



Institutul de Biologie și Patologie Celulară
„Nicolae Simionescu”

si UNITATEA EXECUTIVA PT FINANȚAREA
INVATAMANTULUI SUPERIOR, A CERCETĂRII
DEZVOLTĂRII SI INOVĂRII

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

REZUMAT RAPORT ȘTIINȚIFIC
privind implementarea proiectului in perioada 15/09/2020– 30/11/2022

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 toate obiectivele si activitățile planificate in cadrul proiectului:

Etapa 1 (15/09/2020 - 31/12/2020) - Obținerea plasmidelor recombinante pentru obtinerea adenovirusurilor care codifică diverse peptide derivate din apoA-II

Activitatea 1.1 - Obținerea plasmidelor recombinante care codifică peptide derivate din ApoA-II pt amplificarea adenovirusurilor specifice au fost efectuate in mai multe etape:

- (i) recombinarea constructilor care codifica pt apoA-II în bacterii BJ5193 care conțin pAdEasy-1 prin transformarea chimică în bacterii;
- (ii) selectarea clonelor recombinante pozitive prin PCR;
- (iii) amplificarea clonelor recombinante pozitive selectate folosind bacterii DH5a.

Etapa 2 (01/01/2021 - 31/12/2021) - Generarea de adenovirusuri recombinante care peptide derivate apoA-II cu cisteina (SSCH1, SSCH2, SSCH3, SSCH1H2, SSCH2H3), precum apoA-II cu lungime completa

Activitatea 2.1 - Generarea de adenovirusuri recombinante care peptide derivate apoA-II cu precum apoA-II cu lungime completa

Activitatea 2.2 - Amplificarea adenovirusurilor recombinante care peptide derivate apoA-II cu precum apoA-II cu lungime completa

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

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

Etapa 3 (01/01/2022 - 30/11/2022) - Evaluarea capacității peptidelor derivate din apoA-II de a regresa placa aterosclerotice folosind un model murin de ateroscleroză.

Activitatea 3.1 - Administrarea dietei bogată în grăsimi la șoarecii apoE deficienți,

Activitatea 3.2 - Transducția șoarecilor cu diferite forme trunchiate de apoA-II,

Activitatea 3.3 - Evaluarea nivelului total/HDL/LDL-colesterol și trigliceride in probele de sânge de la șoarecii transduși,

Activitatea 3.4 - Caracterizarea lipoproteinelor de la șoarecii transduși cu formele trunchiate ale apoA-II,

Activitatea 3.5 – Testarea capacității de eflux a colesterolului de la șoarecii transduși cu formele trunchiate ale apoA-II,

Activitatea 3.6 - Analiza evoluției plăcilor aterosclerotice la șoarecii apoE deficienți transduși cu forme trunchiate ale apoA-II.

Rezumat Raport Etapa 1. Prin clonare moleculara, au fost obținuți șase construcții conținând diferite fragmente ale genei apoA-II inserate în vectorul pADTrack. Construcțiile obținute conțin secvența semnal (SS), aminoacidul cisteina din poziția 6 (C) și câte unul sau doua helixuri (H1, H2, H3) ale apoA-II. Acești construcții au fost notați astfel: 1.SS-C-H1, 2.SS-C-H2, 3.SS-C-H3, 4.SS-C-H1H2, 5.SS-C-H2H3.

Etapele de obținere a construcțiilor cu fragmente apoA-II inserate în pADTrack au fost următoarele:

1. Obținerea fragmentelor apoA-II s-a realizat prin overlapping PCR. Fragmentele de ADN amplificate prin PCR au fost separate prin electroforeza în gel de agaroză 1% colorat cu MidoriGreen. Benzile corespunzătoare fragmentelor apoA-II au fost excizate din gelul de agaroză, iar ADN a fost izolat și purificat din gel folosind un kit Promega (Wizard SV gel and PCR Clean-up System).

