



Academia Română
Institutul de Biologie și Patologie Celulară
„Nicolae Simionescu”



TEZA DE DOCTORAT

**Modularea expresiei genice a
apolipoproteinelor cu potențial
terapeutic in ateroscleroză**

Rezumatul tezei de doctorat

Conducător Științific

Acad. Maya Simionescu

Doctorand

Trușcă Georgeta Violeta

**BUCUREȘTI
2013**

CUPRINS

Partea I

Nivelul actual al cunoștințelor

Introducere	5
I. Metabolismul lipoproteinelor in condiții normale și patologice	7
I. 1. Clasificarea și compoziția lipoproteinelor	7
I. 2. Caracteristici generale ale apolipoproteinelor	14
I. 3. Metabolismul chilomicronilor, VLDL, LDL, IDL și HDL	19
I. 4. Implicarea lipoproteinelor in patologia vasculară, ateroscleroza	22
I. 5. Efluxul de colesterol din celule, proces antiaterosclerotic	26
II. Caracterizarea structurală și funcțională a apoE și apoCII	31
II. 1 Apolipoproteina E	31
II. 1. 1. Structura genei apoE	32
II. 1. 2. Reglarea genică a apoE	32
II. 1. 3. Structura proteinei apoE	35
II. 1. 4. Izoformele apoE	36
II. 1. 5. Receptorii pentru apoE	41
II. 1. 6. Rolul apolipoproteinei E și implicarea ei in ateroscleroză.....	44
II. 2. Apolipoproteina CII	49
II. 2. 1. Structura genei apoCII	49
II. 2. 2. Reglarea genică a apoCII	50
II. 2. 3. Structura proteinei apoCII	51
II. 2. 4. Principalele funcții ale apoCII	54
III. Reglarea expresiei genice	56
III. 1. Elemente reglatoare genice proximale și distale	56
III. 2. Mecanismul inițierii transcripției genice	58
III. 3. Factori de transcripție și receptori nucleari implicați in modularea expresiei genice	60
III. 3. 1. Factori implicați in diferențierea macrofagelor	61
III. 3. 2. Complexul de factori transcripționali AP-1	66
III. 3. 3. Factorii de transcripție STAT	77
III. 3. 4. Factorii de transcripție c-Myb	81
III. 3. 5. Receptorii nucleari RXR	83

Partea a II a

Contribu ii originale

IV. Materiale și Metode	86
IV. 1. Culturi celulare	86
IV. 2. Plasmide	87
IV. 2. 1. Plasmide conținând elementele reglatoare ale apoE	87
IV. 2. 2. Plasmide conținând elementele reglatoare ale apoCII	90
IV. 2. 3. Plasmide conținând elementele reglatoare ale apoCI și apoCIV	90
IV. 2. 4. Clonarea plasmidelor (+)ME.2-luc și (-)ME.2-luc	91
IV. 2. 5. Construirea plasmidei care generează shRNA pentru inhibiția STAT1	94
IV. 2. 6. Clonarea promotorului CMV în vectorul pGL3 basic	97
IV. 2. 7. Clonarea CHOP în vectorul pCMV-Sport6	99
IV. 3. Transfecții tranziente	101
IV. 4. Determinarea activității enzimatică a luciferazei și β -galactozidazei.....	102
IV. 5. Determinarea concentrației proteice	103
IV. 6. Tehnica precipitării proteinelor legate la ADN biotinitat	103
IV. 7. Imunotransfer	106
IV. 8. Tehnica 3C (captura conformațională cromosomală)	107
IV. 9. Imunoprecipitarea cromatinei (ChIP)	108
IV. 10. Tehnica de precipitare a proteinelor recombinante fuzionate cu GST.....	108
IV. 11. Co-imunoprecipitare	109
IV. 12. Inhibiția expresiei genice a STAT1	109
IV. 13. RT-PCR	110
IV. 14. Real Time PCR	111
IV. 15. Analiza statistică a rezultatelor	113
V. Rezultate și discuții	114
V. 1. Reglarea expresiei genice în timpul diferențierii monocitelor în macrofage	114
V. 1. 1. Modularea expresiei apoE de către PMA în timpul diferențierii monocitelor ..	114
V. 1. 2. Reglarea expresiei apoE prin intermediul interacției promotorului cu elementul reglator distal, ME.2, în mod specific în macrofage	117
V. 1. 3. Determinarea interacției promotorului apoE cu elementele reglatoare distale în timpul diferențierii monocitelor în macrofage	122

