

**ACADEMIA ROMANA  
INSTITUTUL DE BIOLOGIE SI PATOLOGIE CELULARA  
“NICOLAE SIMIONESCU”**

**TEZA DE DOCTORAT  
*REZUMAT***

**Implicarea protein tirozin fosfatazelor (PTP)  
in semnalizarea intracelulara**

**Conducator stiintific:  
Academician Maya Simionescu**

**Doctorand:  
Andreea Miruna Nemezc**

**Bucuresti  
-2012-**

## CUPRINS

### Partea I- Stadiul actual al cunostintelor

#### I. Fosfatazele, reglatorii homeostaziei

1. Definitia, mecanismul de actiune si clasificarea
2. Protein fosfatazele (PPazele)-clasificarea

#### II. Protein Tirozin Fosfatazele (PTPazele)

1. Clasificarea PTPazelor
2. Structura PTPazelor
3. Genetica PTPazelor
4. Recunosterea substratului de catre PTPaze si mecanismul lor catalitic
5. Reglarea PTPazelor
  - a. Clivajul proteolitic
  - b. Fosforilarea
  - c. Dimerizarea
  - d. Oxidarea
  - e. Alte modificari posttranslationale (sumoilarea, acetilarea)
  - f. Inhibarea activitatii/expresiei PTPazelor

#### III. PTPazele si semnalizarea intracelulara

1. Localizari si substrat celulare
2. PTPaze vasculare-rol in fiziologia si patologia vasculara
  - A. *PTPazele in celulele endoteliale*
    - a. PTPaze implicate in angiogeneza
      - VEGFR si PTPazele
      - Tie2 si PTPazele
    - b. PTPaze implicate in adeziune si motilitate
      - Integrinele si PTPazelor
      - PECAM si PTPazele
    - c. PTPaze implicate in adeziune intercelulara
      - Caderinele si PTPazele
  - B. *PTPaze in celule musculare netede*

PTPaze implicate in angiogeneza

    - PDGFR si PTPazele
    - AT si PTPazele
    - NO si PTPazele
3. Implicarea PTPazelor in diabetul zaharat
4. Rolul PTPazelor in alte patologii

### Partea II - Contributii originale

#### A. INTRODUCERE SI OBIECTIVE

#### B. METODOLOGIE EXPERIMENTALA

#### C. STUDII EXPERIMENTALE

##### I. Model experimental „in vitro”- celule musculare netede in cultura; Efectele stresului oxidativ, al stimulării cu insulina si al inhibitorilor, asupra celulelor musculare netede din peretele vascular: molecule afectate

1. Efectul *glucozei crescute*, *stresului oxidativ* si *insulinei* asupra :
  - caii mitogenice controlate de ERK ½
  - caii metabolice controlate de activarea Akt
  - caii de semnalizare controlata de **PTP-1B** defosforilantaRezultate si discutii
2. Efectul *glucozei crescute* si a *factorului de crestere PDGF-BB* asupra **PTP-1B** si moleculelor din calea de semnalizare a insulinei  
Rezultate si discutii
3. Modularea expresiei si activitatii moleculelor din calea de semnalizare a insulinei (ERK ½, Akt si **PTP-1B**) cu *ajutorul oxidantilor/antioxidantilor si inhibitorilor*
  - a. *Efectul oxidantilor si inhibitorilor*

Rezultate si discutii

b. Influenta *antioxidantilor asupra oxidarilor* produse de concentratia ridicata de glucoza, precum si de factorul de crestere PDGF-BB

Rezultate si discutii

**II. Model experimental „in vivo”- hamsteri sirieni aurii cu diabet streptozotocinic;**

**Procesele de fosforilare/defosforilare in aorta**

Rezultate si discutii

**III. Pacienti cu obezitate si diabet II; Molecule din calea de semnalizare a insulinei**

Rezultate si discutii

**D. Concluzii generale**

**BIBLIOGRAFIE**

**LISTA LUCRARILOR STIINTIFICE PUBLICATE SI COMUNICATE**

## CUVINTE CHEIE

Fosfataze

Kinaze

Defosforilare

Semnalizare intracelulara

Protein tirozin fosfatazele

Reglatori negativi

Patologie vasculara

Insulina

Diabet

Homeostazie

Glicemie

Fosfatazele sunt enzime care prin procesul de defosforilare, indeparteaza de la nivelul substratului o grupare fosfat, prin hidroliza monoesterilor acidului fosforic in ioni fosfat si molecule cu grupari hidroxil libere. Acest proces este opus procesului de fosforilare, catalizat de enzime numite kinaze, care ataseaza grupari fosfat la nivelul substratului utilizand moleculele energetice, precum ATP.

