

Parteneri:

CO: Institutul De Chimie Macromoleculara "Petru Poni", Iasi

P1: Institutul de Biologie si Patologie Celulara „ N. Simionescu”

RAPORTARE STIINTIFICA SI TEHNICA (RST)

2019

PROIECT

TERAPII INTELIGENTE PENTRU BOLI NON-COMUNICABILE, BAZATE PE ELIBERAREA CONTROLATA DE COMPUSI FARMACOLOGICI DIN CELULE INCAPSULATE DUPA MANIPULARE GENETICA SAU BIONANOPARTICULE VECTORIZATE (INTERA)

Contract PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0697

nr. 13PCCDI/2018

PROIECT nr. 4

Conjugati polimerici pentru inducerea eficienta a expresiei unor gene de interes cu aplicabilitate in terapia celulara

Responsabil proiect: Dr. Mariana Pinteala

**REALIZARI in cadrul INTERA-4/ Etapa II, An 2019:
“Investigarea in vitro a citotoxicitatii si eficientei de transfectie a NPM-PEI”**

- (i) Publicarea a doua articole** in reviste cotate ISI, **1 articol acceptat** spre publicare in revista ISI si **1 articol trimis** spre publicare;
- (ii) Diseminarea rezultatelor** prin participarea cu lucrari la **Conferinte Nationale** (2 postere) si **Internationale** (3 postere).

(iii) **DINTRE CELE MAI IMPORTANTE REALIZARI STIINTIFICE MENTIONAM:**

a) Testarea *in vitro* a randamentului de transfectie a NPM-PEI

Rezultatele experimentelor de transfectie cu nanoparticulele cu magnetita au indicat capacitatea acestora de a realiza eficient transfectia cu ADN a celulelor AD293. Asa cum se observa in figura de mai jos, in cazul transfectiei cu NPM-PEI si ADN, randamentul maxim de transfectie a fost obtinut in cazul raportului N/P 1:30, rezultand valori ale activitatii relative a luciferazei de aproximativ 26.000.000. De asemenea, randamente bune de transfectie cu NPM-PEI si ADN au fost obtinute in cazul rapoartelor N/P 1:40 si 1:50, rezultand valori ale activitatii relative a luciferazei cuprinse intre 17.000.000-20.000.000. Transfectia s-a realizat cu eficienta scazuta in cazul transfectiei cu NPM-PEI si ADN la rapoarte N/P 1:60, 1:70, 1:80, 1:90 si 1:100, probabil din cauza ca celulele au fost invadate de concentratii prea mari de nanoparticule cu magnetita. In contrast, in cazul transfectiei cu nanoparticule cu magnetita acoperite cu PEI stabilizat electrostatic si reticulat cu glutaraldehida, a fost obtinut un randament mediu de transfectie in cazul tuturor rapoartelor N/P testate (1:10, 1:20, 1:30, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90 si 1:100), activitatea luciferazei fiind cuprinsa intre 10.000.000-13.000.000 unitati relative de luminiscenta.

