



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

TEZĂ DE DOCTORAT
REZUMAT

PROTEOMICA *RAFT*-URILOR LIPIDICE ȘI MECANISMELE
MOLECULARE IMPLICATE ÎN SEMNALIZARE ÎN MODELE
EXPERIMENTALE DE HIPERLIPIDEMIE

Conducător de doctorat

Dr. Antohe Felicia

Doctorand

Șuică Viorel-Iulian

București

2014

Conținut:

| | |
|---|----|
| INTRODUCERE | 10 |
| PARTEA I – STADIUL ACTUAL AL CUNOȘTIȚELOR PRIVIND RAFT-URILE LIPIDICE ȘI MECANISME MOLECULARE IMPLICATE ÎN SEMNALIZARE | 11 |
| I.1. Noțiuni introductive | 11 |
| I.2. Membrana celulară ca bază a organizării microdomeniilor membranare | 14 |
| I.2.1 Lipidele ca parte integrantă a membranelor celulare și a microdomeniilor membranare | 14 |
| I.2.2 Bistratul lipidic și asimetria membranară | 16 |
| I.2.3 Sterolii și colesterolul – constituenți majori ai microdomeniilor membranare..... | 19 |
| I.3. Conceptul de raft-uri lipidice (microdomenii membranare) | 21 |
| I.4. Dinamica moleculelor membranei plasmatice și a microdomeniilor membranare | 36 |
| I.4.1 Metode biochimice și biofizice de investigare a dinamicii raft-urilor lipidice | 38 |
| I.4.2 Stabilitatea raft-urilor lipidice generată de relația dintre dimensiune și timpul de viață | 41 |
| I.4.3 Modelarea și destabilizarea raft-urilor lipidice..... | 45 |
| I.5. Funcționalitatea dinamică a raft-urilor lipidice determinată de factori externi, membranari și citosolici | 49 |
| I.5.1 Factori externi care controlează dinamica raft-urilor..... | 50 |
| I.5.2 Controlul dinamicii raft-urilor lipidice la nivelul membranei plasmatice | 52 |
| I.5.3 Controlul dinamicii raft-urilor de către factori intracelulari | 57 |
| I.6. Raft-urile lipidice ca platformă de semnalizare | 59 |
| I.6.1 Formarea platformei de semnalizare prin raft-uri lipidice | 64 |
| I.7. Funcția de endocitoză dependentă de raft-uri lipidice/caveole | 68 |
| I.7.1 Endocitoza noncaveolară dependentă de dinamină | 74 |
| I.7.2 Endocitoza noncaveolară independentă de dinamină | 74 |
| I.7.3 Reglarea endocitozei dependentă de raft-uri. Reglarea negativă prin Cav1. Rolul colesterolului și a citoscheletului actinic în endocitoza mediată de raft-uri | 76 |
| I.7.4 Endocitoza prin raft-uri și modularea cascadelor de semnalizare..... | 79 |
| I.8. Funcția apoptotică dependentă de microdomenii membranare plasmatice | 81 |
| I.8.1 Apoptoza prin receptori membranari și canale | 84 |
| I.8.1.1 Fas | 84 |
| I.8.1.2 CD5 | 85 |
| I.8.1.3 CD20..... | 86 |

