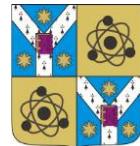




**Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași**

**Facultatea de Fizică**



**Școala Doctorală de Fizică**

# **INVESTIGAREA UNOR SISTEME ȘI INTERACȚIUNI MOLECULARE LA NANOSCALĂ**

**Conducător științific:**

**Prof. Dr. Tudor Luchian**

**Doctorand:**

**Andrei Ciucă**

**Iași**

**2018**

## CUPRINS

<b>I. IMPORTANȚA ȘI MOTIVAREA STUDIULUI TEHNICILOR DE INVESTIGARE A SISTEMELOR MOLECULARE LA NANOSCALĂ -----</b>	<b>3</b>
<b>II. PRINCIPIILE FIZICE ALE DETECȚIEI STOCASTICE CU AJUTORUL NANOPORILOR - 6</b>	
II.1. Prezentarea generală a principiul de detecție și analiză-----	6
II.2. Conductanța unui por cilindric cu suprafață interioară neutră din punct de vedere electric-----	8
II.3. Influența încărcării electrostatice a suprafetei interioare a nanoporului asupra conductanței -----	11
II.4. Electroosmoza datorată încărcării electrice a suprafetei interioare a nanoporului-----	13
II.5. Transportul unei molecule încărcate din soluție la gura porului -----	15
II.6. Rata de captare a unei molecule prin prisma teoriei stării de tranziție-----	20
II.7. Modelul deBlois și Bean de blocare a curentului ionic ca urmare a translocării unei molecule prin por -----	27
<b>III. MATERIALE ȘI METODE UTILIZATE ÎN CADRUL TEHNICII DE ANALIZĂ CU AJUTORUL NANOPORULUI DE <math>\alpha</math>-HL -----</b>	<b>29</b>
III.1. Tehnica utilizată în experimentele de electrofiziologie pentru studiile la nivel de singură moleculă a interacțiunilor nanopor-analit -----	29
III.2. Caracteristicile nanoporului proteic de $\alpha$ -HL secretat de bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> -----	32
III.3. Monitorizarea hibridizării acizilor nucleici prin spectrofotometrie UV -----	35
<b>IV. DETALII STRUCTURALE ȘI FUNCȚIONALE ALE MEMBRANELOR BACTERIENE GRAM-NEGATIVE ȘI INTERACȚIUNEA ACESTORA CU PEPTIDE CITOTOXICE -----37</b>	
IV.1. Caracteristicile membranelor bacteriene Gram-negative-----	37
IV.2. Acțiunea peptidelor antimicrobiene asupra membranelor bacteriene -----	43
IV.3. Particularități ale peptidei citotoxice sintetice hibrid CMA3 -----	45
<b>V. REZULTATE EXPERIMENTALE: DEMONSTRAREA PRINCIPIULUI DE DETECȚIE ȘI DISCRIMINARE A UNOR BACTERII GRAM-NEGATIVE CU AJUTORUL NANOPORULUI DE <math>\alpha</math>-HEMOLIZINĂ -----46</b>	
V.1. Analiza interacțiunilor bacteriilor Gram-negative cu nanoporul de $\alpha$ -HL -----	46
V.2. Utilizarea peptidei antimicrobiene hibrid CMA3 în scopul discriminării bacteriilor Gram-negative -----	53

V.3. Investigarea efectelor induse de pH-ul acid asupra interacțiunii dintre <i>P. aeruginosa</i> și α-HL ---	<b>57</b>
<b>VI. DETALII STRUCTURALE ȘI FUNCȚIONALE ALE DENDRIMERILOR -----</b>	<b>60</b>
VI.1. Structura generală și procesul de sinteză al dendrimerilor -----	<b>60</b>
VI.2. Proprietăți fizico-chimice ale dendrimerilor -----	<b>62</b>
VI.3. Aplicații biomedical ale dendrimerilor-----	<b>67</b>
<b>VII. REZULTATE EXPERIMENTALE: STUDIEREA MODIFICĂRILOR CONFORMAȚIONALE ALE DENDRIMERULUI PAMAM-G1 INDUSE DE pH ȘI CONCENTRAȚIA DE SARE-----</b>	<b>69</b>
VII.1. Influența pH-ului asupra blocajelor de curent ionic înregistrate prin α-HL induse de PAMAM-G1 -----	<b>69</b>
VII.2. Cinetica procesului de interacțiune PAMAM-G1 – α-HL la variația pH-ului -----	<b>73</b>
VII.3. Augmentarea barierei energetice a procesului de asociere dendrimer-por prin scăderea sării ionice -----	<b>80</b>
VII.4. Estimarea coeficientului de difuzie pentru PAMAM-G1 în interiorul α-HL în condiții diferite de pH și sărăie ionică -----	<b>84</b>
<b>VIII. DETALII STRUCTURALE ȘI FUNCȚIONALE ALE ACIZILOR PEPTIDO-NUCLEICI -</b>	<b>88</b>
VIII.1. Structura generală a acizilor peptido-nucleici -----	<b>88</b>
VIII.2. Proprietăți fizico-chimice ale acizilor peptido-nucleici-----	<b>90</b>
VIII.3. Aplicații biomedical ale acizilor peptido-nucleici -----	<b>92</b>
<b>IX. REZULTATE EXPERIMENTALE: UTILIZAREA NANOPORULUI PROTEIC DE α-HEMOLIZINĂ PENTRU DETECTAREA ȘI ANALIZA HIBRIDIZĂRII COMPLEXULUI PNA-DNA -----</b>	<b>93</b>
IX.1. Detectarea hibridizării dintre acizi peptido-nucleici și molecule de ADN monocatenare complementare -----	<b>93</b>
IX.2. Analiza duplexului molecular PNA3-DNA1 cu ajutorul nanoporului proteic de α-HL -----	<b>100</b>
IX.3. Cinetica desfacerii complexului PNA3-DNA1 în interiorul α-HL -----	<b>108</b>
<b>CONCLUZII FINALE -----</b>	<b>114</b>
<b>BIBLIOGRAFIE -----</b>	<b>115</b>

## **I. Importanța și motivația studiului tehniciilor de investigare a sistemelor moleculare la nanoscală**

Metodele biofizice de investigare la nivel de singură moleculă au transformat înțelegerea proceselor biologice și fizice ce stau la baza interacțiunilor biomoleculare și a lumii vii, în general. Tehnicile la nivel de singură moleculă au evoluat și au devenit în prezent instrumente puternice și atractive de sondare a biomoleculelor, datorită capacitatei unice de a investiga structura, dinamica și funcția moleculelor individuale, fără a suferi constrângerile impuse de medierea inherentă măsurătorilor în ansamblu.

Unele dintre metodele cel mai frecvent utilizate în practica de laborator sunt de natură optică, cum ar fi microscopia de fluorescență, permitând observarea și studierea unor sisteme moleculare în mediul lor fiziologic, fără a perturba interacțiunile din cadrul sistemului. Exemple notabile de tehnici de analiză prin microscopie de fluorescență sunt ‘PALM’ – ‘photoactivated localisation microscopy’ [1], ‘STORM’ – ‘stochastic optical reconstruction microscopy’ [2], STED – ‘stimulated emission depletion’ [3], FRAP – ‘fluorescence recovery after photobleaching’ [4] sau ‘FLIP’ – ‘fluorescence loss in photobleaching’ [5]. Alte tehnici apelează la metode ce, tradițional, nu au fost utilizate în acest domeniu dar care, grație avansului tehnologic, permit investigarea cu precizie la nivel molecular, cum ar fi cristalografia la nivel de singură moleculă [6] sau microscopia electronică ultrarapidă (4D UEM) [7]. De asemenea, intervenția directă asupra sistemelor analizate a permis elucidarea unor detalii ale interacțiunilor intermoleculare la nanoscală, prin manipularea biomoleculelor utilizând metode optice (*‘optical tweezers’*) [8], magnetice (*‘magnetic tweezers’*) [9] sau prin microscopie de forță atomică (AFM) [10]. Aceste tehnici sunt utilizate pentru a măsura cuplul și tăria interacțiunilor la nivel de singură moleculă sau pentru a perturba sistemele moleculare și a observa răspunsul acestora. Metodele computaționale, cum ar fi simulările de dinamică moleculară [11], simulări atomistice [12] sau ‘coarse-grain’ [13], oferă o abordare complementară de a investiga mișcarea, interacțiunile și dinamica sistemelor moleculare.

## I. Importanța și motivația studiului tehniciilor de investigare a sistemelor moleculare la nanoscală

---

Tehnici de electrofiziologie moleculară, cum este tehnica ‘patch clamp’ utilizată în studiul canalelor ionice membranare individuale, sunt implementate cu succes pentru investigarea interacțiunilor la nivel de receptor [14] și, împreună cu tehnici optice (FRET), permit studierea modificărilor conformatiionale ale canalelor ionice în momentul legării ligandului [15]. Pe baza modificărilor de conductanță electrică induse ca urmare a unor interacțiuni moleculare reversibile dintre analiți de interes și nanopori proteici sau sintetici, au fost dezvoltate tehnici de detecție și analiză ce permit studiul moleculelor individuale de ADN în scopul sevențierii [16,17], a interacțiunilor proteinelor cu acizi nucleici [18], caracterizarea peptidelor și altor molecule biologice [19,20]. Resurse considerabile sunt investite continuu în scopul creșterii preciziei acestor tehnici și al extinderii domeniilor de aplicabilitate, în mare parte datorită implementării rapide și simple în practica experimentală dar și datorită potențialului de a se adresa cu succes noilor provocări existente la nivelul cercetării biomedicale de vîrf.

În cadrul acestei teze s-a propus utilizarea unei tehnici de electrofiziologie moleculară bazată pe nanoporul proteic de  $\alpha$ -hemolizină în trei studii distincte, în care au fost detectate și analizate trei clase diferite de sisteme moleculare, cu scopul de a evidenția versatilitatea și potențialul deosebit al metodei de a investiga cu pertinență procesele moleculare la nanoscală.

Într-o primă abordare, s-a umărit demonstrarea principală și dezvoltarea unui sistem de detecție a unor bacterii Gram-negative, concomitent cu utilizarea unei peptide antimicrobiene cationice ca agent biomolecular cu rol de discriminare a speciilor bacteriene studiate. În ciuda abordării constraintive de investigare a unor sisteme micrometrice prin intermediul unei tehnici nanoscopice, studiul urmărește să ofere o alternativă rapidă și simplă tehnicielor actuale de detecție și identificare, caracterizate de tempi mari de analiză, aparatură sensibilă și costisitoare și personal calificat [21]. Infecțiile bacteriene încă reprezintă o amenințare reală asupra sănătății și dezvoltării umane în anumite părți ale globului [22] iar apariția tot mai frecventă a unor tulpini noi de bacterii rezistente la antibiotice face ca prevenția, diagnosticul și tratarea infecțiilor bacteriene să constituie cerințe stringente ale societății contemporane [23].

Prin implementarea același principiu experimental bazat pe nanoporul de  $\alpha$ -hemolizină, al doilea studiu a presupus investigarea la nivel unimolecular a unor structuri dendrimerice de generație inferioară, PAMAM-G1, cu scopul de a evalua modificările conformatiionale suferite de acestea ca urmare a schimbărilor unor parametri caracteristici mediului, în contextul potențialului ridicat de utilizare a acestor molecule ca sisteme de transport și livrare a unor

## I. Importanța și motivația studiului tehniciilor de investigare a sistemelor moleculare la nanoscală

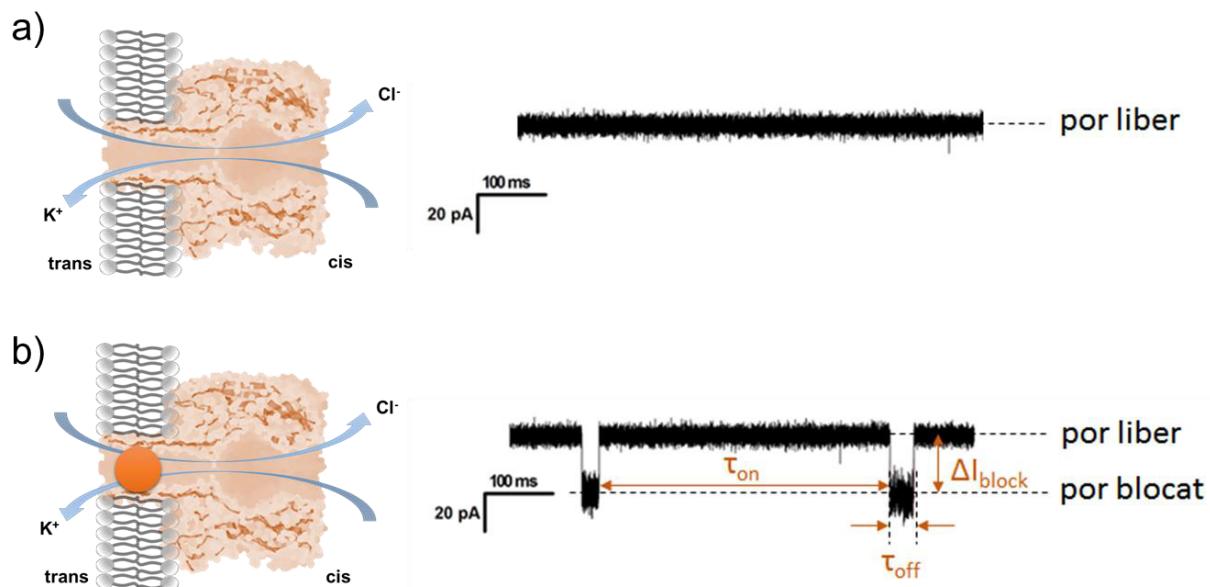
molecule biologic active. Rezultatele obținute au permis o evaluare cantitativă a acestor procese, cât și o înțelegere aprofundată a fenomenelor de transport în condiții de nano-confinare, utile în dezvoltarea unor tehnici de transport și eliberare controlată a unor molecule cu rol terapeutic [24].

Ultimul studiu a urmărit proiectarea unor secvențe de acizi nucleici artificiali (acizi peptido-nucleici – PNA) modificați chimic prin atașarea covalentă a unei peptide liniare cationice la unul dintre capete, în scopul detectării rapide și eficiente, la nivel de singură moleculă, a reacției de hibridizare cu o secvență de ADN mono-catenar complementară. Concomitent, s-a urmărit posibilitatea captării electroforetice a complecșilor PNA-DNA la nivelul nanoporului și desfacerea acestora sub acțiunea unui câmp electric extern, pentru a determina parametrii cinetici și energetici implicați în reacția de dehibridizare a lanțurilor dublu catenare de acizi nucleici. Obținerea acestor informații este utilă în dezvoltarea unor metode de identificare rapidă a secvențelor specifice de ADN caracteristice anumitor patologii, pentru transportul controlat de material genetic cu rol terapeutic sau pentru înțelegerea energiilor implicate în procesele de formare și denaturare ale duplexurilor de acizi nucleici.

## II. Principiile fizice ale detecției stocastice cu ajutorul nanoporilor

### II.1. Prezentarea generală a principiului de detecție și analiză

Într-o expunere sumară, detecția și analiza prin intermediul nanoporilor presupune într-o primă etapă înregistrarea curentului ionic la nivelul unui singur por, prin aplicarea unei diferențe de potențial de o parte și de alta a acestuia. Sub acțiunea câmpului electric rezultat, un analit încărcat electric (polimer, peptidă, ADN, nanoparticulă) este transportat la nivelul nanoporului. Interacțiunea analitului cu porul conduce la o reducere a intensității curentului ionic în momentul asocierii, respectiv la revenirea la valoarea inițială a acestuia în momentul disocierii. Atât timp cât molecula rezidă suficient de mult pentru a fi observată în fluctuațiile curentului ionic înregistrat, semnalul rezultat va reprezenta o succesiune de blocări și deblocări ale porului (Fig. II.1).



**Fig. II.1.** Reprezentare schematică a principiului de funcționare a unui detector stocastic bazat pe un nanopor proteic inserat într-o membrană lipidică planară. a) aplicarea unei diferențe de potențial transmembranare conduce la stabilirea unui curent ionic prin por de intensitate aproximativ constantă; b) inserarea unui analit duce la blocarea reversibilă a porului marcată în fluctuațiile de curent ionic înregistrat.

## II.1. Prezentarea generală a principiului de detecție și analiză

Datorită naturii stocastice a fenomenului de interacțiune, intervalul de timp dintre două blocaje succesive și durata evenimentelor individuale de blocaj diferă de la un blocaj la altul dar, din punct de vedere statistic, cele două variabile aleatoare prezintă o distribuție exponențială ce permite determinarea valorilor medii ale timpilor caracteristici interacțiunii. Astfel, determinarea timpului mediu dintre două evenimente de blocaj succesive ( $\tau_{on}$ ) permite calcularea concentrației analitului din soluție iar magnitudinea variației curentului în momentul blocării porului ( $\Delta I_{block}$ ) și timpul mediu de viață al blocajelor de curent ( $\tau_{off}$ ), ce constituie amprenta caracteristică analitului, fac posibilă identificarea și caracterizarea acestuia.

## **II.2. Conductanța unui por cilindric cu suprafața interioară neutră din punct de vedere electric**

În cadrul experimentelor de electrofiziologie, nanoporul reprezintă singura cale de transport a materiei (apă, ioni, molecule organice) printr-o membrană (biologică sau sintetică) ce separă două medii lichide. Din acest motiv, fenomenul de transport la nivelul unui singur nanopor devine critic pentru înțelegerea proceselor de blocaj induse de molecule studiate. Într-o descriere simplistă, transportul de ioni prin un nanopor cilindric neîncărcat, este descris pe baza teoriei Nernst-Planck ce, aplicată unei specii ionice  $i$ , descrie fluxul  $j_i$  ca fiind:

$$j_i = D_i \cdot c_i \cdot \frac{z_i \cdot F}{RT} \cdot E \quad (\text{II.1})$$

Unde  $D_i$ ,  $c_i$  și  $z_i$  reprezintă coeficientul de difuzie, concentrația și valența speciei ionice  $i$  ce se deplasează în câmpul electric  $E$  iar  $F$ ,  $R$  și  $T$  reprezintă constanta Faraday, constanta gazelor și temperatura absolută. Cum ionii rezultă în urma disocierii unei sări (NaCl, KCl), concentrația de ioni pozitivi va fi egală cu concentrația de ioni negativi  $c_+ = c_- = c$ . Densitatea de curent va fi dată de suma fluxurilor ionice individuale, ceea ce în cazul nostru devine:

$$J = e \cdot \sum_i z_i \cdot j_i = \frac{z_i^2 \cdot F^2}{RT} \cdot [D_+ + D_-] \cdot c \cdot E \quad (\text{II.2})$$

Notația explicită a conductivității soluției  $\sigma_s$  permite simplificarea relației (II.2):

$$J = \sigma_s \cdot E \quad (\text{II.3})$$

Câmpul electric  $E$  rezultă din aplicarea unei diferențe de potential  $\Delta V$  de o parte și de alta a membranei în care se află inserat nanoporul. Această cădere de tensiune se regăsește apoi distribuită neuniform la nivelul electrozilor ( $\Delta\Phi_{ele}$ ), la nivelul soluției ( $\Delta\Phi_{sol}$ ) și la nivelul nanoporului ( $\Delta\Phi_{por}$ ).

## II.2. Conductanța unui por cilindric cu suprafață interioară neutră din punct de vedere electric

---

$$\Delta V = \Delta\Phi_{ele} + \Delta\Phi_{sol} + \Delta\Phi_{por} \quad (\text{II.4})$$

Dacă considerăm căderile de tensiune pe celelalte componente ale circuitului ca fiind mult mai mici decât căderea la nivelul porului, putem scrie că  $\Delta V \approx \Delta\Phi_{por}$ . Prin urmare, pentru un por cilindric de lungime  $L$ :

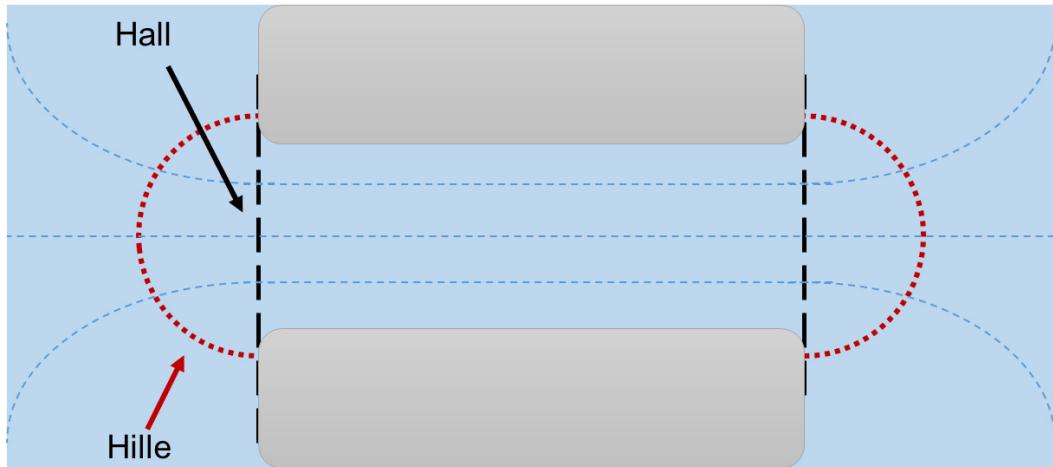
$$E = \frac{\Delta\Phi_{por}}{L} = \frac{\Delta V}{L} \quad (\text{II.5})$$

Din relația (II.3) și (II.5) rezultă curentul ionic total printr-un por cilindric de diametru  $d$ :

$$I = \sigma_s \cdot \Delta V \cdot \frac{\pi d^2}{4L} \quad (\text{II.6})$$

Iar conductanța porului, inversul rezistenței electrice, va fi:

$$G_{por} = \frac{I}{\Delta V} = \frac{\pi d^2}{4L} \cdot \frac{z_i^2 \cdot F^2}{RT} \cdot [D_+ + D_-] \cdot c = \frac{\pi d^2}{4L} \sigma_s \quad (\text{II.7})$$



**Fig. II.2.** Vizualizarea condițiilor în care se definește rezistența de acces a unui nanopor ca urmare efectelor de margine în cadrul modelelor Hille și Hall.

Tranziția liniilor de câmp din afara porului în interior produce o regiune de gradient ce induce apariția unei rezistențe de acces la nivelul ambelor deschideri. Aceste efecte sunt neglijabile pentru porii cu o lungime mult mai mare decât diametrul, dar notabile în cazul porilor scurți [25].

## II.2. Conductanța unui por cilindric cu suprafață interioară neutră din punct de vedere electric

Delimitarea regiunii în care este definită rezistența de acces face subiectul modelelor Hille și Hall de determinare a acestui parametru (Fig. II.2) [26,27]:

$$R_{acc}^{Hille} = \frac{1}{\sigma_s \pi d} \quad (\text{II.8})$$

$$R_{acc}^{Hall} = \frac{1}{\sigma_s d} \quad (\text{II.9})$$

Ambele modele sunt susținute de rezultate experimentale [28,29], astfel încât rezistența de acces poate fi inserată rezistenței porului, conducând la valoarea (modelul Hall):

$$R_{total} = R_{por} + R_{acc} = \frac{1}{\sigma_s} \left( \frac{4L}{\pi d^2} + \frac{1}{d} \right) \quad (\text{II.10})$$

### **II.3. Influența încărcării electrostatice a suprafeței interioare a nanoporului asupra conductanței**

În cazul nanoporilor proteici, resturile de aminoacizi distribuite pe suprafața interioară a porului pot conferi, în funcție de condițiile soluției electrolitice, o încărcare electrică ce va modifica conductanța porului. În aceste situații este necesară completarea formalismului anterior pentru o descriere mai precăsă.

O suprafață încărcată electric imersată într-o soluție electrofiziologică va acumula un strat de ioni de sarcină opusă la interfața mediu solid-lichid. Concomitent, agitația termică va tinde să omogenizeze poziția ionilor în soluție, ceea ce va duce la o distribuție complexă a sarcinilor electrice în vecinătatea suprafeței încărcate. Magnitudinea efectului va depinde de natura materialului imersat și a condițiilor solventului utilizat (tările ionică, pH, temperatură). În funcție de complexitatea ipotezelor utilizate au fost dezvoltate mai multe teorii (Helmholtz, Debye-Hückel, Gouy-Chapman-Stern, DLVO) ce permit descrierea mai mult sau mai puțin precăsă a distribuției ionice la nivelul stratului dublu electric. Indiferent de modelul matematic utilizat, ionii vor prezenta o distribuție neuniformă cu distanță față de suprafață încărcată, efecte descrise cu ajutorul lungimii Debye,  $\lambda_D$ , ce reprezintă distanța la care magnitudinea potențialului electric generat de sarcina superficială scade de  $e$  ori.

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_r \epsilon_0 k_B T}{2 N_A e^2 I}} \quad (\text{II.11})$$

Unde  $\epsilon_r, \epsilon_0$  – permisivitatea electrică relativă a soluției, respectiv a vidului,  $k_B$  – constanta Boltzmann,  $T$  – temperatura absolută,  $N_A$  – numărul lui Avogadro,  $e$  – sarcina electrică elementară și  $I$  – tările ionică (mol/m<sup>3</sup>).

În interiorul nanoporului, datorită distribuției neuniforme a ionilor, densitatea de sarcină pe suprafața interioară va afecta fluxul ionilor. Pentru o densitate de sarcină de suprafață  $\sigma_{supr}$ , sarcina totală neutralizată de ionii de semn opus va fi:

$$Q = \sigma_{supr} \cdot \pi \cdot d \cdot L \quad (\text{II.12})$$

## II.3. Influența încărcării electrostatice a suprafeței interioare nanoporului asupra conductanței

---

Concentrația molară din volumul intern al nanoporului va fi în acest caz:

$$c_{dl} = -\frac{4}{z_{dl}F} \cdot \frac{\sigma_{supr}}{d} \quad (\text{II.13})$$

Unde  $z_{dl}$  reprezintă valența speciei ionice de semn contrar, care pentru săruri monovalente (KCl) are valoarea absolută 1. Fluxul ionic asociat acestei concentrații ionice este:

$$j_{dl} = -4D_{dl} \cdot \frac{\sigma_{supr}}{d \cdot RT} \cdot E \quad (\text{II.14})$$

Densitatea de curent totală în această situație, considerând relațiile (II.1) și (II.14), calculată pe baza relației (II.2) va fi:

$$J = \frac{z_i^2 \cdot F^2}{RT} \cdot [D_+ + D_-] \cdot c \cdot E + z_{dl} \cdot F \cdot \left( -4D_{dl} \cdot \frac{\sigma_{supr}}{d \cdot RT} \cdot E \right) \quad (\text{II.15})$$

Astfel, pentru un por cilindric de diametru  $d$ , având suprafața interioară încărcată negativ ( $\sigma_{supr} < 0$ ), aflat într-o soluție monoivalentă, curentul ionic va fi:

$$I = \sigma_s \cdot \Delta V \cdot \frac{\pi d^2}{4L} + \pi \cdot \frac{d}{L} \cdot |\sigma_{supr}| \cdot u_i \cdot z_i \cdot e \cdot \Delta V \quad (\text{II.16})$$

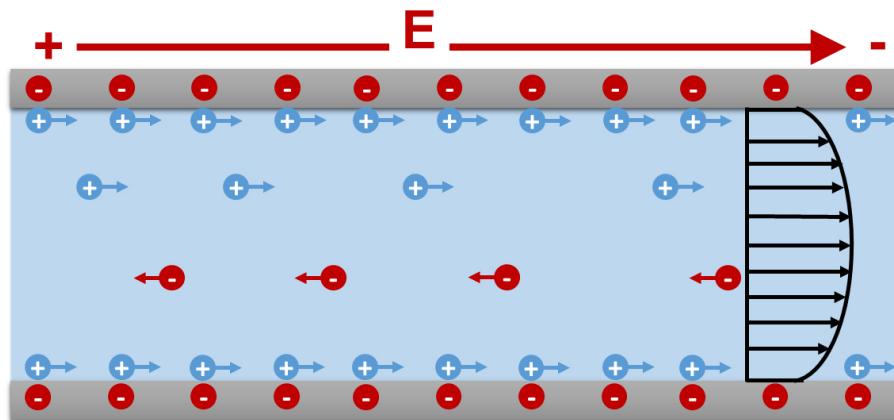
În aceste condiții, conductanța porului,  $G_{por}$ , este:

$$G_{por} = \frac{\pi d^2}{4L} \sigma_s + \pi \cdot \frac{d}{L} \cdot |\sigma_{supr}| \cdot u_i \cdot z_i \cdot e \quad (\text{II.17})$$

Relația (II.17) ține cont de contribuțiile soluției din volumul interior al porului (primul termen) dar și de efectele de suprafață (al doilea termen). Rezultate experimentale confirmă că pentru suprafețe puternic încărcate sau pentru pori cu diametru mic, efectele de suprafață devin semnificative, ducând la alterarea curentului prin por și la dezvoltarea unui dezechilibru între fluxurile de anioni și cationi [30]. Acest fenomen mai poartă denumirea de selectivitate ionică, proprietate foarte importantă în cadrul tehniciilor de analiză pe bază de nanopori.

## II.4. Electroosmoza datorată încărcării electrice a suprafeței interioare a nanoporului

Electroosmoza reprezintă fenomenul apariției unui transport net de apă printr-un por în urma aplicării unei diferențe de potențial, ca urmare a acumulării preferențiale a unei specii ionice la interfața dintre solvent și suprafață încărcată electric a porului. Datorită diferenței induse între concentrațiile celor două specii ionice la nivelul interfeței, mișcarea în câmp electric a ionilor împreună cu sferele lor de hidratare va da naștere unui flux net de lichid al căruia sens depinde de sensul câmpului electric aplicat și de natura sarcinii superficiale a suprafeței (Fig. II.3). Efectul devine din ce în ce mai semnificativ pe măsură ce diametrul porului scade. Astfel, în cazul nanoporilor ce prezintă selectivitate ionică, efectele electroosmozei devin importante.



**Fig. II.3.** Reprezentare schematică a fluxului electroosmotic printr-un por cu pereți încărcați negativ din punct de vedere electric, la aplicarea unui câmp electric. Ionii de semn opus contracarează sarcina superficială de la nivelul interfeței nanopor-soluție apoasă, ducând la creșterea concentrației speciei ionice respective față de concentrația volumică. Săgețile negre ilustrează profilul de viteză al ionilor pozitivi, ce variază cu distanța față de suprafață.

O descriere completă a fenomenului se poate face prin rezolvarea ecuației Navier-Stokes (II.18) dar soluții analitice exacte sunt posibile doar pentru modele geometrice simple [31].

$$\rho \left( \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + \vec{v} \cdot \nabla \vec{v} \right) = -\nabla p + \eta \nabla^2 \vec{u} + \vec{F} \quad (\text{II.18})$$

Unde  $\rho$  – densitatea,  $\vec{v}$  – vectorul viteză,  $p$  – presiunea,  $\eta$  – vâscozitatea lichidului și  $\vec{F} = \vec{E} \cdot \rho_E$  este forța electrică cu care acționează de câmpul electric  $\vec{E}$  asupra densității de sarcină  $\rho_E$ . Dacă se consideră că lichidul se deplasează cu viteza constantă, exclusiv pe direcția axei x, în absența diferențelor de presiune, se poate scrie relația:

$$0 = \eta \nabla^2 \vec{v} + \vec{E} \cdot \rho_E \quad (\text{II.19})$$

Pe baza ecuației Poisson  $\nabla^2 \Phi = -\rho_E / \epsilon$  putem scrie:

$$\epsilon \vec{E} \frac{d^2 \Phi}{dy^2} = \eta \frac{d^2 \vec{v}}{dy^2} \quad (\text{II.20})$$

Prin integrare, soluția ecuației (II.20) pentru viteza lichidului la suprafața peretelui ( $y = 0$ ), unde acționează potențialul  $\zeta$  al stratului dublu electric este:

$$\vec{v}_{in} = \frac{\epsilon \vec{E}}{\eta} (\Phi - \zeta) \quad (\text{II.21})$$

Departă de stratul dublu electric, forța electrică dispare, datorită absenței unei densități locale de sarcină (soluția electrolitică este neutră), ceea ce face ca soluția pentru viteza lichidului să fie:

$$\vec{v}_{out} = \frac{\epsilon \cdot \zeta}{\eta} \cdot \vec{E} \quad (\text{II.22})$$

Rezultate experimentale au dovedit că fluxul electroosmotic constituie o componentă majoră a proceselor de interacțiune dintre diferiți analiți (polimeri, peptide) și nanopori, având capacitatea de a încetini trecerea moleculelor prin por [32] sau de a facilita interacțiunea moleculă-por împotriva forței electroforetice [33]. Prin urmare, pentru proteine sau alte molecule încărcate, timpul și direcția de translocare vor depinde de combinația forțelor electroforetică și electroosmotică [34].

$$\vec{v}_{eff} = \frac{\epsilon}{\eta} (\zeta_{protein} + \zeta_{por}) \cdot \vec{E} \quad (\text{II.23})$$

## II.5. Transportul unei molecule încărcate din soluție la gura porului

Procesul de interacțiune a unei molecule încărcate electric (ADN, ARN, peptidă) cu un nanopor este influențat de câmpul electric slab, neuniform, a cărui linii de câmp se extind de la gura porului în volumul soluție. Moleculele încărcate aflate la distanța  $r$  față de por simt potențialul  $V(r)$  asociat acestui câmp. Pentru a determina valoarea lui  $V(r)$ , raportat la diferența de potențial aplicată,  $\Delta V$ , se va utiliza formalismul descris de Grosberg și Rabin [35] pornind de la potențialul electric la distanța  $r$  a unui electrod sferic de diametru  $d$ , plasat într-un mediu de conductivitate  $\sigma$ . Căderea de tensiune între două pături concentrice aflate la distanța  $r$  și  $r + dr$  este:

$$dV = -\frac{Idr}{4\pi r^2 \sigma} \quad (\text{II.24})$$

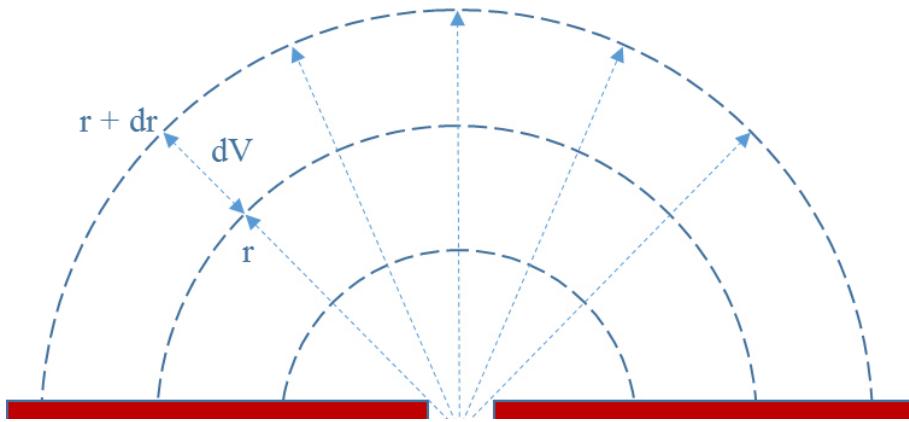
Unde termenul  $-dr/4\pi r^2 \sigma$  reprezintă rezistența electrică a unei pături sferice de grosime  $dr$  și  $I$  este curentul electric prin pătură. Astfel, putem scrie:

$$\frac{dV}{dr} = -\frac{I}{4\pi \sigma r^2} \quad (\text{II.25})$$

Prin integrare se obține soluția soluția:

$$V(r) = \frac{I}{4\pi \sigma r} + V_\infty \quad (\text{II.26})$$

$V_\infty$  reprezintă potențialul electric la infinit și are valoarea  $V_\infty = 0$ .



**Fig. II.4. Reprezentare schematică a potențialului  $dV$  între două pături semi-sferice de rază  $r$  și  $r+dr$ , în jurul unui por.**

Cum diferența de potențial  $\delta V$  aplicată între infinit și suprafața electrodului, aflată la distanța  $d/2$  de centrul electrodului, este:

$$\delta V = \frac{I}{2\pi\sigma d} \quad (\text{II.27})$$

Potențialul la distanța  $r$  devine:

$$V(r) = \frac{d}{2r} \delta V \quad (\text{II.28})$$

Întorcându-ne la cazul unui por inserat într-o membrană, “electrodul” reprezintă deschiderea circulară a porului dintr-o parte a membranei, ceea ce face ca valoarea curentului să fie doar jumătate din cea rezultată din relația (II.27) (Fig. II.4). După cum a fost descris în subcapitolul II.2, diferența de potențial  $\Delta V$  aplicată din exterior prezintă trei componente (relația II.4). Ignorând cădereea de potențial la nivelul electrozilor, și considerând regiunile de o parte și de alta a porului ca fiind simetrice ( $\Delta\Phi_{sol} = 2\delta V$ ), putem scrie că:

$$\Delta V = \Delta\Phi_{por} + 2\delta V \quad (\text{II.29})$$

Rezistența electrică a porului de lungime  $l$  și diametru  $d$  este  $4l/(\pi d^2\sigma)$ , ceea ce face c intensitatea curentului electric să fie egal cu:

$$I = \frac{\Delta V - 2\delta V}{4l} \pi d^2 \sigma \quad (\text{II.30})$$

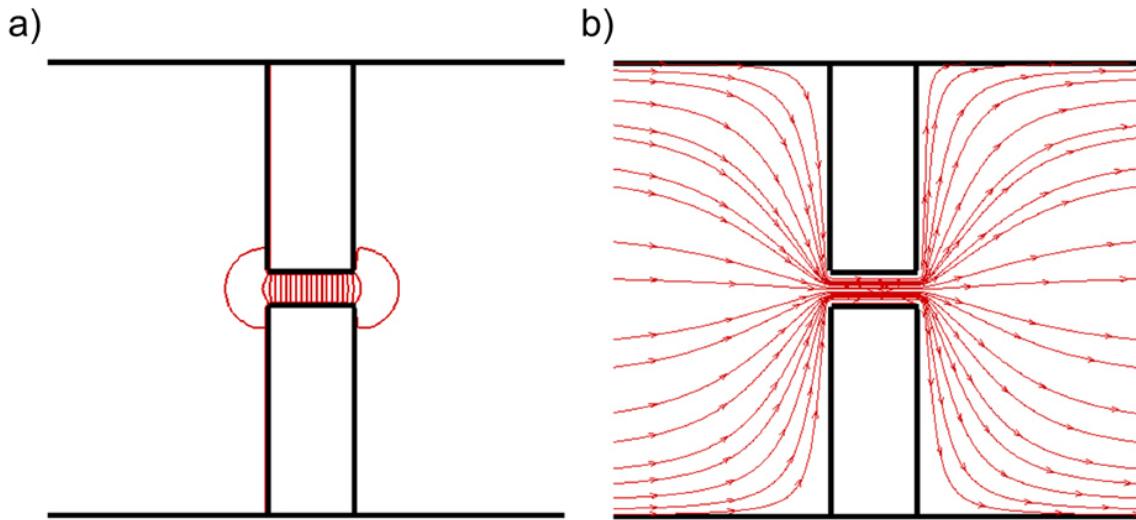
Înlocuind valoarea curentului cu cea rezultată din relația (II.27), dar redusă la jumătate, se obține:

$$\delta V = \frac{d/4l}{1 + d/2l} \Delta V \approx \frac{d}{4l} \Delta V \quad (\text{II.31})$$

Din relațiile (II.28) și (II.31) se obține valoarea potențialului la distanța  $r$  față de por:

$$V(r) = \frac{d^2}{8lr} \Delta V \quad (\text{II.32})$$

În condiții statice, diferența de potențial  $\delta V$  nu ar fi capabilă să transporte o moleculă încărcată, ecranată electrostatic, din soluție, la gura porului. În realitate însă, fenomenul are loc în condiții de non-echilibru iar particulele încărcate simt câmpul electric în soluție la distanțe mai mari de gura porului, ca urmare a curentului menținut din exterior [35] (Fig. II.5).



**Fig. II.5. Distribuția liniilor de echipotențial (a) și a liniilor de câmp electric (b) la nivelul unui nanopor ca urmare a aplicării unei diferențe de potențial. Distribuția a fost determinată prin găsirea soluțiilor ecuației Laplace [36].**

Procesul de captură a unei molecule de către por și realizarea interacțiunii sunt caracterizate de o rată de captură,  $R_c$ , ce reprezintă fracțiunea din moleculele ce se apropie de por care reușesc să ducă la blocarea curentului ionic înregistrat. Această mărime depinde de dimensiunile moleculei transportate, concentrația acesteia, geometria porului, tăria ionică, pH și diferența de potențial aplicată. La distanță mare față de por, molecula încărcată se supune difuziei libere în soluție și poate fi considerată un obiect punctiform, caracterizat prin coeficient de difuzie  $D$  și mobilitate electroforetică  $\mu$ . Pe măsură ce molecula se apropie de por, la distanța  $r^*$  (vezi subcapitolul următor) aceasta este captată ireversibil de câmpul electric și transportată electroforetic de-a lungul liniilor de câmp, la gura porului.

Pentru a înțelege transportul și ulteriora interacțiune a moleculelor cu porul, ca bază a detecției, se va considera mai întâi variația unidimensională a concentrației de molecule încărcate de-a lungul axei porului.

$$\frac{\partial c(x, t)}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial x} j(x, t) \quad (\text{II.33})$$

Unde  $j(x, t)$  este fluxul net de molecule la momentul  $t$  în punctul  $x$ .

$$j(x, t) = -D \frac{\partial c(x, t)}{\partial t} + c(x, t) \cdot v(x, t) \quad (\text{II.34})$$

$v(x, t)$  – viteza moleculelor la momentul  $t$  în punctul  $x$ . În absența gradienților de presiune viteza cuprinde componentele a două procese: acțiunea forței electroforetice  $\vec{F}_{elf}$  ce determină  $\vec{v}_E = \mu \vec{E}$  și acțiunea forței  $\vec{F}$  ca urmare a gradienților locali de energie libera (inclusiv frecarea hidrodinamică) [37].

$$v(x, t) = \mu E - \frac{D}{k_B T} \frac{\partial F(x)}{\partial x} \quad (\text{II.35})$$

Înlocuind relația (II.35) în relația (II.34) obținem pentru fluxul de molecule relația:

$$j(x, t) = -D \frac{\partial c}{\partial t} + c\mu E - c \frac{D}{k_B T} \frac{\partial F(x)}{\partial x} \quad (\text{II.36})$$

Prin reprezentarea explicită a potențialului electric  $V(x)$ , relația (II.36) devine:

$$j(x, t) = -D \frac{\partial c}{\partial t} - c\mu \frac{\partial V(x)}{\partial x} - c \frac{D}{k_B T} \frac{\partial F(x)}{\partial x} \quad (\text{II.37})$$

Cei trei termeni cumulează contribuțiile difuziei, driftului și a energiei libere ce contribuie la deplasarea moleculelor către gura porului. Rezolvarea ecuației Smoluchowskii (II.37) permite determinarea ratei de captură a moleculelor de către por, dacă se cunosc procesele dominante ale asocierii.

## II.6. Rata de captare a unei molecule prin prisma teoriei stării de tranziție

În condițiile în care interacțiunea dintre molecule și por este dominată strict de difuzie, ultimii doi termeni ai relației (II.37) devin neglijabili în comparație cu primul, ceea ce ar face ca rata de captare să fie [38]:

$$R_c^{dif} \sim D \cdot c \quad (\text{II.38})$$

În practică însă, moleculele pot fi considerate ca fiind supuse difuziei libere doar la distanță mare față de por, dincolo de rază  $r^*$  (Fig. II.6), unde potențialul  $V(r)$  poate fi neglijat. Cu alte cuvinte, raza  $r^*$  poate fi privită ca distanță de la care moleculele trec de la difuzie liberă la drift electroforetic. În aceste condiții rata de captare este dată de relația obținută de Smoluchowski [39]:

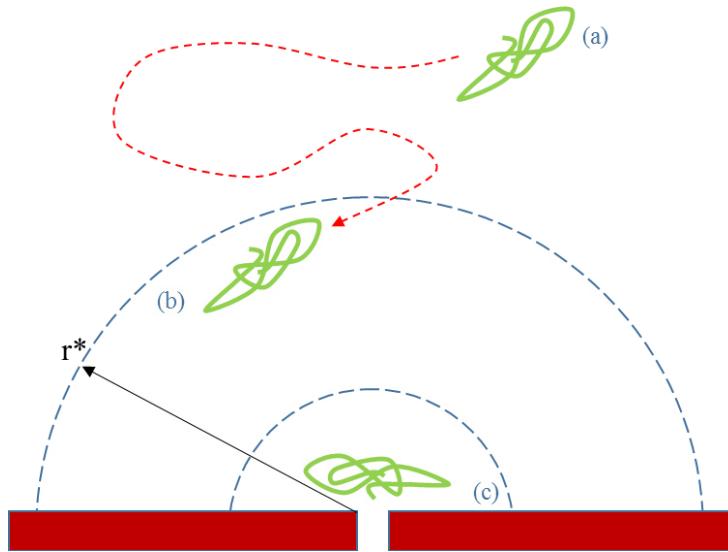
$$R_c^{dif} = 2\pi D r^* \quad (\text{II.39})$$

Potențialul la distanța  $r^*$  va fi  $V(r) = D/\mu$ , ceea ce ar face ca pe baza relațiilor (II.32) și (II.39) să putem scrie:

$$R_c^{dif} = \frac{\pi d^2 \mu}{4l} \Delta V \quad (\text{II.40})$$

Unde  $d$  este diametrul porului,  $\mu$  este mobilitatea electroforetică a moleculei,  $l$  este lungimea porului și  $\Delta V$  este diferența de potențial aplicată.

