenului, formându-se astfel sistemul hibrid α -HL \bullet γ -CD utilizat pentru investigarea dendrimerilor PAMAM G1 în diferite concentrații.

În urma acestor experimente se observă două tipuri de evenimente de blocaj distincte, cu amprentă specifică în curentul ionic înregistrat: i) blocaje cauzate de interacțiunea directă dintre dendrimerul PAMAM G1 și nanoporul liber de α -HL, caracterizate de timpul mediu de blocare $\tau_{OFF}^{\#}$ (**Fig. III. 1. 3. I.**) și ii) blocaje produse de interacțiunea dintre PAMAM G1 și porul hibrid α -HL \bullet γ -CD, atunci când adaptorul molecular este imobilizat temporar în canalul proteic, caracterizate de timpul mediu de blocare τ_{OFF}^* (**Fig. III. 1. 3. II.**). Intervalul de timp dintre două evenimente succesive este notat cu $\tau_{ON}^{\#}$ în primul caz, respectiv τ_{ON}^* în cel de-al doilea.

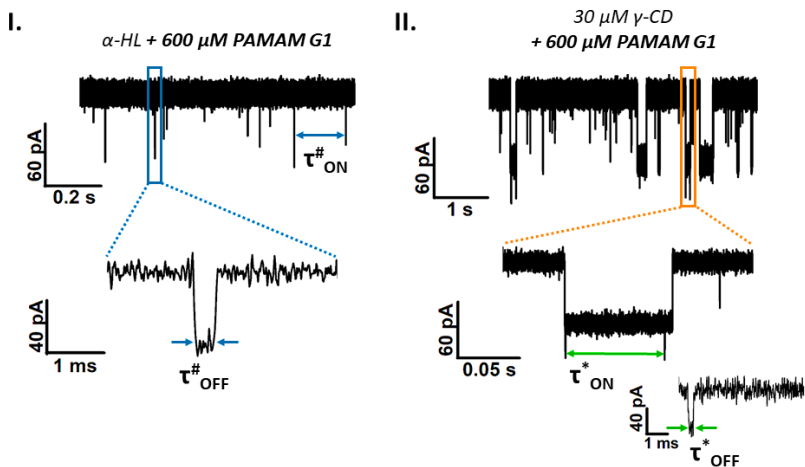


Fig. III. 1. 3: Înregistrări originale ale curentului ionic ce ilustrează exemple de evenimente de blocaj corespunzătoare interacțiunii reversibile a dendrimerilor PAMAM G1 ($600 \mu\text{M}$) cu nanoporul de $\alpha\text{-HL}$ (I), respectiv cu nanoporul hibrid $\alpha\text{-HL}\cdot\gamma\text{-CD}$ (II), la aplicarea unei diferențe de potențial pozitivă.

Din analiza statistică a parametrilor specifici celor două tipuri de evenimente de blocaj și utilizând relațiile definitorii ($rate_{\text{ON}} = 1/\tau_{\text{ON}}$ și $rate_{\text{OFF}} = 1/\tau_{\text{OFF}}$) am calculat ratele de asociere ($rate_{\text{ON}}^{\#}$, respectiv $rate_{\text{ON}}^*$) și disociere ($rate_{\text{OFF}}^{\#}$, respectiv $rate_{\text{OFF}}^*$) corespunzătoare.

Mai apoi, aceste rate de asociere și disociere au fost reprezentate în funcție de concentrația soluției de dendrimeri PAMAM G1 (**Fig. III. 1. 4**). Se observă că ratele de asociere depind direct proporțional de concentrație (**Fig. III. 1. 4. a și c**), frecvența evenimentelor de blocare atât a nanoporului de $\alpha\text{-HL}$, cât și a nanoporului hibrid $\alpha\text{-HL}\cdot\gamma\text{-CD}$, crescând odată cu creșterea concentrației de dendrimer PAMAM G1. Pe de altă parte, ratele de disociere nu depind de concentrație (**Fig. III. 1. 4. b și d**), valoarea acestora fiind aproximativ constantă.

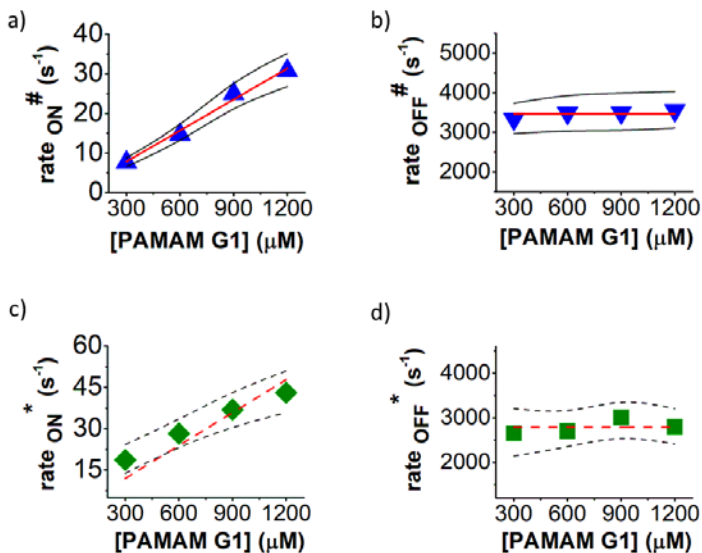


Fig. III. 1. 4: *Dependența de concentrația dendrimerilor a ratelor de asociere (a,c) și disociere (b,d) care caracterizează interacțiunea reversibilă dintre PAMAM G1 și porul de α -HL (sus), respectiv porul hibrid α -HL• γ -CD (jos), în urma aplicării diferenței de potențial pozitivă.*

În ceea ce privește durata blocajelor, timpul de disociere $\tau_{OFF}^{\#}$ scade cu creșterea diferenței de potențial aplicată pentru interacțiunea PAMAM G1 cu nanoporul de α -HL (**Fig. III. 1. 5. a**), respectiv timpul mediu τ_{OFF}^* crește cu ΔV pentru interacțiunea PAMAM G1 cu porul hibrid α -HL• γ -CD (**Fig. III. 1. 5. b**). Aceste rezultate indică faptul că dendrimerii PAMAM G1 translocă prin porul liber de α -HL din partea *trans* (unde au fost adăugați), în partea *cis* a sistemului experimental. Pe de altă parte, din cauza diametrului redus al nanoporului hibrid α -HL• γ -CD, PAMAM G1 pătrunde până în lumenul α -HL blocându-l temporar, însă nu are capacitatea de a transloca de partea cealaltă a membranei lipidice, întorcându-se în partea *trans*.

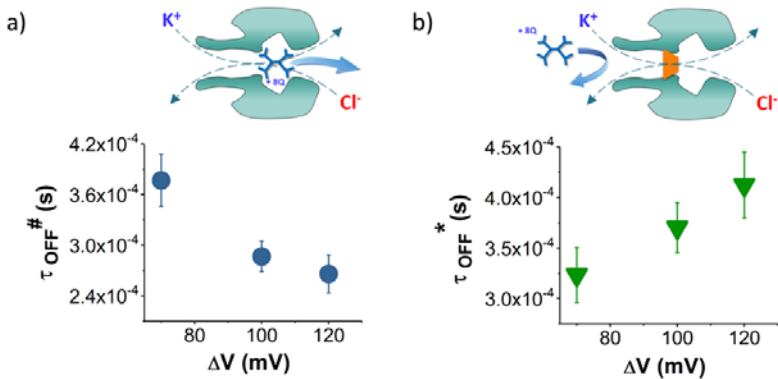


Fig. III. 1. 5: Dependenta de diferența de potențial aplicată a timpilor de disociere care caracterizează interacțiunea reversibilă dintre PAMAM G1 (600 μ M) și porul de α -HL (a), respectiv porul hibrid α -HL- γ -CD (b).

III. 1. 4. Determinări volumetriche ale PAMAM G1 în interiorul unor cavități nanometrice

O altă direcție de interes a acestui studiu a fost aflarea volumului pe care îl ocupă un singur dendrimer PAMAM G1 în interiorul nanoporului cu dimensiuni nanometrice.

Analizând evenimentele de blocaj specifice interacțiunii dendrimerilor PAMAM G1 cu γ -CD, observate în înregistrările electrofiziologice de curent ionic, am determinat volumul moleculelor.

Astfel, din determinările efectuate am obținut valoarea $\delta = 3.061 \text{ nm}^3$ pentru volumul ocupat de PAMAM G1 în interiorul lumenului nanoporului α -HL. Această valoare ar corespunde unei molecule dendrimerice deshidratate aflată în interiorul canalului, al cărei volum l-am calculat în aplicația de modelare moleculară HyperChem ce utilizează raza Van der Waals a atomilor constituenți ($\delta w = 4.459 \text{ nm}^3$).

Concluzii

- În cadrul acestui studiu, am identificat trei tipuri distincte de blocaje ale nanoporului de α -HL utilizat: (i) dendrimerul PAMAM G1 în interiorul nanoporului proteic, (ii) adaptorul molecular în interiorul porului și (iii) dendrimerul în interiorul γ -CD.
- Analiza statistică a interacțiunii dendrimerului PAMAM G1, fie cu nanoporul de α -HL sau cu γ -CD a arătat o cinetică mai rapidă pentru cel din urmă caz. De asemenea, am observat că dendrimerul PAMAM G1 translocă prin nanoporul de α -HL, însă atașarea unui adaptor molecular de γ -CD în interiorul porului nu permite trecerea dendrimerului.
- De asemenea, am calculat volumul ocupat de dendrimer în interiorul γ -CD, al cărei valori este similară cu cea obținută în programul Hyperchem, pentru o moleculă deshidratată.
- Elucidarea comportamentului dendrimerilor în fața unor constrângeri spațiale reprezintă un interes fundamental întrucât aceste molecule încărcate cu diverse substanțe bioactive sunt blocate sau trec frecvent prin canale biologice de dimensiuni nanometrice; scopul final fiind dezvoltarea unor aplicații biomedicale eficiente în transportul medicamentelor.

III. 2. Studiul comparativ, la nivel de singură moleculă, al mecanismului de hibridizare a dupleșilor ADN-PNA și ADN-PNA conjugat cu o coadă de poliarginine

În mod cronologic, proteina homo-heptamerică α -hemolizina (α -HL) a fost prima ca eficiență în timp și cu o abordare rentabilă, ce a făcut posibilă spectroscopia de forță, la nivel de singură moleculă, bazată pe utilizarea unui nanopor proteic (tehnica NFS) [79]–[82]. Această tehnică cuprinde următorii pași, reprezentați schematic în **Fig. III. 2. 1**: 1) un compus molecular încărcat electric, cum este și duplexul ADN-PNA, este dirijat electroforetic spre nanopor, prin interacțiuni cu diferența de potențial electric aplicat de-a lungul nanoporului; 2) odată ce este capturată la gura nanoporului, molecula este mai departe atrasă în regiunea internă a porului; 3) întrucât diametrul moleculei este mai mare decât diametrul porului (la intrarea în por sau oriunde de-a lungul volumului intern), procesul de translocare va fi întrerupt; 4) în zona de contact dintre molecula blocată și nanopor, forța electroforetică aplicată pe moleculă duce la apariția unei forțe mecanice orientată în sens opus, care, concomitent cu forța electrică, poate duce la ruperea compusului molecular.

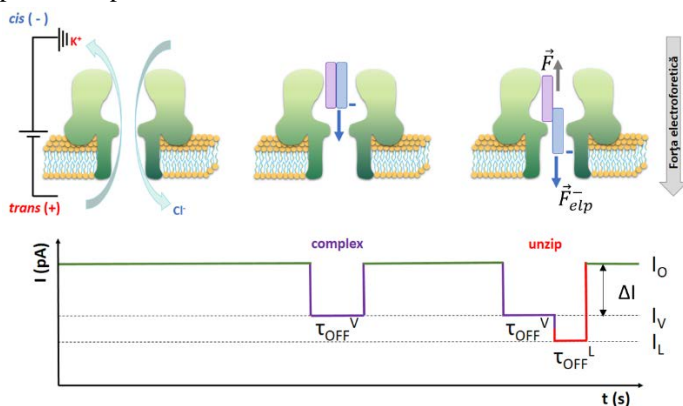


Fig. III. 2. 1: Reprezentarea schematică a principiului tehnicii spectroscopia de forță bazată pe un nanopor proteic α -HL inserat într-o membrană lipidică artificială.

Parametrii ce descriu procesul prezentat sunt: timpul mediu de blocare a vestibulului (τ_{OFF}^V), timpul mediu de blocare a lumenului (τ_{OFF}^L), constanta de reacție calculată ca fiind inversul timpului mediu de blocare ($k_{OFF} = 1/\tau_{OFF}$), și amplitudinea blocajului, ΔI , calculată ca diferența dintre intensitatea curentului ionic înregistrat prin por atunci când este blocat și intensitatea curentului ionic înregistrat prin por liber.

Principala întrebare care se pune în această lucrare este: cât de relevantă pentru procesul de desfacere a unui complex ADN-PNA blocat în interiorul vestibulului

nanoporului de α -HL, este prezența unui fragment de poliarginine atașat de PNA, ce acționează ca o proeminență situată în afara porului permițând procesul în care ambele capete sunt trase simultan în direcții opuse? Datele obținute din studiile comparative demonstrează că nivelul curentului observat înainte, în timpul și după procesul de desfacere atât a duplexilor ADN-PNA simplu cât și ADN-PNA conjugat cu poliarginine, a rămas similar, în timp ce cinetica desfacerii este diferită în mod remarcabil în cele două cazuri. De asemenea, am observat că mecanismul procesului de desfacere a duplexului precaptat în interiorul vestibulului nanoporului este distinct față de cazul în care procesul ar avea loc în apropierea intrării în β -barrel.

III. 2. 1. Caracteristici structurale și funcționale ale acizilor peptido nucleici

Acizii peptido nucleici (PNA – ‘peptide nucleic acid’) sunt molecule artificiale cu o structură similară moleculelor de ADN, a căror schelet format de grupări pentoză-fosfat din catena polinucleotidică a fost înlocuit cu unități de N-(2-aminoetil)glicină unite prin legături peptidice, pe care sunt atașate nucleobazele (adenină, citozină, guanină sau timină). [113]–[116] Structura chimică a unei astfel de molecule este reprezentată în **Fig. III. 2. 2**.

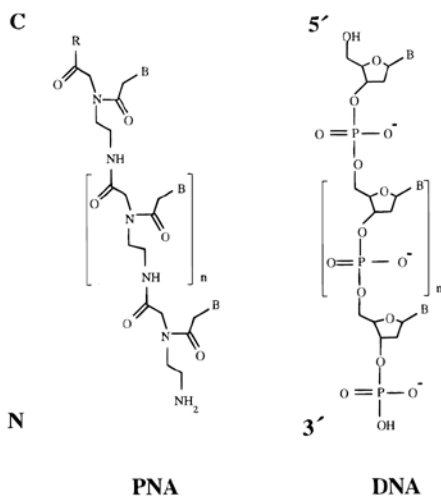


Fig. III. 2. 2: Structura chimică a unei molecule de PNA, neutră electric, formată din grupări N-(2-aminoetil)glicină, cu nucleobazele (B) atașate de acestea. Prin convenție, capătul amino este notat cu N, iar capătul carboxil cu litera C. În partea dreaptă este reprezentată structura chimică a unei molecule de ADN pentru comparație. [117]

Moleculele de PNA sunt neutre din punct de vedere electric și sunt capabile să formeze duplecși de tipul B cu molecule de ADN, prin legături de hidrogen între nucleobazele complementare, după regulile convenționale Watson-Crick [118].

Aplicații biotehnologice ale acizilor peptido-nucleici

Datorită proprietăților fizico-chimice importante precum afinitate de hibridizare mai mare, stabilitate termică însemnată, rezistență la degradarea enzimatică, moleculele de PNA prezintă un mare interes și potențial pentru a fi utilizate în aplicații biotehnologice și biomedicale, ca de exemplu în diagnosticare moleculară și noi terapii țintite care vizează gena (aplicații antisens sau antigen, tratamente anti-cancer, terapia genică nonvirală). [119]–[121], [122], [123] De asemenea, pot fi utilizate în cercetare pentru o bună înțelegere a caracteristicilor structurale ce stau la baza proprietăților unice genetice ale ADN-ului, precum și ARN-ului. [37], [124]–[127], [29]

III. 2. 2. Înregistrarea la nivel de singură moleculă a ampretei dată de interacțiunea duplecșilor ADN-PNA cu nanoporul de α -HL

Pentru studiul comparativ al procesului de desfacere a duplexului ADN-PNA am utilizat un acid nucleic cu o secvență monocatenară alcătuită din 15 baze (cDNA) și două secvențe de acid peptido-nucleic diferite, complementare cu cDNA: una neutră din punct de vedere electric (BPNA) și una funcționalizată cu o polipeptidă de 10 arginine, oferindu-i un caracter cationic. Secvența primară a polinucleotidelor utilizate este prezentată în **Tabel III. 1**.

