



Institutul de Biologie și Patologie Celulară și UNITATEA EXECUTIVA PT FINANTAREA  
„Nicolae Simionescu” INVATAMANTULUI SUPERIOR, A CERCETARII  
DEZVOLTARII SI INOVARII

PN-III-P1-1.1-TE-2019-2044 (acronim A2A)  
„Peptide derivate din apolipoproteina A-II cu potential terapeutic in ateroscleroza”

**RAPORT ȘTIINȚIFIC**  
**privind implementarea proiectului in perioada 01/01/2021 - 31/12/2021**

In cadrul proiectului de cercetare **PN-III-P1-1.1-TE-2019-2044 (acronim A2A)** cu titlul: „Peptide derivate din apolipoproteina A-II cu potential terapeutic in ateroscleroza” au fost realizate următoarele activități planificate in cadrul Etapei 2:

**Etapa 2** - Generarea de adenovirusuri recombinante care codifică peptide derivate apoA-II cu cisteină (SSCH1, SSCH2, SSCH3, SSCH1H2, SSCH2H3), precum și apoA-II cu lungime completă.

**Activitatea 2.1** - Generarea de adenovirusuri recombinante care codifică peptide derivate apoA-II cu cisteină precum și apoA-II cu lungime completă,

**Activitatea 2.2** - Amplificarea adenovirusurilor recombinante care codifică peptide derivate apoA-II cu cisteină precum și apoA-II cu lungime completă,

**Activitatea 2.3** - Purificarea adenovirusurilor care codifică peptidele derivate din apoA-II,

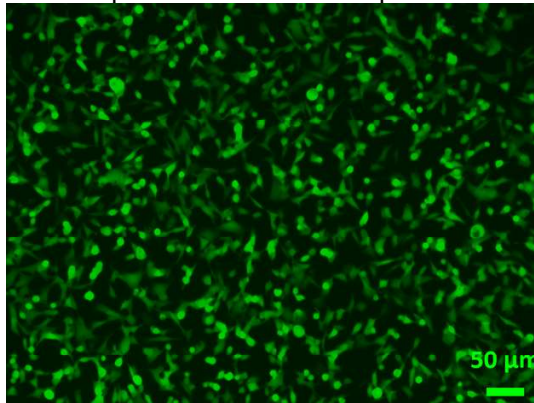
**Activitatea 2.4** - Titrarea adenovirusurilor care codifică peptidele derivate din apoA-II.

**Activitatea 2.1 - Generarea de adenovirusuri recombinante care codifică peptide derivate apoA-II cu cisteină precum și apoA-II cu lungime completă:**

În cadrul acestei activități au fost obținute adenovirusuri care codifică peptide derivate din apoA-II (SSCH1, SSCH2, SSCH3, SSCH1H2, SSCH2H3), precum și apoA-II cu lungime completă. După confirmarea prin digestie enzimatică, din fiecare clonă pozitivă selectată s-a realizat amplificarea ADN în bacterii DH5α și s-a obținut o cantitate mare de ADN (folosind kitul Midiprep de la Qiagen).

**Activitatea 2.2 - Amplificarea adenovirusurilor recombinante care codifică peptide derivate din apoA-II cu cisteină precum și apoA-II cu lungime completă:**

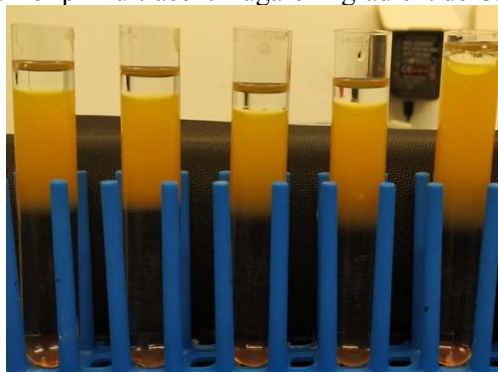
Celulele AD293 au fost însemantate în flăcări T25 și transfectate cu ADN recombinant linearizat cu enzima de restricție *PacI*. După 12 zile, mediul cu celule transduse a fost colectat și centrifugat. Sedimentul celular a fost resuspendat în PBS și supus unor cicluri de înghețare (în azot lichid) - dezghețare (la 37°C) succesiv de trei ori, apoi a fost trecut prin seringă (23G). Atât mediile colectate cât și sedimentele obținute au fost adăugate peste celule AD293 (însemantate cu o zi înainte). Adenovirusurile au fost amplificate succesiv în flăcări T75 → T175 → 5 flăcări T175 → ≥ 25 flăcări T175. Întrucât vectorul adenoviral utilizat în obținerea adenovirusurilor (care codifică pentru proteina ApoA-II) produce și proteina fluorescență verde (GFP, Green Fluorescence Protein), celulele care au produs adenovirusul au putut fi monitorizate și prin microscopie de fluorescență.



