

# Studiul la nivel de singură moleculă al mecanismului de desfacere (unzip) a duplecșilor ADN-PNA cu ajutorul nanoporului proteic de $\alpha$ -hemolizină ( $\alpha$ -HL)

**Ioana Cezara Bucătaru<sup>1</sup>, Isabela Ștefania Dragomir<sup>2</sup>, Irina Șchiopu<sup>2</sup>, Tudor Luchian<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Școala Doctorală a Facultății de Fizică, Universitatea “Alexandru Ioan Cuza” din Iași

<sup>2</sup>Departamentul Științe, Institutul de Cercetări Interdisciplinare, Universitatea “Alexandru Ioan Cuza” din Iași

email: bucataru.cezara93@gmail.com

## Abstract

Tehnicile de investigare la nivel de singură moleculă sunt implementate cu succes pentru a studia sistemele biologice complexe și pentru a înțelege interacțiunile intra- și intermoleculare primordiale pentru procesele biologice, precum împachetarea/despachetarea proteinelor sau a acizilor nucleici, replicarea ADN-ului și transcrierea genetică a ARN-ului, interacțiuni dintre acizi nucleici și proteine sau recunoaștere moleculară în general. [1], [2]

Acizii peptido-nucleici (PNA) sunt analogi sintetici ai moleculelor de ADN, cu structura peptidică formată din unități *N*-(2-aminoetil) glicină, neutră din punct de vedere electric, ce înlocuiește grupările fosfat și dezoxiriboză din componența ADN-ului, și sunt capabili să formeze duplecși complementari cu molecule de ADN [3]. Moleculele PNA sunt utilizate într-o multitudine de aplicații în terapia genică, în diagnosticul molecular și nanotehnologii, precum detecția selectivă a ADN-ului monocatenar [4], determinarea energiei de hibridizare dintre duplecșii ADN-PNA [5] sau detecția unor nucleotide nepereche din structura ADN-ului [6].

În cadrul acestui studiu comparativ am utilizat tehnica experimentală de electrofiziologie moleculară bazată pe nanopori proteici pentru a investiga mecanismul de desfacere a duplecșilor ADN-PNA și ADN-PNA conjugat cu o polipeptidă de poliarginine. În realizarea experimentelor am utilizat un nanopor proteic format de proteina homo-heptamerică  $\alpha$ -hemolizina ( $\alpha$ -HL), inserat într-un bistrat lipidic ce separă două cuve umplute cu soluție electrofiziologică, denumite *cis* și *trans*. Prin intermediul a doi electrozi de Ag/AgCl imersați în cele două cuve se înregistrează fluctuațiile de curent ionic mediate de canalul ionic, datorate interacțiunii cu nanoporul a duplecșilor complementari ce se formează în *cis*, la aplicarea diferențelor de potențial transmembranar pozitive.

Analiza statistică a evenimentelor de blocaj caracteristice fiecărui complex a permis identificarea unor particularități esențiale procesului de desfacere a duplexului, ce are loc în interiorul nanoporului, după captarea acestuia în vestibul. Am observat că prezența cozii de poliarginine atașată moleculei de PNA accelerează procesul de desfacere a duplexului ADN-PNA și am propus un model ce descrie interacțiunea nanopor\*ADN-PNA. [7]

Aceste rezultate reprezintă un pas important spre o bună înțelegere a variabilității cineticii mecanismului de desfacere a duplexului format de acizi nucleici, iar cunoașterea acestor aspecte permit dezvoltarea unor metode de investigare a proceselor ce implică acizi nucleici.

**Keywords:** FIZICĂ; electrofiziologie; singură moleculă; PNA;

**Domain:** Fizică

**Section:** Elaborarea tezei de doctorat

## Acknowledgements

Această cercetare a fost realizată cu suport financiar din PN-III-P1-1.1-PD-2016-0737, 34PFE/19.10.2018 and PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0010 / 74PCCDI/2018 (PNCDI III).

## References

- [1] W. Shi, A. K. Friedman, and L. A. Baker, "Nanopore Sensing," *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 1, pp. 157–188, Jan. 2017, doi: 10.1021/acs.analchem.6b04260.
- [2] N. Varongchayakul, J. Song, A. Meller, and M. W. Grinstaff, "Single-molecule protein sensing in a nanopore: a tutorial," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 47, no. 23, pp. 8512–8524, 2018, doi: 10.1039/C8CS00106E.
- [3] M. Egholm *et al.*, "PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules," *Nature*, vol. 365, no. 6446, pp. 566–568, Oct. 1993, doi: 10.1038/365566a0.
- [4] A. Ciuca *et al.*, "Single-Molecule, Real-Time Dissecting of Peptide Nucleic Acid-DNA Duplexes with a Protein Nanopore Tweezer," *Anal. Chem.*, vol. 90, no. 12, pp. 7682–7690, 19 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.8b01568.
- [5] L. Mereuta, A. Asandei, I. Schiopu, Y. Park, and T. Luchian, "Nanopore-Assisted, Sequence-Specific Detection, and Single-Molecule Hybridization Analysis of Short, Single-Stranded DNAs," *Anal. Chem.*, vol. 91, no. 13, pp. 8630–8637, Jul. 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.9b02080.
- [6] A. Asandei, L. Mereuta, J. Park, C. H. Seo, Y. Park, and T. Luchian, "Nonfunctionalized PNAs as Beacons for Nucleic Acid Detection in a Nanopore System," *ACS Sens.*, vol. 4, no. 6, pp. 1502–1507, Jun. 2019, doi: 10.1021/acssensors.9b00553.
- [7] I. S. Dragomir, I. C. Bucataru, I. Schiopu, and T. Luchian, "Unzipping Mechanism of Free and Polyarginine-Conjugated DNA-PNA Duplexes, Preconfined Inside the  $\alpha$ -Hemolysin Nanopore," *Anal. Chem.*, vol. 92, no. 11, pp. 7800–7807, Jun. 2020, doi: 10.1021/acs.analchem.0c00976.