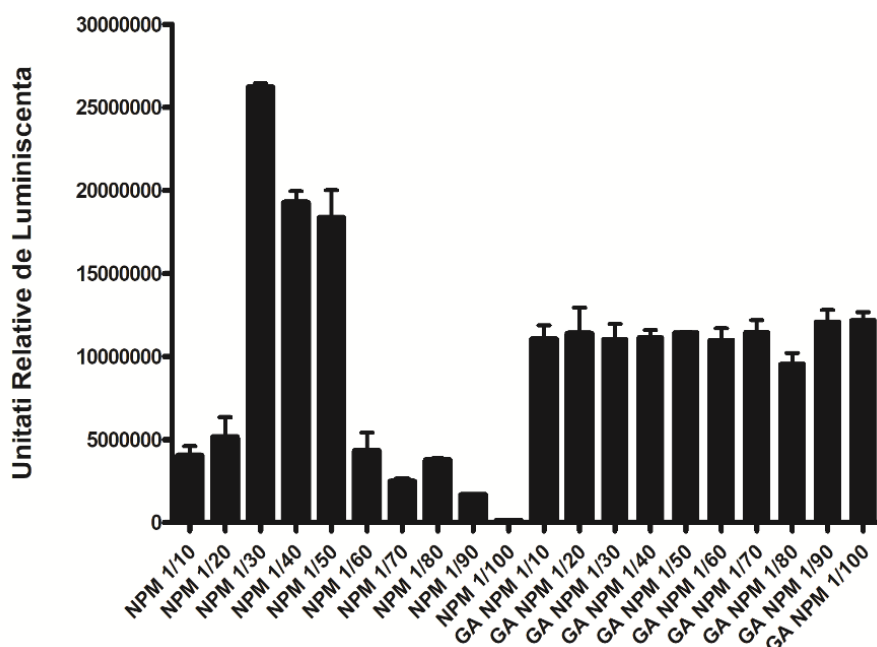


Figura 1. Determinarea activitatii luciferazei dupa transfectia celulelor AD293 cu compusii formati din „NPM-PEI” sau „NPM-PEI-GA” si plasmida pGL3-CMV-LUC.

De asemenea, pentru a se determina gradul de internalizare a NPM-PEI de catre celule, s-a masurat cantitatea de Fe intracelular (dupa incubarea celulelor HeLa cu NPM-PEI) prin metoda cu tiocianat descrisa anterior (A.K. Gupta, M. Gupta, 2005). Astfel, s-a realizat insamantarea celulelor HeLa in placi de 96 de godeuri si cultivarea lor timp de 24h, apoi a fost schimbat mediul de cultura cu mediu proaspat continand diferite concentratii de NPM-PEI. Dupa 48h, mediul de cultura a fost indepartat si celulele au fost lizate cu 30% v/v HCl 2 h la 50–60 °C, urmata de adaugarea persulfatului de potasiu pentru a oxida ionii ferosi la ioni ferici. Apoi, a fost adaugat tiocianat de potasiu pentru a forma complexul colorat fer-tiocianat. Concentratia Fe a fost determinata spectrofotometric la 490 nm utilizand un cititor de microplaci, fata de o curba standard. S-a observat ca internalizarea NPM-PEI in celule HeLa creste dependent de doza, fapt evidentiat de cresterea concentratiei de Fe intracelular.

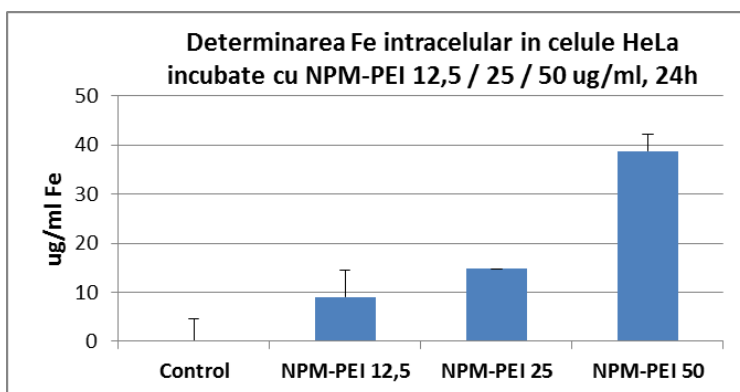


Figura 2. Determinarea fierului intracelular in celulele HeLa incubate cu NPM-PEI.

b) Functionalizarea agentilor de transfectie CORE-PEI cu diferite molecule pentru: penetrare membrana/nucleara, recunoastere celulara, cresterea biocompatibilitatii, CORE-PEI-R

Au fost sintetizati compusi de tip **CORE-PEI** si anume **ROT-PEI**, cu o structura de tip rotaxan, care este constituit dintr-un ax de polietilenglicol având $M_w=1$ kDa ce trece printr-un număr de 9 cavitati de ciclodextrină funcționalizată cu PEI ramificat ($M_w=2$ kDa), ca în figura de mai jos. Pentru ca moleculele de ciclodextrină să rămână pe axul de PEG, la capetele acestui lanț s-au legat covalent câte o moleculă de silatran care împiedică glisarea inelelor de ciclodextrină în exterior. Fiecare ciclodextrină a legat un număr de aproximativ 3 molecule de PEI (**Figura 3**).