| | |
|--|------------|
| I.8.1.4 Trpc-1 | 86 |
| I.8.2 Rolul <i>raft</i> -urilor lipidice în apoptoza indusă de protein kinaze..... | 87 |
| I.8.2.1 Akt | 87 |
| I.8.2.2 JNK..... | 88 |
| I.8.2.3 Familia de kinaze Src..... | 89 |
| I.8.2.4 Familia de proteine PKC..... | 89 |
| I.9. Aterogeneza și mecanisme de semnalizare prin <i>raft-uri</i> lipidice | 91 |
| I.9.1 Transportul transendotelial al lipoproteinelor de joasă densitate | 93 |
| I.9.1.1 Excesul hiperlipidemic ca factor de stres în procesul aterogenic induce modificarea compoziției <i>raft</i> -urilor lipidice | 93 |
| I.9.1.2 Mecanismele de acțiune a lipoproteinelor de înaltă densitate și a statinelor și implicații asupra structurii (compoziției) <i>raft</i> -urilor lipidice | 98 |
| I.9.2 Procesul inflamator promovat prin <i>raft-uri</i> lipidice..... | 101 |
| I.9.3 Activitatea proteazică asociată <i>raft</i> -urilor lipidice..... | 102 |
| I.9.4 Implicarea <i>raft</i> -urilor lipidice în proliferarea celulelor musculare netede cu implicații în ateroscleroza..... | 104 |
| PARTEA A II-A – CONTRIBUȚII ORIGINALE..... | 105 |
| II.1. Introducere și obiective | 105 |
| II.2 Metodologie experimentală | 110 |
| II.2.1 Reactivi..... | 110 |
| II.2.2 Modele experimentale..... | 111 |
| II.2.2.1 Hamsteri..... | 111 |
| II.2.2.2 Șoareci..... | 112 |
| II.2.3 Microscopie optică pe criosecțiuni | 112 |
| II.2.4 Tehnica ELISA | 113 |
| II.2.5 Izolarea <i>raft</i> -urilor lipidice prin ultracentrifugare în gradient de sucroză | 113 |
| II.2.6 Electroforeza unidimensională și <i>Western blotting</i> | 114 |
| II.2.7 Electroforeza diferențială bidimensională (2D-DIGE)..... | 115 |
| II.2.8 Spectrometria de masă de mare performanță cuplată cu cromatografie de lichide. Spectrometria de masă de tip MALDI-TOF | 122 |
| II.2.8.1 Prepararea probelor pentru analiza LC-MS/MS..... | 132 |
| II.2.8.2 Separarea peptidelor prin nano-cromatografie de lichide | 133 |
| II.2.8.3 Analiza spectrometrică de masă (LC-MS și MALDI-TOF)..... | 134 |

| | |
|---|------------|
| II.2.8.4 Prelucrarea datelor spectrometrice de masă (LC-MS) pentru identificarea proteică | 134 |
| II.2.8.5 Prelucrarea datelor spectrometrice de masă (LC-MS) pentru cuantificarea proteică | 135 |
| II.2.8.6 Identificarea căilor de semnalizare reprezentative pentru proteomul identificat | 137 |
| II.2.8.7 Analiza MALDI-TOF | 138 |
| II.2.9 Analiza statistică | 139 |
| II.3 Rezultate. Studii experimentale și prelucrarea bioinformatică a datelor | 140 |
| II.3.1 Validarea și caracterizarea modelelor experimentale | 140 |
| II.3.1.1 Șoarecii ApoE deficienți | 140 |
| II.3.1.2 Hamsterii hiperlipidemici | 142 |
| II.3.2 Caracterizarea DRM-urilor izolate de la loturile de șoareci și hamsteri | 144 |
| II.3.2.1 Discuții și concluzii | 151 |
| II.3.3 Metodologia experimentală 2D-DIGE a relevat modificări substanțiale la nivelul profi- proteice bidimensionale ale DRM-urilor izolate de la hamsterii hiperlipidemici | 154 |
| II.3.3.1 Analiza spoturilor cu sistemul de spectrometrie de masă MALDI-TOF a relevat că hiperlipidemia și tratamentul cu statină alterează expresiile unor proteine structurale și de semnalizare | 163 |
| II.3.3.2 Discuții și concluzii | 167 |
| II.3.4 Analiza proteomică diferențială a căilor de semnalizare dependente de actină din microdomeniile membranare în ateroscleroza experimentală a șoarecilor ApoE deficienți | 169 |
| II.3.4.1 Analiza proteomică de tip <i>Shotgun</i> | 169 |
| II.3.4.2 Cuantificarea relativă a proteinelor identificate în DRM-uri | 172 |
| II.3.4.3 Analiza expresiei proteinelor din DRM-uri în căile de semnalizare dependente de actină | 174 |
| II.3.4.4 Discuții și concluzii | 180 |
| II.3.5 Modificarea expresiei unor proteine rezidente ori atașate DRM-urilor. Spectrometria de masă demonstrează rolul regulator al DRM-urilor asupra Hsp-urilor | 186 |
| II.3.5.1 Hiperlipidemia induce o creștere a expresiei proteice a caveolinei-1 în DRM-uri | 186 |
| II.3.5.2 Hiperlipidemia induce expresia proteică scăzută a PTRF în DRM-uri | 187 |
| II.3.5.2 Expresia unor proteine co-fracționate cu proteina caveolină-1 (filamină A, dinamină) . | 188 |
| II.3.5.3 Hsp-urile eliberate în ser și localizarea acestora în DRM-uri | 189 |
| II.3.5.4 Discuții și concluzii | 191 |
| II.3.6 Analiza comparativă proteomică a microdomeniilor membranare izolate de la două modele experimentale de hiperlipidemie | 195 |
| II.3.6.1 Analiza spectrometrică de masă calitativă | 195 |