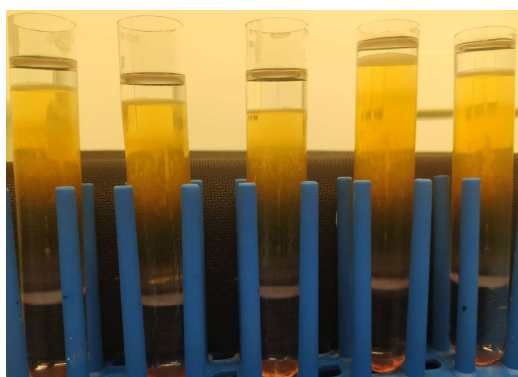
**Fig 1.** Imaginea celulelor AD293 transduse cu adenovirus ApoA-II (la microscopul de fluorescență).

**Activitatea 2.3 - Purificarea adenovirusurilor care codifică peptidele derivate din apoA-II:**

Mediul conținând celule transfectate cu adenovirus au fost colectate și centrifugate. Adenovirusurile din mediu au fost precipitate utilizând sulfat de amoniu, apoi a fost realizată purificarea adenovirusurilor prin ultracentrifugare în gradient de CsCl urmată de dializă. În paralel cu mediul, celulele care au produs adenovirusurile au fost colectate, centrifugate și supuse unor cicluri consecutive îngheț/dezgheț, apoi s-a efectuat purificarea adenovirusurilor prin ultracentrifugare în gradient de CsCl.



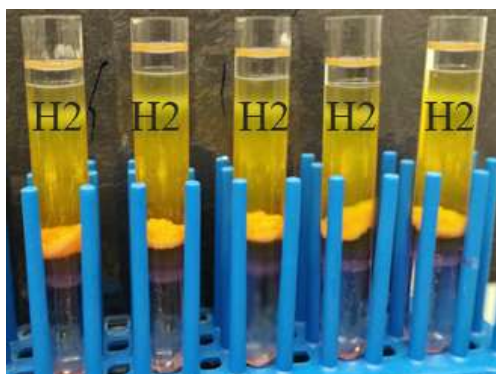
**Fig 2.** Încărcarea cu probe a coloanelor de ultracentrifugare în vederea purificării adenovirusului ApoA-II prin ultracentrifugare în gradient de CsCl.



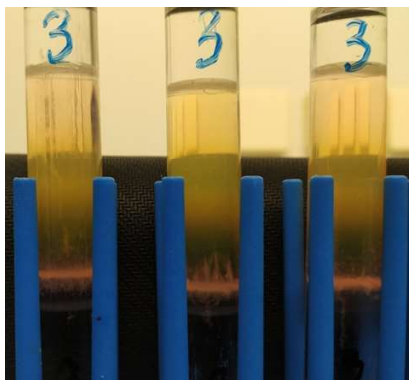
**Fig 3.** Purificarea adenovirusului ApoA-II prin ultracentrifugare in gradient de CsCl.