2. Clivirea capetelor ADN cu enzimele Kpn I și Xho I

3. Ligarea insertului (fragment apoA-II) în vectorul pADTrack folosind T4 ADN ligază

4. Selecția clonelor care au integrat insertul (fragment apoA-II) în vectorul pADTrack

Fragmentele apoA-II clonate în pADTrack au fost utilizate pt recombinare în bacterii competente BJ5183. Recombinarea ADN în bacterii competente BJ5183 s-a realizat cu kitul Mix&Go Transformation. Simultan cu cele cinci fragmente apoA-II, a fost recombinat și apoA-II total (SS-C-H1H2H3) clonat în vectorul pAD Track. Etapele recombinării ADN au fost următoarele:

1. Digestia ADN cu enzima de restricție PmeI

2. Izolarea și purificarea ADN cu fenol/clorofom/alcool izoamilic

3. Transformare bacteriana cu bacterii competente BJ5183

4. Selecția clonelor prin „PCR negativ”: PCR cu primerii pAD Track 4631F și pAD track 5616R.

5. Selecția clonelor prin „PCR pozitiv” prin care a fost testată prezența fiecărui fragment apoA-II.

6. Liza alcalină a culturilor bacteriene.

7. Re-transformarea ADN recombinant în bacterii competente DH5α

După confirmarea prin digestie enzimatică cu PacI și PstI, din fiecare clona pozitivă selectată s-a realizat amplificarea ADN în bacterii DH5α și s-a obținut o cantitate mare de ADN.

Rezumat Raport Etapa 2. Etapele de obținere a adenovirusurilor recombinante care codifică peptide derivate din apoA-II au fost:

i. Recombinarea construcțiilor în pAdTrack cu pAdEasy-1 în bacterii BJ5183

ii. Selecția clonelor pozitive prin PCR și digestie cu enzime de restricție (ex: KpnI, PstI și HindIII)

iii. Impachetarea particulelor adenovirale în celule AD293.

Pentru recombinarea construcțiilor în pAdTrack cu pAdEasy-1, bacteriile BJAdeasy (#16399 Addgene) competente au fost preparate folosind kitul Mix&Go E.coli Transformation Kit (Zymo Research). După obținerea ADN recombinant în pAdTrack cu pAdEasy-1, acesta a fost verificat prin PCR și digestie enzimatică. După confirmarea prin digestie enzimatică, din fiecare clona pozitivă selectată s-a realizat amplificarea ADN în bacterii DH5α și s-a obținut o cantitate mare de ADN.

Pentru amplificarea adenovirusurilor recombinante care codifică peptide derivate din apoA-II cu cisteină precum și apoA-II cu lungime completă, celulele AD293 au fost insamantate 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 (insamantate 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), celulele care au produs adenovirusul au putut fi monitorizate și prin microscopie de fluorescență. Adenovirusurile din mediu au fost precipitate utilizând sulfat de amoniu, după care a fost realizată purificarea adenovirusurilor prin ultracentrifugare în gradient de CsCl urmată de dializă. Celulele care au produs adenovirusurile au fost colectate, centrifugate și supuse unor cicluri consecutive îngheț/dezgheț. În continuare s-a efectuat purificarea adenovirusurilor prin ultracentrifugare în gradient de CsCl și dializă.

Titrarea adenovirusurilor care codifică peptidele derivate din apoA-II a fost realizată prin citometrie în flux, în urma transducerii celulelor AD293 cu diluții seriale ale virusurilor purificate. Titrul viral al adenovirusurilor care codifică peptide derivate apoA-II cu cisteină precum și apoA-II cu lungime completă a fost cuprins între 1.7-4,3x10¹¹ TU/ml. (TU=Transforming Units).

Rezumat Raport Etapa 3. Efectele transductiei cu forme trunctate de apoA-II in modelul murin de ateroscleroză au fost evaluate la intervale diferite de timp: I. la timp scurt si II. la timp lung.