Ambele tipuri de enzime sunt responsabile de controlul starii de fosforilare a celulei, echilibrul dintre procesele reglate de acestea ocupand astfel un rol important in cadrul semnalizarii intracelulare.

Protein fosfatazele (PPazele) sunt fosfataze care defosforileaza exclusiv substraturi proteice, tinta lor reprezentand anumiti aminoacizi din structura unei proteinei. Cei mai intalniti aminoacizii defosforilati sunt: serina (Ser), treonina (Thr) si mai rar tirozina (Tyr), intrucat proteinele sunt predominant fosforilate de protein kinaze (PKaze) la gruparile acestor aminoacizi.

Protein tirozin fosfatazele (PTPazele) sunt enzime care inlatura grupuri de fosfat din cadrul resturilor de Tyr fosforilata ale diferitelor proteine. Fosforilarea proteinelor la aminoacidul Tyr (pTyr), este o modificare post-translationala obisnuita care formeaza noi motive de recunoastere pentru interactia proteinelor si localizarile celulare, aceasta modificare putand afecta stabilitatea proteinelor si regula activitatea enzimatica. Fosforilarea proteinelor la resturi de tirozina reprezinta un mecanism cheie pentru transmiterea semnalului si pentru reglarea unui spectru larg de procese fiziologice precum controlul greutatii, proliferarii si diferentierii celulare.

PTPazele sunt reglatori ai transmiterii semnalului, atat in conditii fiziologice, dar si patologice. Aceste proteine exercita un efect reglator asupra transmiterii de semnal la diferite nivele prin defosforilarea receptorilor de membrana cum ar fi PTKazele si canalele ionice. Ele pot modula cascada de semnalizare prin defosforilarea moleculelor adaptor, kinazelor intracelulare si a factorilor de transcriere. PTKazele au fost identificate ca fiind tinte pentru PTPaze. O serie de PTPaze defosforileaza mai multe PTKaze, si aproape fiecare PTKaza este defosforilata de mai mult decat o PTPaza.

PTPazele exprimate in celulele vasculare in functie de specificitatea de substrat, contribuie la patologia vasculara. PTPazele sunt reglatori importanti ai etapelor semnalizarii dependente de fosforilarea tirozinica, devenind astfel noi tinte terapeutice intr-o serie de afectiuni patologice. PTPazele sunt reglatori negativi ai proliferarii celulare si ai numeroaselor cascade mitogenice: Ang II, INS, IGF-1, EGF, PDGF in numeroase tipuri celulare, printre care si celulele musculare netede vasculare (Marrero, 2004).

Intrucat un pas reglator important in transmiterea semnalului de-a lungul caii activate de insulina il reprezinta defosforilarea moleculelor de semnalizare de catre PTPaze, este destul de probabil ca amplificarea activitatii uneia sau a mai multor PTPaze sa conduca la rezistenta la insulina (Choi si colab., 2010).

In prima parte a tezei „ **Stadiul actual al cunostintelor**”, sunt prezentate pe parcursul a trei capitole diferite aspecte privind PTPazele

Capitolul I descrie fosfatazele, clasificarea si mecanismul lor de actiune. De asemenea este subliniata importanta echilibrului dintre procesele catalizate de fosfataze si cele catalizate de kinaze in cadrul semnalizarii intracelulare, fosfatazele avand un rol deosebit de important in homeostazie.

Capitolul al-II-lea prezinta PTPazele, clasificarea, structura si genetica acestora. Tot in acest capitol sunt prezentate aspecte privind recunosterea substratului si mecanismul de actiune al PTPazelor, dar si principalele procese prin care ele sunt reglate.