| | | |
|---------------------------|---|------------|
| II.3.6.2 | Cuantificarea relativă a proteinelor identificate în DRM-uri | 201 |
| II.3.6.3 | Mecanisme moleculare comune în care sunt implicate proteinele diferit exprimate în probele izolate de la <i>Mus Musculus</i> și <i>Mesocricetus Auratus</i> | 205 |
| II.3.6.4 | Căi de semnalizare în care sunt implicate proteinele diferit exprimate izolate din DRM-urile din <i>Mus Musculus</i> | 214 |
| II.3.6.5 | Căi de semnalizare în care sunt implicate proteinele diferit exprimate izolate din DRM-urile din <i>Mescocricetus Auratus</i> | 218 |
| II.3.6.6 | Discuții și concluzii | 220 |
| II.4 | Concluzii generale | 222 |
| Bibliografie | | 226 |
| Lista de abrevieri | | 252 |

Cuvinte cheie:

Raft-uri lipidice

Microdomenii membranare rezistente la solubilizarea cu detergenți

Endoteliu pulmonar

Hiperlipidemie

Ateroscleroză

Citoschelet

Șoarece ApoE deficient

Hamster hiperlipidemic

Proteomică

Spectrometrie de masă

INTRODUCERE

Ateroscleroza reprezintă o maladie în special a arterelor de calibru mare și mediu cu manifestări clinice severe (plăci aterosclerotice) și finalitate tragică (ischemie cardiacă, cangrena membrelor inferioare, encefalopatie ischemică, infarct miocardic, infarct cerebral). Hiperlipidemia este un factor major de risc în ateroscleroză, conținutul crescut de lipide circulante fiind de obicei contracarat prin tratament cu statine.

Celulele endoteliale sunt primele care iau contact și sunt activate de factorii pro-aterogenici, ca de exemplu nivelele crescute de colesterol și trigliceride din lipoproteinele circulante, care le determină disfuncționalitatea. Endoteliul pulmonar este implicat direct într-o serie de funcții vitale organismului (schimb de soluți, reglarea tonusului vascular, vasculogeneză, angiogeneză) și deși nu dezvoltă în mod normal plăci aterosclerotice, acesta poate fi activat de factorii stresanți, pro-aterogenici (dietă hiperlipidemică, hipertensiune, producție dereglată de oxid nitric, etc.) cu implicații în alterarea căilor de semnalizare din zonele predispușe la apariția plăcilor.

Studiile de specialitate au dovedit importanța majoră a mecanismelor de semnalizare de la nivelul membranelor biologice, bariere structurale și funcționale implicate activ în homeostazia celulei. Microdomeniile membranare reprezintă nano-ansamble dinamice din componența membranelor, cu un conținut proteic și lipidic special și rol în reglarea transportului celular, homeostazia colesterolului, etc. Structura particulară a acestora determină caracteristica de a fi insolubile în detergenții non-ionici și flotația într-un gradient de densitate ca urmare a ultracentrifugării la 200000xg. Profilul proteic, îmbogățit în proteine de semnalizare, sugerează implicarea activă a lor în procese moleculare fiziologice, dar și patologice.

Prezenta lucrare a avut ca scop investigarea mecanismelor moleculare de la nivelul microdomeniilor membranare izolate din endoteliul pulmonar, ca urmare a inducerii unui stres hiperlipidemic în două modele experimentale de laborator: șoarecele ApoE deficient și Hamsterul Sirian Auriu supus unei diete hiperlipidemice.

PARTEA I – STADIUL ACTUAL AL CUNOȘTIȚELOR PRIVIND RAFT-URILE LIPIDICE ȘI MECANISME MOLECULARE IMPLICATE ÎN SEMNALIZARE

Modelul „mozaicului fluid” a fost enunțat în 1972 (Singer și Nicolson, 1972) pentru explicarea organizării structurale și functionale a membranei plasmatică. Acesta raspundea la întrebările referitoare la rolurile pe care membrana plasmatică le îndeplinește: procese de transport, protecție, contacte celula-celula, mecanisme de semnalizare.

Studiile ulterioare (Pike, 2003; Engelman, 2005) au dovedit că membrana plasmatică este mai mult mozaic decât fluid, propunându-se un nou model de organizare membranară, în care aceasta apare „peticită”, cu porțiuni segregate, distincte în grosime și compoziție.

