

UNIVERSITATEA DE MEDICINA SI FARMACIE "IULIU HATIEGANU"
CLUJ-NAPOCA

TEZA DE DOCTORAT
TERAPIA GENICĂ: NOI DESCOPERIRI ÎN UTILIZAREA
VECTORILOR NON-VIRALI

REZUMAT

Doctorand
IULIAN OPREA

Conducător științific
Prof.Dr. SORIN E. LEUCUȚA

CUPRINS

Introducere	1
I. PARTEA GENERALĂ	3
1. Terapia genică	4
2. Sisteme inductibile	20
3. Administrarea genelor in vivo	30
II. PARTEA EXPERIMENTALĂ	38
1. Temperature-assisted cyclic hybridization (TACH): o metodă îmbunătățită pentru hibridarea ADN-ului superspiralat	39
2. Caracterizarea în vivo a sistemelor de administrare genetice folosind bioluminescența	63
3. Un nou sistem inductibil deosebit de eficient, ce folosește microRNA pentru controlul expresiei transgenelor în ficat	74
4. Complexe de acid gras-spermină folosite ca transportor al ADN-ului pentru administrarea nevirală genelor in vivo	87

5. Concluzii generale	109
Referințe	112
Lista publicațiilor	127
Articole publicate	129

Cuvinte-cheie: terapia genică, vectori non-virali, bioplex, PNA, TACH, bioluminescență in vivo, microARN, miR-122, sisteme inductibile, liposmermine

Sinteza părților principale ale tezei de doctorat:

Teza de doctorat intitulată “**Terapia genică: noi descoperiri în utilizarea vectorilor non-virali**” își propune descrierea a patru noi metode ce contribuie la dezvoltarea terapiei genice.

Teza este alcătuită dintr-o parte generală, cu prezentarea cercetărilor din domeniu reflectate de literatura de specialitate, și o parte experimentală ce cuprinde rezultatele experimentale ale autorului.

Partea generală a tezei cuprinde 3 capitole. Primul capitol intitulat “**Terapia genică**” se axează în jurul **vectorilor non-virali** cu descrierea principalelor unități de control al expresiei genetice ale plasmidelor. În cadrul acestui capitol, un accent deosebit s-a pus pe descrierea unei noi tehnologii de construcție de nanoparticule ce înglobează molecule de ADN, tehnologie denumită Bioplex. Este descrisă formarea **nanoparticulelor Bioplex** prin hibridizarea plasmidelor cu oligonucleotide cu afinitate crescută precum Peptide Nucleic Acid (PNA). Procesul de hibridizare dintre plasmide și **PNA** este dependent atât de factori intrinseci (ex. secvența plasmidelor, încărcătura ionică a oligonucleotidelor), cât și extrinseci (temperatura, pH, ioni). Partea experimentală a tezei prezintă o nouă metodă ce controlează și alternează continuu unul dintre factorii extrinseci, și anume temperatura, în procesul de formare a bioplexilor.

Cel de-al doilea capitol al părții generale cuprinde descrierea a două dintre cele mai folosite sisteme de control al expresiei genetice, numite **sisteme inductibile**. Acest capitol este un preambul la noul sistem inductibil dezvoltat de autor și care va fi prezentat în cadrul părții experimentale. Primul sistem inductibil descris este sistemul **Cre-lox**.

Acesta se bazează pe recunoașterea, de către o enzima specializată numită recombinaza, a unor secvențe scurte de ADN din interiorul vectorilor folosiți. În funcție de aranjarea secvențelor de recunoaștere, enzima recombina fragmentele de ADN cuprinse între două secvențe de recunoaștere (prin excizie, inversie și translocare). Acest sistem a contribuit la dezvoltarea de animale transgenice care vor putea fi controlate în expresia transgenei prin controlul exogen al recombinazei. Al doilea sistem inductibil prezentat, **sistemul-Tet** este controlat de tetracilină. Autorul descrie atât elementele de control ce stau la baza acestui sistem cât și câteva modele experimentale ce folosesc sistemul Tet.