I. Femele apoE^{-/-}, in varsta de 6 luni, au fost impartite in cinci loturi experimentale (n=3/grup), pentru fiecare dintre cele 4 adenovirusuri si un grup sham. Soarecii au fost injectati cu suspensie adenovirala (100 µl), intravenos, in vena laterala caudala, folosind o doza de 5x10⁹ TU/ml, sau vehicul folosit pentru prepararea suspensiei virale (PBS). Titrul viral al adenovirusurilor care codifică peptide derivate din apoA-II precum și apoA-II total a fost cuprins intre 1.7-4,3x10¹¹ TU/ml. Pe parcursul intregului experiment, animalele au primit hrana si apa ad libitum, iar starea generala si greutatea acestora a fost monitorizata. La 4 zile dupa transductie si dupa 5 ore de fasting, animalele au fost anesteziate cu un cocktail de ketamina/xilazina/acepromazina (80/10/2 mg/kg corp), iar sangele a fost recoltat prin punctie intracardiaca pentru obtinerea plasmei. Ulterior, animalele au fost perfuzate intracardiac cu PBS si s-a realizat prelevarea chirurgicala a lobului hepatic stang. Tesutul hepatic a fost prelucrat pentru analiza ARN. Plasma a fost utilizata pentru urmatoarele analize: 1) determinarea valorilor colesterolului si trigliceridelor, 2) analiza expresiei apoAI si apoAII murin prin ELISA, 3) determinarea aspectului si dimensiunii particulelor HDL in fractii prin microscopie electronica de transmisie si Nanosizer si 4) determinarea activitatii PON-1 in fractii.

Masculi apoE^{-/-}, in varsta de 4 luni, au fost impartiti in cinci loturi experimentale (n=4/grup), pentru fiecare dintre cele 4 adenovirusuri si un grup sham. Soarecii au fost injectati cu suspensie adenovirala (100 µl), intravenos, in vena laterala caudala, folosind doze de 10⁸ TU/ml, 5*10⁸ TU/ml, 10⁹ TU/ml, 5x10⁹ TU/ml si 10¹⁰ TU/ml sau vehicul folosit pentru prepararea suspensiei virale (PBS). Pe parcursul experimentului, animalele au primit hrana normal si apa ad libitum, iar starea generala si greutatea acestora a fost monitorizata. La 7 zile dupa transductie, animalele au fost anesteziate cu un cocktail de ketamina/xilazina/acepromazina (80/10/2 mg/kg corp) si sangele a fost recoltat prin punctie intracardiaca pt obtinerea plasmei. Ulterior, animalele au fost perfuzate intracardiac cu PBS si s-a realizat prelevarea chirurgicala a ficatului. Acesta a fost utilizat pt analiza IVIS a transductiei adenovirale. Plasma a fost utilizata pt determinarea valorilor colesterolului si trigliceridelor si pt analiza expresiei apoA-I murin prin ELISA.

Ficatul soarecilor apoE^{-/-} injectati cu adenovirus care codifica apoA-II si forme trunctate ale apoA-II a fost transdus cu succes (in special in cazul soarecilor transdusi cu apoA-II se observa benzi de ADN bine conturate), iar adenovirusurile injectate sunt pure, ADN extras fiind amplificat cu primerii specifici fiecarui fragment al apoA-II (cu exceptia adenovirusului care codifica fragmentul H1 al apoA-II).

Rezultatele au aratat ca cea mai mare concentratie de apoAI murin se gaseste in plasma soarecilor apoE^{-/-} injectati cu 5*10⁹ TU/ml de adenovirus care codifica apoA-II, concentratia plasmatica cea mai redusa de apoAI murin fiind la soarecii injectati cu 10⁸ TU/ml de adenovirus. In urma transductiei adenovirale, concentratia de triglyceride si de colesterol total in plasma a crescut la toate grupele de soareci, comparativ cu grupul control. Imaginile de microscopie electronica de transmisie a HDL din fractia 8 de lipoproteine izolata de la soarecii apoE^{-/-} transdusi cu adenovirus care codifica apoA-II si fragmentul H3 al apoA-II, la 4 zile post-transductie. 5 µl din au aratat o heterogenitate in ceea ce priveste aspectul si dimensiunea particulelor HDL la cele 3 grupe de soareci analizati.

Cuantificarea expresiei proteice a apoA-II murin in plasma de la soarecii apoE^{-/-} transdusi cu adenovirus care codifica apoA-II si forme trunctate ale apoA-II a fost realizata prin ELISA de tip sandwich, la 4 zile post-transductie, utilizand un kit specific. S-a observat ca cele mai mari concentratii ale apoA-II murin au fost intalnite la soarecii injectati cu adenovirus care codifica fragmentul H3 al apoA-II, in timp ce concentratia minima este atribuita soarecilor transdusi cu adenovirus care codifica fragmentul H1 al apoA-II.