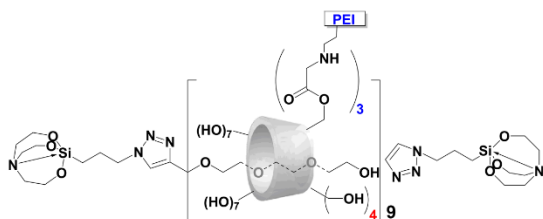


Figura 3. Reprezentarea schematică a structurii ROT-PEI

Structura a fost confirmată prin mai multe tehnici de caracterizare complementare: $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, FTIR, prezentate mai jos

Compusul **CORE-PEI-R** este reprezentat de ROT-PEI-G, obținut prin funcționalizarea ROT-PEI cu guanidină (G), care se cuplează covalent la grupările amino primare ale PEI prin intermediul 1H-Pyrazole-1-carboxamidina clorhidrat, în prezență de N,N-diisopropiletilamina. Raportul dintre reactanți a fost ROT-PEI : G = 1:27, astfel încât fiecărei molecule de PEI să-i corespundă un rest de guanidină. Scopul guanidilării l-a constituit creșterea ratei transfecției datorită proprietăților de a facilita internalizarea celulară pe calea translocării directe, nu prin endocitoză.

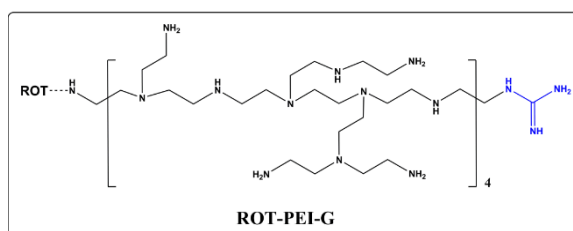


Figura 4. Reprezentarea schematică a structurii ROT-PEI-G. Se păstrează aceeași structură de rotaxan, în figură se evidențiază doar modul de legare a guanidinei de PEI

c) Au fost inmultite plasmide codificatoare pentru apoAI, apoAII si IL-10

Pentru obtinerea plasmidelor codificatoare pentru apoAI, apoAII si IL-10, secventele cDNA pentru apoAI, apoAII si IL-10 au fost clonate in vectorii de clonare pcDNA3.1, pcDNA3.1-DYK si pcDNA3.1-EGFP. Eficienta clonarilor a fost verificata prin digestie enzimatica. De exemplu, plasmidele care contin IL-10 clonata in pcDNA3.1, pcDNA3.1-DYK si pcDNA3.1-EGFP au fost testate cu enzimele de restrictie SalI/EcoRI si ClaI/SpeI. Gelul de electroforeza pentru verificare este redat in figura urmatoare.

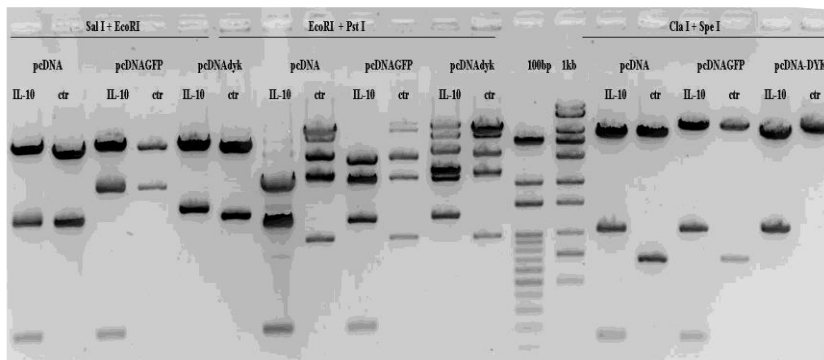


Figura 5. Testarea plasmidelor care contin IL-10 clonata in pcDNA3.1, pcDNA3.1-DYK si pcDNA3.1-EGFP. Se observa diferentele dintre benzile obtinute de la digestia plasmidelor cu IL-10 si a vectorilor fara insert (control).