Capitolul trei “**Administrarea genelor în vivo**” prezintă aspectele legate de administrarea și persistența in vivo a expresiei genice a vectorilor non-virali. Într-un prim subcapitol se descriu **barierele extra și intracelulare** ce trebuie depășite de către plasmide. A doua secțiune a acestui capitol cuprinde **metode fizice** de administrare a plasmidelor cu accent pe **metoda de injectare hidrodinamică**, des folosită la partea experimentală. Capitolul se încheie cu prezentarea de compuși chimici folosiți în prezent, compuși de conjugare a plasmidelor. Sunt prezentate atât molecule de control ale stabilității chimice precum polipepsi, lipoplepsi cât și molecule specifice de tintire și integre celulare precum integrine și molecule cu semnale de localizare nucleară.

Partea de cercetari personale, întreprinse de doctorand este descrisa în teza în 4 capitole.

În primul capitol al părții experimentale, se prezintă un nou proces biotehnologic de formare a compușilor bioplex dezvoltat de autor. Capitolul este intitulat “**Temperature-Assisted Cyclic Hybridization (TACH): o metoda imbunatatita pentru hibridarea ADN-ului superspiralat**“, și reda o nouă metodă de hibridare ciclică, asistată de temperatură, pentru a crește cantitativ și calitativ procesul de hibridizare a ADNului superspiralat. În partea introductivă, pe baza informațiilor existente în literatura se prezintă **scopul studiului** și anume necesitatea îmbunătățirii calitative a procesului de formare a compușilor bioplex. Aceasta se traduce prin încercarea de reducere a hibridării nespecifice dintre plasmide și PNA (oligonucleotidele functionale) și prin creșterea eficienței hibridării. **Rezultate:** în procesul hibridării pentru început s-a modificat pH-ul la valori mai mici, acesta ducând la creșterea afinității și viteza de reacție

dintre PNA și plasmide. A urmat folosirea alternativă a două temperaturi de hibridizare. Prima temperatură este *temperatura de aliniere* (annealing temperature) la care afinitatea dintre ADN-ul plasmidelor și PNA oligonucleotidelor este maximă. După o scurta perioadă de timp (2 minute) se trece la o temperatura mai mare (timp de 30 de secunde), această temperatură fiind denumită *temperatura de disociere* a compușilor incomplet și nespecific formați. Totuși, la această temperatură se păstrează intacti compuşii bioplex corect formați. Prin repetarea ciclica a acestor 2 temperaturi se formeaza compuşii bioplex cu mult superior calitativ și cantitativ metodelor folosite anterior. Metoda, denumită TACH (temperature-assisted cyclic hybridization) conduce la un randament de 2-4 ori mai mare de hibridare a complexului bis-PNA-plasmida. S-a constatat de asemenea prevenirea degradării ADN-ului supersiralat, în condițiile de lucru TACH. În plus toată metoda dureaza doar 1 ora comparativ cu 16 ore – timpul metodelor folosite anterior.

În capitolul al 2-lea al părții experimentale, “**Caracterizarea în vivo a sistemelor de administrare genetice folosind bioluminescența**” se prezintă cercetarea de optimizare a parametrilor de bioluminescență in vivo pentru caracterizarea transferului genic la șoareci. În **introducere** se evidențiază necesitatea punerii la punct a unor metode neinvazive, precum bioluminescența, pentru a caracteriza in vivo expresia unei gene administrate în scopul terapiei genice. **Rezultatele** se bazează pe cercetări efectuate cu luciferază (o gena de control) folosită pentru imagistica longitudinală a expresiei care poate fi detectată prin imagistica de bioluminescența. Folosind plasmide care exprimă gena luciferazei, s-a determinat biodistribuția luciferinei-D în ficat, mușchi și pielea șoarecilor. Determinările s-au efectuat în timp real, rezultatele fiind o monitorizare a cineticii de expresie în timp a genei. Determinările au aratat influența diferiților factori care controlează expresia genei și vizualizarea ei, precum timpii de biodistribuție, tehnicile diferite de administrare (injectie hidrodinamică sau injectie locală), diferite specii și genuri de șoareci, precum și vectori care posedă diferite elemente reglatoare (promoteri și introni). Rezultatele contureaza un tablou complex al parametrilor implicați în caracterizarea controlului expresei genetice prin metoda imagistică de bioluminescență.

