

## **Grasimea ectopica si riscul metabolic**

### **Jeanina Albu**

The New York Obesity Research Center, Saint Luke's - Roosevelt Hospital Center, University Hospital of Columbia University, Columbia University College of Physicians and Surgeons, 1111 Amsterdam Ave, New York, NY 10025, USA, [jba1@columbia.edu](mailto:jba1@columbia.edu)

Suntem la jumatatea unei pandemii a diabetului de tip 2. Grasimea corporala in exces, dar si localizarea acestei grasimi, contribuie la patogeniza diabetului zaharat de tip 2 si a afectiunilor cardiovasculare asociate. O distributie superioara (centrala) a grasimii corporale este asociata cu factori de risc, cum ar fi componentele „sindromului metabolic” si o probabilitate mai mare de dezvoltare a diabetului zaharat si a afectiunilor cardiovasculare, independent de greutatea corporala. Un concept nou aparut este acela ca o acumulare de grasime ectopica este considerat un determinant important al riscului pentru sanatate. Acumularea grasimilor in depozitul tesutului adipos subcutanat este „sigura”, in timp ce acumularea grasimii in tesutul adipos intra-abdominal (visceral) si inter-muscular (in interiorul fasciei musculare), precum si in tesuturi sensibil la insulina (ficat, muschi, pancreas si inima) este „nociva” si reprezinta un „risc” crescut. Tehnici de imagistica au incercat sa masoare ariile grasimii ectopice si sa le coreleze cu factori de risc specifici metabolici, inflamatori si de coagulare. Ipoteza de „supra-curgere” a grasimilor propune urmatoarele: grasimea in muschi cauzeaza rezistenta la insulina si preluare redusa a glucozei, grasimea in ficat produce rezistenta la insulina si preluare hepatica crescuta a glucozei, iar grasimea in pancreas provoaca distrugerea celulei beta si secretie redusa a insulinei; toate acestea duc la diabet zaharat de tip 2 la indivizi cu predispozitie. Metode de masurare a depozitelor de grasimi ectopice sunt continuu rafinate astfel incat pot fi obtinute date mai bune si pot fi propuse si studiate ipotezele mecanistice. O mai buna intelegere a acestor procese vor duce la tratamente mai eficiente.

## Oxigenarea redusa a tesutului adipos in obezitatea umana

**Magdalena Pasarica**, Olga Sereda, Leanne Redman, Diana Albarado, David Hymel, Laura Roan, Jennifer Rood, David Burk, Steven R. Smith

Pennington Biomedical Research Center, Baton Rouge, LA 70808, USA, [pasarim@pbrc.edu](mailto:pasarim@pbrc.edu)

**Introducere:** Pe baza studiilor preliminare efectuate pe rozatoare, noi am propus ipoteza ca o crestere a masei tesutului adipos in obezitate fara un suport adecvat al vascularizarii poate duce la hipoxie, precum si infiltrarea macrofagelor si inflamatie.

**Metode:** Presiunea partiala a oxigenului [AT pO<sub>2</sub>] in tesutul adipos subcutanat abdominal [9 barbati si femei control, 12 supraponderali/obezi (obezi)] a fost masurata prin insertia directa [aprox 1cm sub piele] a unui electrod polarografic [de tip Clark]. Studiile anterioare in laboratorul nostru au validat metoda directa in defavoarea metodei descrisa anterior de Hunt [R=0,64, p<0,01]. Compozitia corporala a fost masurata cu DEXA, iar sensibilitatea la insulina prin metoda clemei hiperinsulinic euglicemic (*hyperinsulinic euglycemic clamp*). Tesutul subcutanat abdominal a fost utilizat pentru metode de colorare, qRT-PCR si de secretie.

**Rezultate:** Grupul obez are indicele de masa corporala (IMC) mai mare decat grupul control [31.7±1.9 vs. 22.1±1.0; kg/m<sup>2</sup>], precum si un continut mai mare de grasimi [34.2±8.2 vs. 20.9±7.6; %]. Asa cum era de asteptat, subiectii obezi au prezentat sensibilitate la insulina mai mica, demonstrata prin vitezele mai mici de eliberare a glucozei (*glucose disposal rate*, GDR) [6.0 ± 2.2], comparativ cu subiectii control [11.2 ± 3.4 mg/min\*kg masa libera de grasimi]. AT pO<sub>2</sub> a fost mai mica la obezi [47 ± 10.6 mm Hg], comparativ cu subiectii control [55 ± 9.1 mm Hg]. AT pO<sub>2</sub> a fost negativ corelata cu continutul de grasimi [R=-0.50, p<0.05] si cu masa grasa [R=-0.48, p<0.05]. Subiectii obezi au densitate mai mica a capilarelor [172±60 vs. 308±135 capillaries/mm<sup>2</sup>] si expresie scazuta a factorului de crestere endotelial vascular [*vascular endothelial growth factor*, VEGF] [1.04±0.34 vs. 2.46±1.11], comparativ cu subiectii control. AT pO<sub>2</sub> s-a corelat pozitiv cu ARNm pentru VEGF [R=0.54, p<0.05]. ARNm pentru CD68 si secretia de MIP1α s-au corelat negativ cu AT pO<sub>2</sub> [R=-0.58, R=-0.79, p<0.05].

