

RAPORT ȘTIINȚIFIC FINAL

Privind implementarea proiectului de cercetare cu titlul “Noi structuri peptidice cu potențiale aplicații în terapia țintită și diagnosticul timpuriu în cancer/ New peptides for targeted cancer therapy and early diagnosis”, acronim THERHOME, cod proiect PN-III-P1-1.1-TE-2021-0331, contract de finanțare nr. TE 63/2022, pentru toate etapele de execuție (2022-2024).

În acest proiect ne-am propus să dezvoltăm și să caracterizăm peptide penetrante cu un grad ridicat de permeabilizare a membranei celulare și specificitate pentru receptori supraexpresați în celule tumorale. Aceste structuri peptidice au potențial pentru dezvoltarea de terapii inovative pentru aplicații în livrarea țintită de medicamente sau agenți imagistici.

Obiectivele și activitățile prevăzute în acest proiect au fost:

Obiectiv 1: Selecția peptidelor homing, penetrante și antimicrobiene, proiectarea noilor structuri peptidice cu proprietăți penetrante și de selecție îmbunătățite.

O1.A1. Selecția peptidelor homing cu specificitate pentru receptori ai celulelor canceroase și construcția noilor molecule peptidice cu structuri penetrante sau antimicrobiene.

O1.A2. Sinteza și marcarea fluorescentă a noilor peptide cu fluorofori adecvați.

Obiectiv 2: Studiul proprietăților penetrante și verificarea specificității noilor peptide pentru receptori ai celulelor canceroase.

O2.A1. Prepararea membranelor model care mimează membrane celulelor normale, canceroase și a endozomilor.

O2.A2. Investigarea acumulării și/sau internalizării în membranele model a peptidelor marcate fluorescent.

O2.A3. Influența pH-ului asupra internalizării și procesului de formare de pori.

O2.A4. Rolul moleculelor tip „cargo” în translocarea peptidelor.

O2.A5. Reconstituirea receptorilor celulelor canceroase în proteoliposomi și fuzionarea cu membranele biomimetice.

O2.A6. Determinarea selectivității noilor peptide pentru receptorii celulelor canceroase.

Obiectiv 3: Investigarea interacțiunilor moleculare ale peptidelor selectate cu proteine incipiente ale căilor mecanosenzitive ale migrației celulare/aderențe focale incipiente (nascente).

O3.A1. Expresia și purificarea proteinelor recombinante utilizate în cadrul proiectului.

O3.A2. Investigarea efectului peptidelor asupra cineticii de polimerizare și/sau depolimerizare a actinei.

O3.A3. Investigarea rolului peptidelor asupra activității proteinelor din căile mecanosenzitive ale migrației celulare.

Obiectiv 4: Coroborarea rezultatelor obținute pentru activitatea peptidelor în vederea optimizării structurilor peptidice sau proiectării unor noi molecule eficiente, cu proprietăți penetrante îmbunătățite și specificitate ridicată pentru receptorii celulelor canceroase

În acest proiect am reușit să îndeplinim **toate** obiectivele pe care le-am propus și să demonstrăm că am proiectat, sintetizat și caracterizat peptide penetrante *homing* care au afinitate ridicată pentru receptori de tip integrină și neuropilină 1 și astfel au potențial ridicat pentru terapia țintită.

Cancerul reprezintă una dintre bolile cu impact semnificativ asupra sănătății, fiind a doua cauză de deces după afecțiunile cardiovasculare. Deși rata de supraviețuire depinde de mai mulți factori, precum tipul de cancer, alegerea tratamentului sau alte boli asociate, apariția metastazelor reprezintă principala cauză de eșec a tratamentului în cancer. Prin urmare, dezvoltarea unor terapii care să acționeze țintit, cu efecte secundare minime, care să identifice celulele tumorale în stadii incipiente ale metastazelor, reprezintă o condiție esențială pentru progresul medicinei, succesul tratamentului și rate de supraviețuire mai bune.

Terapia țintită cu peptide este o strategie terapeutică care vizează receptorii celulelor canceroase și utilizează peptidele penetrante și de tip *homing* (care au selectivitate pentru un anumit receptor) ca vectori pentru livrarea de agenți terapeutici și imagistici. Spre deosebire de metodele clasice de terapie, precum radioterapia sau chimioterapia, terapia țintită nu acționează asupra tuturor celulelor organismului ci în mod foarte selectiv, la nivelul celulelor canceroase. În acest fel, efectele secundare asociate cu terapiile clasice sunt mult diminuate iar avantajele sunt

evidente: selectivitate superioară, eficiență crescută, reducerea rezistenței la medicamente și a toxicității.

În cursul **primei etape**, am studiat proprietățile penetrante ale peptidelor în membrane biomimetice. Peptidele selectate au fost HIV1-TAT (secvența: YGRKKRRQRRR), RGD (Arg-Gly-Asp), NKCS (KILRGVSKKIMRTFLRRISKDILTGK) și NKCS-[15-27] (LRRISKDILTGKK). **HIV1-TAT** este o peptidă penetrantă, izolată așa cum îi spune și numele, din proteina HIV1-TAT (trans-acting activator of transcription) derivată din virusul imunodeficienței umane. **NKCS** este o peptidă antimicrobiană derivată din peptida NK-2, izolată din intestinul porcinelor. Aceasta este o peptidă eficientă împotriva bacteriilor gram-pozitive și gram-negative dar și cu efect asupra unor afecțiuni canceroase de tipul limfom, cancer colorectal, leucemie, neuroblastom¹. **NKCS-[15-27]** este o nouă peptidă antimicrobiană folosită în studiu și corespunde regiunii 15-27 de la capătul terminal C al peptidei NKCS. Ca peptidă *homing* am ales RGD (Arg-Gly-Asp) care recunoaște și leagă receptorii integrină $\alpha_v\beta_3$ și $\alpha_v\beta_5$ supraexpresați în celulele tumorale. Peptida **RGD-TAT** (GRGDSPKYGRKKRRQRRR) este o structură nouă, o moleculă chimeră a peptidei homing RGD și a peptidei penetrante HIV1-TAT.

Pentru studiul proprietăților penetrante ale peptidelor, am folosit ca sistem biomimetic pentru membrana celulară a celulelor normale și canceroase, veziculele unilamelare gigant (GUVs) întrucât dimensiunile lor ($\geq 5 \mu\text{m}$) permit observarea microscopică. Lipidele utilizate pentru a genera GUV-uri au fost alese în funcție de compoziția membranei celulare iar metoda de obținere a acestora a fost cea a electroformării descrisă de Angelova *et al.*²

Compoziția lipidică a membranelor diferă în funcție de linia celulară, de organele celulare și din acest motiv este necesară alegerea cât mai fidelă a componentelor pentru a mima diverse tipuri de membrane. Fosfatidilcolina (PC) este o fosfolipidă care se găsește în membranele celulelor eucariote, de obicei în stratul extern al membranei. Este o moleculă neutră și în acest studiu am folosit-o pentru a mima membranele celulare normale. Fosfatidiletanolamina (PE) este o altă componentă esențială a membranelor celulare. Este o moleculă zwitterionică, dar spre deosebire de PC care are o structură cilindrică, aceasta are o formă conică, cu tendință de a forma structuri lipidice de tipul micelilor inversate. Fosfatidilserina (PS) este o fosfolipidă negativă și se găsește într-o cantitate redusă în celulele

¹Karmakar S, Maity P, Halder A. *Charge-Driven Interaction of Antimicrobial Peptide NK-2 with Phospholipid Membranes*. ACS Omega. 2017 Dec 31;2(12):8859-8867. doi: 10.1021/acsomega.7b01222.

