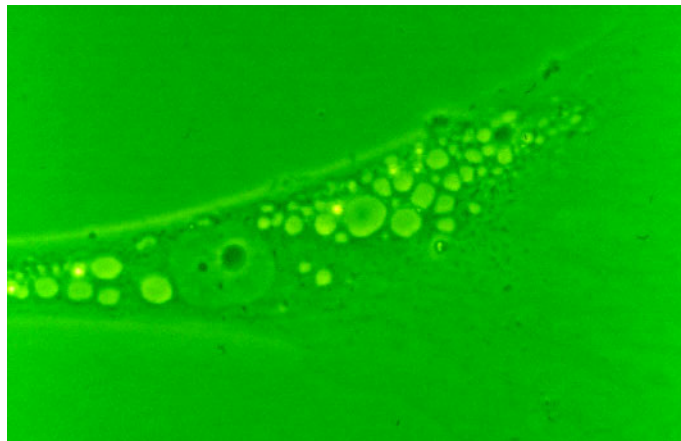


**UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**FACULTAT DE BIOLOGIA**

***DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR***

**IMPLICACIÓ DELS PROTEOGLICANS I DEL RECEPTOR  
LIPOPROTEIC LRP EN L'ACUMULACIÓ LIPÍDICA EN LA  
PARET VASCULAR**



**Marta Otero Viñas**  
Barcelona, Març de 2004

*Imatge portada: Cèl·lula muscular llisa escumosa obtinguda d'explants de coronària humana.  
Autora: Marta Otero Viñas.*

# UNIVERSITAT DE BARCELONA

## FACULTAT DE BIOLOGIA

### *DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR*

*Memòria presentada per la Llicenciada en Bioquímica i en Ciències Químiques Marta Otero Viñas, per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona, pel programa de Doctorat de Biomedicina del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular (bienni 2000-2002).*

*La present Tesi Doctoral: “Implicació dels proteoglicans i del receptor lipoproteic LRP en l’acumulació lipídica en la paret vascular” ha estat realitzada en el Centre d’Investigació Cardiovascular (Institut Català de Ciències Cardiovasculars-Consell Superior d’Investigacions Científiques, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau) sota la direcció de la Dra. Lina Badimon Maestro, Professora d’Investigació del CSIC i directora del Centre, i de la Dra. Vicenta Llorente Cortés, Investigadora de l’Institut de Recerca de l’Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. El tutor ha estat el Dr. Ignasi Ramirez Sunyer.*

La doctoranda:

*Marta Otero Viñas*

Els directors:

*Lina Badimon Maestro*

*Vicenta Llorente Cortés*

El tutor:

*Ignasi Ramirez Sunyer*



*Als meus pares i germana*

*A en Gerard*



## AGRAÏMENTS

Vull expressar en primer lloc el meu agraïment a les directores de tesi. A la Dra. Lina Badimon agrair-li la confiança mostrada al llarg d'aquests anys i les facilitats donades per tirar endavant la tesi. A la Dra. Vicenta Llorente voldria agrair-li els esforços compartits, el suport i ensenyances rebuts dia a dia, així com la seva amistat.

Se'm fa difícil resumir en poques paraules les mostres d'agraïment que voldria expressar a tots els companys amb qui he compartit el dia a dia durant aquests quatre anys i mig. Són molts els que han passat pel grup de recerca i de ben segur que a tots ells els he d'agrair alguna cosa que han aportat tant a la meva vida professional com personal. Així doncs, no m'agradaria oblidar a ningú, i per això, vull donar les Gràcies a tots aquells que m'han fet costat en els moments difícils.

