



Școala de studii avansate a  
Academiei Române



Institutul de Biologie și Patologie  
Celulară „Nicolae Simionescu”

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

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

cu titlul

**Mecanisme epigenetice implicate în instalarea stresului oxidativ și inflamator  
în ateroscleroză**

**Susținută în data de 04.09.2020,**

**Aula George Emil Palade a Institutului de Biologie și Patologie  
Celulară „Nicolae Simionescu”**

**Coordonator științific:**

**Acad. MAYA SIMIONESCU**

**Doctorand:**

**MIHAELA LOREDANA VLAD**

**București**

**2020**

# CUPRINS

<b>Introducere și obiective</b>	6
<b>LISTA DE ABREVIERI</b>	Error! Bookmark not defined.
<b>PARTEA I</b>	Error! Bookmark not defined.
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOȘTIINȚELOR PRIVIND PROCESUL INFLAMATOR ASOCIAT BOLII ATEROSCLEROTICE</b>	Error! Bookmark not defined.
<b>I. Inflamația în stadiile dezvoltării plăcii aterosclerotice</b>	Error! Bookmark not defined.
I.1. Stadiul I. Activarea celulelor endoteliale	Error! Bookmark not defined.
I.2. Stadiul II. Disfuncția celulelor endoteliale	Error! Bookmark not defined.
I.3. Recrutarea celulelor imune din sânge	Error! Bookmark not defined.
I.3.1. Monocitele/Macrofagele	Error! Bookmark not defined.
I.3.1.1. Polarizarea macrofagelor	Error! Bookmark not defined.
I.3.2. Limfocitele T	Error! Bookmark not defined.
I.3.3. Celulele dendritice	Error! Bookmark not defined.
I.3.4. Plachetele sangvine	Error! Bookmark not defined.
I.3.5. Celule polimorfonucleare (PMN)	Error! Bookmark not defined.
I.3.6. Mastocitele	Error! Bookmark not defined.
I.3.7. Celulele B	Error! Bookmark not defined.
I.3.8. Celulele musculare netede (CMN)	Error! Bookmark not defined.
I.4. Stadiul IV. Formarea plăcii fibroase	Error! Bookmark not defined.
I.5. Stadiul V. Placa fibro-calcificată	Error! Bookmark not defined.
I.6. Stadiul VI. Placa instabilă: ruptură și tromboză	Error! Bookmark not defined.
<b>II. Stresul oxidativ și macrofagele</b>	Error! Bookmark not defined.
II.1. NADPH oxidaza 1 (Nox1)	Error! Bookmark not defined.
II.2. NADPH oxidaza 2 (Nox2)	Error! Bookmark not defined.
II.3. NADPH oxidaza 4 (Nox4)	Error! Bookmark not defined.
II.4. NADPH oxidaza 5 (Nox5)	Error! Bookmark not defined.
<b>III. Epigenetica și bolile cardiovasculare</b>	Error! Bookmark not defined.
III.1. Procesele de remodelare ale cromatinei	Error! Bookmark not defined.
III.2. Codul epigenetic al histonelor	Error! Bookmark not defined.
III.3. Variante histonice	Error! Bookmark not defined.

III.4. Acetilarea/deacetilarea histone lor	Error! Bookmark not defined.
III.4.1. Inhibitori HAT (HATi)	Error! Bookmark not defined.
III.4.2. Inhibitori HDAC	Error! Bookmark not defined.
III.5. Metilarea/demetilarea	Error! Bookmark not defined.
III.5.1. Inhibitori DNMT	Error! Bookmark not defined.
III.6. Mecanisme bazate pe modificări ale ARN	Error! Bookmark not defined.

## PARTEA II

### CONTRIBUȚII ORIGINALE

<b>II. Căile dependente de histonacetil transferaze mediază creșterea NADPH oxidazei 5 în macrofagele umane în condiții inflamatorii: un potențial mecanism al supra-producției de specii reactive de oxigen în ateroscleroză</b>	Error! Bookmark not defined.
II.1. Introducere și obiective	Error! Bookmark not defined.
II.2. Materiale și metode	Error! Bookmark not defined.
II.2.1. Materiale	Error! Bookmark not defined.
II.2.2. Țesuturi non-aterosclerotice și aterosclerotice umane	Error! Bookmark not defined.
II.2.3. Culturi celulare și design experimental	Error! Bookmark not defined.
II.2.4. Imunohistochimie (IHC) și Imunofluorescență (IF)	Error! Bookmark not defined.
II.2.5. Evaluarea depozitelor lipidice din leziunile aterosclerotice	Error! Bookmark not defined.
II.2.6. Real-time PCR	Error! Bookmark not defined.
II.2.7. Analiza Western Blot	Error! Bookmark not defined.
II.2.8. Transfecții tranziente și tehnica genei raportor	Error! Bookmark not defined.
II.2.9. Imunoprecipitarea cromatinei (ChIP)	Error! Bookmark not defined.
II.2.10. Analiza statistică	Error! Bookmark not defined.
II.3. Rezultate	Error! Bookmark not defined.
II.3.1. Nivelele proteice ale p300, HAT1 și H3K27ac sunt induse în arterele carotide umane în ateroscleroză	Error! Bookmark not defined.
II.3.2. Nivelele proteice ale p300, HAT1, H3K27ac și H3K9ac sunt prezente în zonele abundente în Mac în arterele carotide umane aterosclerotice	Error! Bookmark not defined.
II.3.3. LPS induce modificări epigenetice în Mac umane observate prin creșterea nivelurilor histonelor acetilate	Error! Bookmark not defined.
II.3.4. Izoformele HAT controlează nivelele genice și proteice ale Nox5 induse de către LPS în Mac	Error! Bookmark not defined.
II.3.5. Supraexprimarea tranzientă a p300 sau HAT1 a reglat pozitiv activitatea promotorului Nox5 în Mac	Error! Bookmark not defined.