**Concluzii:** In acest studiu, aducem dovezi pentru prima data pentru oxigenarea redusa a tesutului adipos in subiecti cu sau fara diabet de tip 2. Corelatiile stranse cu markerii inflamatori ai tesutului adipos sunt in acord cu un model in care hipoxia conduce la inflamatie. Densitatea capilara redusa, in fata unei hipoxii a tesutului adipos, sugereaza faptul ca defecte in neo-vascularizare sunt la baza hipoxiei si inflamatiei in obezitate si diabet. Aceste rezultate asigura noi perspective asupra disfunctiei tesutului adipos in obezitate si diabet si sugereaza noi moduri de abordare a tratamentului acestui tesut adipos disfunctional gasit in obezitate si diabet.

## **Lumini si umbre in explorarea disfunctiei celulelor musculare netede arteriale in hiperglicemie**

**Doina Popov**

Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu",  
8 B.P. Hasdeu Street, Bucharest 050568, Romania, [doina.popov@icbp.ro](mailto:doina.popov@icbp.ro)

Celulele musculare netede (CMN) din peretele arterial sunt un participant important in diminuarea vasodilatarii in conditii de diabet si in ateroscleroza accelerata care insoteste diabetul. Prima parte a prezentarii puncteaza cunostintele dobandite recent in identificarea efectelor hiperglicemiei (HG) asupra moleculelor de semnalizare din CMN; afectarea expresiei proteice a formelor fosforilate/defosforilate ale acestora contribuie la fundamentul biochimic al disfunctiei peretelui arterial in diabet. Astfel, CMN expuse HG activeaza reactii de glicoxidare si de glicare enzimatica a proteinelor, accelereaza calea polioliilor si a diacilglicerolului, sunt activate isoenzime ale protein kinazei C precum si procese transcriptionale care conduc la rezistenta fata de insulina si la producerea excesiva de radicali liberi. Sunt prezentate in context date originale ale Laboratorului "Disfunctii vasculare in diabet" privind participarea protein tirozin fosfatazei (PTP-1B) in procese de defosforilare din CMN, regland hiperfosforilariile asociate conditiei HG. Rezultatul proceselor biochimice modificate din CMN arteriale il formeaza cresterea excesiva a acestora, intensificarea migrarii si proliferarii asociate dezechilibrului mecanismelor intracelulare subtile care mentin fenotipul contractil al CMN. In a doua parte a prezentarii sunt discutate principalele modificari ale fenotipului CMN in HG: transformarea fenotipului contractil normal intr-un fenotip secretor, caracteristic CMN disfunctionale si/sau in fenotip "osteoblast-like". Rezultate recente, inclusiv ale institutului nostru au identificat depunerea de calciu sub forma de centri de calcificare in matricea extracelulara sau in jurul corpiilor apoptotici din CMN care sunt pe cale de distrugere, sub actiunea HG; in plus, la calcificarea peretelui contribuie procese inflamatorii, radicalii liberi ai oxigenului formati in exces conducand la stres oxidativ, hiperfosfatemia, precum si procese de elastinoliza. Ultima parte a prezentarii supune discutiei punctele de interes imediat, ce trebuiesc elucidate pentru a face posibila medicina translationala, adresata remedierii proceselor biochimice afectate de HG in CMN arteriale. In esenta acestea sunt: (i) identificarea fenotipului oxidativ al CMN cu ajutorul unor noi biomarkeri sensibili si specifici, (ii) introducerea unei noi clase de antioxidanti directionati spre limitarea cantitatii de radicali liberi ai oxigenului produsi la nivel mitocondrial, (iii) inhibarea activitatii aldoz reductazei si limitarea astfel a fluxului de glucoza in CMN; aceasta reactie trebuie sa conduca la blocarea rolului citotoxic al enzimei fara a-i afecta rolul detoxifiant la nivel celular, (iv) folosirea RNAi pentru atenuarea activitatii factorului de createre a tesutului conjunctiv (CTGF) reducand astfel hiperplazia intimei mai ales in procesele de restenoza, (v) intelegerea si manipularea eficace a cailor de semnalizare determinate de stresul reticolului endoplasmic, (vi) limitarea calcificarii CMN prin reglarea metabolismului veziculelor matricei extracelulare si al "clearance"-ului acestora.

*Finantare: Grant-uri ale Academiei Romane.*

## O foaie de parcurs pentru cercetarea diabetologica romaneasca

### Constantin Ionescu-Tirgoviste

National Institute of Diabetes, Nutrition and Metabolic Diseases "N.C. Paulescu",  
5-7 Ion Movila Street, Bucuresti, [cit@paulescu.ro](mailto:cit@paulescu.ro)

Diabetul zaharat de tip 2 si celelalte doua tulburari ale metabolismului energetic inrudite (obezitatea si sindromul metabolic) domina patologia metabolica, care explica mortalitatea crescuta prin boli cardiovasculare. Comunitatea stiintifica internationala este profund implicata in prevenirea acestor tulburari sau, in cel mai rau caz, in diagnosticarea precoce, inaintea instalarii complicatiilor cronice ireversibile.