Aducerea moleculei la gura porului este necesară dar nu și suficientă pentru realizarea interacțiunii, acest proces fiind caracterizat printr-o barieră energetică. Această barieră poate fi de natură entropică, când moleculă își modifică conformația pentru a se orienta cu unul din capete către deschiderea porului sau când își reduce volumul pentru a partiționa în por [40], sau de natură entalpică, când există o repulsie de natură electrostatică între moleculă și deschiderea porului [41]. Pentru astfel de procese, captarea moleculelor de către por este dată de teoria Kramers a stării de tranziție.



**Fig. II.6.** Reprezentare schematică a nanoporului și a distanței  $r^*$  față de gura porului până la care deplasarea moleculei este dominată de difuzie (a); la distanța  $r < r^*$  molecula este ireversibil captată electroforetic (b) și adusă la gura porului unde interacțiunea și blocarea porului este posibilă (c).

În cadrul teoriei stării de tranziție ('transition state theory') reacția dintre analit și por necesită trecerea printr-o etapă intermediară  $X^\ddagger$ , numită complex activat sau stare de tranziție, aflată într-o stare de cvasi-echilibru cu reactanții.



Constanta de cvasi-echilibru între reactanți și complexul activat poate fi scrisă:

$$K^\ddagger = \frac{[X^\ddagger]}{[A][B]} \quad (\text{II.42})$$

Ceea ce înseamnă că:

$$[X^\ddagger] = K^\ddagger [A][B] \quad (\text{II.43})$$

Rata de reacție directă (în cazul nostru partaționarea moleculei în por) poate fi scrisă:

$$rate_{on} = \kappa \cdot v \cdot [X^\ddagger] = \kappa \cdot v \cdot K^\ddagger \cdot [A][B] \quad (\text{II.44})$$

Concomitent:

$$rate_{on} = k_{on} \cdot [A][B] \quad (\text{II.45})$$

Termenul  $v$  reprezintă frecvența de trecere peste bariera asociată complexului activat iar  $\kappa$  este un coeficient de transmisie. Din relațiile (II.44) și (II.45) rezultă:

$$k_{on} = \kappa \cdot v \cdot K^\ddagger \quad (\text{II.46})$$

Cum  $v = (k_B T)/h$ , unde  $h$  este constanta Plank iar  $k_B T$  sunt mărimi cunoscute, constanta de rată  $k_{on}$  va fi:

$$k_{on} = \kappa \cdot \frac{k_B T}{h} \cdot K^\ddagger \quad (\text{II.47})$$

$k_{on}$  are unitatea de măsură  $s^{-1} \cdot M^{1-m}$ , unde  $M$  – molaritatea (mol/L) iar  $m$  – molecularitatea, ce caracterizează ordinul reacției:  $m = 1$  pentru reacții unimoleculare,  $m = 2$  pentru reacții bimoleculare și  $m = 3$  pentru reacții trimoleculare.

Din punct de vedere termodinamic, teoria stării de tranziție poate fi exprimată prin relația:

$$\Delta G^\ddagger = -RT \ln K^\ddagger \quad (\text{II.48})$$

Rescrisă:

$$K^\ddagger = e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}} \quad (\text{II.49})$$

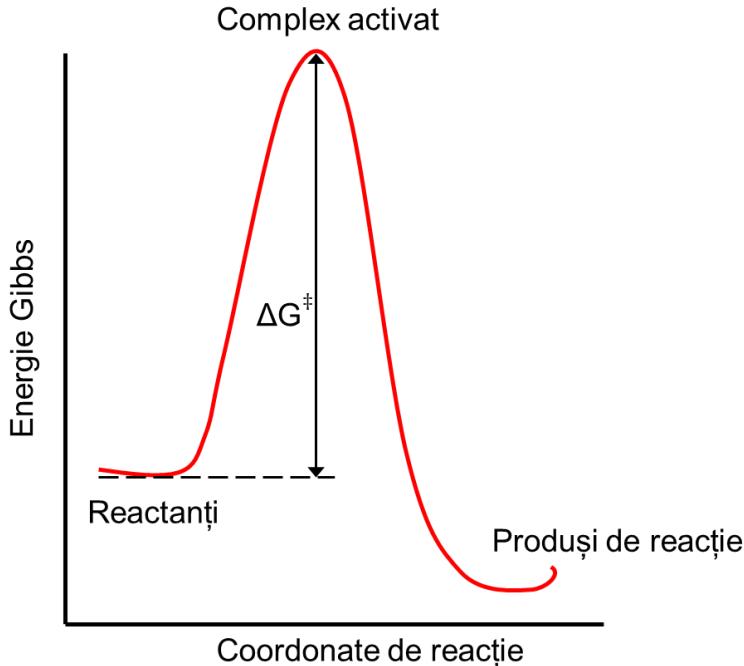
unde  $\Delta G^\ddagger$  reprezintă energia liberă de activare a complexului (Fig. II.7) iar  $R$  – constanta gazelui ideal.

Din relațiile (II.47) și (II.49) rezultă:

$$k_{on} = \kappa \cdot \frac{k_B T}{h} \cdot e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}} \quad (\text{II.50})$$

Pentru o descriere completă, știind că  $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$ , unde  $\Delta H^\ddagger$  - entalpia standard de activare și  $\Delta S^\ddagger$  - entropia standard de activare, putem scrie ecuației Eyring:

$$k_{on} = \kappa \cdot \frac{k_B T}{h} \cdot e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R}} \cdot e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}} \quad (\text{II.51})$$



**Fig. II.7. Reprezentarea schematică a profilului energetic în funcție de coordonatele de reacție, ce ilustrează energia liberă asociată stării de tranziție  $\Delta G^\ddagger$ .**

Astfel, realizarea interacțiunii dintre molecule și nanopor necesită depășirea energiei de activare  $\Delta G^\ddagger$ . Această barieră energetică este redusă de diferența de potențial aplicată, dat de termenul  $\Delta G_{el}^\ddagger = q_{eff}\Delta V$ , unde  $q_{eff}$  reprezintă sarcina electrică efectivă a moleculei [42]. Rata de asociere dintre o moleculă încărcată electric și nanopor, în condițiile unei bariere energetice devine:

$$k_{on} = R_c^{bar} = \kappa \cdot \frac{k_B T}{h} e^{\frac{q_{eff}\Delta V - \Delta G^\ddagger}{RT}} \quad (\text{II.52})$$

Relația (II.52) este mai des întâlnită sub forma unei relații van't Hoff – Arrhenius, unde  $A$  este un factor pre-exponențial:

$$k_{on} = A \cdot e^{\frac{q_{eff}\Delta V - \Delta G^\ddagger}{k_B T}} \quad (\text{II.53})$$

În urma formării complexului AB, molecula de interes rămâne asociată cu nanoporul pentru un interval de timp, după care disociază cu constanta de rată de disociere  $k_{off}$ .

Timpul dintre două evenimentele de blocaj succesive și durata blocajelor sunt mărimi stocastice (variabile aleatoare) astfel încât, momentul când o moleculă blochează sau părăsește porul este imposibil de precizat. Cu toate acestea, este posibilă determinarea distribuțiilor valorilor acestor variabile aleatoare, pe baza cărora putem determina funcția de densitate de probabilitate (*pdf*). Această funcție ne poate apoi oferi informații despre valoarea constantelor de rată  $k_{on}$  și  $k_{off}$ .

Pentru a descrie aceste tranziții se va apela la teoria Markov a proceselor stocastice, în care probabilitatea de tranziție depinde doar de starea actuală a sistemului (procese fără memorie). Pentru început vom considera probabilitatea ca la momentul  $t + \Delta t$  porul să fie blocat de o moleculă, știind că la momentul  $t$  sistemul este în aceeași stare:

$$p_C(t + \Delta t) = p_C(t) \cdot p_C(\Delta t) \quad (\text{II.54})$$

Probabilitatea ca un por blocat de o moleculă să efectueze o tranziție din starea închis (C) în starea deschis (O), într-un interval de timp  $\Delta t$  ( $\Delta t \rightarrow 0$ ), știind că la momentul  $t$  este închis, este:

$$P(C \rightarrow O; t + \Delta t | O, t) = k_{off} \cdot \Delta t \quad (\text{II.55})$$

Probabilitatea ca să nu efectueze o tranziție și să rămână în starea închis, în același interval de timp este:

$$\begin{aligned} P(C; t, t + \Delta t) &= 1 - P(C \rightarrow O; t + \Delta t | O, t) \\ P(C; t, t + \Delta t) &= 1 - k_{off} \cdot \Delta t \end{aligned} \quad (\text{II.56})$$

Putem rescrie acum relația (II.54):

$$p_C(t + \Delta t) = p_C(t) \cdot (1 - k_{off} \cdot \Delta t) \quad (\text{II.57})$$

$$\lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{p_C(t + \Delta t) - p_C(t)}{\Delta t} = -p_C(t) \cdot k_{off} \quad (\text{II.58})$$

$$\frac{d(p_C(t))}{p_C(t)} = -k_{off} dt \quad (\text{II.59})$$

Prin integrarea relației (II.59) de la 0 la  $t$ , știind că la  $t = 0$  porul este închis, rezultă soluția:

$$p_C(t) = e^{-k_{off}t} \quad (\text{II.60})$$

Probabilitatea ca porul să rămână în continuare în starea închis este dată de diferența până la unitate (certitudinea):

$$R_C(t) = 1 - e^{-k_{off}t} \quad (\text{II.61})$$

Prin derivarea relației (II.61) obținem funcția de densitate de probabilitate -  $pdf_C$ :

$$pdf_C = k_{off} \cdot e^{-k_{off}t} \quad (\text{II.62})$$

Pe baza  $pdf$ -ului se poate calcula valoarea medie a timpului de rezidență a moleculei în por, măsurabil experimental:

$$\bar{\tau}_{off} = \int_0^{\infty} t \cdot (pdf_C) dt = \int_0^{\infty} t \cdot (k_{off} \cdot e^{-k_{off} \cdot t}) dt = \frac{1}{k_{off}} \quad (\text{II.63})$$

Pentru procesul de asociere raționalamentul este similar, probabilitatea ca o moleculă să particioneze în por este dată de o funcție densitate de probabilitate (II.62), doar că în această situație valoarea medie a timpului dintre două evenimente de blocaj succesive este dependentă de concentrația moleculelor din soluție ( $1/\tau_{on} \propto [A]$ ) [43]. Reacția de asociere dintre molecule și

## II.6. Rata de captare a unei molecule prin prisma teoriei stării de tranziție

por este o reacție bimoleculară de forma (II.64), în care reactanții sunt analitul (A) și nanoporul (B) iar produsul de reacție este complexul analit-por.



Rata de asociere va fi:

$$rate_{on} = k_{on}[A][B] \quad (\text{II.65})$$

Cum rata de asociere depinde doar de concentrația de analit, deoarece la reacție participă un singur nanopor proteic, putem scrie:

$$rate_{on} = k_{on}[A] \quad (\text{II.66})$$

Valoarea medie a timpului dintre evenimentele de blocaj successive, fiind corelată cu rata de asociere  $rate_{on} = \frac{1}{\bar{\tau}_{on}}$ , putem scrie:

$$\bar{\tau}_{on} = \frac{1}{k_{on}[A]} \quad (\text{II.67})$$

## II.7. Modelul deBlois și Bean de blocare a curentului ionic ca urmare a translocării unei molecule prin por

Interacțiunea dintre analit și por are ca consecință modificarea conductanței porului și implicit a curentului ionic măsurat. Mai precis, partaționarea unei molecule în interiorul nanoporului duce la înlocuirea unui volum de lichid aproximativ egală cu volumul moleculei și la restricționarea accesului speciilor ionice. Acest fenomen reprezintă baza fundamentală a detectării stocastice cu ajutorul nanoporilor, reducerea curentului fiind proporțională cu dimensiunile moleculei. Sarcina analitului joacă de asemenea un rol în magnitudinea blocajului induc deoarece modifică profilul electrostatic al porului, fiind necesară considerarea efectelor electroosmotice, condensarea ionica și alte efecte electro-hidrodinamice [44].

Cu toate aceasta, vom recurge la un model simplu pentru a descrie dependența blocajului de curent de dimensiunile moleculei și pentru a ilustra fundamentele fizice ale procesului. În acest sens, modelul DeBlois și Bean permite determinarea variației rezistenței electrice a porului ca urmare a plasării unei sfere coloidale dielectrice în interiorul acestuia [45].

Rearanjarea relației (II.10) ne oferă o expresie pentru valoarea rezistenței electrice a unui por:

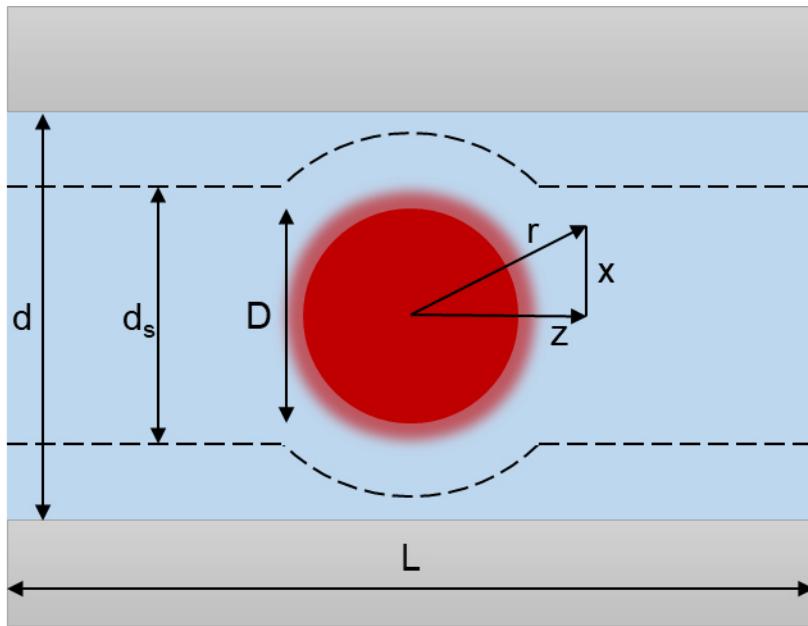
$$R_{por} = \frac{4(L + 0.8d)}{\sigma_s \pi d^2} \quad (\text{II.68})$$

Soluția generală a modelului descrie modificări induse de particule de dimensiuni variate, pornind de la soluția ecuației Laplace a potențialului electric în interiorul porului (Fig. II.8). Curentul ionic din interiorul porului prezintă o formă cilindrică ce suferă o deformare în vecinătatea particulei sferice, proporțională cu diametrul sferei. Modificarea rezistenței electrice a fost estimată ca:

$$\Delta R = R_{part} - R_{por} = \frac{4}{\sigma_s \pi d^2} \cdot \left[ 1 - \left( \frac{D}{d} \right)^3 \right]^{-1} \cdot \left[ \frac{D^3}{2L^2} + 2 \int_0^{L/2} \frac{D^3 dz}{(d_s^2 + 4z^2)^{3/2}} \right] \quad (\text{II.69})$$

## II.7. Modelul deBlois și Bean de blocare a curentului ionic ca urmare a translocării unei molecule prin por

În relația (II.69),  $\sigma_s$  – conductivitatea soluției,  $d$  – diametrul porului,  $D$  – diametrul sferei,  $L$  – lungimea porului,  $d_s$  – secțiunea fluxului de curent prin por și  $z$  – direcția de deplasare a particulei.



**Fig. II.8. Reprezentare schematică a unei particule sferice în interiorul unui nanopor ce duce la alterarea curentului ionic prin modificarea rezistenței electrice, conform relației (II.69).**

Acest model prezintă o descriere simplă a fenomenelor de blocaj dar este utilă pentru a înțelege într-o primă aproximatie legătura dintre reducerea intensității curentului înregistrat și dimensiunea moleculei inserate în por. Au fost dezvoltate modele pentru particule ce se abat de la simetria sferică, molecule ce își modifică dimensiunile în por [46] sau molecule încărcate electric, ce modifică suplimentar magnitudinea blocajului [44].

### **III. Materiale și metode utilizate în cadrul tehnicii de analiză cu ajutorul nanoporului de α-HL**

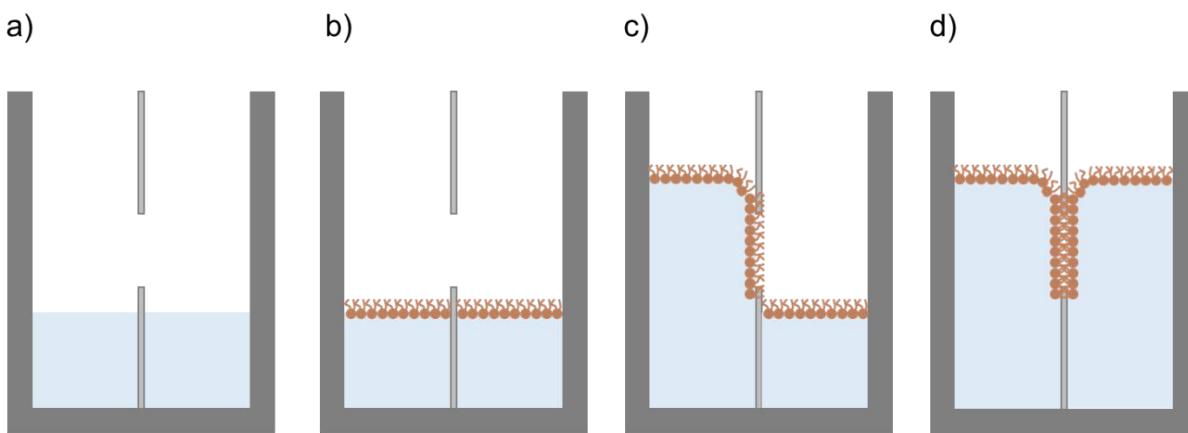
#### **III.1. Tehnica utilizată în experimentele de electrofiziologie pentru studiile la nivel de singură moleculă a interacțiunilor nanopor-analit**

Monitorizarea curentului ionic printr-un singur nanopor proteic prezintă dificultăți multiple atât în implementarea sistemului cât și în înregistrarea și prelucrarea semnalului. Realizarea unui suport fizic stabil pentru nanopor, care să nu afecteze proprietățile fizico-chimice ale porului dar nici ale analiștilor ce se doresc a fi investigați sunt primii pași în pregătirea unui sistem de detecție precis și eficient. În practică se poate utiliza un suport biologic pentru por, cum ar fi un bistrat lipidic artificial (BLM) sau bistraturi lipidice fixate pe suport solid (SLB), în care nanoporul dorit va fi ulterior inserat. Acestea reprezintă cele mai comune suporturi biologice deoarece deoarece sunt ușor de realizat, sunt fiabile și sunt funcționale chiar și la o variație mare a condițiilor experimentale. Pe de altă parte, aceste sisteme sunt fragile din punct de vedere mecanic și chimic, prezintă un timp de viață limitat iar înregistrarea semnalului prin aceste membrane poate fi afectată de zgomot electric. Nanopori pot fi creați sintetici prin tehnici micro- și nano-tehnologice [47,48]. Aceste structuri sunt caracterizate prin stabilitate mecanică foarte mare în timp, pe un platou mare al parametrilor experimentalni (temperatura, pH, tărie ionică) și pot fi mult mai ușor integrate în dispozitive de detecție mobile [49].

În cadrul experimentelor efectuate în această lucrare a fost utilizat un suport lipidic planar format la nivelul unei aperturi de ~100 μm diametru, realizate într-un film de Teflon. Filmul este plasat între două celule ale cuvei experimentale, formând o etanșare sigură prin utilizarea unei vaseline siliconice (Dow Corning), astfel încât apertura să constituie singura cale de acces între cele două celule. Bistratul lipidic este format după ce filmul a fost tratat cu o soluție hidrofobă de hexadecan dizolvat în pentan, utilizând tehnica Montal-Mueller (Fig. III.1) [50]. Fosfolipida folosită a fost DPhPC (di-fitanoil-fosfatidil colină), solubilizată în n-pentan, la o concentrație de 10 mg/mL. Din această soluție a fost adăugată o cantitate de ~4 μL în ambele cuve, peste soluția de sare (sarea utilizată a fost KCl la concentrația potrivită experimentului și ajustată la pH-ul dorit). Utilizarea KCl se datorează mobilităților ionice similare ale K<sup>+</sup> și Cl<sup>-</sup> ce împiedică apariția

### III.1. Tehnica utilizată în experimentele de electrofiziologie pentru studiile la nivel de singură moleculă a interacțiunilor nanopor-analit

unei dezechilibru în curentul ionic înregistrat. Formarea corespunzătoare a bistratului este semnalată de creșterea semnificativă a rezistenței și a capacității electrice măsurate în sistem.



**Fig. III.1. Reprezentare schematică a tehnicii Montal-Mueller de formare a bistraturilor lipidice planare:** a) soluția electrofiziologică este adăugată în ambele cuve ale celulei de înregistrare sub nivelul aperturii; b) lipidele sunt adăugate în ambele celule și după evaporarea pentanului, se organizează sub formă de monostrat la aer-lichid; c) și d) ridicare succesivă a nivelului de lichid din cuve duce la organizarea lipidelor sub formă de bistrom la nivelul aperturii.

În cuvă sunt inserați doi electrozi Ag/AgCl conectați la un amplificator, prin intermediul cărora este aplicată o diferență de potențial și este înregistrat curentul ionic rezultat. La nivelul electrozilor are loc tranziția uniformă a fluxului de electroni, din firul de cupru, în fluxul de ioni din soluție. Fluxul de electroni transformă AgCl în atomi de Ag și ioni de Cl<sup>-</sup>, ce sunt hidratați și transferați soluției iar în sens invers, atomii de Ag cedează un electron și se combină cu ionii de Cl<sup>-</sup> din soluție ducând la formarea de AgCl insolubilă la suprafața electrozilor (reacția II.70).



De reținut este faptul că electrozii Ag/AgCl funcționează corespunzător doar în soluții electrofiziologice ce conțin ioni de Cl<sup>-</sup> (NaCl, KCl). Suplimentar, datorită transferului de ioni între soluție și suprafața electrodului, curentul ionic poate duce la epuizarea AgCl, ceea ce ar duce la contactul direct al Ag pur cu mediul apăr. Ionii de Ag se pot scurge în soluție ducând la contaminarea mediului de lucru și la compromiterea rezultatelor experimentale [51]. Din acest motiv, electrozii Ag/AgCl trebuie curățați de sarea depusă după fiecare experiment și în mod frecvent reclorurați prin plasarea acestora în soluție diluată de hipoclorit de sodiu.

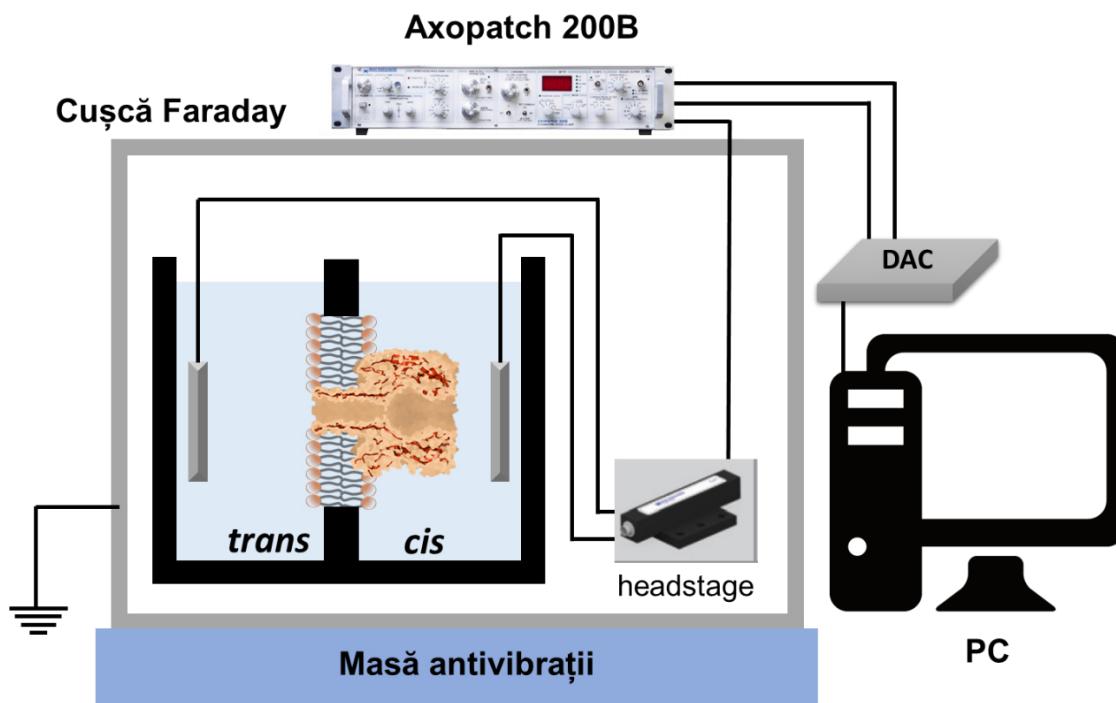


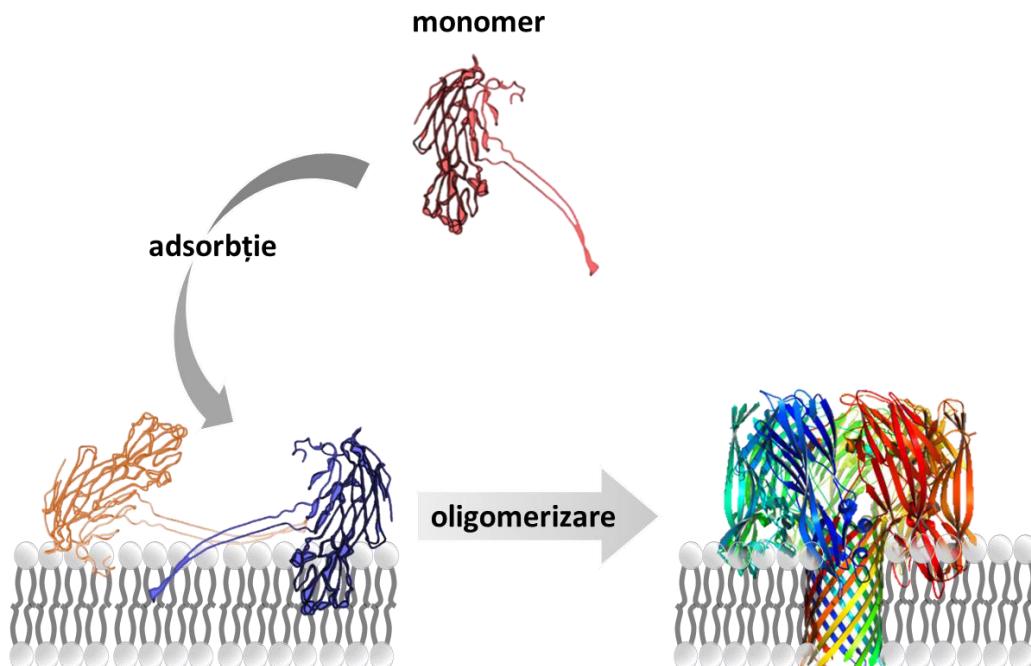
Fig. III.2. Reprezentare schematică a dispozitivului experimental utilizat pentru realizarea măsurătorilor de electrofiziologie la nivel de singură moleculă, prin nanoporul proteic de  $\alpha$ -HL.

Electrozi Ag/AgCl sunt conectați la un amplificator patch-clamp (AxoPatch 200 B) operat în modul ‘voltage-clamp’ ce permite păstrarea din exterior a unei diferențe de potențial fixe între cei doi electrozi (electrodul de comandă și electrodul conectat la masă), setate de operator (tensiune de comandă -  $V_{cmd}$ ). Măsurarea curentului ionic se face indirect, prin măsurarea căderii de potențial pe rezistorul de feed-back al amplificatorului, și apoi convertit în curent printr-o operație algebraică [52]. Semnalul electric preluat este apoi filtrat cu un filtre Bessel trece-jos, la o frecvență de 10 kHz. Filtrarea are scopul de a elimina semnalele nedorite și zgomotul din înregistrare.

Achiziția datelor a fost făcută prin digitizarea semnalului analogic cu ajutorul unei cartele de achiziție (DAC) cu o rezoluție de 16 biți (NI PCI 6014, National Instruments, Inc., USA) și reprezentată, într-o interfață grafică de comandă realizată în LabView (National Instruments, Inc., USA). Prelucrarea datelor a fost realizată cu ajutorul unui program specific Axon<sup>TM</sup> pClamp<sup>TM</sup> 10 (Molecular Devices, LLC, USA) iar analiza și reprezentările grafice au fost efectuate în programul Origin 6.0 (OriginLab Corporation, USA).

### **III.2. Caracteristicile nanoporului proteic de $\alpha$ -HL secretat de bacteria *Staphylococcus aureus***

$\alpha$ -hemolizina ( $\alpha$ -HL) este o toxină secretată de bacteria Gram-pozitivă *S. aureus* sub formă de monomeri, care prin auto-asamblarea acestora în structuri heptamerice la nivelul membranelor lipidice au proprietatea de a le liza, formând pori transmembranari. Proteina este toxică pentru o varietate mare de celule, cu precădere fiind afectate eritrocitele (de unde și originea numelui) unde acționează ca un mecanism de transformare a țesuturilor gazdă în surse de nutrienți pentru bacterie. Monomerii secretați sunt solubili în apă, având o masă moleculară de ~33 kDa, se adsorb la nivelul membranele celulelor țintă, și apoi prin oligomerizare, permează membrana, ducând la eliberarea materialului celular (Fig. III.2).

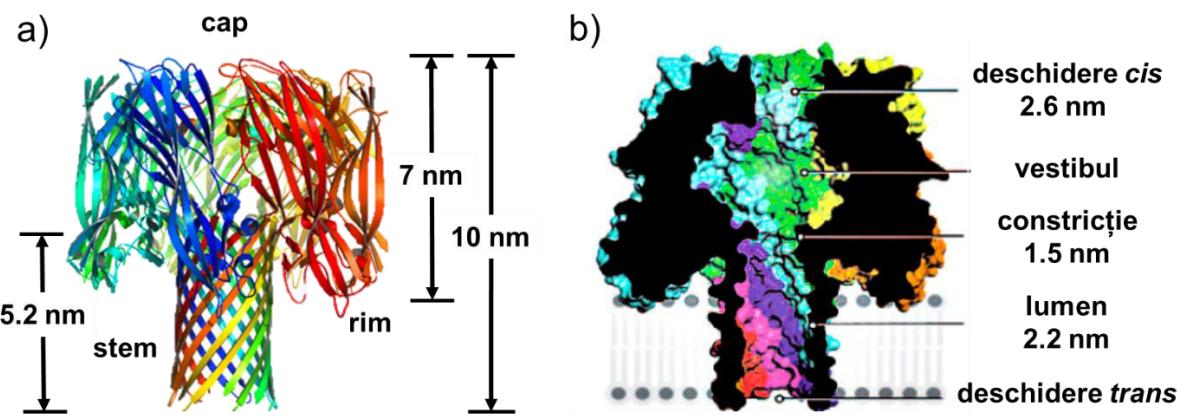


**Fig. III.2. Reprezentare schematică a procesului de adsorbție și oligomerizare a monomerilor de  $\alpha$ -HL la nivelul membranelor lipidice.**

Microscopia electronică [53,54] și ulterior cristalografia de raze X [55] a elucidat structura cristalină a nanoporului heptamic complet asamblat ceea ce a pus în evidență o lungime totală a nanoporului de ~10 nm și existența a trei regiuni distincte: (1) capul

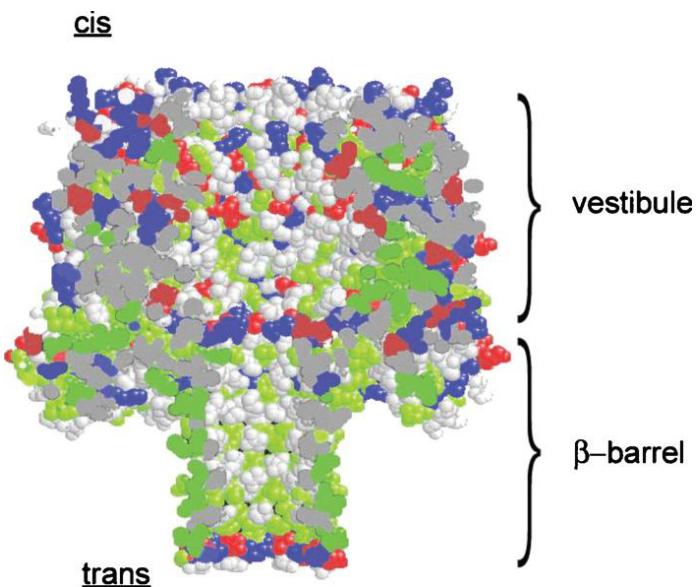
### III.2. Caracteristicile nanoporului proteic de $\alpha$ -HL secretat de bacteria *Staphylococcus aureus*

extramembranar ('cap'), expus mediului apos, (2) marginea capului ('rim') ce se află în contact cu suprafața exterioară a membranei celulare și (3) regiunea trans-membranară ('stem') cu structură de 'β-barrel' (Fig. III.3.a). Interiorul nanoporului prezintă în regiunea extramembranară o deschidere de ~2.6 nm, ce se continuă cu o nanocavitate, având diametrul maxim de ~3.6 nm, numit vestibul. Trecerea în regiunea transmembranară se face prin intermediul unei zone de conștricție cu diametrul de 1.5 nm, urmată de lumen, cu diametrul constant de 2.2 nm (Fig. III.3.b).



**Fig. III.3. (a)** Vedere laterală a proteinei heptamerice de  $\alpha$ -hemolizină, cu principalele domenii marcate și lungimea acestora. **b)** Secțiunea longitudinală prin nanoporul de  $\alpha$ -HL ce evidențiază regiunile cavității interne și diametrele corespunzătoare acestora [55].

Determinarea structurii primare a monomerilor de  $\alpha$ -HL și ulterior, a întregii proteine, a permis înțelegerea procesului de ancorare a porului în membranele lipidice și a proprietăților fizico-chimice, ce fac posibilă utilizarea și exploatarea acestuia în cadrul tehniciilor de analiză bazate pe nanopori proteici. După cum se poate observa în Fig. III.4, o serie de aminoacizi nepolari (verde) acoperă regiunea externă a domeniului transmembranar, ce fac posibilă stabilirea de legături hidrofobe cu cozile hidrocarbonate ale fosfolipidelor membranare. Aceste legături, alături de interacțiunile aminoacizilor polari și cationici cu capetele polare ale lipidelor, oferă stabilitate porului în membranele celulelor întă [55,56].



**Fig. III.4.** Secțiune prin porul  $\alpha$ -HL cu reprezentarea părților principale ale porului (vestibul și zona de  $\beta$ -barrel) cât și distribuția resturilor de aminoacizi la pH = 7.5: cationici (albastru), anionici (roșu), hidrofobi (verde) și hidrofili (gri) [41].

Profilul electrostatic al cavității interioare (datorat resturilor de aminoacizi încărcați electric) conferă porului o selectivitate anionică, ce se menține inclusiv la concentrații mari de sare (4 M KCl) [57,58]. Aplicarea unei diferențe de potențial de 100 mV, prin por, la o concentrație de sare de 1 M KCl, duce la stabilirea unui curent prin por de ~100 pA. Curentul crește liniar cu creșterea diferenței de potențial, ceea ce conferă porului o conductanță de ~1 nS la 22°C [59,60]. Atât selectivitatea cât și conductanța porului sunt sensibile la modificarea pH-ului sau a concentrației de sare, datorită modificărilor aduse gradului de încărcare electrică a aminoacidilor din structura  $\alpha$ -HL [61,62]. Cu toate acestea structura porului poate rămâne stabilă din punct de vedere funcțional la temperaturi apropiate de 100°C și într-un domeniu larg de pH-uri (pH = 2 ÷ 12) [63].

Toate aceste proprietăți fac  $\alpha$ -HL să fie nanoporul de referință în cadrul tehnicilor de analiză stocastică la nivel de singură moleculă. Nanoporul de  $\alpha$ -HL a fost utilizat cu succes la identificarea și caracterizarea lanțurilor de ADN și ARN [16,64], a peptidelor [65], la detectarea ionilor metalici [66] și caracterizarea modificărilor induse în structura unor molecule organice [44,67].

### III.3. Monitorizarea hibridizării acizilor nucleici prin spectrofotometrie UV

Una dintre cele mai comune metode de detectare și cuantificare a acizilor nucleici utilizează analiza spectrofotometrică, aceasta fiind o metodă nedistructivă, ce permite reutilizarea probei pentru analize ulterioare. Acizii nucleici absorb lumina din domeniul UV la ~260 nm, scăderea intensității fasciculului fiind măsurabilă cu ajutorul unui fotodetector. Această metodă permite determinarea concentrației de acizi nucleici dintr-o probă [68], a puritatei unei probe de acizi nucleici [69], gradul de denaturare și prin extensie gradul de hibridizare [70,71].

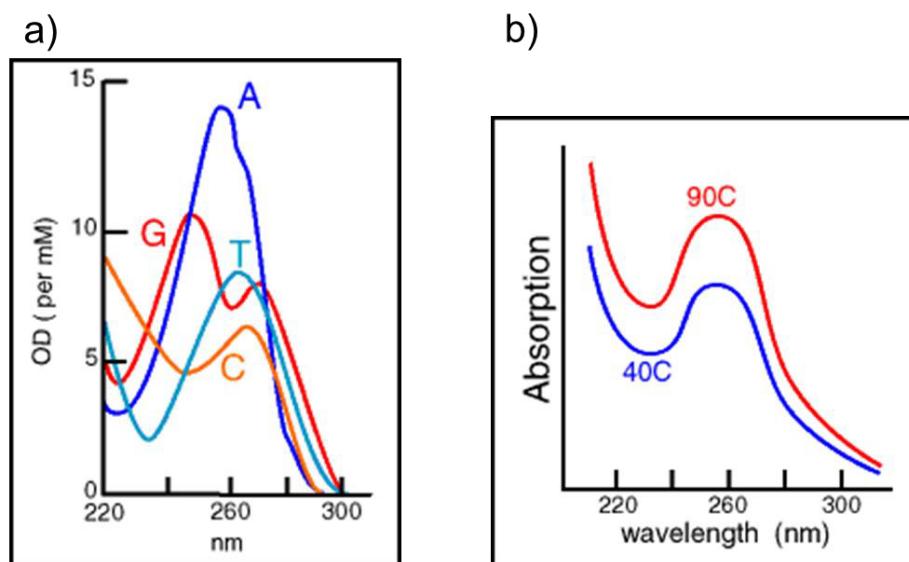


Fig. III.3. a) Reprezentarea schematică a densității optice (OD) a diferitelor baze azotate (adenozină – A cu albastru, guanină – G cu roșu, timină – T cu albastru deschis și citozina – C cu portocaliu) ce determină spectrul caracteristic al ADN-ului; b) Creșterea absorbanței la 260 nm, ca urmare a creșterii temperaturii ce determină denaturarea ADN-ului [72].

Responsabili pentru absorbanță (densitatea optică – OD) a acizilor nucleici sunt inele aromatice ale bazelor purinice și pirimidinice, ce prezintă o lungime maximă de absorbție între 250 nm și 280 nm [73]. Hibridizarea lanțurilor complementare de acizi nucleici determină scăderea absorbanței, datorită suprapunerii legăturilor  $\pi$  ('pi stacking'), proces numit hipocromicitate. Efectul invers (hipercromicitatea) se observă la creșterea temperaturii, dincolo de temperatura de topire  $T_m$  a lanțurilor, proces ce determină expunerea inelelor aromatice și absorbția luminii UV [74]. Spectrul de absorbanță a acizilor nucleici reprezintă spectrul mediat, rezultat din cumularea absorbanței tuturor bazelor azotate în domeniul 256 - 281 nm (Fig. III.3.a)

### III.3. Monitorizarea hibridizării acizilor nucleici prin spectrofotometrie UV

În cadrul analizei experimentale a fost utilizat un spectrofotometru NanoDrop<sup>TM</sup> Microvolume UV-Vis (ThermoFisher Scientific, USA), ce utilizează volume mici (1-2 µL) de soluție. Sursa UV este o lampă cu Xenon, fasciculul fiind ghidat prin intermediul unei fibre optice până la probă și de la probă la detector. Prințipiu de detecție și analiză presupune mai întâi trecerea unui fascicul UV, prin soluția utilizată la solubilizarea acizilor nucleici, pentru realizarea spectrului de absorbție a fondului (blanking) iar apoi urmează adăugarea soluțiilor de acizi nucleici destinate analizei și înregistrarea spectrului eferent, scăderea blank-ului făcându-se automat. Spectrele au fost înregistrate și apoi exportate utilizând memoria flash incorporată și ulterior prelucrate în programul Origin 6.0 (OriginLab Corporation, USA).

## IV. Detalii structurale și funcționale ale membranelor bacteriene Gram-negative și interacțiunea acestora cu peptide citotoxice

### IV.1. Caracteristicile membranelor bacteriene Gram-negative

Bacteriile Gram-negative sunt bacteriile ce nu rețin culoarea violet în urma colorației Gram, datorită absenței în structura peretelui celular extern a moleculelor de peptidoglicani. Acest procedeu, deși simplu, permite diferențierea pe baza proprietăților chimice și fizice diferite ale membranei și reprezintă primul pas în procesul de identificare a organismelor bacteriene. Printre speciile bacteriene Gram-negative se numără organismul model *Escherichia coli* dar și specii patogene ca *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia trachomatis* sau *Helicobacter pylori*.

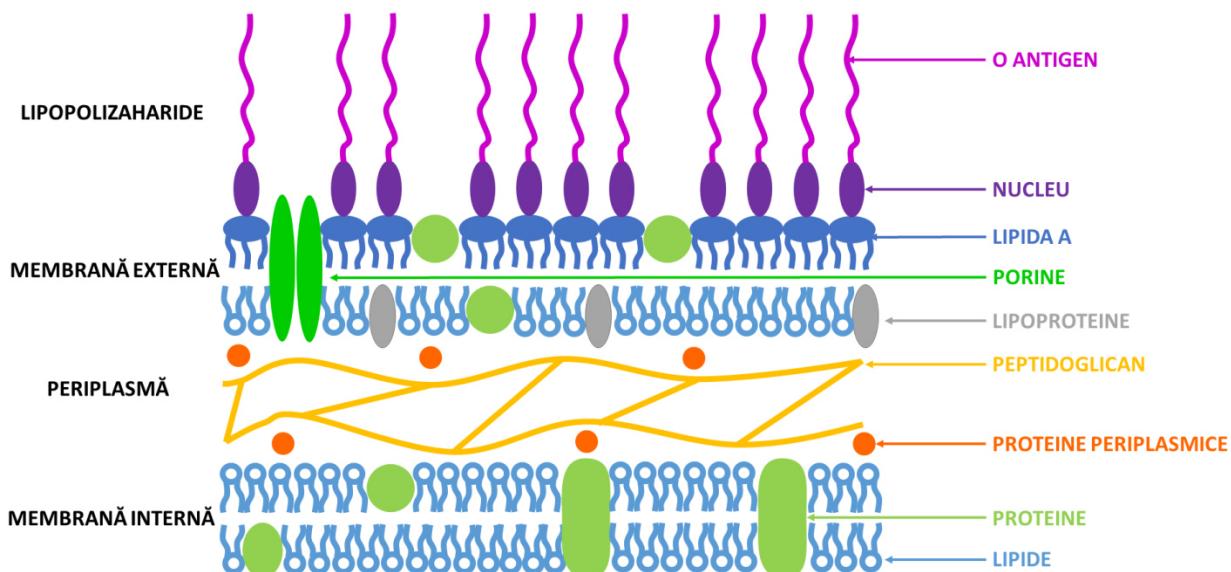
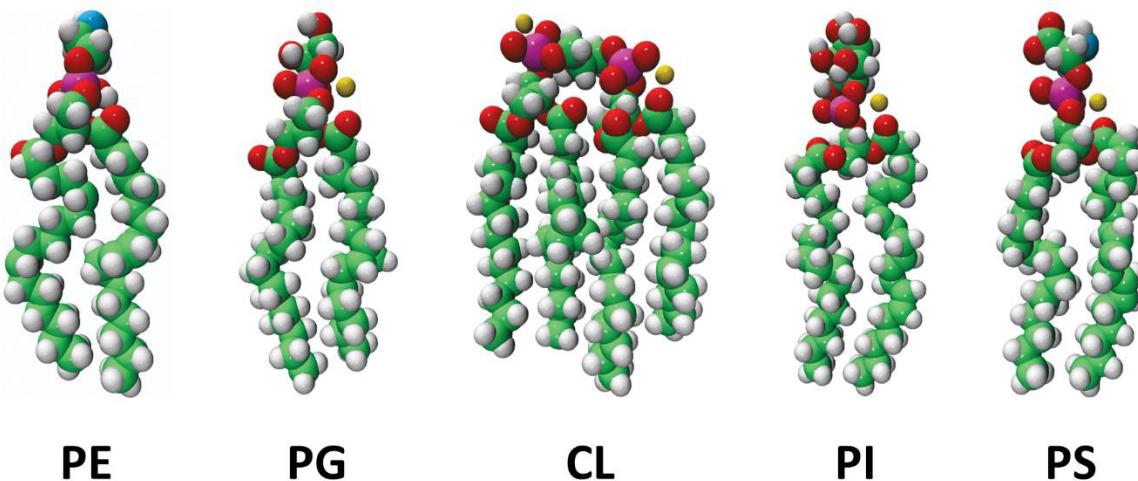


Fig. IV.1. Reprezentare schematică în secțiune a peretelui celular bacterian Gram-negativ ce evidențiază principalele regiuni de interes și compoziția acestora [75].

