

POSIBILITĂȚI DE REGLARE A NIVELULUI SPECIILOR REACTIVE ALE OXIGENULUI ÎN ORGANISMUL UMAN: APLICAȚII ÎN INGINERIA ALIMENTARĂ ȘI MEDICINĂ

Teză destinată obținerii
titlului științific de doctor la
Universitatea "Politehnica" din Timișoara
în domeniul INGINERIE CHIMICĂ
de către

Chim. Olguța Corina Samoilă

Conducător științific:

Referenți științifici:

prof.univ.dr.ing. Lupea Alfa Xenia

prof.univ.dr. Anghel Andrei

prof.univ.dr.ing. Olariu Lucia Ileana

prof.univ.dr.ing. Peter Francisc

Ziua susținerii tezei: 28. 10.2008

Seriile Teze de doctorat ale UPT sunt:

- | | |
|------------------------|---------------------------------------------|
| 1. Automatică | 7. Inginerie Electronică și Telecomunicații |
| 2. Chimie | 8. Inginerie Industrială |
| 3. Energetică | 9. Inginerie Mecanică |
| 4. Ingineria Chimică | 10. Știința Calculatoarelor |
| 5. Inginerie Civilă | 11. Știința și Ingineria Materialelor |
| 6. Inginerie Electrică | |

Universitatea „Politehnica” din Timișoara a inițiat seriile de mai sus în scopul diseminării expertizei, cunoștințelor și rezultatelor cercetărilor întreprinse în cadrul școlii doctorale a universității. Seriile conțin, potrivit H.B.Ex.S Nr. 14 / 14.07.2006, tezele de doctorat susținute în universitate începând cu 1 octombrie 2006.

Copyright © Editura Politehnica – Timișoara, 2008

Această publicație este supusă prevederilor legii dreptului de autor. Multiplicarea acestei publicații, în mod integral sau în parte, traducerea, tipărirea, reutilizarea ilustrațiilor, expunerea, radiodifuzarea, reproducerea pe microfilme sau în orice altă formă este permisă numai cu respectarea prevederilor Legii române a dreptului de autor în vigoare și permisiunea pentru utilizare obținută în scris din partea Universității „Politehnica” din Timișoara. Toate încălcările acestor drepturi vor fi penalizate potrivit Legii române a drepturilor de autor.

România, 300159 Timișoara, Bd. Republicii 9,
tel. 0256 403823, fax. 0256 403221
e-mail: editura@edipol.upt.ro

Cuvânt înainte

Teza de doctorat a fost elaborată pe parcursul activității mele în cadrul Catedrei de Biochimie a Universității de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” din Timișoara. Acest studiu a fost realizat prin participarea sau colaborarea în următoarele proiecte de cercetare:

Grant de cercetare Marie Curie, Universitatea din Leeds UK, Molecular Epidemiology, prin programul Improving the Human Potential fundat de Programul F5 al Comisiei Europene pentru Cercetare și Dezvoltare Tehnologică, număr de contract: HMPT-CT-2001-00320

CEEX 10/2005: Studiul bioactivității sinergice a alimentelor funcționale antioxidante în reversibilitatea sindromului metabolic MET-ANTIOX - Contract Nr.101/7. oct 2005 cu finanțare buget de stat –Ministerul Educației și Cercetării prin Programul Cercetare de Excelență, în valoare de 1 087 400 RON cu durata de 3 ani (oct 2005-oct 2008)

CEEX 44/2007: Impactul Alimentelor Funcționale Multicomponent în combaterea obezității și aterosclerozei –Ministerul Educației și cercetării prin Programul AGRAL

Mulțumiri deosebite se cuvin conducătorului de doctorat Prof.Dr.Ing. Alfa Xenia Lupea pentru activitatea sa ca și coordonator al activității în acest proiect interdisciplinar de doctorat, d-lui Prof. Dr. Anghel Andrei, șeful catedrei de biochimie a UMF „Victor Babeș” din Timișoara în cadrul căreia îmi desfășor activitatea, pentru sprijinul acordat în activitatea mea științifică în toți acești ani, în cadrul mai multor proiecte de cercetare în cadrul cărora am acumulat experiență, d-nei Dr. Angela Carter care a fost supervizorul meu în timpul stagiului de pregătire în cadrul Laboratorului Light de la Universitatea din Leeds (UK) și de la care am învățat extraordinar de multe lucruri atât ca cercetător cât și ca om, d-nei Conf. Dr. Simona Drăgan care a coordonat cele două proiecte CEEX în cadrul cărora am realizat o parte din cercetările din cadrul acestei teme de doctorat precum și d-nei Prof. Univ. Carmen Socaciu și Prof. Univ. Dr. Iosif Gherghen pentru colaborarea în cadrul acestor proiecte. Mulțumesc de asemenea colegilor mei din catedra de biochimie pentru sprijinul acordat în elaborarea tezei (Prof. Dr. Motoc Marilena, Conf. Dr. Dana Kaycsa, Conf. Dr. Edward Șeclăman, Ș.L. Liviu Tămaș) și celor două colege J.A.Bostock și Claire Bennet doctoranzi la Departamentul de Medicină Moleculară Vasculară (Light Laboratories) pentru plasmidele obținute. Nu în ultimul rând țin să mulțumesc familiei mele pentru sprijinul și suportul moral acordat în toți acești ani.

Timișoara, octombrie 2008

Samoilă Olguța Corina

Samoilă, Olguța Corina

Posibilități de reglare a nivelului speciilor reactive ale oxigenului în organismul uman: aplicații în ingineria alimentară și medicină

Teze de doctorat ale UPT, Seria 4, Nr. 20, Editura Politehnica, 2008, 294 pagini, 98 figuri, 76 tabele.

ISSN: 1842-8223

ISBN: 978-973-625-72-42-1

Cuvinte cheie:

specii reactive ale oxigenului, antioxidanți, alimente funcționale multicomponent, posibilități de control al nivelului speciilor reactive ale oxigenului

Rezumat:

Teza de față investighează multiple posibilități de reglare a nivelului speciilor reactive ale oxigenului în organismul uman. Pe de o parte, s-a urmărit obținerea/selectarea unor alimente multicomponent pe bază de compuși naturali de extracție, cu capacitate antioxidantă mare, cu un conținut optim de macro- și microelemente, care s-au introdus în dieta a 90 de subiecți cu sindrom metabolic. S-au analizat efectele administrării dietei alese asupra capacității organismului de neutralizare a speciilor reactive ale oxigenului prin investigarea mai multor parametri de efect metabolic și de progresie a aterosclerozei. Pe de altă parte, s-au investigat posibilitățile de reglare a unor factori genici implicați în controlul speciilor reactive ale oxigenului: genele corespunzătoare superoxid dismutazei extracelulare (EC-SOD) și celor două izoforme α și β ale proteinei de legare a secvenței CCAAT (C/EBP α și C/EBP β). Folosindu-se metode și tehnici specifice, s-au identificat modificări ale secvenței ADN la nivelul acestor gene și s-a analizat modul cum aceste modificări se manifestă la nivel funcțional în vasculatură și în țesutul adipos.

CUPRINS	
Lista de figuri.....	8
Lista cu abrevieri.....	13
INTRODUCERE	17
PARTEA I – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU	19
I.1. Contribuția speciilor reactive ale oxigenului la stresul oxidativ	19
I.1.1. Speciile reactive ale oxigenului.....	19
I.1.1.1. Radicalul Superoxid.....	20
I.1.1.2. Apa oxigenată.....	21
I.1.1.3. Radicalul hidroxil.....	22
I.1.2. Mecanisme de generare a speciilor reactive ale oxigenului în organismul uman.....	26
I.1.3. Mecanisme de neutralizare a speciilor reactive ale oxigenului.....	30
I.1.4. Noțiunea de stres oxidativ.....	33
I.2. Compuși naturali cu activitate antioxidantă.....	35
I.2.1. Vitamina E.....	35
I.2.2. Vitamina C.....	37
I.2.3. Carotenoizii.....	38
I.2.4. Compuși fenolici naturali.....	41
I.2.4.1. Clase și subclase de compuși fenolici naturali.....	41
I.2.4.2. Acidul cafeic și antioxidanți din categoria acizilor hidroxicinamici.....	46
I.2.4.3. Flavonoide	50
I.3. Stresul oxidativ în sindromul metabolic.....	51
I.3.1. Disfuncția endotelială- o legătură între diferitele patologii în sindromul metabolic.....	51
I.3.2. Stresul oxidativ la nivelul endotelului vascular.....	53
I.3.3. Factori genetici implicați în controlul radicalilor liberi.....	55
I.3.3.1. La nivelul endotelului vascular.....	58
I.3.3.2. La nivelul țesutului adipos.....	61
PARTEA II– CONTRIBUȚII PERSONALE	66
II.1. Principiul experimental.....	66
II.2. Obținerea, identificarea și caracterizarea unor compuși naturali de extracție din plante medicinale și aromatice.....	68
II.2.1. Materiale și metode.....	68
II.2.1.1. Obținerea unor extracte din plante aromatice și medicinale.....	68
II.2.1.2. Caracterizarea extractelor.....	69
II.2.1.2.1. Identificarea unor compuși cu activitate antioxidantă prezenți în extractele obținute.....	69
II.2.1.2.1.1. Spectroscopia UV-VIS.....	69
II.2.1.2.1.2. Cromatografia de lichid de înaltă performanță	69
II.2.1.2.2. Determinarea capacității antioxidante a compușilor naturali de extracție	70
II.2.1.2.2.1. Metoda DPPH	70
II.2.1.2.2.2. Metoda FRAP.....	70
II.2.1.2.3. Determinarea conținutului în metale al plantelor medicinale și aromatice.....	71
II.2.2. Rezultate și discuții.....	72
II.2.3. Concluzii.....	85

II.3. Tehnologia obținerii unor alimente îmbogățite cu compuși naturali de extracție.....	86
II.3.1. Oțet balsamic de mere cu cătină, miere și cu extracte de plante medicinale și aromatice.....	86
II.3.2. Amestec de compuși mono- și polifenolici (VITIS).....	88
II.3.3. Amestecuri de cereale.....	94
II.3.4. Suc de tomate îmbogățit cu rozmarin și busuioc.....	95
II.4. Investigarea efectului administrării alimentelor îmbogățite cu compuși de extracție naturali în patologia sindromului metabolic.....	97
II.4.1. Constituirea unei dietei optime	97
II.4.1.1. Materiale și metode	98
II.4.1.1.1 Analiza capacității antioxidante totale a alimentelor îmbogățite cu compuși de extracție naturali în vederea constituirii dietei.....	98
II.4.1.1.2. Analiza conținutului în metale grele a alimentelor multifuncționale în vederea folosirii acestora în dietă.....	98
II.4.1.2. Rezultate și discuții privind constituirea dietei	99
II.4.2. Evaluarea efectelor dietei alese la pacienții cu sindrom metabolic.....	101
II.4.2.1. Materiale și metode.....	101
II.4.2.1.1. Selectarea pacienților umani incluși în loturile de studiu	101
II.4.2.1.2. Recoltarea probelor de sânge.....	103
II.4.2.1.3. Metoda ELISA.....	103
II.4.2.1.3.1. Determinarea insulinei.....	104
II.4.2.1.3.2. Determinarea interleukinei-6.....	105
II.4.2.1.3.3. Determinarea TNF- α	105
II.4.2.1.3.4. Determinarea leptinei.....	106
II.4.2.1.3.5. Determinarea adiponectinei.....	107
II.4.2.1.4. Metoda de determinare a radicalilor liberi din sângele capilar	108
II.4.2.1.5. Determinarea de antioxidanților hidro- și liposolubili din plasmă folosind metoda chemiluminescenței.....	108
II.4.2.1.5.1. Determinarea antioxidanților liposolubili.....	110
II.4.2.1.5.2. Determinarea antioxidanților hidrosolubili.....	110
II.4.2.1.6. Analiza statistică a datelor.....	111
II.4.2.2. Rezultate și discuții	111
II.4.2.3. Concluzii.....	120
II.5. Analiza funcțională a secvenței genice a unor factori implicați în controlul speciilor reactive ale oxigenului la nivelul endoteliului vascular și al țesutului adipos.....	123
II.5.1. Investigarea funcționalității la nivel vascular a unor polimorfisme la nivelul secvenței genice a enzimei superoxid dismutaza extracelulară	124
II.5.1.1. Materiale și metode.....	124
II.5.1.1.1. Selectarea pacienților umani incluși în loturile de studiu	124

II.5.1.1.2. Recoltarea probelor de sânge	124
II.5.1.1.3. Extracția ADN-ului genomic.....	124
II.5.1.1.4. Amplificarea PCR.....	125
II.5.1.1.5. Analiza la nivel populațional a unei secvențe ADN din promotorul genei superoxid dismutazei extracelulare prin metoda Transgenomic WAVE™ DNA Fragment Analysis	129
II.5.1.1.6. Genotiparea prin restricție enzimatică cu enzime de restricție.....	134
II. 5.1.1.7. Secvențializarea ADN	135
II. 5.1.1.8. Analiza computațională a secvenței genice a SOD3....	136
II. 5.1.1.9. Analiza statistică a datelor.....	137
II.5.1.2. Rezultate și discuții	138
II.5.1.3. Concluzii.....	152
II.6. CONCLUZII FINALE.....	223
II.7. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE.....	231
II.8. ANEXE.....	256

LISTA CU FIGURI

Fig. 1.	Specii reactive ale oxigenului (ROS)	Pag. 17
Fig. 2.	Structura electronică: A. Molecula de O ₂ și B. Anionul superoxid	Pag. 18
Fig. 3.	Oxidarea resturilor de cisteină ale proteinelor	Pag. 19
Fig. 4.	Formarea punților de sulf intramoleculare	Pag. 20
Fig. 5.	Dimerizarea proteinelor prin formarea punților de sulf intermoleculare	Pag. 20
Fig. 6.	Acțiunea HO [•] asupra deoxiribozei din structura ADN	Pag. 21
Fig. 7.	Acțiunea HO [•] asupra resturilor de aminoacizi din structura proteinelor	Pag. 22
Fig. 8.	Acțiunea HO [•] asupra lipidelor	Pag. 23
Fig. 9.	Reprezentarea repartizării electronilor pe orbitalii π^* ai oxigenului triplet (A) și singlet (B și C)	Pag. 24
Fig.10.	Modul de formare a speciilor reactive ale oxigenului de oxigen în cadrul desfășurării lanțului respirator	Pag. 26
Fig.11.	Producția de NO catalizată de eNOS	Pag. 27
Fig.12.	Acțiunea glutation peroxidazei	Pag. 29
Fig.13.	Noțiunea de stres oxidativ	Pag. 32
Fig.14.	Acțiunea antioxidantă a vitaminei E	Pag. 34
Fig. 15	Structura tocotrienolilor (A) și tocoferolilor (B)	Pag. 34
Fig.16.	Forma oxidată, redusă și ionizată a acidului ascorbic	Pag. 35
Fig.17.	Structura moleculelor de α -, β - și γ -caroten	Pag. 37
Fig.18.	Biosinteza vitaminelor A	Pag. 38
Fig.19.	Structura acizilor hidroxicinamici și relația dintre ei în cadrul biosintezei	Pag. 45
Fig.20.	Activitatea antioxidantă a acizilor hidroxicinamici	Pag. 45
Fig.21.	Acțiunea antioxidantă a α -tocoferolului, acidului cafeic și vitaminei C	Pag. 47
Fig.22.	Factorii de risc aflați la interfața dintre sindromul de rezistență la insulină, sindromul metabolic, diabet zaharat tip 2 și bolile cardiovasculare	Pag. 51
Fig.23.	Situsul polimorfic la nivelul a 2 secvențe ADN	Pag. 54
Fig.24.	Structura genei cu evidențierea organizării modulare a promotorului și a regiunii 3` UTR	Pag. 55
Fig.25.	Domeniile funcționale ale proteinei EC-SOD	Pag. 57
Fig.26.	Modul de acțiune a factorilor de transcripție din familia C/EBP pentru reglarea transcripției genelor	Pag. 59
Fig.27.	Principalele direcții de cercetare în cadrul tezei	Pag. 65
Fig.28.	Cromatograma standard pentru acizii hidroxicinamici și timpii de retenție aferenți	Pag. 72
Fig.29.	Curba de etalonare-metoda DPPH	Pag. 75
Fig.30.	Curba de etalonare-metoda FRAP	Pag. 77
Fig.31.	Conținutul metalic al plantelor medicinale utilizate la obținerea extractelor	Pag. 79
Fig.32.	Conținutul de metale grele al plantelor medicinale utilizate la obținerea extractelor	Pag. 81

Fig.33.	Schema fluxului tehnologic la fabricarea produsului OȚET BALSAMIC; simbolul ⊗ marchează punctele de control	Pag. 85
Fig.34.	Spectrul UV-VIS al oțetului balsamic	Pag. 86
Fig.35.	Analiza HPLC a oțetului balsamic îmbogățit cu plante aromatice	Pag. 87
Fig.36.	Amprenta UV-Vis pentru VITIS	Pag. 88
Fig.37.	Analiza HPLC a produsului VITIS obținut din struguri roșii	Pag. 89
Fig.38.	Analiza HPLC a produsului VITIS obținut din struguri albi	Pag. 90
Fig.39.	Schema fluxului tehnologic la fabricarea produsului VITIS cu marcarea punctelor de control cu simbolul ⊗	Pag. 91
Fig.40.	Curba de etalonare folosind soluții standard de acid galic	Pag. 94
Fig.41.	Determinarea activității antioxidante a unor alimente în scopul includerii în dietă	Pag. 97
Fig.42.	Conținutul în metale grele ale salatei de legume 1 (culoare albastră), salată 2 (culoare galbenă) și supă de legume (culoare roz) pentru Cu (1), Zn(2), Fe(3), Mn(4), Ni(5), Pb(6), Cd(7), Cr(8)	Pag. 97
Fig.43.	Principiul metodei ELISA sandwich	Pag. 101
Fig.44.	Standardele antioxidante folosite în determinarea activității antioxidante a plasmei prin metoda chemiluminescentă (ACL și ACW)	Pag. 107
Fig.45.	Reacțiile care stau la baza determinării activității antioxidante prin metoda chemiluminescenței	Pag. 107
Fig.46.	Variația indicelui HOMA-IR la cele 4 grupuri la înrolare, după 3 luni și după 6 luni de la înrolare	Pag. 113
Fig.47.	Variația valorilor glucozei (stânga) și insulinei (dreapta) la cele 4 grupuri la înrolare, după 3 luni și după 6 luni de la înrolare	Pag. 114
Fig.48.	Variația valorilor antioxidantilor hidrosolubili și liposolubili la cele 4 grupuri la înrolare, după 3 luni și după 6 luni de la înrolare	Pag. 115
Fig.49.	Variația valorilor adiponectinei (stânga) și leptinei (dreapta) la cele 4 grupuri la înrolare, după 3 luni și după 6 luni de la înrolare	Pag. 115
Fig.50.	Variația valorilor TNF-α și IL-6 la subiecții din cele patru loturi în momentul înrolării în studiu și pe parcursul studiului la 3 respectiv 6 luni	Pag. 116
Fig.51.	Variația nivelului de radicali liberi din sângele periferic la subiecții din cele patru loturi în momentul înrolării în studiu și pe parcursul studiului la 3 respectiv 6 luni	Pag. 117
Fig.52.	Direcțiile de analiză a factorilor genici	Pag. 121
Fig.53.	Verificarea mărimii fragmentului de 485 bp din gena EC-SOD obținut în urma reacției PCR prin compararea cu mărimile fragmentelor din Superladder low 100 bp (ABgene)	Pag. 126

Fig.54.	Verificarea mărimii fragmentului de 485 bp din gena <i>EC-SOD</i> obținut în urma reacției PCR prin compararea cu mărimile fragmentelor din Superladder low 100 bp (ABgene)	Pag. 126
Fig.55.	Formarea homo- și heteroduplecșilor prin denaturarea și răcirea lentă a produsului PCR	Pag. 127
Fig.56.	Rolul moleculei de TEAA (prelucrare după manualul tehnic Transgenomic Wave versiunea 1998)	Pag. 128
Fig.57.	Exemplu de cromatogramă cu evidențierea detecției mai rapide a heteroduplexurilor	Pag. 128
Fig.58	Graficul variației timpului de retenție a fragmentelor de ADN dublu catenar pe coloana DNASep®HPLC .	Pag. 130
Fig.59.	Rezultatul migrării electroforetice a fragmentelor obținute în urma restricției enzimatică în vederea evidențierii polimorfismului Thr40Ala	Pag. 136
Fig.60	Electroforegramele rezultate în urma secvențializării în antisens, prezentând alelele A și G provenind de la homozigoții respectivi (a și c) și de la un heterozigot (b)	Pag. 136
Fig.61.	Rezultatul migrării electroforetice a fragmentelor obținute în urma restricției enzimatică în scopul evidențierii polimorfismului Arg213Gly <i>EC-SOD</i>	Pag. 137
Fig.62	A și B : Exemplu de cromatogramă rezultată în urma analizei WAVE™ DNA analysis la temperaturta de 59°C în gradient de tampon B de 55-63% (A) și la temperatura de 55°C în gradient de tampon B de 59-67% (B) ambele prezentând un singur profil cromatografic corespunzător homozigoților wild type	Pag. 162
Fig.63.	Studiul comparativ al frecvenței genotipurilor AA și AG+GG la diabetici vs. Non-diabetici (stânga) și la normotensivi vs. Hipertensivi (dreapta)	Pag. 141
Fig.64.	Poziția genei <i>EC-SOD</i> la nivelul cromozomului 4 uman obținută din baza de date NCBI Entrez	Pag. 143
Fig.65.	Posibilitatea de reglare a <i>EC-SOD</i> prin intermediul factorilor de transcripție din familia Ets și Kruppel	Pag. 155
Fig.66.	Posibilitatea de reglare a <i>EC-SOD</i> prin intermediul factorilor de transcripție SP1, STAT5, C/EBP și c-Myb	Pag. 156
Fig.67.	Factorii de transcripție cu probabilitate mai mare de a fi implicați în reglarea expresiei <i>EC-SOD</i>	Pag. 158
Fig 68.	Vizualizarea fragmentelor ADN obținute în urma amplificării PCR	Pag. 160
Fig.69.	A. Un exemplu de cromatogramă rezultată în urma analizei WAVE™ DNA analysis care prezintă un homozigot wild type (C/C) și unul mutant (T/T); B-D Electroforegramele rezultate în urma secvențializării prezentând polimorfismul -3429 C/T cu locusul polimorfic indicat prin săgeți	Pag. 167

Fig.70.	A. Un exemplu de cromatogramă (D) rezultată în urma analizei WAVE™ DNA analysis care prezintă un homozigot wild type (CG/CG) și unul mutant (TT/TT) -411/-412 CG/TT cu locusurile polimorfice indicate prin săgeți	Pag. 168
Fig.71.	Localizarea cromozomială a genei <i>C/EBPβ</i> la nivelul cromozomului 20 uman obținută din baza de date NCBI Entrez	Pag. 171
Fig.72.	Constructul -3614C/ <i>EBPβ</i> pGL3-bazic	Pag. 179
Fig.73.	Rezultatul migrării electroforetice în gel de agaroză 1% a produșilor rezultați în urma reacțiilor de restricție enzimatică cu DpnI efectuată după SDM	Pag. 179
Fig.74.	Selectarea clonelor pozitive pentru insertul de 245 bp	Pag. 180
Fig.75.	Verificarea orientării corecte a insertului în constructul corespunzător haplotipului nr.2.	Pag. 180
Fig.76.	Siturile de restricție enzimatică ale enzimelor Bam HI și EcoRI în cazul orientării incorecte a insertului	Pag. 181
Fig.77.	Situsul polimorfic pe catena complementară -3429C (complementar G)	Pag. 181
Fig.78.	Reglarea <i>C/EBPβ</i> prin intermediul factorilor de transcripție Sp-1 și Egr-1	Pag. 184
Fig.79.	Posibilitatea reglării prin intermediul elementelor GATA și CP2	Pag. 185
Fig.80.	Semnalizarea Wnt (în preadipocite a. și în adipocitele mature b.)	Pag. 187
Fig.81.	Mecanism posibil de reglare a adipogenezei în preadipocite (a) și adipocite mature (b)	Pag. 187
Fig.82.	Factori de transcripție posibil implicați în reglarea expresiei <i>C/EBPβ</i>	Pag. 188
Fig.83.	Confirmarea adipocitelor diferențiate	Pag. 194
Fig.84.	Reacțiile de bioluminescență catalizate de cele două luciferaze (Promega)	Pag. 196
Fig.85.	Rezultatele migrării electroforetice ale primerilor corespunzători polimorfismului -2970 A/G în gel de agaroză 1% în comparație cu markerul ADN Superladder low 100 bp	Pag. 198
Fig.86.	Poziția genei <i>C/EBPα</i> la nivelul cromozomului 19 uman obținută din baza de date NCBI Entrez	Pag. 201
Fig.87.	Amplificarea PCR a ADN-ului plasmidial care conține numărul clonei și tipul constructului notate direct pe fotografia obținută cu Chemi-Imager system software (Alpha Innotech Corp)	Pag. 207
Fig.88.	Vizualizarea fragmentelor ADN rezultate în urma reacțiilor PCR	Pag. 208
Fig.89.	Vizualizarea fragmentelor ADN rezultate în urma reacției de digestie cu enzimele BstUI și Cac8I	Pag. 209
Fig.90.	Vizualizarea fragmentelor ADN rezultate în urma reacției de digestie cu enzimele BamHI și Fok I	Pag. 209
Fig.91.	Insertul ce conține haplotipurile analizate introduse în plasmidul pGL-bazic	Pag. 211

Fig.92.	Activitatea comparativă a luciferazei în preadipocitele transfectate cu plasmidele de interes	Pag. 212
Fig.93.	Activitatea comparativă a luciferazei în adipocitele mature ce provin din preadipocitele transfectate cu plasmidele de interes	Pag. 213
Fig.94.	EMSA pentru investigarea capacității de legare a secvențelor ADN ce conțin alelele G și A corespunzătoare polimorfismului -2970 G/A la proteinele nucleare din preadipocitele 3T3-F442A	Pag. 215
Fig.95.	EMSA pentru investigarea capacității de legare a secvențelor ADN ce conțin alelele C și G ale corespunzătoare polimorfismului-1050 C/G la proteinele nucleare din preadipocitele 3T3-F442A	Pag. 216
Fig.96.	Mecanism posibil de reglare prin intermediul factorilor de transcripție HNF4 și PPARγ în hepatocite (a) și adipocite (b)	Pag. 219
Fig.97.	Factorii de transcripție posibili reglatori ai C/EBPα.	Pag. 219
Fig.98.	Reglarea expresiei C/EBPα în preadipocite nediferențiate și adipocite mature de către factorii de transcripție GATA; Oct-1, MZF, Gli-1, Ahr:ARNT, p53 și proteinele de șoc termic.	Pag. 220

LISTA CU ABREVIERI

ROS	Speciile reactive ale oxigenului
RNS	Specii reactive cu azot
HPLC	Cromatografia lichid de înaltă performanță
ELISA	Analiza activității enzimelor imobilizate pe imunoabsorbant
DHPLC	Cromatografia de lichid de înaltă performanță cu denaturare
EMSA	Analiza șiftului de electromobilitate
EC-SOD	Enzima (proteina) superoxid dismutaza extracelulară
<i>EC-SOD (SOD3)</i>	Gena ce codifică superoxid dismutaza extracelulară
<i>C/EBPβ</i>	Proteina de legare a potențiatorului CAAT (izoforma β)
<i>C/EBPβ</i>	Gena ce codifică proteina de legare a potențiatorului CAAT (izoforma β)
<i>C/EBPα</i>	Proteina de legare a potențiatorului CAAT (izoforma α)
<i>C/EBPα</i>	Gena ce codifică proteina de legare a potențiatorului CAAT(izoforma α)
NO	Monoxid de azot
NOS	NO sintetaza
eNOS	Nitric oxid sintetaza endoteliala
GSH	Glutation
NAD(P)H	Nicotinamid-adenin dinucleotid redus
COX	Ciclooxigenaza
XO	Xantinoxidaza
TNF-α	Factor necrotic tumoral
PDGF	Factorul de creștere plachetar
INF-γ	Interferon-gamma
DHA	Acidul dehidroascorbic
VLDL	Lipoproteine cu densitate foarte mică
LDL	Lipoproteine cu densitate mică
HDL	Lipoproteine cu densitate mare
PON-1	Paraxozonaza serică
ET-1	Endotelina 1
PGI ₂	Prostaglandină vasodilatatoare
IL-6	Interleukina -6
IR	Rezistența la insulină
IR-HOMA	Index de rezistență la insulină
IRS	Substratul pentru receptorul insulinic
PI3K	Fosfoinozitol 3- kinaza
Akt	Akt kinaza
VSMC	Celulele mușchiului neted vascular
MAPK	protein kinaze activate de mitogeni
PAI-1	Inhibitorul activării plasminogenului
FVII	Factorul de coagulare FVII
sGC	Guanilat cilaza solubilă
GMPC	GMP ciclic
AMPC	Adenozin monofosfat ciclic
NF-Kb	Factorul hepatic nuclear
p44 MAPK	Proteina p44 din categoria protein kinazelor activate de mitogeni
SNP	Modificarea unei singure nucleotide din secvența ADN
SST	Situsul de start al transcripției unei gene

SLFT	Situsuri de legare a factorilor de transcripție
Cu,Zn-SOD (SOD-1)	Superoxid dismutaza citoplasmatică
Mn-SOD (SOD-2)	Superoxid dismutaza mitocondrială
ADNc	ADN complementar
HBD	Domeniul de legare a heparinei
bZIP	Fermoar de leucină
AUG	Codon start
PPAR γ	Receptor hormonal nuclear numit proliferator peroxizomal
C/EBP(GAAD153)	care este homologul proteinelor C/EBP (C/EBP zetta) care poate induce oprirea creșterii și apoptoza celulelor ca răspuns la stresul celular sau ca răspuns la degradarea ADN.
ADD1/SREBP-1c	Element de diferențiere și determinare a adipocitelor/proteina de legare a elementului care răspunde la sterol-1c
PEPCK	Fosfoenolpiruvatcarboxikinaza
IRS1	Substratul pentru receptorul insulenic-1
GLUT4	Transportor de glucoză
CREB	Proteina de răspuns la AMPc
DPPH	1,1` -difenil-2-picril-hidrazil
FRAP	Capacitatea de reducere a ionului feric de către plasmă
TROLOX	Echivalent structural al vitaminei E
IMT CCA	Grosimea intimei medii a carotidei
IMC	Indice de masă corporală
PCR	Reacție de polimerizare în lanț
dNTPs	Dezoxinucleotid trifosfat (datp, DGTP, dctp, DTPP)
ddNTP	Didezoxinucleotid trifosfat (ddatp, ddgtp, ddctp, ddttp)
DGGE	Electroforeză în gel denaturant cu gradient
qRT-PCR	Cuantificarea în timp real a produșilor PCR
SSCP	Polimorfism conformațional pe o singură catenă
TEAA	Acetat de trietilamoniu
ACN	Acetonitril
Soluții tampon	Soluții tampon (New England Biolabs)
NEB	
RFLP	Analiza fragmentelor obținute prin metoda digestiei enzimatice cu enzime de restricție
TSR	Agent de supresie a matricei ADN cu rol de a împiedica formarea buclelor de ADN
STAT5	Signal transduction activat
SMARCA3	Proteină reglatoare de cromatină dependentă de actină, asociată matrixului din familia SWI/SNF
BLIMP-1	Proteina 1 care induce maturarea limfocitelor B (transcriptional repressor B lymphocyte induced maturation protein-1)
Oct-1	Proteina 1 de legare de octameri (octamer binding protein 1)
Oct-1.P	Proteina 1 de legare de octameri cu domeniu POU (octamer binding protein 1)
TATA	Caseta TATA recunoscută de ARN polimeraza
SF1	Factorul steroidogenic 1
GATA	Proteina de legare a secvenței TATA
CHOP (GAAD153)	omologul proteinelor C/EBP (C/EBP zetta) care poate induce oprirea creșterii și apoptoza celulelor ca răspuns la stresul celular sau ca răspuns la degradarea ADN.

E2F	Proteina E2F implicată în ciclul celular
ETS	Familia de proteine protooncogene
c-Myb	Echivalentul celular al oncogenei v-Myb a virusului mioblastozei aviare
NRF2 (GABP)	Factorul nuclear respirator 2 (proteina de legare a unităților repetitive GA)
PEA3	Papiloma virus enhancer
GC box	Caseta GC
MZF	Factorul de transcripție mieloidic de tip deget de zinc (mieloid zinc finger)
HOX	homeodomeniu HOX
COMP1	Proteina ce cooperează cu proteinele miogenice în complexe multiproteice
SOX5	factor de transcripție specific testicular
DBP	Proteina de legare a domeniului D a albuminei
FREAC.2	Proteina activatoare „fork head related”-2
p53	Proteina tumor-supresoare p53
ELK-1	Proteina din familia ETS
BRIGHT	Proteina BRIGHT, reglator al transcripției imunoglobulinei H în celulele β pancreatice
ERK1/2	Kinază din familia MAPK kinază
p38	Proteina implicată în ciclul celular
JNK	Kinază din familia MAPK kinază
IRF-1	Factorul de transcripție
SREB	Proteina de legare a elementului reglat de sterol (sterol regulatory binding protein)
NFAT	Factorul nuclear al celulelor T activate
AhR	Hidrocarburi aromatice
ARNT	Receptorul hidrocarburilor aromatice
SP1	Proteina stimuloare 1
KKLF	Factorul de transcripție de tip deget de zinc din categoria Kruppel specific rinichiului
GKLF	Factorul de transcripție de tip deget de zinc din categoria Kruppel specific intestinal
BKLF	Factorul de transcripție de tip deget de zinc din categoria Kruppel simplu
EKLF	Factorul de transcripție de tip deget de zinc din categoria Kruppel specific eritroid
Elf-1	Factor de transcripție din familia de protooncogene ETS
Spi-B	Factor de transcripție din familia de protooncogene ETS
Spi-1/PU.1	Factor de transcripție din familia de protooncogene ETS
YY1	Proteina represoare Yin și Yang
NRSE	Elementul de silencing restrictiv neuronal
EGR-1	Factorul 1 de răspuns la creștere
AP-1	Proteina activatoare-1
AP-2	Proteina activatoare-2
AP-4	Proteina activatoare-4
Sp-1	Proteina stimuloare de tip deget de zinc SP1
ZNF219	Proteina 219 de tip deget de zinc din familia Kruppel
ZBP89	Proteina 89 de tip deget de zinc
ZIC2	Proteina de tip deget de zinc

HLTF	Factor de transcripție asemănători helicaselor
AML1/CBFA2	proteina de legare a potențiatorului virusului papiloma virus (papiloma virus enhancer binding protein 2) subunitatea alpha B1
RUNT	Familie de factori de transcripție
ERR	Receptorul de estrogeni
IK-1	Proteina IKAROS-1 din categoria familia IKAROS proteine critice pentru dezvoltarea liniei hematopietice
CP2	factorul de transcripție al α -globinei
TCF/LEF1	Heterodimer specific celulelor T (T cell factor/ lymphoid enhancing factor)
PU.1	Factor de transcripție cu domeniu PU din familia ETS
HIVEP1	Proteina de legare a stimulatorului HIV-1
MeI	Omologul oncogenei EVI I în leucemiile acute mieloides și
(MDS/EVI 1/)	sindrom mielodisplastic (MDS)
HNF4	Factorul hepatic nuclear 1
PPAR/RXR	Heterodimer PPAR/elemente de răspuns la acidul retinoic
NUDR	Factorul nuclear asociat proteinei DEAF-1
INSM1	Factorul de transcripție insulinoma
PAX2	Factor de transcripție specific pancreatic
GCM1	Factorul corionic specific (glial cell missing homolog 1)
USF	Factorul stimulator din aval (upstream stimulatory factor)
WT-1	Supresorul tumorilor Wilms (Wilms tumor supressor)
Gli-1	Oncogena omoloagă asociată glioma (glioma associated oncogene homolog 1)
Cotransfecție	Procesul de introducere a ADN-ului corespunzător a două plasmide diferite simultan
G418	geneticină 418 (antibiotic de selecție)
3T3-L1	Celule embrionare murine de tip fibroblaști
3T3-F442A	Celule preadipocite murine
HDAC1-mSin3A	Complex format din elemente mSin3A și deacetilaza histonelor (HDAC1)

I. INTRODUCERE

În cercetarea modernă, există științe de graniță în care se întrepătrund în mod fericit ingineria chimică, genetică, bioingineria și biotehnologia. Folosirea combinată a metodelor specifice acestor domenii duce la rezolvarea unor aspecte complexe ale temelor de cercetare, deși vizează probleme de o specificitate deosebită. Complexitatea problemelor care privesc producerea, acțiunile și neutralizarea speciilor reactive ale oxigenului, necesită o astfel de îmbinare a metodelor cu care operează ingineria chimică, ingineria genetică și biotehnologia.

Speciile reactive ale oxigenului sunt specii chimice generate în procesul normal al respirației celulare. Trecerea organismelor la metabolismul aerob a dus la generarea permanentă a speciilor reactive ale oxigenului ca produși secundari. Deoarece această trecere a avut ca rezultat un imens câștig energetic, organismele vii s-au adaptat acestei situații dezvoltând mecanisme variate de neutralizare a acestora la nivelul de echilibru, care să nu afecteze viața organismului. Perturbările mecanismelor de menținere a nivelului speciilor reactive la echilibru, cunoscute generic sub denumirea de stres oxidativ, sunt implicate în inițierea și progresul multor boli, printre care sindromul metabolic, bolile cardiovasculare, cancer și diabet. Cercetările în acest domeniu au relevat complexitatea mecanismelor implicate în generarea, acțiunile sau neutralizarea acestor specii reactive, care trebuie să țină cont de aspecte multiple (chimice, genetice sau fiziologice) atunci când studiază implicarea acestor specii într-un anumit tip de boală.

În teza de față s-a analizat implicarea speciilor reactive ale oxigenului în sindromul metabolic, care stă la baza principalelor maladii ce afectează omenirea: diabetul și bolile cardiovasculare. În acest context, teza de față își propune, pe baza unei analize riguroase a parametrilor chimici, metabolici și genetici să efectueze o analiză multifactorială a unor mecanisme biochimice care controlează speciile reactive cu relevanță în sindromul metabolic.

Teza este structurată în două părți principale:

În partea I, care cuprinde considerații teoretice generale, sunt prezentate cunoștințele actuale privind chimia speciilor reactive ale oxigenului, producerea, controlul și neutralizarea acestora. Sunt prezentate exhaustiv mecanismele de protecție antioxidantă (chimice, biochimice și genetice) implicate în neutralizarea fenomenului de stres oxidativ.

În partea II, ce cuprinde contribuțiile proprii, se prezintă un studiu complet în care se întrepătrund cercetarea fundamentală privind factorii ce controlează speciile reactive ale oxigenului, cu cercetări aplicative privind extracția unor principii naturale din plante medicinale și aromatice cu caracter antioxidant, caracterizarea acestora și utilizarea lor în diete cu profil antioxidant administrate subiecților cu sindrom metabolic.

În cadrul tezei s-au urmărit în principal două direcții ce corespund la două modalități de control a nivelului speciilor reactive ale oxigenului în organism:

1. creșterea capacității organismului de neutralizare a speciilor reactive ale oxigenului prin administrarea unor alimente cu capacitate antioxidantă mare la subiecții cu sindrom metabolic

2. prin identificarea unor noi posibilități de reglare fină a nivelului ROS prin reglarea expresiei genelor **EC-SOD**, **C/EBP α** , **C/EBP β** care sunt factori genici importanți în modularea nivelului ROS.

Obiectivele specifice îndeplinite în cadrul celor două direcții de cercetare au fost:

1. Obținerea, identificarea și caracterizarea unor compuși naturali cu activitate antioxidantă obținuți prin extracție din plante medicinale și aromatice.
2. Prezentarea tehnologiei de obținere a unor alimente îmbogățite cu compuși de extracție naturali
3. Investigarea capacității antioxidante și a conținutului în metale grele a alimentelor îmbogățite cu compuși de extracție naturali folosite în dieta subiecților cu sindrom metabolic
4. Evaluarea efectului administrării dietei alese la subiecții cu sindrom metabolic prin analiza unor *parametri de efect metabolic* (rezistența la insulină, profilul lipidic, adiponectina, leptina, interleukina-6, factorul necrotic tumoral- α , nivelul de radicali liberi din sângele periferic și capacitatea antioxidantă a plasmii datorată antioxidantilor hidro- și liposolubili) și a unor *parametri de progresie a aterosclerozei* (valoarea grosimii peretelui arterial)
5. Investigarea unor factori genetici implicați în controlul speciilor reactive ale oxigenului

Studiile au fost realizate prin metode moderne de analiză precum cromatografia de lichid de înaltă performanță (HPLC), analiza activității enzimelor imobilizate pe imunoabsorbant (ELISA), cromatografia de lichid de înaltă performanță cu denaturare (DHPLC), secvențializarea ADN, analiza activității luciferazei, analiza șiftului de electromobilitate (EMSA) precum și alte tehnici de biologie moleculară moderne precum mutageneza dirijată și transfecția celulară.

Finalizarea acestor studii a contribuit la obținerea unui oțet balsamic de miere cu miere și cătină îmbogățit cu plante aromatice, la identificarea posibilităților de utilizare a unor extracte vegetale ca ingrediente naturali pentru alimente care contribuie la terapia în sindromul metabolic, la biotehnologia de modificare a expresiei unor gene care modulează nivelul speciilor reactive ale oxigenului, la identificarea unor markeri genetici în sindromul metabolic.

PARTEA I

STADIUL ACTUAL AL CUNOȘTINȚELOR ÎN DOMENIU

I.1. Contribuția speciilor reactive ale oxigenului la stresul oxidativ

I.1.1. Speciile reactive ale oxigenului

Speciile reactive ale oxigenului (ROS) reprezintă o categorie de specii chimice derivate de la oxigen în procesul normal al respirației celulare. Din această categorie fac parte radicalul superoxid ($O_2^{\cdot-}$), radicalul hidroxil (HO^{\cdot}) precum și alte specii ROS care nu sunt radicali liberi în adevăratul sens al cuvântului dar au proprietăți oxidative ce contribuie la stresul oxidativ, așa cum sunt apa oxigenată (H_2O_2) și acidul hipocloros ($HOCl$). Principalele specii reactive ale oxigenului sunt prezentate în fig.1.

$O \cdot - O \cdot$	oxigenul triplet (atmosferic)
$O - O \cdot$	oxigenul singlet
$O \cdot - O \cdot$	anionul superoxid
$O \cdot - O \cdot H$	radicalul hidroperoxid
$H \cdot O - O \cdot H$	apa oxigenată
$H \cdot O \cdot$	radicalul hidroxil
$H \cdot O \cdot$	ionul hidroxil

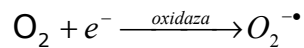
Fig. 1. Specii reactive ale oxigenului (ROS)

Există specii reactive care se formează în urma acțiunii speciilor reactive asupra moleculelor biologice așa cum sunt radicali lipidici (LOO^{\cdot}) care fac parte din categoria ROS și specii reactive cu azot (RNS) printre care se numără și peroxinitritul ($ONOO^{\cdot}$). Atât ROS cât și RNS sunt implicate în diferite procese la nivel celular: reacții catalitice, transportul de electroni mitocondrial, transmiterea semnalelor și expresia genică, activarea factorilor de transcripție nucleari, modificarea oxidativă a moleculelor, celulelor și a țesuturilor, acțiunea antimicrobiană a neutrofilelor și macrofagelor, precum și în procesul de îmbătrânire al organismului. Datorită reactivității lor foarte mari, aceste specii constituie un punct de interes al cercetărilor actuale privind diverse condiții fiziologice și fiziopatologice. Implicarea acestor specii în disfuncția endotelială face ca acestea să fie un punct de interes și în cadrul temei de față. Dintre speciile reactive ale

oxigenului cele mai importante din punct de vedere al reactivității cu moleculele biologice sunt: anionul superoxid, apa oxigenată și radicalul hidroxid.

I.1.1.1. Radicalul superoxid ($O_2^{\cdot-}$)

$O_2^{\cdot-}$ ia naștere prin reducerea incompletă a oxigenului molecular cu un electron, fiind generați prin acțiunea numeroaselor oxidaze.



Structura electronică a moleculei de O_2 este redată în fig.2 și constă în existența a doi orbitali monoelectronici de tip π^* care fac din molecula de oxigen un biradical stabil cu proprietăți paramagnetice. Molecula de oxigen poate fi redusă prin acceptarea pe rând a câte unui electron în orbitalii de tip π^* ; molecula reacționează mai greu cu moleculele de substrat organic (RH) și mai rapid cu speciile radicalice:

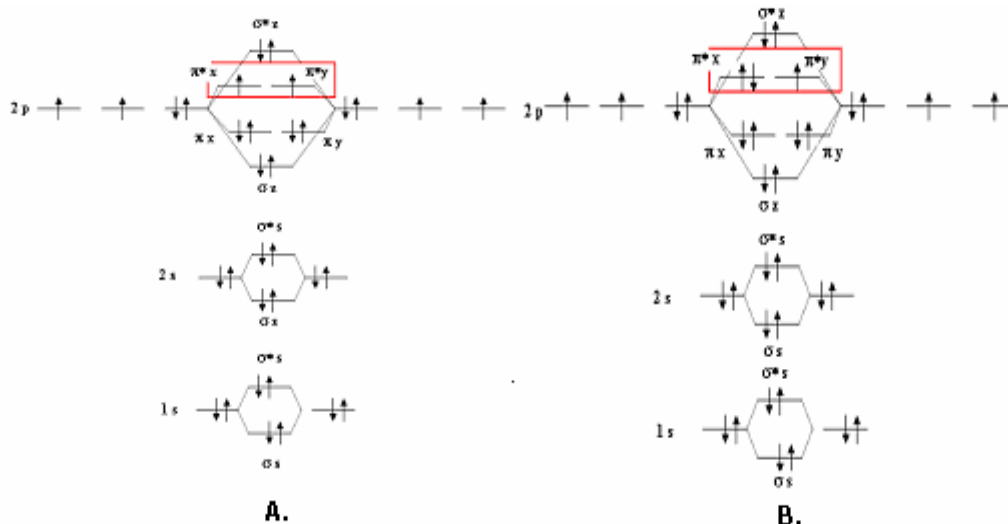
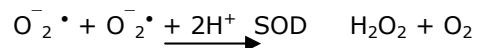
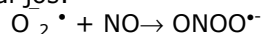


Fig. 2. Structura electronică: A. Molecula de O_2 și B. Anionul superoxid

$O_2^{\cdot-}$ este un radical liber încărcat negativ ce participă la reacții chimice cu componente ale sistemelor biologice. Anionul superoxid reacționează cu el însuși cu o viteză constantă de 8×10^4 mol/s pentru a forma H_2O_2 și O_2 [1]. Enzimele din familia superoxid dismutazei (SOD) au rolul de a accelera eliminarea $O_2^{\cdot-}$; ca urmare, viteza de reacție crește la 2×10^9 mol/s pentru reacția :

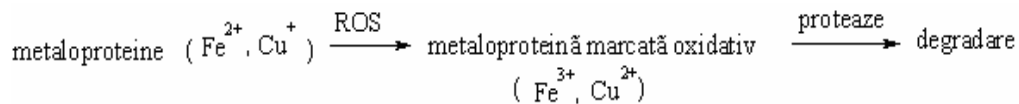


Membrana celulară nu prezintă permeabilitate pentru $O_2^{\cdot-}$. Prin urmare, acesta va acționa doar la nivelul compartimentului unde este generat [2]. $O_2^{\cdot-}$ poate acționa și ca agent reducător, cedând electronul în plus pentru a forma $ONOO^{\cdot-}$ cu NO conform ecuației chimice de mai jos:



$O_2^{\cdot-}$ reacționează cu NO cu o viteză mult mai mare decât cea a reacției de dismutație, dar, în condiții fiziologice, concentrația NO fiind mică, Anionul superoxid ($O_2^{\cdot-}$) va forma H_2O_2 în urma acțiunii enzimelor SOD. Apa oxigenată este mai puțin reactivă decât radicalul peroxinitrit ce rezultă din reacția $O_2^{\cdot-}$ cu NO ($ONOO^{\cdot-}$). În felul acesta, concentrații fiziologice de NO produs de eNOS sau prin intervenții terapeutice exercită un efect antioxidant în prezența unor cantități normale, fiziologice de SOD. [1]

$O_2^{\cdot-}$ reacționează cu proteinele Fe-S de la nivelul lanțului respirator participând fie la inhibarea funcției mitocondriale fie la procesele de semnalizare celulară prin intermediul ionilor de fier. Oxidarea proteinelor catalizată de metale poate duce la alterarea stabilității anumitor proteine de către speciile ROS prin oxidarea metalelor care sunt legate de metaloenzime. Proteinele astfel marcate devin astfel mai sensibile la degradarea proteolitică [3,4].



$O_2^{\cdot-}$ reacționează cu agenți vasoactivi precum catecolaminele norepinefrină și epinefrină, inactivându-le prin inhibarea interacțiunii cu receptorii adrenergici.

I.1.1.2. Apa oxigenată (H_2O_2)

H_2O_2 este o moleculă fără încărcătură electrică ce poate difuza liber prin membrana celulară și între celule. Datorită faptului că este o moleculă difuzibilă și stabilă, iar producția și înlăturarea ei sunt reglate strict, H_2O_2 este un candidat sigur la familia mesagerilor secunzi [1,5] în multiple mecanisme de semnalizare. Datorită capacității sale de a reacționa cu proteinele, apa oxigenată contribuie la alterarea structurii unor proteine cheie în diverse căi de semnalizare celulară. Reacțiile chimice ale apei oxigenate cu proteinele sunt centrate pe modificarea resturilor de cisteină din structura proteinelor:

a) Modificarea oxidativă a resturilor de cisteină ale proteinelor.

Gruparea -SH a restului de cisteină poate fi transformată prin oxidare în grupare sulfenică (-SOH), sulfinică (-SO₂H), sulfonică (-SO₃H) sau S-glutationilată (-SSG) după cum este redat în reacțiile următoare:

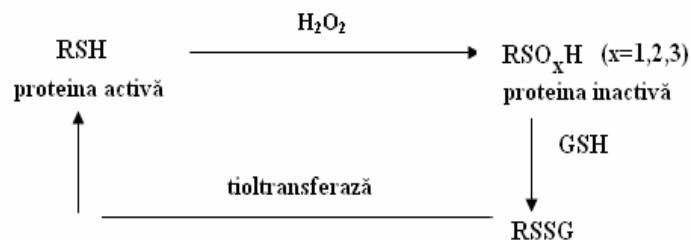


Fig. 3. Oxidarea resturilor de cisteină ale proteinelor

Dacă restul de cisteină este poziționat în domeniul catalitic sau în domeniul de legare ADN atunci activitatea proteinei respective este afectată.

b) Formarea punților de sulf intramoleculare afectează conformația proteinei respective după cum se poate vedea în figura de mai jos:

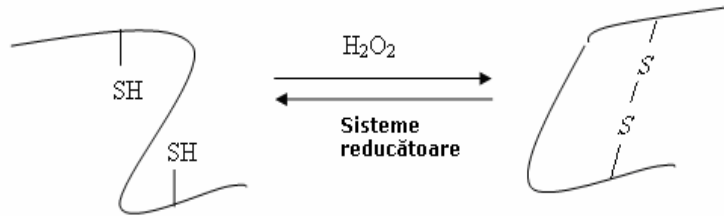


Fig. 4. Formarea punților de sulf intramoleculare

c) **Dimerizarea proteinelor prin formarea punților de sulf intermoleculare** poate avea loc prin formarea punții disulfidice între două resturi de cisteină de la două molecule identice sau diferite de proteină.

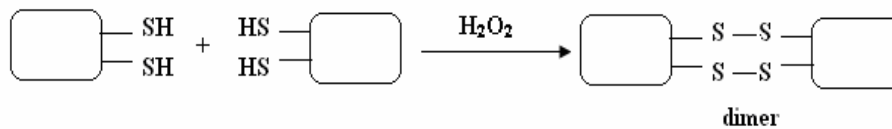
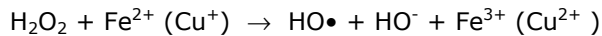


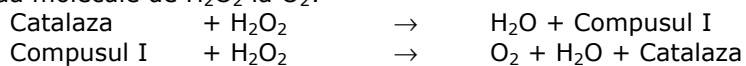
Fig.5. Dimerizarea proteinelor prin formarea punților de sulf intermoleculare

Apa oxigenată, ca și anionul superoxid, participă la alterarea stabilității anumitor proteine prin oxidarea metalelor care sunt legate de metaloenzime. Spre exemplu centrele Fe-S ale proteinelor reglatoare ale fierului din organism pot fi oxidate de către ROS prin mecanisme asemănătoare reacției FENTON [1,6]:

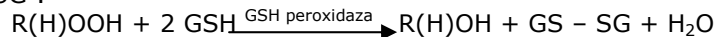


Înlăturarea H_2O_2 este reglată în principal de două enzime importante: catalaza (CAT) și glutatioperoxidaza (GPX).

a. Catalaza metabolizează H_2O_2 dar nu și peroxizii lipidici (produși ai H_2O_2 cu lipide), inițial prin reducerea H_2O_2 la H_2O ca rezultat al cedării a doi electroni din Fe hemic, formând un intermediar hemic foarte oxidant, Compusul I. [1] Hemul compusului I al catalazei este apoi redus la forma inițială de hem feric prin oxidarea unei a doua molecule de H_2O_2 la O_2 :



b. Glutatioperoxidaza metabolizează H_2O_2 și alți peroxizi biologici prin reducerea lor cu ajutorul electronilor proveniți din oxidarea glutationului (GSH) la forma sa disulfidică GS - SG :

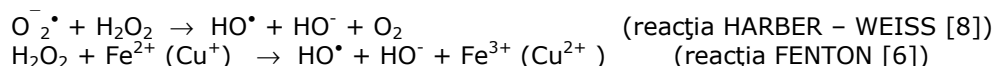


Enzima conține un aminoacid rar, selenocisteina.

I.1.1.3. Radicalul hidroxil

Radicalul hidroxil este produs ca rezultat al radiațiilor ionizante și reprezintă cel mai activ mutagen produs de radiațiile ionizante. Radicalii hidroxil denaturează proteinele, acizii nucleici și acizii grași din lipidele membranare. Există numeroase evidențe care sugerează că reacția peroxizilor cu Fe^{2+} legat de proteine sau de molecule cu mase moleculare mici are ca rezultat obținerea radicalului $\text{HO}\bullet$ cu

reactivitate mare, capabili să participe în procesele de semnalizare oxidând selectiv anumite molecule cheie în procesele de semnalizare [1,7]:



Componentele celulare țintă ale radicalului hidroxil, sunt: ADN-ul, proteinele și lipidele (lipoproteinele cu densitate mică). La nivelul ADN reacțiile anionului hidroxil au loc la resturile de deoxiriboză și la bazele azotate din structura ADN.

A. Acțiunea HO[•] asupra ADN-ului

- a) Acțiunea asupra deoxiribozei are loc prin atacul radicalului HO[•] la C₄ al deoxiribozei cu ruperea legăturii C₄-C₃, urmată de ruperea legăturii între baza azotată și restul de riboză :

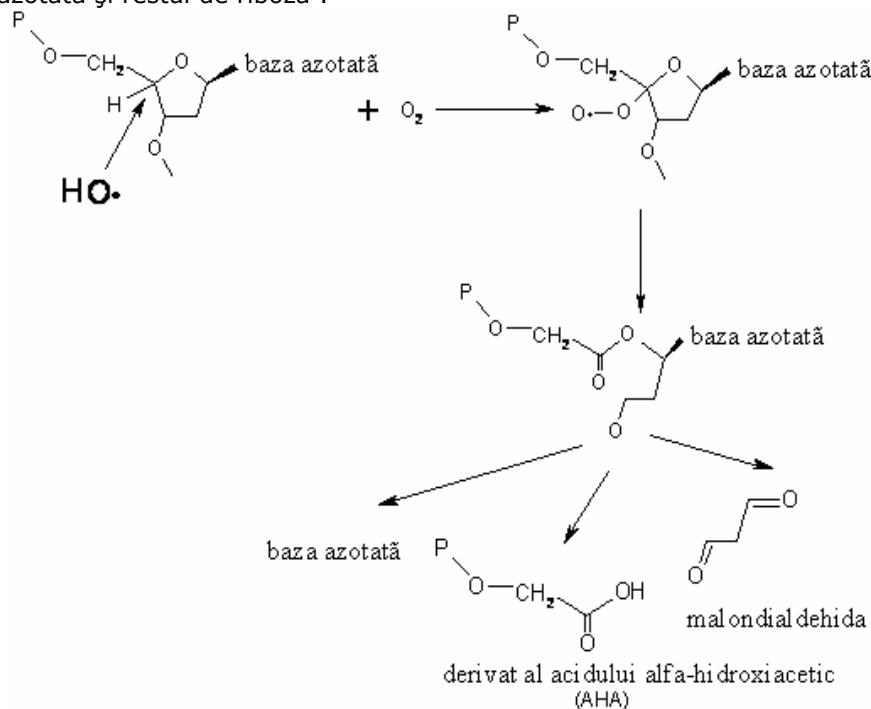


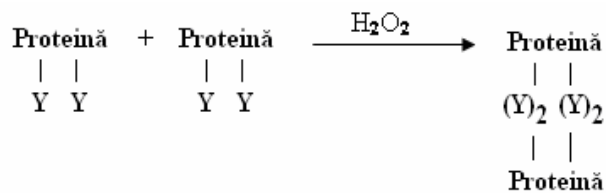
Fig. 6. Acțiunea HO[•] asupra deoxiribozei din structura ADN

- b) Acțiunea asupra bazelor azotate se manifestă prin modificarea oxidativă a acestora. ADN-ul mitocondrial este mai susceptibil la oxidare decât ADN-ul nuclear. Mitocondria reprezintă ținta majoră de acțiune a speciilor reactive ale oxigenului în țesuturile îmbătrânite. Există o corelație inversă între ADN-ul mitocondrial oxidat și durata de viață a unui organism, în timp ce această corelație nu se observă la ADN-ul nuclear. ADN-ul nuclear este protejat de stresul oxidativ prin legarea de proteine de tip histonă, iar leziunile ADN sunt reparate de enzime specifice ce acționează permanent (atât proteinele de tip histonă cât și enzimele reparatorii lipsesc mitocondriilor). Creșterea vitezei de deteriorare a ADN și

reducerea capacității de reparare a ADN-ului pot accelera viteza procesului de îmbătrânire, scăzând astfel durata vieții.

B. Acțiunea HO[•] asupra proteinelor

Se modifică preferențial catenele laterale ale resturilor următorilor aminoacizi : metionina, valina, histidina, arginina, lizina, fenilalanina, tirozina, cisteina (vezi fig.7). Oxidarea resturilor de tirozină (Y) duce la formarea de ditirozină. Acest lucru permite legarea încrucișată a moleculelor de proteină între ele pentru a forma dimeri, oligomeri sau chiar polimeri așa cum este redat în reacția de mai jos:



La nivelul întregii proteine se produce o creștere a susceptibilității la proteoliză (schimbarea conformației facilitează acțiunea proteazelor).

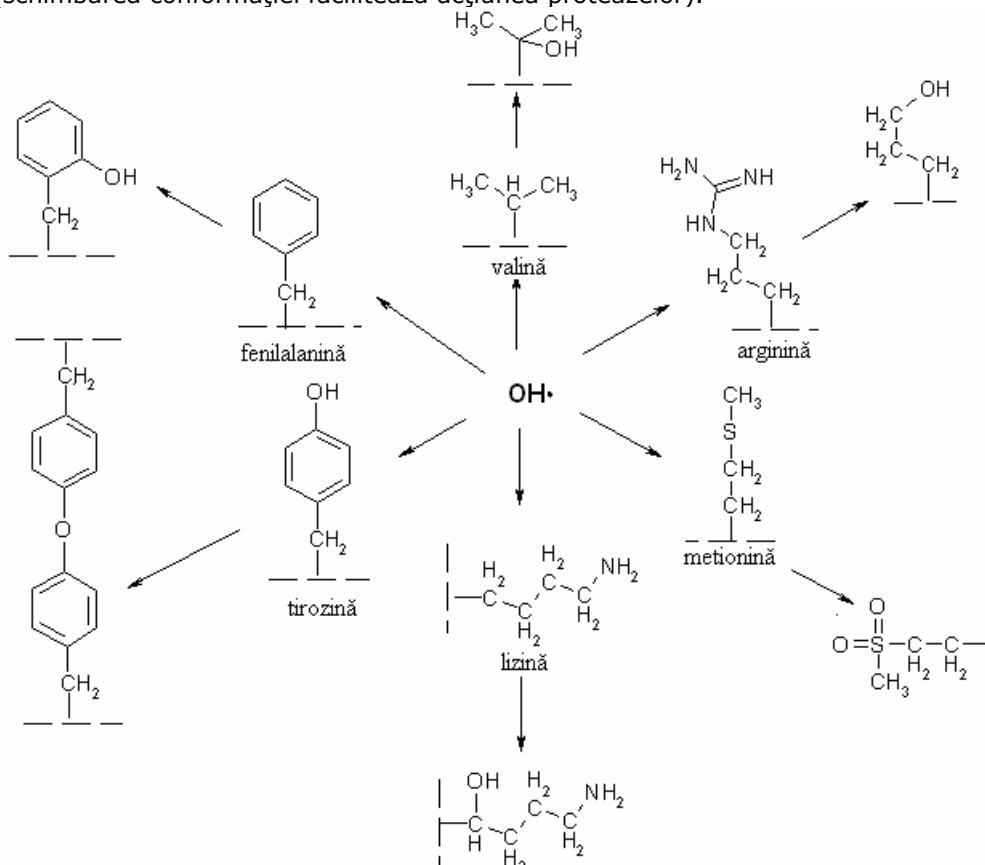
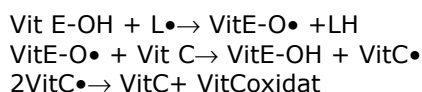


Fig. 7. Acțiunea HO[•] asupra resturilor de aminoacizi din structura proteinelor

C. Acțiunea HO• asupra lipidelor

O țintă majoră a atacului ROS sunt lipidele membranare, datorită prezenței dublelor legături în structura acizilor grași polinesaturați (în structura fosfolipidelor membranare, acizii grași polinesaturați cei mai frecvent întâlniți sunt: acidul linoleic, acidul linolenic și acidul arahidonic). Reacțiile radicalice ale acestor procese cuprind: etapa de inițiere (formarea de peroxizi), etapa de propagare (amplificarea oxidării acizilor grași sub acțiunea peroxizilor), întreruperea propagării lanțului de reacții radicalice prin neutralizarea radicalilor liberi formați procesul are loc în prezența vitaminei E, care acționează ca agent reducător. Ulterior, forma oxidată a vitaminei E se refacă în prezența vitaminei C :



Consecințele oxidării lipidelor membranare sunt: reducerea fluidității și modificarea permeabilității membranei celulare și în final dezorganizarea membranei celulare. Acțiunea radicalilor liberi asupra lipidelor se constituie ca un factor important în etiopatogenia unor afecțiuni cardiovasculare ca: ateroscleroza, hipertensiunea arterială, neoxigenarea post-ischemică. În cazul acestor patologii, un indicator important este gradul de oxidare al fracțiunii lipoproteice circulante LDL.

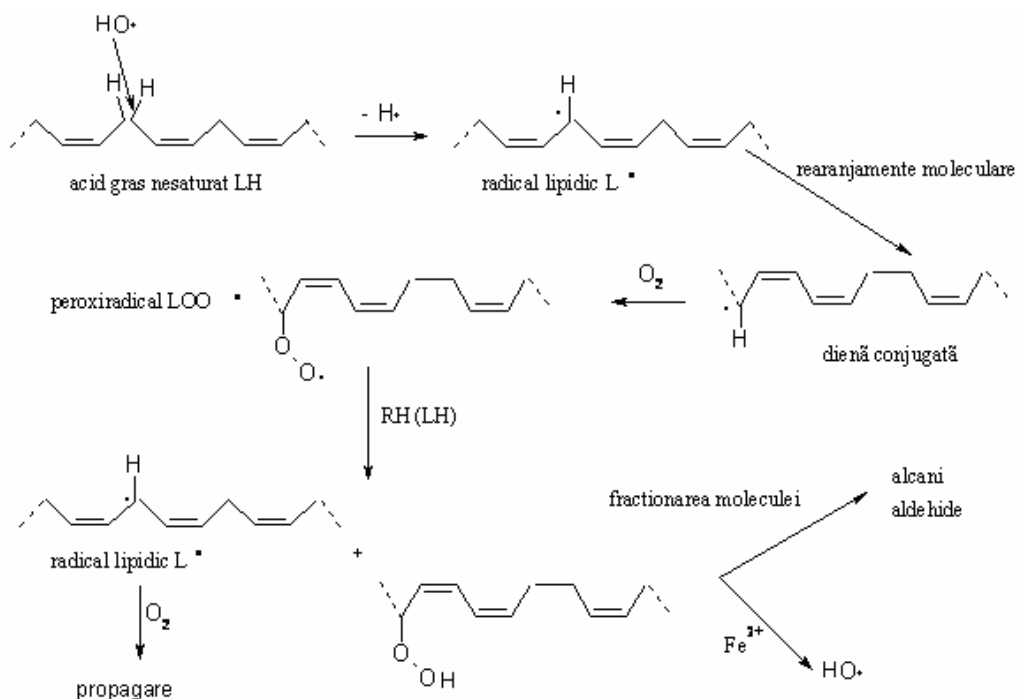


Fig. 8. Acțiunea HO• asupra lipidelor

Neutralizarea HO• la nivel celular se realizează prin reducerea mono-electronică a acestuia, reacție catalizată de complexul citocromoxidază. Din cauza afinității mari pentru substrat, a reactivității și a specificității radicalului hidroxil, mecanismele

fiziologice defensive ale organismului nu sunt eficiente; organismul nu a fost pregătit pentru un atac din partea acestor radicali, ci doar la un atac din partea precursorilor lui, radicalul superoxid și apa oxigenată. Ca apărare, organismul blochează ionii de fier și cupru necesari pentru sinteza radicalilor hidroxil în complexe proteice cu rol de transport sau de stocare. Stresul oxidativ mobilizează însă ionii metalici din complexe în care se găsesc, creând astfel condiții pentru sinteza acestui radical.

I.1.2. Mecanisme de generare a speciilor reactive ale oxigenului în organism

Alterarea transportului electronilor în mitocondrie este prima cauză a creșterii stresului oxidativ. Acest lucru se întâmplă în procesul de îmbătrânire și în situațiile de ischemie-reperfuzie. O sursă importantă de ROS este reprezentată de activarea leucocitelor. Pe lângă acestea, multe studii epidemiologice au demonstrat faptul că homocisteina este un factor de risc independent pentru infarctul miocardic, accidentul vascular cerebral și decesul de cauză coronariană. Unul dintre mecanismele prin care homocisteina poate declanșa apariția aterosclerozei este efectul său citotoxic direct asupra celulelor endoteliale, parțial legat de formarea radicalilor liberi atunci când homocisteina redusă este oxidată de către fier.

Atât factorii de mediu cât și stilul de viață pot cauza creșterea nivelului stresului oxidativ în organism. Acești factori sunt: expunerea prelungită la soare, expunerea la radiații; contactul cu agenți carcinogeni (de exemplu, azbestul); fumatul; medicație contraceptivă; exerciții fizice excesive sau incorect executate; consum excesiv de alcool; stres intelectual; șoc termic; poluarea; agenții infecțioși, etc. Dieta dezechilibrată reprezintă un factor major de stres oxidativ. Fructele și legumele sunt principalii constituenți ai rației alimentare care conțin antioxidanți, fiind bogate în vitamine (A, C, E), oligoelemente și polifenoli. În contrast, consumul regulat de alimente tip fast-food, în special la persoanele tinere, aduce un aport scăzut de substanțe antioxidante.

Oxigenul atmosferic este sursa majoră de specii reactive ale oxigenului. Acesta se găsește sub formă de oxigen triplet (prescurtat $3O_2$). Dacă oxigenul triplet (fig.9A) absoarbe suficientă energie din mediu, el se va transforma în oxigen singlet (fig 9 B sau C) care este foarte reactiv.

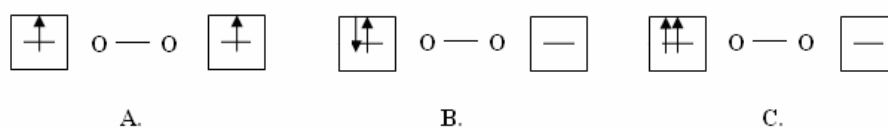
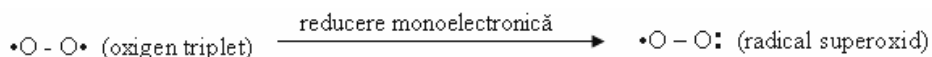
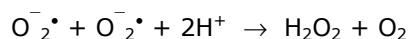


Fig. 9. Reprezentarea repartizării electronilor pe orbitalii π^* ai oxigenului triplet (A) și singlet (B și C)

Radicalul superoxid ($O_2^{\bullet -}$) poate fi obținut din oxigenul triplet prin acceptarea unui electron. Acest proces de acceptare a unui electron poartă numele de reducere monovalentă. Rezultatul reducerii monovalente a oxigenului triplet este radicalul superoxid ce prezintă o încărcătură negativă.



Apa oxigenată (H_2O_2) este produsă în special din radicalul superoxid prin reducere monovalentă:



Prin această reducere ia naștere ionul peroxid (O_2^{-2}) având o încărcătură negativă dar care în sistemele biologice este neutralizată de către doi protoni formând apa oxigenată (H_2O_2)

Această reacție se poate desfășura fără a fi nevoie de prezența unui catalizator, dar dacă se desfășoară în prezența catalizatorului SOD reacția se desfășoară de 10^5 ori mai repede [1].

Teoretic toate tipurile de celule din sistemul cardiovascular produc $O_2^{\cdot-}$ și H_2O_2 , dar se pare ca anumite structuri din sistemul cardiovascular au un rol preponderent [9]. Dacă până acum se știa ca neutrofilele și macrofagele produc ROS în procesul de digestie al microorganismelor patogene, în urma cercetărilor recente s-a descoperit că și fibroblaștii, celulele endoteliale, celule musculare netede și cardiomiocitele produc ROS [10-13]. Sursele de ROS cuprind lanțul respirator mitocondrial, NAD(P)H oxidaza, NO sintetaza, ciclooxygenaza, xantinoxidaza localizarea acestor surse de ROS fiind diferită (tabel 1).

Tabel 1 Surse celulare de radicali liberi

Surse	Localizare
Lipooxygenaza, ciclooxigenaza, NADPH oxidaza	Membrana celulară
Transportul electronilor în catena respiratorie	mitocondrie
Xantinoxidaza, hemoglobina, catecolamine, riboflavina, metale tranzitionale ($Fe^{2+/3+}$; $Cu^{+/2+}$)	citosol
Oxidaze, flavoproteine	peroxizomi
Citocrom p450 și b5	Reticulul endoplasmatic

▪ Lanțul respirator mitocondrial

Mitocondria produce ROS prin transferul unui electron în cadrul lanțului respirator. În condiții fiziologice normale, mici cantități de ROS se formează prin respirația celulară și sunt detoxificate prin mecanismele de apărare locale. Figura 10 redă modul de formare a speciilor reactive ale oxigenului în cadrul desfășurării lanțului respirator.

Formarea $O_2^{\cdot-}$ se realizează printr-o disfuncție la nivelul complexului mitocondrial I, la care se asociază și o disfuncție a complexului III [12,14]. Această disfuncție constă în scăderea activității enzimelor din complexul I mitocondrial ce duce la un blocaj al transportului electronilor și o producție crescută de $O_2^{\cdot-}$.

▪ NAD(P)H oxidaza

Cercetări recente au arătat ca NAD(P)H oxidaza este o sursă majoră de radical superoxid în celulele vasculare și miocite. Enzima prezintă diferențe de structură în funcție de localizarea ei, precum și capacitate diferită de a produce ROS. Această enzimă multicomponent catalizează reducerea O_2 la $O_2^{\cdot-}$ prin transferul unui electron de la NADPH la O_2 (aflat în afara membranei plasmatică). NAD(P)H oxidaza fagocitară este alcătuită din 2 subunități membranare care conțin situsuri flavoproteice și hem, iar în timpul activării celulare se generează o NAD(P)H oxidază foarte activă ce produce cantități mari de $O_2^{\cdot-}$ la nivelul suprafeței externe a

membranei plasmatică. În timpul procesului de fagocitoză, membrana plasmatică este internalizată așa încât membrana externă este orientată către interior direcționând anionii superoxid și metaboliții săi reactivi către interior pentru distrugerea localizată a microbilor [15]. Multe din subunitățile NAD(P)H oxidazei leucocitare se regăsesc în NAD(P)H oxidaza din celulele vasculare, dar capacitatea enzimei reprezintă doar o treime din cea a neutrofilelor [16]: $O_2^{\cdot -}$ este produs în decurs de minute-ore în celulele endoteliale, miocite vasculare și fibroblaști în timp ce în neutrofile este eliberat aproape instantaneu [17,18]

Activitatea NAD(P)H oxidazei este reglată de citokine, hormoni și forțe mecanice care sunt implicate și în patogeneza bolilor cardiovasculare. Stimularea miocitelor vasculare cu Angiotensina II, trombina, factorul de creștere plachetar-PDGF (Platelet-derived growth factor), TNF- α (Tumor necrosis factor), lactozilceramida crește producția de ROS prin creșterea activității NAD(P)H oxidazei [19-23].

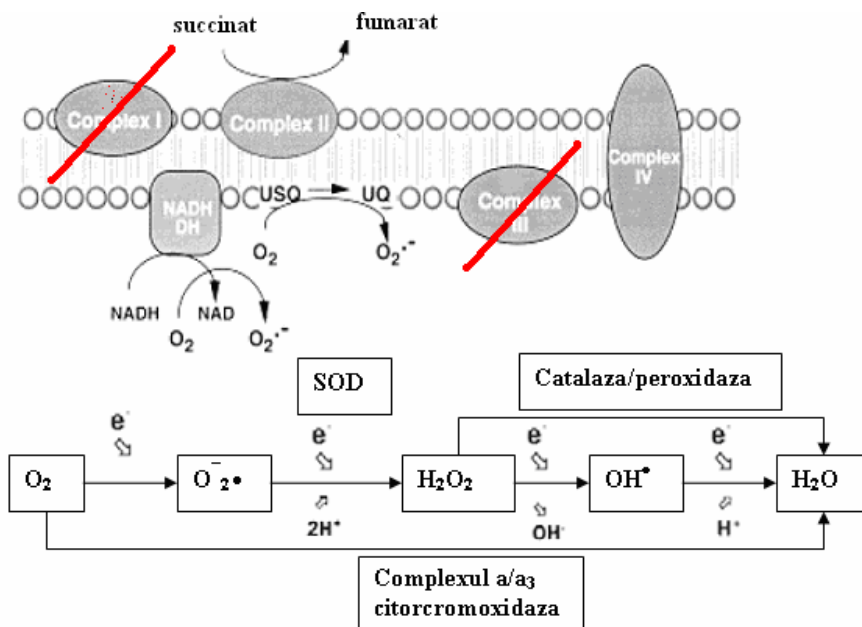


Fig. 10. Modul de formare a speciilor reactive ale oxigenului de oxigen în cadrul desfășurării lanțului respirator

▪ Xantinoxidaza

Xantinoxidaza este o enzimă cu molibden ce oxidează bazele azotate din acizii nucleici la acid uric și apă oxigenată. Este prezentă atât în plasmă cât și legată de glicozaminoglicani în peretele arterial și folosește O_2 pentru a da naștere atât la $O_2^{\cdot -}$ cât și H_2O_2 . În celulele endoteliale activitatea xantinoxidazei este sporită de INF- γ (interferon-gamma) [10, 24]. Studii recente au aratat că în cazul insuficienței de molibden această enzimă nu mai utilizează xantina ca și substrat, dar poate utiliza NADH ca donator de electroni pentru a forma anionul superoxid. În aceste condiții, enzima nu poate fi inhibată de oxipurinol [25].

▪ eNOS (nitric oxid sintetaza endoteliala)

Sintetaza eNOS, localizată la nivelul caveolelor membranare, este o enzimă ce catalizează sinteza de NO (fig.11). Enzima necesita prezența tetrahidropterinei care se leagă la în apropierea grupării prostetice hem pentru a transfera electronii către

L-arginină și a produce NO. Absența substratului L-arginină și al bipterinei (BH₄) duce la producția de O₂^{•-} și H₂O₂ [26-28].

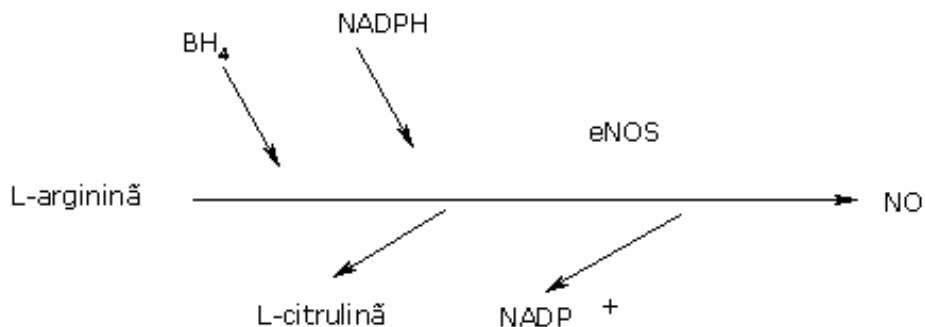


Fig.11. Producția de NO catalizată de eNOS

Acetilcolina, serotonina, trombina, bradikina și stresul mecanic favorizează legarea ionilor de calciu de calmodulină reducând interacțiunile calmodulină-caveolină-1 care inhibă activitatea eNOS și stimulează astfel producția de NO. Dimetilarginina asimetrică (ADMA) și alți analogi de L-arginină sunt inhibitor al producției de NO; nivelul ridicat al ADMA este asociat cu disfuncția endotelială și ateroscleroza [29].

▪ Ciclooxygenaza (COX)

COX este o sursă suplimentară de anion superoxid în timpul sintezei prostaglandinelor (PGs) sau a metabolizării peroxizilor datorită capacității sale de a cooxida NAD(P)H [30]. O₂^{•-} poate fi produs în prezența O₂ prin autooxidarea unor molecule cum ar fi gliceraldehida, FMNH₂, FADH₂, adrenalina, noradrenalina, dopamina și a moleculelor care conțin grupari tiol, cum ar fi cisteina. La nivelul circulației cerebrale principala sursă de O₂^{•-} este citocrom c oxidaza mitocondrială.

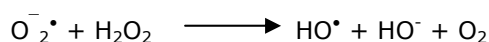
▪ Anticorprii

Legarea anticorpilor la antigenii corespunzător poate genera ROS. Sunt peste 100 de tipuri de anticorpi care generează H₂O₂ în timpul reacției dintre oxigenul singlet (generat de neutrofilele fagocitare în cadrul proceselor oxidative) și apă:



Anticorprii nu produc doar H₂O₂ ci și ozon (O₃). Ozonul este folosit pentru a distruge antigenii, dar în același timp intervine și ca agent declanșator în procesul inflamator. Anticorprii, în prezența oxigenului singlet pot distruge antigenele chiar și în absența celulelor imune sau a altor proteine (cum ar fi proteinele complement).

Radicalul hidroxil (HO[•]) este generat prin interacțiunea O₂^{•-} și H₂O₂ în cursul reacției HARBER – WEISS catalizată de fier (Fe)[8]:



O alta reacție generatoare de HO[•] este reacția FENTON [6]:



I.1.3. Mecanisme de neutralizare a speciilor reactive ale oxigenului

Organismul uman dispune de mai multe sisteme antioxidante capabile să mențină nivelul ROS și RNS în limite fiziologice corespunzătoare pentru funcționarea normală a organismului uman. Aceste sisteme sunt atât endogene cât și sisteme exogene care împreună alcătuiesc un tot unitar integrat de care depinde capacitatea antioxidantă a întregului organism uman (tabelul 2).

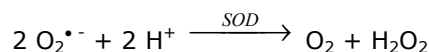
Tabel 2. Sisteme endogene și exogene de neutralizare a speciilor reactive ale oxigenului

Antioxidanții endogeni	Antioxidanții exogeni
<ul style="list-style-type: none"> — NADH și NADPH — Glutacion și tioli — Coenzima Q — Acid uric — Bilirubină — Metaloenzime — Enzimele SOD, GPX, catalază — Proteine care leagă metalele — Metale Se, Cu, Zn 	<ul style="list-style-type: none"> — Vitamina C — Vitamina E — Carotenoizii — Polifenoli și flavonoide — Alți antioxidanți existenți în băuturi și plante aromatice

Acest sistem unitar integrat cuprinde molecule mici de antioxidanți care neutralizează radicalii liberi (acid uric, bilirubină), enzime care catalizează reacții de transformare a radicalilor liberi sau a speciilor reactive în alți compuși ducând la terminarea reacțiilor radicalice în lanț (enzimele SOD, CAT, GPX) și proteine capabile de a forma legături cu metalele tranzitionale fier și cupru, împiedicând astfel participarea acestora ca și catalizatori ai unor reacții de oxidare (ex. ceruloplasmina, metalotioneina, albumina sechestrează cuprul, iar transferina, feritina și mioglobina sechestrează fierul). NADPH / NADH, glutacionul (GSH) și grupările sulfhidril (-SH) ale proteinelor constituie antioxidanți endogeni importanți. Funcționarea unora dintre ei depinde totuși de dietă (sinteza NADPH și NADH necesită niacină, iar GSH necesită sulf). Dieta furnizează de asemenea și vitamina C care are capacitatea de a reacționa cu speciile radicalice ale oxigenului din plasmă și citosol, în timp ce vitamina E și carotenoizii sunt sisteme antioxidante în faza lipidică și oferă protecție acizilor grași nesaturați din membrana celulară. Metale precum Se, Cu și Zn sunt cofactori enzimatici pentru enzimele implicate în neutralizarea ROS (Se este cofactor al glutacion peroxidazei, Cu și Zn al enzimelor SOD)

1. **Superoxid dismutaza (SOD)**

Superoxid dismutaza asigură eliminarea anionului superoxid, prima specie toxică ce se formează din oxigen, reprezentând astfel prima linie de apărare împotriva stresului oxidativ. Pentru a funcționa corect, este necesară prezența unor oligoelemente: cupru și zinc (pentru SOD din citosol) și mangan (pentru SOD din mitocondrii).



Scăderea concentrației SOD se poate datora deficitului de oligoelemente. Absența acestei enzime este incompatibilă cu viața. De asemenea, concentrațiile prea mari

de SOD determină leziuni tisulare datorită producției unei cantități mari de apă oxigenată.

2. Catalaza

Catalaza este o hemoproteină ce catalizează reacția de desfacere a apei oxigenate în oxigen și apă. Este prezentă în toate celulele, în peroxizomi, cu excepția eritrocitelor care nu conțin aceste organite, caz în care ea este o enzimă citoplasmatică. Catalaza are un rol protector asemănător glutatation peroxidazei.



3. Glutatation peroxidaza

Este o enzimă cu localizare citoplasmatică și mitocondrială cu rol de îndepărtare a apei oxigenate din celule prin transformarea ei în apă. Este o selenoproteină, dar nu există o corelație între nivelul seleniului seric și glutatation oxidaza din eritrocite. Acțiunea glutatation peroxidazei este cuplată cu cea a glutatation reductazei cu coenzimă $\text{NADPH} + \text{H}^+$, care reface glutatationul redus.

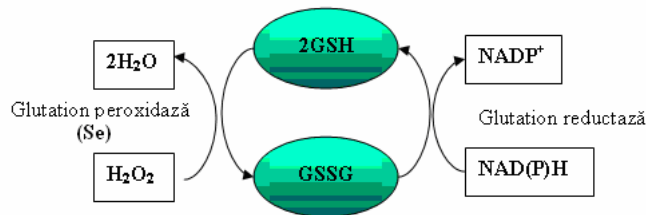
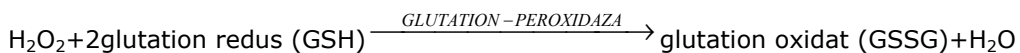


Fig.12. Acțiunea glutatation peroxidazei

Calea pentozofosfaților este o sursă majoră de NAD(P)H , iar GSH reductaza – NADPH dependentă este responsabilă de menținerea GSH în forma sa redusă.

4. NADH

Nivelul de NADH citosolic este determinat de producția acestuia prin acțiunea gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazei și utilizarea acestuia prin funcționarea șuntului mitocondrial și a lactat dehidrogenazei care mențin NADH în forma oxidată NAD^+ la nivelul citosolului [31-33]. În condiții hiperglicemice, o altă sursă de NADH este sorbitolul [33]. La rândul lui, nivelul de NADH controlează producția de anion superoxid la nivelul NAD(P)H oxidazei. Menținerea unui raport ridicat între formele reduse și cele oxidate este de o mare importanță atât pentru capacitatea antioxidantă a acestor sisteme dar și în implicarea acestora în semnalizarea celulară prin modificarea statusului redox intracelular.

5. Tioredoxinele și tioredoxin reductaza

Tioredoxinele sunt enzime cu o activitate antioxidantă intrinsecă și, ca și majoritatea proteinelor, posedă grupări tiol. Ele contribuie la reglarea sistemului imun. O dată oxidate, tioredoxinele sunt reduse de tioredoxin reductază (o enzimă

ce posedă un rest de selenocisteină în situsul său activ). Tioredoxin reductaza intervine de asemenea, în degradarea peroxizilor lipidici și a apei oxigenate și în regenerarea acidului ascorbic de la radicalul ascorbil.

6. Hem oxigenaza (HO)

Sistemul hem-oxigenazic este constituit din trei izoenzime: forma HO-1 inductoare, forma HO-2 constitutivă și forma HO-3. În sistemele biologice HO catalizează conversia hemului la monoxid de carbon, biliverdină și fier. Efectul protector al HO împotriva stresului oxidativ este indirect: o dată formată, biliverdina este convertită la bilirubină ce are o activitate puternică antioxidantă. De asemenea, fierul produs stimulează sinteza de feritină, care are un răspuns antioxidant.

7. Proteinele șocului termic

Proteinele șocului termic formează o familie de proteine chaperone care au rol în stabilizarea, translocția și asamblarea proteinelor. Ele intervin și în repararea modificărilor de structură a proteinelor cauzate de stresul oxidativ. O creștere a nivelului acestor proteine reprezintă un răspuns adaptativ la stresul oxidativ produs de hipo- și hipertermie, acidoză, ischemie-reperfuzie, infecții virale, exerciții fizice, etc.

8. Carotenoizii

Unii carotenoizi ca (de exemplu, β -carotenu) sunt precursorii vitaminei A ce joacă un rol cheie în percepția vizuală. Majoritatea carotenoizilor și vitamina A interacționează cu oxigenul singlet și astfel, previn oxidarea unor substraturi biologice, în special a acizilor grași polinesaturați.