V. 1. 4. Identificarea fragmentului minim al promotorului apoE care poate fi activat de către multienhancerul 2	128
V. 1. 5. Identificarea regiunii minime a ME.2 responsabilă de stimularea transcripțională a promotorului apoE	130
V. 1. 6. Efectul interacției ME.2 cu alți promotori din clusterul genic apoE/apoCI/apoCIV/apoCII în macrofage	132
V. 2. Factori de transcripție și receptori nucleari implicați în reglarea genică a apoE	134
V. 2. 1. Reglarea expresiei apoE de către factorul de transcripție PU.1	134
V. 2. 2. Modularea activității promotorului apoE de către factorii C/EBP	136
V. 2. 3. Modularea expresiei apoE de către factorii transcripționali AP-1	141
V. 2. 4. Acțiunea indirectă a STAT1 asupra promotorului apoE prin intermediul ME.2	146
V. 2. 5. Inhibiția expresiei apoE sub acțiunea factorilor de stres	155
V. 2. 6. Reglarea pozitivă a activității promotorului apoE de către c-Myb	158
V. 3. Factori de transcripție și receptori nucleari implicați în reglarea genică a apoCII	161
V. 3. 1. Reglarea expresiei apoCII în macrofage prin interacția promotorului cu ME.2	161
V. 3. 2. Modularea expresiei apoCII de către factorul de transcripție STAT1	164
V. 3. 3. Modularea expresiei apoCII prin intermediul RXR	170
V. 3. 4. Transactivarea promotorului apoCII prin intermediul interacției STAT1 cu RXR	171
VI. Concluzii	175
VII. Bibliografie	178
Lucrări publicate	207
Comunicări la manifestări științifice internaționale	208
Comunicări științifice naționale	210
Stagii și cursuri de specializare efectuate în cadrul stagiului de doctorat	211
Finanțarea cercetărilor	212
Lista abrevierilor	213

CUVINTE CHEIE

ATEROSCLEROZA
APOLIPOPROTEINA
REGLAREA EXPRESIEI GENICE
ELEMENT REGLATOR
FACTOR DE TRANSCRIPTIE
MACROFAGE
STAT1
RXR

Ateroscleroza este o boală inflamatorie cronică care afectează arterele elastice (aorta, carotida, iliaca) și musculare (coronare, renale). Încă de la începutul secolului trecut, Nikolai Anitschkow a dezvăluit rolul colesterolului și al lipoproteinelor plasmatice în dezvoltarea aterosclerozei, iar după ce a fost posibilă generarea șoarecilor transgenici, a fost evidențiat și rolul apolipoproteinelor în aterogeneză.

Apolipoproteina E este o glicoproteină de 35 kDa, sintetizată în special de către ficat, dar și de alte țesuturi și celule, inclusiv macrofage. ApoE reprezintă un component major sau minor al lipoproteinelor și are o contribuție esențială în metabolismul acestora. Deficiența apoE, atât în cazul modelelor animale cât și în cazul pacienților cu hiperlipoproteinemie de tip III este asociată cu apariția prematură a aterosclerozei. Expresia apoE scăzută sau absentă la nivelul macrofagelor, conduce la apariția procesului aterogen, iar șoarecii transgenici care exprimă apoE doar în macrofage nu dezvoltă ateroscleroză, chiar și atunci când nivelele apoE plasmatice sunt scăzute și animalele sunt hipercolesterolemice. În contrast, șoarecii transgenici cu nivele apoE plasmatice normale, dar care nu exprimă apoE în macrofage sunt predispuși la ateroscleroză. Rolul ateroprotector al apoE se datorează în special faptului că participă la îndepărtarea lipoproteinelor plasmatice aterogene (acționând ca ligand pentru mai mulți membri ai familiei de receptori LDL) și a excesului de colesterol din celule (facilitând transportul invers al colesterolului către ficat). În plus, apoE prezintă multe alte efecte benefice: este antioxidant, inhibă agregarea plachetelor, stimulează producerea oxidului nitric, inhibă activarea celulelor T, etc. Întrucât prin modularea expresiei apoE se pot obține efecte benefice majore în metabolismul lipoproteinelor, apoE este considerată o țintă terapeutică importantă pentru prevenirea și tratamentul aterosclerozei.

