



# **IMPLICAREA BIOLOGIEI IN NANOTEHNOLOGII**

**Dr. Lucia Dumitru**

**Institutul de Biologie al Academiei Române  
Centrul de Microbiologie**

## NANO - VISE

- **In 1986** cartea lui **Eric Drexler** “**Instrumentele Creației**”(Engines of creation) a avut un impact neobișnuit asupra comunității științifice.
- Cartea descrie **nanomașini** care se **autoasamblează** și se **autoreplică**, dispozitive utile în lupta împotriva bolilor care permit extinderea limitei de viață.
- Mulți cercetători au ridiculizat aceste viziuni considerând că se depășește limita de la știință la ficțiune.
- Dar, predicțiile lui Drexler tind să devină realitate. Știința este acum aproape capabilă de a produce mașini nano.

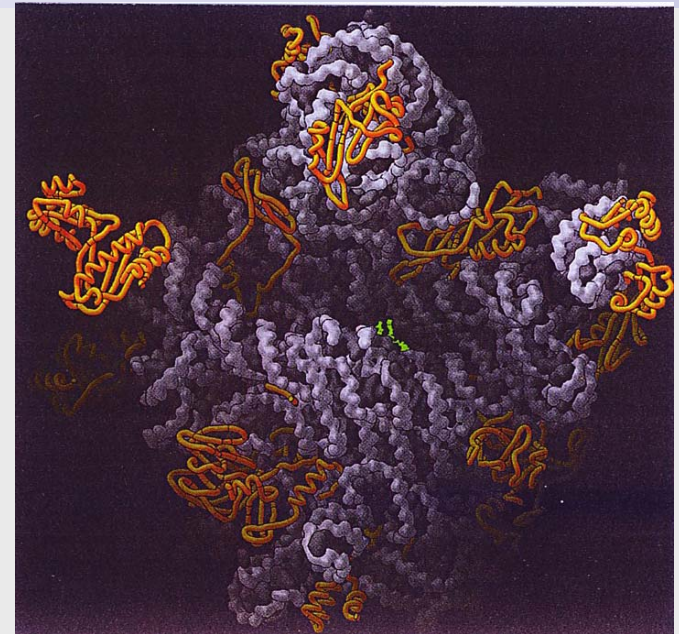
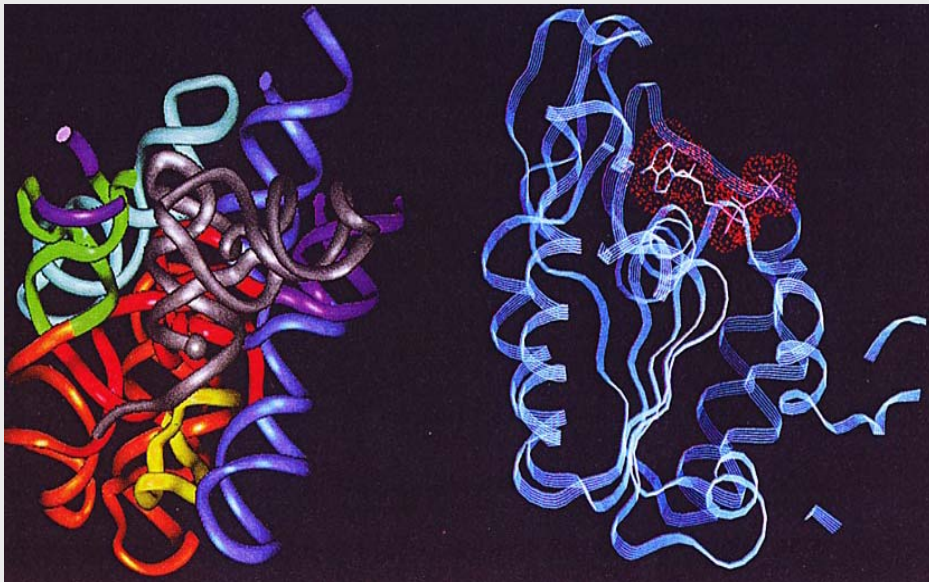
## NANOTEHNOLOGIA, DOMENIU INTERDISCIPLINAR

- Nanotehnologia, reprezintă o **activitate interdisciplinară**, cu aplicații în diverse domenii: optoelectronică, microfluide, medicină, etc.
- Efortul de a produce dispozitive la scară nano este obligatoriu interdisciplinar.
- Ar fi imposibil de realizat construcții atât de complexe de către un singur investigator.
- Acesta implică domenii și specialiști cu cunoștințe profunde de fizică, chimie, biologie, biotehnologie, inginerie, microelectronică, etc.
- Fizica și chimia sunt în centrul atenției, dar biologia capătă un rol din ce în ce mai important, prin posibilitățile enorme de modele pe care le oferă viața.