9. Vitamina C

Vitamina C sau acidul ascorbic nu este sintetizat în organismul uman și din această cauză nivelul său plasmatic depinde de dietă și de modificările survenite în fluxul sangvin hepatic. Vitamina C are rolul de a proteja substraturile biologice (proteine, acizi grași, ADN) împotriva oxidării. La concentrații fiziologice, vitamina C previne oxidarea fracțiunii LDL-colesterolului cauzată de ROS (neutrofile activate, celule endoteliale activate). Unele studii arată că o scădere a concentrației vitaminei C sub 4mg/dL crește riscul dezvoltării bolilor cardiovasculare.

10. Vitamina E

Caracterul hidrofob al vitaminei E determină inserarea acesteia printre lipoproteinele și acizii grași din structura membranei celulare, unde joacă un rol protector împotriva peroxidării lipidelor determinată de stresul oxidativ. Toți tocoferolii, în special, tocoferolii α și γ au proprietăți antioxidante.

11. Glutathionul

Glutathionul este un tripeptid format din acid glutamic, cisteină și glicocol. Glutathionul redus (GSH) poate interacționa direct cu speciile reactive ale oxigenului, dar în primul rând servește ca substrat glutathion peroxidazei. GSH se oxidează în prezența speciilor reactive ale oxigenului la GSSG. Un nivel crescut de GSSG are mai multe consecințe din punct de vedere al semnalizării celulare: contribuie la S-tiolarea proteinelor sau la formarea punților disulfidice precum și la creșterea nivelului celular de H_2O_2 :



Nivelul scăzut de GSH s-a demonstrat a fi asociat cu descreșterea capacității de proliferare celulară la celulele endoteliale [34,35] și cu creșterea proliferării fibroblaștilor [36]. Concentrațiile scăzute de GSH determină slăbirea apărării organismului prin mecanisme imune. GSH influențează expresia genelor ce codează unele proteine pro- și antiinflamatorii. GSH este oxidat la GSSG (glutathion oxidat) în cursul stresului oxidativ, iar o evaluare a acestuia se poate face calculând raportul GSH/GSSG (valori normale ale raportului GSH/GSSG: 156-705)

12. Proteinele ce conțin grupări tiol

Majoritatea proteinelor posedă grupări tiol (-SH) care reacționează rapid cu ROS. Deoarece în plasmă există o abundență a acestor proteine (albumina posedă grupări tiol) determinarea cantitativă a acestor proteine este complementară determinării GSH.

13. Acidul uric

Acidul uric reprezintă produsul final de catabolism al purinelor. El posedă proprietăți antioxidante, putând interacționa cu speciile reactive ale oxigenului în special cu radicalul hidroxil. Producții săi de oxidare (de exemplu, alantoina), atunci când sunt oxidați generează specii toxice.

14. Coenzima Q₁₀

Ubichinona sau coenzima Q₁₀ (Co Q₁₀) joacă un rol important în producerea de energie la nivel mitocondrial. Co Q₁₀ redusă (ubichinol-10 sau Co Q₁₀H₂) posedă proprietăți antioxidante. La fel ca și vitamina E, ea inhibă peroxidarea lipidelor. Pe de altă parte, nivelul Co Q₁₀ poate fi un parametru important pentru depistarea subiecților cu risc crescut pentru boala coronariană.

14. Seleniul

Acest oligoelement nu este el însuși antioxidant, dar participă la apărarea organismului împotriva ROS ca și cofactor al enzimei glutathion peroxidaza. Scăderea concentrației serice a seleniului sub 45-50 μg/L se asociază cu apariția bolii coronariene.

15. Cuprul

Cuprul este unul din cofactorii enzimei superoxid dismutaza (SOD). Concentrațiile crescute ale cuprului poate indica o creștere a stresului oxidativ. S-a evidențiat o creștere a cuprului seric în cursul procesului de îmbătrânire.

16. Zincul

La fel ca și cuprul, zincul este și el unul din cofactorii enzimei superoxid dismutaza (SOD). De asemenea, zincul are efect protector asupra grupării tiol din structura proteinelor și poate inhiba parțial reacțiile de producere a ROS. Deficitul de zinc crește sensibilitatea la leziuni produse de stresul oxidativ. Studii efectuate pe persoanele vârstnice cu boli degenerative au pus în evidență un raport Cu/Zn crescut în comparație cu subiecții aparținând aceleiași categorii de vârstă dar fără boli degenerative.

I.1.4. Noțiunea de stres oxidativ

Procesele normale care au loc în organismele aerobe se desfășoară cu producerea de radicali liberi pe baza oxigenului. Chiar viața, așa cum o cunoaștem

noi, este posibilă datorită reactivității oxigenului și a speciilor reactive ale acestuia (ROS). Supraviețuirea organismului în aceste condiții s-a datorat în primul rând dezvoltării, de-a lungul evoluției, a unor mecanisme de protecție împotriva atacului acestor specii, cu funcție reparatorie, și de asemenea sisteme de semnalizare bazate pe ROS și RNS. Organismul uman dispune, la nivel celular, de următoarele mecanisme de protecție: izolarea locurilor în care se generează ROS, inhibarea propagării reacțiilor radicalice, neutralizarea speciilor ROS și repararea leziunilor la nivel celular provocate de ROS. Atunci când producția de ROS depășește capacitatea acestor sisteme de protecție apare stresul oxidativ.

Noțiunea de stres oxidativ se referă la un dezechilibru între producția de specii reactive ale oxigenului și sistemele de apărare antioxidantă, când producția de specii reactive ROS și RNS depășește capacitatea antioxidantă a organismului.

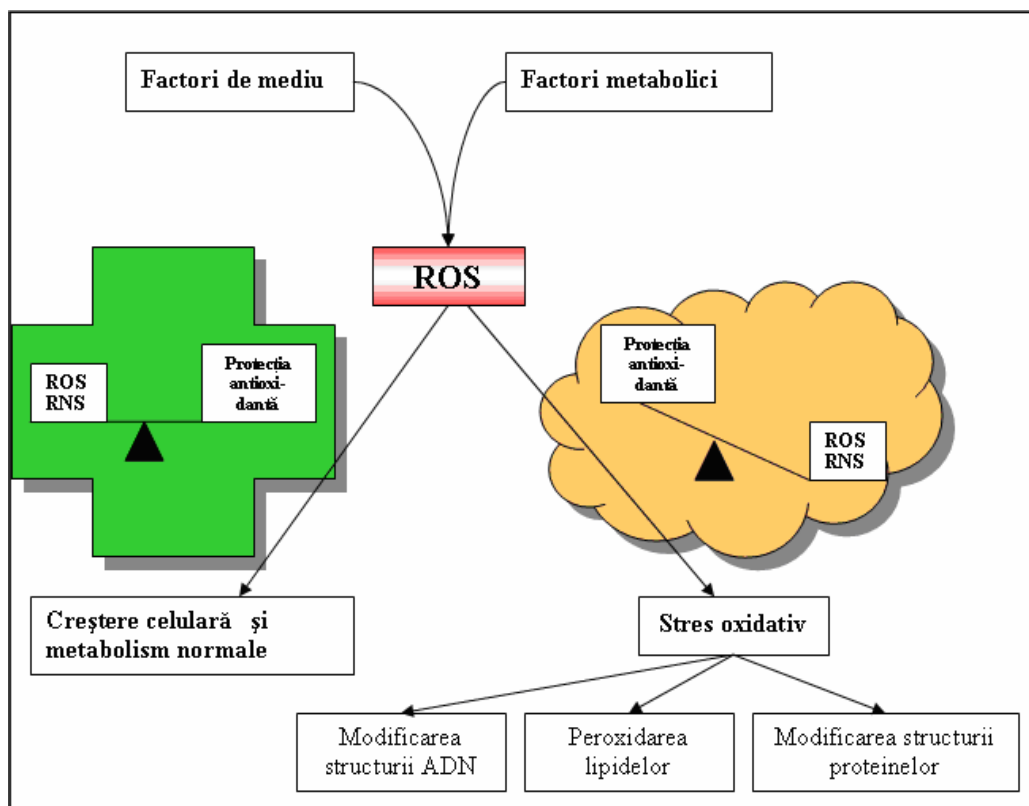


Fig.13 Noțiunea de stres oxidativ

Stresul oxidativ prelungit duce la oxidarea moleculelor biologice: ADN, proteine, carbohidrați și lipide, având drept consecință numeroase boli precum sindromul metabolic, bolile cardiovasculare, cancerul, diabetul sau boli asociate cu îmbătrânirea organismului (ex. cataractă)

I.2. Compuși naturali cu activitate antioxidantă

I.2.1. Vitaminele E

Rolul vitaminei E în organism a fost îndelung studiat după descoperirea vitaminei E în 1922 (Evans și Bishop). Dintre cei opt compuși naturali care se reunesc în această categorie (α -, β -, γ - și δ -tocoferoli și tocotrienoli) cea mai mare activitate biologică o are α -D-tocoferolul [37]. La adulții sănătoși un aport alimentar de vitamina E de 10-30 mg menține nivelul normal de vitamină E. Un nivel plasmatic <0.5 mg/dL se consideră a fi deficiență a vitaminei E [37]. Principalele funcții ale vitaminei E sunt:

- protejarea membranele celulare de atacul speciilor reactive ale oxigenului asigurând integritatea structurală și funcțională a membranelor celulare
- reglarea funcției mitocondriale
- reglarea agregării plachetare prin inhibarea producției de prostaglandine (tromboxani)
- reglarea activității proteinkinazei C
- reglarea metabolismului acizilor nucleici și a proteinelor
- reglează producția hormonală (este vitamina antisterilității)
- stimularea răspunsului imun

Rolul vitaminei E în anumite boli precum cancer, boli cardiovasculare, îmbătrânire prematură a fost intens studiat. În ceea ce privește bolile cardiovasculare, s-a demonstrat la subiecți umani sănătoși că prin acțiunea antioxidantă sinergică a vitaminei E și C se inhibă oxidarea LDL [38]. Cercetările efectuate pe modele animale au arătat că suplimentarea vitaminei E în dietă previne și tratează ateroscleoza [39,40].

Printre factorii ce influențează biodisponibilitatea vitaminei E se numără absorbția intestinală, transportul plasmatic și funcționarea transportului hepatic prin intermediul proteinei de transfer a α -tocoferolului. Eficiența absorbției vitaminei E, chiar și la indivizii sănătoși este de 15-45%. Absorbția intestinală de vitamina E depinde de procesele care duc la digestia grăsimilor care implică acțiunea acizilor biliari și a lipazelor și esterazelor pancreatice [41,42]. Toate formele vitaminei E provenind din dietă sunt absorbite și secretate în mod egal sub formă de chilomicroni, chiar dacă ulterior concentrațiile plasmatice ale anumitor forme sunt mai mici [43]. Diverse studii au demonstrat că absorbția vitaminei E la nivel intestinal interferă cu absorbția colesterolului și a trigliceridelor [44]. În timpul catabolismului chilomicronilor, vitamina E absorbită este transferată proteinelor circulante și o altă parte rămâne în compoziția resturilor chilomicronice. În timpul lipolizei, vitamina E este preluată de HDL și este transferată diverselor lipoproteine circulante prin acțiunea proteinei de transfer PLTP (phospholipid transfer protein) [45]. Vitamina E conținută în resturile chilomicronice ajunge la ficat de unde numai α -RRR- tocoferolul [46-48] și alte forme 2R [49] ale vitaminei E ajung în circulație, ceea ce denotă că nu intestinul ci ficatul discriminează între diversele forme ale vitaminei E existente în dietă. Transportul vitaminei E de la ficat în circulație se face prin intermediul unei proteine de transfer (α -tocoferol transport protein sau α -TTP) care transportă preferențial α -tocoferol. Catabolismul chilomicronilor și secreția preferențială a α -tocoferolului de către ficat cu preluarea acestuia de către VLDL sunt procese mediate de către lipoprotein lipaze [50].

Capacitatea antioxidantă a vitaminei E derivă din structura acesteia. Prin oxidarea la nivelul inelului croman în prezența radicalilor pro-oxidici are loc oxidarea de doi electroni a α -tocoferolului la α -tocoferolchinona (vezi schema de reacții din fig.14). Producții de oxidare ai α -tocoferol există în cantități mici in vivo ceea ce dovedește reducerea radicalului α -tocoferil de către alți agenți antioxidanți.

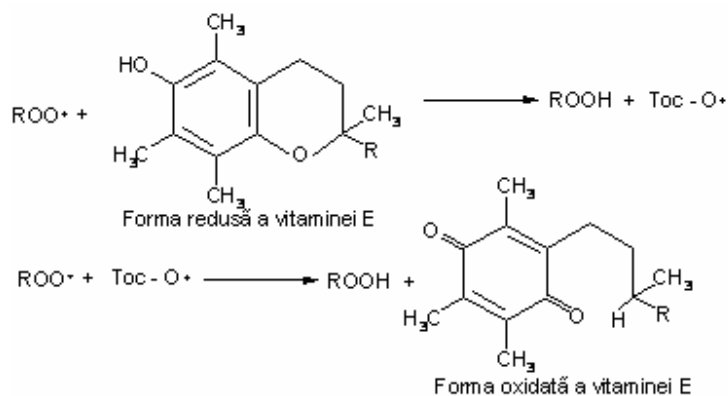


Fig.14. Acțiunea antioxidantă a vitaminei E

Tocotrienolii diferă de tocoferoli la nivelul catenei laterale. Catena laterală lipofilică de tip izoprenic a tocotrienolilor este mai scurtă și mai rigidă comparativ cu restul de fitil existent în cazul tocoferolilor. Inelul de tip croman este prezent și la tocoferoli și la tocotrienoli. Deosebirea dintre izoformele tocoferolilor și tocotrienolilor se datorează substituenților la nucleul croman (vezi fig.15).

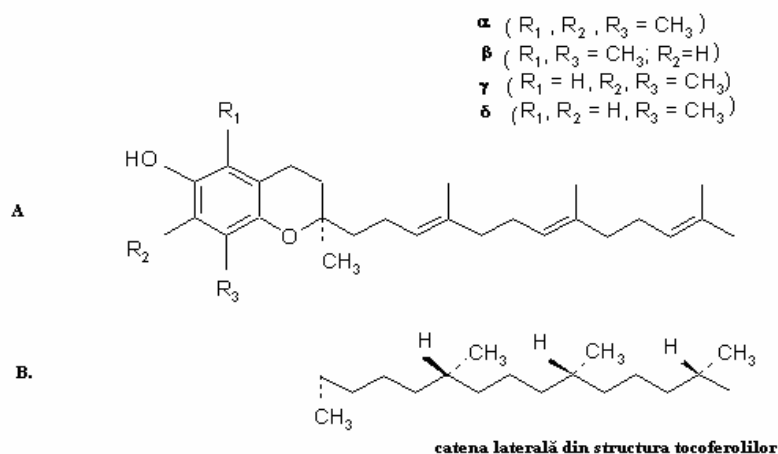


Fig. 15 Structura tocotrienolilor (A) și tocoferolilor (B)

Activitatea α -tocotrienolului în reacția cu radicalii peroxil este de 1.5 ori mai mare în lipozomi comparativ cu cea a α -tocoferolului [51]. Capacitatea antioxidantă mai mare la α -tocotrienol comparativ cu α -tocoferolul se poate explica prin catena laterală mai scurtă și mai rigidă care face ca α -tocotrienolul să fie distribuit mai aproape de suprafața membranei celulare și să aibă astfel o viteză de reciclare mai

mare comparativ cu tocoferolul [52]. Deși eficacitatea tocotrienolilor ca antioxidanți este mare decât a tocoferolilor, preluarea acestora de către țesuturi după ingestia orală este mai mică comparativ cu cea a α -tocoferolului datorită prezenței proteinei de transfer care transferă preferențial α -tocoferolul crescându-i biodisponibilitatea în circulație. În afară de rolul tocotrienolilor ca agenți antioxidanți, tocotrienolii se pare că inhibă sinteza de colesterol. Există studii [53] efectuate pe porc care au aratat că tocotrienolii din dietă au efect protectiv asupra endoteliului, reducând nivelul plasmatic de colesterol, apolipoproteina B, tromboxan B2 și factorul plachetar 4. Rezultatele studiilor pe subiecți umani sunt contradictorii. [54,55].

I.2.2. Vitamina C

Vitamina C (acidul ascorbic) este o vitamină solubilă în apă foarte răspândită în plante. Organismul uman și cel al altor primat nu au abilitatea să sintetizeze vitamina C datorită unor mutații la nivelul genei corespunzătoare L-gulono- γ -lactono-oxidazei care o fac incapabilă de sinteza acestei enzime responsabilă de producerea vitaminei C în organism pe calea acidului glucuronic.

Vitamina C poate participa la reacțiile redox din organism datorită faptului că are capacitatea de a ceda electroni, transformându-se prin oxidare fie în acidul semidehidroascorbic care este un intermediar de tip radicalic instabil, fie în forma mult mai stabilă - acidul dehidroascorbic (DHA). Acidul semidehidroascorbic fiind instabil se poate transforma rapid și reversibil înapoi în acid ascorbic sau poate fi oxidat prin pierderea altui electron la acidul dehidroascorbic. DHA poate fi redus la acidul ascorbic de către glutatation sau prin alte reacții enzimatiche. Dacă nu este redus, DHA duce la hidroliza ireversibilă la acidul 2,3-cetogulonic ce poate fi metabolizat la xiloză, oxalat, xilonat sau lixonat.

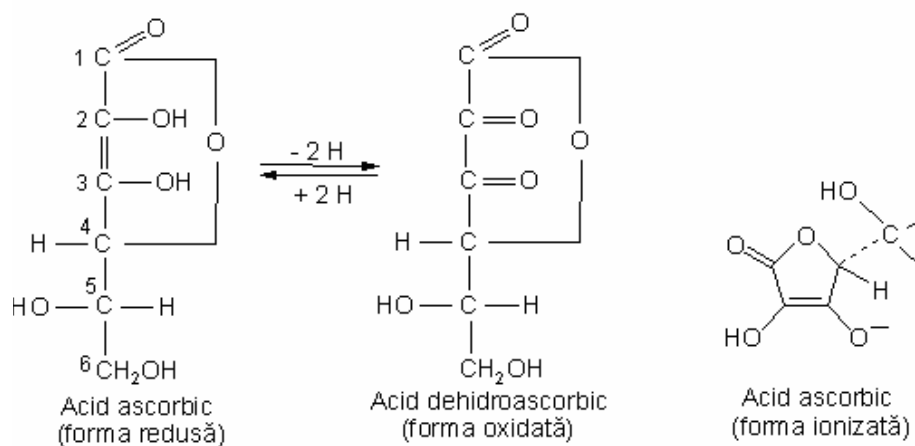


Fig.16. Forma oxidată, redusă și ionizată a acidului ascorbic

Speciile reactive ale oxigenului –ROS, RNS și HOCl pot oxida acidul ascorbic la acid dehidroascorbic iar acest fapt stă la baza capacității antioxidante a vitaminei C. De asemenea vitamina C are capacitate de a se oxida mai mare decât alte molecule de antioxidanți (α -tocoferolul, GSH, acidul uric, β -caroten) și în acest fel acționează în scopul regenerării lor din speciile lor radicalice. În plus radicalul semidehidroascorbic format nu este periculos deoarece este instabil [56] (are durată

de viață de 10^{-5} s). Datorită proprietăților sale, vitamina C funcționează ca antioxidant în celule unde reglează expresia proteinelor (prin reglarea statusului redox), în plasmă inhibă peroxidarea lipidică [57], iar în stomac previne formarea nitriților care sunt agenți mutageni.

În afară de proprietățile sale antioxidante vitamina C este cofactor enzimatic pentru anumite enzime implicate în biosinteza colagenului, carnitinei, norepinefrinei, hormonilor peptidici sau în metabolismul tirozinei.

Vitamina C, datorită proprietăților sale reducătoare contribuie la absorbția fierului în organism prin menținerea sa în forma redusă. S-a demonstrat că o doză de 20-60 mg de vitamina C stimulează absorbția fierului la nivelul intestinului subțire [58,59] și pot îmbunătăți anumiți parametri hematologici pe termen scurt.

Distribuția tisulară a vitaminei C variază destul de mult. Glandele suprarenale și hipofiza au cea mai mare concentrație de vitamina C (30-400 mg/100 g de țesut). Ficatul, splina, pancreasul, rinichiul, creierul conțin cantități cuprinse între 10-50 mg/100 g de țesut [60]. Deoarece masa ficatului este mare, ficatul constituie cel mai mare depozit de vitamina C din organism. Studiile pe animale au arătat că concentrațiile tisulare de vitamina C depind de aportul de vitamina C [60,61] și că anumite organe preiau selectiv vitamina C din circulație [62,63]. Biodisponibilitatea vitaminei C depinde de mai mulți factori: distrugerea acesteia la nivelul tractului intestinal, a mucoasei intestinale, sau la nivelul ficatului, incapacitatea de absorbție a vitaminei C la nivel intestinal datorită legării vitaminei C la altă moleculă și de excreția urinară a vitaminei C.

I.2.3.Carotenoizii

În această categorie de compuși se reunesc aproximativ 600 de compuși fiecare cu particularitățile sale structurale, dar având câteva elemente structurale comune:

- 40 de atomi de carbon.
- inele tip iononic
- catenă laterală poliizoprenică

Catena poliizoprenică, datorită legăturilor duble conjugate ce permit delocalizarea extinsă este responsabilă, în afară de conferirea anumitor particularități structurale și de manifestarea proprietăților de pigmentare, de absorbție radiației UV și reactivitatea chimică a carotenoizilor

Ciclul β -iononic este absolut obligatoriu pentru carotenii care îndeplinesc funcția de provitamine A. Dintre acestea fac parte α -, β -, și γ -carotenii (fig.17) care sunt hidrocarburi și derivații lor oxigenați numiți carotinoide (xantofile). Cel mai important dintre ei este β -carotenul, care conține 2 cicluri β -iononice și din care, în principiu, prin descompunere oxidativă simetrică, rezultă două molecule de vitamina A. α - și γ -Carotenul conțin fiecare câte un ciclu β -iononic și un ciclu α -iononic, respectiv o structură aciclică γ -iononică. Ei vor putea genera în cel mai bun caz doar o moleculă de vitamina A.

Structura carotenoizilor influențează localizarea lor în sistemele biologice. Polaritatea, lungimea și conformația moleculelor respective influențează orientarea carotenoizilor către micelle, lipoproteine și membrane [64,65]. Carotenoizii prezenți în structura membranelor celulare influențează stabilitatea acestora și sensibilitatea membranelor la lezarea oxidativă [66]. Carotenoizii hidrofobi (așa cum este β carotenul) sunt plasați în regiunea centrală a membranelor, în timp ce moleculele xantofile se orientează la suprafața membranelor expunând partea lor polară către exterior unde pot interacționa cu proteinele care le mențin într-o poziție fixă la

nivelul membranei [67] ceea ce conferă membranei rigiditate și rezistență mecanică, precum și posibilitatea apărării acestora de lezarea oxidativă produsă de radiația UV. Orientarea moleculelor de carotenoizi la nivelul membranelor și în exteriorul acestora influențează efectul sinergic al amestecurilor de carotenoizi în apărarea antioxidantă [68].

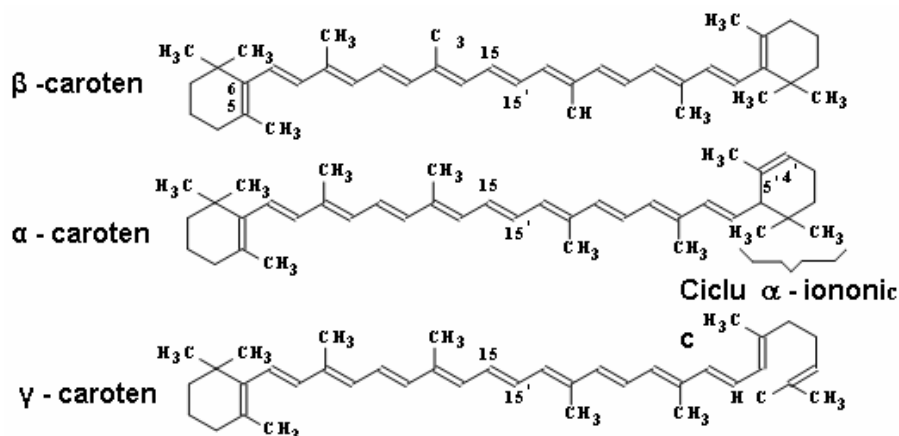


Fig.17. Structura moleculelor de α -, β - și γ -caroten

Datorită structurii ce permite delocalizarea extinsă a electronilor, carotenoizii absorb foarte puternic lumina în domeniul vizibil (400-500 nm), emițând radiația caracteristică pentru culorile galben, portocaliu și roșu [50]. Spectrul de absorbție și maximul de absorbție se folosesc pentru caracterizarea carotenoizilor. Proprietățile de absorbție depind de condițiile de mediu și, în mediul biologic, sunt diferite față de cele din vitro.

Activitatea antioxidantă a carotenoizilor se bazează pe existența dublelor legături conjugate care fac posibilă inhibarea inițierii reacțiilor radicalice prin neutralizarea acțiunii oxigenului singlet și a radicalilor peroxil. Există două modalități de neutralizare a acțiunii oxigenului singlet: pe cale chimică (prin reacție directă cu oxigenul singlet) și pe cale fizică (prin transferul energiei de excitație de la oxigenul singlet la moleculele carotenoizilor). Reacția chimică cu oxigenul singlet este responsabilă de neutralizarea acțiunii a numai 0.05 % din totalul oxigenului singlet neutralizat de carotenoizi [50]; sistemul conjugat al carotenoizilor preia energia emisă de atomii excitați (oxigenul singlet sau alți radicali) transformându-se într-un radical stabil (datorită delocalizării electronilor π). Capacitatea carotenoizilor de a prelua prin transfer energia de excitație de la alte specii (așa cum este oxigenul) și de a o disipa într-o manieră nepericuloasă stă la baza acțiunii carotenoizilor de fotosensibilizare a celulelor la acțiunea luminii. Acest efect de fotosensibilizare are loc numai în condițiile în care catena poliizoprenică a carotenoizilor are cel puțin 8 duble legături conjugate [69,70] iar molecula de carotenoid este orientată către o altă moleculă (proteină) pentru un transfer optim de energie.

Particularitățile structurale ale carotenoizilor precum deschiderea nucleului β -iononic, prezența substituenților la nucleul β -iononic, înlocuirea nucleului β -iononic cu alte grupări funcționale influențează activitatea antioxidantă a acestora [71,72] și de asemenea există diferențiale activităților antioxidante între formele cis- și trans- [73,74]. Prezența unei grupări ceto la nucleul β -iononic crește capacitatea antioxidantă a carotenoizilor respectivi. Sunt dovezi care arată că β -carotenul este implicat în mecanismul de regenerare a α -tocoferolului la nivelul ficatului [75] ceea

[82,83]. După acțiunea lipoproteinlipazelor asupra chilomicronilor, resturile chilomicronice ajung la ficat unde carotenoizii se acumulează. De la ficat la țesuturi transportul carotenoizilor se face prin intermediul VLDL și mai ales LDL.

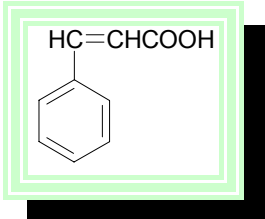
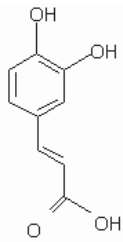
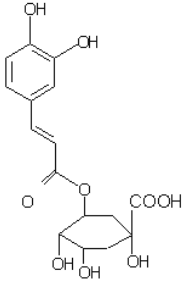
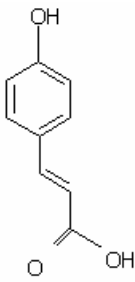
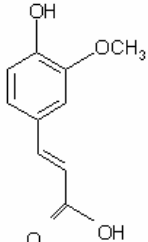
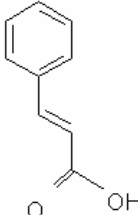
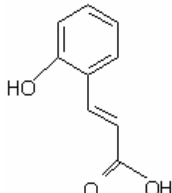
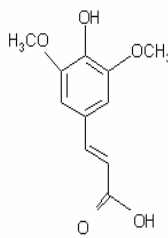
Dintre țesuturi cele mai mari depozite de carotenoizi sunt în ficat și țesutul adipos [84], dar sunt prezente în multe alte țesuturi: pancreas, rinichi, plămâni, glandele medulosuprenale, testicule și ovare, splină, inimă, tiroidă și ochi. La nivel plasmatic, cantitatea de carotenoizi depinde de dietă, de mecanismele de absorbție și metabolismul carotenoizilor [85].

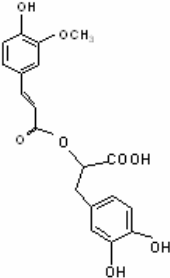
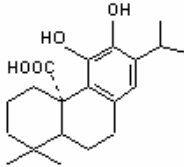
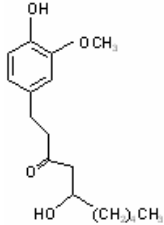
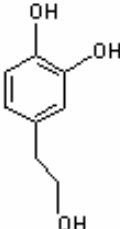
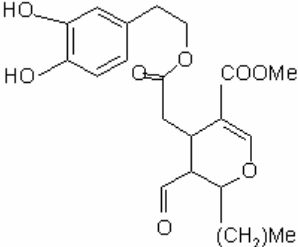
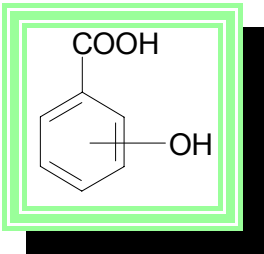
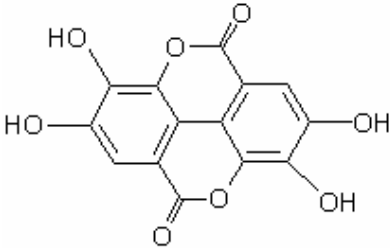
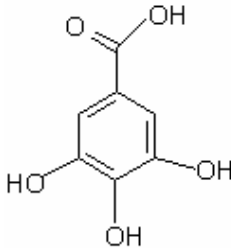
I.2.4. Compuși fenolici naturali

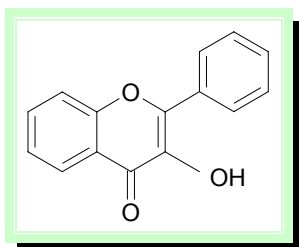
I.2.4.1 Clase și subclase de compuși fenolici naturali

Compușii polifenolici naturali care contribuie la apărarea antioxidantă a organismului sunt proveniți prin aport exogen din dietă. Această largă gamă de compuși include: flavonoide, acizi fenolici și polimeri fenolici (taninuri). În tabelul 3 [50] sunt prezentați într-un mod sintetic compușii fenolici cei mai reprezentativi prezenți în plante:

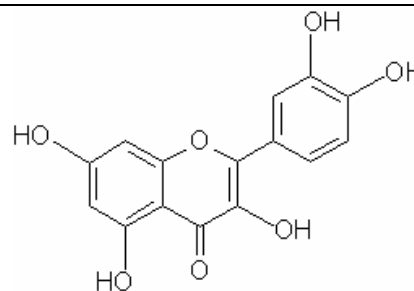
Tabel 3. Compușii fenolici

A. ACIZI FENOLICI			
A.1. Acizi hidroxicinamici			
 <p>Structura caracteristică</p>	 <p>Acid cafeic</p>	 <p>Acid clorogenic</p>	 <p>Acid p-cumaric</p>
 <p>Acid Ferulic</p>	 <p>Acid Cinamic</p>	 <p>Acid o-cumaric</p>	 <p>Acid sinaptic</p>

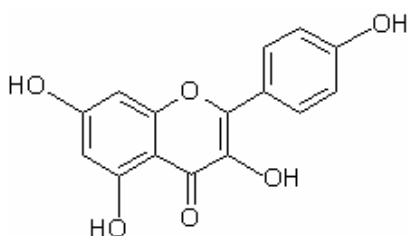
		
<p>Acid Rozmarinic</p>	<p>Acid Carnozic</p>	<p>Gingerol</p>
		
<p>Hidroxitirozol</p>	<p>Oleuropeină</p>	
<p>Surse: mure, cireșe, pere, mere, portocale, grapefruit, ghimber, flori, nuci, semințe și în produse derivate din plante: vin, ceai, cafea sau ulei de măsline</p>		
<p>A.2. Acizi hidrobenzoici</p>		
		
<p>Structura caracteristică</p>		
		
<p>Acid Ellagic</p>	<p>Acid Galic</p>	
<p>Surse: căpșuni, zmeură</p>		
<p>B. Flavonoide</p>		

B. Flavonoide**B.1 Flavonoli**

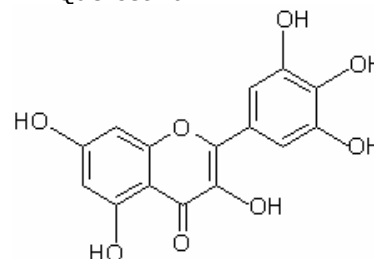
Structura caracteristică flavonolilor



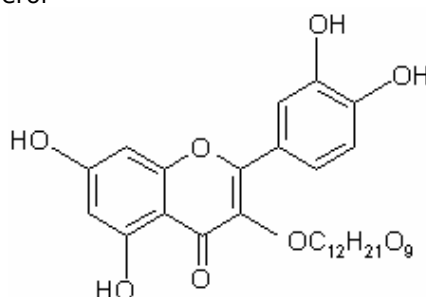
Quercetina



Kaemferol

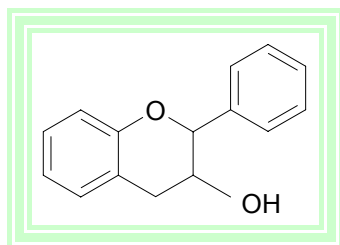


Miricetina

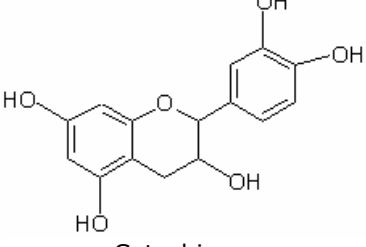
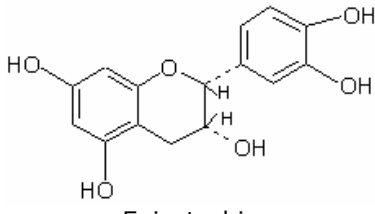
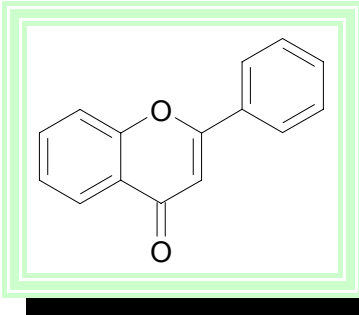
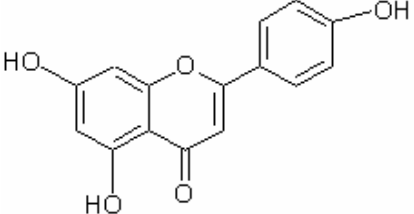
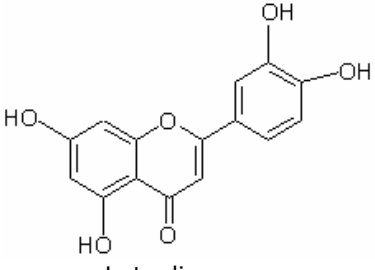
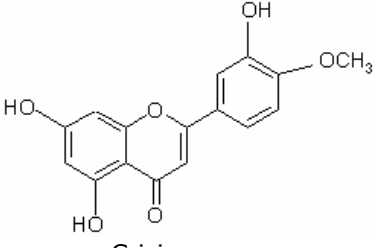
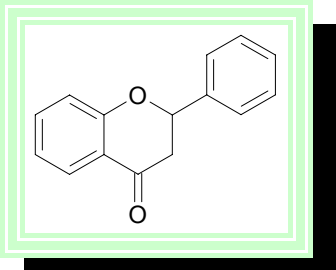
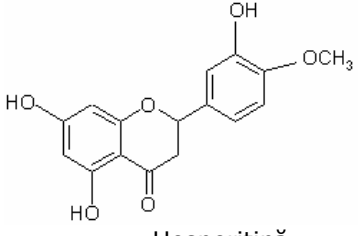


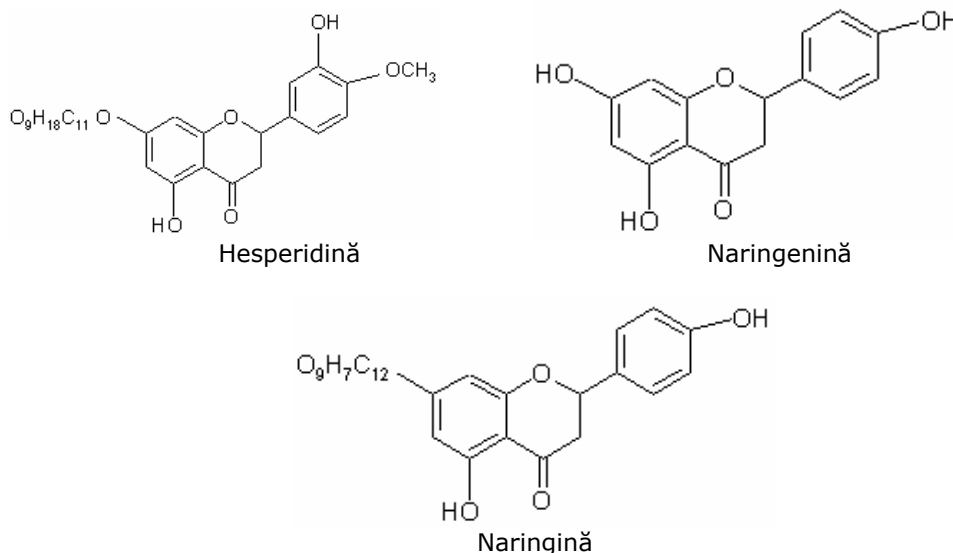
Rutina

Surse: Măslina, ceapă, frunze de salată verde, fragi, roșii, broccoli și în produse derivate din plante: sucuri de mere, portocale și grapefruit, vin roșu, ceai verde și negru

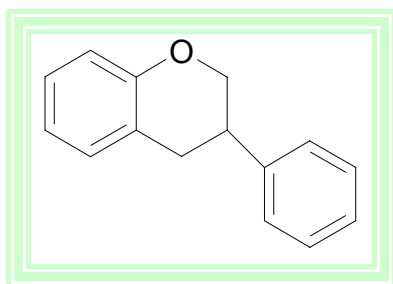
B.2. Flavanoli

Structura caracteristică flavanolilor

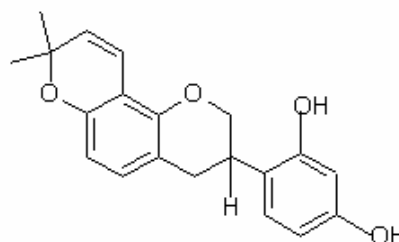
 <p>Catechina</p>	 <p>Epicatechina</p>
<p align="center">Surse: pere, mere, vin și ceai verde</p>	
<p>B.3 Flavone</p>	
 <p>Structura caracteristică flavonelor</p>	 <p>Apigenina</p>
 <p>Luteolina</p>	 <p>Crizina</p>
<p align="center">Surse: Țelină, pătrunjel (apigenina), salvia tomentosa (luteolina), floarea pasiunii (crizina)</p>	
<p>B.4 Flavanone</p>	
 <p>Structura caracteristică flavanonelor</p>	 <p>Hesperitină</p>



Surse : citrice

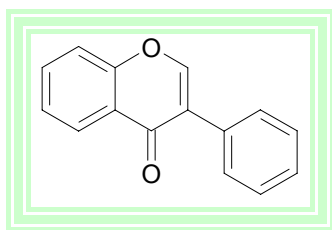
B.5. Izoflavani

Structura caracteristică izoflavanilor

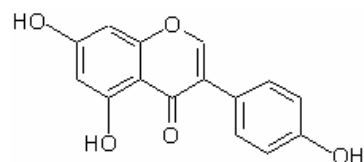


Glabridină

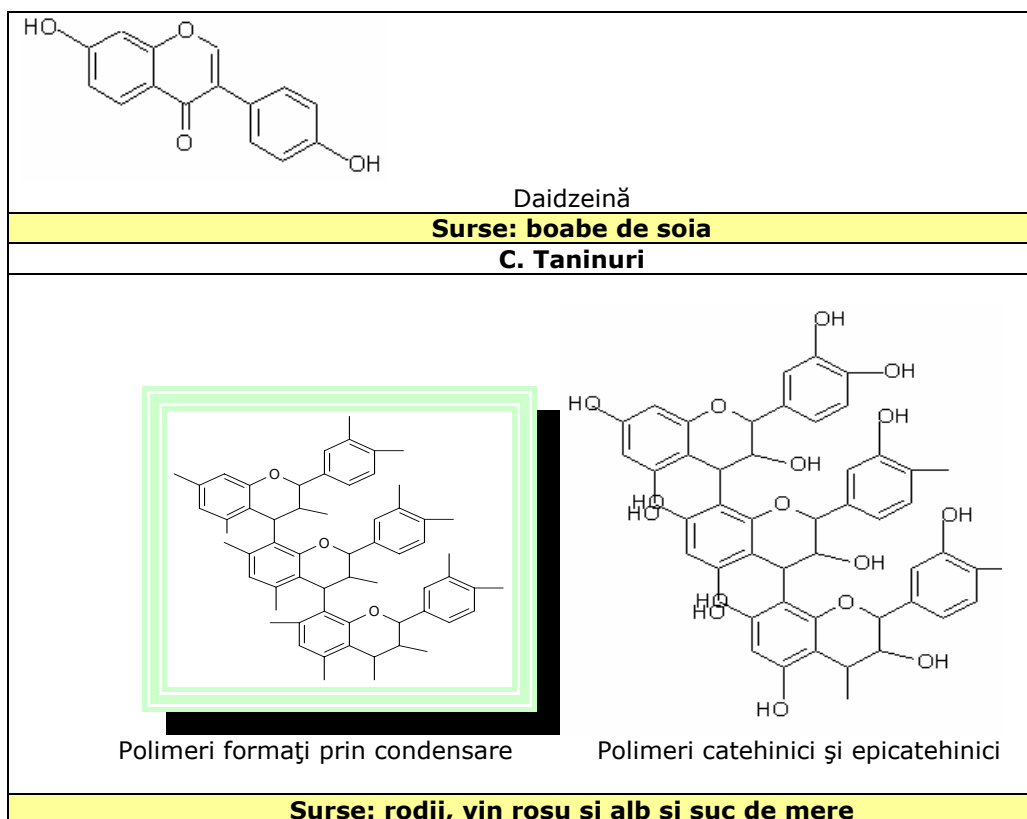
Surse: rădăcină de licorice

B.6. Izoflavone

Structura caracteristică izoflavonelor



Genisteină



1.2.4.2. Acidul cafeic și antioxidanți din categoria acizilor hidroxicinamici

Acizii hidroxicinamici sunt larg răspândiți în plante și în produsele obținute din plante (vezi tabelul nr.3). Componentii acestei subclase pot fi sintetizați pornind de la fenilalanină și contribuie, la rândul lor, la biosinteza altor compuși fenolici cu structură mai complexă așa cum sunt flavonoidele [86,87]. Totodată sunt componenți ai peretelui celular, contribuind astfel la menținerea structurii și susținerea plantelor. În plante, acești acizi hidroxicinamici se găsesc sub formă de esteri sau pot fi glicozilați ori legați de acizi organici sau lipide și sunt într-o continuă interconversie (vezi fig.19). Cei mai răspândiți în natură sunt acidul cafeic, esterul său (acidul clorogenic) și precursorul său acidul p-cumaric.

Activitatea antioxidantă a acestor compuși este determinată de existența grupărilor -OH fenolice și este influențată de substituenții existenți la nucleul fenolic. Prin oxidarea mono-electronică a grupării -OH fenolică de către speciile radicalice reactive se obține un radical fenoxi care fie mai suferă o etapă de oxidare mono-electronică din care rezultă o chinonă, fie dimerizează și formează un dimer stabil (vezi fig. 20). O grupare catecol conferă capacitate antioxidantă mai mare comparativ cu monofenolii (de ex. acidul cafeic are potențial de oxidare mai mare decât acidul p-cumaric). Existența unor legături duble care extind conjugarea existentă la nucleul fenolic cresc de asemenea capacitatea antioxidantă a

compusului deoarece stabilizează radicalul format, în timp ce o catenă laterală saturată sau un -H inhibă activitatea antioxidantă.

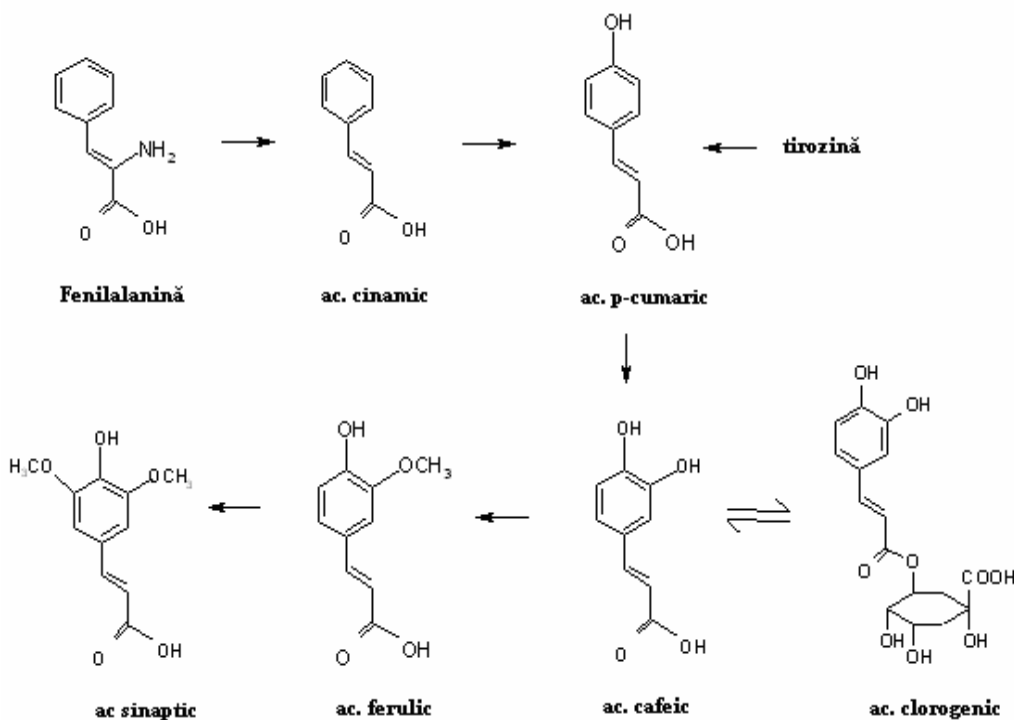


Fig. 19. Structura acizilor hidroxicinamici și relația dintre ei în cadrul biosintezei

Înlocuirea unei grupări -OH din structura o-hidroxi a acidului cafeic cu o grupare metoxi -OCH₃ (ca în cazul acidului ferulic) sau un -H (cum este cazul acidului p-cumaric) duc la scăderea capacității antioxidante a compusului respectiv.

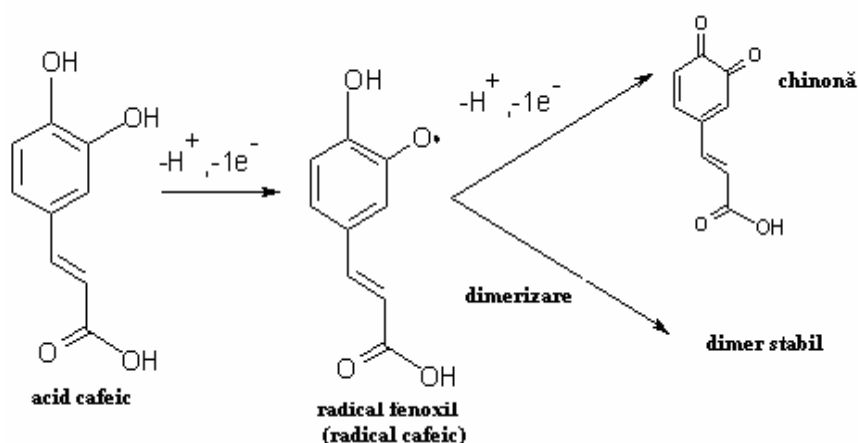
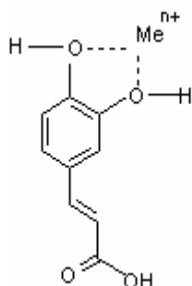


Fig.20. Activitatea antioxidantă a acizilor hidroxicinamici

Acizii hidroxicinamici își manifestă acțiunea antioxidantă prin:

1. reacția cu anionul superoxid previne inițierea proceselor de oxidare prin intermediul HO^\bullet și ONOO^- .
2. formarea de chelați cu metalele tranzitionale (Fe, Cu) la nivelul grupărilor –OH fenolice



3. întreruperea reacțiilor radicalice în lanț din procesul de peroxidare lipidică prin stabilizarea peroxizilor lipidici
4. regenerarea α -tocoferolului

În ceea ce privește viteza de reacție cu speciile reactive ale oxigenului, acizii hidroxicinamici au aproximativ aceeași viteză de reacție cu radicalii peroxi ca și flavonele, dar viteza de reacție cu anionul superoxid este cu 2-3 ordine de mărime mai mare [88], ceea ce este foarte important având în vedere că anionul superoxid nu este foarte reactiv și că acesta poate genera alte specii mult mai reactive așa cum este HO^\bullet sau peroxinitritul ONOO^- . Acidul clorogenic reacționează cu peroxinitritul cu o viteză de aproximativ 1000 de ori mai mare decât acidul ascorbic și glutationul [89,90].

Interacțiunea cu metalele tranzitionale este importantă pentru că acizii hidroxicinamici au capacitatea de forma chelați cu fierul atât în stare Fe^{3+} cât și Fe^{2+} ceea ce duce la manifestarea atât a proprietăților antioxidante cât și a celor prooxidante. Menținerea fierului în starea redusă Fe^{2+} care este activă în reacția cu apa oxigenată contribuie la acțiunea prooxidantă manifestată de acești compuși; în același timp reducerea de către acidul cafeic a Fe^{3+} la Fe^{2+} în centrul activ al unor enzime cu acțiune peroxidazică (ferilmioglobina [50], lipooxygenaza) duce la inhibarea producerii de specii reactive, ceea ce are un efect antioxidant protectiv. Această balanță între manifestarea proprietăților antioxidante sau prooxidante depinde în mare măsură de condițiile de mediu (pH, concentrație, etc). O observație interesantă este aceea că efectele prooxidante au fost observate la concentrații ale fenolilor cu un ordin de mărime mai mare decât concentrațiile la care fenolii inhibă peroxidarea lipidică [50].

Regenerarea α -tocoferolului este de mare importanță pentru inhibarea oxidării LDL. Radicalul α -tocoferil format în decursul reacțiilor radicalice de inițiere sau întrerupere a peroxidării lipidice este destul de stabil și poate deveni el însuși un agent prooxidant în condițiile în care activitatea sau fluxul radicalilor oxidanți (ROS și RNS) scade [91]. Prevenirea oxidării LDL necesită reducerea radicalilor peroxidici proveniți din lipide de către α -tocoferolul existent în faza lipidică urmată de reducerea radicalului α -tocoferil de către un alt antioxidant care funcționează în mediul apos. Cel mai bun antioxidant care poate face acest lucru, menținând α -tocoferolul în stare staționară, este vitamina C (acidul ascorbic). Localizarea particulară a α -tocoferolului la suprafața membranelor (sau a fazei lipidice) [92-95] și a acidului ascorbic în fază apoasă, favorizează interacțiunea dintre cei doi

antioxidanți la interfața dintre cele două medii. Numeroase studii experimentale au studiat acțiunea sinergică antioxidantă a acidului cafeic cu α -tocoferolul și vitamina C. Nardini et al. [96] a observat că în condițiile unei diete bogate în acid cafeic lipoproteinele au fost rezistente la acțiunea agenților antioxidanți, iar suplimentarea acidului cafeic în dietă a dus la creșterea nivelului de α -tocoferol în plasmă și lipoproteine. Stocker et al. [97,98] a demonstrat capacitatea acidului cafeic de a reduce α -tocoferolul, iar Laranjinha et al. [99] a arătat posibilitatea de regenerare a acidului cafeic din radicalul său prin intermediul acidului ascorbic. De fapt, cuplul redox acid cafeic/ascorbat stă la baza multor procese de detoxifiere în plante, demonstrând posibilitatea unui mecanism de acțiune sinergică α -tocoferol / acid cafeic/acid ascorbic (așa cum se observă în fig.21).

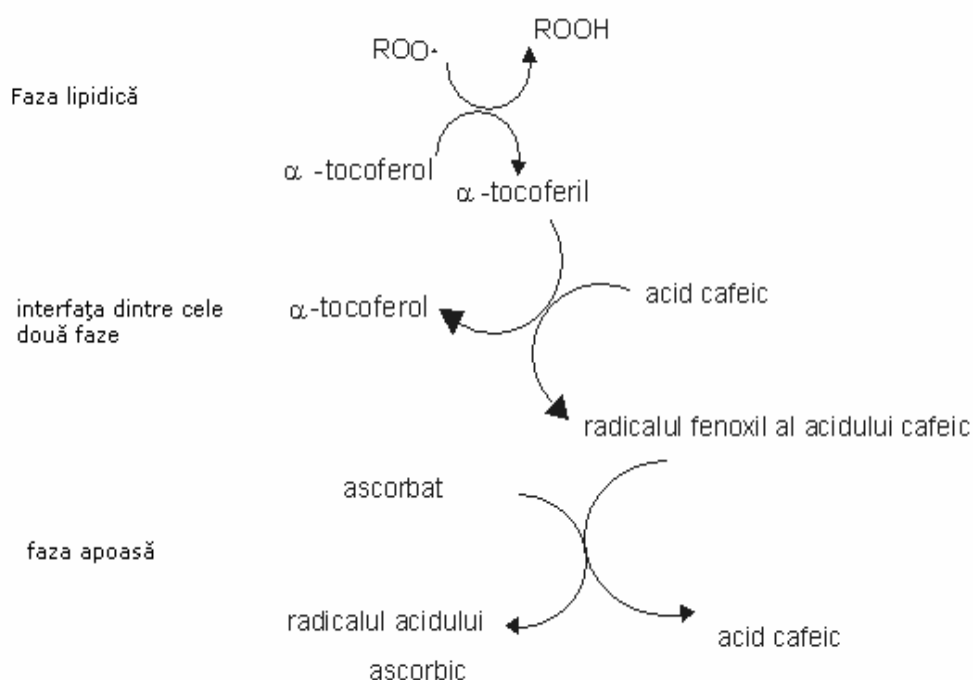


Fig.21. Acțiunea antioxidantă sinergică a α -tocoferolului, acidului cafeic și vitaminei C

Localizarea celor trei componente este foarte importantă; acidul cafeic este puțin solubil în apă, dar are capacitatea de a pătrunde în faza lipidică unde regenerează α -tocoferolul.

În afară de efectele pozitive precum acțiunea antioxidantă și de efectul citoprotectiv indirect asupra celulelor endoteliale prin blocarea apoptozei celulelor [100], unii acizi așa cum este acidul cafeic poate fi un agent mutagen din cauza efectului prooxidant și a capacității de legare de ADN.

La ora actuală se știu foarte puține lucruri despre biodisponibilitatea și metabolismul acestor compuși în organismul uman. În ceea ce privește riscul toxic se consideră că acesta nu există deoarece, în mod obișnuit, se ingeră în cantități mari din plante. Cea mai mare parte a acizilor hidroxicinamici ingerați pe zi o constituie acidul cafeic. După ingestie compușii fenolici sunt transformați în derivați metilați sau pot fi

conjuzați cu acidul glucuronic (ex. conversia acidului cafeic în ferulic) [101]. În urină s-au identificat acizii ferulic, cafeic și cumaric liberi după o dietă bogată în fructe [102].

I.2.4.3.Flavonoidele

Flavonoidele (tabelul 2,B) reprezintă cea mai largă categorie de compuși fenolici din plante (4000 de flavonoide identificate până acum).

Flavonoidele conțin grupări hidroxilice atașate la nucleeele aromatice care le oferă activitate antioxidantă. Flavonoidele se regăsesc de regulă în plante sub formă glicozilată. Sunt două mari categorii de flavonoide: antociani (cel mai important grup de pigmenți din plante) și antoxantine (flavonoli, flavanoli, flavone, flavani și izoflavone)

Quercetina este principalul constituent al plantelor și cel mai important flavonoid din dieta (ceapă, mere, ceai). Catechina și epicatechina apar de regulă în combinație cu acidul galic în compuși ca epigallocatehingalatul sau cu epicatehingalatul de regulă în ceai sau vinul roșu și pot condensa la polimeri taninici ce sunt prezenți în fructe și legume. Izoflavonele sunt exclusiv prezente în legume (soia).

Flavonoidele au acțiune antioxidantă puternică manifestată fie prin donarea echivalenților reducători către speciile reactive ROS și RNS, fie prin chelatarea metalelor tranziționale, reducând posibilitatea acestora de a genera radicali liberi. Activitatea antioxidantă depinde de structura flavonoidului respectiv. Există câteva considerente generale privind corelația structura-activitate antioxidantă.:

- a. Grupările -OH la nucleul B conferă o mare stabilitate radicalului format în cazul reacțiilor radicalice de oxidare deoarece cresc delocalizarea electronică; grupările -OH de la C₃ (nucleul C) și C₅ (nucleul A) cresc potențialul antioxidant al flavonoidelor;
- b. Legătura dublă între C₂ și C₃ precum și gruparea C=O (la C₄) care apar la nucleul C în anumite subclase de flavonoide de asemenea extind delocalizarea electronilor de la nucleul B; eficiența acțiunii antioxidante crește cu hidroxilarea și scade cu glicozilarea

Acțiunea antioxidantă se manifestă prin inhibarea anumitor oxidaze (NADPH oxidaza, xantinoxidaza) ducând astfel la inhibarea inițierii reacțiilor de oxidare în lanț prin intermediul speciilor reactive ale oxigenului. Ca și acizii fenolici, flavonoidele au capacitatea de a forma chelați atât cu ionii de fier divalent cât și cu ionii de fier trivalent ceea ce poate avea nu numai efecte antioxidante, dar și prooxidante, în funcție de condiții. Flavonoidele joacă un rol important în protecția împotriva oxidării LDL deoarece sunt liganzi polidentati capabili să lege simultan suprafața mai multor lipoproteine [103] reducând astfel posibilitatea agregării LDL [104]. De asemenea, flavonoidele sunt foarte potrivite pentru protejarea membranelor celulare împotriva oxidării deoarece au o parte lipofilică și una hidrofilică. Datorită particularităților structurale, aceste molecule se poziționează parțial în membrane, protejând celulele de atacul radicalilor liberi atât din exterior cât și din interior. O altă formă de protejare a LDL împotriva oxidării este protecția vitaminei E și a carotenoizilor din LDL prin regenerarea lor din radicalii corespunzători. Protejarea LDL împotriva oxidării duce la scăderea nivelului de peroxizi lipidici care inhibă enzima paraxonaza serică PON-1 [105]. Această enzimă este asociată fizic cu HDL din ser și are rol în protejarea LDL cât și a HDL împotriva oxidării, fiind responsabilă de hidroliza radicalilor lipidici asociați LDL.

I.3. Stresul oxidativ în sindromul metabolic

I.3.1. Disfuncția endotelială –o legătură între diferitele patologii în sindromul metabolic

Noțiunea de sindrom metabolic reunește un grup de factori de mare risc pentru dezvoltarea diabetului și a bolilor cardiovasculare. Prevalența sindromului metabolic în rândul populației este mare 15-20% [106] și este în continuă creștere datorită stilului de viață sedentar și a unei diete necorespunzătoare. Toate cele trei importante organizații mondiale: Federația Internațională de Diabet - International Diabetes Federation (IDF), Panelul III de Tratare a Adulților - Adult Treatment Panel III (ATP III) și Organizația Mondială a Sănătății - World Health Organisation (WHO) admit, cu anumite diferențe între ele, un trunchi comun al factorilor ce definesc sindromul metabolic: obezitate, dislipidemie, hipertensiune arterială și sindromul rezistenței la insulină sau diabetul [106]. World Health Organisation (WHO) consideră, pe lângă factorii menționați anterior, microalbuminuria ca un posibil factor de risc pentru ateroscleroză deoarece este un marker al disfuncției endoteliale [107]. Noțiunea de sindrom metabolic este destul de controversată datorită faptului că nu există un mecanism molecular unic și în consecință nici o strategie terapeutică unică deoarece reunește mai mulți factori de risc pentru diabet și bolile cardiovasculare, fiecare cu contribuția sa specifică la starea patologică a organismului uman. Cu toate acestea prezența simultană a obezității, dislipidemiei, diabetului și hipertensiunii arteriale a fost semnalată încă din anii 1970 la mulți subiecți cu boli cardiovasculare, fiind asociată cu ateroscleroza [108], mai târziu s-a demonstrat că rezistența la insulină face și ea parte din acest grup de factori de risc. Reaven a introdus pentru prima dată conceptul de rezistență la insulină [109]. Rezistența la semnalul insulinic de preluare a glucozei de către țesuturi determină celulele β pancreatice să producă mai multă insulină pentru a menține nivelul glucozei în limitele normale. După un anumit timp celulele β pancreatice nu mai sunt capabile să producă necesarul cronic ridicat de insulină și acest lucru duce la apariția diabetului zaharat de tip 2. Sindromul de rezistență la insulină [110] caracterizat de hiperinsulinemie, dislipidemie, hipertensiune arterială, hiperglicemie și obezitate [107], [111] a mai fost denumit sindrom X [107] și sindrom metabolic [112]. Însă, nu toți subiecții care au sindrom de rezistență la insulină, îndeplinesc criteriile corespunzătoare sindromului metabolic (aproximativ 78% din subiecții cu sindrom metabolic au rezistență la insulină și numai 48% dintre subiecții cu rezistență la insulină prezintă sindrom metabolic [104]). Ideea de a reuni din punct de vedere diagnostic acest grup de factori drept sindrom atunci în loc să se considere fiecare factor de risc ca un factor individual și să se trateze ca atare, este și ea discutabilă încă. Este evident ca prezența mai multor factori la un pacient crește foarte mult riscul unor complicații cardiovasculare, dar este de preferat identificarea fiecăruia dintre factori la timp și intervenția eficientă pentru a preveni dezvoltarea bolilor cardiovasculare. Factorii implicați în sindromul metabolic se manifestă și la nivel endotelial. În condiții fiziologice normale endoteliul realizează o barieră între peretele vascular și lumen, menținând homeostazia vasculară. Celulele endoteliale mențin tonusul vascular și nivele scăzute ale stresului oxidativ prin producția agenților vasodilatatori (NO, PGI₂) și vasoconstrictori (ET-1, angiotensina II). În plus, endoteliul reglează permeabilitatea vasculară pentru diferiți constituenți plasmatici, precum și procesele de adeziune leucocitară și plachetară, agregarea acestora și

tromboza. În prezența complexului de factori de risc ce definesc sindromul metabolic, menținerea funcționării normale a endoteliului este afectată prin diverse mecanisme care duc în final la disfuncția endotelială care reprezintă un dezechilibru între producția de agenți vasodilatori și vasoconstrictori. Aceasta este asociată cu creșterea expresiei moleculelor de adeziune, sinteza crescută de factori proinflamatori și protrombotici, stres oxidativ crescut, toate acestea conducând la reglarea necorespunzătoare a tonusului vascular cu consecințe la nivel funcțional [113]. Mecanismele prin care obezitatea (centrală sau abdominală) conduce la disfuncția endoteliului sunt multiple și complexe. În general, creșterea țesutului adipos visceral conduce la un dezechilibru al producției anumitor metaboliți (acizi grași liberi), hormoni (leptina, adiponectina, rezistina) și citokine (TNF- α , IL-6) care favorizează descreșterea sensibilității la insulină a ficatului și mușchiului scheletic și la disfuncția endoteliului prin crearea unui mediu proinflamator și proaterosclerotic. Rezistența la insulina (IR) determină disfuncția endotelială prin creșterea stresului oxidativ urmată de reducerea biodisponibilității NO, prin producerea unor compuși proinflamatori precum și prin mecanismele de acțiune ale insulinei [114]. Acțiunile insulinei au efecte divergente asupra funcției endoteliale în IR. Mecanismul de semnalizare pe calea PI3K/Akt (fosforilarea receptorului insulenic, substratului receptorului insulenic, PI-3 kinaza și Akt) stimulat de insulină, ce favorizează pătrunderea glucozei în celulele metabolice active și produce relaxarea vasculară datorită creșterii producției de NO, este inhibat [115]. Pe de altă parte, în IR, calea de semnalizare MAP kinazică stimulată tot de insulină nu este inhibată fiind stimulată producția vasoconstrictorului endotelina I (ET-1), apariția inflamației și apoptoza celulelor endoteliale. Dacă ținem cont că, în IR, pentru a menține nivelul plasmatic al glucozei este stimulată sinteza de insulină ca un efect compensator, atunci este evident că dezechilibrul existent în desfășurarea celor două căi de semnalizare este și mai accentuat având ca rezultat disfuncția endotelială [116]. Disfuncția endotelială este de asemenea prezentă la subiecții cu diabet zaharat de tip 2 deoarece ceilalți factori precum rezistența la insulină, hiperglicemia (cel mai probabil datorită stresului oxidativ indus de starea hiperglicemică [117], hipertensiunea arterială, dislipidemia, obezitatea contribuie fiecare la dezechilibrul care generează disfuncția endotelială [118]. Există studii care arată apariția disfuncției endoteliale timpurii în procesul de ateroscleroză [119], unele constatând prezența acesteia la subiecți cu factori de risc dar la care ateroscleroza nu se manifestă clinic încă [120]. Aceste studii experimentale sugerează că disfuncția endotelială reprezintă o legătură din punct de vedere mecanistic între factorii de risc menționați mai sus și dezvoltarea patologiei cardiovasculare, fiind un factor predictiv timpuriu nu numai al apariției bolilor cardiovasculare, dar și un factor care modelează parcursul clinic al bolii. Îmbătrânirea și expunerea la factorii de risc duc la denudarea endoteliului prin apoptoza celulelor endoteliale [121]. Disfuncția endotelială vine astfel în sprijinul ipotezei „solului comun” formulată de Stern [122] care presupune antecedente comune de natură genetică și condiții de mediu pentru bolile cardiovasculare și diabet care, după cum s-a putut constata se întrepătrund cu cele ale sindromului metabolic. Se pare că există dovezi care vin în sprijinul ipotezei solului comun a lui Stern [122], care presupunea existența unor mecanisme generale similare pentru diabet și bolile cardiovasculare, deoarece de-a lungul timpului, în cadrul sindromului metabolic au mai fost adăugați câțiva factori hemostatici: PAI-1, fibrinogen și FVII [123,124]. Ca urmare, Societatea Americană de Endocrinologie și Organizația Mondială a Sănătății recunosc sindromul cardiometabolic drept un grup de factori metabolici, hemostatici și de risc cardiovascular [125] ca o boală multifactorială care contribuie la creșterea

morbidității și mortalității în urma bolilor cardiovasculare. Procese precum inflamația, disfuncția endotelială, semnalizarea celulară prin intermediul speciilor reactive ale oxigenului sau a altor mediatori, procesele de coagulare, care au loc la interfața dintre sindromul metabolic, diabet și bolile cardiovasculare (fig.22) reprezintă subiecte de interes al cercetării actuale în domeniu.

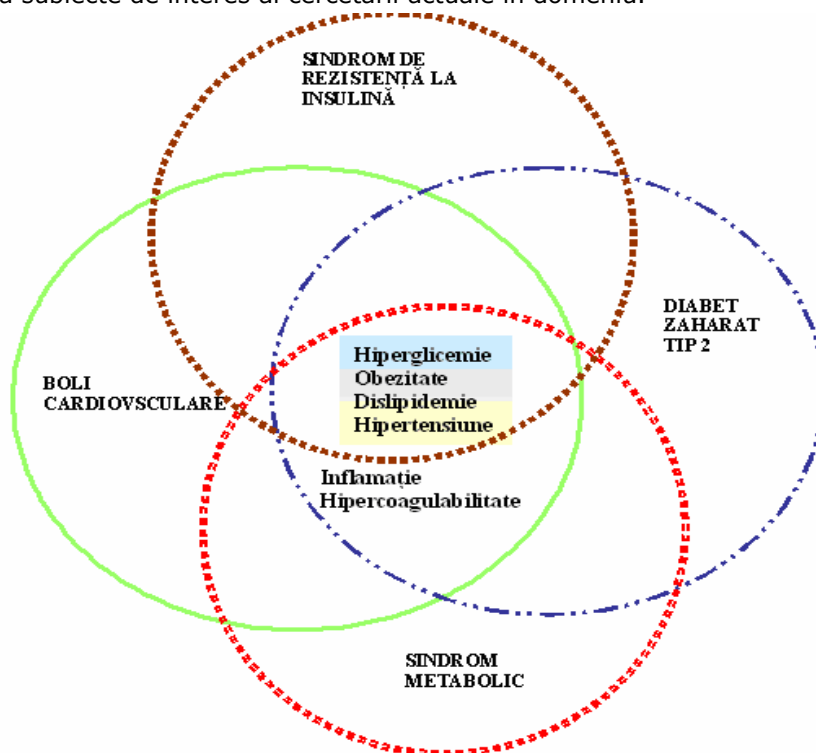


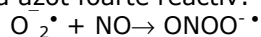
Fig.22. Factorii de risc aflați la interfața dintre sindromul de rezistență la insulină, sindromul metabolic, diabet zaharat tip 2 și bolile cardiovasculare

I.3.2. Stresul oxidativ la nivelul endoteliului vascular

Apariția dezechilibrului între producția de ROS la nivel vascular și capacitatea mecanismelor vasculare de neutralizare are multiple cauze:

- creșterea producției de specii reactive ale oxigenului
- reducerea cantității de NO
- presiunea O_2 , ale cărei modificări sunt sesizate de oxidazele vasculare care conduc la posibile adaptări la noile condiții ce implică expresia genelor și proliferarea
- fluxul sangvin, ale cărui modificări produc schimbări în semnalizarea oxidantă care generează un răspuns vascular adaptativ schimbând expresia proteinelor cheie din mecanismul de semnalizare redox [126,127]
- presiunea la nivelul peretelui vascular care generează o producție excesivă de ROS [128] care prin mecanismele de semnalizare oxidantă contribuie la răspunsul acut al țesutului vascular la presiunea asupra peretelui vascular [129]

La nivelul endoteliului vascular, reacția dintre anionul superoxid și NO duce la formarea peroxinitritului, un compus cu azot foarte reactiv:



are o deosebită importanță datorită faptului că NO este un important factor care produce relaxarea vasculară la nivelul mușchiului neted vascular. În absența enzimei SOD, concentrațiile intracelulare ale anionului superoxid sunt de ordin nanomolar; în prezența enzimei SOD acestea scad la nivel picomolar datorită dismutației anionului superoxid. Aceste nivele scăzute de $O_2^{\cdot -}$ nu interacționează direct cu sistemele de semnalizare, dar apa oxigenată produsă în urma reacției de dismutație poate interacționa cu sistemele de semnalizare celulară [1]. Concentrații de NO de ordin nanomolar intră în competiție cu enzimele SOD pentru neutralizarea anionului superoxid [130,131] viteza reacției dintre NO și anionul superoxid fiind de 3 ori mai mare decât a reacției de dismutație.

La concentrații mai mari de anion superoxid acesta interacționează cu NO și catecolaminele vasoactive ducând la apariția unui răspuns vascular vasoconstrictor; NO este responsabil de inhibarea agregării plachetare și de inhibarea adeziunii leucocitelor la endoteliu. În momentul în care crește concentrația de NO la nivel nanomolar, acesta intră în interacțiune cu anionul superoxid, competiționând cu dismutația acestuia prin intermediul enzimelor SOD. Modul în care desfășurarea acestei reacții contribuie la semnalizarea vasculară depinde de nivelele de anion superoxid și NO disponibile și de cantitatea de produs de reacție format

— reducerea cantității de NO

La concentrații de ordin nanomolar NO se leagă de gruparea de tip hem a guanilat ciclazei solubile (sGC) și la complexul hem-cupru al citocromoxidazei producând stimularea cGMP (GMP ciclic) responsabilă de efectul vasodilatator. NO este responsabil de asemenea de inhibarea agregării plachetare sau adeziunea neutrofilelor la endoteliu. Scăderea concentrației NO în urma reacției cu anionul superoxid duce la un răspuns vasoconstrictor dar și la creșterea permeabilității endoteliului pentru proteinele plasmatice și recrutarea proteinelor și celulelor inflamatoare. Scăderea producției sau a bioactivității NO ca vasodilatator este unul dintre markerii timpurii ai aterosclerozei și se datorează mai multor mecanisme posibile:

- existența substratului L-arginină și a cofactorului enzimatic BH_4 ;
- inhibarea sintezei de NO la nivelul eNOS de către ADMA și alți analogi ai L-argininei;
- decuplarea eNOS datorită oxidării BH_4 de către peroxinitrit cu transformarea ei într-o sursă de radicali $O_2^{\cdot -}$;
- biosinteză scăzută a BH_4 datorită unor mutații la nivelul genei implicată în sinteza BH_4 ;
- producție crescută de ROS;
- activitate redusă a enzimelor SOD;

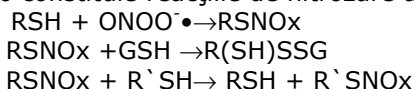
— reducerea cantității de anion superoxid

Reducerea disponibilității anionului superoxid afectează mecanismele de reglare a proceselor de diferențiere și creștere celulară, supraviețuire și apoptoză. Contribuția la procesele de reglare a creșterii și diferențierii celulare se datorează în foarte mare măsură și producției de H_2O_2 care este un mediator important al acestor procese. S-a arătat că inducerea generării anionului superoxid în celulele endoteliale cu angiotensină II [132] stimulează calea Raf-1/MAPK ducând la o expresie anormală a unor gene. S-a demonstrat că stimularea expresiei SOD inhibă proliferarea celulară [133] și crește susceptibilitatea celulelor pentru apoptoză, în timp ce inhibarea expresiei SOD stimulează proliferarea celulară și inhibă apoptoza. În afară de

implicarea anionului superoxid și a H_2O_2 în reglarea proceselor de diferențiere și creștere celulară, acestea sunt implicate și în procesele de remodelare vasculară sau de lezare tisulară prin:

- activarea proteinelor tirozin-kinazice;
 - stimularea tirozinfosfatazelor și factorilor de transcripție (ex. NF-Kb și AP-1) care induc expresia genelor proinflamatoare cu rol în procesul de inflamație vasculară asociată cu hipertensiunea și ateroscleroza;
 - stimularea procesului de depunere al proteinelor din matricea extracelulară la nivelul endoteliului care contribuie la procesele de remodelare vasculară;
 - creșterea permeabilității endoteliului și infiltrarea limfocitelor;
- formarea peroxinitritului $ONOO^\bullet$

Reactivitatea ridicată a acestei specii duce la modificarea structurii ADN, alcoolilor și glucidelor, a structurii proteinelor și lipidelor modificări care pot conduce la lezarea țesutului vascular în condițiile în care se menține o producție ridicată a acestuia pe o perioadă mai lungă de timp. Una dintre cele mai importante acțiuni de semnalizare a peroxinitritului o constituie reacțiile de nitrozare ale tiolilor de tipul:



care prin posibilitatea reversibilității lor constituie o modalitate de reglare foarte fină a acestor procese prin intermediul sistemelor redox celulare.

În cazul nitrozării anumitor tioli din compoziția gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazei sau creatin kinazei se produc anumite disfuncționalități în metabolismul glucidic iar nitrozarea tiolilor la nivelul proteinei $G p^{21ras}$ stimulează activarea căii proteinkinazelor activate de mitogeni (p42/p44 MAPK). Alte modalități de semnalizare se datorează interacției $ONOO^\bullet$ cu centrele Fe-S ale proteinelor componente ale lanțului mitocondrial și a aconitazei care inhibă desfășurarea proceselor mitocondriale corespunzătoare. Formarea $ONOO^\bullet$ este asociată cu inhibarea catalazei [32], GSH peroxidaza [134], MnSOD [135] ceea ce duce la creșterea semnalizării oxidante și la procesele de lezare celulară. De asemenea PGI_2 sintaza este mai sensibilă la acțiunea $ONOO^\bullet$ la nivelul unui rest de tirozină în urma căreia enzima poate fi inhibată.

Mentținerea stării de stres oxidativ la nivelul endoteliului vascular pe o perioadă mai lungă de timp duce la perturbarea echilibrului dintre producția și neutralizarea speciilor reactive care pune în acțiune mecanismele de semnalizare precizate anterior care conduc la dezechilibrul dintre vasodilatare și vasoconstricție. Acest dezechilibru este cauza disfuncției endoteliale și inițiază procese implicate în procesul de ateroscleroză printre care: creșterea permeabilității endoteliului, agregarea plachetară, adeziunea leucocitelor și generarea de citokine [136,137].

I.3.3. Factori genetici implicați în controlul speciilor reactive ale oxigenului

Controlul speciilor reactive ale oxigenului este un subiect de cercetare intens studiat la ora actuală din cauza implicării acestor specii chimice în inițierea și progresul unor boli majore cu care se confruntă omenirea precum bolile cardiovasculare, diabetul, cancerul și îmbătrânirea. Controlul producției și neutralizării acestor specii presupune mecanisme complexe de reglaj fin al unui număr mare de procese. Un factor important care influențează desfășurarea tuturor acestor procese este factorul genetic, determinat de secvența ADN din genomul individului, care influențează de asemenea predispoziția, parcursul bolii, dar și

răspunsul la o anumită terapie. Modificările secvenței ADN la nivel nucleotidic (translocări cromozomiale, polimorfisme, mutații, etc [138]) au repercursiuni asupra funcționalității anumitor gene și se manifestă atât la nivelul expresiei genice cât și la nivelul funcționalității proteinelor codificate de aceste gene. Polimorfismele și mutațiile cauzate de modificarea unei singure nucleotide (SNP) sunt cele mai frecvente modificări ale secvenței ADN existând mai mult de 5 milioane de SNP detectate până în prezent. În funcție de frecvența în populație, aceste variații genetice de numesc SNP (frecvența >1%) sau mutații (frecvența <1%). SNP-urile sunt foarte folositoare ca markeri ADN, incidența mutațiilor fiind de 10^{-9} /locus/generație

.....CTCCCCGTGGAGCT...
CTCCCCGTGAGCT...

Fig. 23. Situsul polimorfic la nivelul a 2 secvențe ADN

Mijloacele folosite în domeniul ingineriei genetice permit, pe de o parte, identificarea modificărilor naturale ale secvenței ADN asociate cu anumite patologii, dar și modificarea artificială a secvenței ADN in vivo și in vitro în scopul reglării expresiei și funcției anumitor proteine cheie. Aceste mijloace sunt reunite într-o strategie relativ nouă: **analiza funcțională a secvenței genice**.

Analiza funcțională a polimorfismelor și mutațiilor implică o gamă variată de metode atât metode bioinformatice cât și metode experimentale. De regulă folosirea mai multor metode pentru validarea unui rezultat oferă mai multă încredere în rezultatele obținute. Atunci când se investighează posibilitatea ca gena respectivă să fie o genă candidat pentru o anumită boală atunci, cea mai folosită metodă este asocierea polimorfismelor identificate în populație cu boala respectivă, pentru că este ușor de aplicat și rapidă totodată. Indiferent de plasarea situsului polimorfic la nivelul genei, studiile populaționale care se realizează în scopul stabilirii unor asocieri semnificative din punct de vedere statistic între frecvențele diferitelor genotipuri corespunzătoare polimorfismului în cauză și parametrii care definesc sau caracterizează o anumită stare patologică sunt întotdeauna un mijloc foarte bun de investigare a funcționalității respectivului polimorfism. Deși aceste studii contribuie la investigarea relației genotip-fenotip totdeauna trebuie să ținem cont că procesele de creștere celulară precum și nivelele de proteină în ser sunt influențate de mulți alți factori în afară de factorul genetic, așa că interpretarea rezultatelor este mult mai dificilă. O altă metodă utilă de asemenea în investigarea tuturor polimorfismelor este crearea animalelor transgenice în care gena endogenă a fost înlocuită cu varianta polimorfică a genei analizate și observarea schimbărilor care au în fenotip. În afară de cercetarea relației genotip-fenotip in vivo prin studii pe modele umane sau animale, în funcție de poziția polimorfismelor la nivelul secvenței genice (fig. 24) se aplică metode variate:

- **Polimorfismele la nivelul secvenței ce codifică proteinele** care duc la modificarea secvenței de aminoacizi a proteinelor se studiază prin obținerea variantelor recombinante ale proteinelor. Acestea vor fi folosite pentru investigarea capacității de legare a diferiților liganzi/receptori sau pentru studierea interacțiunilor proteină-proteină.
- **Polimorfismele la nivelul intronilor** care se presupune că afectează splicing-ul se studiază folosind metoda de cuantificare semicantitativă a numărului de copii rezultate în urma amplificării PCR a fragmentului cuprins între joncțiunile de splicing ale ARN-ului extras dintr-un anumit tip de celule prin tehnica Real Time PCR (RT-PCR).

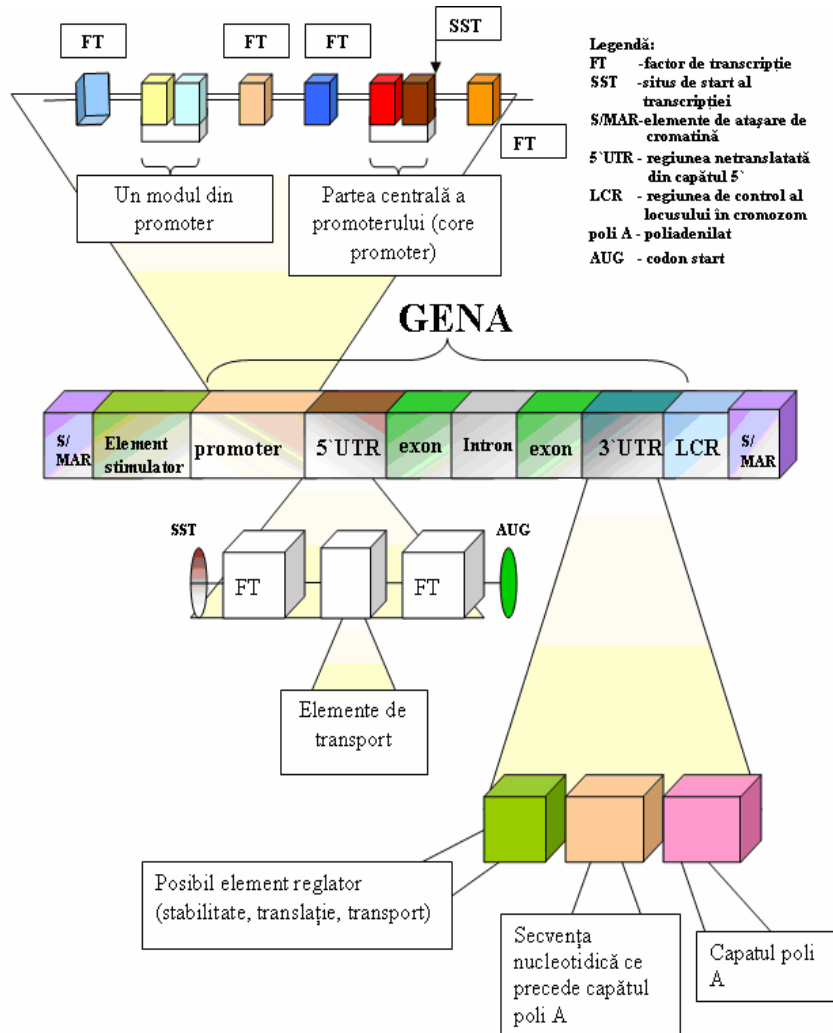


Fig. 24. Structura genei cu evidențierea organizării modulare a promoterului

▪ **Polimorfismele la nivelul regiunii netranslate 3'** sunt investigate cu ajutorul metodei ce măsoară activitatea reporterului atunci când secvența polimorfică este plasată în aval față de gena reporter în cadrul unui construct plasmidial cu care se transfectează celulele de interes. Activitatea reporterului poate fi influențată pozitiv sau negativ de prezența secvenței polimorfice de interes.

Analiza funcțională a polimorfismelor din regiunile promotor și elementele stimulative care pot afecta reglarea genei se poate face printr-o combinație de metode computaționale și experimentale [139-142], care conectează caracteristici legate de organizarea specifică a promoterului cu aspecte legate de procesul de reglare a expresiei genei prin investigarea anumitor interacțiuni *in vivo* și *in vitro*. Promotorul unei gene, poziționat de regulă în amonte de SST - situsul de start al transcripției unei gene - sau suprapus cel mai adesea peste primul exon al genei, reprezintă secvența de ADN cis-relatoare care inițiază procesul de transcripție al

genei. Regiunea promotor conține secvențe scurte de ADN (5-25 bp) numite situsuri de legare a factorilor de transcripție (SLFT) capabile să recunoască și să lege specific proteine reglatoare (factori de transcripție sau FT) pentru a forma complexul de inițiere a transcripției [143]. Caracteristicile organizaționale ale promotorilor genelor umane determina funcționalitatea unui promotor în contextul unei semnalizări specifice. Particularitatea este dată de organizarea promotorului în module structurale aranjate specific [144,145] (vezi fig.24). Aceste module sunt alcătuite din situsuri multiple pentru factorii de transcripție aranjate după un anumit tipar bine definit [146] care determină un răspuns specific al promotorului la semnale specifice [146-148] într-un anumit tip de celulă sau țesut. Funcționalitatea promotorului este dată de organizarea ierarhică a acestor SLFT-uri în module [144] ce permite ca interacțiunile dintre proteinele reglatoare (FT), SLFT și celelalte componente ale sistemului transcripțional să se desfășoare într-un mod specific. Analiza complexă a funcționalității promotorilor sau a elementelor stimuloare cuprinde mai multe etape:

1. Analiza computațională a secvenței genice respective care are ca scop identificarea computațională a factorilor de transcripție cu probabilitatea cea mai mare de a fi funcționali. Aceasta cuprinde mai multe etape [149]: identificarea promotorilor, predicția situsurilor de legare a factorilor de transcripție (SLFT) și analiza profilului expresiei genelor co-reglate intraspecii sau comparație între specii (genomică comparativă sau amprentarea filogenetică) pentru identificarea regiunilor care au probabilitate mai mare de a funcționa ca și elemente reglatoare

2. Metodele experimentale in vitro și in vivo pentru validarea funcționalității secvențelor polimorfe identificate prin analiza computațională au drept scop: înțelegerea interacțiunilor dintre complexe proteice și secvența ADN a promotorului (folosind metode precum: analiza diferenței de electromobilitate - EMSA, analiza hipersensibilității la DNA-ză I (analiza HD), imunoprecipitarea cromatinei - CHIP - sau metoda de imunoprecipitare a cromatinei cuplată cu microarray - CHIP-chip) și înțelegerea modului cum aceste interacțiuni între factorii de transcripție și promotor afectează nivelul expresiei genice (analiza activității genelor reporter, qRT-PCR, microarray). Toate aceste strategii experimentale se întrepătrund pentru a înțelege cum complexe proteice interacționează cu promotorul genei respective pentru a forma complexul de inițiere a transcripției care este primul pas spre producția de ARNm.