De manera especial, voldria agrair l'amistat que ha nascut amb algunes de les persones que he tingut més properes durant aquests anys. Agrair l'ajuda incondicional de les tècnics de laboratori que han passat pel grup: Olga, Rosa, Vanessa i Mari, sense les quals el treball diari hauria estat molt feixuc; a la Vanessa voldria agrair-li també la seva constant sinceritat. Agrair a la Nuri, la Sònia i la Carme les converses de vida compartides. A l'Oriol Llampayas agrair-li el seu somriure i les paraules d'ànim mostrats en tot moment, però especialment la paciència tinguda per suportar el meu caràcter autoritari. A en Xevi voldria agrair-li les profundes converses compartides i la seva amistat. A la Sandra agrair-li les mostres d'efecte mostrades i l'entusiasme amb què compartia amb mi el treball diari. A la Maria i a l'Oriol Juan agrair-los la dedicació mostrada per assegurar-me un bon aprenentatge de les tècniques d'immunohistoquímica, però especialment agrair-los la seva amistat i ajuda incondicional. A la Gemma agrair-li l'ajuda desinteressada en la preparació de congressos, i també agrair-li la seva confiança. Agrair a la Sílvia Morató la paciència que ha tingut per assessorar-me en tots els tràmits administratius requerits al llarg d'aquest temps.

Hi ha però quatre persones a les que realment estic profundament agraïda i a les que mai podré compensar tot allò que m'han donat, així doncs és a ells a qui va dedicada aquesta tesi. Als meus pares vull agrair-los l'esforç realitzat per donar-me un bon futur professional, i donar-los les gràcies pel seu suport incondicional i per les paraules d'encoratjament. A la meva germana agrair-li la confiança que sempre m'ha mostrat. I a en Gerard, sense el qual no hauria arribat fins aquí, gràcies per escoltar-me, i per ajudar-me a millorar professionalment i com a persona.





## **ABREVIATURES**



<b>ACAT</b>	Acil-coenzim A: colesterol acil transferasa
<b>ADN</b>	Àcid desoxiribonucleic
<b>ADNc</b>	Cadena senzilla d'Àcid desoxiribonucleic
<b>ALLN</b>	N-acetil-leu-leu-norleucinal
<b>Apo B</b>	Apolipoproteïna B
<b>Apo E</b>	Apolipoproteïna E
<b>ARN</b>	Àcid ribonucleic
<b>ARNases</b>	Proteases que degraden l'Àcid ribonucleic
<b>ARNm</b>	Àcid ribonucleic missatger
<b>ARNr</b>	Àcid ribonucleic ribosomal
<b>AS</b>	Cadena antisentit
<b><math>\alpha_2</math>MR</b>	Receptor de $\alpha_2$ macroglobulina
<b>bFGF</b>	Factor de creixement de fibroblasts
<b>BSA</b>	Albúmina bovina
<b>CAM</b>	Molècula d'adhesió
<b>CCF</b>	Cromatografia en capa fina
<b>CE</b>	Colesterol esterificat
<b>ChABC</b>	Condroitinasa ABC
<b>CL</b>	Colesterol lliure
<b>CLA-1</b>	Receptor <i>scavenger</i> tipus B
<b>CML</b>	Cèl·lules musculars llises
<b>CMSF-1</b>	Factor estimulator de colònies de macròfags-1
<b>CPP32</b>	Caspasa-3
<b>CS</b>	Condroitin sulfat
<b>CSPG</b>	Proteoglicans condroitin sulfat
<b>Ct</b>	Cicle d'inici de l'amplificació de la reacció de la polimerasa
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonat
<b>DIG</b>	Mescla d'oligonucleòtids marcats amb digoxigenina
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfòxid
<b>dNTPs</b>	Mescla d'oligonucleòtids
<b>DS</b>	Dermatan sulfat
<b>DSPG</b>	Proteoglicans dermatan sulfat
<b>DTT</b>	Ditiotreitòl
<b>EDTA</b>	Àcid etilendiaminotetraacètic
<b>EGF</b>	Factor de creixement endotelial
<b>EtBr</b>	Bromur d'etidi
<b>FAM</b>	Marcador de fluoresceïna
<b>FcRII-B2</b>	Receptor <i>scavenger</i>
<b>FCS</b>	Sèrum fetal boví

