

# **RAPORT STIINTIFIC**

pentru perioada 01.09.2015-30.11.2015

cod proiect PN-RU-TE-2014-4-1444

contract de finantare nr. 4/01.09.2015

Denumirea proiectului: **Prepararea nanostructurilor functionale pe baza de ADN si nanoparticule de aur pentru terapie genica tintita (*DNAnanoGold*)**

Contractor: **Institutul de Chimie Macromoleculara „Petru Poni” Iasi**

Director proiect: **Dr. Alexandru Rotaru**

Adresa web <http://rotarualexandru.wix.com/dnananogold>

**Obiectivul principal al proiectului** este proiectarea si prepararea nano-platformelor pentru terapia genica tintita utilizand nanoparticule de aur functionalizate si pozitionate pe o nanostructura pe baza de ADN. Acest proiect isi propune sa combine proprietatile unice ale nanostructurilor ADN origami care pot fi decorate cu multiple functionalizari si totodata cu nanoparticule de aur specific modificate incarcate cu biomolecule.

**Obiective specifice:**

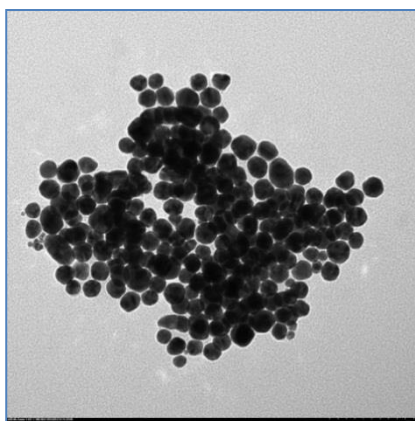
*(O1) Proiectarea si sinteza nanoparticulelor de aur decorate cu polimer cationic si molecule de ciclodextrina PEG-ilate.*

**Activitatea 1. Prepararea si caracterizarea nanoparticulelor de aur**

**1.1 Sinteza nanoparticulelor de aur stabilizate cu citrat**

Pentru sinteza de nanoparticule de aur (AuNPs) functionalizate cu secvente de ADN, am recurs la folosirea **metodei Turkevich**<sup>1</sup> pentru prepararea AuNPs stabilizate cu citrat de marime medie (15-30 nm) si metoda **metoda Turkevich inversa**<sup>2</sup> pentru prepararea nanoparticulelor medii si mici (7-15 nm). Particulele stabilizate cu citrat vor fi apoi concentrate si stabilizate cu fosfina pentru o functionalizare ulterioara cu ADN prin formarea de legaturi Au-S.

**Metoda Turkevich clasica:** solutia apoasa de HAuCl<sub>4</sub> mQ (0,21mM) a fost incalzita pana la 60°C sub agitare intensa continua la care s-a adaugat solutia apoasa de citrat de sodiu (1,3 mM) preincalzita. Temperatura amestecului a fost ridicata la 85°C si mentinuta sub agitarea timp de doua ore. Culoarea initiala de galben pal a devenit in timp rosie, ceea ce indica formarea coloidului. Solutia a fost lasata la racit la temperatura camerei, dupa care a fost depozitata la 4°C. Temperatura amestecului de reactie



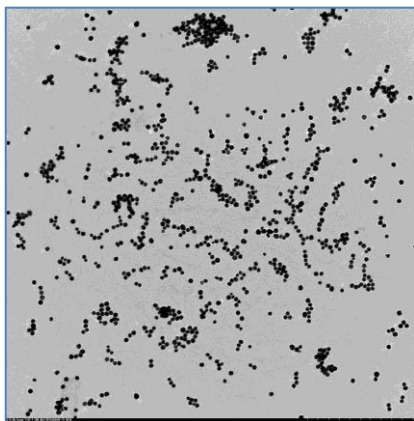
este foarte importanta pentru stabilitatea si polidispersitatea AuNPs. Am efectuat o serie de incercari in care solutia de HAuCl<sub>4</sub> a fost incalzita intr-un interval de 60-100°C, rezultatele reproductibile si calitatea AuNPs obtinute fiind optime pentru temperatura initiala a HAuCl<sub>4</sub> 60°C. AuNPs astfel obtinute au fost caracterizate prin Microscopie Electronica de Transmisie (TEM) (Figura 1).