II.3.6. LPS induce recrutarea proteinelor p300 și HAT1 și favorizează acetilarea histonelor la situsurile transcripțional active la nivelul promotorului genei Nox5 în Mac umane **Error! Bookmark not defined.**

II.4. Discuții **Error! Bookmark not defined.**

**III. Inhibarea farmacologică a histon de acetilazelor reduce exprimarea NADPH oxidazelor, stresul oxidativ și dezvoltarea leziunilor aterosclerotice în șoarecii hipercolesterolemici apolipoprotein E- deficienți; potențiale implicații în ateroscleroză** **Error! Bookmark not defined.**

III.1. Introducere **Error! Bookmark not defined.**

III.2. Materiale și metode **Error! Bookmark not defined.**

III.2.1. Materiale **Error! Bookmark not defined.**

III.2.2. Prelevarea probelor umane non-aterosclerotice și probe de țesut aterosclerotic **Error! Bookmark not defined.**

III.2.3. Design-ul experimental al modelelor aterosclerotice *in vivo* și strategia farmacologică **Error! Bookmark not defined.**

III.2.4. Design-ul experimental al culturilor celulare **Error! Bookmark not defined.**

III.2.5. Măsurarea nivelelor plasmatice de colesterol total, LDL-colesterol și trigliceride în șoareci **Error! Bookmark not defined.**

III.2.6. Reacția de polimerizare în lanț în timp real (Real Time-PCR) **Error! Bookmark not defined.**

III.2.7. Tehnica Western Blot **Error! Bookmark not defined.**

III.2.8. Măsurarea producției SRO **Error! Bookmark not defined.**

III.2.9. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) **Error! Bookmark not defined.**

III.2.10. Analiza statistică **Error! Bookmark not defined.**

III.3. Rezultate **Error! Bookmark not defined.**

III.3.1. Nivelele proteice ale HDAC clasa I, IIa și IV sunt crescute în arterele umane carotide aterosclerotice **Error! Bookmark not defined.**

III.3.2. Inhibarea HDAC nu are efect asupra greutateii corporale sau a nivelelor plasmatice ale colesterolului total, LDL-colesterol, HDL-colesterol și trigliceride în șoarecii hipercolesterolemici ApoE<sup>-/-</sup> **Error! Bookmark not defined.**

III.3.3. Subtipurile clasei HDAC I, IIa și IV sunt crescute în aorta șoarecilor hipercolesterolemici ApoE<sup>-/-</sup> **Error! Bookmark not defined.**

III.3.4. SAHA reduce semnificativ leziunile aterosclerotice în aorta șoarecilor hipercolesterolemici ApoE<sup>-/-</sup> **Error! Bookmark not defined.**

III.3.5. SAHA induce scăderea nivelelor proteice ale CD68 și CD45 în aorta aterosclerotică a șoarecilor ApoE<sup>-/-</sup> **Error! Bookmark not defined.**

III.3.6. SAHA induce scăderea nivelelor proteice Nox1 și Nox4 în aortele aterosclerotice ale șoarecilor ApoE<sup>-/-</sup> **Error! Bookmark not defined.**

III.3.7. Inhibitorul SAHA reduce SRO produse de NADPH oxidaze în aorta șoarecilor ApoE-/- **Error! Bookmark not defined.**

III.3.8. SAHA reduce formarea produșilor 4-HNE în aorta aterosclerotică a șoarecilor ApoE-/- **Error! Bookmark not defined.**

III.3.9. SAHA reduce markerii inflamatori în aorta aterosclerotică a șoarecilor ApoE-/- **Error! Bookmark not defined.**

III.3.10. Modularea HDAC induce creșteri semnificative ale ARNm pentru TNF $\alpha$  și ale proteinelor secretate în Mac M1 în cultură **Error! Bookmark not defined.**

III.3.11. Inhibarea farmacologică a HDAC de către SAHA duce la scăderea exprimării genice Nox-urilor în Mac M1-like **Error! Bookmark not defined.**

III.4. Discuții **Error! Bookmark not defined.**

**Concluzii generale** **Error! Bookmark not defined.**

**Bibliografie** 18

**Lista lucrărilor publicate** **Error! Bookmark not defined.**

**Lucrări publicate în reviste internaționale cotate ISI** 11

**Articole în pregătire** 11

**Prezentări orale** 12

**Lista posterele prezentate la manifestări științifice** 12

**Premii** 15

**Granturi** 16

## REZUMAT

**Cuvinte cheie:** Ateroscleroza, Epigenetică, Specii reactive de oxigen, Boli cardiovasculare, Acetilare, HAT, HDAC, NADPH oxidaze

Număr total de pagini – 117

Număr de figuri în partea de ”Stadiul actual de cunoștințe” - 15

Număr de figuri în partea de ” Contribuții originale”- 23

Număr de tabele - 5

Indicații bibliografice – 119

Lucrări publicate în reviste internaționale indexate ISI – 4 (1 autor principal)

Brevete naționale – 0

Rezumate publicate în reviste indexate ISI – 8

Lucrări în pregătire – 2

Comunicări orale susținute la manifestări științifice internaționale – 2 (1 autor principal)

Postere prezentate la manifestări științifice internaționale – 14 (4 autor principal)

Postere prezentate la manifestări științifice naționale – 16 (5 autor principal)

Cursuri și specializări - 1

Premii naționale – 4

Burse obținute pe durata programului doctoral – 1

Participarea la proiecte de cercetare internaționale/naționale – 8

## Introducere și obiective

Bolile cardiovasculare reprezintă principala cauză de mortalitate în țările dezvoltate, inclusiv în România (60%). Ateroscleroza este o boală complexă, multifactorială și multigenică caracterizată prin îngroșarea și rigidizarea pereților arteriali - determinând îngustarea progresivă a lumenului vascular. Acesta reprezintă un factor determinant al bolilor coronariene și cerebrovasculare. Ateroscleroza afectează primar: a) arterele elastice (aorta, carotida, iliaca); b) arterele musculare medii și mari (coronare, cerebrale, poplitee). Cei mai întâlniți factori de risc ai aterosclerozei sunt neinfluențabili: vârsta avansată, sexul, predispoziția genetică și influențabili: dislipidemia, creșterea LDL (lipoproteine de densitate scăzută), reducerea HDL (lipoproteine de densitate crescută), fumatul, hipertensiunea arterială, diabetul zaharat, obezitatea, sedentarismul, factori psihosociali (Libby, 2002). Deși toată suprafața vaselor de sânge este expusă la factorii de risc, leziunile aterosclerotice apar cu precădere în anumite zone particulare ale arborelui vascular: peretele interior al bifurcațiilor vasculare, curburile arteriale și valvele aortice (Simionescu et al, 1986).