În scopul identificării unor factori genetici care controlează nivelul speciilor reactive ale oxigenului, studiul de literatură efectuat a identificat 3 gene candidat:

- **EC-SOD (SOD3)**
- **C/EBP α**
- **C/EBP β**

ce corespund proteinelor: superoxid dismutaza extracelulară (EC-SOD) și izoformelor α respectiv β a proteinelor de legare a stimulatorului CCAAT (C/EBP α respectiv C/EBP β)

care sunt implicate în modularea nivelului speciilor reactive ale oxigenului.

I.3.3.1. Gena *EC-SOD (SOD₃)*- factor implicat în controlul ROS la nivel vascular

EC-SOD (SOD3) umană localizată la nivelul cromozomului 4p16.3-q21 [150] constă din trei exoni și doi introni și codifică o metaloproteină homotetramerică cu masa subunității monomerice de 135 KDa [151]. Această proteină face parte din familia superoxid dismutazelor (SOD). Enzimele SOD, așa cum s-a

precizat anterior, catalizează reacția de dismutație a anionului superoxid. Cele trei enzime care fac parte din această familie sunt: CuZn-SOD (SOD-1), Mn-SOD (SOD-2) și EC-SOD (SOD-3). Acestea sunt compartimentalizate într-un mod care eficientizează acțiunea concertată a celor trei enzime în dismutația anionului superoxid: Cu, Zn – SOD are localizare citosolică, Mn-SOD are localizare mitocondrială și EC-SOD are localizare extracelulară. Deoarece compartimentalizarea anionului superoxid are repercursiuni asupra efectului oxidant total, localizarea specifică a enzimelor SOD are o semnificație deosebită în apărarea antioxidantă a organismului. EC-SOD este o glicoproteină ancorată de suprafața membranei celulare prin intermediul domeniului său de legare la heparină care-i conferă afinitate pentru heparan sulfat și alți proteoglicani din membrana celulară și din matrix.

EC-SOD a fost detectată pentru prima dată în plasmă, limfă, ascite și lichidul cefalorahidian [152]. Un studiu efectuat de Folz și Crapo [153] a arătat că inima, placentă, pancreasul și plămânii sunt organele cu cea mai ridicată expresie EC-SOD, în timp ce creierul și ficatul au cel mai scăzut nivel de expresie al EC-SOD.

La nivel vascular, EC-SOD este secretată în principal din celulele mușchiului neted vascular și distribuită la nivelul peretelui vascular în funcție de afinitatea enzimei pentru heparan sulfat și collagen I, regăsindu-se în concentrații mari la nivelul endoteliului și al intimei arteriale [154,155]. EC-SOD este principala izoformă SOD din artere datorită activității sale care este de aprox. 100 de ori mai mare în artere și aorta toracică comparativ cu mușchiul scheletic sau țesutul adipos [153,154] și reprezintă 70% din activitatea tuturor enzimelor SOD în aorta [154]. În acest fel, prin localizarea sa strategică între endoteliu și mușchiul vascular EC-SOD protejează NO de atacul radicalului superoxid în timpul difuziei acestuia din endoteliu, făcându-l disponibil pentru manifestarea efectului vasodilatator [156-159]. Referitor la EC-SOD care este cel mai puțin studiat membru al familiei EC-SOD se știu puține lucruri despre structura, reglarea și funcțiile acestei proteine. ADNc corespunzător EC-SOD codifică o secvență peptidică de 240 de aminoacizi care include 18 aminoacizi corespunzători peptidei semnal și 220 aminoacizi corespunzători proteinei mature [160]. Proteina matură EC-SOD cuprinde trei domenii funcționale (vezi fig.25):

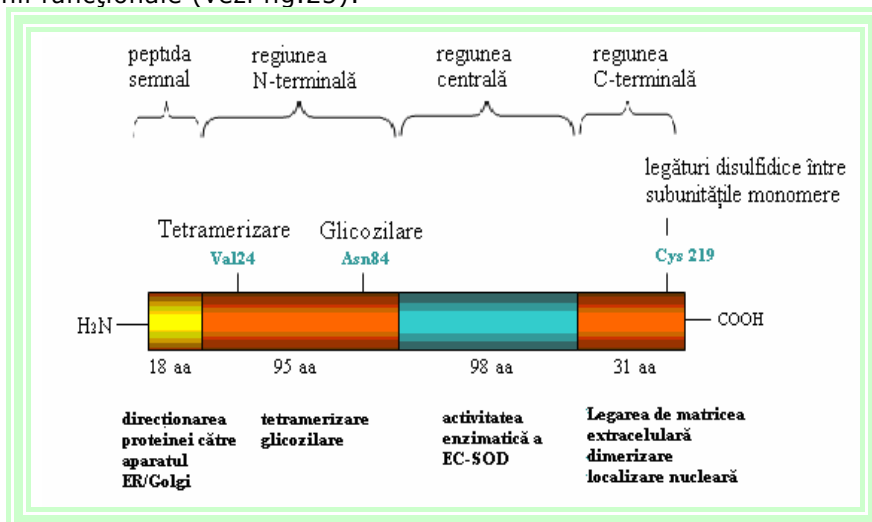


Fig. 25. Domeniile funcționale ale proteinei EC-SOD

1.Capătul N-terminal este responsabil de structura cuaternară a proteinei prin formarea punților disulfidice între unitățile monomerice [161].

2.Domeniul central prezintă similaritate de aprox. 50% cu o parte din secvența proteinei Cu,Zn-SOD [160]. La nivelul regiunii centrale a EC-SOD se conservă resturile de aminoacizi esențiale pentru legarea Cu și Zn identificate și la nivelul enzimei Cu,Zn-SOD. La nivelul regiunii omoloage din Cu,Zn-SOD există 4 resturi de cisteină iar la nivelul EC-SOD s-au identificat 6 resturi de cisteină [160,161]. Peteresen și Engild [161] au arătat că în funcție de legăturile intramoleculare formate există mai multe izoforme EC-SOD.

3.Capătul C-terminal este format din resturi de aminoacizi care-i conferă un caracter hidrofilic pronunțat [160]. Datorită conținutului mare de resturi de Arg și Liz, această regiune este susceptibilă la atacul proteazelor specifice pentru resturile bazice [161]. Regiunea C-terminală este implicată în localizarea enzimei în spațiul extracelular, deoarece prezența resturilor bazice de Arg și Liz favorizează legarea enzimei la heparan sulfat, alți glicozaminoglicani și collagen I [162] ducând la distribuirea enzimei în matrix în funcție de afinitatea enzimei pentru anumiți liganzi. Legarea acestora este determinată de 6 resturi Arg²¹⁰-Liz-Liz-Arg-Arg-Arg [161, 163, 164] care formează domeniul de legare la heparină (HBD-heparin binding domain) și este dependentă de pH [165] [161]. Există mai multe posibilități de reglare a EC-SOD atât la nivel transcripțional, cât și la nivel translațional sau posttranslațional. Mecanismul de reglare a activității enzimatice se bazează pe formarea mai multor tetrameri EC-SOD cu activitate enzimatică diferită [163] datorită celor două tipuri diferite de subunități: o formă activă (aEC-SOD) și una inactivă (iEC-SOD) care determină existența a 5 tetrameri cu activitate diferită.

Cele două forme EC-SOD diferă prin punțile de sulf intramoleculare ce se formează între resturile de cisteină existente în secvența de aminoacizi a EC-SOD, în cazul formei active structura obținută fiind mai compactă [161]. Nu se știe cu exactitate care este cauza exactă și rolul acestei forme inactive a EC-SOD, dar este posibil ca această variantă inactivă a EC-SOD să aibă o altă funcție, ținând cont de faptul că proteinele care au punți de sulf la Cys vicinale participă la transferul de electroni sau funcționează ca molecule cheie de reglare a anumitor procese [161].

Controlul localizării celulare a EC-SOD se face prin proteoliza domeniului C-terminal (Glu209 este aminoacidul terminal) care duce la scăderea afinității enzimei pentru heparan sulfați și respectiv pentru suprafața celulară sau matrix. Scindarea proteolitică a domeniului C-terminal cu pierderea domeniului de legare de heparină și a afinității pentru matrix sau suprafața celulară facilitează pătrunderea formei trunchiate în vasculatură prin capilare și fluxul limfatic [166]. Există dovezi că proteoliza are loc intracelular imediat înainte de secreția proteinei în spațiul extracelular [167,168].

La nivelul genei EC-SOD au fost studiate câteva polimorfisme. Cel mai intens studiată a fost mutația Arg213Gly care cauzează o creștere a nivelului plasmatic al EC-SOD de 8-15 ori [169] fiind investigată pentru asociere cu ateroscleroza [170]. Efectul acestui polimorfism se datorează faptului că substituția Arg cu Gly modifică afinitatea pentru heparină și pentru suprafața endoteliului vascular. O altă mutație identificată la nivelul genei SOD3 a fost Thr40Ala, care nu afectează capacitatea de legare de heparină [169].

Controlul expresiei genei EC-SOD este un domeniu puțin studiat și nu se cunosc încă mecanismele de reglare a expresiei EC-SOD [171]. Implicarea directă a enzimei în dismutarea anionului superoxid, precum și implicarea

acestea în diferite patologii cardiovasculare [172] au condus la selectarea genei *EC-SOD* ca fiind unul dintre factorii cei mai importanți ce pot exercita un control adecvat asupra nivelului speciilor reactive ale oxigenului din organismul uman.

I.3.3.2. Genele ce codifică factorii de transcripție C/EBP α și C/EBP β - implicate în reglarea speciilor reactive ale oxigenului la nivelul țesutului adipos

Familia CCAAT de factori de transcripție fac parte din categoria factorilor de transcripție din categoria bZIP și acționează ca reglatori ai diferențierii celulare. Prin acțiunile lor de activare a transcripției unor gene, ei joacă un rol important în homeostazia glucozei, adipogeneză și inflamație. Factorii de transcripție din familia C/EBP au o structură modulară formată dintr-un domeniu de transactivare (fig.26) situat în capătul N-terminal, un domeniu de legare ADN și un domeniu de dimerizare de tip fermoar de leucină (bZIP) [173].

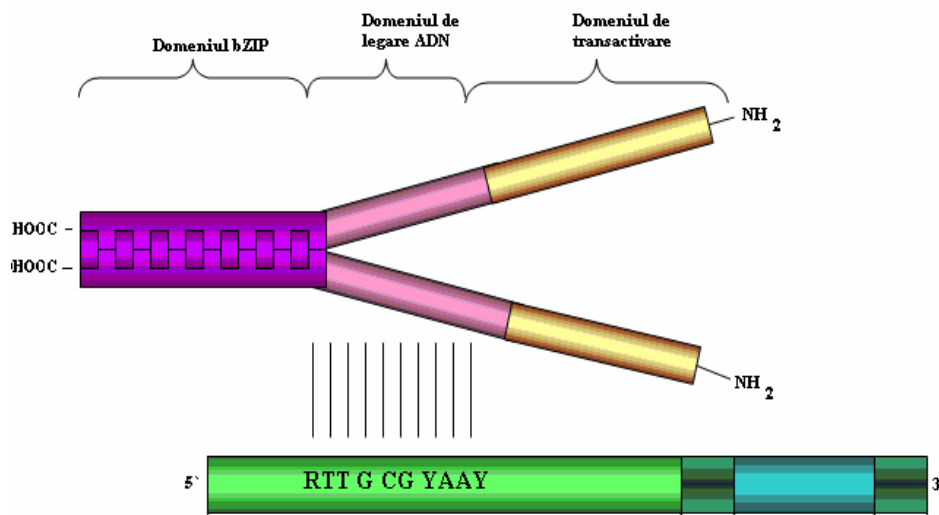


Fig.26. Modul de acțiune a factorilor de transcripție din familia C/EBP pentru reglarea transcripției genelor

Aceste proteine se leagă la secvența consens de recunoaștere a C/EBP: RTTGCGYAAY (R=A sau G; Y=C sau T) aflată în promotorii genelor care trebuie transcrise. Factorii de transcripție din această categorie acționează ca dimeri (homo- sau heterodimeri) [174,176]. Domeniul bZIP al factorilor de transcripție ai membrilor din familia C/EBP este alcătuit din 7 resturi de leucină și pot dimeriza cu factori de transcripție din aceeași familie sau cu alți factori bZIP (precum NF-kB sau cei din familia Fos/Jun [173] prin interacțiuni electrostatice sau punți disulfidice.

Membrii familiei C/EBP prezintă omologie structurală și funcțională, dar diferă prin specificitatea de țesut și capacitatea de transactivare [173]. La ora actuală sunt cunoscuți 5 membri ai acestei categorii (α , β , γ , ϵ , δ și ξ) care sunt prezentați pe scurt în tabelul 4. Exceptând C/EBP ϵ și C/EBP ξ , ceilalți membri ai

familiei C/EBP sunt sunt codificați de gene fără introni [173]. Mai multe proteine C/EBP α și β rezultă prin translația alternativă din ARNm corespunzător C/EBP α și C/EBP β generate de existența mai multor codoni AUG care generează proteine care au domeniul N-terminal trunchiat [173-177].

Tabel 4. Familia de proteine C/EBP

Factor de transcripție	Caracterizare	Alte nume
C/EBP α 19q13.1	Implicată în reglarea IRS1, GLUT4, acetyl-CoA carboxilaza, rezistina, leptina, adiponectina, stearoil-CoA desaturaza. acid gras sintetaza , receptorul nuclear X	C/EBP α
C/EBP β 20q13	Reglează expresia genei IL-6	NF-IL6, IL-6DBP CRP2, AGP-EBP, NF-M, ApCEBP
C/EBP γ ?	Dimerizează cu ceilalți membri ai familiei C/EBP și inhibă transcripția	Ig/EBP
C/EBP δ 8p11.2-p11.1		CELF, CRP3, RcCEBP2
C/EBP ϵ 14q11.2	Este prezent numai în linia mieloidică;este reglator vital al granulopoiezei . Îi lipsește domeniul de transactivare și acționează ca o izoformă dominant negativă	CRP1
C/EBP ξ 12q13.1-q13.2	Este o izoformă dominant negativă; dimerizează cu C/EBP δ , C/EBP β C/EBP α și inhibă expresia genelor	CHOP-10 Gaad 153

Gena corespunzătoare C/EBP α uman conține un singur exon ce codifică 356 de aminoacizi [178]. La nivelul secvenței de ARNm (GeneBank NM_00434) există 4 codoni de start AUG în cadrul de citire. Utilizând acești codoni start pentru inițierea translației, se obțin 4 proteine diferite: p42^{C/EBP α} , p38^{C/EBP α} , p30^{C/EBP α} , p20^{C/EBP α} . Mecanismul implicat în translația acestor izoforme dintr-o singură secvență de ARNm nu este încă elucidat complet. Mecanismul propus se bazează pe o greșeală de scanare ribozomală ca și în cazul C/EBP β .Gena corespunzătoare C/EBP β uman este o genă fără introni al cărei ARNm generează mai multe izoforme [175]. Existența acestor izoforme multiple este importantă pentru reglarea diferitelor procese. Flodby et al. [179] a arătat că izoformele C/EBP β cu masă moleculară mică sunt induse ca răspuns la hepatectomie sugerând rolul lor în proliferarea celulelor hepatice. Izoformele p20^{C/EBP β} (proteina inhibitoare specifică ficatului-LIP) și p35^{C/EBP β} (proteina activatoare specifică ficatului, LAP) au fost investigate privind contribuția lor în procesul de adipogeneză. Proteina p35^{C/EBP β} induce

diferențierea adipocitelor 3T3-L1, iar supraexpesia izoformei p20^{C/EBPβ} în timpul procesului de diferențiere inhibă p35^{C/EBPβ} ducând la inhibarea diferențierii adipocitelor [180]. Mecanismul propus este cel al unei greșeli de scanare ribozomală [181,182] la care mai contribuie și alte mecanisme [183,184].

Expresia celor doi factori de transcripție este reglată ca răspuns la diferiți factori: citokine, mitogeni, hormoni, nutrienți sau stres oxidativ. Reglarea are loc la diverse nivele: transcripțional, translațional, prin interacțiuni cu alte proteine, prin fosforilare-defosforilare, etc [185]. C/EBP α a fost identificat la nivelul țesutului adipos, ficat, intestin, plămân și placenta [186]. În țesutul adipos și ficat, în celulele diferențiate, nivelul de ARNm al C/EBP α este cel mai ridicat. C/EBP β este exprimată în ficat, intestin, placenta, țesut adipos, splină, rinichi [185]. Acești factori de transcripție joacă un rol important în homeostazia glucozei, în diferențierea și proliferarea celulară celulară (adipocite, celule mieloidice, hepatice) și inflamație:

1. Factorii de transcripție C/EBP α și C/EBP β sunt reglatori majori ai adipogenezei. Procesul de adipogeneză este procesul în care preadipocitele se transformă în celule adipocite mature [187]. Celulele precursora (preadipocite și fibroblaști pluripotenți) se pot diferenția la adipocite mature [188] în prezența unor stimuli hormonal (insulină, glucocorticoizi) sau a unor fosfodiesteraze care cresc nivelul de cAMP [180]. Stimularea preadipocitelor cu factori de creștere duce la formarea adipocitelor mature care acumulează lipide și exprimă markeri specifici cum sunt leptina și adiponectina [187]. Mecanismul complex de reglare a procesului de adipogeneză implică 3 clase mari de factori de transcripție: PPAR γ (receptor hormonal nuclear numit proliferator peroxizomal), C/EBP și ADD1/SREBP-1c (element de diferențiere și determinare a adipocitelor/proteina de legare a elementului care răspunde la sterol-1c). Procesele care au loc în adipogeneză au fost studiate pe diverse culturi celulare și au fost evidențiate mai multe etape. În preadipocite, expresia C/EBP α este suprimată atât la nivel de promotor cât și la nivel de cromatină. Inducerea adipogenezei se face folosind insulină, dexametazonă (glucocorticoid) sau metilizobutilxantina (MIX) care dau semnalul expansiunii clonale mitotice. Dexametazona activează direct C/EBP δ , iar metilizobutilxantina activează C/EBP β [186]. Preadipocitele supuse inducerii urmează câteva cicluri de diviziune celulară. După 1 sau 2 cicluri de diviziune (trecând de G1-S), preadipocitele intră în faza G0 a ciclului celular, unde sunt forțate să se diferențieze la celule adipocite mature. C/EBP β este un factor care apare în etapele timpurii ale procesului de expansiune clonală și este absolut necesar pentru desfășurarea procesului de adipogeneză, deoarece el acționează ca un activator transcripțional atât al PPAR γ cât și al C/EBP α [189]. PPAR γ heterodimerizează cu receptorul acidului retinoic (RXR) pentru a exercita un rol cheie în funcționarea celor mai multe gene specifice adipocitelor [187] așa cum sunt enhancerii ai PEPCK (fosfoenolpiruvatcarboxikinazei) [190]. Produsul corespunzător genei C/EBP α nu este detectabil decât în stadiile târzii ale procesului de adipogeneză [191-192]. Ambele izoforme p42^{C/EBP β} și p30^{C/EBP β} sunt prezente în etapa de diferențiere, dar izoforma p30^{C/EBP β} se exprimă înaintea izoformei p42^{C/EBP β} care este singura capabilă să termine expansiunea clonală [194] prin transactivarea promotorilor unor gene specifice adipocitelor mature. Odată ce creșterea celulară este oprită, expresia genelor C/EBP β și C/EBP δ se reduce [195], iar etapa de diferențiere terminală necesită, pe lângă C/EBP α și ADD1/SREBP-1c care activează PPAR γ [195-196] iar aceștia prin

legare la RXR activează C/EBP α [197]. La rândul său, C/EBP α reglează expresia PPAR γ . C/EBP α activează foarte multe gene printre care IRS1 [198], GLUT4 [199], acetyl-CoA carboxilaza [200], rezistina [201], leptina [202], adiponectina [203], stearyl-CoA desaturaza [204], acid gras sintetaza [198], receptorul nuclear X din ficat ce reglează sinteza de colesterol și preluarea glucozei la nivelul ficatului [205,206].

2. În afară de rolul lor major în adipogeneză, cei doi factori de transcripție în discuție sunt reglatori cheie ai metabolismului glucozei. Factorul de transcripție C/EBP α a fost denumit „reglator central al metabolismului energetic” [195]. Acest lucru este valabil și pentru C/EBP β , ambele fiind implicate în reglarea expresiei a numeroase gene implicate în metabolismul glucozei. Mecanismele exacte implicate nu sunt cunoscute, dar sunt câteva date experimentale care dovedesc implicarea celor doi factori în metabolismul glucozei. Funcționarea deficitară a C/EBP α la șoareci transgenici a avut ca efect moartea imediat după naștere și scăderea expresiei de glicogen sintază, glucozo-6-fosfatază, fosfoenolpiruvat kinaza, tirozinaminotransferază [195]. Șoarecii la care ficatul nu exprimă C/EBP α (-/-) prezintă o scădere a expresiei enzimelor implicate în sinteza de glicogen, gluconeogeneză și detoxifierea bilirubinei [195]. Modelele animale murine C/EBP α (-/-) prezintă o scădere a expresiei hepatice de glucokinază și intoleranță la glucoză [207] care sunt premisele pentru dezvoltarea diabetului zaharat de tip 2. Studiile in vitro efectuate pe celule de adipocite 3T3-L1 complet diferențiate au arătat că TNF- α [208] și insulina [209] suprimă expresia C/EBP α .

Gluconeogeneza este reglată de insulină și de glucocorticoizi prin intermediul factorului de transcripție C/EBP β . Acesta transactivează genele fosfoenolpiruvat carboxilaza (PEPCK), tirozinaminotransferază și acetyl-CoA carboxilază [210]. PEPCK este o enzimă cheie în controlul gluconeogenezei. Reglarea PEPCK (inhibarea acesteia prin insulină și stimularea acesteia prin glucagon) se face la nivel transcripțional prin intermediul C/EBP β . Semnalizarea insulinică prin calea PKB duce la incapacitatea de a se forma un complex proteic din C/EBP β și o proteină acivatoare p300/CBP care are drept consecință incapacitatea complexului de a se lega de elementele de răspuns la insulină existente în promotorul PEPCK, deci incapacitatea C/EBP β de a activa transcripția PEPCK [211]. Transcripția PEPCK este activată prin intermediul cAMP mediată de unitatea de răspuns la cAMP (CRU) [212].

La rândul său cAMP poate activa proteinkinaza A (PKA) care stimulează expresia factorului de transcripție CREB (proteina de legare a elementului de răspuns la cAMP). CREB controlează transcripția C/EBP β [213]. De asemenea s-a sugerat că insulina controlează expresia C/EBP β și prin creșterea nivelului de proteină trunchiată p20^{C/EBP β} [214] în defavoarea izoformei p35^{C/EBP β} [215].

3. Factorii C/EBP α și C/EBP β au un rol important în procesul inflamator. Inflamația este răspunsul fiziologic al organismului la infecții sau lezare tisulară. Acest proces este însoțit de un răspuns de fază acută în care se modifică expresia mai multor proteine (TNF- α , IL-6, receptori, molecule de adeziune și proteine de fază acută precum fibrinogen, albumină). Factorii C/EBP α și C/EBP β au un rol important în reglarea expresiei acestor proteine de fază acută. La nivelul ficatului, a țesutului adipos și plămânului, C/EBP β este indus de stimuli inflamatori precum lipopolizaharide sau citokine, în timp ce C/EBP α este represat [216]. C/EBP β este reglator a anumitor gene ale proteinelor de fază acută ca răspuns la semnalul dat de IL-1 și IL-6, C/EBP β fiind factorul de transcripție specific al IL-6 identificat pentru prima dată ca

mediator al semnalizării IL-6 legându-se la promotorii proteinelor de fază acută de anumite secvențe cunoscute ca elemente de răspuns la IL-6 [173].

Prin implicarea acestor două proteine în reglarea anumitor procese importante pentru homeostazia glucozei, a unor procese implicate în reglarea funcției insulinei, adipogeneză, coagulare și metabolismul acizilor grași și a lipoproteinelor plasmatiche, C/EBP α și C/EBP β se constituie într-o echipă care coordonează reglarea factorilor hemostatici și a proceselor care sunt comune pentru dezvoltarea sindromului metabolic, diabetului zaharat și a bolilor cardiovasculare. Și în cazul celor două gene C/EBP α și C/EBP β , variantele genetice pot influența atât expresia proteinelor respective, cât și funcționalitatea acestora manifestată la nivelul reglării genelor țintă ale acestora care contribuie la dezvoltarea patologiei specifice sindromului metabolic, bolilor cardiovasculare sau diabetului.

În concluzie, studiile de literatură arată că factorii genetici precum EC-SOD, care se implică direct în reglarea nivelului ROS din organism prin catalizarea reacției de dismutație a anionului superoxid, sau genele C/EBP α și C/EBP β , care reglează indirect nivelul ROS prin implicarea lor în procesele descrise anterior, se dovedesc a fi factori modulatori importanți ai nivelului ROS, factori ce pot fi controlați la rândul lor prin mecanisme biochimice induse, pentru a crește capacitatea organismului de a menține aceste specii reactive la echilibru și pentru a restabili funcția endotelială, prevenind astfel dezvoltarea sindromului metabolic, a bolilor cardiovasculare și diabetului.

PARTEA A II-A CONTRIBUȚII PERSONALE

II.1. Principiul experimental

În cadrul tezei de față au fost urmărite două direcții de cercetare în scopul de a investiga anumiți factori implicați, direct sau indirect, în controlul speciilor reactive ale oxigenului. Cele două direcții de cercetare (fig.27) corespund la două modalități importante de control a nivelului speciilor reactive ale oxigenului în organism:

1. creșterea capacității organismului de neutralizare a speciilor reactive ale oxigenului prin administrarea unor alimente cu capacitate antioxidantă mare la subiecții cu sindrom metabolic
2. prin identificarea unor noi posibilități de reglare fină a nivelului ROS prin reglarea expresiei genelor **EC-SOD, C/EBP α , C/EBP β** care sunt factori genici importanți în modularea nivelului ROS.

Prima direcție de cercetare a urmărit:

- a. obținerea unor extracte din plante medicinale și aromatice și caracterizarea acestora din punct de vedere al conținutului în acizi fenolici, în metale și din punct de vedere al capacității antioxidante
- b. obținerea unor alimente cu activitate antioxidantă mare în vederea administrării acestora în dieta subiecților cu sindrom metabolic
- c. evaluarea efectelor administrării dietei la subiecții cu sindrom metabolic prin determinarea unor parametri metabolici (indicele de rezistență la insulină IR-HOMA, adiponectin, leptina, interleukina-6, factorul de necroză tumorală TNF- α), a capacității antioxidante a plasmii, a nivelului de specii reactive ale oxigenului din sângele periferic, precum și a parametrilor de progresie a aterosclerozei (grosimea peretelui arterial)

Pentru realizarea obiectivelor specifice primei direcții de cercetare s-au folosit metode chimice și biochimice precum spectroscopia UV-VIS, HPLC, DPPH, FRAP, Folin-Ciocalteu, ELISA, metoda chemiluminescentă pentru determinarea capacității antioxidante a plasmii sangvine, metoda FORT pentru determinarea nivelului de specii reactive ale oxigenului din sângele periferic al subiecților.

Pentru realizarea obiectivelor specifice celei de-a doua direcții de cercetare s-a utilizat o gamă foarte largă de tehnici de **biologie moleculară** și **inginerie genetică**, analiza funcțională a secvenței ADN a celor trei factori genici (EC-SOD, C/EBP α , C/EBP β) apelând la mijloace moderne precum: identificarea de noi polimorfisme la nivelul secvenței ADN corespunzătoare celor trei gene folosind tehnica DHPLC (cromatografia de lichid de înaltă performanță cu denaturare) mai exact metoda Transgenomic WAVE™ DNA Fragment Analysis, care este relativ nouă la nivel mondial și care, conform literaturii consultate, nu a mai fost folosită la noi în țară. Rezultatele acestei metode și a altor metode de genotipare folosite (RFLP) au fost validate prin secvențializarea ADN. După evidențierea polimorfismelor la nivelul celor trei gene s-a realizat o analiză statistică a rezultatelor în vederea identificării unor asocieri ale frecvenței acestor polimorfisme cu ateroscleroza sau alți factori de risc cardiovascular.

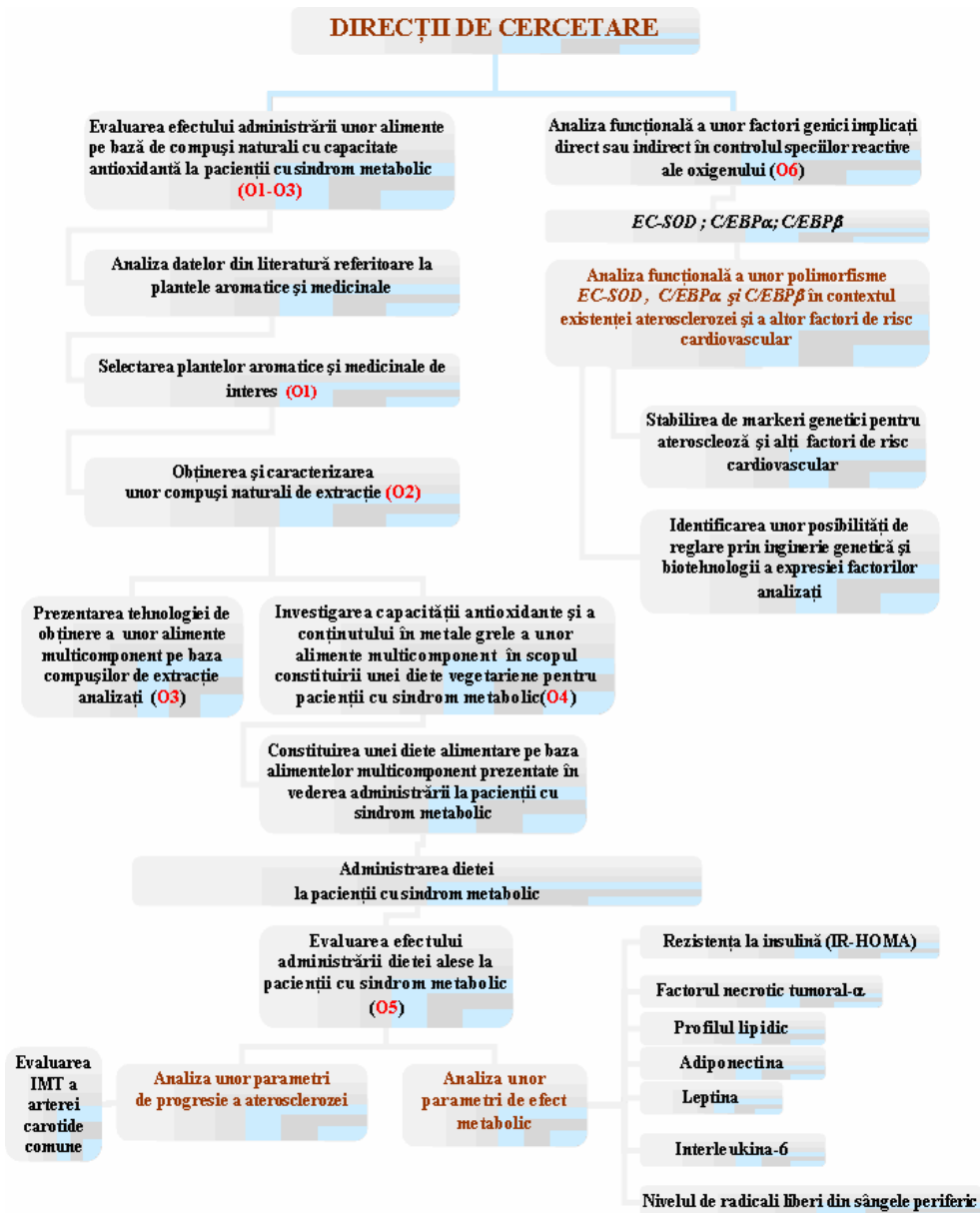


Fig.27. Principalele direcții de cercetare în cadrul tezei

Pentru identificarea factorilor de transcripție cu potențial reglator mare asupra expresiei celor trei gene, s-a utilizat analiza funcțională a secvenței ADN normală și mutantă a promotorului unei gene, strategie nouă în România. Mutageneza dirijată s-a folosit pentru modificarea secvenței ADN și crearea unui plasmid mutant cu aplicabilitate în biotehnologie prin folosirea lui ulterioară în scopul modificării expresiei genei C/EBPβ in vitro și in vivo. Funcționalitatea unor polimorfisme identificate la nivelul C/EBPα și a factorilor

de transcripție al căror situs de legare cuprinde situsul polimorfic a fost evaluată prin tehnici experimentale precum: transfecții celulare stabile cu plasmide ce conțin secvențele normale și mutante, analiza activității genei reporter (Dual-Luciferase® Reporter Assay System) aflată sub controlul promotorului genei normale și mutante în aceste celule, precum și analiza șiftului de electromobilitate (EMSA) pentru aprecierea legării in vivo a factorilor de transcripție nucleari la secvențele normale și mutante de interes.

II.2. Obținerea, identificarea și caracterizarea unor compuși naturali de extracție din plante medicinale și aromatice

În cadrul acestui obiectiv am urmărit obținerea extractelor de cătină, rozmarin, ghimbir, coacăze negre, armurariu, busuioc, angelica, coriandru, magheran, arnică, pufuliță și păpădie din diverse materiale vegetale și le-am caracterizat din punct de vedere al principiilor active existente, al capacității lor antioxidante și din punct de vedere al conținutului metalic în vederea selectării extractelor cu capacitatea antioxidantă cea mai mare și conținutul în microelemente optim. Am selectat plantele medicinale și aromatice așa încât să nu conțină metale grele peste limitele naționale admise.

II.2.1. MATERIALE ȘI METODE

II.2.1.1. Obținerea extractelor de cătină, rozmarin, ghimbir, coacăze negre, armurariu, busuioc, angelica, coriandru, magheran

S-a folosit fie material vegetal uscat obținut din comerț (angelica, arnica, armurariu, pufuliță, păpădie, salvie, busuioc, coriandru, rozmarin, rădăcină de ghimbir uscată), fie direct materialul vegetal umed (coacăze, cătină), măcinate cu un blender. Materialul vegetal a fost constituit din:

- | | |
|-----------------------------------------------------------------|--------------------|
| 1. Angelica (<i>Angelica Archangelica</i>) | -tulpină și frunze |
| 2. Arnica (<i>Arnica Montana</i>) | -flori |
| 3. Armurariu (<i>Silybum marianum</i>) | -semințe |
| 4. Busuioc (<i>Ocimum Basilicum</i>) | -tulpină și frunze |
| 5. Coacăze (<i>Ribes Negrum</i>) | -fructe |
| 6. Coriandru (<i>Coriandrum sativum</i>) | -fructe |
| 7. Cătină (<i>Hippophae rhamnoides</i>) | -fructe |
| 8. Ghimbir (<i>Zingiber officinale</i>) | -rădăcină uscată |
| 9. Măghiran (<i>Majorana hortensis sau Origanum majorana</i>) | -tulpină și frunze |
| 10. Pufuliță (<i>Epilobium Hirsutum</i>) | -tulpină și frunze |
| 11. Păpădie (<i>Taraxacum officinale</i>) | -frunze |
| 12. Rozmarin (<i>Rosmarinus officinalis</i>) | -tulpină și frunze |
| 13. Salvie (<i>Salvia Officinalis</i>) | -tulpină și frunze |

S-au realizat două variante de extracție a principiilor active din aceste plante:

- a. Extracție în alcool etilic 35% (macerare pe durata a 5 zile cu agitare intermitentă) la temperatura ambiantă (23-25 °C) folosind 100g de plantă uscată sau umedă la 1000 ml de solvent.
- b. Extracție în oțet de mere cu miere 9% obținut prin fermentație acetică la S.C. Acetica Bistrița (produs comercial) (macerare pe durata a 5 zile cu agitare intermitentă) la temperatura ambiantă (23-25°C) folosind 100g de plantă uscată sau umedă la 1000 ml de solvent.

După macerare, amestecurile au fost filtrate și filtratul a fost menținut la 4°C până la efectuarea analizelor.

II.2.1.2. Caracterizarea extractelor de cătină, rozmarin, ghimbir, coacăze negre, armurariu, busuioc, angelica, coriandru, magheran, arnică, pufuliță și păpădie

II.2.1.2.1. Identificarea unor compuși cu activitate antioxidantă prezenți în extractele obținute

II.2.1.2.1.1. Spectroscopia UV-VIS

Acizii hidroxicinamici au maxime de absorbție în două regiuni spectrale: 225-235 nm și 290-330 nm [217]. La 320 nm, derivații acidului cinamic pot fi detectați fără interferențe provenind de la derivații acidului benzoic care absorb la 254 nm. Detecția la 280 nm se folosește pentru detecția celor mai mulți compuși fenolici [218]. Absorbția între 350-370 este atribuită unor derivați ai flavanolului, iar cea de la 280 nm corespunde compusului flavan 3-ol și glicozide flavonolice [219]. Acidul galic și siringic absorb la 271 nm și respectiv 275 nm [220].

Pentru analiza UV-VIS a extractelor obținute, probele au fost filtrate inițial prin filtru cu frită și introduse în cuve de cuarț (1 cm). Înregistrarea spectrului s-a realizat în domeniul 200-700 nm utilizând spectrofotometrul (ABL JASCO nr. 580).

II.2.1.2.1.2. Cromatografia de lichid de înaltă performanță (HPLC)

HPLC este o tehnică rapidă și sensibilă, capabilă de detecția și cuantificarea compușilor fenolici de interes din extractele obținute din plante medicinale și aromatice. Folosirea unui sistem de solvenți polari, metanol: acid acetic: apă, cu creșterea progresivă a concentrației de metanol în amestecul de solvenți ce reprezintă faza mobilă, precum și a diverselor tipuri de coloane de separare de dimensiuni mici și cu dimensiuni foarte mici ale particulelor din umplutura coloanei, permite separarea compușilor fenolici din plante cu rapiditate și acuratețe. Cuplarea cromatografiei HPLC cu sistemul de detecție DAD (diode array detection) face posibilă detecția la 280 nm a majorității compușilor fenolici din extractele de plante medicinale și aromatice.

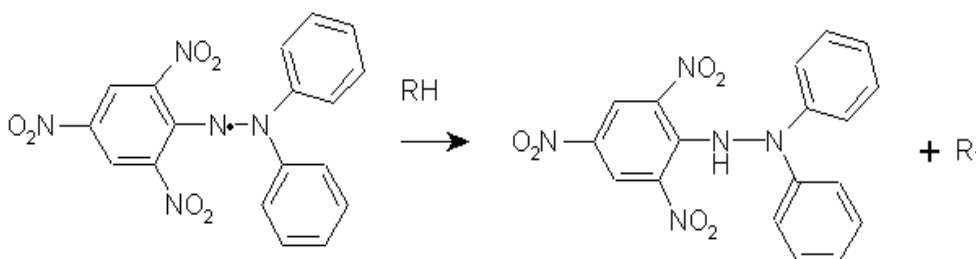
Analiza HPLC s-a realizat la USAMV Cluj în colaborare cu Prof. Dr. Socaciu Carmen în cadrul proiectului CEEX „**Studiul bioactivității sinergice a alimentelor funcționale antioxidante în reversibilitatea sindromului metabolic (met-antiox)**” [221,222]. Analiza s-a realizat pe un sistem cromatografic HPLC-DAD (Waters) folosind o coloană cu fază inversă C18 (cu diametrul particulelor de 5μm și dimensiuni 250x46 mm). Înainte de injecție, probele au fost filtrate pe un filtru de

nylon de 0.4 μm (Milipore. Co). Volumul de injecție a fost de 20 μl . Solvenții folosiți au fost A (metanol: acid acetic glacial: apă = 10:2:88) și solventul B metanol:acid acetic glacial: apă = 90:3:7). Programul de gradient folosit a fost: min 0 - min 20 : solvent B 0%; min.20- min 35 -solvent B de la 0-50%; min. 35-min. 40, solvent B- de la 50 la 100%. Debitul de eluție a fost de 1 mL/min, pH=3.

II.2.1.2.2. Determinarea capacității antioxidante a compușilor naturali de extracție

II.2.1.2.2.1. Metoda DPPH

Metoda DPPH se bazează pe reducerea radicalului liber de 1,1'-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) de către antioxidanții din proba de analizat după reacția:



S-a folosit o soluție etanolică de DPPH (0.1 mM). Soluția alcoolică de DPPH are culoare violet (datorită delocalizării extinse a electronilor la nivelul moleculei) care se decolorează în galben pal pe măsură ce reacția avansează. Soluția de DPPH se păstrează la întuneric până în momentul folosirii sau se prepară proaspăt. La 2.9 ml de soluție DPPH s-au adăugat 0.1 ml soluție din fiecare extract. După 30 de min. de incubare la temperatura camerei s-au măsurat absorbanțele probelor la 517 nm (spectrofotometru Spectronic 401, Spectronic Instruments) folosind ca martor soluția de etanol folosită la prepararea DPPH. S-a calculat procentul de inhibiție I% ca fiind raportul:

$$I\% = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100$$

unde A_1 reprezintă absorbanta soluției de DPPH, iar A_2 reprezintă absorbanta soluției amestecului de reacție (probă și DPPH) după cele 30 de minute de reacție, ambele măsurate față de soluția de etanol 70% folosită pentru prepararea soluției de DPPH. Dacă absorbanta probelor analizate a fost mai mare decât a celui mai concentrat standard, probele au fost diluate corespunzător și s-a ținut cont de această diluție când s-au făcut calculele. Reducerea DPPH a fost cuantificată pe baza unei curbe standard folosind 5 soluții standard de TROLOX (analog structural al vitaminei E). Rezultatele au fost exprimate în mmol TROLOX/g de substanță uscată.

II.2.1.2.2.2. Metoda FRAP

Metoda FRAP (ferric reducing ability of plasm) se bazează pe reducerea ionului Fe^{3+} din complexul acestuia cu clorura de 2,4,6-tripiridil-s-triazină [(TPTZ) $_2\text{Cl}_3$] de către speciile reducătoare din probă în mediu acid. Sarea feroasă rezultată din reacție are

o culoare albastră intensă a cărei absorbantă poate fi monitorizată la 593 nm. Compoziția reactivului de lucru FRAP: 10 părți soluție tampon acetat 300 mM/L (pH=3.6), 1 parte din soluția 10 mM/L obținută prin adăugarea TPTZ într-o sol. HCl 40 mM/L și o parte 20 mM/L FeCl₃·6HCl. S-au folosit 4 soluții standard Fe²⁺ (sare Mohr) cu concentrații de 0.1μM/mL (S1), 0.2μM/mL (S2), 0.4μM/mL (S3), 0.6μM/mL (S4). Câte 0.5 ml din fiecare soluție standard, respectiv probă s-au adăugat la 2.5 ml reactiv de lucru FRAP în 5 eprubete distincte. Amestecurile astfel preparate s-au menținut 10 min. la temperatura camerei, apoi s-a citit absorbanta probelor la 593 nm față de reactivul FRAP utilizat ca soluție martor (spectrofotometru SPECORD 205, Analytic Jena). Capacitatea antioxidantă totală a extractelor s-a exprimat în μM Fe²⁺/mL, iar în final s-a raportat la masa de material vegetal (μM Fe²⁺/100g).

II.2.1.3. Determinarea conținutului în metale al plantelor medicinale și aromatice

Metoda flamfotometrică

Analiza conținutului în metale a 9 plante medicinale: cătină (fructe), rozmarin (frunze), arnică (flori), coacăze negre (fructe), armurariu (fructe), busuioc (tulpină și frunze), salvie (tulpină și frunze), pufuliță (tulpină și frunze) și păpădie (frunze) s-a realizat utilizând o metodă flamfotometrică. În acest scop, 10 g de plantă uscată (procurate din comerț) au fost calcinate în etuvă timp de 4 ore și aduse la masă constantă. Reziduul a fost adus la un volum de 50 ml cu HNO₃ 0.5 N.

Fructele de coacăze și cătină, precum și extractele hidroalcoolice ale celorlalte plantelor au fost mai întâi uscate și apoi calcinate la masă constantă, după care reziduul a fost adus la un volum de 50 ml cu HNO₃ 0.5 N.

S-a utilizat metoda flamfotometrică (flame atomic absorption spectrophotometry sau FASS) și un flamfotometru CONTRAA-300 (Analytik-Jena). Metoda a fost optimizată pentru analiza plantelor uscate și a extractelor hidroalcoolice la Universitatea de Științe Agricole a Banatului și s-a lucrat în colaborare cu Prof.Dr. Gherghen Ioan [223]. S-a folosit flacăra unui amestec aer-acetilenă (99.99% puritate) într-un raport volumetric optimizat pentru fiecare metal în parte. În condițiile optime alese pentru analiză s-au realizat curbele de calibrare pentru Na, K, Mg, Li, Ca, Fe, Mn, Zn, Cu, Cd, Ni, Pb, Sr și Cr folosind un standard multielement (ICP-standard multielement CertiPUR, sol. IV (Sigma)) cu un conținut de 1000 mg/l din fiecare Ag, Al, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Ga, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Tl, Zn. Coeficienții de corelație au fost cuprinși între 0.9745-0.9891(vezi anexa 3).

II.2.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

S-au obținut extractele de busuioc, angelică, cătină, rozmarin, măghiran, ghimbir, coriandru, coacăze negre, armurariu și salvie în etanol 35% și oțet de mere cu miere 9%. Eficiența extracției în alcool etilic a fost mai mare decât eficiența extracției în oțet de mere cu miere 9%, raportul fiind de 1,3 :1.

Analiza spectrelor UV-VIS

Analiza spectrelor UV-VIS (anexa 1) a extractelor de busuioc, angelică, cătină, rozmarin, măghiran, ghimbir, coriandru, coacăze negre, armurariu și salvie în etanol 35% și oțet de mere cu miere 9% a evidențiat prezența acizilor fenolici în toate extractele analizate (vezi tabelele 5 și 6). S-au identificat acidul galic, protocatecuic, cafeic, clorogenic, sinapic, ferulic, p- și o-cumaric. Tinctura și extractul în oțet de mere cu miere obținute din fructele de coacăze negre au prezentat o bandă caracteristică antocianilor ($\lambda = 525 \text{ nm}$). În afară de prezența acizilor fenolici, în extractele din plante obținute s-au identificat, așa cum era de așteptat și flavonoide. Informațiile referitoare la spectrele amestecurilor analizate au fost folosite împreună cu datele provenite din analiza cromatogramelor HPLC pentru formularea unor concluzii privind identificarea acizilor fenolici care intră în compoziția fiecărui extract.

Tabel 5. Caracteristicile tincturilor din plante medicinale și aromatice în alcool 35% rezultate din analiza spectrelor UV-VIS

Planta	Domeniul de absorbție (nm)	Corespunzător pentru
Angelica	220-283 nm 315-395 nm 525 nm	Acizi fenolici Flavonoide
Armurariu		Acizi fenolici
Busuioc		Acizi fenolici Flavonoide
Coacaze negre		Acizi fenolici Antociani
Coriandru		Acizi fenolici Flavonoide
Cătină		Acizi fenolici
Ghimbir		Acizi fenolici
Măghiran		Acizi fenolici Flavonoide
Cătină		Acizi fenolici Flavonoide
Rozmarin		Acizi fenolici Flavonoide
Salvie		Acizi fenolici Flavonoide

Tabel 6. Caracteristicile extractelor din plante medicinale și aromatice în oțet de mere cu miere 9% rezultate din analiza spectrelor UV-VIS

Planta	Domeniul de absorbție (nm)	Compuși identificați
Angelica	220-283 nm 315-395 nm 525 nm	Acizi fenolici Flavonoide
Armurariu		Acizi fenolici
Busuioc		Acizi fenolici Flavonoide
Coacaze negre		Acizi fenolici Antociani
Coriandru		Acizi fenolici Flavonoide
Ghimbir		Acizi fenolici Flavonoide
Măghiran		Acizi fenolici Flavonoide
Cătină		Acizi fenolici Flavonoide
Rozmarin		Acizi fenolici Flavonoide
Salvie		Acizi fenolici Flavonoide

Analiza cromatogramelor HPLC

Analiza cromatogramelor HPLC ale extractelor s-a realizat prin comparație cu cromatograma HPLC standard (anexa 2) și s-au identificat diferiți acizi fenolici care intră în compoziția acestor extracte (vezi tabelul 7). Cromatograma standard prezintă 8 peak-uri caracteristice celor 8 standarde de acizi fenolici (Sigma Aldrich):

(1) Acid galic:	$t_R = 4.3$ min
(2) Acid protocatecic:	$t_R = 6.7$ min
(3) Acid clorogenic:	$t_R = 13.15$ min
(4) Acid cafeic:	$t_R = 14.18$ min
(5) Acid p-cumaric:	$t_R = 19.9$ min
(6) Acid ferulic:	$t_R = 21.75$ min
(7) Acid sinapic:	$t_R = 22.65$ min
(8) Acid o-cumaric:	$t_R = 25.4$ min

În urma analizei caracteristicilor spectrelor în UV-VIS și cromatogramelor HPLC s-a constatat că:

- în soluția etanolică de armurariu sunt prezenți acidul o- și p-cumaric, în timp ce la soluția acetică de armurariu sunt prezenți acidul protocatecic și acidul cafeic
- extractul de busuioc în oțet conține în plus față de soluția alcoolică acid clorogenic

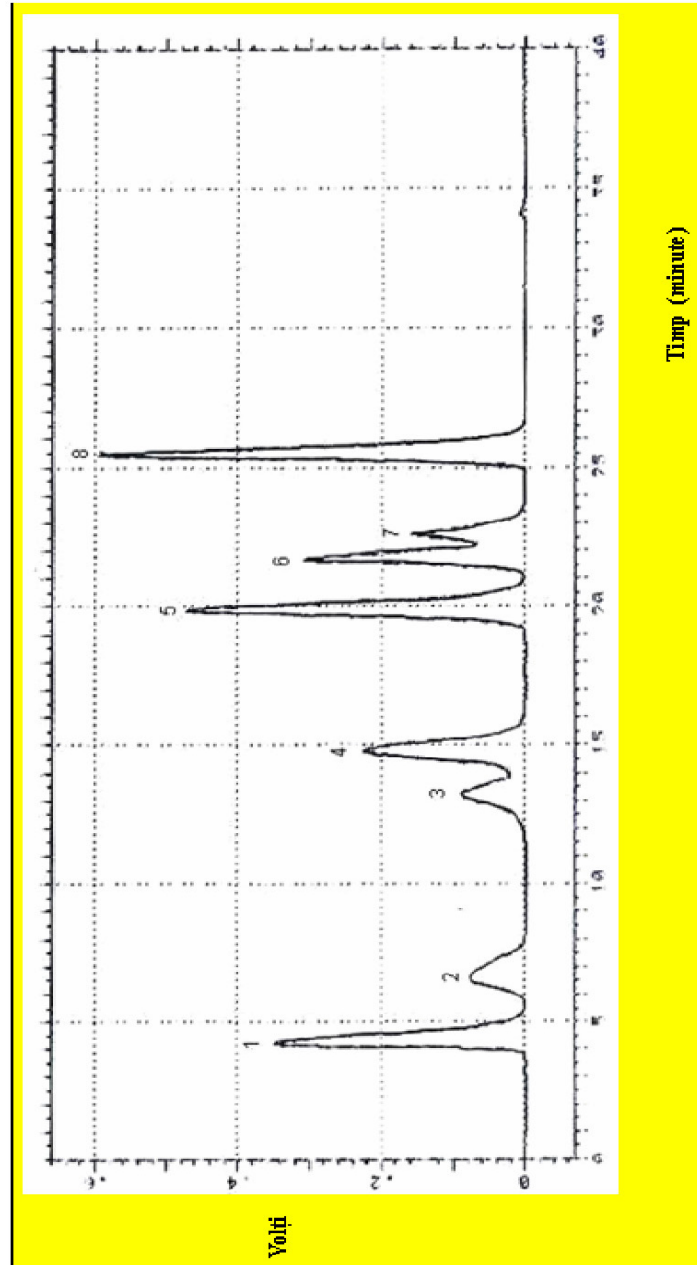


Fig.28. Cromatograma standard pentru acizii hidroxicinamici și timpii de retenție aferenți:
(1) Acid galic- 4.3 min ; (2) Acid protocatecuic- 6.7 min ; (3) Acid clorogenic- 13.15 min; (4) Acid cafeic-14.18 min; (5) Acid p-cumaric-19.9 min; (6) Acid ferulic-21.75 min; (7) Acid sinaptic-22.65 min; (8) Acid o-cumaric 25.4 min

- în extractul etanolic de coacăze s-a identificat acidul p-cumaric și acidul clorogenic care nu au fost identificați la extractul de coacăze în oțet care, în schimb, conține în plus acid cafeic
- în tinctura de ghimbir nu a fost identificat nici unul dintre acizii fenolici de interes, în timp ce în extractul de ghimbir în oțet au fost identificați : acidul galic, acidul o- și p-cumaric
- acidul galic și clorogenic au fost identificați numai la extractul de rozmarin în alcool , în timp ce acidul p-cumaric a fost identificat numai la extractul de rozmarin în oțet.
- extractul alcoolic de angelică nu conține acid protocatecuic, în timp ce extractul alcoolic conține acid protocatecuic.
- extractul de coriandru în oțet conține adițional acizii protocatecuic și clorogenic comparativ cu extractul alcoolic
- extractul de magheran în oțet conține acid cafeic și protocatecuic în plus față de cei ai extractului alcoolic

Tabel 7. Caracteristicile extractelor din plante medicinale și aromatice rezultate din analiza HPLC

Planta	Compuși identificați	
	Extras în alcool 35% (tinctură)	Extras în oțet de mere cu miere 9%
Armurariu semințe	(1)-acid galic: $t_R = 4.2$ min; (3)-acid clorogenic: $t_R = 13.3$ min; (5)-acid p-cumaric: $t_R = 19.9$ min; (6)-acid ferulic: $t_R = 21.6$ min; (7)-acid sinapic: $t_R = 22.3$ min; (8)- acid o-cumaric: $t_R = 25.3$ min.	(1)-acid galic: $t_R = 4.2$ min; (2)-acid protocatecuic: $t_R = 6.8$ min (3)-acid clorogenic: $t_R = 13.0$ min; (4)-acid cafeic: $t_R = 14.2$ min; (6)-acid ferulic: $t_R = 21.6$ min; (7)-acid sinapic: $t_R = 22.7$ min .
Angelica tulpină și frunze	(1)-acid galic: $t_R = 4.5$ min; (3)-acid clorogenic: $t_R = 13.2$ min; (5)-acid p-cumaric: $t_R = 19.9$ min; (6)-acid ferulic: $t_R = 21.8$ min; (7)-acid sinapic: $t_R = 22.6$ min; (8)-acid o-cumaric: $t_R = 25.1$ min;	(1)-acid galic: $t_R = 4.5$ min; (2)-acid protocatecuic: $t_R = 6.8$ min; (3)-acid clorogenic: $t_R = 13.2$ min; (5)-acid p-cumaric: $t_R = 19.9$ min; (6)-acid ferulic: $t_R = 21.8$ min; (7)-acid sinapic: $t_R = 22.6$ min; (8)-acid o-cumaric: $t_R = 25.1$ min;
Busuioc tulpină și frunze	2)-acid protocatecuic: $t_R = 6.7$ min; (4)-acid clorogenic: $t_R = 13.2$ min; (5)- acid cafeic: $t_R = 14.2$ min; (6)-acid ferulic: $t_R = 20.0$ min; (7)-acid sinapic: $t_R = 22.45$ min.	(1)-acid galic: $t_R = 4.3$ min; (2)-acid protocatecuic: $t_R = 6.8$ min; (3)-acid clorogenic: $t_R = 13.1$ min; (4)-acid cafeic: $t_R = 14.2$ min; (5)-acid p-cumaric: $t_R = 19.9$ min; (6)-aci ferulic: $t_R = 21.4$ min; (7)-acid sinaptic: $t_R = 22.4$ min;
Măghiran tulpină și frunze	(3)-acid clorogenic: $t_R = 13.2$ min (5)-acid p-cumaric: $t_R = 19.9$ min; (6)-acid ferulic: $t_R = 21.8$ min.	(2)-acid protocatecuic: $t_R = 6.5$ min; (4)-acid cafeic: $t_R = 14.2$ min; (5)-acid p-cumaric: $t_R = 19.9$ min (7)-acid sinapic: $t_R = 22.3$ min

Tabel 7. Caracteristicile extractelor din plante medicinale și aromatice rezultate din analiza HPLC - Continuare-

Planta	Compuși identificați	
	Extras în alcool 35% (tinctură)	Extras în oțet de mere cu miere 9%
Coriandru tulpină și frunze	(5)-acid p-cumaric: $t_R = 19.9$ min; (6)-acid ferulic: $t_R = 21.4$ min; (7)-acid sinaptic: $t_R = 22.4$ min; (8)-acid o-cumaric: $t_R = 25.0$ min;	(1)-acidul galic: $t_R = 4,2$ min; (2)-acid protocatecuic: $t_R = 6.9$ min; (3)-acid clorogenic: $t_R = 13.1$ min; (6)-acid ferulic: $t_R = 21.5$ min; (7)-acid sinapic: $t_R = 22.3$ min.
Coacăz negru fructe	(1)-acid galic: $t_R = 4.4$ min; (3)-acid clorogenic: $t_R = 13.1$ min; (5)-acid p-cumaric: $t_R = 19.9$ min;	(1)-acidul galic : $t_R = 4.4$ min; (4)-acidul cafeic: $t_R = 14.2$ min;
Cătină fructe	(1)-Acid galic : $t_R = 4.5$ min; (3)-Acid clorogenic: $t_R = 13.2$ min; (5)-Acid p-cumaric: $t_R = 19.9$ min; (6)-Acid ferulic, : $t_R = 21.2$ min; (7)-Acid sinaptic: $t_R = 22.4$ min; (8)-Acid o-cumaric: $t_R = 25.3$ min;	(1)-Acid galic : $t_R = 4.5$ min; (6)-Acid ferulic, : $t_R = 21.2$ min; (8)-Acid o-cumaric: $t_R = 24.9$ min;
Ghimbir rădăcină	În tinctura de ghimbir nu au fost identificați nici unul dintre acizii fenolici urmăriți	(1)-Acid galic : $t_R = 4.2$ min; (5)-Acid p-cumaric : $t_R = 19.9$ min; (8)-Acid o-cumaric: $t_R = 25.4$ min;
Rozmarin tulpină și frunze	(1)-Acid galic: $t_R = 4.3$ min; (3)-Acid clorogenic: $t_R = 13.2$ min; (4)-Acid cafeic: $t_R = 14.4$ min; (6)-Acid ferulic: $t_R = 21.9$ min; (7)-Acid sinaptic : $t_R = 22.7$ min; (8)-Acid o-cumaric: $t_R = 25.3$ min;	(4)-Acid cafeic : $t_R = 14.1$ min; (5)-Acid p-cumaric: $t_R = 20.0$ min; (6)-Acid ferulic: $t_R = 21.5$ min; (7)-Acid sinaptic: $t_R = 22.4$ min; (8)-Acid o-cumaric: $t_R = 25.2$ min;
Salvie tulpină și frunze	(4) acidul cafeic: $t_R = 13.9$ min; (5) acidul p-cumaric: $t_R = 19.9$ min; (6) acidul ferulic: $t_R = 21.4$ min; (7) acidul sinaptic: $t_R = 22.0$ min; (8) acidul o-cumaric: $t_R = 25.4$ min	(1) acidul galic : $t_R = 4.3$ min; (3) acidul clorogenic: $t_R = 13.2$ min; (5) acidului p-cumaric: $t_R = 19.9$ min; (6) acidului ferulic: $t_R = 21.4$ min; (7) acidului sinaptic: $t_R = 22.4$ min; (8) acidului o-cumaric: $t_R = 25.4$ min;

Din cromatograma oțetului de mere cu miere au fost identificate peak-urile acizilor fenolici: (1)-acid galic $t_R = 4.3$ min; (2)- acid protocatecuic $t_R = 6.1$ min și (8) acid o-cumaric $t_R = 25.5$ min. S-a constatat că extractele în oțet de mere cu miere conțin o gamă mai largă de acizi fenolici decât tincturile, pentru majoritatea plantelor analizate.

Determinarea capacității antioxidante

În urma analizelor cromatogramelor HPLC și a comparării între conținutul de acizi fenolici ai diferitelor extracte s-au selectat extractele în oțet și etanol de armurariu, busuioc, coacăze negre, cătină, ghimbir, rozmarin și salvie pentru analiza capacității antioxidante a acestora. Pentru aceasta s-a utilizat metoda DPPH descrisă la capitolul II.2.1.2.2.1. La ora actuală nu există un consens în folosirea acestei

metode, dificultățile de standardizare fiind legate mai ales de complexitatea reacțiilor care au loc care vizează anumite aspecte [224,225]:

- reacția de reducere a radicalului DPP• poate fi reversibilă

$$\text{DPP}^{\bullet} + \text{RH} \leftrightarrow \text{DPPH} + \text{R}^{\bullet}$$
- stoechiometria reacției nu este totdeauna 1:1 dacă ținem cont de faptul că există posibilitatea ca radicalul R• să formeze un compus de tipul R-R (cum este cazul cisteinei) și atunci stoechiometria devine 2:1
- timpul de 30 min.[225] folosit în cele mai multe cazuri, se consideră mai nou a fi insuficient uneori pentru terminarea reacției și se aplică urmărirea reacției până la terminarea ei (când se atinge un platou al absorbanței).

Din această cauză rezultatele acestei metode au fost validate și prin metoda FRAP. Curba de etalonare a folosit 5 standarde TROLOX (analog al vitaminei E) de concentrație 0.25 mM; 0.5 mM; 1 mM; 1.5 mM și 2 mM. Coeficientul de corelație al dreptei a fost $R^2=0.9653$ (fig.29)

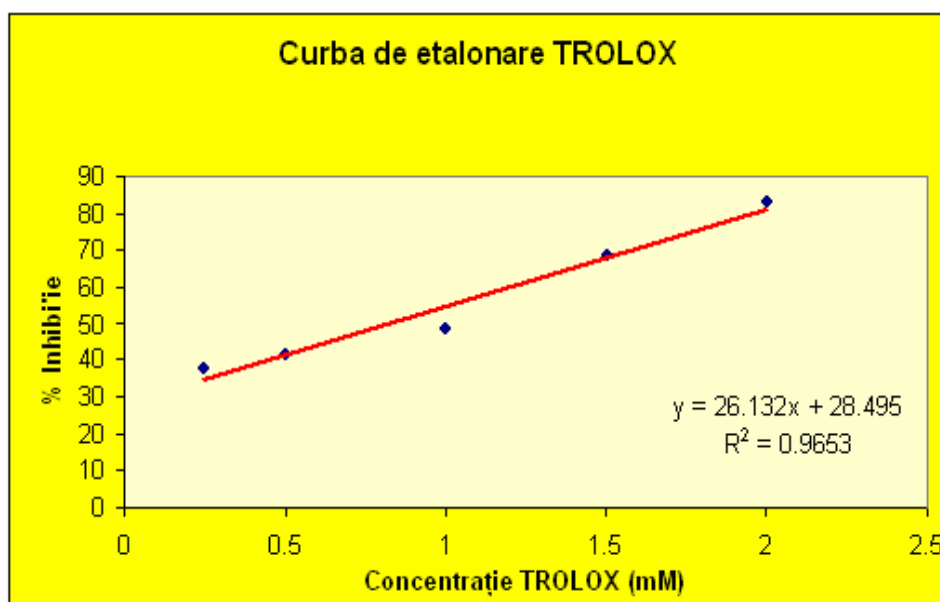


Fig. 29. Curba de etalonare-metoda DPPH

Tabel 8. Procentul de inhibiție (%I) și concentrația mM Trolox pentru extractele în etanol 35% din plantele medicinale analizate

Nr.crt	Extract în etanol 35%	Materialul vegetal de start	Diluție	%I	mM Trolox/volum extract luat în lucru	μmoli TROLOX/g material vegetal
1	Angelica	Tulpină și frunze	1:2	53.4	0.953 mM Trolox	19.06
2	Armurariu	Semințe	1:2	49.8	0.815 mM Trolox	16.3
3	Busuioc	Tulpină și frunze	1:2	60.7	1.232 mM Trolox	24.62
4.	Coriandru	Frunte	1:2	57.2	1.098 mM Trolox	21.96

5.	Coacăze negre	Fructe	1:10	71.5	1.645 mM Trolox	164.5
6	Cătină	Fructe	1:10	66.2	1.442 mM Trolox	144.2
7	Ghimbir	Rădăcină	nediluat	62.3	1.291 mM Trolox	12.91
8	Măghiran	Tulpină și frunze	1:2	62.8	1.312 mM Trolox	26.24
9	Rozmarin	Tulpină și frunze	1:6	73.1	1.706 mM Trolox	102.36
10	Salvie	Tulpină și frunze	1:10	67.5	1.492 mM Trolox	149.20

Rezultatele au ținut cont de volumul de extract folosit și de diluția extractului respectiv realizată așa încât valorile obținute să se încadreze în curba standard. Rezultatele au normalizate prin raportare la g de material vegetal folosit. Activitatea antioxidantă a extractelor vegetale în oțet și în etanol raportată la cantitatea de plantă uscată este prezentată în tabelul 9.

Tabel 9. Procentul de inhibiție (%I) și concentrația mM Trolox pentru extractele în oțet de mere cu miere și cătină 9% din plantele medicinale analizate

Nr.crt	Extract în etanol 35%	Materialul vegetal de start	Diluție	%I	mM Trolox/volum extract luat în lucru	μmoli TROLOX/g material vegetal
1	Angelica	Tulpină și frunze	nediluat	61.2	1.251mM Trolox	12.51
2	Armurariu	Semințe	nediluat	65.3	1.408 mM Trolox	14.08
3	Busuioc	Tulpină și frunze	1:2	72.3	1.677mM Trolox	33.54
4.	Coriandru	Fructe	ned	68.5	1.53mM Trolox	15.3
5.	Coacăze negre	Fructe	1:10	88.7	2.303 mM Trolox	230.3
6	Cătină	Fructe	1:10	82.6	2.069mM Trolox	206.9
7	Ghimbir	Rădăcină	nediluat	79.5	1.948 mM Trolox	19.48
8	Măghiran	Tulpină și frunze	nediluat	67.8	1.504mM Trolox	15.04
9	Rozmarin	Tulpină și frunze	nediluat	80.1	1.974 mM Trolox	19.74
10	Salvie	Tulpină și frunze	1:2	82.5	2.06 mM Trolox	40.12

Dacă se compară capacitatea antioxidantă a extractelor în alcool etilic 35% și oțet de mere cu miere 9% se constată că activitatea extractelor alcoolice este,

în general, mai mare decât activitatea extractelor în oțet de mere cu miere, excepție fac fructele de cătină și coacăzele negre.

Tabel 10. Activitatea antioxidantă a extractelor vegetale în oțet de mere cu miere 9% și în etanol 35%

Nr.crt	Planta	Materialul vegetal de start	Capacitatea antioxidantă a extractelor în alcool 35% $\mu\text{moli TROLOX/g}$ material vegetal	Capacitatea antioxidantă a extractelor în oțet de mere cu miere 9% $\mu\text{moli TROLOX/g}$ material vegetal
1	Angelica	Tulpină și frunze	19.06	12.51
2	Armurariu	Semințe	16.3	14.08
3	Busuioc	Tulpină și frunze	24.62	33.54
4.	Coriandru	Fructe	21.96	15.3
5.	Coacăze negre	Fructe	164.5	230.3
6	Cătină	Fructe	144.2	206.9
7	Ghimbir	Rădăcină	12.91	19.48
8	Măghiran	Tulpină și frunze	26.24	15.04
9	Rozmarin	Tulpină și frunze	102.36	19.74
10	Salvie	Tulpină și frunze	149.20	40.12

Extractele alcoolice de coacăze negre, de cătină, rozmarin și salvie au activitatea antioxidantă cea mai ridicată în alcool, iar extractele de coacăze negre, de cătină, salvie și busuioc au activitatea antioxidantă mai mare în oțet de mere cu miere.

Metoda DPPH a fost validată prin metoda FRAP descrisă anterior. S-a realizat curba de etalonare folosind 4 soluții standard Fe^{2+} (sare Mohr) cu concentrații de $0.1\mu\text{M/mL}$ (S1), $0.2\mu\text{M/mL}$ (S2), $0.4\mu\text{M/mL}$ (S3), $0.6\mu\text{M/mL}$ (S4), iar la final, în exprimarea rezultatelor finale s-a ținut cont de diluție.

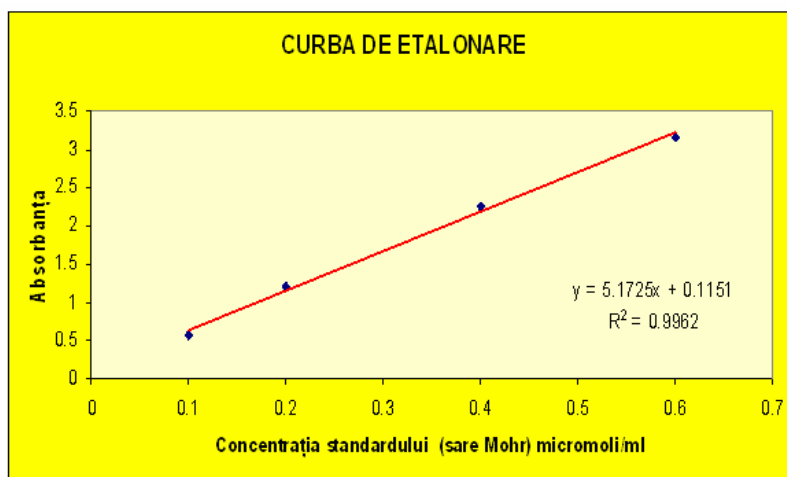


Fig.30. Curba de etalonare-metoda FRAP

Tabel 11. Capacitatea antioxidantă totală a extractelor hidroalcoolice determinate prin metoda FRAP

Nr.crt	Extract în etanol 35%	Materialul vegetal de start	Diluție	TAC final $\mu\text{moli Fe}^{+2}/\text{mL}$	TAC final $\mu\text{moli Fe}^{+2}/\text{g}$
1	Angelica	Tulpină și frunze	1:2	0.018	0.18
2	Armurariu	Semințe	1:2	0.042	0.42
3	Busuioc	Tulpină și frunze	1:2	0.204	2.04
4.	Coriandru	Fructe	1:2	0.154	1.54
5.	Coacăze negre	Fructe	1:2	0.548	5.48
6	Cătină	Fructe	1:2	0.176	1.76
7	Ghimbir	Rădăcină	1:2	0.098	0.98
8	Măghiran	Tulpină și frunze	1:2	0.084	0.84
9	Rozmarin	Tulpină și frunze	1:2	0.352	3.52
10	Salvie	Tulpină și frunze	1:2	0.121	1.21
11	Pufulița	Tulpină și frunze	1:2	0.578	5.78
12	Arnica	Flori	1:2	0.182	1.82
13	Papadie	Frunze	1:2	0.162	1.62

Tabel 12. Capacitatea antioxidantă totală a extractelor plantelor medicinal și aromatice în oțet de mere cu miere 9% determinate prin metoda FRAP

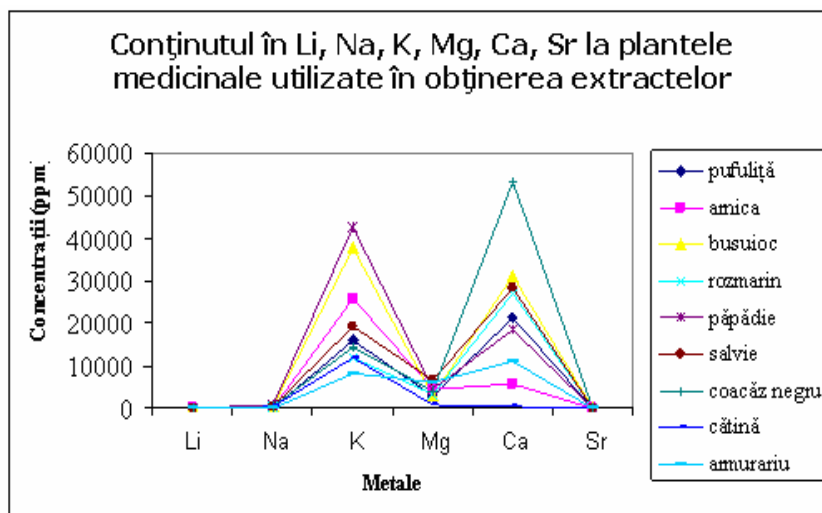
Nr.crt	Extract în oțet de mere cu miere 9%	Materialul vegetal de start	Diluție	TAC final $\mu\text{moli Fe}^{+2}/\text{mL}$	TAC final $\mu\text{moli Fe}^{+2}/\text{g}$
1	Angelica	Tulpină și frunze	1:2	0.011	0.11
2	Armurariu	Semințe	1:2	0.037	0.37
3	Busuioc	Tulpină și frunze	1:2	0.216	2.16
4.	Coriandru	Fructe	1:2	0.142	1.42
5.	Coacăze negre	Fructe	1:2	0.593	5.93
6	Cătină	Fructe	1:2	0.231	2.31
7	Ghimbir	Rădăcină	1:2	0.102	1.02
8	Măghiran	Tulpină și frunze	1:2	0.063	0.63
9	Rozmarin	Tulpină și frunze	1:2	0.824	8.24
10	Salvie	Tulpină și frunze	1:2	0.442	4.42
11	Pufulița	Tulpină și frunze	1:2	1.016	10.16
12	Arnica	Flori	1:2	0.272	2.72
13	Papadie	Frunze	1:2	0.091	0.91

În urma analizei capacității antioxidante a extractelor analizate s-a constatat că rezultatele analizei FRAP sunt în general mai mici decât cele ale analizei DPPH, iar extractele alcoolice au, în general valori mai mari decât cele în oțet de mere cu miere:

Tabel 13. Activitatea antioxidantă a extractelor vegetale în oțet de mere cu miere 9% și în etanol 35%

Nr.crt	Planta	Materialul vegetal de start	TAC final al extractelor în alcool $\mu\text{moli Fe}^{+2}/\text{g}$	TAC final al extractelor în oțet $\mu\text{moli Fe}^{+2}/\text{g}$
1	Angelica	Tulpină și frunze	0.18	0.11
2	Armurariu	Semințe	0.42	0.37
3	Busuioc	Tulpină și frunze	2.04	2.16
4.	Coriandru	Frunze	1.54	1.42
5.	Coacăze negre	Frunze	5.48	5.93
6	Cătină	Frunze	1.76	2.31
7	Ghimbir	Rădăcină	0.98	1.02
8	Măghiran	Tulpină și frunze	0.84	0.63
9	Rozmarin	Tulpină și frunze	3.52	8.24
10	Salvie	Tulpină și frunze	1.21	4.42
11	Pufulița	Tulpină și frunze	5.78	10.16
12	Arnica	Flori	1.82	2.72
13	Papadie	Frunze	1.62	1.62

Plantele medicinale selectate în vederea utilizării au fost supuse analizei metalelor, pentru selectarea celor care nu depășesc limitele admise de metale grele și care pot îmbogăți conținutul în microelemente al alimentelor în componența cărora se vor afla. Cel mai mare conținut de litiu s-a identificat la păpădie și cătină, iar cel mai mare conținut de potasiu a fost determinat la busuioc și păpădie. Sodiul s-a găsit în cantități mai mari la păpădie și cătină, iar magneziul în tulpina și frunzele de salvie. Frunzele de coacăz negru, dar și busuiocul au avut o concentrație ridicată de calciu. Salvia și pufulița au avut un conținut ridicat de stronțiu (fig.31 și tabel 14)



A.

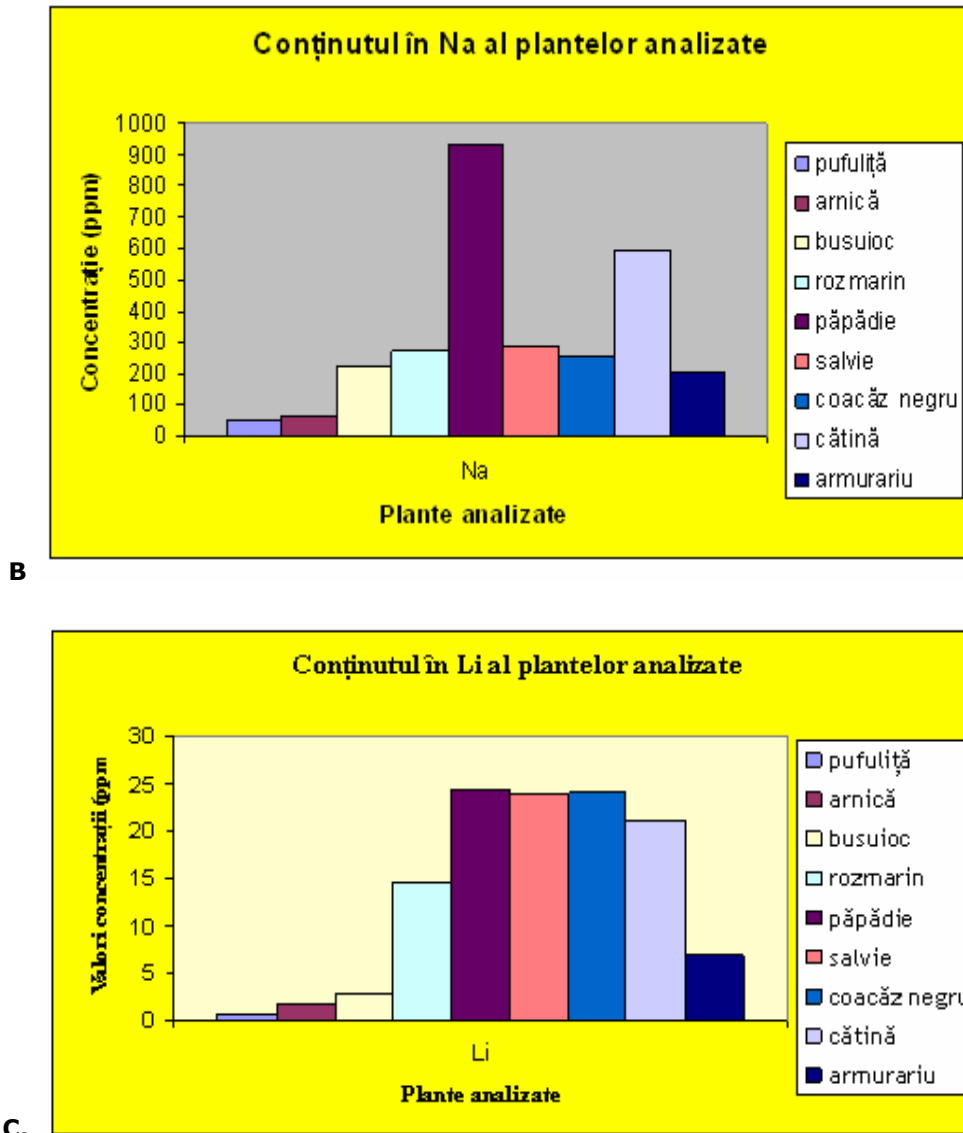
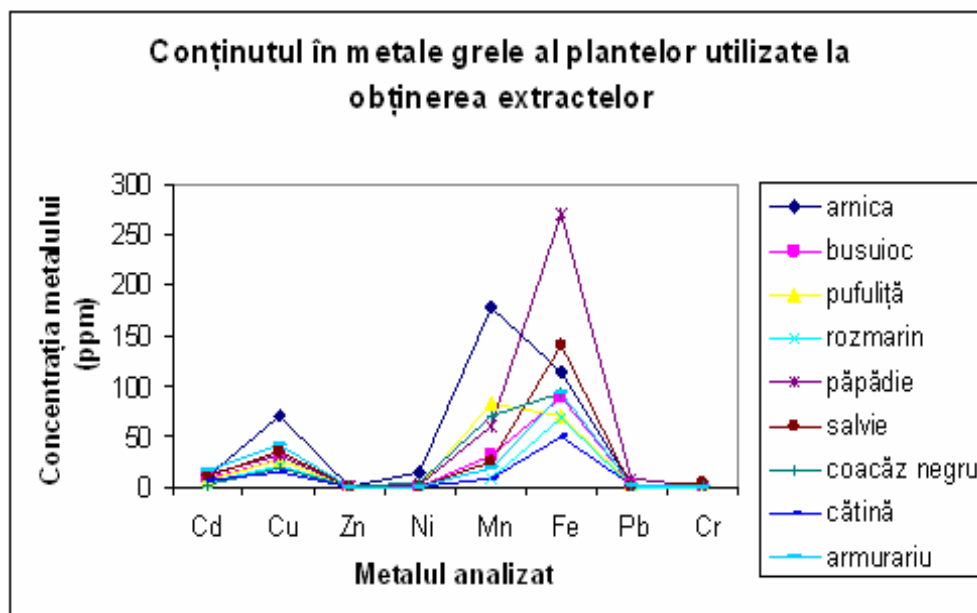


Fig.31. Conținutul metallic al plantelor medicinale utilizate la obținerea extractelor A- conținutul în Na, K, Mg, Li, Ca, Sr; B- conținutul în Na (scala 0-1000ppm); C- conținutul în Li (0-30 ppm)

S-au selectat plantele cu conținut maxim de macroelemente și s-au comparat cu dozele toxice descrise în literatură sau cu aportul alimentar zilnic al acestora. Conținutul de Na, Mg, K și Ca la plantele medicinale folosite pentru prepararea extractelor este prezentat în tabelul 14, în care sunt marcate valorile mai mari obținute în urma analizei.

Tabel 14. Conținutul în Na, K, Mg, Ca la plantele medicinale utilizate în obținerea extractelor

Planta medicinală	Material vegetal folosit	Na ppm	K ppm	Mg ppm	Ca ppm
Busuioc	Tulpină și frunze	225	37951	2755	31438
Rozmarin	Tulpină și frunze	273	11700	3389	26950
Păpădie	Frunze	934	42725	4552	18475
Salvie	Tulpină și frunze	296	19465	6587	28575
Coacăz negru	Fructe	251	14208	4158	53550
Cătină	Fructe	591	11711	674	587
Armurariu	Fructe (semințe)	202	8328	6072	10920
Necesarul zilnic (adult)		3.7g	3.5 g	0.3 g	0.7g

**Fig. 32. Conținutul de metale grele al plantelor medicinale utilizate la obținerea extractelor**

În ceea ce privește conținutul metalelor grele din plantele medicinale și aromatice uscate, s-a remarcat că florile de arnică au un conținut de zinc peste limitele admise, iar tulpina și frunzele de salvie au un conținut ridicat de fier și zinc (vezi tabelul 15 și fig. nr.32). În cazul păpădiei s-a identificat un conținut ridicat în mai multe metale grele ceea ce exclude posibilitatea utilizării acestei plante în studiul de față. În tulpina și frunzele de pufuliță s-a determinat un nivel de cadmiu de 0.007 ppm care, deși este sub limitele admise (0.5 ppm), este ridicată comparativ cu alte plante.

Tabel 15. Conținutul în metale grele al plantelor utilizate la obținerea extractelor în care sunt marcate valorile mai mari obținute în urma analizei (* date de Agenția de Standardizare a Alimentelor)

Planta medicinală	Cu ppm	Zn ppm	Cd ppm	Ni ppm	Mn ppm	Fe ppm	Pb ppm
Arnică	9.5	69.2	0.0	14.57	177.7	112.68	1.15
Pufuliță	5.7	27.1	0.007	0.71	83.50	70.12	1.71
Păpădie	12.9	31.3	0.63	2.87	59.62	271.52	8.38
Salvie	9.7	35.1	0.0	0.58	24.21	141.45	0.32
Armurariu	17.6	41.4	0.0	0.88	18.35	94.23	1.12
Necesarul zilnic* (adult)	1.2 mg	F: 5.5-9.5 mg B: 4-7 mg	-	0.13 mg	1-10 mg	F: 8.7mg B: 14.8 mg	-
Limita națională	50	50	0.5	-	-	-	5.0

Din cele 9 plante uscate analizate din punct de vedere al conținutului metalic, s-au selectat busuiocul, rozmarinul, salvia și cățina ca având un conținut în macro și microelemente ce le face utilizabile în prepararea anumitor alimente în scopul îmbogățirii conținutului metalic al acestora, fără a se depăși însă limitele admise. În cazul rozmarinului, la care analiza metalelor grele efectuate pe planta uscată a demonstrat o valoare de 0.25 ppm, fără a depăși limitele admise, s-a efectuat determinarea conținutului în metale grele și al extractului hidroalcoolic, constatându-se o scădere a nivelului de Pb la 0.01 ppm concomitent cu o scădere a nivelului celorlalte metale grele (Cu: de la 0.41ppm - la 0.83ppm; Zn: de la 21.3ppm - la 1.85; Mn: de la 8.28ppm - la 0.49 ppm; Fe: de la 68.53 ppm- la 3.45 ppm). Deoarece conținutul de metale este mult mai mic în cazul extractelor hidroalcoolice decât în cazul materialului vegetal de start, aceste extracte se pot folosi cu succes la creșterea aportului alimentar de microelemente. Metalele grele utile (Cu, Zn, Fe, Mn) din extracte pot contribui la îmbogățirea în aceste metale utile a matricilor funcționale de bază, fără a se atinge doze toxice. S-a selectat extractul de rozmarin, armurariu și busuioc pentru îmbogățirea sucului de roșii cu microelemente.

II.2.3. CONCLUZII

În urma analizei cromatogramelor HPLC pentru extractele în alcool 35% și oțet de mere cu miere 9% obținute din: angelica (*Angelica Archangelica*) - tulpină și frunze, armurariu (*Silybum marianum*) - semințe, busuioc (*Ocimum Basilicum*) - tulpină și frunze, coacăze (*Ribes Negrum*) - fructe, coriandru (*Coriandrum sativum*) - fructe, cătină (*Hippophae rhamnoides*) - fructe, ghimbir (*Zingiber officinale*) - rădăcină uscată, măghiran (*Majorana hortensis sau Origanum majorana*) - tulpină și frunze, salvie (*Salvia Officinalis*) - tulpină și frunze, precum și rozmarin (*Rosmarinus officinalis*) s-a observat că toate extractele au un conținut remarcabil de acizi fenolici ceea ce le conferă proprietăți antioxidante.