Capitolul al-III-lea descrie localizarea PTPazelor si moleculele substrat ale acestora, insistandu-se pe PTPazele localizate la nivelul peretelui vascular. In functie de tipul celular la nivelul caruia sunt localizate, PTPazele vasculare participa la procese precum angiogeneza, adeziunea si motilitatea celulara. Ele regleaza caile de semnalizare ale factorilor de crestere si moleculelor de adeziune, avand in acest fel un rol important in fiziologia si patologia vasculara. Tot in cadrul acestui capitol sunt prezentate PTPazele care intervin de-a lungul caili de semnalizare a receptorului la insulina, controlandu-i astfel activitatea. PTPazele atenuaza semnalizarea la insulina prin defosforilarea receptorului sau, avand astfel un rol important in calea de semnalizare a insulinei. Alaturi de diabetul zaharat, sunt prezentate aici si alte patologii in care PTPazele au rol de reglatori centrali. Se subliniaza importanta starii de oxidare a PTPazelor in activitatea lor intracelulara, precum si a proceselor oxidative/antioxidative desfasurate la acest nivel.

Cercetarile noastre s-au concentrat asupra identificarii unor noi metode de manipulare a activitatii PTPazelor, prin utilizare inhibitorilor si efectele oxidantilor/antioxidantilor asupra moleculelor cheie din calea de semnalizarea a insulinei. In acest sens, in cadrul partii a II-a a tezei "**Contributii originale**", am incercat sa urmaresc doua mari obiective:

1. Determinarea modificarilor inregistrate la nivelul PTP-1B si a kinazelor implicate in calea de semnalizare a insulinei in hiperglicemie (**capitolul I, II si III**)
  - 1a. Consecintele prezentei apei oxigenate si a insulinei.
  - 1b. Efectele stimulante ale factorul de crestere PDGF-BB

*Modele experimentale:*

- „*in vitro*”, celule musculare netede izolate din aorta umana, linie celulara
- „*in vivo*”, hamsteri sirieni aurii injectati cu streptozotocina
- material biologic uman, provenit de la pacienti obezi si obezi cu diabet II

2. Investigarea mecanismelor prin care oxidantii/antioxidantii si inhibitorii actioneaza asupra PTP-1B si a kinazelor din calea de semnalizare a insulinei (**capitolul I**)

2a. Rolul actiunii glucozei crescute si a ortovanadatului de Na.

2b. Modularea expresiei moleculelor in conditii de hiperglicemie si stimulare cu PDGF-BB sub actiunea catalazei si a superoxid dismutazei.

*Model experimental:*

- „in vitro”, celule musculare netede izolate din aorta umana, linie celulara

## CONCLUZII GENERALE:

Cunoasterea cailor si moleculelor de semnalizare ale celulelor peretelui vascular, sunt esentiale pentru intelegerea disfunctiilor endoteliale asociate diabetului.

In contextul intelegerii patofiziologiei PTPazelor, structurii si activitatilor enzimatice, studiile realizate in aceasta teza de doctorat au urmarit 2 obiective majore:

1. modificarile inregistrate la nivelul moleculelor caii de semnalizare a insulinei in conditii de glucoza crescuta urmarind asocierea hiperglicemiei cu factorii de crestere si oxidanti (**capitolul I,II si III**).
2. mecanismele prin care antioxidantii si inhibitorii actioneaza asupra moleculelor din calea de semnalizare a insulinei, restabilind functia fiziologica (**capitolul I**).

*Rezultatele originale obtinute si prezentate pe parcursul celor 3 capitole in partea de „Contributii originale”, au dovedit ca:*

1. Glucoza crescuta, stresul oxidativ si insulina, sunt factori care duc la un dezechilibru al moleculelor caii de semnalizare a insulinei la nivelul CMNV. Hiperglicemia determina supraexpunerea acestor molecule cu exceptia Akt activat; stresul oxidativ are acelasi efect, mai putin asupra PTP-1B; in timp ce insulina are efecte antagonice asupra celor doua molecule.