In cadrul Asociatiei Medicale Romane, functioneaza de 2 ani „Alianta Stiintifica Romaneasca”, care are ca scop identificarea cercetatorilor romani care lucreaza permanent sau temporar in diferite centre de cercetare din lume, in vederea stabilirii unei comunicari directe pe temele de cercetare de interes comun. In cazul de fata, in patologia metabolica si cardiovasculara. Prin intermediul lor, dorim realizarea unor parteneriate stabile de colaborare intre centrele in care ei lucreaza si centre omoloage din Romania. Aceasta colaborare poate facilita gasirea unor parteneri solizi

Din punctul de vedere al cercetarii diabetologice, principalele obiective inscrise ca prioritati in foaia de parcurs a acesteia, mentionam: (a) modificarea criteriilor de definire si de diagnostic a diabetului, care in prezent nu mai corespund cu realitatea clinica; (b) stabilirea factorilor patogenetici operanti in diferitele fenotipuri ale sindromului diabetic, imbinand analiza factorilor de mediu cu cea a factorilor genetici si epigenetici; (c) dezvoltarea unei metode de evaluare nein vaziva a masei  $\beta$  celulare, conditie esentiala pentru realizarea primelor doua puncte; (d) identificarea unor molecule „naturale” (existente in alimente, in alimentele-medicament sau in plantele-medicament) cu potential de modulare a functiei  $\beta$  celulare si de regenerare a sa. Este bine de stiut ca cea mai utilizata clasa medicamentoasa in tratamentul diabetului zaharat este cea a biguanidelor, descoperita initial in planta *Galega officinalis* si transpus apoi in industria farmaceutica. Intrucat numarul plantelor utilizate in diferite tari in tratamentul diabetului zaharat este mare, se poate presupune ca si numarul moleculelor cu efect antidiabetic trebuie sa fie si el foarte mare.

## **Expresia si functia chemokinelor MCP-1 si fractalkina in celulele musculare netede umane expuse la concentratii crescute de glucoza**

**Elena Dragomir**

Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu",  
8 B.P. Hasdeu Street, Bucharest 050568, Romania, [elena.dragomir@icbp.ro](mailto:elena.dragomir@icbp.ro)

**Obiectiv.** Accelerarea aterosclerozei reprezinta principala complicatie a diabetului zaharat, aceasta implicand un process inflamator in care chemokinele fractalkina si MCP-1 joaca roluri cheie. In acest studiu am investigat efectul glucozei crescute asupra expresiei acestor chemokine si mecanismele de semnalizare declansate in celule musculare netede aortice umane (CMN).

**Materiale si metode.** Efectele induse in urma expunerii CMN la concentratii crescute de glucoza asupra expresiilor genice si proteice a fractalkinei si MCP1 au fost urmarite prin tehnicile de RT-PCR si Western Blot. Implicarea MAPK in modularea expresiei chemokinelor a fost evidentiata cu ajutorul inhibitorilor specifici ai ERK1/2 si p38MAPK, iar a factorilor de transcriptie AP-1 si NF-kB cu ajutorul tehnicii de transfectie a deoxioligonuclotidelor specifice cu secvente consens pentru subunitatile p65 (subunitate a NF-kB) si c-jun (subunitate a c-jun). Efectul biologic functional al modularii fractalkinei si MCP-1 de catre glucoza a fost determinat prin masurarea interactiilor adezive specifice dintre monocite si celule musculare netede cu ajutorul tehnicilor de adeziune celulara in conditii statice sau de flux laminar.

**Rezultate.** Concentratia crescuta de glucoza creste expresia genica si proteica fractalkinei si MCP-1 prin calea de semnalizare a MAPK, proces asociat cu stresul oxidativ crescut. Inhibarea specifica a factorilor de transcriptie NF-kB si AP-1 prin transfectie cu deoxioligonuclotide specifice a demonstrat implicarea acestor factori in modularea expresiei celor doua chemokine. Inhibitorii specifici ai MAPK reduc fosforilarea kinazei I $\kappa$ B $\alpha$  si subunitatii c-jun a factorului de transcriptie AP-1, indicand rolul MAPK in activarea celor doi factori de transcriptie. Cresterea expresiei acestor chemokine a fost corelata cu numarul crescut de interactii adezive dintre monocite si CMN expuse la glucoza crescuta. Activatorii de PPAR $\alpha$  (fenofibrat si clofibrat) reduc expresia genica si proteica a CMN activate de glucoza crescuta.

**Concluzie.** Expunerea CMN la concentratie crescuta de glucoza induce expresia fractalkinei si a MCP-1 printr-un mecanism ce implica activarea MAPK si a factorilor de transcriptie NF-kB si AP-1. Expresia crescuta a celor doua chemokine indusa de catre glucoza, alaturi de cresterea numarului de interactii adezive intre monocite si CMN si de acumularea ulterioara de CMN pot contribui la evolutia accelerata a aterosclerozei in diabet. (Proiect finantat de MEC/CEEX: contract 130/2006 si Academia Romana)

## **Noi perspective asupra reglării apoptozei în celule hematopietice tumorale**

### **Alexandru Almasan**

Departamentul pentru Biologia Cancerului, Bridge appointment with Department of Radiation Oncology, Taussig Cancer Center, Lerner Research Institute/ NB40, 9500 Euclid Avenue, Cleveland, OH 44195, SUA, [almasaa@ccf.org](mailto:almasaa@ccf.org)

