



ACADEMIA ROMÂNĂ
INSTITUTUL DE BIOLOGIE SI PATOLOGIE
CELULARA „NICOLAE SIMIONESCU”

TEZĂ DE DOCTORAT

Rezumat

IMPLICAREA ALARMINEI HMGB1 ÎN PROCESELE
INFLAMATORII ASOCIATE DISFUNȚIILOR VASCULARE ÎN
HIPERLIPIDEMIA ȘI DIABETUL EXPERIMENTA

Conducator Științific:
Dr. FELICIA ANTOHE

Doctorand: RALUCA MARIA BOTEANU

BUCUREȘTI
- 2012 -

INTRODUCERE

În ultimii ani, au fost detectate câteva proteine endogene capabile să indice celulele și țesuturile lezionate. Aceste proteine pot iniția răspunsuri inflamatorii și au fost clasificate din anul 2006, sub denumirea de alarmine (Bianchi M.E., 2007). Alarmina *high mobility group box 1* (HMGB1) a fost studiată și implicată în numeroase patologii, dar rolul ei nu a fost, încă, pe deplin înțeles, ceea ce ne-a determinat ca în această lucrare să investigăm modul în care proteina HMGB1 intervine în procesul inflamator prezent în hiperlipidemia și diabetul tip 1 indus experimental.

HMGB1 este o proteină nucleară cu o mobilitate crescută și numeroase funcții desfășurate la nivelul nucleului, dar care surprinzător deține un rol extracelular foarte important, reprezentat de capacitatea de a semnaliza distrugerea celulară și tisulară. Studiile realizate până în acest moment au arătat că proteina HMGB1 intervine în patogenia bolilor care prezintă, mai ales, stări inflamatorii acute și cronice. Totuși, există numeroase întrebări fără răspuns în acest moment, cu privire la modalitățile prin care alarmina HMGB1 induce și întretine inflamația. Astfel, am considerat esențială realizarea unor experimente care să ne permită cunoașterea și înțelegerea modului în care proteina HMGB1 este implicată în mecanismele moleculare care intervin în declanșarea și menținerea proceselor inflamatorii asociate disfuncțiilor vasculare din starea hiperlipidemică și diabetică.

Lucrarea de doctorat este structurată în două părți, care cuprind în total 7 capitole, 68 figuri și 3 tabele. Prima parte, consacrată cunoștințelor actuale în domeniul abordat, include 2 tabele și 20 figuri, dintre care 4 sunt originale, fiind realizate pe baza datelor din literatură, iar restul de 16 figuri sunt modificate sau preluate ca atare, menționându-se de fiecare dată în text sursa și prelucrările suferite. În partea a doua, atribuită contribuțiilor originale se găsesc un tabel și 48 figuri originale, însumând grafice, diagrame, electroforeze și montaje cu imagini de microscopie optică sau electronică. Teza conține 227 titluri bibliografice și are următorul cuprins:

CUPRINS

Introducere

Partea I STADIUL ACTUAL AL CUNOSTINTELOR

I. HMGB1 – Clasificare, Structura si Localizare

1. Familia proteinelor high mobility group (HMG)
 - 1.1. Familia de proteine HMGA
 - 1.2. Familia de proteine HMGB
 - 1.3. Familia de proteine HMGN
2. Structura proteinei HMGB1
 - 2.1. Domeniile HMG box
 - 2.2. Regiunea acida
 - 2.3. Modificari post-translacionale
3. Distributia proteinei HMGB1
 - 3.1. Repartitia HMGB1 la nivel tisular, celular si subcelular
 - 3.2. Localizarea extracelulara a proteinei HMGB1
 - 3.2.1. Secretia activa
 - 3.2.2. Eliberarea pasiva

II. Receptori proteinei HMGB1 si semnalizarea intracelulara

1. Receptorul produsilor finali de glicare avansata (RAGE)
2. Receptorii tip Toll
3. Proteoglicani
4. Trombomodulina

III. Functiile proteinei HMGB1

1. Functia nucleara
2. Functia de alarmina
 - 2.1. Efectele proinflamatorii ale proteinei HMGB1
 - 2.1.1. HMGB1, hiperlipidemia si ateroscleroza
 - 2.1.2. HMGB1 si diabetul tip1
 - 2.2. Efectele regenerative ale proteinei HMGB1

Concluzii

Partea a II-a
CONTRIBUTII ORIGINALE

1. Scop si obiective

2. Metodologie experimentală

3. Studii experimentale

I. Declansarea, intretinerea si stoparea procesului inflamator initiat de proteina HMGB1 in hiperlipidemia experimentală

Introducere

Metoda experimentală

1. Analiza parametrilor biochimici si a modificarilor morfologice la hamsterii hiperlipidemici

Discutii

Concluzii

2. Dieta hiperlipidemică stimulează eliberarea proteinei HMGB1

- 2.1. Detectia proteinei HMGB1 in ser

- 2.2. Localizarea subcelulară a proteinei HMGB1 in tesutul cardiac

- 2.3. Repartitia subcelulară a proteinei HMGB1 in tesutul pulmonar

Discutii

Concluzii

3. Semnalizarea prin HMGB1 in conditii de stres hiperlipidemic

- 3.1. Detectia nivelului receptorului RAGE, a kinazei AKT1 si a gradului ei de fosforilare in tesutul cardiac

- 3.2. Identificarea si cuantificarea RAGE, AKT1 si fosfo-AKT1 in tesutul pulmonar

Discutii

Concluzii

4. Efectul produs de fluvastatina sodică asupra proteinei HMGB1 in hiperlipidemia indusă experimental

- 4.1. Expresia genică si nivelul proteinei HMGB1 in ser, inima si plaman

- 4.2. Cuantificarea receptorului RAGE in tesutul cardiac si pulmonar

- 4.3. Determinarea nivelului de AKT1 si fosfo-AKT1 in tesutul cardiac si pulmonar

Discutii

Concluzii

II. Modularea expresiei proteice a alarminei HMGB1 in macrofagele activate cu ser hiperlipidemic reprezinta o etapa importanta a procesului inflamator