Originalitatea studiului: **am aratat ca expunerea CMNV pe timp indelungat la HG, are un puternic efect activator asupra Akt. De asemenea, tot la nivelul CMNV, ERK ½ manifesta sensibilitate la H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ramanand insa insensibil la actiunea insulinei. Expunerea prelungita a celulelor la o concentratie si mai mare de glucoza (ex. 30 mM) duce la aparitia unei a doua benzi situata desupra benzii de masa moleculara de 51 kDa.**

2. Stimularea CMNV cu PDGF-BB determina o supraexprimare a moleculelor din calea de semnalizare a insulinei. In timp ce expresia proteica a PTP-1B creste proportional cu concentratia de PDGF-BB utilizata, pAkt si pERK  $\frac{1}{2}$  ating un maxim la 2 ng/ml.

Originalitatea consta in: ***stimularea cu PDGF-BB a CMNV crescute in conditii de hiperglicemie, amplifica efectul avut de acesta asupra moleculelor din calea de semnalizare a insulinei.***

3. Cresterea CMNV in glucoza crescuta, precum si stimularea acestora cu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> duce la o scadere a activitatii PTPazelor datorata oxidarilor produse. Inhibitorul nespecific al PTP-azelor, NaVO<sub>4</sub>, determina scaderea expresiei proteice a PTP-1B, inhibitia acestei fosfataze determinand ulterior modificari ale expresiei pAkt, dar si pERK  $\frac{1}{2}$ .

Originalitatea studiului : ***am demonstrat ca o parte din oxidarile endogene (HG) si exogene (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) responsabile de scaderea activitatii PTPazelor sunt reversibile. De asemenea, in hiperglicemie, la nivelul enzimei PTP-1B se produc o serie de oxidari, o parte din ele reversibile, oxidari ce ar putea influenta activitatea catalitica a acestei fosfataze si implicit reglarea cii de semnalizare in care aceasta joaca un rol important. In conditii hiperglicemice, inhibitorul NaVO<sub>4</sub>, scade expresia PTP-1B in CMNV.***

4. Supraexprimarea moleculelor cheie din calea de semnalizarea a insulinei, consecinta a expunerii CMNV conditiilor hiperglicemice oxidante, poate fi reversata cu ajutorul antioxidantilor. De asemenea, atat catalaza cat si SOD restabilesc nivelele proteice ale acestor moleculelor, amplificate in urma oxidarilor produse prin stimularea CMNV cu PDGF-BB.

Originalitatea consta in: ***cei doi antioxidanti au efect asupra oxidarilor produse de HG si PDGF-BB individual, dar mai ales asupra puternicului efect oxidant produs de stimularea cu PDGF-BB a CMNV crescute in conditii hiperglicemice/oxidarilor asociate hiperglicemiei survenite la nivelul moleculelor stimulate cu PDGF-BB***

5. In cazul hamsterilor injectati cu streptozotocina, hiperglicemia diabetica determina un dezechilibru in exprimarea proteica a fosfatazelor (PTP-1B) vs. kinazelor (PI<sub>3</sub>K si Akt) implicate in calea de semnalizarea a insulinei. Dezechilibrul este asociat cu hiperpermeabilitatea endoteliala si cu apoptoza celulelor musculare netede, si poate sublinia disfunctia peretelui aortic indusa de modificarile acestor celule.

Originalitatea consta in: ***demonstrarea efectelor concentratiei crescute de glucoza circulanta asupra balantei kinazelor/PTP-1B care actioneaza la nivelul peretelui aortic, in cazul diabetul de tip I.***



6. Atât obezitatea, dar mai ales obezitatea asociată diabet II, influențează expresia moleculelor din calea de semnalizare a insulinei. În arteriolele țesutului adipos subcutan, obezitatea induce o scădere a expresiei proteice a moleculelor din calea de semnalizare a insulinei, proces încetinit în cazul asocierii obezității cu diabetul tip II.

Originalitatea constă în: ***am arătat în paralel ca arteriole subcutane umane de la pacienții obezi și obezi cu diabet tip II prezintă modificări la nivelul moleculelor căii de semnalizare a insulinei cu rol important în evoluția celor două patologii.***

Dezechilibrul glicemic induce procesele de fosforilare/defosforilare, însoțite de multiplele oxidări reversibile și ireversibile. Toate acestea pot interveni în disfuncția vasculară a peretelui aortic asociată diabetului. Utilizarea antioxidantilor și inhibitorilor de PTPaze poate corecta dereglările survenite la nivelul celulelor musculare și endoteliale și poate îmbunătăți funcția vasculară. În acest sens utilizarea PTPazelor drept ținte terapeutice poate aduce elemente noi în patofiziologia cardiovasculară.