Capitolul al 3-lea este intitulat “**Un nou sistem inductibil deosebit de eficient, ce folosește microRNA pentru controlul expresiei transgenelor în ficat**”. În **introducere**

se prezintă succint câteva dintre cele mai importante sisteme inductibile și importanța lor în caracterizarea de sisteme biologice și în tratamentul unor boli. Chiar dacă s-au descris mai multe astfel de sisteme, sunt câteva aspecte ale acestora care trebuie îmbunătățite: precum nivelul de inducere in vivo, reversibilitatea și ușurința de construcție. **Sistemul inductibil propus** și testat de către autor aduce noi îmbunătățiri față de cele existente. Noul design al plasmidelor face ca expresia genei care o conține să fie dependentă de prezența intracelulară a unor microRNA care degradează și supresează exprimarea genei. Vectorii folosiți sunt special construiți pentru ca odată injectați în ficat, expresia lor genetică să fie suprasată de care microARN-122, specific celulei hepatice. Expresia vectorilor rămâne dormindă până când se administrează un antagonist de microRNA, denumit AntimiR, sau AmiR. AntimiR-ul blochează efectul supresor al microARN-ului 122, promovând astfel expresia vectorului. S-au folosit vectori ce exprimă luciferaza, GFP și dsRed sub controlul unor promotori diferiți. Modele experimentale au fost linii celulare Huh7, 293T și șoareci NMRI. *In vivo*, atât vectorii cât și antagonistul de microARN, AmiR, s-au injectat hidrodinamic împreună sau separat (la 1 sau 3 luni distanță). **Caracteristicile** sistemului microARN dependent descris sunt: capacitatea mare de inducere a expresiei (de până la 100.000 mai mare decât nivelul bazal), reversibilitatea (expresia revine la normal la 2 săptămâni după administrarea antagonistului) și lipsa efectelor toxice.

Capitolul al 4-lea este intitulat “**Complexele de acid gras-spermina folosite ca transportor al ADN-ului pentru administrarea nevirusală a genelor in vivo**”. În scopul unei terapii genice nevirusale, un element important îl reprezintă identificarea unor compuși chimici care condensează ADN-ul conferind astfel stabilitate și permeabilitate celulară crescută a vectorilor genetici. Din punct de vedere al caracteristicilor fizice și de expresie genică, s-au testat o serie de derivați de acizi grași conjugați cu spermină în structuri de complecși cu plasmidele. Creșterea randamentului de condensare se poate face fie prin creșterea densității de sarcină, fie prin introducerea de grupări hidrofobe. Atașarea unui lanț scurt lipofil la spermină îmbunătățește legarea de ADN și o protejează față de operația de condensare. În studiu s-au realizat lipospermine, compuse din molecule amfifile-acid gras-spermină. Complecșii nanoparticulați lipospermina-ADN s-au caracterizat in vitro, iar reprezentanții decanoil-

și butanoil-spermina s-au dovedit mai corespunzători ca vectori pentru terapia genică. Ca metode s-au folosit DLS (dynamic light scattering), s-a evaluat toxicitatea pe celule hepatice umane (HepG2) și pe rinichi de hamster (BHK) și s-au efectuat studii in vivo pe soareci BALB/c de evidențiere a expresiei genice folosind gene pentru luciferază. S-a demonstrat ca realizarea de complecși cu acizi grași cu lanț scurt reprezintă un potențial transportor al nanoparticulelor de ADN-lipospermina, capabile de administrare eficientă a genei in vivo.

Lucrarea propriu-zisă se încheie cu prezentarea concluziilor generale ale tezei. Aici se trece în revista importanța fiecărui domeniu studiat și integrarea rezultatelor obținute în cadrul terapiei genice.