d) Testarea *in vitro* a compusilor CORE-PEI si CORE-PEI-R pe diferite linii celulare pentru evaluarea citotoxicitatii si a randamentului de transfectie

A fost evaluata citotoxicitatea compusilor ROT-PEI si ROT-PEI-G folosind celulele AD293 cu ajutorul a doua metode, folosind testul colorimetric XTT bazat pe formazan si kit-ul de citotoxicitate ToxiLight. Metoda ToxiLight se bazează pe măsurarea bioluminescentă a activității adenilat kinazei (AK), prezentă în toate celulele. Pierderea integrității membranei celulare determină eliberarea AK în mediul în care acestea sunt cultivate. Astfel se poate determina citotoxicitatea prin măsurarea nivelului de adenilat kinază eliberată.

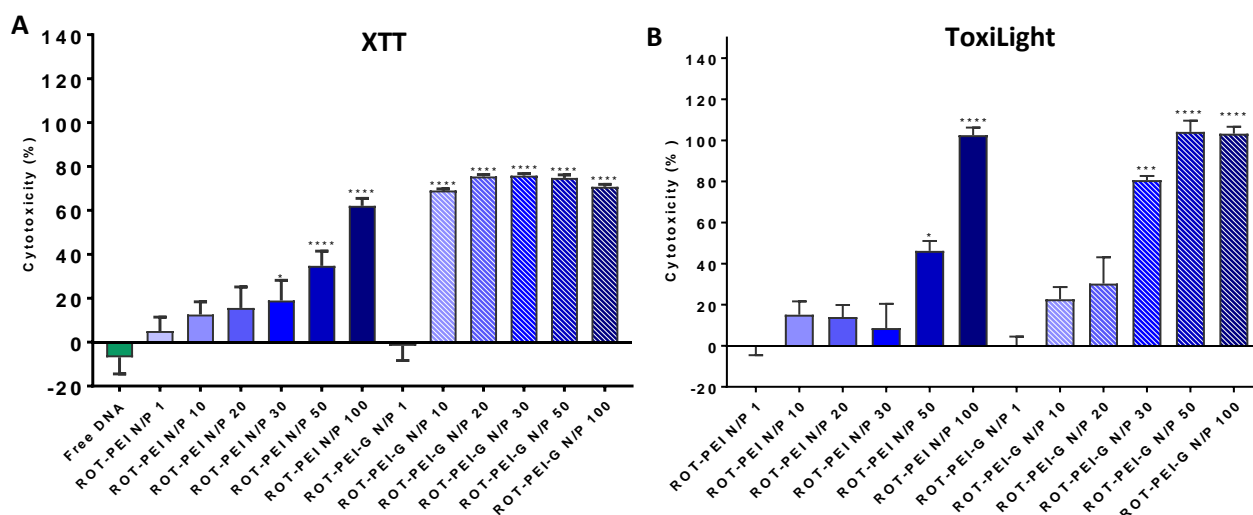


Figura 6. Efectul citotoxic al poliplexelor ROT-PEI/pDNA si ROT-PEI-G/pDNA la diferite raporturi N/P asupra celulelor AD293. *, ***, **** $p < 0.05, 0.001, 0.0001$ versus control.