Structural, peretele bacteriilor Gram-negative este format din două membrane celulare separate de mediul periplasmic. Membrana internă, separă mediul citoplasmatic de părțile

### III.3. Caracteristicile membranelor bacteriene Gram-negative

externe ale peretelui bacterian având o structură simetrică de bistrat lipidic în care sunt inserate proteine membranare specifice. Fosfolipidele implicate în formarea peretelui bacterian intern au caracter amfifatic, fiind alcătuite din două cozi hidrocarbonate, o grupă fosfat și un cap polar variabil. Exemple de fosfolipide ce intră în alcătuirea membranelor bacteriene sunt fosfatidiletilamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), cardiolipin (CL), fosfatidilinositol (PI) și fosfatidilserina (PS) alături de alte lipide ce asigură forma și stabilitate membranei interne (Fig. IV.2) [76,77]. Compoziția precisă și abundența fiecărei lipide diferă între specii fiind totodată și o consecință a medului în care sunt cultivate. *E. coli* prezintă în compoziția membranei preponderent PE (~57%), PG (~15%) și CL (~10%) [78], pe când *P. aeruginosa*, prezintă în componență PG, PE, PC, CL, OL și APG [79–81].

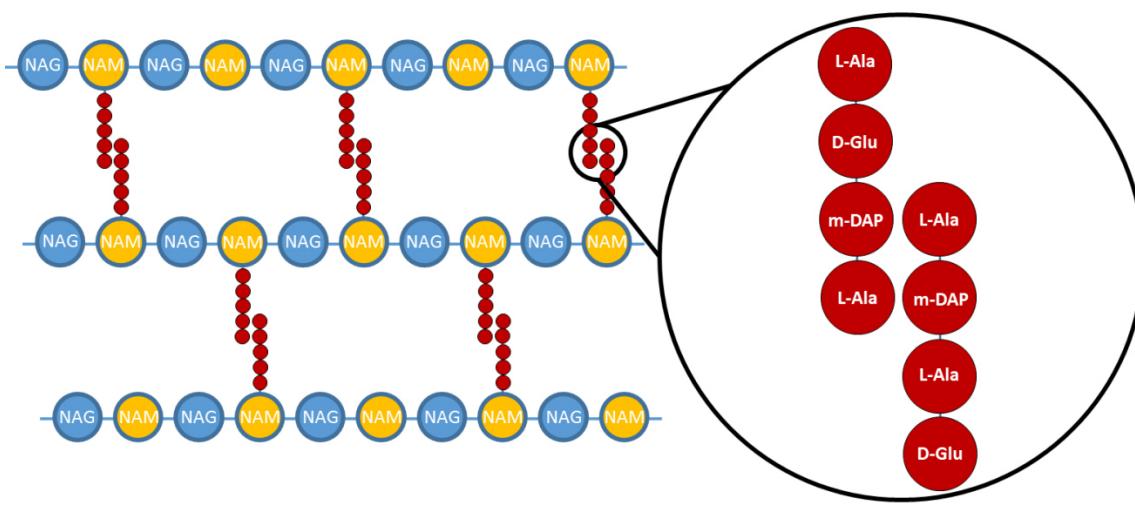


**Fig. IV.2. Principalele fosfolipide ce intră în alcătuirea membranelor bacteriene: fosfatidiletilamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), cardiolipin (CL), fosfatidilinositol (PI) și fosfatidilserina (PS) [82].**

În cazul celulelor eucariote, procesele energetice și de sinteză sunt realizate de structuri specifice numite organele, structuri ce lipsesc celulelor procariote dar ce sunt realizate de proteine cu structuri secundare de  $\alpha$ -helix inserate în membrana citoplasmatică, lipoproteine și proteine periferice solubile atașate. Acestea sunt implicate în procesul de respirație celulară și generarea energetică, diviziune, sinteza lipidelor și secreția proteinelor destinate mediului periplasmic sau membranei externe [83–85].

### III.3. Caracteristicile membranelor bacteriene Gram-negative

Mediul periplasmic separă membrana internă bacteriană de cea externă, având o viscozitate mai mare decât a mediului citoplasmatic [86]. Peptidoglicanii ce traversează mediul periplasmic sunt polimeri liniari formați din N-acetil-glucozamin și N-acetil-acid muramic, interconectați prin intermediul unor peptide scurte formate din 4-5 aminoacizi: L-alanine, D-glutamine, L-lysine, D-alanine [87]. Această structură interconectată este caracterizată de o rigiditate crescută, ce se opune presiunii osmotice a citoplasmei și asigură integritatea peretelui celular și forma celulei bacteriene [88].



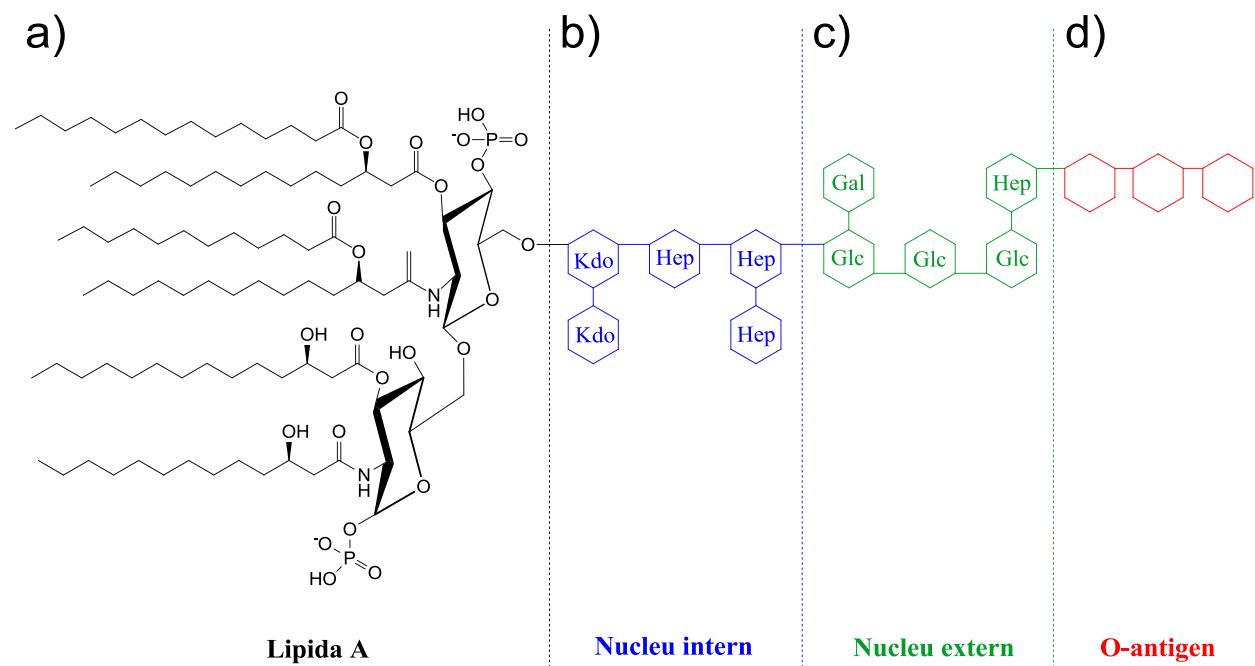
**Fig. IV.3. Reprezentare schematică a matricei de peptidoglicani din interiorul periplasmei bacteriilor Gram-negative. Cu albastru sunt reprezentate moleculele N-acetil-glucozamin (NAG), cu galben moleculele de N-acetil-acid muramic (NAM) și cu roșu punctile de oligopeptide.**

Alături de matricea de peptidoglicani, mediul periplasmic conține o multitudine de proteine cu rol în transportul amino acizilor, vitaminelor și ionilor către citoplasmă sau cu rol enzimatic (proteaze, nucleaze, fosfataze sau beta-lactamaze [89]). O clasă aparte de proteine prezente în mediul periplasmic sunt proteinele ‘chaperone’ ce asistă procesul de împachetare al proteinelor recent sintetizate, împiedicând formarea unor structuri eronate, lipsite de funcție [90].

Învelind mediul periplasmic este membrana externă bacteriană ce, spre deosebire de membrane internă, nu prezintă o structură simetrică, ea fiind formată la interior din glicofosfolipide iar la exterior din lipopolizaharide (LPS). Lipopolizaharidele, numite și endotoxine, joacă un rol important în patogeneză, fiind responsabile pentru aderarea bacteriilor la suprafețe, proliferare și rezistența acestora la acțiunea sistemului imunitar al organismului gazdă.

### III.3. Caracteristicile membranelor bacteriene Gram-negative

În urma multiplicării sau distrugerii bacteriilor, LPS pot fi eliberate și transportate în alte regiuni ale organismului infectat, acționând ca toxine, ce inițiază un răspuns inflamator [91,92]. În funcție de concentrația acestora, lipopolizaharidele pot produce șoc septic [93] și ulterior moartea organismului, motiv pentru care chiar și bacteriile neviabile pot fi toxice.



**Fig. IV.4. Structura generală a lipopolizahardelor cu principalele regiuni de interes: a) lipida A, b) nucleul intern, c) nucleul extern și d) O-antigenul.**

Structura lipopolizahardelor este relativ comună tuturor speciilor bacteriene Gram-negative, având trei regiuni: lipida A, nucleul și O-antigenul (Fig. IV.4). Fiecare din aceste regiuni prezintă o structură și funcție specifică în cadrul lipopolizaharidei și a întregii bacterii. Lipida A este regiunea ce ancorează întreaga structură în peretele bacterian extern, prin legături non-specificice cu alte lipide A și cu capetele hidrofobe ale fosfolipidelor, dispuse în partea internă a membranei. Compoziția acestei lipide se regăsește, cu mici variații, la toate speciile bacteriene, modificări putând să apară la lungimea și numărul de cozi hidrofobe, la tipul de hexosamine prezente, absența grupărilor fosfat [94] ori înlocuirea acestora cu alte grupări funcționale (Ex: acid galacturonic) [95]. Luând ca model *E. coli*, lipida A este formată din două inele glucozamin legate 1→4, primul fiind fosforilat în poziția 4 iar al doilea în poziția 1. Carbonii 2 și 3 ale fiecărei monozaharide sunt acilați cu o catenă primară de 14 atomi de carbon care apoi, în cazul

### III.3. Caracteristicile membranelor bacteriene Gram-negative

primei monozaharide, se extinde cu o catena secundara formată tot din 14 atomi de carbon [96]. Prezența grupărilor fosfat conferă lipidei A o sarcină electrică negativă, ce este corelată cu o toxicitate crescută a LPS [97], lipida A fiind responsabilă de provocarea răspunsului inflamator [98].

Nucleul este legat de lipida A la una din monozaharide, fiind formată din 10 până la 15 zaharide, cu o regiune internă formată din KDO (keto-deoxioctulosonat) și heptoze, și o regiune externă formată din D-glucoză, D-manoză, D-galactoză sau derivate ale acestora [99]. Dimensiunea și compoziția acestei regiuni poate afecta dezvoltarea bacteriei, proprietățile de aderare la suprafață, permeabilitatea membranei și sensibilitatea la antibiotice [100].

Ultima regiune este O-antigenul, o polizaharidă formată din unități repetitive bine definite pornind de la una până la 8 monozaharide, ce se extinde din nucleu. Numărul de monozaharide, diversitatea și disponerea liniară sau ramificată a acestora au determinat varietatea și unicitatea O-antigenilor existenți, această structură fiind specifică fiecărui serotip bacterian [101]. Această polizaharidă joacă un rol important în patogeneză, fiind responsabilă cu adeziunea bacteriei de țesuturi, favorizând astfel colonizarea și proliferarea [102]. Adeziunea este favorizată atât de caracterului hidrofob al O-antigenului cât și de prezența grupărilor anionice în structura monozaharidelor [103]. Un alt rol important al O-antigenului este capacitatea acestuia de a proteja bacteria împotriva acțiunii antibioticelor și a răspunsului imun al organismului gazdă. Spre deosebire de lipida A, O-antigenul este non-toxic dar este recunoscut de sistemul imunitar, prin intermediul anticorpilor și a sistemului complement [104]. Bacterii a căror O-antigen lipsește sau este scurtat sunt mai susceptibile acțiunii antibioticelor și peptidelor antimicrobiene și mai ușor de eliminat de către sistemul imunitar [105]. O-antigenul poate în anumite situații să ecraneze bacteria de sistemul imunitar al organismului gazdă prin procesul de mimetism molecular, atunci când acesta este suficient de similar cu antigenul gazdă [106].

Proteinele specifice membranei externe sunt proteine transmembranare  $\beta$ -barrel și lipoproteine atașate păturii interne, ce intră în contact cu mediul periplasmic. Porinele, cum ar fi OmpA, OmpC, OmpF, mediază transportul transmembranar al nutrienților, prin difuzie pasivă, iar lipoproteinele sunt implicate în transportul de oligopeptide [107,108].

Din analiza sumară a structurii membranei bacteriene Gram-negative externe rezultă că aceasta este caracterizată de o sarcină electrică negativă în majoritatea condițiilor fiziologice.

### III.3. Caracteristicile membranelor bacteriene Gram-negative

Responsabile pentru caracterul electronegativ sunt grupările fosfat, localizat la nivelul lipidei A și a nucleului și grupările ionizabile de la nivelul O-antigenului (carboxil). Măsurători electroforetice efectuate pe culturi bacteriene au demonstrat abilitatea acestora de a se deplasa în câmp electric, având mobilități electroforetice de  $-1,150 \times 10^{-4}$  –  $-0,839 \times 10^{-4}$   $\text{cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$  pentru *E. coli* și  $-0,970 \times 10^{-4}$   $\text{cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$  pentru *P.aeruginosa* [109].

## IV.2. Acțiunea peptidelor antimicrobiene asupra membranelor bacteriene

Peptidele antimicrobiene sunt molecule secrete în urma infecție cu agenți patogeni, ca parte a sistemului imunitar al organismelor vii. Această clasă de antibiotice manifestă activitate împotriva unei game largi de agenți patogeni cum ar fi bacterii Gram-negative și Gram-pozitive, fungi, paraziți și virusuri. În prezent peste 200 de peptide au fost catalogate și majoritatea sunt caracterizate printr-o structură primară formată din cel puțin 10 aminoacizi, dintre care cel puțin doi sunt încărcați pozitiv și un procent ridicat sunt aminoacizi hidrofobi. Caracterul cationic și hidrofob facilitează atracția și inserția peptidelor în membrane anionice, perturbând integritatea acestora și ducând ulterior la distrugerea bacteriilor.

Modelele dominante de acțiune ale peptidelor antimicrobiene împotriva membranelor organismelor patogene sunt prin formarea de pori sau prin „carpetarea” membranei, cu scopul final de a permite difuzia elementelor intracelulare în exterior, perturbând buna funcționare și provocând moartea celulei. În ambele situații interacțiunea începe prin atracția electrostatică a peptidei și absorbția acesteia la nivelul membranei, datorită elementelor hidrofobe din structura peptidei. Odată atinsă o concentrație critică de peptide la nivelul bistratului, acestea vor forma pori transmembranari. Peptidele sub formă de  $\alpha$ -helix străbat membrana bacteriană, cu regiunea hidrofobă orientată către cozile hidrocarbonate ale lipidelor iar regiunea internă formează un canal apus (Fig. IV.5.a). Prinț-un alt proces peptidele determină curbarea bistratului și unirea celor două monostraturi lipidice, interiorul porului fiind format atât din peptide cât și din capetele polare ale fosfolipidelor membranare (Fig. IV.5.b).

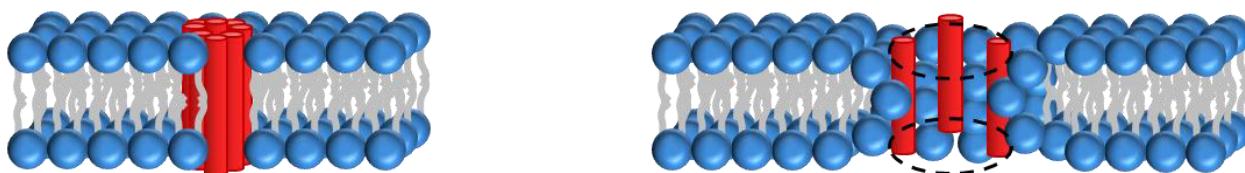
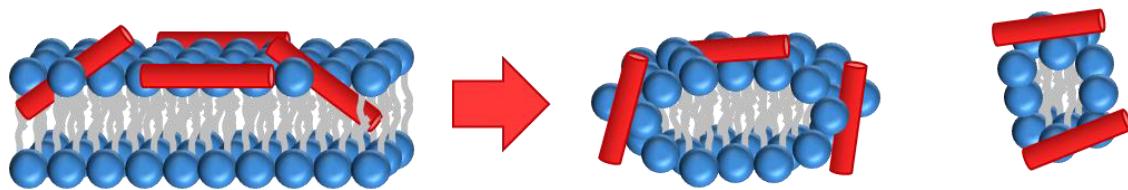


Fig. IV.5.a) Modelul de formare a porilor transmembranari clasici; b) modelul de formare a porilor transmembranari toroidali.

## IV.2. Acțiunea peptidelor antimicrobiene asupra membranelor bacteriene

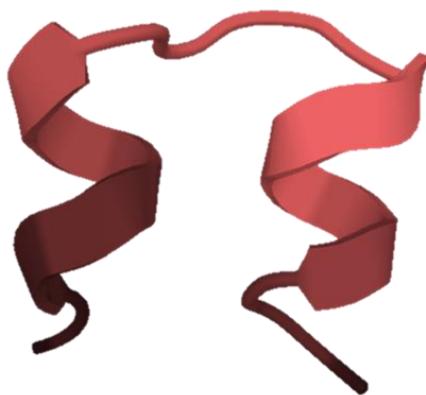
Mecanismul de carpetare al membranelor bacteriene presupune acțiunea peptidelor antimicrobiene într-un mod similar acțiunii detergenților, prin acumularea la interfața lichid-bistrat și ulterior dezintegrarea membranei (Fig. IV.6).



**Fig. IV.6. Modelul de acțiune al peptidelor antimicrobiene prin carpetarea membranele celulelor bacteriene.**

### IV.3. Particularități ale peptidei citotoxice sintetice hibrid CMA3

Peptida antimicrobiană CMA3 (KWKLKKHIGIGKHFLSAKKF-NH<sub>2</sub>) este o peptidă hibrid derivată din peptida sintetică CA-MA, la rândul ei derivată din peptidele cecropin A (CA) și magainin 2 (MA) [110]. CMA3 prezintă activitate puternică împotriva bacteriilor Gram-poitive și Gram-negative dar prezintă o citotoxicitate redusă. În soluție apoasă, la pH=7.4, peptida adoptă o structură de *random coil* dar în LSS (lauril sulfat de sodiu) adoptă o structură de  $\alpha$ -helix, ceea ce indică posibilul comportament în interiorul membranelor lipidice (Fig. IV.7).



**Fig. IV.7. Structura peptidei antimicrobiene CMA3 realizată pe platforma online PEP-FOLD [111].**

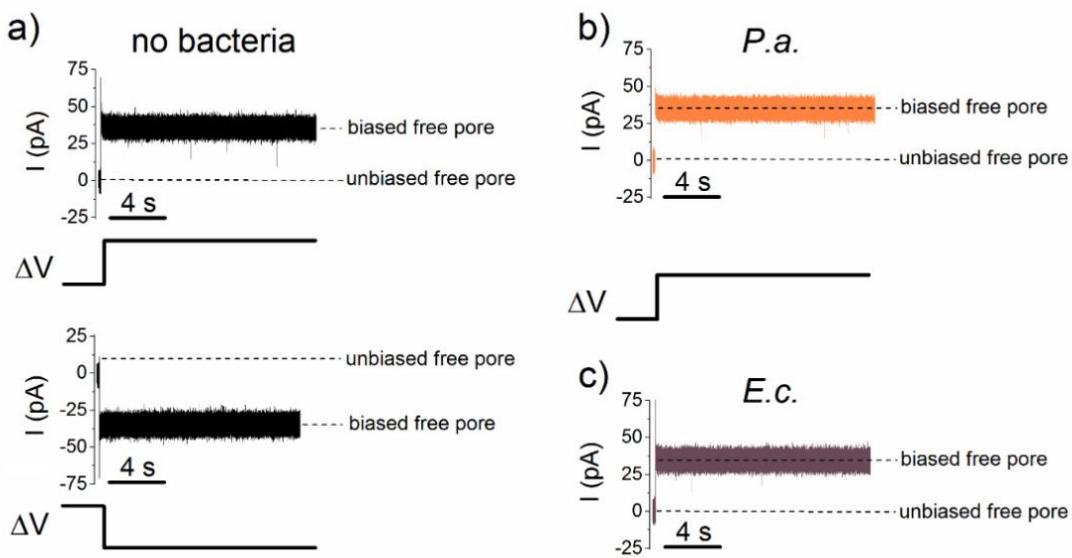
CMA3 este caracterizată printr-o sarcină electrică de +8|e<sup>-</sup>|, în condiții fiziologice normale, ceea ce asigură o atracție electrostatică față de lipopolizaharidele ce intră în structura bacteriilor Gram-negative. Studiul al activității peptidei față de LPS a demonstrat o neutralizare de ~70% a sarcinii LPS la o concentrație de 20 µg/mL, proprietate utilă la modificarea proprietăților electrice a membranelor bacteriene [110].

## **V. REZULTATE EXPERIMENTALE: DEMONSTRAREA PRINCIPIULUI DE DETECȚIE ȘI DISCRIMINARE A UNOR BACTERII GRAM-NEGATIVE CU AJUTORUL NANOPORULUI DE A-HEMOLIZINĂ**

### **V.1. Analiza interacțiunilor bacteriilor Gram-negative cu nanoporul de $\alpha$ -HL**

În cadrul experimentelor au fost utilizate două specii bacteriene Gram-negative: *E. coli* (ATCC 25922) și *P. aeruginosa* (ATCC 15692), prezente sub formă de pudră liofilizată. Probele au fost hidratate cu soluție electrofiziologică 0.5 M KCl, identică cu soluția utilizată în cadrul experimentului. Măsurările au fost realizate la valori diferite ale pH-ului, astfel încât soluțiile au fost tamponate cu 10 mM HEPES la pH = 7, respectiv 5 mM MES la pH = 4. Un volum mic din soluția proteică  $\alpha$ -HL a fost adăugat în partea *cis* a bistratului lipidic, astfel încât să asigure inserția unui singur nanopor în membrană. Bacteriile au fost adăugate de partea *trans* a cuvei experimentale într-o concentrație de  $\sim 1.2 \times 10^8$  cfu/mL.

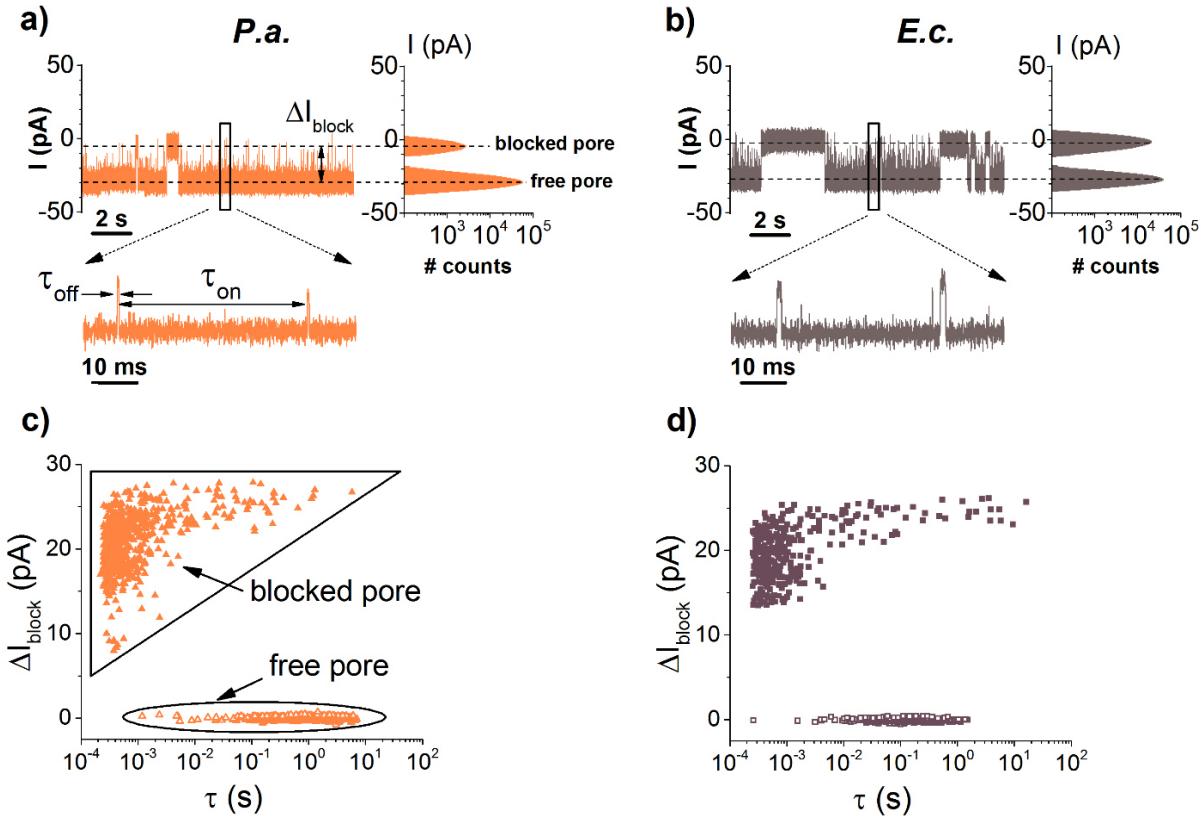
Inserția unui singur nanopor este marcată de creșterea curentului ionic înregistrat la aplicarea unei diferențe de potențial, ca urmare a creșterii conductanței electrice a membranei. Bacteriile Gram-negative, datorită compoziției membranare (grupări fosfat și carboxil din structura lipopolizaharidelor) prezintă o încărcare electrică netă negativă, ceea ce mediază transportul electroforetic a acestora către gura porului la aplicarea unor diferențe de potențial negative (față de electrodul *cis* legat la masă). Interacțiunea bacteriilor cu  $\alpha$ -HL este marcată de reducerea reversibilă a intensității curentului ionic înregistrat.



**Fig. V.1.** Înregistrări reprezentative ale fluctuațiilor de curent ionic prin  $\alpha$ -HL a) în absența bacteriilor, la  $\Delta V = +80$  mV (sus) și  $\Delta V = -80$  mV (jos), respectiv în prezență bacteriilor, *P. aeruginosa* (b) și *E. coli* (c), la  $\Delta V = +80$  mV. pH-ul soluției a fost 7 [112].

Bacteriile nu interacționează cu porul în condițiile în care diferența de potențial aplicată este pozitivă (Fig. V.1.b și c), semnalul de curent ionic fiind similar cu cel înregistrat în condiții control, în absența bacteriilor (Fig. V.1.a), ceea ce sugerează că deplasarea electroforetică a bacteriilor în câmp electric este necesară pentru interacțiunea acestora cu porul și înregistrarea fluctuațiilor de curent observate sub acțiunea unor diferențe de potențial negative (Fig. V.2).

Blocajele de curent datorate interacțiunii bacteriilor cu nanoporul de  $\alpha$ -HL sunt marcate prin scăderea curentului de la valoarea  $I_0 \approx 28 \pm 0.5$  pA la  $I_{block} \approx 3.8 \pm 0.6$  pA, la aplicarea unei diferențe de potențial de  $\Delta V = -80$  mV, pentru ambele specii bacteriene. Datorită dimensiunilor mult mai mari ale bacteriilor raportate la dimensiunea porului, o corelație între amplitudinea blocajului și dimensiunea analitului nu poate fi făcută. Cu toate acestea, existența unei singure stări de blocaj, indicată de histogramele de amplitudine ale curentului (Fig. V.2.a și b), elimină posibilitatea existenței în soluție, într-un număr relevant din punct de vedere statistic, a unor fragmente membranare, rezultate în urma rehidratării, ce ar fi făcut dificilă interpretarea semnalului înregistrat.



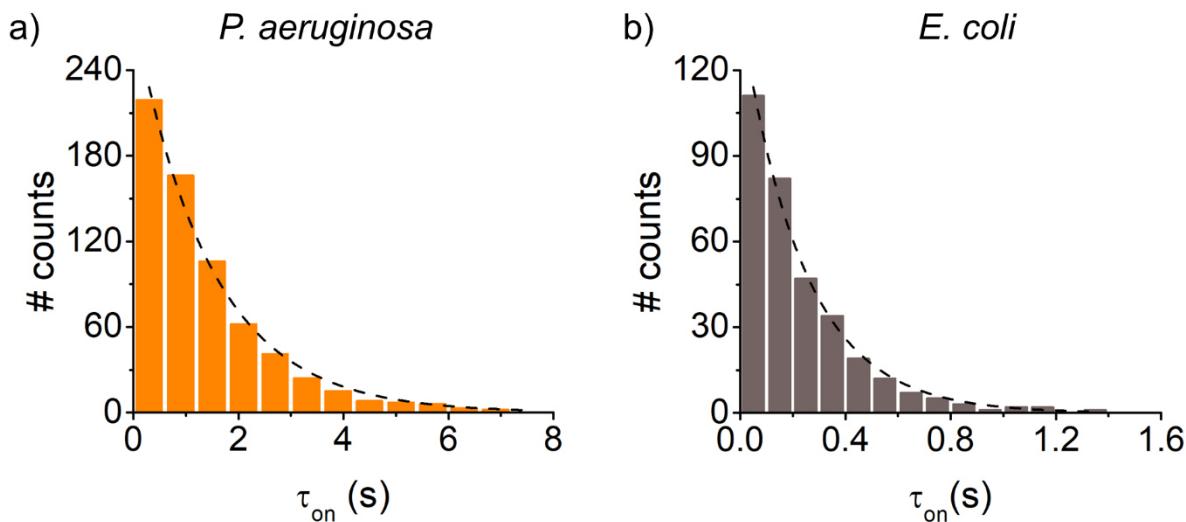
**Fig. V.2.** Înregistrări reprezentative ale fluctuațiilor de curent ionic prin  $\alpha$ -HL ce reflectă blocajele datorate interacțiunii bacteriilor *P. aeruginosa* (a) și *E. coli* (b) cu nanoporul la pH = 7, cu  $\Delta V = -80$  mV, indicate și de histogrammele de amplitudine a curentului; în detaliu sunt reprezentați timpii ce caracterizează frecvența ( $\tau_{on}$ ) și durata ( $\tau_{off}$ ) evenimentelor de blocaj. Magnitudinea blocajului  $\Delta I_{block}$  în funcție de durata acestuia, pentru *P. aeruginosa* (c) și *E. coli* (d) [112].

În cadrul tehnicii, după cum a fost detaliat în capitolul III, existența unor molecule având chiar și variații mici în volumul ocupat, este semnalată în variația amplitudinii de blocaj. Blocajul relativ de curent poate fi corelat cu dimensiunea moleculei ce partionează în interiorul nanoporului pe baza relației (V.1):

$$\Delta I_{block} = \frac{\sigma \Delta V \delta}{l_p^2} \quad (V.1)$$

unde  $\sigma$  reprezintă conductivitatea soluției,  $\Delta V$  diferența de potențial aplicată,  $\delta$  volumul moleculei iar  $l_p$  lungimea nanoporului. În cazul bacteriilor, datorită volumului mai mare cu trei ordine de mărime față de volumul nanoporului, amplitudinea blocajelor de curent este omogenă

indiferent de specia bacteriană analizată. Această informație împiedică realizarea vreunei distincții între cele două specii pornind strict de la amplitudinea blocajului. Astfel, distincția între cele două specii bacteriene se poate face doar pe considerente de cinetică diferită în interacțiunea cu nanoporul de  $\alpha$ -HL.



**Fig. V.3. Distribuția valorilor timpilor de asociere  $\tau_{on}$ , înregistrate în urma analizei fluctuațiilor reversibile de curent ionic pentru interacțiunea dintre a) *P. aeruginosa* și b) *E. coli* și  $\alpha$ -HL la  $\Delta V = -80$  mV, pH = 7.**

Pe baza valorii medii a timpului dintre două evenimente de blocaj succesive ( $\tau_{on}$ ) a fost determinată rata de asociere a bacteriilor cu proteina ( $rate_{on} = 1/\bar{\tau}_{on}$ ) pentru diferite valori ale diferenței de potențial aplicate ( $\Delta V = -120 \div -50$ ). Dependența de potențial a ratei de asociere, pentru cele două specii bacteriene, reprezentată grafic în Fig. V.4, reflectă cinetica procesului de interacțiune.

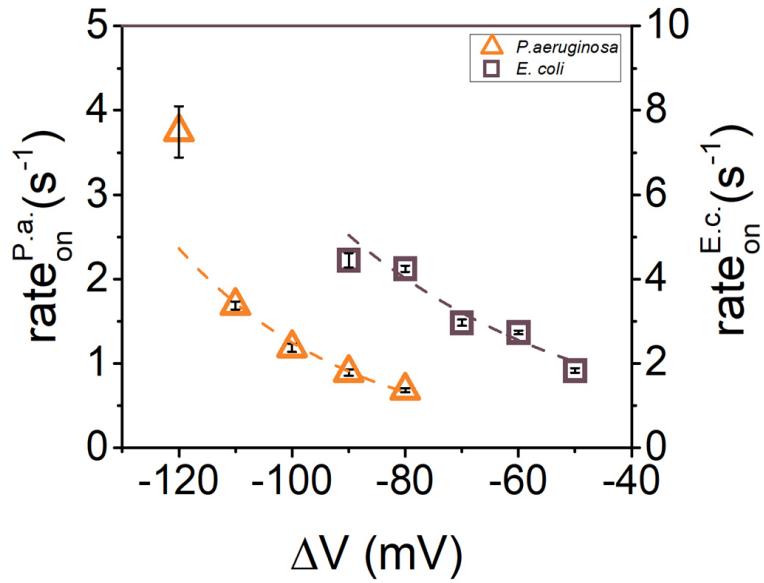


Fig. V.4. Variația ratei de asociere ( $rate_{on}$ ) cu diferența de potențial, la  $pH = 7$ , dintre *P. aeruginosa* (triunghiuri), respectiv *E. coli* (patrate), cu  $\alpha$ -HL.

După cum se poate observa, ratele de asociere cu  $\alpha$ -HL, pentru ambele specii bacteriene se supun unei dependențe exponențiale cu diferența de potențial, ceea ce este caracteristică unei asocieri mediate de o barieră energetică, descrisă pe baza teoriei stării de tranziție (subcapitolul II.6). Pentru a descrie o astfel de reacție se utilizează o relație de tip van't Hoff – Arrhenius, utilizată cu succes pentru descrierea interacțiunii dintre proteine și nanopor [113,114]:

$$rate_{on} = A \cdot \exp\left(\frac{q_{eff}\Delta V - \Delta G^*}{k_B T}\right) \quad (V.2)$$

În această relație, termenul pre-exponențial  $A = p \cdot v$ , unde  $p$  este factorul de probabilitate și  $v$  este un factor de frecvență, ce ia în considerare particularitățile soluției și ale porului (concentrația, coeficientul de difuzie, secțiunea transversală și lungimea porului),  $q_{eff}$  reprezintă sarcina electrică efectivă a bacterie,  $\Delta V$  este diferența de potențial aplicată,  $\Delta G^*$  reprezintă bariera energetică, iar  $k_B$  și  $T$  reprezintă constanta Boltzmann și temperatura absolută a soluției. Relația (V.2) poate fi rescrisă:

$$rate_{on} = r_0 \cdot \exp\left(\frac{z_{eff}|e^-|\Delta V}{k_B T}\right) \quad (V.3)$$

$$r_0 = A \cdot \exp\left(-\frac{\Delta G^*}{k_B T}\right) \quad (V.4)$$

Unde  $r_0$  reprezintă rata de asociere dintre bacterie și nanopor în absența diferenței de potențial aplicate,  $z_{eff}$  valența efectivă iar  $e$  sarcina electrică elementară. Prin fitarea punctelor din Fig. V.4 cu relația (V.3), au fost determinate valorile parametrului  $r_0$  și  $z$  (Tabelul V.1).

**Tabel V.1.** Valorile parametrilor  $r_0$  și  $z$  din relația rezultată din fitarea datelor din Fig. V.5 cu ajutorul relației van't Hoff – Arrhenius (V.3), pentru *P. aeruginosa* și *E. coli*, la 0.5 M KCl pH = 7.

	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
$r_0$ (s <sup>-1</sup> )	0.04 ± 0.02	0.66 ± 0.17
$z$	0.95 ± 0.10	0.58 ± 0.09

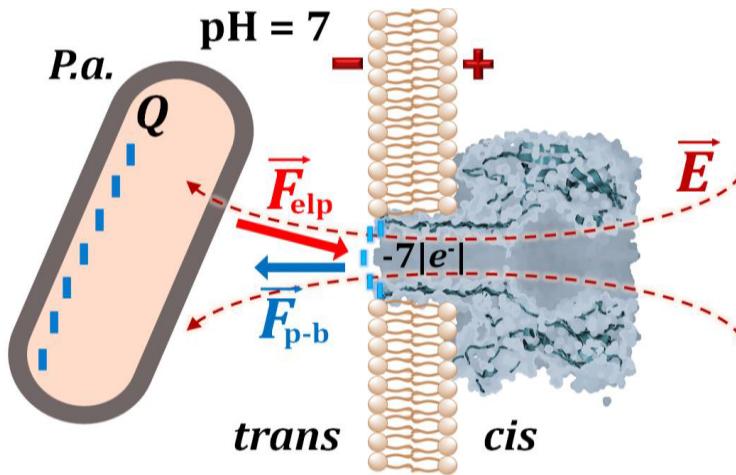
Pe baza acestor valori s-a poate observa că sarcina electrică efectivă, definită ca sarcina electrică de pe suprafața bacteriei ce participă la interacțiune, este sub valoarea unei sarcini electrice elementare. În ciuda dimensiunilor micrometrice, câmpul electric interacționează la gura porului cu o regiune restrânsă de pe suprafața membranei bacteriene, de ordinul nanometrilor. Această interacțiune restrânsă, cumulată cu ecranarea electrostatică datorată concentrației de sare, dată de lungimea Debye (relația V.5), permite realizarea interacțiunii electrostatice doar cu un număr redus de grupări funcționale, aflate la capătul lipopolizaharidelor.

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_r k_B T}{2|e^-|^2 N_A I \cdot 10^3}} \quad (V.5)$$

În relația (V.5)  $\epsilon_0$ ,  $\epsilon_r$  reprezintă permitivitatea electrică a vidului, respectiv permitivitatea electrică relativă,  $k_B$  – constanta Boltzmann,  $T$  – temperatura absolută,  $e^-$  - sarcina electrică elementară,  $N_A$  – numărul lui Avogadro iar  $I$  – tăria ionică a soluției măsurată în mol/L. În cadrul

condițiilor noastre experimentale (0.5 M KCl, 295 K) lungimea Debye are o valoare de  $\lambda_D \approx 0.4$  nm.

Prin urmare, valorile rezultate nu reflectă sarcina totală a bacteriei și implicit nici nu poate constitui o metodă de identificare a acestora, având ca referință valorile potențialelor zeta existente în literatură [115–117]. O altă problemă rezultată în urma valorilor obținute este faptul că acestea sunt în aparentă contradicție cu ratele de asociere ale bacteriilor cu porul. Considerând ratele mai mari obținute pentru *E. coli* ne-am fi așteptat ca acest lucru să fie evidențiat și de o sarcină efectivă mai mare.

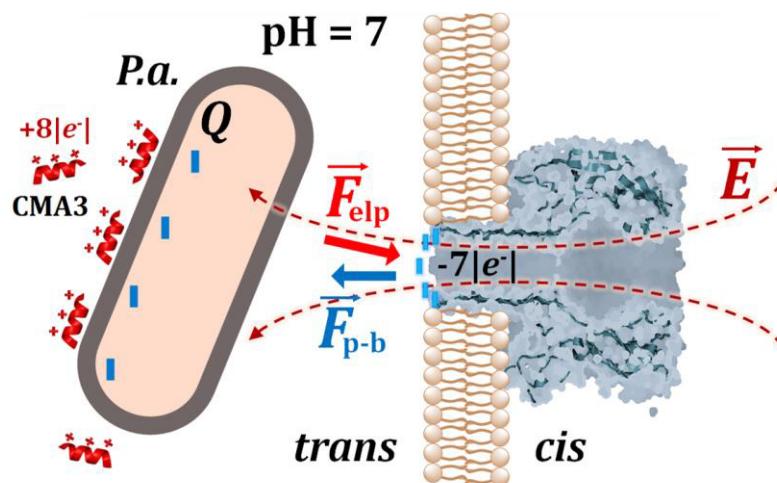


**Fig. V.5. Reprezentare schematică a procesului de interacțiune dintre bacterie (*P. aeruginosa*) și nanoporul de  $\alpha$ -HL la pH=7.  $\vec{F}_{elp}$  (roșu) reprezintă forța electroforetică ce acționează asupra bacteriei pentru a o aduce în contact cu por iar  $\vec{F}_{p-b}$  (albastru) reprezintă forța de repulsie electrostatică datorată încărcării electrice negative a aminoacicizilor de la gura porului (-7|e<sup>-</sup>| albastru) [112].**

Acest aparent paradox este explicat de valorile termenului  $r_0$  ce permit caracterizarea cinematică de interacțiune bacterie – nanopor, în absența diferenței de potențial. Bariera energetică, menționată anterior se datorează în mare parte repulsiei electrostatice dintre inelul de sarcină electrică netă negativă de la gura porului și suprafața bacteriei. La intrarea în lumen sunt expuși un număr de 14 aminoacizi aspartat, cu sarcină electrică netă negativă, și 7 aminoacizi lizină, cu sarcină electrică netă pozitivă, care generează cumulat o sarcină electrică netă de -7|e<sup>-</sup>|. Valorile ratelor  $r_0$  sunt proporționale cu valoarile barierei energetice  $\Delta G^*$  întâmpinate de bacterii în momentul asocierii. Astfel, se poate observa că  $r_0$  este aproximativ cu un ordin de mărime mai mare pentru *E. coli*, decât pentru *P. aeruginosa*, ceea ce corespunde unei bariere energetice reduse pentru această specie bacteriană, reflectat în ratele de asociere mai mari.

## V.2. Utilizarea peptidei antimicrobiene hibrid CMA3 în scopul discriminării bacteriilor Gram-negative

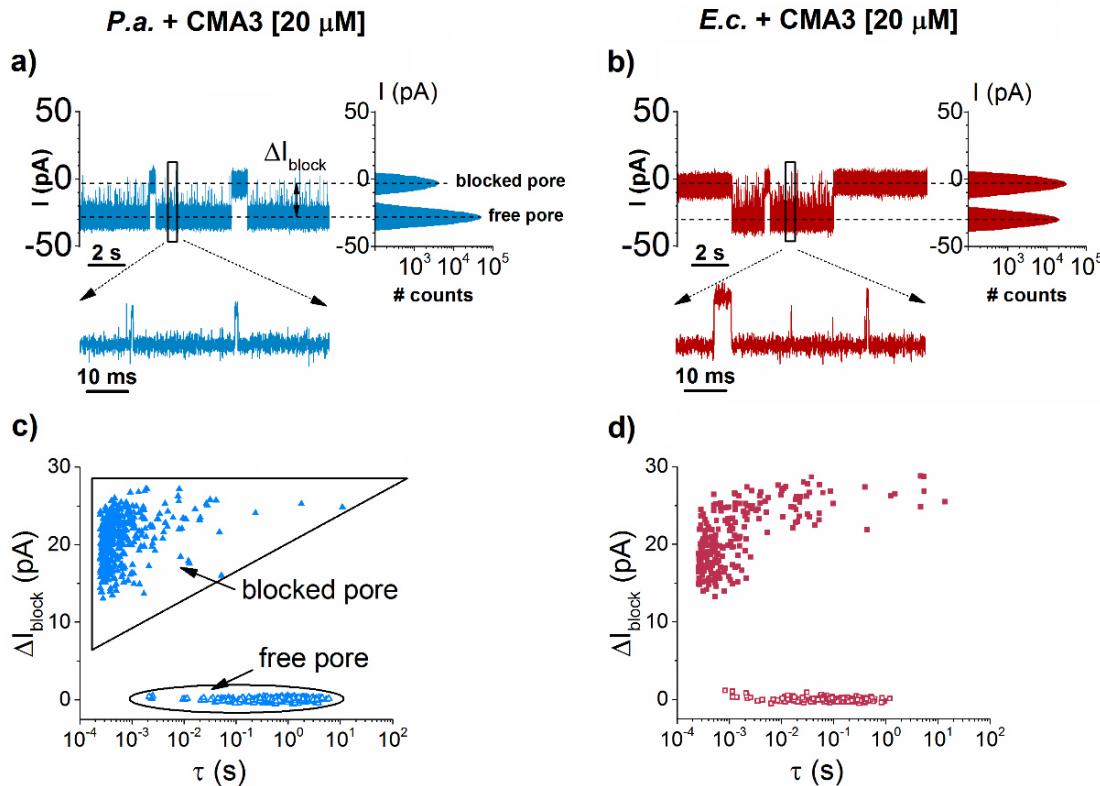
Pornind de la principiul de detecție prezentat anterior, s-a propus utilizarea unei peptide antimicrobiene pentru a modifica caracterul anionic al bacteriilor, cu scopul de a augmenta abilitatea de discriminare a tehnicii utilizate. Peptidele antimicrobiene prezintă afinitate pentru membranele bacteriene datorită unei combinații de procese de atracție electrostatică și interacțiuni hidrofobe. Cum cele două specii bacteriene sunt caracterizate printr-o sarcină electrică superficială și structură membranară similară dar nu identică, este de așteptat ca CMA3 să acționeze diferit asupra acestora. Peptidele cationice CMA3 vor fi adsorbite la nivelul membranei bacteriene și vor conduce la neutralizarea parțială a sarcinii electrice negative [110].