Introducere

Metoda experimentală

1. Repartitia lipidelor in macrofagele U937 activate cu ser hiperlipidemic

Discutii

Concluzii

2. Expresia proteica a alarminei HMGB1 in macrofagele U937 activate cu ser hiperlipidemic

Discutii

Concluzii

3. Imunodectia receptorului RAGE si caracterizarea raportului AKT1/ fosfo-AKT1 in macrofagele activate cu ser hiperlipidemic

Discutii

Concluzii

III. Cresterea expresiei proteinei HMGB1 la nivel genic si proteic induce si mentine inflamatiya pulmonara in diabetul zaharat tip I

Introducere

Metoda experimentală

1. Analiza parametrilor biochimici si a modificarilor morfologice la animalele luate in studiu

Discutii

Concluzii

2. Expresia genica si distributiya subcelulara a proteinei HMGB1 in tesutul pulmonar

Discutii

Concluzii

3. Identificarea cailor de semnalizare activate de HMGB1 in tesutul pulmonar al soarecilor cu diabet experimental tip I
 - 3.1. Evaluarea expresiei proteice a receptorului RAGE
 - 3.2. Cuantificarea nivelului de fosforilare a AKT

3.3. Expresia proteica a factorului de transcriere NF-Kb

Discutii

Concluzii

4. Concluzii generale

Bibliografie

Lista lucrarilor publicate si comunicate

*

In rezumatul de fata sunt prezentate pe scurt obiectivele, metodologia si concluziile generate pe baza rezultatelor obtinute in urma studiilor cuprinse in partea a II-a a lucrarii, **CONTRIBUTII ORIGINALE.**

Scop si obiective

Scop:

Studiile realizate in aceasta teza au urmarit rolul si modul in care proteina HMGB1 intervine in procesul inflamator instalat in conditii hiperlipidemice – aterosclerotice si de diabet tip I indus experimental.

Obiective:

- a. Analiza distributiei celulare si subcelulare a proteinei HMGB1 in sistemul cardio-pulmonar supus procesului inflamator existent in conditii hiperlipidemice.
- b. Contributia alarminei HMGB1 in semnalizarea celulara prezenta in inflamatia indusa de stresul hiperlipidemic.
- c. Studiarea proteinei HMGB1 in macrofagele activate prin expunere la serul hiperlipidemic.

- d. Examinarea moleculii HMGB1 din punct de vedere genic si proteic dupa administrare tratamentului cu fluvastatina sodica la animalele cu placi aterosclerotice dezvoltate prin dieta hiperlipidemică.
- e. Evaluarea efectului indus de admistrarea fluvastatinei sodice asupra proteinelor din cascada de semnalizare initiata de HMGB1 in timpul hiperlipidemieii induse experimental.
- f. Investigarea localizarii proteinei HMGB1 in tesutul pulmonar supus stresului hiperglicemic din diabetul zaharat tip 1.
- g. Detectia cailor de semnalizare activate de alarmina HMGB1 in palmanul diabetic.

Metodologie experimentală

- 1. Modele experimentale
 - 1.1 Hamsterul hiperlipidemic
 - 1.2 Soareci cu diabet tip 1 indus experimental
 - 1.3 Culturi celulare
- 2. Criosectiuni
- 3. Microscopie electronica
- 4. Determinari biochimice
- 5. Tehnica ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)
- 6. Extractia de proteine
- 7. Electroforeza SDS-PAGE
- 8. Tehnica Western blot
- 9. Izolare ARN total
- 10. Real Time PCR semi-cantitativ
- 11. Analiza Statistica

Concluzii generale

Rezultatele studiilor efectuate in aceasta lucrare au aratat ca:

1 – Dieta hiperlipidemica poate induce eliberarea alarminei HMGB1 in ser, conferindu-i statutul de marker al evenimetelor aterosclerotice declansate ulterior de starea hiperlipidemica.

Pentru a demonstra daca dieta hiperlipidemica afecteaza cantitatea de HMGB1, s-a masurat, nivelul seric de HMGB1, folosind tehnica ELISA de captura. Valorile detectate pentru HMGB1 seric la hamsterii control (C) au fost in limite normale, de $4,2 \pm 1,09$ ng/ml. In schimb, hamsterii cu dieta hiperlipidemica (H) au avut concentratia serica de HMGB1 de 5 ori mai mare (21.2 ± 9.6 ng/ml; $p < 0.01$), comparativ cu grupul control (Fig. 30).

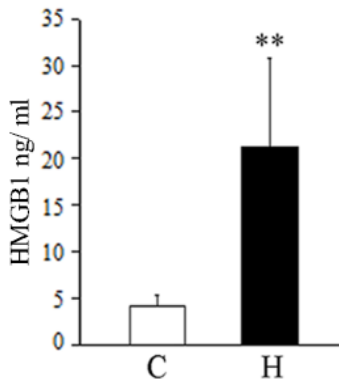


Fig. 1 Concentratia de HMGB1 detectata in serul animalelor hiperlipidemice prin metoda ELISA captura. Datele sunt prezentate ca medie \pm SD; $p^{**} < 0,01$ vs. C

2 – Expresia genica crescuta si nivelul proteic ridicat al alarminei HMGB1 in extractul proteic provenit din inima animalelor hiperlipidemice, indica existenta procesului inflamator la nivelul acestui organ.

La hamsterii hiperlipidemici s-a detectat ca expresia genei Hmgb1, izolat din ventriculul stang, creste de 1,89 ori fata de hamsterii control (Fig. 2a).