Tabel III. 1: Secvența primară a polinucleotidelor utilizate în cadrul experimentelor. Conform convenției, capătul N terminal al moleculei PNA este notat cu 5'. Adaptat din [128].

Polinucleotidă	Secvența primară	M_w (g/mol)
cDNA	3' – CACTATATGCCACTA – 5'	4499
RPNA	Ac-(R) ₁₀ -5' – GTGATATACGGTGAT – 3'	5760.9
BPNA	5' – GTGATATACGGTGAT – 3'	4156.9

În experimentele control, moleculele cDNA adăugate la *cis* (0.5 μ M), sunt transportate electroforetic și conduse în interiorul nanoporului de α -HL prin aplicarea unei diferențe de potențial pozitivă, generându-se astfel fluctuații în semnalul electric

înregistrat, care reflectă transportul de la *cis* la *trans* al unei singure molecule cDNA ce intră în vestibulul nanoporului (substarea V) și trece prin zona de constricție în lumen (substarea L) înainte de a părăsi nanoporul în partea *trans*. (**Fig. III. 2. 3. b**).

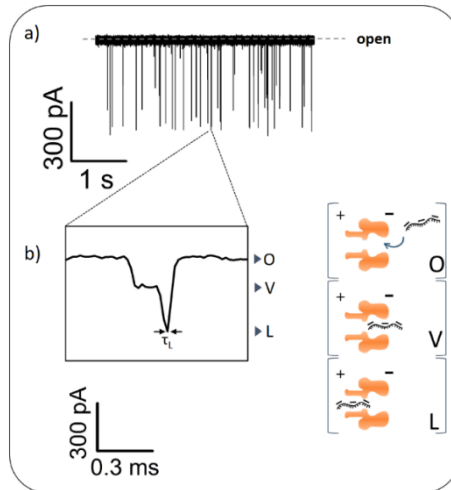


Fig. III. 2. 3: Reprezentarea schematică a interacțiunii moleculelor de cDNA cu nanoporul de α -HL. a) înregistrare reprezentativă a fluctuațiilor curentului ionic ca rezultat al interacțiunii moleculelor de cDNA ($0.5 \mu\text{M}$), cu un singur por de α -HL, la aplicarea unei diferențe de potențial. b) o moleculă de ADN este transportată electroforetic către nanoporul de α -HL deschis (O), este captată în vestibul (V) și trece înspre partea *trans* prin lumen (L). Cu t_L se notează timpul de rezidență a cDNA în lumenul porului, înainte de translocare în partea *trans*. Adaptat din [128].

Amprenta în semnalul electric înregistrat, deși similară, dată de interacțiunea reversibilă a duplecșilor de cDNA-BPNA sau cDNA-RPNA cu un singur nanopor de α -HL se deosebește de cea care rezultă din interacțiunea cDNA- α -HL, în ceea ce privește amplitudinea relativă a blocajelor și este ilustrată în **Fig. III. 2. 4**. După hibridizarea moleculelor monocatenare de cDNA cu secvențe complementare de BPNA sau RPNA adăugate în partea *cis* a membranei lipidice, pentru un raport molar 1:10 (cDNA:PNA), duplecșii formați sunt transportați la gura porului, la aplicarea unei diferențe de potențial pozitivă. Evenimentele caracteristice complexului reflectă două scenarii. În primul caz, complexul cDNA-BPNA (**Fig. III. 2. 4. I, a**) sau cDNA-RPNA (**Fig. III. 2. 4. II, a**) este captat în vestibulul nanoporului dar se întoarce în partea *cis*, sugerând evenimente de unzip nereușite cu durata t_V . În cel de-al doilea caz, complexul cDNA-BPNA (**Fig. III. 2. 4. I, b**) sau cDNA-RPNA (**Fig. III. 2. 4. II, b**) captat în vestibul începe procesul

de desfacere succesivă a legăturilor de hidrogen dintre nucleobaze până la desfacerea totală a acestora (proces de unzip reușit). În **Fig. III. 2. 4**, $t_{V \rightarrow L}$ reprezintă intervalul de timp necesar pentru ca un singur duplex captat să fie parțial desfăcut și să permită moleculei de cDNA să pătrundă în lumenul nanoporului, unde va parcurge un interval de timp t_L înainte de a ieși în partea *trans*, moment în care duplexul cDNA-PNA va fi complet desfăcut.

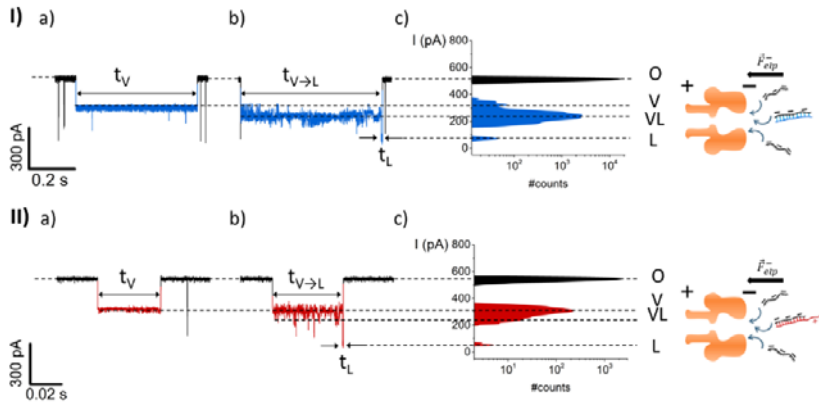


Fig. III. 2. 4: *Reprezentarea evenimentelor de blocaj înregistrate ce reflectă interacțiunea complexului cDNA-BPNA (I) sau cDNA-RPNA (II) cu α -HL, la aplicarea unei diferențe de potențial pozitivă: a) evenimente de unzip a duplexului nereușite, b) evenimente de unzip reușite, c) histograme de amplitudine a fluctuațiilor de curent înregistrat. [128]*

Substarea ‘V’ este atribuită blocajului dat de duplexul DNA-PNA (diametrul de ~ 2.3 nm [130]) ce ocupă vestibulul nanoporului. Din considerente geometrice, oricare dintre cele două tipuri de duplex este exclus de la trecerea prin regiunea de constricție a nanoporului către lumen. Descreșterea abruptă a conductanței electrice care se observă într-un *spike* la finalul amprente, subțare notată cu ‘L’ (**Fig. III. 2. 4**), corespunde moleculei de cDNA ce este desfăcută de duplex și transportată electroforetic prin lumenul nanoporului.

III. 2. 3. Cinetica interacțiunii duplexului cDNA-PNA cu nanoporul de α -HL

Duplexul cDNA-PNA se dehidridizează în interiorul porului conform unui model cinetic predominant și a fost sugerată o schemă bazată pe o reacție cu mai multe

stări separate, în care tranzițiile sunt reprezentate de constante de reacție pentru a înțelege acest model.

În cadrul descrierii Markoviene, înlănțuirea evenimentelor cinetice sugerate în **Fig. III. 2. 5. c**, este corespunzătoare modelului prezentat în **Fig. III. 2. 5. d**.

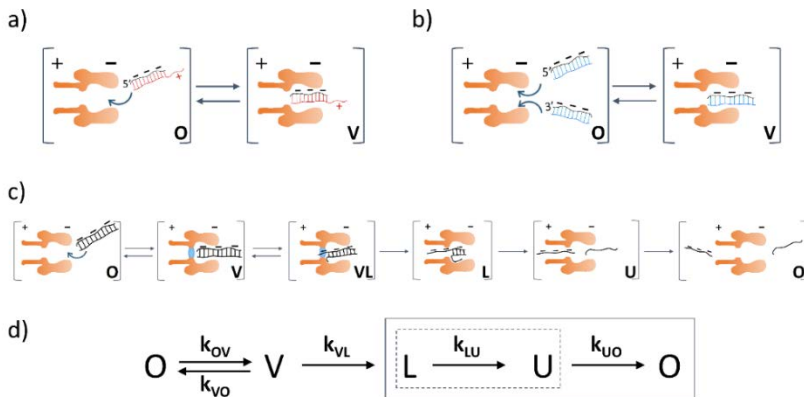


Fig. III. 2. 5: *Reprezentarea schematică a modelului cinetic de interacțiune a duplexului cDNA-PNA cu nanoporul de α -HL.* [128]

În această schemă, k_{OV} și k_{VO} sunt constantele de reacție de asociere și, respectiv, disociere, corespunzătoare captării reversibile a duplexului în interiorul vestibulului nanoporului, fără desfacerea acestuia; k_{VL} este constanta de reacție ce caracterizează pătrunderea ireversibilă în lumenul nanoporului a unei molecule cDNA parțial desfăcută de duplex, k_{LU} reprezintă constanta de reacție ce descrie desfacerea completă a cDNA, ce are loc în interiorul lumenului, k_{UO} descrie cinetica de disociere de către nanopor și trecere în partea *trans* prin lumen a moleculei cDNA complet desfăcută.

Expresia ce descrie media timpilor t_L (timpul în care sistemul se află în stările L și U înainte de ieșirea în substarea O) este:

$$\bar{t}_L = \frac{1}{k_{LU}} + \frac{1}{k_{UO}} \quad (\text{III.8})$$

Ceea ce am observat este că translocarea electroforetică a unei molecule de cDNA liberă (caracterizată de constanta de reacție k_{UO}) este mai rapidă decât desfacerea moleculei din duplex (caracterizată de constanta de reacție k_{LU}), prin urmare, valoarea

medie a timpilor t_L măsurați din înregistrările prezentate în **Fig. III. 2. 4** este dată de cinetica de desfacere a moleculei cDNA și nu de translocarea acesteia ($\bar{t}_L \approx \frac{1}{k_{LU}}$). Cunoscând valorile medii ale timpilor t_L calculate pentru duplecșii cDNA-RPNA și cDNA-BPNA și valoarea constantei de reacție k_{UO} estimată din analiza statistică a timpului mediu de rezidență în lumenul nanoporului a unei molecule cDNA liberă, înregistrat la diferite diferențe de potențial, se poate face o comparație calitativă între constantele de reacție (k_{LU}) ce descriu desfacerea completă fie a duplecșilor cDNA-BPNA, fie cDNA-RPNA, la diferite potențiale. În **Fig. III. 2. 6. a)** Se observă că constanta de reacție k_{LU} este mai mare pentru desfacerea duplexului cDNA-RPNA (\blacklozenge), comparativ cu cea pentru duplexul cDNA-BPNA (\blacksquare).

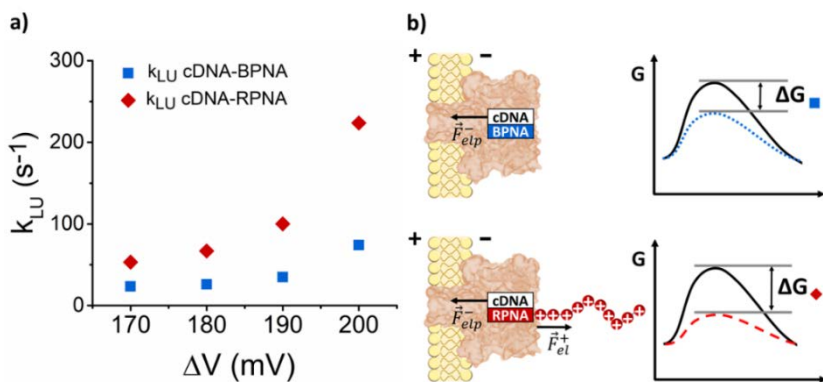


Fig. III. 2. 6: a) Variația constantei de reacție k_{LU} ce descrie desfacerea completă a duplexului cDNA-PNA, în funcție de diferența de potențial aplicată; b) reprezentarea schematică a influenței cozii de arginine atașată moleculei PNA, asupra energiei libere de desfacere a duplexului.

Prezența cozii de arginine în cazul duplexului cDNA-RPNA asigură existența celor două forțe orientate în sens opus ce acționează asupra duplexului (forța electroforetică, \vec{F}_{el}^- , resimțită de molecula cDNA, respectiv forța electrică de la gura porului, \vec{F}_{el}^+ , resimțită de molecula RPNA) datorită diferenței de potențial aplicată. Datorită acestui fenomen, energia liberă de desfacere a duplexului cDNA-RPNA (ΔG_{\blacklozenge}) este mai redusă decât în cazul duplexului cDNA-BPNA (ΔG_{\blacksquare}).

Concluzii

- Experimentele de electrofiziologie au permis studiul comparativ, la nivel de singură moleculă, a mecanismelor de desfacere a duplexului ADN-PNA, cu și fără prezența cozii de arginine atașată moleculei PNA, în interiorul porului proteic α -HL.
- Interpretarea fluctuațiilor de curent ionic asociate interacțiunii specifică duplexului ADN-PNA arată că procesul de desfacere începe în vestibulul nanoporului, dar continuă cu pătrunderea în lumen a moleculei cDNA și cu translocarea ulterioară a acesteia.
- Prezența în apropierea vestibulului a cozii de poliarginine atașată moleculei de PNA facilitează procesul de desfacere a duplexului ADN-PNA. Studiul oferă o bună înțelegere și o optimizare a mecanismului de desfacere a duplexului blocat în vestibul, în fața zonei de constricție, sub acțiunea forțelor electroforetice care acționează asupra ambelor capete ale duplexului.
- Cunoașterea noilor aspecte permit dezvoltarea unor tehnici mai eficiente, fără marcatori și cu minimul necesar de materiale, pentru investigarea unor procese precum disocierea și stabilitatea complexelor de acizi nucleici.

III. 3. Studiul influenței tăriei ionice asupra interacțiunii moleculelor de ADN și PNA cu ajutorul tehnicii electrofiziologice la nivel de singură moleculă

Această temă de cercetare presupune studiul comparativ la nivel unimolecular al detecției unor secvențe monocatenare scurte de ADN (ssDNA), cu ajutorul unor secvențe complementare de PNA conjugate cu un lanț de poliarginine (poly(Arg)-PNA), utilizând tehnica de electrofiziologie moleculară bazată pe nanoporul proteic de α -hemolizină, în condiții de tărie ionice diferite.

Acest studiu urmărește determinarea factorilor și a modului de influență a acestora asupra detecției moleculelor de ADN cu scopul de înțelege interconexiunea dintre interacțiunile electrostatice nespecifice și legăturile de hidrogen, precum și optimizarea acestei tehnici pentru detecția ADN-ului.

În cadrul acestei lucrări s-au realizat seturi diferite de experimente, în care s-a utilizat soluție electrofiziologică de diferite concentrații: 0.5 M, 1M sau 3 M KCl, menținută la pH cu valoarea apropiată de cea fiziologică (pH ~ 7.1) cu soluție buffer 10 mM HEPES. Secvențele de PNA utilizate în acest studiu sunt conjugate cu un lanț polipeptidic de diferite lungimi, ce conțin 9 sau 13 arginine, denumite (Arg)₉-PNA, respectiv (Arg)₁₃-PNA. Pentru a investiga hibridizarea duplecșilor cu ADN-ul țintă, s-au utilizat secvențe specifice de ssDNA cu o porțiune complementară secvenței de PNA. Secvența primară ale acestor polinucleotide este afișată în **Tabel III. 2**.

Tabel III. 2: Secvența polinucleotidelor utilizate în acest studiu și masa moleculară a acestora. Segmentul subliniat din secvența ssDNA reprezintă porțiunea complementară fragmentelor de PNA. Adaptat din [233].

	<i>Polinucleotidă</i>	<i>Secvența primară</i>	<i>M_w</i> <i>(g/mol)</i>
Poly(Arg)-PNA [N→C]	(Arg) ₉ -PNA	CTTTTGGTGT-Arg9	4145.3
	(Arg) ₁₃ -PNA	GTTTGTCTG-Arg13	4770
ssDNA [5'→3']	cDNA((Arg) ₉ -PNA)	<u>ACACCAAAA</u> GATCACATTGG	6104
	cDNA((Arg) ₁₃ -PNA)	<u>CAGAACAAAC</u> CCAAGGAAAT	6122

III. 3. 1. Efectele concentrației de sare asupra interacțiunii moleculelor de poly(Arg)-PNA cu nanoporul

În prima etapă, în regiunea *trans* a cuvei experimentale s-au adăugat secvențe de poly(Arg)-PNA în concentrație 4 μM . Cu ajutorul celor doi electrozi imersați în soluția electrolică din cele două regiuni ale cuvei BLM, s-au înregistrat fluctuațiile curentului ionic datorate interacțiunii moleculelor cu nanoporul de $\alpha\text{-HL}$, în urma aplicării unei diferențe de potențial pozitivă.

