



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

INTERVENȚII MOLECULARE ASUPRA EXPRESIEI DE
PROTEINE PRO ȘI ANTI-ATEROGENE ÎN VEDEREA
AMELIORĂRII ATEROSCLEROZEI

Conducător științific

Acad. Dr. Maya Simionescu

Doctorand

Ioana Mădălina Fenyo

BUCUREȘTI

2013

CUPRINS

Cuvânt Înainte	3
Lista abrevierilor	4
INTRODUCERE	6
I. PARTEA I – Stadiul actual al cunoștințelor	8
I.1. Capitolul I – NADPH oxidazele - promotori ai stresului oxidativ în ateroscleroză	9
I.1.1. Modificări induse de stresul oxidativ în ateroscleroză	9
I.1.2. Surse generatoare de specii reactive de oxigen în vasculatură	11
I.1.3. Caracterizarea structurală și funcțională a NADPH oxidazelor vasculare	14
I.1.4. Distribuția NADPH oxidazelor în peretele vascular	19
I.1.5. Reglarea exprimării și a activității NADPH oxidazelor la nivel vascular	23
I.1.6. Metode de inhibare a activității NADPH oxidazelor pentru reducerea stresului oxidativ	27
I.2. Capitolul II – Apolipoproteina E – rol și implicații în ateroscleroză	33
I.2.1. Caracterizarea structurală și funcțională a apolipoproteinei E	34
I.2.2. Rolul apoE în metabolismul lipoproteic	41
I.2.3. Rolul apoE în ateroscleroză	43
I.2.4. Modele experimentale murine pentru studiul apoE	48
II. PARTEA a II-a – Contribuții originale	55
Ipoteză și obiective	56
II.1. Obiectivul I – Reducerea stresului oxidativ în ateroscleroză prin inhibarea activității NADPH oxidazei	58
II.1.1. Introducere	58
II.1.2. Materiale și metode	59
II.1.3. Rezultate și discuții	69
II.1.3.1. Evaluarea stării de stres oxidativ și inflamator în peretele vascular al șoarecilor hipercolesterolemici	69
II.1.3.2. Efectul administrării tirfostinei AG490 asupra exprimării	

și activității NAPDH oxidazei în aorta șoarecilor ApoE ^{-/-} hipercolesterolemici	76
II.1.3.3. Efectul administrării compusului WP1066 asupra exprimării și activității NAPDH oxidazei în aorta șoarecilor ApoE ^{-/-} hipercolesterolemici	86
II.1.4. Concluzii si perspective	90
II.2. Obiectivul 2 – Elaborarea unor strategii pentru creșterea expresiei apolipoproteinei E în celule implicate în placa de aterom	93
II.2.1. Studiul modulării de către retinoizi a exprimării genei apolipoproteinei E în macrofage	94
II.2.1.1. Introducere	94
II.2.1.2. Materiale și metode	95
II.2.1.3. Rezultate și discuții	101
II.2.1.4. Concluzii și perspective	105
II.2.2. Generarea unui model murin transgenic, de tip condițional, pentru inducerea controlată a expresiei izoformei E3 a apolipoproteinei E umane în mod specific în endoteliul vascular	106
II.2.2.1. Introducere	106
II.2.2.2. Materiale și metode	110
II.2.2.3. Rezultate și discuții	137
II.2.2.4. Concluzii și perspective	160
C. CONCLUZII GENERALE	161
D. BIBLIOGRAFIE	164
E. LISTA LUCRARILOR PUBLICATE SI COMUNICATE	176

CUVINTE CHEIE: boli cardiovasculare, ateroscleroză, stres oxidativ, NADPH oxidaze, AG490, WP1066, șoareci apoE deficienți, apolipoproteina E, macrofage, retinoizi, transgeneză, terapii alternative

REZUMAT

Ateroscleroza este o boală complexă caracterizată prin acumularea în peretele arterial de depozite lipidice, care în timp se transformă în plăci avansate, complexe ca arhitectură și compoziție celulară și moleculară, care perturbă fluxul de sânge normal, putând genera, ca urmare a eroziunii sau rupturii lor, sindroame coronariene acute precum infarctul de miocard și accidentul vascular cerebral.