# INTERRELAȚIA, BIOLOGIE - NANOTEHNOLOGIE

- Rolul biologiei este esențial pentru succesul în nanobiotehnologii, dar biologii nu vor putea construi dispozitive nano.
- Pe de altă parte, inginerii, subestimează complexitatea sistemelor biologice, deținând mai puțină informație științifică biologică.
- În această situație, **se impune o dublă expertiză**, cu pregătire biologică și inginerie, pe de o parte și formarea unei noi generații de biotehnologi, în acest domeniu.
- Unul din domeniile cel mai dificil de abordat, în nanotehnologie, este **biologia**. Aceasta se datorește complexității deosebite a acestei discipline.
- Există însă o **interrelație** fascinantă între cele două domenii, care se manifestă în două direcții.
- **Biologia este beneficiara progresului nanotehnologic, iar nanotehnologia primește informații și se inspiră din biologie.**
- În nanobiotehnologie, informația biologică este situată la bază. **Rolul biologilor în nanobiotehnologii este în primul rând de informare.**
- Sinergia biologie / nanobiotehnologie, este una din cele mai bogate arii interdisciplinare, care a început deja să fie în atenția specialiștilor pentru diverse aplicații: motoare moleculare, pompe transmembranare, proteine sintetice, virusuri artificiale, etc.

- **Membranele** delimitează compartimente inter / intra-celulare (realizând uneori camere de lucru). Totodată ele sunt porțile casei, care controlează fluxul molecular în și din celulă: pasiv și / sau selectiv.
- **Strategia celulei** pentru a se menține și a se înmulți, se bazează pe două idei imbatabile ca eficiență:
  - **polimerizarea**: proces chimic simplu de autoasamblare în molecule mari liniare.
  - **plierea** moleculelor lungi în structuri funcționale, tridimensionale, fabricare sofisticată, realizând structuri primare, secundare sau terciare, care leagă între ele unitățile de bază ale construcției și cu alte molecule.
- Informația este codificată în secvențele unităților. Cele mai importante clase de molecule din celulă sunt construite prin această strategie (ADN, ARN, proteinele etc.).



# LECȚII DIN NATURĂ

- Nanotehnologia este un concept nou, dar nu este în întregime un domeniu nou.
- O bună cunoaștere a sistemelor vii, reprezintă un potențial uriaș pentru dezvoltarea nanotehnologiilor.
- Natura are la bază structuri, procese, fenomene, care funcționează la scară micro și nano.
- **Viața se bazează pe “mașini moleculare biologice”.**
- **Celula**, unitatea de bază a construcției organismelor, este o structură care se autoreplică.  
Prin mecanisme biochimice extrem de sofisticate, aceasta preia molecule din mediu, le procesează pentru a face energie și pentru a-și construi propriile componente (a se menține, a se mișca, a se apăra).
- **ADN** stochează informația (de la o generație la alta) pentru construcție și funcționare.
- **ARNm** copiază și transcrie informații, “povestind” și ordonând ribosomilor ce proteine să facă.
- **Proteinele** sunt prezente peste tot în celulă. Ele realizează ansamble cu alte tipuri de molecule pentru a îndeplini o funcție.
- **Enzimele** sunt molecule care mediază reacțiile biochimice, fără ca ele să fie consumate. Ele conduc activitățile complexe din celule

# ȘTIINȚA LA INTERFAȚA BIOLOGIE / NANOBIOTEHNOLOGIE

- Lumea biologică are la bază structuri și procese care pot concura pentru termenul “tehnologii nano”.
- Complexitatea unor construcții și funcții în organismele vii depășește cu mult orice realizare tehnică.
- Mii de întrebări aparent simple, cum ar fi: de ce și cum se mișcă mușchii, de ce ne este foame, cum digerăm, cum sintetizăm molecule etc. de o complexitate uimitoare, ascund răspunsuri cuprinse fiecare în tomuri de mii de pagini.
- Din cele mai șocante exemple de “**minuni nanobiotehnologice**” selectăm câteva, dintr-o perspectivă de interes aplicativ.