Terapia primară a aterosclerozei include medicamente care scad biosinteza endogenă a colesterolului, de exemplu inhibitori ai 3-hidroxi-3metilglutaril-Coenzima A reductaza (statine). Însă aproximativ 50% dintre pacienți dezvoltă leziuni aterosclerotice în absența hipercolesterolemiei. Folosirea statinelor previne complicațiile bolilor coronariene acute prin stabilizarea plăcii aterosclerotice, nu prin reducerea dimensiunilor acesteia (Aikawa și Libby, 2004). Până în prezent abordările terapeutice sunt limitate la factori de risc, ținând cu predilecție hipercolesterolemia și hipertensiunea, însă eficacitatea maximă a acestor strategii în studiile clinice a fost de 30-40% (Soto et al, 2012). Prin urmare există o nevoie de a proiecta terapii specifice care să vizeze mecanismele patologice de formare și dezvoltare a ateroamelor.

În procesul formării plăcilor aterosclerotice un rol important îl au macrofagele (Mac). Acestea sunt derivate din monocite și sunt celule versatile care își modifică fenotipul ca răspuns la factorii existenți în micromediul plăcii. Mac provin din măduva osoasă hematogenă și trec prin diferite stadii, de la celula stem pluripotentă-monoblast-promonocit-monocit circulant. Disfuncția endotelului cauzată de particulele de LDL translocate și acumulate în subendoteliu determină expresia crescută de MCP-1 ceea ce va conduce la diapedeza monocitelor prin joncțiunile celulelor endoteliale. Acestea se vor diferenția în Mac activate, vor acumula lipide și se vor transforma în celule spumoase. Răspunsul inflamator crescut va fi menținut prin secreția de molecule pro-inflamatorii și prin producerea de specii reactive de oxigen (SRO). De asemenea, Mac apoptotice sunt responsabile de formarea centrului necrotic și de progresia bolii. Datorită rolului important pe care macrofagele îl au în diferitele etape de formare a plăcii aterosclerotice acestea reprezintă ținte atractive pentru dezvoltarea de terapii.

Studiile recente indică rolul determinant al mecanismelor epigenetice în modularea fenotipului Mac în ateroscleroză. Enzimele histon acetil transferaze (HAT) catalizează acetilarea resturilor de lizină din regiunea amino-terminală a histonelor nucleozomale. În urma acestui proces are loc decondensarea cromatinei, care facilitează accesul factorilor de transcriere la elementele lor de consens din secvența ADN și implicit activarea expresiei genice. Acetilarea histonelor este asociată cu hipertrofia miocitelor, apoptoză, stres oxidativ, remodelare cardiacă, aritmie, insuficiență cardiacă, hipertensiune și inflamație (referința).

Scopul acestei teze de doctorat îl constituie identificarea de noi mecanisme moleculare de natură epigenetică în macrofage, în vederea dezvoltării unor noi abordări terapeutice anti-inflamatorii și anti-oxidante în ateroscleroză.

Ipoteza care a determinat acest studiu o reprezintă faptul că dezechilibrul mecanismelor epigenetice implicate în acetilarea histonelor determină alterarea exprimării unor gene cu rol important în modularea funcției macrofagelor pro-inflamatorii (tip M1) și respectiv anti-inflamatorii (tip M2) în ateroscleroză.

În prima parte a tezei vor fi discutate aspecte actuale referitoare la procesul inflamator asociat aterosclerozei, implicarea inflamației și a Mac în toate stadiile de dezvoltare a ateroamelor și a mecanismelor epigenetice, în mod special în ceea ce privește acetilarea și dezacetilarea, mecanisme ce intervin în procesul de formare a plăcilor aterosclerotice.



Partea originală a tezei se refera la : (1) Analiza impactului condițiilor aterogene asupra sistemului acetilării/dezacetilării histonelor: HAT și HDAC; (2) Investigarea implicării HAT și HDAC în instalarea stresului oxidativ și inflamator la nivelul macrofagelor polarizate în ateroscleroză; (3) Determinarea potențialului unor compuși farmacologici direcționați către HAT/HDAC în scopul de a reduce formarea plăcilor aterosclerotice la șoarecii ApoE -/-.

Numeroase studii arată că în afară de factorii genetici, mecanismele epigenetice care traduc efectele interacțiilor gene-(micro)mediu contribuie la ateroscleroză prin reglarea exprimării unor gene foarte importante asociate cu inflamația, sinteza de matrice extracelulară, proliferarea celulelor și diferențiere (Khyzha et al, 2017; Zhang et al, 2018). Stresul oxidativ este un reglator important al numeroaselor procese patologice care duc la formarea plăcilor de aterom. Cu toate acestea, implicarea mecanismelor epigenetice în medierea supraexprimării de SRO și stres oxidativ în ateroscleroză nu este încă definită (Kietzmann et al, 2017). În acest studiu ne-am concentrat atenția asupra mecanismelor dependente de HAT implicate în modularea exprimării Nox5, un membru al familiei Nox identificat și caracterizat în Mon și Mac umane care contribuie la supraexprimarea SRO și a stresului oxidativ în ateroscleroză (Manea et al, 2015).

Studii recente indică rolul SRO produse de Nox5 în etiologia bolilor cardiovasculare (BCV), însă mecanismele precise care guvernează inducerea Nox5 nu sunt pe deplin cunoscute (Jha et al, 2017). De aceea, înțelegerea căilor moleculare ale reglării genei Nox5 reprezintă un pas necesar pentru dezvoltarea de terapii avansate anti-stres oxidativ care să reducă semnificativ evenimentele cardiovasculare asociate cu destabilizarea plăcii aterosclerotice vulnerabile (ex. accident cerebral vascular, infarct miocardic, moarte subită). Astfel, a fost emisă ipoteza că nivelul crescut al Nox5 poate fi mediat parțial de modificările topologiei cromatinei. Pentru a aborda această problemă a fost realizat un design experimental folosind probe umane non- și aterosclerotice obținute ca materiale reziduale de la pacienți care au suferit operații de endarterectomie și Mac umane în cultură.