Rezultatele experimentelor de transfectie au demonstrat capacitatea compusilor „ROT-PEI” si „ROT-PEI-G” de a realiza in mod eficient transfectia cu ADN a celulelor AD293. Asa cum se observa in figura de mai jos, randamentul de transfectie al celulelor a crescut cu cresterea raportului N/P. Randamente foarte mici de transfectie au fost obtinute la rapoartele N/P 1:1 si N/P 1:10, caz in care activitatea luciferazei a fost sub 60.000 unitati relative de luminiscenta. In cazul rapoartelor N/P 1:20 si 1:30, au fost obtinute randamente medii de transfectie, activitatea luciferazei fiind cuprinsa intre 6.800.000-2.500.000 unitati relative de luminiscenta. Randamente foarte mari de transfectie au fost obtinute in cazul in care celulele au fost transfectate cu compusii mentionati mai sus in raport N/P 1:50 si 1:100, activitatea luciferazei fiind cuprinsa intre 27.000.000-29.000.000 unitati relative de luminiscenta.

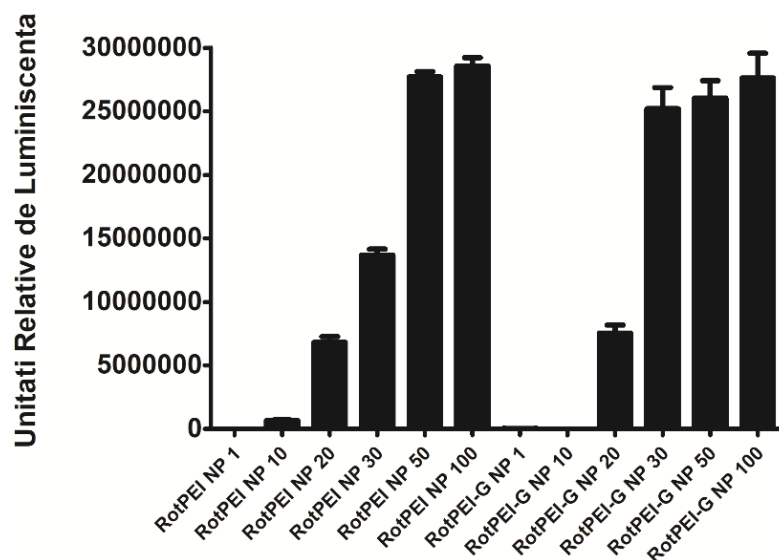


Figura 7. Determinarea activitatii luciferazei dupa transfectia celulelor AD293 cu compusii formati din „ROT-PEI” sau „ROT-PEI-G” si plasmida pGL3-CMV-LUC.

DISEMINARE INTERA-4 2019:

► 5 Participari la manifestari stiintifice nationale/internationale

● Participari la manifestari stiintifice nationale:

1) Laura G. Moise, Lavinia E. Tudor, Violeta G. Trusca, Anca V. Gafencu, “Interleukin-10 signal sequence cloned in front of the luciferase drives the reporter protein secretion”, Simpozion aniversar IBPC “Nicolae Simionescu”- “O calatorie fascinanta de 40 de ani pentru descoperirea secretelor celulei in beneficiul sanatatii omului”, 19-20 septembrie 2019, - **Poster**.

2) Lavinia E. Tudor, Laura G. Moise, Violeta G. Trusca, Gheorghe Fundueanu, Sanda Bucatariu, Maya Simionescu, Anca V. Gafencu, “The secretory potential of interleukin-10 by the encapsulated endothelial cells”, Simpozion aniversar IBPC “Nicolae Simionescu”- “O calatorie fascinanta de 40 de ani pentru descoperirea secretelor celulei in beneficiul sanatatii omului”, 19-20 septembrie 2019, **Poster**.

● Participari la manifestari stiintifice internationale:

1) Lavinia E. Tudor, Laura G. Moise, Violeta G. Trusca, Gheorghe Fundueanu, Sanda Bucatariu, Maya Simionescu, Anca V. Gafencu, The **secretory** potential of interleukin-10

by the encapsulated endothelial cells, “Al 11-lea Congres National cu Participare Internaționala și a 37-a Sesiune Științifică Anuală a Societății Române de Biologie Celulară”, Constanta, Romania- **Poster**.