²Angelova, M.I., Dimitrov, D.S., *Liposome electroformation*. Faraday Discuss. Chem. Soc. , 1986. 81: p. 303-311

normale, de obicei pe stratul intern al membranelor. În schimb, în celulele canceroase, se găsește într-o proporție mai mare în stratul extern. Această fosfolipidă a fost folosită pentru a mima celulele canceroase. Colesterolul (Chol) este o componentă importantă a membranei, de tipul sterolilor, cu rol în permeabilitatea și stabilitatea celulară. În timp ce în celulele normale colesterolul este vital în menținerea integrității structurale a membranelor și pentru diverse funcții biologice, unele forme de cancer au fost asociate cu cantități ridicate de colesterol prezente în membrane sub formă de insule, faze separate de tip raft (cancer ovarian, de sân, cervical, tiroidian, de prostată sau metastatic)³. La concentrații mari de colesterol, fluiditatea membranelor scade și sunt mai puțin permeabile.

Investigarea acumulării și/sau internalizării în membranele model a peptidelor marcate fluorescent s-a efectuat cu ajutorul microscopiei confocale, o tehnică de analiză de înaltă precizie. Microscopia confocală de scanare utilizată în studiile noastre, față de microscopia clasică de fluorescență are o serie de avantaje: posibilitatea de a observa proba într-un anumit plan focal de o grosime determinată cu rezoluție superioară, eliminarea informației de deasupra și dedesubtul planului focal pentru o rezoluție superioară, posibilitatea de a înregistra imagini succesive pe axa Z și reconstituirea lor în imagini 3D. Microscopul confocal inversat Nikon Ti-E a fost utilizat pentru a urmări interacțiunea peptidelor cu sistemele lipidice biomimetice de tipul lipozomilor gigant (GUVs).

În **membrane neutre** compuse din POPC și colesterol, cele patru peptide nu s-au internalizat iar în cazul peptidelor TAT și RGD-TAT s-a observat și o ușoară acumulare pe membrane (Figura 1). În membranele care conțin POPE în schimb, s-a înregistrat internalizarea celor patru peptide. Eliberarea fluoroforului Alexa Fluor 488 (tracer pentru punerea în evidență a porilor) a fost observată pentru peptidele TAT, NKCS și RGD-TAT dar nu și pentru NKCS-[15-27], sugerând că doar primele trei peptide pot genera pori în astfel de membrane (Figura 2).

³Mayengbam, S.S., et al., *Influence of cholesterol on cancer progression and therapy*. Transl Oncol, 2021. **14**(6): p. 101043

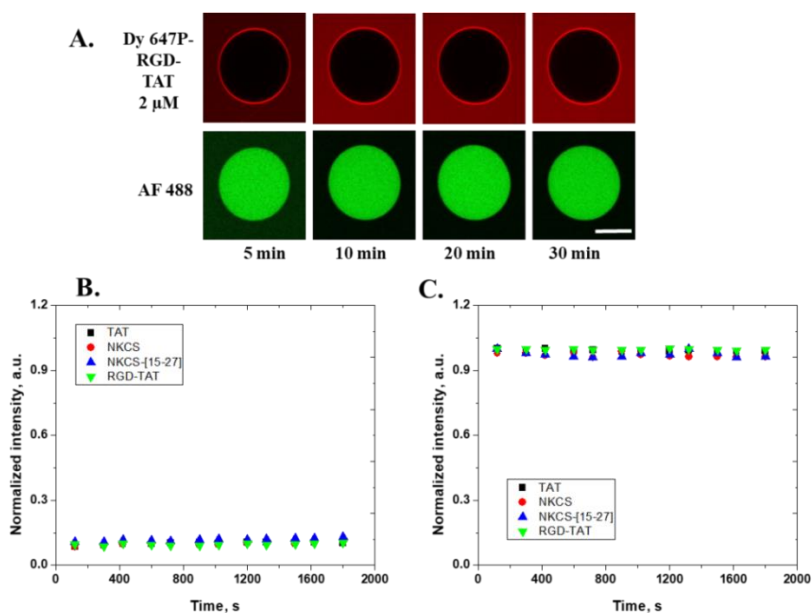


Figura 1: Interacțiunea peptidelor cu GUVs neutre (POPC/Chol 80/20 mol%). Internalizarea peptidelor RGD-TAT (A). Graficele arată că internalizarea peptidei RGD-TAT (B) și eliberarea fluoroforului Alexa Fluor 488 (C) nu se realizează în aceste membrane: ■. TAT; ●. NKCS; ▲. NKCS-15-27; ▼. RGD-TAT. Scala 20 μ m.

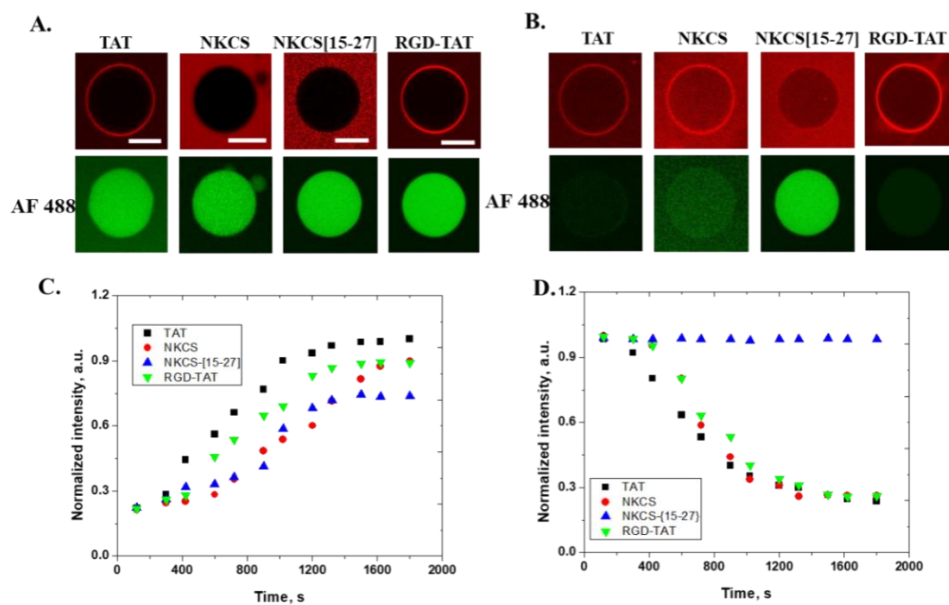


Figura 2: Interacțiunea peptidelor cu GUVs neutre (POPC/POPE/Chol 50/30/20 mol%). Internalizarea peptidelor și eliberarea AF 488 la (A) 5 min și (B) 30 min. Graficele arată internalizarea peptidelor (C) și eliberarea fluoroforului Alexa Fluor 488 (D) în aceste membrane: ■. TAT; ●. NKCS; ▲. NKCS-15-27; ▼. RGD-TAT. Scala 20 μ m.

În GUVs **anionice** care conțin POPS efectele peptidelor asupra membranelor au fost similare cu POPE, dar suplimentar, s-a observat și o acumulare mai puternică a celor patru peptide pe membrane, cel mai probabil datorită interacțiunilor electrostatice (Figura 3).

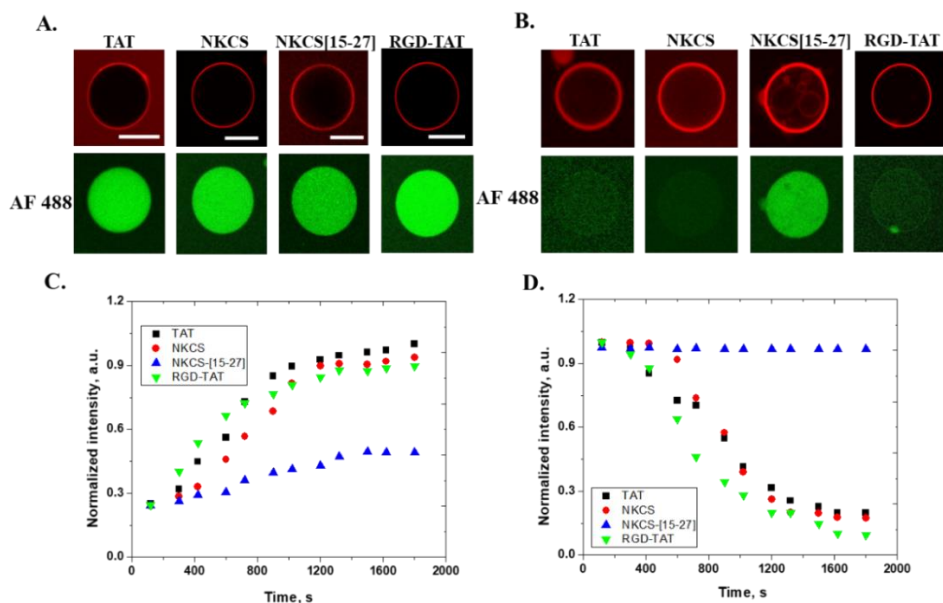


Figura 3: Interacțiunea peptidelor cu GUVs anionice (POPC/POPS/CHOL 50/30/20 mol%). Internalizarea peptidelor și eliberarea AF 488 la (A) 5 min și (B) 30 min. Graficele arată internalizarea peptidelor (C) și eliberarea fluoroforului Alexa Fluor 488 (D) în aceste membrane: ■. TAT; ●. NKCS; ▲. NKCS-15-27; ▼. RGD-TAT. Scala 20 μ m.