**Figura 1.** *Micrografiile TEM pentru nanoparticulele de aur functionalizate cu citrat de sodiu (scala 100 nm).*

**Metoda Turkevich inversa** consta din simpla inversare a ordinii de adaugare a reactantilor, adica se adauga acidul cloroauric la solutia de citrat. Au fost pastrate concentratiile reactantilor (HAuCl<sub>4</sub> si

<sup>1</sup> J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, A. Plech, Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited, *J. Phys. Chem. B*, 110, 15700-15707, (2006).

<sup>2</sup> S. K. Sivaraman, S. Kumar, V. Santhanam, Monodisperse sub-10 nm gold nanoparticles by reversing the order of addition in Turkevich method - the role of chloroauric acid, *J Colloid Interface Sci*, 361(2):543-7, (2011).

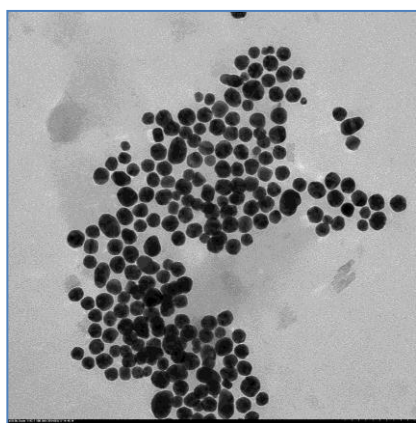


citratul de sodiu) doar ca, conform datelor din literatura, temperatura initiala a reactiei a fost ridicata pana la 100°C. AuNPs astfel obtinute au fost caracterizate cu ajutorul TEM (Figura 2).

**Figura 2.** *Micrografiile TEM pentru nanoparticulele de aur functionalizate cu citrat de sodiu si obtinute prin metoda Turkevich inversa (scala 500 nm).*

## 1.2 Prepararea conjugatelor nanoparticule de aur functionalizate cu ADN

Pentru obtinerea de conjugate AuNPs functionalizate cu ADN este necesara inlocuirea citratului de sodiu cu bis(p-sulfonatofenil)-fenilfosfina si cresterea concentratiei totale a solutiei finale de nanoparticule. In acest scop, o solutie de AuNPs stabilizate cu citrat este amestecata cu o solutie de bis(p-sulfonatofenil)-fenilfosfina timp de 24 de ore. Apoi se adauga NaCl pana cand culoarea se schimba din rosu in albastru. Se centrifugheaza timp de 10 minute la 5000 rpm. Se indeparteaza superatantul si se resuspenda solutia cu bis(p-sulfonatofenil)-fenilfosfina. Se adauga apoi metanol (culoare solutiei devine neagra) si se centrifugheaza timp de 10 minute la 5000 rpm. Se indeparteaza supernatantul si se resuspenda particulele in bis(p-sulfonatofenil)-fenilfosfina. Solutia astfel obtinuta se transfera intr-un tub de 1,5 mL, se acopera cu folie de aluminiu si se depoziteaza la 4°C (ramane stabila timp de cel putin 6 luni). AuNPs stabilizate cu bis(p-sulfonatofenil)-fenilfosfina au fost

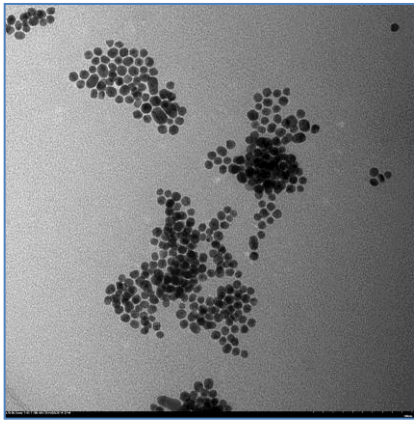


caracterizate cu ajutorul TEM (Figura 3). Din analiza TEM, s-a observat ca marimea si polidispersitatea AuNPs stabilizate cu bis(p-sulfonatofenil)-fenilfosfina a ramas aceiasi cu a AuNPs stabilizate cu citrat de sodiu.

**Figura 3.** *Micrografiile TEM pentru nanoparticulele de aur stabilizate cu bis(p-sulfonatofenil)-fenilfosfina (scala 100 nm).*

Pentru a determina concentratia nanoparticulelor de aur functionalizate cu bis(p-sulfonatofenil)-fenilfosfina s-a determinat absorbanta la 520 nm, iar cu ajutorul legii Lambert-Beer s-a determinat concentratia solutiei stoc obtinuta.