**Fig. V.6.** Reprezentare schematică a procesului de interacție dintre bacterie (*P. aeruginosa*) și nanoporul de  $\alpha$ -HL la  $pH=7$ , în prezența peptidei antimicrobiene CMA3. Sarcina peptidei  $(+8|e^-|)$  va duce la scăderea sarcinii electrice negative a bacteriei, ce se va reflecta în scăderea forței electroforetice  $\vec{F}_{elp}$  (roșu) dar și a forței de repulsie electrostatică  $\vec{F}_{p-b}$  (albastru) [112].

Peptida a fost adăugată într-o concentrație de  $20 \mu\text{M}$  în regiunea *trans* și lăsată să interacționeze cu membranele bacteriene timp de  $\sim 10$  minute, înainte de a începe înregistrarea. În prezența peptidei antimicrobiene CMA3, a fost observată o scădere a valorilor medii ale timpului de asociere ( $\tau_{on}$ ), dintre bacterii și nanopor, pentru ambele specii studiate (Fig. V.7). Mai precis,

CMA3 a determinat scăderea cu  $26.5 \pm 6.2\%$  a valorii medii a timpului de asociere pentru *P.aeruginosa* și cu  $39.3 \pm 6.9\%$  pentru *E. coli*. Pe de o parte, scăderea sarcinii electrice a bacteriilor determină scăderea forței electroforetice ce facilitează interacțiunea bacterie-por. Totodată, după cum a fost prezentat anterior, forța de repulsie electrostatică  $\vec{F}_{p-b}$  joacă un rol critic în medierea procesului de asociere cu porul, ceea ce determină ca aceeași scădere de sarcină electrică să diminueze bariera energetică prezentă la gura porului.



**Fig. V.7.** Înregistrări reprezentative ale fluctuațiilor de curent ionic prin  $\alpha$ -HL ce reflectă blocajele datorate interacțiunii cu *P. aeruginosa* (a) și *E. coli* (b), în prezența peptidei CMA3 (20  $\mu$ M), la pH = 7, la  $\Delta V = -80$  mV. Magnitudinea blocajului în curentul ionic,  $\Delta I_{block}$ , în funcție de timpul de rezidență, pentru *P. aeruginosa* (c), respectiv *E. coli* (d) [112].

Pe baza valorilor medii ale timpului de asociere au fost determinate valorile ratelor de asociere dintre bacterii și nanopor, în domeniul diferențelor de potențial aplicate, cu scopul de a analiza cantitativ cinetica interacțiunii în prezența peptidei CMA3. Astfel, a fost observat că cinetica de asociere are loc mai rapid în prezența peptidei, urmând aceeași tendință, exponențial ascendentă cu valoarea absolută a diferenței de potențial (Fig. V.8). Pe baza relației (V.3),

aplicată punctelor rezultate în noile condiții experimentale, au fost determinate valorile parametrilor  $r_0$  și  $z_{eff}$  (Tabelul V.2).

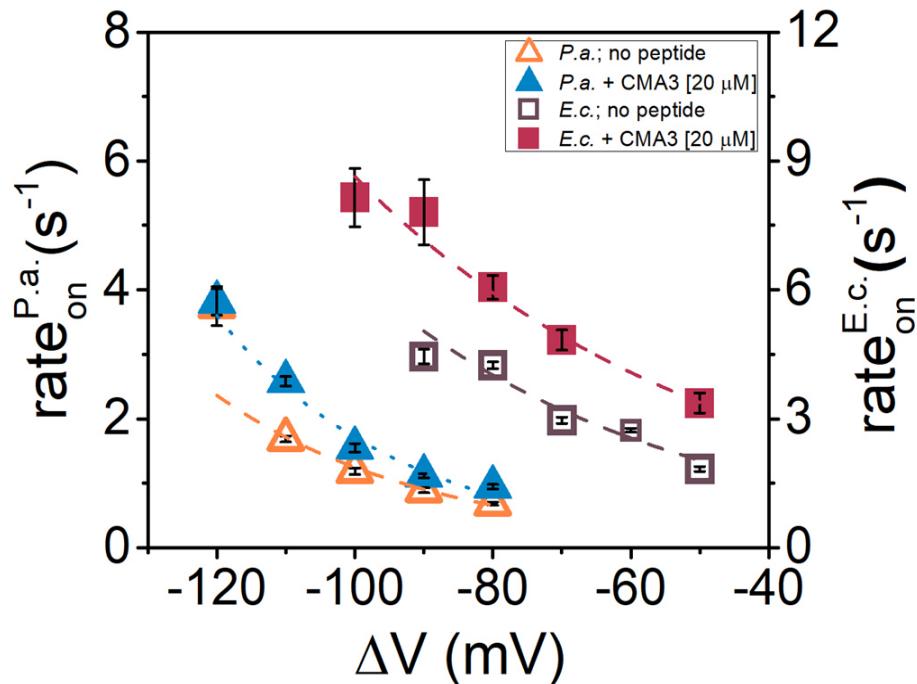


Fig. V.8. Reprezentarea dependenței ratei de asociere dintre bacterie și nanoporul de  $\alpha$ -HL ( $rate_{on}$ ) în funcție de diferența de potențial aplicată, la pH = 7, în prezență (simboluri pline), respectiv absență (simboluri goale) peptidei CMA3 [112].

Tabel V.2. Valorile ratelor de asociere  $r_0$  în absența diferenței de potențial dintre bacterii (*P. aeruginosa* și *E.coli*) și nanoporoul de  $\alpha$ -hemolizină, și valența efectivă a peretelui bacterian ce intră în contact cu porul, în absență și prezență peptidei CMA3.

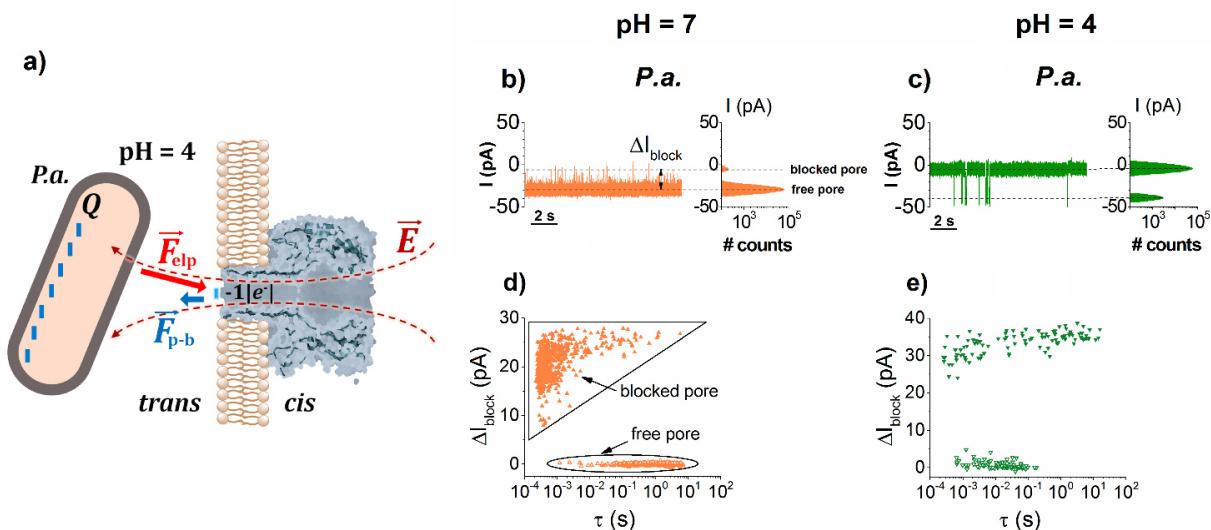
	<i>P.a.</i>	<i>E.c.</i>	<i>P.a.+CMA3</i>	<i>E.c.+CMA3</i>
$r_0$ (s <sup>-1</sup> )	$0.04 \pm 0.02$	$0.66 \pm 0.17$	$0.05 \pm 0.02$	$1.33 \pm 0.14$
$z_{eff}$	$0.95 \pm 0.10$	$0.58 \pm 0.09$	$0.82 \pm 0.10$	$0.48 \pm 0.04$

Valorile parametrilor din Tabelul V.2 confirmă ipotezele de lucru utilizate: i) absorbția peptidelor antimicrobiene CMA3 pe membrana bacteriilor determină scăderea sarcinii electrice, observată chiar și la nivelul sarcinii electrice efective și ii) reducerea barierei energetice asociate interacțiunii bacterie-por, indicată de creșterea ratei  $r_0$  (relația V.5). Cu toate acestea, acțiunea CMA3 nu este identică pentru ambele specii bacteriene, modificările induse fiind procentual

diferite. Acest lucru nu este în totalitate neașteptat, dacă este luată în considerare compoziția membranară diferită a ambelor bacterii. În ciuda faptului că CMA3 nu prezintă o specificitate premeditată față de anumite specii bacteriene, afinitatea diferită a peptidei față de *E. coli*, respectiv *P. aeruginosa*, a contribuit suplimentar la discriminarea între acestea cu ajutorul tehnicii utilizate.

### V.3. Investigarea efectelor induse de pH-ul acid asupra interacțiunii dintre *P. aeruginosa* și α-HL

Pentru a verifica suplimentar și a confirma importanța barierei energetice în procesul de asociere, protocolul de detectie a celulelor bacteriene a fost aplicat la pH acid (pH = 4). Dacă rolul repulsiei electrostatice dintre deschiderea lumenului și bacterii a fost supraevaluat, neutralizarea încărcării electrice a resturilor de aminoacizi acizi de la gura porului ar trebui să nu afecteze cinetica procesului de interacțiune. Pe baza acestor considerente, la pH = 4 resturile de aminoacizi aspartat aflate la gura porului de α-HL se protonează parțial ( $pK_a = 3.9$ ) ceea ce duce la o scădere a valorii absolute a sarcinii electrice locale ( $\sim -1|e^-|$ ) și astfel la scăderea forței de repulsie electrostatică ( $\vec{F}_{p-b}^{pH=4} < \vec{F}_{p-b}^{pH=7}$ ). Din măsurările experimentale (realizate doar pe *P. aeruginosa*) am observat că timpul mediu de blocaj al porului este aproximativ cu două ordine de mărime mai mare la pH acid ( $\tau_{off}^{pH=4} = 1.4$  s) decât la pH neutru ( $\tau_{off}^{pH=7} = 0.02$  s).



**Fig. V.9. a)** Reprezentare schematică a procesului de interacțiune dintre bacterie (*P. aeruginosa*) și nanopor, în condiții de 0.5 M KCl, pH = 4; scăderea încărcării electrostatice de la gura porului ( $-1|e^-|$ ) a determinat scăderea forței  $\vec{F}_{p-b}$ . Înregistrări reprezentative ale fluctuațiilor de curent prin nanoporul de α-HL ce reflectă interacțiunea cu *P. aeruginosa* la pH = 7 (b) și pH = 4 (c), la  $\Delta V = -80$  mV; magnitudinea blocajului în curent  $\Delta I_{block}$  în funcție de timpul de rezidență pentru *P. aeruginosa*, la pH = 7 (d), respectiv pH = 4 (e) [112].

### VII.3. Investigarea efectelor induse de pH-ul acid asupra interacțiunii dintre *P. aeruginosa* și α-HL

Valorile ratelor de asociere în aceste condiții sunt aproximativ cu un ordin de mărime mai mari decât la pH = 7, ceea ce indică scăderea semnificativă a repulsiei electrostatice dintre bacterie și nanopor, în condiții de pH acid.

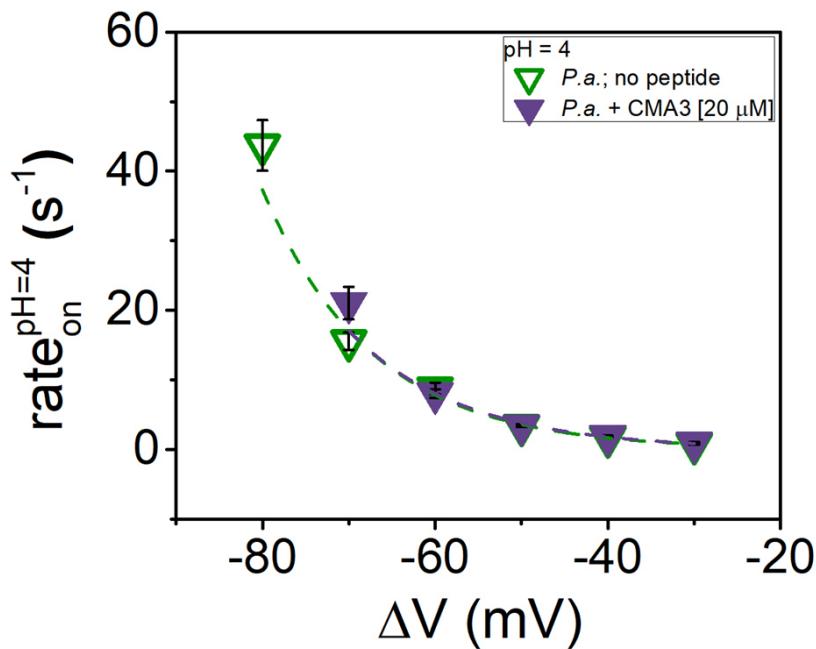


Fig. V.10. Variația ratelor de asociere dintre *P. aeruginosa* și nanoporul de α-HL în funcție de diferența de potențial aplicată în absență, respectiv în prezență peptidei CMA3 (20 μM) în condiții de pH acid [112].

O consecință interesantă a utilizării pH-ului acid a fost eliminarea efectului peptidei CMA3 asupra procesului de interacțiune bacterie – por. După cum a fost observat anterior, la pH = 7 prezența peptidei determină creșterea ratelor de asociere, ca urmare a neutralizării parțiale a sarcinii electrice membranare, ceea ce nu este cazul în condiții de pH = 4. Valorile ratelor de asociere în prezența peptidei CMA3, nu prezintă o abatere semnificativă față de valorile obținute în absență acestia. Este posibil ca în aceste condiții activitatea peptidei să fie diminuată semnificativ, ceea ce ar împiedica adsorbția la nivelul membranelor bacteriene și la păstrarea neschimbată a caracterului anionic.

---

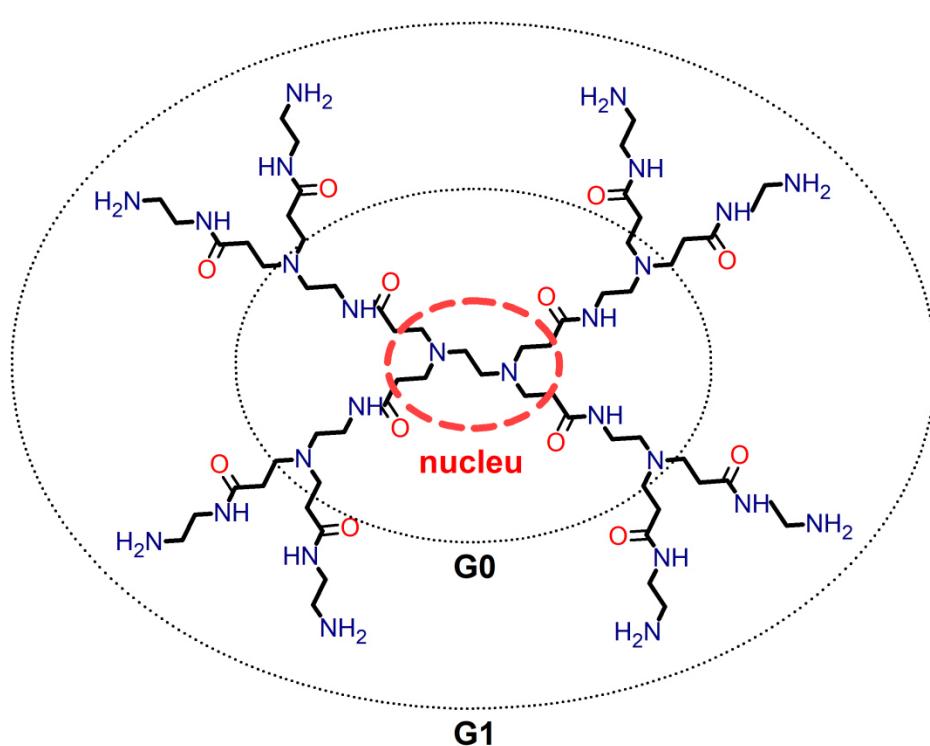
## Concluzii

- Tehnica de analiză la nivel de singură moleculă bazată pe nanoporul proteic de  $\alpha$ -hemolizină a permis detectarea rapidă, în timp real, a unor bacterii Gram-negative individuale, pe baza caracterului electric negativ al membranelor externe.
- *P. aeruginosa* și *E. coli* prezintă afinități diferite față de nanoporul de  $\alpha$ -HL, marcate de valorile medii ale timpilor de asociere ( $\tau_{on}$ ) și de cinetica de interacțiune bacterie-por.
- Analiza ratelor de asociere prin prisma teoriei Kramers a stării de tranziție indică prezența unei bariere energetice ce domină procesul de interacțiune. Pe baza ecuației van't Hoff – Arrhenius a fost determinată sarcina electrică efectivă a bacteriei ce participă la procesul de asociere cu porul și rata de asociere în absența diferenței de potențial  $r_o$ , ce evidențiază mecanismul emergent de realizare a interacțiunii.
- Utilizarea peptidei antimicrobiene CMA3 a permis scăderea barierei energetice asociate procesului de interacțiune dintre bacterii și nanopor, manifestată prin scăderea valorilor medii ale timpilor de asociere. Afinitatea diferită a peptidei, marcată în modificările procentuale diferite induse cinematicii de asociere bacterie – por, permite discriminarea la nivel conceptual a bacteriilor prin tehnica elaborată.
- pH-ul acid determină protonarea resturilor de aminoacizi Asp 127 și Asp128 de la gura porului, ceea ce reduce semnificativ forța de repulsie electrostatică manifestată între deschiderea lumenului și bacterii, evidențiind importanța caracteristicilor structurale și a încărcării electrice atât a analitului, cât și a nanoporului, în interacțiunile de asociere reversibilă dintre aceștia.

## VII. Detalii structurale și funcționale ale dendrimerilor

### VII.1. Structura generală și procesul de sinteză al dendrimerilor

Dendrimerii sunt polimeri caracterizați prin simetrie radială, având o structură bine definită, omogenă și puternic ramificată în jurul unui nucleu central. Nucleul este de cele mai multe ori o moleculă simetrică sau un polimer de dimensiuni reduse la care prin reacții iterative sunt adăugate grupări funcționale ce formează brațele sau dendronii moleculei. Fiecare adiție succesivă poartă denumirea de generație, acest termen fiind de asemenea utilizat pentru a specifica dimensiunea dendrimerului. Procesul de sinteză este foarte precis, ceea ce permite un control ridicat asupra dimensiunilor, formei, topologiei și a numărului de grupări funcționale terminale.



**Fig. VI.1. Structura poliamidoaminei (PAMAM) de generație 1 (G1). Este prezentat nucleul de etilen diamină, generația 0 (G0), obținută după prima reacție de sinteză și generația 1 (G1).**

## VI.1. Structura generală și procesul de sinteză al dendrimerilor

Prima structură dendritică sintetizată și cea mai des utilizată este poliamidoamina (PAMAM), obținută de Tomalia în 1985, utilizând un nucleu de etilen diamină, a cărui grupări funcționale (amine) constituie situsurile active ale reacției de sinteză [118]. Fiecare reacție succesivă introduce în structura moleculei amine suplimentare ce crează o nouă generație de grupări terminale. Această formă de sinteză, pornind de la nucleul central către exterior, poartă denumirea de sinteză divergentă. O altă metodă de sinteză, ce presupune o abordare inversă, pornind de la grupările terminale către nucleu, este numită sinteză convergentă. Ambele procese de sinteză sunt reprezentate schematic în Fig. VI.2.

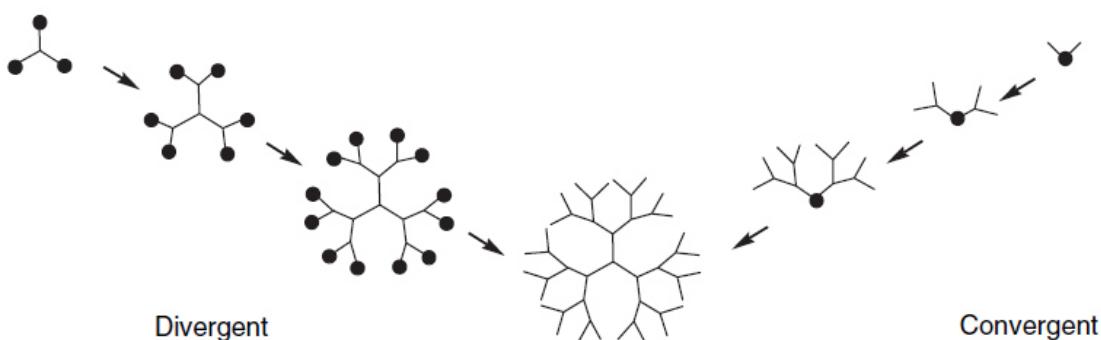


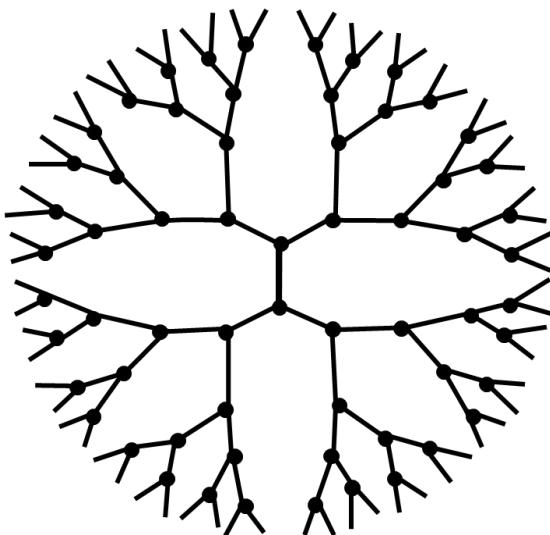
Fig. VI.2. Reprezentare schematică a reacție de sinteză convergentă și divergentă a dendrimerilor.

Odată încheiat procesul de sinteză, dendrimerii prezintă trei regiuni de interes: nucleul, structura dendritică internă și suprafața exterioară ce conține grupările terminale. Nucleul va dicta de la început natura dendrimerului sintetizat iar structura și dimensiunile brațelor vor determina conformarea spațială a acestuia. Grupările terminale sunt cele ce oferă proprietățile unice dendrimerilor, fiind ușor de alterat pentru a modifica solubilitatea [119], capacitatea de a interacționa cu membrane biologice [120], toxicitatea [121], capacitatea de chelare a ionilor metalici [122] sau capacitatea de captare a unor macromolecule [123].

## VI.2. Proprietăți fizico-chimice ale dendrimerilor

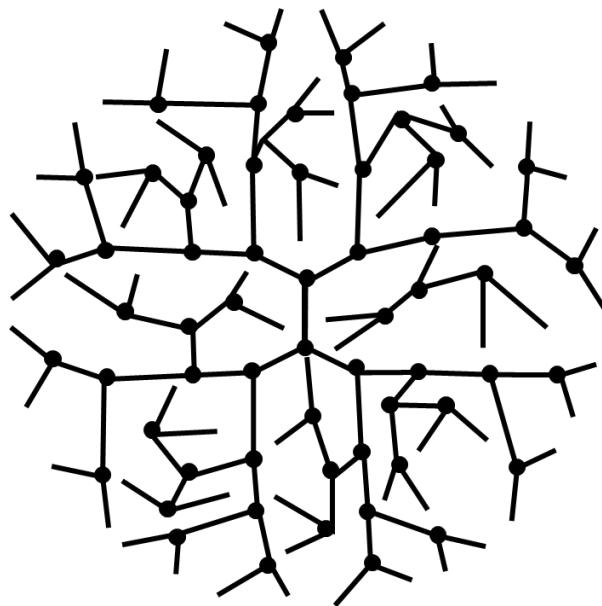
Proprietățile dendrimerilor sunt puternic legate de dimensiunile sau generația acestora, de natura solventului, a pH-ului sau a concentrației de sare. La creșterea generației, regiunile de interes descrise anterior încep să prezinte caracteristici distințe: grupările terminale vor restricționa accesul moleculelor din exterior, regiunea internă va dezvolta nano-compartimente utile în interacțiunile de tip gazdă-oaspete ('host-guest interactions') cu molecule de interes [124,125] iar nucleul va deveni puternic ecranat de mediul extern dendrimerului, ceea ce permite obținerea unor condiții diferite cu proprietăți unice, utile în transportul medicamentelor [126].

Simulații dinamice [127] și tehnici analitice [128] au fost utilizate pentru a determina proprietățile fizico-chimice ale dendrimerilor. Conformația și capacitatea dendrimerilor de a adopta diferite structuri ca răspuns la condițiile de mediu sunt critice pentru dezvoltarea aplicațiilor biomedicale. Studii ce urmăresc corelarea proprietăților conformatiionale ale dendrimerilor cu generația au propus două modele de împachetare, în funcție de natura forțelor ce se exercită între grupările funcționale. Un prim model (modelul „de Gennes”) consideră că la creșterea generației, grupările terminale devin din ce în ce mai apropiate, ducând la creșterea densității păturii externe pe când regiunea internă păstrează o structură deschisă cu o densitate mică [129]. Legăturile de hidrogen ce se stabilesc între grupările terminale sunt responsabile de structura ordonată asociată acestui model (Fig. VI.4). Împachetarea crescută a grupărilor terminale ar duce ulterior la limitarea generației până la care pot fi sintetizați dendrimerii.



**Fig.VI.4. Modelul “de Gennes” de împachetare al dendrimerilor, format din straturi concentrice din ce în ce mai compacte la creșterea generației.**

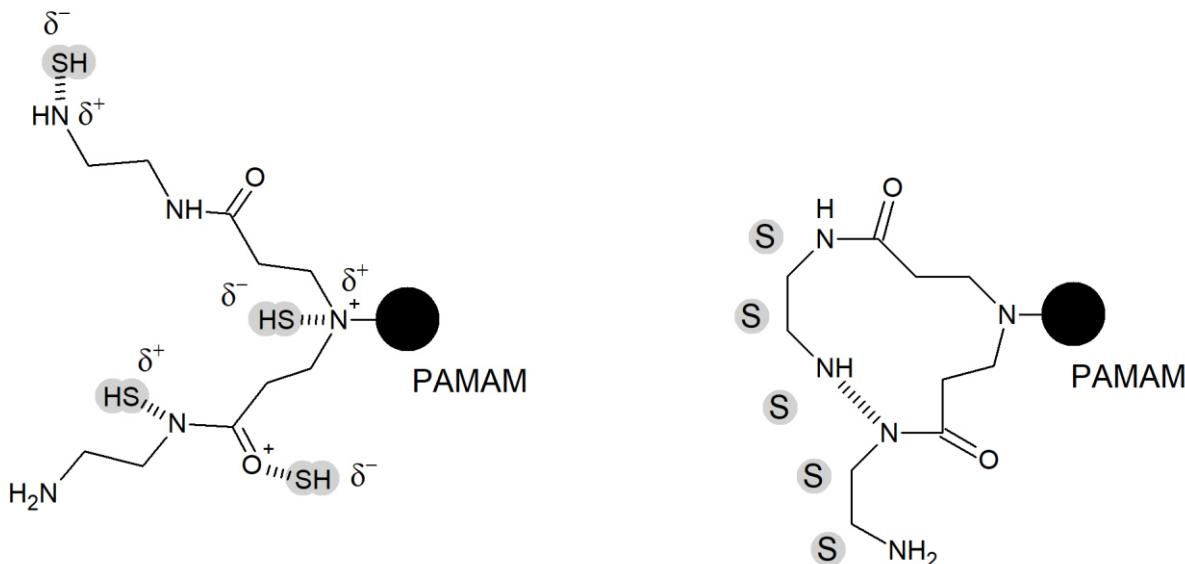
O problema inherentă acestui model este aplicabilitatea lui doar la clasele de dendrimeri a căror grupări terminale sunt capabile să interacționeze constructiv. Acest lucru nu este valabil însă pentru dendrimerii nemodificați cum ar fi PAMAM sau PPI (polipropilenimin). Dendrimerii între a căror grupări terminale nu există forțe de atracție, au o mobilitate crescută și prezintă retro-împachetarea brațelor (“back-folding”) către interiorul moleculei la creșterea generație [130]. Structura adoptată, bazată pe considerente entropice, este mai puțin organizată, având o densitate moleculară mai mare către interior (Fig. VI.5). Simulații de dinamică moleculară efectuate pe PAMAM, generațiile 1-11, au indicat că la generații mari aminele primare sunt distribuite în interiorul dendrimerului și nu sunt blocate la suprafață [131]. Notabil este totuși că la generația 10 suprafața disponibilă pentru fiecare monomer este limitată, ceea ce face imposibilă, din considerente sterice, sintetizarea unui dendrimer de generație mai mare, aceasta fiind o predicție a modelului “de Gennes” [129].



**Fig. VI.5. Reprezentare schematică a modului dezorganizat de conformare al dendrimerilor ce favorizează retro-împachetarea.**

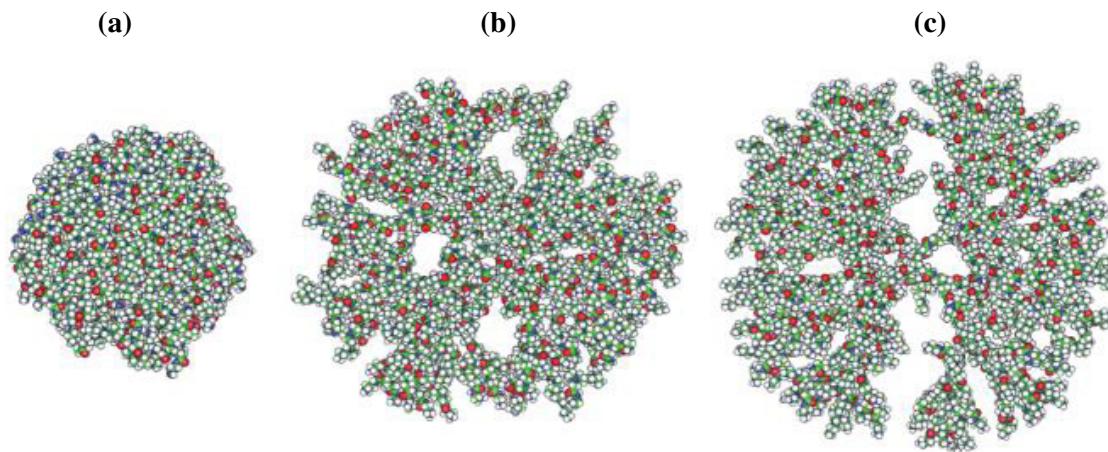
Observații experimentale [132] și simulări moleculare [133] au dovedit că retro-împachetarea este mai probabilă la generații mari, ceea ce oferă o descriere mai realistă asupra flexibilității dendrimerilor și nu elimină posibilitatea utilizării ambelor modele.

Dendrimerii sunt capabili să răspundă la condițiile mediului prin modificarea distribuției spațiale a brațelor și a conformatiei, modificări ce pot fi induse de caracteristicile solventului utilizat. Abilitatea de a solvata cu ușurință brațele dendrimerului va depinde de natura grupărilor funcționale, cu precădere a celor terminale [119]. Toate generațiile de dendrimeri tind să prezinte un grad mai ridicat de retro-împachetare al brațelor la scăderea calității solventului, mobilitatea crescută a permis a brațelor, ca urmare a utilizării unui solven slab a permis observarea retro-împachetării și la generațiile mici [134]. Analiza prin spectroscopie RMN realizată pe dendrimeri ce conțin grupări terminale amino (PPI, PAMAM) confirmă acest lucru, prin existența mai multor legături intramoleculare și a unui grad mai mare retro-împachetare într-un solvent nepolar, ce solvatează slab dendronii [135].



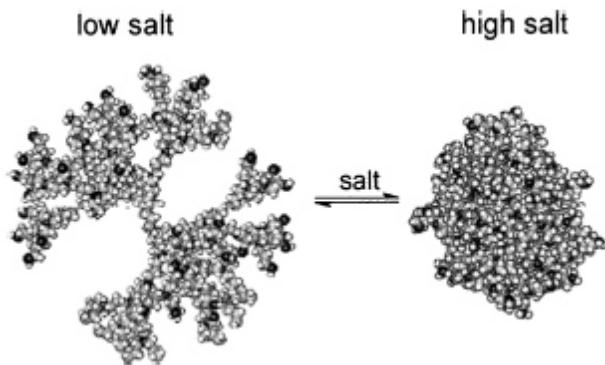
**Fig. VI.6. Influența unui solvent polar (SH) și a unui solvent nepolar (S) asupra împachetării brațelor unui dendrimer (PAMAM).**

Aminele primare și terțiare ale PAMAM-ului își pot modifica gradul de protonare la schimbarea pH-ului, ce se traduce apoi în creșterea sau scăderea repulsiei electrostatice dintre brațe. Calcule bazate pe valorile  $pK_a$ -ului aminelor primare și terțiare la generații mici (G0 – G2) [136] cât și studii de dinamică moleculară, arată o încărcare electrică pozitivă a aminelor primare și terțiare la pH acid. Gradul de protonare scade la pH neutru, unde persistă doar în rândul aminelor primare și dispare total la pH bazic, dendrimerul devenind neutru din punct de vedere electric [127]. Astfel la  $pH = 3$  repulsia electrostatică dintre amine (primare și terțiare) ar duce la creșterea volumului interior și la adoptarea unui structuri extinse spațial. La  $pH = 7$  aminele primare, aflate la suprafață sunt singurele încărcate electric, ceea ce ar duce la extinderea spațială a grupărilor terminale și ulterior la retro-împachetare, în rândul generațiilor mari. pH-ul bazic reduce semnificativ dimensiunile dendrimerului, ce adoptă o structură sferică, globulară [127]. Modificările conformatoionale induse de creșterea repulsiei electrostatice dintre brațele dendrimerului sunt mult mai pregnante la generații medii (G5-G7) decât la generații mari, unde limitările sterice reduc mobilitatea brațelor și obligă adoptarea unei structuri globulare, ce este mai puțin sensibilă la condițiile fiziologice ale mediului [137]. Deși această descriere este confirmată de rezultate experimentale [138,139], există și studii ce nu au remarcat modificări conformatoionale notabile la schimbarea pH-ului [140–142].



**Fig. VI.7.** Variația dimensiunilor dendrimerului cu pH-ul pentru PAMAM-G6: a) pH bazic - neprotonat, b) pH neutru – parțial protonat, c) pH acid – total protonat [127].

O augmentare a repulsiei electrostatice poate fi făcută și prin schimbarea concentrației de sare, ce va afecta gradul de ecranarea al grupărilor funcționale. Tărâia ionică are o influență puternică asupra conformației adoptate de PAMAM și PPI, ducând la structuri compacte, pentru valori mari ale concentrației de sare și la structuri extinse, pentru valori mici ale concentrației de sare [143], similar creșterii, respectiv scăderii valorii pH-ului.

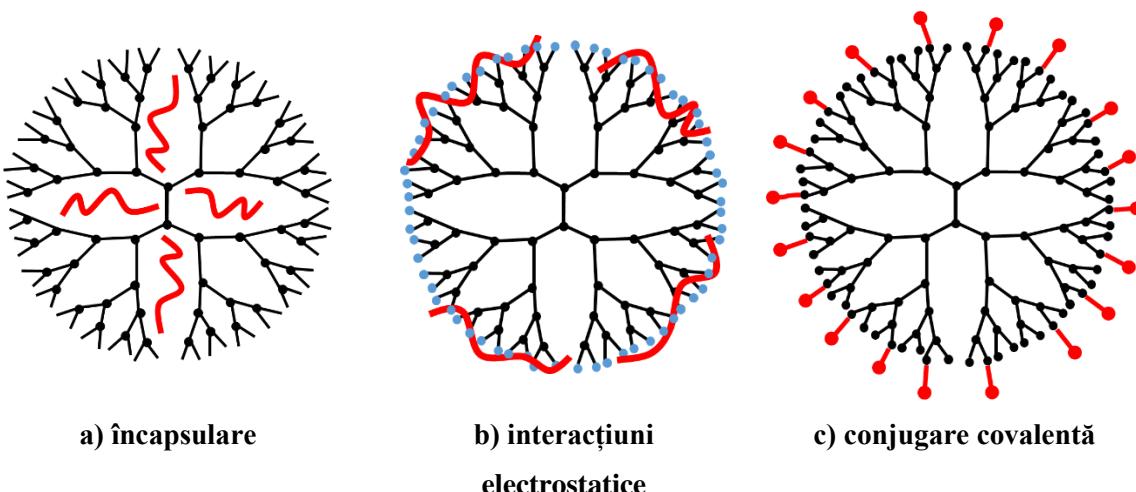


**Fig. VI.8.** Influența concentrației de sare asupra împachetării PPI-G: stânga - concentrație mare, dreapta – concentrație mică [144].

### **VII.3. Aplicații biomedicale ale dendrimerilor**

Funcționalizarea facilă, versatilitatea, uniformitatea moleculară și capacitatea de sinteză precisă sunt responsabile pentru atenția acordată dendrimerilor. Aceste proprietăți specifice permit utilizarea dendrimerilor într-o varietate de tehnologii, de la aplicații biomedicale la aplicații industriale [145]. Proprietățile farmaco-cinetice sunt cele ce au permis utilizarea dendrimerilor ca vehicule de transport și livrare a medicamentelor, în imagistică medicală, în terapia cu captură de neutroni sau în terapia genică, cu rezultate promițătoare.

Numărul mare de grupări funcționale, ce constituie situsuri de interacțiune, și nanocavitatele interioare structurii dendrimerilor oferă bazele stabilirii unei interacțiuni de tip gazdă-oaspete cu o multitudine de molecule cu efect terapeutic. Mecanismele de interacțiune pot fi de trei tipuri: încapsulare, interacțiune electrostatică sau conjugare covalentă. Procesul de încapsulare presupune interacțiunea medicamentelor cu cavitatele dendrimerului prin legături de hidrogen, sau prin interacțiuni hidrofobe, ce constrâng moleculele în interiorul structurii interne. Dacă grupările funcționale sunt încărcate electric (amine pozitive sau carboxil negative) dendrimerul poate interacționa electrostatic cu medicamente sau molecule de interes, facilitând solubilizarea și transportul acestora în organism. În ultimul rând, numărului mare de grupări funcționale de pe suprafața dendrimerului permite, prin conjugare, stabilirea unor legături covalente cu anumite medicamente. Această metodă presupune însă modificarea integrității și a proprietăților farmacologice ale medicamentului în schimbul unui control mai ridicat asupra procesului de ghidare și eliberare al acestuia.



**Fig. VI.9.** Reprezentare schematică a principalelor mecanisme de interacțiune dintre dendrimer și medicament (roșu): a) încapsulare, b) interacțiuni electrostatice, c) conjugare covalentă.

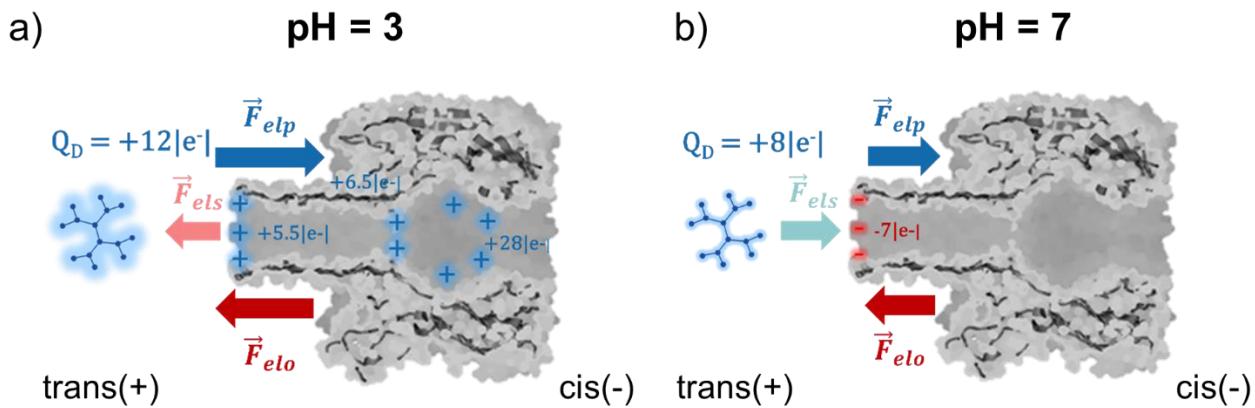
Odată creat complexul dendrimer-medicament, acesta trebuie introdus și transportat către țesutul țintă, unde are loc eliberarea sa. Mecanismele de eliberare vor fi diferite pentru conjugarea covalentă, decât pentru celealte procese de asociere, deoarece acestea necesită ruperea unor legături, prin degradare chimică sau enzimatică. Legăturile de hidrogen sau interacțiunile electrostatice, pe de altă parte, se vor rupe la schimbarea condițiilor din mediu, cum ar fi pH-ul sau temperatura, ce vor induce schimbări conformatiionale sau ale profilului electrostatic al dendrimerului, facilitând eliberarea medicamentului.

Pe baza acestor procedee au fost realizate studii pe o varietate de medicamente și clase de dendrimeri cu rezultate promițătoare. A fost observat că antiinflamatori nesteroidieni (Ketoprofen, Diflunisal) complexați cu PAMAM-G5 prezintă o solubilitate crescută în sânge [146] și o permeabilitate mai mare prin piele [147]. Tratamentele anti-tumorale pot profita de hipervascularizarea și drenajul limfatic limitat al țesuturilor cancerioase, ce acumulează macromolecule (efectul EPR – Enhanced Permeation and Retention), pentru a induce absorbția și retenția dendrimerului urmat de eliberarea medicamentului [148]. Andriamicina și metotrexat (medicamente utilizate în chimioterapie) au fost încapsulate în PAMAM-G3 și -G4, funcționalizat cu PEG carboximetil, ce apoi a fost preluat de țesuturile tumorale, ducând la scăderea semnificativă a citotoxicității asociate medicamentelor [149].

## VII. REZULTATE EXPERIMENTALE: STUDIEREA MODIFICĂRILOR CONFORMATIIONALE ALE DENDRIMERULUI PAMAM-G1 INDUSE DE pH ȘI CONCENTRAȚIA DE SARE

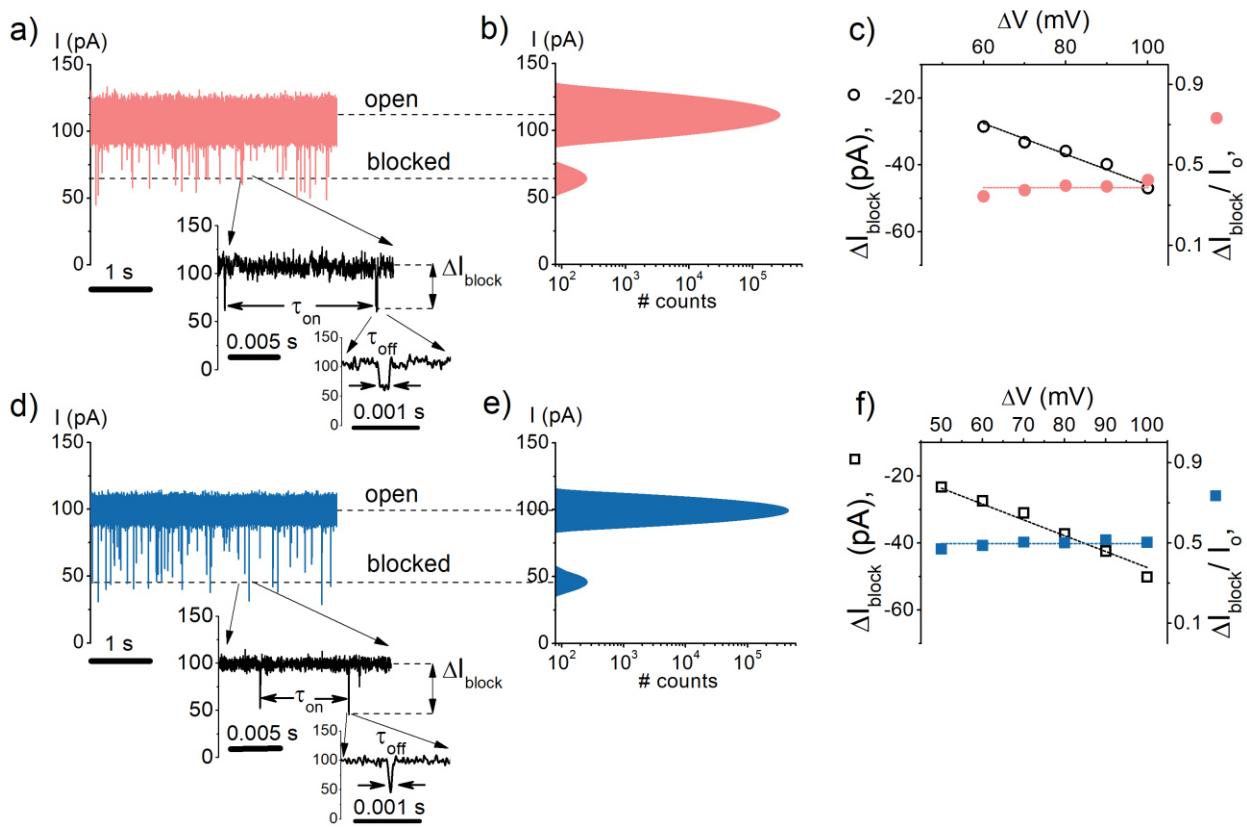
### VII.1. Influența pH-ului asupra blocajelor de curent ionic înregistrate prin $\alpha$ -HL induse de PAMAM-G1

În primul set de experimente a fost studiată interacțiunea PAMAM-G1 cu  $\alpha$ -HL în condiții de 1 M KCl, la pH = 3, respectiv pH = 7. PAMAM-G1 a fost solubilizat în metanol (20% wt) într-o concentrație de 10 mM. Dendrimerul a fost adăugat în regiunea *trans* a cuvei experimentale pentru a atinge o concentrație de 100 – 600  $\mu$ M. Sub acțiunea unei diferențe de potențial pozitive (raportate la electrodul *cis* legat la masă) PAMAM-G1 a fost electroforetic transportat la gura porului de  $\alpha$ -HL, ducând la blocarea reversibilă a acestuia, proces marcat prin scăderea curentului ionic înregistrat (Fig.VII.2.a). În urma analizei fluctuațiilor de curent ionic, au fost observate pentru ambele valori ale pH-ului existența a două stări conductive: una asociată porului liber și una asociată interacțiunii complexului dendrimer-por.