Membrii BH3-exclusivi ai familiei Bcl-2 reglează apoptoza fie prin neutralizarea membrilor familiei pro-supraviețuire, fie prin activarea rudelor lor pro-apoptotice. Am arătat anterior că nivelele PUMA sunt crescute în celulele umane tumorale în urma stresului genotoxic cum ar fi iradierea. Supraexprimarea Bcl-2 și represia PUMA protejează împotriva morții celulare indusă de radiație, în timp ce supraexprimarea sa a sensibilizat celulele ce exprimă Bcl-2 la radiație la un nivel comparabil cu celulele parentale, sugerând că o balanță fiziologică între proteinele pro-supraviețuire și antagoniștii lor BH3-exclusivi este necesară pentru un răspuns eficient apoptotic. Tratatamentul mitocondriilor izolate cu un peptid pe baza de PUMA a tintit eliberarea citocromului C, inhibată prin pre-tratamentul cu un anticorp de mascare a Bim-BH3. Mai mult, interacția Bim cu Bcl-2, Bcl-xL și Mcl-1 a fost puternic diminuată în urma iradierii. Concomitent, asocierea PUMA cu aceste molecule anti-apoptotice a fost semnificativ crescută în celulele iradiate, indicând faptul că PUMA acționează ca un sensibilizant cu Bim servind ca funcție de activare. Iradierea și supraexprimarea PUMA duce la activarea Bax și apoptoza. Translocarea Bax la mitocondrie și oligomerizarea sa au fost evenimente tardii. Exprimerarea PUMA și legarea de proteinele familiei Bcl-2, precum și dislocuirea Bim au fost, de asemenea, evenimente tardii, sprijinind astfel ideea unei etape de amplificare necesare pentru apoptoza. Nivelele PUMA și asocierea cu Bcl-2 a crescut ca răspuns la iradiere în celule primare obținute de la pacienți, dar nu și în celule B normale derivate din sânge periferic. Utilizarea de peptide mimetice BH3, cum ar fi ABT-737, este examinată acum în clinică. ABT-737 acționează ca antagonist al membrilor familiei antiapoptotice Bcl-2 și Bcl-xL. Întrucât rezistența dobândită se pare că apare chiar și pentru cele mai eficiente chimioterapii ale cancerului, am examinat mecanismul rezistenței la ABT-737. Liniile de celule rezistente derivate de noi din linii tumorale hematopietice derivate din celule B au prezentat nivele crescute de Mcl-1. Nivelele crescute de Mcl-1 au fost controlate primar la nivel transcripțional, cu stabilitatea proteinei ca factor contributor. Efectul protector al expresiei crescute de Mcl-1 se bazează pe abilitatea sa de a se asocia cu proteina BH3-exclusivă Bim care este înlocuită din Bcl-2 de către ABT-737. ABT-737 este unică ca medicament deoarece este foarte specifică, iar mecanismul său de omorare a celulelor este bine caracterizat. Pentru a preveni rezistența la ABT-737 noi folosim terapii clinice care sunt cunoscute ca blocanți ai transcripției Mcl-1.

## **Rolul sfingolipidelor in terapia cancerului**

**Claudia Alexandra Dumitru**

University of Duisburg-Essen, Medical School Essen, Dept. of Molecular Biology, Hufelandstrasse 55, D-45122 Essen, Germany, [claudia.dumitru@uni-due.de](mailto:claudia.dumitru@uni-due.de)

Deși ultimele descoperiri în cercetarea cancerului au condus la un prognostic mult îmbunătățit pentru bolnavii de cancer, multe afecțiuni maligne nu beneficiază de tratamente de vindecare până în prezent.

Numeroase dovezi sugerează că alterările produse în aparatul apoptotic al celulelor canceroase acționează ca modulatori importanți atât pentru tumorigeneză, cât și pentru răspunsul la terapie. Apoptoza poate avea loc prin două căi majore, și anume calea extrinsecă (inițiată de receptorii de moarte celulară), sau intrinsecă (inițiată la nivelul mitocondrii). Aceste două căi converg la nivelul activării caspazei-3 și ulterior a altor proteaze și nucleaze care determină etapele finale ale apoptozei. În schimb, fiecare pas al cascadei apoptotice este monitorizat și controlat de anumite semnale pentru supraviețuire, de care sunt responsabile familii de molecule anti-apoptotice cum ar fi NF- $\kappa$ B, Akt/PKB, Bcl-2 și IAPs.

În ultimii ani, multe grupuri au demonstrat implicarea sfingolipidelor, mai ales a ceramidelor, în apoptoza indusă de o varietate largă de stimuli. S-a arătat că ceramidele sunt mediatori cruciali ai semnalelor de moarte celulară declanșate de membri ai familiei de liganzi TNF, iradiere, chimioterapie, raze UV sau soc termic. Ceramidele pot fi generate fie prin sinteza *de novo*, prin activarea ceramid sintazei, sau prin hidroliza sfingomielinei, în urma activării sfingomielinazelor acide, neutre sau alcaline. Principalele căi de degradare ale ceramidelor sunt mediate de către ceramidaze și glucosiltransferaze, care convertesc ceramida la sfingozină și, respectiv glucosilceramida. În timp ce acumularea de ceramide duce la moartea celulară, sfingozină și/sau glucosilceramida sunt în principal anti-apoptotice. De aceea, echilibrul între producerea de ceramide și căile lor de conversie sunt critice pentru soarta celulei. Studiile noastre se concentrează asupra elucidării rolului exact pe care îl au ceramidele în semnalizarea indusă de câțiva stimuli folosiți în prezent în tratamentul cancerului. Acestea vor permite o mai bună modulare a metabolismului ceramidelor în celulele țintă și pot duce la dezvoltarea de noi și îmbunătățite strategii terapeutice.