În **Fig. III. 3. 1** sunt ilustrate o selecție de înregistrări reprezentative pentru fiecare set de experimente, ce ilustrează interacțiunea secvențelor (Arg)₉-PNA (**Fig. III. 3. 1, a-c**), respectiv (Arg)₁₃-PNA (**Fig. III. 3. 1, d-f**), cu nanoporul $\alpha\text{-HL}$, în funcție de concentrația de sare utilizată. În histogramele alăturate se poate observa curentul ionic prin nanoporul liber, înfățișat prin substarea 'O', iar substarea 'B' constituită din două niveluri (vizibile mai bine în **Fig. III. 3. 1, b-e**) sugerează blocarea curentului ionic indusă de prezența fragmentului PNA neutru, precum și a cozii cationice de arginine în interiorul nanoporului.

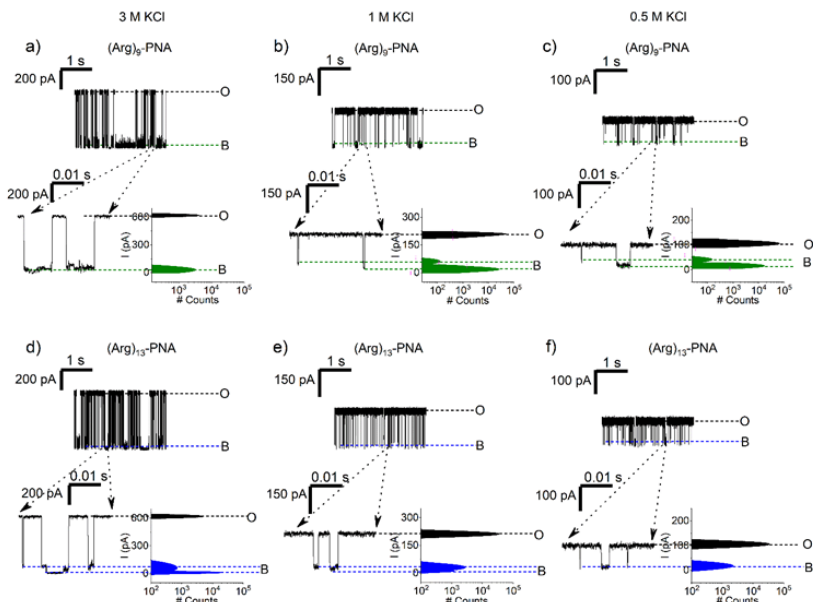


Fig. III. 3. 1: Înregistrări reprezentative pentru interacțiunea reversibilă a poly(Arg)-PNA, utilizând tehnica de electrofiziologie, în condiții de tărie ionică diferite: 3M, 1M și 0.5 M KCl. Adaptat din [233].

În continuare, am realizat analiza statistică a valorilor determinate pentru parametrii caracteristici interacțiunii moleculelor poly(Arg)-PNA cu lumenul nanoporului de α -HL.

Modificări conformaționale ale poly(Arg)-PNA induse de concentrația de sare

Pentru a determina însemnătatea modificărilor conformaționale induse de tăria ionică asupra secvențelor de poly(Arg)-PNA, se măsoară volumul dislocuit din nanopor în prezența moleculelor și efectele concentrației de sare asupra valorilor.

Conform modelului expus în subcapitolul I.2, un analit captat în interiorul unui nanopor determină o reducere a curentului ionic prin nanopor direct proporțională cu volumul de electrolit dislocuit. Din acest formalism simplificat se poate deduce că o moleculă cu dimensiuni mai mari va dislocui un volum mai mare de soluție electrolică din interiorul nanoporului, ceea ce rezultă într-un blocaj mărit (ΔI_{block} mai mare). De asemenea, amplitudinea relativă a blocajelor ($\Delta I_{block}/I_0$) rămâne constantă atunci când variază potențialul.

În Fig. III. 3. 2 este ilustrată analiza amplitudinii relative a blocajelor de curent ionic prin nanoporul de α -HL generate de prezența moleculelor (Arg)₉-PNA (Fig. III. 3. 2. a), respectiv (Arg)₁₃-PNA (Fig. III. 3. 2. b), în timpul translocării prin acesta. Pe baza datelor obținute, se poate observa că în soluția electrolică ce conține 3 M KCl blocajul produs de secvența mai scurtă, (Arg)₉-PNA, are o valoare ușor mai mică, în comparație cu (Arg)₁₃-PNA. Indiferent de concentrația de sare, valorile blocajului relativ sunt invariabile la schimbarea potențialului, acest rezultat indicând că în interiorul nanoporului conformația secvențelor poly(Arg)-PNA este neafectată de diferența de potențial aplicată.

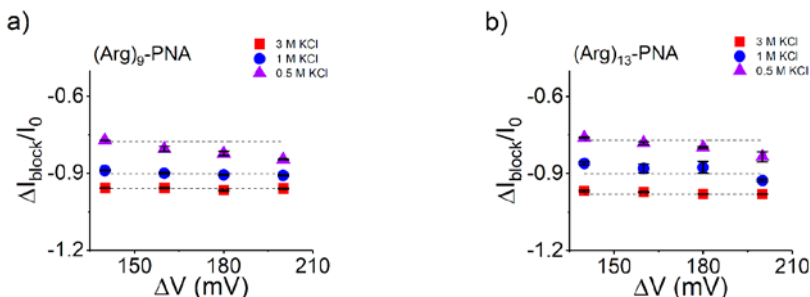


Fig. III. 3. 2: Variația blocajului relativ de curent ($\Delta I_{block}/I_0$) pentru (Arg)₉-PNA (a) și (Arg)₁₃-PNA (b) în funcție de diferența de potențial aplicată, la diferite concentrații de sare utilizată (3 M, 1M, respectiv 0.5 M KCl). [233]

De remarcat faptul că rezultatele arată că volumele dislocuite de moleculele (Arg)₉-PNA și (Arg)₁₃-PNA captate în nanopor, care sunt în strânsă legătură cu valorile amplitudinilor relative a blocajelor, descresc atunci când concentrația de sare este redusă. Ca o completare adusă concluziilor obținute din analiza cinetică realizată mai sus, acest volum dislocuit redus este atribuit în primul rând conformației mai extinse a lanțului de poliarginine la o tărie ionică mică, rezultată din interacțiunile repulsive dintre aminoacizi intensificate.

III. 3. 2. Efectele concentrației de sare asupra interacțiunii duplecșilor poly(Arg)-PNA-DNA cu nanoporul

În cele ce urmează, am investigat la nivel de singură moleculă predispoziția formării duplecșilor dintre molecule poly(Arg)-PNA și secvențe monocatenare de ADN, în funcție de tăria ionică a electrolitului utilizat. Pentru această etapă, în regiunea *trans* ce conține poly(Arg)-PNA (4 μM) se adaugă 8 μM ssDNA a căror structură conține o regiune complementară cu fragmentul de PNA (**Tabel III. 2**). Astfel, prin procesul de hibridizare se vor forma complecși moleculari cu o structură de macrodipol, divizată în secțiuni separate: un domeniu complementar și două capete cu sarcini electrice diferite ce provin de la aminoacizii (Arg) din PNA, pe de-o parte și de la porțiunea rămasă nehibridizată din secvența ssDNA țintă, pe de-altă parte. Având ambele capete de tipul unei structuri monocatenare, captarea duplexului în interiorul lumenului se consideră a fi facilitată.

În acest studiu, plecăm de la presupunerea că o soluție electrolică cu tărie ionică mică ar avea un impact negativ asupra stării de hibridizare între perechele de nucleobaze ale duplecșilor, drept urmare, aceste structuri devin nefavorabile. Mai mult decât atât, este știut că are loc crearea unor complecși poly(Arg)-DNA cu structură destabilizată ('colapsați'), datorită densității de sarcină efectivă crescută, cauzată de scăderea ecranizării mediată de electrolit și intensificarea rezultată a atracției electrostatice nespecifice dintre catena de ssDNA și lanțul de poliarginine. [240]

Rezultatele experimentale prezentate în **Fig. III. 3. 3** demonstrează viabilitatea utilizării înregistrilor electrice realizate cu ajutorul unui nanopor pentru a urmări formarea duplecșilor (Arg)₉-PNA-DNA (**Fig. III. 3. 3, a-c**) și (Arg)₁₃-PNA-DNA (**Fig. III. 3. 3, d-f**), dependentă de tăria ionică a mediului.

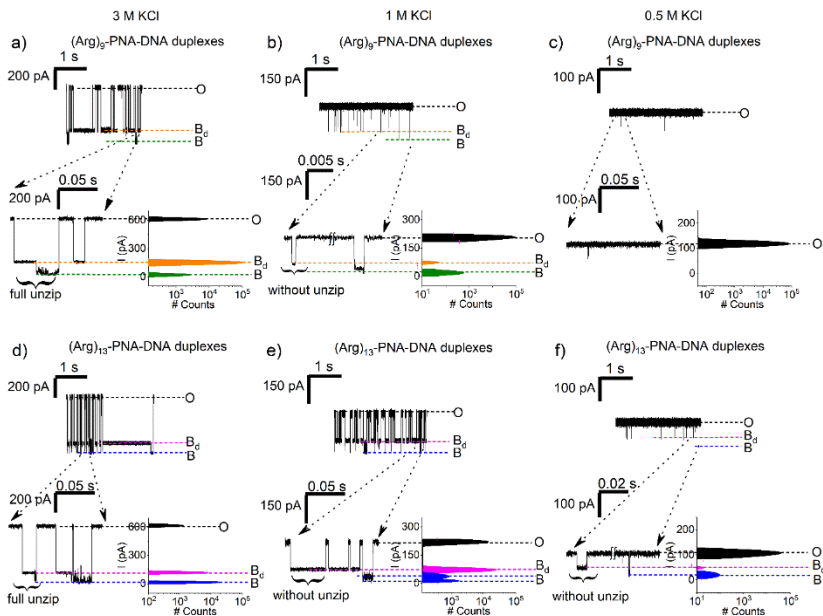


Fig. III. 3: Înregistrări reprezentative pentru detecția dupleșilor poly(Arg)-PNA-DNA, utilizând tehnica de electrofiziologie, în condiții de tărie ionică diferite: 3M, 1M și 0.5 M KCl. [233]

La aplicarea unei diferențe de potențial pozitive, moleculele cationice poly(Arg)-PNA nehibridizate și complecșii poly(Arg)-PNA-DNA cu structură de macrodipol vor fi transportate la gura nanoporului, datorită interacțiunilor electroforetice, respectiv dielectroforetice [241]. Cele două tipuri de structuri moleculare produc semnale caracteristice diferite atunci când interacționează cu nanoporul, datorită încărcării electrice și volumelor distincte; aceste substări de blocaj sunt notate aici 'B', caracteristice pentru poly(Arg)-PNA, respectiv 'B_d' pentru poly(Arg)-PNA-DNA (Fig. III. 3. 3). Întrucât complecșii poly(Arg)-PNA-DNA formați prin interacțiune electrostatică dețin o sarcină electrică netă negativă, este probabil ca aceștia să nu fie captați la gura nanoporului (*trans*), încărcată electric negativ.

Modul de interacțiune al moleculelor cu nanoporul, în soluții electrolitice cu tărie ionică diferite, este reprodus schematic în Fig. III. 3. 4.

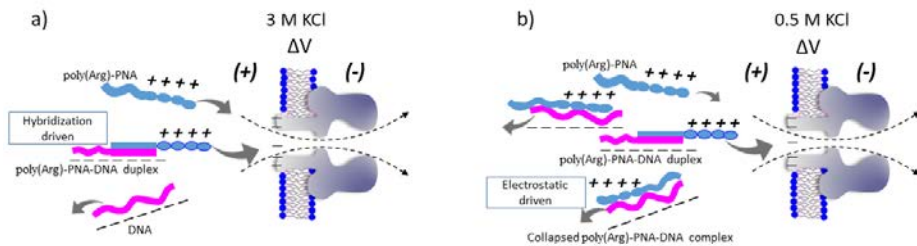


Fig. III. 3. 4: Interacțiunea duplexilor poly(Arg)-PNA-DNA cu nanoporul, în soluții electrolitice cu tărie ionică mare (a), respectiv mică (b). [233]

Absența evenimentelor de blocaj caracteristice captării duplexului la intrarea în nanopor, indicate de substarea 'B_d' (Fig. III. 3. 3, a-b), sugerează faptul că, în soluție salină (KCl) de concentrație 0.5 M, captarea și/sau formarea duplexilor (Arg)₉-PNA-DNA au conținut (Fig. III. 3. 3, c). Totodată, captarea duplexilor (Arg)₁₃-PNA-DNA este discernabilă la toate concentrațiile de sare investigate (Fig. III. 3. 3, d-f).

Rezultatele noastre demonstrează capacitatea tehnicii la nivel de singură moleculă de a identifica tendința de împerechere a nucleobazelor și separarea de fază a mixturii de oligonucleotide complementare, procese ce sunt mediate electrostatic și dependente de tăria ionică a mediului.

III. 3. 3. Monitorizarea la nivel de singură moleculă a formării complexelor poly(Arg)-PNA-DNA nespecifici

În continuare, am folosit o nouă abordare experimentală pentru a încerca vizualizarea în timp real, la nivel de singură moleculă, a formării complexelor poly(Arg)-PNA-DNA în condiții de sare cu tărie ionică scăzută. Acest lucru a fost făcut pentru a întări constatările referitoare la existența unor stări moleculare distincte asociate complexelor în soluții cu concentrație mare de sare (formați prin hibridizare) și, respectiv, cu concentrație scăzută (nespecifici, a căror formare este determinată de forțe electrostatice). Strategia următoare se bazează pe utilizarea nanoporului α -HL ca nanoreactor pentru a investiga reacțiile chimice dintre reactanți separați spațial. [242]

În cadrul acestor experimente am utilizat secvențe de (Arg)₉-PNA și secvențe complementare de ssDNA (cDNA((Arg)₉-PNA)), adăugate separat în cele două compartimente ale cuvei BLM. Am presupus că atunci când moleculele (Arg)₉-PNA sunt adăugate de partea *trans*, respectiv cele de cDNA((Arg)₉-PNA) de partea *cis* a unui

singur nanopor inserat într-o membrană, la aplicarea unei diferențe de potențial pozitive în raport cu electrodul legat la masă, captarea acestora s-ar petrece în timpul aceluiași experiment, datorită electricității opuse a structurilor (**Fig. III. 3. 5**). Prin urmare, emitem ipoteza, pe baza statisticilor și probabilităților, că în aceste circumstanțe nanoporul ar putea în cele din urmă să capteze concomitent atât fragmente individuale de poly(Arg)-PNA, cât și ssDNA. În acest caz, propunem că dacă asupra ambelor molecule capturate în interiorul nanoporului, acționează forțe destul de puternice, pe măsură ce se deplasează în direcții opuse și se întâlnesc în vestibul, atunci se va forma un complex ce va determina apariția unui blocaj distinctiv în curentul ionic înregistrat.

Rezultatele experimentale obținute confirmă scenariul menționat. Într-o soluție electrolică KCl de concentrație 3 M, secvențele cDNA((Arg)₉-PNA) adăugate la *cis* și cele de (Arg)₉-PNA adăugate la *trans* interacționează independent cu nanoporul, având fiecare o amprentă caracteristică în semnalul ionic înregistrat, așa cum se indică în **Fig. III. 3. 5, I. a-d**. Evenimentele de blocaj specifice sunt notate cu $I_{cDNA(v)}$, $I_{cDNA(l)}$, respectiv $I_{(Arg)_9-PNA}$. Existența unui duplex în interiorul nanoporului, format în urma captării simultane a unor astfel de fragmente moleculare, este de scurtă durată, în pofida complementarității bazelor de pe cele două secvențe. Complexul probabil că este instabil din cauza forțelor electrice existente experimentate în interiorul nanoporului, iar evenimentul de blocare nu este detectabil la rezoluția dispozitivului experimental.