**Rezultatele originale** obținute în această teză demonstrează că:

1. Nivelele proteice corespunzătoare p300, HAT1, H3K27ac și Nox5 sunt induse în arterele carotide aterosclerotice umane și sunt abundente în zona capului fibros și a miezului lipidic aterosclerotic care exprimă markerii pan-Mac.

2. Stimularea Mac umane cu LPS induce modificări epigenetice observate prin creșterea nivelului HAT1 și a acetilării histonelor (H3K27ac, H3K9ac).

3. Inhibarea farmacologică a HAT reduce exprimarea genică și proteică în Mac stimulate cu LPS; supraexprimarea p300 sau HAT1 induce activarea transcrierii genei Nox5.

4. Recrutarea proteinelor p300 și HAT1 este crescută la nivelul promotorului genei Nox5 în Mac umane tratate cu LPS.

5. HDAC clasa I (HDAC1, HDAC2, HDAC3), clasa IIa (HDAC4), clasa IIb (HDAC6) și HDAC IV (HDAC11) sunt crescute în arterele carotide aterosclerotice umane și în aortele hipercolesterolemice ale șoarecilor ApoE-/-.

6. Inhibarea farmacologică a HDAC de către SAHA reduce semnificativ dezvoltarea aterosclerozei și a markerilor infiltrării celulelor imune în aortele șoarecilor ApoE-/-.

7. Căile de semnalizare dependente de HDAC mediază inducția exprimării Nox1 și Nox4 în aortele șoarecilor ApoE-/-.

8. Tratamentul cu SAHA induce scăderea proteinelor NOS2 și MMP9 din aorta, contributory majori ai inflamației vasculare și remodelării în ateroscleroză.

9. Subtipurile HDAC clasa I, IIa, IIb și IV precum și izoformele Nox1, Nox2 și Nox4 sunt semnificativ crescute în Mac de șoarece pro-inflamatorii M1 *in vitro*.

10. Inhibarea farmacologică a HDAC (de către SAHA) reduce exprimarea nivelelor Nox1, Nox2, Nox4 și TNF $\alpha$  în Mac de șoarece M1 în cultură.

În ansamblu, datele acestei teze de doctorat întăresc convingerea că p300 are un rol important în medierea inducerii exprimării lui Nox5 în Mac, în condiții inflamatorii și furnizează noi date care creează o legătură între mecanismele modificate epigenetic și supraproducția de SRO cauzate de Nox5 în ateroscleroză. Ținând cont de faptul că stresul oxidativ este un factor incriminat în ateroscleroză, țintirea farmacologică a mecanismelor epigenetice ale căilor care controlează exprimarea Nox5 poate să fie o strategie terapeutică eficientă în tratarea acestei boli.

Interesant, rezultatele noastre furnizează dovezi că în contextul inducerii diferitelor izoforme HDAC, inhibitorul pan-HDAC SAHA prezintă efecte anti-aterosclerotice similare în

șoareci, comparabile cu studiile precedente care subliniau faptul că ablația sistemică sau specifică unei singure izoforme HDAC încetinește ateroscleroza. De aceea, existența compensatorie sau a unor mecanisme reglatorii redundante în sistemul HDAC, precum și a unei rețele complexe între subtipurile HDAC și celule/factori de transcriere specifici genelor rămâne o problemă deschisă. În acest context, utilizarea inhibitorilor pan- sau a celor specifici HDAC în ateroscleroză este încă disputată și necesită studii aprofundate. Colectiv, principalele descoperiri ale acestui studiu indică faptul că în ateroscleroză inhibarea farmacologică a creșterii HDAC reduce exprimarea crescută a subtipurilor Nox în aortă și deasemenea și a stresului oxidativ, duce la scăderea markerilor inflamatori și a formării leziunilor aterosclerotice în șoareci. Deoarece multiplele subtipuri HDAC sunt deasemenea crescute în ateroscleroza umană, intervențiile farmacologice orientate către HDAC ar putea fi o nouă strategie terapeutică eficientă în ateroscleroză.

Colectiv, principalele descoperiri ale acestui studiu indică faptul că în ateroscleroză inhibarea farmacologică a creșterii HDAC reduce exprimarea crescută a subtipurilor Nox în aortă și de asemenea și a stresului oxidativ, duce la scăderea markerilor inflamatori și a formării leziunilor aterosclerotice în șoareci. Deoarece multiplele subtipuri HDAC sunt de asemenea crescute în ateroscleroza umană, intervențiile farmacologice orientate către HDAC ar putea fi o nouă strategie terapeutică eficientă în ateroscleroză.

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

1. Manea SA, **Vlad ML**, Fenyo IM, Lazar AG, Raicu M, Muresian H, Simionescu M, Manea A (2020) Pharmacological inhibition of histone deacetylase reduces NADPH oxidase expression, oxidative stress and the progression of atherosclerotic lesions in hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice; potential implications for human atherosclerosis. *Redox Biology* 101338 ***Factor de impact 9.99***

2. **Antonescu ML**, Manea SA, Raicu M, Muresian H, Simionescu M, Manea A (2019) Histone acetyltransferase-dependent pathways mediate NADPH oxidase 5 up-regulation in human macrophages under inflammatory conditions: a potential mechanism of reactive oxygen species overproduction in atherosclerosis. *Oxid Med Cell Longev* 2:3201062. ***Factor de impact: 5.08***

3. Manea SA, **Antonescu ML**, Fenyo IM, Raicu M, Simionescu M, Manea A (2018) Epigenetic regulation of vascular NADPH oxidase expression and reactive oxygen species

production by histone deacetylase-dependent mechanisms in experimental diabetes. *Redox Biology* 16: 332-343. **Factor de impact 7,8**

4. Stanica L, Rosu-Hamzescu M, Gheorghiu M, Stan M, Antonescu ML, Polonschiu C, Gheorghiu E (2017) Electro-optical sensing of cellular effects under hypoxic conditions and carbonic anhydrase inhibition. *Hindawi Limited* 10: 1155. **Factor de impact 1.34**