## Ce putem invata din simularile pe calculator ale sistemelor biomoleculare?

**Vlad Cojocaru**

EML Research gGmbH, Schloss Wolfsbrunnenweg 33, 69118 Heidelberg, Germania

[Vlad.Cojocaru@eml-r.villa-bosch.de](mailto:Vlad.Cojocaru@eml-r.villa-bosch.de)

Simularile pe calculator (asa numite experimente *in silico*) au devenit instrumente puternice in studiul proceselor biologice, in mare parte datorita cresterii rapide a puterii calculatoarelor si a acuratetei imbunatatite. In simularile de dinamica moleculara, traiectoriile ansamblurilor biomeleculare sunt construite prin rezolvarea numerica a legii de miscare Newton-iene a fiecarui atom al sistemului. Traiectoriile dezvaluie dinamica sistemului studiat, furnizand informatii importante despre legatura dintre structura si functie. Totusi, scala temporală a proceselor biologice reale acopera un interval de la picosecunde la ani. In simularile pe calculator, doar procesele care au loc in picosecunde la microsecunde sunt disponibile. Scala temporală disponibilă pentru simulari este conditionata de alegerea pasului temporal, care este limitata la 1 – 2 femptosecunde (fs) datorita miscarilor foarte rapide din astfel de sisteme (vibratii ale legaturilor implicand atomi de H) si care are loc in aproximativ 10 fs. Totusi, datorita cresterii rapide a disponibilitatii super-calculatoarelor, este acum posibila simularea sistemelor mari de pana la 1 milion de atomi si scala temporală de ordinul a 10 microsecunde. Astfel, procese cum ar fi impachetarea proteinelor mici pot fi simulate in timp real. Daca aceste resurse nu sunt disponibile sau procesele investigate au loc pe o scala temporală depasind microsecunde, o gama variata de metode (unele dintre ele le voi descrie) sunt dezvoltate pentru procesele biologice accelerate *in silico*.

Pentru a evidentia puterea simulării pe calculator in investigarea dinamicii structurilor biomoleculare complexe, voi prezenta simulari care dezvaluie o tranzitie conformationala mare intr-un domeniu ARN, denumit structura *kink-turn* si diferite abordari pentru studiul cailor de acces la substrat si eliberare a produsului din situsul activ mascat al enzimelor citocromului P450 metabolizator de medicamente.

### *Referinte:*

1. **Vlad Cojocaru**, Peter J. Winn, and Rebecca C. Wade. 2007. Exploring the routes out of the active site of cytochrome P450 2C9. *Proceedings of the 15<sup>th</sup> international conference on cytochromes P450, Bled, Slovenia, July 2007*.
2. **Vlad Cojocaru**, Peter J. Winn, and Rebecca C. Wade. 2007. The ins and outs of cytochrome P450s. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1770**:390-401.
3. **Vlad Cojocaru**, Reinhard Klement, and Thomas M. Jovin. 2005. Loss of G-A base pairs is insufficient for achieving a large opening of U4 snRNA K-turn motif. *Nucleic Acids Research* **33**:3435-3446.
4. **Vlad Cojocaru**, Stephanie Nottrott, Reinhard Klement, and Thomas M. Jovin. 2005. The snRNP 15.5K protein folds its cognate K-turn RNA: A combined theoretical and biochemical study. *RNA* **11**:197-209.
5. **Vlad Cojocaru** 2005. Molecular motions at the 5' stem-loop of U4 snRNA: Implications for U4/U6 snRNP assembly. Doctoral dissertation published online by the Georg-August- University Goettingen.



## **Analiza determinantilor moleculari ai PRL-3, o protein-tirozin fosfataza implicata in metastaza canceroasa**

**Stefan Szedlacek**

Enzymology Department, Institute of Biochemistry from the Romanian Academy,  
296 Splaiul Independentei, Bucharest 060031, Romania, [szedlacs@yahoo.co.uk](mailto:szedlacs@yahoo.co.uk)

PRL-3 (fosfataza de regenerare a ficatului) face parte dintre protein-tirozin fosfatazele cu specificitate duala. Interesul special acordat in ultimii ani acestei PTPaze se datoreaza supraexprimarii ei in diferite forme de cancer, precum si in metastazele cancerului colorectal. Un numar mare de studii au fost facute pentru a investiga aceasta proteina; totusi, in prezent exista putine date referitoare la determinantii sai moleculari. Pentru a evalua daca secventa C-terminala polibazica reprezinta un semnal de localizare nucleara (SLN), am obtinut ceteve forme truncate si mutante ale PRL-3 si am analizat localizarea lor subcelulara comparativ cu forma nativa. Rezultatele noastre invalideaza ipoteza potrivit careia aceasta este un SLN. Am studiat si influenta resturilor C- si N-terminale asupra activitatii fosfatazice a PRL-3. Rezultatele noastre arata ca motivul C-terminal CAAX, pe langa functia sa de directionare a farnesilarii proteinei, joaca un rol aditional de reglare prin inhibarea eficientei catalitice a PRL-3. Considerand rezultatele pe care le raportam aici, cat si pe cele raportate in literatura, propunem un mecanism molecular ipotetic pentru localizarea nucleocitoplasmatica si transferul PRL-3.