De-a lungul timpului au fost propuse mai multe ipoteze pentru a explica formarea plăcilor aterosclerotice. Astăzi, relația causală dintre hipercolesterolemie, dezvoltarea leziunilor aterosclerotice și bolile cardiovasculare este universal dovedită și acceptată. Cu toate acestea, așa-numită „ipoteză a colesterolului” nu poate ilustra în mod exclusiv complexitatea procesului patologic în ateroscleroză, care cuprinde, între altele, activarea și disfuncția celulelor endoteliale (CE), precum și procesul inflamator cu rol major în toate fazele lezionale („ipoteza răspunsului la lezare”), retenția în spațiul subendotelial al lipoproteinelor aterogene („ipoteza răspunsului la retenție”) și modificările lor oxidative („ipoteza modificării oxidative”).

Mai mult decât atât, multitudinea datelor științifice acumulate până în prezent demonstrează că ateroscleroza este o boală multifactorială la care contribuie și o serie de alți factori de risc, cum ar fi hipertensiunea arterială, hiperglicemia și diabetul zaharat, obezitatea, fumatul și istoricul familial.

Abordările folosite în prezent în terapia în ateroscleroză vizează în principal reglarea metabolismului colesterolului și a metabolismului lipoproteic, reducerea procesului inflamator sau prevenția complicațiilor de tip trombotic. Totuși, aceste terapii nu dau rezultate la toți pacienții. În consecință, pentru a crește eficiența tratamentului este nevoie de găsirea de metode terapeutice alternative.

Diferitele strategii terapeutice folosite până în prezent pentru contracararea stresului oxidativ s-au concentrat în principal pe folosirea suplimentelor de antioxidanți și vitamine sau pe găsirea de inhibitori selectivi ai diferitelor surse enzimatică de specii reactive de oxigen (SRO). Deși promițătoare la început, terapia cu antioxidanți nu a dat rezultatele scontate în câteva trialuri clinice randomizate pentru că acești compuși

acționează doar ca scavengeri de SRO și nu ca modulatori în procesele de semnalizare redox intracelulare care au loc la nivelul peretelui vascular.

Datorită contribuției lor majore la generarea de SRO și implicării lor în medierea semnalelor induse de diferiți factori de risc cardiovascular, inhibarea farmacologică a enzimelor NADPH oxidaze (Nox) vasculare este considerată a fi o strategie atractivă și potențial mai eficientă pentru combaterea stresului oxidativ asociat cu diverse stări patologice.

Ca alternativă la inhibarea directă a NADPH oxidazelor, se pot lua în considerare ca opțiuni eficiente efectele pleiotropice ale unor medicamente convenționale folosite în afecțiuni cardiovasculare (de exemplu, statine, inhibitori ai enzimei de conversie a angiotensinei, blocanți ai receptorului la angiotensină II, tiazolidindione), sau *țintirea unor căi de semnalizare specifice implicate în reglarea exprimării și activității NADPH oxidazelor*.

Drept urmare, primul obiectiv al lucrării de față este *„Reducerea stresului oxidativ în ateroscleroză prin inhibarea activității NADPH oxidazei”*.

Pe de altă parte, un proces profund afectat în ateroscleroză este efluxul particulelor de lipoproteine din spațiul subendotelial și din celulele spumoase formate la nivelul leziunilor aterosclerotice. O posibilă abordare pentru ameliorarea acestui aspect este *creșterea exprimării unor proteine cu implicate în proces și care au o acțiune benefică în ateroscleroză, precum apolipoproteina E*.

Drept urmare, cel de-al doilea obiectiv al lucrării de față este *„Elaborarea unor strategii pentru creșterea expresiei apolipoproteinei E în celule implicate în placa de aterom”*.

Lucrarea este structurată în două părți principale și un capitol de concluzii generale.

PARTEA I – Stadiul actual al cunoștințelor, reprezintă o trecere în revistă a datelor din literatură privind cele două proteine studiate și implicarea lor în ateroscleroză. Partea I este compusă din două capitole.

Capitolul 1 – NADPH oxidazele - promotori ai stresului oxidativ în ateroscleroză, prezintă date de literatură legate de: modificările induse de stresul oxidativ în ateroscleroză; sursele generatoare de SRO la nivel vascular; caracterizarea structurală și funcțională a NADPH oxidazelor; distribuția NADPH oxidazelor în peretele

vascular; reglarea exprimării și a activității NADPH oxidazelor la nivel vascular, și metode de inhibare a activității NADPH oxidazelor pentru reducerea stresului oxidativ.

Capitolul 2 – Apolipoproteina E – rol și implicații în ateroscleroză, prezintă date de literatură legate de: caracterizarea structurală și funcțională a genei și a proteinei apo E, izoformele apoE, receptorii pentru apoE; rolul apoE în metabolismul lipoproteic; rolul apoE în ateroscleroză; caracteristicile exprimării și secreției de apoE de către macrofage, și modele experimentale murine pentru studiul apoE.