### Articole în pregătire

1. Vlad ML, Lazar AG, Fenyó IM, Manea SA, Manea A (2020) Inhibition of miR-155-5p reduces NADPH oxidase expression and oxidative stress in the aorta of hypercholesterolemic ApoE-deficient mice; potential implication in human atherosclerosis. *Cells*. **Factor de impact: 4.37.**
2. Manea SA, Vlad ML, Rebleanu D, Lazar AG, Calin M, Simionescu M, Manea A (2020) High resolution near-infrared fluorescence imaging of reactive oxygen species overproduction associated with atherosclerosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice. *Antioxidants*. **Factor de impact: 5.01.**

### Prezentări orale

1. Lazar A, Cosac MT, Vlad ML, Manea A, Manea SA. Cross-communication between histone acetyltransferase and histone deacetylase epigenetic enzymes augments oxidative stress and fibrosis in the kidney of diabetic mice. "European Atherosclerosis Society Congress 2019 – 87th EAS Congress". Science at a Glance Section, Netherlands, 2019.
2. Antonescu ML, Manea SA, Fenyó IM, Constantin A, Simionescu M, Manea A. Epigenetic mechanisms of oxidative stress in atherosclerosis., EAS advanced course on AIL, March 22-25 2016, Amsterdam, Netherlands.

### Lista posterelor prezentate la manifestări științifice

1. Vlad ML, Manea SA, Lazar AG, Raicu M, Muresian H, Simionescu M, Manea A. Epigenetic regulation of NADPH oxidase 5 expression by histone acetyltransferase-activated mechanisms in human macrophages exposed to inflammatory conditions; potential role in atherosclerosis. "ICBP Nicolae Simionescu - 40 years, Anniversary symposium", 2019
2. Lazar AG, Cosac MT, Vlad ML, Raicu M, Manea A, Manea SA. Activation of p300 histone acetyltransferase-dependent signaling pathways induces NADPH oxidase

- expression and oxidative stress in the kidney of diabetic mice. "ICBP Nicolae Simionescu - 40 years, Anniversary symposium", 2019
3. **Vlad ML**, Manea SA, Lazar AG, Cosac MT, Raicu M, Muresian H, Simionescu M, Manea A. Activation of histone acetyltransferase-dependent signaling pathways induces macrophage polarization towards a pro-inflammatory M1-like phenotype in vitro; potential implication in human atherosclerosis. "The 11th National Congress with International Participation and the 37th Annual Scientific Session of the Romanian Society of Cell Biology", 20-23 iunie 2019, Constanta, Romania
  4. Lazar AG, Cosac MT, **Vlad ML**, Raicu M, Manea A, Manea SA. Activation of P300 histone acetyltransferase dependent signaling pathways induces NADPH oxidase expression and oxidative stress in the kidney of diabetic mice. "The 11th National Congress with International Participation and the 37th Annual Scientific Session of the Romanian Society of Cell Biology", 20-23 iunie 2019, Constanta, Romania
  5. Cosac MT, **Vlad ML**, Manea SA, Lazar AG, Raicu M, Simionescu M, Manea A. Pharmacological inhibition of histone lysine demethylase JARID1b down-regulates the expression of pro-inflammatory molecules in cultured M1-polarized human macrophages. "The 11th National Congress with International Participation and the 37th Annual Scientific Session of the Romanian Society of Cell Biology", 20-23 iunie 2019, Constanta, Romania
  6. Manea A, Manea SA, **Vlad ML**, Lazar AG, Cosac MT, Simionescu M. Histone deacetylase subtypes are part of positive feedback mechanisms controlling their own expression in the atherosclerotic aorta of hypercholesterolemic ApoE<sup>-/-</sup> mice. "29th European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection", 2019
  7. Manea SA, **Vlad ML**, Lazar AG, Fenyó IM, Cosac MT, Manea A. Identification of novel microRNAs associated with atherosclerotic lesion formation in the aorta of hypercholesterolemic ApoE<sup>-/-</sup> mice; potential implications for human atherosclerosis. "29th European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection", 2019
  8. **Vlad ML**, Manea SA, Lazar AG, Raicu M, Muresian H, Simionescu M, Manea A. NADPH oxidase – derived reactive oxygen species augment inflammatory macrophage responses via redox-sensitive histone deacetylase-dependent epigenetic mechanisms in experimental atherosclerosis. "European Atherosclerosis Society Congress 2019 – 87th EAS Congress" 26-29 Mai 2019, Maastricht, Olanda
  9. Lazar AG, Cosac MT, **Vlad ML**, Manea A, Manea SA. Cross communication between histone acetyltransferase and histone deacetylase epigenetic enzymes augments oxidative stress and fibrosis in the kidney of diabetic mice. European Atherosclerosis Society Congress 2019 – 87th EAS Congress" 26-29 Mai 2019, Maastricht, Olanda
  10. Manea SA, **Vlad ML**, Lazar AG, Cosac MT, Muresian H, Simionescu M, Manea A. Novel microRNAs associated with advanced human atherosclerotic lesions - potential biomarkers and therapeutic targets. "5th ESPT Congress - Precision Medicine and Personalised Health", 2019
  11. Manea A, Manea SA, **Vlad ML**, Lazar AG, Cosac MT, Simionescu M. P300/CBP-histone acetyltransferase mediates the up-regulation of NADPH oxidase expression and