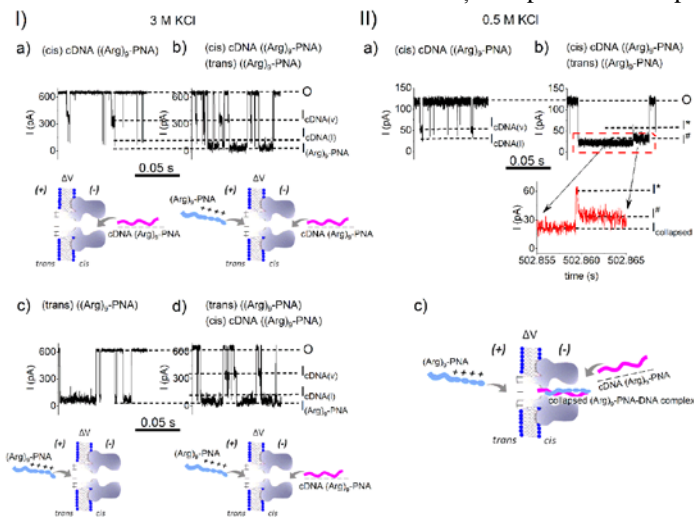


Fig. III. 3. 5: Înregistrări electrofiziologice reprezentative pentru a pune în evidență producerea complexelor poly(Arg)-PNA-DNA colapsați, cauzată de concentrația scăzută de sare. [233]

Pe de altă parte, în experimentele realizate în aceleași condiții (cDNA((Arg)₉-PNA) adăugat în regiunea *cis*, iar (Arg)₉-PNA adăugat ulterior în *trans*), dar într-o soluție cu concentrația de sare mai mică (0.5 M KCl), s-a observat un tip nou de evenimente de blocare, ilustrat în **Fig. III. 3. 5. II**. După cum se poate remarca, aceste evenimente încep cu un blocaj mai mare ($I_{\text{collapsed}}$), și se continuă cu două substări consecutive diferite (I^* și $I^\#$). Pentru a efectua o comparație precisă, am analizat evenimentele de blocare date de interacțiunea cu nanoporul a secvențelor cDNA((Arg)₉-PNA) adăugate în *cis* (**Fig. III. 3. 5. II. a**), precum și cele apărute după adăugarea în *trans* a fragmentelor (Arg)₉-PNA (**Fig. III. 3. 5. II. b**).

Captarea concomitentă a moleculelor de cDNA((Arg)₉-PNA) și (Arg)₉-PNA în condiții de sare cu tărie ionică mică poate duce în cele din urmă la evenimente de coliziune în vestibulul nanoporului. Reprezentarea schematică a procesului este redată în **Fig. III. 3. 5. II. c**. Acțiunea forței electrice, în sens opus complexului, va contribui la disocierea acestuia. Compușii vor fi eliberați, fragmentul (Arg)₉-PNA în partea *cis*, iar catena de ssDNA va transloca prin vestibulul și lumenul nanoporului în partea *trans*. Se presupune că substările ‘*’, respectiv ‘#’ evidențiază această translocare, fiind confirmat de valorile apropiate ale blocajelor relative ($\Delta I_{cDNA(v)}/I_0 \sim \Delta I^*/I_0$ și $\Delta I_{cDNA(l)}/I_0 \sim \Delta I^\#/I_0$).

Concluzii

- Experimentele de electrofiziologie au permis studiul, la nivel de singură moleculă, a influenței tăriei ionice asupra interacțiunii secvențelor scurte de ssDNA și fragmente de PNA funcționalizate cu un lanț de arginine (poly(Arg)-PNA), cu ajutorul nanoporului proteic α -HL.
- Am identificat amprenta specifică interacțiunii moleculelor cationice de poly(Arg)-PNA cu nanoporul, precum și a complexilor poly(Arg)-PNA-DNA în medii cu tărie ionice diferite, prin observarea tipurilor de evenimente care dezvăluie etapele procesului de dehibridizare în detaliu.
- Concentrația soluției electrofiziologice utilizată influențează conformația fragmentelor de PNA, fiind vizibilă o descreștere a ariei transversale, corespondentă extinderii sale, la o tărie ionică mică. De asemenea, am observat realizarea unor legături electrostatice nespecifice între poly(Arg)-PNA și secvențele țintă de ssDNA, care ajung predominante la 0.5 M KCl.
- Nu în ultimul rând, am vizualizat la nivel de singură moleculă obținerea reversibilă a complexilor poly(Arg)-PNA-DNA ‘colapsați’, determinați de forțe electrostatice, în timp ce secvențe individuale de poly(Arg), respectiv ssDNA complementar, se deplasează prin nanopor în direcții opuse și se întâlnesc în interiorul vestibulului.
- Înțelegerea efectelor tăriei ionice asupra interacțiunii dintre moleculele de ADN și PNA este relevantă pentru dezvoltarea și optimizarea unor tehnologii de detecție a ADN-ului monocatenar utilizând sisteme ce au la bază nanopori proteici.

III. 4. Detecția specifică a unor secvențe monocatenare de ADN cu ajutorul unui sistem bazat pe utilizarea nanoporului proteic și nanoparticule din aur

Metodele de detecție a unor acizi nucleici care să fie atât rapide, ieftine, cât și ușor de utilizat sunt necesare pentru diagnosticarea din timp a unor boli infecțioase cauzate de transmiterea unor patogeni, precum bacterii sau virusuri. De asemenea, pot fi utilizate în dezvoltarea de aplicații biotehnologice pentru investigații medico-legale sau monitorizarea siguranței alimentare.

În prezent, metodele convenționale utilizate la scală largă, cu scopul diagnosticului clinic al infecțiilor virale sau bacteriene, sunt împărțite în metode de numărare a culturilor și coloniilor, metode imunologice și metode bazate pe reacția de polimerizare în lanț (PCR). Deși aceste metode oferă informații cantitative și calitative cu mare sensibilitate și specificitate, ele prezintă dezavantaje din cauza complexității procesului de pregătire a probei, a timpului mare de procesare, a costurilor implicate mari, precum și a necesității unui personal specializat. [243]–[245]

În cadrul acestei lucrări dorim să propunem o metodă alternativă necostisitoare pentru detecția unei game largi de secvențe monocatenare de ADN, cu ajutorul tehnicii de electrofiziologie. Metoda constă în utilizarea unui nanopor de α -hemolizină pentru a detecta și discrimina nanoparticule din aur în funcție de modificările proprietăților de suprafață, induse de prezența unor polimeri artificiali și predispoziția la agregare, în strânsă legătură cu hibridizarea duplexului format de PNA și secvențele de ADN țintă. Această metodă rapidă și simplă de aplicat, bazată pe hibridizarea acizilor nucleici exogeni, ar putea fi implementată pentru diagnosticarea la locul de interes, întrucât este o tehnică mobilă care nu necesită o infrastructură complexă și pentru care nu este necesară marcarea sau amplificarea probei.

III. 4. 1. Caracteristici și proprietăți ale nanoparticulelor de aur

Nanoparticulele de aur (AuNP) sunt particule bi sau tridimensionale, cu dimensiuni de ordinul nanometrilor (de la 1 la 100 nm) și au, de obicei, formă sferică sau quasi-sferică. Pe lângă acestea, în practică se mai întâlnesc și AuNP cu formă anizotropă (e.i., bastonașe, cuburi, panglici) de dimensiuni nanoscopice.

Datorită proprietăților fizice și chimice unice ale NP, care sunt diferite decât cele ale metalului la scală macrosopică ('*bulk*') sau ale atomilor individuali, AuNP au atras un interes major în cercetare, ceea ce a condus la implementarea unei varietăți de aplicații în detecția biomoleculară (e.g., biosenzorii enzimatici) optică și medicină.

AuNP sunt cele mai stabile NP metalice și prezintă specificații remarcabile, precum raport mare între aria suprafeței și volumul lor, proprietăți optice dependente de mediu, reactivitatea mare cu alte biomolecule [243].

Aplicații biotehnologice ale nanoparticulelor de aur

Nanoparticulele de aur sunt nanomateriale dezvoltate pentru multiple aplicații, inclusiv în biotehnologii. Complexele formate de AuNP cu oligonucleotide permit detecția unor secvențe de ADN, făcând posibilă utilizarea lor în realizarea unor biosenzori, în diagnosticul medical al unor boli sau în exprimarea genică. Datorită proprietății de rezonanță plasmonică de suprafață a AuNP, precum și deplasarea benzii plasmonice, implicit modificarea culorii (din roșu în albastru), în urma procesului de agregare determinat de un analit țintă, acestea au fost exploatate în metode calorimetrice de detecție a acizilor nucleici. [252]

Analizele bazate pe utilizarea AuNP sunt alternative viabile la metodele convenționale pentru detecția bolilor infecțioase și a altor agenți biologici nocivi. Nanoparticule de aur modificate cu ADN sau cu anticorpi au fost utilizate pentru detecția diferitor patogeni (bacterii sau virusuri).

III. 4. 2. Principiul metodei de detecție a ADN-ului și materialele utilizate

În cadrul acestui studiu am propus o metodă de detecție specifică a unor secvențe monocatenare scurte de ADN, ce constituie biomarkeri pentru prezența unor patogeni în proba investigată, fiind destinată întrebuințării în diagnosticarea medicală a unor boli, în investigații medico-legale sau monitorizarea siguranței alimentare.

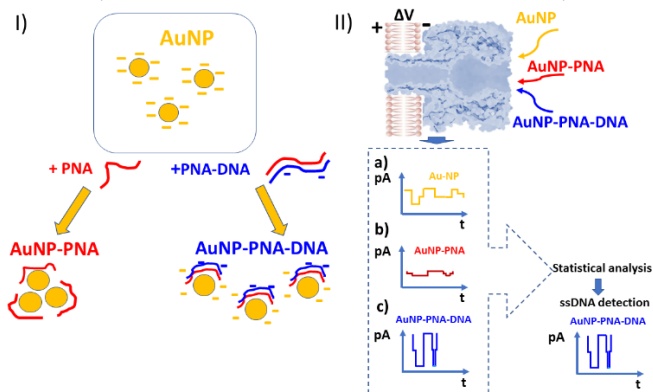


Fig. III. 4. 6: Reprezentare schematică a principiului metodei de detecție a unor secvențe monocatenare de ADN, bazată pe utilizarea unui sistem format de nanoporul de α -HL, AuNP și PNA. [265]

Această metodă se bazează pe utilizarea unui sistem format de nanoporul de α -HL și AuNP funcționalizate cu ioni de citrat pentru a detecta semnale caracteristice care sugerează prezența moleculelor de ADN monocatenar în soluția electrolică, prin intermediul hibridizării cu secvențe complementare de PNA. Principiul metodei de detecție specifică a moleculelor de ADN este ilustrat în **Fig. III. 4. 6**.

Prezența unor molecule de PNA, neutre din punct de vedere electric, induce agregarea AuNP stabilizate în citrat, întrucât adsorbția de PNA ecranează ionii anionici de citrat de la suprafața AuNP, ceea ce duce la scăderea respingerii electrostatice dintre nanoparticule [266]. Datorită dimensiunilor sale, aceste agregate se disting ușor de AuNP stabilizate cu ioni de citrat dispersate în soluție, prin semnalul caracteristic dat de blocarea reversibilă a curentului ionic înregistrat printr-un singur nanopor. Întrucât adăugarea în soluție de secvențe complementare de ADN atenuează semnificativ procesul de agregare indus de PNA [266], prezența acestora este vizibilă ușor prin modificarea blocajelor de curent ionic prin α -HL.

Având în vedere observațiile făcute anterior, această abordare oferă un sistem selectiv de detecție rapidă, ușor de utilizat, pentru a determina prezența unor secvențe scurte de ADN monocatenar.

În studiul acestei strategii am proiectat detecția unor secvențe monocatenare scurte de ADN specifice infecției cu virusul hepatitei C (*HCV*), cu ajutorul unor molecule de PNA cu secvență complementară (*PNA2*) și AuNP funcționalizate cu citrat, cu diametrul ~ 5 nm. Pentru testul de control negativ, am utilizat alte secvențe monocatenare scurte de ADN, specifice infecției cu virusul *H1N1*. Secvențele primare ale polinucleotidelor se regăsesc în **Tabel III. 3**.

Tabel III. 3: Secvența primară și masa moleculară a polinucleotidelor utilizate în cadrul acestui studiu. Conform convenției acceptate, capetele terminale N și C ale moleculei de PNA corespund capătului 5', respectiv, capătului 3'. Adaptat din [265].

Polinucleotidă	Secvența primară	M _w (g/mol)
PNA2	5' – CCCACCCGCAGCCCTCATTA – 3'	5263.1
HCV	5' – TAATGAGGGCTGCGGGTGGG – 3'	6297
H1N1	5' – ACGGAAGGAGTGCCAA – 3'	4968

III. 4. 4. Detecția unor secvențe monocatenare scurte de ADN utilizând sistemul AuNP/ α -HL

Pentru a implementa metoda de detecție propusă în acest studiu am utilizat tehnica de electrofiziologie moleculară la nivel de singură moleculă descrisă în secțiunea II.1.

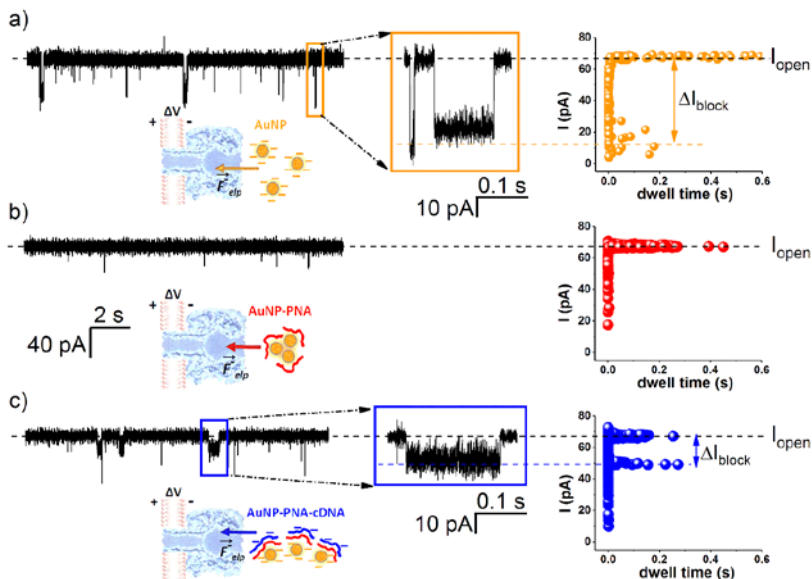


Fig. III. 4. 7: *Reprezentarea schematică a interacțiunilor cu nanoporul de α -HL a analiților adăugați succesiv în regiunea cis, însoțită de înregistrări ale curentului ionic, în urma aplicării unei diferențe de potențial transmembrantar pozitiv. Reprezentările grafice asociate ilustrează intensitatea curentului prin nanoporul deschis (I_{open}) și în timpul blocajelor cu amplitudinea ΔI_{block} .* [265]

Pentru început, AuNP (5 nM) funcționalizate cu citrat, ce au o sarcină electrică net negativă la suprafață, sunt adăugate în regiunea *cis* a cuvei experimentale. La aplicarea unei diferențe de potențial cu valori pozitive, nanoparticulele anionice sunt transportate electroforetic și captate reversibil la gura vestibulului nanoporului, acest proces fiind vizibil prin reducerea stocastică a curentului ionic prin porul deschis (**Fig. III. 4. 7. a**).

Ulterior, adăugarea în regiunea *cis* de molecule PNA2 în concentrație 1 μ M, peste nanoparticulele de aur, duce la încetarea evenimentelor de blocaj date de

interacțiunea AuNP cu nanoporul (**Fig. III. 4. 7. b**). Cel mai probabil, aceasta se întâmplă datorită procesului de agregare a nanoparticulelor, indus de adsorbția moleculelor de PNA2 pe suprafața lor și a formării de conjugate de dimensiuni mai mari, ce depășesc cu mult diametrul deschiderii vestibulului α -HL. Cu toate că sarcina electrică netă a AuNP acoperite cu PNA2 este negativă, ceea ce le face predispuse transportului electroforetic, aceste ansambluri, în condițiile spațiale date, sunt excluse captării de către nanopor și mai degrabă contribuie la apariția unor evenimente foarte scurte, de tip ‘bumping’.

În **Fig. III. 4. 7. c** se observă că după adăugarea, în aceeași regiune, de secvențe complementare de HCV în concentrație 4 μ M, apar evenimente de blocaj cu durată medie de ordinul milisecundelor și cu o amplitudine mai mică comparativ cu cazul AuNP dispersate în soluție.

Acest tip de evenimente sunt specifice hibridizării complexelor PNA2-HCV. Datorită diferențelor majore în semnalele caracteristice date de interacțiunea cu un singur nanopor de α -HL a complexelor AuNP/PNA-HCV, respectiv AuNP/PNA-H1N1, se poate realiza discriminarea secvențelor de HCV prezente în electrolit.