CURRICULUM VITAE

17 noiembrie 2010

- 1. Nume:** OPREA
Prenume: IULIAN
Data si locul nasterii: 2 iulie 1979, SOVATA, jud. MURES, ROMÂNIA
Cetatenie: româna
Stare civila: casatorit

2. Studii:

<i>Institutia de învățământ</i>	Liceul de Contabilitate si Finante, Sovata, România	Universitatea de Medicina si Farmacie, Târgu Mures, România
<i>Perioada</i>	1993 – 1997	1997 - 2003
<i>Diplome obtinute</i>	Diploma de bacalureat	Medic doctor

3. Studii doctorale:

Data înscrierii: 1 noiembrie 2003
Numele îndrumătorului : Prof. Dr. Sorin Emilian Leucuta
Universitatea de Medicina si Farmacie Iuliu Hatieganu, Cluj-Napoca,
România

4. Limbi straine (nivel 1-5):

Engleza – nivel 5
Franceza – nivel 2

5. Domeniu de cercetare/interes:

- terapia genica folosind: vectori non-virali, microARN, aptameri
- Sisteme genetice inductibile
- Apoptoza celulara si regenerarea tesuturilor
- procesul de imbatranire
- nanotehnologii

6. Experienta in cercetare / loc de munca:

2006-prezent: Iuliu Hatieganu, Universitatea de Medicina si Farmacie Iuliu Hatieganu, Cluj-Napoca, Romania si Institutul Karolinska, Stockholm, Suedia

2005-2006: Bursa bilaterala romano-suedeza acordata de Insitulul Suedez pentru continuarea cercetarii la Institutul Karolinska, Suedia

2004-2005: Bursa Marie Curie (Programul Eurogendis) pentru cercetare in grupul Molecular biology and Gene Therapy, de la Institutul Karolinska, Suedia.

2002-2004: studii legate de gena p53 in cancere mamare, Institutul

Oncologic Cluj, Romania

2001 iulie: participarea la scoala de vara organizata la catedra de biologie a univesrsitatii Babes-Bolyai, Cluj-Napoca, Romania.

7. Experienta pedagogica:

- Coordonator al modulului practic “ Functional genomic in cancer therapy and biology” – Scoala nationala de vara, Cluj-Napoca, 2-12 Iulie 2006
- Coordonator al modulului de lucrari de laborator “Course in General and Molecular Virology” at Södertörns University College, Stockholm, Suedia intre anii 2005, 2006, 2007, 2008 and 2009.

8. Cursuri de pregatire:

- Methodologies in Molecular Medicine (Course No. 1844, Sept. 27-Dec. 06, 2007, Karolinska Institute, Sweden)
- Principles of Transcriptional Networks in Metabolic Disease and Cancer (Course 1575, 2007, Karolinska Institute, Sweden)
- Writing Science and information literacy (Course No. 1366, Nov. 21-2 Dec. 2005, Karolinska Institute, Sweden)
- BD FACSCalibur flow cytometry system application sort education system for Becton Dickinson (Oct. 19-20, 2005, Stockholm, Sweden)
- Applications of Nanoparticles in Biomedicine (Course no.1864, 7-11March. 2005 Karolinska Institute & KTH, Sweden)
- Developmental Biology and Cellular Signaling (Course No. 1571, Oct. 6-1 Dec. 2004, Karolinska Institute, Sweden)
- Course on Laboratory Animal Science (Course No, 1132, April 26-7 May, 2004, Karolinska Institute, Sweden)

9. Conferinte si Scoli de vara:

- Nucleic Acid Chemical Biology (NACB) PhD Summer School, June 24-28 2007 Odense, Denmark
- European Society for Gene Therapy Conference, 9-12 November, Athens, Greece, poster presentation: “Early stage gene expression patterns after intrahepatic and intramuscular administrations of different plasmid based constructs”
- Nucleic Acid Chemical Biology (NACB) PhD Summer School, June 19-23 2005 Odense, Denmark

10. Tehnici si metode insusite:

- genomic DNA, plasmids and total RNA extraction
- PCR, Polyacrylamide and Agarose gel electrophoresis
- molecular cloning
- FACS
- western blot
- microscopy
- luminescence-based assays (using B-Gal or luciferase based systems)
- cell lines transfection (liposome based, electroporation)
- adenoviral and retroviral methods: transfections, transductions, titration
- animal handling (mouse model)
- in vivo bioluminescence imaging (IVIS, Xenogen)

11. Premii:

- Premiul de excelenta (Universitatea de Medicina si Farmacie Targu-Mures, Romania, 2003)
- Premiul al doilea la sectiunea Morfologie Normala si Patologica (Universitatea de Medicina si Farmacie, Constanta, Romania, 2003)