**Fig. VII.1.** Reprezentare schematică a procesului de interacțiune dintre PAMAM-G1 și  $\alpha$ -HL la (a) pH = 3, respectiv (b) pH = 7. Interacțiunea PAMAM-G1 -  $\alpha$ -HL are loc sub efectul combinat al forței electroforetice ( $\vec{F}_{elk}$ ) ce facilitează interacțiunea cu și transportul dendrimerului prin por, a forței electroosmotice ( $\vec{F}_{elo}$ ), datorate selectivității ionice a  $\alpha$ -HL și forței electrostatice ( $\vec{F}_{els}$ ) datorate încărcării electrice a resturilor de aminoacizi prezenți la gura porului.

VII.1. Infleunța pH-ului asupra blocajelor de curent ionic înregistrate prin  $\alpha$ -HL induse de PAMAM-G1



**Fig. VII.2.** Date originale ce reflectă blocajele reversibile de curent ionic datorate interacțiunii PAMAM-G1 500  $\mu$ M cu  $\alpha$ -HL la 1 M KCl pH = 3 (a) și pH = 7 (d), cu evidențierea principalilor parametri măsuраti (inset) ( $\Delta V = +100$  mV); Histograme de amplitudine ce reflectă stările conductive ale complexului dendrimer-por la pH = 3 (b) și pH = 7 (e); variația ( $\frac{I_0 - I_{block}}{I_0}$ ) a blocajului relativ de curent în funcție de diferența de potential aplicată la pH = 3 (c) și pH = 7 (f) [150].

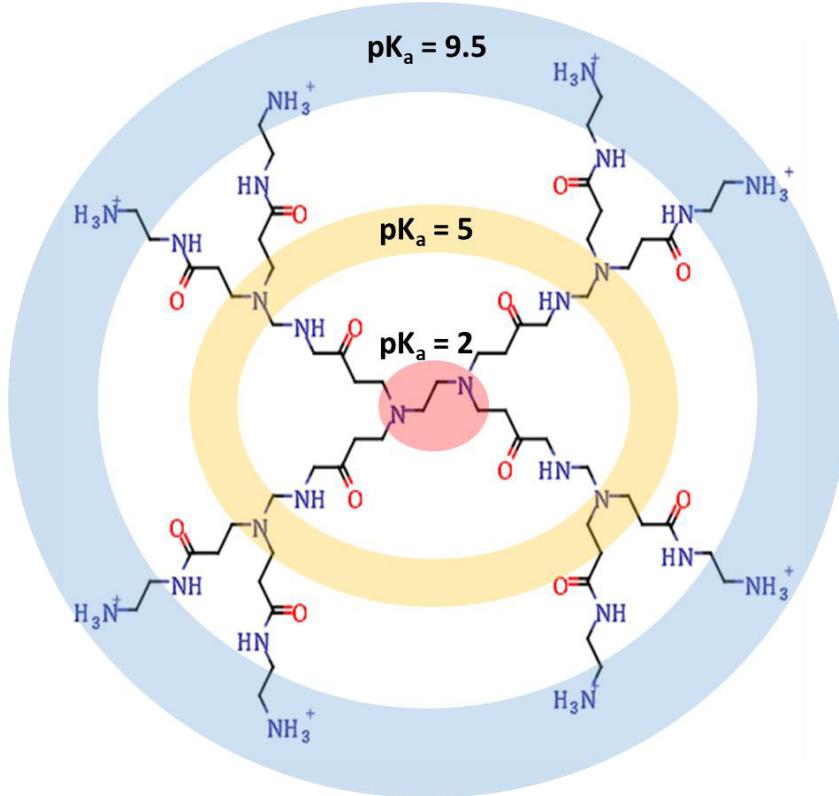
Într-o primă observație, magnitudinea relativă a blocajelor de curent datorate prezenței dendrimerului în interiorul  $\alpha$ -HL este mai mare la pH = 7 ( $\Delta I_{block}/I_0 = 0.497 \pm 0.006$ ) decât la pH = 3 ( $\Delta I_{block}/I_0 = 0.386 \pm 0.013$ ) ceea ce poate părea constraintuitiv atunci când se consideră influența documentată a pH-ului asupra conformatiei dendrimerului. La pH = 3 toate grupările  $NH_3^+$  (primare și terțiare) sunt protonate ceea ce determină, pe baza repulsiei electrostatice dintre brațele polimerului, adoptarea unei structuri spațiale extinse. La pH = 7 însă, PAMAM-G1 este parțial deprotozonată, aminele primare fiind singurele încărcate electric, ceea ce determină adoptarea unei structuri cu dimensiuni reduse. Aceste efecte nu au fost observate însă, după cum reiese din valorile măsurate ale curentului. Pentru a explica această aparentă contradicție, este necesară o analiză a relației dintre valoarea relativă a curentului și dimensiunea moleculei ce produce blocajul. După cum a fost detaliat în subcapitolul II.3, molecula care induce blocajul

## VII.1. Infleunța pH-ului asupra blocajelor de curent ionic înregistrate prin $\alpha$ -HL induse de PAMAM-G1

determină o scădere a curentului ionic înregistrat proporțională cu dimensiunile ei. Modelul dezvoltat de Blois și Bean [52] oferă o relație pentru modificările rezistenței porului ca urmare a inserției unei particule sferice, relație ce a fost ulterior îmbunătățită pentru a lua în considerare modificările de flux, poziția particulei și forma variabilă a porului [53].

$$\Delta I \propto \Delta R = \frac{4\rho d^3}{\pi D^4} \quad (\text{VII.1})$$

În relația (VII.1)  $\rho$  – rezistivitatea porului,  $d$  – diametrul moleculei din por și  $D$  – diametrul porului, în condițiile în care lungimea porului  $L \gg D$ .



**Fig. VII.3. Structura chimică a PAMAM-G1 aminele primare marcate cu albastru și cele terțiare marcate cu galben și roșu, alături de valorile  $pK_a$ -urilor acestor grupări, ce caracterizează gradul de încărcare electrică al dendrimerului în funcție de valoarea pH-ului.**

Acest model de excludere presupune totuși că analitul este sferic și neutru din punct de vedere electric, ceea ce oferă o imagine mult simplificată asupra evenimentelor de blocaj observate [44]. Deși dendrimerul poate fi idealizat în soluție, departe de por, ca fiind o moleculă

## VII.1. Infleunța pH-ului asupra blocajelor de curent ionic înregistrate prin $\alpha$ -HL induse de PAMAM-G1

sferică, în interiorul acestuia, dimensiunile și caracteristicile intrinseci devin imposibil de neglijat. La  $pH = 3$  structura ramificată a PAMAM-G1 este mai rigidă și nefavorabilă din punct de vedere steric rezidenței în zona de conștricție, blocajul de curent observat realizându-se la nivelul lumenului (Fig. VII.4.a). La  $pH = 7$  dimensiunile compacte ale dendrimerului fac posibilă ocuparea zonei de conștricție pentru un timp îndelungat și blocarea mai mare a curentului (Fig. VII.4.b). Rezultate similare au fost obținute pentru dendrimeri de diferite generații, ce au prezentat o dependență neliniară între mărimea dendrimerului și magnitudinea blocajului de curent indus [151].

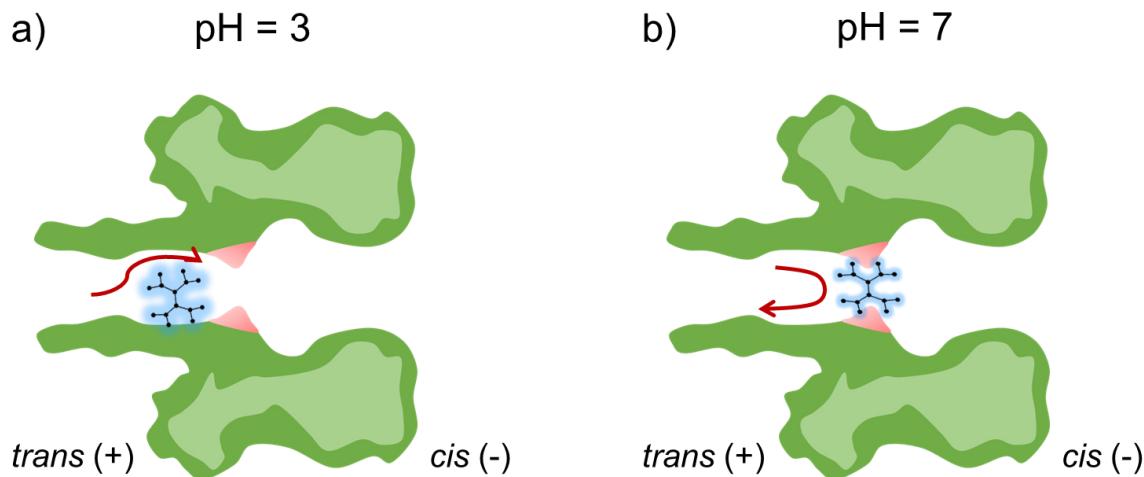
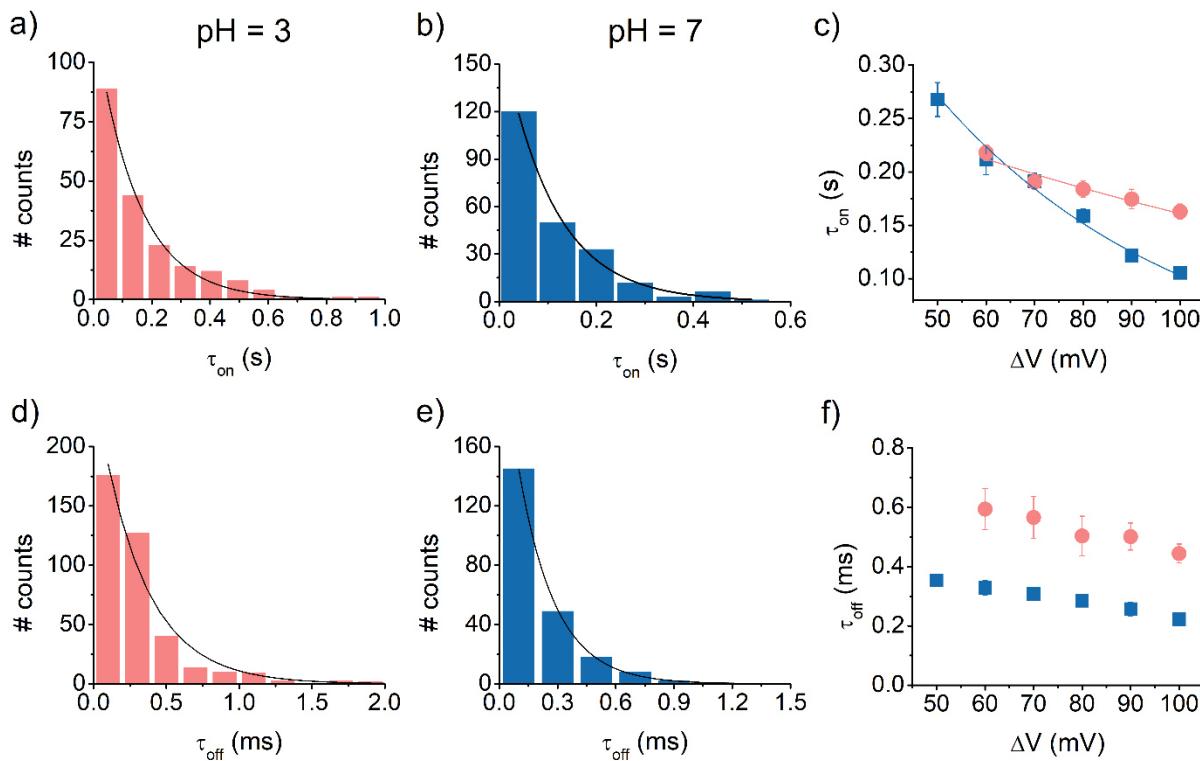


Fig. VII.4. Reprezentarea schematică a poziției dendrimerului PAMAM-G1 în interiorul nanoporului de  $\alpha$ -HL. a) La  $pH = 3$  dendrimerul prezintă o structură rigidă ce nu se conformează zonei de conștricție (marcată cu roșu) ceea ce permite accesul ionilor prin por (săgeata roșie). b) La  $pH = 7$  dendrimerul prezintă o strucțură compactă ce se conformează cu ușurință regiunii de conștricție, ceea ce restricționează semnificativ fluxul de ioni prin por (săgeata roșie), și determină înregistrarea unui blocaj de curent de magnitudine mai mare.

## VII.2. Cinetica procesului de interacțiune PAMAM-G1 – $\alpha$ -HL la variația pH-ului

În detaliile din Fig.VII.2.a și VII.2.d sunt marcați timpii dintre două evenimente de blocaj succesive ( $\tau_{on}$ ) și timpii de rezidență ai dendrimerului în nanopor ( $\tau_{off}$ ). În urma analizei valorilor determinate pentru acești parametri, la diferite diferențe de potențial, a fost posibilă caracterizarea interacțiunii dendrimer-por din punct de vedere cinetic. Valorile timpilor  $\tau_{on}$  și  $\tau_{off}$  au fost măsurate iar distribuția exponențială a valorilor a permis determinarea valorilor medii (Fig. VII.5.a,b,d,e) pentru toate diferențele de potențial aplicate ( $\Delta V = 50\div100$  mV).



**Fig. VII.5.** Histogramme ale valorilor timpilor de asociere ( $\tau_{on}$ ) și ale timpilor de disociere ( $\tau_{off}$ ) caracateristici interacțiunii PAMAM-G1 –  $\alpha$ -HL, pe baza cărora au fost calculate valorile medii la pH = 3 (a și d), respectiv pH = 7 (b și e); c) variația valorilor medii ale lui  $\tau_{on}$  cu diferența de potențial aplicată, la pH = 3 (cercuri), respectiv pH = 7 (pătrate).; punctele au fost fitate cu o ecuație de tip van't Hoff-Arrhenius (VII.2) f) variația valorilor medii ale lui  $\tau_{off}$  cu diferența de potențial aplicată, la pH = 3 (cercuri), respectiv pH = 7 (pătrate).

După cum se poate observa în Fig.VII.4.c valorile medii ale timpilor de asociere dintre PAMAM-G1 și nanopor scad cu creșterea diferenței de potențial aplicate ( $\Delta V$ ), consistent cu creșterea forței electroforetice ce acționează asupra dendrimerului, în ambele condiții experimentale. Cu toate acestea, se poate observa o variație mai rapidă în cazul experimentelor efectuate la pH = 7 față de cele efectuate la pH = 3. Variația poate fi descrisă cu ajutorul unei ecuații de tip van't Hoff-Arrhenius:

$$rate_{on} = r_0 \cdot e^{\frac{z_{eff}|e^{-}|\Delta V}{k_B T}} \quad (\text{VII.2})$$

Unde termenii au aceeași semnificație ca și în capitolele anterioare:  $r_0 = A \cdot e^{\frac{-\Delta G^{*}}{k_B T}}$  - rata de asociere în absența diferenței de potențial,  $A$  – termen pre-exponențial,  $\Delta G^{*}$  - bariera energetică asociată procesului de interacțiune,  $k_B$  - constanta Boltzman,  $T$  - temperatura absolută,  $z_{eff}$  - valența efectivă a dendrimerului și  $|e^{-}|$  - sarcina electrică elementară. Prin urmare se poate folosi relația (VII.2) pentru a fita punctele din Fig. VII.4.c dacă se ține cont de relația  $rate_{on} = \tau_{on}^{-1}$ .

Pe baza ratelor de asociere au fost calculate constantele de rată de asociere  $k_{on} = rate_{on} \times [PAMAM - G1]^{-1}$  (Fig. VII.6) ce oferă o dovedă mai clară a faptului că asocierea este mai facilă la pH neutru (Tabel VII.1)

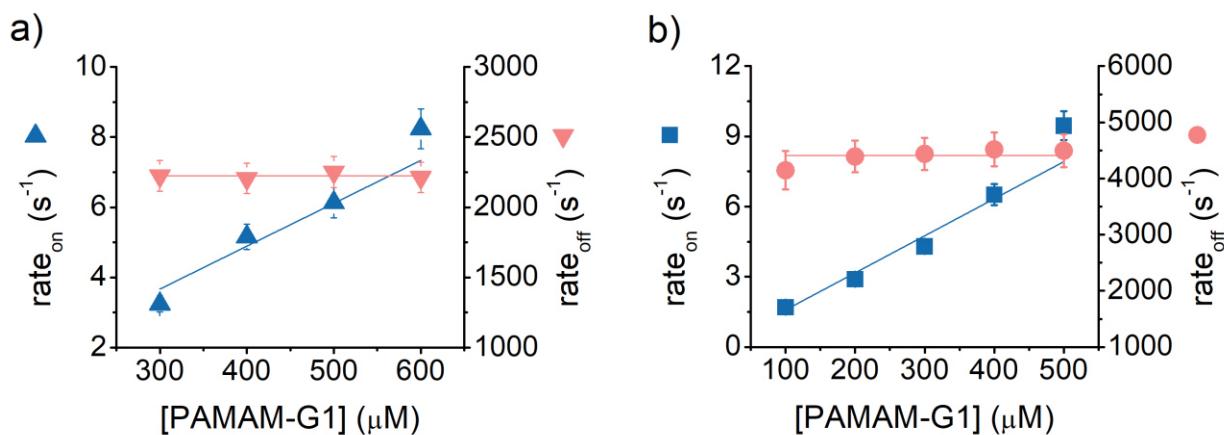


Fig. VII.6. Variația ratelor de asociere ( $rate_{on}$ ) și disociere ( $rate_{off}$ ) cu concentrația de PAMAM-G1 la pH = 3 (a), respectiv pH = 7 (b) la  $\Delta V = +100$  mV; pe baza fitării punctelor a fost posibilă determinarea constantei ratelor de asociere  $k_{on} = rate_{on} \times [PAMAM-G1]^{-1}$  și disociere  $k_{off} = rate_{off}$  [150].

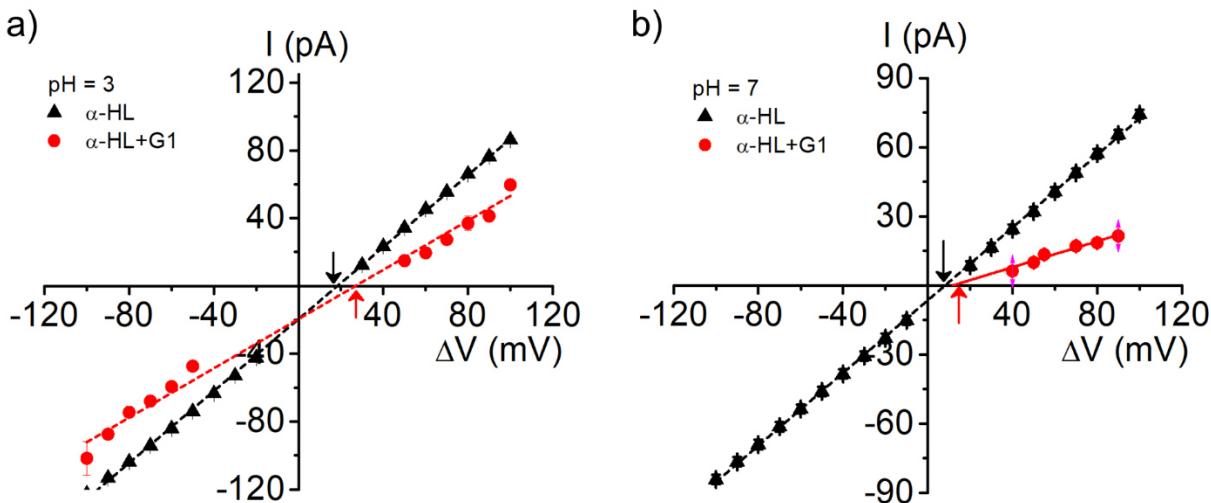
**Tabel VII.1. Valorile constantelor de rată de asociere, respectiv de disociere ce caracterizează interacțiunea PAMAM-G1 – α-HL, la  $\Delta V = +100$  mV, pentru pH = 3 și pH = 7.**

	$k_{on}$ (s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	$k_{off}$ (s <sup>-1</sup> )
pH = 3	$12.2 \times 10^3 \pm 0.6 \times 10^3$	$2.2 \times 10^3 \pm 9.95$
pH = 7	$15.8 \times 10^3 \pm 0.8 \times 10^3$	$4.4 \times 10^3 \pm 60.3$

Cinetica diferită a procesului de asociere poate fi explicată dacă sunt analizate efectele forțelor implicate în medierea interacțiunii, reprezentate schematic în Fig.VII.1. Variația forței electroforetice, ca urmare a încărcării electrice diferite, nu poate fi responsabilă pentru modificările observate în cinetica reacției, deoarece sarcina estimată a dendrimerului, pe baza relației Hendersson-Hasselback (VII.3), este mai mare la pH = 3 ( $q = +12e^-$ ) decât la pH = 7 ( $q = +8e^-$ ), ceea ce ar rezulta într-o asociere diferită și opusă rezultatelor obținute.

$$q_{total} = \sum q^- + \sum q^+ = \sum_{n=1}^N \frac{(-1) \times n}{1 + 10^{-(pH-pKa)}} + \sum_{m=1}^M \frac{(1) \times m}{1 + 10^{+(pH-pKa)}} \quad (\text{VII.3})$$

La pH = 3 gura porului prezintă o încărcare electrică pozitivă (~ +5.5e<sup>-</sup>) datorată resturilor de aminoacizi ce formează această regiune (14 Asp și 7 Lys) [41]. Din acest motiv, între dendrimer și gura porului se manifestă o forță de repulsie electrostatică ( $\vec{F}_{els}$ ) ce aumentează bariera energetică. La pH = 7 sarcina de la gura porului este inversată (~ -7e<sup>-</sup>), ceea ce duce la apariția unei forțe  $\vec{F}_{els}$  atractive [41]. Suplimentar acestei forțe, un rol decisiv în cadrul procesului de interacțiune îl are forța electroosmotică ( $\vec{F}_{elo}$ ), datorată selectivității anionice a α-HL. Selectivitatea ionică apare datorită resturilor de aminoacizi încărcăți electric din zona de constricție a α-HL ce determină fluxul preferențial al anionilor [152]. Pentru a estima impactul forței electroosmotice au fost realizate experimente pentru determinarea selectivității ionice a porului. Aceste măsurători au fost realizate în prezența unui gradient de concentrație, prin utilizarea unei soluții de 0.1 M KCl la *cis* și a unei soluții 3 M KCl la *trans*, la pH = 7 în 10 mM HEPES, soluție tampon sau la pH = 3 în 5 mM MES. Suplimentar electrozii de Ag/AgCl au fost conectați la cuvă prin intermediul unor punți de agar (~1% w/v) dizolvat în 3 M KCl. Pentru determinarea permeabilității ionilor, pentru ambele valori ale pH-ului, s-au realizat diagrame curent tensiune (I-ΔV), ce prin fitare permit determinarea potențialului reversibil  $\psi_{rev}$  (Fig. VII.7).



**Fig. VII.7. Diagrame curent tensiunea înregistrate prin porul de  $\alpha$ -HL în condiții de gradient de concentrație în prezență (▲), respectiv absență dendrimerului (●) PAMAM-G1 care se află în interiorul nanoporului, la pH = 3 (a) și pH = 7 (b) [150].**

Valorile potențialelor reversibile ( $\psi_{rev,pH=3}=18.32$  mV și  $\psi_{rev,pH=7}=8.21$  mV) au fost apoi introduse în ecuația Goldman-Hodgkin-Katz [153]:

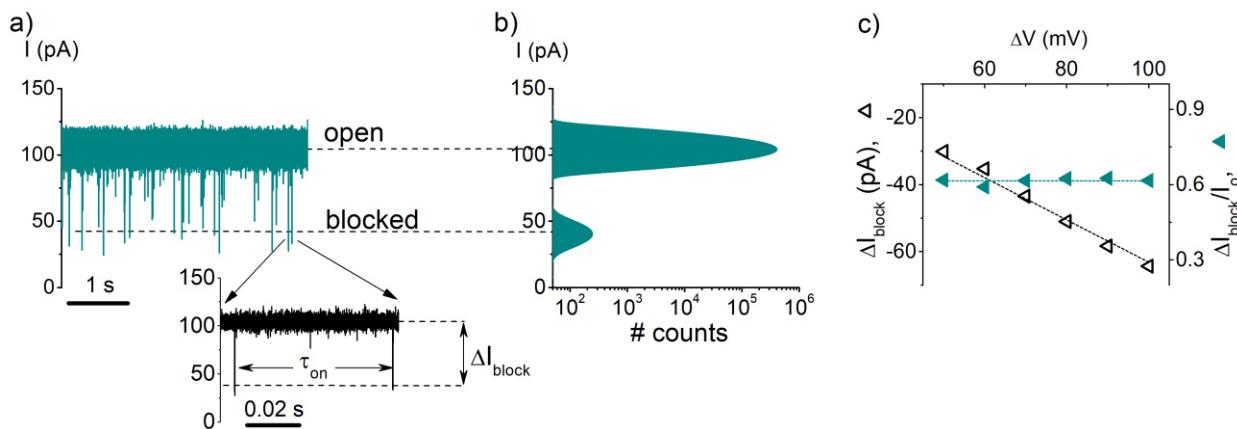
$$\frac{P_{K^+}}{P_{Cl^-}} = \frac{a_{Cl^-}^{trans} - a_{Cl^-}^{cis} \cdot \exp\left(\frac{\psi_{rev}F}{RT}\right)}{a_{K^+}^{trans} \cdot \exp\left(\frac{\psi_{rev}F}{RT}\right) - a_{K^+}^{cis}} \quad (\text{VII.4})$$

unde  $a_{Cl^-}^{trans}$ ,  $a_{K^+}^{trans}$ ,  $a_{Cl^-}^{cis}$ ,  $a_{K^+}^{cis}$  – activitățile chimice ale ionilor de  $K^+$  și  $Cl^-$  în regiunea *trans* și respectiv *cis* a membranei, calculate pe baza coeficientului de activitate  $\gamma_i$  ( $a_i = \gamma_i \cdot c_i$ , unde  $c_i$  reprezintă concentrația de sare) a cărui valori se găsesc tabelate în literatură [154].

Atât la pH = 3 cât și la pH = 7,  $\alpha$ -HL este anionic selectivă, fluxul electroosmotic fiind orientat de la *cis* la *trans*, în contextul diferențelor de potențial aplicate. Forța electroosmotica se opune inserției dendrimerului în interiorul nanoporului, efectul fiind mai puternic la pH acid ( $P_{K^+}/P_{Cl^-} \sim 0.453$ ) decât la pH neutru ( $P_{K^+}/P_{Cl^-} \sim 0.703$ ) [150].

Într-un experiment separat, efectuat la pH = 10, fluxul electroosmotic a fost capabil să faciliteze interacțiunea dintre dendrimer și  $\alpha$ -HL, atunci când dendrimerul este lipsit de sarcină electrică. Pe baza relației Hendersson-Hasselbach (VII.3) și pe observații experimentale existente

în literatură [136], la această valoarea a pH-ului, sarcina dendrimerului este nulă ( $q \approx 0$ ), ceea ce nu a împiedicat însă observarea și analiza evenimentelor de blocaj (Fig. VII.8).



**Fig. VII.8. a)** Date originale ce reflectă blocajele reversibile de curent ca urmare a interacțiunii PAMAM-G1 500  $\mu$ M cu  $\alpha$ -HL, la 1 M KCl pH = 10,  $\Delta V$  = +100 mV; **b)** Histograme de amplitudine ce reflectă stările conductive ale complexului dendrimer-por la pH = 10; **c)** variația ( $\frac{I_0 - I_{block}}{I_0}$ ) a blocajului relativ de curent în funcție de diferența de potențial aplicată [150].

În condițiile în care dendrimerul prezintă o încărcare electrică netă nulă, forța electroforetică ce acționează asupra dendrimerului la pH = 3 și pH = 7 este anulată, însă fluxul electroosmotic la pH = 10 este inversat, fiind orientat de la *trans* la *cis* [152]. Această componentă este singura capabilă să asigure inserția dendrimerului în interiorul  $\alpha$ -HL, atunci când interacțiunile de natură electrică și electrostatică sunt eliminate. În concordanță cu explicația folosită în subcapitolul VII.1, pentru valorile relative ale curentului ionic înregistrat în momentul blocajului, la pH bazic, forma compactă, globulară, adoptată de dendrimer determină o reducere semnificativă a curentului ionic înregistrat ( $\Delta I_{block}/I_0 = 0.615 \pm 0.005$ ).

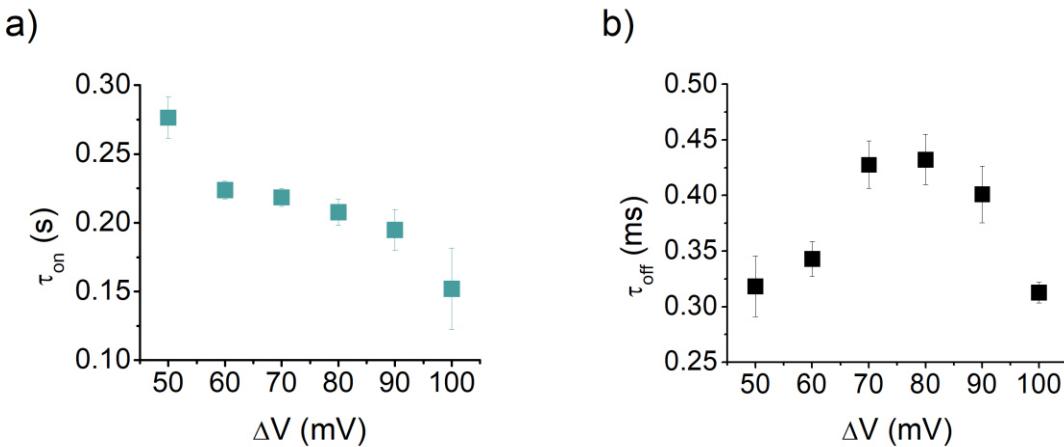


Fig. VII.9. a) Variația valorilor medii ale timpilor de asociere  $\tau_{on}$  și b) ale timpilor de disociere  $\tau_{off}$  cu diferența de potențial aplicată, dintre PAMAM-G1 (500  $\mu$ M) și  $\alpha$ -HL la pH = 10.

Determinarea valorilor medii ale timpilor de asociere ( $\tau_{on}^{pH=10}$ ) ne arată că interacțiunea are loc mai rapid la creșterea diferenței de potențial dar cinetica procesului de interacțiune nu urmărește modelul dominat de barieră, utilizat la pH = 3 și pH = 7 (relația VII.2). Capacitatea fluxului electroosmotic de a antrena molecule și de a facilita interacțiunea cu nanopori a fost observată pentru peptide [33] și ADN [155], ceea ce reflectă suplimentar aportul adus de această componentă procesului de interacțiune studiat.

În Fig. VII.5.f sunt reprezentate valorile medii ale timpilor de disociere  $\tau_{off}$ , calculate pe baza distribuției exponențiale ale valorilor măsurate (Fig. VII.5.d și e). În funcție de diferența de potențial aplicată. Variația descrescătoare a valorilor  $\tau_{off}$  cu diferența de potențial aplicată arată că dendrimerului translocă din regiunea *trans* în regiunea *cis*, dar acest proces are loc mai greu la pH = 3, decât la pH = 7. Valorile constantelor  $k_{off}$ , determinate pe baza Fig. VII.6, indică și ele existența unei cinetici de disocier mai lente la pH = 3, ceea ce confirmă existența unei structuri, rigide, extinse spațial, ce nu se conformează constrângerilor spațiale impuse de cavitatea  $\alpha$ -HL. Structura adoptată la pH netru pe de altă parte este mai favorabilă procesului de translocare după cum este indicat de valorile medii ale timpilor de disociere și de constanta de rată de disociere. Cumularea penalităților induse de constrângerile spațiale cu fluxul electroosmotic nefavorabil determină comportamentul observat la pH neutru și acid.

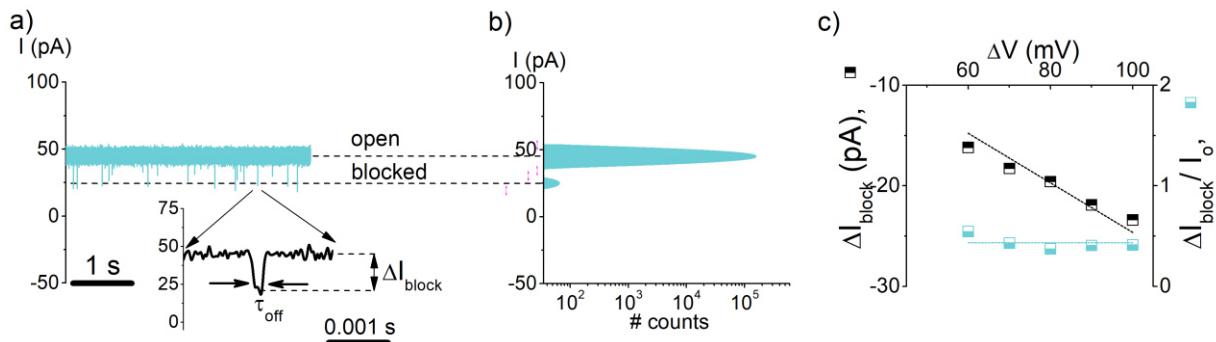
## VII.2. Cinetica procesului de interacțiune PAMAM-G1 – α-HL la variația pH-ului

---

Ca o completare adusă descrierii făcute la pH = 10, forța electroosmotică ce facilitează interacțiunea dintre dendrimer și α-HL în aceste condiții, nu este capabilă să asigure translocarea către regiunea *cis* (Fig. VII.9.b). Pragul de +80 mV pentru  $\tau_{off}^{pH=10}$  ne arată că translocare are loc doar atunci când fluxul electroosmotic ce antrenează dendrimerul devine suficient de puternic pentru a învinge forțele de frecare cu pereții interiori ai nanoporului.

### VII.3. Augmentarea barierei energetice a procesului de asociere dendrimer-por prin scăderea sării ionice

Influența repulsiei electrostatice dintre grupările funcționale asupra rigidității dendrimerului a fost verificată suplimentar prin realizarea unui alt set de experimente la pH = 7, dar în condiții de sărăie ionică redusă (0.5 M KCl). Dacă la 1 M KCl lungimea Debye este ~0.3 nm, la 0.5 M KCl,  $\lambda_D \sim 0.43$  nm, ceea ce va afecta comportamentul dendrimerului în interiorul  $\alpha$ -HL. Din cauza concentrației mai mici de sare, valoarea curentului înregistrat este redusă semnificativ ( $I_0 \cong 45,08$  pA, la  $\Delta V = +100$  mV). Blocajul relativ al curentului ionic la 0,5 M KCl este  $\Delta I_{block}/I_0 = 0.433 \pm 0.029$ , mai mic decât la 1 M, ceea ce indică creșterea rigidității și a volumului ocupat în por, similar efectelor induse de scăderea pH-ului.



**Fig. VII.10.** a) Date originale ce reflectă blocajele reversibile de curent ca urmare a interacțiunii PAMAM-G1 500  $\mu$ M cu  $\alpha$ -HL la 0,5 M KCl pH = 7 ( $\Delta V = +100$  mV); b) Histograme de amplitudine ce reflectă stările conductive ale complexului dendrimer-por la 0,5 M KCl; c) variația relativă ( $\frac{I_0 - I_{block}}{I_0}$ ) a curentului ionic în funcție de diferența de potențial aplicată la 0,5 M KCl [150].

Valorile timpilor medii de asociere ( $\tau_{on}$ ), măsuăriți în condiții de sărăie ionică scăzută, sunt mai mari, față de valorile obținute la 1 M KCl, după cum se poate observa în Fig. VII.11.a. Cu alte cuvinte, reducerea concentrației de sare afectează negativ procesul de asociere, în ciuda creșterii atracției electrostatice dintre dendrimer și gura porului.

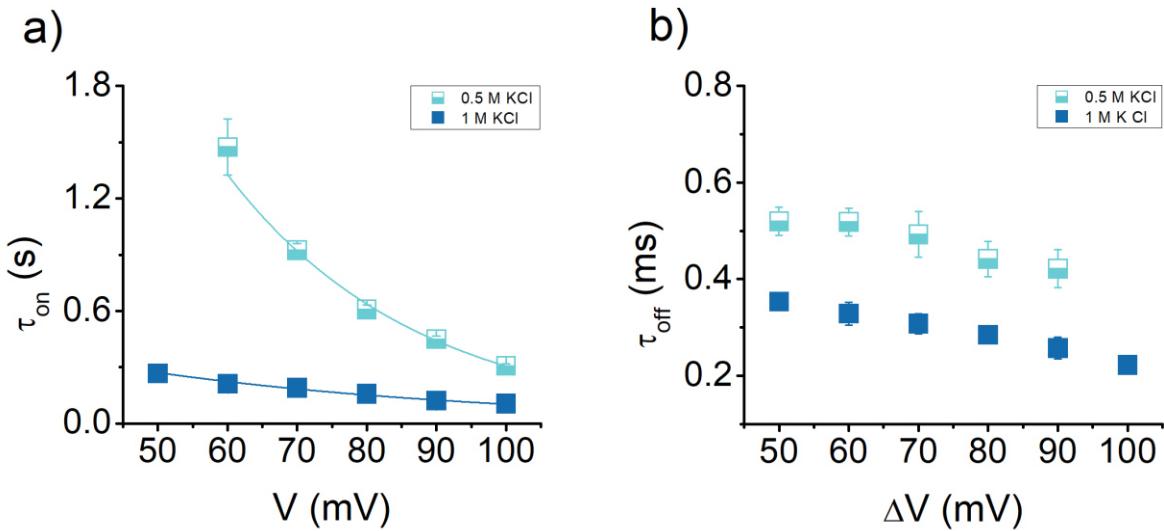


Fig. VII.11. a) Variația valorilor medii ale timpilor de asociere și b) disociere cu diferența de potențial aplicată, dintre PAMAM-G1 și  $\alpha$ -HL la 0,5 M KCl (□), raportat la valorile obținute pentru 1 M KCl (■).

Variația valorilor medii ale timpilor  $\tau_{on}$  cu diferența de potențial aplicată a fost fitată cu relația van't Hoff - Arrhenius (VII.2), ce a permis determinarea parametrilor  $r_0$  și  $z_{eff}$ , ce caracterizează procesul de interacțiune (Tabelul VII.2)

Tabelul VII.2. Valorile parametrilor  $r_0$  și  $z_{eff}$  calculați pe baza relației (VII.2) pentru 0,5 M KCl pH = 7; pentru comparație sunt reprezentate și valorile determinate la 1 M KCl pH = 7.

	$r_0$ ( $s^{-1}$ )	$z_{eff}$
0,5 M KCl	$0.08 \pm 0.01$	$0.94 \pm 0.04$
1 M KCl	$1.40 \pm 0.14$	$0.49 \pm 0.03$

Pe baza datelor din Tabelul VII.2 se poate observa că sarcina efectivă a PAMAM-G1 (indicată prin valență efectivă  $z_{eff}$ ) este mai mare la 0,5 M KCl, ceea ce este în concordanță cu o atracție electrostatică mai puternică cu deschiderea *trans* a porului, ca urmare a ecranării electrostactice reduse, față de 1 M KCl. Rata  $r_0$  este însă mai mică la 0,5 M KCl decât la 1 M KCl, ceea ce ne permite să intuim că scăderea sării ionice a determinat creșterea barierei energetice  $\Delta G^*$  caracteristică reacției de asociere dendrimer-por. Pentru confirmare, am considerat în aceste condiții, termenul pre-exponențial  $A$ , ce intră în componența ratei  $r_0$  (relația V.4), identic pentru

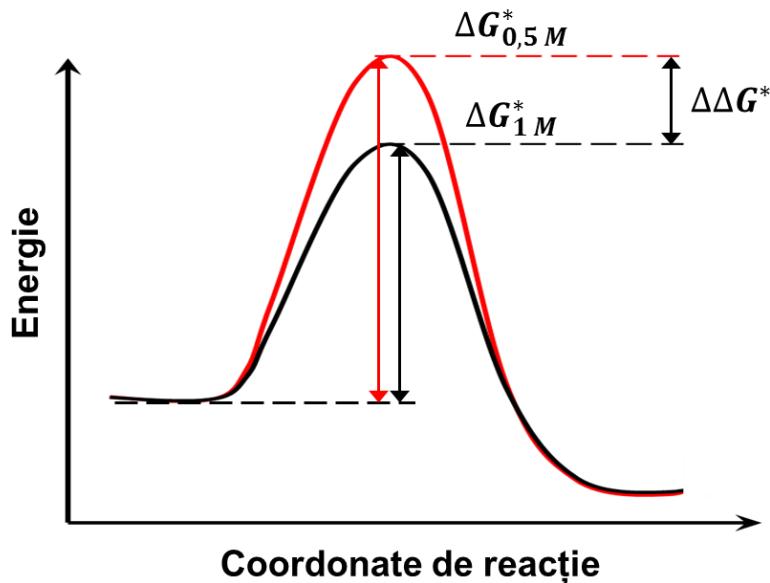
### VII.3. Augmentarea barierei energetice a procesului de asociere dendrimer - por prin scăderea sării ionice

ambele concentrații de sare. Acest lucru ne permite estimarea diferenței în energie liberă  $\Delta\Delta G^*$  asociată schimbării sării ionice (relațiile VII.5 și VII.6).

$$\frac{r_0^1}{r_0^{0.5}} = e^{\frac{(\Delta G_{0.5}^* - \Delta G_1^*)}{k_B T}} \quad (\text{VII.5})$$

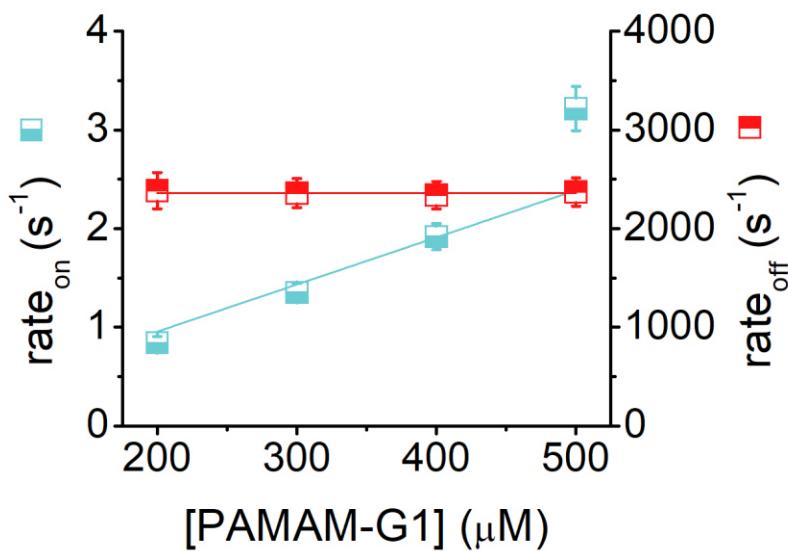
$$\Delta\Delta G^* = \Delta G_{0.5}^* - \Delta G_1^* = k_B T \cdot \ln \frac{r_0^1}{r_0^{0.5}} \quad (\text{VII.6})$$

La temperatura  $T = 295.15$  K valoarea diferenței de energie dintre bariera energetică la 0.5 M KCl și la 1 M KCl este  $\Delta\Delta G^* = 1.69$  kcal/mol. Cum penalitatea asociată inserției dendrimerului în por nu este de natură entalpică, dovedă fiind sarcina mai mare ce interacționează cu porul la 0,5 M KCl ( $z_{eff}$ ), este evident că schimbarea conformatională, determinată de creșterea repulsiei electrostatice dintre amine, impune o structură extinsă moleculei, căreia îi este asociată o barieră de natură entropică mai mare la partaționarea în interiorul α-HL (Fig. VII.12).



**Fig. VII.12. Reprezentare schematică a creșterii barierei energetice ca urmare a scăderii concentrației de sare de la 1 M KCl la 0,5 M KCl**

Creșterea barierei energetice determină o creștere a constantei de rată de asociere ( $k_{on}$ ), determinată în Fig. VII.13, relativ la valoarea constantei pentru 1 M KCl (Tabelul VII.3).



**Fig. VII.13.** Variația ratelor de asociere ( $rate_{on}$ ) și disociere ( $rate_{off}$ ) cu concentrația de PAMAM-G1 la 0,5 M KCl, pH = 7,  $\Delta V = +100$  mV; pe baza fitării punctelor a fost posibilă determinarea constatelor de rată de asociere  $k_{on} = rate_{on} \times [PAMAM-G1]^{-1}$ , respectiv disociere  $k_{off} = rate_{off}$  [150].