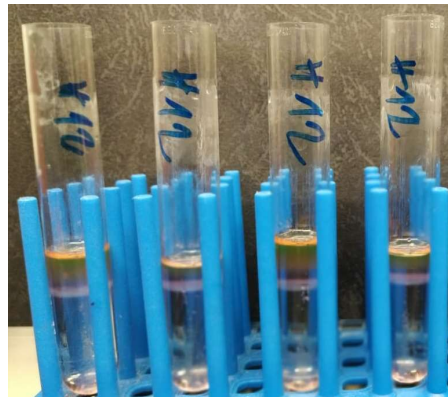
**Fig 4.** Purificarea fragmentului ApoA-II H1 prin ultracentrifugare in gradient de CsCl.



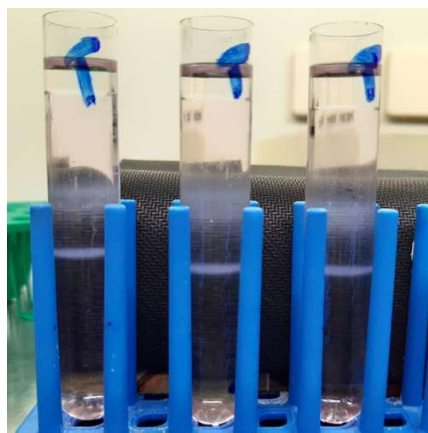
**Fig 5.** Purificarea fragmentului ApoA-II H2 prin ultracentrifugare in gradient de CsCl.



**Fig 6.** Purificarea prin ultracentrifugare in gradient de CsCl a fragmentului ApoA-II H3.



**Fig 7.** Purificarea fragmentului ApoA-II H1H2 prin ultracentrifugare in gradient de CsCl.



**Fig 8.** Purificarea ApoA-II total prin ultracentrifugare in gradient de CsCl.

**Activitatea 2.4 - Titrarea adenovirusurilor care codifică peptidele derivate apoA-II:**

Titarea adenovirusurilor care codifică peptidele derivate din apoA-II a fost realizata prin citometrie in flux, in urma transducerii celulelor AD293 cu adenovirus purificat. Au fost realizate dilutii seriale ale stocului viral ( $10^{-3}$ - $10^{-7}$ ) si au fost evaluate celulele GFP pozitive prin citometrie in flux.

Titrul adenoviral obtinut a fost cuprins intre  $1.7- 4.3 \times 10^{11}$  TU/ml (TU=Transforming Units).

Titrul viral a fost calculat utilizand urmatoarea formula:

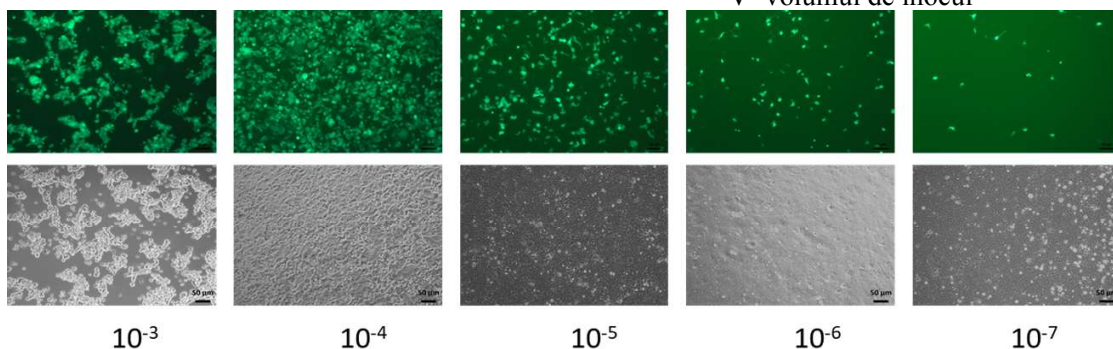
$$TU/ml = D * F / 100 * C / V$$

D=factor de dilutie

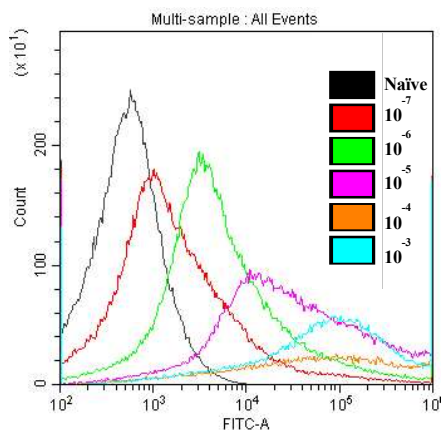
F=numarul de celule pozitive/100

C=numarul de celule/godeu

V=volumul de inocul



**Fig 9.** Titrarea adenovirusului apoA-II: celulele AD293 au fost transduse cu adenovirus folosind diferite dilutii seriale ale stocului viral ( $10^{-3}$ - $10^{-7}$ ).



