

Realizari in cadrul INTERA-1/ Etapa I, An 2018: “Obtinerea celulelor transfectate stabil si optimizarea conditiilor de incapsulare”

- (i) Angajarea a 2 tineri cercetatori (unul in IBPCNS si unul in ICMPP);
- (ii) Trimiterea unui articol spre publicare;
- (iii) Realizarea unei oferte de serviciu
- (iv) Realizarea unei tehnologii
- (v) Depunerea unei cereri de brevet
- (vi) Dintre cele mai importante realizari stiintifice mentionam:

a. **Obtinerea unor plasmide codificatoare pentru IL-10** in vectorul pcDNA3.1. si a IL-10 cu reporter DYK si EGFP

b. **Obtinerea unei plasmide care codifica luciferaza cu secventa semnal a IL-10** pentru a mima secretia acesteia. Pentru determinarea probabilitatii cu care secventa semnal s-a realizat analiza folosind programul SignalP 4.1. SERVER de la Technical University of Denmark. Au fost testate mai multe variante ale legarii Secventei semnal de proteina propriu zisa. In graficul din figura 1 se observa ca luciferaza (cu structura MEDAKNI.....) se va elibera de secventa semnal in mod optim.

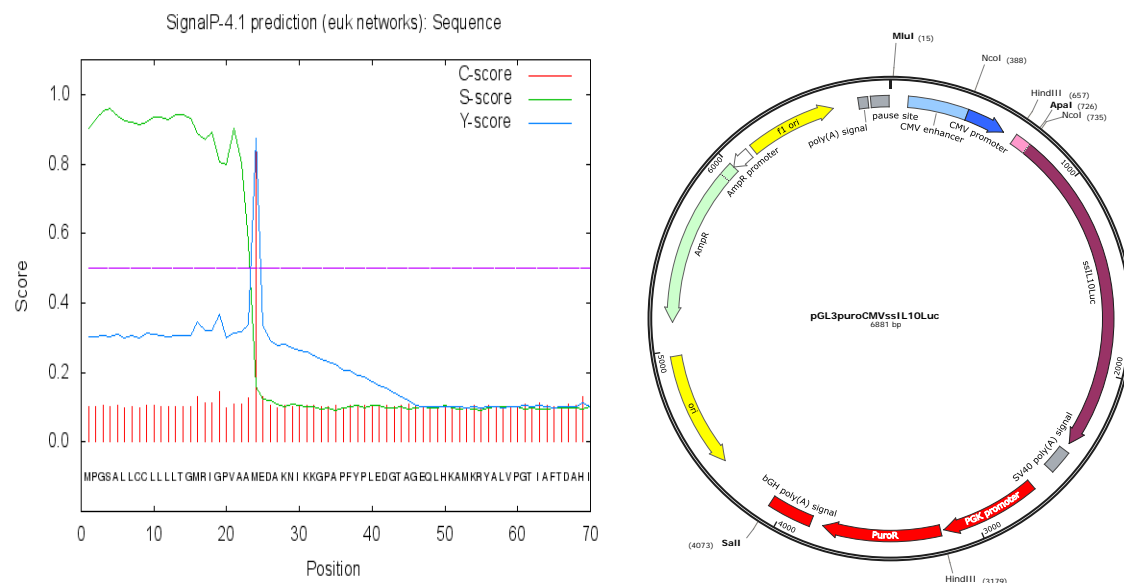
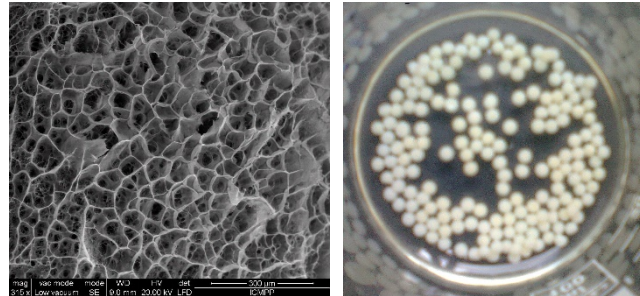


Fig. 1. Reprezentarea grafica a potentialului secventei semnal IL10 de a se cliva pentru producerea proteinei mature. Harta plasmidei care contine constructul ssIL10-Luc in pGL3, in care a fost inserat promotor CMV si gena de rezistenta a puomicina.