PARTEA a II-a – Contribuții originale, însumează datele experimentale adunate pentru îndeplinirea a două obiective principale.

Obiectivul 1 – Reducerea stresului oxidativ în ateroscleroză prin inhibarea activității NADPH oxidazei, a urmărit investigarea potențialului pe care doi inhibitori farmacologici ai căii de semnalizare Jak2, compușii AG490 și WP1066, îl au pentru reducerea SRO generate de NADPH oxidaze și pentru reducerea dezvoltării leziunilor aterosclerotice în șoareci ApoE deficienți (apoE^{-/-}) hipercolesterolemici.

1. Evaluarea stării de stres oxidativ și inflamator în peretele vascular al șoarecilor hipercolesterolemici. Experimentele au arătat că hipercolesterolemia este asociată cu stres oxidativ și inflamator crescut în aortele șoarecilor hipercolesterolemici. Acest lucru este demonstrat printr-o creștere semnificativă a nivelelor de exprimare genică și proteică a tuturor izoformelor Nox, caracteristică atât stadiilor incipiente, cât și stadiilor mai avansate ale aterosclerozei. Această creștere se traduce printr-o producție susținută de SRO în peretele vascular.

2. Efectul administrării tirfostinei AG490 asupra exprimării și activității NADPH oxidazei în aorta șoarecilor ApoE^{-/-} hipercolesterolemici. Experimentele au demonstrat că tratarea șoarecilor ApoE^{-/-} hrăniți cu dietă hipercolesterolemică cu tirfostina AG490 a redus semnificativ activitatea Nox și a determinat scăderea nivelelor de exprimare a ARNm și la nivel proteic a fiecărei izoforme Nox. De asemenea, administrarea AG490 la șoarecii ApoE^{-/-} hipercolesterolemici a indus o reducere semnificativă a infiltrării macrofagelor în peretele aortic, comparativ cu animalele injectate cu vehicul. În concordanță cu această observație, analiza morfometrică a leziunilor a demonstrat o reducere semnificativă a leziunilor timpurii în aortele totale și în cârja aortică la animalele tratate cu AG490 comparativ cu șoarecii ApoE^{-/-} hrăniți cu dietă hipercolesterolemică.

3. *Efectul administrării compusului WP1066 asupra exprimării și activității NADPH oxidazei în aorta șoarecilor ApoE^{-/-} hipercolesterolemici.* Rezultatele obținute au demonstrat că tratamentul cu WP1066 scade semnificativ activitatea Nox și nivelele de exprimare ale ARNm pentru izoformele Nox1 și Nox4. Totodată, inhibarea farmacologică a Jak2 de către WP1066 a redus ușor aria de extindere a leziunilor aterosclerotice, dar nu semnificativ.

Rezultatele obținute în experimentele realizate în cadrul Obiectivului 1 reprezintă primul studiu care demonstrează faptul că AG490 are efect anti-aterosclerotic și anti-oxidant *in vivo* prin reglarea enzimelor Nox, evidențiând un nou mecanism al acțiunii tirfostinelor la nivelul sistemului cardiovascular. Împreună, toate aceste rezultate sugerează că modularea căilor de semnalizare activate de Jak poate reprezenta o nouă strategie farmacologică pentru contracararea efectelor nocive ale stresului oxidativ în ateroscleroză.

Obiectivul 2 – Elaborarea unor strategii pentru creșterea expresiei apolipoproteinei E în celule implicate în placa de aterom, a urmărit să găsească modalități prin care să poată fi crescută sau indusă expresia apoE în peretele arterial. Pentru aceasta, experimentele au vizat două tipuri celulare implicate în dezvoltarea și progresia leziunilor aterosclerotice, în speță macrofagele și CE.

1. *Studiul modulării de către retinoizi a exprimării genei apolipoproteinei E în macrofage.* Exprimarea selectivă a apoE în macrofage are potențial pentru reducerea riscului cardiovascular. Țintirea unor procese precum exprimarea și secreția apoE în macrofage permite pe de-o parte investigarea rolului pe care apoE secretat de acestea îl are în economia plăcii de aterom, iar pe de altă parte poate reprezenta o strategie terapeutică în ateroscleroză. Studiul de față și-a propus să afle dacă există un efect direct al retinoizilor asupra exprimării genei apoE în macrofage și să investigheze mecanismul implicat. Rezultatele obținute demonstrează faptul că retinoizii induc creșterea exprimării endogene a genei apoE în macrofage, atât *in vitro*, cât și *in vivo*. Astfel, acidul 9-cis-retinoic induce creșterea nivelului de ARNm al apoE în linia de macrofage murine RAW 264.7, iar vitamina A crește exprimarea genei apoE în macrofagele peritoneale de șoarece. Acidul 9-cis-retinoic nu acționează direct asupra promotorului genei, ci își exercită efectul asupra multienhancerului ME.2, prin intermediul căruia induce creșterea semnificativă a activității promotorului, creștere