---

<b>FGF</b>	Factor de creixement de fibroblasts
<b>FITC</b>	Fluoresceïna isotiocianat
<b>FSP</b>	Proteïna de superfície de fibroblasts
<b>GAGs</b>	Glucosaminoglicans
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulator de colònies de granulòcits i macròfags
<b>HDL</b>	Lipoproteïnes d'alta densitat
<b>(4-HNE)-LDL</b>	Lipoproteïnes de baixa densitat modificades amb 4-hidroxinonal
<b>HMG-CoA</b>	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzim A
<b>HS</b>	Heparan sulfat
<b>HSI</b>	Heparinasa I
<b>HSIII</b>	Heparinasa III
<b>HSI&amp;III</b>	Heparinasa I i heparinasa III
<b>HSPG</b>	Proteoglicans heparan sulfat
<b>ICAM</b>	Molècula d'adhesió intercel·lular
<b>IDL</b>	Lipoproteïnes de densitat intermitja
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferó gamma
<b>KSPG</b>	Proteoglicans queratan sulfat
<b>LDL</b>	Lipoproteïnes de baixa densitat
<b>LDLac</b>	Lipoproteïnes de baixa densitat acetilades
<b>LDLag</b>	Lipoproteïnes de baixa densitat agregades
<b>LDLn</b>	Lipoproteïnes de baixa densitat natives
<b>LDLox</b>	Lipoproteïnes de baixa densitat oxidades
<b>LDL-PGs</b>	Complexes de LDL amb proteoglicans
<b>LOX</b>	Receptor <i>scavenger</i>
<b>Lp(a)</b>	Lipoproteïna (a)
<b>LpL</b>	Lipoproteïna lipasa
<b>LRP</b>	Proteïna relacionada amb el receptor de les LDL
<b>MCP-1</b>	Proteïna quimiotàctica de monòcits-1
<b>MDA</b>	Malondialdehid
<b>MDA-LDL</b>	Lipoproteïnes de baixa densitat modificades amb malondialdehid
<b>MEC</b>	Matriu extracel·lular
<b>MGB</b>	Molècula orgànica unida a la sonda de la PCR a temps real
<b>MEF</b>	Fibroblasts embrionaris de ratolí que expressen el receptor LRP
<b>MMPs</b>	Metal·loproteases
<b>MMP-9</b>	Metal·loproteasa-9
<b>MØ</b>	Macròfags
<b>NEFA-LDL</b>	Lipoproteïnes de baixa densitat enriquides en àcids grassos no esterificats
<b>NO</b>	Òxid nítric

<b>nt</b>	Nucleòtid
<b>N<sub>2</sub></b>	Nitrogen
<b>OCT</b>	Medi de congelació de teixits
<b>ODNs</b>	Oligodesoxinucleòtids
<b>PAGE</b>	Electroforesi en gels de poliacrilamida
<b>PAI-1</b>	Inhibidor de l'activador de plasminogen tissular-1
<b>PCR</b>	Reacció en cadena de la polimerasa
<b>PDGF</b>	Factor de creixement derivat de plaquetes
<b>PEA</b>	Fibroblasts embrionaris de ratolí deficientes en el receptor LRP
<b>PGs</b>	Proteoglicans
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
<b>rLDL</b>	Receptor de les lipoproteïnes de baixa densitat natives
<b>RT</b>	Transcripció inversa
<b>RT-PCR</b>	Transcripció inversa seguida de reacció en cadena de la polimerasa
<b>rVLDL</b>	Receptor de les VLDL
<b>S</b>	Cadena sentit
<b>SDS</b>	Dodecil sulfat sòdic
<b>SMasa</b>	Esfingomielinasa
<b>SRAI/II</b>	Receptor <i>scavenger</i> tipus A
<b>SRBI</b>	Receptor <i>scavenger</i> tipus B
<b>SRE</b>	Element regulat per esterols
<b>SREBPs</b>	Proteïna d'unió a elements regulats per esterols
<b>SR-PSOX</b>	Receptor <i>scavenger</i>
<b>t<sub>amb</sub></b>	Temperatura ambient
<b>TBA</b>	Àcid 2-tiobarbitúric
<b>TBARS</b>	Substàncies que reaccionen amb l'àcid tiobarbitúric
<b>TF</b>	Factor tissular
<b>TFPI</b>	Inhibidor de la via del factor tissular
<b>TGF-β</b>	Factor de creixement transformant beta
<b>T<sub>m</sub></b>	Temperatura de fusió
<b>TNF-α</b>	Factor de necrosi tumoral alfa
<b>t-PA</b>	Activador del plasminogen tissular
<b>u-PA</b>	Activador uroquinasa del plasminogen
<b>UV</b>	Ultraviolada
<b>VCAM-1</b>	Molècula d'adhesió vascular-1
<b>vs</b>	Vers
<b>Versicà-LDL</b>	Lipoproteïnes de baixa densitat modificades amb versicà
<b>VLDL</b>	Lipoproteïnes de molt baixa densitat
<b>vWF</b>	Factor de <i>von Willebrand</i>