Pentru a functionaliza AuNPs cu secvente de acizi nucleici sintetici, se foloseste metoda de formare a legaturii specifice intre suprafata particulelor de aur si gruparea tiol (-SH), atasata de secventa de acid nucleic. Pentru obtinerea conjugatelor AuNPs/ADN s-a utilizat urmatoarea secventa test: 5'-TT-SH-3'. Astfel, AuNPs functionalizate

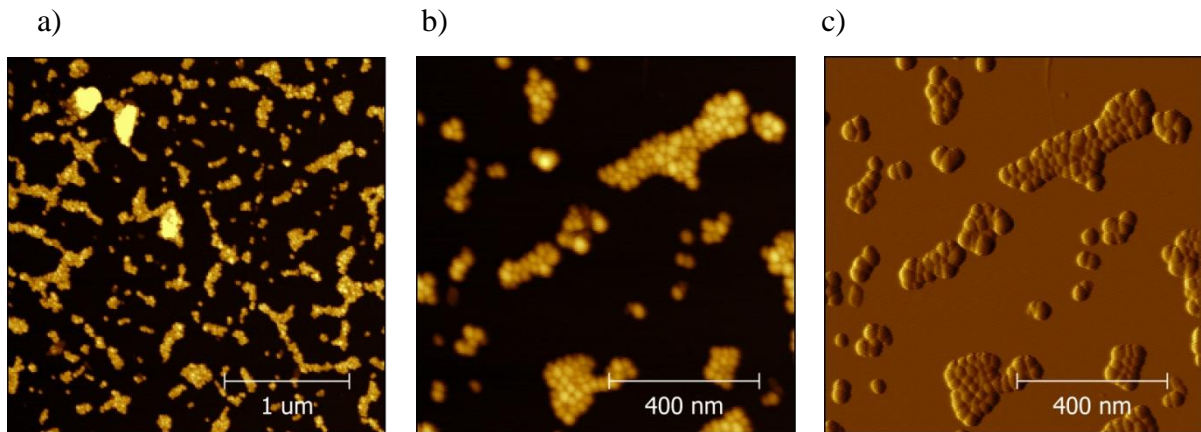


cu bis(p-sulfonatofenil)-fenilfosfina se amesteca cu ADN in solutie tampon si se lasa la agitat timp de 48 de ore. AuNPs functionalizate cu ADN au fost caracterizate cu ajutorul TEM (Figura 4).

**Figura 4.** Micrografiile TEM pentru nanoparticulele de aur functionalizate cu ADN (scala 100 nm).

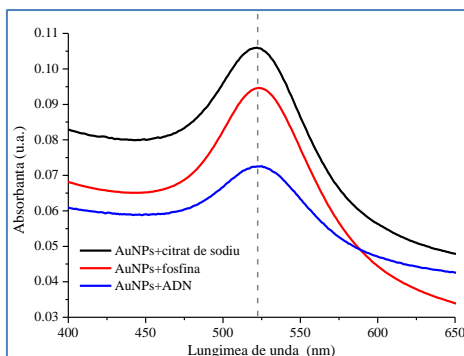
Din analiza TEM, s-a observat ca marimea si polidispersitatea AuNPs functionalizate cu ADN a ramas aceeaasi cu cea a AuNPs stabilizate cu citrat de sodiu sau bis(p-sulfonatofenil)- fenilfosfina.

Additional, rezultatele obtinute prin TEM au fost verificate si prin microscopie de forta atomica (AFM) in cazul particulelor functionalizate cu ADN (Figura 5). A fost posibila utilizarea acestei metode datorita sarcinii negative a suprafetei de mica pe care a fost depusa proba de AuNPs-ADN si a sarcinii negative a gruparilor fosfat din catena ADN-ului. Astfel, la adaugarea unui cantitati de  $Mg^{2+}$  in solutia de analizat, se imobilizeaza usor AuNPs-ADN pe suprafata de mica prin crearea unei punti de Mg intre doua sarcini negative.



**Figura 5.** Imaginile AFM de topografie (a, b) si eroare (c) pentru nanoparticulele de aur functionalizate cu ADN.

In Figura 5 se observa o topografie insulara, nanoparticulele de aur avand forma sferica si dimensiuni de aproximativ 20 nm, datele care se coreleaza cu datele obtinute din TEM.