2) Laura G. Moise, Lavinia E. Tudor, Violeta G. Trusca, Maya Simionescu, Anca V. Gafencu, The addition of the signal sequence of interleukin-10 to the luciferase drives the reporter protein secretion, “Al 11-lea Congres National cu Participare Internaționala și a 37-a Sesiune Științifică Anuală a Societății Române de Biologie Celulară”, Constanta, Romania- **Poster**.

3) Hemp-extracted cannabidiol: Activation and in vitro anticancer effect; A.R. Petrovici, N. Simionescu, V. Paraschiv, M. Pinteala, M. Silion; 2nd Food Chemistry Conference: Shaping the Future of Food Quality, Safety, Nutrition and Health; Seville, Spain, 17-19 September, 2019- **Poster**.

4) Cristina Ana Constantinescu, Daniela Rebleanu, Geanina Voicu, Mariana Deleanu, Ileana Manduteanu, Virginie Escriou, Maya Simionescu, Manuela Calin, Simulated blood flow to study interaction specificity of P-selectin targeted nanocarriers in vitro, “JRC Summer School on Non-Animal Approaches in Science. Challenges and future directions”, Ispra, Italia, 21-24 mai, 2019-**Poster**.

► **Articole publicate in reviste ISI**

1) Trusca VG, Fuior EV, Kardassis D, Simionescu M, Gafencu AV, The Opposite Effect of c-Jun Transcription Factor on Apolipoprotein E Gene Regulation in Hepatocytes and Macrophages, *Int J Mol Sci.* 2019 Mar 23;20(6). pii: E1471. doi: 10.3390/ijms20061471. PubMed PMID: 30909560; *International Journal of Molecular Sciences – (Factor de Impact: 4.3)*

2) Duodenoscope-associated infections beyond the elevator channel: alternative causes for difficult reprocessing; G.G. Balan, I. Rosca, E.-L. Ursu, A. Fifere, C.-D. Varganici, F. Doroftei, I.-A. Turin-Moleavin, V. Sandru, G. Constantinescu, D. Timofte, G. Stefanescu, A. Trifan, C.V. Sfarti; *Molecules* 24, 2343 (2019)

3) Moraru AC, Rosca I, Craciun B, Nicolescu A, ChiriacAE, Voicu V, 2019. Insights of the antimicrobial activity of piperine extracted from *Piper nigrum* L, *Farmacia* (IF 1,528)-acceptat spre publicare.

4) Violeta G. Trusca, Madalina Dumitrescu, Ioana M. Fenyo, Irina F. Tudorache, Maya Simionescu and Anca V. Gafencu, The mechanism of Bisphenol A atherogenicity involves apolipoprotein A-I downregulation through NF-κB activation. *Lucrarea este trimisa spre publicare la International Journal of Molecular Sciences – (Factor de Impact: 4.3)*

CONCLUZII:

Obiectivul etapei 2 a proiectului P4-INTERA a fost indeplinit in totalitate. Au fost indepliniți toți indicatorii de realizare propusi, si anume: **1 raport experimental** de testare in vitro a randamentului de transfectie a NPM-PEI, **1 raport de sinteza** pentru functionalizarea agentilor de transfectie CORE-PEI cu diferite molecule pentru: penetrare membrana/nucleara, recunoastere celulara, cresterea biocompatibilitatii, CORE-PEI-R, **3 plasmide** codificatoare pentru ApoAI, ApoAII și IL-10 amplificate, **1 protocol de obtinere** a complexelor CORE-PEI și a CORE-PEI-R cu acizi nucleici, **1 raport de biocompatibilitate si randament de transfectie** a compusilor CORE-PEI și CORE-PEI-R, **diseminarea rezultatelor** prin participarea cu lucrari la **5 Conferinte Nationale (2 postere)** și **Internationale (4 postere)**, **publicarea a doua articole** in reviste cotate ISI, **1 articol acceptat** spre publicare in revista ISI și **1 articol trimis** spre publicare.