#### **BIBLIOGRAFIE:**

1. Marrero, M.B. Introduction to JAK/STAT signaling and the vasculature. *Vascul Pharmacol.* 2005; **43**: 307–309
2. Choi, K. And Kim, Y.-B., Molecular Mechanism of insulin Resistance in Obesity and type 2 Diabetes. *Korean J Intern Med.* 2010; **25**: 119-129

#### **LISTA LUCRARILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE ȘI COMUNICATE:**

##### **Lucrări publicate în reviste internaționale cotate ISI**

1. Popov Doina, **Nemecz Miruna**, Dumitrescu Madalina, Georgescu Adriana, Böhmer Frank D. Long-term high glucose concentration influences Akt, ERK1/2, and PTP1B protein expression in human aortic smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 388(1):51-55, 2009 (IF: 2.64)

2. Adriana Georgescu, Doina Popov, Anamaria Constantin, **Miruna Nemecz**, Nicoleta Alexandru, Daniel Cochior, Aura Tudor. Dysfunction of human subcutaneous fat arterioles in obesity alone or obesity associated with Type 2 diabetes. *Clinical Science*, 120(10): 463-472; 2011 (IF: 4.2)- premiat în 2011

3. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, **Miruna Nemecz**, Irina Titorencu, Doina Popov. Enoxaparin reduces adrenergic contraction of resistance arterioles in aging and in aging associated with diabetes via engagement of MAP kinase pathway. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 22(4): 310:316, 2011 (IF: 1.4)-premiat in 2011

### **Lucrari publicate in reviste nationale recunoscute CNCSIS**

**Miruna Nemecz**, Doina Popov, Adriana Georgescu. Phosphorylation/dephosphorylation signaling events in the aorta of streptozotocin-injected Golden Syrian Hamsters. *Annals of RSCB*, vol XV, issue 1, 28-34, 2010, edited by A. Ardelean et. al. (indexat CNCSIS B+ )

### **Rezumate ale lucrarilor prezentate la manifestari stiintifice internationale**

1. Microparticles as potential markers in venous insufficiency. A. Georgescu, N. Alexandru, H. Maniu, **M. Nemecz**, D. Popov in *Book of Abstracts , at Romanian Society for Cell Biology at 25 years-Aniversary Workshop: "From Basic Science to Therapeutic Applications"*. p.4, 2007, Bucharest, Romania

2. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Manuela Amuzescu, **Miruna Nemecz**, Constantin Zamfir, Horia Maniu, Adrian Badila. Chronic venous insufficiency is associated with elevated level of circulating microparticles, in *Journal of Vascular Research*, vol. 45, supplements 2, p.146, at "25th Conference of the European Society for Microcirculation: Integrating Vascular Biology & Medicine Basic and Clinical Science", August 26-29, 2008, Budapest, Hungary

3. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Manuela Amuzescu, **Miruna Nemecz**, Eugen Andrei, Constantin Zamfir, Horia Maniu, Adrian Badila, Maya Simionescu. Elevated level of circulating microparticles in chronic venous insufficiency. in *Book of Abstracts*, p. 31, at Biomedicine Workshop "From fundamental research to therapeutic applications", "Conference, Diaspora in Romanian Sciences Research", September 17-18, 2008, Bucharest, Romania

4. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Manuela Amuzescu, **Miruna Nemezc**, Constantin Zamfir, Horia Maniu, Adrian Badila. Chronic venous insufficiency is associated with elevated level of circulating microparticles. *Journal of Clinical Lipidology*, vol. 2, no. 5S, p. 64-67- at 7<sup>th</sup> International Symposium on "MULTIPLE RISK FACTORS IN CARDIOVASCULAR DISEASES – Prevention and Intervention – Heath Policy", October 22-25, 2008, Venice, Italy