Apolipoproteina CII este o altă proteină plasmatică asociată în special particulelor de chilomicroni și VLDL. ApoCII reprezintă principalul activator al lipoprotein lipazei, enzimă care hidrolizează trigliceridele din chilomicroni și LDL, furnizând celulelor acizi grași liberi. Principalele situsuri de sinteză ale apoCII sunt reprezentate de către ficat și intestin, însă apoCII poate fi sintetizată și de macrofagele infiltrate în placa aterosclerotică. Pacienții cu deficiență pentru apoCII sunt incapabili să îndepărteze din plasmă lipoproteinele bogate în trigliceride și prin urmare dezvoltă hiperlipidemie de tip I, caracterizată prin hipertrigliceridemie, xantoame și risc crescut pentru pancreatită și ateroscleroză. Studiile realizate folosind șoareci transgenici au demonstrat că nu numai deficiența apoCII ci și supraexpresia apoCII induce hipertrigliceridemie severă. Astfel, apoCII în concentrație mare inhibă activitatea lipoprotein lipazei, maturarea particulelor HDL, transportul invers de colesterol precum și îndepărtarea lipoproteinelor prin intermediul receptorilor apoE. Prin

urmare, menținerea unui nivel optim al expresiei apoCII este esențială pentru metabolismul normal al lipoproteinelor.

Lucrarea de față a avut ca scop descifrarea mecanismelor de reglare a expresiei genice a apoE și apoCII (apolipoproteine cu rol esențial în metabolismul lipoproteinelor și implicat în ateroscleroză) în tipuri celulare cu rol cheie în procesul aterosclerotic.

Modularea expresiei genice a ApoE. În timpul diferențierii monocitelor în macrofage, expresia genică a apoE este indusă la nivel transcripțional prin intermediul interacției promotorului cu elementele reglatorii distale, interacție facilitată de legarea anumitor factorilor transcripționali. Rezultatele obținute prin tehnica 3C (captura conformațională cromosomală) au demonstrat că promotorul apoE interacționează cu elementele reglatorii distale, ME.1 și ME.2 în monocite diferențiate în macrofage prin tratament cu PMA. Interacția promotorului cu secvența multienhancerului are loc în orientarea inversă a celor două fragmente ADN, sensul interacției optime fiind confirmat și prin experimentele de transfecție tranzientă.

Multienhancerul 2 a indus de ~9 ori activitatea promotorului apoE în celulele RAW 264.7, dar nu și în monocite THP-1 sau alte tipuri celulare testate (celule HepG2 și HEK293), confirmând faptul că acest element reglator distal are o acțiune specifică asupra promotorului apoE în macrofage. Fragmentul minim al promotorului apoE care poate fi activat de către multienhancerul 2 este reprezentat de regiunea -100/+73. Rezultatele au arătat că întreaga secvență a ME.2 este necesară pentru o interacție optimă cu promotorul apoE, iar pentru modularea activității promotorului apoE regiunea 5'-terminală a multienhancerului este mai importantă decât regiunea 3'-terminală. ME.2 este un enhancer transcripțional care induce activitatea tuturor promotorilor genelor din clusterul apoE/apoCI/apoCI/apoCIV/apoCII în macrofage. Studiile efectuate au arătat că ME.2 crește activitatea celor patru promotori din cluster în ordinea următoare apoE>apoCII>apoCIV>apoCI.

Complexitatea reglării genice a apoE este rezultatul interacțiunii a numeroși factori de transcripție cu elementele reglatorii proximale sau distale, în funcție de tipul celular în care are loc biosinteza proteinei. Rolul factorilor de transcripție PU.1, AP-1, STAT1, C/EBP și c-Myb în modularea expresiei apoE a fost testat prin experimente de transfecție tranzientă realizate în două tipuri celulare esențiale: hepatocite (situsul major de sinteză a apoE) și macrofage (sursa periferică de apoE, foarte importantă deoarece are implicații în procesul de aterogeneză).

Datele arată că factorii de transcripție PU.1, implicați în diferențierea monocitelor în macrofage, au rol pozitiv în reglarea apoE mod specific în macrofage, acționând indirect asupra promotorului apoE prin intermediul multienhancerului 2.

Factorii de transcripție C/EBP α și C/EBP β au un efect opus în reglarea apoE în macrofage și hepatocite, întrucât supraexpresia C/EBP în macrofage a indus scăderea activității promotorului proximal al apoE, iar supraexpresia C/EBP în hepatocite a determinat o creștere semnificativă a activității promotorului. În mod interesant, C/EBP α a avut un efect mai pronunțat asupra activității promotorului în hepatocite, iar C/EBP β a avut un efect mai pronunțat în macrofage.