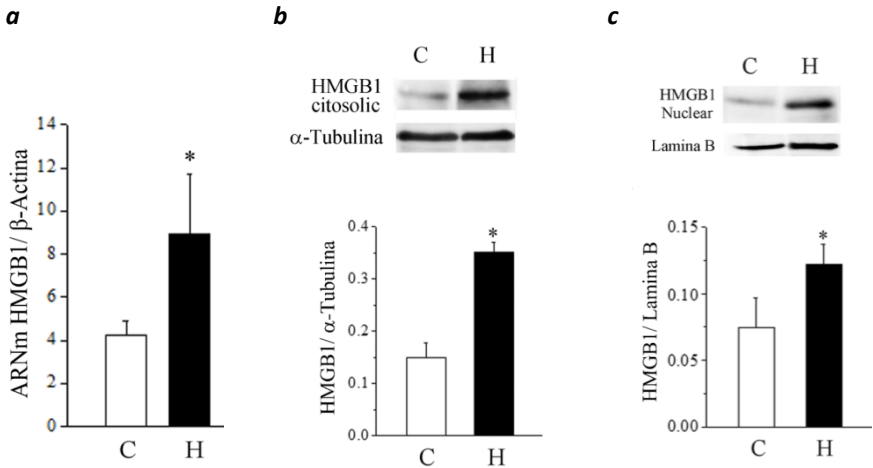


Fig. 2 HMGB1 in tesutul cardiac (a) Nivelul ARNm al HMGB1. (b) Identificarea prin *Western blot* a proteinei HMGB1 in fractia imbogatita in proteine citosolice (c). Imuno-transfer reprezentativ pentru HMGB1 in fractia nucleara. Pentru normalizarea rezultatelor s-au folosit β -Actina, α Tubulina si respectiv Lamina B. Datele sunt prezentate ca medie \pm SD; $p^* < 0,05$ vs. C.

Datele obtinute prin *Western blot* au aratat ca la hamsterii hiperlipidemici nivelul de HMGB1 din fractia imbogatita in proteine citosolice, creste semnificativ ($p < 0,05$), acesta fiind de 2,35 ori mai mare comparativ cu animalele din grupul C (Fig. 2b), iar in fractiile imbogatite in proteine nucleare nivelul proteinei HMGB1 detectat a fost de 1.63 ori mai mare decat cel obtinut la hamsterii din grupul control (Fig. 2c).

3 – Plamanul animalelor hiperlipidemice a aratat o crestere a expresie genice si un nivel ridicat al proteinei HMGB1 in cele doua fractii proteice subcelulare analizate, semnalizand prezenta inflamatiei tisulare.

La animale hiperlipidemice, expresia genei *Hmgb1* a inregistrat o crestere de 1,58 ori ($p < 0.05$) fata de animalele control. De asemenea, in fractia imbogatita in proteine citosolice a grupului H, nivelul proteinei HMGB1 este de 4.42 ori mai mare decat in cea a grupului C (Fig. 3a), iar in fractia nucleara a existat o

crestere semnificativa ($p < 0,05$) de 1,64 ori la hamsterii hiperlipidemici fata de grupul control (Fig. 3b).

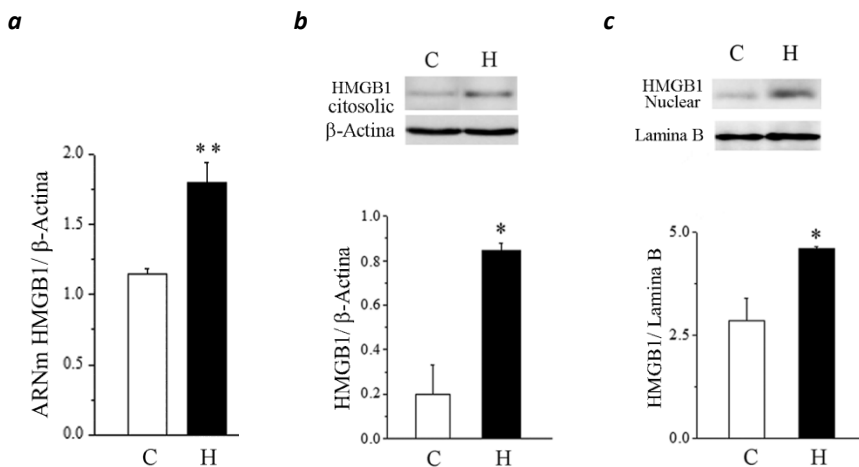


Fig. 3 Detectia proteinei HMGB1 in tesutul pulmonar. (a) Expresia genica a moleculei HMGB1 (b) Identificarea prin *Western blot* a proteinei HMGB1 in fractia imbogatita in proteine citosolice (c). Imuno-transfer reprezentativ pentru HMGB1 in fractia nucleara. Pentru normalizarea rezultatelor s-au folosit β -Actina si respectiv lamina B. Datele sunt prezentate ca medie \pm SD; $p^* < 0,05$ vs. C, $p^{**} < 0,01$ vs. C.

4 – Legatura demonstrata dintre HMGB1 si hiperlipidemia experimentală, ii ofera alarminei statutul de tinta certa a strategiei terapeutice folosita in vederea imbunatatirii starii clinice si pentru o evolutie favorabila a pacientului.

5 – In tesutul cardiac si pulmonar expresia proteica crescuta a proteinei HMGB1 se coreleaza pozitiv cu nivelul ridicat al receptorului RAGE si cu fosforilarea puternica a kinazei AKT. Aceste date ne ofera posibilitatea sa afirmam pentru prima data ca la animalele hiperlipidemice, interactiunea HMGB1 – RAGE poate mentine procesul inflamator prin activarea caii de semnalizare PI3K/ AKT.

Rezultatele obtinute au aratat ca in conditii hiperlipidemice nivelul receptorului RAGE creste semnificativ ($p < 0.05$), atat in inima cat si in tesutul

pulmonar, acesta fiind de 2,37 si respectiv 1,8 ori mai mare decat nivelul detectat la grupul C. In tesaturile analizate s-a putut observa la animalele H o fosforilare notabila a AKT1 la Thr³⁰⁸, acesta fiind de 10 ori mai mare in tesutul cardiac si de 6 ori mai mare in cel pulmonar.