- Analiza capacității antioxidante a arătat că extractele alcoolice au o capacitate antioxidantă mai mare decât cele în oțet, iar dintre extractele alcoolice extractul etanolic de coacăze negre, de frunze de cătină, rozmarin și salvie au activitatea antioxidantă cea mai ridicată. Deși extractele plantelor medicinale și aromatice în alcool 35% au activitate antioxidantă mai mare, totuși, mai avantajoase din punct de vedere al administrării în dieta subiecților cu sindrom metabolic ar fi extractele în oțet de mere cu miere ale următoarelor plante: fructe de cătină, tulpină și frunze de rozmarin, tulpină și frunze de salvie, tulpină și frunze de busuioc, precum și semințe de coriandru. În acest scop s-a propus obținerea unui oțet balsamic obținut prin macerarea acestor părți din plantele aromatice și medicinale în oțet de mere cu miere.
- S-au analizat din punct de vedere al conținutului metalic următoarele plante aromatice și medicinale: cătină (fructe), rozmarin (tulpină și frunze), arnică (flori), coacăze negre (fructe), armurariu (fructe), busuioc (tulpină și frunze), salvie (tulpină și frunze), pufuliță (tulpină și frunze) și păpădie (frunze).
- Determinarea conținutului în oligoelemente a evidențiat următoarele:
 - Păpădia, datorită conținutului mare de Cd și Pb ar trebui exclusă din studiu
 - Arnica, deși are conținut mare de Ni, Mn și Fe, are un conținut de Zn peste limitele naționale admise și de asemenea utilizarea ei în studiu poate fi riscantă
 - Armurariul, chiar dacă are un conținut ridicat de Cu, este sub limitele naționale admise și se poate utiliza pentru obținerea de alimente îmbogățite cu metale
 - Dintre plantele analizate, busuiocul, rozmarinul, măghiranul, angelica, coacăzul negru, cătina și salvia conferă un aport echilibrat de oligoelemente necesare organismului și concomitent, extractele acestora în etanol 35% sau oțet de mere cu miere 9% au activitate antioxidantă mare, care le recomandă cu succes în scopul obținerii de alimente îmbogățite cu oligoelemente.

II.3. Tehnologia obținerii unor alimente îmbogățite cu compuși naturali de extracție

În cadrul acestui obiectiv sunt prezentate alimentele funcționale multicomponent selectate pentru utilizarea în trialul clinic din cadrul acestui studiu, etapele fluxului tehnologic de obținere a acestora și rezultatele controlului de calitate.

Alimentele funcționale multicomponent care se vor afla în componența dietei administrate subiecților au fost luate în considerare următoarele amestecuri:

1. Oțet balsamic de mere cu miere, cătină și plante medicinale și aromatice selectate (salvie, busuioc, rozmarin cu boabe de muștar, coriandru și cimbru pentru condimentare) cu licență de fabricație 2008
2. Amestec de compuși mono- și polifenolici în forma monomera, dimera și polimera (taninuri), obținut prin extracție protejată din semințe, ramificații și coji de struguri, subproduse de la obținerea vinului, produs notificat IBA București (2006)
3. Amestecuri de cereale VITAPAN, produs avizat încă din anul 2002 de către Ministerul Sănătății și Familiei București, în urma analizelor și a referatului tehnic întocmit de departamentul de specialitate (Alimentație) a Institutului de Igienă și Sănătate Publică Cluj-Napoca. SC PROPLANTA S.A. din Cluj-Napoca deține licența de fabricație a acestui produs .
4. Suc de tomate îmbogățit cu rozmarin, armurariu și busuioc, produs aflat încă în stadiul de testare

II.3.1. Oțet balsamic de mere cu cătină și miere cu extracte de plante medicinale și aromatice

Produsul „OJET BALSAMIC” se prezintă sub forma unei soluții limpezi, ușor opalescente de culoare galben-auriu, cu miros plăcut de oțet și plante aromatice. Oțetul balsamic necesar acestui studiu a fost produs și analizat la SC PROPLANTA S.A. din Cluj-Napoca (licență de fabricație 2008). Produsul se obține din: oțet de mere, miere de albine, suc de cătină filtrat, plante aromatice (salvie, busuioc, rozmarin, măghiran, armurariu, angelica și cimbru) și semințe condimentare (boabe de muștar, busuioc, coriandru, rozmarin [fișa tehnică a produsului PROPLANTA]. Produsul conține următoarele principii active: taninuri, catechine, acizi fenolici, glucozide flavonoidice, antociani, pigmenți naturali (carotenoide, antociani) [Fișa Tehnică a produsului, PROPLANTA]. Datorită concentrației mari de compuși polifenolici antioxidanți, și de acizi organici obținuți prin fermentația merelor, antagoniști ai depunerii colesterolului, oțetul balsamic previne bolile cardiovasculare, are efect tonic asupra vaselor sangvine.

Previne bolile degenerative, este recomandat persoanelor adulte cu antecedente familiare de accidente vasculare, cardiace și/sau cancer [221]. La obținerea oțetului balsamic s-a folosit suc de cătină natural 100%, obținut prin simpla trecere a fructelor printr-un sistem de filtre industriale, metodă care asigură păstrarea tuturor vitaminelor din fruct, doar cojile și semințele fiind îndepărtate.

Sucul de cătină este foarte bogat în acizi organici, fapt confirmat de valoarea acidității titrabile și pH-ul scăzut (aproape 2.7). Din punct de vedere cantitativ, acidul malic este principalul acid; nivelul de proteine este de asemenea

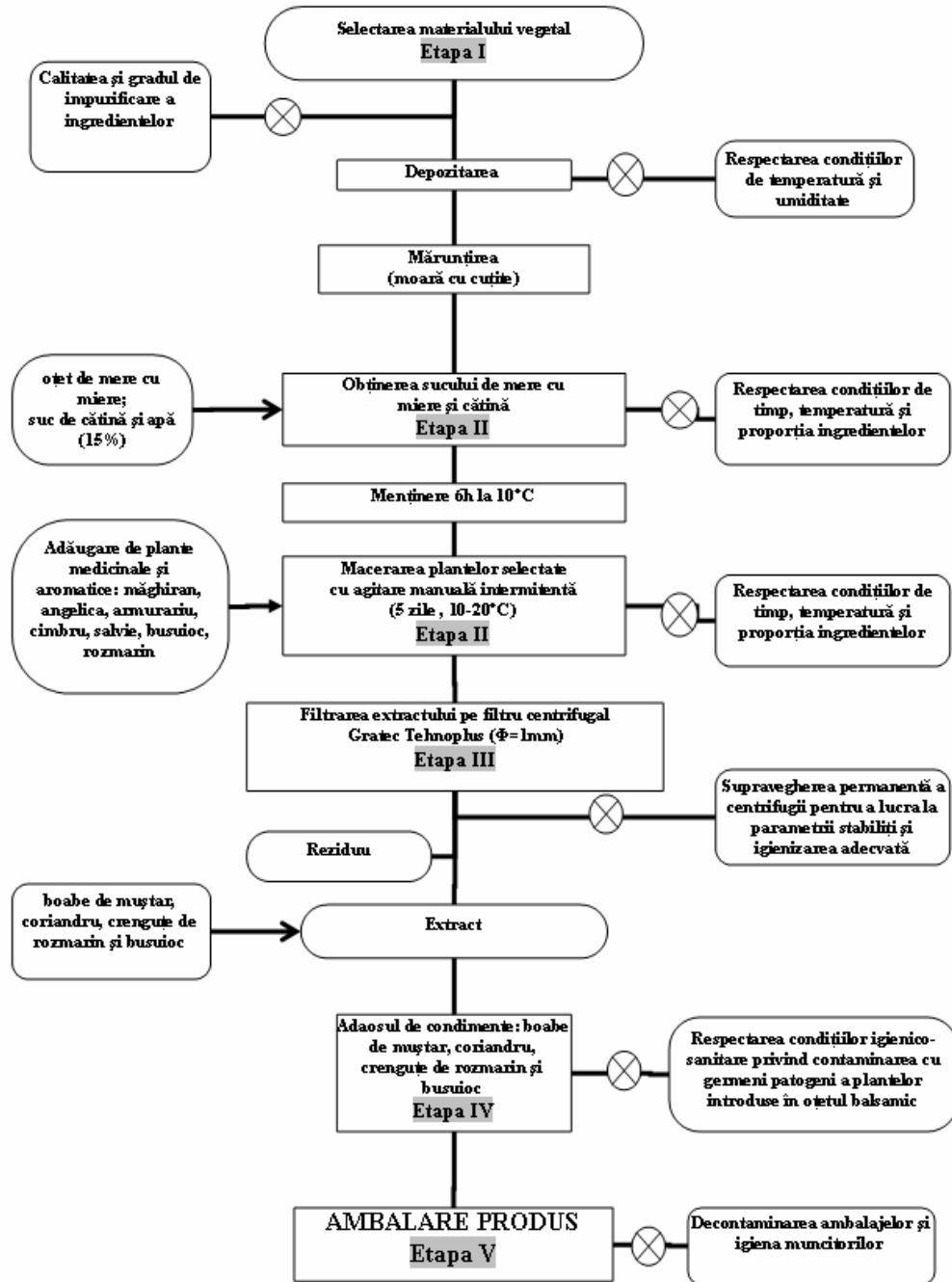


Fig. 33. Schema fluxului tehnologic la fabricarea produsului OJET BALSAMIC; simbolul ⊗ marchează punctele de control

ridicat pentru un suc de fructe acesta explicând de fapt aspectul opalescent al sucului. Prin presarea fructelor de cătină, randamentul de obținere este cuprins între 60-85% [221]. Sucul de cătină, comparativ cu fructul conține mai puține zaharuri, dar are și un conținut mai mic de antioxidanți, iar vitamina E este prezentă numai în urme. Schema de obținere a oțetului balsamic este prezentată în fig.34.

Controlul de calitate al oțetului balsamic conform standardului de firmă a fost realizat la SC PROPLANTA S.A. din Cluj-Napoca în vederea controlului calității produsului [226]

Amprenata UV-VIS pentru oțetul balsamic, determinată cu metoda descrisă la capitolul II.2.2.1.2.1. , după o diluție a probei de 1:20 a evidențiat prezența acizilor fenolici (semnale 220 și 280 nm) și a flavonoidelor (semnale la 220 și la 325 nm).

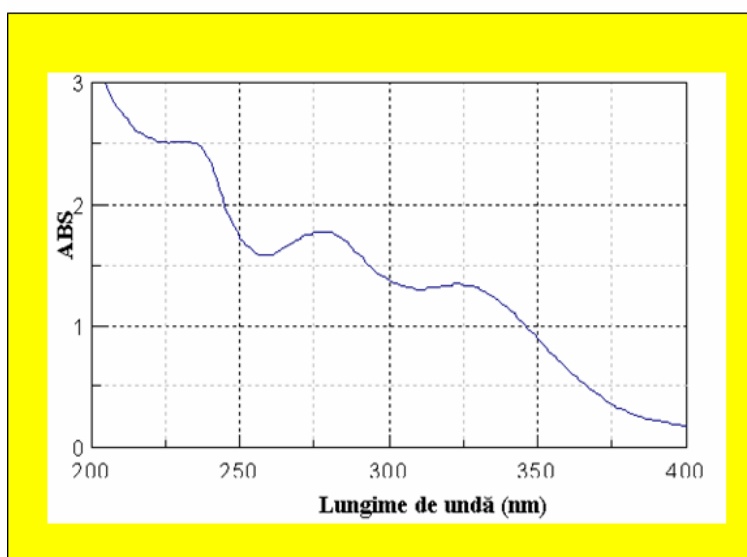


Fig. 34. Spectrul UV-VIS al oțetului balsamic

Analiza HPLC a oțetului balsamic de mere cu miere și cătină (fig. 35) a evidențiat prezența acidului galic (t_R =min 4.4), a acidului protocatecuic (t_R =min 7.3), acidului o-cumaric (t_R =24.3), precum și prezența flavonoidului quercetină (t_R =31.9). Semnalul major de la t_R = 28,67 a fost atribuit **rutinei**, compus major specific busuiocului și rozmarinului. Picul cromatografic de la t_R =2.950, ca și picurile care au timpi de retenție mai mari de 35 min indică prezența cătinei în oțet (fig. 35).

II.3.2. Amestec de compuși mono- și polifenolici (VITIS)

Produsul VITIS este un extract de tip MPF – un complex de compuși mono- și polifenolici în formă monomeră, dimeră și polimeră (taninuri), obținut prin extracție protejată din semințe, ramificații și coji de struguri, subproduse de la obținerea vinului. Produsul „VITIS” se prezintă sub forma unei soluții limpezi, de culoare roz-rubinie, cu miros de sămburi de struguri și gust slab amărui. Produsul se obține din: apă deionizată purificată [227], alcool etilic, glicerină, semințe, pielțe și ciorchini de struguri roșii și albi; Subprodusele de la prelucrarea vinului au provenit de la Stațiunea Experimentală Viticolă BLAJ și s-au selecționat în funcție de culoarea

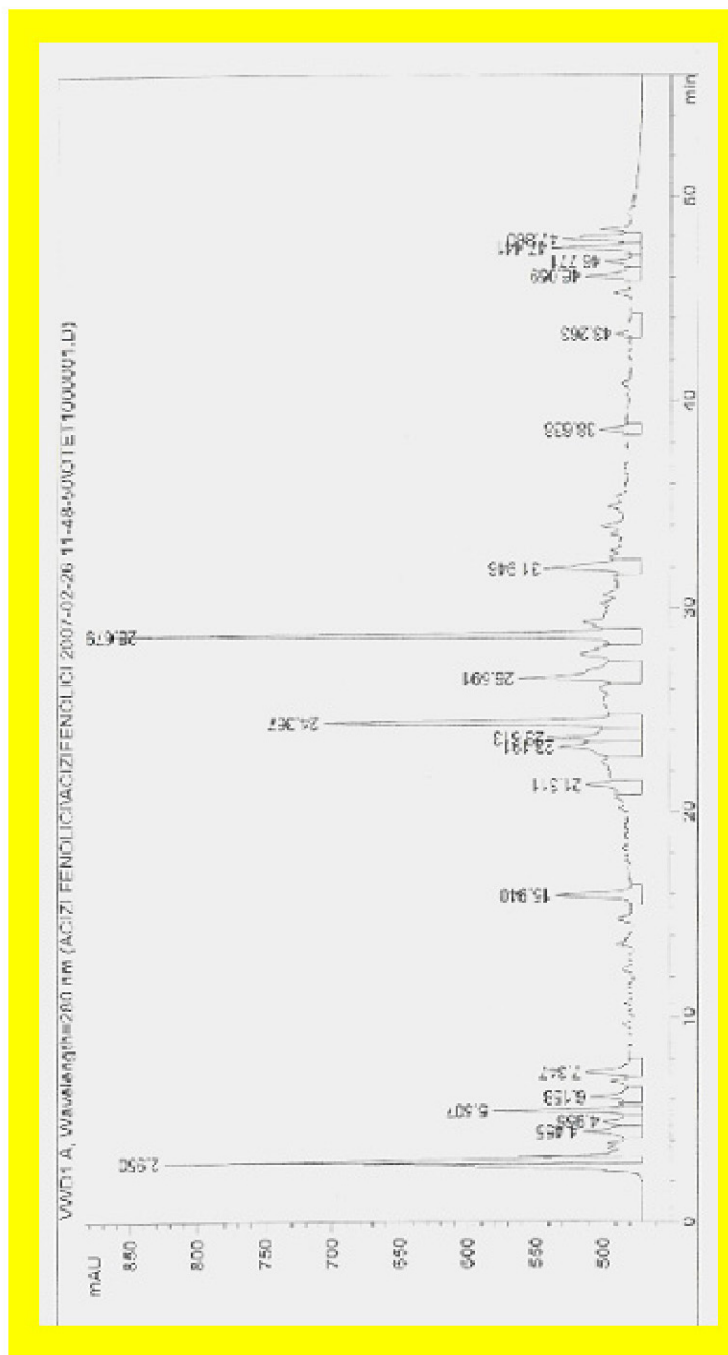


Fig. 35. Analiza HPLC a oțetului balsamic îmbogățit cu plante aromatice: acid galic- 4.455 min ; acid protocatecuic- 7.347 min ; Acid o-cumaric 24.365 min

strugurilor, în timpul culegerii evitându-se colectarea frunzelor odată cu ciorchinii de struguri. Principiile active conținute în acest amestec sunt: taninuri, catechine, acizi fenolici, flavonoide, antociani, acizi grași polinesaturați. Prin analiza spectrelor UV-VIS (fig.36) și cromatografică (HPLC) s-au evidențiat mai multe clase de compusi fenolici [227].

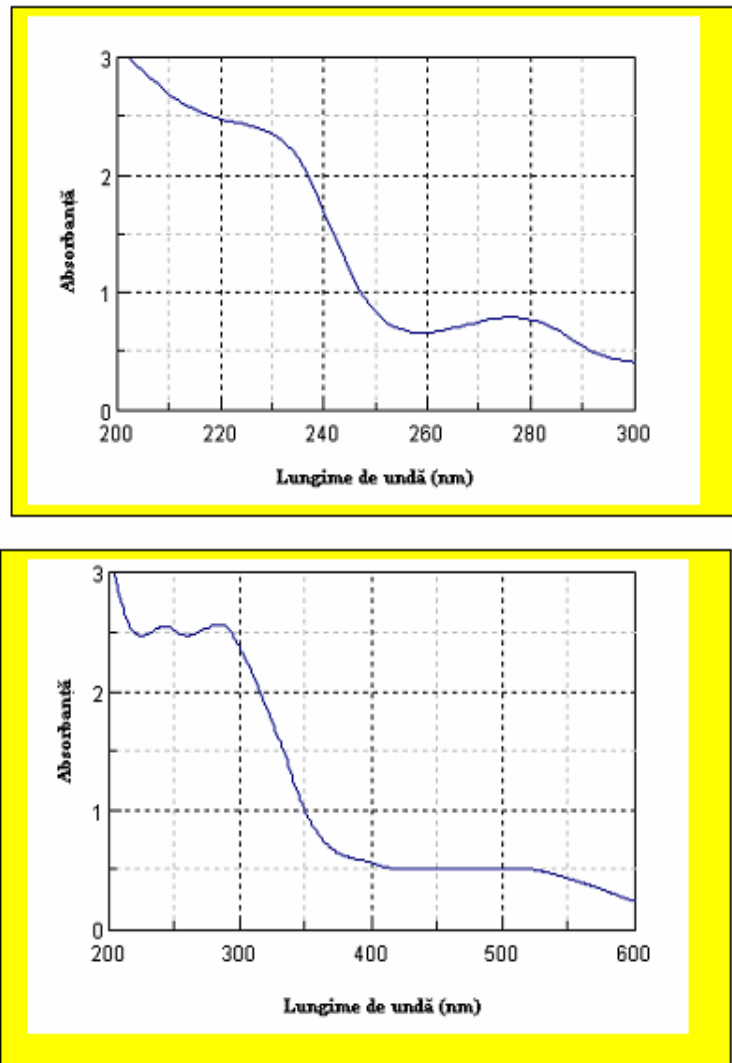


Fig. 36. Amprenta UV-Vis pentru VITIS

Analiza HPLC [227] a produsului VITIS (obținut din struguri roșii) a condus la identificarea semnalelor caracteristice acidului galic, clorogenic și cafeic, precum și a semnalelor caracteristice unor catechine ($t_R = 5-11$ min) (vezi fig.37). S-a evidențiat ca semnal major malvidin glucozidul (antocian cu efect puternic antioxidant). Nu sunt prezente flavonoide. În cromatograma produsului VITIS din struguri albi (vezi fig.38) se observă acidul galic la minutul 4.5, acidul protocatecuic la minutul 6.718 și acidul clorogenic la minutul 13.692.

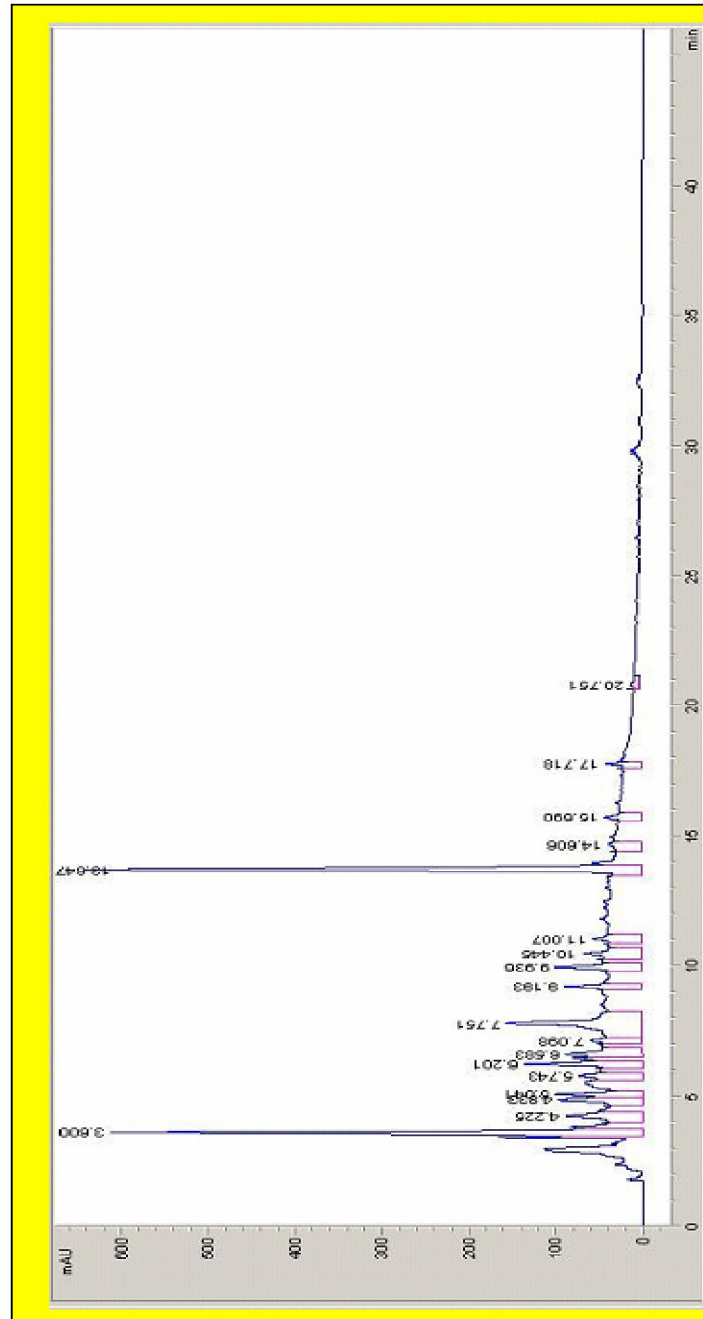


Fig. 37. Analiza HPLC a produsului VITIS obținut din struguri roșii: (1) Acid galic- $t_R=4.226$ min ; (2) Acid protocatecuic- $t_R=6.743$ min ; (4) Acid cafeic - $t_R=13.647$ min;

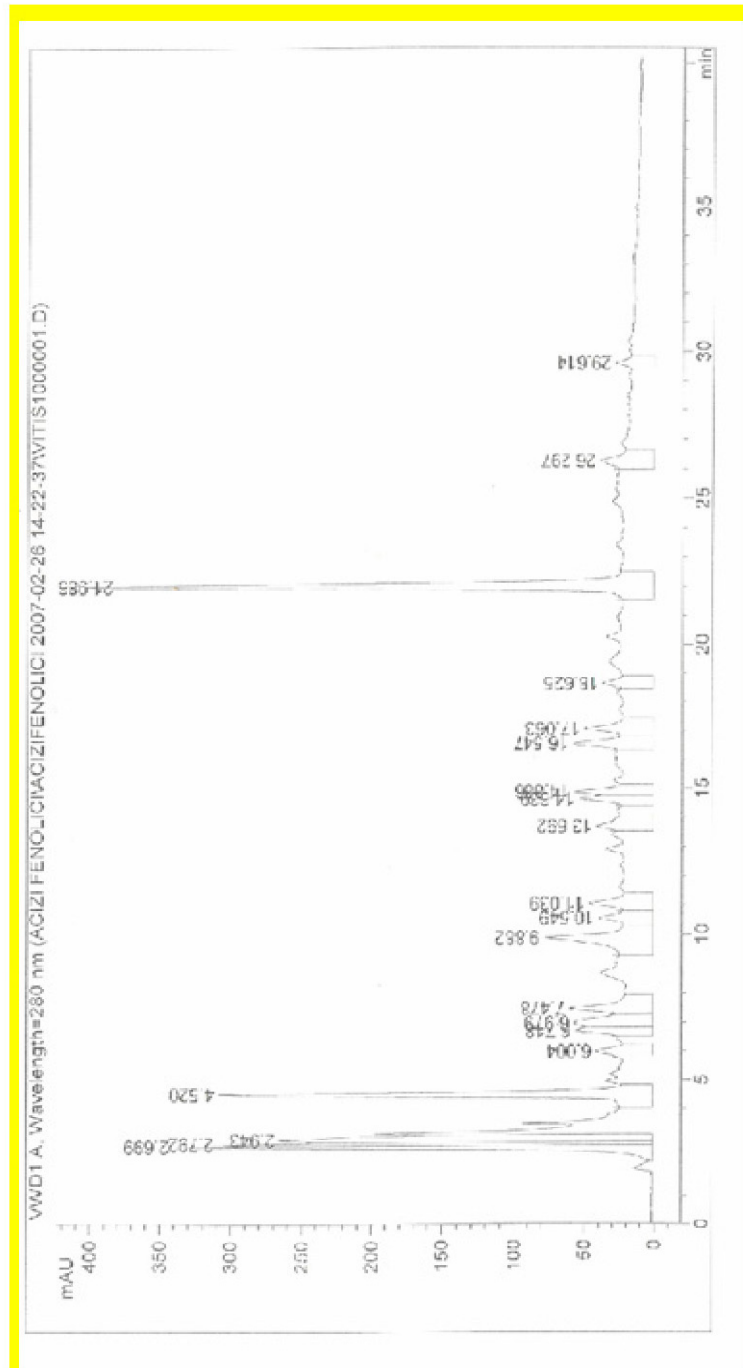


Fig. 38. Analiza HPLC a produsului VITIS obținut din struguri albi:(1) Acid galic- 4.500 min ; (2) Acid protocatecic- 6.718 min ; (3) Acid clorogenic - $t_R=13.692$ min; (4) Acid cafeic - $t_R=14.3$ min; (6) acid ferulic - $t_R=21.985$ mi

Fluxul tehnologic de producție cuprinde 5 etape majore cu 7 puncte de control al producției:

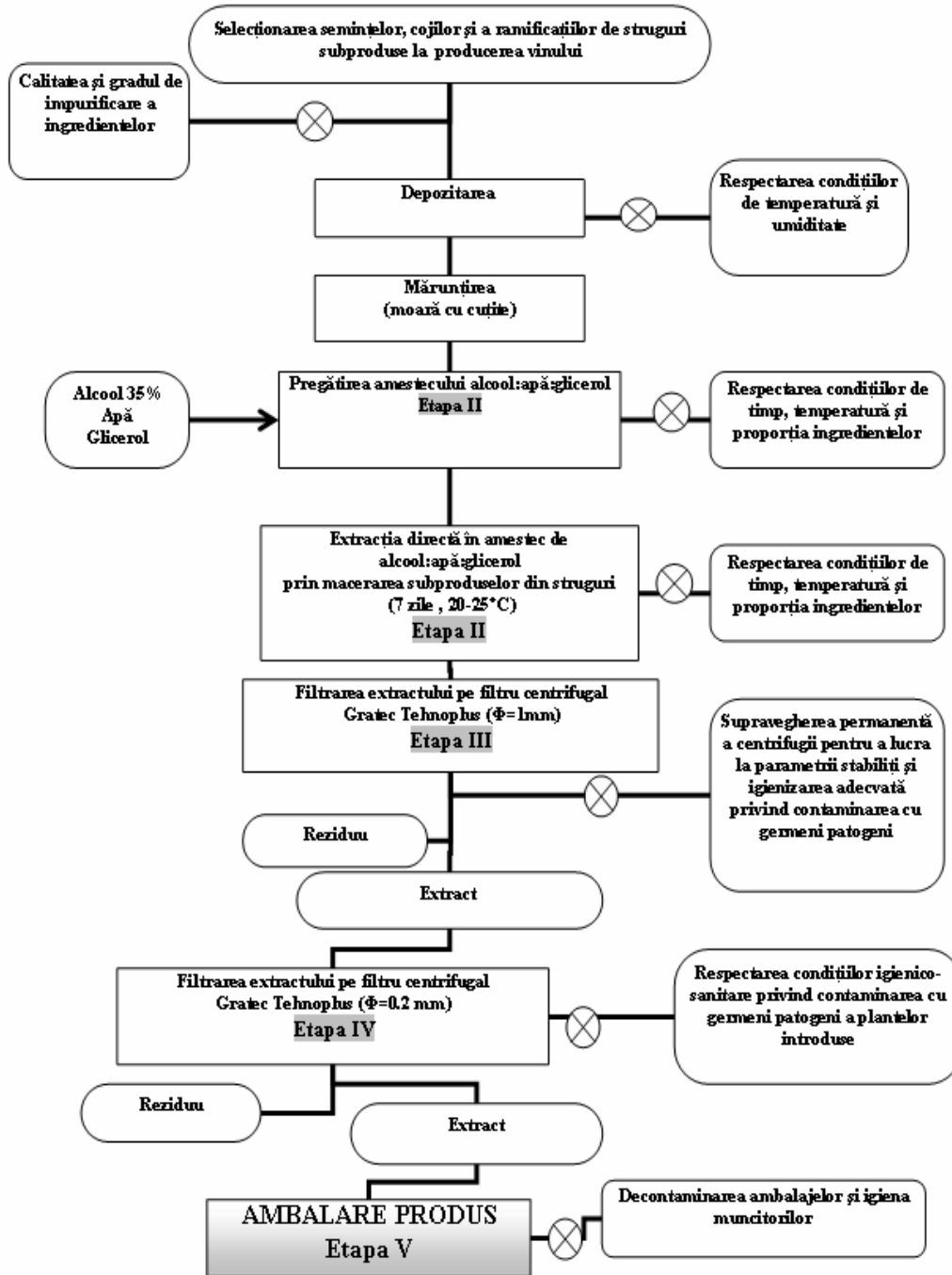


Fig. 39. Schema fluxului tehnologic la fabricarea produsului VITIS cu marcarea punctelor de control cu simbolul ⊗

II.3.3. Amestecuri de cereale (VITAPAN)

Ca aliment multicomponent pe bază de cereale s-a utilizat o pâine preparată din făina de panificație uzuală la care s-a adăugat un aditiv VITAPANUL, un aditiv natural care substituie multe tipuri de aditivi:

Tabel 16 Aditivi folosiți în industria pâinii substituiți de VITAPAN

Nr. cod	Substanța	Rol / Eventuale reacții adverse
E240	Formaldehidă	Conservant / Cancerigen
E322	Lecitină	Antioxidant, emulsificator
E450	Difosfați	Săruri minerale
E451	Trifosfați	Săruri minerale
E 452	Polifosfați	Săruri minerale
E471	Mono- și distearat de glicerină	Emulsificator
E472	Mono și digliceride cu acizi grași și acid acetic (E472a), acid lactic (E472b), acid citric (E472c), tartric (E472d); esteri de mono- și digliceride cu acizi grași (E472e) și amestec de mono-și di-gliceride cu acid acetic și tartric (E472f)	Emulsificator
E473	Esteri ai zaharozei cu acizi grași	Emulsificator
E474	Poliglicerol esteri ai acizilor grași	Emulsificator

VITAPAN este un supliment nutritiv natural pentru panificație, alcătuit dintr-un amestec echilibrat neomogen de pudre, de culoare galben-pai, obținute din boabe și germeni de cereale (soia, grâu, secară, cartof), semințe de floarea soarelui, în și fructe deshidratate de cătină, măceșe, ardei dulce. Are efect fortifiant prin conținutul de vitamine B₁, B₂, B₆, C, E, PP, folat și pantotenat. Aduce un aport semnificativ de macro- și oligoelemente: potasiu, magneziu, zinc, mangan, fosfor, seleniu, fier, cupru, calciu, pigmenți vegetali antioxidanți, acizi grași nesaturați în produsele de panificație [223]. Acest amestec asigură un efect antioxidant, stabilizator, emulgător, hidratant, conservant.

VITAPAN adăugat în concentrație de 1,5% în făina de panificație, asigură la un consum de 500 g de pâine un aport de:

- aprox. 1,2 g proteină, 0,7g lipide (din care 18-20% lipide mononesaturate și 50-55% lipide polinesaturate) și 2,5 g glucide (din care 35% fibră brută).
- vitamine: provitamina A (40-60 mg), vitamina B₁ (3-4 mg), vitamina B₂ (5-8 mg), vitamina B₆ (4-6 mg), vitamina C (34-38 mg), vitamina E (1,5-1,7 mg), folat (1,8-1,9 mg), vitamina PP (niacină) (0,6-0,8 mg), pantotenat (8-10 mg).
- macro- și oligoelemente și anume: 51-55 mg potasiu, 1,0-1,4 mg sodiu, 7-9 mg calciu, 19-21 mg magneziu, 0,2-0,4 mg cupru, 0,5-0,7 mg fier, 1,4-1,6 mg zinc, 0,3-0,5 mg mangan, 30-35 mg fosfor, 1,8-2 mg seleniu [223,226].

Avantaje:

- VITAPAN se introduce în făină, prin adaus direct, în procent de 1,5%, procesul tehnologic fiind similar cu cel convențional de obținere a pâinii.
- reduce timpul de dospire a aluatului
- crește timpul de relaxare și capacitatea de emulsionare și spumare a aluatului,

- întârzie învechirea pâinii (capacitate crescută de reținere a apei).
- protejează pâinea de mucegăire datorită unor fitoncide naturale prezente în compoziție.
- Concentrația de 1,5 % poate fi mărită la 2-2,5% în cazul administrării pâinii la persoane subnutrite, bolnavi, militari, sportivi

II.3.4. Suc de tomate îmbogățit cu rozmarin, armurariu și busuioc

Sucul de tomate îmbogățit cu rozmarin, armurariu și busuioc este un aliment multicomponent, ce s-a creat în scopul creșterii aportului exogen de microelemente Cu, Zn, Fe, Mn. Extractele de rozmarin și busuioc în alcool au o activitate antioxidantă mare (așa cum s-a determinat la capitolul II.2.1) și conținut mare de K și Ca, Zn, Mn, Fe.

Acest aliment nu este pregătit la scară industrială, ci a fost obținut în cantități mai mici necesare desfășurării studiului, la Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară (USAMVB) din Timișoara. Deocamdată, utilizarea acestuia este încă în fază experimentală, încercându-se integrarea lui într-o dietă vegetariană așa încât să contribuie nu numai la aportul exogen de antioxidanți, dar și de microelemente. Procedul de obținere este simplu și pornește de la tomate crescute în condiții ecologice, fără folosirea de substanțe chimice pentru stimularea și tratarea plantelor.

După prepararea sucului de tomate (randamentul de obținere a sucului de tomate este de 55%), când acesta a ajuns la temperatura ambiantă, s-a adăugat extractul hidroalcoolic de rozmarin, armurariu și busuioc obținut prin macerarea la rece (20°C-25°C) a plantelor uscate procurate din comerț în etanol 50% într-un raport de 10 g plantă uscată la 100 ml extract, urmată de filtrare rapidă la vid și păstrate în flacoane de plastic la -20°C. Extractele în alcool au fost analizate imediat.. Extractul alcoolic s-a adăugat într-un raport volumetric de 5% în suc de tomate [223, 226]. Pentru conservare s-a folosit rădăcină de hrean ras în raport de 5% (w/v) Sucul de tomate îmbogățit cu rozmarin și busuioc s-a analizat în vederea determinării activității antioxidante folosind metodele FRAP descrisă la capitolul II.2.1.2.1.2.2, precum și analiza compușilor fenolici totali folosind metoda Folin-Ciocalteu.

Metoda Folin-Ciocalteu

Metoda, propusă inițial pentru analiza proteinelor [227], a fost folosită ulterior pentru analiza de polifenolilor [228] și se bazează pe capacitatea de reducere a probelor de analizat cu reactivul Folin- Ciocalteu care conține un amestec de săruri de molibden și tungsten. Prezența antioxidanților în proba de analizat, în mediul bazic (pH=10), duce la reducerea ionului de molibden și formarea unui complex de culoare albastră care absoarbe la 750-765 nm. Prin această metodă nu se determină numai conținutul în fenoli, dar și alți compuși cu activitate antioxidantă (ex. vitamina C)

Reactivi de lucru:

- Reactiv Folin-Ciocalteu 2.0mM
- Soluții standard de acid galic 0.2, 0.4, 0.8 și 1.2 μM/ml
- 7.5% Na₂CO₃

Mod de lucru:

Reactivul Folin -Ciocalteu stoc s-a diluat 1:10 în momentul folosirii pentru obținerea reactivului de lucru. 0.5 ml din fiecare probă și standard s-au adăugat la 2.5 ml din reactivul de lucru. Pentru realizarea unui pH bazic, s-au adăugat 2 ml soluție Na₂CO₃

7.5%. Eprubetele s-au menținut la temperatura camerei timp de 2h. S-au citit absorbanțele probelor la 750 nm față de soluția martor. Conținutul total de polifenoli se exprimă în echivalenți de acid galic mmoli/l (μM acid galic/ml)

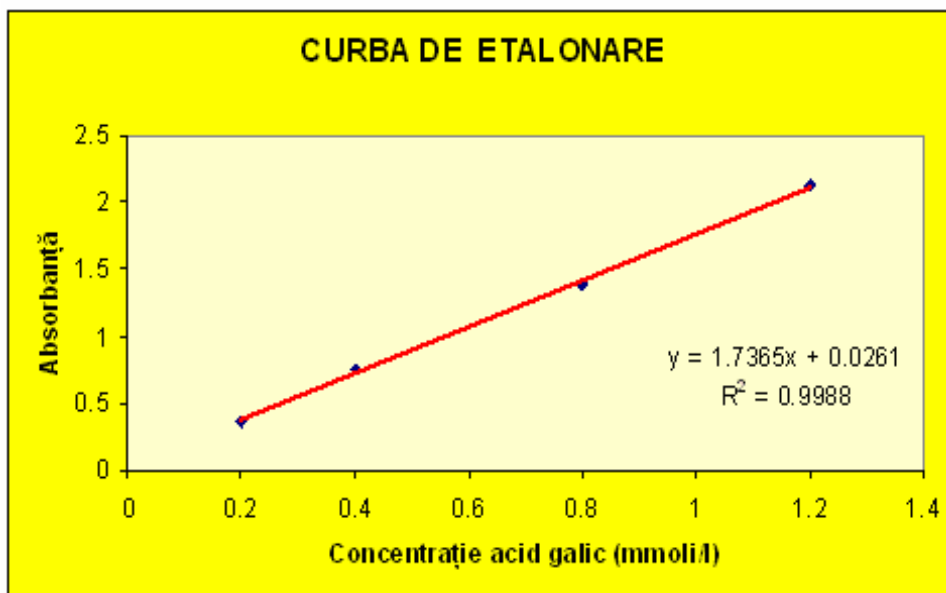


Fig. 40. Curba de etalonare folosind soluții standard de acid galic

Analiza conținutului total de polifenoli s-a realizat pe un extract în alcool etilic 50% obținut din suc de tomate, într-un raport suc de tomate: alcool etilic 50% = 1: 2 (w/v) (10 g de suc de tomate : 20 ml alcool etilic 50%) prin macerare la rece timp de 7 zile. După filtrarea pe filtru cu bandă albastră, filtratul s-a analizat imediat. În fiecare caz în parte, s-a ținut cont de diluția probelor pentru ca absorbanta citită să se încadreze în curba de etalonare.

Tabel 17. Capacitatea antioxidantă a extractelor alcoolice de suc de roșii din comerț

Extractul alcoolic analizat	TAC _{FRAP} ($\mu\text{moli Fe}^{+2}/\text{mL}$)	TAC _{FRAP} ($\mu\text{moli Fe}^{+2}/\text{g suc}$)	Polifenoli totali ($\mu\text{moli acid galic/ml}$)	Polifenoli totali ($\mu\text{moli/g suc}$)
Suc de tomate	6.96	13.90	2.14	4.28

Determinarea conținutului metalic al sucului de tomate

Determinarea conținutului metalic al sucului de tomate s-a realizat folosind metoda flamfotometrică descrisă anterior. Sucul de tomate concentrat a fost mineralizat prin ardere, cenușa fiind reluată cu o soluție 1N de HNO_3 . Rezultatele experimentale (tabel 18) au relevat un conținut ridicat de sodiu și potasiu. Conținutul în Cu al sucului de roșii analizat este ridicat, dar se află în limitele naționale admise. În concluzie, folosirea unui suc de roșii cu un conținut mai ridicat de busuioc, armurariu și rozmarin care au un conținut mare de calciu și magneziu asigură un supliment de oligoelemente important fără a depăși limitele admise.

Tabel 18. Conținutul în metale al sucului de tomate îmbogățit cu rozmarin și busuioc

Conținutul în metale alcaline și alcalino-pământoase				
Na ppm	K ppm	Ca ppm	Mg ppm	
770	21970	2320	1350	
Conținutul în metale grele				
Cu ppm	Mn ppm	Zn ppm	Fe ppm	Ni ppm
12.7	10.2	29	72	1.5

II.4. Investigarea efectului administrării alimentelor îmbogățite cu compuși de extracție naturali în patologia sindromului metabolic

II.4.1. Constituirea unei diete optime pentru subiecții cu sindrom metabolic

Managementul sindromului metabolic și al factorilor individuali de risc în sindromul metabolic pune accent, în primul rând, pe modificarea stilului de viață (pierderea în greutate și activitate fizică), în timp ce terapia medicamentoasă se plasează în planul secund (în condițiile în care problemele cardiovasculare nu necesită tratament) [229]. Un studiu efectuat în Grecia în 2002 pe 22 043 participanți aparent sănătoși a arătat o asociere a dietei mediteraneene cu scăderea mortalității din cauze cardiovasculare sau cancer [230]. Dieta mediteraneeană este caracterizată de consum ridicat de fructe și legume, nuci și cereale, consum ridicat de ulei de măsline în detrimentul lipidelor saturate, consum moderat de pește și un consum moderat scăzut de lactate, consum scăzut de carne și un consum regulat, moderat scăzut de alcool, în principal vin consumat în timpul mesei [231]. Analiza efectuată pe componente individuale ale dietei mediteraneene a arătat că asocierea cu scăderea mortalității nu se mai menține, ceea ce sugerează o acțiune cumulativă, sinergică sau interactivă, a acestor componente individuale care este mai importantă decât acțiunea fiecărui component în parte [229].

În cazul studiului de față, întocmirea rațiilor alimentare vegetariene a avut în vedere aportul fiecărui aliment multicomponent cu componentele nutriționale naturale aferente. Aportul de acizi grași nesaturați omega-3 a fost asigurat, pe de o parte de sursele vegetale introduse în dietă (nuci și VITIS), iar pe de altă parte de suplimente nutritive omega-3. Acești acizi grași nesaturați au proprietăți antiinflamatoare, inhibând sinteza citokinelor TNF- α , IL-1 și IL-2 [232] și procesul de adeziune la nivel endotelial [233]. Acizii omega-3 duc la scăderea conținutului în acid arahidonic la nivelul membranelor plasmactice responsabil corelat cu nivelul de prostglandine

atrosclerotice (pGE2 și PGD2) și leucotriene, molecule de lipide biologice active care contribuie la procesul inflamator. Substituirea uleiului de floarea soarelui sau grăsimilor solide, frecvent utilizate în bucătăria românească, cu ulei de măsline a avut ca scop creșterea conținutului de acizi grași mononesaturați în detrimentul celor polinesaturați. Ruano și colab. [234] au demonstrat efectul pozitiv al uleiului de măsline extravirgin asupra funcției endoteliale precum și scăderea nivelului de lipoperoxizi. Se pare că, mai degrabă conținutul ridicat în polifenoli al uleiului de măsline extravirgin decât conținutul în acizi grași mononesaturați este cauza proprietăților cardioprotective ale acestuia [234]. Nucile au de asemenea un conținut ridicat de acizi grași mononesaturați care contribuie la ameliorarea profilului lipidic, dar și la reducerea proceselor de adeziune a moleculelor de adeziune la nivelul endoteliului. Conținutul ridicat în arginină contribuie și el la efectul cardioprotectiv al acestora [235]. Conținutul în metale precum potasiu, calciu, cupru, zinc, fier și mangan îmbogățit prin prezența plantelor medicinale și aromatice precum rozmarin, busuioc sau a coacăzelor negre și cătinei în alimentele funcționale (VITIS și suc de tomate îmbogățit) asigură suplimentarea cu microelemente necesare unor proceselor enzimatice și nu numai, care au loc în organism. O asociere invers proporțională a fost raportată prin mai multe studii între consumul de fructe și legume și apariția și progresul bolilor cardiovasculare [236, 237]. În cazul studierii contribuției antioxidantilor din fructe și legume la procesul inflamator, rezultatele studiilor observaționale au arătat o asociere între capacitatea antioxidantă totală asigurată de dietă, nivelul de carotenoizi și vitamine cu markeri ai inflamației [238,239]. S-a dovedit in vitro că prin combinarea anumitor antioxidanți cu proprietăți diferite care se reîncarcă radicalic unul pe altul se poate oferi protecție optimă pentru toate compartimentele celulare sau de la nivelul unui organism [240]. Așa este cazul rețelei formate de α -tocoferol, α -tocotrienol, vitamina C, acid lipoic și tioli care interacționează in vitro între ei pentru stingerea reacțiilor radicalice, ducând la neutralizarea ROS [240]. Ținând cont de toate aceste aspecte, s-au întocmit rații alimentare vegetariene, pe bază de legume de sezon, care conțin o gamă largă de antioxidanți cărora li s-a determinat capacitatea antioxidantă și care s-au analizat din punct de vedere al conținutului în metale bioactive și metale toxice. Deoarece perioada de urmărire a subiecților a fost de 6 luni, rațiile alimentare nu au fost foarte stricte. Au fost realizate experimental diferite rații alimentare vegetale, cele mai convenabile fiind considerate următoarele: salată de varză albă, varză roșie, morcovi, pătrunjel, ceapă; salată de tomate, ardei, castraveți, ceapă, țelină pătrunjel și supă de legume morcovi, păstârnac, conopidă, cartofi, țelină, pătrunjel și bulion.

II.4.1.1. MATERIALE ȘI METODE

Pentru analiza alimentelor multifuncționale din dietă s-au folosit metodele de determinare a activității antioxidante FRAP și Folin-Ciocalteu descrise la capitolul II.2.1. Prelucrarea materialului în vederea determinării capacității antioxidante a alimentelor a ridicat destul de multe probleme. Materialul vegetal a fost mărunțit cu un robot de bucătărie. Extractul hidroalcoolic s-a obținut prin macerarea la rece (20°C-25°C) a materialului vegetal în alcool 50% (10 g material vegetal/20 ml alcool etilic 50%) timp de 7 zile. Filtrarea materialului vegetal s-a făcut pe filtru cu bandă albastră. Pe filtratul obținut s-a făcut analiza capacității antioxidante cu metoda FRAP și analiza conținutului în polifenoli totali folosind reactivul Folin-Ciocalteu.

II.4.1.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

S-a determinat conținutul în polifenoli și capacitatea antioxidantă și s-a raportat la masa de material vegetal folosită pentru analiză (nu la g de substanță uscată).

Tabel nr. 19. Caracterizarea capacității antioxidante a produselor funcționale obținute

Nr. crt.	Produsul	Capacitatea Antioxidantă (FRAP) Fe ²⁺ μM/g	Polifenoli (acid galic) μM/100g
1	Salată legume1	2.41	2.25
2	Salată legume 2	1.80	2.68
3	Supă legume	1.17	0.94

Cea mai ridicată capacitate antioxidantă a fost determinată la salata pe bază de varză, urmată de salata pe bază de tomate și castraveți.

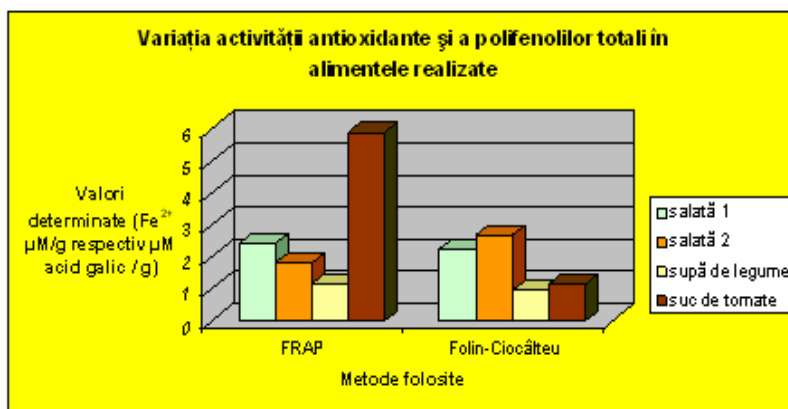


Fig.41. Determinarea activității antioxidante a unor alimente în scopul includerii în dietă

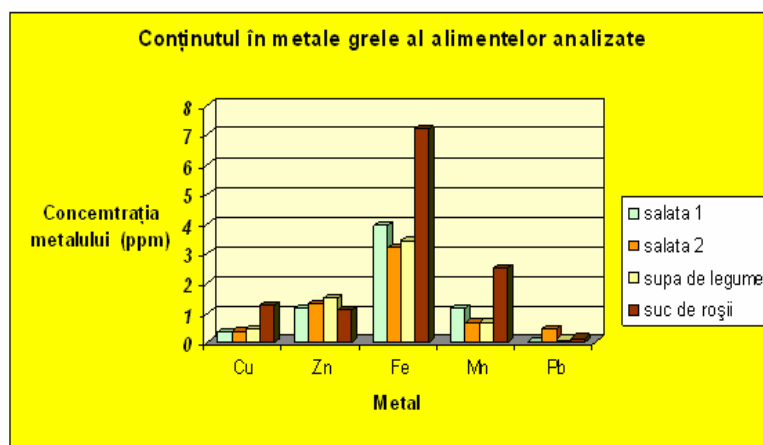


Fig.42. Conținutul în metale grele ale salatei de legume 1 (culoare albastră), salată 2 (culoare galbenă) și supa de legume (culoare roz) pentru Cu (1), Zn(2), Fe(3), Mn(4), Ni(5), Pb(6), Cd(7), Cr(8)

Se remarcă conținuturile apreciabile, dar fără a deveni toxice, de Fe, Mn urmat de Zn și Cu. Alimentele funcționale vegetale au conținuturi similare de metale, nedepășind limitele legale admise.

Dieta pentru subiecții cu sindrom metabolic a fost propusă ținând cont de nevoile individuale ale subiecților și a constatat în:

Tabel 20. Constituirea și administrarea dietei

Ingredient	Aliment multicomponent	Mod de administrare
<ul style="list-style-type: none"> ▪ min. 200g legume proaspete ▪ 15 ml oțet balsamic ▪ 15 ml ulei de măsline 	Salată de legume 1 Salata de legume 2 Supă de legume	Se consumă o dată pe zi, timp de 5 zile / săptămână pe durata a 6 luni a unei salate de crudități la alegere (min.200g) cu 15 ml ulei de măsline și 15 ml oțet balsamic sau a unei supe de legume (min.200g) preparată folosind 100 ml de suc de tomate. În cazul alegerii unei salate, sucul de tomate se administrează sub formă de sosuri pentru paste.
<ul style="list-style-type: none"> ▪ 100 ml suc de tomate îmbogățit cu rozmarin 	Supă de legume Sosuri	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ 15 ml de extract de sâmburi de struguri 	Produsul VITIS	După fiecare masă din dietă (de prânz sau cină)
<ul style="list-style-type: none"> ▪ 3-4 nuci sau 15 g de semințe de dovleac 	Nuci, semințe	După fiecare masă din dietă (de prânz sau cină)
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Supliment nutritiv natural VITAPAN 	Pâine	În timpul fiecărei mese dietetice (prânz sau cină)

II.4.2. Evaluarea efectelor dietei alese la subiecții cu sindrom metabolic

II.4.2.1. MATERIALE ȘI METODE

II.4.2.1.1. Selecționarea subiecților umani incluși în loturile de studiu

Subiecții cu sindrom metabolic au fost selectați conform criteriilor ATP III din ghidul american de clasificare a sindromului metabolic. Au fost selectați subiecții care îndeplinesc 3 din următoarele 5 criterii: obezitate, dislipidemie, hipertensiune arterială și sindromul rezistenței la insulină sau diabet.

Criterii de includere:

1. bărbați sau femei cu vârsta 18 – 70 de ani;
2. obezi (cu indicele de masă corporală -IMC > 30 kg/m²) sau indici antropometrici de obezitate;
3. fără medicație pentru obezitate;
4. cu complianța la dieta și exerciții indicate de medic;

Criterii de excludere:

- a. IMC < 30 kg/m²;
- b. Tensiune arterială necontrolată prin medicație sau modificări ale electrocardiogramei
- c. Abuz de alcool sau alte medicamente;
- d. Istoric de HIV sau hepatită cronică cu virusul B sau C, alte afecțiuni hepatice (cu TGO și TGP > 2-3 X decât normalul);
- e. Istoric de afecțiuni maligne;
- f. Subiecți cu probleme psihice care nu pot adera la tratamentul dietetic indicat;
- g. Femei în perioada sarcinii sau alăptării;
- h. Tratamente cu suplimente nutritive;
- i. Subiecți cu afecțiuni endocrine (tiroidiene, cortico-suprarenale, etc);
- j. Subiecți diagnosticați cu sindroame anemice;
- k. Istoric relevant de afectare renală (creatinina serică > 2mg/dl) sau gastro-intestinală;
- l. Subiecți diagnosticați cu accident vascular cerebral, infarct miocardic, angina pectorală, aritmii, insuficiență cardiacă congestivă clasa III-IV NYHA;
- m. Participanții (90) care au întrunit criteriile de includere au fost ulterior randomizați în grupuri de intervenție (A, B, C) și grup martor (D). Cei din *lotul A* de intervenție au primit alimente funcționale multicomponent + omega 3 (ulei de pește: 1 capsulă de 500 mg/zi), *lotul B* au primit alimente funcționale, *lotul C* omega 3 după o prealabilă tipizare metabolică și analiza toleranțelor alimentare. *Lotul D* a servit ca lot de control.
- n. Urmărirea efectelor alimentelor funcționale prin intervenție nutrițională a fost realizată după 3 luni și 6 luni de la înrolare în studiu (prin comparare cu momentul înrolării) prin analiza probelor biologice (sânge, ser, plasmă) provenite de la subiecți a următorilor parametri măsurabili:

A. Parametrii de efect metabolic:

- a. **scorul IR-HOMA** care este un indice al rezistenței la insulină. Acest index se poate calcula după formula: $IR-HOMA = \text{insulină } (\mu\text{U/ml}) \times \text{glucoză (mmol/l)} / 22.5$. și este o măsură a funcționării echilibrului dintre producția de glucoză de la nivel hepatic și secreția de insulină la nivelul celulelor β pancreatice. Valorile

- ridicate ale indicelui HOMA-IR indică sensibilitate la insulină redusă, iar acest lucru se manifestă prin apariția rezistenței la insulină.
- b. **profilul lipidic:** trigliceride totale, colesterol total și fracțiunile acestuia HDL colesterol și LDL colesterol. Dislipidemia aterogenică, prezentă printre factorii de risc în sindromul metabolic este caracterizată de nivel plasmatic crescut de trigliceride, nivel scăzut de HDL colesterol și ușor crescut până la normal de LDL colesterol.[241] Acizii grași liberi din circulație, acționează la nivelul ficatului unde stimulează sinteza de trigliceride și secreția de VLDL colesterol. Creșterea de VLDL colesterol duce la scăderea fracțiunii HDL datorită faptului că se transferă colesterol de la HDL la LDL prin intermediul CETP (proteina de transfer a colesterolilor)
 - c. **adiponectina** este un hormon proteic care modulează diferite procese metabolice cum ar fi catabolismul acizilor grași și metabolismul glucidic la nivelul ficatului și mușchiului scheletic. Adiponectina are și activitate antiateroscleroză prin: inhibarea expresiei citokinelor și a moleculelor de adeziune implicate în procesul inflamator și inhibarea expresiei receptorilor "scavenger" care leagă și internalizează formele oxidate și acetilate ale LDL implicate în patogeniza aterosclerozei. Adiponectina este secretată exclusiv la nivelul țesutului adipos și se afla în concentrație crescută în plasma sanguină în comparație cu alți hormoni (aprox. 5-10 μg/ml). Secreția de adiponectină este stimulată de: insulină (după administrarea acută), IGF-1, activarea PPAR γ și este inhibată de TNF-α, de administrarea cronică de insulină, glucocorticoizi și AMPc. Nivelele plasmatice ale adiponectinei sunt scăzute în stările asociate cu rezistența la insulină (obezitate, diabetul zaharat tip II și boala coronariană) și crescute în anorexia nervoasă, diabetul zaharat tip I și insuficiența renală cronică [241].
 - d. **leptina** este un hormon proteic, sintetizat predominant la nivelul adipocitelor diferențiate din țesutul adipos, dar și în alte țesuturi și organe: stomac, mușchi scheletic, ficat, placenta. Leptina acționează asupra sistemului nervos central, în special asupra hipotalamusului, prin legare de receptori specifici, determinând suprimarea apetitului și creșterea consumului energetic. Aportul alimentar determină creșterea producției de insulină, care stimulează la rândul ei secreția de leptină. Supraalimentarea masivă determină creșteri ale leptinei serice cu 50 % față de valoarea bazală inițială. La 24 de ore de înfometare, concentrația serică a leptinei scade la 30% din valoarea bazală [241]
 - e. **IL-6** este una dintre citokinele proinflamatorii asociate cu rezistența la insulină și diabetul tip 2, situații în care nivelul IL-6 crește de 2-3 ori comparativ cu condițiile bazale. IL-6 inhibă semnalizarea celulară prin intermediul receptorului insulinic (IR) și acțiunea directă a insulinei la nivelul hepatocitelor [242]. Datorită acestor considerente și faptului că producția acestuia de către adipocite și macrofage este de 2-3 ori mai ridicată la subiecții obezi, se consideră că producția crescută de IL-6 poate fi asociată cu sindromul metabolic.
 - f. **TNF-α**, sunt citokine proinflamatorii secretate de către țesutul adipos. Nivelul acestora este crescut la subiecții obezi. TNF-α este considerat ca fiind un potențial factor ce contribuie la dezvoltarea sindromului de rezistență la insulină. TNF-α influențează expresia GLUT-4, IRS-1, glicogen sintazei [243]. În celulele 3T3-L1 s-a observat că TNF-α reduce nivelul de adiponectină [244]
 - g. **nivelul de radicali liberi din sângele periferic** este influențat de multiple mecanisme așa cum s-a prezentat la capitolul I.1.1., iar dezechilibrul existent între producția și neutralizarea acestor specii duce la disfuncția endotelială în multiple moduri.

- h. **antioxidanții hidrosolubili** circulă nelegați în plasmă și se elimină la nivel urinar netransformați. Pentru transportul prin membrane au nevoie de sisteme de transport specializate. Din acest motiv, acționează pentru neutralizarea radicalilor liberi mai mult la nivel plasmatic.
 - i. **antioxidanți liposolubili** circulă în plasmă transportați de proteine și, în consecință, au timp mai lung de staționare în plasmă. Au un timp de metabolizare mai lung decât antioxidanții hidrosolubili și pot trece prin membrane (chiar se pot asocia la acestea), acumulându-se la nivelul țesutului adipos și a altor țesuturi unde își manifestă acțiunea de neutralizare a radicalilor liberi.
- B. Parametrii de progresie a aterosclerozei** : grosimea intima-medie la nivelul arterei carotide comune reprezintă un parametru ce caracterizează grosimea peretelui vascular la nivelul intimei arterei carotide comune.

II.4.2.1.2. Recoltarea probelor de sânge

Pentru a nu influența măsurarea variabilelor hemostatice, recoltarea probelor de sânge venos s-a făcut dimineața după o perioadă de aproximativ de 10 ore de post, folosind sisteme vacutainer care micșorează timpul în care sângele ajunge pe anticoagulant. Determinările de glucoză, lipide și de colesterol la subiecții analizați s-a realizat la Clinica de Cardiologie și Recuperare Vasculară din Timișoara valorile obținute fiind înregistrate în fișele medicale ale subiecților. Pentru determinările ELISA și antioxidanți s-a separat plasma din sângele venos recoltat pe anticoagulant (heparinat de litiu) prin centrifugare 10 min. la 2500 rpm. Pentru determinarea celorlalți parametrii biochimici s-a utilizat serul separat din sângele venos recoltat pe accelerator de coagulare prin centrifugare 10 min la 2500 rpm.

II.4.2.1.3. Metoda ELISA

Determinarea insulinei, adiponectinei, leptinei, IL-6 și TNF-α s-a realizat folosind metoda ELISA și analizorul ELISA (Start Fax 3200, Awareness Technology Inc.).

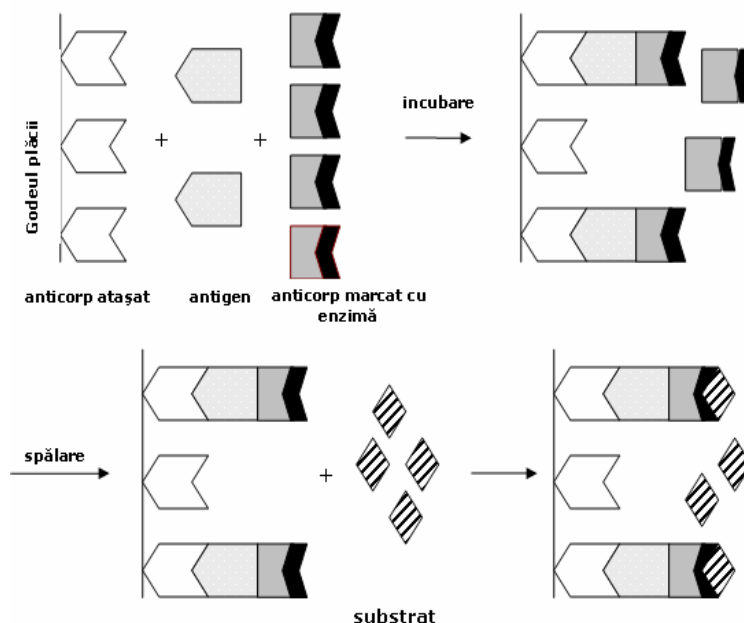


Fig. 43. Principiul metodei ELISA sandwich

Metoda ELISA sandwich utilizează un prim anticorp (anticorpul atașat) fixat de faza solidă (placa ELISA). Cantitatea de anticorp legat trebuie să fie astfel fixată încât numărul de situsuri de legare disponibile să fie mai mare decât numărul de molecule de antigen prezente în soluția etalon sau din cea necunoscută. Antigenul se va fixa astfel de situsurile specifice. Adăugarea unui al doilea anticorp marcat, este urmată de fixarea sa pe antigenul în prealabil fixat de primul anticorp. Antigenul este prins astfel în "sandwich" între cei doi anticorpi, de unde numele atribuit acestui tip de metodă. O simplă spălare a plăcii permite înlăturarea anticorpilor marcați nefixați aflați în exces. Pentru ca anticorpii marcați să poată reacționa cu antigenul deja angajat în reacția cu primul anticorp, cei doi anticorpi trebuie să reacționeze cu epitopi diferiți ai antigenului. Marcarea anticorpilor se face cu o enzimă, iar determinarea cantității de anticorp marcat cu enzima marker se face prin determinarea cantității de substrat sau de produs al reacției catalizate de enzima respectivă. În cadrul fiecărei metode utilizate se folosește o curbă standard folosind cantități cunoscute de antigen. Analizorul ELISA folosit construiește curba de etalonare și prezintă direct concentrația componentului de analizat.

A. Determinarea insulinei folosind metoda ELISA (kit DRG Instruments GMBH)

Principiul metodei. Kit-ul ELISA (solid phase enzyme-linked immunosorbent assay) se bazează pe principiul sandwich, în care anticorpii monoclonali specifici unui situs antigenic din structura insulinei sunt fixați de o matrice solidă ce acoperă peretele interior al godeurilor. Proba de analizat (plasmă) care conține insulină este incubată în godeurile respective cu un anticorp anti-insulină conjugat cu biotină (conjugatul enzimatic) și se formează un complex anticorp-insulină-anticorp-biotină. După incubare, conjugatul nelegat de insulină este îndepărtat prin spălare. În timpul celui de-al doilea proces de incubare, complexul enzimatic streptavidin peroxidază (HRP) se leagă de complexul biotină-anticorp antiinsulinic. Cantitatea de complex HRP legată este proporțională cu concentrația insulinei din proba analizată și va fi determinată printr-o reacție colorimetrică. Se citesc absorbanțele standardelor, controalelor și probelor la 450 ± 10 nm. Se folosește o curbă de etalonare folosind cele 6 standarde pe baza căreia se determină concentrațiile probelor necunoscute.

Mod de lucru:

1. S-au adăugat 25 μ L din fiecare standard (0; 6.25; 12.5; 25; 50; 100 μ IU/mL), control și probe în godeurile corespunzătoare (standardele conțin anticorp monoclonal antiinsulină)
2. S-au adăugat 25 μ L din conjugatul enzimatic în fiecare godeu (anticorp monoclonal antiinsulină conjugat cu biotină)
3. S-a amestecat ușor pentru 10 secunde pentru o amestecare completă
4. S-au incubat 30 minute la temperatura camerei fără să se acopere godeurile
5. S-a aruncat conținutul godeurilor rapid și s-a spălat de 3 ori cu câte 400 μ L de soluție de spălare
6. În fiecare godeu s-au adăugat câte 50 μ l de complex enzimatic (streptavidină-HRP)
7. S-au incubat 30 min la temperatura camerei
8. S-a aruncat conținutul godeurilor rapid și s-a spălat de 3 ori cu câte 400 μ L de soluție de spălare
9. În fiecare godeu s-au adăugat 50 μ L de soluție de substrat cromogen (3,3',5,5' tetrametilbenzidină TMB și H₂O₂)
10. S-au incubat 15 minute la temperatura camerei
11. S-a stopat reacția enzimatică cu reactivul de stopare (20% H₂SO₄)

12. S-a citit absorbanta probelor la 450 ± 10 nm folosind un cititor ELISA START FAX 2000 în decurs de 10 min. de la stoparea reacției

B. Determinarea interleukinei-6 folosind metoda ELISA (kit DRG Instruments GMBH)

Principiul metodei. Kit-ul ELISA (Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay) folosește un amestec de mai mulți anticorpi monoclonali direcționați către epitopi diferiți ai IL-6. Folosirea acestora conferă o sensibilitate mai mare metodei și evită hiperspecificitatea. Prima categorie de anticorpi (MABs1) sau anticorpi de captură sunt atașați de partea inferioară a pereților interiori ai godeurilor. Standardele, controalele și probele sunt adăugate la fiecare godeu. După incubare, se îndepărtează prin spălare excesul de antigen. Se adaugă complexul HRP-MABs-2 și se incubează. Se spală godeurile pentru îndepărtarea anticorpilor marcați nelegați. Soluția revelatoare (tetrametilbenzidină-TMB- și H_2O_2) este adăugată și se incubează amestecul de reacție. Reacția este stopată cu o soluție de H_2SO_4 și se citesc absorbantele standardelor, controalelor și probelor diferențial la 450 nm și 490 nm. Se folosește o curbă de etalonare folosind cele 6 standarde pe baza căreia se determină concentrațiile probelor necunoscute.

Mod de lucru:

1. În fiecare godeu s-au adăugat 50 μ l de soluție tampon de incubare (conține antiser)
2. S-au adăugat 100 μ l din fiecare standard (0; 16; 45; 147; 462; 1690 pg/mL), control și probe în godeurile corespunzătoare (standardele conțin MABs1)
3. S-a incubat 1h la temperatura camerei și s-a agitat pe un agitator orizontal la 700 ± 100 rpm
4. S-a aspirat conținutul godeurilor și s-a spălat de 3 ori cu câte 400 μ L de soluție de spălare
5. S-a adăugat câte 100 μ L de complex enzimatic Anti-IL-6-HRP în fiecare godeu
6. S-a pipetat 50 μ L de soluție A în fiecare godeu
7. S-a incubat 1h la temperatura camerei și se agită pe un agitator orizontal la 700 ± 100 rpm
8. S-a aspirat conținutul godeurilor și se spală de 3 ori cu câte 400 μ L de soluție de spălare
9. S-a adăugat 200 μ L de soluție de substrat cromogen (3,3',5,5' tetrametilbenzidină TMB și H_2O_2) în fiecare godeu în decurs de 15 minute
10. S-au incubat probele 15 minute la temperatura camerei cu agitare continuă 700 rpm
11. S-a stopat reacția enzimatică cu 100 μ L reactivul de stopare (H_2SO_4 20%)
12. S-a citit absorbanta probelor la 450 nm și 490 nm

C. Determinarea TNF- α din plasmă folosind metoda ELISA (kit DRG Instruments GMBH)

Principiul metodei. Kit-ul ELISA (Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay) folosește un amestec de mai mulți anticorpi monoclonali direcționați către epitopi diferiți ai TNF- α . Prima categorie de anticorpi (MABs1) sau anticorpi de captură sunt atașați de partea inferioară a pereților interiori ai godeurilor. Standardele, controalele și probele sunt adăugate la fiecare godeu. După incubare, se îndepărtează prin spălare excesul de antigen. Se adaugă complexul HRP-MABs-2 și se incubează. Se spală godeurile pentru îndepărtarea anticorpilor marcați nelegați. Anticorpii marcați legați de enzimă sunt măsurați folosind o reacție de culoare.

Soluția revelatoare (tetrametilbenzidină-TMB- și H_2O_2) este adăugată și se incubează amestecul de reacție. Reacția este stopată cu o soluție de H_2SO_4 și se citesc absorbânțele standardelor, controalelor și probelor. Se folosește o curbă de etalonare folosind cele 6 standarde pe baza căreia se determină concentrațiile probelor necunoscute.

Mod de lucru:

1. S-au adăugat 50 μ l de soluție tampon de incubare în fiecare godeu
2. S-au adăugat 200 μ l din fiecare standard (0; 13.2; 27.70; 115; 293; 1121 pg/mL), control și probe în godeurile corespunzătoare (ce conțin MABs1)
3. S-a incubat 2h la temperatura camerei și se agită pe un agitator orizontal la 700 ± 100 rpm
4. S-a aspirat conținutul godeurilor și se spală de 3 ori cu câte 400 μ L de soluție de spălare
5. S-a pipetat 100 μ L de standard 0 în fiecare godeu
6. S-a adăugat câte 50 μ l de complex enzimatic conjugat -anti-TNF- α -HRP în fiecare godeu
7. S-a incubat 2h la temperatura camerei și s-a agitat pe un agitator orizontal la 700 ± 100 rpm
8. S-a aspirat conținutul godeurilor și s-a spălat de 3 ori cu câte 400 μ l de soluție de spălare
9. S-a adăugat 200 μ l de soluție de substrat cromogen (3,3',5,5' tetrametilbenzidină TMB și H_2O_2) în fiecare godeu în decurs de 15 minute
10. S-au incubat probele 30 minute la temperatura camerei cu agitare continuă 700 rpm
11. S-a stopat reacția enzimatică cu 50 μ L reactivul de stopare (H_2SO_4 20%)
12. S-a citit diferențial absorbânța probelor la 450 nm și 490 nm

D. Determinarea leptinei din plasmă folosind metoda ELISA (kit DRG Instruments GMBH Leptina (sandwich) ELISA)

Kit-ul ELISA (solid phase enzyme-linked immunosorbent assay) se bazează pe principiul sandwich, în care anticorpii monoclonali specifici unui situs antigenic din structura leptinei sunt fixați de o matrice solidă ce acoperă peretele interior al godeurilor. Proba de analizat (plasmă) este incubată în godeurile respective cu un anticorp specific de iepure anti-leptină. Se îndepărtează materialul nelegat prin spălare, se adaugă conjugatul peroxidazic și se formează un complex anticorp-leptină -anticorp-marcant. După incubare, conjugatul nelegat de leptină este îndepărtat prin spălare. Concentrația de leptină din proba analizată va fi determinată printr-o reacție colorimetrică. Se citesc absorbânțele standardelor, controalelor și probelor la o lungime de undă specifică. Se folosește o curbă de etalonare folosind cele 6 standarde pe baza căreia se determină concentrațiile probelor necunoscute.

Mod de lucru:

1. S-au adăugat 15 μ l din fiecare standard (0; 2; 5; 25; 50; 100 μ IU/mL), control și probe în godeurile corespunzătoare
2. În fiecare godeu s-au adăugat 100 μ l de tampon de incubare (anticorpi antileptină)
3. S-a amestecat ușor pentru 10 sec. pentru o amestecare completă
4. S-au incubat 120 min. la temperatura camerei fără să se acopere godeurile
5. S-a aruncat conținutul godeurilor rapid și s-a spălat de 3 ori cu câte 300 μ L de soluție de spălare
6. S-au adăugat câte 100 μ L de antiser în fiecare godeu (antiser leptină)
7. S-au incubat 30 minute la temperatura camerei

8. S-a aruncat conținutul godeurilor rapid și s-a spălat de 3 ori cu câte 300 μL de soluție de spălare
9. S-au adăugat 100 μL de complex enzimatic anti-iepure-HRP
10. S-au incubat probele 30 minute la temperatura camerei
11. S-au adăugat 100 μL de soluție de substrat cromogen (3,3',5,5' tetrametilbenzidină TMB și H_2O_2) în fiecare godeu
12. S-au incubat 15 minute la temperatura camerei
13. S-a stopat reacția enzimatică cu 50 μL reactivul de stopare (H_2SO_4)
14. S-a citit absorbanta probelor la 450 ± 10 nm folosind un cititor ELISA START FAX 2000 în decurs de 10 minute de la stoparea reacției

E. Determinarea adiponectinei din plasmă folosind tehnica ELISA (kit DRG Adiponectin (Human) ELISA)

Principiul metodei. Kit-ul ELISA sandwich folosește un amestec de mai mulți anticorpi monoclonali direcționați către epitopi diferiți ai adiponectinei. Prima categorie de anticorpi monoclonali sunt atașați de partea inferioară a pereților interiori ai godeurilor. Standardele, controalele și probele sunt adăugate la fiecare godeu. După incubare, se îndepărtează prin spălare excesul de antigen. Adăugarea unui al doilea anticorp anti-adiponectină biotinitat. După incubare, se îndepărtează prin spălare excesul de antigen. Se adaugă conjugatul HRP legat de streptavidină și se incubează. Se spală godeurile pentru îndepărtarea anticorpilor marcați nelegați. Anticorpii marcați legați de enzimă sunt măsurați folosind o reacție de culoare. Soluția revelatoare (3,3',5,5'-tetrametilbenzidină-TMB- și H_2O_2) este adăugată și se incubează amestecul de reacție. Reacția este stopată cu o soluție de H_2SO_4 și se citește absorbanțele standardelor, controalelor și probelor diferențial 450 nm-590 nm. Se folosește o curbă de etalonare folosind cele 7 standarde pe baza căreia se determină concentrațiile probelor necunoscute.

Mod de lucru:

1. S-a diluat soluția tampon de spălare 10x HRP de 10 ori prin amestecarea conținutului sticlei de tampon din kit cu 450 mL apă deionizată și distilată
2. S-au spălat godeurile de 3x 300 μL soluție tampon de spălare și s-a înlăturat soluția de spălare
3. S-au adăugat 60 μL din soluția tampon de analiză A din kit
4. S-au adăugat 20 μL din fiecare standard (1.56; 3.125; 6.25; 12.5; 25; 50; 100 $\mu\text{IU/mL}$), control și probe (diluante în prealabil 1:500) în godeurile corespunzătoare
5. S-au adăugat 20 μL din soluția de anticorp de detecție (Biotinilated Mouse anti Human adiponectin antibodies)
6. S-a amestecat ușor pentru 10 sec. pentru o amestecare completă
7. S-au incubat 2 h la temperatura camerei cu agitare ușoară (400 rpm)
8. S-a aruncat conținutul godeurilor rapid și s-a spălat de 3 ori cu câte 300 μL de soluție tampon HRP de spălare
9. S-au adăugat câte 100 μL de soluție enzimatică în fiecare godeu (streptavidin -HRP)
10. S-au incubat 30 minute la temperatura camerei
11. S-a aruncat conținutul godeurilor rapid și se spală de 5 ori cu câte 300 μL de soluție de spălare
12. S-au adăugat 100 μL de soluție de substrat cromogen (3,3',5,5' tetrametilbenzidină TMB și H_2O_2) în fiecare godeu
13. S-a agitat placa ușor 5-10 min.

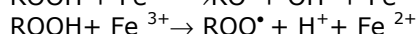
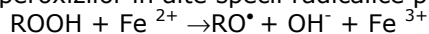
14. S-a stopat reacția enzimatică cu 100 μ l din reactivul de stopare (H_2SO_4 20%)
15. S-a citit diferențial absorbanta probelor la 450 și 590 nm folosind un cititor ELISA START FAX 2000.

II.4.2.1.4. Determinarea nivelului de specii reactive ale oxigenului de tip hidroperoxid

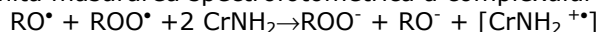
Determinarea ROS de tip hidroperoxid din sângele periferic s-a realizat utilizând testul FORT folosind analizorul FORM (Callegari)

Principiul metodei

FORT este o metodă colorimetrică bazată pe reacția Fenton a hidroperoxidilor în prezența fierului liber producând diferite specii radicalice secundare. Testul FORT se bazează pe capacitatea metalelor tranziționale de a cataliza reacția de transformare a hidroperoxidilor în alte specii radicalice precum alcoxil (RO^\bullet) și peroxil (ROO^\bullet):



Aceste specii nou formate reacționează cu un cromogen specific (derivat aminic) și generează un radical complex de tip cation aminic cu durată de viață suficientă cât să permită măsurarea spectrofotometrică a complexului colorat la 505 nm:



Datorită heterogeneității speciilor radicalice formate prin reacția Fenton, rezultatele sunt calculate în unități arbitrare FORT care pot fi convertite în cantități echivalente de H_2O_2 (o unitate FORT cuprinde aproximativ 7.6 mmol/l echivalent a 0.26 mg/l de H_2O_2).

Valori normale: până la 310 unități FORT

Liniaritatea metodei se menține între 160-600 unități FORT

Interferențe: orice fel de agenți chelanți, fier și/sau surse de peroxid hidrogen externe (de ex. EDTA, citrat, H_2O_2 , BHT)

Mostra: 20 microlitri de sânge integral.

Mod de lucru:

- S-a colectat sângele utilizând tubul capilar.
- S-a plasat capilarul în reactivul R2 (conține Fe^{2+}), apoi s-a transferat conținutul în reactivul R1 (cromogen) agitând ușor conținutul
- S-a centrifugat 1 min. la 3500 rpm
- La 6 minute după introducerea cuvei în celula aparatului de citire se citește direct rezultatul în unități FORT

II.4.2.1.5. Determinarea activității antioxidantilor hidro- și liposolubili din plasmă

Au fost analizați prin metoda chemiluminescentă și analizorul PHOTOCHEM (Analytik Jena). Prin iradiere ($\lambda=360$ nm) se generează anioni superoxid într-o soluție ce conține luminol (10 μ mol/l în tampon carbonat, pH=10,6). Reacția luminolului cu O_2^\bullet (fig.45) produce, în final, după câteva etape intermediare, un compus excitat electronic (anionul aminoftalat). Radiația emisă de acest compus se măsoară cu o celulă chemoluminometrică (~ 425 nm). Antioxidanții din probele testate captează ionii superoxid generați, reducând în intensitate radiația emisă de luminolul excitat (inhibând reacția luminolului – comparativ cu proba martor).

Capacitatea antioxidantă este cuantificată prin comparare cu un standard. Pentru substanțele liposolubile acesta este TROLOX, un derivat de α -tocoferol. Pentru cele

hidrosolubile, standardul este acidul ascorbic. În ambele cazuri se construiește o curbă de etalonare.

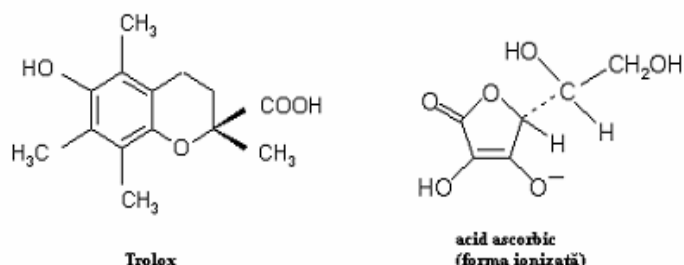


Fig.44. Standardele antioxidante folosite în determinarea activității antioxidante a plasmii prin metoda chemiluminescentă (ACL și ACW)

În cazul substanțelor liposolubile, se calculează diferența între integrala de sub curbă a matorului (soluția fără antioxidant) și a probei (soluția cu antioxidant – standardul sau extractul de plante) și se împarte la integrala standardului. Pentru substanțele hidrosolubile se determină derivata 1 a curbei, se determină punctul de inflexiune, apoi panta prin acest punct. Punctul de intersecție al tangentei (panta) cu axa X definește timpul Lag (durata fazei Lag). Parametrul de definire al capacității antioxidante este diferența între timpul Lag al matorului (determinarea fără antioxidant) și cel al probei (Lag-Lag(O)). Aceste calcule sunt realizate automat de soft-ul aparatului.

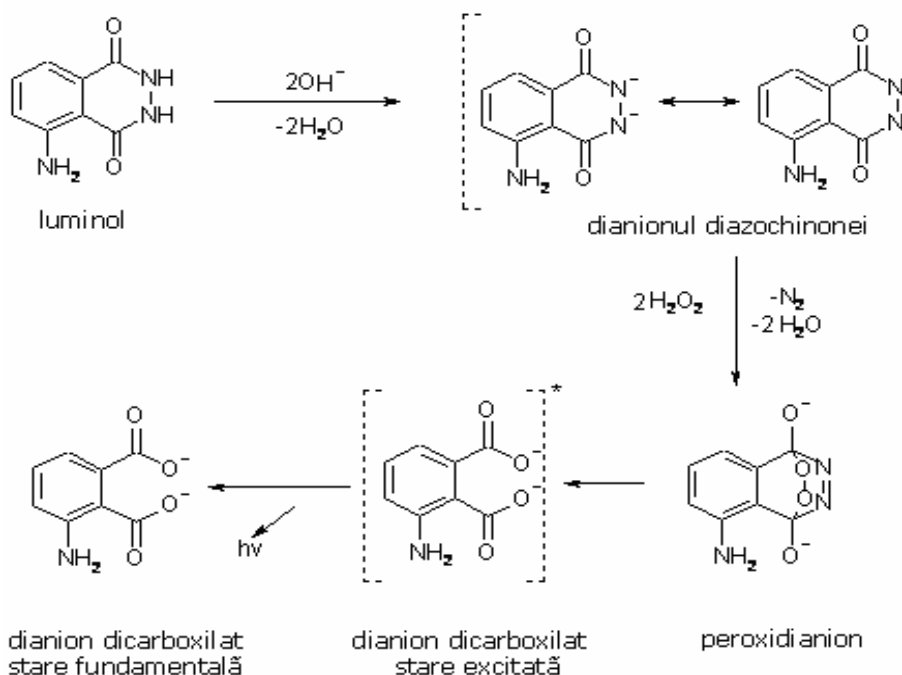


Fig.45. Reacțiile care stau la baza determinării activității antioxidante prin metoda chemiluminescenței

A. Determinarea antioxidanților hidrosolubili

Reactivi conform kitului Photochem

- Reactiv 1 - Diluant ACW (solvent pentru probe)
- Reactiv 2 - Tampon de reacție
- Reactiv 3 - Soluție stoc de substanță fotosensibilă (va genera ion superoxid) și reactiv de detecție (luminol). La conținutul sticlei se adaugă 750 μl tampon de reacție (Reactiv 2) și se agită energic la vortex.
- Reactiv 4 – Standard de acid ascorbic. 10 μl Reactiv 4 de lucru conțin 1 nmol acid ascorbic. (soluție stoc – la conținutul sticlei se adaugă 490 μl Reactiv 1 și 10 μl acid sulfuric concentrat 95-97% și se agită la vortex 20-30 secunde; soluție de lucru – se diluează soluția stoc 1 : 100 cu Reactiv 1).

Mod de lucru

Se lucrează direct pe plasmă. Dacă concentrația antioxidanților este prea mare și nu se încadrează în curba de etalonare, se procedează la diluarea plasmei cu Reactiv 1. Pentru determinarea antioxidanților hidrosolubili se procedează conform instrucțiunilor aparatului. În eprubete de plastic se pipetează conform tabelului următor:

Tabel 21. Mod de lucru la determinarea antioxidanților hidrosolubili

Reactiv	1	2	3	4-de lucru	Probă
Martor (μl)	1500	1000	25	0	0
Calibrare (μl)	1500 - X	1000	25	X	0
Probă (μl)	1500 - Y	1000	25	0	Y

Se procedează separat și pe rând pentru fiecare eprubetă. După amestecarea reactivilor prin vortexare, eprubeta se atașează la aparat, se fixează programul de lucru corespunzător și se pornește determinarea. Aparatul va lucra automat, înregistrează datele și calculează conținutul în antioxidanți, exprimat ca acid ascorbic, în fiecare probă, în nmoli. Pentru curba de etalonare se pipetează 5, 10, 20, 30 și respectiv 40 μl reactiv 4 de lucru, corespunzător la 0,5; 1; 2; 3 și respectiv nmoli acid ascorbic (vezi curbe de etalonare anexa 4.1 și 4.2). Concentrația finală se calculează cu formula:

$$\text{concentrație } (\mu\text{mol/l}) = [(\text{Cantitate} \times \text{Diluție}) / \text{volum pipetat}] \times 1000$$

unde: cantitatea exprimată în nmol reprezintă numărul de echivalenți de acid ascorbic sau Trolox (valoare calculată de aparat); diluția reprezintă factorul de diluție al probei înainte de determinare (pentru încadrarea în curba de etalonare), iar volumul pipetat reprezintă μl de probă, diluată sau nu, luați pentru determinare.

B. Determinarea antioxidanților liposolubili

Reactivi conform kitului Photochem

- Reactiv 1 - Diluant ACL (metanol)
- Reactiv 2 - Tampon de reacție
- Reactiv 3 – soluție stoc substanță fotosensibilă (vezi A).
- Reactiv 4 – Standard TROLOX (soluție stoc – la conținutul sticlei se adaugă 500 μl Reactiv 1 și se agită la vortex 20-30 secunde; soluție de lucru – se diluează soluția stoc 1 : 100 cu Reactiv 1. 10 μl).

- Reactiv 4 de lucru conține 1 nmol TROLOX.

Mod de lucru

Antioxidanții liposolubili se extrag în prealabil într-un solvent organic, hexan. Se pipetează 200 μ l plasmă, 200 μ l apă distilată, 400 μ l etanol (pentru precipitarea proteinelor) și se agită bine apoi se adaugă 800 μ l hexan. Se vortijează 1 minut apoi se centrifughează 5 – 10 minute la 2500 rpm. Pentru analiză se utilizează supernatantul.