5. **M. Nemezc**, A. Georgescu, D. Popov. Protein Tyrosine Phosphatase 1B expression in the smooth muscle cells in aorta in hyperglycemia conditions, at "Biomedicine Workshop, *From fundamental research to therapeutic applications*", "Conference, *Diaspora in Romanian Sciences Research*", September 17-18, 2008, Bucharest, Romania

6. A. Georgescu, N. Alexandru, D. Popov, M. Amuzescu, E. Andrei, **M. Nemezc**, C. Zamfir, A. Badila, M. Simionescu. Elevation of endothelial and platelet microparticles in patients with chronic venous insufficiency, at *XXII Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis*, July 11-16, 2009, Boston, USA

7. L-D. Popov, **M. Nemezc**, M. Dumitrescu, A. Georgescu, F. D. Böhmer. Long time culture of human aortic smooth muscle cells in high glucose concentration up-regulates ERK1/2 activation and PTP1B protein expression, at 45<sup>th</sup> *EASD Annual Meeting*, Vienna, Austria, 29.09.2009-02.10.2009, published in *Diabetologia*, 52, Suppl. 1, p.S515, no. 1336, 2009

8. **Miruna Nemezc**, Adriana Georgescu, Doina Popov. Influence of antioxidants on human vascular smooth muscle cells grown in high glucose, in *Bulletin of Romanian Society for Cell Biology*, p. 91, no.39, at The 3<sup>rd</sup> International Congress and 29<sup>th</sup> Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology, June 8-12, 2011, Arad-Szeged, Romania-Hungary

9. **Miruna Nemezc**, Adriana Georgescu, Doina Popov. The effect of antioxidants on high glucose and platelet derived growth factor stimulated human vascular smooth muscle cells. 'Inflammation and Cardiovascular Disease' Summer School, Obergurgl, Austria, September 29 - October 2, 2011

10. Adriana Georgescu, **Miruna Nemezc**, Nicoleta Alexandru, Aura Tudor, Daniel Cochior, Doina Popov. Dysfunction of Human Subcutaneous Fat Arterioles in Obesity Alone or Obesity Associated with Type 2 Diabetes, at '4th Annual Meeting of the Diabetes and Cardiovascular Disease EASD Study Group', October 27–29, 2011, Munich, Germany, Book of Abstracts, p.37.

**11. M. Nemezc**, A. Georgescu, D. Popov, M. Simionescu. Influence of catalase and superoxide dismutase on human vascular smooth muscle cells grown in high glucose. at *'4th Annual Meeting of the Diabetes and Cardiovascular Disease EASD Study Group'*, October 27-29, 2011, Munich, Germany, Book of Abstracts, p.33

### **Rezumate ale lucrarilor prezentate la manifestari stiintifice nationale**

**1.** A. Georgescu, N. Alexandru, M. Amuzescu, **M. Nemezc**, C. Zamfir, H. Maniu, A. Badila, D. Popov. Insuficienta venoasa cronica este asociata cu un nivel crescut de microparticule circulante/ Chronic venous insufficiency is associated with elevated level of circulating microparticles, *in Buletinul SNBC/ in Bulletin of Romanian Society for Cell Biology* , pag . 50/p. 50, nr.36/no.36, *la a XXVI-A Sesiune Stiintifica Anuala a Societatii Nationale de Biologie Celulara/ at The 26<sup>th</sup> Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology* , 12-15 iunie 2008/ June 12-15, 2008, Cluj-Napoca, Romania

**2. Miruna Nemezc**, Adriana Georgescu, Doina Popov. Expresia protein tirozin fosfatazei 1B in celulele musculare netede si aorta in conditii de glucoza crescuta/The expression of protein tyrosine phosphatase 1B in smooth muscle cells and aorta in hyperglycemia conditions, *in Buletinul SNBC/ in Bulletin of Romanian Society for Cell Biology* , pag . 52/p.52, nr.36/no.36, *la a XXVI-A Sesiune Stiintifica Anuala a Societatii Nationale de Biologie Celulara/ at The 26<sup>th</sup> Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology*, 12- 15 iunie/June 12-15, 2008, Cluj-Napoca, Romania