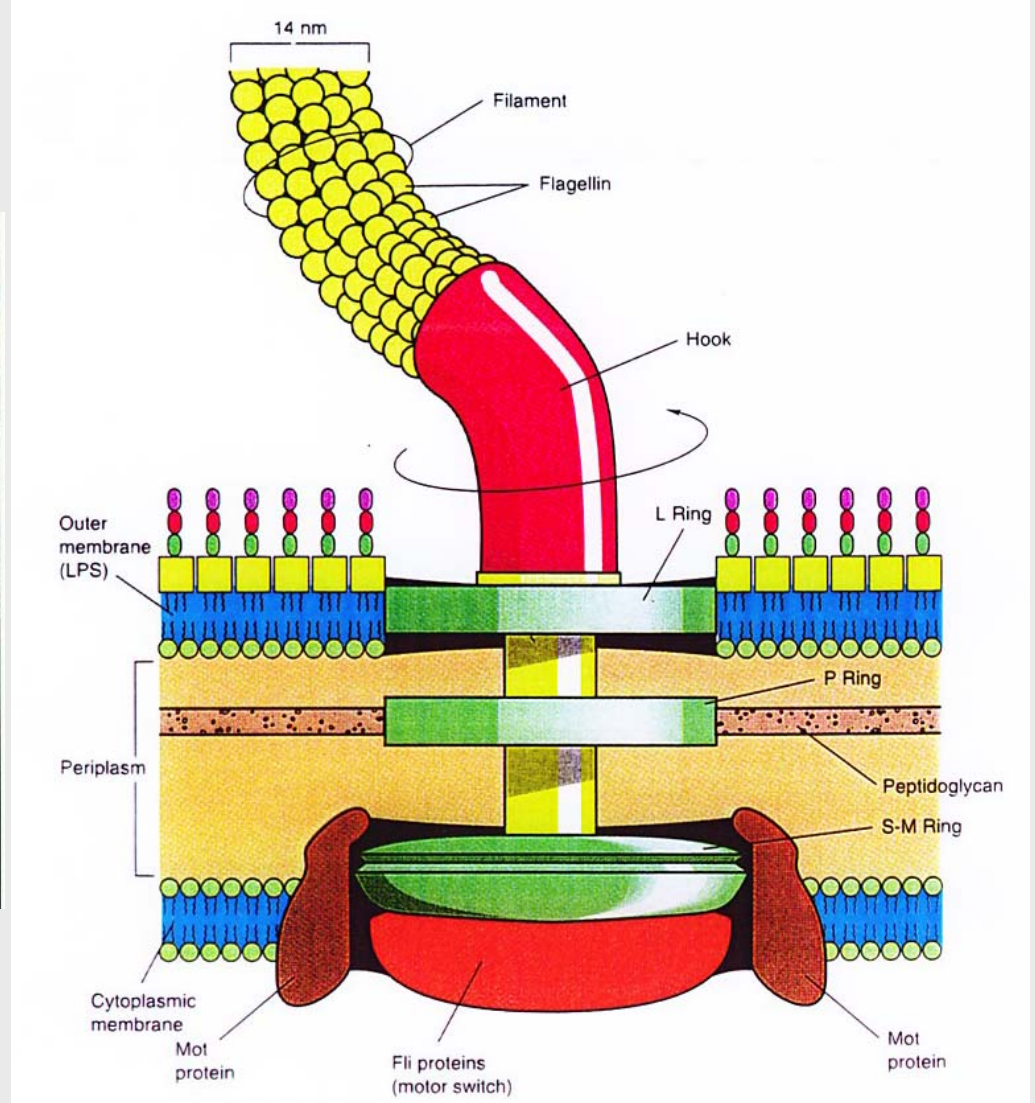
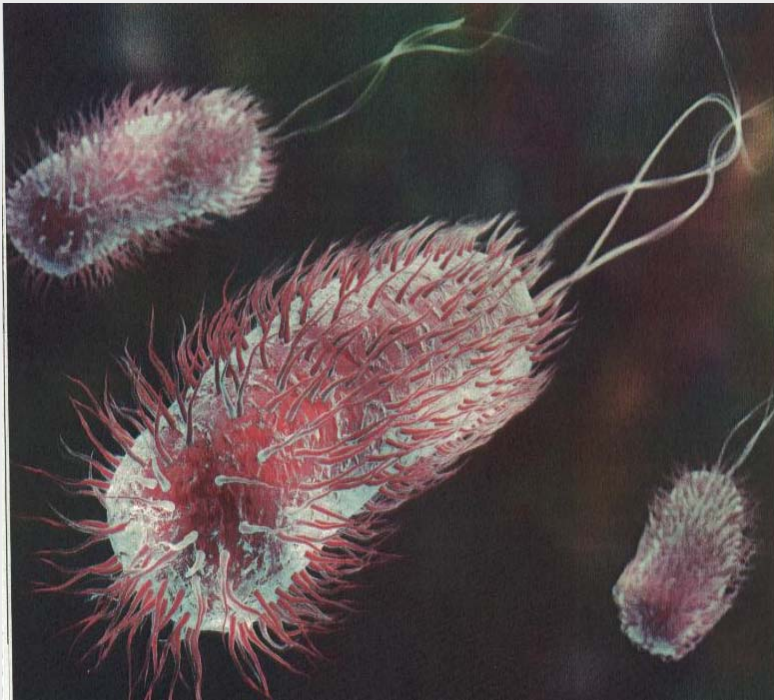
## Autoasamblarea

- **Autoasamblarea** ca nanobiotehnologie, este dintre cele mai atrăgătoare și reticuli nanotehnologice care joacă un rol central în lumea vie. Procesul îmbracă diferite forme:
  - Autoasamblarea proteinelor monomere împreună cu mesajul genetic în molecule de ARN.
  - Formarea liposomilor din molecule lipidice (fosfatidilcholina) organizate spontan într-un mod care leagă catene hidrofobe din mediu.
  - Formarea capsidului viral, din subunități proteice etc.
- Aceste structuri joacă o varietate de **roluri, deloc întâmplătoare în lumea biologică** pentru care procesul de autoasamblare este codificat, într-o diversitate enormă de acțiuni.
- Pe această bază, una din cele mai incitante dezvoltări în nanotehnologia modernă este exploatarea **procesului de autoasamblare codificat**, cu scopul obținerii unor materiale noi (proteine sintetice cu proprietăți programate).