În **etapa a doua** a proiectului am selectat pentru studii peptida **RGD-TAT** (GRGDSPKYGRKKRRQRRR) care are atât proprietăți penetrante cât și homing și s-a dovedit a fi cea mai eficientă dintre peptidele testate.

De cele mai multe ori, când un medicament este internalizat prin endocitoză, se acumulează în endozomi. Pentru a-și exercita activitatea biologică și să-și atingă ținta este nevoie să fie eliberat și nu să fie digerat sau degradat în lizozomi. Prin urmare, peptidele penetrante care formează pori, inclusiv în endozomi și la pH 5,5 sunt eficiente în a asigura eliberarea moleculelor active și pot fi utilizate în sistemele cu eliberare țintită.

Endozomii timpurii iau naștere în urma procesului de endocitoză prin invaginări ale membranei plasmactice, prin urmare și compoziția lor lipidică este similară cu a acestora. Maturarea în endozomi tardivi este urmată de o scădere a nivelului de steroli și o creștere a lipidelor încărcate negativ, precum PS. În endozomi, compoziția lipidică se inversează, astfel că lipidele zwitterionice se găsesc în stratul intern și cele negative în stratul extern al membranei. Dacă în celulele normale, pH-ul citoplasmic este în jur de 7, în endozomi variază de la 6.5 pentru

endozomii timpurii, la 5.5 pentru endozomii tardivi⁴. De asemenea, în celulele canceroase pH-ul este mai acid decât în celulele normale și are valoarea 6.5.

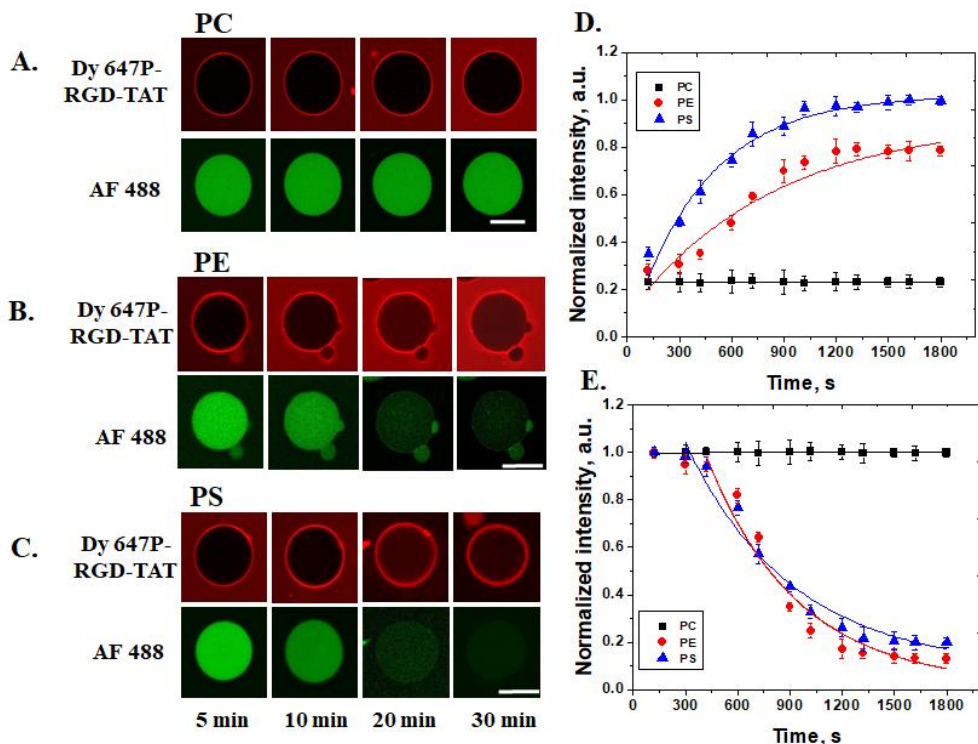


Figura 4: Internalizarea peptidei RGD-TAT marcată cu DY647 și eliberarea fluoroforului Alexa Fluor 488 la pH 5.5. A. Acumularea peptidei pe GUVs ce conțin PC/chol 90/10 mol%. B. Acumularea și internalizarea peptidei respectiv eliberarea Alexa Fluor 488 în membrane PC/PE/chol 60/30/10. C. Acumularea și internalizarea peptidei respectiv eliberarea Alexa Fluor 488 în membrane PC/PS/chol 60/30/10. Graficul din dreapta arată intensitatea fluorescenței peptidei normalizată, măsurată în interiorul GUV (D) și eliberarea fluoroforului (E) pentru PC (■), PE (●) and PS (▲). Scala 20 μ m.

Experimentele au vizat studiul **eficienței de penetrare** a membranei lipidice a peptidei RGD-TAT la pH 5,5 în GUVs ce conțin PC, PE, PS și 10 mol% colesterol pentru a mima endozomii. Similar cu rezultatele observate la pH 7,5, RGD-TAT se acumulează și formează pori în GUVs care conțin 30 mol% PS sau 30 mol% PE. De asemenea am observat eliberarea de fluorofor Alexa Fluor 488, sugerând formarea de pori și la pH scăzut (Figura 4).

⁴ Scott, C. C., F. Vacca and J. Gruenberg (2014). "Endosome maturation, transport and functions." *Semin Cell Dev Biol* **31**: 2-10

În continuare am determinat ratele de internalizare ale peptidei RGD-TAT în membranele ce conțin PE și PS, respectiv ratele de eliberare ale Alexa Fluor 488 și am observat că sunt ușor mai ridicate comparativ cu pH 7,5 (Tabelul 1).

Tabelul 1: Ratele de internalizare a peptidei și eliberare a Alexa Fluor 488 la pH 5,5 și 7,5.

Membrana	RGD- TAT pH 5,5		RGD- TAT pH 7,5	
	K_{int}	K_{eff}	K_{int}	K_{eff}
DOPC/chol	-	-	-	-
DOPC/DOPE/chol	$(1.22 \pm 0.39) \times 10^{-3}$	$(1.08 \pm 0.06) \times 10^{-3}$	$(1.12 \pm 0.34) \times 10^{-3}$	$(0.76 \pm 0.04) \times 10^{-3}$
DOPC/DOPS/chol	$(2.34 \pm 0.21) \times 10^{-3}$	$(1.15 \pm 0.08) \times 10^{-3}$	$(2.19 \pm 0.36) \times 10^{-3}$	$(1.08 \pm 0.06) \times 10^{-3}$

Acumularea peptidelor pe membrana lipidică reprezintă primul pas în activitatea de permeabilizare a acesteia și internalizarea peptidelor. Un studiu comparativ între peptidele RGD-TAT și TAT poate oferi indicații despre eficiența primei peptide. Astfel, am analizat intensitatea fluorescenței peptidelor pe membrane după 30 minute de incubare, la aceeași intensitate a laserului. Am evaluat intensitatea cu Fiji Image J⁵ și am observat o acumulare mai intensă a peptidei RGD-TAT pe membranele PC și PE decât a peptidei TAT (Figura 5). În membranele anionice PS, efectul a fost invers. Acest efect se poate datora numărului mai mare de grupări guanidinium ale aminoacidului arginină care este esențial pentru internalizare. Peptidele cu un conținut mare de arginine interacționează preferențial cu lipida anionică PS iar grupările guanidinium formează punți de hidrogen bidentate cu grupările fosfat. Ca urmare, peptida RGD-TAT se internalizează mai rapid decât TAT.