**Fig 10.** Titrarea adenovirusului apoA-II: celulele au fost transduse cu adenovirus folosind diferite diluții seriale ale stocului ( $10^{-3}$ - $10^{-7}$ ), iar după 48 de ore de la transducere celulele GFP pozitive au fost evaluate prin citometrie în flux.

Titrul viral al adenovirusurilor care codifică peptide derivate apoA-II cu cisteină (SSCH1, SSCH2, SSCH3, SSCH1H2), precum și apoA-II cu lungime completă a fost cuprins între  $1.7-4,3 \times 10^{11}$  TU/ml.

**Diseminarea rezultatelor:** Rezultatele obținute în cadrul proiectului au fost prezentate sub forma de postere și prezentări orale la următoarele manifestări științifice:

- **“Generation of recombinant adenoviruses encoding ApoA-II”**, Gabriela Florea, Irina F. Tudorache, Violeta G. Trusca, Anca V. Gafencu, poster prezentat la „A 23 a Conferința Internațională: Materials, Methods & Technologies”, organizată în Burgas, Bulgaria în perioada 19-22 August 2021.
- **“An optimised method to obtain recombinant adenoviruses”**, prezentare orală susținută de către Violeta Trusca la „A 23 a Conferința Internațională: Materials, Methods & Technologies”, organizată în Burgas, Bulgaria în perioada 19-22 August 2021.
- **„Generation of recombinant adenoviruses encoding ApoA-II”**, autori Gabriela Florea, Irina F. Tudorache, Violeta G. Trusca, Laura Moise, Madalina Fenyo, Anca V. Gafencu, poster prezentat la simpozionul aniversar „International Conference under the aegis of the Romanian Academy - The 42<sup>nd</sup> Anniversary Symposium of The Institute of Cellular Biology And Pathology “Nicolae Simionescu” held jointly with The 38<sup>th</sup> Annual Scientific Session of The Romanian Society For Cell Biology - “From basic cell biology to personalized medicine during Covid-19 pandemic; creativity and vision in a rapidly changing world”, 4-6 Noiembrie, 2021.
- **„Understanding apolipoprotein gene regulation, a key step toward the development of successful therapies for reduction of atherosclerosis”**, prezentare orală susținută de către Violeta Trusca la simpozionul aniversar „International Conference under the aegis of the Romanian Academy - The 42<sup>nd</sup> Anniversary Symposium of The Institute of Cellular Biology And Pathology “Nicolae Simionescu” held jointly with The 38<sup>th</sup> Annual Scientific Session of The Romanian Society For Cell Biology - “From basic cell biology to personalized medicine during Covid-19 pandemic; creativity and vision in a rapidly changing world”, 4-6 Noiembrie, 2021.

**Publicații:** „*Apolipoprotein A-II - role in health, cardiovascular disease, diabetes, cancer, and other pathologies*”, autori Gabriela Florea, Irina Florina Tudorache, Madalina Dumitrescu, Ioana Madalina Fenyo, Violeta Georgeta Bivol (Trusca), Anca Violeta Gafencu, manuscris în preparare. „*The Promise of Apolipoprotein AI-Based Therapy*”, Trusca VG, Austin Journal of Molecular and Cellular Biology.

În concluzie, obiectivul etapei 2 al proiectului PN-III-P1-1.1-TE-2019-2044 (A2A): „Generarea de adenovirusuri recombinante care codifică peptide derivate din apoA-II, precum și apoA-II cu lungime completă” a fost îndeplinit în totalitate.