

**ACADEMIA ROMÂNĂ  
INSTITUTUL DE BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE CELULARĂ  
„NICOLAE SIMIONESCU”**

**TEZĂ DE DOCTORAT**

**-Carte rezumat-**

**CARACTERIZAREA FUNCȚIONALĂ ȘI STRUCTURALĂ A  
MICRODOMENIILOR MEMBRANARE LIPIDICE ÎN STĂRI  
NORMALE ȘI PATOLOGICE  
(diabet, hipercolesterolemie, ateroscleroză)**

**Conducător științific**

**Dr. Felicia Antohe**

**Doctorand**

**Elena Uyy**

**BUCUREȘTI**

**2012**

## CUPRINS

### PARTEA I - STADIUL ACTUAL AL CUNOȘTIȚELOR PRIVIND MICRODOMENIILE MEMBRANARE

<b>I.1. Membrana plasmatică și microdomeniile lipidice</b>	
<b>I.2. Caveolele, microdomenii membranare înalt specializate.....</b>	<b>7</b>
I.2.1. Introducere.....	10
I.2.2. Caveolele și implicarea lor în fiziologia cardiovasculară.....	16
<b>I.3. Caveolele în celula endotelială.....</b>	<b>17</b>
I.3.1. Introducere.....	17
I.3.2. Implicarea caveolelor în reglarea permeabilității vasculare.....	19
I.3.3. Rolul caveolelor/ caveolinelor în transportul și homeostazia macromoleculelor plasmatice.....	26
I.3.4. Caveolina-1 și angiogeneza .....	29
<b>I.4. Caveolele și disfuncția celulei endoteliale .....</b>	<b>30</b>
I.4.1. Introducere.....	30
I.4.2. Disfuncția celulei endoteliale în boli cardiovasculare și rolul caveolelor în:.....	31
I.4.2.1. diabet.....	36
I.4.2.2. hipercolesterolemie/ateroscleroză.....	42
I.4.2.3. hipertensiune arterială.....	49
I.4.2.4. cancer.....	58
<b>I.5. Receptori și căi de semnalizare implicate în relația caveolelor/caveolinelor și disfuncția celulei endoteliale .....</b>	<b>61</b>
I.5.1. Receptori asociați membranei caveolare.....	61
I.5.2. Căi de semnalizare.....	63
I.5.3. Rolul caveolelor în mecanismele de mobilizare a $Ca^{2+}$ .....	65
I.5.4. Caveolele, receptorul la folat, gruparea receptorilor și potocitoza.....	66
I.5.5. Potențialul terapeutic al conjugatilor folatului.....	67
<b>I.6. Concluzii.....</b>	<b>69</b>

### PARTEA II - CONTRIBUȚII ORIGINALE

<b>II.1. Introducere și obiective.....</b>	<b>71</b>
<b>II.2. Metodologie experimentală.....</b>	<b>73</b>
II.2.1. Modele experimentale.....	73
II.2.2. Tehnici de microscopie.....	75
II.2.2.1. Microscopie electronică și analiză morfometrică.....	75
II.2.2.2. Microscopie optică.....	75
II.2.3. Prepararea extractelor îmbogățite în proteine citoplasmatic, nucleare și membranare.....	76