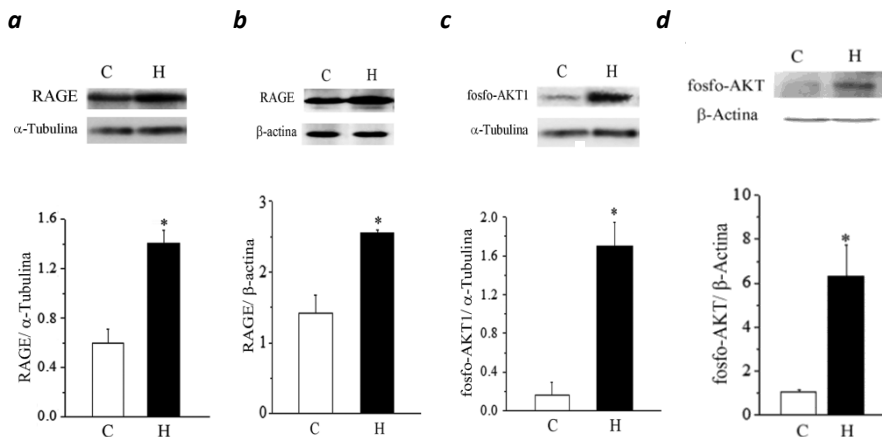


Fig. 4 Analiza receptorului RAGE Identificarea nivelului de AKT1 fosforilat. (a) Evidentierea receptorului RAGE in tesutul cardiac si (b) pulmonar. (c) Detectia AKT-1 fosforilat in inima si (d) palman. Pentru normalizarea rezultatelor s-au folosit α Tubulina si β -Actina. Datele sunt prezentate ca medie \pm SD; p* < 0,05 vs. C.

7 – Administrarea fluvastatinei animalelor care au primit initial o dieta hiperlipidemica a avut un efect pozitiv la nivelul tesutului cardiac prin aducerea moleculei HMGB1 la un nivel genic si proteic asemanator cu cel detectat la animalele control.

La hamsterii hiperlipidemici tratati cu fluvastatina sodica (Ht) s-a detectat ca expresia genei Hmgb1, scade de 1,89 ori fata de hamsterii hiperlipidemici (Fig. 5a), iar nivelul proteinei HMGB1 in fractia citosolica este de 2,18 ori mai mic la animalele Ht comparativ cu cele din grupul H (Fig. 5b). Prin analiza densitometrica a benzilor proteice obtinute s-a demonstrat ca la hamsterii hiperlipidemici tratati, nivelul moleculei HMGB1 a scazut, in fractia nucleara, de 2,16 ori fata de grupul hamsterii hiperlipidemici (Fig. 5c).

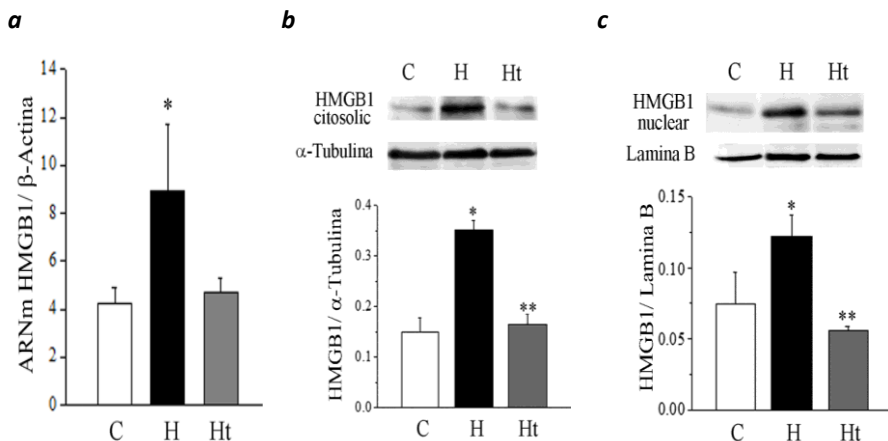


Fig. 5 Efectul produs de fluvostatina sodica asupra proteinei HMGB1 in inima. (a) Nivelul ARNm al HMGB1. (b) Imunodetectia alarminei HMGB1 in fractia imbogatita in proteine citosolice si (c) nucleare Pentru normalizarea rezultatelor s-au folosit β-Actina, α Tubulina si respectiv lamina B. Datele sunt prezentate ca medie ± SD; p* < 0,05 vs. C, p** < 001 vs H.

8 – Tratamentul cu fluvostatina a avut acelasi efect pozitiv asupra receptorului RAGE si a kinazei AKT1 fosforilate. Astfel, consecinta majora a acestor evenimente moleculare generate de actiunea fluvostatinei este reprezentata de diminuarea sintezei de novo a moleculelor pro-inflamatoare, inclusiv RAGE si HMGB1, avand consecinta reducerea inflamatiei tisulare.

Studiul in care s-a urmarit efectul hiperlipidemiei asupra caili de semnalizare initiata de HMGB1, a aratat ca la hamsterii hiperlipidemici expresia receptorului RAGE scadea 2,3 ori in grupul Ht in comparatie cu grupul H (Fig. 6a). De asemenea, rezultatele obtinute au indicat ca intre cele trei grupe de animale luate in studiu nu au existat modificari semnificative in nivelul de AKT1 in tesutul cardiac (Fig. 6b). Totusi, fluvostatina sodica a redus fosforilarea kinazei de 7,7 ori in grupul Ht fata de grupul H (Fig. 6c)

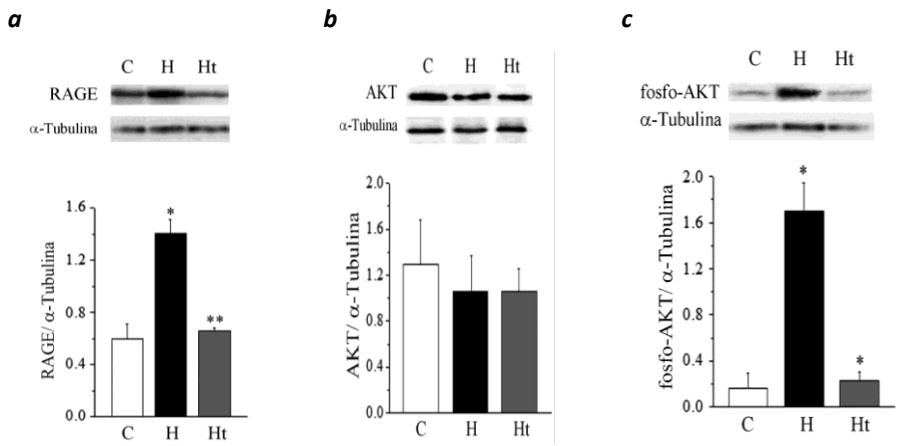


Fig. 6 Efectul pozitiv al tratamentului cu fluvastatina asupra moleculelor (a) RAGE, (b) AKT1 si (c) fosfo-AKT1 in tesutul cardiac. Datele sunt prezentate ca medie \pm SD; p* < 0,05 vs. C, p** < 0.01 vs. H.