Concentratia de triglyceride in fractii izolate de la soarecii apoE^{-/-} transdusi cu adenovirus care codifica apoA-II si forme trunctate ale apoA-II a fost determinata prin utilizarea unui kit specific de dozare, la 4 zile post-transductie. In urma transductiei adenovirale, concentratia de triglyceride a prezentat valori maxime in fractia 9 la soarecii din grupul H1 si sham. De asemenea, au fost observate valori crescute ale concentratiei de colesterol in fractiile de VLDL la toate grupele de soareci, in special la grupul H1. Valorile maxime ale concentratiei de colesterol in fractiile de HDL au fost observate in fractia 8 la toate grupele de soareci, la grupul H2 si grupul H3 inregistrandu-se cele mai ridicate valori.

Activitatea PON-1 a fost determinata in fractii izolate de la soarecii apoE^{-/-} transdusi cu adenovirus care codifica apoA-II si forme trunctate ale apoA-II. S-a observat o initiere a activitatii PON-1 in fractii incepand cu fractia 7 (la grupul de soareci H1, H3 si A2) sau fractia 8 (grupul de soareci H2 si sham), cu un

maxim de activitate in fractia 9 si un minim de activitate in fractia 11 pentru toate grupele de soareci. De asemenea, PON-1 este cea mai activa in grupele de soareci H3 si H1, la polul opus situandu-se grupele de soareci H2 si A2. Proteinele apoA-II precum si fragmentele H1 si H2 derivate din apoA-II au fost vizualizate pe gel de poli-acrilamida 15% prin coloratie Pierce Silver. Au fost observate benzi proteice corespunzatoare fragmentelor H1 si H2 ale apoA-II in fractia 10, avand masa moleculara de pana in 10 kDa, precum si benzi proteice corespunzatoare apoA-II in fractiile 9-12, cu masa moleculara cuprinsa in intervalul 15-20 kDa.

II. Femele apoE^{-/-}, in varsta de 3 luni, au fost impartite in cinci loturi experimentale (n=7/grup), pentru fiecare dintre cele 4 adenovirusuri si un grup sham. Soarecii au fost injectati saptamanal, timp de trei saptamani, cu suspensie adenovirala (100 µl), intravenos, in vena laterala caudala, folosind doza de 5x10⁹ TU/ml, sau cu vehicul folosit pt prepararea suspensiei virale (PBS). Pe parcursul intregului experiment, animalele au primit hrana si apa *ad libitum*, iar starea generala si greutatea acestora a fost monitorizata. Dupa transductie, a fost realizata saptamanal dozarea de colesterol total si de trigliceride in plasma la fiecare 3 zile respectiv 6 zile dupa fiecare injectie. Pentru aceasta, de la fiecare animal s-a recoltat un volum de sange de ~ 75 µl prin tehnica de ciupire a cozii (tail snip), inainte de transductie pentru timpul 0, iar dupa transductie, la 3 si respectiv 6 zile dupa fiecare injectie. La 3 saptamani de la prima transductie si dupa 5 ore de fasting, animalele au fost anesteziate cu un cocktail de ketamina/xilazina/acepromazina (80/10/2 mg/kg corp) si sangele a fost recoltat prin punctie intracardiaca pentru obtinere de plasma. Plasma a fost utilizata pentru determinarea valorilor colesterolului si trigliceridelor.

Concentratia de trigliceride in plasma soarecilor apoE^{-/-} transdusi cu adenovirus care codifica apoA-II si forme truncate ale apoA-II, a fost determinata prin utilizarea unui kit specific de dozare, la fiecare 3, respectiv 6 zile post-transductie. Valorile maxime ale concentratiei trigliceridelor in plasma au fost inregistrate in urma administrarii celei de-a treia doze adenovirale, respectiv in ziua 15 post-transductie, la toate grupele de soareci, in timp ce valorile minime, au fost observate in ziua 17 post-transductie. Concentratia de trigliceride in fractii izolate din plasma soarecilor apoE^{-/-} transdusi cu adenovirus care codifica apoA-II si forme truncate ale apoA-II, determinata prin utilizarea unui kit specific de dozare, la 24 zile post-transductie. Post-transductie, concentratia de trigliceride a prezentat un peak in fractia 6 la grupele H2 si A2, in timp ce la grupul H3 acest peak se afla in fractia 7, iar la grupul H1 este in fractia 10.