Pentru determinarea antioxidantilor liposolubili se procedează conform instrucțiunilor aparatului. În eprubete de plastic se pipetează conform tabelului de mai jos:

Tabel 22 . Mod de lucru la determinarea antioxidantilor liposolubili

Reactiv	1	2	3	4-de lucru	Probă
Blank (μ l)	2300	1000	25	0	0
Calibrare (μ l)	2300 – X	1000	25	X	0
Probă (μ l)	2300 – Y	1000	25	0	Y

În continuare, modul de lucru și de calcul este identic cu cel de la metoda A. Curba standard este prezentată în anexa 4.3. Conținutul în antioxidanți a fost exprimat ca nmoli acid ascorbic, în fiecare probă.

II.4.2.1.6. Determinarea grosimii intima-medie a arterei carotide comune (CCA)

Determinarea grosimii intima-medie a arterei carotide comune (CCA) s-a efectuat cu ajutorul ecocardiografului VIVID 4, sonda 1,5-2,5/D20MHz. Evaluarea CCA cu ajutorul ultrasunetelor s-a făcut pe echipamentul standard ce include un sistem de operare tip B de rezoluție înaltă cu transductor liniar cu frecvența de 17MHz. Pentru obținerea unei imagini de calitate s-a folosit o distanță focală optimă (ex. 30–40 mm), frecvența optimă a cadrelor de 25 Hz (1 15 Hz), și setări de amplificare (artefacte intraluminale minime). S-au respectat recomandările legate de scanarea carotidiană IMT și citirea protocolului.

II.4.2.1.7. Analiza statistică a datelor

Analiza statistică a datelor s-a efectuat cu ajutorul programului SPSS versiunea V. 13.1. S-a utilizat testul de t-student pentru compararea mediei între două variabile, ANOVA pentru compararea mediei unei singure variabile la cele 4 loturi de studiu, sau compararea a trei variabile diferite la fiecare lot individual. S-a considerat semnificativă statistic valoarea lui $p \leq 0.05$.

II.4.2. 2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Cei 90 de subiecți incluși în studiu au fost randomizați în patru grupe de studiu după cum urmează : lotul A a primit alimente funcționale și omega 3 (23 de subiecți), lotul B care a primit numai alimente funcționale (23 de subiecți), lotul C care a primit numai omega 3 (21 de subiecți) și lotul D control (23 de subiecți).

S-au comparat valorile medii ale fiecărui parametru individual între cele 4 loturi de studiu și s-au observat diferențe statistice la înrolare între valorile insulinei în sensul că grupul subiecților tratați cu omega 3 (lotul C) prezintă o medie a valorilor de insulină mai mare decât celelalte grupuri. Valorile medii ale IL-6 la înrolare în grupul A (alimente + omega 3) au fost mult mai mici comparativ cu lotul control, dar și cu celelalte grupuri după cum se poate vedea în tabelul următor:

Tabel 23. Rezultatul comparării mediei valorilor fiecărui parametru metabolic investigat între grupurile A-D

Nr. crt	Parametrul analizat	Inițial	La 3 luni	La 6 luni
1.	HOMA-IR	p = 0.204	p = 0.145	p = 0.335
2.	Glicemia (mmol/l)	p = 0.426	p = 0.184	p = 0.212
3.	Insulina (μ UI/ml)	p = 0.034	p = 0.124	p = 0.303
4.	Antioxidanți hidrosolubili (μ mol/L)	p = 0.732	p = 0.056	p = 0.012
5.	Antioxidanți liposolubili (μ mol/L)	p = 0.379	p = 0.576	p = 0.633
6.	Adiponectină (μ g/ml)	p = 0.124	p = 0.015	p = 0.446
7.	Leptină (μ IU/ml)	p = 0.373	p = 0.657	p = 0.326
8.	TNF- α (pg/ml)	p = 0.501	p = 0.758	p = 0.411
9.	IL-6 (pg/ml)	p = 0.041	p = 0.378	p = 0.263

Notă: valori ale lui $p \leq 0.05$ s-au considerat semnificative statistic

Din tabelul 23 se constată o diferență semnificativă statistic a valorilor medii ale adiponectinei între cele 4 grupuri analizate la trei luni de la înrolare, diferență ce nu se mai menține după 6 luni de administrare a terapiei respective. Nivelul antioxidantilor hidrosolubili din plasma nu a fost semnificativ diferit la cele 4 grupuri analizate, dar după 3 luni de terapie se constată o tendință de diferențiere a celor 4 grupuri pentru ca, după 6 luni, să se constate că există o diferență statistică între grupuri în ceea ce privește valorile antioxidantilor hidrosolubili. Pentru a vedea cum variază aceste valori la cele 4 grupe analizate valorile medii ale parametrilor evaluați la înrolare, după 3 luni și după 6 luni de administrare a terapiei se vor urmări tabelele 24-25. Compararea valorilor aceluiași parametru la înrolare și după terapie pentru fiecare din cele 4 grupuri luat individual s-a realizat folosind testul t-student pentru perechi de variabile (la înrolare și după 3, respectiv 6 luni). Valorile lui p calculate pentru fiecare comparație în parte sunt prezentate în tabelul nr.24.

Tabel 24. Compararea valorilor fiecărui parametru individual la înrolare și după aplicarea terapiei pentru fiecare din loturile analizate (culoare gri închis valori semnificativ statistice ale lui p, culoare gri deschis un trend de a fi semnificativ statistic al lui p)

Comparația între valorile fiecărui parametru individual la înrolare și după 3 luni					
Nr. Crt.	Parametrul analizat	Lotul A Alimente + omega 3	Lotul B Alimente	Lotul C Omega	Lotul D Control
1	HOMA IR	p = 0.425	p = 0.027	p = 0.158	p = 0.397
2	Glicemia (mg/100 ml)	p = 0.565	p = 0.129	p = 0.045	p = 0.448
3	Insulina (μ IU/ml)	p = 0.737	p = 0.041	p = 0.294	p = 0.519
4	Antioxidanți hidrosolubili (μ mol/L)	p = 0.895	p = 0.066	p = 0.819	p = 0.750
5	Antioxidanți liposolubili (μ mol/L)	p = 0.218	p = 0.142	p = 0.653	p = 0.946
6	Adiponectină (μ g/ml)	p = 0.028	p = 0.393	p = 0.512	p = 0.096
7	Leptină (μ IU/ml)	p = 0.007	p = 0.004	p = 0.180	p = 0.131
8	TNF- α (pg/ml)	p = 0.576	p = 0.500	p = 0.028	p = 0.631
9	IL-6 (pg/ml)	p = 0.031	p = 0.467	p = 0.467	p = 0.418

Comparația între valorile fiecărui parametru individual la înrolare și după 6 luni					
Nr. crt.	Parametrul analizat	Lotul A Alimente + omega 3	Lotul B Alimente	Lotul C Omega	Lotul D Control
1	HOMA IR	p =0.375	p =0.249	p=0.275	p =0.541
2	Glicemia (mg/100 ml)	p =0.326	p =0.194	p=0.015	p =0.920
3	Insulina (μIU/ml)	p =0.528	p =0.135	p=0.589	p =0.421
4	Antioxidanți hidrosolubili (μmol/L)	p =0.268	p =0.002	p=0.328	p =0.942
5	Antioxidanți liposolubili (μmol/L)	p =0.039	p =0.038	p=0.282	p =0.324
6	Adiponectină (μg/ml)	p =0.059	p =0.121	p=0.403	p =0.634
7	Leptină (μIU/ml)	p =0.526	p =0.898	p=0.013	p =0.316
8	TNF-α (pg/ml)	p =0.283	p =0.535	p=0.103	p =0.454
9	IL-6 (pg/ml)	p =0.071	p =0.959	p=0.162	p =0.041

Luând în considerare datele prezentate în tabelele 24-27 și graficele din figurile 46-47 se poate constata că indicele HOMA-IR (insulină (μU/ml) x glucoză (mmol/l)/22.5) a fost crescut la înrolare la lotul C comparativ cu celelalte grupuri. Valorile ridicate ale indicelui HOMA-IR indică sensibilitate la insulină redusă a subiecților din grupul C. Aceste valori ridicate se datorează valorilor mari ale insulinei și glicemiei (p=0.045 la 3 luni și respectiv p=0.015 la 6 luni de la înrolare). După aplicarea tratamentului cu omega-3, indexul HOMA-IR se reduce la valori comparabile cu ale celorlalte grupuri datorită unei scăderi a insulinei și a valorilor glicemiei. Pe de altă parte la nivelul lotului B de studiu, după 3 luni de dietă se constată o creștere semnificativă a indicelui HOMA -IR comparativ cu grupul control (p=0.025) și cu momentul înrolării (p=0.027) (vezi 25-27).

Tabel 26. Compararea nivelelor plasmatice ale parametrilor metabolici inițial (I), după 3 luni de la înrolare (II) și după 6 luni de la înrolare (III) comparativ cu valorile corespunzătoare din lotul control (↑ nivel crescut, ↓ nivel scăzut, * semnificativ statistic (p≤0.05), culoare gri pal - aproape semnificativ statistic, culoare gri închis semnificativ statistic — similar)

Parametrul analizat	Lotul A Alimente + omega 3			Lotul B alimente funcționale			Lotul C Omega3		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
HOMA IR	↓	↑	↓	↓	↑*	↑	↑	↑	↑
Glicemia (mg/100 ml)	↓	↑	↓	↑	↑	↑	↓	↓	↓
Insulina (μIU/ml)	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↑
Antioxidanți hidrosolubili (μmol/L)	↓	↓	↓	↑	↑	↑*	↓	↓	↓
Antioxidanți liposolubili (μmol/L)	↑	↓	↓	↑	—	↑	↑	—	↑
Adiponectină (μg/ml)	↓	↑	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↓
Leptină (μIU/ml)	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↑
TNF-α (pg/ml)	↑	↓	↓	↑	—	↓	↓	↓	↓
IL-6 (pg/ml)	↓*	↓	↓	↓	↓	↑	↓*	↓	↓
Radicali liberi din sângele periferic (FORT)	↑	↓*	↓*	↑	↑	↓	↓	↑*	↓

Parametrii analizați	La înrolare				După 3 luni				După 6 luni			
	Lotul A	Lotul B	Lotul C	Lotul D	Lotul A	Lotul B	Lotul C	Lotul D	Lotul A	Lotul B	Lotul C	Lotul D
	N=23	N=23	N=21	N=23	N=23	N=23	N=21	N=23	N=23	N=23	N=21	N=23
HOMA-IR	5.0321 ±3.369	4.1193 ±2.3981	7.9207 ±9.49	3.9686 ±4.069	4.6958 ±2.2230	6.8985 ±4.88712	5.3738 ±2.8021	3.3987 ±2.22051	3.4945 ±1.2786	5.5129 ±4.0786	4.7400 ±1.4854	3.9745 ±3.0066
Glucosa (mmol/l)	5.1129 ±0.9972	6.4033 ±2.96154	5.6264 ±1.4257	6.084 ±2.6695	4.8442 ±0.36	6.5760 ±0.905	5.1850 ±0.2812	5.2012 ±0.34	4.8501 ±0.946	6.2986 ±2.84	4.6780 ±0.62776	6.3909 ±3.69408
Glucosa (mg/100ml)	93.557 ±17.66	116.513 ±53.84	102.900 ±25.37	110.900 ±48.6926	93.700 ±15.9105	127.93 ±65.83	94.3667 ±17.758	97.6875 ±15.827	88.255 ±17.2188	114.586 ±51.6565	108.3405 ±77.77	116.274 ±67.1438
Insulina (μIU/ml)	27.1986 ±2.7459	13.9133 ±2.5999	21.2157 ±12.6834	13.3500 ±12.8202	22.926 ±11.3663	23.663 ±15.0312	22.846 ±8.09	12.431 ±5.0208	16.1273 ±5.89153	22.4953 ±21.1273	22.7956 ±5.74	14.5164 ±7.6799
Antioxidanții hidrosolubili (μmol/L)	343.60 ±185.858	378.52 ±188.332	441.53 ±314.042	406.06 ±240.064	359.778 ±209.8074	624.398 ±242.0288	398.500 ±196.0958	458.425 ±197.3573	417.07 ±186.155	643.74 ±271.954	407.49 ±129.749	405.51 ±202.643
Antioxidanții liposolubili (μmol/L)	64.183 ±22.4681	78.744 ±31.2210	64.183 ±22.461	60.274 ±30.25	54.3967 ±5.8938	59.6844 ±11.5639	57.3592 ±9.17470	59.9163 ±9.79334	51.267 ±19.0686	56.763 ±12.9943	57.629 ±19.8792	50.815 ±10.3593
Adiponectina (μg/ml)	6.925 ±4.6176	7.707 ±4.5413	7.983 ±4.6266	11.679 ±7.2853	11.70 ±10.704	6.53 ±3.643	7.57 ±5.594	19.70 ±16.288	11.1338 ±3.39	7.6467 ±4.2292	8.3770 ±5.4221	10.4837 ±7.90636
Leptina (μIU/ml)	29.236 ±20.4707	32.880 ±16.8507	25.156 ±11.489	40.050 ±28.4065	47.844 ±32.2834	56.172 ±23.6239	45.477 ±34.0199	63.329 ±45.2676	36.325 ±23.59	39.686 ±23.6174	59.040 ±5.6114	57.320 ±32.8545
TNF-α (pg/ml)	31.75 ±51.20	27.91 ±64.94	6.75 ±7.512	12.39 ±16.13	21.705 ±18.1454	18.111 ±13.1822	15.633 ±7.5007	18.322 ±12.8962	12.9614 ±9.51144	17.6357 ±8.9447	23.5278 ±19.0227	11.891 ±12.9169
IL-6 (pg/ml)	1.1364 ±2.7145	22.9433 ±24.9891	21.933 ±27.068	50.2629 ±69.4401	43.24 ±75.828	16.04 ±17.288	17.45 ±14.157	42.74 ±70.756	2.59 ±2.856	25.43 ±45.801	4.88 ±8.234	13.73 ±16.208
Radicali liberi din sângele periferic (FORT)	330.64 ±20.35	349.92 ±26.68	323.6 ±25.376	335.3 ±26.495	258.27 ±29.71	309.23 ±21.958	325.9 ±25.376	301.00 ±24.817	235.00 ±32.018	312.75 ±26.593	258.67 ±23.470	347.07 ±34.812

Tabel 25. Valorile medii ±SD pentru paramterii analizați la nivelul celor patru loturi, la înrolare, după 3 luni și după 6 luni de la înrolare

Tabel 27. Compararea nivelelor plasmatice ale parametrilor după 3 luni de la înrolare (I) și după 6 luni de la înrolare (II) comparativ cu valorile corespunzătoare din momentul înrolării (↑ nivel crescut, ↓ nivel scăzut, * semnificativ statistic ($p \leq 0.05$), culoare roșie - aproape semnificativ statistic, — similar)

Parametrul analizat	Lotul A <i>Alimente + omega 3</i>		Lotul B <i>alimente funcționale</i>		Lotul C <i>Omega3</i>		Lotul D <i>Control</i>	
	I	II	I	II	I	II	I	II
HOMA IR	↓	↓	↑*	↑	↓	↓	↓	↓
Glicemia (mg/100 ml)	↑	↓	↑	↓	↓*	↓*	↓	↑
Insulina(μIU/ml)	↓	↓	↑*	↑	↓	↓	↓	↓
Antioxidanți hidrosolubili (μmol/L)	—	↑	↑	↑*	↓	↓	↓	↓
Antioxidanți liposolubili (μmol/L)	↓	↓*	↓	↓*	↓	↓	↓	↓
Adiponectină (μg/ml)	↑*	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↓
Leptină (μIU/ml)	↑*	↑	↑*	↓	↑	↑	↑	↓
TNF-α (pg/ml)	↓*	↓	↓	↓	↓*	↓	↑	↑
IL-6 (pg/ml)	↑*	↓	↑	↓	↓	↓	↑	↓
Radicali liberi din sângele periferic (FORT)	↓*	↓	↓*	↓	↓	↓*	↓	↑

Această creștere a indicelui IR-HOMA comparativ cu momentul înrolării s-a datorat creșterii semnificative a valorilor insulinei comparativ cu momentul înrolării ($p=0.041$).

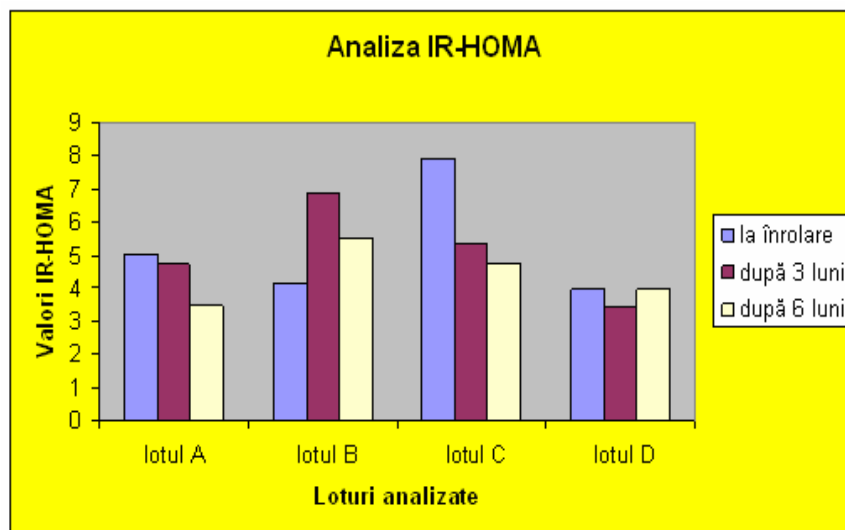


Fig.46. Variația indicelui HOMA-IR la cele 4 grupuri la înrolare, după 3 luni și după 6 luni de la înrolare

Nivelul de insulină era din start mai mare decât la celelalte grupuri, dar administrarea dietei timp de trei luni a crescut și nivelul de glucoză (vezi fig.47), fapt care a dus la creșterea indicelui de rezistență la insulină IR-HOMA. La lotul A, care a primit pe lângă dieta cu alimente funcționale și supliment OMEGA-3, atât insulina cât și glucoza scad comparativ cu momentul înrolării la 3 respectiv 6 luni de la înrolare, fapt care duce la scăderea IR-HOMA, la nivele mai mici decât ale lotului control (ne semnificativ), deși la înrolare au fost mai mari. Suplimentarea sau înlocuirea grăsimilor polinesaturate din alimentație cu omega-3 prin asociere cu o dietă vegetariană pe bază de componente naturali, face posibilă scăderea producției de insulină la nivelul celulelor β pancreatice.

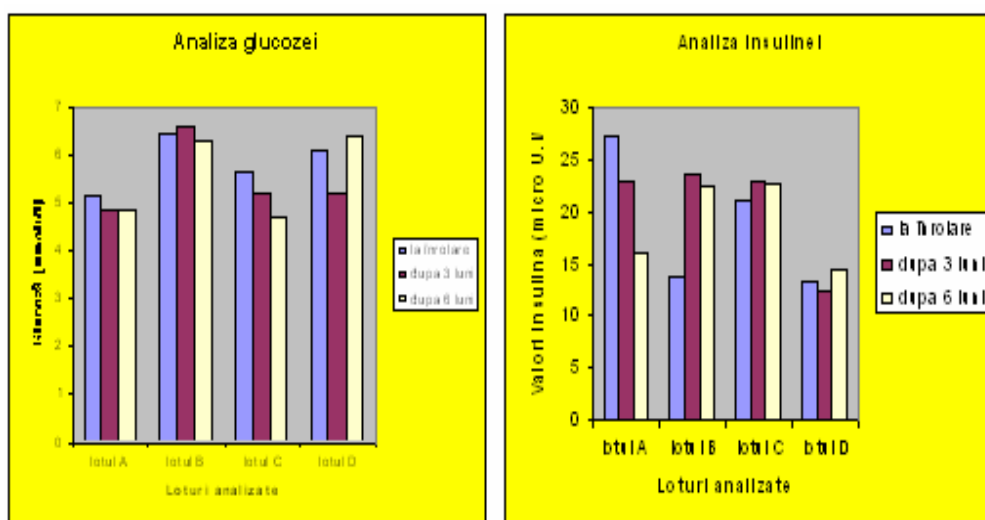


Fig.47. Variația valorilor glucozei (stânga) și insulinei (dreapta) la cele 4 grupuri la înrolare, după 3 luni și după 6 luni de la înrolare

Capacitatea antioxidantă a plasmii sanguine măsurată prin metoda chemiluminescenței a relevat faptul că, deși antioxidanții hidrosolubili care s-au determinat în plasmă nu diferă semnificativ între grupuri în momentul înrolării, după 6 luni de la înrolare, capacitatea antioxidantă determinată de aceștia a fost semnificativ mai mare la lotul B comparativ cu cel al grupului control ($p=0.024$); la lotul B și la înrolare și după 3 luni sau 6 luni se constată un nivel mai ridicat de antioxidanți hidrosolubili plasmatici comparativ cu lotul control (tabele 24-27), iar celelalte două loturi de studiu prezintă valori mai mici decât cele ale lotului control (ne semnificativ)

După 3 luni de la înrolare, la lotul B se observă un trend de creștere a valorilor acestora ($p=0.066$) pentru ca după 6 luni să existe o creștere semnificativă a antioxidanților hidrosolubili în plasmă ($p=0.002$) după cum se poate observa în fig.48. Nivelul antioxidanților liposolubili în plasmă scade semnificativ după 6 luni de dietă comparativ cu momentul inițial atât la lotul A cât și la lotul B ($p=0.039$ respectiv 0.038). Se poate spune că această creștere a capacității antioxidante a plasmii (creșterea antioxidanților hidrosolubili în plasmă și scăderea concentrației plasmatică a antioxidanților liposolubili ca urmare a pătrunderii prin membranele celulare) este o consecință a administrării dietei vegetariene alese, dar trebuie ținut

cont că biodisponibilitatea acestor antioxidanți depinde de mai mulți factori cum ar fi absorbția și metabolizarea lor.

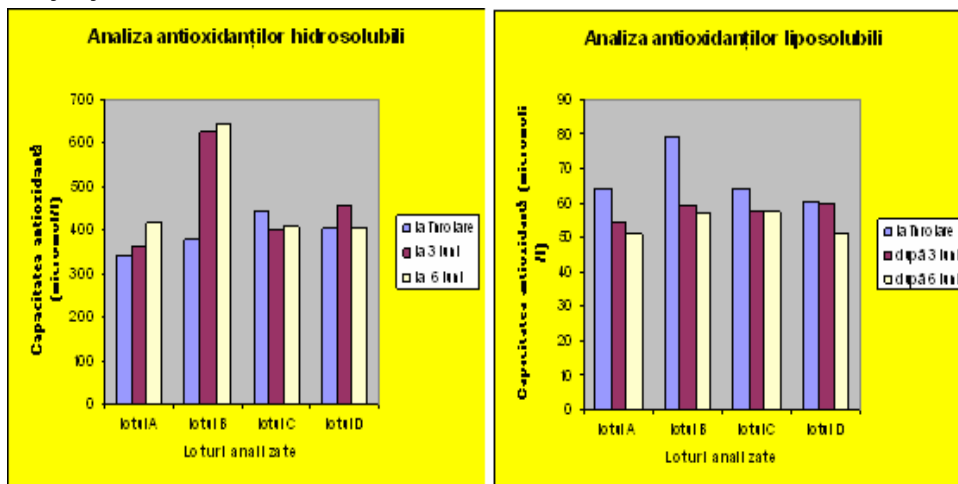


Fig.48. Variația valorilor antioxidanților hidrosolubili și liposolubili la cele 4 grupuri la înrolare, după 3 luni și după 6 luni de la înrolare

Nivelul factorilor care monitorizează țesutul adipos, adiponectina și leptina, nu a fost semnificativ diferit la cele 4 grupuri la înrolare, deși nivelul de adiponectină determinat pentru loturile A, B și C a avut o tendință de a fi semnificativ mai mică comparativ cu lotul control chiar de la înrolare. Deși la lotul A s-a înregistrat o creștere semnificativă a valorilor adiponectinei după 3 luni de la înrolare ($p=0.028$) și valorile se mențin ridicate și la 6 luni comparativ cu momentul înrolării ($p=0.059$).

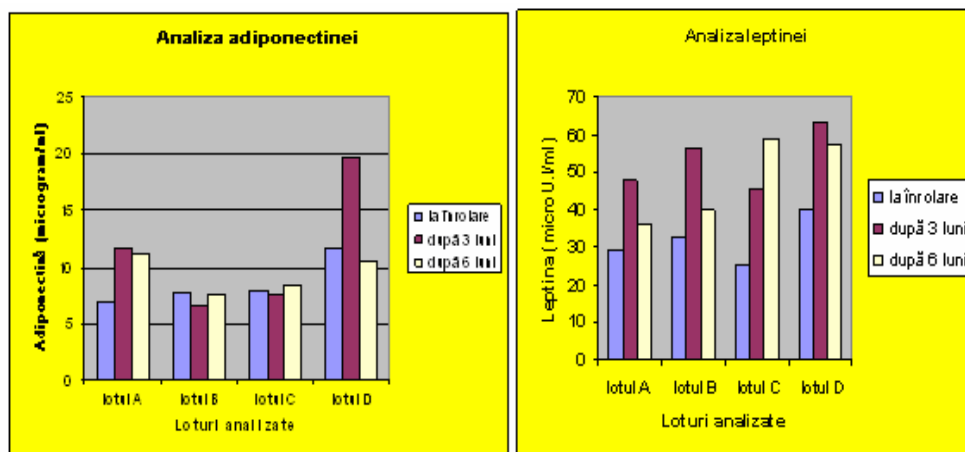


Fig.49. Variația valorilor adiponectinei (stânga) și leptinei (dreapta) la cele 4 grupuri la înrolare, după 3 luni și după 6 luni de la înrolare

La lotul B, creșterea nivelului de adiponectină a fost nesemnificativă (ns). Și la lotul A cât și la lotul B s-a înregistrat o creștere semnificativă a valorilor leptinei la 3 luni după înrolare comparativ cu momentul inițial ($p=0.007$ respectiv $p=0.004$). Lotul C a cunoscut o creștere semnificativă a nivelului de leptină din plasmă după 6 luni de

suplimentare cu omega 3 ($p=0.013$) comparativ cu momentul înrolării. Nivelul de leptină a crescut la lotul control după 3 și 6 luni dar nu semnificativ. Nivelul semnificativ de leptină are ca efecte inhibarea apetitului și scăderea greutateii corporale, căci s-a constatat că între indicii de masă corporală (kg/m^2) măsurat la subiecții din lotul B la înrolare ($33.6 \text{ kg}/\text{m}^2$) și după 3 luni de la înrolare ($29.10 \text{ kg}/\text{m}^2$) există o diferență semnificativă din punct de vedere statistic ($p=0.004$).

Analiza parametrilor care monitorizează procesul inflamator, $\text{TNF-}\alpha$ și IL-6 , a relevat faptul că au existat diferențe între grupuri încă de la înrolare: nivelul de $\text{TNF-}\alpha$ la lotul A având un nivel ridicat de $\text{TNF}\alpha$ ($p=0.041$) comparativ cu celelalte, nivelul de IL-6 a fost scăzut la lotul A comparativ cu celelalte loturi considerate ($p=0.051$). În momentul înrolării, subiecții din lotul C au prezentat un nivel semnificativ scăzut de TNF-a , iar după 3 luni de la înrolare, nivelul de $\text{TNF-}\alpha$ a crescut semnificativ la lotul C ($p=0.028$). Nivelele de IL-6 au fost semnificativ reduse la loturile A și C comparativ cu controlii la înrolare, Nivelul de IL-6 în lotul A, care la înrolare a fost semnificativ mai mic comparativ cu oricare dintre celelalte loturi, a crescut semnificativ ($p=0.031$) la trei luni după înrolare, ca după 6 luni să scadă din nou la valori foarte mici (fig.50).

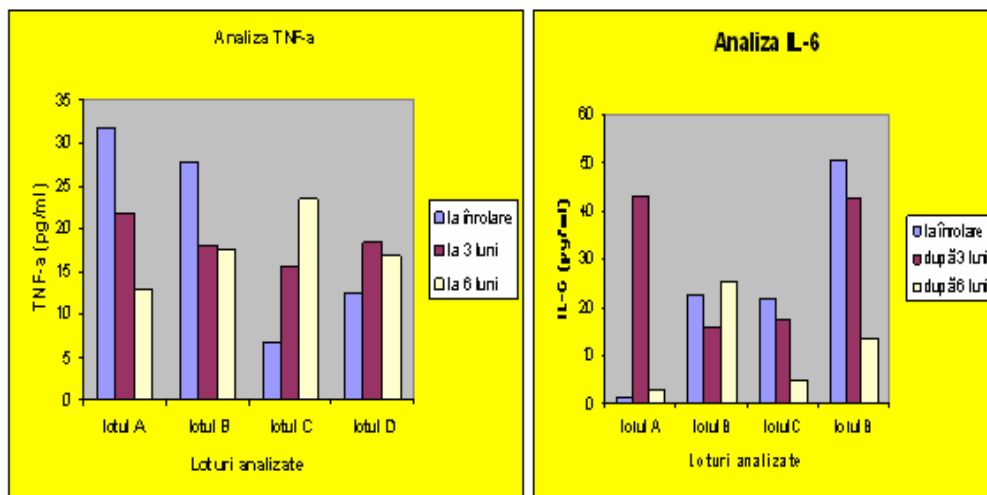


Fig. 50. Variația valorilor $\text{TNF-}\alpha$ și IL-6 la subiecții din cele patru loturi în momentul înrolării în studiu și pe parcursul studiului la 3 respectiv 6 luni

În ceea ce privește rezultatele analizei radicalilor liberi din sângele periferic (fig.51), s-a înregistrat o tendință a acestor valori de a fi diferite ($p=0.056$) la cele 4 loturi numai după 6 luni de la înrolare când nivelul stresului oxidativ la loturile A (alimente + omega 3) și C (omega 3) sunt semnificativ mai mici comparativ cu lotul control D ($p=0.044$ respectiv $p=0.053$), în timp ce pentru lotul B valorile nivelului de radicali liberi nu au fost semnificativ diferite comparativ cu lotul control (fig.51). Raportat la momentul înrolării, analiza statistică a indicat o scădere semnificativă a stresului oxidativ în cadrul lotului A atât după 3 luni cât și după 6 luni de la înrolare, iar în lotul B care a primit dieta cu alimente multicomponent s-a înregistrat o scădere semnificativă a nivelului de radicali liberi din sângele periferic după 3 luni de la înrolare, după care valorile „radicalilor liberi” măsurate folosind metoda FORT au crescut din nou așa încât după 6 luni ele nu au mai fost semnificativ diferite de cele

ale lotului control. La lotul C s-a constatat o scădere a nivelului de radicali liberi, dar diferențele nu sunt semnificative așa cum se poate observa din tabelul 28.

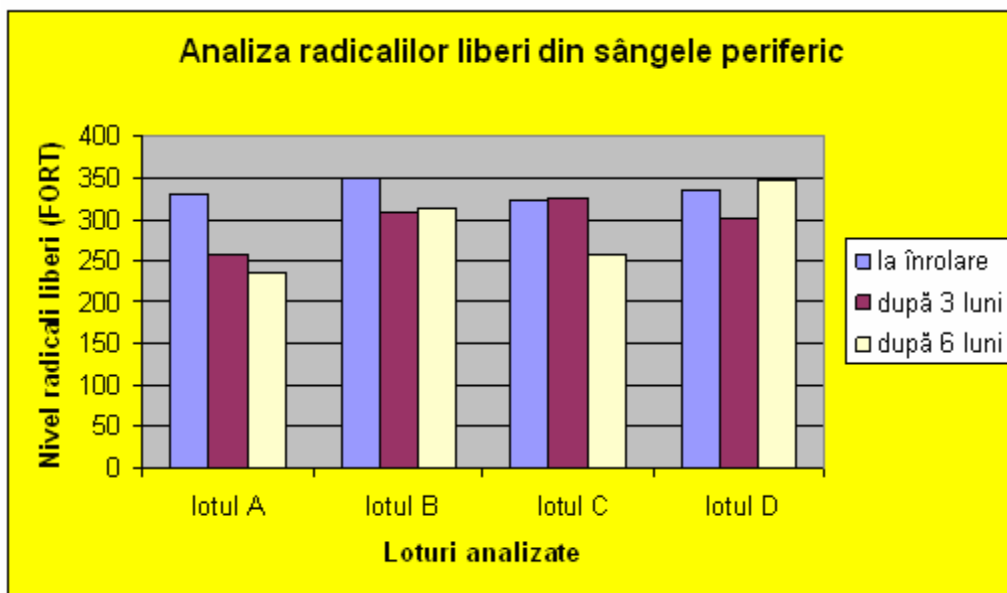


Fig. 51. Variația nivelului de radicali liberi din sângele periferic la subiecții din cele patru loturi în momentul înrolării în studiu și pe parcursul studiului la 3 respectiv 6 luni

Tabel 28. Rezultatele comparațiilor (valoarea p statistic) valorilor nivelului de radicali liberi din sângele periferic pentru fiecare grup individual: înrolare-3 luni, înrolare-6 luni, 3 luni-6 luni

Comparație	Lotul A	Lotul B	Lotul C	Lotul D (control)
Valori la înrolare-valori după 3 luni	p=0.009	p=0.041	p=0.909	p=0.070
Valori la înrolare-valori după 6 luni	p=0.047	p=0.111	p=0.168	p=0.747
Valori la 3 luni -valori după 6 luni	p=0.388	p=0.677	p=0.190	p=0.372

Determinarea grosimii intimă-medie arterei carotide (IMT) s-a efectuat cu ajutorul ecocardiografului VIVID 4, sonda 1,5-2,5/D20MHz. Determinarea IMT carotidiene la includere și la 6 luni s-a efectuat pe 46 subiecți (23 subiecți din lotul B și 23 de subiecți din lotul de control) dintre cei investigați în cadrul studiului.

S-a înregistrat o corelație semnificativă între sindromul metabolic și IMT. După Mannheim Consensus, limita de progresie a IMT către ateroscleroză este considerată a fi de 0.620 mm. La subiecții cu sindrom metabolic din studiul nostru, această valoare a fost prezentă la nivelul arterei carotide comune stângi (ACCS). Alimentația multicomponent a influențat pozitiv valorile IMT, scăzându-le semnificativ la subiecții din lotul B după 6 luni (tabel 29).

Tabel 29. Evoluția IMT la lotul intervențional cu alimente versus control

Grupa N=46	Valoarea medie a grosimii intimei media a arterei carotide comune drepte (mm)	Valoarea lui p	Valoarea medie a grosimii intimei media a arterei carotide comune stângi (mm)	Valoarea lui p
Includere	0.604	$p=0.029$	0.623	$p=0.045$
6 luni	0.486		0.533	

II.4.2.3. CONCLUZII

În cadrul acestui obiectiv s-a investigat capacitatea antioxidantă a alimentelor îmbogățite cu compuși de extracție naturali în patologia endoteliului vascular. Studiul s-a realizat pe 90 de subiecți umani. După o prealabilă tipizare metabolică și analiza toleranțelor alimentare, s-au constituit trei loturi intervenționale și un lot control : *lotul A* (alimente funcționale multicomponent + omega 3) a inclus 23 de subiecți, *lotul B* (alimente funcționale) a inclus 23 de subiecți, *lotul C* (omega 3) a inclus 21 de subiecți, iar *lotul control D* a inclus 23 de subiecți. S-au analizat **parametrii de efect metabolic** (scorul IR-HOMA al rezistenței la insulina, profilul lipidic, adiponectina, leptina, IL-6, TNF- α , nivelul de radicali liberi din sângele periferic și antioxidanții totali hidro- și liposolubili), precum și **parametrii de progresie a aterosclerozei** (grosimea intima-medie la nivelul arterei carotide comune).

Studiul populațional desfășurat a arătat că administrarea alimentelor multicomponent care acționează sinergic în scopul neutralizării radicalilor liberi a dus la scăderea semnificativă a nivelului de hidroxiperoxizi din sângele capilar după înrolare determinată de creșterea capacității antioxidante a plasmei sangvine datorate antioxidanților hidrosolubili și creșterea probabilă a capacității antioxidante la nivel tisular determinată de prezența antioxidanților liposolubili. S-a observat îmbunătățirea funcției endoteliale evaluată prin indici de progresie a aterosclerozei la 6 luni de administrare a dietei la lotul B comparativ cu lotul control (scăderea grosimii intimei media a arterei carotide comune drepte $p=0.029$ și scăderea grosimii intimei media a arterei carotide comune stângi $p=0.045$). Analiza parametrilor metabolici la lotul B a arătat că, la 3 luni, s-a înregistrat o creștere a indicelui de rezistență HOMA -IR comparativ cu grupul control ($p=0.025$) și cu momentul înrolării ($p=0.027$), ceea ce înseamnă că sensibilitatea țesuturilor la semnalul insulenic scade; această scădere a sensibilității la insulină este pe termen scurt, deoarece la 6 luni nivelul nu este mult diferit comparativ cu momentul înrolării și comparativ cu grupul control. Această modificare în semnalizarea insulinică, are probabil ca efect o producție semnificativ crescută de leptină înregistrată la 3 luni ($p=0.004$). Producția acestui hormon proteic, care acționează asupra sistemului nervos central, determinând suprimarea apetitului și creșterea consumului energetic a avut ca efect inhibarea apetitului și scăderea greutatei corporale, căci s-a constatat că între BMI la înrolare și BMI după 3 luni de la înrolare a existat o diferență semnificativă din punct de vedere statistic ($p=0.004$). Deși diferențele nu sunt semnificative statistic, nivelul de adiponectină la lotul B la 3 luni este mai scăzut comparativ cu momentul înrolării, probabil ca urmare a creșterii rezistenței la insulină, iar după 6 luni nivelul de adiponectină se restabilește. În ceea ce privește markerii inflamatori, nu se poate trage o concluzie clară în ceea ce privește influența dietei alese în procesul antiinflamator, constatându-se o scădere a nivelului de TNF- α după 3 luni care se menține scăzut și la 6 luni (diferențele sunt nesemnificative);

în ceea ce privește IL-6 nivelul înregistrat la 3 luni de la înrolare este mai mic, după care crește nesemnificativ.

La lotul A care a primit alimente și supliment omega-3, analiza parametrilor de efect metabolic arată o îmbunătățire a funcției endoteliale. Indicele de rezistență la insulină a scăzut continuu dar nesemnificativ din momentul înrolării. Acest lucru probabil că a influențat nivelul de adiponectină care a fost semnificativ mai crescut la 3 luni ($p=0.028$) și mai crescut la 6 luni ($p=0.059$) comparativ cu momentul înrolării, nivelul inițial fiind mult mai mic decât la lotul control (tendință de a fi semnificativ). Nivelul crescut de adiponectină a fost influențat probabil și de scăderea semnificativă a TNF- α la 3 luni după înrolare, TNF- α fiind un reglator negativ expresia adiponectinei. Adiponectina are ca efect stimularea sintezei de NO fie prin activarea AMPK, fie prin inhibarea efectului supresor al LDL-oxidat asupra NO sintezei endoteliale, contribuind astfel la îmbunătățirea funcției endoteliale. Leptina crește semnificativ la 3 luni ($p=0.007$) comparativ cu momentul înrolării, probabil datorită alimentației. Indicele de masă corporală a scăzut semnificativ la 3 luni ($p=0.035$). Studiul de față indică însă ca utilizarea combinată a acizilor mononesaturați omega-3 și a dietei alimentare propuse are un efect major asupra neutralizării speciilor reactive comparativ cu contribuția componentelor individuale. La acest lot, nivelul de radicali liberi din sângele periferic a scăzut semnificativ la 3 luni ($p=0.009$) și la 6 luni ($p=0.047$) comparativ cu momentul înrolării. Acest lucru poate fi asociat cu creșterea capacității antioxidante la nivelul țesuturilor (scăderea capacității antioxidante la nivelul plasmăi sanguine, $p=0.039$). În ceea ce privește procesul inflamator, rezultatele privind TNF- α indică o scădere semnificativă a nivelului de TNF- α la 3 luni de la înrolare la lotul A și C care au primit omega-3, dar scăderea nu este semnificativă la lotul B care a primit numai alimentele din dietă. IL-6 crește la lotul A la 3 luni după înrolare (semnificativ). În consecință, nu se poate trage o concluzie clară în ceea ce privește influența dietei alese în procesul antiinflamator, dar studiul este limitat de o serie de factori cum ar fi numărul redus de subiecți analizați, perioada relativ scurtă de urmărire și sensibilitatea metodelor de analiză.

La lotul C s-a înregistrat scăderea indicelui de rezistență la insulină IR-HOMA pe fondul unei reduceri semnificative a nivelului de glucoză ($p=0.045$ la 3 luni, respectiv $p=0.015$) și o ușoară creștere a producției de insulină. Acest lucru s-a manifestat și în nivelul de leptină, deoarece creșterea nivelului de leptină a fost semnificativă după 6 luni de la înrolare ($p=0.013$). În ceea ce privește nivelul de radicali liberi din sângele periferic și capacitatea de neutralizare a acestora în plasmă nu s-au observat modificări semnificative. În ceea ce privește procesul inflamator, la lotul C s-a înregistrat o creștere semnificativă a nivelului de TNF- α ($p=0.028$) la 3 luni de la înrolare și o scădere nesemnificativă a nivelului plasmatic de IL-6.

Rezultatele acestui studiu [245-247] au arătat că folosirea dietei propuse care cuprinde un amestec echilibrat de antioxidanți proveniți din compușii naturali folosiți are un efect pozitiv asupra funcției endoteliale. În consecință, se pot folosi cu succes alimentele multicomponent obținute și analizate în acest studiu în anumite strategii terapeutice în sindromul metabolic.

Studiul a evidențiat faptul că folosirea acestei diete suplimentată cu acizi grași omega-3 modulează parametrii metabolici de interes așa încât prin acțiunile lor concertate să aibă un rol pozitiv în reglarea funcției endoteliale, iar efectul dietei suplimentate cu acizi grași omega-3 este îmbunătățit comparativ cu folosirea individuală a dietei sau a suplimentelor omega-3.

În afară de acțiunea antioxidantă a acizilor din categoria compușilor fenolici, datele din literatură prezintă și rolul acestora în procesul de diferențiere a

preadipocitelor la adipocite, acest proces de diferențiere și proliferare a preadipocitelor la adipocite fiind unul din mecanismele propuse împotriva obezității [248]. Hsu și colab.[249,250] au investigat rolul acizilor fenolici în procesul de adipogeneză in vitro pe culturi de celule murine embrionare 3T3-L1(preadipocite) arătând că tratamentul acestor celule cu acid galic duce la creșterea numărului de celule apoptotice, în timp ce tratamentul cu acizi clorogenic, o- și m-cumaric duce la oprirea ciclului celular în faza G1. Hsu și colab. [249] au arătat că tratarea celulelor cu diferiți acizi fenolici duce la inhibarea nivelului de expresie al PPAR γ și C/EBP α care sunt exprimate în adipocitele mature, inhibând în acest fel adipogeneza.

Toate aceste observații sugerează că procese moleculare precum reglarea nivelului de expresie al ARNm sau al proteinelor implicate în modularea proceselor de inflamație, coagulare sau diferențiere celulară oferă mult mai multe informații privind procesele care au loc la interfața dintre sindromul metabolic, bolile cardiovasculare și diabetul.

II.5. Analiza funcțională a secvenței genice a unor factori implicați în controlul speciilor reactive ale oxigenului

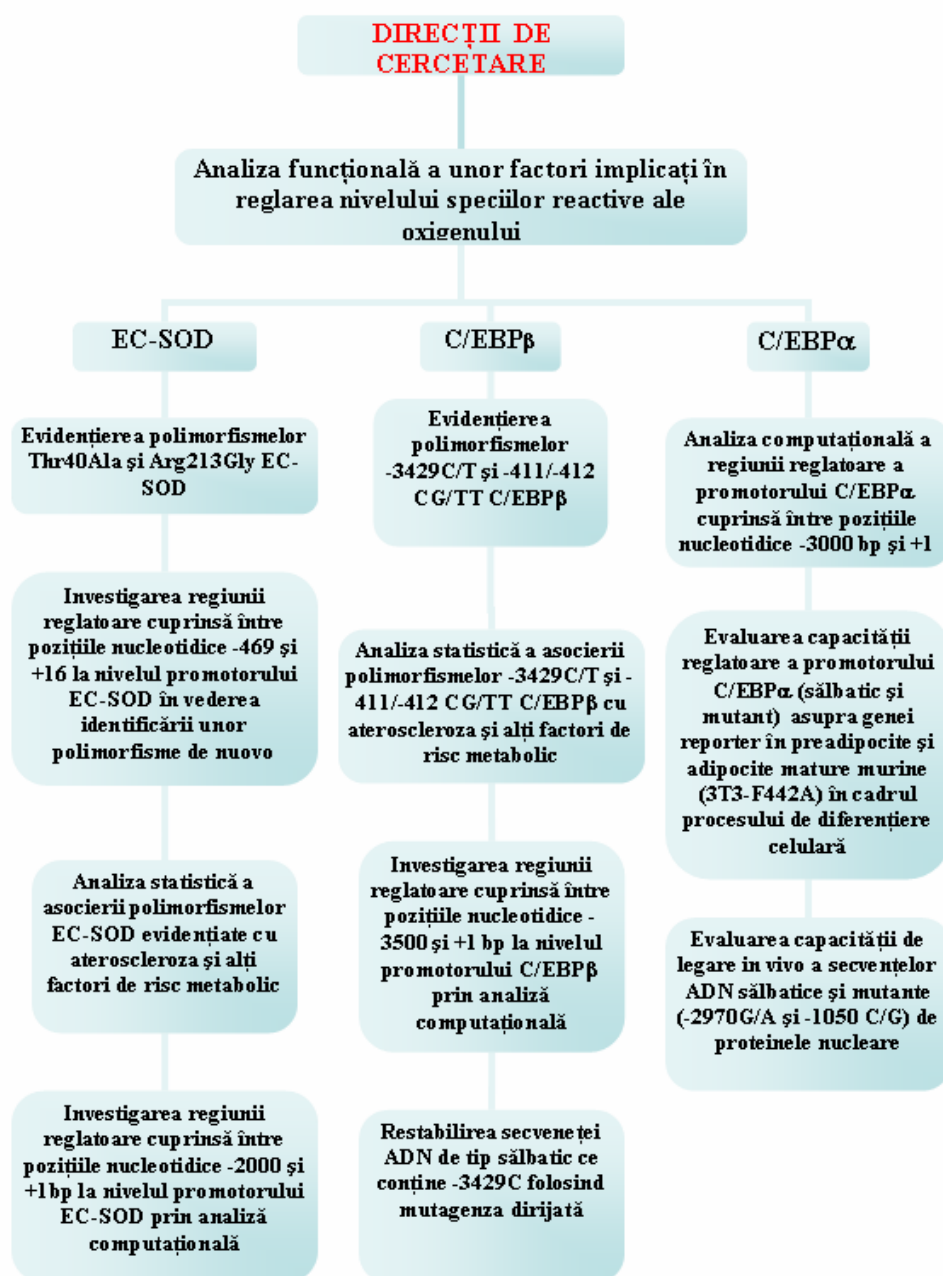


Fig.52. Direcțiile de analiză a factorilor genici

II.5.1. Investigarea funcționalității la nivel vascular a unor polimorfisme la nivelul secvenței genice a enzimei superoxid dismutaza extracelulară (*EC-SOD*, *SOD3*)

S-a urmărit evidențierea unor polimorfisme naturale la nivelul secvenței ADN corespunzătoare *EC-SOD*: polimorfismul Thr40Ala (172A→G) și polimorfismul Arg213Gly (C691→G) la nivelul secvenței ce codifică ***SOD3***, deja descrise în literatură și identificarea de *nuovo* a unor polimorfisme la nivelul unui fragment de 485 bp din promotorul genei ***SOD3*** (între nucleotidele -469 și +16) la un lot de 294 de subiecți.

II.5.1.1. MATERIALE ȘI METODE

II.5.1.1.1. Selecționarea subiecților umani incluși în loturile de studiu

Studiul populațional s-a realizat pe un lot de 294 de subiecți de tip caucazian care trăiesc în regiunea de vest a țării și care au fost investigați la Clinica de Cardiologie și Recuperare Vasculară din Timisoara. Rezultatele examinării angiogramelor au arătat că din cei 294 de subiecți, 144 de subiecți prezintă ateroscleroză care obstrucționează mai mult de 50% din arteră la nivelul a 1, 2 sau 3 artere coronariene, și/sau leziuni la nivelul arterelor periferice și/sau cel puțin o stenoză aterosclerotică carotidiană evidențiată ecografic. Acest grup de subiecți reprezintă lotul de subiecți cu ateroscleroză semnificativă. La ceilalți 150 de subiecți analizați nu s-a evidențiat ateroscleroză semnificativă din punct de vedere angiografic sau ecografic la nivelul arterelor coronariene, carotidiene sau arterelor periferice (lotul control). Valorilor anumitor parametri metabolici și detaliile privind factorii de risc cardiovascular au fost obținute din fișa medicală a subiecților.

Condiția de hipertensiune arterială a fost înregistrată în cazul în care presiunea sistolică măsurată a fost ≥ 140 mmHg și/sau presiunea diastolică a fost ≥ 90 mmHg, iar obezitatea în cazul în care $IMC > 30$ Kg/m². Dislipidemia a fost semnalată atunci când una dintre condițiile următoare a fost îndeplinită: colesterol total > 5.69 mmol/l, LDL colesterol > 3.6 mmol/l, HDL colesterol < 0.9 mmol/l, trigliceride > 1.6 mmol/l.

II.5.1.1.2. Recoltarea probelor de sânge

Pentru a nu influența măsurarea variabilelor hemostatice, recoltarea probelor de sânge venos s-a făcut dimineața după o perioadă de aproximativ de 10 ore de post, folosind sisteme vacutainer care micșorează timpul în care sângele ajunge pe anticoagulant. Determinările de lipide și de colesterol total la subiecții analizați s-a realizat la Clinica de Cardiologie și Recuperare Vasculară din Timisoara valorile obținute fiind înregistrate în fișele medicale ale subiecților.

II.5.1.1.3. Extracția ADN-ului genomic

Materialul biologic folosit este sânge venos recoltat pe EDTA. ADN-ul genomic a fost extras folosind kit-ul QIAamp DNA Blood Mini kit from QIAGEN care constă în liza celulelor prin incubarea probei de sânge timp de 10 min. la 56°C cu soluție tampon de liză AL urmată de precipitarea ADN-ului cu etanol absolut și reținerea acestuia într-o coloniță de separare urmată de spălări succesive ale ADN-ului cu soluțiile de spălare AW1 și AW2 din kit urmată, în cele din urmă, de eluarea ADN-ului de pe coloniță cu ajutorul unei soluții tampon de eluție AE. Cele 294 de probe de ADN

extrase, păstrate la o temperatură de 5°C au fost transportate la Light Laboratories Leeds unde au fost utilizate în scopul genotipării ADN.

S-a cuantificat ADN-ul utilizând un spectrofotometru BioWave S2100 (Walden Precision Apparatus Ltd). Aparatul a fost calibrat la 0 folosind 50 μ l de apă bidistilată (molecular grade). Pentru analiza probelor de ADN dublu catenar, ARN sau a oligonucleotidelor se măsoară absorbanta probelor de ADN (de regulă diluate 1:10 într-un volum de 50 μ l) în lumină UV la 260 nm. O absorbantă de $A_{260} = 1$ corespunde la o concentrație a ADN-ului dublu catenar de 0,05 μ g/ μ l, o concentrație a ARN-ului de 0,04 μ g/ μ l sau o concentrație a oligonucleotidului de 0,033 μ g/ μ l. Concentrația ADN-ului se calculează folosind formula următoare:

$$C(\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times \text{factorul de diluție} \times \text{coeficientul molar de extincție}$$

Un raport $A_{260} / A_{280} > 1,8$ indică probe pure. Pentru o mai rapidă cuantificare spectrofotometrică a unor concentrații mici de ADN, ARN sau oligonucleotide se poate folosi nanodrop-ul care utilizează numai 2 μ l soluție măsurându-se absorbția soluțiilor respective la 260 nm față de soluția martor corespunzătoare utilizată la obținerea soluțiilor de ADN. Citirea reprezintă concentrația calculată în ng/ μ l.

Se poate determina concentrația unei probe necunoscute de ADN prin comparare cu o probă de concentrație exact cunoscută comparând intensitățile benzilor ADN rezultate în urma migrării electroforetice în gel de agaroză (de regulă 1%) și vizualizate în UV.

II.5.1.1.4. Amplificarea PCR

Fiecare probă de ADN genomic a fost folosită pentru amplificarea unui fragment de 485 bp din regiunea promotor a **EC-SOD** notată pr-1, precum și a altor două fragmente din regiunea ce codifică EC-SOD: un fragment de 245 bp care include situsul polimorfic 172A→G (Thr40Ala EC-SOD) și un fragment de 159 bp care include situsul polimorfic 691C/G (Arg213Gly EC-SOD). Pentru designul primer-ilor s-au obținut secvența genei EC-SOD din baza de date NCBI Gene Database (*EC-SOD* cu număr de acces. NM_003102 și secvența ADN din regiunea de flancare 5'. Utilizând secvența obținută prin accesarea băncii de date s-a făcut designul de primeri folosind programul Primers 3 (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.www.cgi>) și secvența corespunzătoare fiecărui primer a fost verificată utilizând programul BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) pentru a certifica faptul că primerii se leagă specific prin complementaritate numai de porțiunea din genă pentru care a fost conceput designul. Situsurile de legare prin complementaritate ale primerilor la secvența nucleotidică a genelor pentru care au fost concepuți sunt prezentate în anexa 5.2.

Reacțiile PCR pentru fiecare fragment au fost optimizate așa încât să se obțină cele mai clare și intense benzi cu o dimerizare minimă a primerilor și să nu se formeze alte benzi nespecifice. Pentru optimizarea procesului PCR s-a utilizat un gradient de temperatură între 55-71 °C și o concentrație de clorură de magneziu variabilă de: 1M, 1.5M și 2M. Pentru situația în care fragmentul de amplificat a avut o secvență bogată în baze azotate de tip GC, atunci s-a adăugat în mixul de reacție betaină până la o concentrație finală 1M și 5% DMSO.

Pentru amplificare, s-a folosit un termocycler programabil PTC 200. Fiecare reacție se desfășoară în tuburi de 0.2 ml utilizând 25 μ l de amestec de reacție în care se folosec 0,6 unități de Thermoprime Plus DNA polymerase (ABgene), 0.2 mM dNTPs, PCR Buffer 1 x Red Type IV, o anumită cantitate de MgCl₂ determinată prin

optimizare, 1 pmol μl^{-1} reverse și forward oligonucleotide, cu 5%DMSO și betaină 1M. În reacțiile PCR s-au folosit între 5ng-100 ng ADN genomic / reacție. Volumele componentelor de reacție folosite în reacțiile de amplificare PCR sunt precizate în tabelul nr 30, iar secvențele nucleotidice ale primerilor folosiți, condițiile de amplificare, precum și programele PCR utilizate sunt cuprinse în tabelele 31 și 32. După amplificare, 5 μl din amestecul de reacție este supus migrării electroforetice printr-un gel de agaroză de concentrație 1% folosind bromură de etidiu ca marker fluorescent și utilizând o migrare a fragmentelor de ADN în tampon 1xTAE (anexa 5.3) la 120 V timp de 30 min. Deoarece tamponul în care s-a desfășurat reacția PCR, PCR Buffer 1 x Red Type IV, conține deja

Tabel 30. Componentele amestecului de reacție PCR

Reactivul	Volumul de reactiv	Concentrația componentului în soluția finală
H ₂ O Bidistilată	11-x μl	
soluția tampon a polimerazei (10x)	2,5 μl	1x
clorură de magneziu	x μl	xmM
amestec dNTP	0,4 μl	200 μM
5` primer	0,5 μl	1 pmol μl^{-1}
3` primer	0,5 μl	1 pmol μl^{-1}
Thermoprime Plus DNA polimeraza	0,12 μl	0,6 u
DMSO	1,25 μl	5%
betaină 4M	6,25 μl	1M
ADN	2,5 μl	2 ng/ μl

Tabel 31. Condiții pentru desfășurarea reacțiilor PCR utilizate în screening-ul pe EC-SOD

Regiunea	Oligonucleotide (5'→3')	Mărimea produsului PCR (bp)	Temp. de aliniere (°C)	[MgCl] (mM)	DMSO (5%)	Betaină (1 M)
promotor	F: 5` - ATA CCA GAA CGG AGA CTG G-3` R: 5` - CTA AAT CTC TGG ATC CCACC-3`	485 bp	56	1,5	+	+
Exon 3	F: 5` -GAC ATG TAC GCC AAG GTC AC-3` R: 5` - AAC TGG TGC ACG TGG ATG-3`	245 bp	57	2.0	+	+
Exon 3	F: 5` -AGG ACG ACC TGG GCC GCG- 3` R: 5` - ACT CGC TCT CGC ACC GCC-3` A	159 bp	68	2.0	+	+

Tabel 32 Etapele programelor PCR pentru reacțiile de amplificare a fragmentelor de interes

Gena	Mărimea fragmentului amplificat	Etapa	Temperatura	Timp	Numărul de cicluri PCR
<i>EC-SOD</i>	485 bp	Denaturare inițială	94°C	4min, 30 sec.	1
		Denaturare	94°C	30 sec	30
		Aliniere primeri	56°C	1 min	
		Extensie	72°C	30 sec	
		Extensie finală	72°C	5 min	1
		Mentinerere la 25°C	25°C	5 sec	1
	245 bp	Denaturare inițială	94°C	5min	1
		Denaturare	94°C	45 sec.	40
		Aliniere primeri	57°C	45 sec.	
		Extensie	72°C	45 sec.	
		Extensie finală	72°C	5min	1
		Mentinerere la 25°C	25°C	5 sec	1
	248 bp	Denaturare inițială	94°C	5min	1
		Denaturare	94°C	45 sec.	40
		Aliniere primeri	68°C	45 sec.	
		Extensie	72°C	45 sec.	
		Extensie finală	72°C	5min	1
		Mentinerere la 25°C	25°C	5 sec	1

colorantul necesar vizualizării rezultatului migrării electroforetice nu mai este necesară adăugarea de colorant de migrare bromfenol blue care se utilizează frecvent (anexa 5.4).

Gelurile au fost vizualizate cu ajutorul unui transluminator UV și fotografiate folosind Chemi-Imager system software (Alpha Innotech Corp). În urma vizualizării se determină dacă mărimea fragmentului obținut în urma amplificării PCR (vezi fig. 53) este cea dorită prin comparație cu un marker (Superladder low 100 bp de la Abgene):

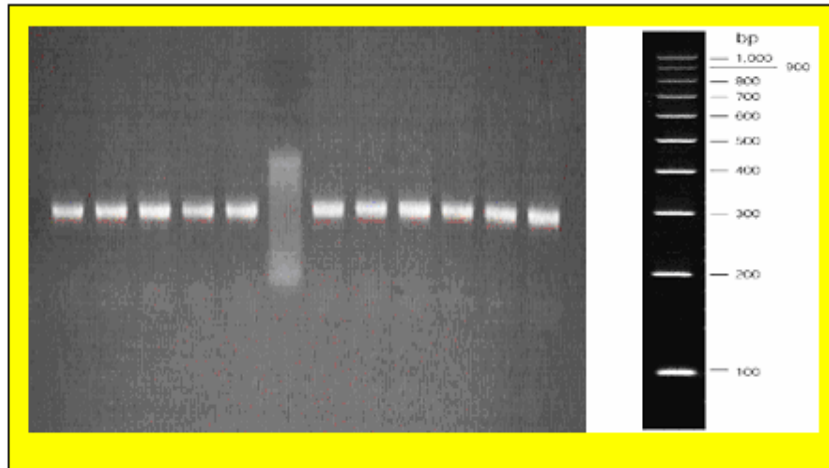


Fig. 53. Verificarea mărimii fragmentului de 485 bp din gena *EC-SOD* obținut în urma reacției PCR prin compararea cu mărimile fragmentelor din Superladder low 100 bp (ABgene)

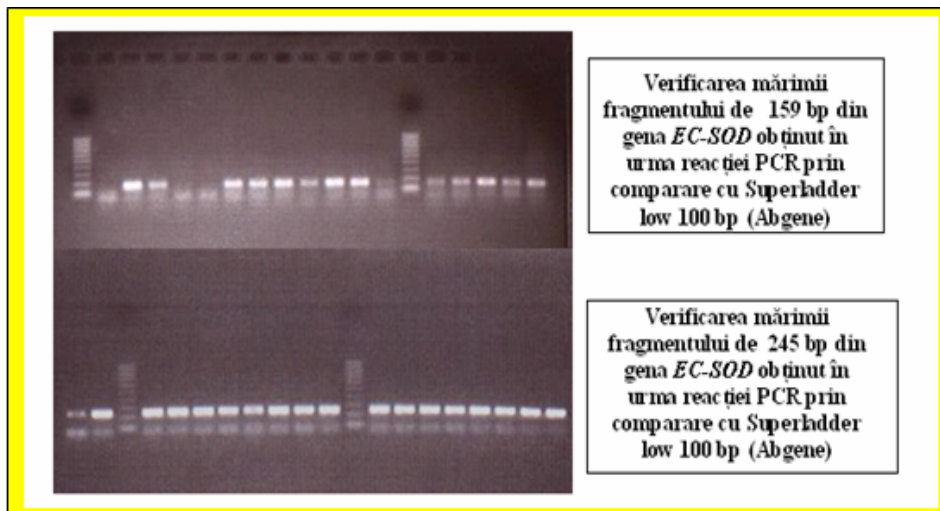


Fig. 54. Verificarea mărimii fragmentului de 485 bp din gena *EC-SOD* obținut în urma reacției PCR prin compararea cu mărimile fragmentelor din Superladder low 100 bp (ABgene)

Purificarea produsilor PCR utilizând metoda PCR Quick Clean (Qiagen) s-a realizat prin adăugarea unei soluții tampon Quick Clean la amestecul PCR (1:1 vol. sau 2:1 vol. pentru fragmente de ADN mai mici de 200 bp) urmată de centrifugare la viteza maximă timp de 15 minute și îndepărtarea supernatantului. La precipitatul obținut se adaugă 100 μ l 70% etanol pentru precipitarea ADN-ului și se vortexează ușor 30 sec. După centrifugare la viteză maximă timp de 15 min. se îndepărtează supernatantul și se usucă în aer precipitatul obținut pentru a îndepărta urmele de alcool care pot inhiba reacțiile de genotipare ulterioare. Se resuspendă precipitatul în 25 μ l soluție tampon 1x TE (anexa 5.5.)

II.5.1.1.5. Analiza la nivel populațional a unei secvențe ADN din promotorul genei superoxid dismutazei extracelulare prin metoda Transgenomic WAVE™ DNA Fragment Analysis pe principiul cromatografiei de lichid de înaltă performanță cu denaturare (DHPLC)

Transgenomic WAVE™ DNA Fragment Analysis se alătură tehnicilor clasice de detecție a polimorfismelor care includ analiza heteroduplex-urilor, SSCP (single strand conformation polymorphism) și secvențializarea directă a ADN-ului conferind însă un plus de rapiditate, acuratețe și eficiență economică față de acestea în detecția de SNP-uri [251, 252]. Metoda se bazează pe formarea de heteroduplexuri prin complementaritatea unei catene de tip sălbatic (wild type) cu una care conține alela polimorfică. Are loc mai întâi denaturarea fragmentelor respective la o anumită temperatură (melting) urmată de o răcire lentă care duce la renaturare și la formarea heteroduplexurilor (Transgenomic™ Application Note No. 101). Aceste heteroduplexuri (fig. 55) generate de heterozigoți sunt mai susceptibili la denaturare decât homoduplexuri generați de homozigoții wild type sau cei mutați, proprietate care-i face utilizabili în detecția polimorfismelor.

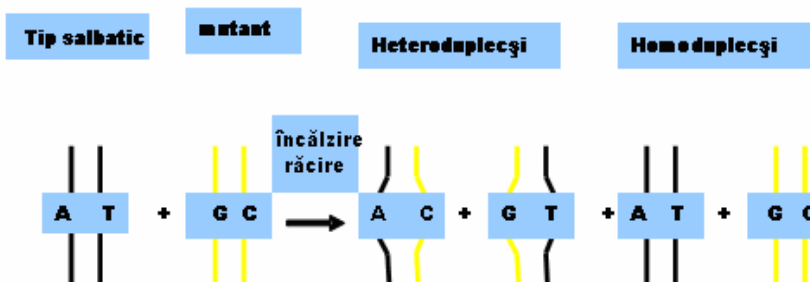


Fig. 55. Formarea homo- și heteroduplexurilor prin denaturarea și răcirea lentă a produsului PCR

În timp ce principala metodă clasică utilizată la analiza heteroduplexurilor, DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), se bazează pe proprietatea de denaturare a ADN-ului la migrarea electroforetică într-un gel denaturant de poliacrilamidă la o anumită temperatură când heteroduplexurile parțial denaturate au o conformație distinctivă cu o porțiune dublu catenară deschisă în jurul situsului polimorfic și această conformație face ca aceste heteroduplexuri să migreze mai încet decât homozigoții de tip sălbatic ori cei mutați [253]. Transgenomic WAVE™ DNA Fragment Analysis se bazează pe cromatografia de lichid de înaltă performanță cu denaturare, DHPLC (denaturing high performance liquid chromatography) care presupune separarea diferențiată a heteroduplexurilor și a homoduplexurilor prin eluție cromatografică printr-o coloană DNASep®HPLC folosind cromatografia de lichid de înaltă performanță fază inversă bazată pe afinitate ionică (interacțiuni electrostatice). Fragmentele dublu catenare de ADN (200-500 bp) încărcate negativ migrează de-a lungul coloanei de separare purtate de curentul de soluție tampon și interacționează electrostatic cu moleculele de acetat de trietilamoniu (TEAA) care se găsesc în tamponul A (anexa 5.6) și care acționează ca o punte de legătură între umplutura coloanei de separare și fragmentele de ADN. Moleculele de TEAA sunt ancorate, pe de o parte, de umplutura hidrofobă a coloanei prin interacțiuni hidrofobe ale grupărilor alchil cu matricea de copolimeri neporoși (polistiren-

divinilbenzen) iar pe de altă parte fiind legate electrostatic de grupările fosfat ale fragmentelor de ADN [252] așa cum este prezentat în figura 56 .

Fragmentele de ADN conectate prin intermediul TEAA la matricea coloanei vor fi parțial denaturate la o anumită temperatură din intervalul 50-75 °C și vor fi eluate de pe coloană cu ajutorul tamponului de eluție (faza mobilă) care conține concentrații crescătoare de acetonitril (ACN) care reduce interacțiunile hidrofobe dintre TEAA și matricea suport. Fragmentele de ADN parțial denaturate eluate de pe coloană vor fi detectate spectrofotometric la 260 nm. Fragmentele mai scurte de ADN vor fi detectate molecule de TEAA migrând astfel mai ușor de-a lungul coloanei.

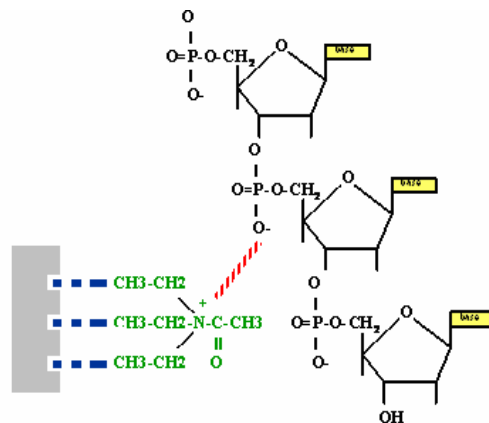


Fig. 56. Rolul moleculei de TEAA (prelucrare după manualul tehnic Transgenomic Wave versiunea 1998)

Datorită susceptibilității la denaturare heteroduplexurile vor fi parțial denaturate mai repede decât homoduplexurile cu creșterea temperaturii și o dată cu creșterea concentrației de ACN vor fi eluați mai repede de pe coloană, fiind detectați mai repede decât homoduplexurile. Sistemul DHPLC este prevăzut cu un program software care interpretează rezultatul detecției homo și heteroduplexurilor sub forma unei cromatograme așa cum este exemplificat în figura de mai jos:

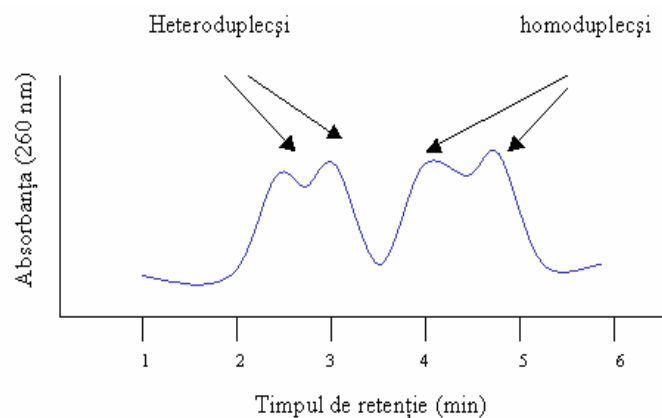


Fig. 57. Exemplu de cromatogramă cu evidențierea detecției mai rapide a heteroduplexurilor

Detecția polimorfismelor prin metoda Trangenomic WAVE™ DNA Fragment Analysis s-a folosit pentru detecția polimorfismelor pentru un fragment de 485 bp din regiunea promotor a genei **EC-SOD**. Detecția polimorfismelor prin această metodă depinde de trei factori importanți: de mărimea fragmentului de ADN pe care se face screening-ul, de temperatura specifică la care are loc separarea cromatografică și de gradientul de concentrație al soluției de acrilonitril. Înainte de detecția propriu-zisă a polimorfismelor sunt foarte importante două etape preliminare și anume determinarea gradientului optim de ACN necesar eluției și determinarea temperaturii la care va avea loc eluția.

Etapa 1. Eluția fragmentelor de ADN în gradient universal în vederea stabilirii gradientului optim de ACN necesar eluției

Pentru a stabili gradientul de ACN optim se folosesc 15 probe de produs PCR identice care se amestecă rezultând un singur tub cu amestec PCR care conține fragmente de ADN dublu catenar neheteroduplexat (prin încălzire și răcire lentă). Fragmentele de ADN migrează împreună cu tamponul A (anexa 5.6) și prin intermediul moleculelor de TEAA (conținute într-o concentrație de 0,1M în tamponul A (anexa 5.6) se fixează de umplutura coloanei. Pentru eluare se folosește apoi un gradient universal de tampon A și B (anexa 5.6) pe o durată de timp de la 0,1min la 16,1 min și la o temperatură de 50 °C. La timpul 0,1 min procentul de ACN eluat prin amestecul tamponelor A și B este de 40%, iar la sfârșitul perioadei de timp la 16, 1 min acest procent ajunge la 72% cu o creștere de 2% pe minut așa cum este prezentat în tabelul 33

Timp (minute)	% Tampon B	Proces
0.0	35	Echilibrare
0.1 – 16.1	40 - 72	Eluție
16.2 – 16.7	100	Spălare
16.8 – 18.0	35	Echilibrare

Tabel 33. Gradientul universal folosit pentru stabilirea timpului de eluție al fragmentului analizat

Pentru stabilirea curbei de temperatură de topire ADN (melting profile) este necesar să se determine gradientul optim de tampon B necesar eluării fragmentului respectiv de ADN dublu catenar de pe coloană în timp de 6.5 min într-un anumit interval de temperatură. În acest scop, folosind timpul de eluție al fragmentului în gradientul universal se poate calcula gradientul de tampon B optim pentru eluție în 6.5 minute. Spre exemplu dacă fragmentul a fost eluat în 14 min în gradientul universal, atunci procentul de ACN a crescut de la 40% (inițial) la 68 % după 14 minute cu o creștere de 2% pe minut. Dacă eluția se dorește a avea loc numai în 6.5 min atunci creșterea procentului de ACN va fi de 13 % în această perioadă și procentul maxim de ACN este 68% necesar pentru eluția fragmentului de ADN dublu catenar, atunci procentul inițial este 55%. Deci, gradientul optim de tampon B pentru determinarea profilului temperaturilor de denaturare este în acest caz de 55%-68%. Pentru fragmentul de ADN dublu catenar EC-SOD analizat timpul de

eluție al fragmentelor respective precum și gradientul optim de tampon B care va fi folosit în stabilirea profilului temperaturilor de denaturare se găsește în tabelul 34.

Etapa II. Stabilirea curbei de temperatură

Amestecul PCR format din cele 15 probe identice de ADN neheteroduplexat utilizat anterior se va folosi în continuare pentru stabilirea curbei de temperatură (curba de topire – melting curve) pe baza căreia se va stabili temperatura optimă la care să aibă loc analiza fragmentelor de ADN. Fragmentele de ADN dublu catenar vor migra de-a lungul coloanei de separare DNASep®HPLC purtate de curentul de amestec al soluțiilor tampon cu o concentrație mai mare a TEAA după care eluția va avea loc odată cu creșterea progresivă a concentrației de ACN.

Pentru stabilirea curbei de denaturare se va considera un interval de temperatură între 50-75°C și pentru eluția fragmentului respectiv se va considera un gradient de tampon B care va trece prin coloană începând cu minutul 0,1 până în minutul 6,6 cu o creștere de 2% pe minut. Fiecare timp de eluție a fragmentului pentru fiecare temperatură din acest interval va fi reprezentată grafic și acest grafic este curba de denaturare caracteristică fragmentului respectiv. În fig.58. sunt reprezentate curbele de denaturare ale celor trei fragmente analizate prin Trangenomic WAVE™ DNA Fragment Analysis și vor fi folosite pentru stabilirea temperaturii optime și a gradientului de tampon B optim necesar detecției polimorfismelor în fragmentele analizate.

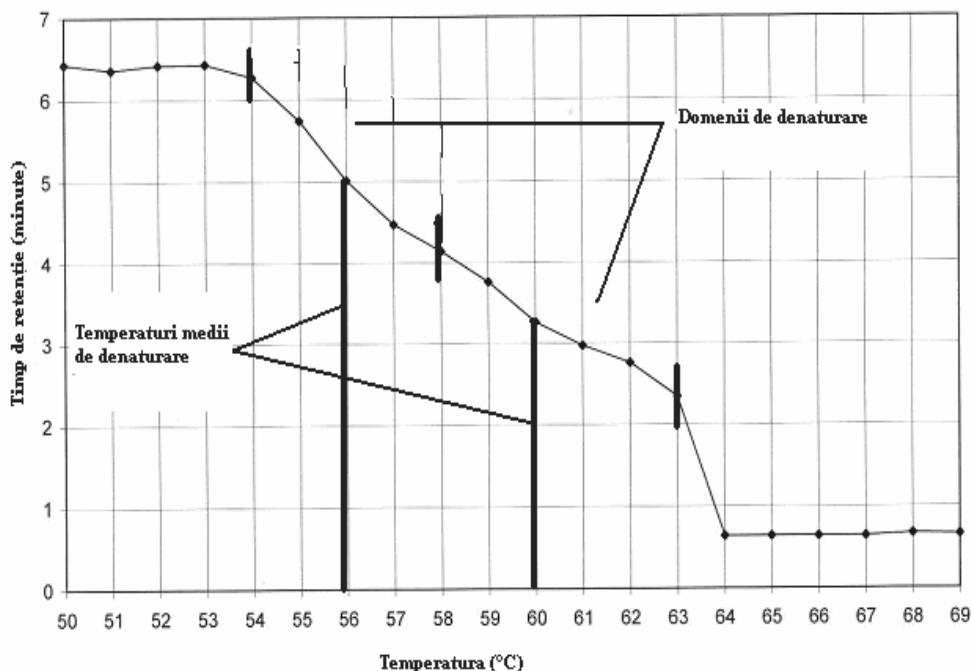


Fig. 58. Graficul variației timpului de retenție a fragmentelor de ADN dublu catenar pe coloana DNASep®HPLC . Se observă cum timpul de retenție a fragmentelor parțial denaturate scade odată cu creșterea temperaturii și cu creșterea de 2% pe minut a procentului de ACN din tamponul de eluție B. Temperaturile medii (liniile bordo) au fost stabilite pentru fiecare domeniu de denaturare care cuprinde între 2-6 puncte. Temperaturile optime la care va avea loc screening-ul se obțin din valorile medii ca și Tmediu-1. Deci screeningul se va face la două temperaturi 55°C și 59°C.

După cum se observă din figura de mai sus curba de temperatură cuprinde mai multe domenii de denaturare (melting domains) ce cuprind între 2 și 6 valori de temperatură (nu mai mult de 6). Fiecare curbă de denaturare a unui anumit fragment de ADN dublu catenar cuprinde 1-4 domenii de denaturare. Pentru fiecare domeniu se face media temperaturilor cuprinse în domeniul respectiv, iar temperaturile optime de detecție a polimorfismelor în fragmentul considerat sunt cu un grad mai mici decât media temperaturilor pe fiecare domeniu (Transgenomic™ Application Note No.101)

Pentru detecția de polimorfisme se urmărește determinarea gradientului de tampon B necesar să elueze fragmentele de pe coloană în 4 minute pentru fiecare dintre cele două temperaturi optime determinate din grafic. Pentru aceasta se vor stabili pentru fiecare dintre temperaturile optime timpurile corespunzătoare de eluție ale fragmentului în gradientul de tampon B la care s-a determinat curba de denaturare.

Considerând spre exemplu curba de denaturare caracteristică fragmentului din regiunea promotor a genei EC-SOD unde temperaturile optime pentru screening sunt de 55 °C și 59 °C cu timpii de eluție determinați grafic aproximativ 6 și 4 minute, pentru determinarea gradientului de tampon B necesar eluției fragmentelor de ADN dublu catenar se aplică următorul raționament: dacă timpul de eluție al fragmentului a fost de 6 în gradient determinat de tampon B de 55%-68% atunci dacă se pleacă de la un procent de 55% ACN la minutul 0,1 cu o creștere de 2% pe minut atunci la minutul 6,1 procentul de ACN va fi aproximativ 67%. La acest procent de ACN eluția fragmentului este completă și pentru o eluție completă în 4 minute unde procentul de ACN necesar este 67% , ținând cont că rația creșterii este de 2% pe minut înseamnă că procentul minim de ACN necesar pentru screeningul în 4 minute este de 59%. În consecință, pentru temperatura de 55 °C considerată, gradientul optim de tampon B necesar eluării de pe coloană în timp de 4 minute este de 59% -67% ACN. Printr-un raționament analog, la temperatura de 59°C , procentul de ACN furnizat de tamponul B necesar screening-ului este de 55% la minutul 0,1 și de 63% ACN la minutul 4,1.

Etapa III. Detecția propriu-zisă a polimorfismelor

Înainte de inițializarea analizei Transgenomic WAVE™ DNA Fragment Analysis probele de ADN sunt supuse reacțiilor PCR așa cum este specificat în capitolul II.5.1.1.4 și tabelele 30-32 cu singura deosebire că reacțiile s-au desfășurat în tampon 1 x Clear Type IV PCR buffer folosind ADN-ul genomic extras de la cei 294 de subiecți considerați în studiu. 95 de reacții PCR și un martor (care nu conține ADN genomic) au fost efectuate utilizând ThermoFast plates (ABgene). Fragmentele de ADN rezultate în urma reacțiilor PCR au fost denaturate prin încălzire 3 min la 95 °C și renaturate prin răcire lentă până la 22°C cu o scădere a temperaturii de 0.2 °C la fiecare 4 secunde pentru a permite formarea hetero și homoduplexurilor de ADN așa cum este ilustrat în fig.55.

Fiecare fragment de ADN dublu catenar format în acest fel a fost supus screening-ului pentru detecția de polimorfisme fiind trecut prin coloana cromatografică timp de 4 minute la un gradient al tamponului B determinat anterior pe baza temperaturilor optime de denaturare așa cum a fost descris anterior. Reamintim că alegerea condițiilor de detecție a avut loc așa încât fragmentele de ADN dublu catenar să se elueze de pe coloană între minutul 0,1 și minutul 4,1 în timp ce are loc o creștere progresivă cu 2% pe minut a concentrației de AC N furnizat de tamponul B. Condițiile care au fost determinate pentru screening-ul celor trei fragmente precizate în deschiderea acestui capitol (vezi 2.5.1.1.5.) sunt însumate și prezentate în tabelul de mai jos:

Tabel 34. Condițiile utilizate pentru screeningul fragmentelor analizate folosind metoda Transgenomic Wave System

Regiunea	Gradientul la care are loc screening-ul (% A/B)	Temperatura (°C)
Pr- 1 EC-SOD	55-63	59
	59-67	55

II.5.1.1.6. Genotiparea ADN folosind metoda digestiei enzimatică cu enzime de restricție (RFLP- restriction fragment length polymorphism)

RFLP este o tehnică rapidă de genotipare ADN în care se folosesc enzime de restricție pentru a diferenția genotipurile generate de existența situsului polimorfic. Metoda a fost folosită pentru genotiparea celor 294 de probe de ADN [254] provenite de la subiecții luați în studiu în vederea evidențierii polimorfismelor Thr40Ala *EC-SOD* și Arg213Gly *EC-SOD*. În acest scop, două porțiuni din secvența nucleotidică a genei (care corespund celor două fragmente de 245 bp respectiv 159 bp amplificate PCR -vezi cap.IV.1.1.5.- cuprinzând fiecare din cele două polimorfisme de interes au fost analizate cu Webcutter 2 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>) pentru a determina care alelă polimorfică crează sau distruge un situs de recunoaștere pentru enzimele de restricție, selectându-se o enzimă convenabilă din punct de vedere economic (NEB). În cazul în care nici un situs de restricție enzimatică nu era prezent în jurul polimorfismului de interes s-a folosit un "mismatch primer" care a fost creat așa încât să producă un situs artificial de restricție enzimatică în fragmentul de interes în poziția dorită prin substituția unei baze cu o altă bază în secvența primerului la capătul 3' așa încât în urma reacției de amplificare fragmentul ADN amplificat să conțină deja noua bază în poziția dorită pentru a crea un situs de restricție enzimatică. Condițiile de optimizare a amplificării precum și secvențele nucleotidice ale primerilor sunt descrise II.5.1.1.6.

Condițiile optime pentru fiecare reacție de digestie enzimatică au fost determinate utilizând diferite concentrații de enzimă în intervalul 0.5-4 U / volumul de reacție (25 μ l PCR mix) folosind tamponul corespunzător enzimei respective și temperatura optimă așa încât reacția enzimatică să se desfășoare complet. Aceste condiții optime sunt prezentate în tabelul 35 iar compoziția soluțiilor tampon este prezentată în anexa 5.7.

Tabel 35. Condițiile optime pentru desfășurarea reacțiilor de digestie enzimatică

Mărimea fragmentului ADN supus restricției enzimatică	Enzima de restricție	Secvența de recunoaștere (5' - 3')	Unități de enzimă per reacție	NEBuffer (1 x)	Temp. (°C)	BSA (0.1 x)
245 bp	<i>BssHII</i>	G[^]CGCGC	2,5 u	3	50	-
159 bp	<i>Fnu4HI</i>	GC[^]NGC	2u	4	37	-

Produceți rezultați în urma amplificării PCR au fost supuși reacțiilor de digestie enzimatică O/N (peste noapte) la temperaturile indicate în tabel. A doua zi,

amestecul rezultat prin reacția enzimatică este supus migrării electroforetice în gel de agaroză 1% timp de 2 h la 120 V și folosind ca marker fluorescent 0.5 mg ml^{-1} bromură de etidiu. Vizualizarea fragmentelor obținute în urma restricției enzimatice sunt vizualizate prin iluminare UV.

II.5.1.1.7. Secvențializarea ADN

Determinarea secvenței nucleotidice a fragmentelor ADN s-a realizat în scopul certificării existenței polimorfismelor identificate prin restricție enzimatică sau folosind metoda Trangenomic WAVE™ DNA Fragment Analysis. Metoda de secvențializare, utilizând o mașină ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems) și un kit v3.0 ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit implică câteva etape care vor fi descrise în cele ce urmează.

Etapa 1. Reacția de amplificare PCR cu marcarea fluorescentă a capătului 3` al secvenței nucleotidice din fragmentul de analizat (Reacția de secvențializare ciclică - Cycle Sequence Reaction)

În reacție s-a folosit versiunea v3.0 ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix (Applied Biosystems) care conține AmpliTaq DNA Polymerase FS, MgCl_2 , tampon Tris-HCl, un amestec de dezoxinucleozid trifosfați (dATP, dCTP, dITP, dUTP) și terminatorii fluorescenți (BigDye™ Terminators). Terminatorii fluorescenți (BigDye™ Terminators) conțin un amestec de didezoxinucleotid trifosfați, fiecare tip de nucleotid fiind marcat fluorescent cu un marker fluorescent compus dintr-un fluorofor (6-carboxifluoresceina) și un colorant derivat de la diclororodamină specific pentru fiecare bază : A-diclor[R6G], C-diclor[ROX], G-diclor[R110] or T-diclor[TAMRA].

Reacția se desfășoară ca o amplificare PCR a fragmentului de ADN care se dorește a fi secvențializat utilizând primeri concepuți la fel ca și pentru o reacție PCR obișnuită, dar se folosește o concentrație mult mai mică $1.6 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1}$ (vezi secvența primerilor pentru fragmentele analizate în cap. II.5.1.1.4.). În cursul reacției, primerii se leagă prin complementaritate de secvența corespunzătoare din fragmentul de analizat și polimeraza construiește catena complementară pornind de la primeri și înglobând dNTP-urile corespunzătoare. În momentul înglobării unui didezoxinucleozid marcat fluorescent reacția de polimerizare este întreruptă din cauza absenței grupării -OH în poziția 3` care permitea extinderea catenei în urma reacției de fosforilare. Prezența didezoxinucleotid trifosfaților terminator permite, prin reacția de secvențializare ciclică, generarea a unor fragmente de ADN de diverse mărimi care conțin markerii fluorescenți la capătul 3`.

Componentele amestecului pentru reacția de secvențializare au fost: $2 \mu\text{l}$ v3.0 ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix (Applied Biosystems), 40-50 ng produs PCR (or 150-200 ng ADN plasmidial), $1 \mu\text{l}$ primer forward sau reverse (sens or antisens), $4 \mu\text{l}$ 5xtampon de secvențializare, DMSO 5% și betaină 1M în amestecul final, completându-se cu apă bidistilată (puritate moleculară) până la $20 \mu\text{l}$. Programul termocycler-ului (Gene Amp PCR 2400 - Applied Biosystems) a cuprins 25 de cicluri, fiecare ciclu presupunând încălzire la 96°C pentru 20 sec., 55°C pentru 55 sec., 60°C pentru 4 min.

Etapa II. Purificarea produsului reacției de secvențializare

Peste produsul reacției de secvențializare s-au adăugat $50 \mu\text{l}$ de etanol 95% și $2 \mu\text{l}$ de acetat de sodiu 3M (pH=4,6). Amestecul s-a incubat la temperatura camerei timp de 15 min. pentru precipitarea ADN-ului, după care se centrifughează la 13 000 rpm timp de 30 min. S-a îndepărtat supernatantul prin pipetare cu foarte mare grijă pentru a nu aspira din precipitat. Peste precipitatul obținut s-au adăugat $125 \mu\text{l}$ de etanol 70% și se centrifughează la 13 000 rpm 15 min. S-a îndepărtat din nou

supernatantul și precipitatul s-a centrifugat în vederea uscării 10-30 min. la 35 °C în SpeedVac® (Savant)

Etapa III Electroforeza în procesul de secvențializare

Produsul reacției de secvențializare ciclică purificat prin precipitare cu etanol a fost resuspendat în 15 μl reactiv TSR dacă mărimea fragmentului analizat depășește 300 bp (Template Suppression Reagent cu rol de a împiedica formarea buclilor de ADN menținând o structură uniformă a catenei de ADN) sau în 10 μl formamidă dacă mărimea fragmentului este mai mică decât 300 bp. Amestecul de reacție a fost denaturat timp de 3 min. prin încălzire la 90 °C și răcit brusc în gheață.