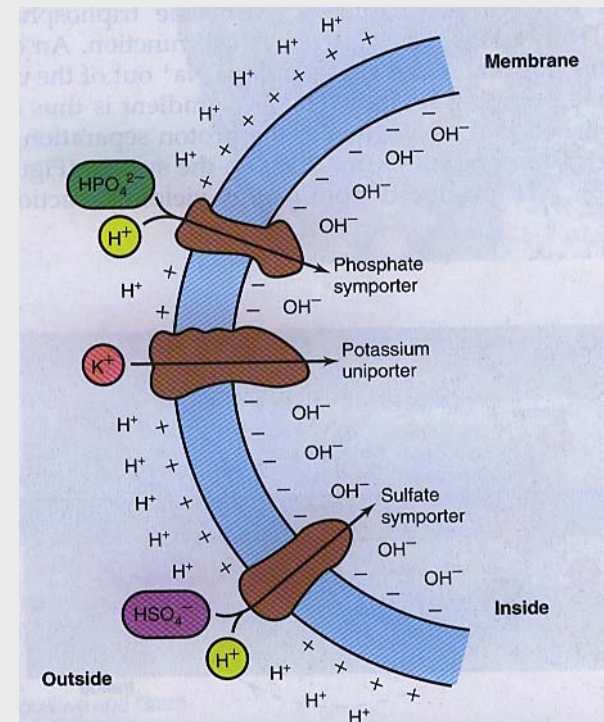
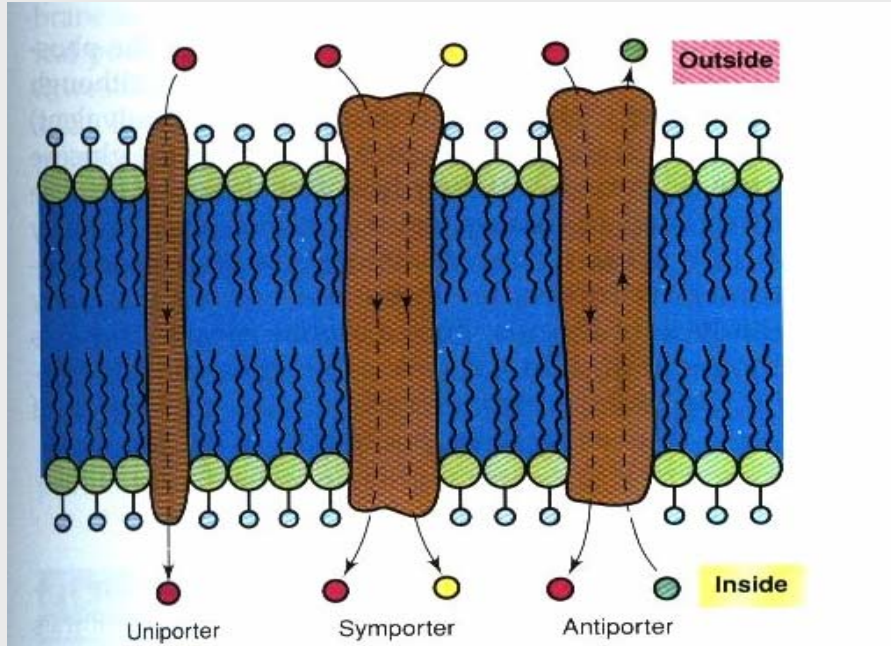
## Motoare Moleculare

- ❖ **Mișcarea** este una din caracteristicile vieții.
- ❖ Mobilitatea bacteriilor, spre ex. este realizată prin **rotația unui motor molecular**, situat în PC de care sunt atașați flageli care asigură propulsia celulei.
- ❖ Acesta este o structură complexă care seamănă izbitor cu un motor electric.
- ❖ Mobilitatea celulei nu este asociată cu consumul de energie (ATP), ci de potențialul electrochimic (fluxul de protoni prin membrană).
- ❖ În plus, au un grad înalt de sofisticare, deoarece **reacționează la stimuli** din mediul extern, schimbând direcția de rotație a motorului prin chemotaxie.
- ❖ În dispozitivele ingineresti transmisia semnalului este realizată de circuite complexe. În lumea vie, această funcție este realizată de procese biochimice și modificarea conformației moleculare.
- ❖ Înțelegerea funcționării unor **motoare moleculare construite**, implică interrelația dintre biologie, chimie, termodinamică și mecanică.
- ❖ La Univ. Cornell, s-a încercat construirea unei mașini primitive cu un motor biologic. Proteina motorului flagelar a fost conectată la un anod. Motorul rotativ de 11 nm., a fost alimentat cu o sursă de energie chimică (ATP).
- ❖ Experiența a demonstrat posibilitatea construirii unor astfel de nanodispozitive.