Totuși, conceptul de microdomenii membranare a apărut mult mai devreme (Klausner et al., 1980; Simionescu et al., 1981; van Meer și Simons, 1983, etc.) iar denumirea de *raft*-uri lipidice a fost propusă în 1997 (Simons și Ikonen, 1997), acestea fiind descrise ca insule plutitoare de pe suprafața membranei. *Raft*-urile lipidice sunt îmbogățite în colesterol, glicosfingolipide, fosfolipide saturate, a căror împachetare rigidă permite o separare de fază, dar și proteine specializate. În prezent, acestea sunt văzute ca nano-ansamble proteice ordonate, dinamice, bogate în sfingolipide și colesterol, în care starea de repaus metastabilă poate fi activată sub acțiunea unor stimuli să atragă și să realizeze interacțiuni specifice lipid-lipid, proteină-lipid și proteină-proteină cu formarea unor platforme de semnalizare (Hancock, 2006).

Funcțiile *raft*-urilor lipidice în diferite tipuri celulare a reprezentat domeniul de studiu pentru multe grupuri de cercetători de-a lungul anilor. Printre acestea se numără polarizarea, semnalizare celulară, endocitoza, homeostazia colesterolului, procese de adeziune celulă-celulă și celulă-factor patogen (Jacobson et al., 2007), însă cel mai apreciat rol al acestora este posibilitatea de recrutare și concentrare a moleculelor implicate în semnalizarea celulară. S-a evidențiat că prin coalescența microdomeniilor membranare se eficientizează procesul de semnalizare. De asemenea o caracteristică majoră a microdomeniilor membranare, în special a caveolelor (subdomeniu

membranelor) este funcția de transport realizată prin endocitoză și transcitoză unor molecule specifice în particular în celulele endoteliale (Palade et al., 1981; Vasile et al., 1983; Nistor și Simionescu, 1986). De exemplu, caveolele reprezintă principala rută de transport a albuminei în celulele endoteliale, printr-un proces de transcitoză (Predescu et al., 1988, Antohe et al., 1991). De asemenea, prin caveole se realizează transportul anticorpilor împotriva aminopeptidazei P din fluxul sangvin prin endoteliu către țesutul pulmonar (Oh et al., 2007).

Observațiile că numeroase proteine membranare implicate în semnalizare celulară, procese de adeziune și migrare, sunt localizate în microdomeniile membranare, împreună cu datele furnizate de studiile pe nano-ansamble de steroli, sfingolipide și proteine în celule vii, a crescut interesul privind funcțiile biologice ale *raft*-urilor lipidice și în special rolul acestora în inflamație și răspunsul imun. Se pare că microdomeniile îmbogățite în colesterol și sfingolipide sunt reglatori majori ai patofiziologiei aterosclerotice. Tipul și compoziția lipidică a membranei plasmatice *per se* reprezintă un determinant major în localizarea proteinelor în *raft*-uri lipidice, iar schimbări subtile în compoziția lipidică a membranei plasmatice și în special în conținutul de colesterol pot rezulta în modificări generale ale cascadelor de semnalizare.

Ateroscleroza a fost percepută multă vreme ca un proces lent și ireversibil. Noile cunoștințe în domeniu relevă însă faptul că aceasta este un proces multi-zonal, dinamic și totodată reversibil atunci când tratamentul este aplicat din timp. Celulele endoteliale sunt în mod special implicate în dezvoltarea și progresia (sau regresia) leziunilor aterosclerotice. Endoteliul vascular este primul strat celular care interacționează cu diferiți factori de stres pro-aterogeni sau modificări biochimice de la nivelul plasmei sangvine, în urma cărora se activează, stare care se traduce prin disfuncție endotelială și vasculară (Blankenberg et al., 2003; Simionescu și Antohe, 2006; Pavlides et al., 2014).

Endoteliul pulmonar este implicat activ în realizarea funcțiilor vitale ale organismului, precum schimbul de soluți, fibrinoliză, coagulare, reglarea vasculogenezei și angiogenezei, interacția cu plachetele și leucocitele (Lucas, 2008). Deși plăcile

aterosclerotice nu se dezvoltă în mod normal în vasculatura pulmonară, diferite studii sugerează ca endoteliul pulmonar în mod particular reprezintă un situs biologic determinant, care poate fi modulată pentru îmbunătățirea sănătății folosind inhibitori pentru enzima de conversie a angiotensinei și statine (Lucas, 2008, Osto et al., 2007). Date publicate au demonstrat că factori de stres aterosclerotici precum dieta bogată în lipide (Uyy et al., 2013; Haraba et al., 2011), hipertensiunea (Sellers et al., 2008), speciile reactive de oxigen (Lang et al., 2002), o producție dereglată de oxid nitric (Sud et al., 2007), supra-producția de citokine, chemokine (Hamacher et al., 2002; Bechara et al., 2007) și dereglarea proceselor de coagulare și fibrinoliză (Lucas et al., 1997; Russel et al., 2003), pot activa endoteliul pulmonar, afectând multiple căi de semnalizare, cu impact semnificativ asupra stabilității plăcilor aterosclerotice din zonele vasculare predispuse la apariția acestora.