Următoarele experimente au urmărit înțelegerea rolului pe care peptidele RGD-TAT îl joacă în internalizarea moleculelor de tip "cargo". Pentru aceasta, am folosit peptida RGD-TAT conjugată cu biotină. Molecula de tip cargo utilizată a fost streptavidina marcată fluorescent cu Alexa Fluor 546. Cele trei tipuri de membrane, DOPC/Chol 80/20 mol%, DOPC/DOPE/Chol 50/30/20 mol% și DOPC/DOPS/Chol 50/30/20 mol% au fost incubate cu 2 μM Biotin-RGD-TAT și Streptavidin-AF546. S-a observat o ușoară acumulare pe membranele cu PC/Chol 80/20 mol%. În GUVs cu 30% PE sau PS, complexul peptidă-cargo se acumulează pe membrane, fără

⁵ J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J. Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona, *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*, Nat Methods **2012**, 9, 676-682

internalizare (Figura 6). Putem concluziona că peptida RGD-TAT poate fi folosită pentru a livra molecule mici, de tipul fluoroforului Dy 647, dar nu pentru molecule mari cum este streptavidina.

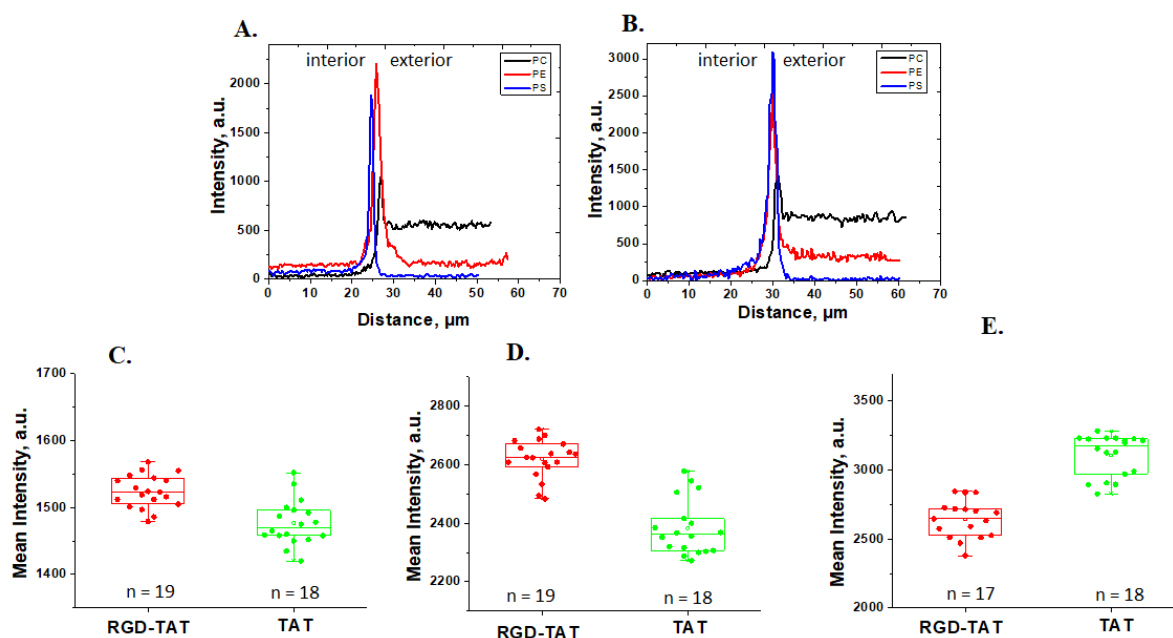


Figura 5. Intensitatea fluorescenței peptidei în GUVs. Profilul fluorescenței din centrul GUV spre exterior, după 30 min (A) pentru RGD-TAT și (B) pentru TAT. Acumularea peptidelor RGD-TAT și TAT pe membrane ce conțin DOPC/chol 80/20 mol% (C), DOPC/DOPE/Chol 50/30/20 mol% (D) și DOPC/DOPS/Chol 50/30/20 mol% (E).

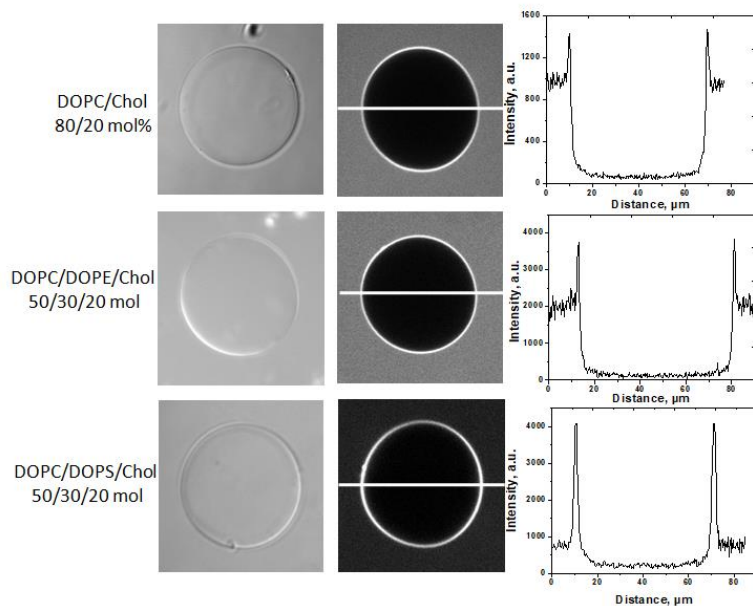


Figura 6: Acumularea complexului Biotin-RGD-TAT-streptavidin-AF546 (peptidă-cargo) în GUVs ce conțin DOPC/Chol 80/20 mol%, DOPC/DOPE/Chol 50/30/20 mol% și DOPC/DOPS/Chol 50/30/20 mol% după 30 min. În stânga se observa membranele vizualizate cu DIC (Differential Interference Contrast). Complexul nu se internalizează în GUVs, doar se acumulează pe membrana. În dreapta se poate observa intensitatea fluorescenței complexului Biotin-RGD-TAT-streptavidin-AF546 de-a lungul liniei mediane din imaginea din stânga.

Tot in etapa a doua, am determinat și selectivitatea peptidei RGD-TAT pentru receptorii integrină și neuropilină 1. Integrina reconstituită în GUVs după o procedură dezvoltată de ⁶ a fost obținută din trombocite umane (integrină $\alpha\text{IIb}\beta 3$) de către colaboratorii de la Institute for Integrative Biology of the Cell (IB4C), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Gif-sur-Yvette, France. Integrina a fost marcată fluorescent cu Alexa Fluor 546 sau Alexa Fluor 488 iar prezența acesteia în membrană a fost vizualizată prin microscopie confocală. Pentru efectuarea experimentelor ce urmăresc a pune în evidență co-localizarea peptidei și a integrinei, am folosit soluție tampon cu MnCl_2 pentru activarea integrinei iar ca membrane biomimetice, bistraturi lipidice pe suport. Acestea au fost generate prin fuzionarea proteolipizomilor depozitați pe o lamelă de sticlă proaspăt curățată pentru a îndepărta eventualele contaminări. Ca urmare a interacțiunilor electrostatice ale capetelor lipidice și suprafața de sticlă hidrofilă, proteolipozomii se atașează de suprafață sub formă de bistraturi în decurs de câteva minute. Lipozomii care nu au fuzionat au fost spălați cu soluție tampon HEPES-glucoză. În acest caz, membrana lipidică a fost marcată fluorescent cu DOPE-TAMRA, iar integrina cu Alexa Fluor 488. Peptida marcată cu Dy 647P a fost adăugată la o concentrație foarte redusă, de 1nM, pentru a fi posibilă observarea clusterurilor individuali de integrină, respectiv a peptidei RGD-TAT (Figura 7).