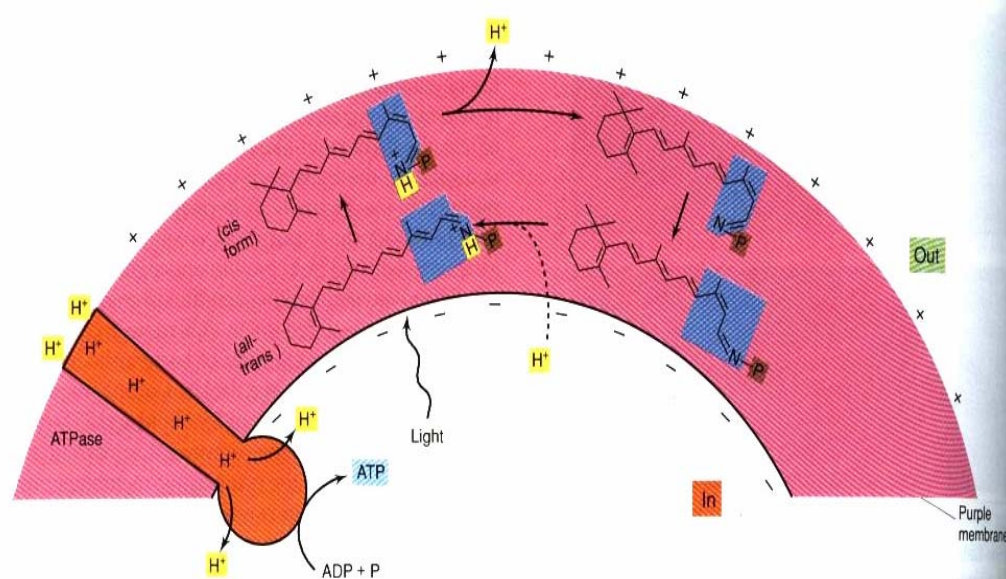
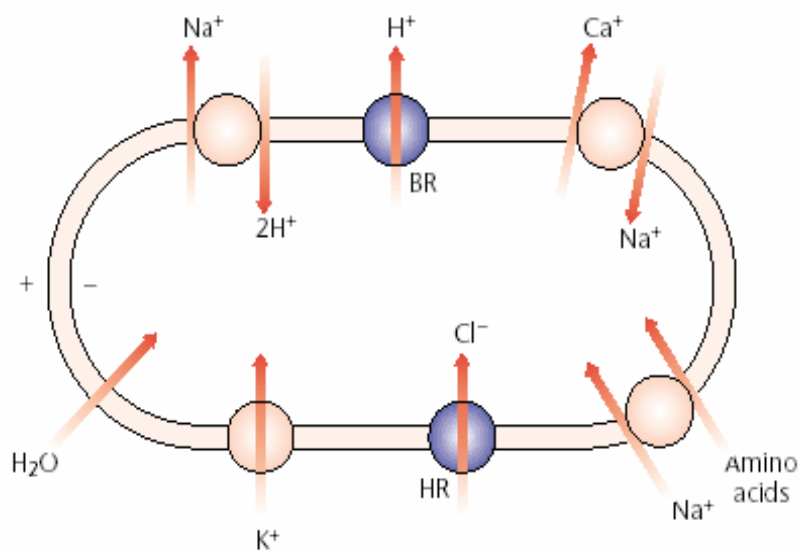


## Canale și pompe moleculare

- Dintr-o perspectivă structurală, una din trăsăturile sistemelor biologice celulare, este compartimentarea marcată de membrane.
- Prezența acestor compartimente, străjuite de membrane, explică influxul și efluxul anumitor **gradienti**.
- Aceste procese, se datorează prezenței unui șir de canale transmembranare, care mediază schimbul de material dintre diferite compartimente ale celulei sau dintre celulă și mediu.



- Există **versiuni pasive**, determinate de prezența unor molecule semnal sau tensiuni în membrană, anumite molecule trecând pragul pasiv, prin **difuziune**.
- Cealaltă versiune, mai elaborată, **activă** este reprezentată de **canale ionice**.
- Un exemplu din cele mai remarcabile mecanisme de acest tip, se referă la **pompele ionice de Na / K**.



- Mașina este acționată prin scindarea ATP, obținând energia necesară pentru a pompa ioni împotriva unui gradient de concentrație ionică.
- Ca rezultat, ionii de Na sunt pompați în afara celulei, împotriva unui gradient de ioni cu conc. mare, pompând K în celulă din nou împotriva unui gradient de concentrație.