**Tabel VII.3.** Valorile constatării ratelor de asociere și disociere ce caracterizează interacțiunea PAMAM-G1 –  $\alpha$ -HL, la  $\Delta V = +100$  mV, pentru pH = 3 și pH = 7.

	$k_{on} (s^{-1} M^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$
<b>0.5 M KCl (pH = 7)</b>	$4.8 \times 10^3 \pm 0.4 \times 10^3$	$2.4 \times 10^3 \pm 9.4$
<b>1 M KCl (pH = 7)</b>	$15.8 \times 10^3 \pm 0.8 \times 10^3$	$4.4 \times 10^3 \pm 60.3$

Din analiza timpilor de rezidență a dendrimerului în interiorul  $\alpha$ -HL, în condiții de 0,5 M KCl pH = 7 (Fig. VII.11.b), reiese că moleculele translocă în regiunea *cis*, dar acest proces are loc mai lent decât în condiții de 1 M KCl. Cinetica lentă a reacției de disociere este confirmată și de valoarea constantei  $k_{off}$ , mai mică la 0,5 M KCl. Rezultatele confirmă ipotezele de lucru și demonstrează că repulsia electrostatică dintre brațele dendrimerului determină o schimbare de conformatie și de rigiditate în structura PAMAM-G1. În aceste condiții dendrimerul se va opune limitărilor spațiale impuse de cavitatea nanometrică a porului și va traversa  $\alpha$ -HL mai puțin eficient.

#### **VII.4. Estimarea coeficientului de difuzie pentru PAMAM-G1 în interiorul $\alpha$ -HL în condiții diferite de pH și tărie ionică**

Pentru a elucida suplimentar mecanismul de translocare, în condiții diferite de pH și tărie ionică, a dendrimerului PAMAM-G1 în interiorul  $\alpha$ -HL, a fost propus un formalism pentru estimarea coeficientului de difuzie a unei particule încărcate electric, în prezența unui câmp electric constant și a unui flux electroosmotic, pornind de la valorile medii ale timpilor de rezidență în nanopor  $\tau_{off}$ .

După cum a fost demonstrat în capitolul II, valoarea medie a timpilor  $\tau_{off}$  este dată de funcția densitate de probabilitate  $pdf(t)$  (relația II.63). Conform modelului dat Ling [156] această funcție este dată de relația:

$$pdf(t) = \frac{L}{\sqrt{4\pi Dt^3}} \cdot e^{-\frac{(L-v_{drift})^2}{4Dt}} \quad (\text{VII.7})$$

unde  $L$  – lungimea porului ( $\sim 10$  nm),  $D$  – coeficientul de difuzie și  $v_{drift}$  – viteza de drift a dendrimerului, ca urmare a efectelor cumulate ale forței electroforetice ( $\vec{F}_{elp}$ ) și electroosmotice ( $\vec{F}_{elo}$ ). Astfel viteza de drift este compusă din componentelor electroforetice ( $v_{elp}$ ) și electroosmotice ( $v_{elo}$ ) ale vitezei:

$$v_{drift} = v_{elp} - v_{elo} = \mu \frac{\Delta V}{L} - \frac{1 - \frac{P_{K^+}}{P_{Cl^-}}}{1 + \frac{P_{K^+}}{P_{Cl^-}}} \cdot \frac{N_w \cdot I_{bloc}}{|e^-| \cdot s_{por} \cdot [H_2O]} \quad (\text{VII.8})$$

Cu  $\mu = \frac{z|e^-|D}{k_B T}$  – mobilitatea electroforetică a dendrimerului,  $P_{K^+}, P_{Cl^-}$  – permeabilitățile ionilor de  $K^+$  și  $Cl^-$  prin por atunci când acesta este blocat de PAMAM-G1,  $N_w$  – numărul de molecule de apă asociate fiecărui ion ( $\sim 10$ ),  $[H_2O]$  – concentrația de apă în molecule/ $m^3$  ( $\sim 3.35 \times 10^{28}$  molecule/ $m^3$ ),  $s_{por}$  – secțiunea transversală media a  $\alpha$ -HL ( $\sim 3.14 \times 10^{-18} m^2$ ),  $I_{bloc}$  –

#### VII.4. Estimarea coeficientului de difuzie a PAMAM-G1 în interiorul $\alpha$ -HL în condiții diferite de pH și sărăcie ionică

valoarea curentului rezidual înregistrat când PAMAM-G1 blochează  $\alpha$ -HL iar restul termenilor reprezintă mărimi cunoscute.

Pe baza relației (VII.7) și (II.63) putem scrie:

$$\bar{t}_{off} = \frac{1}{rate_{off}} = \int_0^{\infty} t \cdot \frac{L}{\sqrt{4\pi D t^3}} \cdot e^{-\frac{(L-v_{drift})^2}{4Dt}} dt \quad (\text{VII.9})$$

Este posibilă calcularea coeficientului de difuzie, dacă se cunosc valorile permeabilităților speciilor ionice  $K^+$  și  $Cl^-$  în prezența dendrimerului, calculate pe baza relației (VII.5) și a valorilor potențialelor reversibile  $\psi_{rev,pH=3}^{PAMAM-G1}=26.73$  mV și  $\psi_{rev,pH=7}^{PAMAM-G1}=11.84$  mV (Fig. VII.7). La pH = 7 a fost calculată valoare  $P_{K^+}/P_{Cl^-} \sim 0.601$  iar la pH = 3 a fost calculată valoare  $P_{K^+}/P_{Cl^-} \sim 0.350$  pentru porul blocat de dendrimer. Se poate observa că prezența dendrimerului în interiorul porului de  $\alpha$ -HL determină scăderea selectivității anionice, efect mai pregnant la pH acid (~ 29%) decât la pH neutru (~ 17%).

**Tabel VII.4. Valorile estimate ale coeficienților de difuzie a PAMAM-G1 în interiorul  $\alpha$ -HL pentru condițiile experimentale utilizate.**

	pH = 3 (1 M KCl)	pH = 7 (1 M KCl)	pH = 7 (0.5 M KCl)
D ( $cm^2 s^{-1}$ )	$(3.04 \pm 0.27) \times 10^{-8}$	$(1.78 \pm 0.19) \times 10^{-8}$	$(1.12 \pm 0.08) \times 10^{-8}$

Prin combinarea relațiilor (VII.8) și (VII.9) au fost calculate valorile coeficienților de difuzie ale PAMAM-G1 în interiorul  $\alpha$ -HL, pentru valori distincte ale pH-ului și ale concentrației de sare (Tabelul VII.4). Valorile obținute pentru coeficientul de difuzie a PAMAM-G1 în soluție ( $\sim 2,138 \times 10^{-6} cm^2 s^{-1}$ ) [157] sau prin cristale coloidale cu nanopori de 14 nm ( $\sim 2,35 \times 10^{-6} cm^2 s^{-1}$ ) [158] sunt cu două ordine de mărime mai mari decât valorile obținute de noi pentru PAMAM-G1 în interiorul nanoporului. Mai mult decât atât, la pH = 3, când condițiile au impus o structură extinsă spațial a dendrimerului, coeficientul de difuzie a fost estimat ca fiind aproximativ de două ori mai mare decât la pH = 7, ceea ce contrazice dependența lui  $D$  față de raza  $r$  a moleculei, conform relației Stokes-Einstein:

VII.4. Estimarea coeficientului de difuzie a PAMAM-G1 în interiorul  $\alpha$ -HL în condiții diferite de pH și sărăcie ionică

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (\text{VII.10})$$

Cu toate acestea, relația (VII.10) se referă la particule sferice de rază  $r$ , aproximativ ce pentru dendrimerul prezent în interiorul  $\alpha$ -HL nu este precisă, după cum a mai fost prezentat în cadrul acestui capitol și observat în experimente anterioare [159]. Astfel, dendrimerul prezintă o sarcină electrică nenulă ce permite stabilirea unor interacțiuni electrostatice cu suprafața interioară a porului, încărcată electric. Aceste interacțiuni pot modula diferit forța de frecare simțită de dendrimer în procesul de translocare, în funcție de valoarea pH-ului (Fig.VII.14). La pH = 3 profilul electrostatic al cavității interioare porului este predominant pozitiv, ceea ce duce la stabilirea unor forțe de repulsie electrostatică cu dendrimerul, ducând la difuzia rapidă a acestuia prin por. La pH = 7 însă, resturile de aminoacizi favorizează o interacțiune atractivă din punct de vedere electrostatic cu dendrimerul, manifestată într-o valoare mai mică a coeficientului de difuzie.

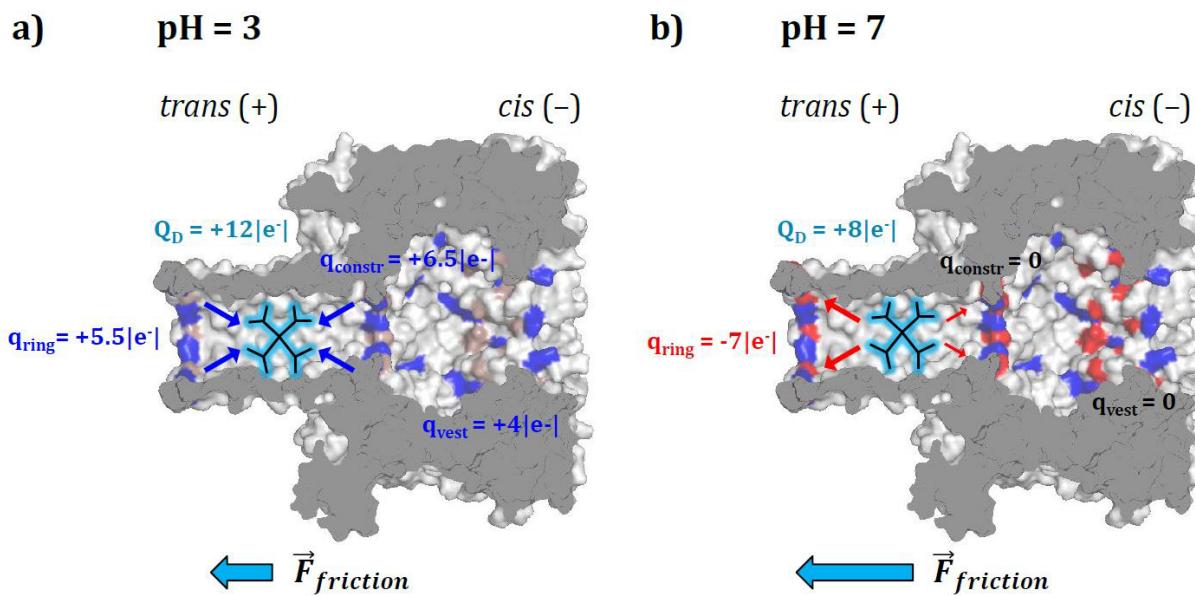


Fig.VII.14. Reprezentarea schematică a interacțiunilor electrostatice stabilite între PAMAM-G1 și suprafața interioară a porului de  $\alpha$ -HL, la pH acid și pH neutru, ce afectează difuzia dendrimerului prin por, prin modularea forței de frecare [150].

---

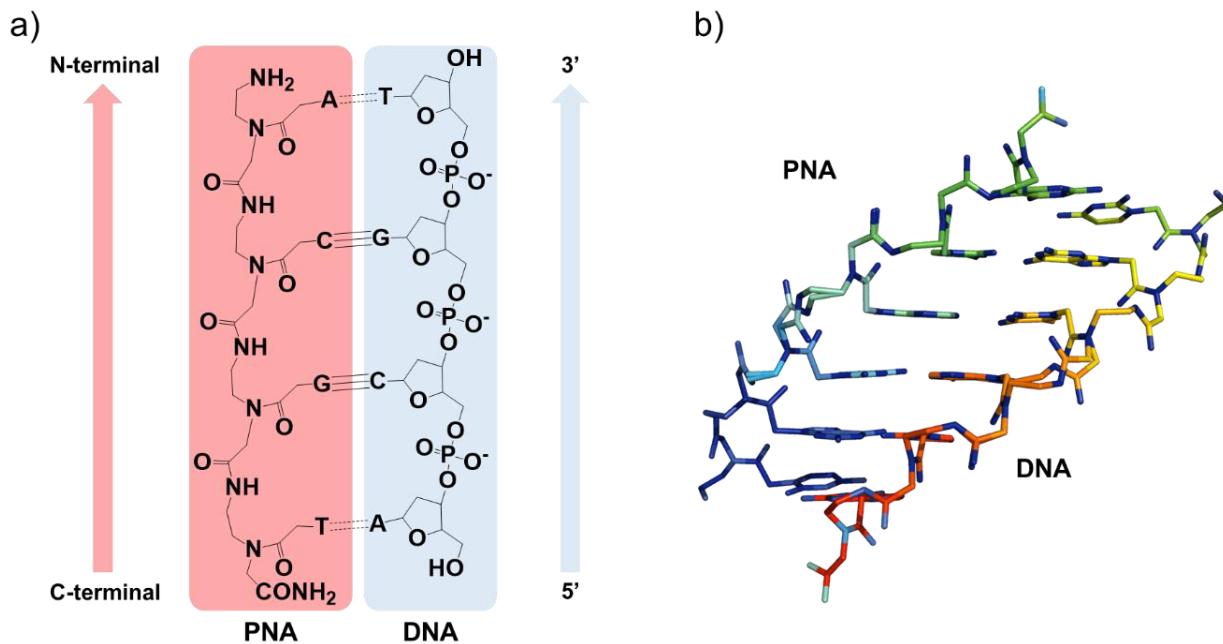
## Concluzii

- Rezultatele obținute au arătat că procesul de interacțiune dintre dendrimerul PAMAM-G1 și nanoporul de  $\alpha$ -HL este sensibil la variația pH-ului și a sării ionice a soluției, datorită modificărilor conformatiionale suferite de structura dendrimerului, observate indirect prin intermediul parametrilor măsuiați.
- În cazul experimentelor derulate în soluție cu pH și sărăie ionică scăzută, magnitudinea blocajelor porului de către dendrimer și durata necesară translocării acestuia prin por a indicat faptul că dendrimerul fiind caracterizat în aceste condiții de o rigiditate mai ridicată, acesta se conformează mai greu nano-confinării în spațiul intern al nanoporului.
- În cazul experimentelor derulate în soluție și sărăie ionică mai ridicată s-a putut observa o scădere a barierei energetice asociate partaționării dendrimerului în por, ca urmare a dimensiunilor compacte adoptate de către dendrimer în aceste condiții. Acest lucru indică importanța repulsiei electrostatice în reglarea structurii dendrimerului și posibilitatea modulației acestor forțe prin ecranarea grupărilor amino.
- Analiza statistică a timpilor medii de rezidență în por, a făcut posibilă estimarea coeficienților de difuzie la diferite concentrații de sare și pH, în condiții de confinare nanometrică.
- Aceste rezultate ilustrează răspunsul PAMAM-G1 la schimbarea condițiilor fiziole, proprietate utilă în dezvoltarea aplicațiilor ce urmăresc transportul și eliberarea controlată a medicamentelor.
- Înțelegerea fenomenelor de transport prin pori este relevantă dezvoltării aplicațiilor biomedicale ce urmăresc livrarea moleculelor cu rol terapeutic în interiorul celulelor, procedeu posibil prin utilizarea concomitentă a dendrimerilor de generație mică și a nanoporilor proteici.

## VIII. Detalii structurale și funcționale ale acizilor peptido-nucleici

### VIII.1. Structura generală a acizilor peptido-nucleici

Acizii peptido-nucleici ('Peptide Nucleic Acids' – PNA) sunt oligomeri nucleobazici, la care structura de legătură este formată din unități N-(2-aminoetil)-glicină, unite prin legături peptidice, bazele purinice și pirimidinice fiind atașate prin legături metilen carbonil. PNA-urile sunt analogi sintetici ai ADN-ului, neutri din punct de vedere electric, datorită absenței grupărilor fosfat din structură, sintetizați original ca liganzi specifici pentru recunoașterea structurilor dublu-helix de ADN. Aceste molecule se pot ataşa prin perechi Hoogsteen, la nivelul canalului major ('major groove'), formând structuri de triplu-helix cu lanțuri de ADN dublu-catenar.



**Fig. VIII.1. a)** Structura generală a acizilor peptido-nucleic și modul de formare a structurilor dublu helix PNA-DNA; **b)** reprezentare tridimensională a duplexului PNA-DNA [160].

### VIII.1. Structura generală a acizilor peptido-nucleici

Fiind structuri sintetizate prin reacții peptidice, secvența bazelor este în mod convențional reprezentată de la capătul N terminal la capătul C terminal, echivalent capitelor 5' și 3' din structura ADN-ului (Fig. VIII.1). Abilitatea de a forma structuri de triplu-helix au arătat că acizii peptido-nucleici prezintă capacitatea de a imita acizii nucleici naturali, fiind capabili să formeze perechi de baze Watson-Crick.

## VIII.2. Proprietăți fizico-chimice ale acizilor peptido-nucleici

### Stabilitate termică a duplexului

Absența grupărilor  $PO_4^-$  conferă PNA-urilor o stabilitate termică mai mare la formarea structurilor de dublu-helix PNA-ADN, raportat la structuri ADN-ADN echivalente ( $T_m^{PNA} > T_m^{DNA}$ ) [161]. Energiile de disociere termică pentru duplexuri de 10 baze, măsurate prin tehnici calorimetrice au evidențiat temperaturi de tranziție între 329 și 343 K și entalpii de tranziție între 209 și 283 kJ/mol pentru duplexuri PNA-ADN. În cazul duplexurilor ADN-ADN temperaturile de tranziție sunt mai mici cu 7-20 K și entalpii de tranziție între 72 și 236 kJ/mol [162,163]. În medie temperatura de topire pentru duplexuri PNA-ADN este mai mare cu 1°C pentru fiecare pereche de baze decât temperatura aceleiași secvențe ADN-ADN.

### Hibridizarea independentă de concentrația de sare

O altă consecință a lipsei încărcării electrice este abilitatea de a forma hibrizi cu ADN la concentrații mici de sare, nefiind necesară ecranarea grupărilor fosfat pentru a contracara repulsia electrostatică dintre lanțuri. Acest lucru este reflectat de invarianța temperaturii de topire a duplexurilor PNA-DNA cu concentrația de sare [164].

### Solubilitatea PNA-urilor

Caracterul neutru al PNA-urilor afectează negativ solubilitatea, fiind slab solubile în apă, raportat la ADN. Solubilitatea scade cu lungimea moleculei și cu numărul de baze purinice din structură [164,165]. O metodă de îmbunătățire a solubilității este prin introducerea de lizine cationice la capete sau în locul glicinelor din structura de legătură [166] sau a altor grupări reactive [167].

### Structuri triplex

Creșterea concentrației de baze pirimidinice din structura moleculelor de PNA face posibilă asocierea de ADN sub formă de structuri triplex  $(PNA)_2 - ADN$ , formate prin perechi de baze Watson-Crick și perechi Hoogsteen (Fig. VIII.2). Stabilitatea structurilor formate depinde de lungimea oligomerilor, temperatura de topire crescând cu  $\sim 10$  °C pentru fiecare pereche de baze [168].

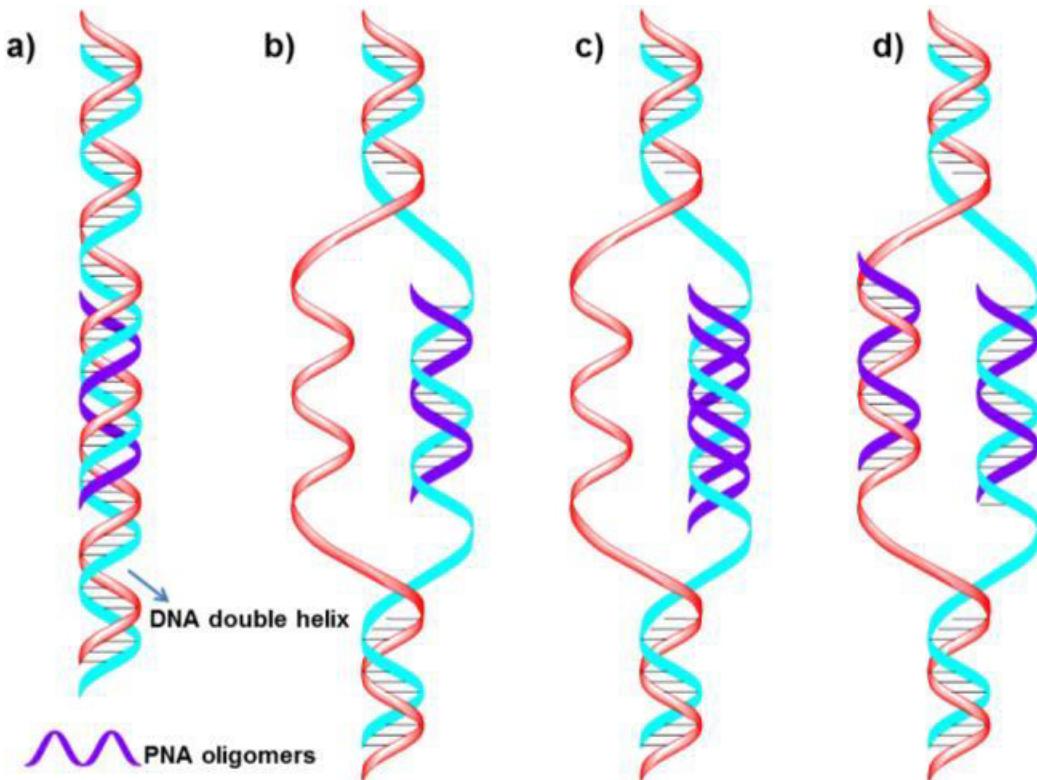


Fig. VIII.2. Reprezentare schematică a metodelor de formare a structurilor triplex PNA-ADN: a) triplex normal, prin perechi Hoogsteen, b) triplex între structuri homopurinice ADN și homopirimidinice PNA, c) invazie duplex ('duplex invasion') cu structuri homopurinice PNA și d) invazie duplex dublă ('double duplex invasion') [169].

### **VIII.3. Aplicații biomedicale ale acizilor peptido-nucleici**

Datorită înaltei specificități în interacțiunea cu secvențe de ADN și a proprietăților unice, acizii peptido-nuclei prezintă potențial ridicat în aplicații biomedicale și biotecnologice, în mod particular în terapia genică, în diagnostic genetic sau ca sonde de manipulare a acizilor nucleici.

PNA-urile prezintă rezistență la activitatea enzimatică a nucleazelor și proteazelor, ceea ce permite utilizarea în terapie antisens și antigen prin legarea și inactivarea secvențelor specifice de ARN mesager (mRNA) [170] și ARN viral [171]. Un alt mechanism de blocare a transcripției anumitor gene este prin formarea de structuri de tip triplex, ce blochează activitatea ARN-polimerază. Acest efect este obținut chiar dacă PNA-ul se leagă în aval de promoter ('downstream promoter element') prin blocarea progresiei și transcripției polimerazei [172].

Detectarea specifică a secvențelor de acizi nucleici poate fi exploatată în diagnosticul clinic, în genomică și la dezvoltarea medicamentelor. Sonde PNA marcate cu un fluorofor la un capăt și un 'quencher' la celălalt capăt au fost utilizate ca biosenzori de acizi nucleici. În mod normal, prin împachetare capetele sunt apropiate, ceea ce ar împiedica emisa fluorescentă, dar în momentul hibridizării molecula adoptă o structură extinsă, ce separă fluoroforul de 'quencher' și permite observarea unui semnal [173]. PNA având atașată o coadă poli-peptidică cationică a permis detectarea specifică a secvențelor de micro-ARN cu ajutorul măsurătorilor în cadrul experimentelor de electrofiziologie prin nanoporul de  $\alpha$ -HL [174].

PNA-urile prezintă avantaje semnificative în tratarea cancerului. Acizii peptido-nucleici pot participa ca agenți moleculari de identificare a secvențelor micro-ARN specifice procesului oncologic, având atașat un medicament [175] sau prin blocarea și alterarea proceselor de exprimare și maturare genetică [176].

## IX. REZULTATE EXPERIMENTALE: UTILIZAREA NANOPORULUI PROTEIC DE $\alpha$ -HEMOLIZINĂ PENTRU DETECTAREA ȘI ANALIZA HIBRIDIZĂRII COMPLEXULUI PNA-DNA

### IX.1. Detectarea hibridizării dintre acizi peptido-nucleici și molecule de ADN monocatenare complementare

Acidul peptido-nucleic folosit (PNA3) conține o secvență de 10 baze azotat funcționalizate cu o polipeptidă de 9 arginine, ce asigură capătului C terminal o sarcină electrică pozitivă. Pentru a studia hibridizarea dintre PNA și ADN, au fost utilizate două secvențe diferite de ADN mono-catenar, denumite DNA1 și DNA3. DNA1 conține o secvență de 10 baze azotat complementară secvenței PNA3, pe când DNA3 prezintă 8 baze non-complementare în secvență. Ambele secvențe ADN prezintă la capătul 5' o polinucleotidă formată din 7 citozine ('poly-C'), cu scopul de a compensa sarcina electrică pozitivă prezentă la capătul C terminal al moleculei PNA3 pentru a facilita ruperea duplexului format prin supunerea acestuia prezenței unui câmp electric. Soluțiile stoc de PNA3 și ADN au fost făcute în apă ultra pură cu TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA) și 1 M NaCl, ajustat la pH = 7.9.

**Tabel IX.1. Secvența primară a polinucleotidelor utilizate în cadrul experimentelor. Regiunile marcate cu roșu reprezintă domeniile complementare în care hibridizarea poate avea loc (în cazul DNA1) și regiunile subliniate reprezintă abaterile de la complementaritate (în cazul DNA3).**

DENUMIRE	SECVENȚĂ	$M_w$ (g/mol)
PNA3	Ac – (R) <sub>9</sub> – 5' – GTGATATACG – 3'	4214.4
DNA1	5' – CCCCCCCC <u>CGTATATCAC</u> – 3'	5014
DNA3	5' – CCCCCCCC <u>GTGTTTCG</u> – 3'	5067

Realizarea reacției de hibridizare între acidul peptido-nucleic (PNA3) și secvențele de ADN (DNA1 și DNA3) utilizate sunt critice pentru realizarea analizei prin intermediul nanoporului de  $\alpha$ -HL. Din acest motiv s-a urmărit, pentru început confirmarea faptului că hibridizarea dintre ADN și PNA este posibilă, în condiții experimentale specifice măsurătorilor electrofiziologice. Astfel, conform principiului expus în cadrul subpitolului III.3, hibridizarea a fost pusă în evidență prin monitorizarea absorbanței UV la 260 nm la momentul combinării

## IX.1. Detectarea hibridizării dintre acizi peptido-nucleici și molecule de ADN monocatenare complementare

concentrațiilor molare distincte de ADN și PNA, identice celor utilizate pentru experimentele de electrofiziologie.

După încălzirea separată la  $95^{\circ}\text{C}$  (peste temperatură de topire  $T_m$ ) și răcirea lentă la  $22^{\circ}\text{C}$  a probelor cu ajutorul dispozitivului IKA Digital Block Heater (Cole-Parmer, US) pentru a elimina posibilele agregate, probele de DNA1-PNA3, respectiv DNA3-PNA3 au fost amestecate și analizate cu ajutorul unui spectrofotometru Thermo Scientific, NanoDrop OneC. În Fig. IX.1 se pot observa spectrele de absorbanță pentru cele două perechi complementare și respectiv, non-complementare de acizi nucleici.

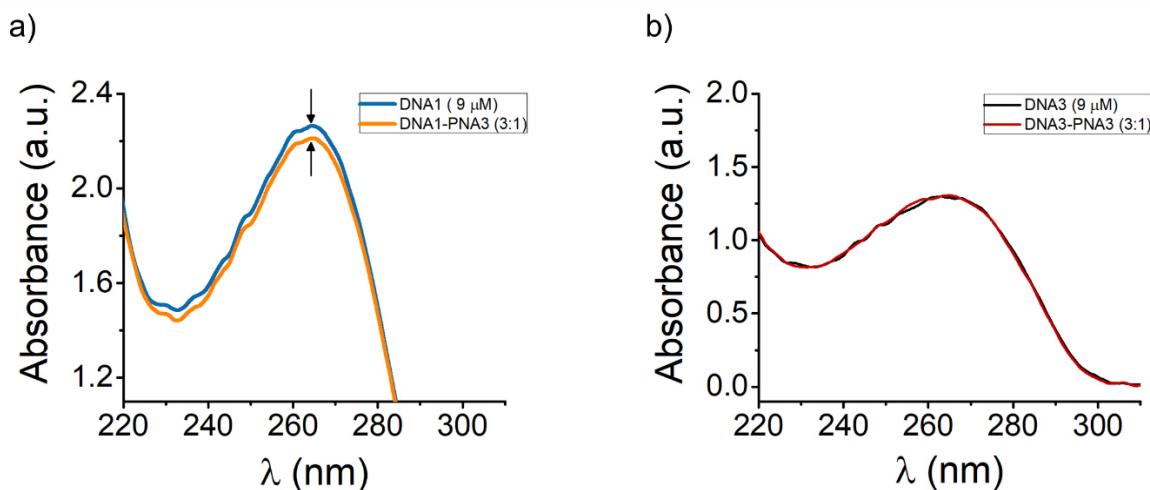


Fig. IX.1. Spectrul UV la 260 nm pentru a) DNA1 (9  $\mu\text{M}$ ) și DNA1-PNA3 (3:1) și pentru b) DNA3 (9  $\mu\text{M}$ ) și DNA3:PNA3 (3:1) ce indică realizarea hibridizării, respectiv absența acestia.

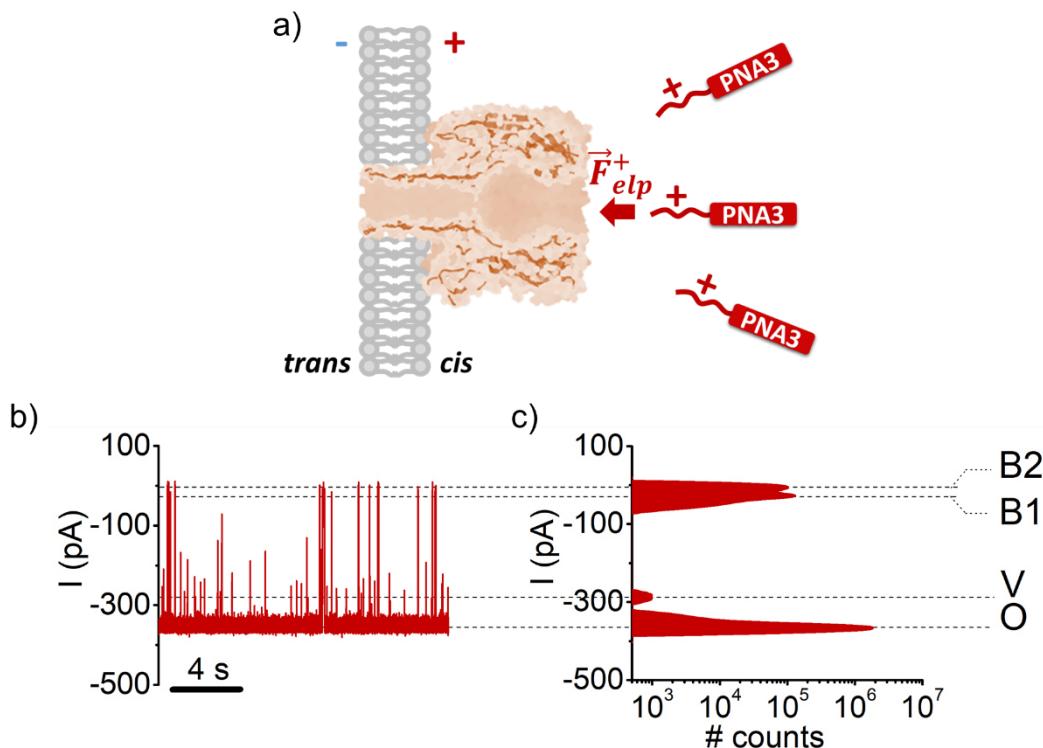
Spectrele rezultate confirmă realizarea hibridizării între lanțurile mono-catenare de DNA1 și PNA3, chiar și în condițiile unui exces de ADN (scăderea absorbanței) și lipsa acestei reacții între lanțurile de DNA3 și PNA3. Pornind de la acest rezultat au fost realizate măsurările de electrofiziologie moleculară prin intermediul nanoporului de  $\alpha$ -HL, pentru a vedea dacă este posibilă detectarea și ulterior analiza complexului PNA-DNA.

Într-un prim set de experimente au fost realizate măsurători de electrofiziologie prin nanoporul de  $\alpha$ -HL prin adăugarea moleculelor de studiu în regiunea *cis* a cuvei de măsurare, pentru a analiza interacțiunea PNA-ului și a complexului PNA-DNA cu vestibulul proteinei. Raționamentul utilizării vestibulului ca punct de pornire în studiul întreprins a fost diametrul mai mare al deschiderii *cis*, ce oferă duplexului molecular posibilitatea de a pătrunde mai mult în

## IX.1. Detectarea hibridizării dintre acizi peptido-nucleici și molecule de ADN monocatenare complementare

interiorul nanoporului, unde intensitatea câmpului electric aplicat este maximă. Mai mult decât atât, variația volumului cavității interne oferă posibilitatea moleculelor studiate de a adopta diferite conformatii și a de a indica cu precizie locația acesteia în por (ex: în lumen sau în vestibul), observată în stările diferite de blocaj ale curentului ionic înregistrat (Fig. IX.2).

Pentru început PNA3 a fost adăugat în regiunea *cis* a cuvei experimentale într-o concentrație de 3  $\mu\text{M}$ . Molecula cationică a fost transportată electroforetic către deschiderea porului prin aplicarea unei diferențe de potențial negativă în intervalul  $\Delta V = -120 \div -180 \text{ mV}$ , raportată la electrodul de masă (*cis*). Interacțiunea PNA3-ului cu  $\alpha$ -HL a fost observată prin reducerea reversibilă a curentului ionic înregistrat (Fig. IX.2).

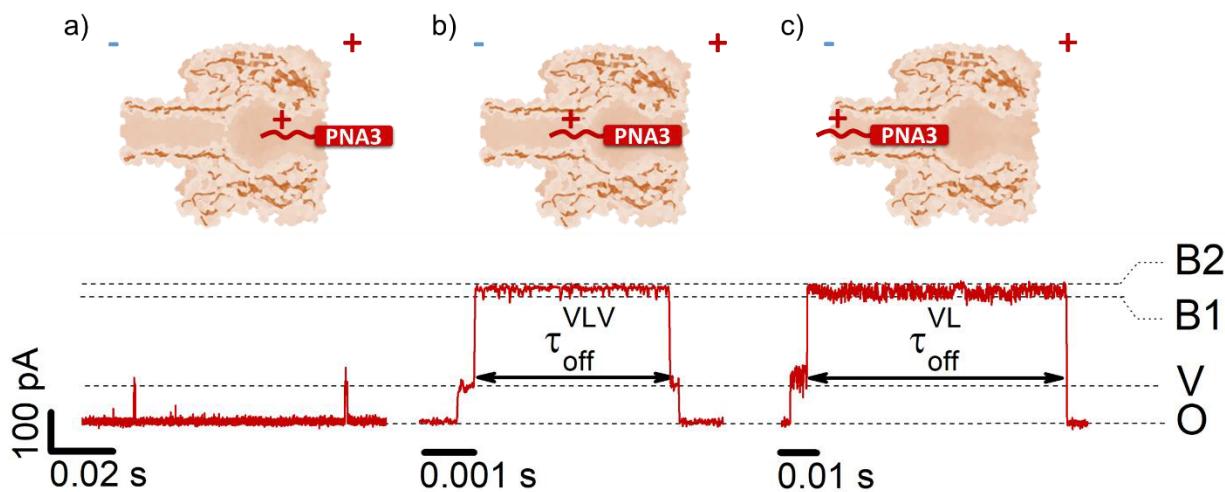


**Fig IX.2. a)** Reprezentare schematică a interacțiunii PNA3, adăugat în regiunea *cis*, cu vestibulul porului de  $\alpha$ -HL, sub acțiunea forței electroforetice  $\vec{F}_{elp}^+$ ; **b)** înregistrare reprezentativă a fluctuațiilor de curent ionic ca urmare a interacțiunii PNA3 (3  $\mu\text{M}$ ) cu nanoporul de  $\alpha$ -HL, la  $\Delta V = -160 \text{ mV}$ ; **c)** histogramă de amplitudine a fluctuațiilor de curent înregistrate ce indică stările de blocaj distincte datorate partaționării PNA3 în nanopor [177].

Analiza curentului ionic înregistrat a scos în evidență existența unor stări de blocaj multiple, după cum se poate observa în Fig. IX.3, ce reflectă poziția PNA3-ului în regiuni

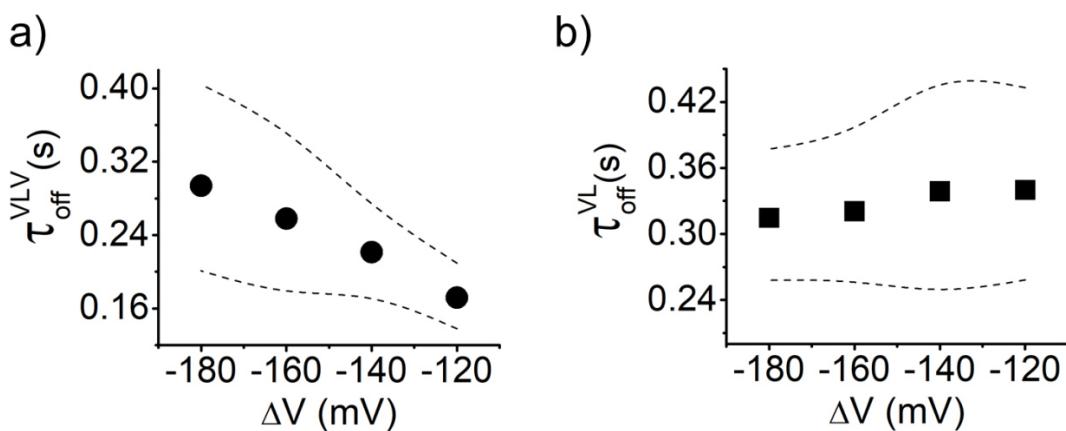
## IX.1. Detectarea hibridizării dintre acizi peptido-nucleici și molecule de ADN monocatenare complementare

diferite din interiorul nanoporului. Pornind în ordine crescătoare a amplitudinii blocajului de curent avem, după starea liberă a porului (O – ‘open’), starea V asociată prezenței moleculei în vestibul nanoporului și stările B1 și B2, asociate prezenței moleculei în regiunea de conștricție. Fluctuațiile între stările B1 și B2, pot fi asociate tranzițiilor înainte și înapoi, a poli-argininei (caracterizate printr-un volum mai mic) și respectiv a nucleotidelor (caracterizată printr-un volum mai mare), prin regiunea de conștricție.



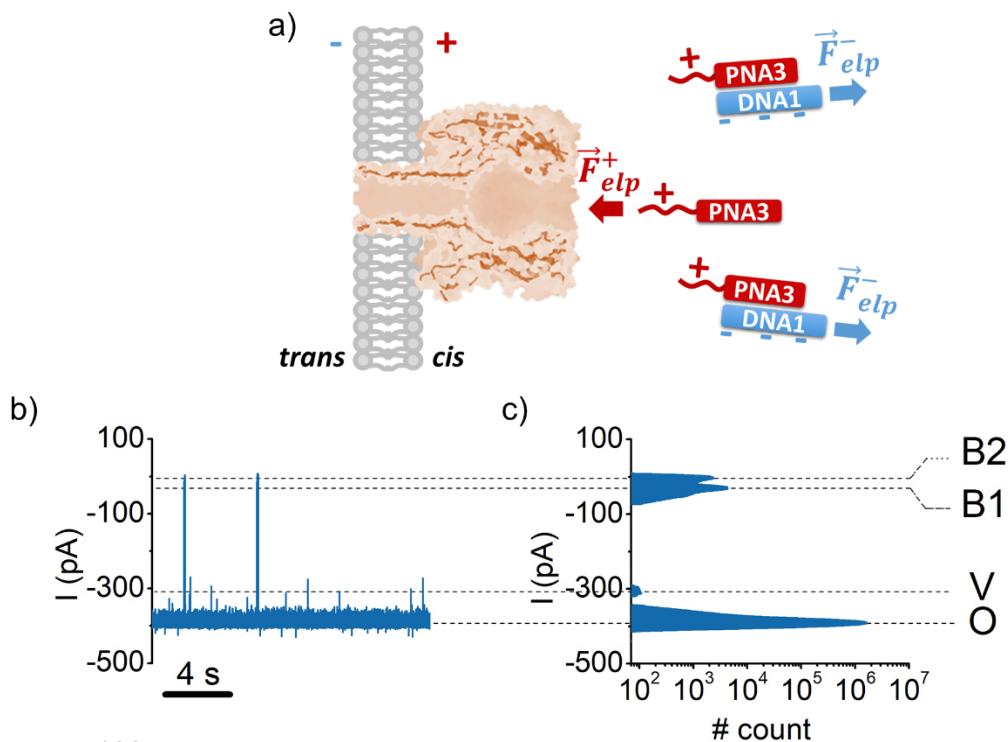
**Fig. IX.3. Reprezentare schematică a evenimentelor de blocaj, indicate de scăderea curentului ionic, datorate partiționării PNA3 (3  $\mu$ M) în interiorul  $\alpha$ -HL: a) inserția PNA3-ului în vestibul și revenirea rapidă în regiunea *cis*, b) tranziția vestibul-lumen-vestibul cu revenirea PNA3-ului în regiunea *cis* și c) tranzițiile vestibul-lumen cu translocarea PNA3-ului în regiunea *trans* [177].**

Pe baza stărilor de blocaj observate au fost calculate valorile medii ale timpilor de tranziție vestibul-lumen ( $\tau_{off}^{VL}$ ) și vestibul-lumen-vestibul ( $\tau_{off}^{VLV}$ ), în domeniul diferențelor de potențial aplicate, reprezentate în Fig. IX.4. După cum se poate observa, durata medie a tranzițiilor vestibul-lumen scade cu diferența de potențial, ceea ce denotă translocarea moleculelor PNA3 în regiunea *trans*. Tranzițiile lumen-vestibul-lumen prezintă o variație crescătoare cu diferența de potențial, consistentă cu întoarcerea moleculei în regiunea *cis*. Aceste observații relevă pe de o parte abilitatea tehnicii de q determina cu precizie, în timp real, partiționarea moleculei PNA3 în por dar și poziția acesteia și ne asigură că metoda de analiză este capabilă să furnizeze informații relevante studiului propus.



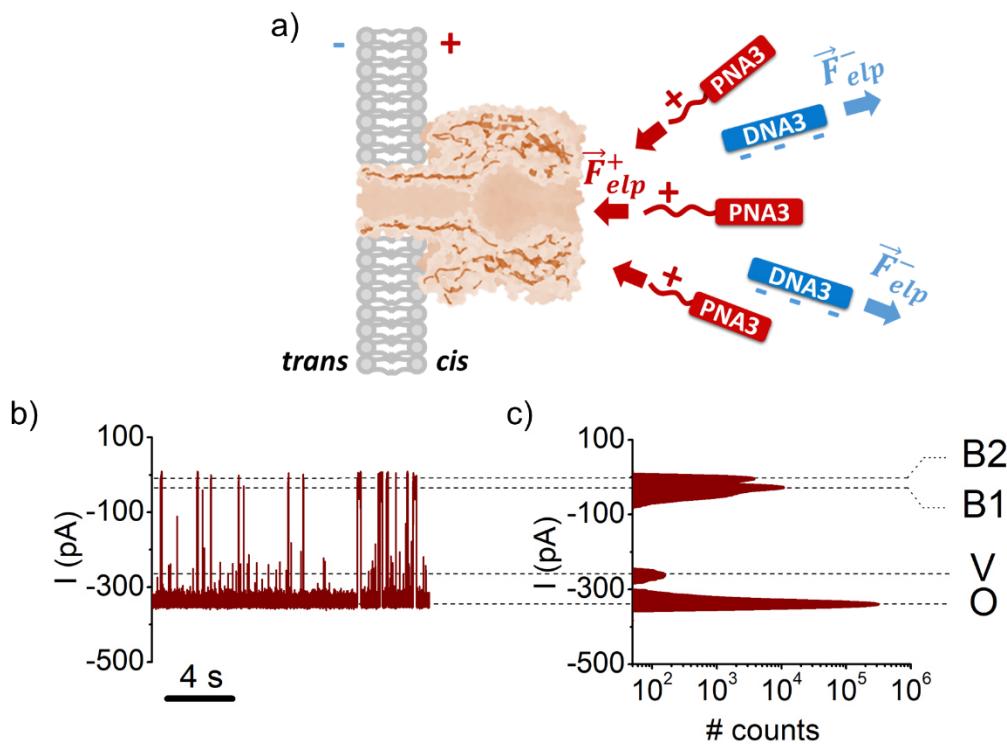
**Fig. IX.4.** Timpul de rezidență al PNA3 ( $3 \mu\text{M}$  *cis*) în interiorul  $\alpha$ -HL, în funcție de diferență de potențial aplicată, alături de intervalul de confidență 95% asociat, pentru a) tranzițiile vestibul-lumen-vestibul și b) vestibul-lumen [177].