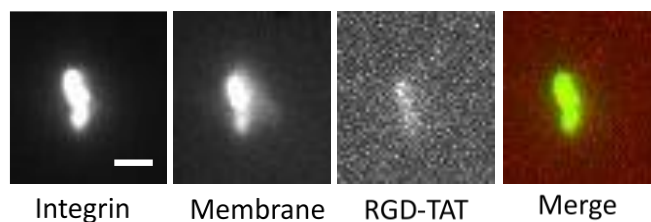


Figura 7: Co-localizarea peptidei RGD-TAT și a integrinei. Receptorul integrină este marcat fluorescent cu Alexa Fluor 488, membrana lipidică cu DOPE-TAMRA iar peptida cu Dy 647P. Scala 2 μm .

Următorul experiment a urmărit determinarea rolului integrinei în internalizarea peptidei. Am adăugat 2 μM de RGD-TAT respectiv TAT peste integrin-GUVs și am observant că internalizarea peptidei RGD-TAT este mult mai rapidă, cu o valoare a ratei de internalizare de $(1.98 \pm 0.02) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ comparativ cu $(0.65 \pm 0.03) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ pentru peptida TAT. De asemenea,

⁶Rigaud JL, Lévy D. Reconstitution of membrane proteins into liposomes. *Methods Enzymol.* 2003;372:65-86. doi: 10.1016/S0076-6879(03)72004-7. PMID: 14610807.

am observat că peptida RGD-TAT nu se acumulează pe membrane cu integrină, spre deosebire de TAT sau de membranele fără integrină (Figura 8).

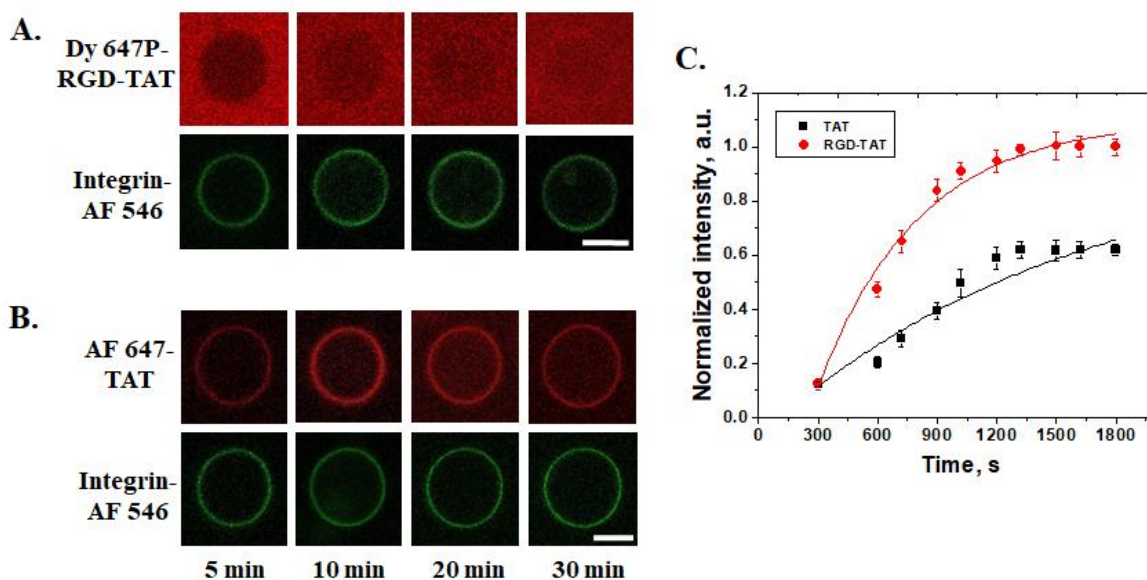


Figura 8: Internalizarea peptidei RGD-TAT în integrin-GUVs. A. Internalizarea peptidei RGD-TAT în GUVs marcate fluorescent cu Alexa Fluor 546. B. Internalizarea peptidei TAT în GUVs. C. Intensitatea fluorescenței peptidelor măsurată în interiorul GUVs pentru determinarea eficienței internalizării.

În continuare, am efectuat experimente pentru a determina efectul peptidei RGD-TAT asupra polimerizării actinei și în special a prezenței unui efect inhibitor. Actina este o proteină structurală care se găsește în celulele eucariote, fiind esențială pentru funcționarea lor corectă. Este una dintre cele două proteine principale care alcătuiesc citoscheletul, cealaltă fiind miozina. Citoscheletul este responsabil pentru menținerea formei celulare, pentru mișcarea celulelor și pentru diviziunea celulară. Actina există sub două forme principale în celule: actina G (globulară) și actina F (filamentoasă sau fibroasă). Actina G este monomerul de actină, iar actina F este forma polimerizată a acesteia, în care monomerii de actină G sunt asamblați în microfilamente. Aceste două forme sunt în echilibru dinamic și sunt reglate de o serie de proteine care controlează polimerizarea și depolimerizarea actinei, precum și interacțiunile cu alte proteine implicate în funcțiile celulare. Pentru studiul nostru am folosit actina G. Am observat polimerizarea actinei (Figura 9.A.) în absența peptidei (control). În următorul experiment am

adăugat o proteină cu efect inhibitor asupra polimerizării actinei, domeniul F2F3 al talinei pentru control pozitiv (Figura 11.B.) și apoi am verificat peptida RGD-TAT (Figura 9.C.).

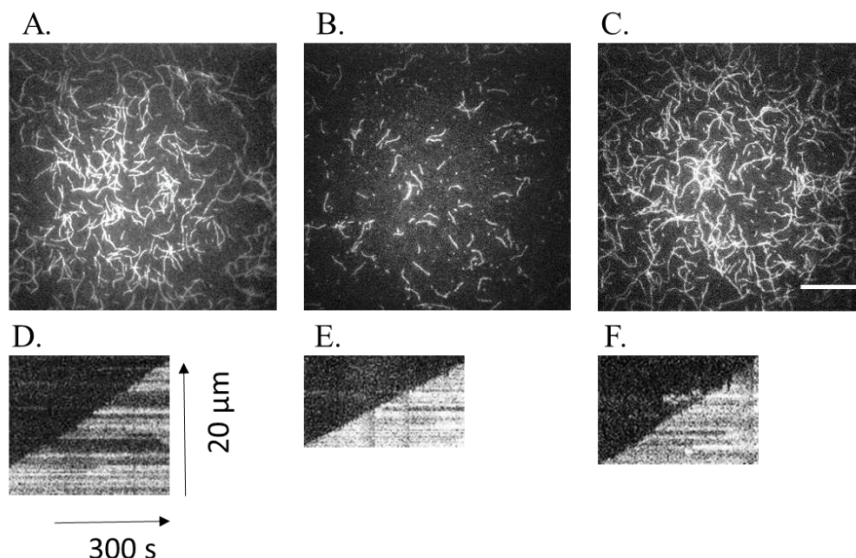


Figura 9: Filamente de actină polimerizată observate în TIRF. A. Control, B. În prezența F2F3 și c. RGD-TAT. Scala 10 μm . D, E, F. Kimograf corespunzător filamentelor de actină măsurat de-a lungul unui filament de actină în timpul unui film ce înregistrează fluorescența corespunzătoare polimerizării filamentelor de actină în situațiile A B, C. Scala 15 μm .

Am observat ca peptida nu are niciun efect asupra polimerizării actinei. Măsurând viteza de polimerizare a actinei în experimentul control dar și în situațiile B. și C. Am constatat ca $v_{\text{actina}}=0,7$, $v_{\text{F2F3}}=0,4$ iar $v_{\text{RGD-TAT}}= 0,7$ (Figura 8, D, E, F.), deci peptida RGD-TAT nu influențează activitatea de polimerizare actinei.