demonstrată în experimentele de transfecție prin creșterea activității luciferazei. Analiza unei serii de mutații de deleție ai ME.2 au indicat existența unui sit de legare pentru RXR în regiunea 405 – 420 a ME.2. Creșterea expresiei apoE în macrofage reprezintă un nou efect cu potențial benefic al retinoizilor, sugerând că acești compuși ar putea avea o utilizare terapeutică pentru reglarea metabolismului lipidic, precum și în prevenția și/sau ameliorarea aterosclerozei.

2. *Generarea unui model murin transgenic, de tip condițional, pentru inducerea controlată a expresiei izoformei E3 a apolipoproteinei E umane în mod specific în endoteliul vascular.* CE nu exprimă apoE, însă exprimă receptori din familia LDLR care recunosc și leagă apoE. Mai mult decât atât, CE sunt capabile să facă transcitoză, transportând macromolecule între sânge și spațiul subendotelial. Având în vedere aceste caracteristici funcționale ale CE, inducerea exprimării genei apoE în endoteliu ar putea contribui pe de-o parte la creșterea concentrației plasmatice de apoE, accentuând efectele benefice ale acesteia la nivel sistemic, iar pe de altă parte, la creșterea concentrației de apoE în placă, unde aceasta ar putea participa activ la efluxul de lipoproteine din spațiul subendotelial.

Principiul mecanistic care a stat la baza generării acestui model a fost acela al transactivării transcripționale dependente de tetraciclină. În experimentele prezentate în lucrarea de față am folosit sistemul binar de exprimare genică Tet-On 3G (Clontech) pentru a produce două transgene:

(i) transgena Tek/Tie2promoter-Tet3G-Tek/Tie2enhancer (denumită scurt Tek-Tet3G) (5200pb) care conține gena pentru proteina transactivator Tet-On3G sub controlul promotorului specific endotelial Tek/Tie2 care asigură exprimarea în mod specific în endoteliu. Transgena conține și enhancerul specific endotelial Tek/Tie2, care reglează activitatea promotorului asigurând o expresie susținută.

(ii) transgena TRE-hapoE3 (5523pb) care conține gena de interes pentru izoforma apoE3 umană sub controlul promotorului inductibil P_{TRE3G} .

În prezența inducătorului doxiciclină (Dox), un derivat sintetic al tetraciclinei, Tet-On 3G se leagă specific la P_{TRE3G} și activează transcrierea genei de interes. P_{TRE3G} nu conține situri de legare pentru factori de transcriere endogeni mamiferi, astfel că este practic inactiv în absența inducătorului Dox.

Fiecare dintre cele două transgene a fost folosită pentru crearea unui animal transgenic: un șoarece care să poarte transgena Tek-Tet3G și un șoarece care să poarte transgena TRE-hapoE3. Prin împerecherea celor două animale se va obține un șoarece dublu transgenic care va purta ambele transgene și care va exprima izoforma apoE3 umană doar atunci când i se va administra tratament cu Dox.

Pentru a obține expresia izoformei apoE3 umane în absența genei apoE endogene murine, acest șoarece dublu transgenic va fi împerecheat cu șoarecele ApoE^{-/-} deficient în apoE.

În lucrarea de față sunt prezentate primele trei etape din obținerea acestui model, și anume:

A. Obținerea transgenelor – pentru realizarea construcțiilor pentru transgeneză s-au folosit tehnici clasice de clonare moleculară (transformare bacteriană, digestia enzimatică, defosforilare, ligare). În studiul de față s-au obținut cu succes transgenele necesare generării unui model murin transgenic, de tip condițional, în care expresia izoformei apoE3 umane să poată fi indusă în mod controlat, în absența genei apoE endogene murine. Funcționalitatea construcțiilor realizați a fost demonstrată prin rezultatele obținute după transfectarea mai multor tipuri celulare cu plasmidele care conțin transgenele, urmată de cultivarea celulelor în mediu suplimentat sau nu cu Dox. Funcționalitatea și specificitatea promotorului endotelial Tek/Tie2 a fost de asemenea demonstrată prin măsurarea capacității sale de a activa transcrierea genei luciferazei în mod specific în celule de tip endotelial.