**Anglicismes**

<i>In vivo</i>	Estudi directament en un teixit o organ
<i>In vitro</i>	Estudi en un sistema fora del teixit o de l'organ d'un ésser viu
<i>freeze-etching</i>	Criofractura de mostres cel·lulars
<i>Kit</i>	Lot que conté els productes necessaris per realitzar un assaig
<i>Quencher</i>	Supressor de fluorescència
<i>Reporter</i>	Donant de fluorescència
<i>Scavenger</i>	Receptor escombriaire
<i>slam-freezing</i>	Criofixació de mostres cel·lulars
<i>Threshold cycle</i>	Cicle d'inici d'amplificació de la reacció de PCR
<i>Vasa vasorum</i>	Petits vasos de nova formació
<i>von Willebrand</i>	Marcador de cèl·lules endotelials
<i>Vòrtex</i>	Agitador vibrador

**Sistema d'unitat**

<b>atm</b>	Atmosfera
<b>cpm</b>	Comptes per minut
<b>cm</b>	Centímetre
<b>°C</b>	Grau centígrad
<b>g</b>	Gram
<b>x g</b>	Unitats d'acceleració de rotació
<b>h</b>	Hora
<b>KDa</b>	Quilo dalton
<b>L</b>	Litre
<b>min</b>	Minut
<b>M</b>	Molar
<b>mbar</b>	Milibar
<b>nm</b>	Nanòmetre
<b>µm</b>	Micròmetre
<b>pb</b>	Parell de bases
<b>p/v</b>	Unitat de pes per unitat de volum
<b>p/p</b>	Unitat de pes per unitat de pes
<b>r.p.m</b>	Revolucions per minut
<b>s</b>	Segon
<b>UI</b>	Unitats internacional
<b>V</b>	Volts
<b>v/v</b>	Unitat de volum per unitat de volum

## **ÍNDEX**





---

<b>1. INTRODUCCIÓ</b> .....	1
I. PATOGÈNIA DE L'ATEROSCLEROSI .....	3
II. PAPER DE LES LIPOPROTEÏNES EN L'ATEROGÈNESI .....	6
II.1. Retenció de LDL .....	6
II.2. Modificació de LDL .....	7
III.3. Conseqüències de la modificació de LDL en la paret vascular .....	9
III.3.1. Disfunció endotelial .....	9
III.3.2. Formació de cèl·lules escumoses .....	9
III.3.3. Síntesi i degradació de la matriu extracel·lular .....	11
III. PAPER DELS COMPONENTS DE LA PARET VASCULAR EN L'ATEROGÈNESI .....	13
III.1. Lípid .....	13
III.2. Matriu extracel·lular .....	14
III.2.1. Col·lagen .....	15
III.2.2. Proteoglicans .....	16
- Proteoglicans condroitin sulfat .....	18
- Proteoglicans heparan sulfat .....	19
III.3. Components cel·lulars .....	21
III.3.1. Cèl·lules endotelials .....	21
III.3.2. Monòcits/macròfags .....	22
III.3.3. Cèl·lules musculars llises .....	22
IV. RECEPTORS LIPOPROTEICS. LRP .....	24
IV.1. LRP: proteïna relacionada amb el receptor de les LDL .....	25
<b>2. OBJECTIUS</b> .....	29
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	33