De mentionat ca la fiecare etapa de sinteza a AuNPs, formarea particulelor a fost verificata prin spectroscopie UV-Vis. Un prim indiciu al formarii nanoparticulelor de aur a fost culoarea rosie a solutiei coloidale, cauzata de excitarea rezonantelor plasmonice ale nanoparticulelor care a fost verificata prin masuratori spectroscopice UV-Vis.

**Figura 6.** Spectele UV-Vis pentru nanoparticulele de aur dupa fiecare etapa de functionalizare.

Spectrul de extincție al AuNPs este ilustrat în Figura 6 și prezintă o singură bandă de extincție în regiunea spectrală vizibilă la 521 nm. S-au înregistrat spectrele de extincție după fiecare etapă de funcționalizare a nanoparticulelor și nu s-au evidențiat deplasări față de valoarea inițială a maximumului.

**In concluzie**, am stabilit condițiile optime de preparare a AuNPs medii prin **metoda lui Turkevich**. Pentru aceste particule au fost stabilite condițiile de funcționalizare cu ADN prin formarea legăturii Au-S. Formarea de AuNPs la fiecare etapă a fost monitorizată prin TEM, UV-Vis și AFM.

**Metoda Turkevich inversată** permite obținerea de nanoparticule cu dimensiuni cuprinse între 5 și 10 nm<sup>2</sup>. Aplicând această metodă am reușit să obținem nanoparticule de aur cu dimensiuni cuprinse între 10 și 30 nm, de diferite forme, dar considerăm că sunt necesare investigații suplimentare în ceea ce privește influența diferiților parametri (raportul molar citrat de sodiu: acid cloroauric, pH-ul amestecului de reacție, concentrațiile reactanților) asupra dimensiunii și formei nanoparticulelor pentru a obține rezultate reproductibile și polidispersitatea mică.

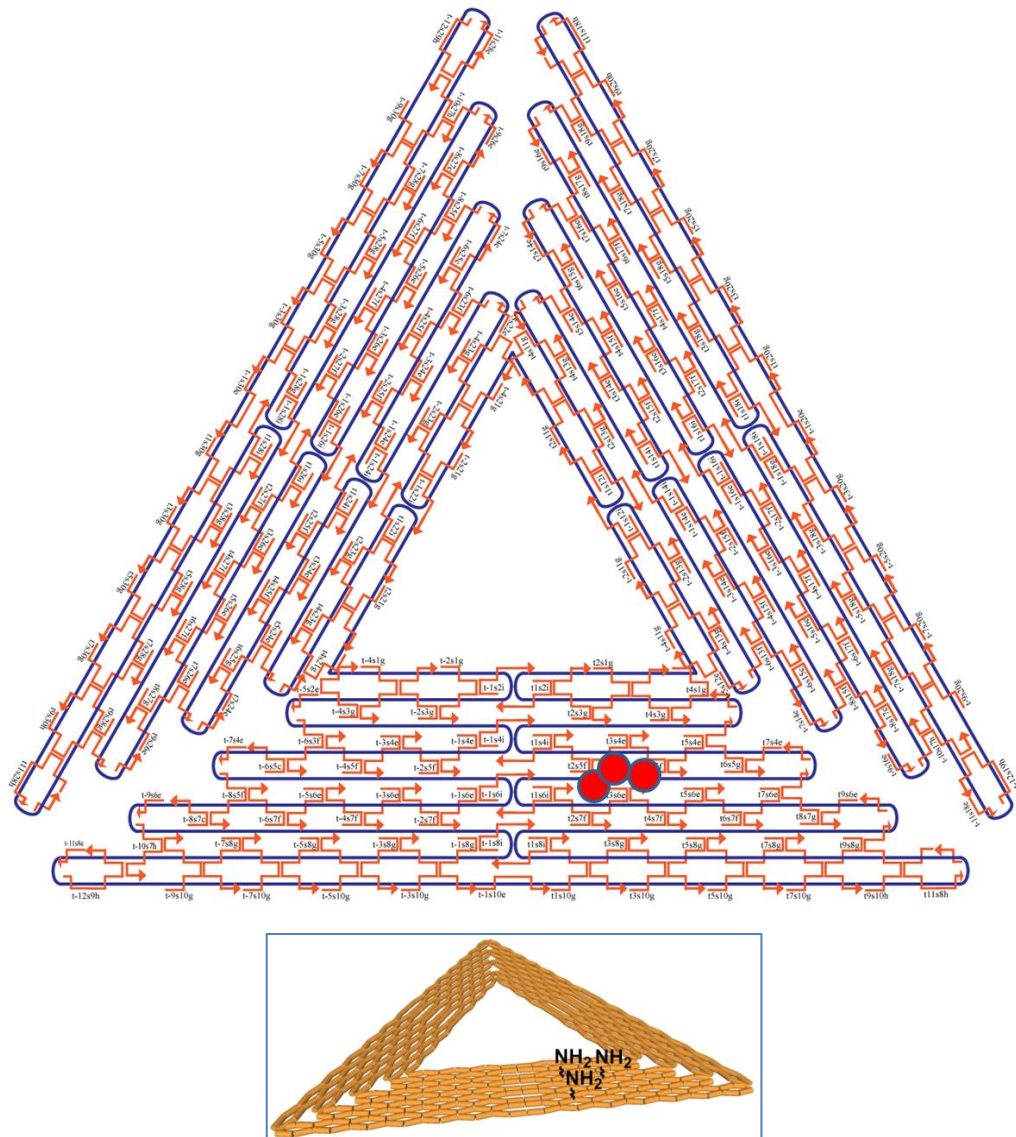
## **Activitatea 2. Design-ul și achiziționarea de secvențe de ADN modificate pentru formarea de nanostructuri pe baza de ADN.**