III. 4. 5. Studiul selectivității și sensibilității metodei de detecție bazată pe sistemul AuNP/ α -HL

În continuare, pentru a investiga sensibilitatea și selectivitatea detecției secvențelor monocatenare țintă de ADN utilizând sistemul AuNP/ α -HL, experimentele discutate anterior au fost repetate într-un mod similar, cu excepția că atât moleculele de PNA2, cât și secvențele complementare HCV sau necomplementare H1N1 adăugate peste AuNP (5nM) aflate în regiunea *cis* a cuvei experimentale, au fost în concentrație molară de 5 nM.

Pe baza analizei volumetrică a evenimentelor de blocaj a curentului ionic prin nanopor ilustrate în **Fig. III. 4. 8** și aplicând același raționament ca în studiul anterior, am demonstrat posibilitatea detecției secvențelor monocatenare de HCV prezente în soluția electrolitică, în concentrație de ordinul nanomolar. Această metodă de detecție selectivă este posibilă datorită faptului că interacțiunea reversibilă a ansamblurilor AuNP/PNA2/HCV, respectiv AuNP/PNA2/H1N1 cu nanoporul de α -HL oferă semnale caracteristice distincte (**Fig. III. 4. 8. c**), respectiv **Fig. III. 4. 8. f**).

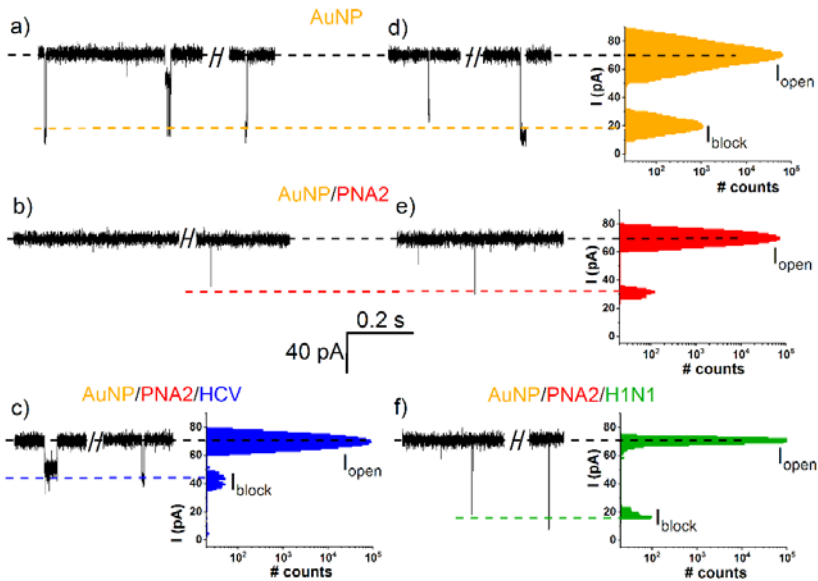


Fig. III. 4. 8: Înregistrările specifice și histogramele corespunzătoare fluctuațiilor de curent ionic date de interacțiunea cu nanoporul de α -HL a adăugării succesive în partea *cis* a cuvei a: (a, d) 5 nM AuNP (b, e) 5 nM PNA2, (c) 5 nM HCV, complementar cu PNA2 sau (f) 5 nM H1N1, necomplementar cu PNA2. Toate înregistrările prezentate în figură au fost efectuate la o valoare de + 80 mV a potențialului electric aplicat. [265]

Mai departe, am arătat capacitatea de a distinge secvențele monocatenare țintă de ADN dintr-o anumită specie, în prezența altor patogeni, cu ajutorul metodei de detecție propusă, bazată pe utilizarea unui nanopor proteic și combinația dintre AuNP și molecule PNA. Un avantaj al utilizării moleculelor de PNA pentru detecția secvențelor complementare de ADN monocatenar se datorează hibridizării dintre secvențele de PNA și secvențele țintă de ADN, cu specificitate crescută [216].

În cadrul acestor experimente, a căror înregistrări electrofiziologice reprezentative sunt ilustrate în **Fig. III. 4. 9**, reacții au fost adăugați, pe rând, în regiunea *cis* a cuvei experimentale, în ordinea următoare: a) AuNP (5 nM), b) PNA2 (5 nM), peste care au fost adăugate ulterior c) molecule H1N1 (15 nM) necomplementare și d) molecule HCV (50 nM) complementare cu PNA2.

Așa cum a fost demonstrat deja, nanoparticulele de aur încărcate electric negativ din regiunea *cis*, la aplicarea unei diferențe de potențial pozitivă, interacționează cu nanoporul de α -HL, ceea ce se reflectă în tipul de eveniment de blocaj prezentat în

Fig. III. 4. 9. a), dreptunghi portocaliu. Adăugarea ulterioară de molecule de PNA2 duce la agregarea AuNP și implicit întreruperea acestor blocaje (**Fig. III. 4. 9. b**). Pentru a simula o probă contaminată, în aceeași regiune se adaugă fragmente de ADN cu secvență necomplementară cu PNA2 (H1N1). În **Fig. III. 4. 9. c** este redată interacțiunea acestor molecule cu nanoporul de α -HL, în dreptunghiul verde fiind evidențiat evenimentul de blocaj tipic. După adăugarea de fragmente țintă de ADN (HCV), se observă niște evenimente de blocaj distincte (**Fig. III. 4. 9. d**, dreptunghi albastru), cu o amplitudine mai mică și o durată mai lungă comparativ cu cele observate anterior. Această interacțiune cu nanoporul sugerează formarea complexelor AuNP/PNA2/HCV, respectiv detecția fragmentelor de HCV, cu secvență complementară cu PNA2.

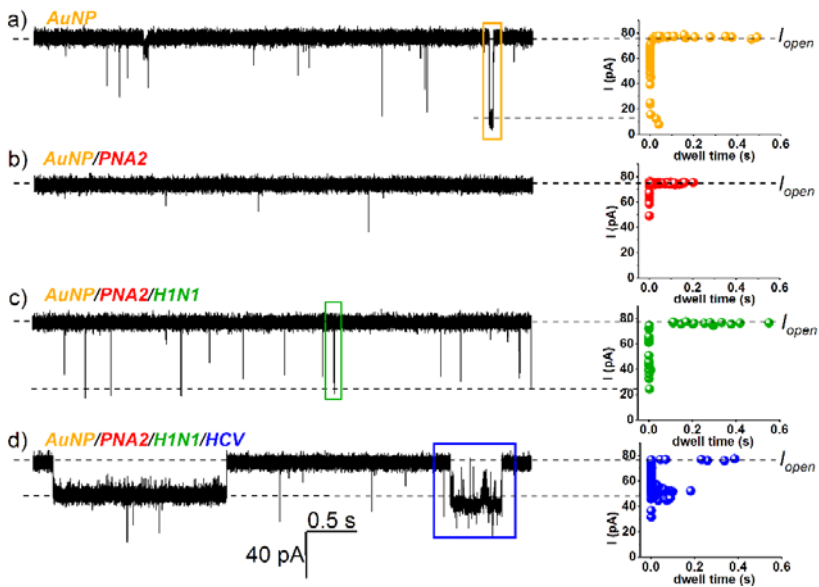


Fig. III. 4. 9: *Detecția selectivă a unor fragmente țintă de ADN (HCV) cu ajutorul sistemului format de AuNP/ α -HL, dintr-o probă contaminată.* [265]

Analiza statistică a amplitudinii evenimentelor de blocaj, pe baza argumentelor făcute anterior, indică posibilitatea de a detecta prezența secvenței de HCV în soluția electrolică, ce conține și alte fragmente de acizi nucleici. Această caracteristică a metodei propusă este relevantă pentru aplicații în care se urmărește detecția selectivă sau multiplex a unor secvențe monocatenare de ADN distincte.

Concluzii

- În acest studiu atenția a fost îndreptată spre o tehnică relativ simplă bazată pe nanopori, deschizând calea pentru crearea unei tehnologii care să permită detecția selectivă și discriminarea fragmentelor scurte de ADN monocatenar a diferiților agenți patogeni cu ajutorul nanoparticulelor din aur. Această metodă se bazează pe modificările proprietăților de suprafață a AuNP ca urmare a procesului de hibridizare a secvențelor de PNA prezente în sistem, complementare cu cele de ADN țintă. Analiza fluctuațiilor de curent ionic datorate interacțiunilor distincte cu nanoporul proteic a indicat că metoda este eficientă pentru detecția în timp real și precisă a secvențelor specifice de ADN din probă.
- Metoda prezentată dispune de o serie de avantaje: (i) secvența primară a moleculelor de PNA poate fi adaptată cu ușurință pentru a permite detecția selectivă a unei game largi de secvențe monocatenare de ADN scurte sau lungi; (ii) metoda este necostisitoare, ușor de utilizat și rapidă, procesele având loc la temperatura camerei și (iii) numărul de reactivi implicați în detecție este redus la minimum, fără a fi necesară o marcarea suplimentară a compușilor țintă.
- Această metodă de detecție a moleculelor de ADN cu sensibilitate și specificitate ridicată ar putea fi implementată pentru dezvoltarea unor aplicații biotehnologice utilizate în testarea medicală pentru diagnosticare realizată la punctul de îngrijire, în investigațiile medico-legale sau în monitorizarea siguranței alimentare.

CONCLUZII GENERALE

În cadrul acestei teze de doctorat am studiat nivel de singură moleculă comportamentul dinamic al unor biomolecule de interes funcțional, într-o serie de experimente din care s-au extras următoarele concluzii:

1. Am realizat investigarea comportamentului dendrimerilor PAMAM de generație inferioară atunci când sunt supuși unor constrângeri spațiale. Astfel, am utilizat un adaptor molecular de ciclodextrină împreună cu nanoporul α -HL și am urmărit cinetica de interacțiune a dendrimerului PAMAM G1, în cele două cazuri. Rezultatele obținute din analiza statistică a evenimentelor de blocaj distincte au indicat faptul că dendrimerul interacționează mai rapid cu γ -CD, însă nu poate transloca prin aceasta. Înțelegerea modului în care dendrimerii se comportă în spații moleculare nanometrice cu grade de libertate limitate este crucială pentru dezvoltarea aplicațiilor biomedicale, deoarece aceste molecule, care pot fi încărcate cu diverși compuși bioactivi, sunt de obicei blocate sau trec prin canale biologice cu dimensiuni nanometrice.

2. Utilizând tehnica NFS cu ajutorul nanoporului de α -HL am reușit realizarea unui studiu comparativ a unor duplecși moleculari formați din secvențe scurte de ADN și secvențe complementare de acizi nucleici artificiali (PNA), nefuncționalizați sau funcționalizați cu un lanț polipeptidic cationic. Studiul a permis identificarea etapelor distincte prin care trec duplecșii în interiorul nanoporului, conducând astfel la o mai bună înțelegere asupra mecanismului de dehibridizare (*unzip*) al acestora.

3. Mai departe, cu scopul optimizării detecției moleculelor de ADN cu ajutorul nanoporului de α -HL, am arătat efectele tăriei ionice a mediului asupra interacțiunii duplecșilor ADN-PNA funcționalizați cu poliarginine. Mai mult decât atât, am reușit să vizualizăm formarea complecșilor ADN-PNA 'colapsați' în interiorul nanoporului.

4. În continuare, am demonstrat capacitatea biosenzorului α -HL de a fi folosit în dezvoltarea unei metode de detecție în timp real, ușor de utilizat și cu costuri reduse, a unor secvențe monocatenare scurte de ADN, fără necesitatea altor procese biochimice complexe (e.g. marcarea fluorescentă, amplificarea de tip PCR). Sistemul de detecție implică utilizarea unor nanoparticule din aur (AuNP) și a unor secvențe de PNA complementare cu cele de ADN țintă, iar principiul de funcționare se bazează pe fenomenul de agregare al AuNP. Totodată, am arătat gradul crescut de sensibilitate și specificitate al metodei, prin detecția fragmentelor de ADN la concentrații de ordinul nanomolar dintr-o probă contaminată cu alte secvențe necomplementare.

BIBLIOGRAFIE

- [1] Z. Liu, L. D. Lavis, and E. Betzig, "Imaging Live-Cell Dynamics and Structure at the Single-Molecule Level," *Molecular Cell*, vol. 58, no. 4, pp. 644–659, May 2015, doi: 10.1016/j.molcel.2015.02.033.
- [2] W. Wu, X. Zhu, and C. Song, "Single-molecule technique: a revolutionary approach to exploring fundamental questions in plant science," *New Phytol*, vol. 223, no. 2, pp. 508–510, Jul. 2019, doi: 10.1111/nph.15928.
- [3] J. Ellenberg *et al.*, "Nuclear Membrane Dynamics and Reassembly in Living Cells: Targeting of an Inner Nuclear Membrane Protein in Interphase and Mitosis," *Journal of Cell Biology*, vol. 138, no. 6, pp. 1193–1206, Sep. 1997, doi: 10.1083/jcb.138.6.1193.
- [4] S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, and M. D. Mason, "Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy," *Biophysical Journal*, vol. 91, no. 11, pp. 4258–4272, Dec. 2006, doi: 10.1529/biophysj.106.091116.
- [5] M. J. Rust, M. Bates, and X. Zhuang, "Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)," *Nat Methods*, vol. 3, no. 10, pp. 793–796, Oct. 2006, doi: 10.1038/nmeth929.
- [6] G. Binnig, C. F. Quate, and Ch. Gerber, "Atomic Force Microscope," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 56, no. 9, pp. 930–933, Mar. 1986, doi: 10.1103/PhysRevLett.56.930.
- [7] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and S. Chu, "Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles," *Opt. Lett.*, vol. 11, no. 5, p. 288, May 1986, doi: 10.1364/OL.11.000288.
- [8] S. Smith, L. Finzi, and C. Bustamante, "Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads," *Science*, vol. 258, no. 5085, pp. 1122–1126, Nov. 1992, doi: 10.1126/science.1439819.
- [9] C. L. Hill and G. J. Stephens, "An Introduction to Patch Clamp Recording," in *Patch Clamp Electrophysiology*, vol. 2188, M. Dallas and D. Bell, Eds. New York, NY: Springer US, 2021, pp. 1–19. doi: 10.1007/978-1-0716-0818-0_1.
- [10] L.-Q. Gu, O. Braha, S. Conlan, S. Cheley, and H. Bayley, "Stochastic sensing of organic analytes by a pore-forming protein containing a molecular adapter," *Nature*, vol. 398, no. 6729, pp. 686–690, Apr. 1999, doi: 10.1038/19491.
- [11] H. Bayley and P. S. Cremer, "Stochastic sensors inspired by biology," *Nature*, vol. 413, no. 6852, pp. 226–230, Sep. 2001, doi: 10.1038/35093038.