După denaturare, probele au fost transferate în suportul pentru tuburile cu probă cu 98 sau cu 48 de locuri. ADN-ul monocatenar a fost preluat de fluxul de soluție tampon iar fragmentele au fost separate electroforetic prin migrare print-o coloană capilară foarte fină cu lungimea de 47 cm umplută cu polimer POP6 (Applied Biosystems). Migrarea electroforetică a avut loc la 50°C timp de 30 minute.

Detecția de fluorescență permite detectarea unui semnal de fluorescență la o lungime de undă specifică pentru fiecare bază A, C, G sau T marcată fluorescent de la sfârșitul fragmentului de ADN deoarece carboxifluoresceina absoarbe energia emisă de un laser cu ioni de argon apoi o transferă grupărilor acceptorului de tip rodaminic. Fiecare colorant derivat de la clorrodamină care este legat de ultima bază de la capătul 3' a catenei de ADN monocatenar emite fluorescența la o lungime de undă caracteristică.

După separarea electroforetică a fragmentelor de ADN s-a citit secvența nucleotidică cu ajutorul ABI Prism software (Applied Biosystem).

II.5.1.1.8. Analiza computațională a EC-SOD

Pentru identificarea situsurilor de recunoaștere a factorilor de transcripție situate în regiunea promoter a genei *SOD₃* s-a folosit programul MatInspector de la GenomatrixSuite (www.genomatix.de). MatInspector scanează în ambele sensuri secvența promotorului și utilizează un algoritm propus de Quandt et al. [255] care folosește o metodă PWM (position weight matrix) care va crea o matrice matriță în care fiecare rând reprezintă o bază și fiecare coloană reprezintă o poziție. Valoarea în fiecare celulă a matricei este calculată în funcție de probabilitatea ca acea bază să apară în poziția specificată în secvența consens [256]. Programul MatInspector permite căutarea potrivirii secvențelor submise cu matricea matriță consens, iar similaritatea dintre cele două este exprimată ca un scor de similaritate care trebuie să depășească un anumit prag (>0.85). Cu cât scorul are o valoare mai mare cu atât probabilitatea ca secvența dată să se potrivească cu secvența consens.

Programul MatInspector realizează căutarea în baza de date TRANSFAC [257] care conține o vastă colecție de secvențe ale situsurilor de legare ale factorilor de transcripție. Pentru identificarea secvențelor consens și a referințelor bibliografice am utilizat baza de date NCBI PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/ENTREZ/) și BioBase TRANSFAC 7.0 (<http://www.gene-regulation.com/pub/databases/transfac/cl.html>)

Compararea secvențelor nucleotidice între specii este o metodă frecvent folosită în analiza promotorilor mamiferelor și se aplică pentru a găsi regiuni conservate de-a lungul evoluției care se presupune a fi regiuni funcționale. Sunt mai multe programe disponibile care permit compararea secvențelor ADN aliniindu-le pentru a putea găsi similitudini între ele și secvențe omoloage. Dintre acestea se vor utiliza 3 programe:

1. Clustal W (www.ebi.ac.uk) [258] care permite alinierea mai multor secvențe nucleotidice cu lungimi diferite aparținând unor specii înrudite sau

aparținând aceleiași specii. Rezultatele programului prezintă și un procent de omologie între secvențele analizate.

2. PIPMaker (<http://bio.cse.psu.edu>) [259] aliniază două secvențe de ADN de la specii înrudite și identifică regiunile conservate prezentând ca rezultate un grafic ce redă procentul de identitate al celor două secvențe (pip), graficul dot-plot care redă gradul de omologie existent între ele .
3. Foot Printer (<http://bio.cs.washington.edu/software>) pentru a identifica domenii scurte (10 bp) la nivelul a două sau mai multe secvențe ADN aliniat care se conservă. Programul oferă mai multe informații comparativ cu PIP Maker referitoare la regiunile omoloage [260]. Ca și Clustal W poate da informații despre relația de filogenie între speciile analizate (filograma) fără a indica însă procentul de omologie, așa cum face Clustal W sau PIP Maker

Analiza computațională utilizând toate aceste programe oferă mult mai multe informații despre speciile și regiunile omoloage decât ar oferi un singur program, de aceea am utilizat toate trei programele computaționale pentru analiza a fragmentului de interes din promotorul *SOD3* la om (*homo sapiens*), șoarece (*mus musculus*) și șobolan (*rattus norvegicus*) pentru a identifica regiunile omoloage conservate în timpul evoluției care ar putea avea rol funcțional. Pentru analiza regiunilor bogate în CG care pot fi metilate (identificarea insulelor CpG) s-a utilizat programul EMBOSS-CpG de la EMBL-EBI [261] folosind criteriile de selecție standard : 100 de ferestre, raportul obs./expected = 0.6 și >50% GC cu mărirea insulei CpG mai mare de 50.

II.5.1.1.9. Analiza statistică a rezultatelor

Analiza statistică s-a făcut folosind programul statistic SPSS (Statistics Package for the Social Sciences) versiunea V12.0 (SPSS Inc) pentru a identifica asociațiile dintre polimorfismele evidențiate și existența plăcii de aterom sau corelația cu anumiți factori de risc cardiovascular. Pentru a determina dacă variabilele sunt normal distribuite pentru populația studiată, s-a folosit testul Kolmogorov-Smirnov. Dacă distribuția variabilelor a fost deviată de la normalitate, graficul distribuției fiind o curbă de tip gaussian deplasată spre stânga sau spre dreapta , atunci variabilele au fost transformate în diverse moduri pentru a avea o curbă cât mai apropiată de normal, iar în cazul în care transformarea variabilelor nu a putut fi performată cu succes prin nici una din metodele de transformare, atunci analiza a fost făcută folosindu-se teste nonparametrice specifice pentru variabile care nu sunt normal distribuite.

În analiza statistică a fost considerată semnificativă o valoare a lui $p < 0,05$ ceea ce înseamnă o probabilitate >95% ca rezultatul să nu fie rezultatul întâmplării și de asemenea, unde a fost cazul, s-a calculat și intervalul de confidență (CI >95%). Pentru a compara variabile categorice a fost folosit testul Chi-pătrat (χ^2), pentru a compara media variabilelor în două grupuri distincte s-a folosit testul t-student pentru variabile normal distribuite și testul Mann-Whitney pentru variabile care nu sunt distribuite normal. Pentru compararea mediei valorilor variabilelor la trei grupuri s-au folosit testul 1-Way ANOVA pentru variabile normal distribuite și testul Kruskal-Wallis pentru variabile care nu sunt normal distribuite, iar pentru analiza multiplelor comparații între grupuri a fost folosită Multi-way ANOVA pentru a identifica grupurile care diferă semnificativ de restul grupurilor. Atunci când numărul de homozigoți mutanți este mic sau absent atunci acest grup a fost considerat împreună cu grupul de heterozigoți și în acest caz a fost folosit un test t-student pentru grupuri independente.

II.5.1.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Evidențierea polimorfismelor la nivelul secvenței ce codifică *SOD3*

Polimorfismul Thr40Ala EC-SOD Fiecare probă de ADN genomic extrasă a fost folosită pentru amplificarea unui fragment de 245 bp din regiunea ce codifică sinteza proteinei EC-SOD, mai exact din exonul 3 al regiunii codante. Acest fragment include situsul pentru polimorfismul 172A→G (manifestat în existența polimorfismului Thr40Ala EC-SOD). Genotiparea probelor de ADN în acest caz s-a făcut prin restricție enzimatică folosind enzima BssHII (NEB). Mărimea fragmentului rezultat după reacția enzimatică în cazul prezenței alelei A (Thr40) rămâne neschimbată (245 bp) deoarece enzima nu are situs de restricție enzimatică în interiorul fragmentului, în timp ce în cazul prezenței alelei G (Ala40) se creează un situs de restricție enzimatică pentru BssHII și prin urmare, în urma digestiei, se obțin două fragmente de 63 respectiv 182 bp. În cazul heterozigoților A/G se vor obține trei fragmente de 63 bp, 182 bp respectiv 245 bp. Fragmentele sunt separate prin migrare electroforetică în gel de agaroză de concentrație 1% și vizualizate în lumină UV:

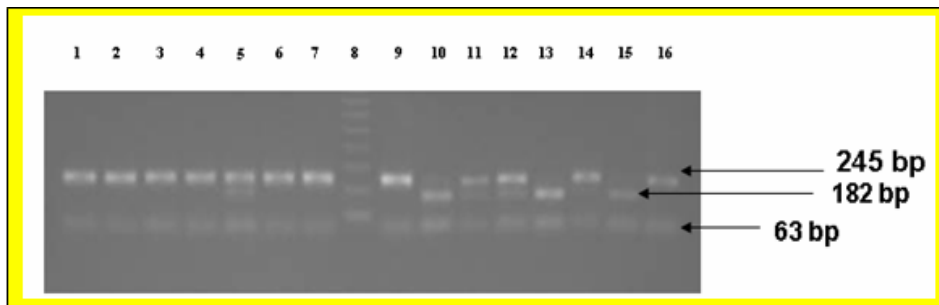


Fig. 59. Rezultatul migrării electroforetice a fragmentelor obținute în urma restricției enzimatică în vederea evidențierii polimorfismului Thr40Ala (linia 8 marker ADN ABgene, liniile 12,13,15 homoziigoți mutanți, liniile 5,11,12 heterozigoți)

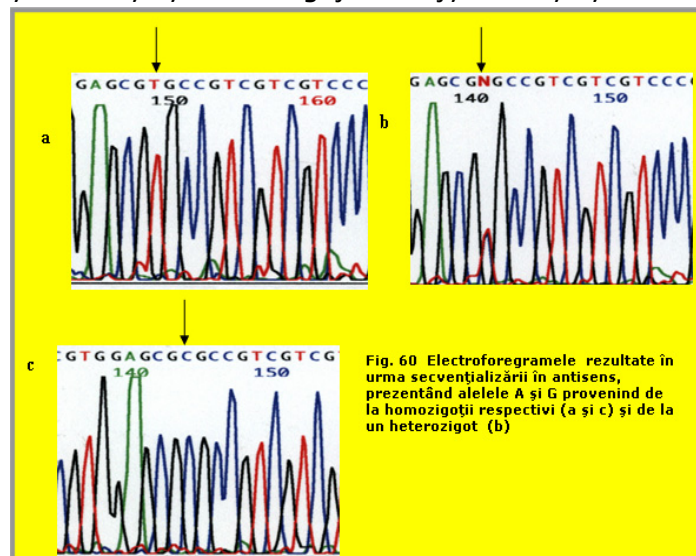


Fig. 60 Electroforeramele rezultate în urma secvențializării în antisens, prezentând alelele A și G provenind de la homoziigoții respectivi (a și c) și de la un heterozigot (b)

În fig. 59 și 60 sunt prezentate rezultatele secvențializării pentru un set de trei probe identificate ca fiind un homozigot cu genotip AA, un homozigot cu genotip GG și un heterozigot AG în urma genotipării prin metoda RFLP (restriction fragment length polymorphism). Pentru polimorfismul Thr40Ala, din cei 294 de subiecți analizați, 133 de subiecți au fost găsiți homozigoți pentru alela A (45,2%), 115 subiecți au fost heterozigoți (39,1%) și 46 au fost homozigoți pentru alela G (15,6%).

Polimorfismul Arg213Gly EC-SOD În vederea evidențierii polimorfismului Arg213Gly EC-SOD (691 C/G referitor la poziția nucleotidului la nivelul căruia are loc polimorfismul față de codonul start ATG +1 sau 231 dacă ne referim la codonul la nivelul căruia are loc polimorfismul) s-a amplificat un fragment de 159 de perechi de baze care a fost supus reacției de digestie enzimatică cu enzima *Fnu4HI* (NEB) așa cum este prezentat la capitolul II.5.1.1.6.

În urma reacției de digestie enzimatică s-au obținut unele fragmente (6 bp, 14bp, 11 bp and 40 bp) comune atât pentru homozigoții care prezintă alela C cât și pentru heterozigoți sau homozigoți purtători ai alelei G; în prezența alelei C (Arg213) s-au obținut fragmente adiționale de 70 bp și 18 bp, iar în prezența alelei G (Gly213) s-a obținut un fragment adițional de 88 bp așa cum este ilustrat în fig.nr.65, rezultată în urma vizualizării în UV

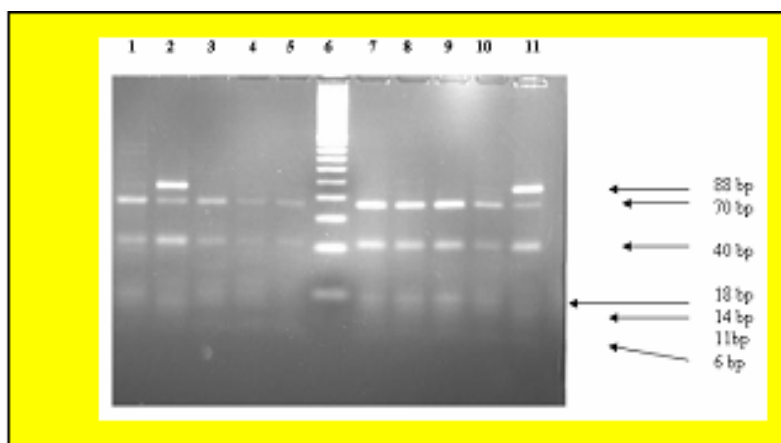


Fig. 61. Rezultatul migrării electroforetice a fragmentelor obținute în urma restricției enzimaticice în scopul evidențierii polimorfismului Arg213Gly EC-SOD; Liniile 1,3-5,7-10 : homozigoți pentru alela C (wild type); Linia 6 : Hyperladder IV(Bioline); Liniile 2 și 11: heterozigoți pentru alela G

a benzilor separate prin electroforeză într-un gel Metaphor 4% prin compararea cu un marker ADN Hyperladder IV (Bioline) care cuprinde benzi din 20 bp în 20 bp pentru fragmente de până la 1000 bp (vezi subcapitolul II.5.1.1.4.) Pentru polimorfismul Arg213Gly EC-SOD nu a fost identificat nici un individ homozigot pentru alela G (Gly213), identificându-se doar 5 indivizi heterozigoți (1,7%). 289 de indivizi (98,3%) au fost homozigoți pentru alela C (Arg213).

Analiza fragmentului din promotorul genei EC-SOD Analiza fragmentului de 485 bp din regiunea promotorului genei EC-SOD cuprinsă între nucleotidele -469 și +16 s-a realizat utilizând metoda Transgenomic WAVE™ fragment analysis la două temperaturi diferite (59°C și 55°C) în gradient de tampon B de 55-63% și respectiv 59-67%, după o amplificare PCR a fragmentului dorit efectuată în prealabil în condițiile descrise în tabelele nr. 30-32 urmată de o denaturare la temperatură

ridicată și de o răcire lentă a care permite formarea hetero- și homoduplexurilor. Analiza cromatogramelor nu a indicat nici un polimorfism în această regiune a promotorului *EC-SOD* la nici unul din subiecții analizați în ambele condiții experimentale.

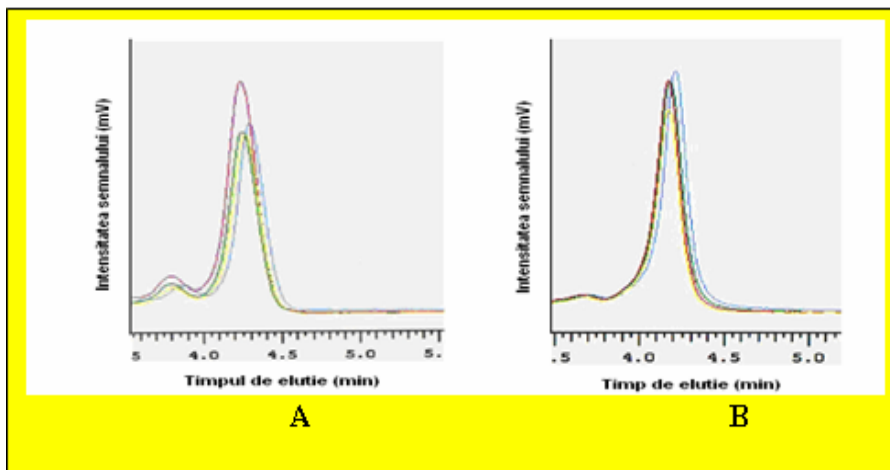


Fig. 62 A și B : Exemplu de cromatogramă rezultată în urma analizei WAVE™ DNA analysis la temperatura de 59°C în gradient de tampon B de 55-63% (A) și la temperatura de 55°C în gradient de tampon B de 59-67% (B) ambele prezentând un singur profil cromatografic corespunzător homozigoților wild type

Analiza statistică a asocierilor dintre polimorfismele *EC-SOD* evidențiate și existența plăcii de aterom semnificativ sau alți factori de risc

Caracterizarea subiecților Caracterizarea subiecților, așa cum se poate urmări în tabelul 36, a indicat că din punct de vedere al numărului de vase afectate cei mai mulți dintre subiecți au avut afectate 1,2 sau 3 artere afectate (42%). În urma analizei preliminare a datelor s-a constatat că vârsta subiecților cu aterom semnificativ este mai mare decât a celor din grupul control. De asemenea, datele reflectă influența factorilor de risc cardiovascular asupra profilului subiecților, în grupul subiecților fiind înregistrați, așa cum era de așteptat, semnificativ mai mulți diabetici (103 vs.12), hipertensivi (112 vs.70), fumători (75 vs. 28) și dislipidemici (97 vs.32), manifestându-se de asemenea o creștere a procentului de indivizi cu un istoric al accidentelor heredocolaterale în grupul subiecților care prezintă aterom semnificativ. Numărul bărbaților înregistrați cu aterom semnificativ este de asemenea mai mare decât al celor fără aterom semnificativ (106 vs 44) și mai mare decât al femeilor cu aterom semnificativ (106 vs.38). Diferențe semnificative din punct de vedere statistic se înregistrează și între valorile medii ale colesterolului și trigliceridelor pentru grupurile celor cu și fără aterom semnificativ care sunt mai ridicate la lotul de subiecți.

Analiza asociațiilor celor două polimorfisme *EC-SOD* cu ateroscleroza și factorii de risc

S-a realizat mai întâi analiza asociației fiecăruia dintre cele două polimorfisme cu existența plăcii de aterom prin compararea distribuției genotipurilor identificate la subiecții cu și fără aterom, apoi toți cei 294 de subiecți au fost împărțiți în grupuri în funcție de existența sau absența factorilor de risc cardiovasculari urmărindu-se identificarea de asociații ale acestor două polimorfisme ale *EC-SOD* cu factorii de risc cardiovascular. Au fost de asemenea investigate

corelațiile între genotipurile identificate și factorii de risc cardiovascular separat pentru femei și bărbați.

Tabel 36. Numărul de vase afectate de formarea plăcii de aterom la subiecții selectați

Tipul arterelor afectate		Numărul cazurilor înregistrate	Frecvența cazurilor în populația studiată
Artere coronariene	(1,2 sau 3 artere afectate)	125	42,5%
	1 arteră afectată	40	13,6%
	2 artere afectate	48	16,3%
	3 artere afectate	37	12,6%
Carotidă		21	7,1%
Artere periferice		33	11,2%
Artere coronariene și carotidă		15	5,10%
Artere coronariene și periferice		17	5,78%
Artere periferice și carotidă		4	1,36%
Artere coronariene, carotidă și periferice		0	0%

Deși pentru polimorfismul 691 C/G Arg213Gly nu s-au identificat indivizi purtători homozigoți ai alelei G, distribuția genotipurilor s-a demonstrat că respectă echilibrul Hardy-Weinberg și s-au aplicat metodele de analiză statistică, deși din cauza numărului mic de heterozigoți și a inexistenței homozigoților purtători ai alelei G rezultatele analizei statistice sunt neconcludente.

Din analiza celor 294 de subiecți se constată că între frecvențele genotipurilor la cele două grupuri analizate (subiecți cu și fără aterom semnificativ) nu este o diferență semnificativă din punct de vedere statistic (vezi tabelul 37).

Tabel 37. Frecvențele genotipurilor studiate la nivelul genei EC-SOD și valorile lui p statistic rezultat prin compararea frecvențelor genotipurilor între cele două grupuri de subiecți : cu și fără aterom semnificativ

Poziția / regiunea	Grupuri analizate	Frecvențele genotipurilor identificate			Valoarea lui p
691 C/G	Subiecți cu aterom semnificativ	CC:97,9% 291 cazuri	CG: 2,1% 3 cazuri	GG: 0% 0 cazuri	p=0,619
	Subiecți fără aterom semnificativ	CC:98,7% 292 cazuri	CG: 1,3% 2 cazuri	GG: 0% 0 cazuri	
172 A/G	Subiecți cu aterom semnificativ	AA:49.3% 71 cazuri	AG:34.7% 50 cazuri	GG:16.0% 23 cazuri	p=0,290
	Subiecți fără aterom semnificativ	AA:41.3% 62 cazuri	AG:43.3% 65 cazuri	GG:15.3% 23 cazuri	

S-a analizat, de asemenea, la întreg lotul de 294 de indivizi posibilitatea existenței unor corelații ale polimorfismelor **Arg213Gly** și **Thr40Ala** cu ceilalți factori de risc cardiovascular precizați în tabelele nr. 38 și 39.

Tabel 38. Frecvența genotipurilor corespunzătoare polimorfismului Arg213Gly (691C/G)

Nr. crt.	Grupuri analizate	Genotip (nr cazuri [frecvența %])			Valoarea lui p
		CC	CG	GG	
1	Cu leziuni coronariene Fără leziuni coronariene	122[97,6]	3 [2,4]	0 [0]	p=0,425
		167[98,8]	2 [1,2]	0 [0]	
2	Cu leziuni carotidiene Fără leziuni carotidiene	21[100]	0[0]	0 [0]	p=0,532
		268[98,2]	5[1,8]	0 [0]	
3	Cu leziuni la nivelul vaselor periferice Fără leziuni la nivelul vaselor periferice	33[100]	0[0]	0 [0]	p=0,423
		256[98,1]	[5]	0 [0]	
4	Diabetici Non diabetici	52[98,1]	1[1,9]	0 [0]	p=0,908
		237[98,3]	4[1,7]	0 [0]	
5	Hipertensivi Normotensivi	180[98,9]	2[1,1]	0 [0]	p=0,309
		109[97,3]	3[2,7]	0 [0]	
6	Cu dislipidemie Fără dislipidemie	126[97,7]	3[2,3]	0 [0]	p=0,464
		163[98,8]	2[1,2]	0 [0]	
7	Obezi Non obezi	147[98,7]	2[1,3]	0 [0]	p=0,630
		142[97,9]	3[2,1]	0 [0]	
8	Cu accidente heredocolaterale Fără accidente heredocolaterale	109[98,2]	2[1,8]	0 [0]	p=0,917
		180[98,4]	3[1,6]	0 [0]	
9	Fumători Nefumători	131[97]	4[3]	0 [0]	p=0,123
		158[99,4]	1[0,6]	0 [0]	

Tabel 39. Frecvența genotipurilor corespunzătoare polimorfismului Thr40Ala (172A/G)

Nr. crt.	Grupuri analizate	Genotip (nr cazuri [frecvența %])			Valoarea lui p
		AA	AG	GG	
1	Cu leziuni coronariene Fără leziuni coronariene	60 [48]	44 [35,2]	21[16,8]	p=0,496
		73 [43,2]	71[42]	25[14,8]	
2	Cu leziuni carotidiene Fără leziuni carotidiene	9[42,9]	9[42,9]	3[14,2]	p=0,934
		124[45,4]	106[38,8]	43[15,8]	
3	Cu leziuni la nivelul vaselor periferice Fără leziuni la nivelul vaselor periferice	18 [54,5]	11[33,3]	4 [12,1]	p=0,514
		115[44,1]	104[39,8]	42[16,1]	
4	Diabetici Non diabetici	31[58,5]	12[22,6]	10[18,9]	p=0,024
		102[42,3]	103[42,6]	36[14,9]	
5	Hipertensivi Normotensivi	91[50]	62[34,1]	29[15,9]	p=0,063
		42[37,5]	53[47,3]	17[15,2]	
6	Cu dislipidemie Fără dislipidemie	60[46,5]	48[37,2]	21[16,3]	p=0,837
		73[44,2]	67[40,6]	25[15,2]	

7	Obezi	71[47,7]	55[36,9]	23[15,4]	p=0,680
	Non obezi	62[42,8]	60[41,4]	23[15,9]	
8	Cu accidente heredocolaterale	51[45,9]	49[44,1]	11[9,9]	p=0,085
	Fără accidente heredocolaterale	82[44,8]	66[36,1]	35[19,1]	
9	Fumători	57[44,2]	60[44,4]	18[13,3]	p=0,205
	Nefumători	76[47,8]	55[34,6]	28[17,6]	

După cum se observă din tabelul 38, nu s-a remarcat existența unei corelații statistice între nici unul dintre factorii de risc cardiovascular și polimorfismul Arg213Gly EC-SOD, în schimb s-a observat existența unor asocieri între existența alelei Thr40 EC-SOD la subiecții cu diabet și hipertensiune arterială. Pentru a avea o evaluare mai clară a asociației existente ținând cont că genotipul cel mai puțin frecvent este GG am analizat comparativ distribuția genotipurilor AA și AG+GG la cele două grupuri amintite. Rezultatele analizei statistice efectuate luând în considerare genotipurile AA și AG +GG au confirmat că frecvența genotipului AA a polimorfismului Thr40Ala (corespunzătoare variantei Thr40 a EC-SOD) a fost mai mare la subiecții diabetici comparativ cu subiecții care nu prezintă diabet ($p=0,03$) și la subiecții hipertensivi comparativ cu cei normotensivi ($p=0,04$) așa cum arată graficele de mai jos:

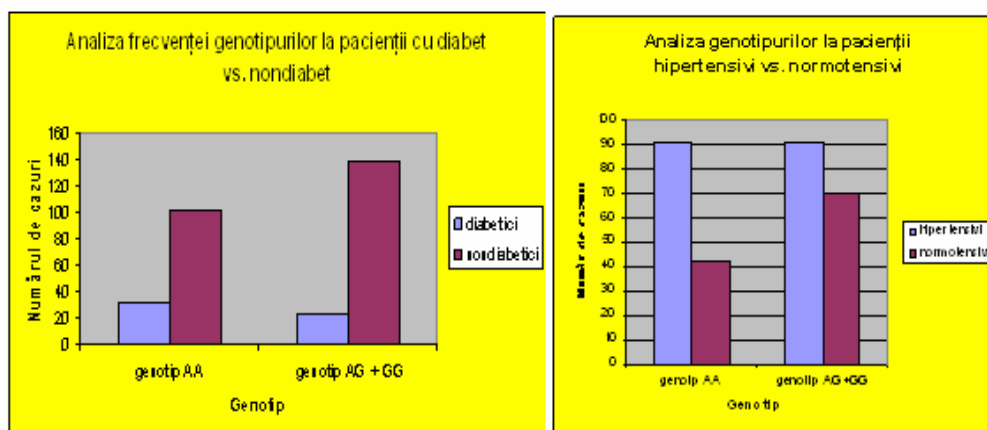


Fig. 63. Studiul comparativ al frecvenței genotipurilor AA și AG+GG la diabetici vs. Non-diabetici (stânga) și la normotensivi vs. Hipertensivi (dreapta)

Analiza asociațiilor celor două polimorfisme EC-SOD cu ateroscleroza și factorii de risc separat pentru femei și bărbați

În urma analizei datelor genotipării, nu s-au înregistrat diferențe statistice între femei și bărbați în ceea ce privește distribuția genotipurilor Thr40Ala și Arg213Gly EC-SOD (tabel 40). Analizând corelațiile între existența celorlalți factori de risc cardiovascular și genotipurile AA și AG + GG ale polimorfismului 172 A/G **EC-SOD** identificate separat la femei și bărbați s-au obținut rezultate semnificative din punct de vedere statistic (tabel 41). După cum s-a constatat, există o diferență statistică între frecvențele celor două genotipuri la subiecții cu și fără ateroscleroză semnificativ, cu și fără diabet precum și la hipertensivi comparativ cu cei normotensivi, diferențe semnificative înregistrate, însă, numai la femei.

Tabel 40. Frecvența genotipurilor Thr40Ala și Arg213Gly EC-SOD la femeii și bărbați

Grupuri analizate	Genotip Thr40Ala EC-SOD (nr cazuri [frecvența %])			Valoarea lui p
	AA	AG	GG	
Femei	66 [45,8]	54 [37,5]	24 [16,7]	p=0,819
Bărbați	67[44,7]	61 [40,7]	22 [14,7]	
	Genotip Arg213GlyEC-SOD (nr cazuri [frecvența %])			
	CC	CG	GG	
Femei	143 [99,3]	1[0,7]	0 [0]	p=0,191
Bărbați	146[97,3]	4[2,7]	0 [0]	

După cum se observă, frecvența alelei Thr40 (AA) este mai mare la femeile cu aterom semnificativ comparativ cu cele cu aterom nesemnificativ, fiind de asemenea mai mare la femeile cu diabet și la cele hipertensive.

Tabel 41. Compararea frecvențelor genotipurilor AA și AG + GG între diverse grupuri analizate separat la femeii și bărbați

Sex	Grupuri comparate	Genotip (nr. cazuri / frecvența%)		Valoarea lui p
		AA	AG+GG	
Femei	Cu aterom semnificativ	24 [63,2]	14 [36,8]	p=0,012
	Fără aterom semnificativ	42 [39,6]	64 [60,4]	
Bărbați	Cu aterom semnificativ	47 [44,3]	59 [55,7]	p=0,900
	Fără aterom semnificativ	20 [45,5]	24 [54,5]	
Femei	Hipertensivi	46[54,1]	39[45,9]	p=0,017
	Normotensivi	20[33,9]	39[66,1]	
Bărbați	Hipertensivi	45[46,4]	52[53,6]	p=0,565
	Normotensivi	22[41,5]	31[58,5]	
Femei	Diabetici	16[72,6]	6[27,3]	p=0,006
	Nondiabetici	50[41]	72[59]	
Bărbați	Diabetici	15[48,4]	16[51,6]	p=0,640
	Nondiabetici	52[43,7]	67[56,3]	

Analiza computațională a promoterului și ARN mesager corespunzător genei EC-SOD

1. Localizarea cromozomială a genei EC-SOD (SOD_3)

În 1990 Hendrickson et al. [150] au poziționat gena SOD_3 la nivelul regiunii cromozomale 4 pter-q21 printr-un studiu al celulelor somatice hibride. Mai târziu, Stern și colab. [262] folosind o gamă variată de metode – celule somatice hibride, mapare de linkaj, FISH - au mapat gena SOD_3 la nivelul regiunii 4p15.3-4p.15.1. La ora actuală se consideră că gena umană EC-SOD este localizată în cromozomul 4p15.3- p15.1 cu poziția cromozomială ilustrată în fig 64.

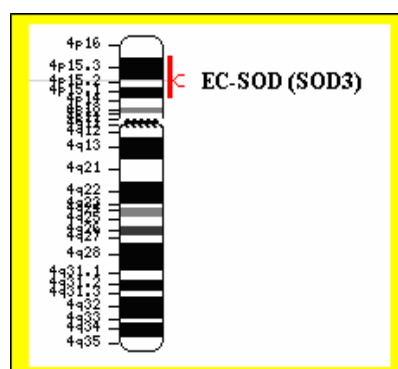


Fig. 64. Poziția genei EC-SOD la nivelul cromozomului 4 uman obținută din baza de date NCBI Entrez

Folosind link-ul (www.ncbi.nlm.nih.gov/ENTREZ/) s-a obținut secvența nucleotidică a genei EC-SOD și a promoterului după parcurgerea mai multor etape de căutare. Gena EC-SOD și 2000 bp din secvența nucleotidică a promoterului au fost localizate la nivelul cromozom 4 uman, NC_00004.10, catena +. Pentru a localiza ARN-ul mesager și secvența promoterului la nivelul genomului, s-a folosit programul NCBI BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) utilizând secvența de referință cu număr de acces NM_003102.1 identificat regiunea cromozomială NT_006316. Secvența cu număr de acces NM_003102.2 a înlocuit de curând secvența NM_003102.1.

Folosind programul NCBI BLAST 2Sequences (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html) au fost comparate secvențele nucleotidice ale secvenței genomice cu numărul de acces AC006390.8 și ale ARN-ului mesager corespunzător numărului secvenței de referință NM_003102.1, localizându-se poziția genei SOD_3 și a 2000 bp din promoterul genei SOD_3 la nivelul clonei respective.

Analizându-se cele 2000 bp din promoterul SOD_3 cu programul NCBI BLAST s-a observat că secvența promotorului nu corespunde nici unei proteine reale sau ipotetice.

2. Identificarea situsurilor de legare a factorilor de transcripție existente în promotorului SOD_3

Cele 2000bp din regiunea promotorului EC-SOD au fost analizate cu cele trei programe precizate la în urma submiterii cate unui fragment de 500 bp din secvența "wild-type". Situsurile de recunoaștere a factorilor de transcripție cu cele mai mari scoruri de similaritate cu secvența centrală și cu matricea de similaritate identificate în cele 2000 bp analizate au fost reunite în Anexa 6.1. Din mulțimea de

situsuri pentru factori de transcripție identificate, s-au selectat situsurile conservate prin compararea secvențelor a trei specii (om, șoarece și șobolan) pentru a obține situsurile care au probabilitate mai mare de a fi funcționale.

3. Compararea secvențelor ADN corespunzătoare promotorilor SOD3 la om, șobolan și șoarece

Programul PIP Maker [259] a fost folosit pentru compararea a 2000 bp cuprinse în secvențele nucleotidice ale promotorilor *SOD3* provenind de la om, șobolan și șoarece, analiza efectuându-se prin compararea a câte două secvențe (om-șoarece, om-șobolan și șoarece-șobolan). Rezultatul comparației șoarece – șobolan a arătat că există mai multe fragmente care se aliniază cu un scor de similaritate de 85.5% și un procent de matching de 70 % între promoterul genei *SOD3*, lucru ilustrat și de diagrama de comparație șoarece-șobolan (anexa 6.2.C) care indica un număr mare de regiuni cu identitate mai mare de 75% comparativ cu diagramele de comparație om-șobolan și om-șoarece care arată un număr mic de fragmente aliniate care au identitate mai mică de 75% (anexa 6.2. A și B). Diagramele dot-plot indică o omologie mică între om și șobolan sau om și șoarece. Aceste scoruri de similaritate sunt în concordanță cu analiza Clustal W care a arătat un scor obținut în urma alinierii secvențelor umane, murine și celei provenind de la șobolan de 9% (om-șoarece), 7% (om-șobolan) și 55% (șoarece-șobolan). Toate rezultatele obținute confirmă faptul că promotorul *SOD3* uman s-a modificat de-a lungul evoluției semnificativ comparativ cu promotorul de la șoarece și șobolan.

S-au comparat secvențele ADN de câte 500 bp cu programele Foot Printer, Clustal W și rezultatele programului MatInspector (vezi II.5.1.1.8):

Analiza FootPrinter la nivelul fragmentului cuprins între -2000 bp și -1500 bp nu a evidențiat nici un motiv structural conservat la nivelul celor trei specii, fapt remarcat și în urma analizei diagramei PIP.

Analiza FootPrinter la nivelul fragmentului cuprins între -1500 bp și -1000 bp a dus la identificarea a **5 clustere omoloage** la nivelul secvențelor provenind de la șoarece și șobolan (vezi anexa 6.3.1) dar secvența umană prezintă un grad mic de similaritate cu celelalte două specii la nivelul fragmentului analizat. Programele FootPrinter și ClustalW [258,260] (vezi anexa 6.3.1.) au dus la identificarea unor situsuri **SMARCA3** (din categoria factorilor SWI/SNF de remodelare a cromatinei) conservate la nivelul celor trei secvențe analizate: unul este conform secvenței de recunoaștere descrisă în literatură (MCWTDK, [263]) pentru toate cele trei secvențe, iar celălalt situs identificat diferă la nivelul secvenței umane printr-o bază față de secvența descrisă în literatură și la celelalte două secvențe la nivelul a două baze, ceea ce scade probabilitatea acestui situs de a fi funcțional. La secvențele provenind de la șoarece și șobolan, acest din urmă situs pentru legarea SMARCA3 se suprapune în parte peste un situs **BLIMP-1** care diferă și el față de secvența de recunoaștere (GAAAG, [264]) la nivelul unei singure baze. La nivelul secvențelor de la șoarece și șobolan s-au identificat mai multe situsuri de recunoaștere pentru BLIMP-1 dintre care unul singur corespunde exact secvenței descrise în literatură în timp ce la secvența umană situsurile BLIMP -1 au probabilitate destul de mică de legare pentru că diferă la nivelul a mai mult de două baze față de secvența de recunoaștere. Mai multe situsuri pentru Oct-1 și Oct-1.P au fost identificate la nivelul secvenței umane [265,266]. Situsurile **Oct-1** diferă față de secvența de recunoaștere (5`-ATGCWAAT-3`, [265]) printr-una sau două

nucleotide. Acest fapt adăugat la neconservarea acestor situsuri la cele trei secvențe analizate indică un potențial reglator mai redus al acestor situsuri. Situsul SREB identificat la nivelul secvenței umane corespunde cu secvența de recunoaștere descrisă de Magana și colab.[267] și Sato și colab. [268] (5`-ATCACCCAC-3`) dar pentru secvențele provenite de la șoarece și șobolan aceste situsuri sunt mult diferite de secvența de recunoaștere, ceea ce denotă evoluția diferită a promotorului genei umane. **TATA box** identificată pentru secvența umană coincide cu secvența descrisă în literatură (5`-TATAAA-3`, [269]), la celelalte două specii analizate diferă la nivelul mai multor baze față de secvența de recunoaștere ceea ce denotă o probabilitate mică de a fi funcțională în reglarea transcripției EC-SOD. De asemenea situsurile **STAT5** identificate la nivelul secvenței umane corespund secvențelor de recunoaștere (5'-TTNYNNAA-3', [270]) dar nu se mai regăsesc conservate la nivelul celorlalte două specii, ceea ce scade probabilitatea acestora de a fi funcționale. La toate cele trei specii s-a identificat un situs pentru legarea factorului steroidogenic **SF1** din categoria receptorilor hormonalni nucleari. La nivelul tuturor celor trei secvențe situsul de legare SF1 diferă la nivelul unei singure nucleotide față de secvența de recunoaștere (5`-GTCAAGGCTA-3`, [271]). La nivelul secvenței umane acest situs se suprapune parțial peste un situs **GATA** (5`-WGATAR-3`, [272])

Analiza secvențelor nucleotidice corespunzătoare fragmentului cuprins între -1000 bp și -500 bp din promotorii genei *SOD3* de la om, șoarece și șobolan folosind programul FootPrinter a demonstrat un grad mic de similaritate la om cu celelalte specii (**un singur cluster conservat**), în timp ce secvențele de la șoarece și șobolan conțin **4 cluster** conservate, demonstrând un grad de omologie mai mare (vezi anexa 6.3.2.). Situsurile pentru factorii de transcripție identificate cu programul MatInspector de la Genomatrix au fost selectate folosind rezultatele programului FootPrinter în vederea stabilirii situsurilor conservate la cele trei specii cu o mai mare probabilitate de a fi funcționale. Astfel, la nivelul fragmentului analizat s-a identificat un motiv structural conservat la cele trei specii corespunzător casetei **TATA box** (5`-TATAAA-3`, [269]), dar care la secvența umană diferă la nivelul unei baze, iar la celelalte două secvențe diferă la nivelul a două baze ceea ce denotă o probabilitate mică ca situsul să fie funcțional. Secvența de legare a **c-Myb** (5`-GTTR-3`, [273]) este conservată la toate cele trei specii, aceasta suprapunându-se peste un situs C/EBP care constă din două diade repetitive simetrice (5`- RTTGCGYAA-3`, [274]). La nivelul secvenței umane, situsul **C/EBP** este parțial conform cu secvența de recunoaștere descrisă în literatură, existând la nivelul celor două diade o modificare la nivelul unei singure baze. La celelalte două secvențe analizate există o singură unitate (CAAC) care se regăsește din tot situsul de recunoaștere al C/EBP. Acest lucru sugerează o probabilitate mai mare de legare a C/EBP pentru secvența umană comparativ cu celelalte două specii analizate. Situsul de legare a heterodimerilor **CHOP/ CEBPa** din secvența umană este mai apropiat de secvența de recunoaștere descrisă în literatură (RRRTGCAATMCCC, [275]), la șoarece și șobolan nu se mai regăsește o mare parte din aceasta. Faptul că la toate cele trei secvențe analizate, secvențele CHOP se găsesc în vecinătatea secvenței corespunzătoare casetei CCAAT (5`-CCAAT-3`) cresc șansele pentru legarea acestor heterodimeri la secvența umană, chiar dacă la șoarece și șobolan probabilitatea de legare este mică deoarece situsurile identificate nu sunt decât parțial conforme cu secvența de recunoaștere. Situsul **E2F** identificat la nivelul celor trei secvențe este numai parțial conform cu secvența de recunoaștere (5`-SGCSSAAA-3'; [276]). Acest lucru denotă o probabilitate mică de legare a acestui

factor de transcripție la cele trei secvențe. La nivelul secvențelor de la șoarece și șobolan, situsul E2F se suprapune peste un situs corespunzător factorului nuclear respirator 2 (**NRF2**) din familia de factori de transcripție ETS, al cărui situs de recunoaștere este conservat la toate cele trei specii, ceea ce denotă o probabilitate mare de legare a acestui factor la nivelul tuturor celor trei secvențe. La nivelul secvenței umane s-a identificat un situs pentru legarea **BLIMP-1** (5'-GAAAG-3' [264]) dar care este mult diferit față de secvența de recunoaștere la celelalte două specii, ceea ce reduce probabilitatea ca acest situs să fie funcțional. Situsul **STAT5** identificat la nivelul secvenței umane este conform cu secvența de recunoaștere (5'-TTNYNNAA-3', [270]) în timp ce la celelalte secvențe acesta nu se mai regăsește conservat decât parțial, acest fapt scăzând probabilitatea acestui situs de a fi funcțional.

Analiza secvențelor nucleotidice corespunzătoare fragmentului cuprins între -500 bp și + 1 bp din promotorii genei *SOD3* de la om, șoarece și șobolan folosind programul FootPrinter ([260]) a demonstrat un grad mic de omologie al secvenței umane cu celelalte două secvențe analizate. **Un singur cluster** a fost identificat ca fiind conservat la toate cele trei specii (vezi anexa 6.3.3.), în timp ce secvența de la șoarece și șobolan au un grad mai mare de omologie la nivelul acestora fiind înregistrate **3 cluster** conservate. Totodată, programul Clustal W [258] a aliniat secvențele nucleotidice ale promoterilor genei de la om, șoarece și șobolan în vederea identificării situsurilor conservate precum și pentru a urmări care dintre polimorfismele descrise în literatură modifică unele dintre aceste situsuri de recunoaștere și legare a factorilor de transcripție (vezi anexa 6.3.3).

Diagramele FootPrinter din anexa 6.3.3. arată existența unor mici cluster care conțin motive structurale cu înaltă omologie conservate la șoarece și șobolan notate 10,11,12 (vezi anexa 6.3.3.), în timp ce promotorul uman prezintă un grad mic de omologie cu promotorii celorlalte două specii analizate. El conține numai motivul 12 omolog cu cel de la șoarece și șobolan, în timp ce clusterelor 11 și 12 au suferit modificări de-a lungul evoluției. Folosind informațiile furnizate de analiza anterioară privind motivele conservate de-a lungul evoluției am identificat aceste secvențe nucleotidice la cele trei specii și le-am reprezentat în anexa 6.3.3., identificând totodată și regiunile de legare a factorilor de transcripție prezente în aceste motive structurale. Identificarea acestor situsuri de legare a factorilor de transcripție s-a dovedit foarte dificilă, pentru că s-au identificat situsuri posibile de legare pentru mai mulți factori de transcripție care se suprapun [277]. Analiza ulterioară a clusterelor conservate și a motivelor structurale identificate ca fiind omoloage au evidențiat secvențe de recunoaștere pentru factorii de transcripție din familia de protooncogene ETS care se leagă specific de o secvență centrală GGAA (secvența consensus este C/AGGAA/T), fiecare factor din această categorie având anumite preferințe pentru nucleotidele vecine [278].

Analiza Foot Printer și MatInspector a secvențelor de interes corespunzătoare celor trei specii a identificat motivul structural 3 care corespunde unui situs slab **EIk-1** ca fiind conservat la toate cele trei specii. Situsul identificat la om și șoarece este slab datorită faptului că diferă printr-o bază față de secvența de recunoaștere identificată în literatură (5'-mrMMGGAWry-3', [278]), iar la șobolan acesta diferă la nivelul a două nucleotide. Acest lucru, împreună cu faptul că, în cazul secvenței de la șoarece și șobolan, acest situs se suprapune peste situsul de recunoaștere **PEA3** (5'-AGGAAR-3' [279]) denotă faptul că acest factor de transcripție are un potențial regulator redus asupra procesului de transcripție al *EC-SOD*. Sistemul **GKLF** este

numai parțial conform secvenței de recunoaștere (5`-RRGGYGY-3`, [280]) diferind de aceasta la nivelul a două nucleotide. Acesta de asemenea poate avea o influență redusă asupra transcripției. S-a identificat de asemenea o casetă GC box la secvența umană care se suprapune însă peste situsurile parțial conforme cu secvențele de recunoaștere ale factorilor din categoria Kruppel-like: GKLf sau KKLf. Sistolul corespunzător casetei **GC** box se regăsește la secvența murină unde se observa că diferă printr-o nucleotidă de situsul specific (5`-GGGNGGG-3`, [281]) în timp ce la șobolan situsul este mai slab. Conservarea acestui situs dovedește faptul că GC are un potențial reglator modest. Deși analiza funcțională arată că **MZF** și factorii din familia Kruppel-like au o afinitate mai mare pentru situsurile corespunzătoare decât factorii din familia Ets, analiza de față arată că deși elementul bipartit **GKLf/GABP** este conservat la șoarece și șobolan, la om acesta se mai regăsește deși secvența corespunzătoare diferă de cea de la șoarece și șobolan, fapt care indică de asemenea un potențial reglator modest al acestuia. Situsul corespunzător MZF este parțial conform cu secvența de recunoaștere (5`-GAGGGGAA-3`, [281,282]) la șoarece și șobolan, iar la om acest situs de legare parțial conform secvenței de recunoaștere este mult mai slab, ceea ce denotă faptul că la om potențialul reglator al acestui factor în procesul de transcripție este mai mic.

4. Analiza influenței polimorfismelor descrise în literatură la nivelul promotorului **SOD3** uman asupra situsurilor de legare a factorilor de transcripție

SNP-urile existente în bazele de date (NCBI SNP: www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/ și NCBI Locus Link : www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/) în regiunea din promotor cuprinsă între -500 bp și 1 bp au fost poziționate în secvența genei EC-SOD și secvența astfel modificată a fost reanalizată cu programul MatInspector pentru a vedea ce situsuri distrug sau creează aceste polimorfisme identificate anterior în această regiune. În tabelul 42 sunt prezentate SNP-urile cu numerele de referință și situsurile create sau distruse de prezența alelelor rare. Așa cum se poate observa se formează două situsuri corespunzătoare factorilor de transcripție din categoria proteinelor cu homeodomeniu HOX, proteine ale căror situsuri se regăsesc frecvent la nivelul promotorilor genelor. Existența situsului HOX/PBX, care permite legarea unei proteine din categoria HOX cu o alta din categoria PBX, crește specificitatea legării celor două proteine la secvența corespunzătoare din promotorul **SOD3**. Așa cum se poate observa se formează două situsuri corespunzătoare factorilor de transcripție din categoria proteinelor cu homeodomeniu HOX, proteine ale căror situsuri se regăsesc frecvent la nivelul promotorilor genelor. Existența situsului HOX/PBX, care permite legarea unei proteine din categoria HOX cu o alta din categoria PBX, crește specificitatea legării celor două proteine la secvența corespunzătoare din promotorul **SOD3**.

Prezența alelei rare A (rs3471066) induce mai multe modificări într-o regiune unde sunt prezente mai multe situsuri de legare pentru factorii din categoria Kruppel-like și ETS. Astfel, situsul nou format HOX/PBX se suprapune peste un nou situs GKLf creat la 5 baze diferență față de vechiul GKLf situs deja existent. Aceste situsuri s-au format în regiunea unde exista un situs pentru GABP care jonctiona cu situsul de legare a GKLf, ambele fiind generate de existența alelei comune G al polimorfismului în discuție. Distrugerea situsurilor ETS care au un potențial rol activator poate avea influențe asupra expresiei **SOD3** în anumite tipuri de celule. Concluzia este că este posibil ca polimorfismele rs17885921 G/A, rs17885306 G/A,

rs34841282 C/T și rs3471066G/A să fie funcționale, factorii de transcripție respectivi fiind implicați în reglarea transcripției.

Tabel 42. Influența variantelor alelice descrise în literatură la nivelul promotorului *SOD3* uman asupra situsurilor de legare a factorilor de transcripție (litere mari roșii secvența centrală conservată, litere albastre baze neconservate, litere mici negre nu fac parte din secvența centrală)

SNP	Alela polimorfică	Factorul de transcripție	Secvența de recunoaștere (5`-3`)	Situsul predictiv de legare a FT în <i>EC-SOD</i>	Poziția situsului în secvență
rs17885921 G/A	-452A	p53	GGACATGCC [295]	CATGT	-452-449
rs17885306 G/A	-431A	FREAC.2	AACGTAAACAA [296]	ccTTAAACAaa	-437-431
rs34841282 C/T	-310T	DBP	RTTAYGTAAA [297]	ccttaTTATGaatcttt	-312-308
	-310T	HOX1.3	CYNNATTAKY [298]	ttCAATAAaa	-312-307
	-310C	COMP1	TGATTGACRACAA [299]	gaaGATTCACaa	-316-310
	-310 C	SOX5	AACAAT [300]	attcACAATAag	-311-307
rs3471066 G/A	-143A	HOX/PBX	RTGATTTATKACTTT [301]	gtaGGATggaagg	-144-142
	-143G	EKLF	CCACACCCCT [302]	ggtAGGGTgg	-146-142
	-143G	GABP	NGMGAAGG [287]	ggGTGGAAGGg	-143-136

R = A sau G, K = G sau T, Y = C sau T, S = C sau G, N = A, C, G sau T, M = A sau C și W = A sau T

5. Identificarea insulelor CpG din promotorii genelor *EC-SOD* de la om, șoarece și șobolan

Insulele CpG sunt grupuri de dinucleotide CpG care se găsesc într-o ordine aleatoare în secvența ADN corespunzătoare promotorilor genelor. Restul de citozină poate fi metilat la carbonul 5` prin intervenția ADN metiltransferazei. La nivelul promotorilor se exercită un reglaj fin, aceștia conținând resturi de citozină nemetilată pentru a permite realizarea transcripției. În anumite situații (de exemplu în cancer) hipermetilarea promotorului poate duce la abrogarea genei respective. Nu este cunoscut deocamdată nimic despre reglarea fină a expresiei *SOD3* prin procesele de metilare/demetilare de aceea este interesant de identificat poziția anumitor insule CpG pentru a investiga teoria reglării prin metilare-demetilare a genei *SOD3*. Identificarea posibilelor regiuni bogate în CG s-a realizat folosind programul EMBOSS-CpG de la EMBL-EBI [266] folosind criteriile de selecție standard : 100 de ferestre, raportul obs./expected = 0.6 și >50% GC cu mărirea insulei CpG mai mare de 50. Regiunea analizată de 2000 bp din promotorii celor trei gene *SOD3* nu este bogată în GC, dar s-au identificat câteva insule CpG la nivelul celor trei promotori care variază atât ca mărime precum și în ceea ce privește conținutul de GC (vezi anexa 6.3.4.). La promotorul *SOD3* uman s-au identificat patru insule CpG din care insulele 3 și 4 au un conținut mai ridicat de 50% CG (obs/exp>0.8) și pot avea un rol reglator important în reglarea transcripției *SOD3* (tabelul 43) și care se regăsesc ca și poziție în cadrul insulelor 4 și 5 de la șoarece deși acestea au mărime diferită decât cele de la om.

Distribuția insulelor CpG în cadrul promotorului la șobolan diferă atât față de șoarece cât și față de om. Dar, ca și poziție nucleotidică, se poate regăsi o parte din insula 4 de la om în cadrul insulei 5 de la șoarece și 7 de la șobolan (fragmentul

Tabel 43 Insulele CpG în promotorul SOD3 uman

Nr. crt	Numărul de perechi de baze	Poziția în promotor	Conținutul % CG	Raportul Obs./Exp.
1	208	De la -1046 la -839	47.12 %	1.55
2	58	De la -733 la -676	43.10%	1.28
3	95	De la -605 la -511	54.04%	0.86
4	161	De la -279 la -119	51.58%	1.07

Tabel 44 Insulele CpG în promotorul SOD3 la șoarece

Nr. crt	Numărul de perechi de baze	Poziția în promotor	Conținutul % CG	Raportul Obs/Exp
1	134	De la -1749 la -1616	51.49 %	0.92
2	497	De la -1484 la -988	53.32%	0.96
3	227	De la -985 la -789	51.1%	1.01
4	208	De la -558 la -351	50.48%	1.06
5	147	De la -284 la -138	53.06%	0.88

Tabel 45 Insulele CpG în promotorul SOD3 la șobolan

Nr. crt	Numărul de perechi de baze	Poziția în promotor	Conținutul % CG	Raportul Obs/Exp
1	245	De la -1950 la -1706	53.47%	1.32
2	126	De la -1606 la -1491	53.17%	0.79
3	152	De la -1429 la -1278	52.63%	0.89
4	184	De la -1210 la -1027	47.28%	0.88
5	193	De la -859 la -667	48.7%	1.05
6	136	De la -568 la -197	54.41%	0.95
7	171	De la -367 la -197	49.12%	1.07
8	112	De la -169 la -58	58.92%	0.96

cuprins între pozițiile -279 și -197), o parte din insula 2 de la om se regăsește în cadrul insulei 5 de la șobolan și o parte din insula 3 de la om se regăsește atât la nivelul insulei 4 de la șoarece cât și la nivelul insulei 6 de la șobolan (fragmentul cuprins între pozițiile -558 și -511). Se poate spune că insulele 3 și 4 din cadrul promotorului **SOD3** uman au un potențial reglator în sensul că lalterarea acestor secvențe sau procesele de metilare/demetilare pot duce la modificarea expresiei genei SOD3.

6.Compararea secvențelor ARNm corespunzătoare *SOD3* uman, murin (șoarece) și cel provenind de la șobolan

Secvențele de referință corespunzătoare celor 3 gene *SOD3* (homo sapiens, mus musculus și rattus norvegicus) au fost selectate din baza de date NCBI Entrez având numerele de acces NM_003102.1, NM_0011435.3 și respectiv NM_012880. Pentru a compara cele trei secvențe ARNm s-au folosit de asemenea programele PipMaker și Clustal W de la EMBL-EBI. Secvențele analizate au 1984 bp, 2045 bp respectiv 1729 bp. Rezultatele analizei PipMaker au demonstrat o homologie mai mică a mRNA-ului genei umane cu secvența murină (41,73%) și cu cea provenind de la șobolan (39.6 %) așa cum se poate urmări în diagramele PIP prezentate în anexa 6.3.5 și o homologie de peste 75% între secvențele corespunzătoare pentru șoarece și șobolan (80%).

Scorurile de similaritate obținute s-au confirmat folosind și programul Clustal W (scorul de similaritate om-șoarece este de 35%, scorul de similaritate la comparația om-șobolan este de 34%, în timp ce compararea secvențelor șoarece-șobolan este de 82%). Alinierea secvențelor mRNA provenind de la cele trei specii este prezentată în anexa 6.3.5. Alinierea secvențelor ARNm de la cele trei specii analizate arată conservarea codonului de start al translației proteinei EC-SOD pentru toate speciile de-a lungul evoluției.

II.5.1.3.CONCLUZII

EC-SOD face parte din apărarea antioxidantă a organismului acționând în spațiul extracelular în sensul transformării anionilor superoxid acumulați aici din diferite surse. Există în literatură numeroase studii care au investigat implicarea enzimei respective în patologia bolilor cardiovasculare și diabet. Concluziile acestor studii au relevat faptul că EC-SOD este responsabilă de progresul ambelor condiții patologice [254], constituind în acest fel o genă candidat care face parte din mecanismele ce sprijină ipoteza solului comun pentru bolile cardiovasculare, sindromul metabolic și diabet. EC-SOD are nivel ridicat de expresie în peretele vascular unde, prin menținerea anionului superoxid la nivel scăzut, este responsabilă de biodisponibilitatea NO ca și factor de relaxare vasculară implicat în reglarea presiunii sanguine. EC-SOD este implicată de asemenea în protecția împotriva oxidării LDL care este un mecanism major care contribuie la inițierea și progresul formării plăcii de aterom. **Polimorfismul Arg213Gly** este cel mai studiat dintre polimorfismele EC-SOD, deoarece varianta Gly213 este asociată cu nivele ridicate de EC-SOD în ser care sunt urmate de scăderea protecției antioxidante în peretele arterial [168]. Acest polimorfism modifică domeniul de legare a enzimei la heparină scăzând afinitatea enzimei pentru heparină și alți liganzi omologi. În populația analizată în cadrul acestui studiu, nu s-au identificat homozigoți mutanți pentru Arg213Gly, iar frecvența acestui polimorfism (1.7%) este mică în comparație cu cele descrise în literatură pentru alte populații [254,283]. În cadrul subiecților cu aterom semnificativ, frecvența heterozigoților cu genotip CG este puțin mai ridicată decât la cei fără aterom semnificativ (2.1% vs. 0.9%). Numărul de cazuri fiind mic nu se pot trage concluzii referitoare la asocierea acestui polimorfism cu existența plăcii de aterom la nivelul populației analizate.

La nivelul secvenței codante a EC-SOD s-a evidențiat **polimorfismul Thr40Ala** care are o frecvență relativ ridicată în vederea studierii unei asocieri a acestuia cu prezența aterosclerozei sau a altor factori de risc cardiovascular. Acest polimorfism a fost identificat folosind metoda RFLP ca și în cazul precedent, fiind validat prin

secvențializarea ADN. Deși nu s-a stabilit nici o asociere semnificativă din punct de vedere statistic între genotipurile caracteristice acestui polimorfism și existența plăcii de aterom, s-a găsit o asociere a alelei Thr40 cu diabetul (diabetici: [AA]= 58.5%; [AG+GG] = 41.5% versus nondiabetici: [AA]= 42.3%; [AG+GG] =57.7%; p=0.03) și hipertensiunea arterială (hipertensivi: [AA]= 50%; [AG+GG] =50% versus normotensivi:[AA]= 37.5%; [AG+GG] =62.5% p=0.04), fapt care confirmă rezultatele unui studiu recent [284] care a raportat asocierea alelei Thr40 cu rezistența la insulină și cu diabetul de tip 2. În studiul nostru [254,283], alela A (Thr40) este alela comună (AA: 45.2%, AG: 39.1% și GG: 15.6%), în timp ce în populația japoneză din studiul amintit, alela Ala40 este alela cea mai frecventă. Realizând analiza statistică diferențiat în funcție de sex, s-a observat că la femei există distribuție diferită a celor două alele Thr40 și Ala40 în grupul femeilor cu aterom semnificativ vs. control (aterom semnificativ: [AA] =24(63.2%); [AG+GG] =14(36.8 %) versus controlii: [AA]= 42 (39.6%); [AG+GG] =64 (60.4%) p=0.012), cu hipertensiune vs. normotensive (hipertensivi: [AA]= 46 (54.1%); [AG+GG] =39 (45.9%) versus normotensivi: [AA]= 20 (33.9%); [AG+GG] =39 (66.1%) p=0.017), cu diabet zaharat de tip 2 vs. non-diabetice (diabet: [AA]= 16(72.6%); [AG+GG] = 6 (27.3%) versus nondiabet: [AA]= 50(41%); [AG+GG]=72 (59%); p=0.006)

Rezultatele acestui studiu sugerează o asociere a alelei Thr40 (genotip AA) cu o disfuncționalitate a EC-SOD. Deocamdată nu se poate spune dacă acest polimorfism este funcțional afectând activitatea enzimatică sau expresia proteinei. O altă ipoteză privind funcționalitatea acestui polimorfism este că acesta ar putea fi în dezechilibru de linkaj cu un alt polimorfism funcțional. Deoarece polimorfismul Arg213Gly este puțin frecvent la subiecții cu diabet sau hipertensiune arterială (ca de altfel în întreg lotul de studiu) este puțin probabil ca polimorfismul Thr40Ala să fie în dezechilibru de linkaj cu acest polimorfism.

La nivelul promotorului EC-SOD, analiza funcțională a secvenței ADN s-a efectuat *in vitro*. Analiza computațională efectuată pe cele 2000 bp a evidențiat existența unor situsuri de legare a factorilor de transcripție identificate și în alte studii referitoare la analiza *in silico* a genei EC-SOD: AP-4 (adaptor complex-4) care este implicată în recunoașterea și selectarea proteinelor cărăuș din aparatul Golgi în sistemul endozomal-lizozomal, ARE (antioxidant response elements), caseta CAAT [153], factori de transcripție din familia Kruppel-like BKLf, EKLF, KKLf precum și ETS: Ets-1a, PEA3, Elk-1, GABPa, Spi-B și Spi-1/PU.1 [265]. În plus, în acest studiu s-au identificat situsuri de recunoaștere pentru factorii de transcripție din familia STAT (signal transducers): STAT1 și STAT 5 care răspund la semnalul dat de citokine și factori de creștere (IL-2, IL-4 și IL-6, CSF, EGF, PDGF) [171]. S-au identificat de asemenea situsuri corespunzătoare FT implicate în ciclul celular: p53, GATA-1, GATA-3, Egr-1, Oct-1, cMyb, EVI 1 și NF-κβ, E2F. Situsurile corespunzătoare FT implicate în hematopoieză au fost poziționate și ele în regiunea de flancare 5' a genei EC-SOD (FT implicate în dezvoltarea celulelor T precum ZBF 89, NF-κβ, NFAT, IRF-4, IKAROS, în dezvoltarea celulelor B precum Pu.1, BRIGHT, IRF-4, BLIMP sau în diferențierea mieloidică: BLIMP și Pax5). Situsuri pentru factorul de transcripție Nkx2.5 au fost identificate la nivelul celor 2000 bp alături de situsuri pentru MSX2 și N-Myc acești factori fiind implicați în procesul de dezvoltare a inimii. O serie de factori de transcripție din categoria factorilor din grupul de mare mobilitate (HMG family) cum sunt factorii arhitecturali (HMGA), Sox5, Sox9, HBP1, Nkx2.5, subunitatea S8, BARX2, NANOG au fost de asemenea identificați cu un scor de similaritate al regiunii centrale $\geq 0,9$. Această categorie de factori de transcripție sunt implicați în expresia genică diferențiată pe tip de țesut fiind factori cheie ai

diferențierii tisulare în hematopoieză. Din categoria factorilor de transcripție din familia C/EBP cu rol în procesele de dezvoltare celulară și proliferare au fost identificate mai multe situsuri de legare ale acestor factori cu un scor variabil de similaritate cu secvența centrală sau cu matricea de referință. În această categorie am inclus și proteina CHOP (GAAD153) care este homologul proteinelor C/EBP (C/EBP zetta) care poate induce oprirea creșterii și apoptoza celulelor ca răspuns la stresul celular sau ca răspuns la degradarea ADN. Din categoria complexelor SWI/SNF de remodelare a cromatinei ATP dependente care utilizează energia furnizată de hidroliza ATP pentru a modifica structura cromatinei din jurul genelor ce trebuie transcrise și de a crește în acest fel accesibilitatea ADN-ului nucleozomal pentru legarea componentelor necesare transcripției, s-au identificat mai multe situsuri corespunzătoare SMARCA3. S-au identificat situsuri corespunzătoare factorilor de transcripție nucleari hepatocitari HNF1, 4 și 6 și câte un situs caracteristic pentru Sp-1 și respectiv caseta GC în întreaga regiune de 2000 bp analizată.

În urma selecției efectuate prin identificarea regiunilor omoloage la om, soarece și șobolan cuprinse în secvențele ADN corespunzătoare celor trei promotori **SOD3** precum și identificarea motivelor structurale conservate, s-a selecționat un număr restrâns de factori de transcripție care ar putea influența transcripția **SOD3** (vezi fig.67). În regiunea cuprinsă între -2000 bp și -1500 bp, așa cum reiese din analiza ClustalW și Foot Printer, nu se pot alinia secvențele ADN de la cele trei specii ceea ce denotă că nu există regiuni omoloage la nivelul secvențelor ADN analizate și nici măcar module structurale conservate. Și la nivelul celorlalte fragmente analizate gradul de omologie este foarte mic dar s-au identificat câteva motive comune celor trei specii. Dintre situsurile pentru factorii de transcripție identificați la nivelul fragmentelor de 1500 bp aliniat cu ajutorul programului Clustal W, situsurile pentru SMARCA3, c-Myb, GABP (NRF2) au cea mai mare probabilitate de a se lega in vivo la secvența ADN deoarece nu există nici o diferență între secvența specifică existentă la nivelul ADN-ului tuturor celor trei specii analizate și secvența de recunoaștere descrisă în literatură pentru acești factori de transcripție.

Situsul SMARCA3, poziționat la nivelul secvenței umane *între nucleotidele -1113 și -1093*, corepunde perfect secvenței de recunoaștere descrisă în literatură pentru acest situs (5' - MCWTDK-3', [264]) și situsul rămâne nemodificat și pentru celelalte două specii. Proteinele SMARCA3 sau proteina din subfamilia A a proteinelor SWI/SNF asociate matrixului dependente de actină și reglatoare ale cromatinei (SWI/SNF-related matrix associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 3) fac parte din familia SWI/SNF de remodelare a cromatinei și se întâlnesc descrise sub mai multe denumiri: reglatorul regiunii proximale a promotorului HIV, reglator al SV40 enhancer, reglator al promotorului PAI-1, reglator al promotorului uteroglobinei la iepuri (RUSH) și HRLF (helicase-like transcription factor). Dacă la cei mai mulți membri ai familiei SWI/SNF le lipsește domeniul de legare ADN acționând prin intermediul elementelor transactivatoare, HRLF conține un domeniu de legare ADN de tip inelar (RING-finger) dar și domeniu caracteristic helicazelor [285]. Câteva gene din familia SWI/SNF sunt inactivate prin hipermetilare în cancer, sugerând un rol de supresori tumorali. În ceea ce privește HRLF, rezultatele în ceea ce privește modul de reglare a transcripției genelor în cancer sunt contradictorii. Motivul structural de tip RING-finger este similar cu domeniul RING al proteinei BRCA1 care este cunoscut ca supresor tumoral, dar nu s-a determinat experimental existența hipermetilării SMARCA3 în cancer. Pe de altă parte există studii care arată că celulele canceroase au un nivel de expresie al acestei proteine de aproximativ 20 de ori mai ridicat

comparativ cu celulele normale și este un marker timpuriu al tumorilor induse de estrogeni [285]. Aceste proteine nucleare sunt exprimate la nivel tisular în: creier, inimă, rinichi, ficat, plămâni, pancreas, placenta și mușchiul scheletic, activarea transcripției acestei proteine este mediată de progesteron și procesarea posttranslațională este favorizată de acțiunea steroizilor [285]. Ținând cont de exprimarea tisulară a proteinelor SMARCA3 și aceea a EC-SOD este posibil ca factorul de transcripție SMARCA3 să regleze expresia EC-SOD.

Situsul c-Myb identificat în regiunea **-783-771** a promotorului uman corespunde secvenței de recunoaștere descrisă de Howe și colab. 5`-YAACKG-3`, [273], ca și situsurile identificate la nivelul celorlalte două secvențe. Protooncogenul c-Myb reglează proliferarea celulelor mușchiului neted vascular și hematopoieza. c-Myb este implicată în reglarea expresiei unor gene ale unor proteine implicate în desfășurarea ciclului celular. La nivel vascular, în ateroscleroză, c-Myb joacă un rol esențial în apărarea antiaterosclerotică, contribuind la supraviețuirea celulelor mușchiului neted vascular la nivelul căii de semnalizare PDGF (factorul de creștere plachetar). Semnalizarea PDGF stimulează expresia c-Myb la nivelul arterelor, iar inhibarea funcției c-Myb duce la apoptoza celulelor VSMC tratate cu PDGF [286]. Factorul de transcripție c-Myb poate contribui la reglarea expresiei EC-SOD în celulele VSMC.

Situsul NRF2 (factorul nuclear respirator 2 cunoscut ca proteina de legare a GA- GABP-) este un factor din familia de proteine protooncogene Ets care se leagă la secvența de recunoaștere (5`-NGMGGAGTG-3`, [287]) similară cu secvența PEA3 (5`-AGGAAG-3` [279]) din aceeași familie. Proteina de legare la dinucleotidele GA (GABP) este activator al expresiei citocrom oxidazei c (COX) și a factorului de transcripție mitocondrial. COX nu are caseta TATA necesară pentru inițierea transcripției celor mai multe gene [279]. La nivelul acesteia inițierea transcripției se face și prin intermediul motivelor PEA3 de care se leagă NRF2. NRF2 poate fi reglată redox, demonstrându-se că în linia de adipocite 3T3-L1 expresia acestui factor de transcripție este inhibată de stresul oxidativ, din cauza faptului că GABP nu se mai poate lega de situsurile de recunoaștere [279]. În sistemul vascular, se cunosc puține lucruri despre genele țintă ale acestui factor de transcripție. Promotorul *SOD3* uman nu conține o casetă TATA box funcțională. Este posibil ca inițierea transcripției să se facă prin asemenea elemente din categoria PEA3/ ETS ca și în cazul COX, mai ales că fragmentul din regiunea proximală a promotorului conține câteva elemente din categoria Ets printre care și PEA3. La nivelul secvenței umane există mai multe situsuri unde se poate lega GABP. Situsul poziționat între **-584 și -591** la nivelul secvenței umane corespunde secvenței PEA3 descrisă în literatură, dar nu este conservat integral la celelalte două specii. În schimb, în regiunea cuprinsă între **-153-160**, la nivelul secvenței umane, mai există un situs bipartit unde se mai poate lega ELK-1 (secvența de recunoaștere 5`-mMMGGAWry-3`, [288]) din aceeași familie de protooncogene Ets care este conservat și la celelalte specii fiind conform cu secvențele de recunoaștere. Acest lucru sugerează că există posibilitatea reglării expresiei *SOD3* prin intermediul proteinei GABP, dar și prin intermediul ELK-1. Proteina ELK-1 este ținta fosforilării în trei căi diferite de semnalizare mediate de kinaze activate de mitogeni (MAPK): ERK1/2, p38, JNK. În contextul în care are loc interacțiunea dintre semnalul dat de speciile reactive ale oxigenului și acțiunea semnal a acestor protein kinaze care acționează prin fosforilare/defosforilare, este posibilă interacțiunea ELK-1 cu secvența ADN corespunzătoare din promotorul *SOD3*.

În afară de aceste situsuri cu probabilitate mare de a fi funcționale, există situsuri care la secvența umană corespund într-un total secvenței de recunoaștere descrisă în

literatură, dar diferă la nivelul uneia sau mai multor nucleotide la nivelul celorlalte secvențe analizate. În această situație se află situsurile pentru SREB, STAT-5, caseta GC și Ets-1.

Situsul SREB (Proteina de legare a elementului reglat de sterol) a fost identificat în regiunea cuprinsă între nucleotidele **-1275 și -1286** la nivelul secvenței umane. Proteina de legare a elementului reglat de sterol sau SREB este un factor de transcripție implicat în biosinteza colesterolului, a acizilor grași și fosfolipidelor și în adipogeneză. Una dintre țintele SREB este receptorul receptorului LDL. Speciile reactive ale oxigenului pot oxida fosfolipide și steroli, aceste fosfolipide oxidate fiind mediatori ai procesului inflamator. SREB este activată în procesul inflamator asociat proceselor aterosclerotice, expresia ei fiind ridicată în nucleul celulelor endoteliale la nivelul arterelor aterosclerotice [289]. SREB este unul dintre potențialii reglatori ai expresiei EC-SOD.

Situsurile STAT-5 (Factorul de activare a transcripției și de transducere a semnalului) la nivelul secvenței umane au fost identificate două situsuri: între nucleotidele -1042-1032 primul situs și respectiv între nucleotidele **-622 și -613** al doilea situs. Aceste situsuri sunt conforme cu secvența descrisă în literatură pentru STAT5 (5'-TTNYNNAA-3', [270]). Proteinele din familia STAT sunt activate de citokine și factori de creștere (IL-2, IL-3, hormonul de creștere, factorul de creștere plachetară). Proteinele STAT se găsesc în citoplasmă, dar în urma activării mediate de kinaze din familia Jak ele sunt translocate în nucleu pentru a activa transcripția genelor țintă. Printre țintele STAT 5 enumerăm β -caseina, insulina, IRF-1, cotransportorul acizilor biliari, ciclina D1. STAT5 activează transcripția unor gene prin cooperarea cu alți factori de transcripție sau coactivatori. Spre exemplu STAT5 poate coopera cu receptorul pentru glucocorticoizi, cu C/EBP β [290], cu SP1 [291] pentru activarea transcripției unor gene. Este posibil ca reglarea expresiei *SOD3* să se desfășoare prin legarea oricăroră dintre cei trei factori după cum este prezentat în fig.68.

Caseta GC identificată la nivelul secvenței umane între pozițiile nucleotidice **-282 și -275** este conformă cu secvența de recunoaștere descrisă în literatură (5'-GGGNGGG-3', [269]). Această secvență este succedată de un alt situs corespunzător casetei GC dar care diferă printr-o nucleotidă de secvența de recunoaștere. De regulă, în secvențele promotorilor se află situsuri multiple pentru caseta GC care acționează concertat pentru activarea acestor gene prin legarea Sp-1 (stimulatory factor-1) care face parte tot din familia Kruppel-like. Se pare că în acest caz, pentru al doilea situs de tip casetă GC există o competiție între factorii din familia Kruppel-like în legarea acestui situs deoarece el se suprapune peste două situsuri corespunzătoare GKLf (factorul intestinal Kruppel-like) și KKLf (factorul renal Kruppel-like) care sunt numai parțiale cu secvențele de recunoaștere (5'-RRGGYGY-3', [280] și respectiv 5'-GGGNGGNG-3' [291]). Aceștia doi funcționează de regulă ca represori ai transcripției genelor țintă.

Situsul Ets-1 corespunde secvenței de recunoaștere (5'-SMGGWGY-3', [281]) dar diferă de secvența descrisă în 2007 de Dwyer [293] la nivelul unei baze. Această proteină din familia ETS cuprinde o gamă variată de proteine printre care Ets-1a, Ets-2, PEA3, Elf-1, Elk-1 și 2, GABP α , Spi-B și Spi-1/PU.1 implicate în reglarea expresiei unui număr mare de gene atât celulare cât și virale [294], fie ca activatori fie ca represori ai transcripției [281]. Ets-1, sinonim cu p54, este implicată în devoltarea celulelor stem, în senescența și moartea celulară. De asemenea s-a demonstrat implicarea acestei proteine în tumorigeneză și angiogeneză. Reglarea expresiei proteinei se face prin diferiți factori angiogenici ca și de diferiți factori de

stres și există posibilitatea legării Ets-1 la EC-SOD in vivo pentru reglarea expresiei genei EC-SOD.

Analiza funcțională a promotorului genei *SOD3* murine, realizată de Folz și Zelko [281] a arătat că factorii de transcripție din familia Ets au afinitate mai mică pentru situsurile corespunzătoare din secvența promoterului *SOD3* comparativ cu MZF-1 și Kruppel-like. Membrii familiei Ets (Elf-1 și factorul GA binding) acționează ca activatori în timp ce GKLf și MZF-1 sunt represori ai expresiei genei *SOD3* murine [281], dar depinde de nivelul expresiei acestor factori de transcripție la nivel celular cum va fi modulată expresia EC-SOD.

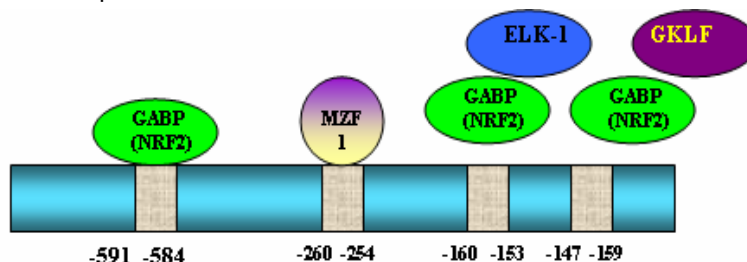


Fig. 65. Posibilitatea de reglare a EC-SOD prin intermediul factorilor de transcripție din familia Ets și Kruppel

Au fost identificate de asemenea câteva elemente cu potențial reglator ale căror situsuri sunt conservate la toate cele trei specii, dar diferă puțin față de de secvențele descrise în literatură: SF1, C/EBP, CHOP/CEBP α , CCAAT, MZF, GABP/GKLf.

Situsul SF1 (steroidogenic factor 1) este factor din categoria celor cu motiv structural deget de zinc cu rol important în procese implicate în dezvoltarea pe axa hipotalamus-hipofiză-gonade, reglează expresia unor gene implicate în steroidogeneză și axa reproductivă. Acest situs a fost identificat la secvența umană între nucleotidele **-1005 și -1013**. Ținând cont de faptul că, la nivelul secvenței promotorului *SOD3* analizat, s-au identificat mai multe situsuri pentru YY1 (Yin și Yang) și SOX5 specifice aparatului reproducător, este posibil ca la nivelul acestui sistem, expresia *SOD3* să fie reglată printr-o cooperare între acești trei factori, mai ales că s-au identificat alte două situsuri mai slabe pentru YY1: unul care se suprapune peste situsul CHOP, iar altul peste situsul SOX5 aflat între -311 și -307.

Situsul MZF (factorul mieloidic de tip deget de zinc) identificat la secvența umană între **-260 și -254** care se manifestă ca un represor a fost identificat și la celelalte două secvențe. Analiza funcțională a promotorului genei *SOD3* murine, realizată de Folz și Zelko [281] a arătat că MZF este funcțional și acționează ca represor al *SOD3* murine. La om secvența diferă prin două baze față de secvența descrisă în literatură (5`-GAGGGGAA-[282]) și este un situs mai slab, dar care poate fi totuși funcțional într-un anumit context celular.

Situsul GABP/GKLf este un situs dual format dintr-un situs de legare a GABP (NRF2) aflat la nivelul secvenței umane între **-147 și -139** care se suprapune peste un situs GKLf aflat între pozițiile -147 și -140. Acest situs dual se menține și la celelalte două specii, ceea ce sugerează o posibilă implicare lor în reglarea expresiei EC-SOD, cu atât mai mult cu cât acest situs se află în apropierea altor situsuri ETS și Kruppel-like (KLF).

Situsul C/EBP care se suprapune peste un situs c-Myb (între **-785 și -777**) este un situs slab (5`-RTTGCGYAAY-3` [274]), dar la șoarece și șobolan, situsul este

mult mii slab. Deși potențialul de legare a acestui situs este slab, totuși este posibil ca aceștia să fie implicați în reglarea expresiei *SOD3*.

Situsul CHOP/CEBP α poziționat la secvența umană între -764 și -754 este specific pentru legarea heterodimerilor CHOP/CEBP α . Proteina CHOP (GAAD153) care este homologul proteinelor C/EBP (C/EBP zetta) care poate induce oprirea creșterii și apoptoza celulelor ca răspuns la stresul celular sau ca răspuns la lezarea ADN. De regulă proteina se leagă ca heterodimer cu diferiți membrii ai C/EBP și acționează ca represor al expresiei genelor. Faptul că la toate cele trei secvențe analizate, secvențele CHOP se găsesc în vecinătatea secvenței corespunzătoare casetei CCAAT (5`-CCAAT-3` [274]) cresc șansele pentru legarea acestor heterodimeri la secvența umană, chiar dacă la șoarece și șobolan probabilitatea de legare este mică deoarece situsurile identificate nu sunt decât parțial conforme cu secvența de recunoaștere.

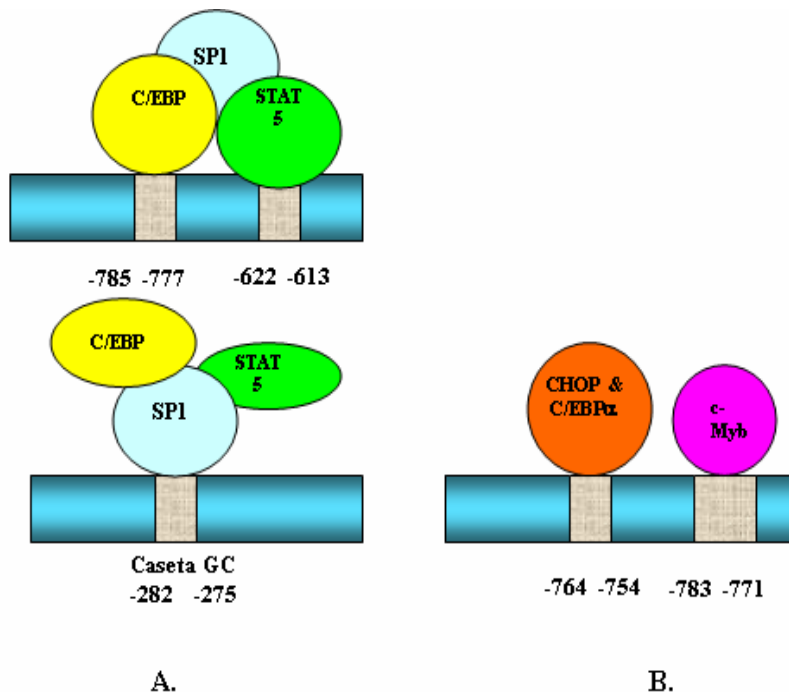


Fig.66. Posibilitatea de reglare a EC-SOD prin intermediul factorilor de transcripție SP1, STAT5, C/EBP și c-Myb

Analiza polimorfismelor din baza de date NCBI GeneBank

Analiza polimorfismelor existente în literatură în baza de date NCBI GeneBank și analiza secvențelor la cele trei specii a arătat că existența polimorfismului **rs3471066 G/A** în poziția **-143** care se află într-o regiune cu potențial reglator ridicat modifică situsurile corespunzătoare anumitor factori de transcripție. Prezența alelei rare A induce un situs de legare a heterodimerilor HOX/PBX (frecvent întâlnit în cadrul mai multor promotori) care se suprapune peste un nou situs EKLf creat la 5 baze diferență față de vechiul GKLf situs deja existent. Existența situsului HOX / PBX1 ce permite legarea simultană a factorului PBX1 (pre-B cell leukemia factor 1) și a proteinei HOX1 care reglează morfogeneza și diferențierea celulară sporește

probabilitatea de legare a ambelor proteine în discuție și poate avea un rol în reglarea expresiei genei *SOD3*. Aceste situsuri nou create s-au format în regiunea unde există un situs pentru GABP care jonctionează cu situsul de legare a GKLf, ambele fiind generate de existența alelei comune G al polimorfismului în discuție. Distrugerea situsului GABP care are un potențial rol activator, poate avea influențe asupra expresiei *SOD3*. În baza de date, la nivelul fragmentului analizat din cadrul promotorului *SOD3* există și alte polimorfisme precum : rs17885921 G/A, rs17885306 G/A, rs34841282 C/T ce distrug sau creează anumite situsuri de legare a FT care au probabilitatea de a fi funcționale în contextul biologic specific. Alela rară A corespunzătoare polimorfismului **rs17885921 G/A** creează un situs slab de recunoaștere și legare a proteinei p53 care este implicată în controlul ciclului celular. Proteina este cunoscută ca un supresor tumoral deoarece activează gene care inhibă proliferarea celulară. Proteina are un nivel redus de expresie în celulele normale iar în celulele canceroase are un nivel ridicat al expresiei genice. În cancer apar numeroase mutații la nivelul secvenței ADN corespunzătoare care duc la incapacitatea acestora de legare la situsurile corespunzătoare spre a-și exercita rolul de supresor tumoral. Existența alelei rare A corespunzătoare polimorfismului **rs17885306 G/A** creează un situs pentru legarea unei proteine din categoria Forkhead - FREAC2 - care activează transcripțional gene exprimate la nivelul plămânului. Polimorfismul **rs34841282 C/T** prin existența alelei comune C sau alelei rare T creează mai multe situsuri caracteristice anumitor factori de transcripție. Alela rară T creează situsuri posibile pentru DBP (proteina de legare a albuminei) și HOX1.3. Prin crearea acestor situsuri se distrug situsuri pentru COMP1 și pentru SOX5. Acest situs COMP1 se suprapune peste unul corespunzător SOX5 care corespunde întocmai secvenței de recunoaștere descrisă în literatură. SOX5 este un factor de transcripție specific testicular care reglează dezvoltarea embrionară, dar se exprimă și în ficat și nodulii limfatici. Mai multe situsuri SOX5 au fost identificate la nivelul celor 2000 bp din promotorul EC-SOD ceea ce sugerează faptul că SOX5 poate avea rol reglator asupra expresiei EC-SOD în acest tip de celule, în timp ce la nivelul mușchiului scheletic este posibil ca expresia acestora să fie reglată de COMP1.

Identificarea unor noi mutații/polimorfisme la nivelul promotorului EC-SOD

Prin screening-ul efectuat la nivelul a 100 de indivizi cu ateroscleroză semnificativ înrolați în studiul nostru în vederea identificării unor polimorfisme care deja se găsesc în baza de date NCBI GeneBank s-a urmărit evidențierea unor astfel de mutații sau polimorfisme existente la nivelul unui fragment din promotorul *EC-SOD* (cuprins între nucleotidele -467 și +16). Rezultatele analizei DHPLC au arătat că nici una din aceste polimorfisme nu există la lotul de subiecți analizați, iar dacă cumva acestea există frecvența acestora este de sub 1%. Prezența alelei comune G la nivelul situsului polimorfic **rs3471066 G/A** menține un motiv structural conservat la toate cele trei specii, situsul dual GKLf/GABP care are astfel o probabilitate mare de a fi funcțional. Factorii posibil implicați în reglarea expresiei EC-SOD identificați prin analiza computațională sunt prezentați în fig. 67.

Analiza insulelor CpG

Analiza insulelor CpG a indicat existența a 4 insule CpG la om susceptibile la procesul de metilare-demetilare (reprezentate în fig.) dintre care două regiuni se suprapun ca și poziție peste insulele CpG la șoarece și șobolan: între -279 bp și -197

bp respectiv între -558 și -511. Nu se știe deocamdată nimic despre reglarea *EC-SOD* prin acest fel de procese de metilare-demetilare. Identificarea unui situs de legare a proteinei HLTF cu potențial de legare mare în regiunea cuprinsă între nucleotidele -1113 și -1093, care poate desface structura compactă a cromatinei și existența unei insule CpG la secvența umană tocmai în vecinătatea acestei regiuni (-1046 la -839) sugerează posibilitatea reglării expresiei *SOD3* prin aceste procese de metilare-demetilare.