Un set de 209 de secvențe liofilizate scurte de ADN sintetic, care constituie baza nanostructurii origami "triunghi"<sup>3</sup>, a fost achiziționat de la *Metabion International AG*, Germania ([www.metabion.com](http://www.metabion.com)). Toate secvențele au fost diluate individual la concentrația de 100 μM și depozitate la -25°C. Pentru a testa posibilitatea de introducere a oricăror modificări chimice prin formarea legăturii amidice, am procurat în plus un set de trei secvențe cu modificări amino terminale. Design-ul secvențelor a fost ales în așa fel încât toate cele trei grupări amino să fie poziționate în imediată apropiere (6 nm distanță una de alta, Figura 7).

---

<sup>3</sup> P. W. K. Rothemund. "Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns". *Nature* **440**, 297–302, (2006).





**Figure 7.** *Reprezentarea schematica a nanostructurii "triunghi" din ADN cu numele si pozitia exacta a fiecarei secvente individuale. Cercurile rosii indica pozitia modificarilor amino pe nanostructura (sus). Reprezentarea 3D a nanostructurii din ADN care contine trei modificari amino (jos).*

Secventele modificate cu grupari amino si pozitia lor in nanostructura "triunghi" din ADN sunt:

t3s6e\_amino\_5:  $\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{-TTT}-\text{CACCGGAAAGCGCGTTTTTCATCGGAAGGGCGA}$

t3s4e\_amino\_3:  $\text{TGTACTGGAAATCCTCATTAAGCAGAGCCAC-TTT-C}_7\text{-NH}_2$

t4s5f\_amino\_5:  $\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{-TTT}-\text{CTCAGAGCATATTCACAAACAAATTAATAAGT}$