12. Lista de publicatii si manuscrise:

1. **Oprea**, I. Iulian, Simonson, O. E., Moreno, P. M., Viola, J. R., Lundin, K. E., Smith, C. I. Temperature-assisted cyclic hybridization (TACH): an improved method for supercoiled DNA hybridization. *Mol Biotechnol* **45**, 171-179 (2010).
2. **Oprea**, I. Iulian, Viola, J.R., Simonson, O., Vlase, L., Leucuța, S.E., Lundin, K.E. & Smith, C.I. In vivo characterization of gene delivery systems using bioluminescence . (*manuscript*).
3. **Oprea**, I. Iulian, Moreno, P.M., Lundin, K.E., Viola, J.R. & Smith, C.I. A new highly efficient microrna-based inducible system for the control of transgene expression in the liver. (*manuscript*).
4. Lundin, K.E. Hasan, M., Moreno, P. M., Tornquist, E., **Oprea**, I., Svahn, M. G., Simonson, E. O., Smith, C. I. Increased stability and specificity through combined hybridization of peptide nucleic acid (PNA) and locked nucleic acid (LNA) to supercoiled plasmids for PNA-

anchored "Bioplex" formation. *Biomol Eng* **22**, 185-192 (2005).

5. Viola, J.R., Leijonmarck, H., Simonson, O. E., **Oprea**, I. I., Frithiof, R., Purhonen, P., Moreno, P. M., Lundin, K. E., Stromberg, R., Smith, C. I. Fatty acid-spermine conjugates as DNA carriers for nonviral in vivo gene delivery. *Gene Ther* **16**, 1429-1440 (2009).
6. Lundin, K., Simonson, O.E., Moreno, P.M., Zaghloul, E., **Oprea**, I. I., Svahn, M. G., Smith, C. I. Nanotechnology approaches for gene transfer. *Genetica* **137**, 47-56 (2009).
7. Viola, J.R., El-Andaloussi, S., **Oprea**, I. I., Smith, C.I.E. Non-viral nanovectors for gene delivery: factors that govern successful therapeutics. *Expert Opinion on Drug Delivery* **7**, 721-735 (2010).
8. EL-Andaloussi, S., Imre, M., Lehto, T., Simonson, O., **Oprea**, I., Sillard, R., Kurrikoff, K., Sork, H., Viola, J., Ezzat, K., Zaghloul, E., Suhorutšenko, J., Guterstam, P., Tedebark, U., Smith, C.I.E., Langel, U. PepFect6-mediated siRNA delivery into primary cells in vitro and systemically in vivo. *Nucleic Acids Research - under review*.
9. Zaghloul, E.M., Madsen, A. S., Moreno, P. M., **Oprea**, I.I., El-Andaloussi, S., Bestas, B., Gupta, P., Pedersen, E. B., Lundin, K. E., Wengel, J., Smith, C. I.E. Optimizing anti-gene oligonucleotide 'Zorro-LNA' for improved strand invasion into duplex DNA. *Nucleic Acids Res* (2010). DOI: [10.1093/nar/gkq835](https://doi.org/10.1093/nar/gkq835) [doi]

**Iuliu Hatieganu University of Medicine and Pharmacy
Cluj-Napoca**

DOCTORAL THESIS

GENE THERAPY: NEW DEVELOPMENTS OF NON-VIRAL VECTORS

Summary

PhD. student

IULIAN OPREA

Ph.D. supervisor

Prof. Dr. SORIN E. LEUCUȚA

Content

Introduction	1
I. THEORETICAL BACKGROUND	3
1. Gene Therapy	4
2. Inducible systems	20
3. In vivo gene delivery	30
II. PARTEA EXPERIMENTALA	38
1. Temperature-assisted cyclic hybridization (TACH): An Improved Method for Supercoiled DNA Hybridization	39
2. In Vivo Characterization of Gene Delivery Systems Using Bioluminescence	63
3. A New Highly Efficient MicroRNA-based Inducible System for the Control of Transgene Expression in the Liver	74
4. Fatty Acid–spermine Conjugates as DNA Carriers for Non-viral <i>in Vivo</i> Gene Delivery	87
5. General conclusions	109
References	112

List of publications	127
Published articles	129

Keywords: gene therapy, non-viral vectors, bioplex, PNA, TACH, *in vivo* bioluminescence, microRNA, miR-122, inducible systems, lipospermines, *in vivo* gene delivery.