c. **Selectia polimerilor de incapsulare adecvati.** Acest lucru s-a facut tinand cont de mai multe aspecte cum ar fi rezistenta mecanica si chimica in fluidele fiziologice, biocompatibilitatea si biodegradabilitatea. De asemenea, polimerii trebuie sa fie solubili in fluidele fiziologice in care sunt incubate celulele. Tinand cont de aceste aspecte, pentru sinteza microcapsulelor s-au ales polimeri naturali si anume polizaharidele native sau modificate chimic-chitosan, pululan, curdlan si alginat.

Chitosanul a fost modificat chimic prin transformarea acestuia în chitosan clorhidrat pentru a putea fi solubil în mediile de cultură ale celulelor, după care a fost purificat prin dializă și recuperat prin liofilizare. S-a demonstrat **capacitatea acestuia de a forma microcapsule** prin injectarea soluției de chitosan clorhidrat sub formă de picături într-o soluție de tripolifosfat de sodiu (**Fig. 2**). Microcapsulele au prezentat o structură poroasă cu dimensiunea porilor de aproximativ 100 μm.

Fig. 2. Imagini ale microcapsulelor de chitosan: vedere generală și secțiune.



Curdlanul a fost modificat chimic prin introducerea grupelor fosfat pe lanțul principal (**Fig. 3**) pentru a-i mări solubilitatea și pentru a-i conferi proprietatea de a chelata în prezența ionilor polimetali. Prin titrări potențiometrice s-a determinat un grad de substituție, $GS = 1,58$ și o valoare a constantei aparente de disociere, $pK_a = 2,14$. Derivatul de curdlan cu grupe fosfat a fost testat preliminar în vederea stabilirii **capacității de a forma microcapsule** prin gelificare ionotropă.

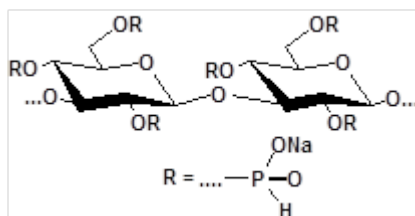


Fig. 3. Structura chimică a curdlanului cu grupe fosfat monobazice.

Pululanul a fost modificat chimic pentru a introduce grupe carboxilice ionice care să îi confere polimerului solubilitate și capacitate de a chelata cu ioni metalici bi- și tri-valenți. Gradul de substituție, GS (conținutul de grupe carboximetil) al derivatului anionic al pululanului s-a determinat prin titrare conductometrică și a fost de 1,4. Studiile preliminare au demonstrat capacitatea de a forma microcapsule prin chelatare cu diferiți ioni metalici bi- sau tri-valenți: Ca, Cu, Al, Fe.

Alginatul sau sarea de sodiu a acidului alginic a fost purificat prin filtrarea soluției apoase printr-o membrană de 0,45 μm după care soluția a fost precipitată în etanol absolut. Soluția apoasă de alginat în tampon fosfat cu $pH = 7,4$ (10 %, g/v) a fost injectată (INJECTOMAT SEP 21S PLUS) într-o soluție apoasă de $CaCl_2$ 0.5M. S-au obținut microcapsule rotunde, fără coadă, cu diametru în jur de 1,8 mm (**Fig. 4**).

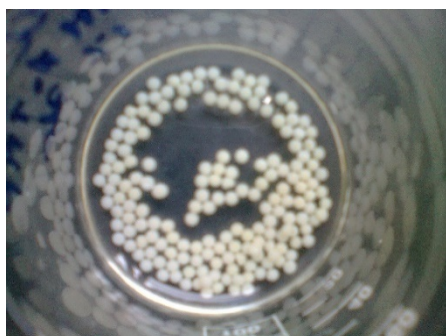


Fig. 4. Imagini ale microcapsulelor de alginat de calciu.