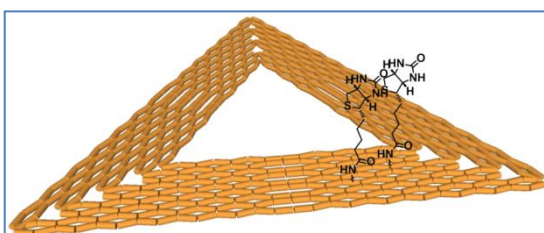
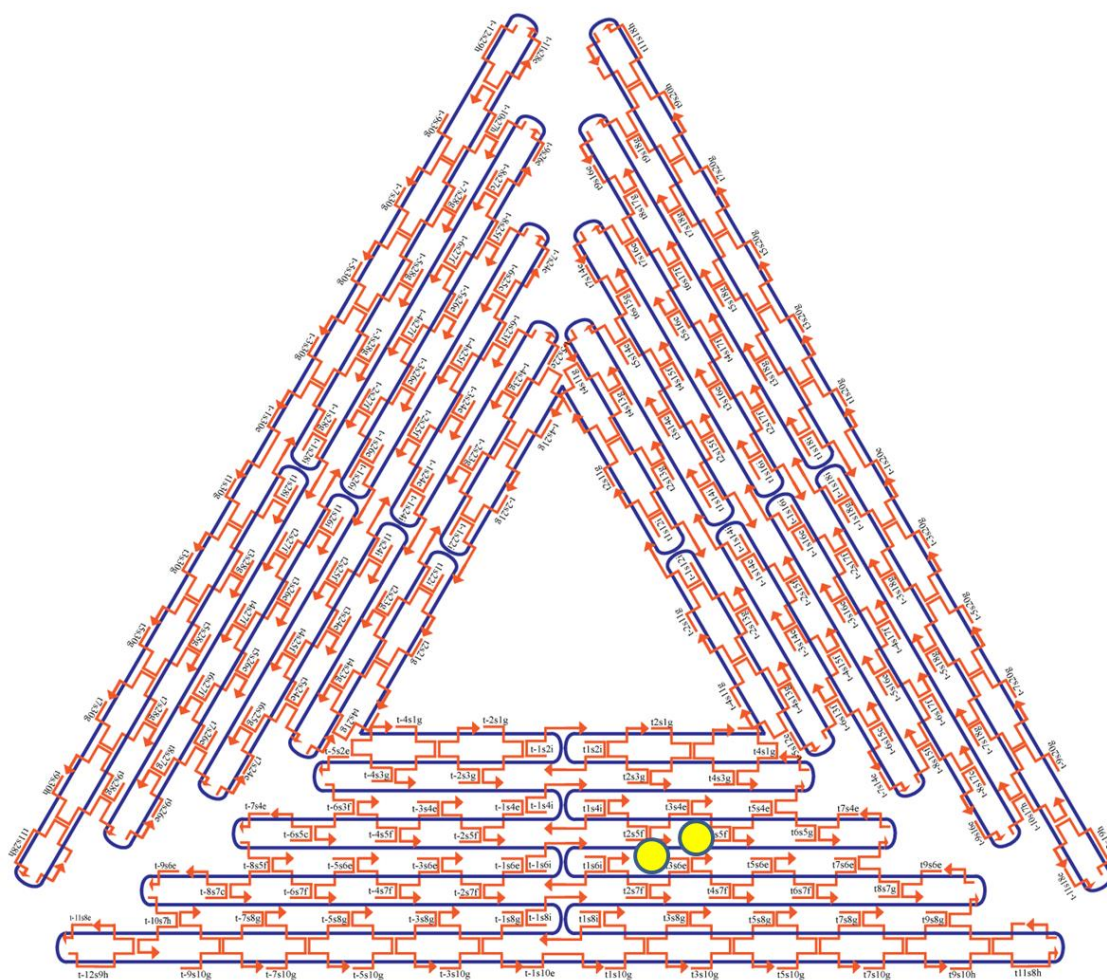
Toate cele trei secvente au fost proiectate continand un linker (trei baze timinale marcate cu rosu) pentru a ridica modificarea amino deasupra suprafetei nanostructurii din ADN. Acest lucru va ajuta la evitarea impiedicarilor sterice ale modificarilor cu suprafata nanostructurii. In etapa urmatoare, ne asteptam sa utilizam aceste grupari amino pentru atasarea moleculelor de interes cum ar fi adamantan sau ciclodextrina.

In plus, un set de doua secvente modificate care contin biotina au fost, de asemenea, achizitionate pentru a testa posibilitatea de formare a complexului de incluziune intre ciclodextrina si biotina si vizualizarea acestui proces pe suprafata nanostructurata de ADN cu ajutorul AFM-ului. Pentru acest scop, au fost alese doua pozitii la o distanta de 6 nm una fata de alta (figura 8). In caz de o pozitionare de succes a moleculelor de ciclodextrina in aceste conditii pe suprafata origami ADN, se preconizeaza utilizarea interactiunilor multiple dintre moleculele de biotina strans pozitionate cu moleculele de ciclodextrina atasate la un nano-obiect (ex. nanoparticule de aur).