---

I. OBTENCIÓ, MODIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE LIPOPROTEÏNES ...	35
I.1. Obtenció de LDL .....	35
I.2. Modificació <i>in vitro</i> de LDL .....	36
I.2.1. Modificació de LDL per agregació .....	36
I.2.2. Modificació de LDL per incubació amb versicà .....	37
I.3. Caracterització de lipoproteïnes .....	37
I.3.1. Determinació de la concentració proteica .....	37
I.3.2. Determinació de la concentració de colesterol .....	38
I.3.3. Determinació del grau d'oxidació .....	38
I.3.4. Caracterització electroforètica .....	39
- Electroforesi en gel d'agarosa .....	39
- Electroforesi en gel en gradient d'acrilamida .....	39
I.3.5. Caracterització per microscòpia electrònica .....	40
II. CULTIUS CEL·LULARS .....	40
II.1. Cultius de cèl·lules musculars llises humanes .....	40
II.1.1. Obtenció del cultiu primari i creixement de les cèl·lules musculars llises .	40
II.1.2. Caracterització de cèl·lules musculars llises .....	41
II.2. Cultius de fibroblasts .....	43
II.3. Assajos en cultius cel·lulars .....	43
II.3.1. Incubació amb lipoproteïnes .....	44
II.3.2. Assajos de compatència de lligant .....	44
II.3.3. Incubació amb oligonucleòtids contra el LRP .....	45
II.3.4. Tractament amb N-acetil-leu-leu-norleucinal (ALLN) .....	46
II.3.5. Marcatge radioactiu de proteoglicans .....	46
II.3.6. Digestió de proteoglicans .....	47
II.3.7. Estudis de proliferació cel·lular .....	47
III. ANÀLISIS D'ACUMULACIÓ LIPÍDICA INTRACEL·LULAR .....	48
III.1. Recollida de mostres cel·lulars .....	48
III.2. Extracció lipídica .....	48
III.3. Cromatografia en capa fina .....	49

---

IV. ESTUDIS D'EXPRESSION GÈNICA .....	50
IV.1. Obtenció de proteïna i ARN dels cultius cel·lulars .....	50
IV.2. Anàlisi dels nivells d'ARNm per RT-PCR .....	51
IV.2.1. Reacció de la transcriptasa inversa .....	51
IV.2.2. PCR semiquantitativa .....	52
- Visualització dels productes de PCR .....	53
IV.2.3. PCR quantitativa .....	55
- Fonament teòric de la PCR quantitativa .....	55
- Optimització de les condicions de la PCR quantitativa .....	57
IV.3. Anàlisi de proteïnes cel·lulars per western blot .....	60
IV.3.1. Electroforesi en gel d'acrilamida .....	61
IV.3.2. Transferència a membranes de nitrocel·lulosa .....	61
IV.3.3. Detecció de proteïnes .....	61
V. ESTUDI DE LA MATRIU EXTRACEL·LULAR .....	62
V.1. Caracterització per microscòpia òptica .....	62
V.2. Caracterització de l'ultraestructura de la matriu extracel·lular .....	62
V.2.1. Criofixació de mostres cel·lulars. <i>slam-freezing</i> .....	63
V.2.2. Criofractura de mostres cel·lulars. <i>freeze-etching</i> .....	63
V.2.3. Observació microscòpica de mostres cel·lulars .....	64
V.3. Anàlisi de proteoglicans cel·lulars .....	64
V.3.1. Aïllament de proteoglicans .....	64
- Extracció de proteoglicans de cultius cel·lulars .....	64
- Aïllament de proteoglicans per cromatografia de bescanvi iònic .....	65
V.3.2. Caracterització de proteoglicans per SDS-PAGE .....	66
VI. ESTUDIS <i>IN VIVO</i> EN MOSTRES HUMANES I PORCINES .....	66
VI.1. Estudis en model porcí. Tractament dels animals .....	66
VI.2. Processat de les mostres de teixit humà i porcí .....	67
VII. ESTUDIS IMMUNOHISTOQUÍMICS .....	68
VII.1. Caracterització dels teixits per Tricròmic de Masson .....	68
VII.2. Estudis histològics .....	69