The PhD thesis, entitled "**Gene therapy: new developments of non-viral vectors**" describes four new methods that contribute to the development of gene therapy. Gene therapy is considered to be one of the most promising technologies that use genes to treat or prevent disease. Genetic disorders such as hemophilia, cystic fibrosis, muscular dystrophy, or acquired diseases such as cancer, neurodegenerative disease or viral infections are just a few that will benefit from the developments in the gene therapy field. There are four approaches of gene therapy. The first, and also the most common one, involves inserting a normal gene to replace the function of an abnormal gene. The others are swapping an abnormal gene for a normal one, repairing an abnormal gene, and altering the degree to which a gene is turned on or off. This thesis will focus on the aspects related to the first and the last approach.

The purpose of this thesis is to describe the author's contribution in the field of gene therapy. The thesis describes a new plasmid design that allows exogenous regulation of plasmid gene expression. It presents a new biotechnological method that could be used in preparing DNA nanoparticles that have small functional peptide-like entities. It evaluates the effect of new DNA carriers in the process of *in vivo* delivery. Finally, it better characterize a luminescence-based method, which helps to evaluate gene delivery and expression *in vivo*.

The thesis is structured in two parts: theoretical background and experimental part. The first part of the thesis covers the most recent and important theoretical aspects of non-viral vectors with focus on a new biological system (Bioplex) and of *in vivo* delivery, and aspects of inducible genetic systems.

The experimental part of the thesis presents the author's experimental contribution to the non-viral gene therapy field. This section contains 4 chapters. Regarding the author contribution to the experimental part, most of the experiments from the first 3 chapters were planned and done by the author. In the 4th chapter the author contributed partially, mainly to the design and execution of the animal experiments.

The first chapter presents a new method of generating improved Bioplex molecules, entitled **TACH** (temperature-assisted cyclic hybridization). The Bioplex particles are hybrid molecules that contain plasmid DNA and peptide nucleic acid oligonucleotides. When preparing new Bioplex molecules is important to use hybridization methods that creates well defined Bioplex structures. The TACH method offers a few critical advantages over the previous hybridization method in generating Bioplex molecules. Its main merit is the production of Bioplex molecules that are more clean, having much less undesired (unspecific bound) oligonucleotides attached to the plasmid. A second advantage of the TACH is that it takes considerably less time to generate the Bioplex-es. If the previous methods use overnight incubation (average of 16 hour) by TACH, using 1 hour is enough to form the Bioplex molecules. Moreover, there is no occurrence of negative modification in the structure and function of the Bioplex particles. From the economical point of view the TACH method is achieving a very good quality and yield of hybrids by using 2 to 4 fold less PNA oligonucleotides.

The second chapter presents new aspects of an *in vivo* **bioluminescence**-based method. There are two types of information that is presented in this work. In the first group there are described new critical parameters for the bioluminescence method that, together with the already described data, complete the array of variables of bioluminescent protocol. The second group of data, contains different applications of the bioluminescent method in order to better characterize different aspects of the non-viral vectors. There are three types of new parameters that were identified important for an accurate and reproducible bioluminescent assay. The biodistribution of the substrate needs to be characterized, for different localization of gene expression, by taking serial image acquisitions. In this way only the highest bioluminescent value is used as the representative value at a time point. The other two new identified parameters are the dose

of the substrate and the gender of animals. Both of parameters are important to be taking into consideration when comparing different studies.

The *in vivo* bioluminescence is a high cost-effective method that allows the characterization of different components of a genetic vector. It was analyzed the expression profile of different promoters such as, CMV, ubiquitin C and albumin in the muscle and liver. As expected, having an endogenous, tissue specific promoter together with other gene regulatory elements convey a long gene expression.

In the third chapter the author describes a **new gene inducible system** for the control of gene expression in the liver. One of the most appealing features of this system is its design simplicity: it is based on the 120 bp addition at the 3'untranslated region of the gene of interest. As compared to the most used inducible vectors (Cre-lox-, tetracycline-, or shield based) this design is the simplest.