După realizarea experimentului de control cu PNA3, a urmat realizarea experimentelor în prezența DNA1, prin adăugarea acestuia într-o concentrație de  $9 \mu\text{M}$  în regiunea *cis*, pentru a studia impactul hibridizării asupra evenimentelor de blocaj observate. Utilizarea unei concentrații mai mari de DNA1, pentru un raport molar PNA3:DNA1 = 1:3, asigură atingerea unei concentrații mari de molecule hibrid, astfel încât numărul evenimentelor observate și analizate să fie relevant din punct de vedere statistic. După adăugarea soluției de DNA1, moleculele au fost lăsate să interacționeze timp de  $\sim 15$  minute, pentru a permite reacției de hibridizare să atingă echilibrul.



**Fig. IX.5. a)** Reprezentare schematică a interacțiunii PNA3 ( $3 \mu\text{M}$ ), adăugat în regiunea *cis*, cu vestibulul porului de  $\alpha$ -HL, în prezență DNA1 ( $9 \mu\text{M}$ ) sub acțiunea forței electroforetice  $\vec{F}_{elp}^+$ ; **b)** înregistrare reprezentativă a fluctuațiilor de curent ionic ca urmare a interacțiunii PNA3 nehibridizat cu  $\alpha$ -HL, la  $\Delta V = -160 \text{ mV}$ ; **c)** histogramă de amplitudine a fluctuațiilor de curent înregistrate ce indică stările de blocaj distincte datorate partaționării PNA3 nehibridizat în nanopor [177].

Adăugarea ADN-ului complementar reduce semnificativ numărul de evenimente observate iar evenimentele existente prezintă aceeași amprentă ca și evenimentele observate anterior, în prezență strict a moleculei PNA3, ceea ce sugerează ca în urma hibridizării, complexul PNA3-DNA1 este exclus de la interacțiunea cu porul de  $\alpha$ -HL și doar PNA3-ul nehibridizat poate interacționa. Moleculele de DNA1 prezintă o sarcină electrică netă negativă de  $\sim -17\text{e}^-$ , valoare maximă estimată pe baza numărului de grupări fosfat constituente, ceea ce în contextul diferențelor de potențial aplicate, determină deplasarea ADN-ului departe de por. În urma hibridizării și formării complexului PNA3-DNA1, acesta va fi caracterizat printr-o încărcare electrică negativă, în ciuda caracterului cationic al poli-argininei atașate moleculei de PNA3 ( $\sim +9\text{e}^-$ ). Astfel complexul PNA3-DNA1, alătur de moleculele de DNA1, vor fi transportate electroforetic ( $\vec{F}_{elp}^-$ ) departe de vestibulul porului de  $\alpha$ -HL.

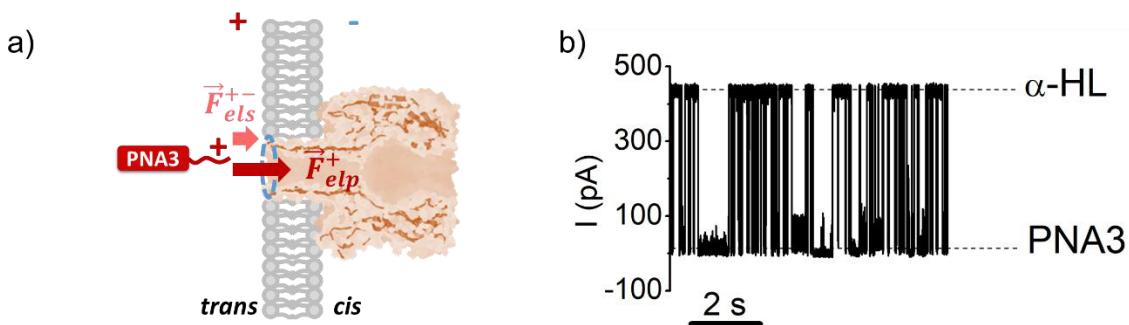


**Fig. IX.6.** a) Reprezentare schematică a interacțiunii PNA3 (3  $\mu\text{M}$ ), adăugat în regiunea *cis*, cu vestibulul porului de  $\alpha$ -HL, în prezența DNA3 (9  $\mu\text{M}$ ) sub acțiunea forței electroforetice  $\vec{F}_{elp}^+$ ; b) înregistrare reprezentativă a fluctuațiilor de curent ionic ca urmare a interacțiunii PNA3 cu  $\alpha$ -HL, la  $\Delta V = -160$  mV; c) histogramă de amplitudine a fluctuațiilor de curent înregistrat ce indică stările de blocaj distințe datorate partitioanării PNA3 în nanopor [177].

Într-un experiment separat, au fost realizate măsurători în care au fost adăugate molecule de DNA3 (9  $\mu\text{M}$ ) peste PNA3 (3  $\mu\text{M}$ ), ce prezintă o structură non-complementară secvenței PNA3. În această situație însă, adăugarea de DNA3 nu a produs nicio schimbare notabilă în frecvența sau amprenta evenimentelor observate (Fig. IX.6), ceea ce indică absența reacției de hibridizare dintre cele două molecule, după cum a fost demonstrat în cadrul analizei spectrofotometrice. Moleculele de DNA3 sunt transportate electroforetic departe de por pe când moleculele de PNA3, neafectate de prezența ADN-ului, interacționează cu  $\alpha$ -HL și duc la blocarea reversibilă a curentului ionic. Aceste rezultate reflectă abilitatea tehnicii de analiză în timp real a hibridizării specifice între lanțuri de ADN monocatenar și acizi peptido-nucleici complementari.

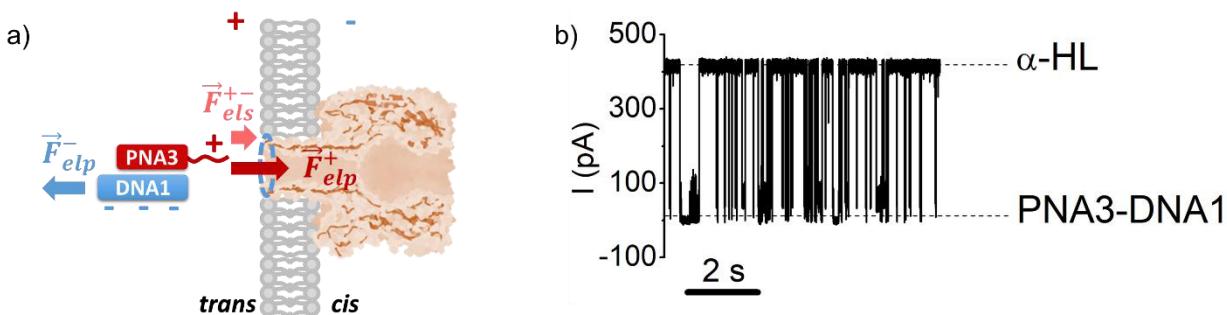
## IX.2. Analiza duplexului molecular PNA3-DNA1 cu ajutorul nanoporului proteic de $\alpha$ -HL

Realizarea măsurătorilor experimentale în regiunea *cis* permite observarea reacției de hibridizare, dintre PNA3 și DNA1, respectiv, lipsa acestei reacții, pentru DNA3. Cu toate acestea, acest tip de măsurători nu oferă posibilitatea examinării complexului molecular format, motiv pentru care, în al doilea set de experimente, moleculele de studiu au fost adăugate în regiunea *trans* a porului. Raționamentul din spatele experimentelor a urmărit faptul că resturile de amino-acizi aflate la gura porului (14 Asp și 7 Lys) conferă, la pH = 7, o încărcare electrică negativă, ce ar facilita interacționea cu duplexul PNA-DNA, prin atragerea electrostatică a cozii polipeptidice cationice. Din acest moment s-a renunțat la utilizarea secvenței non-complementare de DNA3, datorită lipsei interacției acestuia cu PNA3.



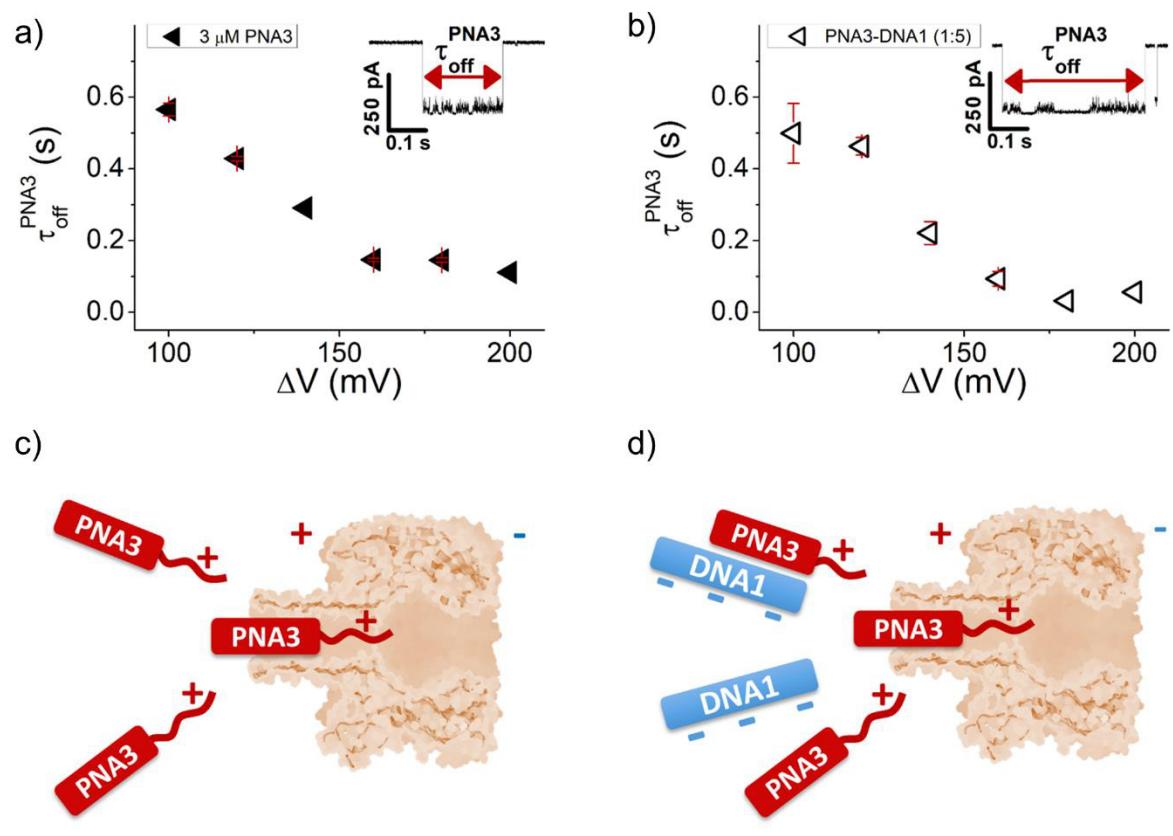
**Fig. IX.7. Reprezentare schematică a interacțiunii PNA3, adăugat în regiunea *trans*, cu lumenul porului de  $\alpha$ -HL, sub acțiunea forței electroforetice  $\vec{F}_{elp}^+$  și a forței de atracție electrostatică  $\vec{F}_{els}^{+-}$ ; b) înregistrare reprezentativă a fluctuațiilor de curent ionic ca urmare a interacțiunii PNA3 (3  $\mu$ M) cu  $\alpha$ -HL, la  $\Delta V = +160$  mV [177].**

Pentru început au fost realizate măsurările de control cu PNA3 pentru a se identifica amprenta acestei molecule la interacționea cu nanoporul. Primul efect observabil, și cel mai evident, a fost frecvența mare a evenimentelor de blocaj, ce nu poate fi pusă decât pe seama interacției dintre poli-arginine și gura porului  $\alpha$ -HL, fapt ce sugerează că forța electrostatică ( $\vec{F}_{els}^{+-}$ ) aumentează semnificativ forța electroforetică ( $\vec{F}_{elp}^+$ ) și face posibilă captarea mai eficientă a PNA3-ului la nivelul porului (Fig. IX.7).



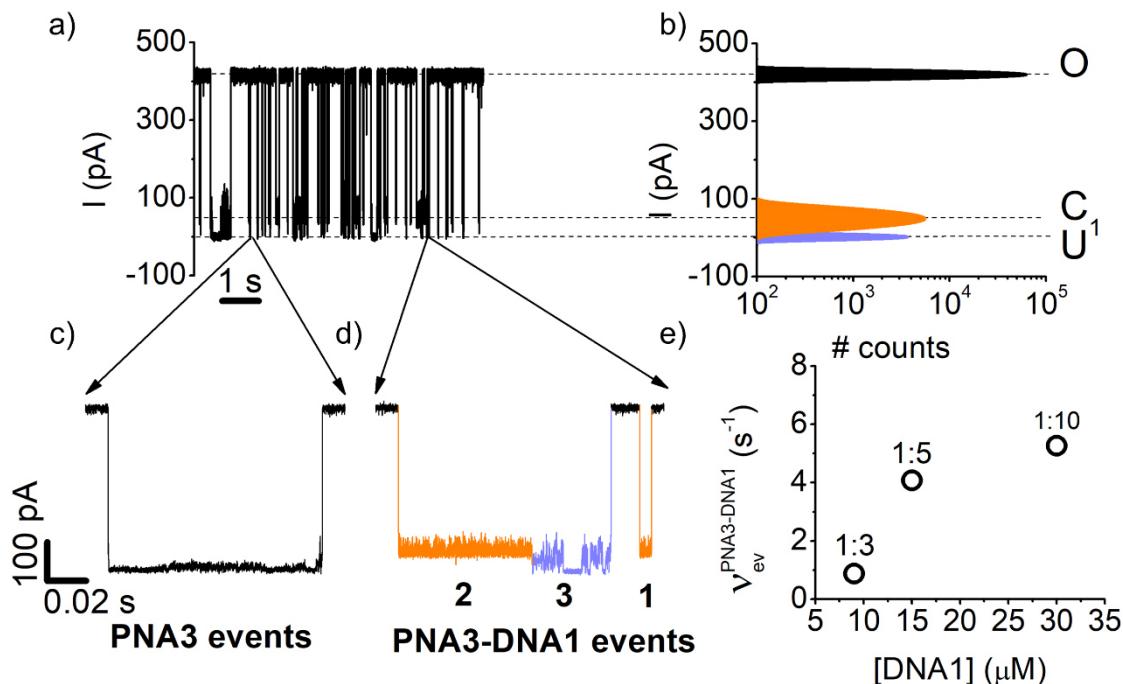
**Fig. IX.8.** Reprezentare schematică a interacțiunii complexului PNA3-DNA1, adăugat în regiunea *trans*, cu lumenul  $\alpha$ -HL, sub acțiunea forței electroforetice  $\vec{F}_{elp}^+$  și a forței de atracție electrostatică  $\vec{F}_{els}^{+-}$ ; b) înregistrare reprezentativă a fluctuațiilor de curent ionic ca urmare a interacțiunii duplexului PNA3:DNA1 (1:3) cu  $\alpha$ -HL, la  $\Delta V = +160$  mV [177].

La adăugarea DNA1 în concentrație incrementală (9  $\mu$ M, 15  $\mu$ M și 30  $\mu$ M) nu a fost observată nici o scădere semnificativă a frecvenței evenimentelor de blocaj (Fig. IX.8). După cum a fost pus în evidență în cazul experimentelor realizate la *cis*, realizarea hibridizării determină scăderea concentrației de PNA3 liber, capabil să interacționeze cu porul și implicit a frecvenței evenimentelor de blocaj. Analiza detaliată a blocajelor a pus în evidență apariția unor evenimente de blocaj diferite, cu amprentă specifică, ceea ce indică interacțiunea complexului PNA3-DNA1 cu  $\alpha$ -HL. Prin urmare, forța de atracție electrostatică cumulată cu orientarea avantajoasă a duplexului în câmp (Fig. IX.8.a) facilitează asocierea complexului PNA3-DNA1 cu nanoporul, proces ce nu a fost observat în cadrul experimentelor realizate la *cis*. Noile blocaje de curent, datorate complexului PNA3-DNA1 (Fig. IX.10.a) sunt caracterizate prin sub-stări distinse de blocaj, indicate și de histograma de amplitudine a curentului ionic (Fig. IX.10.b). Alături de aceste evenimente noi, au fost observate și evenimente tipice PNA3-ului liber, după cum reiese din analiza statistică realizată pe valorile medii ale timpului de asociere în funcție de diferența de potențial aplicată (Fig. IX.9).



**Fig. IX.9.** Reprezentarea valorilor medii ale timpilor de asociere în funcție de diferența de potențial pentru a) PNA3 (3  $\mu\text{M}$ ) și b) PNA3 (3  $\mu\text{M}$ ) în prezență DNA1 (15  $\mu\text{M}$ ); analiza a fost făcută doar pe evenimentele tipice PNA3 nehibridizat; c) și d) reprezentare schematică a procesului de interacție PNA3 –  $\alpha$ -HL pentru care a fost făcută analiza.

Evenimentele de blocaj au fost clasificate astfel: i) evenimente având o magnitudine mare a blocajului de curent (Fig. IX.10.c), datorate PNA3-ului nehibridizat și ii) evenimente ce prezintă o amprentă de blocaj complexă, caracterizate printr-o magnitudine de blocaj redusă, asociată complexului PNA3-DNA1 (Fig. IX.10.d).



**Fig IX.10.** a) Înregistrare reprezentativă a fluctuațiilor de curent ionic ce reflectă interacțiunea reversibilă dintre duplexul PNA3-DNA1 (1:10) și  $\alpha$ -HL, la  $\Delta = +160$  mV; b) histogramă de amplitudine a fluctuațiilor de curent înregistrat ce indică stările de blocaj distincte datorate partilionării duplexului PNA3-DNA1 în nanopor. Vedere detaliată a blocajelor de curent tipice observate la adăugarea a 3  $\mu M$  PNA3 și 30  $\mu M$  DNA1 (PNA3:DNA1 = 1:10) la trans; c) evenimente de blocaj datorate interacțiunii PNA3-ului nehibridizat și d) evenimente datorate interacțiunii duplexului PNA3-DNA1; e) Frecvența evenimentelor de blocaj tipice duplexului în funcție de concentrația de DNA1 [177].

La creșterea concentrației de DNA1 frecvența evenimentelor asociat complexului crește, tinzând spre saturăție, consistent cu atingerea maximului de molecule hibride posibile (complexarea tuturor moleculelor de PNA3 liber). Cresterea frecvenței evenimentelor postulate ca fiind asociate interacțiunii complexul PNA3-DNA1 cu  $\alpha$ -HL constituie un argument în favoarea ipotezei de lucru. Prin urmare evenimentele tipice duplexului pot fi de două tipuri: evenimente cu blocaj al curentului relativ mic ( $\Delta I_{PNA3-DNA1}^1/I_0 = 0.865 \pm 0.018$ ) marcate ca fiind evenimente de tip '1' (colorate portocaliu) și evenimente ce încep cu o magnitudine de blocaj relativ mică ( $\Delta I_{PNA3-DNA1}^2/I_0 = 0.868 \pm 0.008$ ) și apoi tranziționează într-un blocaj de magnitudine mare ( $\Delta I_{PNA3-DNA1}^3/I_0 = 0.995 \pm 0.001$ ), marcate '2', respectiv '3'. Blocajul relativ pentru evenimentele '1' și '2' sugerează un proces identic de interacțiune a complexului cu nanoporul de  $\alpha$ -HL (Fig. IX.11.a).

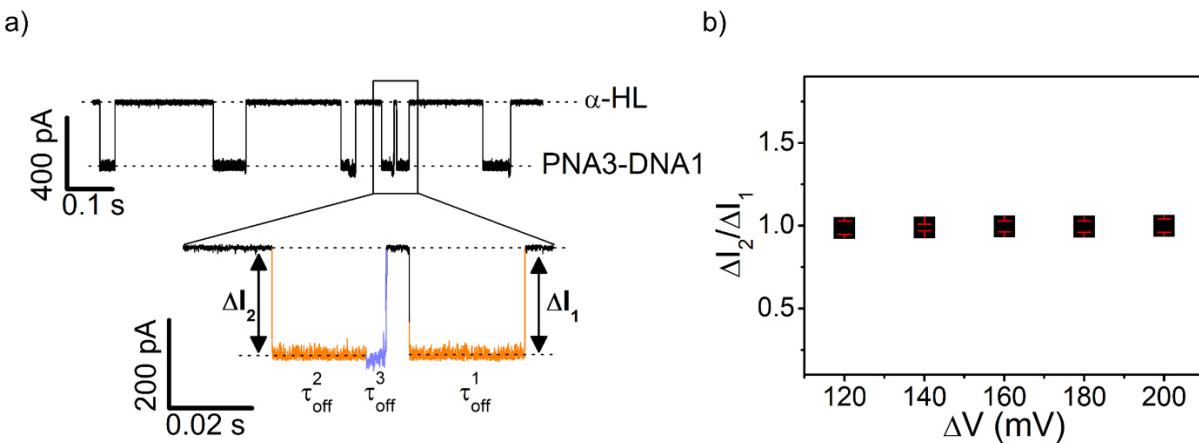
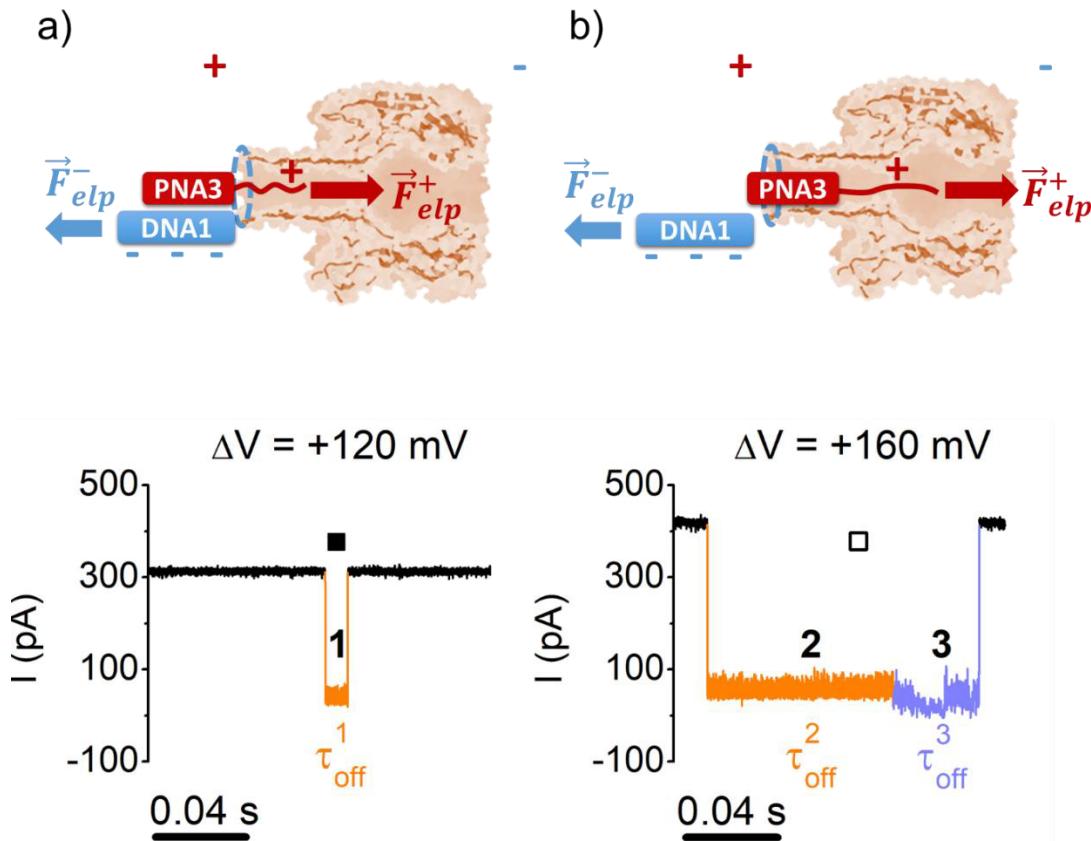


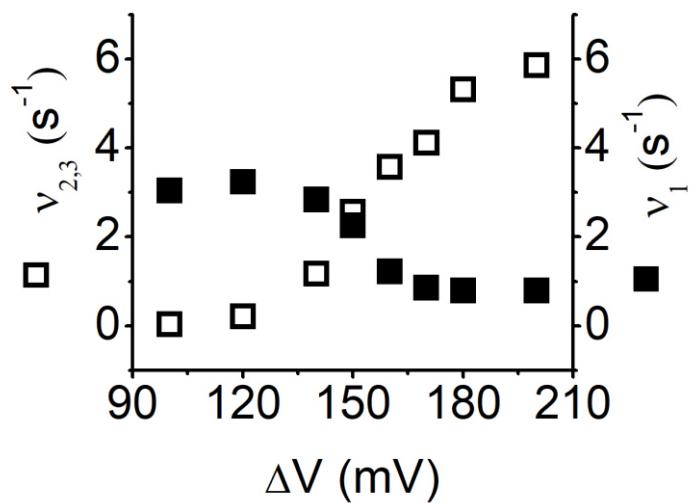
Fig. IX.11. a) Înregistrare reprezentativă a fluctuațiilor de curent ionic cu vedere detaliată a magnitudinii blocajului de curent tipice evenimentelor de tip ‘1’ și tip ‘2’; b) raportul blocajului relativ al celor două evenimente în funcție de diferența de potențial reflectă faptul ca procesul de interacție este identic.

Dată fiind blocajul redus al curentului ionic în stările ‘1’ și ‘2’ față de blocajul de curent ionic asociat PNA3-ului nehibridizat, aceste evenimente au fost atribuite inserției parțiale a duplexului PNA3-DNA1 în interiorul nanoporului. Similar lanțurilor de ADN dublu catenar, ce nu pot partiționa în totalitate în interiorul  $\alpha$ -HL [178], dimensiunile complexului PNA3-DNA1 nu permit realizarea blocajului la nivelul conștricției, ci este limitat la localizarea capătului polipeptidic la nivelul lumenului, ceea ce explică magnitudinea redusă de blocaj. Odată inserat complexul în interiorul nanoporului, există două situații posibile: i) complexul PNA3-DNA1 revine în regiunea *trans*, fără a suferi vreo modificare, caracteristic evenimentelor de tip ‘1’ (Fig. IX.12.a) sau ii) complexul PNA3-DNA1, sub acțiunea câmpului electric, suferă o modificare ireversibilă, în urma căreia PNA3-ul este desprins de DNA3, transportat prin regiunea de conștricție și translocat în regiunea *cis*, caracteristic evenimentelor de tip ‘3’ (colorat mov) în Fig. IX.12.b.



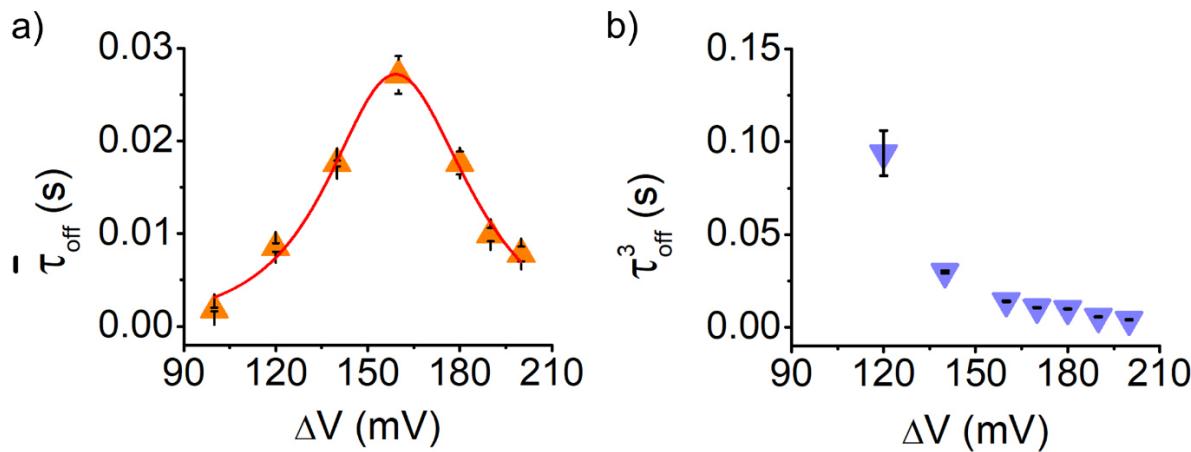
**Fig.IX.12.** Reprezentare schematică a interacțiunii complexului PNA3-DNA1 cu  $\alpha$ -HL ce reflectă evenimentele de blocaj înregistrate: a) blocajul de curent de magnitudine joasă, mai comun la diferențe mici de potențial ( $\Delta V = +120 \text{ mV}$ ), având durată  $\tau_{off}^1$  (■) și b) blocajul inițial de magnitudine joasă ( $\tau_{off}^2$ ) ce evoluează spre un blocaj de magnitudine înaltă ( $\tau_{off}^3$ ), indicând ruperea punților de hidrogen și desfacerea duplexului (□), mai comun la diferențe de potențial mari ( $\Delta V = +160 \text{ mV}$ ) [177].

Evenimentele caracteristice complexului au fost analizate din punct de vedere al frecvenței și duratei acestora raportat la diferența de potențial aplicată. Astfel a fost observat că la creșterea diferenței de potențial, frecvența evenimentelor cu amprentă complexă, ce rezultă în desfacerea duplexului, crește, pe când frecvența evenimentelor reversibile scade (Fig. IX.13). Acest lucru sugerează că desfacerea duplexului este mai facilă la diferențe de potențial mari, pe când la diferențe de potențial mici este mult mai probabil ca duplexul să interacționeze cu porul, fără a suferi vreo modificare.



**Fig. IX.13.** Frecvența evenimentelor de blocaj tipice duplexului în funcție de diferență de potențial aplicată; evenimentele ce nu rezultă în desfacerea duplexului (■) devin mai rare la creșterea diferenței de potențial pe când cele ce rezultă în desfacerea duplexului devin mai comune la diferențe de potențial mari [177].

Analiza statistică valorilor timpilor asociate duratei stărilor ‘1’ și ‘2’ ce descriu aceași stare a complexului molecular în interiorul  $\alpha$ -HL, a permis calcularea valorii medii (notată cu  $\bar{\tau}_{off}$ ). Valorile medii  $\bar{\tau}_{off}$  prezintă o dependență neliniară cu diferența de potențial aplicată (Fig. IX.14.a)..



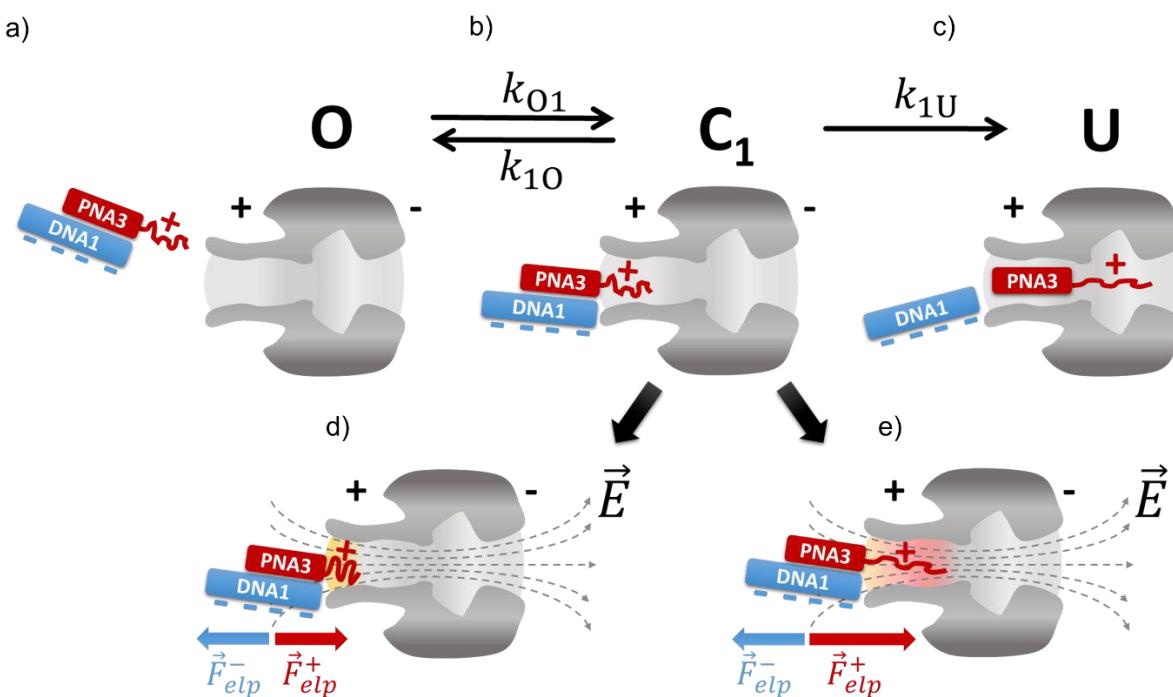
**Fig. IX.14.** a) Valorile medii ale timpilor de rezidență complexului PNA3-DNA1 în interiorul nanoporului ce cuprind evenimentele de tip ‘1’ și ‘2’, în funcție de diferența de potențial aplicată; punctele au fost fitate cu ajutorul relației (IX.11); b) Valorile medii ale timpilor de rezidență PNA3, pe parcursul translocării în regiune *cis*, ca urmare a desfacerii duplexului PNA3-DNA1 [177].

## IX.2. Analiza duplexului molecular PNA3-DNA1 cu ajutorul nanoporului proteic de $\alpha$ -HL

Sub-stările ‘3’ prezintă, pe de altă parte, o variație descrescătoare a valorilor timpilor medii  $\tau_{off}^3$  cu diferența de potențial aplicată, consistent cu translocarea PNA3-ului după desprinderea de DNA1 (Fig. IX.14.b). Important de menționat este faptul că valorile timpilor  $\tau_{off}^3$  sunt mai mici decât cele asociate translocării strict a PNA3 ( $\tau_{off}^{PNA3}$  în Fig. IX.9), lucru ușor de înțeles, când este luat în considerarea distanța mai mică pe care o traversează PNA3-ul de la zona de conștricție către deschidere vestibulului, în regiunea *cis*, în condițiile disocierii de DNA1

### IX.3. Cinetica desfacerii complexului PNA3-DNA1 în interiorul $\alpha$ -HL

Pentru a înțelege modelul kinetic dominant responsabil pentru desfacerea duplexului PNA3-DNA1 în interiorul porului putem considera o reacție cu stări multiple în care tranzițiile între diferitele stări sunt descrise prin constante de reacție distințe. Într-o primă aproximare putem considera un model reprezentativ al interacțiunii complexului PNA3-DNA1 cu nanoporul de  $\alpha$ -HL alcătuit din trei stări: porul liber (O), porul blocat de duplex (C<sub>1</sub>) și desfacerea duplexului urmat de translocarea PNA3-ului (U).



**Fig. IX.15.** Reprezentare schematică a modelului kinetic ce descrie interacțiunea complexului PNA3-DNA1 cu nanoporul de  $\alpha$ -HL; a) porul se află inițial în starea O, de unde realizează o tranziție în starea C<sub>1</sub>, cu constantă de rată  $k_{01}$  (b); din această stare complexul poate reveni în starea O (reație caracterizată de constantă  $k_{10}$ ) sau poate disocia prin ruperea legăturilor de hidrogen, eliberarea DNA1 în *trans* și translocarea PNA3 în *cis* (c) (reație caracterizată  $k_{1U}$ ); reația dominantă va depinde de localizarea cozii cationice în interiorul porului, ceea ce se reflectă în cazul nefavorabil, în care coada cationică nu reușește să pătrundă destul de mult în lumen pentru a fi trasă electroforetic prin por (d) sau cazul favorabil când coada cationică ajunge în zona de constrație și este trasă electroforetic prin por, astfel putându-se realiza ruperea duplexului (e) [177].

Pentru a descrie din punct de vedere cinetic desfacerea duplexului vom folosi un formalism similar celui descris în capitolul II, utilizat pentru descrierea disocierii unei molecule din por. Timpul petrecut de complex în fiecare din sub-stări poate fi descris prin prisma teoriei Markov a proceselor stochastice, ca fiind valori aleatorii ce pot fi descrise cu ajutorul funcției densitate de probabilitate (*pdf* din eng. ‘probability density function’). Pentru descrierea desfacerii duplexului molecular am considerat că la momentul  $t = 0$  sistemul se află în starea C1, de unde poate reveni în starea O sau poate continua către starea U, proces descris de sistemul de ecuații diferențiale, sub formă matricială (IX.1):

$$\frac{\delta}{\delta t} \begin{pmatrix} oo[t] & oc1[t] & ou[t] \\ c1o[t] & c1c1[t] & c1u[t] \\ uo[t] & uc1[t] & uu[t] \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} oo[t] & oc1[t] & ou[t] \\ c1o[t] & c1c1[t] & c1u[t] \\ uo[t] & uc1[t] & uu[t] \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} 0 & k_{o1} & 0 \\ k_{1o} & -(k_{1o} + k_{1u}) & k_{1u} \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad (\text{IX.1})$$

Soluțiile sistemului sunt probabilitățile de tranziție între oricare două stări ( $O \rightarrow O$ ,  $O \rightarrow C1$ ,  $O \rightarrow U, \dots, U \rightarrow U$ ) notate sugestiv  $oo[t]$ ,  $oc1[t]$ ,  $ou[t], \dots, uu[t]$  și care pentru acest caz particular devin:

$$\frac{\partial}{\partial t} \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} 0 & k_{o1} & 0 \\ k_{1o} & -(k_{1o} + k_{1u}) & k_{1u} \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad (\text{IX.2})$$

Rezolvarea ecuației (IX.2) oferă probabilitatea ca la momentul  $t$  sistemul să se găsească tot în starea C1:

$$P_{blocat}[t] = c1o[t] + c1u[t] \quad (\text{IX.3})$$

$$P_{blocat}[t] = 1 - e^{-(k_{1o} + k_{1u})t} \quad (\text{IX.4})$$

Astfel funcția distribuție de probabilitate ale intervalelor de timp în care sistemul duplex-nanopor se găsește în starea C1 se poate determina prin derivarea în timp a lui  $P_{blocat}[t]$ :

$$pdf = \frac{\partial P_{blocat}[t]}{\partial t} = e^{-(k_{1o} + k_{1u})}(k_{1o} + k_{1u}) \quad (\text{IX.5})$$

Prin integrare valoarea medie a timpului de rezidență în starea C1 este:

$$\bar{\tau}_{off} = \int_0^{\infty} t \cdot (e^{-(k_{1O} + k_{1U})} (k_{1O} + k_{1U})) = \frac{1}{k_{1O} + k_{1U}} \quad (\text{IX.6})$$

Conform teoriei barierei energetice a lui Kramers (capitolul II.6) constanta ratei de desfacere  $k_{1U}$  variază:

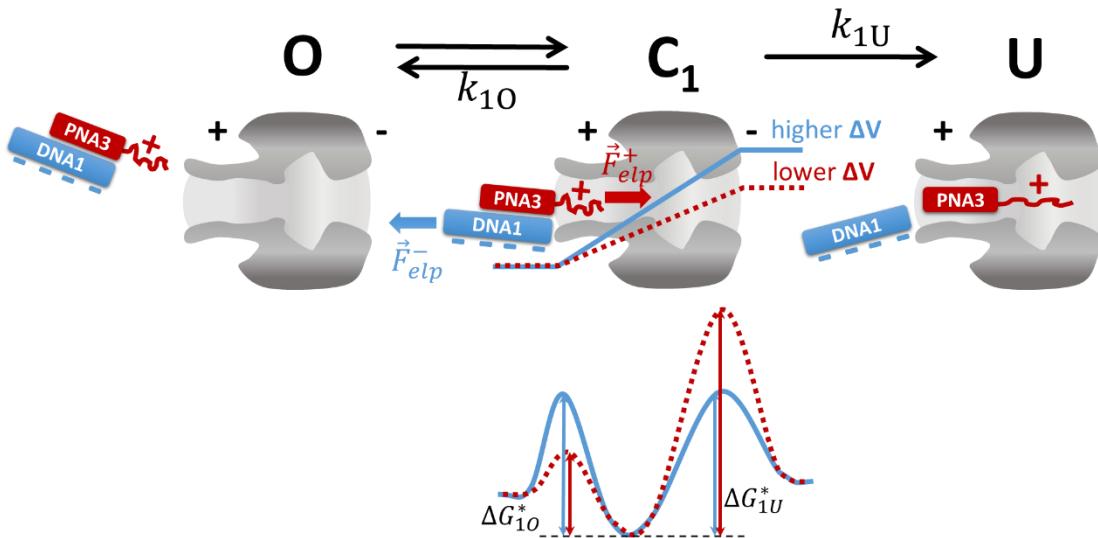
$$k_{1U}(\Delta V) = k_{1U}(0) \cdot \exp\left(\frac{\Delta G_{el,1U}^*}{k_B T}\right) \quad (\text{IX.7})$$

Unde  $k_{1U}(0)$  reprezintă constanta ratei de desfacere în absența diferenței de potențial și este dată de relația (IX.8) iar  $\Delta G_{el,1U}^* = q_{eff} \frac{\Delta V}{l} \delta^*$  reprezintă energia suplimentară adusă barierei energetice asociată desfacerii duplexului ca urmare a deplasării duplexului de-a lungul coordonatelor de reacție în timpul reacției, cu  $q_{eff}$  sarcina electrică efectivă ce interacționează cu diferența de potențial  $\Delta V$ ,  $\delta^*$  distanța în coordonate de reacție până la vârful barierei energetice ce desface duplexul iar  $l$  lungimea porului.

$$k_{1U}(0) = \frac{k_B T}{h} \cdot \exp\left(-\frac{\Delta G_{0,1U}^*}{k_B T}\right) \quad (\text{IX.8})$$

$\Delta G_{0,1U}^*$  reprezintă bariera energetică de desfacere în absența diferenței de potențial,  $k_B$  constanta Boltzmann iar  $T$  temperatura absolută.

Se poate observa că diferența de potențial determină scăderea barierei energetice asociată procesului de desfacere a duplexului. Câmpul electric prezintă o intensitate mult mai mare în interiorul porului, unde acționează asupra cozii cationice a PNA3-ului, decât în afara acestuia unde acționează asupra DNA1, ceea ce face ca disocierea de por în regiunea *trans* să fie nefavorabilă din punct de vedere energetic la diferențe de potențial mari (Fig. VI.17). Astfel se explică variația frecvenței evenimentelor de blocaj specifice duplexului cu diferența de potențial aplicată (Fig. VI.14).



**Fig. IX.16.** Reprezentare schematică a energiei libere asociate tranziției complexului PNA3-DNA1 din starea  $C_1$  în funcție de coordonatele de reacție; pentru diferențe de potențial mici (roșu) bariera energetică este mai mare pentru desfacerea duplexui decât pentru disociere la *cis* ( $\Delta G_{1U}^* > \Delta G_{1O}^*$ ), pe când la diferențe de potential mari (albastru) bariera pentru desfacere și translocare PNA3 la *trans* este diminuată.

Sarcina electrică  $q_{eff}$  ce interacționează cu  $\Delta V$  în interiorul  $\alpha$ -HL depinde la randul ei de  $\Delta V$ . Pe măsură ce diferența de potențial crește, duplexul, și implicit coada polipeptidică, se inseră și mai mult în interiorul nanoporului, unde are loc o interacțiunea și mai puternică cu câmpul electric [179]. Se pot scrie constantele ratelor, sub formă simplificată, astfel:

$$k_{1U}(\Delta V) = k_{1U}(0) \cdot \exp(a \cdot \Delta V^2) \quad (\text{IX.9})$$

$$k_{1O}(\Delta V) = k_{1O}(0) \cdot \exp(-b \cdot \Delta V^2) \quad (\text{IX.10})$$

Unde  $a$  și  $b$  cumulează termenii implicați în modelul Kramers descris anterior (relația IX.7 și IX.8). Cum  $\bar{\tau}_{off} = \frac{1}{k_{1O} + k_{1U}}$  (relația IX.6), variația  $\bar{\tau}_{off}$  cu  $\Delta V$  (Fig. IX.14.a) poate fi modelată cu relația:

$$\bar{\tau}_{off} = [k_{1U}(0) \cdot \exp(a \cdot \Delta V^2) + k_{1O}(0) \cdot \exp(-b \cdot \Delta V^2)]^{-1} \quad (\text{IX.11})$$

Pe baza relației (IX.11) a fost determinată valoarea constantelor  $k_{1U}(0)$  și  $k_{1O}(0)$  care au permis mai departe calcularea barierelor energetice asociate desfacerii duplexului și respectiv

### IX.3. Cinetica desfacerii complexului PNA-DNA în interiorul $\alpha$ -HL

disocierii reversibile de por. Pentru desfacerea ireverisibilă a complexului PNA3-DNA1 a fost determinată valoarea  $\Delta G_{0,1U}^* = 11,6 \text{ kcal/mol}$ , echivalentul a 1,17 kcal/mol pentru fiecare pereche de baze (10 perechi de baze hibridizate). Valoarea determinată este una pertinentă, fiind similară valorii obținute prin metode calorimetrice [180]. Pentru fenomenul reversibil, bariera energetică  $\Delta G_{0,1O}^* = 7,24 \text{ kcal/mol}$ , ceea ce ne arată, prin comparație, că desfacerea duplexului PNA3-DNA1 în interiorul  $\alpha$ -HL necesită mai multă energie decât simpla disociere ( $\Delta G_{0,1O}^* < \Delta G_{0,1U}^*$ ).