II.2.4. Prepararea domeniilor membranare îmbogățite în caveolina-1 prin ultracentrifugare în gradient de sucroză.....	77
II.2.5. Western Blotting .....	77
II.2.6 ELISA.....	78
II.2.7. Extracție de ARN și RT-qPCR.....	78
II.2.8. LC-MS/MS.....	79
II.2.9. Analiză statistică.....	79
<b>II.3.Studii experimentale.....</b>	<b>80</b>
<b>II.3.1 Caveolina-1 este asociată modificărilor structurale ale celulelor endoteliale pulmonare în diabetul zaharat.....</b>	<b>80</b>
II.3.1.1. Introducere.....	80
II.3.1.2. Modele experimentale.....	81
II.3.1.3. Rezultate și discuții.....	82
II.3.1.3.1. Caracterizarea modelelor experimentale.....	82
II.3.1.3.2. Modificări structurale ale celulelor endoteliale pulmonare în diabetul zaharat.....	82
II.3.1.3.3. Caracterizarea microdomeniilor membranare îmbogățite în caveolina-1 (activitate ACE, colesterol, proteină totală) .....	85
II.3.1.3.4. Creșterea expresiei proteice a caveolinei-1 și -2 în diabetul zaharat.....	88
II.3.1.3.5. Creșterea expresiei genice a caveolinei-1 în diabetul zaharat.....	91
II.3.1.4. Concluzii.....	93
<b>II.3.2. Corelarea expresiilor proteice a proteinelor de șoc termic (HSP) și a proteinelor „raft”-urilor lipidice în hiperlipidemia experimentală.....</b>	<b>95</b>
II.3.2.1. Introducere.....	95
II.3.2.2. Modele experimentale.....	97
II.3.2.3. Rezultate și discuții.....	97
II.3.2.3.1. Dieta hiperlipidemică induce progresia plăcii aterosclerotice....	97
II.3.2.3.2. Schimbările structurale ale celulelor endoteliale în plămânul hiperlipidemic.....	101
II.3.2.3.3. Caracterizarea microdomeniilor membranare îmbogățite în caveolina-1.....	102
II.3.2.3.4. Caracterizarea fracțiilor îmbogățite în proteine citosolice / nucleare / membranare.....	106
II.3.2.3.5. Hiperlipidemia induce o creștere a expresiei proteice a caveolinei-1 în „raft”-urile lipidice.....	108
II.3.2.3.6. Expresia genică a caveolinei-1 în ateroscleroză.....	109
II.3.2.3.7. Ateroscleroza induce o scădere a expresiei proteice a PTRF-ului în „raft”-urile lipidice îmbogățite în caveolina-1.....	110
II.3.2.3.8. Ateroscleroza induce o creștere a expresiei RAGE cofracționat cu caveolina-1 și o activare a căii de semnalizare AKT.....	111
II.3.2.3.9. Creșterea expresiei receptorilor la folat în endoteliul pulmonar în ateroscleroză.....	114
II.3.2.3.10. Creșterea expresiei proteinelor implicate în endocitoza	

mediată de dinamină cofracționate cu caveolina-1 (dinamina, filamina A, clatrina).....	115
II.3.2.3.11. Corelarea secreției proteinelor de șoc termic în serul animalelor hiperlipidemice cu expresia lor în fracțiile membranare îmbogățite în caveolina-1.....	118
II.3.2.4. Concluzii.....	121
<b>II.3.3. Absorbția crescută a conjugatilor acidului folic de către macrofagele activate în condiții de hiperlipemie.....</b>	<b>125</b>
II.3.3.1. Introducere.....	125
II.3.3.2. Modele experimentale .....	127
II.3.3.3. Proceduri experimentale.....	127
II.3.3.3.1. Pregătirea criosecțiunilor de țesuturi cu leziuni aterosclerotice.....	128
II.3.3.3.2. Preluarea acidului folic-FITC/Texas Red de către macrofagele peritoneale .....	129
II.3.3.3.3. Preluarea acidului folic-FITC/Texas Red de monocite U937 .....	129
II.3.3.4. Rezultate și discuții.....	130
II.3.3.4.1. Internalizarea specifică a acidului folic-FITC/Texas Red de către macrofagele activate.....	130
II.3.3.4.2. Preluarea acidului folic de către celulele asociate plăcii de aterom.....	133
II.3.3.4.3. Preluarea specifică a acidului folic-FITC/Texas Red de către linia de celule U937.....	135
II.3.3.5. Concluzie.....	137
<b>II.4. Concluzii generale.....</b>	<b>139</b>
<b>II.5. Bibliografie.....</b>	<b>143</b>
<b>II.6. Lista lucrărilor științifice publicate și comunicate.....</b>	<b>161</b>