Concentratia de colesterol in plasma soarecilor apoE^{-/-} transdusi cu adenovirus care codifica apoA-II si forme truncate ale apoA-II, a fost determinata prin utilizarea unui kit specific de dozare, la fiecare 3, respectiv 6 zile post-transductie. Valorile maxime ale concentratiei de colesterol in plasma au fost inregistrate in ziua 14 post-transductie la grupul H1, respectiv in ziua 17 la grupurile H2 si H3. La 24 de zile post-transductie, toate grupele de soareci au prezentat valori minime ale concentratiei de colesterol, dar mai mari decat cele de la momentul zero. La grupul A2, in intervalul de zile 10-17 au fost observate valori mai reduse ale concentratiei de colesterol fata de celelalte grupe de soareci. Concentratia de colesterol in fractiile VLDL la soarecii apoE^{-/-} transdusi cu adenovirus care codifica apoA-II si forme truncate ale apoA-II, a fost determinata prin utilizarea unui kit specific de dozare, la fiecare 3, respectiv 6 zile post-transductie. Concentratiile de colesterol in fractiile VLDL au fost uniforme pt grupele de soareci utilizate in experiment, exceptie facand grupul A2, unde valorile inregistrate pt concentratia de colesterol au fost mai ridicate fata de restul grupelor. Concentratia de colesterol in fractiile HDL la soarecii apoE^{-/-} transdusi cu adenovirus care codifica apoA-II si forme truncate ale apoA-II, au fost determinata prin utilizarea unui kit specific de dozare, la fiecare 3, respectiv 6 zile post-transductie. In fractiile 8 si 9, concentratiile de colesterol au prezentat valori minime pt grupele de soareci H1, H2 si H3. La grupul A2 concentratiile de colesterol au fost mai ridicate decat la restul grupelor in fractiile de HDL.

De asemenea, a fost evaluat potentialul formelor truncate ale apoA-II de a reduce leziunile aterosclerotice prin promovarea efluxului de colesterol la soareci apoE^{-/-} injectati cu adenovirus care codifica apoA-II si forme truncate ale apoA-II. Cuantificarea leziunilor a aratat o reducere semnificativa a suprafetei lezionale la animalele transduse cu adenovirus care codifica fragmentul H1 al apoA-II comparativ cu grupul control. Scaderi semnificative s-au obtinut si pt grupurile de animale H2 si H3, comparativ cu grupul control.

Toate rezultatele obtinute reprezinta materialul pt un articol stiintific care este in pregatire pt publicare.

Diseminarea rezultatelor

Rezultatele obținute în cadrul proiectului au fost prezentate la următoarele manifestări științifice:

- **„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 45th European Lipoprotein Club (ELC) Meeting, Tutzing, Germany, 04-08.09.2022
- **“Generation of recombinant adenoviruses encoding ApoA-II”**, Gabriela Florea, Irina F. Tudorache, Violeta G. Trusca, Anca V. Gafencu, poster prezentat la „A 23 a Conferinta Internationala: Materials, Methods & Technologies”, organizata in Burgas, Bulgaria in perioada 19-22 August 2021
- **“An optimised method to obtain recombinant adenoviruses”**, prezentare orala sustinuta de catre Violeta Trusca la „A 23 a Conferinta Internationala: Materials, Methods & Technologies”, organizata in Burgas, Bulgaria in 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 42nd Anniversary Symposium of The Institute of Cellular Biology And Pathology “Nicolae Simionescu” held jointly with The 38th 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 orala sustinuta de catre Violeta Trusca la simpozionul aniversar „International Conference under the aegis of the Romanian Academy - The 42nd Anniversary Symposium of The Institute of Cellular Biology And Pathology “Nicolae Simionescu” held jointly with The 38th 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, a Player in Multiple Processes and Diseases”**, Gabriela Florea, Irina Florina Tudorache, Elena Valeria Fuior, Radu Ionita, Madalina Dumitrescu, Ioana Madalina Fenyo, Violeta Georgeta Bivol, Anca Violeta Gafencu, Biomedicines, 2022.
- **„The Promise of Apolipoprotein AI-Based Therapy”**, Trusca VG, Austin Journal of Molecular and Cellular Biology, 2021.

In concluzie, obiectivele proiectului **PN-III-P1-1.1-TE-2019-2044** au fost îndeplinite în totalitate.