- [12] L. Movileanu, J. P. Schmittschmitt, J. Martin Scholtz, and H. Bayley, "Interactions of Peptides with a Protein Pore," *Biophysical Journal*, vol. 89, no. 2, pp. 1030–1045, Aug. 2005, doi: 10.1529/biophysj.104.057406.
- [13] S. Howorka and Z. Siwy, "Nanopore analytics: sensing of single molecules," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38, no. 8, pp. 2360–2384, 2009, doi: 10.1039/b813796j.
- [14] S. Majd, E. C. Yusko, Y. N. Billeh, M. X. Macrae, J. Yang, and M. Mayer, "Applications of biological pores in nanomedicine, sensing, and nanoelectronics," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 21, no. 4, pp. 439–476, Aug. 2010, doi: 10.1016/j.copbio.2010.05.002.
- [15] A. Liu, Q. Zhao, and X. Guan, "Stochastic nanopore sensors for the detection of terrorist agents: Current status and challenges," *Analytica Chimica Acta*, vol. 675, no. 2, pp. 106–115, Aug. 2010, doi: 10.1016/j.aca.2010.07.001.
- [16] G. Oukhaled *et al.*, "Unfolding of Proteins and Long Transient Conformations Detected by Single Nanopore Recording," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 98, no. 15, p. 158101, Apr. 2007, doi: 10.1103/PhysRevLett.98.158101.
- [17] L. Payet *et al.*, "Thermal Unfolding of Proteins Probed at the Single Molecule Level Using Nanopores," *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 9, pp. 4071–4076, May 2012, doi: 10.1021/ac300129e.
- [18] D. Rodriguez-Larrea and H. Bayley, "Multistep protein unfolding during nanopore translocation," *Nature Nanotech*, vol. 8, no. 4, pp. 288–295, Apr. 2013, doi: 10.1038/nnano.2013.22.
- [19] K. J. Freedman, S. R. Haq, J. B. Edel, P. Jemth, and M. J. Kim, "Single molecule unfolding and stretching of protein domains inside a solid-state nanopore by electric field," *Sci Rep*, vol. 3, no. 1, p. 1638, Dec. 2013, doi: 10.1038/srep01638.
- [20] J. J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Branton, and D. W. Deamer, "Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 93, no. 24, pp. 13770–13773, Nov. 1996, doi: 10.1073/pnas.93.24.13770.
- [21] N. Ashkenasy, J. Sánchez-Quesada, H. Bayley, and M. R. Ghadiri, "Recognizing a Single Base in an Individual DNA Strand: A Step Toward DNA Sequencing in Nanopores," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 44, no. 9, pp. 1401–1404, Feb. 2005, doi: 10.1002/anie.200462114.
- [22] D. Stoddart, A. J. Heron, E. Mikhailova, G. Maglia, and H. Bayley, "Single-nucleotide discrimination in immobilized DNA oligonucleotides with a

- biological nanopore,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, no. 19, pp. 7702–7707, May 2009, doi: 10.1073/pnas.0901054106.
- [23] J. Clarke, H.-C. Wu, L. Jayasinghe, A. Patel, S. Reid, and H. Bayley, “Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing,” *Nature Nanotech*, vol. 4, no. 4, pp. 265–270, Apr. 2009, doi: 10.1038/nnano.2009.12.
- [24] Y. Wang, D. Zheng, Q. Tan, M. X. Wang, and L.-Q. Gu, “Nanopore-based detection of circulating microRNAs in lung cancer patients,” *Nature Nanotech*, vol. 6, no. 10, pp. 668–674, Oct. 2011, doi: 10.1038/nnano.2011.147.
- [25] Y. Feng, Y. Zhang, C. Ying, D. Wang, and C. Du, “Nanopore-based Fourth-generation DNA Sequencing Technology,” *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, vol. 13, no. 1, pp. 4–16, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.gpb.2015.01.009.
- [26] D. Stoddart, L. Franceschini, A. Heron, H. Bayley, and G. Maglia, “DNA stretching and optimization of nucleobase recognition in enzymatic nanopore sequencing,” *Nanotechnology*, vol. 26, no. 8, p. 084002, Feb. 2015, doi: 10.1088/0957-4484/26/8/084002.
- [27] V. Tabard-Cossa, M. Wiggin, D. Trivedi, N. N. Jetha, J. R. Dwyer, and A. Marziali, “Single-Molecule Bonds Characterized by Solid-State Nanopore Force Spectroscopy,” *ACS Nano*, vol. 3, no. 10, pp. 3009–3014, Oct. 2009, doi: 10.1021/nn900713a.
- [28] S. W. Kowalczyk, M. W. Tuijtel, S. P. Donkers, and C. Dekker, “Unraveling Single-Stranded DNA in a Solid-State Nanopore,” *Nano Lett.*, vol. 10, no. 4, pp. 1414–1420, Apr. 2010, doi: 10.1021/nl100271c.
- [29] K. Tian, Z. He, Y. Wang, S.-J. Chen, and L.-Q. Gu, “Designing a Polycationic Probe for Simultaneous Enrichment and Detection of MicroRNAs in a Nanopore,” *ACS Nano*, vol. 7, no. 5, pp. 3962–3969, May 2013, doi: 10.1021/nn305789z.
- [30] W. H. Coulter, “Means for counting particles suspended in a fluid,” US2656508A, Oct. 20, 1953 Accessed: Jul. 01, 2021. [Online]. Available: <https://patents.google.com/patent/US2656508A/en>
- [31] S. C. Kim, S. K. Kannam, S. Harrer, M. T. Downton, S. Moore, and J. M. Wagner, “Geometric dependence of the conductance drop in a nanopore due to a particle,” *Phys. Rev. E*, vol. 89, no. 4, p. 042702, Apr. 2014, doi: 10.1103/PhysRevE.89.042702.
- [32] R. M. M. Smeets, U. F. Keyser, D. Krapf, M.-Y. Wu, N. H. Dekker, and C. Dekker, “Salt Dependence of Ion Transport and DNA Translocation through Solid-State

- Nanopores,” *Nano Lett.*, vol. 6, no. 1, pp. 89–95, Jan. 2006, doi: 10.1021/nl052107w.
- [33] R. W. DeBlois and C. P. Bean, “Counting and Sizing of Submicron Particles by the Resistive Pulse Technique,” *Review of Scientific Instruments*, vol. 41, no. 7, pp. 909–916, Jul. 1970, doi: 10.1063/1.1684724.
- [34] LuchianTudor, *Electrofiziologie moleculară: teorie și aplicații*. Iași: Sedcom Libris, 2006.
- [35] L. Mereuță, *Metode actuale în biofizica moleculară*. Iași: Editura Universității "Alexandru Ioan Cuza, 2017.
- [36] M. Bates, M. Burns, and A. Meller, “Dynamics of DNA Molecules in a Membrane Channel Probed by Active Control Techniques,” *Biophysical Journal*, vol. 84, no. 4, pp. 2366–2372, Apr. 2003, doi: 10.1016/S0006-3495(03)75042-5.
- [37] A. Ciuca *et al.*, “Single-Molecule, Real-Time Dissecting of Peptide Nucleic Acid–DNA Duplexes with a Protein Nanopore Tweezer,” *Anal. Chem.*, vol. 90, no. 12, pp. 7682–7690, Jun. 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.8b01568.
- [38] J. Mathé, H. Visram, V. Viasnoff, Y. Rabin, and A. Meller, “Nanopore Unzipping of Individual DNA Hairpin Molecules,” *Biophysical Journal*, vol. 87, no. 5, pp. 3205–3212, Nov. 2004, doi: 10.1529/biophysj.104.047274.
- [39] B. Hornblower *et al.*, “Single-molecule analysis of DNA-protein complexes using nanopores,” *Nat Methods*, vol. 4, no. 4, pp. 315–317, Apr. 2007, doi: 10.1038/nmeth1021.
- [40] M. Wanunu, J. Sutin, and A. Meller, “DNA Profiling Using Solid-State Nanopores: Detection of DNA-Binding Molecules,” *Nano Lett.*, vol. 9, no. 10, pp. 3498–3502, Oct. 2009, doi: 10.1021/nl901691v.
- [41] A. Crnković, M. Srnko, and G. Anderluh, “Biological Nanopores: Engineering on Demand,” *Life*, vol. 11, no. 1, p. 27, Jan. 2021, doi: 10.3390/life11010027.
- [42] C. Plesa, J. W. Ruitenbergh, M. J. Witteveen, and C. Dekker, “Detection of Individual Proteins Bound along DNA Using Solid-State Nanopores,” *Nano Lett.*, vol. 15, no. 5, pp. 3153–3158, May 2015, doi: 10.1021/acs.nanolett.5b00249.
- [43] X. Lin, A. P. Ivanov, and J. B. Edel, “Selective single molecule nanopore sensing of proteins using DNA aptamer-functionalised gold nanoparticles,” *Chem. Sci.*, vol. 8, no. 5, pp. 3905–3912, 2017, doi: 10.1039/C7SC00415J.
- [44] A. P. Ivanov *et al.*, “DNA Tunneling Detector Embedded in a Nanopore,” *Nano Lett.*, vol. 11, no. 1, pp. 279–285, Jan. 2011, doi: 10.1021/nl103873a.

- [45] D. Al Sulaiman, P. Cadinu, A. P. Ivanov, J. B. Edel, and S. Ladame, "Chemically Modified Hydrogel-Filled Nanopores: A Tunable Platform for Single-Molecule Sensing," *Nano Lett.*, vol. 18, no. 9, pp. 6084–6093, Sep. 2018, doi: 10.1021/acs.nanolett.8b03111.
- [46] S. J. Heerema and C. Dekker, "Graphene nanodevices for DNA sequencing," *Nature Nanotech*, vol. 11, no. 2, pp. 127–136, Feb. 2016, doi: 10.1038/nnano.2015.307.
- [47] S. Hernández-Ainsa and U. F. Keyser, "DNA origami nanopores: developments, challenges and perspectives," *Nanoscale*, vol. 6, no. 23, pp. 14121–14132, Oct. 2014, doi: 10.1039/C4NR04094E.
- [48] A. R. Hall, A. Scott, D. Rotem, K. K. Mehta, H. Bayley, and C. Dekker, "Hybrid pore formation by directed insertion of α -haemolysin into solid-state nanopores," *Nature Nanotech*, vol. 5, no. 12, pp. 874–877, Dec. 2010, doi: 10.1038/nnano.2010.237.
- [49] S. Ryuzaki *et al.*, "Rapid structural analysis of nanomaterials in aqueous solutions," *Nanotechnology*, vol. 28, no. 15, p. 155501, Apr. 2017, doi: 10.1088/1361-6528/aa5e66.
- [50] A. Fragasso, S. Schmid, and C. Dekker, "Comparing Current Noise in Biological and Solid-State Nanopores," *ACS Nano*, vol. 14, no. 2, pp. 1338–1349, Feb. 2020, doi: 10.1021/acsnano.9b09353.
- [51] A. H. Laszlo, I. M. Derrington, and J. H. Gundlach, "MspA nanopore as a single-molecule tool: From sequencing to SPRNT," *Methods*, vol. 105, pp. 75–89, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.ymeth.2016.03.026.
- [52] T. Z. Butler, M. Pavlenok, I. M. Derrington, M. Niederweis, and J. H. Gundlach, "Single-molecule DNA detection with an engineered MspA protein nanopore," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, no. 52, pp. 20647–20652, Dec. 2008, doi: 10.1073/pnas.0807514106.
- [53] M. Chen, S. Khalid, M. S. P. Sansom, and H. Bayley, "Outer membrane protein G: Engineering a quiet pore for biosensing," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, no. 17, pp. 6272–6277, Apr. 2008, doi: 10.1073/pnas.0711561105.
- [54] E. M. Nestorovich, C. Danelon, M. Winterhalter, and S. M. Bezrukov, "Designed to penetrate: Time-resolved interaction of single antibiotic molecules with bacterial pores," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 99, no. 15, pp. 9789–9794, Jul. 2002, doi: 10.1073/pnas.152206799.

- [55] A. Apetrei, A. Asandei, Y. Park, K.-S. Hahm, M. Winterhalter, and T. Luchian, "Unimolecular study of the interaction between the outer membrane protein OmpF from *E. coli* and an analogue of the HP(2–20) antimicrobial peptide," *J Bioenerg Biomembr*, vol. 42, no. 2, pp. 173–180, Apr. 2010, doi: 10.1007/s10863-010-9273-z.
- [56] L. Song, M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, and J. E. Gouaux, "Structure of Staphylococcal alpha -Hemolysin, a Heptameric Transmembrane Pore," *Science*, vol. 274, no. 5294, pp. 1859–1865, Dec. 1996, doi: 10.1126/science.274.5294.1859.
- [57] B. Cressiot, H. Ouldali, M. Pastoriza-Gallego, L. Bacri, F. G. Van der Goot, and J. Pelta, "Aerolysin, a Powerful Protein Sensor for Fundamental Studies and Development of Upcoming Applications," *ACS Sens.*, vol. 4, no. 3, pp. 530–548, Mar. 2019, doi: 10.1021/acssensors.8b01636.
- [58] C. Cao, J. Yu, Y.-Q. Wang, Y.-L. Ying, and Y.-T. Long, "Driven Translocation of Polynucleotides Through an Aerolysin Nanopore," *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 10, pp. 5046–5049, May 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.6b01514.
- [59] C. Cao *et al.*, "Mapping the sensing spots of aerolysin for single oligonucleotides analysis," *Nat Commun*, vol. 9, no. 1, p. 2823, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-05108-5.
- [60] M. Soskine, A. Biesemans, B. Moeyaert, S. Cheley, H. Bayley, and G. Maglia, "An Engineered ClyA Nanopore Detects Folded Target Proteins by Selective External Association and Pore Entry," *Nano Lett.*, vol. 12, no. 9, pp. 4895–4900, Sep. 2012, doi: 10.1021/nl3024438.
- [61] G. Huang, K. Willems, M. Soskine, C. Wloka, and G. Maglia, "Electro-osmotic capture and ionic discrimination of peptide and protein biomarkers with FraC nanopores," *Nat Commun*, vol. 8, no. 1, p. 935, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41467-017-01006-4.
- [62] F. Haque, J. Lunn, H. Fang, D. Smithrud, and P. Guo, "Real-Time Sensing and Discrimination of Single Chemicals Using the Channel of Phi29 DNA Packaging Nanomotor," *ACS Nano*, vol. 6, no. 4, pp. 3251–3261, Apr. 2012, doi: 10.1021/nn3001615.
- [63] H. Bayley and L. Jayasinghe, "Functional engineered channels and pores (Review)," *Molecular Membrane Biology*, vol. 21, no. 4, pp. 209–220, Jul. 2004, doi: 10.1080/09687680410001716853.

- [64] L.-Q. Gu and J. W. Shim, "Single molecule sensing by nanopores and nanopore devices," *Analyst*, vol. 135, no. 3, pp. 441–451, 2010, doi: 10.1039/B907735A.
- [65] C. Meesters, A. Brack, N. Hellmann, and H. Decker, "Structural characterization of the α -hemolysin monomer from *Staphylococcus aureus*: Characterization of the α -Hemolysin Monomer," *Proteins*, vol. 75, no. 1, pp. 118–126, Apr. 2009, doi: 10.1002/prot.22227.
- [66] S. Bhakdi *et al.*, "Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and Escherichia coli hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins," *Archives of Microbiology*, vol. 165, no. 2, pp. 73–79, Feb. 1996, doi: 10.1007/s002030050300.
- [67] J. E. Gouaux *et al.*, "Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha-hemolysin in crystals and on membranes: a heptameric transmembrane pore.," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 91, no. 26, pp. 12828–12831, Dec. 1994, doi: 10.1073/pnas.91.26.12828.
- [68] S. Bhakdi and J. Tranum-Jensen, "Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*," *Microbiol Rev*, vol. 55, no. 4, pp. 733–751, Dec. 1991, doi: 10.1128/mr.55.4.733-751.1991.
- [69] Y. E. Korchev *et al.*, "Staphylococcus aureus alpha-toxin-induced pores: Channel-like behavior in lipid bilayers and patch clamped cells," *The Journal of Membrane Biology*, vol. 143, pp. 143–151, Jan. 1995, doi: <https://doi.org/10.1007/BF00234660>.
- [70] A. Aksimentiev and K. Schulten, "Imaging α -Hemolysin with Molecular Dynamics: Ionic Conductance, Osmotic Permeability, and the Electrostatic Potential Map," *Biophysical Journal*, vol. 88, no. 6, pp. 3745–3761, Jun. 2005, doi: 10.1529/biophysj.104.058727.
- [71] G. Menestrina, "Ionic channels formed by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: Voltage-dependent inhibition by divalent and trivalent cations," *J. Membranes Biol.*, vol. 90, no. 2, pp. 177–190, Jun. 1986, doi: 10.1007/BF01869935.
- [72] M. Montal and P. Mueller, "Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of Their Electrical Properties," *PNAS*, vol. 69, no. 12, pp. 3561–3566, Dec. 1972.
- [73] N. Jain, R. Prajapati, A. Agarwal, U. Gupta, and A. Asthana, "Dendrimers - Reflections on host-guest interaction mechanism towards solubility enhancement," *Asian J Pharm*, vol. 3, no. 3, p. 188, 2009, doi: 10.4103/0973-8398.56296.