- oxidative stress in the aorta of diabetic mice. “7th World Congress on Controversies to Consensus in Diabetes, Obesity and Hypertension”, 2019
12. Manea SA, Lazar AG, **Vlad ML**, Cosac MT, Manea A. Induction of histone deacetylase signaling pathways augments vascular inflammation and remodeling in diabetic mice. “7th World Congress on Controversies to Consensus in Diabetes, Obesity and Hypertension”, 2019
  13. Manea SA, **Antonescu ML**, Rebleanu D, Lazar AG, Calin M, Manea A. Ultrasound-based imaging of reactive oxygen species overproduction associated with atherosclerosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice. The 43rd FEBS Congress 2018, Czech Republic
  14. Manea A, Manea SA, **Antonescu ML**, Lazar AG, Muresian H, Simionescu M. Epigenetic regulation of inflammatory macrophage polarization by histone deacetylase-dependent mechanisms in experimental atherosclerosis. The 43rd FEBS Congress 2018, Czech Republic
  15. **Antonescu ML**, Manea SA, Lazar AG, Raicu M, Muresian H, Simionescu M, Manea A. Epigenetic control of macrophage polarization by histone acetylation/deacetylation enzymes in experimental atherosclerosis. “The 36th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology and the 10th National Congress with International participation”, 2018, Craiova, Romania
  16. Manea SA, **Antonescu ML**, Rebleanu D, Lazar AG, Raicu M, Calin M, Manea A. High resolution near-infrared fluorescence imaging of reactive oxygen species overproduction associated with atherosclerosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice. “The 36th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology and the 10th National Congress with International participation”, 2018, Craiova, Romania
  17. Lazar AG, **Antonescu ML**, Fenyo IM, Manea A, Manea SA. Histone acetyltransferase-dependent signaling pathways mediate endothelin-1 up-regulation and markers of vascular dysfunction in experimental diabetes. “1st Olympiad in Cardiovascular Medicine”, International Symposium on Experimental & Clinical Cardiology, 17-19 Mai 2018, Athens, Greece
  18. **Antonescu ML**, Lazar AG, Manea SA, Raicu M, Muresian H, Simionescu M, Manea A. Pharmacological inhibition of NADPH oxidase down-regulates the expression of pro-inflammatory markers in classically-activated macrophages in vitro: potential implication in human atherosclerosis. “1st Olympiad in Cardiovascular Medicine”, International Symposium on Experimental & Clinical Cardiology, 17-19 Mai 2018, Athens, Greece
  19. **Antonescu ML**, Lazar AG, Manea SA, Raicu M, Muresian H, Manea A, Simionescu M. Up-regulation of macrophage NADPH oxidase 5 expression and reactive oxygen species production by histone acetyltransferase-dependent mechanisms in atherosclerosis. “Protecting the Code: Epigenetic Impacts on Genome Stability”, 28 octombrie – 02 noiembrie 2017, Berlin, Germania
  20. Manea SA, **Antonescu ML**, Lazar A, Fenyo IM, Manea A. Pharmacological inhibition of histone acetyltransferase reduces endothelin-1 expression and mitigates markers of

vascular dysfunction in diabetes. “European Society for Pharmacogenomics and Personalized Therapy, 4th Conference”, 2017

21. **Antonescu ML**, Manea SA, Simionescu M, Manea A. NADPH oxidase 5 expression are is regulated by histone acetyltransferase 1 and P300 – dependent in human macrophages. “85th EAS Congress”, 23-26 aprilie 2017, Praga
22. Manea A, **Antonescu ML**, Fenyo IM, Manea M. In vivo silencing of histone deacetylase 1 displays anti-atherosclerotic effects in hypercholesterolemic apolipoprotein E deficient mice. “Heart Failure 2017 - 4th World Congress on Acute Heart Failure”, 28 aprilie - 04 mai 2017, Paris, Franta
23. Manea A, Manea SA, **Antonescu ML**, Fenyo IM, Raicu M, Simionescu M. Protein expression profiling of histone acetyltransferases and histone deacetylases in human and experimental atherosclerosis. “Heart Failure 2017 - 4th World Congress on Acute Heart Failure”, 28 aprilie - 04 mai 2017, Paris, Franta
24. **Antonescu ML**, Manea SA, Muresian H, Simionescu M, Manea A. Histone acetyltransferases control macrophage-type NADPH oxidase 5 up-regulation and reactive oxygen species formation in atherosclerosis. “9th National Congress with International Participation and 35th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology”, 06 - 12 iunie 2017, Iasi, Romania
25. Manea SA, Fenyo IM, **Antonescu ML**, Preda B, Raicu M, Muresian H, Manea A. Histone deacetylase-dependent epigenetic pathways mediate oxidative stress and inflammation in experimental atherosclerosis. “9th National Congress with International Participation and 35th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology”, 06 - 12 iunie 2017, Iasi, Romania
26. Manea SA, **Antonescu ML**, Lazar A, Fenyo IM, Manea A. Pharmacological inhibition of histone acetyltransferase reduces endothelin-1 expression and mitigates markers of vascular dysfunction in diabetes. “European Society for Pharmacogenomics and Personalized Therapy, 4th Conference”, 2017
27. Manea SA, **Antonescu ML**, Lazar AG, Fenyo IM, Manea A. Pharmacological inhibition of histone acetyltransferase reduces endothelin-1 expression and mitigates markers of vascular dysfunction in diabetes. “European Society for Pharmacogenomics and Personalized Therapy, 4th Conference”, 03 - 08 octombrie 2017, Catania, Italy
28. **Antonescu ML**, Manea SA, Simionescu M, Manea A. Epigenetic regulation of NADPH oxidase 5 expression by p300/histone acetyltransferase in human macrophages. 8th National Congress with International Participation and 34rd Annual Scientific Session of the RSCB, 8-12 iunie 2016, Oradea, Bulletin of Romanian Society for Cell Biology, No. 44, June 2016, pg. 74
29. Manea A, Manea SA, **Antonescu ML**, Fenyo IM, Raicu M, Simionescu M. Pharmacological inhibition of histone deacetylase reduces vascular NADPH oxidase expression and reactive oxygen species formation in experimental diabetes. 8th National Congress with International Participation and 34rd Annual Scientific Session of the

RSCB, 8-12 iunie 2016, Oradea, Bulletin of Romanian Society for Cell Biology, No. 44, June 2016, pg 80

30. Manea A, Manea SA, Fenyó IM, Antonescu ML, Raicu M, Simionescu M. Pharmacological inhibition of histone deacetylase reduces oxidative stress and inflammation in the aorta of diabetic mice. The 4th International Symposium on Adipobiology and Adipopharmacology (ISAA), 28-31 octombrie 2015, Bucuresti, Romanian Journal of Diabetes, Nutrition and Metabolic Diseases, Volumul 22 (2015)/Supplement 2, pg. 29