## **CUVINTE CHEIE**

**Celule endoteliale,  
„Raft”-uri lipidice,  
Caveolina-1,  
PTRF,  
Receptorul acidului folic  
Diabet,  
Hiperlipidemia,  
Ateroscleroza,**

**PARTEA I**  
**STADIUL ACTUAL AL CUNOȘȚINȚELOR PRIVIND MICRODOMENIILE**  
**MEMBRANARE**

Modelul „mozaicului fluid” al structurării membranelor celulare (ca și a endomembranelor) are la bază un bistrat lipidic fluid heterogen, asimetric, organizat bidimensional, la care se adaugă: proteine care îi conferă caracterul unui mozaic (proteinele plutesc pe, sau sunt scufundate într-o mare lipidică), citoscheletul asociat membranei (structura aflată pe fața internă a membranelor) și glicocalixul (structura expusă pe fața externă a membranelor, alcătuită din lanțuri oligo-(poli-)zaharidice din compoziția glicolipidelor, glicoproteinelor și proteoglicanilor din membrană).

În completarea modelului „mozaic fluid” sub aspect structural, dar și funcțional au fost definite noțiunile de domenii și/sau microdomenii membranare. Compoziția și existența microdomeniilor (caveole, „raft”-uri lipidice, structuri cu înveliș de clatrină) au o dinamică ce răspunde nevoilor în continuă schimbare ale celulelor, nevoi impuse de activitățile biochimice interne ale celulei, sau de stimuli externi la care celulele trebuie să răspundă. Componentele membranelor fie ele lipide, proteine sau structuri glucidice au atât roluri structurale cât și metabolice. Aceasta dualitate a rolurilor este valabilă atât pentru clasele componentelor biochimice ale membranelor, cât și pentru entitățile moleculare (aceeași moleculă poate îndeplini atât funcții structurale cât și metabolice).

Un progres semnificativ s-a făcut în biologia celulară și moleculară în 2009 când Pike și colaboratorii săi au formulat câteva întrebări al căror răspuns este căutat și în prezent. Pe scurt acestea se adresează următoarelor mecanisme: 1) Cum se modifică nivelul proteinelor membranare ca răspuns la stimulii proveniți din mediul înconjurător care afectează compoziția și comportamentul „raft”-urilor lipidice?; 2) Care sunt funcțiile fiziologice ale „raft”-urilor lipidice?; 3) Cum se realizează fluxul continuu al lipidelor membranare în, și dinspre membrana plasmatică către compartimentele interne; 4) Cum afectează acest flux formarea domeniului și cum poate dieta sau tratamentul medicamentos să modifice compoziția lipidică alterând funcția domeniilor lipidice?

## PARTEA II

### CONTRIBUȚII ORIGINALE

Experimentele efectuate *in vitro* pe sistemele membranare model *black hole* nu explică în totalitate funcțiile complexe ale celulelor intacte. În acest context s-au realizat experimente *in vivo* având ca obiectiv înțelegerea patofiziologiei microdomeniilor membranare. Datele studiilor noastre au arătat că:

În diabetul zaharat insulino dependent, celulele endoteliale exprimă un număr crescut de caveole, expun o suprafață luminală mai mare și un complex membranar intern biosintetic bine dezvoltat. Aceste schimbări se corelează cu creșterea activității ACE, a conținutului de colesterol și a expresiei caveolinei-1 indicând un răspuns al CE la stresul indus de creșterea glicemiei și a concentrațiilor lipidelor serice (Uyy et al., 2010).

Asocierea dietei hiperlipidemice cu diabetul zaharat de tip I accentuează efectele induse de diabet în țesutul pulmonar.