d. **Realizarea unei tehnologii de formare a microcapsulelor polimerice de chitosan cu proprietati speciale.** Chitosanul clorhidrat cu masa moleculara $M_v = 105.000 \text{ g/mol}$ si gradul de deacetilare, $GD = 83,55$ a fost folosit pentru optimizarea conditiilor de obtinere a microcapsulelor de chitosan prin injectarea acestuia (INJECTOMAT SEP 21S PLUS) sub forma de picaturi intr-o solutie de tripolifosfat de sodiu si pululan oxidat cu grupe aldehydice. Caracterul inovativ al acestei tehnologii consta in reticularea simultana ionica si covalenta a microcapsulelor de chitosan cu ioni de tripolifosfat de sodiu, respectiv cu pululan cu grupe aldehydice. Reticularea covalenta suplimentara a grupelor aminice ale chitosanului de pe suprafata microcapsulelor cu grupele aldehydice ale pululanului modificat are ca rezultat obtinerea de microcapsule mult mai stabile in fluidele fiziologice.

e. **Incapsularea celulelor transfectate stabil cu proteine reporter fluorescente in matrici de alginat.** Celulele transfectate au fost incapsulate in alginat si urmarite pentru expresia genei reporter prin microscopie de fluorescenta pentru 2 saptamani. S-a observat ca celulele se mentin viabile pe perioada analizata si exprima proteina fluorescenta asa cum se vede in Fig. 5.

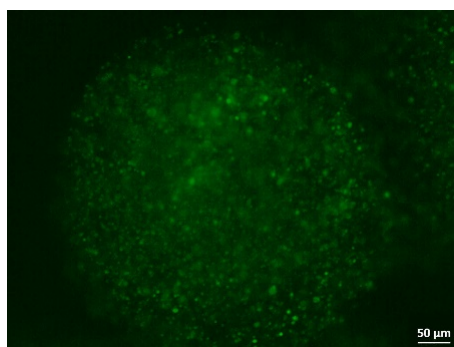


Fig. 5. Celule transfectate stabil, incapsulate in alginat.

DISEMINARE INTERA-1 2018:

► A fost creata a **pagina web INTERA:** http://www.icbp.ro/static/en/en-networking_grants-grants-national_grants/intera.html

► **Participari la manifestari stiintifice :**

1. 4th International Conference on Chemical Engineering, ICCE 2018, 31.10-02.11.2018, Iasi, Romania, Conferinta plenara- Fundueanu G., Constantin M., Bucatariu S., Smart polymeric materials for controlled release of bioactive molecules.

2. participarea la conferinta „20th International Conference on Synthetic Polymer Chemistry, Nanoscience and Nanotechnology” Londra, UK, cu lucrarea „Synthesis and Characterization of Some Alginate Hollow Fibres Using Co-Axial Needles” Anton Ficai, Ioana Lavinia Ardelean, Roxana Doina Trusca, Bogdan Stefan Vasile, Denisa Ficai, Ecaterina Andronescu - a fost apreciată de juriul conferinței cu premiul „BEST PRESENTATION AWARD”.

► s-a depus o cerere pentru un brevet de invenție

► A fost trimisa o lucrare spre publicare la revista JoVE (cotata ISI) "An efficient method for adenovirus production" Madalina Dumitrescu, Violeta G. Trusca and Anca V. Gafencu. care a primit manuscript number: JoVE59105 si este acum in process de evaluare.

CONCLUZII:

Obiectivul etapei I al subproiectului **P1-INTERA** a fost indeplinit in totalitate:

Indicatori de realizare au fost atinsi:

- Au fost analizate secventele IL-10 si a proteinelor reporter si au fost obtinute plasmidele pentru IL-10 si proteine reporter secretate
- Au fost obtinute biomatrici polimere cu functiuni specifice
- Au fost obtinute celule transfectate stabil
- A fost realizata o Tehnologie de formare a microcapsulelor polimerice cu proprietati speciale
- A fost realizata pagina web INTERA, au fost efectuate participari la manifestari stiintifice, a fost realizat un brevet si o lucrare stiintifica a fost trimisa spre publicare
- au fost angajati doi noi cercetatori (Alina-Gabriela Rusu – ICMPP si Laura Moise - IBPCNS), procedura de angajare a unui tanar la UPB fiind in desfasurare.
- Un serviciu a fost postat in platforma ERRIS, la adresa <https://erris.gov.ro/Department-gene-analysis> Plasmid design and cloning strategies.