9 – Un alt element de noutate demonstrat, il constituie capacitatea fluvastatinei de a reduce semnificativ concentratia serica a alarminei HMGB1.

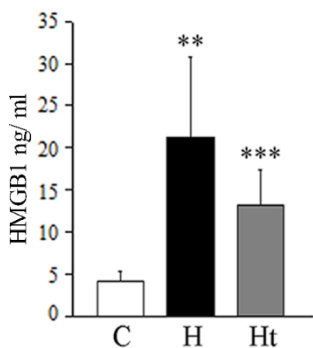


Fig. 7 Nivelul de HMGB1 seric detectat prin tehnica ELISA captura. Fiecare proba a fost masurata in triplicat. Datele sunt prezentate ca medie \pm SD; p** < 0,01 vs. C, p*** < 0.001 vs. C.

10 – La animalele tratate s-a inregistrat scaderea expresiei genice si proteice a HMGB1, in tesutul pulmonar. De asemenea, nivelul receptorului RAGE si gradul de fosforilare a kinazei AKT au fost in mod semnificativ reduse, fiind astfel afectata interactiunea HMGB1-RAGE si implicit semnalizare prin PI3K/ AKT, care activeaza factorul de transcriere NF-kB. Astfel, nivelul citokinelor pro-

inflamatorii va scadea, iar odata cu ele si procesul inflamator isi va pierde din intensitate.

Efectul medicamentului a fost observat si in plaman, unde expresia genica a proteinei HMGB1 a scazut de 1,46 ori la animalele tratate comparativ cu cea a grupului de animale hiperlipidemice, iar experimentele de imunodectie au confirmat scaderea expresiei proteice a HMGB1 de 1,2 ori in fractia citosolica (Fig. 45a) si de 1,27 (Fig. 45b) in fractia nucleara a hamsterilor tratati comparativ cu cei din grupul hiperlipidemic.

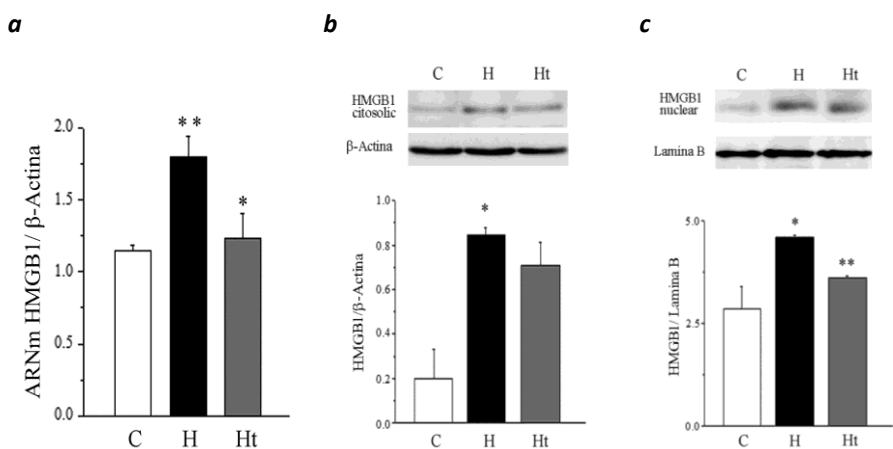


Fig. 8 Expresia genica (a) si proteica a moleculei HMGB1 in fractiile imbogatite in proteine citosolice (b) si nucleare (c) obtinute din tesutul pulmonar. Datele sunt prezentate ca medie \pm SD; p** < 0,01 vs. C, p* < 0,05 vs. H, corespunzatoare graficului (a); p* < 0,05 vs. C, p** < 0,01 vs H, corespunzatoarea graficelor (b) si (c).

Medicamentul administrat hamsterilor din grupul Ht a reusit sa scada de 2,6 ori efectul hiperlipidemiei asupra receptorului, asa cum se poate observa in Fig. 9a. In timp ce nivelul kinazei AKT1 a ramas aproape neschimbat la cele trei grupe de animale studiate (Fig. 9b), fosforilarea notabila a AKT1 la Thr³⁰⁸ observata in tesutul pulmonar al hamsterilor care au primit dieta hiperlipidemica a fost si de aceasta data redusa de 1,75 ori la hamsterii, carora li s-a administrat prin gavaj tratamentul cu fluvastatina sodica (Fig. 9c).

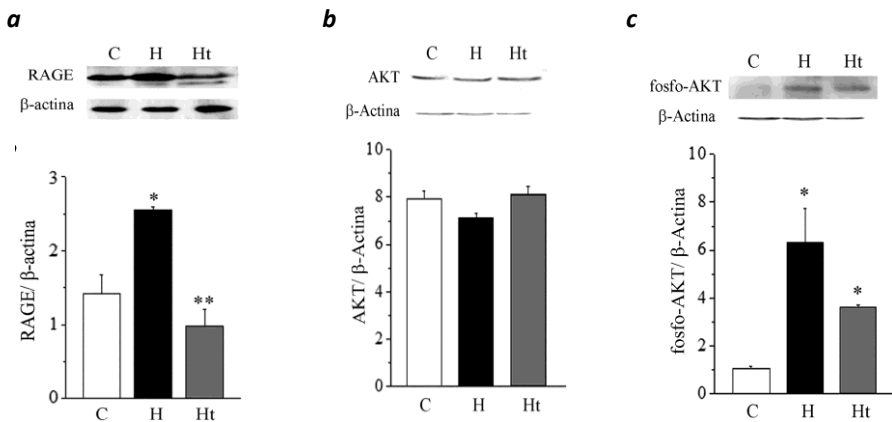


Fig. 9 Efectul pozitiv al tratamentului cu fluvastatina asupra moleculelor (a) RAGE, (b) AKT1 si (c) fosfo-AKT1 in plaman. Datele sunt prezentate ca medie \pm SD; $p^* < 0,05$ vs. C $p^{**} < 0.01$ vs. H, graficului (a); $p^* < 0,05$ vs. C, corespunzatoarea graficelor (b) si (c).