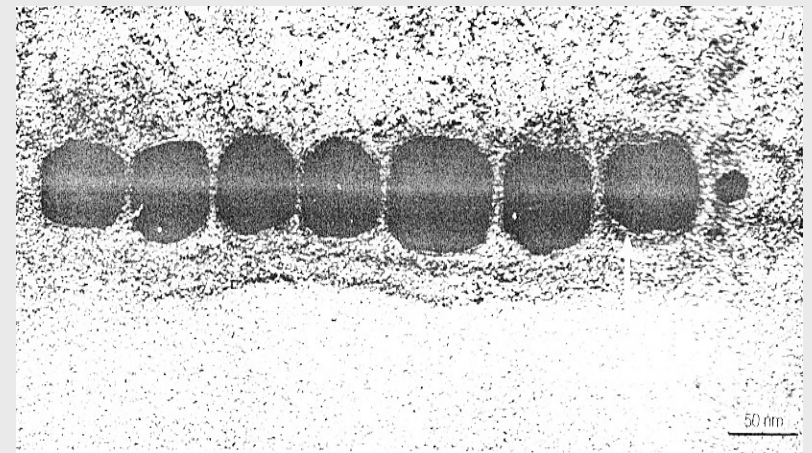
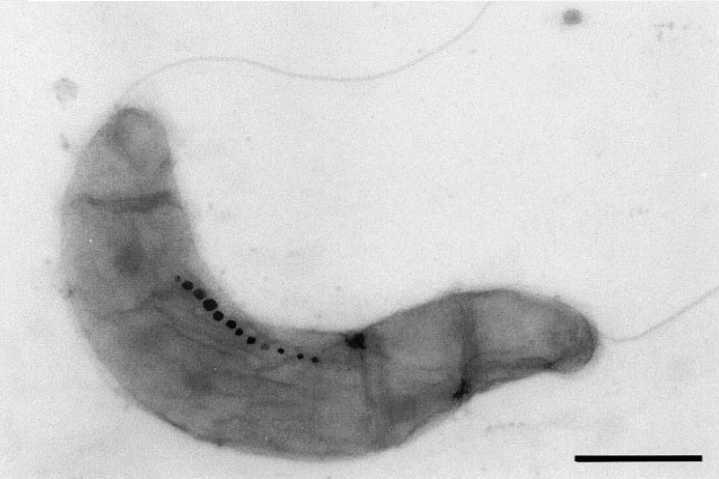
## **“LESS IS MORE IN MEDICINE”**

**(Alivisatos, 2001)**

- **Cele mai interesante aplicații nanobiotehnologice, sunt cele din domeniul medical (Alivisatos, 2001).**
- **Acestea pot crește potențialul instrumentelor de cercetare medicală:**
  - **Tipuri noi de markeri pentru descoperirea medicamentelor;**
  - **Relevarea genelor active în celule în condiții diferite;**
  - **Dispozitive nano pentru selectarea rapidă a diagnosticului;**
  - **Evaluarea sensibilității persoanelor la boli genetice;**
  - **Evidențierea genelor implicate în cancer;**
  - **Agenți de contrast perfecționați, pentru imagini neinvazive;**
  - **Vehicule pentru eliberarea medicamentelor în țesuturi.**
- **În majoritatea acestor posibilități sunt implicate rezultate ale cercetărilor biologice.**
- **Din cele mai actuale și mai interesante fac parte: “Magneții bacterieni” și “Stratul S”.**

## Atracția magnetică

- **Bacterii magnetotactice**, capabile să migreze în sensul liniilor magnetice ale pământului, datorita unui șirag de cca 20 cristale magnetice (35-120 nm fiecare). Împreună, aceste cristale, constituie un compas în miniatură, o minunată inginerie la scară nano.
- Ele sunt particule de **magnetită** ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) sau **greigită** ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ) (Matsunaga,1991).
- Cristalele magnetice bacteriene sau magnetosomii, sunt sintetizați de spirili din genurile: *Aquaspirillum* si *Magnetospirillum*.
- Înconjurați de membrană, în principal, fosfolipidică, ei formează lanțuri de-a-lungul celulei.
- Deși pretențioase, bacteriile pot fi obținute în culturi în masă ( 1000 l).
- Ating creșterea maximă în 4-5 zile -  $1,4 \times 10^9$  celule/ml.
- Un litru de cultură, conține cca 2,6 mg magnetită, ce poate fi izolată prin metode de sonicare sau cu magneți (Sm-Co) (Matsunaga,1991).



## Construcții nanobiotehnologice cu aplicații medicale

Grație membranei, biomagneții au un **raport suprafață / volum, foarte mare.**

Ei pot fi folosiți ca suporturi de imobilizare a unor substanțe bioactive (enzime, anticorpi)

Împreună cu compușii bioactivi, alcătuiesc **conjugate** care pot avea diferite aplicații:

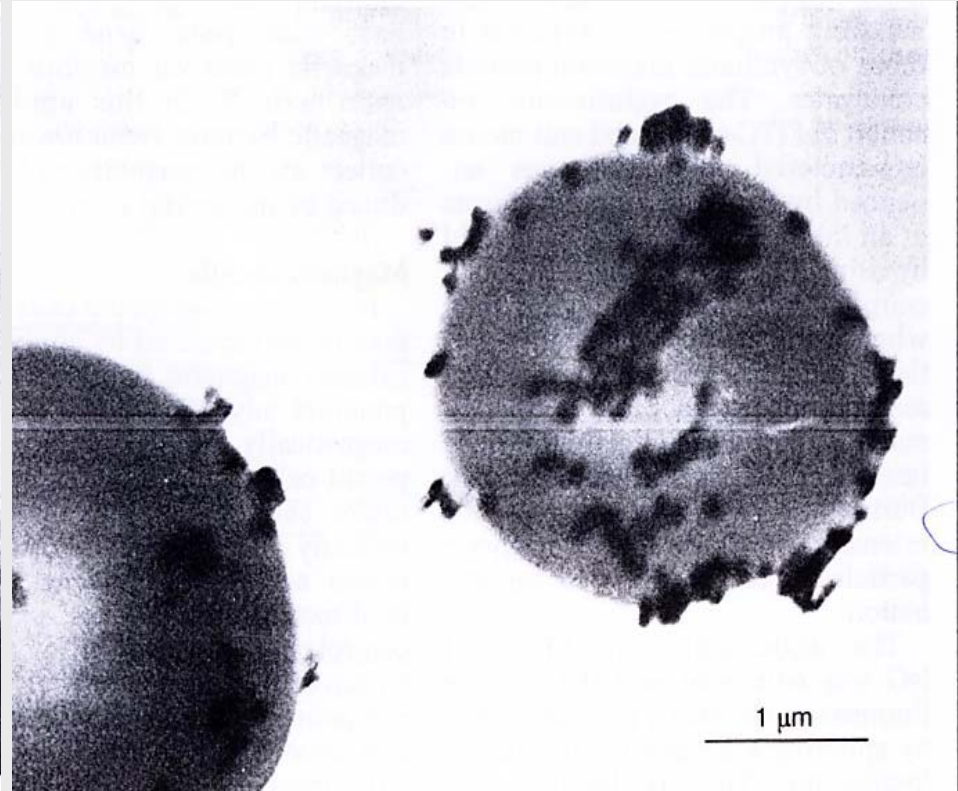
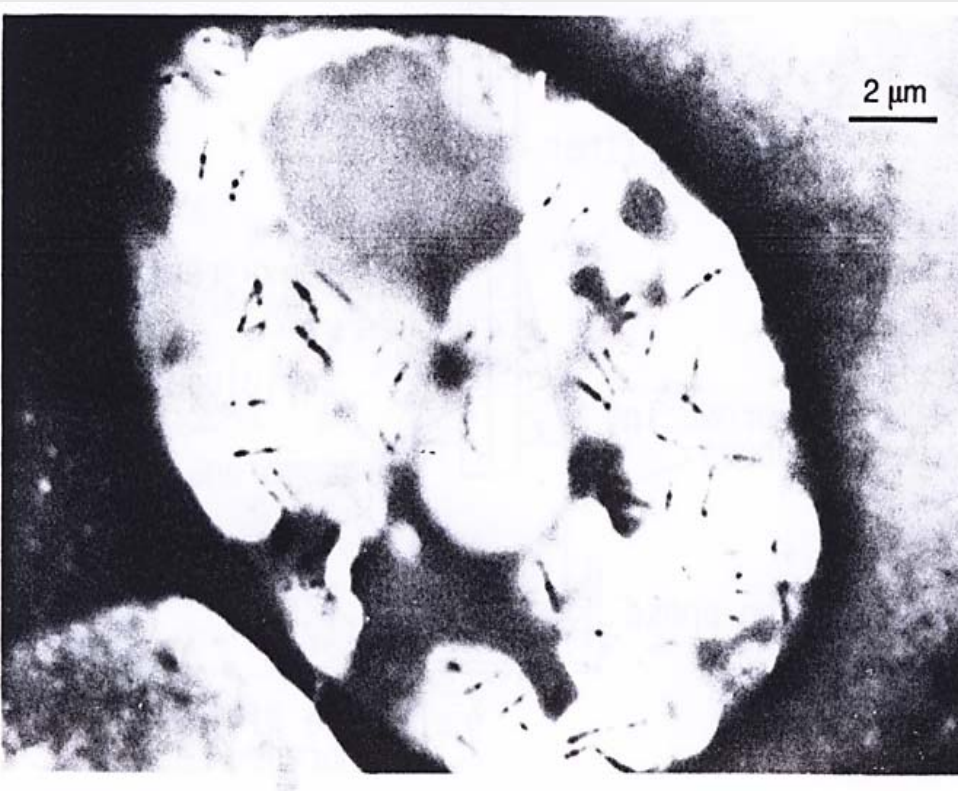
- **Enzime magnetice:** sunt complexe magnetită / enzime, în care enzima se atașază de suprafața membranei biomagneților prin legarea de ....

Conjugate magnetită / glucoz-oxidază și uricază s-au folosit în construcția de biosenzori utilizați în diagnosticul clinic, pentru glucoză și imunoglobuline (Nakamura et al., 1989).

- **Anticorpi magnetici:** anticorpi, imobilizați pe particule de magnetită, pot fi folosiți în detectarea unor celule canceroase și ca senzori pt. determinarea IgG în serul sangvin, (Nakamura et al., 1990).

- **Celule magnetizate:** încorporarea magnetitei în leucocite prin fagocitoză sau depunerea acesteia la suprafața hematiilor, dă posibilitatea manipulării celulelor prin aplicarea unui câmp magnetic extern.

Aceste construcții pot fi folosite pentru vizualizarea sau distrugerea controlată a celulelor tumorale (Matsunaga et al., 1989, Kornguth et al., 1987). Ele sunt particule de **magnetită ( $Fe_3O_4$ )** sau **greigită ( $Fe_3S_4$ )** sintetizate intracelular.