În cea de-a **treia etapă** a proiectului am continuat studiul folosind peptida **RGD-TAT** atât varianta liniară a acestei peptide (TAMRA-GRGDSPKYGRKKRRQRRR) cât și pe cea ciclică (cycloRGDfK-TAMRA-YGRKKRRQRRR-COOH). Aceste peptide au afinitate pentru receptorii integrină și neuropilină. Integrinele sunt o familie de proteine transmembranare implicate în interacțiunile celulă-celulă și celulă-matrice extracelulară. Acestea sunt compuse din două subunități, alfa și beta, care formează heterodimeri funcționali. În total, există peste 20 de combinații posibile de subunități alfa și beta, ceea ce conferă o diversitate mare a integrinelor și

funcțiilor lor în organism⁷. Integrinele sunt implicate într-o varietate de procese fiziologice și patologice, inclusiv în dezvoltarea organismului, în răspunsurile imune, în inflamație, în formarea și metastaza cancerului și în boli autoimune. Neuropilina 1 (NRP1) este o proteină transmembranară implicată în diverse procese biologice, inclusiv dezvoltarea nervoasă, angieneză (formarea de noi vase de sânge) și răspunsul imun. Această proteină este exprimată pe suprafața celulelor și are multiple funcții, fiind implicată în interacțiunea cu diverse molecule de semnalizare iar în context patologic este supraexprimată în cancer⁸.

Migrația celulară este un proces esențial în dezvoltarea organismelor, în vindecarea rănilor, în răspunsul imun al organismului și în multe alte procese fiziologice sau patologice. În contextul unor procese patologice, putem exemplifica metastaza în cancer, unde celulele canceroase se deplasează de la un organ la altul, formând noi tumori. De obicei, pentru a se deplasa, celulele folosesc pseudopode sau filopode constituite din filamente de actină pentru a se trage înainte, iar altele pot fi ghidate de semnale chimice specifice din mediul lor înconjurător. Adeziunile focale sunt structuri specializate localizate la interfața dintre celulă și matricea extracelulară. Acestea sunt compuse din molecule de aderență celulară, cum ar fi integrinele, și componente ale matricei extracelulare, cum ar fi fibronectina sau colagenul. Adeziunile focale sunt importante pentru ancorarea și stabilizarea celulelor în timpul migrării. În timpul migrației, celulele receptează și răspund la schimbările din jurul lor prin remodelarea matricei extracelulare, transmiterea forței generate de celulă, modificarea dinamicii, și a aderenței la matricea extracelulară. Integrinele din adeziunile focale conectează celula cu matricea extracelulară, permițând celulelor să se atașeze de substrat și să se deplaseze în mod coordonat. Pentru studiul interacțiunii peptidei RGD-TAT cu integrina (ITG, un receptor din adeziunile focale), am folosit membrane biomimetice, atât sub forma de lipozomi gigant (GUVs) cât și bistraturi lipidice pe suport. Am utilizat integrina $\alpha v \beta 3$ care este supraexprimată în cancer (ex. melanoma, cancer de sân sau de ovare)⁹, iar pentru activarea acesteia am folosit $MnCl_2$ (Figura 10).

⁷Corina Ciobanasu, Julien Pernier, and Christophe LeClainche, *Integrin Facilitates the Internalization of TAT Peptide Conjugated to RGD Motif in Model Lipid Membranes*, CHEMBIOCHEM 2023, e202300642, <https://doi.org/10.1002/cbic.202300642>

⁸Corina Ciobanasu, Isabela Dragomir, Aurelia Apetrei, *The penetrating properties of the tumour homing peptide LyP-1 in model lipid membranes*, Journal of Peptide Science, 25(3):e314, 2019, <https://doi.org/10.1002/psc.3145>

⁹Fangfang Liu, Qiong Wu, Zigang Dong, Kangdong Liu, *Integrins in cancer: Emerging mechanisms and therapeutic opportunities*, Pharmacology & Therapeutics, Volume 247, 2023, 108458, ISSN 0163-7258, <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2023.108458>.

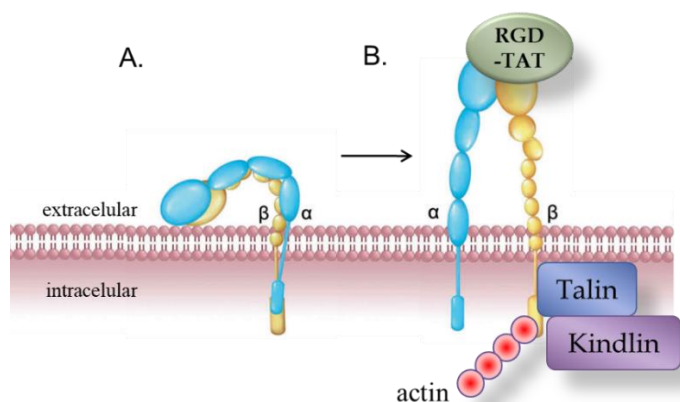


Figura 10: Schema activării integrinei. A. În stare inactivă, subunitățile α și β sunt apropiate și orientate spre membrană; B. În stare activată, integrina se poate lega de domeniul RGD.

Imobilizarea integrinei pe membrana lipidică s-a realizat prin tehnica Ni(NTA)-His Tag între lipida DGS-NTA(Ni) și integrina conjugată cu 6 histidine. În figura 11 este exemplificată această tehnică. Ioni de nichel de pe matrice interacționează cu grupările de histidină de pe proteina His-Tag, formând o legătură specifică. După incubare, suprafața se spală pentru a îndepărta impuritățile nespecifice și proteina nelegată.

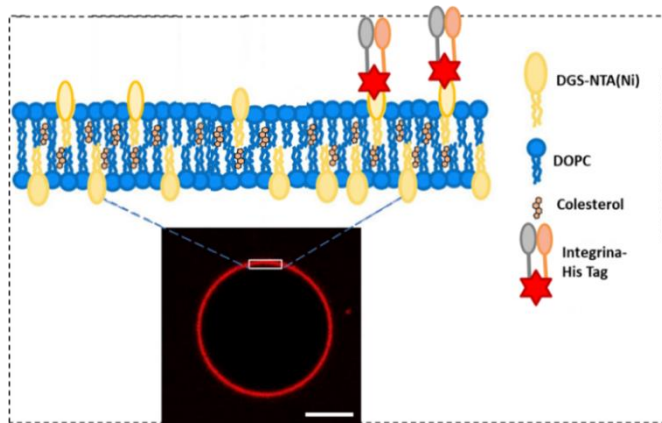


Figura 11: Imobilizarea integrinei în bistratul lipidic compus din DOPC, DGS-NTA (Ni) și colesterol. Integrina, cu șase histidine, se va atașa de DGS-NTA (Ni) în membrana GU. Scala: 10 μm .

Experimentele de microscopie la nivel de singură moleculă au demonstrat că în prezența integrinei, acumularea peptidei RGD-TAT pe suprafață este considerabil mai mare față de absența acesteia (Figura 12.B-D). De asemenea, acumularea peptidei TAT care nu are domeniul RGD, este redusă comparativ cu RGD-TAT (Figura 12.A.). Intensitatea fluorescenței corespunzătoare peptidei liniare TGD-TAT pe suprafața incubată cu integrină este mai redusă decât în cazul peptidei ciclice, sugerând o interacțiune mai puternică a acesteia din urmă cu

integrina. Această observație este confirmată și de alte studii. Prin investigații de dinamică moleculară (MD) s-a constatat că afinitatea de legare de integrină $\alpha_v\beta_3$ a peptidei ciclice RGD a fost mai ridicată decât în cazul peptidei liniare¹⁰. De asemenea, constanta de disociere pentru forma liniară a peptidei RGD este mai mică ($K_d = 12.2$ nM) decât pentru cea ciclică ($K_d = 2.1 \mu\text{M}$)¹¹.