Statinele sunt medicamente care scad nivelul lipidelor din sânge, fiind dezvoltate și testate clinic pentru caracteristicile speciale de a regla biosinteza colesterolului. Diferite studii de măsurare a parametrilor hemostatici au demonstrat de asemenea efectele benefice ale statinelor asupra celulelor endoteliale, inclusiv promovarea unei stări pro-fibrinolitice (Seljeflot et al., 2002).

Având în vedere numeroasele aspecte nerezolvate încă, ne-am propus ca obiectiv general să ne concentrăm asupra mecanismelor moleculare de semnalizare localizate la nivelul membranei plasmatică utilizând modele animale experimentale de hiperlipidemie (Hamsteri Sirieni Aurii și șoareci ApoE deficienți) și analize biochimice, de spectrometrie de masă și bioinformatică. Utilizând metodele deja existente pentru separarea microdomeniilor membranare, am urmărit modificările induse de dieta hiperlipidemică asociată sau nu cu modificări genice (deficiență în gena ApoE) în compoziția proteică a microdomeniilor membranare insolubile în detergenți non-ionici (DRM) și am analizat modificarea proteomului și a căilor de semnalizare alterate.

PARTEA A II-A – CONTRIBUȚII ORIGINALE

Pentru evidențierea mecanismelor moleculare implicate în semnalizare localizate la nivelul microdomeniilor membranare în hiperlipidemie, am utilizat două modele experimentale de animale de laborator hiperlipidemice: șoarecele ApoE deficient și Hamsterul Sirian Auriu, supuși unor diete hiperlipidemice. Controalele au fost reprezentate de un lot de șoareci C57 Black, respectiv un lot de hamsteri cu dietă standard. De asemenea, în acest studiu au mai fost folosite loturi de animale care după dieta hiperlipidemică au fost trecuți pe dietă standard, în paralel cu un tratament cu statină. Astfel, după dieta hiperlipidemică, șoarecii ApoE deficienți și Hamsterii Sirieni Aurii au prezentat nivele semnificativ crescute de colesterol și trigliceride serice față de loturile control. Tratamentul cu statină a determinat scăderea semnificativă a nivelelor de colesterol și trigliceride serice. Experimente de microscopie optică au evidențiat depozite lipidice la nivelul valvelor cardiace prelevate în serie prin crioprotecție și secționare la criotom în ambele loturi hiperlipidemice ale celor două tipuri de animale.

Microdomeniile membranare au fost izolate și purificate pe baza caracteristicii acestora de a fi rezistente la solubilizarea cu detergenți non-ionici și a flotației selective într-un gradient de densitate (Sargiacomo et al., 1993). Din cele 12 fracții colectate în urma ultracentrifugării la 200000xg s-a evidențiat o concentrație crescută de proteine, colesterol și glicerolipide în fracțiile 4 și 5, de la interfața dintre soluțiile de 5%, respectiv 30% sucroză. Aceste 2 fracții au fost combinate și numite microdomenii membranare rezistente la solubilizarea cu detergenți non-ionici (DRM), fiind ulterior utilizate în experimentele calitative și cantitative. S-a demonstrat de asemenea, originea preponderent endotelială a microdomeniilor izolate, prin detectarea maximumului de activitate al enzimei de conversie a angiotensinei, la nivelul celor două fracții amintite. În plus, s-a observat o activitate crescută la nivelul șoarecilor ApoE deficienți care au primit o dietă hiperlipidemică și a celor care au primit tratament cu statină, sugerându-se astfel activarea endoteliului ca urmare a stresului hiperlipidemic. Validarea izolării

microdomeniilor membranare s-a realizat prin experimente imunologice și de spectrometrie de masă.