11 – Experimentele prezentate aduc noi dovezi care sustin ipoteza ca alarmina HMGB1 functioneaza ca un mediator al inflamatiei sistemice generate in timpul stresului hiperlipidemic.

12 – Modelul experimental *in vitro* propus, se incadreaza in categoria modelelor folosite in studierea celulelor spumoase, populatie preponderanta in leziunile aterosclerotice.

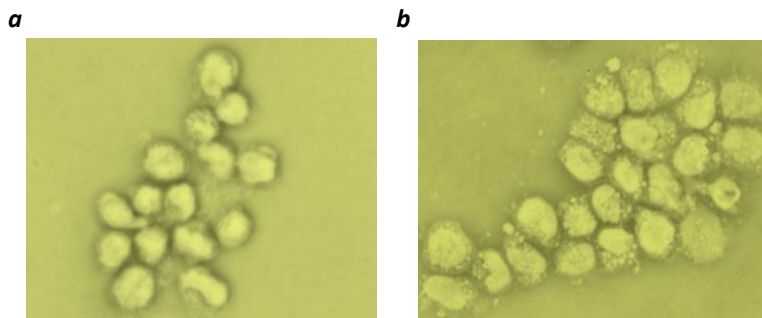


Fig. 10 Aspectul macrofagelor in cultura dupa 48h. (a) Celule control; (b) Celule activate cu ser hiperlipidemic. Imagini realizate in contrast de faza cu obiectivul 40x.

13 – Serul hiperlipidemic induce translocarea alarminei HMGB1 din nucleu in citoplasma, proces demonstrat prin cantitatea semnificativ redusa de HMGB1 in nucleu, dar crescuta in citosolul macrofagelor, pentru ca in final HMGB1 sa fie secretata in mediul extracelular.

Analiza densitometrica a benzilor proteice detectate cu anticorpi specifici a aratat ca in cazul celulelor activate (A), nivelul citosolic al moleculei HMGB1 a fost de 1,5 ori mai mare decat la celulele control (C), dar nivelul nuclear al proteinei a fost de 7 ori mai mic la celulele A comparativ cu celulele C, demonstrandu-se astfel ca serul hiperlipidemic folosit in activarea monocitelor U937 este capabil sa produca relocalizarea proteinei HMGB1 din nucleu in citosolul macrofagelor incarcate cu lipide.

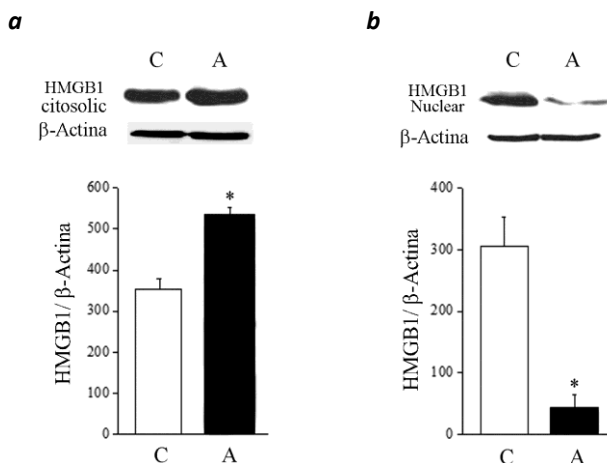


Fig. 11 Localizarea proteinei HMGB1 in fractia imbogatita in proteine citosolice (a) si nucleare (b) izolate din celulele control si activate cu ser hiperlipidemic. Datele sunt prezentate ca medie \pm SD; $p^* < 0,05$ vs. C.

14 – Rezultatele obtinute fac posibila introducerea proteinei HMGB1 pe lista citokinelor implicate in patogenia aterosclerozei, avand in vedere relocalizarea sa subcelulara in macrofagele incarcate cu lipide, ceea ce indica existenta unui rol important al alarminei HMGB1 inca din etapele timpurii ale procesului aterosclerotic.

15 – Macrofagele activate cu ser hiperlipidemic exprima pe suprafata lor receptorul RAGE intr-o cantitate mai mare decat celulele control. In acelasi context hiperlipidemic, a fost evidentiata activarea caii de semnalizare PI3K/AKT la macrofagele activate, prin fosforilarea kinazei AKT la treonina din pozitia 308.

Analiza densitometrica a benzilor proteice obtinute a aratat ca serul hiperlipidemic actioneaza asupra exprimarii proteinelor implicate in cascada de semnalizare HMGB1-RAGE via AKT.

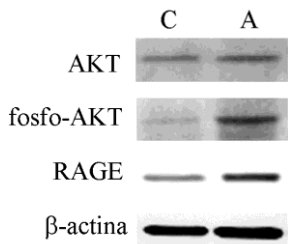
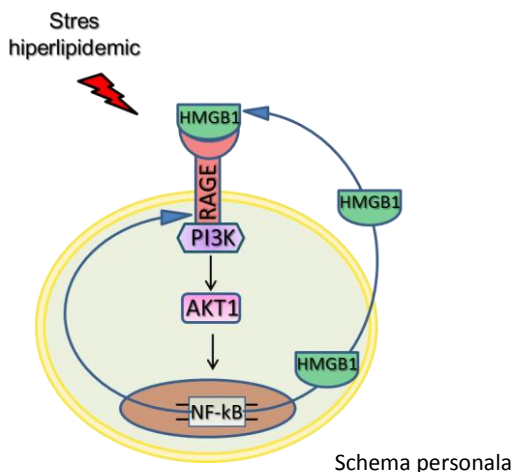


Fig. 12 Evidentierea prin Western blot a proteinelor AKT1, fosfo-AKT1, RAGE si beta-actina in celule U 937 control si activate cu ser hiperlipidemic.