- [74] D. A. Tomalia *et al.*, "A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules," *Polym J*, vol. 17, no. 1, pp. 117–132, Jan. 1985, doi: 10.1295/polymj.17.117.
- [75] A. Patri, J. Kukowskalatallo, and J. Bakerjr, "Targeted drug delivery with dendrimers: Comparison of the release kinetics of covalently conjugated drug and non-covalent drug inclusion complex," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 57, no. 15, pp. 2203–2214, Dec. 2005, doi: 10.1016/j.addr.2005.09.014.
- [76] D. A. Tomalia, "Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic polymer chemistry," *Progress in Polymer Science*, vol. 30, no. 3–4, pp. 294–324, Mar. 2005, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2005.01.007.
- [77] L.-Q. Gu *et al.*, "Reversal of charge selectivity in transmembrane protein pores by using noncovalent molecular adapters," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 97, no. 8, pp. 3959–3964, Apr. 2000, doi: 10.1073/pnas.97.8.3959.
- [78] A. Gupta, S. Dubey, and M. Mishra, "Unique Structures, Properties and Applications of Dendrimers," *J. Drug Delivery Ther.*, vol. 8, no. 6-s, pp. 328–339, Dec. 2018, doi: 10.22270/jddt.v8i6-s.2083.
- [79] A. F. Sauer-Budge, J. A. Nyamwanda, D. K. Lubensky, and D. Branton, "Unzipping kinetics of double-stranded DNA in a nanopore," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 90, no. 23, p. 238101, Jun. 2003, doi: 10.1103/PhysRevLett.90.238101.
- [80] J. Mathé, H. Visram, V. Viasnoff, Y. Rabin, and A. Meller, "Nanopore unzipping of individual DNA hairpin molecules," *Biophys. J.*, vol. 87, no. 5, pp. 3205–3212, Nov. 2004, doi: 10.1529/biophysj.104.047274.
- [81] M. Wanunu and A. Meller, "Single-molecule analysis of nucleic acids and DNA–protein interactions using nanopores," in *Single-Molecule Techniques: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2008, pp. 395–420.
- [82] B. Hornblower *et al.*, "Single-molecule analysis of DNA-protein complexes using nanopores," *Nat. Methods*, vol. 4, no. 4, pp. 315–317, Apr. 2007, doi: 10.1038/nmeth1021.
- [83] L. Song, M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, and J. E. Gouaux, "Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore," *Science*, vol. 274, no. 5294, pp. 1859–1866, Dec. 1996.
- [84] O. K. Dudko, J. Mathé, A. Szabo, A. Meller, and G. Hummer, "Extracting kinetics from single-molecule force spectroscopy: nanopore unzipping of DNA

- hairpins," *Biophys. J.*, vol. 92, no. 12, pp. 4188–4195, Jun. 2007, doi: 10.1529/biophysj.106.102855.
- [85] V. Arnaut, M. Langecker, and F. C. Simmel, "Nanopore Force Spectroscopy of Aptamer–Ligand Complexes," *Biophysical Journal*, vol. 105, no. 5, pp. 1199–1207, Sep. 2013, doi: 10.1016/j.bpj.2013.07.047.
- [86] R. T. Perera, A. M. Fleming, A. M. Peterson, J. M. Heemstra, C. J. Burrows, and H. S. White, "Unzipping of A-Form DNA-RNA, A-Form DNA-PNA, and B-Form DNA-DNA in the α -Hemolysin Nanopore," *Biophys. J.*, vol. 110, no. 2, pp. 306–314, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.bpj.2015.11.020.
- [87] Y. Wang *et al.*, "Single molecule investigation of Ag⁺ interactions with single cytosine-, methylcytosine- and hydroxymethylcytosine-cytosine mismatches in a nanopore," *Sci Rep*, vol. 4, p. 5883, Aug. 2014, doi: 10.1038/srep05883.
- [88] A. E. P. Schibel *et al.*, "Sequence-specific single-molecule analysis of 8-oxo-7,8-dihydroguanine lesions in DNA based on unzipping kinetics of complementary probes in ion channel recordings," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, no. 37, pp. 14778–14784, Sep. 2011, doi: 10.1021/ja205653v.
- [89] S. Howorka, L. Movileanu, O. Braha, and H. Bayley, "Kinetics of duplex formation for individual DNA strands within a single protein nanopore," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 98, no. 23, pp. 12996–13001, Nov. 2001, doi: 10.1073/pnas.231434698.
- [90] S. Howorka, S. Cheley, and H. Bayley, "Sequence-specific detection of individual DNA strands using engineered nanopores," *Nat. Biotechnol.*, vol. 19, no. 7, pp. 636–639, Jul. 2001, doi: 10.1038/90236.
- [91] V. S. K. Balagurusamy, P. Weinger, and X. Sean Ling, "Detection of DNA hybridizations using solid-state nanopores," *Nanotechnology*, vol. 21, no. 33, p. 335102, Aug. 2010, doi: 10.1088/0957-4484/21/33/335102.
- [92] Q. Jin, A. M. Fleming, C. J. Burrows, and H. S. White, "Unzipping kinetics of duplex DNA containing oxidized lesions in an α -hemolysin nanopore," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 26, pp. 11006–11011, Jul. 2012, doi: 10.1021/ja304169n.
- [93] Q. Jin, A. M. Fleming, Y. Ding, C. J. Burrows, and H. S. White, "Structural destabilization of DNA duplexes containing single-base lesions investigated by nanopore measurements," *Biochemistry*, vol. 52, no. 45, pp. 7870–7877, Nov. 2013, doi: 10.1021/bi4009825.

- [94] R. P. Johnson, A. M. Fleming, Q. Jin, C. J. Burrows, and H. S. White, "Temperature and electrolyte optimization of the α -hemolysin latch sensing zone for detection of base modification in double-stranded DNA," *Biophys. J.*, vol. 107, no. 4, pp. 924–931, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.bpj.2014.07.006.
- [95] Y. Ding, A. M. Fleming, H. S. White, and C. J. Burrows, "Internal vs fishhook hairpin DNA: unzipping locations and mechanisms in the α -hemolysin nanopore," *J Phys Chem B*, vol. 118, no. 45, pp. 12873–12882, Nov. 2014, doi: 10.1021/jp5101413.
- [96] X. Zhang, Y. Wang, B. L. Fricke, and L.-Q. Gu, "Programming Nanopore Ion Flow for Encoded Multiplex MicroRNA Detection," *ACS Nano*, vol. 8, no. 4, pp. 3444–3450, Apr. 2014, doi: 10.1021/nn406339n.
- [97] X. Wu *et al.*, "Multiplexed discrimination of microRNA single nucleotide variants through triplex molecular beacon sensors," *Chem. Commun. (Camb.)*, vol. 54, no. 55, pp. 7673–7676, Jul. 2018, doi: 10.1039/c8cc03574a.
- [98] Y. Wang, D. Zheng, Q. Tan, M. X. Wang, and L.-Q. Gu, "Nanopore-based detection of circulating microRNAs in lung cancer patients," *Nat Nanotechnol*, vol. 6, no. 10, pp. 668–674, Sep. 2011, doi: 10.1038/nnano.2011.147.
- [99] M. Wanunu, T. Dadosh, V. Ray, J. Jin, L. McReynolds, and M. Drndić, "Rapid electronic detection of probe-specific microRNAs using thin nanopore sensors," *Nat Nanotechnol*, vol. 5, no. 11, pp. 807–814, Nov. 2010, doi: 10.1038/nnano.2010.202.
- [100] L. Wang *et al.*, "Displacement chemistry-based nanopore analysis of nucleic acids in complicated matrices," *Chem. Commun.*, vol. 54, no. 99, pp. 13977–13980, 2018, doi: 10.1039/C8CC07944G.
- [101] M. Egholm *et al.*, "PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules," *Nature*, vol. 365, no. 6446, pp. 566–568, Oct. 1993, doi: 10.1038/365566a0.
- [102] P. Nielsen, M. Egholm, R. Berg, and O. Buchardt, "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide," *Science*, vol. 254, no. 5037, pp. 1497–1500, Dec. 1991, doi: 10.1126/science.1962210.
- [103] S. Tomac *et al.*, "Ionic Effects on the Stability and Conformation of Peptide Nucleic Acid Complexes," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 118, no. 24, pp. 5544–5552, Jan. 1996, doi: 10.1021/ja960495l.

- [104] F. P. Schwarz, S. Robinson, and J. M. Butler, "Thermodynamic comparison of PNA/DNA and DNA/DNA hybridization reactions at ambient temperature," *Nucleic Acids Res.*, vol. 27, no. 24, pp. 4792–4800, Dec. 1999, doi: 10.1093/nar/27.24.4792.
- [105] V. V. Demidov *et al.*, "Stability of peptide nucleic acids in human serum and cellular extracts," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 48, no. 6, pp. 1310–1313, Sep. 1994, doi: 10.1016/0006-2952(94)90171-6.
- [106] K. Tian, Z. He, Y. Wang, S.-J. Chen, and L.-Q. Gu, "Designing a polycationic probe for simultaneous enrichment and detection of microRNAs in a nanopore," *ACS Nano*, vol. 7, no. 5, pp. 3962–3969, May 2013, doi: 10.1021/nn305789z.
- [107] T. J. Morin *et al.*, "Nanopore-Based Target Sequence Detection," *PLoS ONE*, vol. 11, no. 5, p. e0154426, May 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0154426.
- [108] M. Ali, R. Neumann, and W. Ensinger, "Sequence-specific recognition of DNA oligomer using peptide nucleic acid (PNA)-modified synthetic ion channels: PNA/DNA hybridization in nanoconfined environment," *ACS Nano*, vol. 4, no. 12, pp. 7267–7274, Dec. 2010, doi: 10.1021/nn102119q.
- [109] A. Ciuca *et al.*, "Single-Molecule, Real-Time Dissecting of Peptide Nucleic Acid-DNA Duplexes with a Protein Nanopore Tweezer," *Anal. Chem.*, vol. 90, no. 12, pp. 7682–7690, 19 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.8b01568.
- [110] L. Mereuta, A. Asandei, I. Schiopu, Y. Park, and T. Luchian, "Nanopore-Assisted, Sequence-Specific Detection, and Single-Molecule Hybridization Analysis of Short, Single-Stranded DNAs," *Anal. Chem.*, vol. 91, no. 13, pp. 8630–8637, Jul. 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.9b02080.
- [111] A. Asandei, L. Mereuta, J. Park, C. H. Seo, Y. Park, and T. Luchian, "Nonfunctionalized PNAs as Beacons for Nucleic Acid Detection in a Nanopore System," *ACS Sens.*, vol. 4, no. 6, pp. 1502–1507, Jun. 2019, doi: 10.1021/acssensors.9b00553.
- [112] T. Luchian, Y. Park, A. Asandei, I. Schiopu, L. Mereuta, and A. Apetrei, "Nanoscale Probing of Informational Polymers with Nanopores. Applications to Amyloidogenic Fragments, Peptides, and DNA–PNA Hybrids," *Acc. Chem. Res.*, vol. 52, no. 1, pp. 267–276, Jan. 2019, doi: 10.1021/acs.accounts.8b00565.
- [113] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, and O. Buchardt, "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted

- polyamide," *Science*, vol. 254, no. 5037, pp. 1497–1500, Dec. 1991, doi: 10.1126/science.1962210.
- [114] M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, and R. H. Berg, "Peptide nucleic acids (PNA) - Oligonucleotide analogues with an achiral peptide backbone," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 114, pp. 1895–1897, 1992.
- [115] O. Buchardt, M. Egholm, R. H. Berg, and P. E. Nielsen, "Peptide nucleic acids and their potential applications in biotechnology," *Trends in Biotechnology*, vol. 11, no. 9, pp. 384–386, Sep. 1993, doi: 10.1016/0167-7799(93)90097-S.
- [116] P. E. Nielsen, "DNA Analogues with Nonphosphodiester Backbones," *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, vol. 24, no. 1, pp. 167–183, Jun. 1995, doi: 10.1146/annurev.bb.24.060195.001123.
- [117] S. Tomac *et al.*, "Ionic Effects on the Stability and Conformation of Peptide Nucleic Acid Complexes," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 118, no. 24, pp. 5544–5552, Jan. 1996, doi: 10.1021/ja960495l.
- [118] M. Egholm *et al.*, "PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules," *Nature*, vol. 365, no. 6446, pp. 566–568, Oct. 1993, doi: 10.1038/365566a0.
- [119] P. E. Nielsen, M. Egholm, and O. Buchardt, "Sequence-specific transcription arrest by peptide nucleic acid bound to the DNA template strand," *Gene*, vol. 149, no. 1, pp. 139–145, Nov. 1994, doi: 10.1016/0378-1119(94)90422-7.
- [120] J. Hanvey *et al.*, "Antisense and antigene properties of peptide nucleic acids," *Science*, vol. 258, no. 5087, pp. 1481–1485, Nov. 1992, doi: 10.1126/science.1279811.
- [121] D. F. Doyle, D. A. Braasch, Carla G. Simmons, B. A. Janowski, and D. R. Corey, "Inhibition of Gene Expression Inside Cells by Peptide Nucleic Acids: Effect of mRNA Target Sequence, Mismatched Bases, and PNA Length," *Biochemistry*, vol. 40, no. 1, pp. 53–64, Jan. 2001, doi: 10.1021/bi0020630.
- [122] F. Pellestor and P. Paulasova, "The peptide nucleic acids (PNAs), powerful tools for molecular genetics and cytogenetics," *Eur J Hum Genet*, vol. 12, no. 9, pp. 694–700, Sep. 2004, doi: 10.1038/sj.ejhg.5201226.
- [123] J. C. Norton, M. A. Piatyszek, W. E. Wright, J. W. Shay, and D. R. Corey, "Inhibition of human telomerase activity by peptide nucleic acids," *Nat Biotechnol*, vol. 14, no. 5, pp. 615–619, May 1996, doi: 10.1038/nbt0596-615.
- [124] T. J. Morin *et al.*, "Nanopore-Based Target Sequence Detection," *PLoS ONE*, vol. 11, no. 5, p. e0154426, May 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0154426.

- [125] M. Ali, R. Neumann, and W. Ensinger, "Sequence-Specific Recognition of DNA Oligomer Using Peptide Nucleic Acid (PNA)-Modified Synthetic Ion Channels: PNA/DNA Hybridization in Nanoconfined Environment," *ACS Nano*, vol. 4, no. 12, pp. 7267–7274, Dec. 2010, doi: 10.1021/nn102119q.
- [126] L. Mereuta, A. Asandei, I. Schiopu, Y. Park, and T. Luchian, "Nanopore-Assisted, Sequence-Specific Detection, and Single-Molecule Hybridization Analysis of Short, Single-Stranded DNAs," *Anal. Chem.*, vol. 91, no. 13, pp. 8630–8637, Jul. 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.9b02080.
- [127] A. Asandei, L. Mereuta, J. Park, C. H. Seo, Y. Park, and T. Luchian, "Nonfunctionalized PNAs as Beacons for Nucleic Acid Detection in a Nanopore System," *ACS Sens.*, vol. 4, no. 6, pp. 1502–1507, Jun. 2019, doi: 10.1021/acssensors.9b00553.
- [128] I. S. Dragomir, I. C. Bucataru, I. Schiopu, and T. Luchian, "Unzipping Mechanism of Free and Polyarginine-Conjugated DNA-PNA Duplexes, Preconfined Inside the α -Hemolysin Nanopore," *Anal. Chem.*, vol. 92, no. 11, pp. 7800–7807, Jun. 2020, doi: 10.1021/acs.analchem.0c00976.
- [129] B. Luan, G. Martyna, and G. Stolovitzky, "Characterizing and controlling the motion of ssDNA in a solid-state nanopore," *Biophys. J.*, vol. 101, no. 9, pp. 2214–2222, Nov. 2011, doi: 10.1016/j.bpj.2011.08.038.
- [130] M. Eriksson and P. E. Nielsen, "Solution structure of a peptide nucleic acid-DNA duplex," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 3, no. 5, pp. 410–413, May 1996, doi: 10.1038/nsb0596-410.
- [131] W. Vercoutere, S. Winters-Hilt, H. Olsen, D. Deamer, D. Haussler, and M. Akeson, "Rapid discrimination among individual DNA hairpin molecules at single-nucleotide resolution using an ion channel," *Nat. Biotechnol.*, vol. 19, no. 3, pp. 248–252, Mar. 2001, doi: 10.1038/85696.
- [132] A. Asandei, A. E. Rossini, M. Chinappi, Y. Park, and T. Luchian, "Protein Nanopore-Based Discrimination between Selected Neutral Amino Acids from Polypeptides," *Langmuir*, vol. 33, no. 50, pp. 14451–14459, 19 2017, doi: 10.1021/acs.langmuir.7b03163.
- [133] A. Asandei, I. S. Dragomir, G. Di Muccio, M. Chinappi, Y. Park, and T. Luchian, "Single-Molecule Dynamics and Discrimination between Hydrophilic and Hydrophobic Amino Acids in Peptides, through Controllable, Stepwise Translocation across Nanopores," *Polymers (Basel)*, vol. 10, no. 8, p. 885, Aug. 2018, doi: 10.3390/polym10080885.