## Premii

### Premii UEFISCDI

1. Antonescu ML, Manea SA, Raicu M, Muresian H, Simionescu M, Manea A (2019) Histone acetyltransferase-dependent pathways mediate NADPH oxidase 5 up-regulation in human macrophages under inflammatory conditions: a potential mechanism of reactive oxygen species overproduction in atherosclerosis. *Oxid Med Cell Longev* 2:3201062. **Factor de impact: 5,08**
2. Manea SA, Antonescu ML, Fenyó IM, Raicu M, Simionescu M, Manea A (2018) Epigenetic regulation of vascular NADPH oxidase expression and reactive oxygen species production by histone deacetylase-dependent mechanisms in experimental diabetes. *Redox Biology* 16: 332-343. **Factor de impact 7,8**

### Premii postere

1. Antonescu ML, Manea SA, Lazar AG, Raicu M, Muresian H, Simionescu M, Manea A. Epigenetic control of macrophage polarization by histone acetylation/deacetylation enzymes in experimental atherosclerosis. "The 36th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology and the 10th National Congress with International participation", 2018, Craiova, Romania
2. Lazar AG, Cosac MT, Vlad ML, Raicu M, Manea A, Manea SA Activation of P300 histone acetyltransferase dependent signaling pathways induces NADPH oxidase expression and oxidative stress in the kidney of diabetic mice. "The 11th National Congress with International Participation and the 37th Annual Scientific Session of the Romanian Society of Cell Biology", 20-23 iunie 2019, Constanta, Romania

## Granturi



### **1. PNCDI III, P2 - Creșterea competitivității economiei românești prin CDI**

Tip proiect: Proiect experimental demonstrativ (PED), Contract nr. 342/2020

Titlul proiectului: Strategie teranostica avansata in ateroscleroza care integreaza interventii farmaco-epigenomice si microbule biomimetice pentru administrarea tinta a medicamentelor cu ajutorul ultrasunetelor

Perioada: August 2020 - Iulie 2022

Director de proiect: Dr. Adrian Manea

### **2. PNCDI III, P2 - Creșterea competitivității economiei românești prin CDI**

Tip proiect: Proiect experimental demonstrativ (PED), Contract nr. 265/2020

Titlul proiectului: Strategie farmacologica inovatoare bazata pe triterpene pentru tratamentul complicatiilor micro- si macrovasculare asociate diabetului zaharat – studiu preclinic

Perioada: August 2020 - Iulie 2022

Director de proiect: Dr. Simona-Adriana Manea

### **3. PNCDI III, Programul 4 - Cercetare fundamentala si de frontiera**

Tip proiect: Proiecte complexe de cercetare de frontiera, Contract nr. 5/2018

Titlul proiectului: Tintirea mecanismelor imunitatii innascute pentru o mai buna stratificare a riscului si identificarea de noi optiuni terapeutice in infarctul de miocard

Perioada: Iulie 2018 - Iunie 2022

Director de proiect: Acad. Maya Simionescu

### **4. Programul Operațional Competitivitate, Axa prioritară 1: Cercetare, dezvoltare tehnologică și inovare (CDI) în sprijinul competitivității economice și dezvoltării afacerilor**

Tip proiect: Atragerea de personal cu competențe avansate din străinătate pentru consolidarea capacității de CD, Contract nr.115/2016

Titlul proiectului: Terapii tintite pentru boala valvei aortice in diabet (THERAVALDIS)

Perioada: Septembrie 2016 - Decembrie 2020

Director de proiect: Dr. Agneta Simionescu

### **5. PNCDI III, Programul 1 - Dezvoltarea sistemului national de cercetare dezvoltare**

Tip proiect: Proiecte de cercetare pentru stimularea tinerelor echipe independente, Contract nr. 51/2018

Titlul proiectului: Strategie preclinica pentru reducerea inflamatiei vasculare si stresului oxidativ in ateroscleroza prin modularea unor noi mecanisme moleculare dependente de ARN necodant

Perioada: Mai 2018 - Iulie 2020

Director de proiect: Dr. Adrian Manea

### **6. PNCDI III, Programul 4 - Cercetare fundamentala si de frontiera**

Tip proiect: Proiecte de cercetare exploratorie, Contract nr. 69/2017

Titlul proiectului: Noi mecanisme epigenetice implicate in activarea macrofagelor antiinflamatorii - potentiale tinte terapeutice in ateroscleroza

Perioada: Iulie 2017 - Decembrie 2019

Director de proiect: Acad. Maya Simionescu

### **7. PNCDI III, Programul 2 - Cresterea competitivitatii economiei romanesti prin cercetare, dezvoltare si inovare**

Tip proiect: Proiect experimental - demonstrativ, Contract nr. 137/2017

Titlul proiectului: Metoda neinvaziva bazata pe nanotehnologie pentru imagistica moleculara a stresului oxidativ in bolile cardiovasculare

Perioada: Ianuarie 2017– Septembrie 2018

Director de proiect: Dr. Adrian Manea

### **8. PNII IDEI, Contract nr. 107/2011**

Titlul proiectului: Mecanisme moleculare implicate in reglarea stresului oxidativ in ateroscleroza: dezvoltarea unor nanocomplexe functionale inovative pentru terapia antioxidanta

Perioada: Ianuarie 2012– Decembrie 2016

Director de proiect: Acad. Maya Simionescu

## **Bibliografie selectivă**

1. Aikawa M, Libby P (2004) Atherosclerotic plaque inflammation: The final frontier?. *Canadian Journal of Cardiology* 20: 631-4.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2007) Molecular biology of the cell. Garland Science.
3. Chen F, Li X, Aquadro E, Haigh S, Zhou J, Stepp DW, Weintraub NL, Barman SA, Fulton DJR (2016) Inhibition of histone deacetylase reduces transcription of NADPH oxidases and ROS production and ameliorates pulmonary arterial hypertension. *Free Radical Biology and Medicine* 99:167-178.