DRM-urile extrase de la loturile de hamsteri au fost solubilizate și purificate pentru extracție proteică. Acestea au fost premarcate cu cianine fluorescente și supuse focalizării izoelectrice pentru separarea în funcție de punctul izoelectric și electroforezei unidimensionale pentru separare în funcție de greutatea moleculară (2D-DIGE). Folosirea unui sistem de imagistică pe baza de scanare, foarte performant împreună cu analiza bio-informatică ulterioară, au permis detecția a ~1500 de spoturi proteice diferite în domeniul de pH 4-9. Tehnica 2D-DIGE utilizată a permis de asemenea obținerea unei foarte bune reproductibilități între probele analizate, ceea ce a determinat un grad înalt de confidență în analiza cantitativă ulterioară. În urma acesteia, s-au evidențiat 48 de spoturi proteice diferit exprimate între grupul control și cel care a primit tratament cu statină, 85 de spoturi cu abundență alterată determinată de dieta hiperlipidemică și tratamentul cu statina, în total observându-se peste 200 de spoturi proteice cu expresii alterate. Spoturile astfel analizate au fost excizate în mod automat din geluri și procesate pentru analiza spectrometrică de masă utilizând un sistem de tip MALDI-TOF prin *Peptide Mass Fingerprinting*. Aceasta a relevat identificarea unor proteine de natură structurală (variante de actină, vimentină, tubulină, miozină), citochine (interferon, interleuchine), a diferite molecule cu rol general în semnalizare (GTP-aze, receptori, Hsp-uri, etc), a unora cu rol în trafic și transport celular (anexină, ATP-sintază, canale membranare, etc), precum și numeroase enzime (sintaze, reductaze, dehidrogenaze, nucleotidaza, caspaze, etc). Dintre aceste molecule, s-a observat că dieta hiperlipidemică a acționat prin creșterea expresiei unor molecule (beta actinei, vimentinei, interferonului, precursorului interleukinei-1, inozitol fosfatazei F, caspazei-12, anexinei A3 și sintazei de acid gras), pe când în cazul altora aceasta a fost diminuată (tubulină, Ras, Grp94). Tratamentul cu statină a determinat scăderea abundenței până la un nivel comparabil cu controlul (*HDL binding protein*, anexina A3, Grp94), dar și un efect invers în cazul antigenului MHC de clasa II, kinazei CRA, proteinei de trafic a sintazei oxidului nitric.

Tehnica de înaltă performanță bazată pe spectrometrie de masă cuplată cu nano-cromatografia de lichide a fost aplicată pentru analiza calitativă și cantitativă

relativă a DRM-urilor extrase de la loturile de șoareci. Astfel, prin tehnica *MudPIT*, au fost identificate 1279 de proteine în grupa control, 1233 în cea hiperlipidemică și 1239 la nivelul grupei de șoareci care a primit tratament cu statină. Analiza în bazele de date de *Ontologie Genică* au relevat că, din punct de vedere al *Componentei Celulare*, majoritatea proteinelor identificate sunt într-adevăr de origine membranară. Totuși, s-au identificat cu mare confidență și proteine de origine nucleară, citoscheletală, citosolică, mitocondrială și extracelulară. Distribuția proteinelor pe baza *Procesului Biologic* a demonstrat un rol principal al acestora în procese metabolice, reglarea proceselor biologice, răspuns la stimuli, organizare celulară și biogeneză, comunicare celulară, dezvoltare și diferențiere celulară. Categoria de *Funcții Moleculare* ale proteinelor este bazată pe același tip de evaluare și a demonstrat o principală reprezentare a proteinelor în evenimente de interacție moleculară, dar și în activitate catalitică, interacție cu nucleotide, legarea ionilor metalici și activitate structurală moleculară. În urma analizei de cuantificare relativă, s-au obținut 654 de proteine diferit exprimate în grupele hiperlipidemice și cu tratament cu statină relativ la grupa control. Distribuția spațială cantitativă a acestora, prin *Analiza Componentelor Principali*, a relevat o diferențiere foarte bună a grupelor de DRM-uri luate în lucru. Dintre proteinele diferit exprimate în mod semnificativ, 29 de proteine au fost strâns corelate cu interacția citoschelet-DRM-uri. Analiza acestora a relevat că stresul hiperlipidemic și tratamentul cu statină afectează în mod particular următoarele căi de semnalizare *KEGG*, care au fost găsite suprareprezentate din punct de vedere statistic: *Reglarea Citoscheletului Actinic*, *Adeziune Focală* și *Joncțiuni Aderente*.