The *in vivo* efficiency of the miR-based inducible system was up to 100.000 fold of inducibility level. This high level of inducibility it comparable only to the Cre-lox system. Other characteristics of the microRNA-based inducible systems include the ability to switch on-off the system whenever needed (reversibility) and repeatedly.

Regarding safety, the inducer of the micro-RNA inducible system, the AmiR-122 not only does not have a negative effect on the organism but it can decrease cholesterol levels and it can be use in treating and preventing the hepatitis C viral infection.

The fourth chapter presents an efficient ***in vivo* delivery** method of plasmids. The chapter describes **fatty acid–spermine conjugates** that mixed with plasmid-DNA will improve the intracellular delivery and thus the expression of the plasmid. The conjugates were tested in vivo in mice, in the muscle and skin.

The thesis ends with presenting the general conclusions over the presented findings. It contains the integration of every important finding that was presented, in the gene therapy field.

CURRICULUM VITAE

17th of November, 2010

- 1. First Name:** IULIAN
Family Name: OPREA
Date and Place of Birth: 2nd July 1979, SOVATA, jud. MURES,
ROMANIA
Citizenship: ROMANIAN
Civil State: married

2. Studies:

<i>Institution</i>	Financing and Accounting High School, Sovata, Romania	University of Medicine and Pharmacy, Targu Mures, Romania
<i>Period</i>	1993 – 1997	1997 - 2003
<i>Received Diplomas</i>	High School Diploma	Medical Doctor

3. Ph.D. studies:

Enrolment Date: 1 November 2003
Name of Supervisor: Prof. Dr. Sorin Emilian Leucuta
University of Medicine and Pharmacy Iuliu Hatieganu, Cluj-
Napoca,
Romania

4. Known Languages (level 1-5):

English – level 5
French – level 2

5. Research area/interest::

- Gene Therapy: using non-viral vectors, microRNAs, aptamer based technologies (e.g. Bioplex)
- Genetic inducible systems
- Cell apoptosis and tissue regeneration
- Aging
- Nanotechnology

6. Research Experience:

2006-ongoing: Iuliu Hatieganu, University of Medicine and Pharmacy, Romania *and* Karolinska Institute, Sweden

2005-2006: Romanian-Swedish Bilateral Scholarship for Studies at
Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

2004-2005: Marie Curie Fellowship (Eurogendis Program) in Molecular biology and Gene Therapy Group, at Karolinska Institute, Sweden.

2002-2004: studies in p53 gene in breast cancer in Biomolecular Laboratory, Oncological Institute, Cluj-Napoca, Romania

2001: cloning enolase's gene in Genetic Department from University Babes-Bolyai, Cluj-Napoca, Romania

7. Teaching experience:

- Coordinator of the practical training module: " Functional genomic in cancer therapy and biology" – National Summer School, Cluj-Napoca, 2nd- 12th July 2006
- Teaching in the practical module of the "Course in General and Molecular Virology" at Södertörns University College, Stockholm, Sweden during the years 2005, 2006, 2007, 2008 and 2009.

8. Training courses :

- Methodologies in Molecular Medicine (Course No. 1844, Sept. 27-Dec. 06, 2007, Karolinska Institute, Sweden)
- Principles of Transcriptional Networks in Metabolic Disease and Cancer (Course 1575, 2007, Karolinska Institute, Sweden)
- Writing Science and information literacy (Course No. 1366, Nov. 21-2 Dec. 2005, Karolinska Institute, Sweden)
- BD FACSCalibur flow cytometry system application sort education system for Becton Dickinson (Oct. 19-20, 2005, Stockholm, Sweden)
- Applications of Nanoparticles in Biomedicine (Course no.1864, 7-11 March. 2005 Karolinska Institute & KTH, Sweden)
- Developmental Biology and Cellular Signaling (Course No. 1571, Oct. 6-1 Dec. 2004, Karolinska Institute, Sweden)
- Course on Laboratory Animal Science (Course No, 1132, April 26-7 May, 2004, Karolinska Institute, Sweden)