---

## Concluzii

- Implementarea tehnicii de analiză cu ajutorul nanoporului de  $\alpha$ -HL a făcut posibilă detectarea în timp real a formării de hibrizi PNA între formați din ADN monocatenar și acizi peptido-nucleici (PNA) funcționalizați cu o polipeptidă cationică.
- Experimentele efectuate în partea *trans* a nanoporului au permis sondarea duplexului molecular PNA3-DNA1, și suplimentar, prin ajustarea câmpului electric de la nivelul porului, a fost posibilă captarea cozii de poli-arginine în interior urmată de desfacerea duplexului molecular.
- Analiza datelor obținute prin tehnica de studiu la nivel de singură moleculă a permis descrierea cinematicii reacțiilor de dehibridizare a duplexelor moleculare de PNA3-DNA1, determinarea constantelor de rată de disociere a duplexului molecular și nanopor, cât și constanta ratei de rupere a duplexului. Deasemenea, s-a putut estima valoarea energiei libere asociate ruperii legăturilor de hidrogen din structura duplexului.
- Rezultatele obținute permit elaborarea de tehnici de detecție și caracterizare a lanțurilor de acizi nucleici pentru genotipare, secvențiere sau spectroscopie de forță la nivel de singură moleculă pornind de la sisteme bazate pe nanopori proteici și acizi nucleici artificiali.

---

## CONCLUZII FINALE

- În cadrul acestei lucrări a fost evaluată abilitatea metodei de detecție bazată pe nanopori proteici de a investiga cu precizie interacțiuni moleculare la nanoscală. Au fost elaborate cu succes protocoale ce au urmărit utilizarea tehnicii pentru detectarea, caracterizarea și manipularea unor sisteme moleculare variate.
- Pe baza experimentelor de electrofiziologie ce utilizează nanoporul proteic de  $\alpha$ -HL a fost posibilă detectarea cu succes a două tipuri diferite de bacterii Gram-negative, *E. coli* și *P. aeruginosa*. Utilizarea peptidei antimicrobiene CMA3, ca agent biomolecular de recunoaștere, a permis, prin atașarea selectivă și modificarea profilului electrostatic al membranelor bacteriene, discriminarea la nivel conceptual a celor două bacterii.
- Tehnica elaborată a fost aplicată și în cazul studiului dendrimerului PAMAM-G1 și a modificărilor conformatiionale ale acestuia în cazul schimbării parametrilor descriptivi ai mediului (pH, săturare ionică). Astfel, un pH scăzut și o săturare ionică mică promovează adoptarea unei structuri rigide și extinse spațial de către dendrimer, ca urmare a creșterii repulsiei electrostatice dintre aminele primare și terțiare. Creșterea pH-ului și a concentrației de sare a soluției induce o scădere a barierei energetice facilitând translocarea eficientă și rapidă a dendrimerului prin por.
- Analiza procesului de translocare a PAMAM-G1 în condiții de nano-confinare spațială permite o mai bună înțelegere a impactului condițiilor mediului asupra proprietăților mecanice și electrice ale dendrimerului, utilă în dezvoltarea aplicațiilor ce urmăresc utilizarea sistemelor dendrimer-nanopor ca mecanisme de livrare a unor molecule cu rol terapeutic.
- Tehnica de studiu la nivel de singură moleculă utilizând nanoporul de  $\alpha$ -HL a permis ca prin utilizarea unei sonde polipeptidice atașate unei structuri nucleotidice artificiale (PNA) să fie posibilă detectarea cu precizie a reacției de hibridizare cu o secvență complementară de ADN. În acest caz, nanoporul a fost utilizat ca ‘nanoreactor’ pentru interogarea și ruperea duplexurilor moleculare PNA-DNA și pentru determinarea energiilor implicate în procesul de desfacere a perechilor de baze azotat.

---

## BIBLIOGRAFIE

- [1] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, Lindwasser O W, Olenych S, Bonifacino J S, Davidson M W, Lippincott-Schwartz J and Hess H F 2006 Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution *Science* **313** 1642–5
- [2] Rust M J, Bates M and Zhuang X 2006 Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) *Nat. Methods* **3** 793–5
- [3] Klar T A, Jakobs S, Dyba M, Egner A and Hell S W 2000 Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission *Proc Natl Acad Sci USA* **97** 8206
- [4] Edidin M, Zagynsky Y and Lardner T J 1976 Measurement of membrane protein lateral diffusion in single cells *Science* **191** 466–8
- [5] Ellenberg J, Siggia E D, Moreira J E, Smith C L, Presley J F, Worman H J and Lippincott-Schwartz J 1997 Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis *J. Cell Biol.* **138** 1193–206
- [6] Morgan J L W, Strumillo J and Zimmer J 2013 Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation *Nature* **493** 181–6
- [7] Flannigan D J, Barwick B and Zewail A H 2010 Biological imaging with 4D ultrafast electron microscopy *Proc Natl Acad Sci USA* **107** 9933
- [8] Nieminen T A, du Preez-Wilkinson N, Stilgoe A B, Loke V L Y, Bui A A M and Rubinsztein-Dunlop H 2014 Optical tweezers: Theory and modelling *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* **146** 59–80
- [9] Strick T R, Bensimon D and Croquette V 1999 Micro-Mechanical Measurement of the Torsional Modulus of DNA *Structural Biology and Functional Genomics* NATO Science Series (Springer, Dordrecht) pp 87–96
- [10] Hinterdorfer P and Dufrêne Y F 2006 Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy *Nature Methods* **3** 347–55
- [11] Mori T, Miyashita N, Im W, Feig M and Sugita Y 2016 Molecular dynamics simulations of biological membranes and membrane proteins using enhanced conformational sampling algorithms *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1858** 1635–51
- [12] Shaw D E, Maragakis P, Lindorff-Larsen K, Piana S, Dror R O, Eastwood M P, Bank J A, Jumper J M, Salmon J K, Shan Y and Wriggers W 2010 Atomic-level characterization of the structural dynamics of proteins *Science* **330** 341–6
- [13] Ouldridge T E, Hoare R L, Louis A A, Doye J P K, Bath J and Turberfield A J 2013 Optimizing DNA Nanotechnology through Coarse-Grained Modeling: A Two-Footed DNA Walker *ACS Nano* **7** 2479–90

- 
- [14] Machtens J-P, Kortzak D, Lansche C, Leinenweber A, Kilian P, Begemann B, Zachariae U, Ewers D, de Groot B L, Briones R and Fahlke C 2015 Mechanisms of anion conduction by coupled glutamate transporters *Cell* **160** 542–53
  - [15] Sasmal D K and Lu H P 2014 Single-molecule patch-clamp FRET microscopy studies of NMDA receptor ion channel dynamics in living cells: revealing the multiple conformational states associated with a channel at its electrical off state *J. Am. Chem. Soc.* **136** 12998–3005
  - [16] Kasianowicz J J, Brandin E, Branton D and Deamer D W 1996 Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93** 13770–3
  - [17] Mikheyev A S and Tin M M Y A first look at the Oxford Nanopore MinION sequencer *Molecular Ecology Resources* **14** 1097–102
  - [18] Hornblower B, Coombs A, Whitaker R D, Kolomeisky A, Picone S J, Meller A and Akeson M 2007 Single-molecule analysis of DNA-protein complexes using nanopores *Nature Methods* **4** 315–7
  - [19] Anon Disease Detection and Management via Single Nanopore-Based Sensors - Chemical Reviews (ACS Publications)
  - [20] Majd S, Yusko E C, Billeh Y N, Macrae M X, Yang J and Mayer M 2010 Applications of biological pores in nanomedicine, sensing, and nanoelectronics *Curr. Opin. Biotechnol.* **21** 439–76
  - [21] Anon Methods for Rapid Detection of Foodborne Pathogens: An Overview
  - [22] Organization W H 2014 *Preventing diarrhoea through better water, sanitation and hygiene: exposures and impacts in low- and middle-income countries* (World Health Organization)
  - [23] Anon WHO | Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014 WHO
  - [24] Tripathy S and Das M 2013 Dendrimers and their applications as novel drug delivery carriers *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **3** 142–9
  - [25] Wang J, Ma J, Ni Z, Zhang L and Hu G 2014 Effects of access resistance on the resistive-pulse caused by translocating of a nanoparticle through a nanopore *RSC Adv.* **4** 7601–10
  - [26] Hille B 1968 Pharmacological Modifications of the Sodium Channels of Frog Nerve *J Gen Physiol* **51** 199–219
  - [27] Hall J E 1975 Access resistance of a small circular pore *J. Gen. Physiol.* **66** 531–2
  - [28] Kowalczyk S W, Grosberg A Y, Rabin Y and Dekker C 2011 Modeling the conductance and DNA blockade of solid-state nanopores *Nanotechnology* **22** 315101
  - [29] Hyun C, Rollings R and Li J 2012 Probing Access Resistance of Solid-state Nanopores with a Scanning Probe Microscope Tip *Small* **8** 385–92
  - [30] Apel P Y, Blonskaya I V, Orelovitch O L, Ramirez P and Sartowska B A 2011 Effect of nanopore geometry on ion current rectification *Nanotechnology* **22** 175302
  - [31] Anon Micro and nanoscale fluid mechanics transport microfluidic devices | Thermal-fluids engineering *Cambridge University Press*

- 
- [32] Mereuta L, Roy M, Asandei A, Lee J K, Park Y, Andricioaei I and Luchian T 2014 Slowing down single-molecule trafficking through a protein nanopore reveals intermediates for peptide translocation *Scientific Reports* **4** 3885
- [33] Asandei A, Schiopu I, Chinappi M, Seo C H, Park Y and Luchian T 2016 Electroosmotic Trap Against the Electrophoretic Force Near a Protein Nanopore Reveals Peptide Dynamics During Capture and Translocation *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8** 13166–79
- [34] Firnkes M, Pedone D, Knezevic J, Döblinger M and Rant U 2010 Electrically facilitated translocations of proteins through silicon nitride nanopores: conjoint and competitive action of diffusion, electrophoresis, and electroosmosis *Nano Lett.* **10** 2162–7
- [35] Grosberg A Y and Rabin Y 2010 DNA capture into a nanopore: Interplay of diffusion and electrohydrodynamics *The Journal of Chemical Physics* **133** 165102
- [36] Alapati S, Che W S and Suh Y K 2013 Effect of Nanopore Length on the Translocation Process of a Biopolymer: Numerical Study *Materials (Basel)* **6** 3989–4000
- [37] Long D, Viovy J-L and Ajdari A 1996 Simultaneous Action of Electric Fields and Nonelectric Forces on a Polyelectrolyte: Motion and Deformation *Phys. Rev. Lett.* **76** 3858–61
- [38] Muthukumar M 2010 Theory of capture rate in polymer translocation *J Chem Phys* **132**
- [39] Smoluchowski M 1917 Mathematical theory of the kinetics of the coagulation of colloidal solutions *Z. Phys. Chem.* **92**
- [40] Muthukumar M 2011 *Polymer Translocation* (Boca Raton: CRC Press)
- [41] Wong C T A and Muthukumar M 2010 Polymer translocation through alpha-hemolysin pore with tunable polymer-pore electrostatic interaction *J Chem Phys* **133** 045101
- [42] Henrickson S E, Misakian M, Robertson B and Kasianowicz J J 2000 Driven DNA transport into an asymmetric nanometer-scale pore *Phys. Rev. Lett.* **85** 3057–60
- [43] Movileanu L, Howorka S, Braha O and Bayley H 2000 Detecting protein analytes that modulate transmembrane movement of a polymer chain within a single protein pore *Nat. Biotechnol.* **18** 1091–5
- [44] Qiu Y, Lin C-Y, Hinkle P, Plett T S, Yang C, Chacko J V, Digman M A, Yeh L-H, Hsu J-P and Siwy Z S 2016 Highly Charged Particles Cause a Larger Current Blockage in Micropores Compared to Neutral Particles *ACS Nano* **10** 8413–22
- [45] DeBlois R W and Bean C P 1970 Counting and Sizing of Submicron Particles by the Resistive Pulse Technique *Review of Scientific Instruments* **41** 909–16
- [46] Zhang M, Ai Y, Sharma A, Joo S W, Kim D-S and Qian S Electrokinetic particle translocation through a nanopore containing a floating electrode *ELECTROPHORESIS* **32** 1864–74
- [47] Storm A J, Chen J H, Ling X S, Zandbergen H W and Dekker C 2003 Fabrication of solid-state nanopores with single-nanometre precision *Nature Materials* **2** 537–40
- [48] Anon Fabrication of solid- state nanopores and its perspectives - Kudr - 2015 - ELECTROPHORESIS - Wiley Online Library

- 
- [49] Howorka S and Siwy Z 2009 Nanopore analytics: sensing of single molecules *Chem Soc Rev* **38** 2360–84
- [50] Montal M and Mueller P 1972 Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of Their Electrical Properties *PNAS* **69** 3561–6
- [51] Roger I and Symes M D 2017 Silver Leakage from Ag/AgCl Reference Electrodes as a Potential Cause of Interference in the Electrocatalytic Hydrogen Evolution Reaction *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9** 472–8
- [52] Luchian T *Electrofiziologie molecular. Teorii si aplicatii Tudor Luchian* (Iasi: Sedcom Libris)
- [53] Anon 1981 On the mechanism of membrane damage by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin *J Cell Biol* **91** 83–94
- [54] Freer J H, Arbuthnott J P and Bernheimer A W 1968 Interaction of Staphylococcal  $\alpha$ -Toxin with Artificial and Natural Membranes *I J Bacteriol* **95** 1153–68
- [55] Song L, Hobaug M R, Shustak C, Cheley S, Bayley H and Gouaux J E 1996 Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore *Science* **274** 1859–66
- [56] Kasianowicz J J, Burden D L, Han L C, Cheley S and Bayley H 1999 Genetically Engineered Metal Ion Binding Sites on the Outside of a Channel's Transmembrane  $\beta$ -Barrel *Biophysical Journal* **76** 837–45
- [57] Misakian M and Kasianowicz J J 2003 Electrostatic Influence on Ion Transport through the alpha HL Channel *Journal of Membrane Biology* **195**
- [58] Merzlyak P G, Capistrano M-F P, Valeva A, Kasianowicz J J and Krasilnikov O V 2005 Conductance and ion selectivity of a mesoscopic protein nanopore probed with cysteine scanning mutagenesis *Biophys. J.* **89** 3059–70
- [59] Akeson M, Branton D, Kasianowicz J J, Brandin E and Deamer D W 1999 Microsecond Time-Scale Discrimination Among Polycytidylic Acid, Polyadenylic Acid, and Polyuridylic Acid as Homopolymers or as Segments Within Single RNA Molecules *Biophysical Journal* **77** 3227–33
- [60] Dekker C 2007 Solid-state nanopores *Nature Nanotechnology* **2** 209–15
- [61] Bezrukov null and Kasianowicz null 1993 Current noise reveals protonation kinetics and number of ionizable sites in an open protein ion channel *Phys. Rev. Lett.* **70** 2352–5
- [62] Kasianowicz J J and Bezrukov S M 1995 Protonation dynamics of the alpha-toxin ion channel from spectral analysis of pH-dependent current fluctuations. *Biophys J* **69** 94–105
- [63] Kang X-F, Gu L-Q, Cheley S and Bayley H 2005 Single protein pores containing molecular adapters at high temperatures *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **44** 1495–9
- [64] Meller A, Nivon L, Brandin E, Golovchenko J and Branton D 2000 Rapid nanopore discrimination between single polynucleotide molecules *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** 1079–84
- [65] Wolfe A J, Mohammad, Cheley S, Bayley H and Movileanu L 2007 Catalyzing the Translocation of Polypeptides through Attractive Interactions *J. Am. Chem. Soc.* **129** 14034–41

- 
- [66] Braha O, Gu L-Q, Zhou L, Lu X, Cheley S and Bayley H 2000 Simultaneous stochastic sensing of divalent metal ions *Nature Biotechnology* **18** 1005–7
- [67] Asandei A, Schiopu I, Iftemi S, Mereuta L and Luchian T 2013 Investigation of Cu<sup>2+</sup> binding to human and rat amyloid fragments A<sup>β</sup> (1-16) with a protein nanopore *Langmuir* **29** 15634–42
- [68] Nielsen K, Mogensen H S, Hedman J, Niederstätter H, Parson W and Morling N 2008 Comparison of five DNA quantification methods *Forensic Science International: Genetics* **2** 226–30
- [69] Glasel J A 1995 Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios *BioTechniques* **18** 62–3
- [70] Wang X, Lim H J and Son A 2014 Characterization of denaturation and renaturation of DNA for DNA hybridization *Environ Health Toxicol* **29**
- [71] Tataurov A V, You Y and Owczarzy R 2008 Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids *Biophys. Chem.* **133** 66–70
- [72] Anon The UV spectrum of a base
- [73] Barbatti M, Aquino A J A and Lischka H 2010 The UV absorption of nucleobases: semi-classical ab initio spectra simulations *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12** 4959–67
- [74] Freifelder D and Davison P F 1962 Hyperchromicity and strand separation in bacterial DNA *Biophys. J.* **2** 249–56
- [75] Carlsson S 2012 Surface Characterization of Gram-Negative Bacteria and their Vesicles: Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Dynamic Light Scattering
- [76] Shokri A and Larsson G 2004 Characterisation of the Escherichia coli membrane structure and function during fedbatch cultivation *Microb Cell Fact* **3** 9
- [77] Sohlenkamp C and Geiger O 2016 Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways *FEMS Microbiol. Rev.* **40** 133–59
- [78] Anon E. coli Extract Total | Avanti Polar Lipids
- [79] Tashiro Y, Inagaki A, Shimizu M, Ichikawa S, Takaya N, Nakajima-Kambe T, Uchiyama H and Nomura N 2011 Characterization of phospholipids in membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75** 605–7
- [80] Lewenza S, Falsafi R, Bains M, Rohs P, Stupak J, Sprott G D and Hancock R E W 2011 The olsA gene mediates the synthesis of an ornithine lipid in *Pseudomonas aeruginosa* during growth under phosphate-limiting conditions, but is not involved in antimicrobial peptide susceptibility *FEMS Microbiol. Lett.* **320** 95–102
- [81] Klein S, Lorenzo C, Hoffmann S, Walther J M, Storbeck S, Piekarski T, Tindall B J, Wray V, Nimtz M and Moser J 2009 Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to various conditions includes tRNA-dependent formation of alanyl-phosphatidylglycerol *Mol. Microbiol.* **71** 551–65
- [82] <https://avantilipids.com/product/100500>
- [83] Luirink J, von Heijne G, Houben E and de Gier J-W 2005 Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli* *Annu. Rev. Microbiol.* **59** 329–55

- 
- [84] Daley D O, Rapp M, Granseth E, Melén K, Drew D and von Heijne G 2005 Global topology analysis of the *Escherichia coli* inner membrane proteome *Science* **308** 1321–3
- [85] Maddalo G, Stenberg-Bruzell F, Götzke H, Todd S, Björkholm P, Eriksson H, Chovanec P, Genevaux P, Lehtio J, Ilag L L and Daley D O 2011 Systematic analysis of native membrane protein complexes in *Escherichia coli* *J. Proteome Res.* **10** 1848–59
- [86] Mullineaux C W, Nenninger A, Ray N and Robinson C 2006 Diffusion of Green Fluorescent Protein in Three Cell Environments in *Escherichia Coli* *J. Bacteriol.* **188** 3442–8
- [87] Vollmer W, Blanot D and de Pedro M A 2008 Peptidoglycan structure and architecture *FEMS Microbiol. Rev.* **32** 149–67
- [88] Vollmer W and Höltje J-V 2004 The Architecture of the Murein (Peptidoglycan) in Gram-Negative Bacteria: Vertical Scaffold or Horizontal Layer(s)? *J. Bacteriol.* **186** 5978–87
- [89] Beacham I R 1979 Periplasmic enzymes in gram-negative bacteria *International Journal of Biochemistry* **10** 877–83
- [90] Wülfing C and Plückthun A 1994 Protein folding in the periplasm of *Escherichia coli* *Mol. Microbiol.* **12** 685–92
- [91] Morrison D C and Ryan J L 1987 Endotoxins and disease mechanisms *Annu. Rev. Med.* **38** 417–32
- [92] Raetz C R, Ulevitch R J, Wright S D, Sibley C H, Ding A and Nathan C F 1991 Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction *FASEB J.* **5** 2652–60
- [93] Taveira da Silva A M, Kaulbach H C, Chudian F S, Lambert D R, Suffredini A F and Danner R L 1993 Brief report: shock and multiple-organ dysfunction after self-administration of *Salmonella* endotoxin *N. Engl. J. Med.* **328** 1457–60
- [94] Caroff M and Karibian D 2003 Structure of bacterial lipopolysaccharides *Carbohydr. Res.* **338** 2431–47
- [95] Frirdich E, Bouwman C, Vinogradov E and Whitfield C 2005 The Role of Galacturonic Acid in Outer Membrane Stability in *Klebsiella pneumoniae* *J. Biol. Chem.* **280** 27604–12
- [96] Raetz C R H, Reynolds C M, Trent M S and Bishop R E 2007 Lipid A modification systems in gram-negative bacteria *Annu. Rev. Biochem.* **76** 295–329
- [97] Homma J Y, Matsuura M, Kanegasaki S, Kawakubo Y, Kojima Y, Shibukawa N, Kumazawa Y, Yamamoto A, Tanamoto K and Yasuda T 1985 Structural requirements of lipid A responsible for the functions: a study with chemically synthesized lipid A and its analogues *J. Biochem.* **98** 395–406
- [98] Galanos C, Lüderitz O, Rietschel E T, Westphal O, Brade H, Brade L, Freudenberg M, Schade U, Imoto M and Yoshimura H 1985 Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities *Eur. J. Biochem.* **148** 1–5
- [99] Silipo A and Molinaro A 2010 The Diversity of the Core Oligosaccharide in Lipopolysaccharides *Endotoxins: Structure, Function and Recognition* Subcellular Biochemistry (Springer, Dordrecht) pp 69–99

- 
- [100] Wang Z, Wang J, Ren G, Li Y and Wang X 2015 Influence of Core Oligosaccharide of Lipopolysaccharide to Outer Membrane Behavior of *Escherichia coli* *Mar Drugs* **13** 3325–39
- [101] Stenutz R, Weintraub A and Widmalm G 2006 The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens *FEMS Microbiol. Rev.* **30** 382–403
- [102] Walker S L, Redman J A and Elimelech M 2004 Role of Cell Surface Lipopolysaccharides in *Escherichia coli* K12 Adhesion and Transport *Langmuir* **20** 7736–46
- [103] Schromm A B, Brandenburg K, Loppnow H, Zähringer U, Rietschel E T, Carroll S F, Koch M H, Kusumoto S and Seydel U 1998 The charge of endotoxin molecules influences their conformation and IL-6-inducing capacity *J. Immunol.* **161** 5464–71
- [104] Reeves P 1995 Role of O-antigen variation in the immune response *Trends Microbiol.* **3** 381–6
- [105] Duerr C U, Zenk S F, Chassin C, Pott J, Gütle D, Hensel M and Hornef M W 2009 O-Antigen Delays Lipopolysaccharide Recognition and Impairs Antibacterial Host Defense in Murine Intestinal Epithelial Cells *PLOS Pathogens* **5** e1000567
- [106] Appelmelk B J, Simoons-Smit I, Negrini R, Moran A P, Aspinall G O, Forte J G, De Vries T, Quan H, Verboom T, Maaskant J J, Ghiara P, Kuipers E J, Bloemena E, Tadema T M, Townsend R R, Tyagarajan K, Crothers J M, Monteiro M A, Savio A and De Graaff J 1996 Potential role of molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and host Lewis blood group antigens in autoimmunity *Infect. Immun.* **64** 2031–40
- [107] Alloing G, de Philip P and Claverys J P 1994 Three highly homologous membrane-bound lipoproteins participate in oligopeptide transport by the Ami system of the gram-positive *Streptococcus pneumoniae* *J. Mol. Biol.* **241** 44–58
- [108] Braun V and Wu H C 1994 Chapter 14 Lipoproteins, structure, function, biosynthesis and model for protein export *New Comprehensive Biochemistry* Bacterial Cell Wall vol 27, ed J-M Ghuyse and R Hakenbeck (Elsevier) pp 319–41
- [109] Bayer M E and Sloyer J L 1990 The electrophoretic mobility of gram-negative and gram-positive bacteria: an electrokinetic analysis *J. Gen. Microbiol.* **136** 867–74
- [110] Lee J-K, Seo C H, Luchian T and Park Y 2016 Antimicrobial Peptide CMA3 Derived from the CA-MA Hybrid Peptide: Antibacterial and Anti-inflammatory Activities with Low Cytotoxicity and Mechanism of Action in *Escherichia coli* *Antimicrob. Agents Chemother.* **60** 495–506
- [111] Maupetit J, Derreumaux P and Tuffery P 2009 PEP-FOLD: an online resource for de novo peptide structure prediction *Nucleic Acids Research* **37** W498–503
- [112] Apetrei A, Ciucă A, Lee J-K, Seo C H, Park Y and Luchian T 2016 A Protein Nanopore-Based Approach for Bacteria Sensing *Nanoscale Res Lett* **11** 501
- [113] Pastoriza-Gallego M, Rabah L, Gibrat G, Thiebot B, van der Goot F G, Auvray L, Betton J-M and Pelta J 2011 Dynamics of Unfolded Protein Transport through an Aerolysin Pore *J. Am. Chem. Soc.* **133** 2923–31
- [114] Oukhaled A, Bacri L, Pastoriza-Gallego M, Betton J-M and Pelta J 2012 Sensing Proteins through Nanopores: Fundamental to Applications *ACS Chem. Biol.* **7** 1935–49

- 
- [115] Alves C S, Melo M N, Franquelim H G, Ferre R, Planas M, Feliu L, Bardají E, Kowalczyk W, Andreu D, Santos N C, Fernandes M X and Castanho M A R B 2010 Escherichia coli cell surface perturbation and disruption induced by antimicrobial peptides BP100 and pepR *J. Biol. Chem.* **285** 27536–44
- [116] Shephard J, McQuillan A J and Bremer P J 2008 Mechanisms of Cation Exchange by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and PAO1 wbpL, a Strain with a Truncated Lipopolysaccharide *Appl Environ Microbiol* **74** 6980–6
- [117] Kerchove A J de and Elimelech M 2007 Impact of Alginate Conditioning Film on Deposition Kinetics of Motile and Nonmotile *Pseudomonas aeruginosa* Strains *Appl. Environ. Microbiol.* **73** 5227–34
- [118] Tomalia D A, Baker H, Dewald J, Hall M, Kallos G, Martin S, Roeck J, Ryder J and Smith P 1985 A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules *Polymer Journal* **17** 117–32
- [119] Fréchet J M 1994 Functional polymers and dendrimers: reactivity, molecular architecture, and interfacial energy *Science* **263** 1710–5
- [120] Lombardo D, Calandra P, Bellocchio E, Laganà G, Barreca D, Magazù S, Wanderlingh U and Kiselev M A 2016 Effect of anionic and cationic polyamidoamine (PAMAM) dendrimers on a model lipid membrane *Biochim. Biophys. Acta* **1858** 2769–77
- [121] Chauhan A S, Jain N K and Diwan P V 2009 Pre-clinical and behavioural toxicity profile of PAMAM dendrimers in mice *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* rspa20090448
- [122] Mankbadi M R, Barakat M A, Ramadan M H, Woodcock H L and Kuhn J N 2011 Iron chelation by polyamidoamine dendrimers: a second-order kinetic model for metal-amine complexation *J Phys Chem B* **115** 13534–40
- [123] Giri J, Diallo M S, Simpson A J, Liu Y, Goddard W A, Kumar R and Woods G C 2011 Interactions of Poly(amidoamine) Dendrimers with Human Serum Albumin: Binding Constants and Mechanisms *ACS Nano* **5** 3456–68
- [124] Hu J, Xu T and Cheng Y 2012 NMR Insights into Dendrimer-Based Host–Guest Systems *Chem. Rev.* **112** 3856–91
- [125] Ficker M, Petersen J F, Hansen J S and Christensen J B 2015 Guest-Host Chemistry with Dendrimers—Binding of Carboxylates in Aqueous Solution *PLoS ONE* **10** e0138706
- [126] Kojima C, Kono K, Maruyama K and Takagishi T 2000 Synthesis of Polyamidoamine Dendrimers Having Poly(ethylene glycol) Grafts and Their Ability To Encapsulate Anticancer Drugs *Bioconjugate Chem.* **11** 910–7
- [127] Lee I, Athey B, Wetzel A, Meixner W and Baker J 2002 Structural Molecular Dynamics Studies on Polyamidoamine Dendrimers for a Therapeutic Application: Effects of pH and Generation *Macromolecules* **35**
- [128] Pande S and Crooks R M 2011 Analysis of Poly(amidoamine) Dendrimer Structure by UV–Vis Spectroscopy *Langmuir* **27** 9609–13

- 
- [129] de Gennes P G and Hervet H 1983 Statistics of “Starburst” Polymers <http://dx.doi.org/10.1051/jphyslet:01983004409035100> **44**
- [130] Mansfield M L and Klushin L I 1993 Monte Carlo studies of dendrimer macromolecules *Macromolecules* **26** 4262–8
- [131] Maiti P K, Çağın T, Wang G and Goddard W A 2004 Structure of PAMAM Dendrimers: Generations 1 through 11 *Macromolecules* **37** 6236–54
- [132] Meltzer A D, Tirrell D A, Jones A A, Inglefield P T, Hedstrand D M and Tomalia D A 1992 Chain dynamics in poly(amidoamine) dendrimers: a study of carbon-13 NMR relaxation parameters *Macromolecules* **25** 4541–8
- [133] Lescanec R L and Muthukumar M 1990 Configurational characteristics and scaling behavior of starburst molecules: a computational study *Macromolecules* **23** 2280–8
- [134] Anon Molecular Dynamics Study of Dendrimer Molecules in Solvents of Varying Quality - Macromolecules (ACS Publications)
- [135] Chai M, Niu Y, Youngs W J and Rinaldi P L 2001 Structure and Conformation of DAB Dendrimers in Solution via Multidimensional NMR Techniques *J. Am. Chem. Soc.* **123** 4670–8
- [136] Castagnola M, Zuppi C, Rossetti D V, Vincenzoni F, Lupi A, Vitali A, Meucci E and Messana I 2002 Characterization of dendrimer properties by capillary electrophoresis and their use as pseudostationary phases *Electrophoresis* **23** 1769–78
- [137] Terao T and Nakayama T 2004 Molecular Dynamics Study of Dendrimers: Structure and Effective Interaction *Macromolecules* **37** 4686–94
- [138] Rathgeber S, Monkenbusch M, Kreitschmann M, Urban V and Bruylants A 2002 Dynamics of starburst dendrimers in solution in relation to their structural properties *The Journal of Chemical Physics* **117** 4047–62
- [139] Topp A, Bauer B J, Tomalia D A and Amis E J 1999 Effect of Solvent Quality on the Molecular Dimensions of PAMAM Dendrimers *Macromolecules* **32** 7232–7
- [140] Chen W-R, Porcar L, Liu Y, Butler P D and Magid L J 2007 Small Angle Neutron Scattering Studies of the Counterion Effects on the Molecular Conformation and Structure of Charged G4 PAMAM Dendrimers in Aqueous Solutions *Macromolecules* **40** 5887–98
- [141] Liu Y, Bryantsev V S, Diallo M S and Goddard W A 2009 PAMAM dendrimers undergo pH responsive conformational changes without swelling *J. Am. Chem. Soc.* **131** 2798–9
- [142] Nisato G, Ivkov R and Amis E J 2000 Size Invariance of Polyelectrolyte Dendrimers *Macromolecules* **33** 4172–6
- [143] Huissmann S, Wynveen A, Likos C N and Blaak R 2010 The effects of pH, salt and bond stiffness on charged dendrimers *J Phys Condens Matter* **22** 232101
- [144] Bosman A W, Janssen H M and Meijer E W 1999 About Dendrimers: Structure, Physical Properties, and Applications *Chem. Rev.* **99** 1665–88
- [145] Geitner N K, Wang B, Andorfer R E, Ladner D A, Ke P C and Ding F 2014 Structure-function relationship of PAMAM dendrimers as robust oil dispersants *Environ. Sci. Technol.* **48** 12868–75

- 
- [146] Koç F E and Senel M 2013 Solubility enhancement of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) using polypolypropylene oxide core PAMAM dendrimers *Int J Pharm* **451** 18–22
- [147] Cheng Y, Man N, Xu T, Fu R, Wang X, Wang X and Wen L 2007 Transdermal delivery of nonsteroidal anti-inflammatory drugs mediated by polyamidoamine (PAMAM) dendrimers *J Pharm Sci* **96** 595–602
- [148] Medina S H and El-Sayed M E H 2009 Dendrimers as Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Agents *Chem. Rev.* **109** 3141–57
- [149] Li X, Takashima M, Yuba E, Harada A and Kono K 2014 PEGylated PAMAM dendrimer-doxorubicin conjugate-hybridized gold nanorod for combined photothermal-chemotherapy *Biomaterials* **35** 6576–84
- [150] Asandei A, Ciucă A, Apetrei A, Schiopu I, Mereuta L, Seo C H, Park Y and Luchian T 2017 Nanoscale Investigation of Generation 1 PAMAM Dendrimers Interaction with a Protein Nanopore *Scientific Reports* **7** 6167
- [151] Ficici E, Andricioaei I and Howorka S 2015 Dendrimers in Nanoscale Confinement: The Interplay between Conformational Change and Nanopore Entrance *Nano Lett.* **15** 4822–8
- [152] Piguet F, Discala F, Breton M-F, Pelta J, Bacri L and Oukhaled A 2014 Electroosmosis through  $\alpha$ -Hemolysin That Depends on Alkali Cation Type *J. Phys. Chem. Lett.* **5** 4362–7
- [153] Hille B *Ion Channels of Excitable Membranes*, Third Edition 11
- [154] Goldberg R N and Nuttall R L 1978 Evaluated activity and osmotic coefficients for aqueous solutions: The alkaline earth metal halides *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **7** 263–310
- [155] Wong C T A and Muthukumar M 2007 Polymer capture by electro-osmotic flow of oppositely charged nanopores *The Journal of Chemical Physics* **126** 164903
- [156] Ling D Y and Ling X S 2013 On the distribution of DNA translocation times in solid-state nanopores: an analysis using Schrödinger's first-passage-time theory *J Phys Condens Matter* **25** 375102
- [157] Jiménez V A, Gavín J A and Alderete J B 2012 Scaling trend in diffusion coefficients of low generation G0–G3 PAMAM dendrimers in aqueous solution at high and neutral pH *Struct Chem* **23** 123–8
- [158] Leon P A A I and Zharov I 2011 Size-selective molecular transport through silica colloidal nanopores *Chemical Communications* **47** 553–5
- [159] Maiti P K and Bagchi B 2009 Diffusion of flexible, charged, nanoscopic molecules in solution: Size and pH dependence for PAMAM dendrimer *J Chem Phys* **131** 214901
- [160] <https://www.atdbio.com/content/12/Nucleic-acid-analogues>
- [161] Wittung P, Nielsen P E, Buchardt O, Egholm M and Norde'n B 1994 DNA-like double helix formed by peptide nucleic acid *Nature* **368** 561–3

- 
- [162] Calabretta A, Tedeschi T, Corradini R, Marchelli R and Sforza S 2011 DNA and RNA binding properties of an arginine-based ‘Extended Chiral Box’ Peptide Nucleic Acid *Tetrahedron Letters* **52** 300–4
- [163] Joshi R, Jha D, Su W and Engelmann J 2010 Facile synthesis of peptide nucleic acids and peptide nucleic acid-peptide conjugates on an automated peptide synthesizer *Journal of Peptide Science* **17** 8–13
- [164] Hyrup B and Nielsen P E 1996 Peptide nucleic acids (PNA): synthesis, properties and potential applications *Bioorg. Med. Chem.* **4** 5–23
- [165] Gildea B D and Coull J M 2004 Methods for modulating the solubility of synthetic polymers
- [166] Lesnik E, Hassman F, Barbeau J, Teng K, Weiler K, Griffey R and Freier S 1997 Triplex Formation Between DNA and Mixed Purine-Pyrimidine PNA Analog with Lysines in Backbone *Nucleosides and Nucleotides* **16** 1775–9
- [167] Nielsen P E, Egholm M, Berg R H and Buchardt O 1991 Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide *Science* **254** 1497–500
- [168] Egholm M, Nielsen P E, Buchardt O and Berg R H 1992 Recognition of guanine and adenine in DNA by cytosine and thymine containing peptide nucleic acids (PNA) *J. Am. Chem. Soc.* **114** 9677–8
- [169] Wang qi, Chen L, Long Y, Wu W and Wu J 2013 *Molecular Beacons of Xeno-Nucleic Acid for Detecting Nucleic Acid* vol 3
- [170] Chiarantini L, Cerasi A, Fraternale A, Millo E, Benatti U, Sparnacci K, Laus M, Ballestri M and Tondelli L 2005 Comparison of novel delivery systems for antisense peptide nucleic acids *J Control Release* **109** 24–36
- [171] Robaczewska M, Narayan R, Seigneres B, Schorr O, Thermet A, Podhajska A J, Trepo C, Zoulim F, Nielsen P E and Cova L 2005 Sequence-specific inhibition of duck hepatitis B virus reverse transcription by peptide nucleic acids (PNA) *J. Hepatol.* **42** 180–7
- [172] Nielsen P E 2001 Peptide nucleic acid targeting of double-stranded DNA *Methods in Enzymology Drug-Nucleic Acid Interactions* vol 340 (Academic Press) pp 329–40
- [173] Tyagi S and Kramer F R 1996 Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization *Nat. Biotechnol.* **14** 303–8
- [174] Tian K, He Z, Wang Y, Chen S-J and Gu L-Q 2013 Designing a Polycationic Probe for Simultaneous Enrichment and Detection of MicroRNAs in a Nanopore *ACS Nano* **7** 3962–9
- [175] Lee J-S, Kim S, Na H-K and Min D-H MicroRNA-Responsive Drug Release System for Selective Fluorescence Imaging and Photodynamic Therapy In Vivo *Advanced Healthcare Materials* **5** 2386–95
- [176] Stockwell B R 2000 Frontiers in chemical genetics *Trends Biotechnol.* **18** 449–55
- [177] Ciucă A, Asandei A, Schiopu I, Apetrei A, Mereuta L, Seo C H, Park Y and Luchian T 2018 Single-Molecule, Real-Time Dissecting of Peptide Nucleic Acid-DNA Duplexes with a Protein Nanopore Tweezer *Anal. Chem.* **90** 7682–90

- 
- [178] Ren H, Cheyne C G, Fleming A M, Burrows C J and White H S 2018 Single-Molecule Titration in a Protein Nanoreactor Reveals the Protonation/Deprotonation Mechanism of a C:C Mismatch in DNA *J. Am. Chem. Soc.* **140** 5153–60
- [179] Heng J B, Aksimentiev A, Ho C, Marks P, Grinkova Y V, Sligar S, Schulten K and Timp G 2006 The Electromechanics of DNA in a Synthetic Nanopore *Biophys J* **90** 1098–106
- [180] Ratilainen T, Holmén A, Tuite E, Nielsen P E and Nordén B 2000 Thermodynamics of Sequence-Specific Binding of PNA to DNA *Biochemistry* **39** 7781–91

---

## **Lucrări prezentate la conferințe naționale**

1. Isabela Dragomir, Andrei Ciucă, Aurelia Apetrei, Corina Ciobănașu, *Studiul interacțiunii dintre peptide antimicrobiene marcate fluorescent și membrane biomimetice bacteriene*, **FARPHYS 2015 - Sesiune de comunicări științifice studențești**, 24 Octombrie, 2015, Iași, România.
2. Aurelia Apetrei, Andrei Ciucă, Jong-kook Lee, Chang Ho Seo, Yookyung Park, Tudor Luchian, Assessing antimicrobial peptides interaction with Gram-negative bacterial cells using a protein nanopore sensor, **14th National Conference of Biophysics – CNB 2016**, 2-4 Iunie, 2016, Cluj-Napoca, România.
3. Andrei Ciucă, Alina Asandei, Irina Șchiopu, Aurelia Apetrei, Loredana Mereuță, Chang Ho Seo, Yoonkyung Park, Tudor Luchian, *Breaking Apart Molecular Dimer with Nanopores*, **15th National Conference of Biophysics – CNB 2018**, 7-10 Septembrie 2018, București, România.

---

## **Lucrări prezentate la conferințe internaționale**

1. Aurelia Apetrei, **Andrei Ciucă**, Jong-kook Lee, Chang Ho Seo, Yoonkyung Park, Tudor Luchian, *Tuning the interaction environment for single nanopore-based sensing of Gram-negative bacterial cells*, **International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences - IC-ANMBES 2016**, 29 Iunie – 1 Iulie, 2016, Brașov, România.
2. **Andrei Ciucă**, Aurelia Apetrei, Jong-kook Lee, Chang Ho Seo, Yoonkyung Park, Tudor Luchian, *Nanopore-based detection of selected Gram-negative bacterial cells*, **41st FEBS Congress**, 3-8 Septembrie, 2016, Kuşadası, Turcia.
3. **Andrei Ciucă**, Alina Asandei, Aurelia Apetrei, Irina Șchiopu, Loredana Mereuță, Chang Ho Seo, Yoonkyung Park, Tudor Luchian, *Uni-molecular study of the pH- and salt-dependent PAMAM dendrimers – α-hemolysin nanopore interactions*, **19th IUPAB Congress and 11th EPSA Congress**, 16-22 Iulie, 2017, Edinburgh, Scoția.
4. Alina Asandei, **Andrei Ciucă**, Irini Șchiopu, Aurelia Apetrei, Loredana Mereuță, Chang Ho Seo, Yookyoung Park, Tudor Luchian, *Single-Molecule Study of pH- and Salt-Induced Conformational Changes of PAMAM-G1and –G1.5 Dendrimers, with Protein Nanopores*, **International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences - IC-ANMBES 2018**, 23-25 Mai, 2018, Brașov, România.
5. **Irinia Șchiopu**, **Andrei Ciucă**, Alina Asandei, Aurelia Apetrei, Chang Ho Seo, Yoonkyung Park, Tudor Luchian, *Exploring PNA-DNA Hybrids with a Nanopore-Based Technique*, **International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences - IC-ANMBES 2018**, 23-25 Mai, 2018, Brașov, România.
6. **Tudor Luchian**, Alina Asandei, Irina Șchiopu, **Andrei Ciucă**, Loredana Mereuță, Aurelia Apetrei, Corina Ciobănașu, *Interrogation of biomolecular structure at nanoscale*, **International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences - IC-ANMBES 2018**, 23-25 Mai, 2018, Brașov, România.

---

## Articole publicate în reviste indexate ISI

1. Aurelia Apetrei\*, **Andrei Ciucă\***, Jong-kook Lee, Chang Ho Seo, Yookyung Park, Tudor Luchian, *A Protein Nanopore-Based Approach for Bacteria Sensing*, **2016**, *Nanoscale Research Letters* 11, 501.

**Factor de impact:** 3.125

**Prim autor:** da, contribuții egale cu Aurelia Apetrei

**Citări:**

- G. M. Roozbahani et al., *Peptide-Mediated Nanopore Detection of Uranyl Ions in Aqueous Media*, 2017, *ACS Sensors*, 2(5), 703-709.
- M. Tsutsui et al., *Discriminating single-bacterial shape using low-aspect-ratio pores*, 2017, *Scientific Reports*, 7, 17371.
- M. Tsutsui et al., *Identification of Individual Bacterial Cells through the Intermolecular Interactions with Peptide-Functionalized Solid-State Pores*, 2018, *ACS Analytical Chemistry*, 90(3), 1511-1515.
- M. Fahie, *Por forming protein assembly and the use in nanopore sensing: a study on E. coli proteins ClyA and OmpG*, Doctoral Dissertation, University of Massachusetts Amherst – UMass Amherst, 2017, USA.
- S. Zhou et al., *Applications of Nanopore Sensing in Detection of Toxic Molecules*, 2018, *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 46(6), 826-835.

2. Alina Asandei\*, **Andrei Ciucă\***, Aurelia Apetrei, Irinia Șchiopu, Loredana Mereuță, Chang Ho Seo, Yookyung Park, Tudor Luchian, *Nanoscale Investigation of Generation 1 PAMAM Dendrimers Interaction with a Protein Nanopore*, **2017**, *Scientific Reports* 7, 6167.

**Factor de impact:** 4.122

**Prim autor:** da, contribuții egale cu Alina Asandei

**Citări:**

- A. Asandei et al. *If Squeezed, a Camel Passes Through the Eye of a Needle: Voltage-Mediated Stretching of Dendrimers Facilitates Passage Through a Nanopore*, 2018, *The Journal of Membrane Biology*, 251(3), 405-417.

3. **Andrei Ciucă\***, Alina Asandei\*, Irina Șchiopu, Aurelia Apetrei, Loredana Mereuță, Chang Ho Seo, Yookyung Park, Tudor Luchian, *Single-Molecule, Real-Time Dissecting of Peptide Nucleic Acid-DNA Duplexes with a Protein Nanopore Tweezer*, **2018**, *ACS Analytical Chemistry*, 90(12), 7682-7690.

**Factor de impact:** 6.0242

**Prim autor:** da, contribuții egale cu Alina Asandei și Irina Șchiopu

---

## **Proiecte de cercetare**

1. PN-II-RU-TE-2014-4-2388 nr. 64/01.10.2015 – „**Metodă bazată pe nanopori de detecție și cuantificare a bacteriilor prin interacțiunea selectivă a peptidelor antimicrobiene cu membrane bacteriene (BACTODET)**”
2. PN-III-P4-ID-PCE-2016-0026 nr. 33/12.07.2017 – „**Studierea interacțiilor la nivel unimolecular cu ajutorul pensetei cu nanopori. Aplicații în investigarea interacțiunilor mediate de metale în hibridizarea bazelor necomplementare din acizi nucleici (NANOTWEEZ)**”
3. PN-III-P1-1.1-TE-2016-0508 nr. 45/02.05.2018– „**Identificarea unimoleculară a domeniilor aminoacidice din structura primară a polipeptidelor folosind nanopori proteici (PEPREC)**”
4. PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0010 nr. 74PCCDI/01.03.2018 – „**Tehnologii moleculare emergente bazate pe sisteme micro și nano-structurate cu aplicații biomedicale (TehnoBioMed)**”