De asemenea, prin studii imunologice, biochimice și de spectrometrie de masă au fost evidențiate molecule proteice rezidente ori asociate DRM-urilor extrase din loturile de șoareci, a căror expresie a fost alterată semnificativ de stresul hiperlipidemic și tratamentul cu statină. Astfel, s-a demonstrat că disfuncția cardiopulmonară apărută ca urmare a hiperlipidemie, afectează expresia caveolinei-1, aceasta crescând în mod semnificativ, dar și a PTRF, care scade semnificativ. De asemenea, s-a demonstrat co-fracționarea și alterarea expresiei dinaminei (care scade semnificativ în grupa hiperlipidemică), filaminei (care crește în grupa hiperlipidemică), a Hsp70 (expresie semnificativ crescută în grupa hiperlipidemică) și Hsp90 (expresie semnificativ scăzută

în grupa hiperlipidemică) cu DRM-urile izolate. Rezultatele obținute au dus la corelarea nivelului secretat în ser al Hsp-urilor menționate cu nivelul tisular al acestora, evidențiindu-se un posibil rol transportor și reglator al DRM-urilor.

Prin experimente de spectrometrie de masă de înaltă performanță, s-a realizat compararea profilelor proteice ale DRM-urilor izolate de la lotul de șoareci și de la lotul de hamsteri. Prin procentul mare de proteine identificate atribuite organismului *Mus Musculus* în grupele de hamsteri (~65%), precum și prin evaluarea profilelor cromatografice, s-a demonstrat înalta omologie a celor două organisme. De asemenea, analiza de Ontologie Genică realizată cu Protein Center, a evidențiat profilul asemănător al proteinelor identificate de la cele două loturi, majoritatea fiind de origine membranară, extracelulară, citoscheletală, nucleară și mitocondrială, cu rol în procese metabolice, răspuns la stimuli, organizare celulară și biogeneză, fiind implicate în interacție proteică, activitate catalitică și legarea nucleotidelor. Analiza cantitativă relativă a relevat 830 de proteine a căror abundență este modificată de hiperlipidemie și tratamentul cu statina. Cele 422 de proteine diferit exprimate și unic atribuite lotului de șoareci au fost găsite în căile KEGG de semnalizare suprareprezentate statistic: *Procesarea și Prezentarea Antigenului, Calea TCA și Metabolismul Medicamentelor*. În lotul de hamsteri, au fost găsite 288 de proteine cu expresie semnificativ alterată de stresul hiperlipidemic și tratamentul cu statină. Acestea au fost implicate în *Joncțiuni Aderente și Fosforilarea Oxidativă*. În mod interesant, hiperlipidemia a acționat asupra a 120 de proteine atât în lotul de șoareci cât și în cel de hamsteri. Acestea au fost implicate în *Migrarea transendotelială leucocitară, Joncțiuni Strânse, Fosforilarea Oxidativă și Calea Fagozomală*.

Astfel, se poate concluziona că moleculele și căile de semnalizare identificate cu mare confidență și semnificație statistică pot reprezenta noi direcții de studiu a implicațiilor extraordinare pe care hiperlipidemia le demonstrează în funcționalitatea țesuturilor și organelor.

Bibliografie:

1. Antohe F, Heltianu C, Simionescu M. 1991. Albumin binding proteins of endothelial cells: immunocytochemical detection of the 18kDa peptide. *Eur. J. Cell Biol.*, 56, 34-42.
2. Bechara C, Chai H, Lin PH, Yao Q, Chen C., 2007. Growth related oncogene-alpha (GRO-alpha): roles in atherosclerosis, angiogenesis and other inflammatory conditions. *Med Sci Monit* 13:RA87-90.
3. Blankenberg S, Barboux S, Tiret L., 2003. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 170:191-203.
4. Engelman DM. 2005. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* 438: 578–580.
5. Hamacher J, Lucas R, Lijnen HR, Buschke S, Dunant Y, Wendel A, et al., 2002. Tumor necrosis factor-alpha and angiostatin are mediators of endothelial cytotoxicity in bronchoalveolar lavages of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 166:651-6.
6. Hancock JF. 2006. Lipid rafts: Contentious only from simplistic standpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 456–462.
7. Haraba R, Suica VI, Uyy E, Ivan L, Antohe F., 2011. Hyperlipidemia stimulates the extracellular release of the nuclear high mobility group box 1 protein. *Cell Tissue Res* 346:361-8.
8. Jacobson K, Mouritsen OG, Anderson RGW. 2007. Lipid rafts: At a crossroad between cell biology and physics. *Nat Cell Biol* 9: 7–14.
9. Klausner, R.D., Kleinfeld, A.M., Hoover, R.L. and Karnovsky, M.J. 1980. Lipid domains in membranes. Evidence derived from structural perturbations induced by free fatty acids and lifetime heterogeneity analysis. *J. Biol. Chem.* 255, 1286–1295
10. Lang JD, McArdle PJ, O'Reilly PJ, Matalon S., 2002. Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury. *Chest* 122:314S-20S.
11. Lucas R, Lou J, Morel DR, Ricou B, Suter PM, Grau GE., 1997. TNF receptors in the microvascular pathology of acute respiratory distress syndrome and cerebral malaria. *J Leukoc Biol* 61:551-8.
12. Lucas R., 2008. Recent advances on the role of the endothelium in pulmonary function and disease. *Vascul Pharmacol* 49:111-2.
13. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J et al., 2003. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for a new definitions and risk assessment strategies: part I. *Circulation* 108:1664–1672
14. Nistor A, Simionescu M., 1986. Uptake of low density lipoproteins by the hamster lung. Interactions with capillary endothelium. *Am Rev Respir Dis.*; 134(6):1266-72.
15. Oh, P., Borgstrom, P., Witkiewicz, H., Li, Y., Borgstrom, B.J., Chrastina, A., et al., 2007. Live dynamic imaging of caveolae pumping targeted antibody rapidly and specifically across endothelium in the lung. *Nat. Biotechnol.* 25, 327–337.
16. Osto E, Coppolino G, Volpe M, Cosentino F., 2007. Restoring the dysfunctional endothelium. *Curr Pharm Des* 13:1053-68.
17. Palade GE, Simionescu M, Simionescu N., 1981. Differentiated microdomains on the luminal surface of the capillary endothelium. *Biorrheology*, 17, 563-568, 1981.
18. Pavlides S, Gutierrez-Pajares JL, Iturrieta J, Lisanti MP, Frank PG., 2014. Endothelial caveolin-1 plays a major role in the development of atherosclerosis. *Cell Tissue Res* 356:147-57
19. Pike, L.J. 2003. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* 44, 655–667
20. Predescu D, Simionescu N, Simionescu M, Palade GE. 1988. Binding and transcytosis of glycoalbumin by the microvascular endothelium of the murine myocardium. Evidence that the glycoalbumin behaves as a bifunctional ligand. *J. Cell Biol.*, 107, 1729-1738.
21. Russell JA., 2003. Genetics of coagulation factors in acute lung injury. *Crit Care Med* 31:S243-7.
22. Sargiacomo M, Sudol M, Tang ZL, Lisanti MP., 1993. Signal transducing molecules and GPI-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J Cell Biol* 122:789–807
23. Seljeflot I, Tonstad S, Hjermann I, Arnesen H., 2002. Improved fibrinolysis after 1-year treatment with HMG CoA reductase inhibitors in patients with coronary heart disease. *Thromb Res* 105:285-90.
24. Sellers MM, Stallone JN., 2008. Sympathy for the devil: the role of thromboxane in the regulation of vascular tone and blood pressure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294:H1978-86.

25. Simionescu M, Antohe F., 2006. Functional ultrastructure of the vascular endothelium—changes in various pathologies. In: Moncada S, Higgs A (eds) Handbook of physiology and biochemistry, vol 176/I. Springer, Berlin, pp 41–69
26. Simionescu N, Simionescu M, Palade GE., 1981. Differentiated microdomains on the luminal surface of the capillary endothelium. I. Preferential distribution of anionic sites. *J. Cell Biol.*, 90, 605-613.
27. Simons K, Ikonen E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569–572.
28. Singer, S.J. and Nicolson, G.L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720–731
29. Sud N, Sharma S, Wiseman DA, Harmon C, Kumar S, Venema RC, et al., 2007. Nitric oxide and superoxide generation from endothelial NOS: modulation by HSP90. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293:L1444-53.
30. Uyy E, Ivan L, Boteanu RM, Suica VI, Antohe F., 2013. High-fat diet alters protein composition of detergent-resistant membrane microdomains. *Cell Tissue Res* 354:771-81.
31. van Meer, G. and Simons, K. 1983. An efficient method for introducing defined lipids into the plasma membrane of mammalian cells. *J. Cell Biol.* 97, 1365–1374
32. Vasile E, Simionescu M, Simionescu N., 1983. Visualization of the binding, endocytosis, and transcytosis of low-density lipoprotein in the arterial endothelium in situ. *J Cell Biol.* Jun;96(6):1677-89.