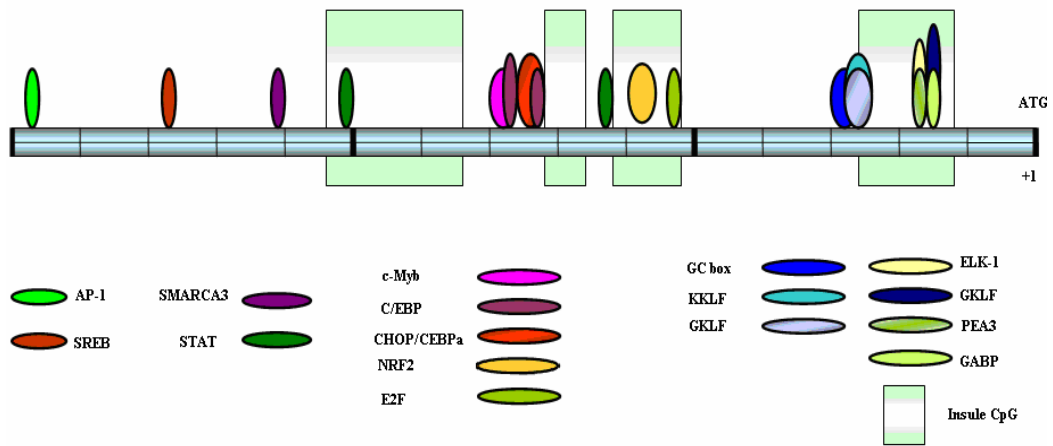


Fig.67. Factorii de transcripție cu probabilitate mai mare de a fi implicați în reglarea expresiei EC-SOD

II.5.2. Investigarea funcționalității unor polimorfisme la nivelul secvenței genice a C/EBP β

În cadrul acestui obiectiv s-a urmărit cercetarea următoarelor aspecte funcționale:

1. Evidențierea unor polimorfisme la nivelul a două fragmente ADN din secvența promotorului genei C/EBP β la 294 de subiecți randomizați în două loturi: subiecți cu ateros semnificativ (obstrucție arterială >50%) și lot control (obstrucție arterială < 50%)
2. Analiza statistică a asocierilor dintre frecvențele alelice ale polimorfismelor identificate cu existența aterosclerozei și a altor factori de risc cardiovascular.
3. Analiza computațională a unui fragment de 3500 bp din secvența ADN a promotorului C/EBP β în vederea identificării unor factori de transcripție cu mare probabilitate de a fi funcționali și în vederea stabilirii modului în care variantele alelice ale secvenței ADN din promotorul C/EBP β pot influența legarea factorilor de transcripție la situsurile corespunzătoare din promotor.
4. Modificarea artificială a secvenței ADN în scopul restabilirii secvenței sălbatice (wild-type)

II.5.2.1. MATERIALE ȘI METODE

II.5.2.1.1. Extracția și cuantificarea ADN-ului genomic

Materialul biologic folosit este sângele venos recoltat de la cei 294 de subiecți prezentați la II.5.1.1.1. Recoltarea s-a făcut după o perioadă de post de 10 ore pe EDTA. ADN-ul genomic a fost extras folosind kit-ul QIAmp DNA Blood Mini kit from QIAGEN al cărui principiu este descris la capitolul II.6.1.3. Pentru cuantificarea ADN s-a folosit nandropul pentru volume mici de ADN și metoda comparării cu markeri ADN de tipul Hiperladder (Bioline) după metodele descrise la capitolul II.5.1.3

II.5.2.1.2. Amplificarea PCR

Amplificarea PCR s-a realizat folosind două perechi de oligonucleotide selectate cu programul Primer3:

Pentru fragmentul cu prins între -3689 și -3296 s-au utilizat oligonucleotidele F: 5' - GGG AGG AGG AAT TGT GAAAA-3' și R: 5' - GTA CGT GAG TGG CTG TGT GG-3', iar pentru fragmentul cuprins între -540 și -292 s-au folosit oligonucleotidele: F: 5' - GGG AGG AGG AGG TGG GAG TTT AC-3' și R: 5' - CTG GAG GCT GTC CTG GAA-3' Condițiile optime utilizate pentru amplificarea celor două fragmente de interes sunt prezentate în tabelul de mai jos :

Tabel 46. Condițiile optime de desfășurare a amplificării PCR a fragmentelor din promotorul C/EBP β

Regiunea	Mărimea produsului PCR (bp)	Temperatura de annealing (°C)	[MgCl] (mM)	DMSO (5%)	Betaină (1 M)
Promoter-1 (-3689...-3296)	395 bp	59	1,5	+	+
Promoter- 2 (-540....-292)	248 bp	59	1,5	+	+

Programul ales pentru amplificare a fost identic pentru ambele fragmente și anume: denaturare inițială la 94°C timp de 4min, 30 sec., urmată de 40 de cicluri de amplificare ce cuprind fiecare 30 sec. de denaturare la 94°C , 1 min. de aliniere primeri la 59°C și 30 sec. de extensie la 72°C. Extensia finală a avut loc timp de 5 min. la 72°C, după care temperatura produșilor de amplificare a fost adusă și menținută la 25°C timp de 5 sec.

Reacția PCR a fost urmată de o separare electroforetică în gel de agaroză 1% a fragmentelor obținute în urma reacției PCR și vizualizarea produșilor prin iluminare UV în condițiile descrise anterior (vezi fig.68)

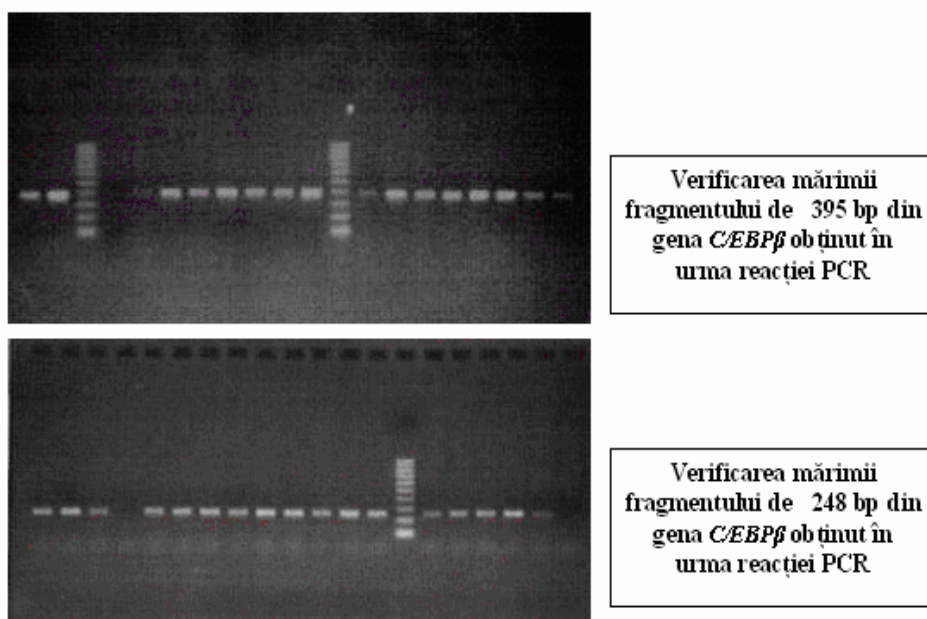


Fig 68. Vizualizarea fragmentelor ADN obținute în urma amplificării PCR

II.5.2.1.3. Investigarea fragmentului din promotorul *C/EBPβ* utilizând metoda detecției polimorfismelor Transgenomic WAVE™ DNA Fragment Analysis bazată pe principiul cromatografiei de lichid de înaltă performanță cu denaturare sau DHPLC

Principiul metodei este descris la capitolul II.5.1.1.5. Urmărindu-se etapele descrise în prezentarea modului de lucru, condițiile alese pentru programul de gradient au fost:

Tabel 47. Condițiile utilizate pentru screeningul fragmentelor analizate folosind metoda Transgenomic Wave System

Regiunea	Gradientul la care are loc screening-ul (% A/B)	Temperatura (°C)
Pr-1 C/EBPB	47-55	68
	53-61	64
Pr-2 CEBPB	53-61	62

II.5.2.1.4. Secvențializarea ADN

Determinarea secvenței nucleotidice a fragmentelor ADN s-a realizat în scopul certificării existenței polimorfismelor identificate folosind metoda Trangenomic WAVE™ DNA Fragment Analysis. Metoda de secvențializare, utilizând o mașină ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems) și un kit v3.0 ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit s-a realizat utilizând protocolul de la capitolul II.5.1.1.7 și primerii prezentați la capitolul II.5.2.1.2. diluați conform protocolului II.5.1.1.4.

II.5.2.1.5. Analiza statistică a rezultatelor

Analiza statistică s-a făcut folosind programul statistic SPSS (Statistics Package for the Social Sciences) versiunea V12.0 (SPSS Inc) pentru a identifica asociațiile dintre polimorfismele evidențiate și existența plăcii de aterom sau corelația cu anumiți factori de risc cardiovasculari folosind metodele de analiză descrise la capitolul II.5.1.1.9.

II.5.2.1.6. Analiza computațională a C/EBPβ

Pentru analiza computațională a 3500 bp din promotorul C/EBPβ au fost utilizate aceleași programe și aceleași etape pentru identificarea factorilor de transcripție ca și pentru EC-SOD.

II.5.2.1.7. Mutageneza dirijată**Designul de oligonucleotide**

Designul de oligonucleotide a urmărit obținerea schimbării de baze -3429 T→C.

Designul primerilor s-a realizat în acord cu indicațiile din ghidul Stratagene (<http://labtools.stratagene.com/QC>):

- primerii mutagenici sunt realizați individual pentru fiecare mutație și conțin în secvența lor baza dorită în insert
- fiecare secvență oligonucleotidică a primerilor cuprinde între 25 și 45 de baze și are un punct de topire (T_m - melting point) mai mare de 78°C
- primerii au un conținut de până la 40% GC și se termină în una sau mai multe baze de tip C sau G
- oligonucleotidele sunt concepute cu baza mutată în mijloc, având de o parte și de alta 10-15 nucleotide care corespund exact secvenței din insert
- primerii au fost 5` fosforilați (Invitrogen) pentru o maximă eficiență a procesului de mutageneză.

Temperatura de topire a primerilor s-a calculat cu formula $T_m = 81.5 + 0.41 (\%GC) - 675/N$ unde N este numărul de baze din secvența primerului, iar %GC reprezintă procentul de grupări CG din secvența acestuia.

Primerii utilizați în reacțiile de mutageneză dirijată pentru obținerea construcțiilor plasmidice ce conțin haplotipurile dorite, precum și câteva detalii referitoare la aceștia sunt trecute în tabelul 48. Primerii selectați au fost verificați pentru verificarea secvențelor omoloage cu insertul ce cuprinde fragmentul de promoter al C/EBPβ sau cu pGL3-bazic vector folosind programul BLAST2Sequences (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html).

Condițiile de desfășurare ale reacției PCR

Datorită faptului că procentul de GC este ridicat s-a folosit în mixul de reacție o concentrație variabilă de DMSO între 2-8%DMSO la un volum final de amestec de reacție de 25 sau 50 μl precum și betaină 1M.

Tabel 48. Secvențele oligonucleotidice necesare pentru reacția de mutagenză dirijată C și G reprezintă nucleotida dorită la nivelul situsului polimorfic pe catena sens și cea complementară

Mutația	Oligonucleotide (5' → 3')	T _m (°C)	GC (%)
-3429 T/C	F GCT ATG GGG TCA AAT TGA ACA CAT CTG TGG TCT CGA TTT GGC R GCC AAA TCG AGA CCA CAG ATG TGT TCA ATT TGA CCC CAT AGC	85	63

Toate reacțiile efectuate s-au desfășurat simultan în volume finale de reacție de 25 și 50 μl; cantitatea de enzimă a fost variată de asemenea de la 1U Pfu Turbo DNA polymerase la 6U pentru a găsi o cantitate optimă pentru reacția de mutagenză. Amestecurile de reacție au avut un conținut între 125 ng-150 ng de oligonucleotide primeri, 1x tampon de reacție, concentrații variabile 50 ng - 560 ng de ADN plasmidial (construct -3641 C/EBPpGL3-bazic) și 0,5 sau 1 μl amestec dNTP în funcție de volumul final al amestecului. Compoziția amestecului de reacție pentru SDM este prezentată în tabelul 49.

Tabel 49. Compoziția amestecului PCR pentru mutagenza dirijată

Reactivi	Volumele de reactivi în reacția control (μl)	Volumele de reactivi în Proba 1(μl)	Concentrația în amestecul final
Tampon PCR 10x	5	5	1x
ADN plasmidial	2	1	137ng (2,74 ng/μl)
Primer 5`	1,25	1,25	2,5ng/μl
Primer 3`	1,25	1,25	2,5ng/μl
amestec dNTP	1	1	250μM
Apă bidistilată sterilă	39,5	33,5	-
Betaină	-	6,25	0,5M
DMSO	-	1,25	2,5%
Pfu	1	1	3u (0,06u/μl)

Programul optim de PCR care a fost folosit este prezentat în tabelul:

Tabel 50. Programul reacției PCR pentru mutagenza dirijată

Etapa	Temperatura	Timp	Numărul de cicluri PCR
Denaturare inițială	98°C	1min	1
Denaturare	98°C	30 sec	30
Aliniere primeri	55°C	1 min	
Extensie	68°C	9 min	
Răcire	4 °C	2 min	1

Digestia cu DpnI și transformarea celulelor competente DH5a

DpnI (Stratogene) este o enzimă de restricție specifică pentru un ADN metilat și semimetilat și va digera numai ADN-ul dublu catenar parental care nu conține mutația de interes, în acest fel rămânând intact ADN-ul nou sintetizat prin reacția de mutagenază.

Reacția enzimatică s-a desfășurat în prezența a 0,5 μl Dpn I (10 U) pentru un volum final de amestec PCR de 25 μl. După o centrifugare scurtă (1min) la viteză maximă (13 000 rpm), amestecul reacției enzimatică s-a incubat timp de 1,5 ore la temperatura de 37 °C.

Celulele competente DH5a au fost menținute în gheață în vederea transformării. Pentru fiecare reacție de mutagenază, 50 μl de celule competente DH5a au fost adăugate în tuburi Falcon răcite în prealabil în gheață și au fost menținute în continuare în gheață timp de 10 min. La suspensia de celule s-a adăugat în fiecare tub Falcon 10 μl de amestec rezultat în urma reacției enzimatică cu DpnI. Pentru a verifica eficiența transformării celulelor competente s-a utilizat 1 μl (0,01 ng/ μl) control plasmidic pUC18 adăugat la 50 μl suspensie de celule competente. Amestecul de transformare a fost incubat 30 min în gheață după care a fost supus unui șoc termic timp de 20 sec. la 42 °C urmat de incubare în gheață pentru 2 min. La amestecul de transformare din fiecare tub Falcon s-a adăugat 450 μl de mediu LB. Amestecul rezultat a fost supus incubării la 37 °C timp de 1h1/2 și agitării la 225 rpm în incubatorul cu agitare pentru culturi celulare. După incubare, 200 μl din fiecare suspensie de celule a fost distribuită pe o placă Petri preîncălzită (37 °C) cu agar care conține ampicilină 0,2 mg/ml, excepție făcând controlul pUC18 din care 100 μl a fost inoculat în mediul de agar cu ampicilină. Plăcile Petri astfel pregătite au fost incubate o noapte la temperatura de 37°C.

Selectarea coloniilor

Au fost selectate câteva colonii și fiecare clonă obținută a fost inoculată în 20 μl mediu LB și 20 μl apă bidistilată sterilă. Amestecurile au fost inoculate în câte 10 ml mediu LB suplimentat cu 0,2 mg/ml ampicilină și incubate la 37 °C cu agitare continuă (225 rpm) în incubatorul cu agitare pentru culturi celulare. Cultura obținută a fost folosită a doua zi pentru purificarea ADN-ului plasmidial cu metoda miniprep.

Purificarea ADN-ului plasmidial prin metoda Miniprep

ADN-ul plasmidial a fost purificat folosind kitul QIAprep® Spin DNA purification system de la Qiagen care se bazează pe liza alcalină a celulelor urmată de separarea ADN-ului prin adsorbția sa pe o membrană de silicagel.

Procedeul cuprinde mai multe etape care urmează după incubarea peste noapte a coloniei în mediul LB. Cultura bacteriană s-a centrifugat la 4000 rpm timp de 20 minute la temperatura camerei și s-a îndepărtat supernatantul. La precipitatul obținut s-a adăugat 250 μl soluție tampon de resuspendare P1 din kit. Amestecul obținut în urma resuspendării a fost transferat prin pipetare într-un tub de centrifugă de 1,5 ml și s-a adăugat 250 μl soluție de liză P2. Amestecul componentelor în tub s-a produs prin câteva inversiuni ușoare ale tubului de 4-6 ori așa încât reacția să nu dureze mai mult de 5 min. Peste amestecul obținut în urma reacției de liză s-au adăugat 350 μl de tampon de neutralizare N3 și s-a amestecat prin inversiunea tubului de câteva ori, după care s-a centrifugat la viteză maximă (13000 rpm) timp de 10 minute. S-a separat supernatantul și va fi transferat prin decantare într-o coloniță de separare QIAprep® așezată deasupra unui tub de colectare de 2 ml. Pentru fixarea ADN-ului de membrana coloniței s-a centrifugat pentru 30 secunde. la viteza maximă. S-a aruncat filtratul din tubul de colectare și

s-a spălat membrana coloniței succesiv cu 500 µl tampon de spălare PB urmată de 750 µl de soluție tampon de spălare PE după care se centrifughează la viteza maximă timp de 1 min. pentru a îndepărta soluția de spălare și impuritățile colectate. De fiecare dată se schimbă tubul de colectare. După ultima centrifugare se înlocuiește tubul de colectare și se mai centrifughează colonița pentru 30 sec. la viteza maximă pentru îndepărtarea urmelor de soluție de spălare, după care se transferă colonița într-un tub de centrifugă de 1.5 ml și se eluează ADN-ul fixat pe coloană cu o soluție 30-50 µl de tampon de eluție EB care se dispune cu grijă în centrul coloanei. După un minut de incubare la temperatura camerei se vortexează foarte ușor și se măsoară concentrația ADN-ului fie prin măsurare cu nanodropul, fie utilizând compararea cu Hyperladder I (anexa 5.1.) în urma migrării diferențiate în cursul electroforezei în gel de agaroză 1% la 100 V.

II.5.2.1.8. Verificarea existenței insertului la probele de ADN plasmidial purificate cu Miniprep

Verificarea existenței insertului în ADN-ul plasmidial purificat prin metoda miniprep se face prin amplificarea PCR a unui anumit fragment cuprins în regiunea promotor C/EBPβ folosind o pereche de primeri al căror situs de recunoaștere se află în fragmentul inserat.

Secvențializarea anumitor fragmente din ADN-ul plasmidial al construcțiilor în vederea validării succesului reacției de mutageneză dirijată

Secvențializarea s-a realizat folosind o mașină ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems) și un kit v3.0 ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit după principiul descris anterior la capitolul II.1.1.7. Oligonucleotidele (II.5.2.1.2) au fost concepute așa încât în urma reacției de secvențializării ciclice să se amplifice fragmente din insertul constructului plasmidial acoperind regiunea notată pr-1 și pr-2 a promoterului genei C/EBPβ. Componentele amestecului pentru reacția de secvențializare sunt: 2 µl v3.0 ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix (Applied Biosystems), 400-800 ng ADN plasmidial, 1 µl primer forward sau reverse (sens or antisens), 4 µl 5xtampon de secvențializare, DMSO 5% și betaină 1M în amestecul final, completându-se cu apă bidistilată (puritate moleculară) până la 20 µl. Programul termocycler-ului (Gene Amp PCR 2400 -Applied Biosystems) cuprinde 25 de cicluri, fiecare ciclu presupunând încălzire la 98°C pentru 10 sec., 55 °C pentru 55 sec., 60 °C pentru 4 min și la sfârșit răcire la 4°C.

Verificarea existenței insertului și a orientării corecte a acestuia

Probele care conțin plasmidul corespunzător haplotipului 2 la care reacția de SDM a avut loc cu succes s-au folosit pentru transformarea celulelor competente DH5α. Transformarea celulelor competente a avut loc după protocolul descris mai sus, folosindu-se volume de ADN plasmidial care cuprind aproximativ 100 ng ADN. S-au prelevat 7 colonii din fiecare placă Petri la care transformarea a reușit și fiecare colonie a fost resuspendată în 20 µl apă bidistilată sterilă. 2 µl din soluția de ADN astfel obținută a fost folosită în continuare pentru o reacție PCR în urma căreia se va obține un fragment de 250 bp din insert. Primerii utilizați sunt notați Pr-2:

F: 5` - GGG AGG AGG AGG TGG GAG TTT AC-3`
R: 5` - CTG GAG GCT GTC CTG GAA-3`

Condițiile reacției PCR sunt prezentate în tabelul de mai jos:

Tabel 51. Compoziția amestecului PCR pentru verificarea insertului corect

Reactivul	Volumul de reactiv	Concentrația componentului în soluția finală
H ₂ O Bidistilată	17,98 μ l	
soluția tampon a polimerazei (10x Red buffer)	2.5 μ l	1x
clorură de magneziu	2 μ l	2mM
amestec dNTP	0,4 μ l	200 μ M
forward primer	0,5 μ l	25pM
reverse primer	0,5 μ l	25 pM
Thermoprime Plus DNA polymerase	0,12 μ l	0,6 u

Programul optim de PCR ales pentru desfășurarea reacției a fost descris în tabelul 52. După verificarea existenței insertului s-a verificat dacă acesta este într-o poziție corectă prin reacții de restricție enzimatică cu 2 enzime BamHI și EcoRI. Enzimele au fost alese folosind programul Nebcutter, în urma screening-ului efectuat în secvența vectorului pGL3-bazic și a insertului de 3.7 Kb compus din fragmentul din vectorul TOPOpCRII și fragmentului de 3641 bp din promoterul C/EBP β iar condițiile sunt descrise în tabelul 53:

Tabel 52. Programul PCR pentru verificarea insertului corect

Mărimea fragmentului amplificat	Etapa	Temperatura	Timp	Numărul de cicluri PCR
245 bp	Denaturare inițială	94°C	4min, 30 sec.	1
	Denaturare	94°C	30 sec	30
	Aliniere primeri	59°C	30 min	
	Extensie	72°C	30 sec	
	Extensie finală	72°C	5 min	1
	Mentineră la 25°C	25°C	5 sec	1

Tabel 53. Condițiile reacțiilor de restricție enzimatică efectuate pentru verificarea insertului

Mărimea fragmentului ADN supus restricției enzimatice	Enzima de restricție	Secvența de recunoaștere (5' – 3')	Unități de enzimă per reacție	NEBuffer (1 x)	Temperatura (°C)	BSA (0.1 x)
AND plasmidial 7,8 kb	BamHI	G [*] GATCC	20 u	BamHI tampon	37	+
AND plasmidial 7,8 kb	EcoRI	G [*] AATTC	20u	NEB tampon 2	37	-

Odată verificată existența insertului într-o orientare corectă s-a preparat o soluție glicerol stoc a plasmidului obținut și de asemenea s-au realizat maxiculturi pentru a obține ADN plasmidial cu metoda Maxiprep prezentate la secțiunea

Extracția ADN-ului plasmidial folosind kitul Endo-free plasmid Maxiprep kit (Qiagen)

Clonele selectate au fost resuspendate în 5 ml mediu LB conținând ampicilină în concentrație de 0,2 mg/ml și incubate 16 h la 37 °C într-un incubator cu agitare continuă. 100 μl din fiecare cultură celulară a fost adăugată la 100 ml de mediu LB conținând ampicilină în concentrație de 0,2 mg/ml și cultivate sub agitare încă 16 ore la 37° C.

Fiecare cultură s-a împărțit în tuburi 2x50 ml și apoi s-au centrifugat la 4400 x g , timp de 25 min la 4°C (Zentrifugen). Supernatantul a fost îndepărtat din fiecare tub, iar precipitatul a fost resuspendat în 10 ml tampon P1 (compoziția tampoanelor în apendix 10) urmat de 10 ml soluție tampon P2 . După amestecare prin inversiunea tubului, amestecul de reacție s-a incubat la 21°C timp de 5 min. La amestecul de mai sus s-au adăugat 10 ml soluție tampon P3 rece, iar lizatul astfel obținut s-a introdus într-un cartuș de filtrare QIA filter cartridge , fiind incubat timp de 10 min la 21°C. Lizatul a fost filtrat într-un tub de 50 ml după care s-au adăugat 2.5 ml soluție ER. Amestecul obținut în urma amestecării prin inversiune a tubului a fost incubat în gheață timp de 30 min. În paralel, se echilibrează o coloană QIAGEN - tip 500 prin adăugarea a 10 ml soluție tampon QBT care va fi lăsat să treacă prin coloană la presiunea atmosferică. După echilibrarea coloanei, lizatul a fost lăsat să treacă prin coloană prin curgere liberă, după care conoana a fost spălată de două ori cu câte 30 ml tampon de spălare QC pentru îndepărtarea impurităților. ADN-ul plasmidial a fost eluat în 15 ml tampon de eluție QN (anexa 5.8). ADN-ul plasmidial a fost precipitat cu 10,5 ml (0,7 vol) de izopropanol 100% la temperatura camerei urmat de centrifugare la 4450 g timp de 65 min la 4°C. Supernatantul a fost îndepărtat cu grijă din fiecare tub, iar precipitatul a fost lăsat cu capacul deschis pentru uscare după care s-a resuspendat în 500 μl soluție tampon 1xTE (apendix nr.5).

II.5.2.2.REZULTATE ȘI DISCUȚII

Evidențierea unor polimorfisme la nivelul secvenței ADN a promotorului C/EBPβ

Investigarea fragmentului pr-1 C/EBPβ

În regiunea promotorului C/EBPβ notată pr-1, un fragment de 395 bp a fost supus analizei utilizând temperatura de 62°C și un gradient de 53-61% tampon B. Screeningul efectuat în aceste condiții pe cele 294 de probe a arătat existența a trei profile distincte așa cum este prezentat în fig. 62 unde picurile de culoare galbenă și verde indică două homoduplexuri diferite (corespunzătoare homozigoților wild type, respectiv mutant) iar fiecare dintre liniile purpurie și albastră reprezintă profilul cromatografic al câte unui heteroduplex ce cuprinde trei picuri.

Investigarea fragmentului pr-2 C/EBPβ

În regiunea pr-2 a promoterului genei C/EBPβ screeningul s-a efectuat în două condiții experimentale diferite (vezi tabelul 47). Utilizând un gradient de 53-61% tampon B la temperatura de 64°C s-au obținut profile identice pentru probele

analizate nereușindu-se diferențierea heteroduplexurilor de homoduplexuri. S-a utilizat apoi celălalt gradient de 47-55% tampon B și o temperatură de 68°C ,

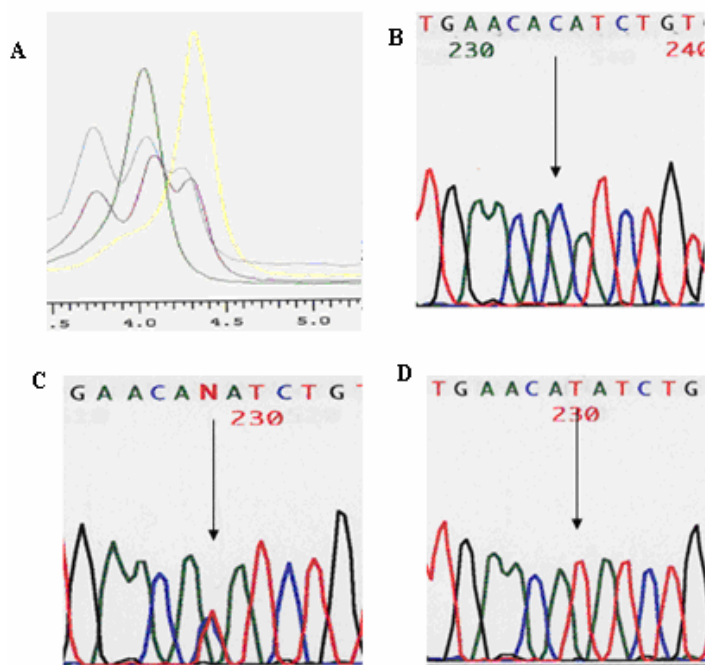


Fig. 69. A. Un exemplu de cromatogramă rezultată în urma analizei WAVE™ DNA analysis care prezintă un homozigot wild type (C/C) și unul mutant (T/T) –picurile verde și galben- și doi heterizigoți C/T –picurile purpuriu și albastru; B-D Electroforegramele rezultate în urma secvențializării prezentând polimorfismul -3429 C/T cu locusul polimorfic indicat prin săgeți

trei profile distincte ce corespund homoduplexurilor corespunzătoare homozigoților wild type respectiv mutant și heteroduplexurilor corespunzătoare heterozigoților. Analizându-se prin secvențializare probele ce au prezentat pattern-uri diferite la analiza DHPLC, s-au identificat două polimorfisme adiacente în pozițiile -411/-412 din regiunea promotor a *C/EBPβ*. Deoarece au fost identificați numai homozigoți wild type -411 CC; -412 GG, heterozigoți -411/-412CG/TT și homozigoți polimorfici -411, -412 TT, neidentificându-se heterozigoți de tip -411/-412 CT/CG, -411/-412 TG/CG -411/-412 CG/TG sau -411/-412 CG/CT, în continuare vom vorbi despre polimorfismul -411/-412 CG/TT.

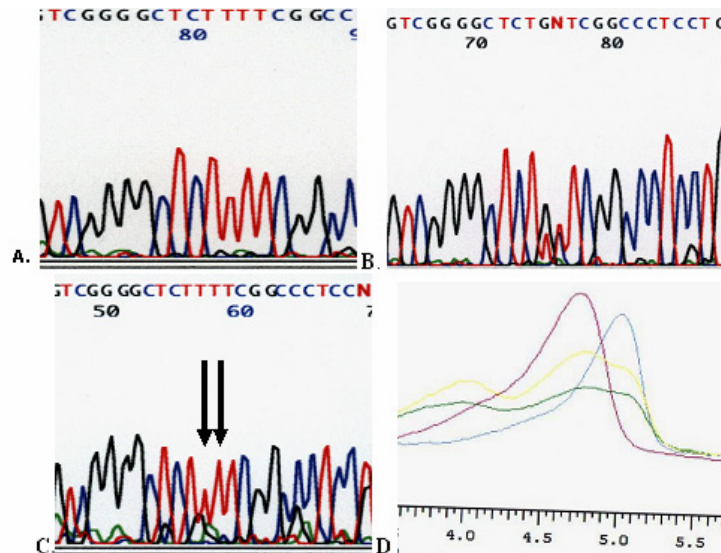


Fig. 70. A. Un exemplu de cromatogramă (D) rezultată în urma analizei WAVE™ DNA analysis care prezintă un homozigot wild type (CG/CG) și unul mutant (TT/TT) – picurile purpuriu și albastru - și doi heterizigoți CG/TT – picurile verde și galben; A-C Electroforegramele rezultate în urma secvențializării prezentând polimorfismul - 411/-412 CG/TT cu locusurile polimorfice indicate prin săgeți

Rezultatele analizei au arătat existența homozigoților -411/-412 CG/CG într-un procent de 29,5% la populația analizată, heterozigoților - 411/-412 CG/TT într-un procent de 49,6%, iar existența homozigoților -411/-412 TTTT a fost demonstrată la 20,9% din lotul analizat. Frecvența polimorfismului -3429 C/T este mai mică în comparație cu frecvența polimorfismului - 411/-412 CG/TT (tabel 54)

Tabel 54. Frecvențele genotipurilor identificate la nivelul promotorului C/EBPβ

Poziția /regiunea	Frecvențele genotipurilor identificate		
-3429 pr-1	CC: 32,5%	CT: 48,1%	TT: 19,4%
-412 pr-2	GG : 29,5%	GT : 49,6%	TT : 20,9%
-411 pr-2	CC : 29,5%	CT : 49,6%	TT : 20,9%

La fel ca și pentru polimorfismele EC-SOD, s-a realizat mai întâi analiza asociației fiecăruia dintre cele trei polimorfisme C/EBPβ analizate cu existența plăcii de aterom prin compararea distribuției genotipurilor identificate la subiecții cu și fără aterom, apoi toți cei 294 de subiecți au fost împărțiți în grupuri în funcție de existența sau absența factorilor de risc cardiovasculari urmărindu-se identificarea de asociații ale acestor polimorfisme C/EBPβ cu factorii de risc cardiovascular. Au fost de asemenea investigate corelațiile între genotipurile identificate și factorii de risc cardiovascular separat pentru femei și bărbați.

Nu s-a identificat o asocierie semnificativă din punct de vedere statistic a polimorfismelor -3429 C/T sau -411/412 GC/TT identificate la nivelul promotorului genei C/EBPβ cu existența sau absența plăcii de aterom semnificativ la nivelul arterelor la subiecții analizați, frecvențele alelice precum și valoarea lui p statistic determinată în urma testului Chi-pătrat fiind prezentate în tabelele de mai jos:

Tabel 55. Compararea frecvențelor genotipurilor identificate în regiunea promotor a genei C/EBPβ între subiecți și controli

Poziția /regiunea	Grupuri analizate	Frecvențele genotipurilor identificate			p
-3429 pr-2	Subiecți cu aterom semnificativ	CC: 32,0%	CT: 47,0%	TT:21,0%	p=0,531
	Subiecți fără aterom semnificativ	CC: 33,0%	CT: 49,4%	TT:17,6%	
-411/412 pr-1	Subiecți cu aterom semnificativ	CG/CG 30,5%	CG/TT 50,7%	TT/TT 18,8%	p=0,485
	Subiecți fără aterom semnificativ	28,9%	48,3%	22,8%	

Tabel 56. Compararea frecvențelor genotipurilor polimorfismului -3429C/T C/EBPβ între diverse grupuri

Nr. crt.	Grupuri analizate	Genotip-3429C/T C/EBPβ (nr cazuri [frecvența %])			Valoarea lui p
		CC	CT	TT	
1	Femei Bărbați	45[32,6]	68[49,3]	25[18,1]	p=0,831
		46[31,1]	71[48]	31[20,9]	
2	Cu leziuni coronariene Fără leziuni coronariene	37[30,3]	63[51,6]	22[18]	p=0,667
		54[32,9]	76 [46,3]	34 [20,7]	
3	Cu leziuni carotidiene Fără leziuni carotidiene	3[14,3]	12[38,7]	6 [28,6]	p=0,177
		88[33,2]	127[47,9]	50[18,9]	
4	Cu leziuni la nivelul vaselor periferice Fără leziuni la nivelul vaselor periferice	14[45,2]	12[38,7]	5[16,1]	p=0,240
		77[30,2]	127[49,8]	51[20]	
5	Diabetici Non diabetici	20[38,5]	24[46,2]	8[15,4]	p=0,782
		71[30,3]	115[49,1]	48[20,5]	
6	Hipertensivi Normotensivi	59[33,3]	84[47,5]	34[19,2]	p=0,465
		32[29,4]	55[50,5]	22[20,2]	
7	Cu dislipidemie Fără dislipidemie	45[34,9]	63[48,8]	21[16,3]	p=0,367
		46[29,3]	76[78,4]	35[22,3]	
8	Obezi Non obezi	52[35,1]	75[50,7]	21[14,2]	p=0,070
		42[29,8]	64[45,4]	35[24,8]	
9	Cu accidente heredocolaterale Fără accidente heredocolaterale	37[33,9]	53[48,6]	19[17,4]	p=0,717
		54[30,5]	86[48,6]	37[20,9]	
10	Fumători Nefumători	38[28,8]	66[50]	28[21,2]	p=0,566
		53[34,4]	73[47,4]	28[18,2]	

Analizându-se asocierile cu factorii de risc cardiovascular la întregul lot de s-a remarcat pentru toate polimorfismele C/EBPβ studiate o tendință de corelare cu obezitatea, în sensul că este posibil ca prezența alelelor wild type: C în poziția -3429, precum și a alelelor G și C în pozițiile, -412, -411 să fie corelată cu

susceptibilitatea la obezitate, în timp ce prezența alelelor T mutante în aceste poziții să confere indivizilor un rol protectiv în ceea ce privește susceptibilitatea la obezitate. S-a analizat, de asemenea, la întreg lotul de 294 de indivizi posibilitatea existenței unor corelații ale acestor polimorfisme cu ceilalți factori de risc cardiovascular (tabel 57).

Tabel 57. Compararea frecvențelor genotipurilor polimorfismului -411/-412 CG/TT C/EBPβ între diverse grupuri

Nr. crt.	Grupuri analizate	Genotip -411/-412 CG/TT C/EBPβ (nr cazuri [frecvența %])			Valoarea lui p
		GG	GT	TT	
1	Femei Bărbați	40 [28,2]	71 [50]	31 [21,8]	p=0,870
		46 [30,7]	74 [49,3]	30 [20]	
2	Cu leziuni coronariene Fără leziuni coronariene	35 [28,2]	66 [53,2]	23 [18,5]	p=0,541
		51 [30,4]	79 [47]	38 [22,6]	
3	Cu leziuni carotidiene Fără leziuni carotidiene	5 [23,8]	13 [61,9]	3 [14,3]	p=0,496
		81 [29,9]	132 [48,7]	58 [21,4]	
4	Cu leziuni la nivelul vaselor periferice Fără leziuni la nivelul vaselor periferice	11 [34,4]	12 [37,5]	9 [28,1]	p=0,322
		75 [28,8]	133 [51,2]	52 [20]	
5	Diabetici Non diabetici	17 [32,7]	25 [48,1]	10 [19,2]	p=0,843
		69 [28,8]	120 [50]	51 [21,2]	
6	Hipertensivi Normotensivi	57 [31,5]	87 [48,1]	37 [20,4]	p=0,618
		29 [26,1]	58 [52,3]	24 [21,6]	
7	Cu dislipidemie Fără dislipidemie	37 [28,7]	69 [53,5]	23 [17,8]	p=0,414
		49 [30,1]	76 [46,6]	38 [23,3]	
8	Obezi Non obezi	49 [32,9]	76 [51,0]	24 [16,1]	p=0,110
		38 [26,4]	69 [47,9]	37 [25,7]	
9	Cu accidente heredocolaterale Fără accidente heredocolaterale	35[31.5]	54[48.6]	22[19.8]	p=0,820
		51[28.2]	91[50.3]	39[21.5]	
10	Fumători Nefumători	37[27.4]	73[54.1]	25[18.5]	p=0,364
		49[31.2]	72[45.9]	36[22.9]	

În ceea ce privește variabilele continue pentru analiza asociațiilor dintre cele trei polimorfisme și colesterol sau trigliceride din cauza faptului că variabilele nu au fost uniform distribuite s-a utilizat testul neparametric Kruskal-Wallis. Rezultatele testului Kruskal-Wallis au demonstrat o corelație semnificativă între existența polimorfismului -3429 C/T și nivelul de colesterol, în timp ce pentru polimorfismul -411/-412 GC/TT nu există o corelație semnificativă, dar există o tendință de asociere a acestui polimorfism cu nivelul de colesterol așa după cum este prezentat în tabelul 58.

Testul Jonckheere-Terpstra aplicat simultan cu testul Kruskal-Wallis indică faptul că nivelul de colesterol este mai mic la subiecții care prezintă alela T în cele trei poziții precizate anterior, mai mare la subiecții heterozigoți și mai mare la homozigoții wild

type pentru fiecare polimorfism indicat ceea ce sugerează că profilul genetic determinat de prezența alelelor T ar putea conferi indivizilor o anumită protecție care duce la menținerea unor nivele mai scăzute de colesterol (vezi tabel 58).

Tabel 58. Rezultatele testelor Kruskal-Wallis și Jonckheere-Terpstra pentru compararea nivelului de colesterol la indivizii care prezintă genotipurile studiate

Genotip		Rang (N)	Media	p	Rezultatele Testului Jonckheere-Terpstra
Genotip - 3429	CC	73	120,31	0,045	J=6053.5 z= -2,42 p=0,16
	CT	107	108,6		
	TT	37	88,82		
Genotip -412/411	GC	66	117,49	0,140	J=6290 z= -1,875 p=0,61
	GC/TT	111	109,83		
	TT	40	92,68		

Analiza computațională a genei C/EPB β

1. Localizarea cromozomială a C/EPB β

Gena *CEPB β* este localizată în genomul uman la nivelul cromozomului 20 (NC_000020.9, catena +) în regiunea cromozomială 20q13.1 (vezi fig.nr. 84)

Folosind link-ul (www.ncbi.nlm.nih.gov/ENTREZ/) s-a obținut secvența nucleotidică a genei *CEPB β* și a 3700 bp din promoterul parcurgând mai multe etape de căutare:

- Gena *CEPB β* și 3700 bp din secvența nucleotidică a promoterului au fost localizate la nivelul clonei RP11-112L6 cu nr.de acces AL161937.13.
- Pentru a localiza ARN-ul mesager și secvența promoterului la nivelul genomului, s-a folosit programul NCBI BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) utilizând secvența de referință cu număr de acces NM_005194.2. Rezultatul analizei a indicat poziția genei la nivelul genomului la nivelul cromozomului 20, cu vecinătățile cromozomiale NT_011362.9.

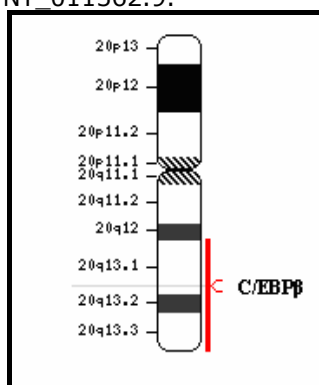


Fig.71. Localizarea cromozomială a genei C/EPB β la nivelul cromozomului 20 uman obținută din baza de date NCBI Entrez

Înregistrarea secvenței de referință NM_005194.2, corespunzătoare ARN mesager al genei *CEPBβ*, aparține staff-ului NCBI, fiind determinată computațional după ultima completare a genomului uman și derivă de la secvențele cu numerele de acces BC021931.1 și BU753.628.1.

Folosind programul NCBI BLAST 2Sequences (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html) au fost comparate secvențele nucleotidice ale secvenței genomice cu numărul de acces AL161937.13 și ale ARN-ului mesager corespunzător numărului secvenței de referință NM_005194.2, localizându-se poziția genei ***CEPBβ*** și a 3700 bp din promotorul genei ***CEPBβ*** la nivelul clonei respective.

Analizându-se cromozomul 20 folosind map view din categoriile NCBI Entrez (www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?ORG=hum&MAPS=ideogr_10C&VERBOSE=ON&CHR=20) în vecinătățile cromozomiale ale genei s-a observat prezența factorului de transcripție NFAT-2 în regiunea cromozomială 20q13.2-13.3 și a unui transportor ionic Na⁺/H⁺ (solute carrier member 8).

2. Identificarea situsurilor FT existente în secvența ADN corespunzătoare promotorului *CEPBβ*

Pentru identificarea situsurilor de recunoaștere și legare a factorilor de transcripție s-a folosit și în acest caz programul MatInspector de la GenomatrixSuite (www.genomatix.de) împreună cu site-ul NCBI PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/ENTREZ/) și BioBase TRANSFAC 7.0 (<http://www.gene-regulation.com/pub/databases/transfac/cl.html>) pentru identificarea secvențelor consens și a referințelor bibliografice corespunzătoare fiecărui situs corespunzător unui factor de transcripție. Mai întâi a fost analizată secvența wild-type, generându-se fragmente de 500 bp în scopul efectuării acestei analize în vederea identificării situsurilor corespunzătoare FT cu cele mai mari scoruri de similaritate. În al doilea rând, s-a reluat analiza secvențelor ce conțin situsurile polimorfice pentru a identifica factorii de transcripție ale căror situsuri sunt create sau desființate de existența alelei rare la nivelul situsului polimorfic. La nivelul secvenței wild-type s-au identificat mai multe situsuri corespunzătoare FT care, conform analizei MatInspector au o probabilitate mai mare de a fi funcționale (vezi anexa 7.1).

La nivelul celor 3500 bp analizate cu MatInspector [256] s-au identificat situsuri pentru CREB, SREB, NRSE și EGR-1 care se cunosc ca fiind parteneri de interacțiune ai C/EBPβ. În afară de acestea s-au identificat situsuri de recunoaștere și legare pentru Sp-1, GATA-1, Oct-1, p53, c-Myb, AP-1, AP-2 și AP-4. S-au identificat de asemenea mai multe situsuri de legare a proteinelor din familia C/EBP. De remarcat sunt situsurile multiple la nivelul cărora se pot lega mai mulți factori de transcripție cu probabilitate mai mică sau mai mare (cum sunt cei din categoria Kruppel-like sau din categoria proteinelor deget de zinc ZIC2, ZNF219, ZBP89). Regiunea de 3500 bp din secvența promotorului C/EBPβ uman a fost cu programul MatInspector iar situsurile create sau distruse de existența polimorfismului în pozițiile respective din secvența promotorului sunt prezentate în tabelul 59. Toate polimorfismele analizate modifică situsurile anumitor factori de transcripție. Prin existența alelelor rare corespunzătoare polimorfismelor **-3249 C/T** se creează un nou situs pentru factorul MELI. Polimorfismul **- 412 G/T**, prin prezența alelei rare T duce la crearea a două noi situsuri pentru NUDR și PAX2, ultimul fiind un situs destul de slab.

Tabel 59. Siturile de recunoaștere și legare a factorilor de transcripție din secvența promotorului C/EBPβ create sau distruse de existența alelelor rare corespunzătoare polimorfismelor de interes

Alela polimorfica	Factorul de transcripție	Secvența de recunoaștere (5`-3`)	Situsul predictiv de legare a FT în secvența ADN a promotorului C/EBPα	Localizarea situsului identificat în secvența promotorului
-3429 T	MELI	AGATA Soderhohn J. et al., 1997	cAGATGAg	-3252-3247
-412T	NUDR	TTCSG Michelson R.J et al.,	ccGTCGGggctctTctcgg	-423-418
	PAX2	SAAACWC Havic et al.,1999	gctcggccctcctGAAACCT	-399-393
-411 T	NUDR	TTCSG Michelson R.J et al.,	ccGTCGGggctctgTctcgg	-423-418

R = A sau G, K = G sau T, Y = C sau T, S = C sau G, N = A, C, G sau T, M = A sau C și W = A sau T

3. Compararea secvențelor promotorilor CEPBβ la om, șobolan și șoarece

Programul PIP Maker [259] a fost folosit pentru compararea a 3700 bp cuprinse în secvențele nucleotidice ale promotorilor **CEPBβ** provenind de la om, șobolan și șoarece, analiza efectuându-se prin compararea a câte două secvențe (om-șoarece, om-șobolan și șoarece-șobolan). Rezultatul comparației șoarece – șobolan a arătat că, la nivelul promotorului genei **CEPBβ**, există mai multe fragmente care se aliniază cu un scor de similaritate mai mare de 75% comparativ cu celelate două secvențe. Scorurile de similaritate sunt în concordanță cu analiza Clustal W care a arătat un scor obținut în urma alinierii secvențelor umane, murine și celei provenind de la șobolan de 10 % (om-șoarece), 10% (om-șobolan) și 77% (șoarece-șobolan). Analiza Foot Printer (<http://bio.cs.washington.edu/software>) [260] a celor 3500 bp din promotorul genelor C/EBPβ provenind de la om, șoarece și șobolan s-a realizat prin compararea a câte 500 bp din secvențele respective, programul realizând compararea succesivă pe ferestre de câte 100 bp în scopul identificării de motive structurale (10 bp) conservate la cele trei specii de-a lungul evoluției.

Analiza fragmentului cuprins între -3500 bp și -3000 bp a dus la identificarea a **3 clustere** conservate la șoarece și șobolan, care însă nu se regăsesc conservate la om (anexa 7.1). La nivelul celor 500 bp analizate s-au identificat mai multe situsuri de recunoaștere pentru factorii de transcripție. S-a identificat un situs **AML1/CBFA2** (papiloma virus enhancer binding protein2 alpha B1) din categoria RUNT care este un reglator major a multor gene specifice celulelor T. Situsul identificat în secvența umană se potrivește cu secvența consensus descrisă în literatură (5`-RACCRCA-3` ; [303, 304]). Acest situs se regăsește și la secvențele celorlalte două specii dar modificat la nivelul unei singure baze. Acest lucru demonstrează că situsul corespunzător AML1/CBFA2 are o probabilitate destul de

mare de a fi funcțional. Prezența alelei rare T datorată polimorfismului **-3429 C/T** nu distruge nici un potențial situs de recunoaștere, dar anulează prezența alelei C care este o alelă conservată la cele trei specii. Situsul **MZF1** identificat la nivelul secvenței umane diferă printr-o singură bază de secvența consensus (5`-GAGGGGAA-3` ; [282]) iar cele identificate la secvențele de la șoarece și șobolan diferă prin două baze de secvența consensus, ceea ce sugerează faptul că situsul de recunoaștere este mai slab în ultima situație. Prezența situsului BKLF 5`- GGGGTG-3` (5`-AAGGGGTAA-3` ; [305]) este slab și de asemenea diferă de cele de la șoarece și șobolan prin două baze ceea ce denotă o capacitate de legare de FT mai slabă.

Analiza fragmentului cuprins între -3000 bp și -2500 bp a dus la identificarea a **2 cluster**e conservate la șoarece și șobolan care însă nu se regăsesc conservate la om. S-a remarcat că situsul corespunzător **TATA box** (5`-TATAAA-3` , [269]) identificat în secvența umană apare și în celelalte două secvențe dar modificat la nivelul a două nucleotide, ceea ce face ca probabilitatea acestui situs de a fi funcțional să scadă foarte mult. Situsurile **GATA** (5`-GATAR-3` , [306]) consecutive identificate la nivelul secvenței umane nu se regăsesc la nivelul celorlalte două secvențe, fapt care duce la concluzia că aceste situsuri au apărut ca urmare a evoluției umane. Situsul USF, care se regăsește la nivelul celor trei specii ca și regiune conservată, diferă de secvența consensus descrisă în literatură (5`-NNCACGTGNN -3` ; [307]) printr-o singură bază la secvența umană și la nivelul a două baze în cazul secvențelor rozătoarelor analizate ceea ce denotă faptul că este un situs de legare mai slab. Un motiv structural care permite legarea slabă atât a ERR cât și a p53 se conservă la șoarece și șobolan, în timp ce la om se identifică două situsuri separate de asemenea slabe (diferență de două baze) pentru fiecare dintre cei doi factori de transcripție.

Analiza fragmentului cuprins între -2500 bp și -2000 bp a dus la identificarea a **5 cluster**e conservate la șoarece și șobolan, care însă din nou nu se regăsesc conservate la om, ceea ce denotă un grad de omologie mic al secvenței umane cu celelalte două la nivelul fragmentului analizat. Mai multe situsuri de recunoaștere corespunzătoare **MZF1** au fost identificate la nivelul acestui fragment mai mult sau mai puțin conforme cu secvența de recunoaștere descrisă în literatură (5`-GAGGGGAA-3` , [282]). Situsul KKLK identificat la nivelul secvenței umane se suprapune peste un situs de recunoaștere pentru SREB identificat de MatInspector pe catena complementară. Situsul SREB diferă de secvența de recunoaștere descrisă în literatură (5`-ATCACCCAC-3` , [267,268]) la nivelul unei singure baze, iar la celelalte două secvențe diferă la nivelul a mai mult de două baze ceea ce denotă un situs slab. Situsul **KKLF** (5`-GGGGNGGNG-3` , [285]) identificat la nivelul celor trei secvențe este de asemenea un situs destul de slab. Situsul **Myb** identificat la nivelul secvenței umane nu diferă de secvența de recunoaștere descrisă în literatură (5`-GTTR-3` , [273]), iar la nivelul secvențelor provenind de la șoarece și șobolan printr-o bază este corespunzător cu situsul de recunoaștere. Secvența **STAT** s-a regăsit la toate cele trei secvențe dar diferă la nivelul a trei baze față de secvența de recunoaștere (5`-TTNYNNAA-3` , [270]) la toate cele trei secvențe, sugerând un situs slab de recunoaștere în cadrul acestor motive structurale conservate. În schimb, situsul **GCM1** (5`-RCCCGGAT-3`) corespunde secvenței de recunoaștere la secvența umană, la celelalte două secvențe diferă la nivelul a două baze. Situsul **IK-1** (IKAROS) corespunde pentru secvența umană cu secvența de recunoaștere descrisă în literatură (5`-GGGAA-3` , [308]) și se menține la secvența de la șobolan,

dar diferă puțin la secvența de la șoarece, ceea ce face din IK un posibil regulator în această regiune din promotorul C/EBPβ.

Analiza fragmentului cuprins între -2000 bp și -1500 bp a dus la identificarea unui singur motiv structural conservat la șoarece și șobolan care nu se regăsește însă conservat și la om. Motivul structural conservat la șoarece și șobolan conține situsuri pentru **GATA și CP2**. Situsul GATA identificat pe catena complementară la șoarece și șobolan corespunde secvenței de recunoaștere descrisă în literatură (WGATAR, [272]) dar la secvența umană diferă la nivelul unei singure baze. Situsul CP2 identificat în cadrul aceluiași motiv structural la șoarece și șobolan care cuprinde repetări ale secvenței CNRG se regăsește și la secvența umană conformă cu secvența de recunoaștere (5`- CNRGN5-6CNRG, [309]) ceea ce sugerează faptul că aceste două situsuri să fie funcționale în contextul celular. Situsul TATA box care s-a identificat a fi conservat la șoarece și șobolan ca fiind conform cu secvența de recunoaștere, diferă la om față de secvența descrisă în literatură (5`-TATAAA-3`,[269]) la nivelul a două baze, ceea ce face ca probabilitatea legării acestui FT să fie mai mică. Situsul **Sp-1** identificat la nivelul secvenței umane este conform cu secvența descrisă în literatură (5`-GGGCGGG-3` , [310]), dar la celelalte secvențe acesta nu se mai regăsește (vezi anexa 6.3.4.). Mai multe situsuri de recunoaștere pentru **KKLF** au fost identificate la nivelul secvenței umane care corespund parțial secvenței descrise în literatură (GGGGNGGNG, [292]) având în consecință o capacitate mai mică de legare a FT corespunzător. Situsul **SREB** (5`- ATCACCCAC-3` [267,268]) diferă la nivelul a două baze față de secvența de recunoaștere iar la celelalte două secvențe analizate diferența față de secvența de recunoaștere este mult mai mare ceea ce sugerează că acest factor are probabilitate mică de a fi funcțional. Situsul **TCF-LEF1** (5`- TCAAAG-3` , [311]) identificat la toate cele trei secvențe analizate diferă la nivelul unei baze față de secvența de recunoaștere, ceea ce reduce puțin probabilitatea de legare a acestui factor. Secvența de recunoaștere PU.1 a fost identificată la secvența umană fiind conformă cu secvența de recunoaștere (5`- AGGAA-3`) dar nu s-a regăsit și la celelalte două regiuni conservate de la șoarece și șobolan.

Analiza fragmentului cuprins între -1500 bp și -1000 bp a dus la identificarea a 4 clustere conservate la șoarece și șobolan. La om gradul de omologie este mic. Analiza Foot Printer a fragmentului de interes a identificat prezența mai multor situsuri pentru diferiți factori de transcripție în regiunile conservate, dar numai pentru secvența umană în timp ce la celelalte două specii nu se mai mențin situsurile acestor factori. În această situație se află situsul pentru **AP2** care la secvența umană corespunde situsului de recunoaștere descris în literatură (5`-GCCNNGGC-3` [312,313]), dar la celelalte specii diferă la nivelul mai multor nucleotide. Situsul de recunoaștere pentru proteina **HIVP1(human immunodeficiency virus type I protein binding)** din categoria factorilor NFκB ce se află de asemenea într-un motiv structural conservat dar diferă la nivelul a două nucleotide față de secvența descrisă în literatură (5`-AGGGACTTTCC-3` , [314], dar secvențele de la șoarece și șobolan diferă față de secvența umană la nivelul a mai mult de două nucleotide. Situsul 5`-AGATG-3` corespunzător factorului de transcripție **MelI** identificat la nivelul secvenței umane este un situs slab (5`-AGATA-3` , [315]) care nu se mai menține la celelalte două specii. S-a identificat de asemenea situsul **HNF4** care, la secvența umană corespunde secvenței de recunoaștere descrisă în literatură (5`-CAWAR-3` , [316]) dar diferă la nivelul unei baze la secvența murină și la cea provenind de la șobolan. La șobolan

această secvență este modificată așa încât este perfect cuprinsă în situsul de recunoaștere pentru **PPAR_RXR** (3`-AGNNAWAGKTSW-5`,[317]), care însă este modificat la celelalte două specii la nivelul a două sau mai multe nucleotide, ceea ce denotă o posibilitate mai mică de legare pentru acest FT. Situsul **IRF** a fost identificat ca fiind conservat la cele trei specii corespunde secvenței descrise în literatură (3`-GAAANN-5`,[318]). Dintre situsurile identificate, HNF4 și IRF au cea mai mare probabilitate de a fi funcționale.

Analiza fragmentului cuprins între -1000 bp și -500 bp a dus la identificarea a 4 clustere conservate la șoarece și șobolan, care însă nu se regăsesc conservate la om. Analiza Foot Printer a fragmentului a avut ca rezultat identificarea unui situs **AP-1** la nivelul secvenței umane identic cu situsul descris în literatură (5`-TGACTCA-3`,[319]) dar la celelalte două specii există diferență la nivelul a două baze. S-au identificat de asemenea la nivelul secvențelor omoloage câteva situsuri pentru elementele din familia Kruppel-like care se leagă de secvența GGGGTG cu preferințe individuale pentru nucleotidele învecinate. Programul MatInspector a identificat pentru secvența umană situsuri slabe pentru **KKLF și EKLF** parțial conforme cu secvențele de recunoaștere descrise: 5`-CCACACCCT-3` [302] și 5`-GGGGNGGNG-3` [292]. Situsul **Egr-1** identificat ca și cel corespunzător **p53**, este slab la toate cele trei specii diferind de secvența de recunoaștere descrisă în literatură (5`-GCGGGGCG-3`,[320] respectiv 5`-GGACATGCC-3`,[295]) la nivelul mai multor baze, ceea ce indică o probabilitate mică ca situsurile să fie funcționale.

Analiza fragmentului cuprins între -500 bp și +1 bp (anexa 7.3) a demonstrat o slabă omologie a celor trei secvențe, secvența provenind de la șobolan prezentând cea mai mică omologie cu celelalte două. Analiza Foot Printer a acestui fragment a identificat mai multe situsuri **Sp-1** la nivelul celor trei secvențe care sunt mai mult sau mai puțin conservate. Situsul Sp-1 localizat între poziția **-228 și poziția -222** pe secvența umană este identic cu secvența de recunoaștere literatură (5`-GGGCGG-3` [310]) și este conservat și la secvența murină. La șobolan, acest situs diferă printr-o bază ceea ce denotă o capacitate mai mică de legare a Sp-1 la secvența respectivă. Situsul situat între **-286 și -280** pe secvența umană este din nou identic cu secvența de recunoaștere și se regăsește conservat și la șoarece, în timp ce la șobolan din nou este mai slab pentru că diferă printr-o bază. Situsul Sp-1 cuprins între **-274 și -269** pe secvența umană corespunde secvenței de recunoaștere 5`-GGGCGG-3` exact, dar se regăsește conservat numai la secvența murină, el suprapunându-se peste situsul slab de **Egr-1** (5`-GCGGGGCG-3`,[320]) care diferă prin două baze de secvența de recunoaștere descrisă în literatură. Acest lucru indică o probabilitate mai mare pentru acest situs de a funcționa totuși ca situs Sp-1 și nu Egr-1. S-a identificat o casetă GC box conservată la toate cele trei specii conformă cu secvența de recunoaștere descrisă în literatură (5`-GGGNG-3`[269]) care are probabilitate mare de a fi funcțională. Situsul **NUDR** identificat la nivelul secvenței umane este conform cu secvența de recunoaștere (5`-TTCSG-3`,[321].), iar la celelalte două secvențe diferă printr-o bază față de secvența de recunoaștere descrisă în literatură. Situsul de legare **CREB** s-a regăsit la toate cele trei secvențele dar diferă față de secvența de recunoaștere (5`-GNTGACGY-3`,[322]) la nivelul a două baze, ceea ce indică o probabilitate mai mică de a fi funcțional. S-a identificat de asemenea un situs slab **INSM1** la toate cele trei secvențele care diferă față de secvența de recunoaștere descrisă de Breslin și

colab. (5'-TKYYWGGGGKCR-3',[323]). Secvența corespunzătoare casetei **TATA** box a fost identificată numai la secvența umană.

Polmorfismele identificate nu sunt plasate în situsuri corespunzătoare nici unui factor de transcripție (variante wild-type), dar alela -411C și alela -3429 C sunt baze conservate la toate cele trei specii (vezi anexa 7).

4. Insulele CpG din promotorii genelor *CEPB β* de la om, șoarece și șobolan

Existența insulelor CpG cu potențial reglator ridicat asupra expresiei genelor datorită proceselor de hipermetilare/demetilare a fost investigată cu programul EMBOSS-CpG de la EMBL-EBI [265] folosind criteriile de selecție standard: 100 de ferestre, raportul obs./expected = 0.6 și >50% GC cu mărimea insulei CpG mai mare de 50. Analiza CpG a identificat două insule destul de mari situate în regiunea promotorului proximală punctului de start al transcripției genei (tabelul 60).

Tabel 60. Insulele CpG în promotorul *CEPB β* uman

Nr. crt	Numărul de perechi de baze	Poziția în promotor	Conținutul % CG	Raportul Obs./Exp.
1	279	De la -794 la -516	68.82%	0.73
2	453	De la -514 la -62	78.59%	0.83

Tabel 61. Insulele CpG în promotorul *CEPB β* la șoarece

Nr. crt	Numărul de perechi de baze	Poziția în promotor	Conținutul % CG	Raportul Obs/Exp
1	316	De la -369 la -54	72.22%	0.94

Tabel 62. Insulele CpG în promotorul *CEPB β* la șobolan

Nr. crt	Numărul de perechi de baze	Poziția în promotor	Conținutul % CG	Raportul Obs/Exp
1	108	De la -3373 la -3266	55.66%	0.74
2	61	De la -473 la -413	62.38%	0.85
3	59	De la -215 la -157	64.41%	0.74

La șoarece (tabel 61) s-a identificat numai o insulă CpG care conține 316 bp dintre care 244 sunt dinucleotide GC (72,2%), iar raportul obs/exp. este 0.94. La șobolan s-au identificat trei insule CpG de dimensiuni mai mici (vezi tabelul 62) dintre care insulele 2 și 3 au poziție similară cu insula 1 de la om, insula 2 de la șobolan având, de altfel, ca și corespondent o parte din insula 1 identificată la șoarece.

Rezultatele EMBOSS-CpG au arătat că regiunea promotorilor cuprinsă între -215 și 157 poate avea un potențial reglator mare datorită proceselor de metilare/demetilare care sunt cunoscute ca fiind implicate în reglarea expresiei anumitor gene.

5. Compararea secvențelor ARNm *C/EBP β* la om, șoarece și șobolan

Pentru compararea secvențelor ARNm corespunzătoare *C/EBP β* de la om, șoarece și șobolan în vederea identificării regiunilor cu înaltă omologie la nivelul secvențelor

comparate s-au folosit două programe PipMaker (<http://bio.cse.psu.edu>) și Clustal W (www.ebi.ac.uk). Pentru comparație s-au folosit secvențele din baza de date NCBI Entrez (www.ncbi.nlm.nih.gov/ENTREZ/) cu numerele de acces : NM_005194 pentru secvența umană, NM_009883.3 pentru secvența murină și NM_024125.5 pentru secvența provenită de la șobolan.

Analiza PipMaker [259] a celor 3 secvențe ARNm provenind de la om, soarece și șobolan (1837bp, 1507bp și respectiv 1831 bp) arată cea mai mare similaritate soarece-șobolan (procent de match de 96%), similaritate mai mare la compararea secvențelor om-soarece față de scorul de similaritate om-șobolan, lucru confirmat și de alinierea Clustal W : om-soarece (81%), om-șobolan 65%) și soarece-șobolan (96%). La compararea soarece-șobolan s-au identificat 3 posibilități de aliniere, considerându-se în continuare alinierea care generează cel mai mare scor de similaritate.

Rezultatele alinierii Clustal W [258] arată conservarea codonului start corespunzător proteinelor p38^{C/EBPβ}, p35^{C/EBPβ}, p20^{C/EBPβ}. Aceste rezultate sunt în concordanță cu studiile lui Calkhoven și colab. [324] care a demonstrat generarea mai multor izoforme ale C/EBPβ în funcție de începerea translației de la diferitele ATG de start care se găsesc de-a lungul secvenței de ARNm. Reglarea translației s-a arătat a fi dependentă de integritatea unui codon ATG (uORF-upstream open reading frame) care este în afara cadrului de citire dacă se consideră codonii de start ATG care generează diferitele izoforme [325]. Realizând mutații controlate la nivelul acestor codoni ATG s-a demonstrat că integritatea celui de-al doilea ATG care este în afara cadrului de citire (out of reading frame) inhibă translația open reading frame localizată în aval față de acest al doilea ATG Domeniul de legare a ADN-ului și domeniul fermoar de leucină prezintă cea mai mare omologie. Sunt conservate de asemenea cele 7 resturi de leucină așa cum este prezentat în anexa 7.3.

6. Modificarea artificială a secvenței ADN a promotorului C/EBPβ prin mutagenza dirijată în scopul restabilirii secvenței sălbatice (wild-type)

În cadrul acestui studiu s-a urmărit restabilirea haplotipului 2 (tabel 63) cu frecvență mai mare folosind un construct plasmidic în care există un fragment de 3641 bp din regiunea reglatoare a genei C/EBPβ (ce conține toate cele trei mutații) inserat în situsul de clonare multiplă al unui vector pGL-basic (Promega) de 4.8 kb care conține o genă reporter (*luciferaza*) care nu se află sub controlul nici unui alt promotor eucariotic sau element stimulator (vezi fig.72). Acest construct plasmidic a fost obținut de J.A.Bostock PhD student la Departamentul de Medicină Vasculară, Light Laboratories, Universitatea din Leeds și l-am utilizat în continuare pentru a obține un plasmid modificat genetic în scopul de a restabili haplotipul 2 care conține numai mutațiile -411/-412 CG/TT.

Tabel 63. Restabilirea secvenței sălbatice prin modificarea bazei mutante T (2) în alela sălbatică C (1) în poziția

Haplotip	-3429C/T	-412G/T	-411C/T	Frecvență
1	2	2	2	3 %
2	1	2	2	32 %

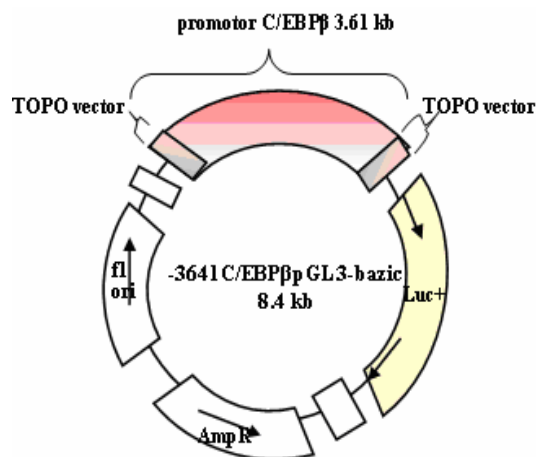


Fig. 72. Constructul -3614C/EBPβ pGL3-bazic

S-au folosit kiturile QuikChange® Site-Directed Mutagenesis I and II kits (Stratagene) pentru a produce mutagenza dirijată -3429T →C într-un construct plasmidic -3641 C/EBPβpGL3-bazic ce conține haplotipul nr.1. Folosind perechea de primeri mutageni corespunzători mutației -3429 T/C (descrisă anterior) și pornind de la constructul care are inserat haplotipul numărul 4 s-a obținut constructul plasmidial ce conține haplotipul nr. 2 cu frecvența mult mai ridicată.

După reacția de mutagenză dirijată (SDM), a avut loc restricția enzimatică a ADN parental cu DpnI. Produsul plasmidial obținut este mai compact și va fi vizualizat în agaroză puțin mai jos decât banda corespunzătoare fragmentului respectiv din marker-ul ADN.

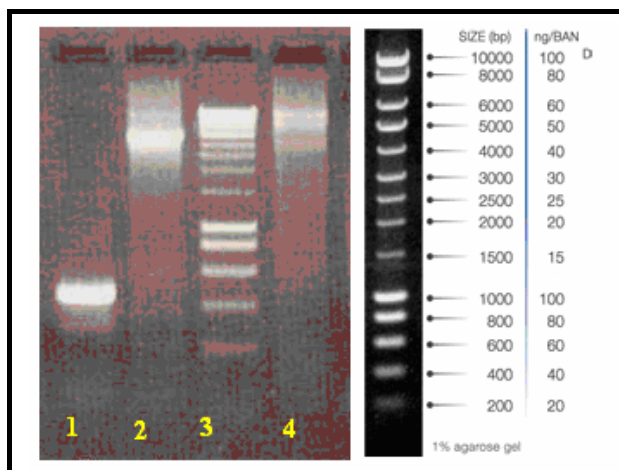


Fig. 73. Rezultatul migrării electroforetice în gel de agaroză 1% a produșilor rezultați în urma reacțiilor de restricție enzimatică cu DpnI efectuată după SDM pentru digerarea ADN-ului plasmidial parental pentru haplotipul nr 2 (liniile 1, 2 și 4) și compararea mărimii fragmentelor cu Hyperladder I (Bioline) –linia 3

Pentru verificarea constructului obținut s-au parcurs toate etapele descrise la II.5.2.1.8: amplificarea unui anumit fragment din insert cu primeri specifici,

restricția enzimatică a ADN-ului plasmidial, secvențializare pentru verificarea fiecărui construct -3641 C/EBPpGL3-bazic clonat.

Din clonele selectate pozitiv în urma transformării celulelor competente DH5 α , s-au selectat câte 7 clone de pe fiecare placă Petri și s-au inoculat în 20 μ l de apă bidistilată sterilă. 2 μ l din soluția de ADN obținută s-au folosit pentru amplificarea unui fragment de 245 bp din insertul de 3641 bp din promotorul C/EBP β inserat în plasmid. Din cele 14 clone selectate de pe două plăci Petri, 3 au conținut insertul dorit (vezi fig.74).

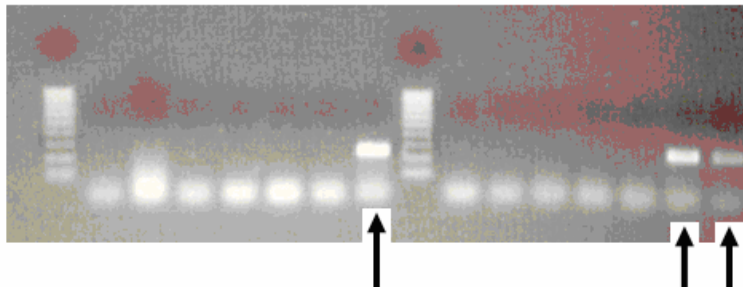


Fig. 74. Selectarea clonelor pozitive pentru insertul de 245 bp

Soluțiile rămase după amplificare, corespunzătoare celor trei clone pozitive pentru insert s-au inoculat în 18 μ l de mediu de cultură LB și s-au menținut peste noapte în

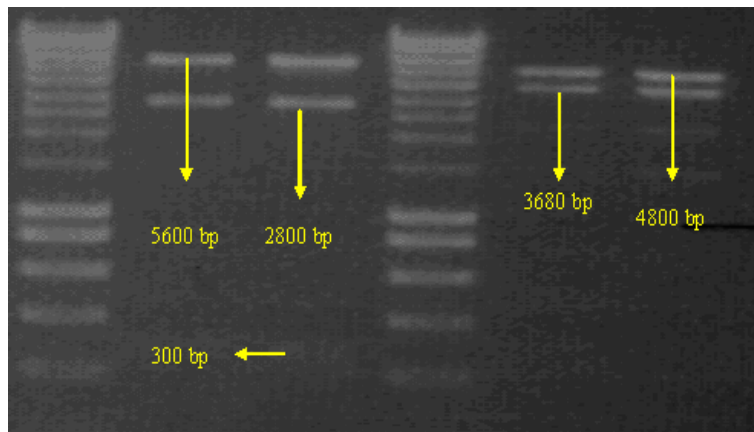


Fig. 75. Verificarea orientării corecte a insertului în constructul corespunzător haplotipului nr.2.

Linia 1 și 4 Hyperladder I (Bioline); Liniile 2 și 3 ADN plasmidial corespunzător haplotipului nr 2 digerat cu enzima Bam HI; Liniile 5 și 6 ADN plasmidial corespunzător haplotipului nr 2 digerat cu enzima EcoRI

vederea purificării ADN cu metoda mini-prep descrisă la capitolul II.5.2.1.7 urmând ca ADN-ul obținut să fie verificat pentru orientarea corectă a insertului în plasmid cu enzimele de restricție Bam HI și EcoRI. Enzima Bam HI are trei situsuri de recunoaștere și generează 3 fragmente: 5600 bp, 2800 bp și 300 bp în cazul orientării corecte a insertului. În cazul unei orientări incorecte a insertului, digestia cu enzima BamHI va conduce la fragmente de 3400 bp, 2500 bp și 2800 bp. Enzima EcoRI are două situsuri de recunoaștere poziționate în afara fragmentului de promotor inserat, generând două fragmente în urma reacției de restricție

enzimatică: 3680 bp și 4800 bp așa cum este prezentat în figura 75-76. Restricția cu Eco RI verifică dacă mărimea insertului corespunde celei corecte.

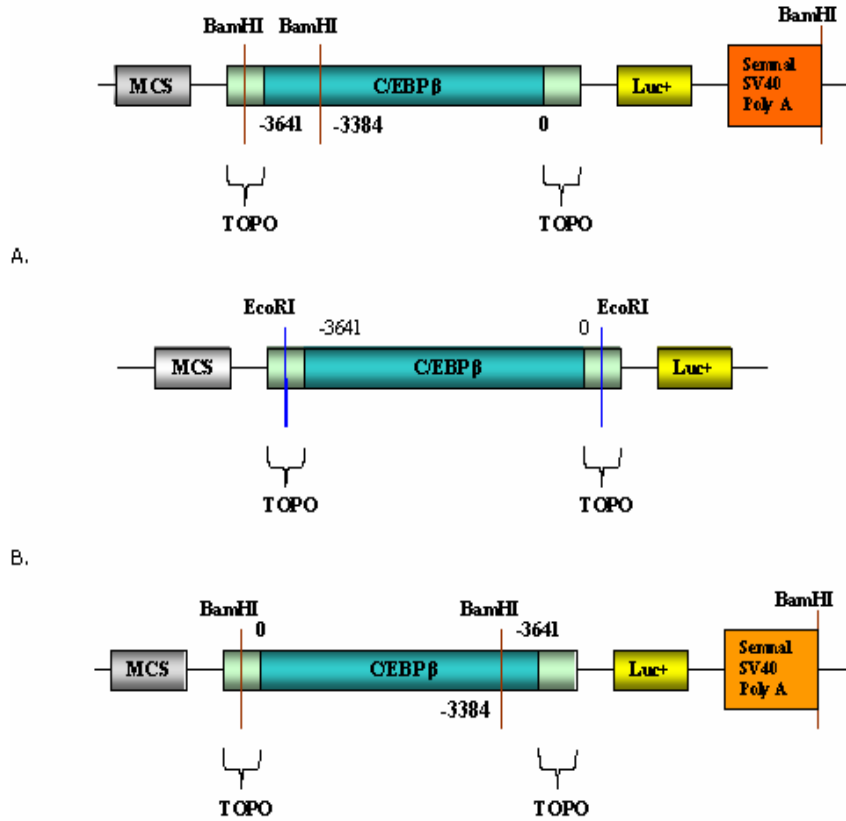


Fig. 76. Siturile de restricție enzimatică ale enzimelor Bam HI și EcoRI în cazul orientării incorecte a insertului

S-a secvențializat un fragment de 395 bp amplificat din ADN-ul plasmidial obținut în urma purificării miniprep și s-a secvențializat. În urma secvențializării pe catena complementară s-a observat schimbarea dorită de baze în poziția -3429 a promotorului C/EBPβ (fig 77).

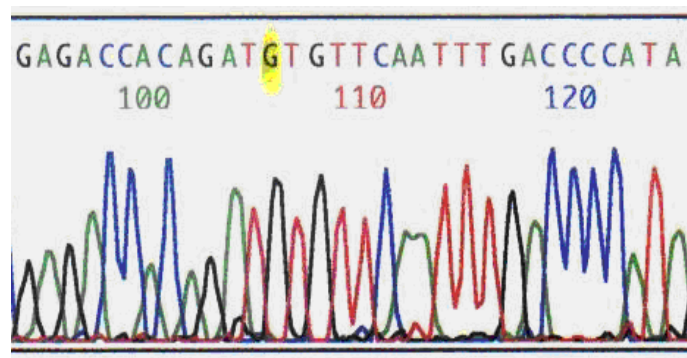


Fig. 77. Situsul polimorfic pe catena complementară -3429C (complementar G)

II.5.2.3. CONCLUZII

În cadrul acestui obiectiv au fost realizate cu succes toate sub-obiectivele propuse pentru investigarea funcționalității secvenței *C/EBPβ*:

La nivelul celor două fragmente din promotorul *C/EBPβ* cuprinse între pozițiile nucleotidice -3689 și -3296, respectiv -540 și -292 au fost identificate 3 polimorfisme: -3429 C/T [326, 327] și polimorfismele adiacente -411/-412 CG/TT folosind metoda Transgenomic Wave DNA Fragment Analysis și verificarea prin secvențializare. Analiza statistică a datelor a relevat următoarele aspecte:

- Frecvența polimorfismului -3429 C/T în populația de tip caucazian din vestul României analizată în cadrul studiului (294 subiecți) a fost mai mică comparativ cu cea a polimorfismelor adiacente-411/-412 CG/TT {polimorfismul -3429 C/T: [CC]=32.5% ; [CT]=48.1% ; [TT]=19.4% în timp ce frecvențele genotipurilor -411/-412 CG/TT sunt: [CG/CG]=29.5% ; [CG/TT]=49.6% ; [TTTT]=20.9%}. Nu au fost identificați heterozigoți individuali pentru fiecare din polimorfismele -411 C/T și -412 G/T.
- Nu au existat diferențe din punct de vedere statistic între subiecții cu ateroscleroză semnificativ și controli [$p=0.531$ (-3429 C/T), respectiv $p=0.485$ (-411/-412 CG/TT)].
- Pentru toate polimorfismele a existat un trend de asociere semnificativă a alelei rare cu obezitatea: {polimorfismul -3429 C/T: [CC]= 52 (35.1%) ; [CT] =75 (50.7%); [TT] =21 (14.2%) la obezi versus [CC]= 42 (29.8 %) ; [CT] =64 (45.4%); [TT] =35 (24.8%) la persoane non-obeze ($p=0.07$) în timp ce frecvențele genotipurilor -411/-412 CG/TT sunt: [CG/CG]=49 (32.9%); [CG/TT] =76 (51.0%); [TTTT] =24 (16.1%) la obezi versus [CG/CG]=29.5% ; [CG/TT]=49.6% ; [TTTT]=20.9% la persoane fără obezitate ($p=0.110$)}.
- Pentru polimorfismul -3429 C/T, nivelul de colesterol la indivizii cu genotip CC este mai mare decât la indivizii cu genotip CT sau TT ($p=0.045$), iar pentru polimorfismele adiacente -411/-412 CG/TT tendința de variație a fost în același sens ($p=0.140$)
- Se poate constata că prezența alelei rare T la nivelul tuturor situsurilor polimorfice, este asociată cu scăderea nivelului de colesterol, în timp ce prezența alelei comune este asociată cu susceptibilitatea la obezitate și nivele crescute de colesterol.

Analiza computațională a unui fragment de 3500 bp din secvența ADN a promotorului *C/EBPβ* a identificat mai multe situsuri de legare a factorilor de transcripție CREB, SREB, NRSE și EGR-1 care se cunosc ca fiind parteneri de interacțiune ai *C/EBPβ*. În afară de acestea s-au identificat situsuri de recunoaștere și legare pentru Sp-1, GATA-1, Oct-1, p53, c-Myb, AP-1, AP-2 și AP-4. S-au identificat de asemenea mai multe situsuri de legare a proteinelor din familia *C/EBP*. De remarcat sunt situsurile multiple la nivelul cărora se pot lega mai mulți factori de transcripție cu probabilitate mai mică sau mai mare (cum sunt cei din categoria Kruppel-like sau din categoria proteinelor deget de zinc ZIC2, ZNF219, ZBP89). Regiunea de 3500 bp din secvența promotorului *C/EBPβ* uman a fost analizată cu programul MatInspector analizându-se situsurile create sau distruse de existența polimorfismelor evidențiate -3429 C/T și - 411/ - 412 CG/TT ***C/EBPβ***.

Prin existența alelei rare corespunzătoare polimorfismului **-3429 C/T** se creează un nou situs pentru factorul MELI. MEL-1 (MDS-EVI I -like factor) nou creat se află în vecinătatea unui situs AML1/CBFA2 deja existent, pe care nu îl modifică, dar existența acestor două situsuri vicinale este posibil să ducă la legarea de oligomeri

AME (AML1/MDS/EVI-1) în cazul leucemiilor acute mieloide și a sindromului displastic. Legarea acestor oligomeri poate duce la respresarea expresiei C/EBP β . În condiții fiziologice normale, factorul Mel-I nu este activat transcripțional, ceea ce sugerează ideea că acest polimorfism nu este funcțional în condiții fiziologice normale, dar poate fi în dezechilibru de linkaj cu un alt polimorfism funcțional la nivelul C/EBP β .

Polimorfismele adiacente - **411/ - 412 CG/TT**, prin prezența alelei rare T duc la crearea a două noi situsuri pentru NUDR și PAX2, ultimul fiind un situs destul de slab. Cele două polimorfisme adiacente crează premisele legării factorului de transcripție NUDR cu o mai mare probabilitate deoarece crează o a doua unitate NUDR în vecinătatea uneia existente deja. NUDR este represor al proliferării celulare acționând prin legarea la elementele de răspuns la acidul retinoic-RARE. Este posibil ca legarea NUDR să inhibe expresia C/EBP β .

Situsul corespunzător IRF7 este reglator cheie al acțiunii citokinelor și se găsește conservat conform secvenței de recunoaștere descrisă în literatură (5`-GAAANN-3`, [303]) la toate speciile analizate. La secvența umană acest situs este plasat în regiunea cuprinsă între nucleotidele **-1114 și -1108** și are posibilitate de a regla expresia genei C/EBP β în procesul inflamator. IRF7 este stimulat de către TNF- α [328]. După infecția virală sau în urma unor mecanisme de semnalizare devine activat în urma fosforilării și migrează din citoplasmă în nucleu unde activează IFN-tip I sau alte gene stimulate de interferon [329]. Deoarece gena C/EBP β este reglată de INF- γ este posibil ca expresia genei să fie activată în urma infecțiilor virale. Totuși, există o contradicție deoarece TNF- α care stimulează expresia IRF7 [328] este cunoscut ca represor al transcripției C/EBP β la nivelul localizării nucleare a C/EBP β .

Situsul -caseta GC a fost identificată ca fiind conservată la toate cele trei secvențe analizate conform secvenței de recunoaștere descrisă de Bucher et al 5`-GGGNG-3` [269], la secvența umană identificându-se între nucleotidele **-448 și -443**. De regulă, în secvențele promotorilor se află situsuri multiple pentru caseta GC care acționează concertat pentru activarea acestor gene prin legarea Sp-1 (factorul specific-1) care face parte tot din familia Kruppel-like. În cazul C/EBP, alături de caseta GC s-au identificat și situsuri Sp-1, ceea ce crește probabilitatea ca legarea acestui Sp-1 la secvența ADN corespunzătoare din C/EBP β .

Situsul Sp-1 a fost identificat la nivelul celor trei secvențe ADN analizate (5`-GGGCGGG-3`, [295]). S-au identificat 5 situsuri Sp-1 cu potențial reglator ridicat. Situsurile Sp-1 (poziționate între **-1604-1596**, între **-228 și -222** respectiv **-286-280**) sunt conforme cu secvența de recunoaștere la om, dar diferă puțin la celelalte două secvențe. Situsul Sp-1 poziționat între **-274 și -269** este suprapus peste un situs Egr-1 slab care diferă față de secvența de recunoaștere din literatură (5`-GGGCGGG-3`, [310]). Mai există un situs dual Sp-1/Egr-1 între -379 și -370 la care situsul pentru Egr-1 diferă de secvența descrisă în literatură la nivelul unei singure baze. Situsuri duale **Sp-1/Egr-1** au fost identificate la nivelul mai multor promotori. Interschimbabilitatea dintre Sp-1 și Egr-1 se manifestă la nivelul reglării în două moduri. Sunt dovezi care arată că dacă expresia Egr-1 crește are loc o competiție cu Sp-1 pentru legarea situsului respectiv, în care Sp-1 este înlocuit și nu-și mai manifestă rolul de activator [330]. Asemenea acțiuni opuse în ceea ce privește reglarea expresiei genelor s-a observat și în cazul TNF- α , IL-2 și PDGF. Alte studii arată cooperarea între cele două proteine și stimularea expresiei 5-lipooxigenazei [331]. Huang și colab. [332], a arătat că dacă cele două situsuri se suprapun atunci cele două proteine acționează antagonist în reglarea expresiei genelor, în timp ce juxtapunerea celor două situsuri duce la acțiunea sinergică a celor doi factori de

transcripție. Prezența a două situsuri de acest fel la secvența umană a *C/EBPβ* sugerează posibilitatea reglării prin intermediul Sp-1 și Egr-1. Situsul poziționat între -379 și -370 arată o suprapunere a celor două situsuri individuale cu acțiunea reglatoare a expresiei genelor țintă depinzând de competiția dintre cei doi factori, implicat de expresia celor doi factori de transcripție în contextul specific celular. Situsul poziționat între -274 și -269, care este un situs mai slab de recunoaștere a Egr-1, conține cele două situsuri individuale suprapuse, dar are un situs Sp-1 conservat la toate cele trei specii (om, șoarece și șobolan) adiacent în regiunea de flancare 5'. Este astfel destul de probabil ca această contribuție a celor doi factori Sp-1 și Egr-1 la reglarea *C/EBPβ* la reglarea expresiei *C/EBPβ* să fie semnificativă, dar dependentă firește de contextul celular.