VII.2.1. Tinció ORO .....	69
VII.2.2. Tècniques immunohistoquímiques .....	69
VII.3. Hibridació <i>in situ</i> .....	69
VII.3.1. Clonació de l'ADNc del LRP .....	70
VII.3.2. Preparació de bactèries competents .....	71
VII.3.3. Transformació de bactèries amb ADN plasmídic .....	72
VII.3.4. Obtenció de la sonda marcada .....	73
VII.3.5. Hibridació .....	74
VII.4. Anàlisi d'imatge .....	75
 ANNEX-I. TAULES DE SOLUCIONS .....	 77
 <b>4. RESULTATS</b> .....	 <b>85</b>
 I. INTEGRACIÓ RESULTATS ARTICLES I i II .....	 87
I.1. Caracterització de lipoproteïnes modificades <i>in vitro</i> .....	87
I.2. Efecte de les versicà-LDL en el contingut de colesterol intracel·lular en les cèl·lules musculars llises .....	88
I.3. Internalització de lipoproteïnes per les cèl·lules musculars llises .....	88
I.4. Caracterització dels proteoglicans sintetitzats per les cèl·lules musculars llises i pels fibroblasts .....	89
I.5. Rellevància dels proteoglicans i del LRP en la internalització de les LDLag en les cèl·lules musculars llises i en els fibroblasts .....	90
 II. INTEGRACIÓ RESULTATS ARTICLES III I IV .....	 92
II.1. Efecte de la internalització de les LDL i de les LDLag en la regulació de l'expressió dels receptors LRP i rLDL en cultius de les cèl·lules musculars llises	92
II.2. Hipercolesterolèmia i expressió del LRP en la paret vascular .....	93
II.3. Rellevància dels SREBPs en el control de l'expressió del LRP .....	94
II.4. Efecte del contingut lipídic intracel·lular en la supervivència de les cèl·lules musculars llises .....	95

---

III. ARTICLES ORIGINALS .....	97
III.1. Article I .....	99
III.2. Annex de l'article I ( <i>on-line</i> ) .....	109
III.3. Article II .....	115
III.4. Annex de l'article II ( <i>on-line</i> ).....	125
III.5. Article III .....	129
III.6. Article IV .....	139
<b>5. DISCUSSIÓ .....</b>	<b>159</b>
I. PROTEOGLICANS I ATEROGÈNESI .....	161
I.1. Proteoglicans condroitin sulfat i modificació de LDL .....	161
I.2. Proteoglicans heparan sulfat i internalització de LDLag en les cèl·lules musculars llises .....	163
II. PAPER DEL LRP COM A RECEPTOR LIPOPROTEIC EN L'ATEROGÈNESI	165
II.1. LRP i acumulació lipídica intracel·lular per la captació de LDL agregades en les cèl·lules musculars llises .....	165
II.2. Internalització de LDLag i expressió del LRP en les cèl·lules musculars llises .....	167
II.3. Internalització de LDLag mitjançant el LRP i supervivència de les cèl·lules musculars llises .....	169
<b>6. CONCLUSIONS .....</b>	<b>171</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>175</b>
<b>8. CURRÍCULUM .....</b>	<b>203</b>