9. Conferences and Summer schools:

- Nucleic Acid Chemical Biology (NACB) PhD Summer School, June 24-28 2007 Odense, Denmark
- European Society for Gene Therapy Conference, 9-12 November, Athens, Greece, poster presentation: "Early stage gene expression patterns after intrahepatic and intramuscular administrations of different plasmid based constructs"
- Nucleic Acid Chemical Biology (NACB) PhD Summer School, June 19-23 2005 Odense, Denmark

10. Techniques and methods acquired:

- genomic DNA, plasmids and total RNA extraction

- PCR, Poliacrilamide and Agarose gel electrophoresis
- molecular cloning
- FACS
- western blot
- microscopy (fluorescence)
- luminescence-based assays (using B-Gal or luciferase based systems)
- cell lines transfection (liposome based, electroporation)
- adenoviral and retroviral methods: transfections, transductions, titration
- animal handling (mouse model)
- in vivo bioluminescence imaging (IVIS, Xenogen)

11. Awards :

- Prize of Excellence (University of Medicine and Pharmacy Targu-Mures, Romania, 2003)
- 2nd Prize in the section of Normal and Pathological Morphology (University of Medicine and Pharmacy, Constanta, Romania, 2003)

12. List of publications and manuscripts:

1. **Oprea**, I. Iulian, Simonson, O. E., Moreno, P. M., Viola, J. R., Lundin, K. E., Smith, C. I. Temperature-assisted cyclic hybridization (TACH): an improved method for supercoiled DNA hybridization. *Mol Biotechnol* **45**, 171-179 (2010).
2. **Oprea**, I. Iulian, Viola, J.R., Simonson, O., Vlase, L., Leucuța, S.E., Lundin, K.E. & Smith, C.I. In vivo characterization of gene delivery systems using bioluminescence . (*manuscript*).
3. **Oprea**, I. Iulian, Moreno, P.M., Lundin, K.E., Viola, J.R. & Smith, C.I. A new highly efficient microrna-based inducible system for the control of transgene expression in the liver. (*manuscript*).
4. Lundin, K.E. Hasan, M., Moreno, P. M., Tornquist, E., **Oprea**, I., Svahn, M. G., Simonson, E. O., Smith, C. I. Increased stability and specificity through combined hybridization of peptide nucleic acid (PNA) and locked nucleic acid (LNA) to supercoiled plasmids for PNA-anchored "Bioplex" formation. *Biomol Eng* **22**, 185-192 (2005).

5. Viola, J.R., Leijonmarck, H., Simonson, O. E., **Oprea**, I. I., Frithiof, R., Purhonen, P., Moreno, P. M., Lundin, K. E., Stromberg, R., Smith, C. I. Fatty acid-spermine conjugates as DNA carriers for nonviral in vivo gene delivery. *Gene Ther* **16**, 1429-1440 (2009).
6. Lundin, K., Simonson, O.E., Moreno, P.M., Zaghoul, E., **Oprea**, I. I., Svahn, M. G., Smith, C. I. Nanotechnology approaches for gene transfer. *Genetica* **137**, 47-56 (2009).
7. Viola, J.R., El-Andaloussi, S., **Oprea**, I. I., Smith, C.I.E. Non-viral nanovectors for gene delivery: factors that govern successful therapeutics. *Expert Opinion on Drug Delivery* **7**, 721-735 (2010).
8. EL-Andaloussi, S., Imre, M., Lehto, T., Simonson, O., **Oprea**, I., Sillard, R., Kurrikoff, K., Sork, H., Viola, J., Ezzat, K., Zaghoul, E., Suhorutšenko, J., Guterstam, P., Tedebark, U., Smith, C.I.E., Langel, U. PepFect6-mediated siRNA delivery into primary cells in vitro and systemically in vivo. *Nucleic Acids Research - under review*.
9. Zaghoul, E.M., Madsen, A. S., Moreno, P. M., **Oprea**, I.I., El-Andaloussi, S., Bestas, B., Gupta, P., Pedersen, E. B., Lundin, K. E., Wengel, J., Smith, C. I.E. Optimizing anti-gene oligonucleotide 'Zorro-LNA' for improved strand invasion into duplex DNA. *Nucleic Acids Res* (2010). DOI: [10.1093/nar/gkq835](https://doi.org/10.1093/nar/gkq835) [doi]