Creșterea concentrației colesterolului în membrana plasmatică indusă de diabet de tip I și/sau dieta hiperlipemică, indică o îmbogățire a membranei celulare cu „raft”-uri lipidice cu o compoziție biochimică modificată care afectează considerabil fluiditatea și permeabilitatea membranei celulare (Uyy et al., 2010, Uyy et al., in press 2012).

În patogeneza diabetului zaharat insulino dependent, creșterea expresiei caveolinei-1, concentrației de colesterol și intensificarea activității enzimatică a ACE poate duce la o inhibare a eNOS localizat pe fața internă a membranei, urmată de scăderea producției de NO, care conduce în final la apariția disfuncției celulelor endoteliale (Uyy et al., 2010).

Rezultatele obținute au un potențial aplicativ prin țintirea simultană a moleculelor de pe suprafața celulelor endoteliale afectate de hiperglicemie și hiperlipidemie (ACE, caveolina-1), mecanism care ar putea fi o strategie terapeutică suplimentară în diabetul zaharat de tip I (Uyy et al., 2010)

Modelele experimentale realizate prin administrarea unei diete hiperlipidemice pe hamsterii Sirieni Aurii și șoarecii *knockout* la APO E, au demonstrat dezvoltarea leziunilor aterosclerotice și instalarea patologiei însoțită de modificări importante la nivelul celulei endoteliale (Haraba, Uyy et al., 2011, 2011, Uyy et al., in press 2012).

Dieta hiperlipemică induce modificarea expresiilor proteinelor membranare implicate în fiziunea veziculelor de transport cofracționate cu caveolina-1. Aceste rezultate susțin rapida dezasamblare a caveolelor ca răspuns al celulei endoteliale la

stresul hiperlipidemic și redistribuirea caveolinei-1 în „raft”-uri lipidice non-caveolare de la nivelul plasmalemei sau în membranele intracelulare (scăderea expresiilor PTRF și dinaminei și creșterea expresiilor proteice a caveolinei-1 și filaminei A) (Uyy et al., in press 2012).

Variația indusă de dietă hiperlipidemică în expresia proteinelor cofracționate cu caveolina-1 implicate în fiziunea veziculelor de transport (PTRF, dinamină, clatrină și filamină A) poate fi o explicație indirectă a creșterii internalizării macromoleculilor prin endocitoza mediată de clatrină dependentă de dinamină în defavoarea celei prin caveole în condițiile patologice induse de ateroscleroză în microvasculatura pulmonară (Uyy et al., in press 2012).

Instalarea aterosclerozei a indus o amplificare a expresiei RAGE și a receptorilor la folat cofracționați cu caveolina-1 din membrana endoteliului pulmonar prin activarea căii de semnalizare AKT. Aceste mecanisme mențin și amplifică procesele inflamatorii în țesutul pulmonar (Haraba, Uyy et al., 2011, 2011).

Tratamentul cu statină scade semnificativ tendința de acumulare a receptorului la folat și RAGE în fracțiile membranare izolate din endoteliul pulmonar și atenuază procesul de activare al căii de semnalizare AKT și implicit al inflamației asociate aterosclerozei.

Dezasamblarea caveolelor indusă de hiperlipidemie și redistribuirea caveolinei-1 în „raft”-uri lipidice non-caveolare nu pare a influența expresia celor două proteine (RAGE și FR) în fracțiile membranare îmbogățite în „raft”-uri lipidice caveolina-1 pozitive și mai degrabă se coroborează cu creșterea expresiei caveolinei-1.

Ateroscleroza induce o creștere a expresiei HSP 70 și o scădere a expresiei HSP 90 cofracționate cu caveolina-1 în fracțiile membranare izolate din țesut pulmonar (Uyy et al., in press 2012).

Tratamentul cu statină inversează semnificativ procesele induse de hiperlipidemie scăzând secreția în ser a HSP-urilor 60 și 70 și crescând secreția și cofracționarea lui HSP 90 cu caveolina-1 (Uyy et al., in press 2012).