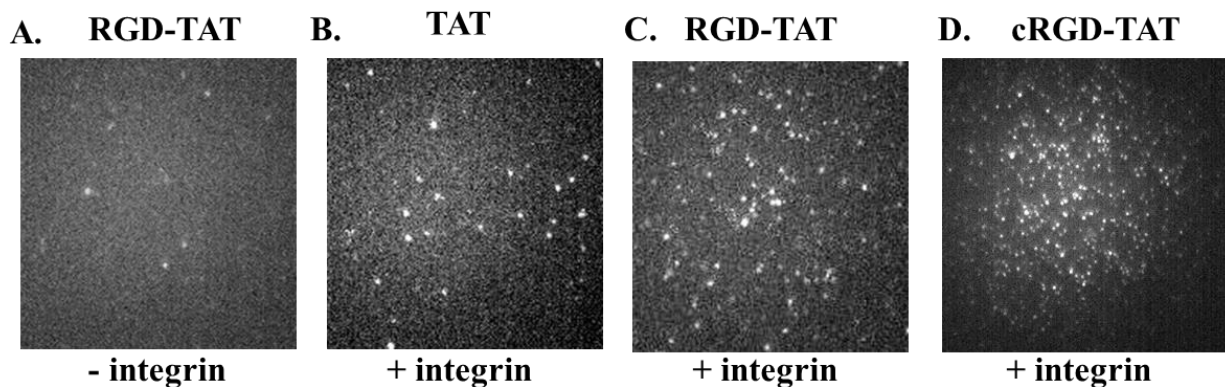


Figura 12: Interacțiunea peptidei RGD-TAT cu integrina prin microscopie la nivel de singură moleculă. A. Bistraturi lipidice cu RGD-TAT fără receptor. B. Peptida TAT în prezența integrinei. C. Bistraturi lipidice cu integrină și peptida liniară RGD-TAT. D. Bistraturi lipidice cu integrină și peptida ciclică RGD-TAT. Suprafața are $(62.5 \mu\text{m})^2$.

De asemenea, experimentele de microscopie confocală au confirmat interacțiunea dintre peptida RGD-TAT în forma liniară sau ciclică cu receptorul integrină (ITG) (Figura 13). În interiorul GUVs se găsește fluoroforul Alexa Fluor 488, pentru verificarea integrității membranei. Integrina $\alpha_v\beta_3$ a fost imobilizată în membrana GUVs prin metoda descrisă anterior și prezentată în figura 11, tehnica Ni(NTA)-His Tag. În GUVs compuse din DOPC și colesterol, fără integrină, se observă că peptida RGD-TAT nu interacționează cu membrana (Figura 13, stânga). În schimb, atunci când în membrană este prezent și receptorul integrină, se observă atât acumularea peptidei pe suprafața GUVs cât și formarea clusterilor de ITG, care reprezintă în celule fundația pentru complexe focale din care vor evolua adeziunile focale.

¹⁰Li N, Qiu S, Fang Y, Wu J, Li Q. *Comparison of Linear vs. Cyclic RGD Pentapeptide Interactions with Integrin $\alpha_v\beta_3$ by Molecular Dynamics Simulations*. Biology (Basel). 2021 Jul 20;10(7):688. doi: 10.3390/biology10070688

¹¹Urquiza, M., Benavides-Rubio, D. & Jimenez-Camacho, S. *Structural analysis of peptide binding to integrins for cancer detection and treatment*. Biophys Rev 15, 699–708 (2023). <https://doi.org/10.1007/s12551-023-01084-3>

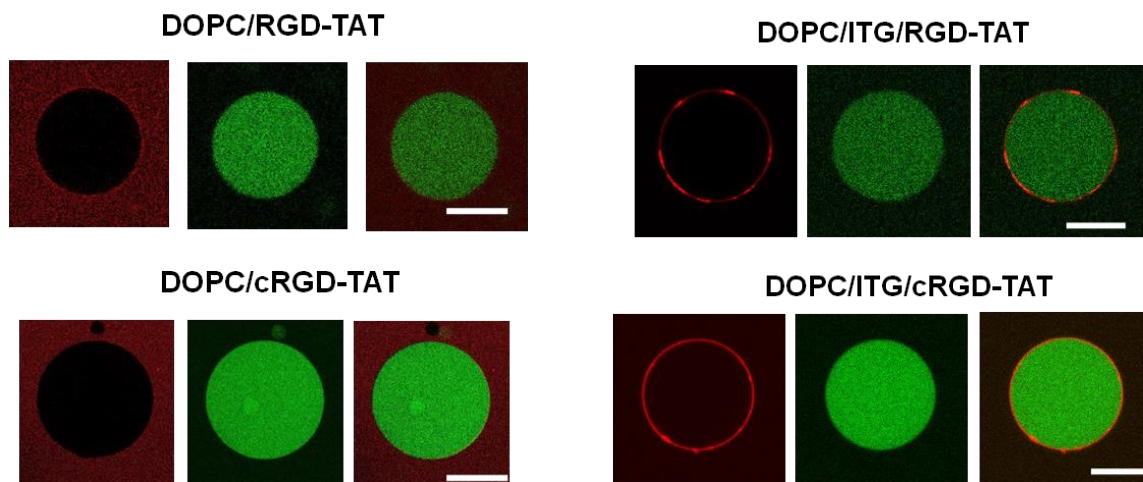


Figura 13: Interacțiunea peptidei RGD-TAT cu integrina prin microscopie confocală. În absența ITG (integrinei), RGD-TAT nu se acumulează (stânga) pe membrane. Când ITG este prezentă (dreapta), RGD-TAT se acumulează și formează clusteri de integrină. Scala 20 μm .

Următoarele experimente au vizat studiul interacțiunii peptidei RGD-TAT cu un alt receptor, neuropilina 1 (NRP1). La fel ca și în cazul integrinei, experimentele de microscopie la nivel de singură moleculă au demonstrat că în prezența NRP1, acumularea peptidei RGD-TAT pe suprafață este mai mare față de absența receptorului (Figura 14.B-D).

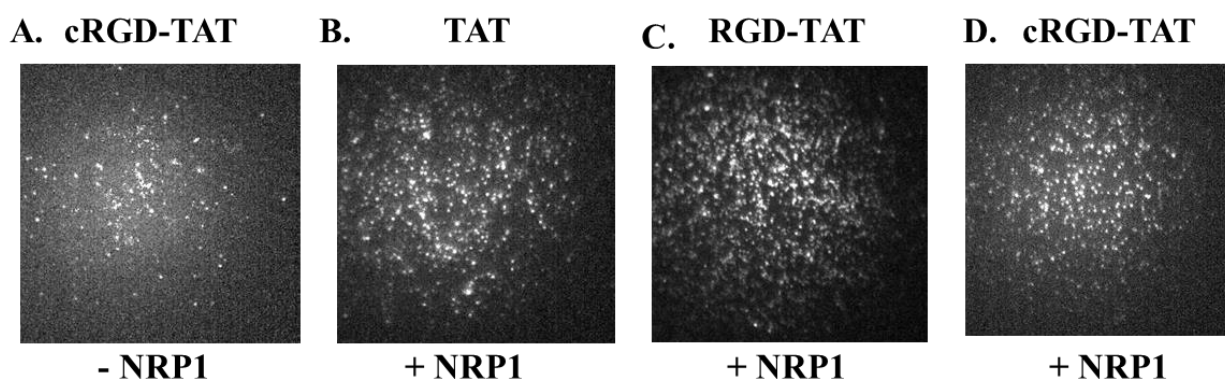


Figura 14: Interacțiunea peptidei RGD-TAT cu neuropilina 1 (NRP1) prin microscopie la nivel de singură moleculă. A. Bistraturi lipidice cu cRGD-TAT fără receptor. B. Peptida TAT în prezența NRP1. C. Bistraturi lipidice cu NRP1 și peptida liniară RGD-TAT. D. Bistraturi lipidice cu NRP1 și peptida ciclică RGD-TAT. Suprafața are $(62.5 \mu\text{m})^2$.

De asemenea, acumularea peptidei TAT care nu are domeniul RGD, are aceeași intensitate comparativ cu RGD-TAT și similară cu cRGD-TAT (Figura 14.A.). Această observație nu este surprinzătoare, întrucât domeniul RQRRR care se leagă de neuropilină se găsește la capătul C al peptidei și nu în capătul terminal N unde se află gruparea RGD.