16 – Rezultatele studiului *in vitro* reprezinta o dovada clara ca HMGB1 este un mediator important al inflamatiei declansate de stresul hiperlipidemic, iar blocare ei ar putea reprezenta o cale fezabila de a incetini procesul aterosgenic.



Schema personala

Fig. 13 HMGB1 mediator al procesului inflamator initiat de stresul hiperlipidemic

In urma corelarii acestor date cu cele obtinute anterior, consideram ca alarmina HMGB1 este secretata de macrofagele incarcate cu lipide, iar disponerea ei in mediul extracelular ii va permite interactiunea cu receptorul RAGE, exprimat pe suprafata acestor celule. Astfel, HMGB1 intretine procesul inflamator declansat de stresul hiperlipidemic.

17 – Animalele dublu transgenice (dTg) au suferit pe parcursul a opt saptamani diferite dezechilibre metabolice si somatice care au condus la instalarea diabetului zaharat de tip 1, reprezentand o alegere conforma cu cerintele experimentelor.

18 – Modificarile biochimice produse la animalele dTg, reprezentate mai ales de nivelul glicemic ridicat, a generat acestor animalele o stare lipisita de energie, explicata prin lipsa insulinei care asigura necesarul energetic celular. Aceasta stare a dus implicit la scaderea in greutate a animalelor diabetice.

Tabel 1

Caracteristicile animalelor control si diabetice

Grupa de animale	sTg	dTg
Greutate corp (g)	25 ± 0.5	16 ± 0.5
Glucoza (mg/dl)	110± 1.5	430 ± 2.5

Datele sunt prezentate ca medie ± SEM.

19 – Morfologia atipica a endoteliului vascular pulmonar detectata la soarecii dTg si nivelul ridicat al proteinei HMGB1 in plamanul diabetic, fapt explicat prin rata mare de sinteza a HMGB1 si prin translocarea ei din nucleu in citosol, indica existenta procesului inflamator la nivelul acestui tesut.

La soarecii dTg, microscopia electronica a permis detectia unor modificari structurale evidente la nivelul celulelor endoteliale din capilarele pulmonare. Astfel, endoteliul a afisat un aparat sintetic bine dezvoltat reprezentat de reticulul endoplasmatic si numerosi ribozomi indicand o intensa activitate secretorie. In plus, la soarecii dublu transgenici, numarul caveolelor endoteliale a fost mai ridicat decat la soarecii din grupul control. De asemenea, lamina bazala a

fost considerabil ingrosata la soarecii dTg, comparativ cu cea a soarecilor sTg (Fig. 14).

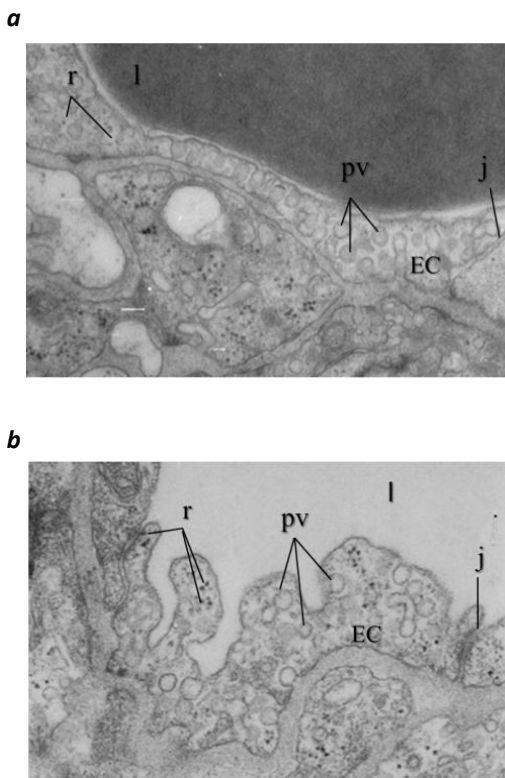


Fig. 14 Microscopia electronica a endoteliului vascular pulmonar la animalele sTg folosite control (a) si dTg (b) ; r: ribozomi, l:lumen, pv: vezicule plasmalemale, j: jonctiune. Bara = 200 nm

Evaluarea proteinei HMGB1 in tesutul pulmonar al soarecilor sTg si dTg, s-a realizat atat prin tehnica de real time PCR cat si Western blot, pentru a putea stabili si evidentia cu certitudine existenta eventualelor modificari din expresia genica, respectiv proteica a moleculei. Astfel, la soarecii diabetici s-a detectat ca expresia genei Hmgb1, creste de 1,75 ori fata de soarecii control (Fig. 15a), nivelul alarminei HMGB1 in fractia imbogatita in proteine citosolice creste semnificativ,

acesta fiind de 3,14 ori mai mare comparativ cu animalele din grupul C (Fig. 15b), iar in fractia imbogatita in proteine nucleare creste de 3,94 ori comparativ cu animalele din grupul control (Fig. 15c).