Modificarea expresiilor HSP 70 și HSP 90 cofracționate cu caveolina-1 în fracțiile membranare se corelează cu cea din serul hiperlipidemic al animalelor din lotul experimental, ceea ce ne conduce la ipoteza implicării „raft”-urilor lipidice-caveolina-1- pozitive în secreția acestora (Uyy et al., in press 2012).



Pentru că modelele experimentale utilizate prezintă similitudini cu patologia umană, datele obținute pot avea relevanță asupra modulării proceselor moleculare la pacienții cu diabet zaharat de tip I și /sau ateroscleroză.

Prin analiza cantitativă (spectrofluorimetric) și calitativă (microscopie de fluorescență) s-a evidențiat o creștere a preluării conjugatilor acidului folic de către macrofagele peritoneale provenite de la hamsterii hiperlipidemici comparativ cu cele din hamsterii hrăniți cu o dietă standard sau deficitară în acid folic (Antohe, Puchianu et al. 2005).

Analiza histologică a confirmat preluarea prevalentă în plăcile aterosclerotice populate de macrofage, în comparație cu nivelul scăzut de fluorescență detectat în regiunile distale (Antohe, Puchianu et al. 2005).

Experimentele realizate pe macrofagele U937 în cultură în mediu hiperlipidemic au confirmat rezultatele obținute *in vivo* (Antohe, Puchianu et al. 2005).

Preluarea crescută a folatului în macrofagele U937 poate fi explicată prin creșterea expresiei receptorilor la folat (FR) de pe macrofagele activate. Această creștere a expresiei FR poate fi exploatată în terapii țintite ale compușilor acidului folic cu diverse medicamente către leziunile aterosclerotice, bogate în macrofage activate (Antohe, Puchianu et al. 2005).

Conceptul microdomeniilor membranare în explicarea disfuncției celulei endoteliale în diferite patologii este un subiect de mare actualitate. În acest sens caracterizarea conținutului proteic al acestora și valorificarea oportunităților terapeutice localizate și sortate de microdomeniile membranare lipidice ar putea extinde arsenalul opțiunilor de tratament în bolile cardiopulmonare.

## **Bibliografie**

Elena Uyy, Felicia Antohe, Luminita Ivan, Raluca Haraba, Dorel Lucian Radu, Maya Simionescu, Upregulation of caveolina-1 expression is associated with structural modifications of endothelial cells în diabetic lung, *Microvascular Research*, 79, 154-159, 2010.

Elena Uyy, Luminita Ivan, Raluca Boteanu, Viorel Suica and Felicia Antohe, Heat Shock Proteins and Membrane Caveolins Overexpression în Experimental Hyperlipidemia trimisa spre publicare la *Biology of the cell* (FI 4,898)

Felicia Antohe, Luminita Radulescu, Elena Puchianu, Michael D. Kennedy, Philip Low, Maya Simionescu - Increased uptake of folate conjugates by activated macrophages în experimental hyperlipemia, *Cell Tissue Res.*, 320(2):277-285, 2005. (FI 2,991)

Pike L. J., The challenge of lipid „raft”s, Journal of Lipid Research, 2009, 50:S323-328

Raluca Haraba, Elena Uyy, Viorel I. Suica, Luminita Ivan, Felicia Antohe - Fluvastatin reduces the high mobility group box 1 protein expression în hyperlipidemia, International Journal of Cardiology, Jul 1;150(1):105-7, 2011, (FI 7,078)

Raluca Haraba, Viorel I. Suica, Elena Uyy, Luminita Ivan, Felicia Antohe, Hyperlipidemia stimulates the extracellular release of nuclear high mobility group box 1 protein, Cell Tissue Res. Dec; 346 (3) : 361-8. 2011 (FI 3,114)