În continuare, experimentele de microscopie confocală au arătat interacțiunea dintre peptida RGD-TAT (forma liniară sau ciclică) cu receptorul NRP1 (Figura 15). NRP1 a fost imobilizată în membrana GUVs, la fel ca în cazul ITG, prin metoda prezentată în figura 11, tehnica Ni(NTA)-His Tag. În GUVs compuse din DOPC și colesterol, fără integrină, se observă că peptida RGD-TAT nu interacționează cu membrana (Figura 13, stânga). În schimb, atunci când în membrană este prezent și receptorul NRP1, se observă acumularea peptidei pe suprafața GUVs, sugerând interacțiunea dintre cele două.

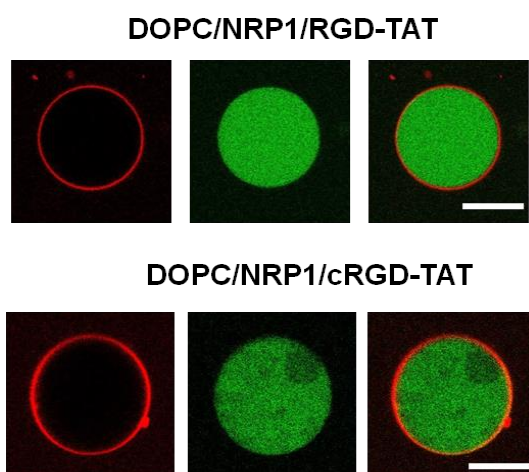


Figura 15: Interacțiunea peptidei RGD-TAT cu neuropilina 1 prin microscopie confocală. În prezența NRP1, RGD-TAT se acumulează pe membrane. Scala 20 μm .

Am reușit astfel în cea de-a treia etapă a proiectului să demonstrăm că peptidele RGD-TAT au afinitate pentru receptorii integrină $\alpha\text{v}\beta_3$ și neuropilina 1 (NRP1).

Impactul estimat al rezultatelor obținute, cu sublinierea celui mai semnificativ rezultat obținut.

Rezultatele proiectului precum și rapoartele detaliate pentru fiecare etapă (inclusiv raportul pentru a treia etapă, cu protocolul experimental pentru determinarea rolului peptidelor asupra activității proteinelor din căile mecanosensibile ale migrației celulare) se găsesc pe pagina proiectului, <https://www.uaic.ro/therhome/>.

Impactul științific: Experimentele realizate pentru implementarea acestui proiect au demonstrat că peptida penetrantă *homing* RGD-TAT, la fel ca și TAT poate penetra și induce formarea de pori în membrane care conțin fosfatidiletanolamină (PE) și fosfatidilserină (PS), atât la pH 7,5 cât și 5,5. De asemenea, această peptidă are afinitate ridicată pentru receptorul integrină, o proteină transmembranară care face parte din adeziunile focale ale celulei. Mai mult, prin capătul C-terminal, peptida se poate lega și de receptorul neuropilină 1 (NRP1). Atât integrina $\alpha_v\beta_3$ cât și NRP1 sunt proteine supraexprimate în celule tumorale. Aceste rezultate confirmă faptul că peptida RGD-TAT are potențial pentru a fi utilizată pentru **dezvoltarea de terapii inovative pentru aplicații în livrarea țintită de medicamente sau agenți imagistici**.

În cadrul acestui proiect am reușit să îndeplinim **toate obiectivele** pe care le-am propus și să demonstrăm că peptidele proiectate și studiate în acest proiect pot contribui la dezvoltarea metodelor de diagnostic și tratament moderne. De asemenea, în timpul derulării acestui proiect, doctorandul a obținut titlul de doctor în 2023 iar directorul de proiect a promovat pe poziție de cercetător științific II (CS II) și a stabilit o nouă **colaborare** cu Clausius-Institute of Physical and Theoretical Chemistry, University of Bonn, Germania, unde a fost cercetător invitat în 2023. Această colaborare a fost inițiată în timpul conferinței Focus on Microscopy 2023, 02-06 aprilie 2023, Porto, Portugalia, raportată mai jos.

Rezultatele estimate ale proiectului au fost publicarea a 2 articole ISI și participarea cu lucrări oral/poster la cel puțin o conferință, dar au fost publicate 6 articole și am participat la 3 conferințe, conform tabelului și detaliilor de mai jos:

Rezultate verificabile ale activităților	Estimate	Realizate
Articole	2	6 + 1 (în evaluare)
Participări la conferințe	1	3
Raport de activitate	3	3
Pagină web	1	1
Protocol de lucru	6	6

Rezultatele și modul de diseminare a rezultatelor

Articole științifice:

În acest proiect au fost publicate un număr de 6 articole științifice cu factor de impact, dintre care 4 situate în zona roșie (Q1) și 2 situate în zona galbenă (Q2) și încă un articol este trimis spre publicare.

1. **Bucataru, I.C.**; Dragomir, I.; **Asandei, A.**; Pantazica, A.-M.; Ghionescu, A.; Branza-Nichita, N.; Park, Y.; Luchian, T., *Probing the Hepatitis B Virus E-Antigen with a Nanopore Sensor Based on Collisional Events Analysis*. Biosensors 2022, 12, 596. <https://doi.org/10.3390/bios12080596>, **Q1**
2. **Ciobanasu, Corina**, *Confocal Laser Scanning Microscopy and Model Membranes to Study Translocation Mechanisms of Membrane Active Peptides*. Pharmaceutics 2022, 14, 1699. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081699>, **Q1**
3. **Corina Ciobanasu**, Julien Pernier, and Christophe LeClainche, *Integrin Facilitates the Internalization of TAT Peptide Conjugated to RGD Motif in Model Lipid Membranes*, CHEMBIOCHEM 2023, e202300642, <https://doi.org/10.1002/cbic.202300642>, **Q2**
4. **Mereuta, Loredana**; **Asandei, Alina**; Schiopu, Irina; Park, Jonggwan; Park, Yoonkyung; Luchian, Tudor, *Synthetic Receptor Based on a Peptide Antibiotic-Functionalized Chimera for Hybridization-Based Polynucleotide Detection*, ACS APPLIED MATERIALS & INTERFACES 2023, 15 (27), 33159-33168, DOI:10.1021/acsami.3c06086, **Q1**
5. **Mereuta, Loredana**; **Asandei, Alina**; Andricioaei, Ioan; Park, Jonggwan; Park, Yoonkyung; Luchian, Tudor, *Considerable slowdown of short DNA fragment translocation across a protein nanopore using pH-induced generation of enthalpic traps inside the permeation pathway*, NANOSCALE 2023, 15(36), 14754-14763. DOI: 10.1039/d3nr03344a, **Q1**
6. Irina Schiopu, Isabela Dragomir and **Alina Asandei**, *Single molecule technique unveils the role of electrostatic interactions in ssDNA-gp32 molecular complex stability*, RSC advances 14 (8), 5449-5460, 2024, DOI: 10.1039/D3RA07746B, **Q2**
7. **Cezara Bucataru** and **Corina Ciobanasu**, *Antimicrobial Peptides: Opportunities and Challenges in Overcoming Resistance*, in evaluare la jurnalul Microbiological Research. **Q1**

Conferințe:

Rezultatele obținute în cadrul acestui proiect au fost prezentate la 3 conferințe internaționale și la seminariile organizate de Clausius-Institute of Physical and Theoretical Chemistry, University of Bonn, Bonn, Germania unde directorul de proiect a fost cercetător invitat:

1. **Corina Ciobanasu**, *Kinetic studies of membrane-active peptides by confocal microscopy*, Focus on Microscopy 2023, 02-06 aprilie 2023, Porto, Portugalia
2. **Corina Ciobanasu**, *Internalization of RGD-TAT peptide in integrin containig model membranes*, 47th FEBS Congress – ‘Together in bioscience for a better future’, 07-12 iulie 2023, Tours, Franța
3. **Ioana Cezara Bucataru, Alina Asandei, Loredana Mereuta, Tudor Luchian**, *Salt effects on the translocation dynamics of polycationic peptide nucleic acids through a protein nanopore*, DPG Spring Meeting of the Atomic, Molecular, Quantum Optics and Photonics Section (SAMOP), 5-10 Martie 2023, Hannover, Germany

30.04.2024

Director Proiect,

CS II Dr. Ciobanasu Vasilica Corina