4. Chen X, Barozzi I, Termanini A, Prosperini E, Recchiuti A, Dalli J, Mietton F, Matteoli G, Hiebert S, Natoli G (2012) Requirement for the histone deacetylase Hdac3 for the inflammatory gene expression program in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: E2865–E2874.
5. Chinetti-Gbaguidi G, Sophie C, Staels B (2015) Macrophage subsets in atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology* 12:10–17.
6. Hassle M, Egger G (2012) Epigenomics of cancer - emerging new concepts. *Biochimie* 10: 1-12.
7. Kietzmann T, Petry A, Shvetsova A, Gerhold JM, Görlach A (2017) The epigenetic landscape related to reactive oxygen species formation in the cardiovascular system. *British Journal of Pharmacology* 174: 1533-1554.
8. Khyzha N, Alizada A, Wilson MD, Fish JE (2017) Epigenetics of atherosclerosis: emerging mechanisms and methods. *Trends in Molecular Medicine* 23: 332-347.
9. Kouzarides T (2007) Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 128: 693-705.
10. Kurdistani SK, Tavazoie S, Grunstein M (2004) Mapping Global Histone Acetylation Patterns to Gene Expression. *Cell* 11: 721–733.
11. Libby P (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420: 19-26.
12. Libby P, Ridker PM (2006) Inflammation and Atherothrombosis: From Population Biology and Bench Research to Clinical Practice. *Journal of the American College of Cardiology* 48: A33-46.
13. Manea A, Manea SA, Gafencu AV, Raicu M, Simionescu M (2008) AP-1-dependent transcriptional regulation of NADPH oxidase in human aortic smooth muscle cells: role of p22phox subunit. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28: 878–885.
14. Manea A (2010) NADPH oxidase-derived reactive oxygen species: involvement in vascular physiology and pathology. *Cell and Tissue Research* 342: 325-339.
15. Manea A, Tanase LI, Raicu M, Simionescu M (2010) Jak/STAT signaling pathway regulates nox1 and nox4-based NADPH oxidase in human aortic smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30: 105–112.
16. Manea A, Tanase LI, Raicu M, Simionescu M (2010) Transcriptional regulation of NADPH oxidase isoforms, Nox1 and Nox4, by nuclear factor-kappaB in human aortic smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396: 901–907.
17. Manea A, Simionescu M (2012) Nox enzymes and oxidative stress in atherosclerosis. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)* 4: 651-670.
18. Manea A, Manea SA, Florea IC, Luca CM, Raicu M (2012) Positive regulation of NADPH oxidase 5 by proinflammatory-related mechanisms in human aortic smooth muscle cells. *Free Radical Biology and Medicine* 52: 1497-1507.
19. Manea SA, Todirita A, Raicu M, Manea A (2014) C/EBP transcription factors regulate NADPH oxidase in human aortic smooth muscle cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 18: 1467-1477.

20. Manea A, Manea SA, Gan AM, Constantin A, Fenyo IM, Raicu M, Muresian H, Simionescu M (2015) Human monocytes and macrophages express NADPH oxidase 5; a potential source of reactive oxygen species in atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 461:172-9.
21. Manea SA, Constantin A, Manda G, Sasson S, Manea A (2015) Regulation of Nox enzymes expression in vascular pathophysiology: Focusing on transcription factors and epigenetic mechanisms. *Redox Biology* 5: 358-366.
22. Manea SA, Fenyo IM, Manea A (2016) c-Src tyrosine kinase mediates high glucose-induced endothelin-1 expression. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 75: 123-130.
23. Manea SA, Antonescu ML, Fenyo IM, Raicu M, Simionescu M, Manea A (2018) Epigenetic regulation of vascular NADPH oxidase expression and reactive oxygen species production by histone deacetylase-dependent mechanisms in experimental diabetes. *Redox Biology* 16: 332-343.
24. Schiano C, Vietri MT, Grimaldi V, Picascia A, De Pascale MR, Napoli C (2015) Epigenetic-related therapeutic challenges in cardiovascular disease. *Trends in Pharmacological Sciences* 36: 226-235.
25. Selemidis S, Sobey CG, Winkler K, Schmidt HH, Drummond GR (2008) NADPH oxidases in the vasculature: molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. *Pharmacol Ther* 120:254-91.
26. Sima AV, Stancu CS, Simionescu M (2008) Vascular endothelium in atherosclerosis. *Cell and Tissue Research* 335: 191.
27. Simionescu M (2007) Implications of Early-Structural-Functional Changes in the Endothelium for Vascular Diseases. *Atherosclerosis, Trombosis and Vascular Biology* 2: 266-74.
28. Simionescu N, Vasile E, Lupu F, Popescu G, Simionescu M (1986) Prelesional events in atherogenesis. Accumulation of extracellular cholesterol-rich liposomes in the arterial intima and cardiac valves of the hyperlipidemic rabbit. *The American Journal of Pathology* 123: 109-125.
29. Soto Y, Acosta E, Delgado L, Pérez A, Falcón V, Bécquer MA, Fraga Á, Brito V, Álvarez I, Griñán T, Fernández-Marrero Y, López-Requena A, Noa M, Fernández E, Vázquez AM (2012) Antiatherosclerotic effect of an antibody that binds to extracellular matrix glycosaminoglycans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32(3): 595-604.
30. Sumida A, Canugovi C, Lozhkin A, Hayami T, Madamanchi NR, Runge MS (2019) NOXA1-dependent NADPH oxidase regulates redox signaling and phenotype of vascular smooth muscle cell during atherogenesis. *Redox Biol.* 21: 101063.
31. Wang Y, Miao X, Liu Y, Li F, Liu Q, Sun J, Cai L (2014) Dysregulation of Histone Acetyltransferases and Deacetylases in Cardiovascular Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 10: 641968-61979.

32. Wang ZY, Qin W, Yi F (2015) Targeting histone deacetylases: perspectives for epigenetic-based therapy in cardio-cerebrovascular disease. *J. Geriatr. Cardiol.* 12: 153–164.
33. Zhong Y, Li J, Wang JJ, Chen C, Tran JT, Saadi A, Yu Q, Le YZ, Mandal MN, Anderson RE, Zhang SX (2012) X-box binding protein 1 is essential for the anti-oxidant defense and cell survival in the retinal pigment epithelium. *PLoS One* 7: e38616.