## **Gliconectinele – o clasa primordiala de molecule de adeziune celulara implicate in aparitia organismelor multicelulare**

**Octavian Popescu**

Babes-Bolyai University, Institute for Interdisciplinary Experimental Research, Faculty of Biology and Geology, Molecular Biology Center, 42 August Treboniu-Laurian Street, 400271 Cluj-Napoca, Romania [opopescu@biolog.ubbcluj.ro](mailto:opopescu@biolog.ubbcluj.ro)

Aparitia primelor organisme multicelulare a fost strans legata de capacitatea acestora de a-si mentine integritatea structurala si de a face distinctia necesara intre "self" si "non-self". Moleculele mari de glicoconjugati, localizate la suprafata celulei, asa cum sunt gliconectinele (GN), sunt candidatii cheie pentru functiile de recunoastere si adeziune primordiale in sistemele biologice cu capacitata de autoasamblare. In experimente anterioare, folosind microscopia de forta atomica, am demonstrat ca forta de legare in cadrul unei perechi de molecule de GN1 (izolate de la suprafata celulelor de *Microciona prolifera*) este suficienta pentru a sustine greutatea a 1600 de celule, ceea ce dovedeste rolul lor in adeziunea celulara. In studiul de fata am utilizat ca model experimental pentru discriminarea primordiala intre "self" si "non-self", cuantificarea autorecunoasterii moleculare in cazul moleculelor: GN1, GN2 si GN3 (purificate de la trei specii de spongieri). Proprietatile fizico-chimice, biofizice si biochimice ale acestor trei gliconectine demonstreaza existenta unei noi familii de molecule "proteoglycan-like", familie caracterizata prin structuri specifice speciei cu motive glucidice acide complexe si repetitive, diferite de cele ale proteoglicanilor cunoscuti. In teste functionale si de "blotting", gliconectinele demonstreaza proprietati de recunoastere si adeziune specifice speciei. Anticorpi monoclonali si anticorpi policlonali monospecifici, recunoscand epitopuri glicanice din gliconectine, inhiba foarte selectiv adeziunea celulara la speciile respective. Mecanismul molecular al interactiunilor homoflice gliconectina-gliconectina in cazul spongierilor (interactiuni mediate de glicani) este dependent de ionii de calciu si are o mare specificitate de specie. Din punct de vedere al gradului de selectivitate, acest mecanism molecular se aseamana cu sistemul heterofilic de recunoastere mult mai evoluat al superfamiliei imunoglobulinelor. Rezultatele obtinute sprijina un nou model al functiei fundamentale a glicanilor gliconectinelor primordiale in adeziunea celulara, caracterizata prin autoasamblare si discriminare "non-self", inainte de aparitia si evolutia multicelularitatii.

1. **Popescu O, Misevic GN**, Self-recognition by proteoglycans, *Nature*, **386**, 231-232, 1997.
2. **Dammer U, Popescu O, Wagner P, Anselmetti D, Guntherodt HJ, Misevic GN**, Binding strength between cell adhesion proteoglycans measured by atomic force microscopy, *Science*, **267**, 1173-1175, 1995.
3. **Popescu O, Checiu I, Gherghel P, Simon Z, Misevic GN**, Quantitative and qualitative approach of glycan-glycan interactions in marine sponges, *Biochimie*, **85**, 181-188, 2003.
4. **Misevic GN, Guerardel Y, Sumanovski L, Slomianny MC, Demarty M, Ripoll C, Karamanos Y, Maes E, Popescu O, Strecker G**, Molecular recognition between glyconectins as an adhesion self-assembly pathway to multicellularity, *J. Biol. Chem.*, **279**, 15579-15590, 2004.
5. **Guerardel Y, Czeszak X, Sumanovski L, Karamanos Y, Popescu O, Strecker G, Misevic GN**, Molecular fingerprinting of carbohydrate structures phenotypes of three porifera proteoglycan-like glyconectins, *J. Biol. Chem.*, **279**, 15591-15603, 2004.

## Endoteliopatia in ateroscleroza

### Maya Simionescu

Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu",  
8 B.P. Hasdeu Street, Bucharest 050568, Romania, [maya.simionescu@icbp.ro](mailto:maya.simionescu@icbp.ro)

Endoteliul vascular este, direct sau indirect, implicat in majoritatea maladiilor umane. In ateroscleroza, prin locatie, suprafata si proprietati, celulele endoteliale (CE) sunt primele care se confrunta cu alterarea homeostasiei lipidelor din plasma si participa direct la reactia inflamatorie care, in final, conduce la disfunctia endoteliala si formarea ateromului.

Datele noastre experimentale obtinute pe animale hiperlipemice, precum si pe material uman, au demonstrat ca CE raspund initial la hiperlipemie prin *modularea functiilor constitutive* (amplificarea transcitozei si acumularea subendoteliala de lipoproteine modificate) si cresterea capacitatii de sinteza. Dislipidemia si lipoproteinele modificate genereaza *disfunctia endoteliala*, manifestata prin alterarea componentelor plasmalemei, aparitia de noi molecule de adeziune, stresul reticolului endoplasmic, recrutarea de monocite, anoikis, deteriorarea jonctiunilor, modificarea capacitatii antitrombogenice, dereglarea tonusului vascular, deficienta in enzime lisosomale si formarea celulelor spumoase derivate din endoteliu. Actiunea prelungita factorilor agresori conduce la *lezarea si apoptoza* celulelor endoteliale.

Experimentele noastre de farmacologie celulara au demonstrat ca disfunctia endoteliala poate fi corectata prin medicamente precum enoxaparina, aspirina sau activatorii de PPAR-alpha. In viitor, evidentierea markerilor timpurii si aplicarea unei combinatii tintite de medicamente care sa se adreseze specific unei anumite disfunctii endoteliale, vor contribui major la reversarea disfunctiei endoteliale si la prevenirea formarii placii de aterom.