Factorii din complexul AP-1 au efecte opuse asupra expresiei apoE în macrofage și hepatocite. Supraexpresia factorilor de transcripție c-Jun, c-Fos, Jun B și Jun D în macrofage RAW 264.7 a determinat o scădere a activității promotorului proximal al apoE și a expresiei genice, în timp ce supraexpresia acestor factori în hepatocite HepG2 a crescut semnificativ activitatea promotorului și a cantității de mRNA sintetizată. Rezultatele experimentale au arătat că supraexpresia c-Jun determină scăderea activității promotorului apoE chiar și în prezența inhibitorului SP, sugerând faptul că acțiunea c-Jun asupra promotorului apoE nu este dependentă de fosforilarea c-Jun.

Rezultatele experimentale au evidențiat că atât în macrofage cât și în hepatocite, supraexpresia factorilor de transcripție CHOP a indus scăderea semnificativă a activității promotorului proximal al apoE, ceea ce sugerează că, în condiții inflamatorii și de stres, cantitatea de apoE biosintetizată de către macrofage va fi diminuată.

Datele obținute arată că factorii de transcripție c-Myb au rol pozitiv în reglarea expresiei apoE, întrucât supraexpresia c-Myb a indus creșterea semnificativă a activității promotorului proximal al apoE atât în macrofage RAW 264.7 cât și în hepatocite HepG2. În plus, supraexpresia c-Myb în celule HEK a crescut de ~două ori expresia genică a apoE.

Inducerea diferențierii monocitelor în macrofage prin tratament cu PMA este însoțită de creșterea expresiei apoE și STAT1. Supraexpresia factorului de transcripție STAT1 induce activarea promotorului apoE prin intermediul interacției cu ME.2. Proteinele STAT1 se leagă la ME.2 și determină indirect activarea transcripției genei apoE, în macrofage (dar nu și în hepatocite). Situsul de legare al factorilor de transcripție STAT1 la multienhancerul 2 a fost identificat prin multiple căi experimentale: transfecție tranzientă, precipitarea ADN biotinilat cu streptavidină și imunoprecipitarea cromatinei.

Modularea expresiei genice a ApoCII. Rezultatele prezentate în această teză au demonstrat că în macrofage multienhancerul 2 poate interacționa cu promotorul genei

apoCII, iar această interacție facilitează activarea transcripțională a promotorului apoCII prin intermediul factorilor de transcripție STAT1. Prin experimente de transfecție tranzientă, precipitarea ADN biotinitat cu streptavidină și imunoprecipitarea cromatinei a fost identificat un nou situs de legare a STAT1 în regiunea -500/-493 a promotorului apoCII, responsabil de activarea indusă de STAT1.

În mod interesant, STAT1 nu și-a exercitat efectul activator asupra promotorului apoCII, atunci când secvența acestuia a conținut o mutație în situsul de legare a RXR α /T3R β , sugerând că STAT1 activează promotorul apoCII prin intermediul interacției cu RXR α . Folosind tehnicile de precipitare a proteinelor recombinante cu GST și co-immunoprecipitare a fost evidențiată pentru prima oară interacția fizică a factorilor de transcripție STAT1 și RXR α . Transactivarea promotorului apoCII de către STAT1 este amplificată de către ligandul RXR în macrofage, evidențiind faptul că STAT1 și RXR α reprezintă activatori importanți ai expresiei apoCII.

Având în vedere rolul esențial al apoE și apoCII în metabolismul lipoproteinelor, aceste apolipoproteine reprezintă molecule țintă importante în terapia aterosclerozei. În ciuda multiplelor efecte benefice ale acestor apolipoproteine, supraexpresia sistemică a apoE sau apoCII la șoarecii transgenici a determinat apariția hipertrigliceridemieii. Prin urmare, în scopul prevenirii sau reducerii aterosclerozei este nevoie de elaborarea unor strategii de creștere a expresiei acestor proteine doar în anumite tipuri celulare cu rol cheie în procesul aterosclerotic. Rezultatele prezentate în această lucrare demonstrează specificitatea interacțiilor dintre elementele reglatorii distale și promotorii genelor apoE și apoCII. Prin legarea anumitor factori transcripționali la elementele reglatorii distale, expresia genică a acestor apolipoproteine poate fi reglată în mod specific în funcție de tipul celular.

Rezultatele acestui studiu vor contribui la o mai bună înțelegere a mecanismelor de reglare a expresiei genice a apoE și apoCII, ceea ce ar putea duce la descoperirea unor noi strategii de tratament sau prevenire a aterosclerozei prin creșterea expresiei apolipoproteinelor cu efecte benefice sau prin inhibarea activității moleculelor care scad expresia acestor apolipoproteine.