- [134] S. Sorgenfrei *et al.*, “Label-free single-molecule detection of DNA-hybridization kinetics with a carbon nanotube field-effect transistor,” *Nat Nanotechnol*, vol. 6, no. 2, pp. 126–132, Feb. 2011, doi: 10.1038/nnano.2010.275.
- [135] J. Muzard, M. Martinho, J. Mathé, U. Bockelmann, and V. Viasnoff, “DNA translocation and unzipping through a nanopore: some geometrical effects,” *Biophys. J.*, vol. 98, no. 10, pp. 2170–2178, May 2010, doi: 10.1016/j.bpj.2010.01.041.
- [136] Y. Wang, K. Tian, L. L. Hunter, B. Ritzo, and L.-Q. Gu, “Probing molecular pathways for DNA orientational trapping, unzipping and translocation in nanopores by using a tunable overhang sensor,” *Nanoscale*, vol. 6, no. 19, pp. 11372–11379, 2014, doi: 10.1039/C4NR03195D.
- [137] A. Y. L. Sim, J. Lipfert, D. Herschlag, and S. Doniach, “Salt dependence of the radius of gyration and flexibility of single-stranded DNA in solution probed by small-angle x-ray scattering,” *Phys. Rev. E*, vol. 86, no. 2, p. 021901, Aug. 2012, doi: 10.1103/PhysRevE.86.021901.
- [138] N. T. S. De Costa and J. M. Heemstra, “Evaluating the Effect of Ionic Strength on Duplex Stability for PNA Having Negatively or Positively Charged Side Chains,” *PLoS ONE*, vol. 8, no. 3, p. e58670, Mar. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0058670.
- [139] J. Lei, Y. Huang, W. Zhong, D. Xiao, and C. Zhou, “Early Monitoring Drug Resistant Mutation T790M with a Two-Dimensional Simultaneous Discrimination Nanopore Strategy,” *Anal. Chem.*, vol. 92, no. 13, pp. 8867–8873, Jul. 2020, doi: 10.1021/acs.analchem.0c00575.
- [140] D. Xi, J. Shang, E. Fan, J. You, S. Zhang, and H. Wang, “Nanopore-Based Selective Discrimination of MicroRNAs with Single-Nucleotide Difference Using Locked Nucleic Acid-Modified Probes,” *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 21, pp. 10540–10546, Nov. 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.6b02620.
- [141] M. S. Verma, J. L. Rogowski, L. Jones, and F. X. Gu, “Colorimetric biosensing of pathogens using gold nanoparticles,” *Biotechnology Advances*, vol. 33, no. 6, pp. 666–680, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.03.003.
- [142] V. Velusamy, K. Arshak, O. Korostynska, K. Oliwa, and C. Adley, “An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors,” *Biotechnology Advances*, vol. 28, no. 2, pp. 232–254, Mar. 2010, doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.12.004.

- [143] A. Abi and A. Safavi, "Targeted Detection of Single-Nucleotide Variations: Progress and Promise," *ACS Sens.*, vol. 4, no. 4, pp. 792–807, Apr. 2019, doi: 10.1021/acssensors.8b01604.
- [144] S. Cosnier and P. Mailley, "Recent advances in DNA sensors," *Analyst*, vol. 133, no. 8, p. 984, 2008, doi: 10.1039/b803083a.
- [145] J. Tian, H. Zhao, M. Liu, Y. Chen, and X. Quan, "Detection of influenza A virus based on fluorescence resonance energy transfer from quantum dots to carbon nanotubes," *Analytica Chimica Acta*, vol. 723, pp. 83–87, Apr. 2012, doi: 10.1016/j.aca.2012.02.030.
- [146] A. Y. Y. Loh *et al.*, "Electric Single-Molecule Hybridization Detector for Short DNA Fragments," *Anal. Chem.*, vol. 90, no. 23, pp. 14063–14071, Dec. 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.8b04357.
- [147] N. F. Dupuis, E. D. Holmstrom, and D. J. Nesbitt, "Single-Molecule Kinetics Reveal Cation-Promoted DNA Duplex Formation Through Ordering of Single-Stranded Helices," *Biophysical Journal*, vol. 105, no. 3, pp. 756–766, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.bpj.2013.05.061.
- [148] K. Liu *et al.*, "Detecting topological variations of DNA at single-molecule level," *Nat Commun*, vol. 10, no. 1, p. 3, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41467-018-07924-1.
- [149] M.-C. Daniel and D. Astruc, "Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology," *Chem. Rev.*, vol. 104, no. 1, pp. 293–346, Jan. 2004, doi: 10.1021/cr030698+.
- [150] R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger, and C. A. Mirkin, "Selective Colorimetric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles," *Science*, vol. 277, no. 5329, pp. 1078–1081, Aug. 1997, doi: 10.1126/science.277.5329.1078.
- [151] P. Zhao, N. Li, and D. Astruc, "State of the art in gold nanoparticle synthesis," *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 257, no. 3–4, pp. 638–665, Feb. 2013, doi: 10.1016/j.ccr.2012.09.002.
- [152] G. Frens, "Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions," *Nature Physical Science*, vol. 241, no. 105, pp. 20–22, Jan. 1973, doi: 10.1038/physci241020a0.
- [153] S. K. Sivaraman, S. Kumar, and V. Santhanam, "Monodisperse sub-10nm gold nanoparticles by reversing the order of addition in Turkevich method – The

- role of chloroauric acid," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 361, no. 2, pp. 543–547, Sep. 2011, doi: 10.1016/j.jcis.2011.06.015.
- [154] W. Zhao, M. A. Brook, and Y. Li, "Design of Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Biosensing Assays," *ChemBioChem*, vol. 9, no. 15, pp. 2363–2371, Oct. 2008, doi: 10.1002/cbic.200800282.
- [155] S. K. Ghosh and T. Pal, "Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications," *Chem. Rev.*, vol. 107, no. 11, pp. 4797–4862, Nov. 2007, doi: 10.1021/cr0680282.
- [156] C. L. de Vasconcelos, M. R. Pereira, and J. L. C. Fonseca, "Polyelectrolytes in Solution and the Stabilization of Colloids," *Journal of Dispersion Science and Technology*, vol. 26, no. 1, pp. 59–70, Jan. 2005, doi: 10.1081/DIS-200040170.
- [157] R. J. Hunter, *Foundations of colloid science*, 2nd ed. Oxford ; New York: Oxford University Press, 2001.
- [158] W. Zhao, W. Chiunan, J. C. F. Lam, M. A. Brook, and Y. Li, "Simple and rapid colorimetric enzyme sensing assays using non-crosslinking gold nanoparticle aggregation," *Chem. Commun.*, no. 36, p. 3729, 2007, doi: 10.1039/b705335e.
- [159] W. R. Glomm, "Functionalized Gold Nanoparticles for Applications in Bionanotechnology," *Journal of Dispersion Science and Technology*, vol. 26, no. 3, pp. 389–414, May 2005, doi: 10.1081/DIS-200052457.
- [160] K. Sato, K. Hosokawa, and M. Maeda, "Rapid Aggregation of Gold Nanoparticles Induced by Non-Cross-Linking DNA Hybridization," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 27, pp. 8102–8103, Jul. 2003, doi: 10.1021/ja034876s.
- [161] H. Li and L. Rothberg, "Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 101, no. 39, pp. 14036–14039, Sep. 2004, doi: 10.1073/pnas.0406115101.
- [162] S. Arca-Lafuente, P. Martínez-Román, I. Mate-Cano, R. Madrid, and V. Briz, "Nanotechnology: A reality for diagnosis of HCV infectious disease," *Journal of Infection*, vol. 80, no. 1, pp. 8–15, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.jinf.2019.09.010.
- [163] L. Mereuta *et al.*, "Sequence-specific detection of single-stranded DNA with a gold nanoparticle-protein nanopore approach," *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, p. 11323, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-68258-x.
- [164] X. Su and R. Kanjanawarut, "Control of Metal Nanoparticles Aggregation and Dispersion by PNA and PNA–DNA Complexes, and Its Application for

- Colorimetric DNA Detection,” *ACS Nano*, vol. 3, no. 9, pp. 2751–2759, Sep. 2009, doi: 10.1021/nn9005768.
- [165] X. Liu, M. Atwater, J. Wang, and Q. Huo, “Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands,” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 58, no. 1, pp. 3–7, Jul. 2007, doi: 10.1016/j.colsurfb.2006.08.005.
- [166] D. Murphy, G. Redmond, B. de la Torre, and R. Eritja, “Hybridization and Melting Behavior of Peptide Nucleic Acid (PNA) Oligonucleotide Chimeras Conjugated to Gold Nanoparticles,” *HCA*, vol. 87, no. 11, pp. 2727–2734, Nov. 2004, doi: 10.1002/hlca.200490245.
- [167] R. Kanjanawarut and X. Su, “Colorimetric Detection of DNA Using Unmodified Metallic Nanoparticles and Peptide Nucleic Acid Probes,” *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 15, pp. 6122–6129, Aug. 2009, doi: 10.1021/ac900525k.
- [168] M. P. Monopoli *et al.*, “Physical–Chemical Aspects of Protein Corona: Relevance to *in Vitro* and *in Vivo* Biological Impacts of Nanoparticles,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, no. 8, pp. 2525–2534, Mar. 2011, doi: 10.1021/ja107583h.
- [169] S. H. D. P. Lacerda *et al.*, “Interaction of Gold Nanoparticles with Common Human Blood Proteins,” *ACS Nano*, vol. 4, no. 1, pp. 365–379, Jan. 2010, doi: 10.1021/nn9011187.
- [170] L. Mereuta, A. Asandei, C. H. Seo, Y. Park, and T. Luchian, “Quantitative Understanding of pH- and Salt-Mediated Conformational Folding of Histidine-Containing, β -Hairpin-like Peptides, through Single-Molecule Probing with Protein Nanopores,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, no. 15, pp. 13242–13256, Aug. 2014, doi: 10.1021/am5031177.

I. Lucrări publicate

A. Articole științifice publicate in extenso în reviste cotate Web of Science cu factor de impact:

1. Isabela S. Dragomir[#], **Ioana C. Bucataru[#]**, Irina Schiopu, and Tudor Luchian, *Unzipping Mechanism of Free and Polyarginine-Conjugated DNA-PNA Duplexes, Preconfined Inside the α -Hemolysin Nanopore*, **Analytical Chemistry** 92, 11, 7800–7807 (2020).

<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00976>

[#]**Prim autor**, contribuții egale cu Isabela S. Dragomir

Factor de impact (FI): 6.986

Scorul de influență absolut (AIS): 1.380

2. Loredana Mereuta, Alina Asandei, Isabela S. Dragomir, **Ioana C. Bucataru**, Jonggwan Park, Chang Ho Seo, Yoonkyung Park and Tudor Luchian, *Sequence-specific detection of single-stranded DNA with a gold nanoparticle-protein nanopore approach*, **Scientific Reports** 10, 11323 (2020).

<https://doi.org/10.1038/s41598-020-68258-x>

FI: 4.380

AIS: 1.285

3. 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** 13(8), 1210 (2021).

<https://doi.org/10.3390/polym13081210>

FI: 4.967

AIS: 0.611

4. 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** 66, 161-174 (2021).

<https://doi.org/10.24193/subbchem.2021.3.09>

FI: 0.558

AIS: 0.062

5. 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**, 17(12), e202200261 (2022). <https://doi.org/10.1002/asia.202200261>

FI: 4.839

AIS: 0.746

6. **Ioana C. Bucataru**[#], Isabela Dragomir[#], Alina Asandei, Ana-Maria Pantazica, Alina Ghionescu, Norica Branza-Nichita, Yoonkyung Park, and Tudor Luchian, *Probing the Hepatitis B Virus E-Antigen with a Nanopore Sensor Based on Collisional Events Analysis*, **Biosensors** 12(8), 596 (2022).

<https://doi.org/10.3390/bios12080596>

[#]**Prim autor**, contribuții egale cu Isabela Dragomir

FI: 5.743

AIS: 0.876

FI total = 6.986 + 4.380 + 4.967 + 0.558 + 4.839 + 5.743 = 27.473

AIS total = 1.380 + 1.285 + 0.611 + 0.062 + 0.746 + 0.876 = 4.96

B. Articole științifice publicate in extenso în volumele conferințelor indexate ISI - Proceedings

1. I. Soldanesu and **C. I. Bucataru**, *Electrophysiological Characterization of Transport Processes through Protein Nanopores*, 2021 International Conference on e-Health and Bioengineering (EHB), pp. 1-4, (2021).
<https://doi.org/10.1109/EHB52898.2021.9657652>

II. Participări la conferințe științifice

A. Lucrări prezentate la conferințe naționale

1. **Ioana Cezara Bucataru**, Isabela S Dragomir, Irina Schiopu, Tudor Luchian, *Nanopore-based Investigation of PNA-DNA Duplexes Unzipping Mechanism*, National Online Conference of Biophysics, CNB2020, 14-16 Iunie, 2020, online – poster
2. **Ioana Cezara Bucataru**, Isabela S Dragomir, Irina Schiopu, Tudor Luchian, *Studiul influenței tăriei ionice asupra detecției moleculelor de ADN cu ajutorul tehnicii electrofiziologice la nivel de singură moleculă*, Conferința Școlilor Doctorale din Cadrul Universității "Alexandru Ioan Cuza" din Iași – în cadrul proiectului DOCTORANZI ȘI CERCETĂTORI POSTDOCTORAT PREGĂTIȚI PENTRU PIAȚA MUNCII! Cod proiect: POCU/380/6/13/123623, 22-23 Octombrie, 2020, online – prezentare orală
3. **Ioana Cezara Bucataru**, Isabela S Dragomir, Irina Schiopu, Tudor Luchian, *Studiul la nivel de singură moleculă al mecanismului de desfăcere (unzip) a duplecșilor ADN-PNA cu ajutorul nanoporului proteic de α -hemolizină (α -HL)*, Conferința națională a doctoranzilor din Consorțiul Universitaria pentru domeniile Matematică, Informatică, Fizică, CSDCU-MIF2020, 22-24 Octombrie, 2020, online – prezentare orală

B. Lucrări prezentate la conferințe internaționale

1. Irina Schiopu, **Ioana Cezara Bucataru**, Tudor Luchian, Chang Ho Seo, Yoonkyung Park, *Electrophoretic migration of PAMAM G1 dendrimers into confined nano-spaces: a single-molecule assay*, The 12th EBSA/The 10th ICBP-IUPAP Biophysics Congress, Biophysics for Life and Technology, 20-24 Iulie 2019, Madrid, Spania – poster

2. Irina Schiopu, **Ioana Cezara Bucataru**, Tudor Luchian, Chang Ho Seo, Yoonkyung Park, *Nanoscale investigation of low generation PAMAM dendrimers*, The 12th International Conference PIM, Processes in Isotopes and Molecules, 25-27 septembrie 2019, Cluj-Napoca, România – poster

3. **Ioana Cezara Bucataru**, Loredana Mereuta, Alina Asandei, Isabela Dragomir, Tudor Luchian, *Protein nanopore-based method for sequence specific detection of single-stranded DNA using gold nanoparticles and peptide nucleic acids*, Sixth Edition of International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences, IC-ANMBES 2022, 8-10 Iunie 2022, Brașov, Romania – poster

4. **Ioana Cezara Bucataru**, Alina Asandei, Loredana Mereuta, Tudor Luchian, *Salt effects on the translocation dynamics of polycationic peptide nucleic acids through a protein nanopore*, DPG Spring Meeting of the Atomic, Molecular, Quantum Optics and Photonics Section (SAMOP), 5-10 Martie 2023, Hanovra, Germania – prezentare orală

III. Premii:

1. Young Scientist Prize - premiul II, **Ioana Cezara Bucataru**, Isabela S Dragomir, Irina Schiopu, Tudor Luchian, *Nanopore-based Investigation of PNA-DNA Duplexes Unzipping Mechanism*, National Online Conference of Biophysics, CNB 2020, 14-16 Iunie, 2020, online – poster.

2. Competiția 3MT – THREE MINUTE THESIS, în cadrul Universității "Alexandru Ioan Cuza" din Iași, 11 martie 2022 - locul I și premii de popularitate, **Ioana Cezara Bucataru**, *Specific detection of single stranded DNA (ssDNA) using a protein nanopore based platform and gold nanoparticles (AuNP)*.

IV. Participări la workshop-uri și școli de vară:

1. 5th @RoBioinfo Seminar: *Bioinformatics tools for exploring protein biology*, 4-5 aprilie 2019, Iași, România.

2. EBSA 2019 Summer Biophysics School, *Biophysics in the 21st Century*, 17-19 iulie 2019, El Escorial, Spania.

3. satellite workshop in the frame of PIM 2019, *Emerging molecular technologies based on micro- and nano-structured systems with biomedical applications*, 24 septembrie 2019, Cluj Napoca, România.

V. Proiecte de cercetare

Membru angajat în calitate de doctorand în cadrul proiectelor:

1. *Detecția multiplex, cu sensibilitate și selectivitate moleculară, a unor miRNAs relevante fiziologic, cu ajutorul unor xeno acizi nucleici*, Acronim: RNANANODETECT-, Cod proiect: **PN-III-P4-ID-PCE-2020-0011** (2021).
2. *Noi structuri peptidice cu potențiale aplicații în terapia țintită și diagnosticul timpuriu în cancer*, Acronim: THERHOME, Cod proiect: **PN-III-P1-1.1-TE-2021-0331** (2022).

VI. Alte activități conexe

Participant în cadrul proiectului *Doctoranzi și cercetători postdoctorat pregătiți pentru piața muncii!*, Cod proiect: **POCU/380/6/13/123623**, în perioada Octombrie 2019 - Iunie 2021.