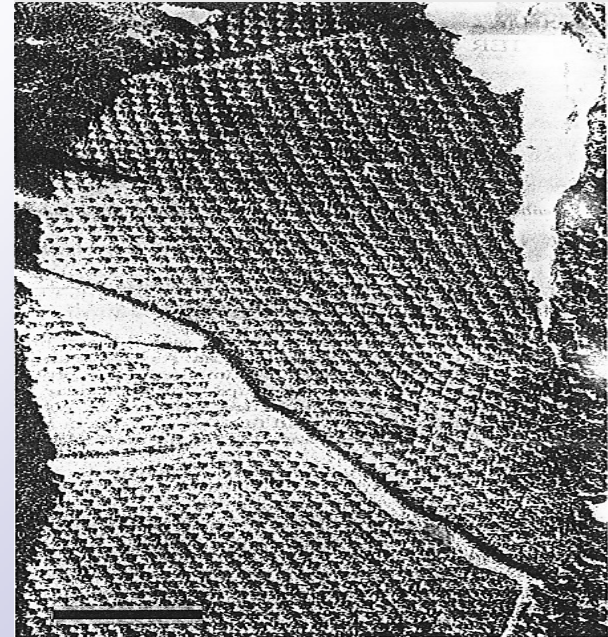
## **Avantajele biomagneților față de magneții artificiali**

**(Matsunaga et al., 1991)**

- ❖ **Membranele previn agregarea particulelor, menținând suprafața mare de contact.**
- ❖ **Prezența unor constituenți proteici în membrană, permite legarea mai eficientă a agenților bioactivi.**
- ❖ **Tehnica relativ simplă a construcției conjugatelor.**
- ❖ **Cantitatea agenților bioactivi cuplați, de cca 100 ori mai mare.**
- ❖ **Conjugatele sunt mai stabile.**
- ❖ **Activitatea se păstrează mai mult timp, în utilizări multiple.**
- ❖ **Mărimea conjugatelor, cca jumătate din cele mai mici particule magnetice artificiale.**
- ❖ **Capacitatea de manipulare a conjugatelor cu un câmp magnetic extern.**
- ❖ **Particulele biomagnetice sunt considerate ca noi și valabile resurse biologice pentru aplicații nanobiotehnologice.**

## Stratul S

- ✓ Component unic sau asociat in structura PC la microorganismele, cu grosime de 5 – 25 nm;
- ✓ Foarte raspandit la bacterii si aproape universal la *Archaea*;
- ✓ Reprezinta cel mai simplu tip de membrana biologica;
- ✓ Alcatuit dintr-un singur tip de (glico)proteine asamblate in siruri bidimensionale la suprafata celulei;
- ✓ In functie de unele caracteristici (sarcini de suprafata, hidrofobicitate) formeaza o structura sub forma de retea cu simetrie diferita (romb, patrat, hexagon);
- ✓ Formeaza pori cu morfologie identica;
- ✓ Subunitatile interactioneaza cu fiecare alta si cu stratul invelisului suport prin legaturi covalente;
- ✓ Se poate lega de alte molecule functionale (enzime, anticorpi, liganzi, haptene) prin grupari carbonil, amino, hidroxil;
- ✓ Viteza foarte mare de sinteza ~ 500 copii ale unui polipeptid (sinteza, translocare, asamblare) / min. la un timp de generatie de 20 min. a celulei.



## Avantaje:

- Raspandire mare,
- Autoasamblare in siruri regulate in suspensie sau pe suprafete,
- Uniformitate repetitiva structurala si fiziologica,
- Scala nanometrica,
- Structura de retea cu izoporozitate,
- Cuplare cu molecule functionale,
- **Posibilitati de aplicare in nanotehnologii.**

## Aplicații potențiale:

- Senzori bioanalitici,
- Membrane de afinitate si de ultrafiltrare,
- Vaccinuri conjugate,
- Matrice pentru imobilizarea controlata a moleculelor functionale,
- Dispozitive cu anticorpi monoclonali imobilizati pentru analize imunologice,
- Structuri suport pentru membrane functionale lipidice,
- Constructie de liposomi care contin molecule functionale (eliberare controlata a medicamentelor)
- In tehnologii nano: matrice pentru biomineralizare controlata, construirea suprafetelor nanostructurate, recristalizare pe siliciu,
- Matrice biomimetica pentru semiconductori.

## REZULTATE ORIGINALE

- Selectarea microorganismelor producătoare de straturi S: *Synechocystis* PCC 6803, *Halobacterium salinarum*, *Halobacterium* sp. TL 1, *Haloferax mediterranei*
- Evidențierea straturilor S: - hidrofobicitate (Rosenberg et al., 1980),  
- det. sarcinii de suprafață (Schultze-Lam et al., 1994)
- Izolarea straturilor S: - soc termic (met. Schultze-Lam, 1992)  
- soc osmotic (met. Sleytr și Thorne, 1976)
- Determinarea concentrației proteice (met. Bradford, 1976)
- Optimizarea condițiilor de cultivare a microorganismelor în vederea obținerii unor cantități crescute de strat S
- Dezintegrarea straturilor S în subunitățile componente: - hidroliza uree,  
- dialize
- Estimarea masei moleculare a proteinelor: - electroforeza în gel de poliacrilamidă (PAGE)