In concluzie, endoteliopatia in ateroscleroza, poate fi considerata un sindrom care consta in *modularea functiilor constitutive*, urmata de *disfunctia endoteliala* si in final *lezarea si apoptoza celulelor*.

Informatiile complexe asupra rolului endoteliului in conditii de sanatate si boala se pot constitui intr-o disciplina complexa care include *endoteliologie, endoteliopatie si endotelioterapie*.

Proiect finantat din granturi obtinute de la Ministerul Educatiei si Cercetarii, programul VIASAN (contractele INFLAGEN – Nr. 130/2006 si AMCADO – Nr. 22/2005), Academia Romana si Comunitatea Europeana PC6.

## **Endocanul, un nou marker pentru activarea endoteliala**

**Bogdan Dragos Grigoriu**

University of Medicine and Pharmacy, 16 Universitatii Street, Iasi 700115, Romania and INSERM U774, Pasteur Institute, Lille 59019, France, [b\\_grigoriu@hotmail.com](mailto:b_grigoriu@hotmail.com)

Dezvoltarea tumorală implică interacții între celula tumorală și mediul său (matrice extracelulară, celule stromale, endoteliul tumoral și celule imune), care contribuie activ la dezvoltarea tumorii.

Endocanul, un proteoglican dermatan sulfat specific celulei endoteliale selectivă din plămân și rinichi, este o moleculă prezentă în acest mediu tumoral și este supraexprimată în diverse tumori cum ar fi cancerul de plămân, sân, colon sau rinichi.

*In vitro*, endocanul amplifică efectul mitogenic al factorului de creștere asupra celulelor de origine epitelială. Endocanul este, de asemenea, implicat în reglarea transmigrării leucocitelor din sânge la țesuturi prin blocarea interacțiilor LFA-1/ICAM-1, o etapă importantă în adeziunea fermă a leucocitelor la endoteliu și un cofactor important implicat în funcția citotoxică leucocitară.

Am arătat că, *in vivo*, supra-exprimarea endocanului în celule non-tumorigenice epiteliale induce formarea tumorii, în timp ce supra-exprimarea de către celule tumorigenice crește rapid viteza de creștere a tumorii rezultante. Totuși, endocanul singur nu influențează proliferarea tumorii sau a celulelor endoteliale. Astfel, capacitățile endocanului de stimulare a tumorii rezultă din amplificarea efectelor factorului de creștere asupra celulelor tumorale. Factorul de creștere endotelial vascular (VEGF) este un inductor puternic al secreției de endocan în celulele endoteliale, iar expresia sa este corelată în cancer de plămân *non small cell*. În aceste tumori endocanul este supra-exprimat și aceasta implică în principal izoforma endocanului conținând exonul 2, tumorigenic. Mai mult, valorile de endocan seric sunt corelate cu supraviețuirea pacientului, cu o rată de supraviețuire mai mică la pacienți cu nivele circulante mari ale endocanului. Interesantă este corelația dintre nivelele serice de endocan și prezența metastazei și implicarea nodală, dar nu și cu dimensiunea tumorii primare.

În pacienții cu septicemie, unde stimularea endotelială este un fenomen patologic important, nivelele endocanului sunt, de asemenea, crescute și asociate cu severitatea crescută a septicemiei și mortalitatea ridicată.

În concluzie, am arătat că endocanul joacă un rol important în dezvoltarea tumorală, prin amplificarea efectelor factorului de creștere asupra celulelor tumorale și prin inhibarea recrutării celulelor imune în tumora. Nivelele serice de endocan reflectă stimularea tumorală angiogenică și reprezintă un factor prognostic în cancer de plămân *non small cell*. Endocanul este, de asemenea, exprimat de endoteliu în septicemie și are semnificație de prognostic.

## **Reglarea transcriptionala a NADPH oxidazelor in celule musculare netede aortice umane: rolul sistemului renina-angiotensina**

**Adrian Manea**

Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu"  
8 B.P. Hasdeu Street, Bucharest 050568, Romania, [adrian.manea@icbp.ro](mailto:adrian.manea@icbp.ro)

**Obiective** - Numeroase studii clinice si experimentale demonstreaza implicarea stresului oxidativ in patofiziologia bolilor sistemului cardiovascular. Mecanismele moleculare implicate in cresterea productiei de specii reactive de oxigen (ROS) nu sunt complet definite. NADPH oxidazele reprezinta principalele surse vasculare generatoare de ROS. Factorii de transcriere redox-dependenti NF-kB si AP-1 au un rol determinant in disfunctia celulelor vasculare prin reglarea unor gene implicate in: inflamatie, apoptoza, proliferare, migrare, crestere si diferentiere celulara. In acest studiu a fost investigat rolul cailor de semnalizare NF-kB si AP-1 in modularea expresiei si functiei NADPH oxidazelor in celule musculare netede aortice umane (CMN) mentinute in conditii pro-inflamatorii.