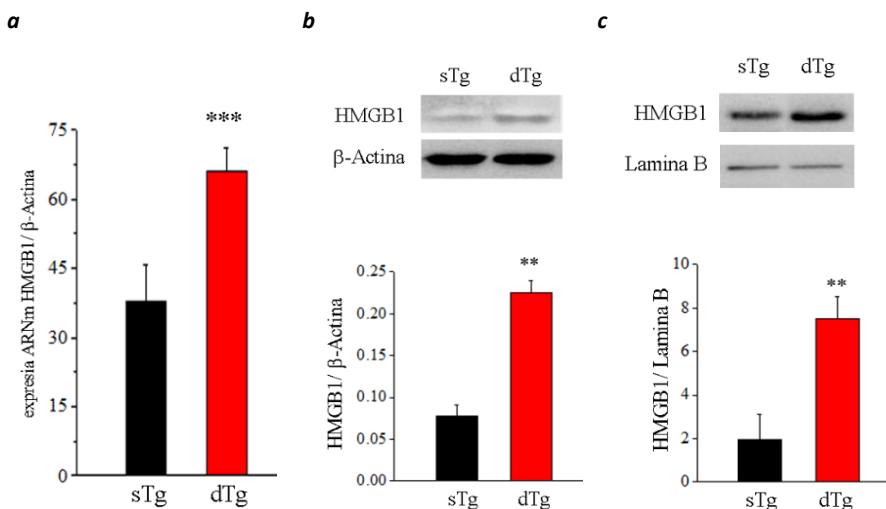


Fig. 15 Expresia genica (a) si proteica a moleculei HMGB1 in fractiile imbogatite in proteine citosolice (b) si nucleare (c) obtinute din tesutul pulmonar al soarecilor sTg si dTg. Datele sunt prezentate ca medie \pm SD; $p^{**} < 0,01$ vs. sTg, $p^{***} < 0,001$ vs. sTg.

20 – Procesul inflamator pus in evidenta in plamanul diabetic, este mentinut si ulterior amplificat prin caile de semnalizare activate de alarma HMGB1. Astfel, nu a fost semnalt doar nivelul ridicat al receptorului RAGE in tesutul pulmonar al soarecilor diabetici, ci si activarea lui, evidentiata prin fosforilarea kinazei AKT1 si prin nivelul ridicat al subunitatii p65 a factorului de transcriere NF- κ B. Deoarece, factorul nuclear κ B este implicat in sinteza de novo atat a receptorului RAGE cat si a alrminei HMGB1, consideram ca in plamanul diabetic este indusa o stare inflamatorie care poate capata amploarea necesara pentru producerea modificarilor histologice tisulare si a afectarii functiei pulmoare.

Experimentele au demonstrat ca in plamanul diabetic nivelul receptorului creste semnificativ, acesta fiind de 3,58 ori mai mare comparativ cu nivelul detectat la soarecii control (Fig. 16a). Nivelul de fosfo-AKT din tesutul pulmonar a crescut de 2,56 ori la grupul dTg

comparativ cu grupul sTg (Fig. 16b), iar expresia proteica a NF-kB p65 creste semnificativ la soarecii dTg, avand un nivelul de 7,2 ori mai mare decat la soarecii sTg.

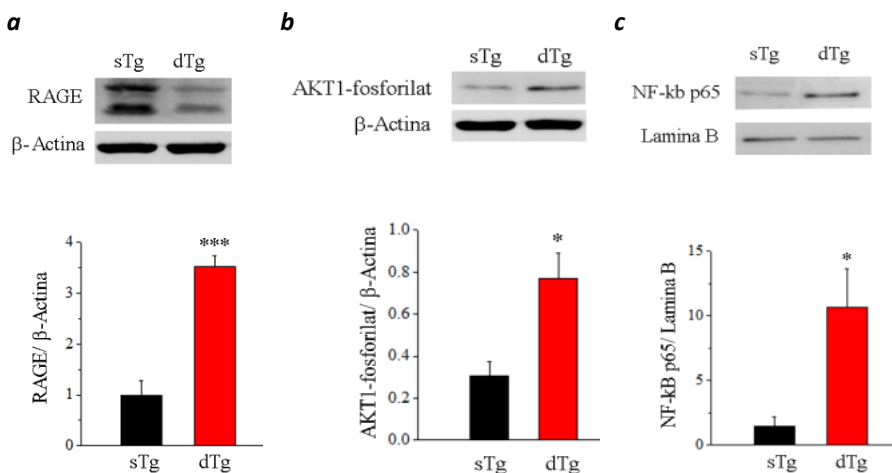


Fig. 16 Imunodectia receptorului RAGE (a), foso-AKT1 (b) si a factorului de transcriere NF-kB subunitatea p65 (c) in tesutul pulmonar. Datele sunt prezentate ca medie \pm SD; $p^* < 0,05$ vs. sTg, $p^{***} < 0,001$ vs. sTg.

In concluzie, rezultatele obtinute au demonstrat ca procesul inflamator pus in evidenta in plamanul diabetic, este mentinut si ulterior amplificat prin caile de semnalizare activate de alarmina HMGB1.

21 – In lumina acestor date si a implicatiilor lor, eventule terapii tintite care sa urmareasca blocarea alarminei HMGB1 ar putea fi esentiale pentru diminuarea complicatiilor cardio-respiratorii asociate hiperlipidemiei si diabetului.

Lucrari publicate in reviste internationale cotate ISI

1. 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 in diabetic lung*, *Microvasc Res.* 2010; 79(2):154-9. (FI 3.075)
2. **Raluca Haraba**, Elena Uyy, Viorel I. Suica, Luminita Ivan, Felicia Antohe - *Fluvastatin reduces the high mobility group box 1 protein expression in hyperlipidemia*, *International Journal of Cardiology*, *Int J Cardiol.* 2011 1;150(1):105-7. (FI 7.078)
3. **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.* 2011;346(3):361-8 (FI 3,114)
4. **Raluca Haraba**, F Antohe - *T cells are active participants in the progression of atherosclerotic plaques*, *DJNB* 2011; 6;4: 1529-1534 (FI 2,079)
5. Elena Uyy, Luminita Ivan, **Raluca Boteanu**, Viorel Suica and Felicia Antohe, *Heat shock proteins and membrane caveolins overexpression in experimental hyperlipidemia*, Trimisa spre publicare la *Biology of the Cell*, 2012 (FI 4,898)

Lucrari prezentate la conferinte internationale – 32

Lucrari prezentate la conferinte nationale – 13

Specializari si cursuri efectuate – 5

Premii obtinute – 3

Participarea la proiecte de cercetare – 9