Secventele modificate cu biotina si pozitionarea lor in nanostructurile "triunghi", inclusiv cele trei baze de timina ca si linker pentru a ridica molecula de biotina deasupra suprafetei nanostructurii sunt:

t3s6e\_biotin\_5: Biotin-C<sub>6</sub>-**TTT**- CACCGGAAAGCGCGTTTTTCATCGGAAGGGCGA

t4s5f\_biotin\_5: Biotin-C<sub>6</sub>-**TTT**- CTCAGAGCATATTCACAAACAAATTAATAAGT



**Figure 8.** *Reprezentarea schematica a nanostructurii "triunghi" din ADN cu denumirea si pozitia exacta a fiecărei secvente modificate cu biotina. Cercurile galbene indica pozitia moleculelor de biotina pe suprafata nanostructurii (sus). Reprezentarea 3D a nanostructurii din ADN care contine doua molecule de biotina (jos).*

Toate secventele achizitionate au fost impartite in trei grupuri separate, amestecate si ajustate la aceeasi concentratie stoc: a) solutia kit origami ADN (209 secvente, concentratia fiecărei secvente individuale = 500 nM); b) amestec de secvente amino (3 secvente, concentratia fiecărei secvente individuale = 500 nM); c) amestec de secvente modificate cu biotina (2 secvente, concentratia fiecărei secvente individuale = 500 nM). Aceste solutii vor fi folosite de-a lungul intregului proiect pentru a pregati nanostructuri din ADN "triunghi" martor si modificate.

## **Concluzii**

In prima etapa a proiectului am investigat conditiile de sinteza ale nanoparticulelor de aur cu dimensiuni cuprinse intre 10 si 30 nm utilizand metoda Turkevich si metoda Turkevich inversa. Am reusit sa stabilim conditiile optime de preparare ale AuNPs stabilizate cu citrat de sodiu cu dimensiuni medii (15, 20 sau 30 nm) cu polidispersitate mica. De asemenea, am incercat conditiile de sinteza ale AuNPs cu dimensiuni sub 10 nm folosind metoda Turkevich inversa, care a avut ca rezultat obtinerea de nanoparticule mici (cca 10 nm) dar cu o polidispersitate mare.

Pentru a functionaliza AuNPs (stabilizate cu citrat de sodiu) cu secvente de ADN, am efectuat un schimb de liganzi de stabilizare ale AuNPs folosind bis(p-sulfonatofenil)-fenilfosfina, obtinand nanoparticule mai stabile si solutii mai concentrate. Solutiile de AuNPs astfel obtinute si cuantificate cu ajutorul UV-Vis au fost folosite in reactia cu secvente scurte de ADN modificate cu grupare tiol, obtinandu-se AuNPs stabilizate cu ADN.

Nanoparticulele obtinute in fiecare etapa au fost caracterizate cu ajutorul TEM (Figura 1-4), UV-Vis (Figura 6) si, in cazul AuNPs stabilizate cu ADN, a fost posibila utilizarea AFM (Figura 5). Astfel, au putut fi stabilite partial conditiile de sinteza si caracterizarea totala ale AuNPs initiale si functionalizate.

De asemenea, a fost stabilit design-ul pentru nanostructura de ADN de baza care va fi functionalizata in etapele urmatoare ale proiectului. Nanostructura „triunghi” consta din 209 de secvente de ADN sintetic si dintr-o secventa lunga de ADN natural extras din bacterii. Kit-ul total pentru nanostructura „triunghi” a fost procurat si pregatit pentru utilizare in laborator. Pentru testarile preliminare de imobilizare ale modificarilor chimice pe suprafata nanostructurii „triunghi”, au fost procurate 2 seturi de ADN modificat: (1) trei secvente de ADN modificat cu gruparea amino; (2) doua secvente modificate cu biotina. Astfel, au fost pregatite solutiile de lucru pentru asamblarea nanostructurii „triunghi” nemodificata (martor) si nanostructuri care contin diverse modificari chimice.



## ***Perspective***

In urmatoarea etapa a proiectului vom efectua urmatoarele: (a) stabilirea conditiilor de sinteza ale AuNPs cu dimensiuni sub 10 nm cu ajutorul metodei Turkevich inversa; (b) optimizarea functionalizarii AuNPs cu ADN pentru a reduce cantitatea de ADN folosita (evitarea prezentei excesului de ADN liber dupa reactie); (c) testarea accesibilitatii secventelor de ADN pe suprafata AuNPs pentru legare de alte materiale (secvente complementare de ADN sau, de exemplu, nanotuburi de carbon si alte nano-obiecte); (d) asamblarea nanostructurilor de ADN si optimizarea conditiilor de vizualizare a lor cu AFM (in are si lichid); (e) studii privind interactiuni gazda-oaspete pe suprafata nanostructurilor cu ajutorul AFM; (f) sinteza organica a ciclodextrinelor mono functionalizate si atasarea lor la diferiti linkeri (secvente ADN sau PEG).