**Metode si Rezulate** – CMN au fost stimulate cu angiotensina II (Ang II) sau factor de necroza tumorală (TNF)- $\alpha$ . Analiza productiei de anion superoxid prin chemiluminiscenta si a expresiei genice prin real time PCR a evidentiat faptul ca activitatea NADPH oxidazelor si nivelele ARNm (NOX1, NOX4, p22phox, p47phox, p67phox) stimulate de Ang II sau TNF- $\alpha$  sunt reduse semnificativ de catre inhibitorii NF-kB sau AP-1. Activitatea promotorului si expresia proteica a subunitatii esentiale p22phox a fost redusa semnificativ in conditiile blocarii cailor de semnalizare NF-kB sau AP-1. Supraexprimarea tranzitorie a p65/RelA, IKK $\beta$ , c-Jun sau c-Fos a determinat o crestere semnificativa a activitatii promotorului genei p22phox. Precipitarea factorilor de transcriere ("biotin-streptavidin pull-down assay") si imunoprecipitarea cromatinei au demonstrat ca proteinele p65 si c-Jun intreactioneaza fizic cu secventele de consensus din promotorul genei p22phox umane.

**Concluzii** – Implicarea cailor de semnalizare NF-kB si AP-1 in modularea productiei de specii reactive de oxigen reprezinta un posibil mecanism prin care agentii pro-inflamatori induc stres oxidativ si disfunctia celulelor vasculare in ateroscleroza, hipertensiune, diabet sau obezitate.

*(Lucrare finantata prin fonduri de la Academia Romana si Ministerul Educatiei si Cercetarii).*

## Asocieri ale apolipoproteinei A5 cu sindromul metabolic

Loredan Stefan Niculescu

Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu"  
8 B.P. Hasdeu Street, Bucharest 050568, Romania, [loredan.niculescu@icbp.ro](mailto:loredan.niculescu@icbp.ro)

**Introducere.** Dislipidemia, ca hipertrigliceridemia si hipercolesterolemia, sunt considerate factor de risc independent pentru bolile cardiovasculare. APOA5 a fost recent identificata ca o noua gena localizata la 30kb upstream de grupul de gene APOA1/C3/A4 pe 11q23 si s-a demonstrat ca joaca un rol important in metabolismul lipoproteinelor bogate in trigliceride. ApoA5 accelereaza catabolismul lipoproteinelor bogate in trigliceride printr-o activare directa a hidrolizei de catre lipoprotein lipaza si a eliminarii lor din plasma, dar nu prin afectarea secretiei hepatice de VLDL-trigliceride. Epidemiological studies demonstrate that apoA5 plays a key role in triglyceride-rich lipoproteins metabolism. Datele publicate au aratat ca polimorfisme ale genei APOA5 sunt asociate cu nivele crescute ale trigliceridelor plasmatic, un factor de risc pentru sindromul metabolic. Intr-un studiu anterior am demonstrat ca alela *APOA5* -1131C este asociata cu riscul pentru sindromul metabolic in subiecti romani. La ora actuala exista putine studii care analizeaza asocierea dintre nivelele plasmatic ale apoA5 si parametrii lipidici principali in subiecti cu dislipidemie.

**Scopul studiului** a fost de a determina asocierea variantelor genei *APOA5* si a parametrilor biochimici cu nivelele apoA5 in plasma si fractia de HDL de la pacienti cu sindrom metabolic dintr-o populatie urbana din Romania.

**Metode.** Polimorfismele genei *APOA5* (-1131T>C, c.56C>G), nivelele apoA5 in plasma si fractia de HDL au fost analizate in 279 de subiecti, apoi corelate cu parametrii biochimici plasmatici. Subiectii au fost divizati in 2 grupuri: *martor* si *sindrom metabolic* (SM), toti fiind clasificati in functie de diagnoza de corpolenta, urmarind criteriile Organizatiei Mondiale a Sanatatii (WHO).

**Rezultate.** Am masurat o scadere a nivelelor apoA5 in plasma si fractia de HDL de la pacientii SM, purtatori ai alelei *APOA5* -1131C, comparativ cu ne-purtatorii SM. In contrast, pacientii SM avand alela *APOA5* c.56G au avut nivele mai mari ale apoA5 plasmatic si asociat cu HDL, comparativ cu ne-purtatorii SM. Nu am observat diferente intre concentratiile de apoA5 in plasma si fractia de HDL la subiecti martor, purtatori sau nu ai alelelor rare *APOA5* -1131C/c.56G. Am masurat nivele apoA5 mai mari in plasma si fractia de HDL de la pacienti SM purtatori ai alelei c.56G, comparativ cu pacientii SM avand alela -1131C si cu cei purtatori ai genotipului comun -1131TT/c.56CC. Am observat o redistribuire a apoA5 de la particulele de HDL la cele de VLDL in urma analizei FPLC a plasmei izolata de la pacienti SM obezi.

Am observat o corelatie pozitiva intre nivelele de apoA5 in plasma si fractia de HDL si concentratiile plasmatic de trigliceride la pacienti SM purtatori ai alelei *APOA5* -1131C. De asemenea, nivelele de apoA5 plasmatic si cele asociate cu HDL s-au corelat pozitiv cu nivelele de trigliceride si glucoza la pacienti SM cu alela *APOA5* c.56G. Mai mult, la pacientii SM purtatori ai alelei *APOA5* c.56G, nivelele de HDL-colesterol s-au corelat negativ cu concentratiile de apoA5 in plasma si in fractia de HDL a acestor pacienti.

**Concluzii.** Rezultatele noastre demonstreaza faptul ca polimorfismul *APOA5* c.56C>G rezulta in nivele plasmatic mai mari ale apoA5, fiind un polimorfism functional, in timp ce functionalitatea variantei genice -1131T>C este inca discutabila.

**Finantare** a fost asigurata din granturi de la Academia Romana si de la Ministerul Educatiei si Cercetarii.