B. Transgeneza – procedura propriu-zisă de transfer a transgenelor în animal. Metoda folosită în studiul de față pentru obținerea animalelor transgenice a fost transgeneza clasică, metodă ce presupune microinjectarea pronucleară de ADN.

Pentru procedura de transgeneză s-au folosit patru tipuri de animale : femele donatoare de ovule fecundate; masculi fertili folosiți pentru obținerea de ovule fecundate; femele pseudo-gestante folosite drept mame surrogat; masculi vasectomizați folosiți pentru obținerea de femele pseudo-gestante. Procedura de transgeneză a presupus: prelevarea de ovule fecundate după inducerea în prealabil a supraovulației cu hormonii placentari la femele donatoare de ovule fecundate, din linia consangvină FVB; transferul de ADN (cele două transgene liniarizate și purificate) s-a făcut prin microinjectare în pronucleul mascul al unui ovul fecundat. Volumul de soluție de ADN

injecat per ovul a fost de ordinul picolitrilor, iar concentrația de ADN folosită a variat între 1 și 5ng/μl; reimplantarea ovulelor viabile în femele B6CBAF1 pseudogestante. Pentru obținerea de masculi vasectomizați s-au folosit masculi B6CBA.

În lucrarea de față, s-au realizat trei runde de transgeneză – două pentru transgena TRE-hapoE3 și una pentru transgena Tek-TetOn.

C. Identificarea fondatorilor – genotiparea prin PCR a puilor rezultați în prima generație și identificarea animalelor pozitive pentru transgenele de interes. În cadrul experimentelor de transgeneză s-a reușit obținerea unui fondator care va fi folosit mai departe pentru întemeierea unei linii de șoareci transgenici pentru TRE-hapoE3 care să poată fi folosită pentru obținerea șoarecelui dublu transgenic în care exprimarea apoE3 umane să poată fi indusă prin administrarea de Dox.

CONCLUZII GENERALE. Teza de față abordează un subiect de actualitate în domeniul științelor biomedicale, și anume găsirea de metode noi, alternative, pentru prevenirea și încetinirea procesului aterosclerotic.

Lucrarea propune o nouă strategie de țintire a activității NADPH oxidazei în vederea ameliorării producției de SRO la nivel vascular în condiții de hipercolesterolemie. Rezultatele obținute au demonstrat că o astfel de abordare, în speță țintirea căilor de semnalizare care controlează funcția NADPH oxidazei, oferă o perspectivă valabilă pentru terapie. În mod specific, modularea căilor de semnalizare activate de Jak poate reprezenta o nouă strategie farmacologică pentru contracararea efectelor nocive ale stresului oxidativ în ateroscleroză.

Lucrarea propune de asemenea două strategii care au vizat modul în care poate fi modulată efluxul particulelor de lipoproteine acumulate în celulele spumoase din placă și în spațiul subendotelial prin creșterea exprimării proteinei apoE, o proteină cu bine cunoscute funcții anti-aterogene. Prima dintre ele identifică vitamina A și retinoizii ca modulatori ai exprimării genei apolipoproteinei E în macrofage și demonstrează că acești compuși pot induce creșterea exprimării endogene a genei apoE în macrofage, atât *in vitro*, cât și *in vivo*. Rezultatele sugerează că acești compuși ar putea avea o utilizare terapeutică pentru reglarea metabolismului lipidic, precum și în prevenția și/sau ameliorarea aterosclerozei.

A doua strategie se referă la inducerea exprimării genei apoE în celulele endoteliale și propune generarea unui model murin transgenic, de tip condițional, în

care expresia izoformei apoE3 umane să poată fi indusă în mod controlat, în absența genei apoE endogene murine. În studiul de față s-au parcurs primele trei etape ale procesului de dezvoltare a unui astfel de model, obținându-se și testându-se cu succes transgenele necesare. În cadrul experimentelor de transgeneză s-a reușit obținerea unui fondator care va fi folosit mai departe pentru întemeierea unei linii de șoareci transgenici pentru TRE-hapoE3 care să poată fi folosită pentru obținerea șoarecelui dublu transgenic în care exprimarea apoE3 umane să poată fi indusă prin administrarea de Dox. Crearea acestui model va oferi posibilitatea investigării funcției apoE în ateroscleroză și al modului în care o creștere a concentrației acestei proteine la nivelul plăcii, dar și în circulație, poate ameliora procesul patologic.