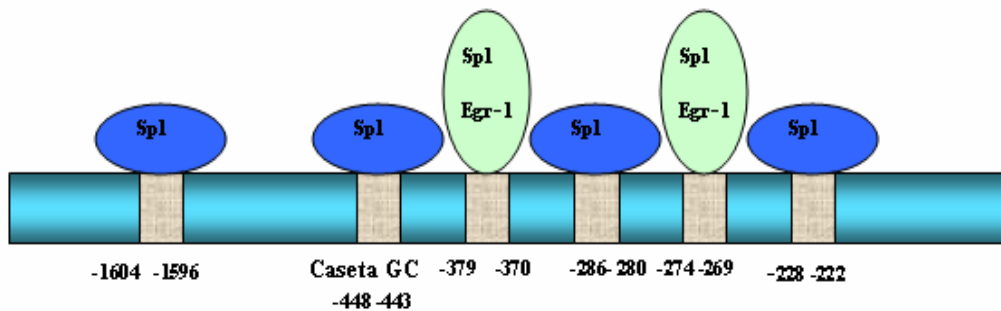


Fig.78. Reglarea genei *C/EBPβ* prin intermediul factorilor de transcripție Sp-1 și Egr-1

Situsul v-Myb (-2336 și 2331) este conservat la secvența umană comparativ cu secvența descrisă în literatură (5'-GTTR-3', [273]), dar la celelalte două secvențe analizate diferă la nivelul unei singure baze de situsul descris în literatură. Proteina v-Myb este produsul proteic trunchiat al genei c-Myc [333] și este responsabilă de potențialul virusului mieloblastozei aviare de a transforma mielomonocitele [333]. Această oncogenă retrovirală cooperează cu *C/EBPβ* în activarea promotorului genei mim-1, o genă specifică mielomonocitelor [334]. Acest lucru sugerează posibilitatea interacțiunii in vivo a acestor proteine.

Caseta TATA box a fost identificată de trei ori la nivelul secvenței ADN analizate. Primul situs este cuprins între nucleotidele -753-747 și apare numai la secvența murină. Al doilea situs se regăsește la toate 3 secvențele analizate, la șoarece și șobolan situsurile identificate sunt conforme cu secvența de recunoaștere (5'-TATAA-3', [269]) iar la secvența umană diferă la nivelul unei singure baze. Situsul TATA care este responsabil de inițierea transcripției s-a identificat la nivelul secvenței umane între nucleotidele -30 și -25.

Situsul AML1/CBFA2 (proteina de legare a enhancerului virusului papiloma virus-papiloma virus enhancer binding protein 2 alpha B1) a fost identificat la toate cele trei specii. Situsul AML1/CBFA2 a fost identificat la secvența umană între nucleotidele -3425 și -3418 pe catena complementară și corespunde secvenței de recunoaștere descrisă în literatură (5'-RACCRCA-3', [303]). AML1/CBFA2 este un reglator al limfocitelor T care face parte din categoria factorilor de transcripție RUNT, iar AML1 este gena ce codifică una dintre subunitățile enhancerului virusului papiloma virus și anume CBF. Acest factor de transcripție acționează de regulă ca un activator al expresiei genelor, dar în contextul unei cooperări AML1/MDS1/EVI I s-a demonstrat că poate fi implicat și în represia anumitor gene [335]. Până în prezent,

studiul literaturii de specialitate nu a arătat o interacțiune AML1- *C/EBPβ*, dar este posibil ca acestea să interacționeze in vivo.

Situsul MZF1 (factorul mieloidic de tip deget de zinc). Există mai multe situsuri MZF1 (5`-GAGGGGAA-3`, [282]) la secvența *C/EBPβ* umană poziționate între nucleotidele : **-3248 și -3240** (diferă la om prin două baze față de secvența de recunoaștere), **-3071 și -3065** (diferă la nivelul unei singure baze și se suprapune peste un situs BKLf), **-2364 și -2372** (este diferit de sevența de recunoaștere printr-o bază la om și la celelalte două specii prin două baze) și pe catena complementară între **-2443 și -2433** este un situs MZF1 diferit printr-o bază față de secvența de recunoaștere. De regulă MZF1 acționează ca supresor tumoral. De exemplu, Hsieh YH [336] a arătat că reducerea expresiei MZF1 a avut influență negativă asupra expresiei PKC și a dus la o reducere a migrării celulare și invaziei în cazul carcinomului hepatic uman. În ceea ce privește interacția directă *C/EBPβ* aceasta nu este descrisă direct în literatură.

Situsurile GATA (proteine de legare a secvenței GATA) au fost identificate la nivelul secvenței umane între regiunile cuprinse între **-2733 și -2737** respectiv **-2743 și -2739**. Aceste situsuri nu se mai regăsesc la secvențele de la șoarece și șobolan, ceea ce indică o probabilitate mai mică de a fi funcționale in vivo. În schimb s-a identificat un motiv structural format dintr-un situs GATA aflat pe catena complementară (conform secvenței de recunoaștere 5`-WGATAR-3`, [272]) și un situs CP2 (unități repetitive CNRGNNNNNNCNRG, [294]) poziționate între nucleotidele **-1671 și -1667** respectiv între **-1721 și -1714**. La om există mai multe unități repetitive CP2, deși la celelalte două secvențe există o singură unitate de legare. CP2 (factorul de transcripție al α -globinei) este exprimat în aproape toate tipurile de celule și este implicat în transcripția fibrinogenului, virusului SV40 și are un efect minor asupra expresiei HIV-1 (long terminal repeat). În mulți promotori ai genelor eritroid specifice s-a remarcat prezența adiacentă a CP2 și GATA1 [309]. S-ar putea ca și la nivelul *C/EBPβ* uman acest motiv structural să fie funcțional.

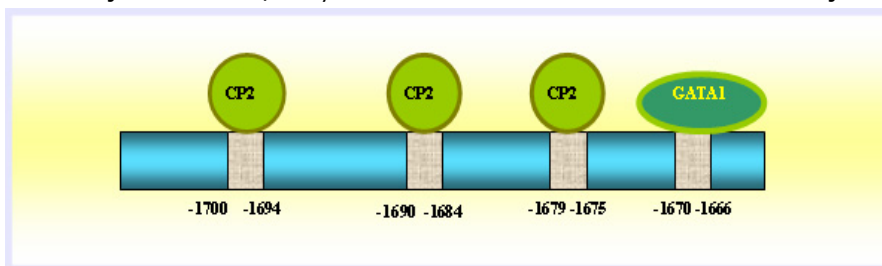


Fig.79. Posibilitatea reglării prin intermediul elementelor GATA și CP2

Situsul IK1 (IKAROS) corespunde secvenței de recunoaștere (5`-GGGAAT-3`, [308]) la secvența umană și la cea de la șobolan, dar diferă la șoarece. Proteinele din familia IKAROS sunt critice pentru dezvoltarea liniei hematopoietice, deleția domeniului de legare a ADN din genele IKAROS ducând la stoparea creșterii limfocitelor [337]. IK-1 este un stimulator al expresiei genelor specifice limfocitelor [308]. În secvența umană situsul IK-1 a fost identificat între nucleotidele **-2109 și -2103** și are potențial de legare a secvenței ADN a *C/EBPβ*.

Situsurile proteinelor activatoare AP-1 și AP-2 au fost identice cu secvențele descrise în literatură (5`-TGACTCA-3`, [319] respectiv 5`-GCCNNNGGC-3`, [313]) pentru secvența umană între pozițiile nucleotidice **-840 și -833**, respectiv **-1345 și -1336**. Proteina AP-1 (c-JUN) interacționează cu factorii GATA și Ets-1

pentru reglarea expresiei IL-5 în limfocitele T [338]. AP-1 contribuie la reglarea expresiei ciclului D1 și a factorului E2F implicați în ciclul celular [339]. AP-2 (activating enhancer-binding protein 2 α) s-a demonstrat că leagă un situs bipartit CUP/ AP-2 existent în secvența ADN a C/EBP α și inhibă expresia C/EBP α [340]. În ceea ce privește interacțiunea cu C/EBP β nu sunt date de literatură care investighează acest lucru.

Situsul dual HNF4/PPAR: RXR a fost identificat la nivelul tuturor celor trei secvențe analizate. La nivelul secvenței umane situsul pentru HNF4 corespunde secvenței descrise în literatură (5'-CAWAR-3', [316]) în timp ce situsul pentru legarea heterodimerilor PPAR:RXR diferă la nivelul a două nucleotide față de secvența de recunoaștere (5'-AGGNNAWAGKTSN-3', [317]). Factorul de transcripție HNF4 (factorul de transcripție nuclear specific hepatocitelor). În adipocite, HNF4 reglează expresia apolipoproteinelor C2 și C3, a transportorului de glucoză GLUT 2, a aldolazei B [341]. HNF4 contribuie la producerea factorului de coagulare VII în celulele hepatice Hep2 [342]. Situsul dual HNF4/PPAR: RXR nu a fost investigat din punct de vedere al interacțiunii cu C/EBP β , deși acest situs dual a fost raportat în literatură [343]. La C/EBP α , există de asemenea un situs dual de acest tip, iar PPAR γ se leagă de secvența ADN a C/EBP α ca heterodimer și în acest fel reglează expresia C/EBP α în timpul adipogenezei. Este posibil ca acest situs să fie funcțional și în cazul C/EBP β , iar HNF4 să se lege la acest situs în hepatocite, iar PPAR γ : RXR în adipocite pentru reglarea expresiei C/EBP β .

Situsul NUDR (nuclear deaf-related) a fost identificat la secvența umană în copii multiple și este conform secvenței de recunoaștere (5'-TTCSG-3', [321]). La celelalte două secvențe analizate diferă printr-o bază. Este exprimat în diverse țesuturi și celule și reprimă transcripția genelor țintă prin legarea la elementele de răspuns la acidul retinoic-RARE. NUDR este un inhibitor al proliferării celulare [344]. Studiul de față a identificat posibilitatea interacțiunii NUDR cu secvența ADN C/EBP β corespunzătoare, NUDR acționând ca un represor al acesteia și implicit ca represor al C/EBP α . În consecință, sinteza de colesterol la nivelul ficatului va fi inhibată.

CREB (cAMP response element binding protein) a fost identificat la toate cele trei secvențele analizate. La om secvența poziționată între **-747 și -472** este conformă cu secvența de recunoaștere (5'-GNTGACGY-3', [322]), dar diferă la celelalte două secvențe prin două baze. CREB este implicat în procesele de dezvoltare și supraviețuire a adipocitelor, funcționând nu numai în stadii incipiente ale adipogenezei, dar și mai târziu în supraviețuirea adipocitelor [345]. Stimularea expresiei CREB are loc în două moduri: implicând calea de semnalizare cAMP și PKA sau prin stimularea insulinică pe calea ERK. S-a arătat că stimularea CREB crește expresia C/EBP β [346] care continuă procesul de stimulare a adipogenezei. Alte amănunte despre interacțiunea celor două în vivo nu sunt descrise încă în literatură.

Situsul GCM1 (glial cells missing) a fost identificat la toate cele trei secvențele analizate. La om, situsul identificat între **-2130 și -2120** este conform cu secvența de recunoaștere (5'-RCCCGGAT-3' [347]), iar la celelalte secvențe prin două nucleotide. GCM1 a fost identificat în celulele gliale la drosophila iar la om se găsește mai mult în placentă în celulele care se ocupă cu transferul între mamă și făt în ceea ce privește aprovizionarea cu sânge: scintio și citotropoblaști. [348]. Nu se știe încă dacă GCM1 se leagă de C/EBP β in vivo sau dacă are vreo influență asupra expresiei C/EBP β .

Situsul TCF/LEF (T cell factor/ lymphoid enhancing factor) Situsul TCF/LEF1 identificat la toate cele trei secvențe analizate diferă la nivelul unei baze față de secvența de recunoaștere (5'-TCAAAG-3', [311]), ceea ce reduce puțin probabilitatea de legare a acestui factor. TCF/LEF1 este un dimer format din

factorul specific celulelor T (TCF) și LEF1 specific celulelor T dar și celulelor pre-B [349]. Aceste proteine care dimerizează au un rol important în oncogeneză, fiind activate la rândul lor de proteinele din familia Wnt. Implicarea semnalizării Wnt în procesul de adipogeneză descrisă în câteva studii de literatură a demonstrat că proteinele Wnt 1 și Wnt 10 exprimate în preadipocite sunt implicate în intermediul căii de semnalizare Wnt/ β catenină/ TCF în inhibarea expresiei PPAR γ și C/EBP α , după care în condițiile în care are loc deblocarea C/EBP β în urma acțiunii stimulatorilor adipogenezei (glucocorticoizi, insulină) calea Wnt este scurtcircuitată. În aceste condiții este posibilă o interacțiune directă a TCF asupra secvenței ADN de la nivelul C/EBP β care duce la inhibarea expresiei acestuia în preadipocite, urmată de anularea acestui efect prin scăderea nivelului expresiei celor două proteine Wnt în cazul adipocitelor mature, ceea ce duce la stimularea expresiei C/EBP β , a PPAR γ și C/EBP α . Wiper-Bergeron și colab. [350] au demonstrat că formarea unui complex co-represor al C/EBP β cu HDAC1-mSin3A duce la deacetilarea histonei H4 care împiedică recrutarea ARN polimerazei II la promotorul C/EBP α . Tratamentul cu dexametazonă al preadipocitelor 3T3-L1 duce la desfacerea complexului corepresor care are ca efect eliberarea C/EBP β și activarea transcripției C/EBP α . Studii pe culturi de celule 3T3-L1 [351] au arătat că în aceste preadipocite activarea semnalizării Wnt nu are influență asupra expresiei temporare C/EBP β , dar inhibă expresia PPAR γ și C/EBP α .

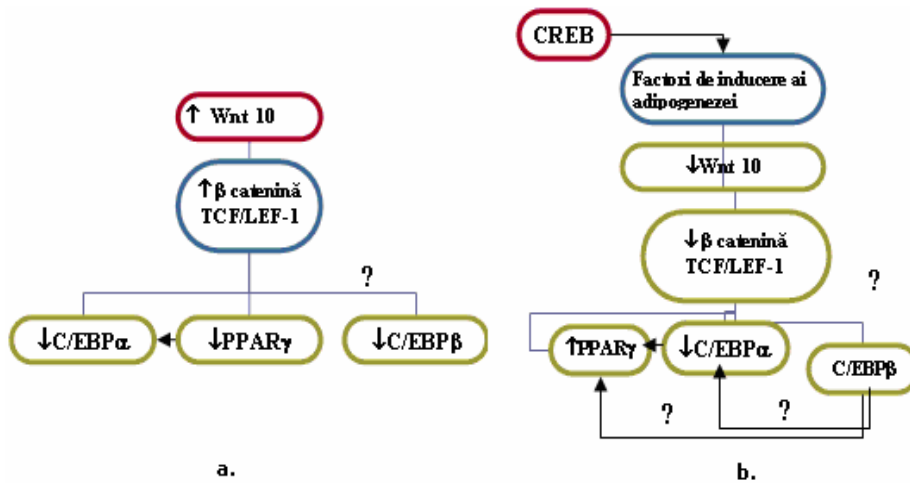


Fig. 80. Semnalizarea Wnt (în preadipocite a. și în adipocitele mature b.)

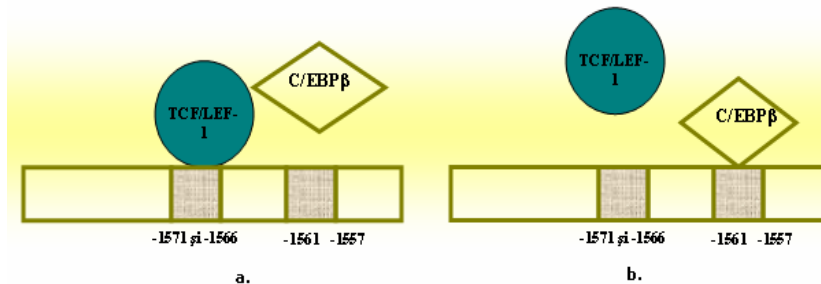


Fig.81. Mecanism posibil de reglare a adipogenezei în preadipocite (a) și adipocite mature (b)

În aceste condiții este posibil ca influența semnalizării Wnt, sau influența altor mecanisme care inhibă adipogeneza să aibă efect asupra capacității $C/EBP\beta$ de a induce $PPAR\gamma$ și $C/EBP\alpha$, sau asupra feed-back-ului pozitiv de reglare a expresiei $C/EBP\alpha$ prin intermediul $PPAR\gamma$. Urmărindu-se situsurile adiacente situsului pentru TCF/LEF-1 s-a remarcat existența unui situs C/EBP în imediata vecinătate a situsului TCF/LEF-1. Este posibil ca legarea TCF/LEF-1 la situsul corespunzător din promotorul $C/EBP\beta$ să afecteze capacitatea $C/EBP\beta$ de a interacționa factorii C/EBP și acest lucru s-ar putea reflecta în capacitatea de reglare a $PPAR\gamma$ și $C/EBP\alpha$ de către $C/EBP\beta$.

Situsul USF (upstream stimulatory factor) este un situs care este poziționat în secvența umană între nucleotidele **-2664 și -2658** și diferă față de secvența de recunoaștere ($5'$ - NNCACGTGNN $-3'$; [307]) printr-o singură bază. La celelalte secvențe diferența este de 2 baze. USF și SREB cooperează pentru activitatea acid gras sintetazei. La nivelul secvenței $C/EBP\beta$ umane există două situsuri de legare SREB (sterol response element binding protein) dar care sunt poziționate între **-2040 și -2029** respectiv **-1595 și -1585**. Ambele situsuri diferă la secvența umană la o singură bază față de secvența de recunoaștere descrisă în literatură ($5'$ - ATCACCCAC $-3'$, [267,268]). Primul situs este un situs dual SREB / KKLf a cărui funcționalitate rămâne de investigat.

Situsuri slabe de legare pentru **p53 și Egr-1** s-au identificat la nivelul secvenței ADN $C/EBP\beta$ analizate.

În consecință obiectivele au fost realizate prin selectarea unor factori de transcripție cu probabilitate mare de a fi funcționali (vezi fig.86) și identificarea unor mecanisme posibile de interacțiune

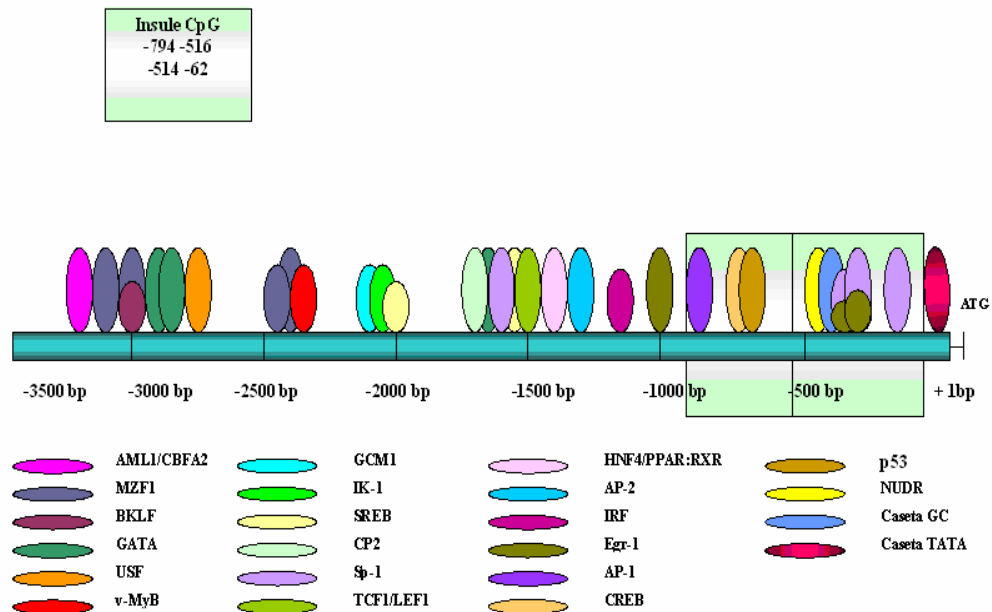


Fig. 82. Factori de transcripție posibil implicați în reglarea expresiei $C/EBP\beta$

S-a realizat cu succes restabilirea unui haplotip wild-type care nu conține alela -3429 T. Inducerea alelei comune C a fost realizată prin reacția de mutageneză dirijată la nivelul secvenței ADN corespunzătoare promotorului $C/EBP\beta$ uman inclusă

Într-un construct plasmidic -3641 C/EBP β GL3-bazic fiind astfel restabilită secvența inițială (wild type) la nivelul situsului polimorfic din poziția -3429. Prin acest proces s-a obținut un construct plasmidic ce conține un haplotip mult mai frecvent întâlnit în populația analizată (32% comparativ cu cel inițial de 3%) care modifică situsul polimorfic corespunzător Mel I așa încât acesta are șanse mai mici de legare la secvența ADN a C/EBP β .

Analiza computațională a promotorului C/EBP β uman a arătat că prezența alelei rare T la nivelul promotorului se află în vecinătatea situsului **AML1/CBFA2** pe care nu îl modifică și crează un situs de legare pentru **MEL I**. Sunt foarte puține lucruri care se știu în literatură despre factorul MEL-I (MDS-EVI I -like). Factorul de transcripție EVI I este cunoscut ca una dintre cele mai agresive oncogene umane asociată cu leucemia. MEL-I este omologul EVI I în leucemiile acute mieloide și sindrom mielodisplastic (MDS). Acest factor este activat transcripțional numai în celulele t(1;3)(p36q21) pozitive în care are loc această translocare cromozomială. Astfel, este puțin probabil ca situsul MEL-I nou creat să fie funcțional în contextul celular normal. Obținerea acestui construct are ca aplicabilitate, dezvoltarea unei strategii biotehnologice de obținere a unui plasmid modificat genetic ce poate fi apoi utilizat fie pentru analiza ulterioară a funcționalității polimorfismelor de interes, fie în terapia genică pentru eliminarea unui situs responsabil de legarea factorului MELI în cazul leucemiilor mieloide.

II.5.3. Investigarea funcționalității unor mutații induse prin mutagenizația dirijată la nivelul promotorului genei C/EBP α

În cadrul acestui obiectiv s-au urmărit următoarele aspecte funcționale:

1. Analiza computațională a unui fragment de 3000 bp din secvența ADN a promotorului C/EBP α în vederea identificării unor factori de transcripție cu mare probabilitate de a fi funcționali
2. Stabilirea modului în care variantele alelice -2970 G/A, -2269 C/T, -1801C/T, -1050 C/G ale secvenței ADN din promotorul C/EBP α pot influența legarea factorilor de transcripție la situsurile corespunzătoare din promotor.
3. Evaluarea capacității reglatoare a promotorului C/EBP α (sălbatic și mutant) asupra unei gene reporter in vivo în preadipocite și adipocitele mature murine (3T3-442A)
4. Evaluarea capacității de legare in vivo a secvențelor sălbatice și mutante ce corespund situsurilor polimorfice : -2970 G/A și -1050 C/G

La Departamentul de Medicină Moleculară Vasculară la Laboratoarele Light ale Universității din Leeds au fost identificate, în urma unui studiu populațional, mai multe haplotipuri posibile generate de existența unor polimorfisme la nivelul promotorului C/EBP α . Aceste polimorfisme au fost investigate pentru evidențierea unor asocieri cu factori metabolici și hemostatici în boli precum diabetul zaharat de tip 2 sau sindromul rezistenței la insulină care se constituie importanți factori de risc pentru bolile cardiovasculare. Dintre acestea, s-au considerat 4 polimorfisme care generează 4 haplotipuri cu frecvența mai mare în populație și care s-au analizat din punct de vedere al funcționalității lor. S-a evaluat efectul reglator al promotorului ce conține un anumit haplotip asupra genei reporter în preadipocite și adipocite mature. S-a evaluat totodată și capacitatea de legare a secvenței ADN ce conține alela comună sau cea rară in vivo la proteinele nucleare în adipocitele mature. Plasmidele folosite au fost obținute de către Ms. Claire Bennet de la LIGHT Laboratories, Leeds prin inserarea a 3048 bp conținând haplotipurile de interes în

situsul de clonare multiplă al unui vector pGL-basic (Promega) de 4.8 kb ce conține o genă reporter (*Luciferaza*) care nu se află sub controlul nici unui alt promoter eucariotic sau enhancer. Ms. Claire Bennet a fost de acord să utilizez plasmidele obținute în studiul de față, ceea ce constituie un imens ajutor în sprijinul tezei mele de doctorat, pentru care îi mulțumesc.

Tabel 64. Frecvențele haplotipurilor identificate la nivel populational

Haplotip	-2970 G/A	-2269 C/T	-1801 C/T	-1050 C/G	Nr. cromozomi	Frecvența (% și SE)
1	1	1	1	1	332	82.3 (0.4)
2	1	2	2	2	35	9.0 (0.2)
3	2	1	2	2	16	4.1 (0.1)
4	1	1	2	2	5	1.3 (0.09)

Analiza bioinformatică a 3 kb din promoterul *C/EBP α* a urmărit identificarea cu o probabilitate cât mai mare a unor posibile TFBS-uri a căror secvență este modificată prin existența polimorfismelor amintite. După analiza bioinformatică s-a dorit, pe de o parte, obținerea unor transfectanți stabili obținuți prin transfecția preadipocitelor cu construcții plasmidice ce conțin haplotipurile prezentate mai sus, urmată de procesul de diferențiere celulară a preadipocitelor transfectate la adipocite complet diferențiate și analiza activității genei reporter ce reflectă activitatea reglatoare a promoterului *C/EBP α* în ambele tipuri de celule asupra genei reporter, iar pe de altă parte obținerea extractului nuclear din adipocite și aplicarea metodei diferenței de electromobilitate (electromobility shift assay-EMSA) care analizează complexele stabile ale proteinelor nucleare cu fiecare dintre secvențele nucleotidice corespunzătoare ce cuprind situsurile polimorfice de interes.

II.5.3.1. MATERIALE ȘI METODE

II.5.3.1.1. Analiza computațională

Pentru identificarea situsurilor de recunoaștere a factorilor de transcripție situate în regiunea promotor a genei *C/EBP α* s-au folosit programele descrise la capitolul II.5.1.1.9

II.5. 3.1.2. Verificarea existenței haplotipului dorit în construcții -3038 *C/EBP α* pGLbazic

Probele care conțin plasmidul corespunzător celor 4 haplotipuri precizate anterior s-au folosit pentru transformarea celulelor competente DH5 α . Transformarea celulelor competente a avut loc după protocolul descris la secțiunea II.5.1.18. dar folosind volume de ADN plasmidial care cuprind aproximativ 10 ng ADN plasmidial. S-au prelevat 7 colonii din fiecare placă Petri la care transformarea a reușit și fiecare colonie a fost resuspendată în 20 μ l apă bidistilată sterilă. 2 μ l din soluția de ADN astfel obținută a fost folosită în continuare pentru una din reacțiile PCR ale căror condiții sunt prezentate în tabelele 65 și 66. Pentru fiecare clonă selectată pozitiv în urma transformării celulelor DH5 α s-a verificat existența insertului prin amplificarea ADN (în condițiile descrise în tabelele 65-67) urmată de migrare în gel de agaroză 1%. S-au selectat două clone corespunzătoare fiecărui construct plasmidial care au prezent insertul și s-au folosit în continuare pentru purificarea ADN-ului plasmidial folosind metoda Miniprep descrisă anterior, păstrând însă 250 μ l din mediul de cultură LB ce conține celulele transformate pentru obținerea stocului de plasmide în glicerol (250 μ l din mediul de cultură LB ce conține celulele transformate la care s-

au adăugat 750 μ l glicerol 60%, amestecul fiind păstrat la -80°C ca și stoc de plasmide).

Tabel 65. Volumele componentelor reacției PCR și concentrațiile acestora în soluția finală; DMSO și betaina au fost adugate numai în cazul amplificării regiunii PR-2 și de aceea s-au marcat cu roșu

eactivul	Volumul de reactiv	Concentrația componentului în soluția finală
H ₂ O Bidistilată	Până la 25 μ l	
Soluție tampon PCR Red Buffer (10x)	2.5 μ l	1x
clorură de magneziu	2 μ l	2mM
amestec dNTP	0,4 μ l	200 μ M
5` primer	0,5 μ l	1 pmol μ l ⁻¹
3` primer	0,5 μ l	1 pmol μ l ⁻¹
Thermoprime Plus DNA polymerase	0,12 μ l	0,6 u
DMSO	1,25 μ l	5%
betaină 4M	6,25 μ l	1M
ADN	2 μ l	x

Tabel 66. Secvența oligonucleotidelor și condițiile de desfășurare ale reacțiilor PCR

Regiunea / polimorfismul investigate	Oligonucleotide (5'→3')	Mărimea produsului PCR (bp)	Temp. (T°C)	[MgCl] (mM)	DMSO (5%)	Betaină (1 M)
PR- 4 (-2970G/A)	F: AGC CTG GGA GAT AAG GGTT R: GAG CAG GAA TTT GCT GGA AG	237	58	2	-	-
PR-2 (-2269C/T)	F: GGC AGG GAC ACA GTT CAGT R: CCC GTA GGA CTG GAA GAAAC	473	58	2	-	-
Pr2 (-1801C/T)	F: CTC GGT GGC AAG CTC CTT R: GTT ACC CGG CGT GGA GTC	401	57	2	+	+
PR1gn (-1050 C/G)	F: CAG TCC TAC GGG GCA GAG TT R: AAA GCA CCA AGA GCG ATT CG	194	58	2	-	-

Tabel 67. Programul folosit pentru desfășurarea reacției PCR

Mărimea fragmentului amplificat (bp)	Etapă	Temperatura	Timp	Numărul de cicluri PCR
237, 473, 401, 194	Denaturare inițială	94°C	4min, 30 sec.	1
	Denaturare	94°C	30 sec	30
	Aliniere primeri	T°C	1 min	
	Extensie	72°C	30 sec	
	Extensie finală	72°C	5 min	1
	Mentinere la 25°C	25°C	5 sec	1

S-au măsurat concentrațiile soluțiilor ADN obținute în urma operațiunilor cuprinse în metoda Miniprep cu nanodropul și o singură probă de ADN plasmidial din fiecare construct plasmidial obținut prin Miniprep a fost selectată pentru desfășurarea tuturor celor 4 reacții PCR simultan. Verificarea existenței alelelor dorite s-a realizat prin restricție enzimatică a fragmentelor rezultate în urma reacțiilor PCR anterioare folosind patru enzime în condițiile de reacție descrise în tabelul 68 obținute după optimizarea restricției enzimaticice.

Tabel 68. Condițiile reacțiilor de restricție enzimatică a fragmentelor PCR

Enzime de restricție	Regiunea / polimorfismul investigate	Secvența de recunoaștere (5' – 3')	Unități	Tampon NEB (1 x)	Temperatura (°C)	BSA (0.1 x)	Timp de incubare
<i>BamH I</i>	PR- 4 (-2970G/A)	G ^y GATCC	20	BamH I Buffer	37	+	O/N
<i>Fok I</i>	PR-2 (-2269C/T)	GGATG(N _{9/1} ₃) ^y	16	4	37	-	O/N
<i>BstU I</i>	Pr2 (-1801C/T)	CG ^y CG	20	2	65	-	4h
<i>Cac8 I</i>	PR1gn (-1050 C/G)	GCN ^y NGC	8	3	37	-	4h

Producții reacțiilor de restricție enzimatică au fost migrați pe un gel de agaroză 2% și vizualizați în lumină UV folosind ca marker fluorescent bromura de etidiu.

II.5.3.1. 3.Culturi celulare**II.5.3.1.3.1 Preadipocite 3T3-F442A**

Linia de celule 3T3-F442A reprezintă o linie de preadipocite de la șoareci obținută de la ECACC (no. 00070654). Un tub cu celule 3T3-F442A proaspăt scos din azot lichid s-a dezghețat la temperatura camerei după care celulele din tub s-au transferat într-un flacon T75cm³ cu capac cu aerisire (Corning). Preadipocitele au fost cultivate în mediu esențial Dulbeco` s modificat (DMEM)(Sigma) suplimentat cu ser de vițel nou născut (NBCS) 10% inactivat prin încălzire, L-glutamină 2mM (Sigma) și soluție 1x antibiotic/antimycotic (Sigma). Celulele au fost cultivate și menținute în incubator la 37°C cu 5% CO₂. La fiecare 2-3 zile, celulele au fost spălate în 1% tampon PBS (anexa 8) și s-a schimbat mediul de cultură atunci când confluința celulelor era aproximativ 60-70%. După spălarea cu PBS a celulelor după aspirarea vechiului mediu de cultură și tratarea cu 5 ml soluție tripsină în DMEM (0.05% tripsină/EDTA 0.5 mM) timp de 5-10 min. la 37°C pentru desprinderea celulelor de peretele flaconului, s-a colectat suspensia de celule în 10 ml de mediu și s-a transferat într-un tub Falcon de 15 ml. 50μl din suspensia de celule este folosită pentru numărarea celulelor cu hemocitometrul prin adăugarea a 50μl Trypan Blue (Sigma). Din acest amestec 20 μl au fost utilizați în hemocitometru pentru a număra celulele. Celulele au fost cultivate într-un flacon nupu la o densitate de 2x10⁵ celule pentru un flacon T75cm³ și 4x10⁵ celule pentru un flacon T 165cm³.

II.5.3.1. 3.2. Diferențierea adipocitelor 3T3-F442A

În scopul diferențierii, 2x10⁵ celule a fost cultivate într-un flacon de T75cm³ (Corning) și suplimentate cu 10 ml de mediu DMEM la care s-au adăugat în prealabil 10% ser de vițel inactivat prin încălzire (HIFCS-heat inactivated fetal calf serum)(First Link LTD), 2mM L-glutamină (Sigma), 1x antibiotic/antimycotic (Sigma) și insulină umană 2x 10⁻⁸ M (Sigma). S-a schimbat mediul la fiecare 2 zile timp de 10-13 zile. Morfologia celulelor a fost urmărită zilnic la un microscop Olympus CK2 light .

II.5.3.1. 3.3.Fixarea adipocitelor 3T3-F442A diferențiate cu Oil Red O

Metoda cu Oil Red O staining propusă de Green și Kehinde [342] pentru confirmarea celulelor complet diferențiate folosește un compus lipofilic ce se leagă de lipide. S-a preparat o soluție stoc de Oil Red O din 0,125 g Oil Red O (Sigma) dizolvat în 50 ml izopropanol care a fost încălzită la 56°C timp de oră după care a fost filtrată prin două straturi de hârtie Watman no.1. Soluția de lucru s-a preparat din soluția stoc în ziua folosirii prin amestecare într-un raport volumetric de 1,5:1 a soluției stoc cu apă distilată MiliQ. Soluția de lucru a fost de asemenea filtrată tot prin două straturi de hârtie Watman no.1. Mediul de cultură a fost aspirat din flacon și celulele au fost spălate de două ori cu soluție 1xPBS. 5 ml din reactivul de lucru a fost adăugat la întreg flaconul T75cm³ și celulele au fost incubate împreună cu acest reactiv de culoare timp de 30 min la 37°C. După incubare, celulele au fost spălate prin adăugarea succesivă cu 5 ml izopropanol 60% urmată de spălarea cu 5 ml de apă MiliQ.

Celulele au fost vizualizate cu un microscop Olympus CK2 light (fig. nr. 83) și diferențierea a fost confirmată prin prezența picăturilor de lipide celulare fixate de colorantul roșu în interiorul celulelor rotunde de dimensiuni mai mari.

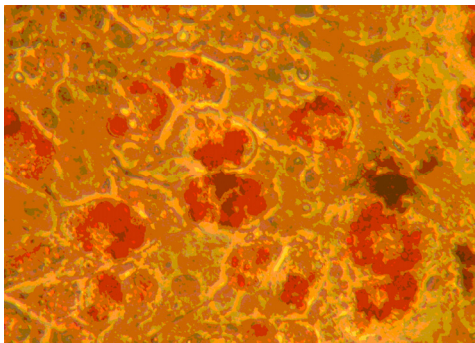


Fig. 83. Confirmarea adipocitelor diferențiate prin prezența picăturilor de lipide celulare în interiorul celulelor rotunde de dimensiuni mai mari, picăturile de lipide fiind fixate cu colorantul roșu Oil Red O

II.5.3.1. 3.4. Transfecția stabilă a preadipocitelor 3T3F442A

➤ Analiza curbei de răspuns la antibioticul G418

O populație de 2×10^5 celule 3T3 F442A netransformate a fost cultivată în fiecare dintre cele 7 flacoane T25 cm³ necesare determinării cantității optime de geneticină (G418) care ucide complet populația de celule într-un timp cât mai scurt. S-au folosit concentrații variabile de geneticină 0.01-0.07 mg/ml timp de 10 zile. La fiecare 2 zile s-a schimbat mediul de cultură cu un mediu proaspăt la care s-a adăugat cantitatea dorită de G418. Celulele au fost monitorizate zilnic folosind microscopul. Concentrația optimă determinată în urma experimentului a fost de 0.3 mg/ml G418, concentrație care s-a dovedit că ucide complet populația de celule în 10 zile.

➤ Pregătirea plasmidelor

S-au folosit următoarele plasmide: **pcDNA3 (Invitrogen)** care este un vector de 5.4Kb care conține în structura sa gena de rezistență la neomicină (anexa 8.2). Acest vector a fost folosit pentru selectarea clonelor pozitive rezultate în urma transfecției prin tratare cu G418 și **construcții plasmidiale de tipul -3038 CEBPa pGL-3basic** care conțin haplotipurile 1,2,3 și 4 precizate în introducerea capitolului 5 inserate în vectorul pGL-3 basic descris la subcapitolul 4.4.1 (anexa 8.3).

➤ Clonarea plasmidelor

S-au transformat celulele competente DH5α folosind 1 μl din vectorii pcDNA3 și construcții plasmidiale 1111, 1222, 2122 și 1122 și 50 μl de celule competente folosind protocolul descris la capitolul IV.2.1.12. Clonele selectate pozitiv pentru transformare s-au folosit în continuare pentru obținerea ADN-ului plasmidial din maxiculturi folosind kit-ul EndoFree Plasmid Maxiprep (Qiagen) cu protocolul prezentat la capitolul II.5. 2.1.8.

➤ Optimizarea procesului de transfecție stabilă a celulelor 3T3-F442A

a. Transfecția celulelor 3T3-F442A cu un singur plasmid (pcDNA3)

S-a utilizat metoda descrisă de Sambrook și colab. [352] pentru transfecția celulelor 3T3-F442A mediată de fosfatul de calciu care formează un precipitat cu ADN-ul plasmidial care se dorește a fi introdus în celulă. O populație de $0,66 \times 10^5$ celule 3T3 F442A a fost cultivată în fiecare godeu al unei plăci cu 6 godeuri. S-au utilizat cantități variabile de pcDNA3 de 0, 100, 300, 600, 900 și 1200 ng DNA care s-a adăugat la volumul corespunzător de soluție tampon 0,1 xTE așa încât să rezulte un volum final de amestec de 220 μl. La amestecul de mai sus s-au adăugat 250 μl

de soluție tampon 2xHBS (HEPES buffer) a cărui compoziție este în anexa 8.2 și 31 μ l clorură de calciu 2M adăugată foarte încet. Amestecurile de reacție s-au incubat la 21°C timp de 30 min pentru a permite formarea precipitatului. Acest amestec de reacție a fost adăugat la celule amestecând foarte încet placa pe care sunt cultivate celulele. Celulele astfel pregătite au fost incubate la 37°C timp de 4 h, după care fosfatul de calciu s-a îndepărtat prin aspirare și celulele s-au spălat cu o soluție 1xPBS (anexa 8.1). Între timp, un amestec de soluție tampon 2x HBS și soluție glicerol 30% în raport volumetric 1:1 a fost pregătit și, după spălarea celulelor cu 1xPBS, 1 ml din acest amestec s-a adăugat la fiecare godeu la un interval exact de 10 sec. Celulele au fost incubate la temperatura camerei exact 2 min, după care s-a făcut spălarea celulelor cu 4 ml de 1xPBS și s-a adăugat mediu de cultură DMEM suplimentat.

Celulele au fost menținute la incubator în condițiile descrise anterior fără antibioticul de selecție G418 timp de 24 de ore, după care s-a schimbat mediul de cultură cu un mediu nou ce conține G418 într-o concentrație de 0,3 mg/ml necesară pentru selecția pozitivă a celulelor transfectate stabil cu pcDNA3. Procesul de selecție a durat 10 zile, timp în care mediul de cultură cu antibioticul G418 era schimbat la 2-3 zile. Tratamentul cu antibiotic G418 cu o concentrație 0,3 mg/ml se aplică și după cele 10 zile, chiar dacă selecția celulelor transfectate a avut loc, pentru a fi siguri că nu există contaminări cu celulele netransformate. Procesul de optimizare a dovedit că sunt necesare cantități optime de 900 ng sau 1200 ng pcDNA3 pentru transfectarea cu succes a celulelor 3T3-F442A.

b. Cotransfecția celulelor 3T3-F442A cu pcDNA3 și construcții plasmidiale - 3038 CEBPa pGL-3bazic

S-a dorit transfecția simultană a celulelor 3T3-F442A cu pcDNA3 și un plasmid - 3038 CEBPa pGL-3bazic specific construit pentru a conține un anumit haplotip din cele precizate și anterior : 1111, 1222, 21222 și 1122. Pentru aceasta s-a folosit un amestec de pcDNA3: construct plasmidic în raport masic de 1:10. S-au utilizat cantități ale plasmidelor de 900 ng pcDNA3 : 9000 ng construct plasmidic precum și 1200ng pcDNA : 12 000 ng construct plasmidic. Procedul folosit implică aceleași etape ca în etapa anterioară și ambele situații experimentale au ca rezultat formarea unui număr mare de clone stabile cotransfectate cu ambele plasmide. S-a ales raportul de pcDNA3: construct plasmidic să fie optim și din punct de vedere economic, adică cel de 900 ng :9000ng și selectarea celulelor cotransfectate prin tratarea cu 0,3 mg/ml de G418.

II.5.3.1.4. Analiza expresia genei reporter (luciferază-luc) folosind metoda Dual-Luciferase® Reporter Assay System

Pentru a analiza expresia genei luciferază în preadipocite și adipocite complet diferențiate s-au cotransfectat preadipocitele din linia celulară 3T3-F442A cu vectorul pcDNA3 și, pe rând, cu fiecare dintre cei patru construcții plasmidiale, iar celulele transfectate stabil cu cele două plasmide au fost supuse procesului de diferențiere celulară descrisă la capitolul anterior. Metoda utilizată este Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) (Technical Manual #TM040) care utilizează două luciferaze reporter permițând măsurarea rapidă și secvențială a activității celor două luciferaze: firefly (*Photinus pyralis*) și sea pansy (*Renilla reniformis*) în lizatul celular. Ambele luciferaze sunt proteine codificate de gena luc⁺ care se găsește în secvența unor vectori specifici: luciferaza firefly este codificată de gena luc⁺ din structura vectorului pGL3-bazic, în timp ce Renilla este codificată de gena aflată în secvența vectorului pRL-TK. Reacțiile chimice care stau la baza emisiei de fotoni ca și chemiluminiscență sunt redată în fig.84. Luciferaza Renilla produce o luminiscență de 6 ordine de mărime mai mică decât Firefly și este

folosită pentru normalizarea activității relative a luciferazei Firefly. Pentru obținerea lizatului celular, 100 μ l 1xPLB (passive lysis buffer)(Promega) s-au adăugat la celulele din fiecare godeu al plăcii de 6x6 mm², această etapă fiind urmată de incubarea amestecului la temperatura camerei timp de 20 min, timp în care se amestecă ușor prin mișcarea lentă a plăcii de cultură. Din fiecare lizat celular, s-au pus 20 μ l în fiecare godeu al unui suport cu 96 de godeuri și suportul a fost plasat într-un luminometru PhL (Mediators PhL) în scopul determinării activității luciferazei. S-a utilizat un set de reactivi DLR™ (Promega) care permit măsurarea activității celor două luciferaze secvențial din aceeași probă. Prin adăugarea a 100 μ l din reactivul LAR II (Luciferase Assay Reagent II) în fiecare godeu cu lizat celular este permisă începerea și desfășurarea primei reacții din fig de mai sus și după 10 secunde cu o perioadă de precizie de 2 sec se citește activitatea luciferazei Firefly. După citirea luminiscentei, reacția se stinge prin adăugarea a 100 μ l din reactivul Stop &Glo™ care inițiază reacția catalizată de Renilla și care descrește încet în timp în decursul experimentului. Datele au fost interpretate cu ajutorul unui software specific Mediators PhL Software. Activitatea luciferazei Firefly este raportată la activitatea luciferazei Renilla pentru normalizare obținându-se astfel unități arbitrare de măsură ale activității luciferazei Firefly. Aceste unități arbitrare au fost folosite pentru a determina procentul de activitate al luciferazei Firefly raportat la constructul -3038 *CEBPa* pGL-3basic care s-a presupus a fi 100%.

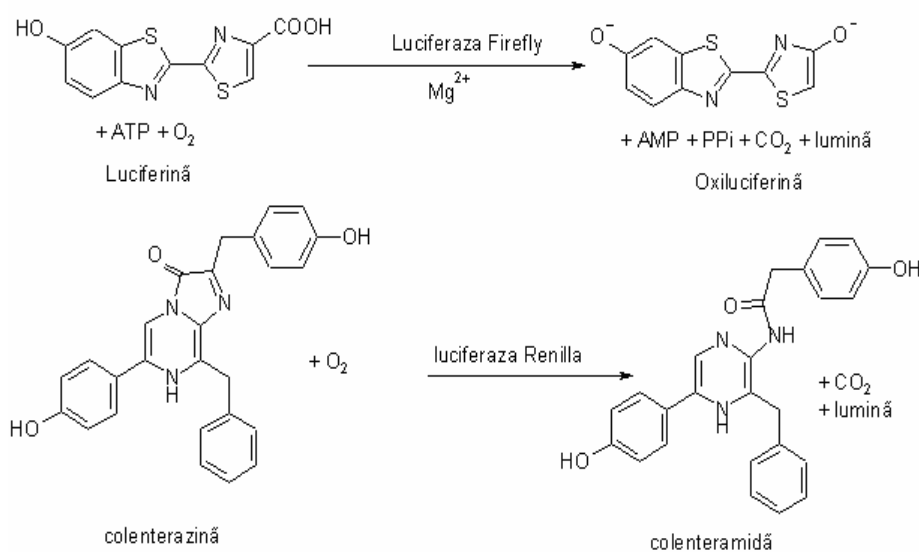


Fig.84. Reacțiile de bioluminescență catalizate de cele două luciferaze (Promega)

II.5.3.1.5. Analiza șiftului de electromobilitate (Electromobility Shift Assay-EMSA)

Metoda este folosită pentru investigarea interacțiunilor dintre proteinele nucleare și anumite secvențe reglatoare de ADN dublu catenar precum și la discriminarea diferențelor între alelele polimorfice în ceea ce privește interacțiunea cu proteinele nucleare.

Tehnica permite vizualizarea complexelor stabile proteine-ADN care migrează mai lent printr-un gel denaturant de poliacrilamidă decât oligonucleotidele necomplexate. Pentru vizualizare, metoda originală presupunea marcarea radioactivă cu ^{32}P a oligonucleotidelor dublu catenare de analizat și pentru aceasta se foloseau [γ ^{32}P]-ATP și T4 polinucleotid kinază. Această metoda însă era limitată de faptul că probele marcate radioactiv aveau o durată de viață scurtă, radiația emisă scăzând foarte repede în timp; de asemenea metoda este potențial periculoasă din punct de vedere al manipulării substanțelor radioactive. Astăzi metoda marcării fluorescente a primerilor pe catena sens la capătul 5' este din ce în ce mai folosită deoarece primerii au o durată de viață mai mare și detecția se face cu un detector de fluorescență.

Proteinele nucleare folosite în experimentele EMSA se obțin fie din extractul nuclear fie se face analiza pe întreg extractul celular. Pentru evitarea legării nespecifice a proteinelor nucleare prin adsorbție la nucleotide se utilizează un competitor nespecific poli (dI dC) care se adaugă la amestecul de reacție înaintea oligonucleotidelor marcate fluorescent și competiționează pentru legarea proteinelor nucleare cu competitorul specific reprezentat de oligonucleotidele nemarcate fluorescent.

Extracția factorilor nucleari

Pentru extracția factorului nuclear s-au utilizat celule 3T3-F442A provenind de la 5 flacoane T162 cm³ și crescute până la confluența de 100%. Dintr-unul din flacoane s-a făcut determinarea densității celulelor cu hemocitometrul dintr-un amestec de 50 μl de suspensie de celule și 50 μl colorant Tripan Blue. În vederea extracției s-a îndepărtat mediul de cultură din flacoane, s-au spălat celulele de două ori cu câte 5 ml 1xPBS, după care, pentru fiecare 1×10^6 celule/ml s-au adăugat 1 ml de tampon 1xPBS răcit în gheață. Pentru favorizarea resuspendării celulelor de pe suprafața flaconului se folosește un scalpel special. S-a distribuit suspensia de celule în tuburi Eppendorf de 1.5 ml și s-a centrifugat timp de 1 min la 4000 rpm și 4 °C. S-a îndepărtat supernatantul, iar depozitul de celule obținut în urma separării s-a resuspendat în 400 μl soluție tampon de liză A rece (anexa 8.4) și s-a menținut în gheață timp de 10 min pentru ca celulele să fie lizate. Amestecul astfel obținut a fost vortexat 10 sec și centrifugat 10 sec la 14 000 rpm și 4 °C. Depozitul obținut în urma centrifugării care conține nucleii s-a resuspendat în 100 μl soluție tampon C (anexa 8.4) și incubat 20 min în gheață pentru liza nucleilor. Amestecul obținut în urma acestor etape a fost centrifugat 2 min la 14 000 rpm și 4 °C. Supernatantul care conține factorii nucleari a fost folosit pentru cuantificarea cantității de proteină totală cu nanodrop-ul, după care a fost transferat în tuburi Eppendorf în volume de 40 μl respectiv 80 μl necesare unei analize EMSA și păstrate la -80 °C.

Designul oligonucleotidelor

Oligonucleotidele utilizate în EMSA sunt concepute așa încât fiecare secvență oligonucleotidică fie că este în sens, fie că este în antisens, conține în mijlocul său alela polimorfică de interes iar de o parte și de alta a acesteia câte 14 baze. În EMSA sunt necesari primeri fluorescenți marcați cu un colorant fluorescent la capătul 5' al secvenței sens iar competitorii specifici sunt primeri nemarcați fluorescent. Primerii au fost procurați de la Invitrogen. Secvențele oligonucleotidelor folosite pentru investigarea celor patru polimorfisme -2970G/A, -2269 C/T -1801C/T, -1050 C/G sunt prezentate în tabel 69.

Oligonucleotide SP1 care reprezintă competitorul nespecific sunt obținuți prin bunăvoința doamnei Amy Jones, PhD student la Departamentul de Medicină Moleculară Vasculară al laboratoarelor Light.

Oligonucleotidele de interes trebuie să fie dublu catenare pentru a interacționa cu proteinele nucleare. Generarea ADN-ului dublu catenar de interes s-a făcut parcurgând următoarele etape.

- s-au amestecat volume egale de oligonucleotide sens și antisens, fiecare cu concentrația de 100 ng/ μ l
- amestecul de primeri a fost încălzit la 100 °C timp de 10 minute după care a fost răcit lent la frigider peste noapte
- pentru a verifica formarea ADN-ului dublu catenar, oligonucleotidele pregătite anterior au fost supuse migrării electroforetice în gel de agaroză 1% timp de 30 min și vizualizate în lumină UV :

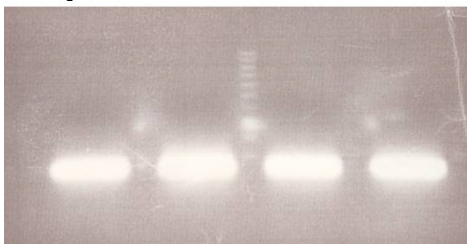


Fig.85. Rezultatele migrării electroforetice ale primerilor corespunzători polimorfismului -2970 A/G în gel de agaroză 1% în comparație cu markerul ADN Superladder low 100 bp

- s-a decupat din gel banda corespunzătoare fiecărui primer și s-a purificat ADN-ul din gel cu ajutorul unei coloanțe de separare Costar Spin X Column proces care implică doar centrifugarea coloanței în care s-au pus porțiuni cât mai mici de gel la viteza maximă timp de 20 minute. Impuritățile rămân pe coloanță iar soluția de ADN rezultată în urma centrifugării este supusă unui proces ulterior de purificare cu etanol urmând etapele descrise la capitolul II.6.1.1.4. dar folosind un raport volumetric 1:2:0.1 de soluție ADN: etanol 95%: acetat de sodiu 3M (pH=4,6).
- Soluția de ADN purificat este supusă cuantificării cu nanodropul, concentrația fiind exprimată în μ g/ μ l.

Tabel 69. Secvența oligonucleotidelor folosite în EMSA cu precizarea că acești primeeri sunt nemarcați fluorescent. Adițional, pentru fiecare alelă a fiecărui polimorfism s-a comandat un primer fluorescent pe secvența forward

Alela	Secvența oligonucleotidică (5' → 3')
-2970G	F CAG CCC TGT CTG CGG ATC CAG CCT TAT CT R AG ATA AGG CTG GAT CCG CAG ACA GGG CTG
-2970A	F CAG CCC TGT CTG CGA ATC CAG CCT TAT CT R AG ATA AGG CTG GAT TCG CAG ACA GGG CTG
-2269 C	F AA TGA AGT CCC ATC CCC TAC TCC TTC TGT R ACA GAA GGA GTA GGG GAT GGG ACT TCA TT
-2269 T	F AA TGA AGT CCC ATC TCC TAC TCC TTC TGT R ACA GAA GGA GTA GGA GAT GGG ACT TCA TT
-1801C	F AC CGC AGA AAA AAA CGC AAA TCG CTC TTG R CAA GAG CGA TTT GCG TTT TTT TCT GCG GT
-1801T	F AC CGC AGA AAA AAA TGC AAA TCG CTC TTG R CAA GAG CGA TTT GCA TTT TTT TCT GCG GT
-1050C	F GA GTT CTC CCT GTG CGT GCT CGG ACC TGG

	R CCA GGT CCG AGC ACG CAC AGG GAG AAC TC
-1050G	F GAG TTC TCC CTG TGG GTG CTC GGA CCT GG R CCA GGT CCG ACC ACC CAC AGG GAG AAC TC
SP1	F ATT CGA TCG GGG CGG GGC GAG C R TAA GCT AGC CCC GCC GCC CCG CTC G

Optimizarea EMSA

Optimizarea reacțiilor EMSA s-a realizat cu scopul de a determina concentrația optimă a primerilor care trebuie folosită pentru formarea complexelor ADN-proteine nucleare. S-au folosit diferite concentrații ale primerilor: 0,015; 0,03; 0,04 și 0,06 pmoli/ μ l și diferite cantități de nuclear extract : 10, 25, 40 și 80 μ g . Valorile optime determinate au fost pentru o concentrație a primerilor fluorescenți de 0,06 pmoli/ μ l și o cantitate de 80 μ g de extract nuclear (40 μ l).

Pentru fiecare reacție s-au utilizat 50 μ l apă bidistilată sterilă și volumul dorit de extract nuclear la care s-au adăugat 1 μ l poli (dIdC) și 40 μ l din soluția tampon (binding buffer) necesară formării complexelor ADN-proteine (anexa 8.5). Amestecul s-a incubat 10 min. în gheață, apoi s-au adăugat primerii fluorescenți incubându-se 30 min la temperatura camerei pentru a permite formarea complexelor respective. Pentru a îndepărta excesul de persulfat de amoniu folosit la prepararea gelului, a avut loc mai întâi o premigrare fără a avea probele în godeuri la 15 $^{\circ}$ C și 300 V timp de 15 min în soluție tampon 0,25 x TBE (vezi compoziția în apendix nr. 12), după care s-au spălat godeurile cu tampon 0,25 x TBE și s-a încărcat 40 μ l din fiecare amestec de reacție în godeurile din gel. Probele astfel încărcate pe gel au fost supuse migrării electroforetice într-un gel nednaturant de poliacriamidă 5% (anexa 8.5) folosind soluție tampon 0,25 x TBE.

Reacțiile de competiție EMSA

Reacțiile de competiție s-au desfășurat pentru a evidenția diferențele în legarea proteinelor nucleare la secvența dorită de ADN determinate de existența celor două alele polimorfice de interes la nivelul secvenței ADN ce cuprinde polimorfismul studiat. S-au desfășurat reacții de competiție între alelele -2970G și A, -2269 C și T -1801C și T, -1050 C și G. La reacțiile de competiție EMSA participă: apa bidistilată sterilă, volumul optim de extract nuclear, poli (dI-dC), tamponul în care se desfășoară reacția de formare a complexului ADN-proteină și cantitatea optim determinată de primeri fluorescenți specifici fiecărei alele așa cum au fost descrise anterior. Se mai folosesc : competitorul specific care este primerul nemarcat fluorescent ce conține alela analizată și care competiționează cu primerul fluorescent pentru legarea proteinelor nucleare, cross-competitorul reprezentat de primerul nemarcat fluorescent care conține cealaltă alelă corespunzătoare polimorfismului analizat și care poate competiționa sau nu cu primerul fluorescent conținând cealaltă alelă pentru legarea extractului nuclear. De asemenea s-a mai folosit un competitor nespecific care este SP1 Consensus oligo care corespunde unui factor de transcripție O-glicozilat care conține în situsul său de legare a ADN 3 structuri de tip deget de zinc. Compoziția amestecurilor de reacție folosite pentru discriminarea alelică este notată în tabelul 70.

Tabel 70. Volumele participanților la reacțiile de competiție EMSA folosite la discriminarea diferențelor între două alele ipotetice A și B ale unui polimorfism studiat, unde marcat A reprezintă primerul marcat fluorescent specific alelei a , nemarcat A sau B reprezintă primerii nemarcați fluorescent specifici celor două alele

Reacția	Apă bidistilată sterilă (μl)	Poli (dI-dC) (μl)	Soluție tampon (μl)	Competitor (pmoli)	Extract nuclear (μl)	Primer fluorescent
Control negativ	X	1	40	-	40	1.5 pmoli
Control pozitiv	X	1	40	-	40	1.5 pmoli
Marcat A + 1x competitor nemarcat A	X	1	40	1,5 nemarcat A	40	1.5 pmoli
Marcat A + 3x competitor nemarcat A	X	1	40	4,5 nemarcat A	40	1.5 pmoli
Marcat A + 5x competitor nemarcat A	X	1	40	7,5 nemarcat A	40	1.5 pmoli
Marcat A + 1x cross competitor B nemarcat	X	1	40	1,5 nemarcat B	40	1.5 pmoli
Marcat A + 3x cross competitor B nemarcat	X	1	40	4,5 nemarcat B	40	1.5 pmoli
Marcat A + 5x cross competitor B nemarcat	X	1	40	7,5 nemarcat B	40	1.5 pmoli
Marcat A + 1x competitor nespecific SP1	X	1	40	1,5 nemarcat SP1	40	1.5 pmoli
Marcat A + 3x competitor nespecific SP1	X	1	40	4,5 nemarcat SP1	40	1.5 pmoli
Marcat A + 5x competitor nespecific SP1	X	1	40	7,5 nemarcat SP1	40	1.5 pmoli

II.5.3.2.REZULTATE ȘI DISCUȚII

Analiza computațională a 3000 bp din promotorul genei C/EBPa și a ARNm corespunzător genei C/EBPa

1. Localizarea cromozomială a genei C/EBPa

Genă **C/EBPa** este localizată la nivelul cromozomului 19 poziția q13.1 (fig.86). Folosind motorul de căutare NCBI Entrez (www.ncbi.nlm.nih.gov/ENTREZ/) s-a localizat un fragment de 3000 bp din promotorul **C/EBPa** la nivelul clonei CTD-2540B15, AC.008738.6, NT_011109 cu ajutorul secvenței cu numărul de acces U34070 folosind programul NCBI BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)

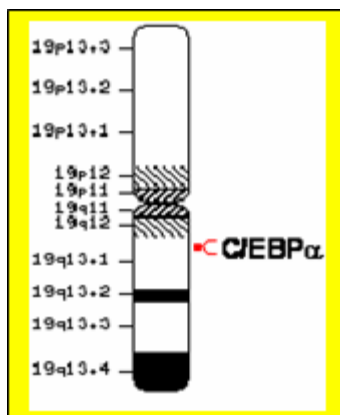


Fig. 86. Poziția genei *C/EBPα* la nivelul cromozomului 19 uman obținută din baza de date NCBI Entrez

Deoarece secvența AC.008738.6 a fost adaptată la AC.008738.7, am comparat cele două secvențe folosind programul BLAST2Sequences (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html) și am constatat că secvențele promotorilor corespunzătoare celor două secvențe sunt în antisens, dar nu există diferențe la nivel nucleotidic. În continuare, am considerat pentru analizele bioinformatiche ulterioare secvența AC.008738.6. Studiind contextul genomic în care se află gena *C/EBPα* realizat cu MapViewer de la NCBI Entrez (www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/mapscgi?ORG=hum&MAPS=ideogr,10C&VERBOSE=ON&CHR=19) arată existența unei gene corespunzătoare unei proteine ipotetice FLJ12355 la nivelul locusului 19q13.12 al cărei mRNA este în antisens față de secvența sens a promoterului genei *C/EBPα* (start -624; stop -1091).

2. Identificarea situsurilor FT existente în promotorului *C/EBPα*

A fost analizată o regiune din promotorul genei *C/EBPα* de 3000 bp reprezentând secvența genomică "wild-type". Au fost analizate pe rând fragmente de câte 500 bp din această secvență. Au fost identificate cu ajutorul programului MatInspector mai multe elemente cu potențial reglator mare. Printre ele se află unele elemente care au mai fost menționate în literatură ca fiind implicate în reglarea expresiei *C/EBPα* în adipogeneză : Sp-1 și Sp-3, PPAR γ , USF, COUP/AP-2 α , CREB, E2F, TCF-4, STAT5A. În plus au fost identificate situsuri pentru recunoașterea și legarea factorilor de transcripție hepatocitari HNF-1 și HNF-4, precum și pentru proteina p53, Egr-1, Ap-4, GATA-1, Oct-1, cMyb și NF-k β .

Regiunea de 3000 bp din secvența promotorului *C/EBPα* uman conținând cele 4 situsuri polimorfice identificate de Claire Bennet (Light Laboratories, University of Leeds, UK) a fost analizată și ea cu programul MatInspector iar situsurile create sau distruse de existența polimorfismului în pozițiile respective din secvența promotorului sunt prezentate în tabelul nr.71. Polimorfismul -2970 G/A nu distruge nici un situs corespunzător unui factor de transcripție. Polimorfismul -2269 C/T nu creează nici nu distruge nici un situs de legare a vreunui factor de transcripție. Polimorfismul -1801 C/T, prin prezența alelei rare T generează un situs de legare Oct-1. Existența alelei comune C corespunzătoare polimorfismului -1050 C/G determină existența unui situs slab de recunoaștere pentru p53 și a unui situs

DRE/XRE (ARNT), în timp ce alela rară G crează un situs Gli-1 care, în această situație, va fi conservat la toate cele trei speciile.

Tabel 71. Situsurile de recunoaștere și legare a factorilor de transcripție din secvența promotorului C/EBPa create sau distruse de existența alelelor rare corespunzătoare polimorfismelor de interes

Alela polimorfica	Factorul de transcripție	Secvența de recunoaștere (5`-3`)	Situsul predictiv de legare a FT în secvența ADN a promotorului C/EBPa	Localizarea situsului identificat în secvența promotorului
-2269 C	MZF1	GAGGGGAA Morris J. Et al., 1994	taGGGGatg	-2273-2265
-1801 T	Oct-1	ATGCWAAT Lundback et al., 2000 Van Leuwen et al.,1997	aaaATGCAATcgc	-1802-1796
-1050 G	Gli-1	AGGGTGCTC Dahmane et al., 1997	ctgTGGGTGCTGgg	-1052-1044
-1050 C	p53	GGACATGCC Funk et al.,1992	cctGTGCGTGCTCgga	-1053-1044
-1050 C	DRE/XRE	TNGCGTG Swanson et al., 1992	tGTGCGTGctc	-1053-1047

3. Compararea secvențelor nucleotidice ADN corespunzătoare promotorilor genei C/EBPa la om, șoarece și șobolan

Ca și în cazul analizei computaționale a genei EC-SOD, și în acest caz s-au folosit toate cele trei programe computaționale Foot Printer (<http://bio.cs.washington.edu/software>), PIPMaker (<http://bio.cse.psu.edu>), Clustal W (www.ebi.ac.uk) pentru compararea celor trei secvențe (un fragment de 3000 bp din promotorul genei C/EBPa umane și fragmente de câte 3000 bp din promotorul genei C/EBPa provenind de la șoarece și șobolan). Programul PIP Maker [259] a fost folosit pentru compararea a câte două secvențe (om-șoarece, om-șobolan și șoarece-șobolan). Rezultatul comparației șoarece – șobolan a arătat că există mai multe fragmente care se aliniază cu un scor de similaritate de 85% între promotorul genei C/EBPa la cele două specii, comparativ cu similaritățile om-șobolan și om-șoarece care arată un număr mic de fragmente aliniate care au identitate mai mică de 75%. Aceste scoruri de similaritate sunt în concordanță cu analiza Clustal W care a arătat un scor obținut în urma alinierii secvențelor umane, murine și celei provenind de la șobolan de 40% (om-șoarece), 41% (om-șobolan) și 85% (șoarece-șobolan).

Analiza Foot Printer (<http://bio.cs.washington.edu/software>) [260] a celor 3000 bp din promotorul genelor C/EBPa provenind de la om, șoarece și șobolan s-a realizat prin compararea a câte 500 bp din secvențele respective, programul realizând compararea succesivă pe ferestre de câte 100 bp în scopul identificării de motive

structurale (10 bp) conservate la cele trei specii de-a lungul evoluției. (anexa 9.1) Aceste motive conservate au o probabilitate mare de a fi funcționale .

Analiza fragmentului cuprins între -3000 bp și -2500 bp a dus la identificarea a două clustere cu motive structurale conservate la cele trei specii analizate. Identificarea secvențelor corespunzătoare acestor motive structurale și compararea cu rezultatele analizei Genomatrix au condus la poziționarea GATA box pe catena (-) cu o similaritate cu secvența centrală de recunoaștere 5`-GATAR-3` de 1.000. Polimorfismul **-2970 G/A** nu se află într-o secvență cu grad mare de omologie (anexa 9.2).

Analiza fragmentului cuprins între -2500 bp și -2000 bp (anexa 9.3) a arătat o mare similaritate între șoarece și șobolan la nivelul fragmentelor analizate, identificându-se **7 clustere omoloage**. La nivelul secvenței umane, s-a regăsit **un cluster** omolog cu cel de la șoarece și șobolan. La nivelul acestui cluster nu s-a identificat nici un situs de legare pentru vreun factor de transcripție. Rezultatele analizei Clustal W indică faptul că situsul polimorfic **-2269 C/T** se află într-o regiune cu omologie mică, prezența alelei rare, care se regăsește la secvența corespunzătoare de la șoarece și șobolan distruge un situs **MZF1**.

Analiza fragmentului cuprins între -2000 bp și -1500 bp (anexa 9.4) a relevat **7 clustere** conservate la nivelul fragmentelor analizate. Acest fapt denotă că aceste regiuni manifestă un potențial reglator semnificativ. Studiindu-se situsurile posibile pentru FT din aceste regiuni s-a identificat numai un situs slab de legare pentru **HNF-4** cu secvența 5`-CAGAG-3` (secvența de recunoaștere este 5`-CAWAR-3`, [343]). Este posibil ca acest situs să nu funcționeze ca situs de recunoaștere și legare a HNF-4 sau să aibă un efect mic în reglarea transcripției genei C/EBPa. Alinierea Clustal W în vederea stabilirii omologiei regiunii care cuprinde polimorfismul **-1801 C/T** a relevat faptul că polimorfismul este poziționat într-o regiune cu omologie mică, iar prezența alelei rare -1801T duce la conservarea alelei ancestrale T. Situsul de recunoaștere (5`-ATGCWAAT-3`), pentru **Oct-1** [265,266] generat de existența alelei rare -1801T în secvența umană nu se menține și în cazul celorlalte două secvențe.

Analiza fragmentului cuprins între -1500 bp și -1000 bp (anexa 9.5) a arătat și în acest caz un înalt grad de similaritate între secvența promotorului C/EBPa la șoarece și șobolan. Secvența umană prezintă omologie relativ scăzută cu secvențele corespunzătoare celorlalte două specii. Din cele **10 clustere** identificate la nivelul secvențelor provenite de la rozătoare numai primele 6 sunt conservate și la secvența umană. Folosirea combinată a metodelor computaționale a demonstrat existența unui situs pentru recunoașterea și legarea **USF** (factor de stimulare din amonte) conservat la cele trei specii conform secvenței de recunoaștere 5`-NNCACGTGNN -3` [307]. Acest lucru subliniază importanța acestui factor de transcripție în reglarea transcripției C/EBPa. Situsul de recunoaștere pentru **Sp-1** este conform celei descrise în literatură (5`-GGGCGG-3`-[310]) pentru secvența umană, iar pentru șoarece și șobolan diferă printr-o bază. Poziționarea situsului pentru Sp-1 în clustere de înaltă omologie la șoarece și șobolan în timp ce la om este într-o regiune cu un grad mic de omologie precum și situsul de recunoaștere mai slab sugerează că este posibil ca acest situs să nu funcționeze ca și situs de recunoaștere pentru Sp-1. În ceea ce privește analiza regiunii care cuprinde situsul polimorfic -1050C/G s-a constatat că prezența alelei comune C generează un situs bipartit pentru **p53 și DRE/XRE**. Situsurile de recunoaștere descrise în literatură pentru cei doi factori sunt: 5`-GGACATGCC-3` [295] respectiv 5`-TNGCGTG-3` [353]. Prezența alelei rare G (prezență de altfel la șoarece și șobolan) crează un situs de recunoaștere a factorului **Gli-1** (5'-AGGGTGCTC-3';[354]). Poziționarea

acestui situs la nivelul clusterului 24 la șoarece și șobolan , sugerează că această regiune poate fi implicată în reglarea expresiei genei *C/EBPa*. Toate acestea indică un posibil rol reglator al factorilor p53, DRE/XRE și Gli-1 în reglarea expresiei genei *C/EBPa*.

Analiza fragmentului cuprins între -1000 bp și -500 bp a pus în evidență **4 clustere** formate din mai multe motive conservate care evidențiază această regiune ca fiind de mare omologie la toate cele trei specii. Analiza fragmentului a evidențiat existența unei **casete GC** care are similaritate cu secvența centrală de recunoaștere de 1.000 (5'-GGGNG-3';[269]) ceea ce sugerează un potențial reglator ridicat al acestui factor de transcripție. Analiza a reflectat faptul că situsul de legare **E2F** la secvența umană diferă de secvența de recunoaștere (5'-SGCSSAAA-3'; [276]) ceea ce denotă că acest situs este slab, deci E2F are potențial reglator mai redus în această situație. S-a mai identificat o secvență **TATA box** în cazul secvenței umane, care se află într-o regiune omoloagă cu secvențele rozătoarelor dar situsul de recunoaștere în cazul acestora nu corespunde cu secvența de recunoaștere (5'-TATAAA-3',[269]), ceea ce demonstrează că este puțin probabil ca situsul să fie funcțional.

Analiza fragmentului cuprins între -500 bp și +1bp a evidențiat regiunea ca fiind una de omologie ridicată în care s-au identificat **10 clustere** de înaltă omologie. Poziționarea acestui fragment de 500 bp în proxima vecinătate a punctului de start al transcripției face din aceasta o regiune foarte importantă din punct de vedere al reglării procesului de transcripție. Rezultatele Foot Printer și Genomatrix au demonstrat existența mai multor situsuri necesare legării factorilor de transcripție (Sp-1, p53, TATA box, USF, E2F) în clusterelor de înaltă omologie identificate la cele trei specii. Situsul corespunzător lui **p53** are o probabilitate mai mică de a fi funcțional deoarece situsul existent în secvență 5`-GGACAGGCCT-3` diferă cu două nucleotide față de situsul de recunoaștere existent în literatură 5`-GGACATGCCC-3` [295]. De asemenea situsul de recunoaștere pentru **Sp-1** este poziționat într-o regiune conservată, dar situsul corespunzător pe secvența umană de recunoaștere 5`-CCGCCC-3` diferă de cel identificat pe celelalte două secvențe și de asemenea, situsul de recunoaștere este slab comparativ cu secvența consensus: 5`-GGGCGGG-3` [310], ceea ce indică faptul că acest factor de transcripție are probabilitate destul de mică de a fi funcțional. Factorul nuclear hepatic, **HNF-4**, a fost identificat prin programul MatInspector de la Genomatrix în secvența umană cu probabilitate mică de a fi funcțional fiind parțial conform cu secvența de recunoaștere (5`-CAWAR-3`, [343]). Deși situsurile de recunoaștere a **HNF-4** , parțial conforme cu secvența de recunoaștere descrisă în literatură, s-au regăsit la nivelul clusterului 35 la șoarece și șobolan, la om acesta nu s-a regăsit la nivelul vreunui motiv structural conservat identificat cu programul Foot Printer așa cum se poate vedea în anexa 6. Caseta **TATA-box** identică cu secvența de recunoaștere descrisă în literatură 5`-TATAAA-3`, a prezentat un grad înalt de omologie la toate cele trei specii. Caseta TATA a fost identificată la nivelul clusterului 39, fiind identificată anterior și de Timchenko și colab., subliniind încă o dată rolul important în inițierea procesului de transcripție al acestui situs poziționat în regiunea proximală a promotorului. S-au mai identificat de asemenea situsuri pentru legarea factorilor de transcripție **USF** (factorul de stimulare din amonte) și **WT1** (supresorul tumoral Wilms) ale căror secvențe specifice prezintă o mare omologie la toate cele trei specii. Secvențele de recunoaștere identificate în secvențele analizate pentru legarea USF și WT1 corespund celor descrise în literatură : 5`- NNACGTGNN -3` [307] respectiv 5`-CGCCCCGC-3` [355] ceea ce denotă o probabilitate mare ca acești factori să fie funcționali.

4. Insulele CpG la nivelul promotorului genei C/EBPa provenită de la om, șoarece și șobolan

Pentru identificarea zonelor cu potențial reglator prin metilarea/demetilarea resturilor de citozină din cadrul insulelor CpG, s-a folosit programul și metoda descrise la capitolul II.5.1.1.8.. La nivelul promotorului uman C/EBPa s-au identificat patru insule CpG așa cum este prezentat în tabelul 72, iar la nivelul promotorului C/EBPa de la șoarece și șobolan 4 respectiv 5 insule cu pozițiile notate în tabelele 73-74.

Tabel 72 Insulele CpG în promotorul C/EBPa uman

Nr. crt	Numărul de perechi de baze	Poziția în promotor	Conținutul % CG	Raportul Obs./Exp.
1	56	De la -1840 la -1735	53,57 %	0,77
2	103	De la -1494 la -1392	59,52%	0,78
3	1078	De la -1367 la -290	70,78%	0,82
4	274	De la -280 la -7	80,66%	0,98

Tabel 73. Insulele CpG în promotorul C/EBPa la șoarece

Nr. crt	Numărul de perechi de baze	Poziția în promotor	Conținutul % CG	Raportul Obs/Exp
1	337	De la -1326 la -1090	64,09 %	0.93
2	537	De la -992 la -455	63,13%	0.77
3	183	De la -334 la -152	65,57%	0,77
4	76	De la -131 la -56	61,84%	0,69

Tabel 74. Insulele CpG în promotorul C/EBPa la șobolan

Nr. crt	Numărul de perechi de baze	Poziția în promotor	Conținutul % CG	Raportul Obs/Exp
1	295	De la -1479 la -1115	63,05%	0,76
2	163	De la -1061 la -899	59,51%	0.70
3	205	De la -862 la -658	60,00%	0.77
4	159	De la -604 la -446	57,86%	0.91
5	173	De la -316 la -144	68,21%	0,85

Se observă că regiunile analizate au un conținut ridicat de GC, la promotorul uman identificându-se 2 insule largi cu un conținut de 70,78% GC respectiv 80,66%. Din analiza promotorilor genei C/EBPa pentru toate cele trei specii se observă că regiunile ADN bogate în GC la nivelul cărora se poziționează insulele 3 și 4 (de la -1367 bp la -290 bp, respectiv de la -280 la -7) de la promotorul uman (sau parte din aceste insule) se regăsesc la nivelul promotorului genei C/EBPa de la șoarece (insulele 1, 2 și 3) și promotorului C/EBPa de la șobolan (insulele 1, 2 și 5) ceea ce indică un posibil rol reglator al acestor regiuni asupra expresiei genei C/EBPa.

5. Compararea secvențelor ARNm corespunzătoare C/EBP α la om, șoarece și șobolan

Pentru compararea secvențelor ARNm corespunzătoare C/EBP α de la om, șoarece și șobolan în vederea identificării regiunilor cu înaltă omologie la nivelul secvențelor s-au folosit secvențele din baza de date NCBI Entrez cu numerele de acces : NM_004364.2 (homo sapiens), NM_007678.3 (mouse) și NM_012524.2 (rattus norvegicus). Pentru rezultate vezi anexa 9.5. Fragmentele analizate cuprinse între codonul ATG start corespunzător proteinei p42^{C/EBP α} și codonul stop au lungimi de 1077 bp (om), 1080 bp (șoarece) și respectiv 1077 bp (șobolan). Analiza PipMaker [259] a celor 3 secvențe ARNm a indicat, așa cum arată diagramele pip și dot-plot din fig. nr un scor de similaritate mai mare de 75% între secvențele ARNm om-șobolan (procent de match 89%) și om-șoarece (procent de match 79%) și un scor de similaritate aproape de 90% între șoarece și șobolan (procent de match 95%), procent confirmat și de alinierea Clustal W: om-șoarece (82%), om-șobolan (82%) și șoarece-șobolan (95%). Rezultatele alinierii Clustal W [263] arată conservarea codonului start corespunzător proteinelor p42^{C/EBP α} , p38^{C/EBP α} , p30^{C/EBP α} , p20^{C/EBP α} . Domeniul de transactivare prezintă cea mai mică omologie în timp ce domeniul de legare a ADN-ului și domeniul fermoar de leucină prezintă cea mai mare omologie. Sunt conservate de asemenea cele 7 resturi de leucină așa cum este prezentat în anexa 9.5.

Evaluarea capacității reglatoare a promotorului C/EBP α (sălbatic și mutant) la nivelul expresiei/activității unei gene reporter in vivo în preadipocite și adipocitele mature murine (3T3-442A)

În această parte experimentală a lucrării s-au verificat existența insertului corect corespunzător haplotipurilor de interes ce conțin situsurile polimorfice prezentate în tabelul nr. 67 prin amplificarea PCR urmată de digestie enzimatică și obținerea unui stoc de plasmide prin metoda Maxiprep. După ce existența insertului corect a fost validată, s-au pregătit celulele 3T3-F442 în vederea efectuării co-transfecției stabile cu construcții plasmidiale de interes și cu vectorul pcDNA3, s-a realizat co-transfecția stabilă, selecția celulelor cotransfectate cu antibiotic G418 și diferențierea celulelor transfectate de la preadipocite la adipocite, după care s-a măsurat activitatea luciferazei aflată sub controlul promoterului analizat prin metoda Dual-Luciferase Reporter Assay, urmărindu-se investigarea influenței polimorfismelor analizate asupra activității promoterului în preadipocite și adipocitele complet diferențiate.

Verificarea existenței insertului corect în cei 4 construcți plasmidici -3038 C/EBP α pGL3-bazic

Verificarea existenței insertului s-a realizat prin amplificarea PCR a unui fragment din promoterul C/EBP α , selectându-se pozitiv câte 7 clone în urma transformării celulelor DH5 α cu fiecare dintre construcții plasmidici analizați. 2 μ l din soluția ADN rezultată prin suspensia clonelor selectate pozitiv în apă bidistilată sterilă au fost supuși reacției de amplificare PCR cu primer PR-2 în condițiile prezentate anterior. După vizualizarea fragmentelor ADN în urma migrării electroforetice în gel de agaroză 1% s-a observat că celulele transformate cu constructul 1222 (corespunzător haplotipului 2) nu conțin insertul dorit și s-au reamplificat (vezi fig. 87). Câte două din clonele pentru care s-a demonstrat existența insertului la fiecare dintre construcții analizați s-au folosit în continuare pentru purificarea ADN-ului

plasmidial cu metoda Miniprep kit (Qiagen) descrisă anterior. S-a cuantificat ADN-ul corespunzător cu nanodropul determinându-se concentrația ADN-ului în ng/ μ l.

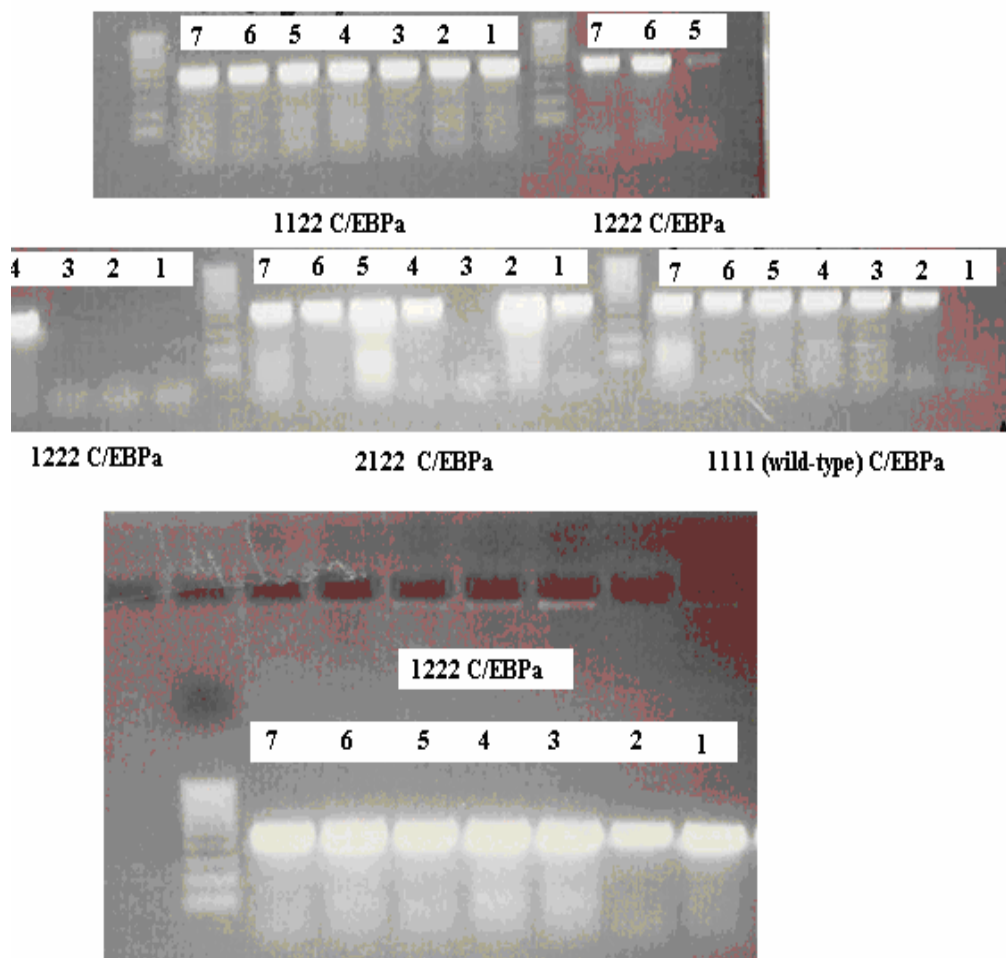


Fig. 87. Amplificarea PCR a ADN-ului plasmidial care conține numărul clonei și tipul constructului notate direct pe fotografia obținută cu Chemi-Imager system software (Alpha Innotech Corp) ; Markerul ADN pentru compararea mărimii fragmentelor ADN este Superladder low 100 bp (ABgene)

Pentru verificarea existenței alelelor polimorfice dorite la cei patru construcții plasmidiale s-a efectuat mai întâi amplificarea PCR a patru fragmente diferite din fiecare tip de plasmid fiecare conținând câte unul cele patru polimorfisme de interes (așa cum este prezentat în tabelul nr.64). Rezultatele reacției PCR au fost observate în urma migrării electroforetice în gel de agaroză 1% (fig.88).

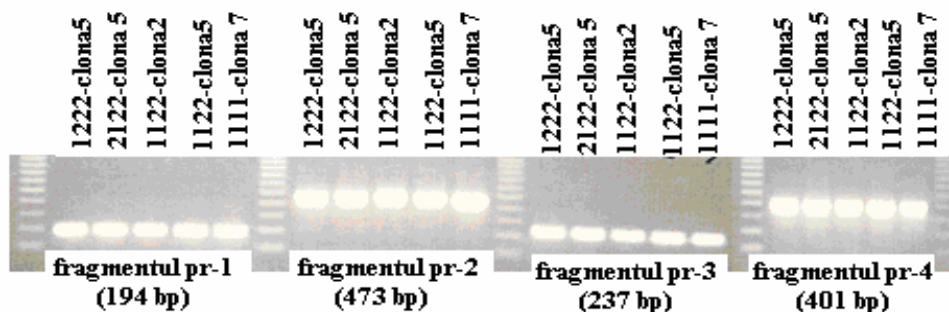


Fig. 88. Vizualizarea fragmentelor ADN rezultate în urma reacțiilor PCR; primerii, tipul constructului și numărul clonei din care provine ADN-ul folosit la amplificare sunt notați pe fotografie; Markerul ADN pentru compararea mărimii fragmentelor ADN este Superladder low 100 bp (ABgene)

Reacțiile de restricție enzimatică cu enzimele de restricție specific alese pentru evidențierea polimorfismelor de interes s-au desfășurat în condițiile notate în tabelul 75.

Cantitățile de enzimă au fost optimizate destul de greu, cantitățile determinate ca fiind optime sunt foarte mari deoarece enzimele aveau o vechime considerabilă și de aceea s-a lucrat cu cantități mari de enzimă pe un volum de reacție de 25 μ l care conține doar 5 μ l produs PCR, tampon de reacție 1x, enzimă corespunzător tabelului nr. 69 și restul apă bidistilată sterilă. Producții rezultate în urma reacțiilor de restricție enzimatică în fiecare caz în parte sunt notați în tabelul 75.

Tabel 75. Producții rezultate în urma reacțiilor de restricție enzimatică în prezența alelelor comune și rare ale polimorfismelor considerate

Enzime de restricție	Regiunea / polimorfismul investigate	Secvența de recunoaștere (5' – 3')	Mărimea produsului PCR (bp)	Mărimea fragmentelor rezultate în urma reacției de restricție enzimatică
<i>BamH I</i>	PR- 4 (-2970G/A)	G [^] GATCC	237	alela G: 9 bp, 163 bp, 65 bp alela A: 9 bp , 228 bp
<i>Fok I</i>	PR-2 (-2269C/T)	GGATG(N ₉ / ₁₃) [^]	473	Alela C: 57 bp , 90 bp, 108 bp, 218 bp Alela T: 90 bp, 165 bp, 218 bp
<i>BstU I</i>	PR1gn (-1801C/T)	CG [^] CG	194	Alela C: 24 bp, 170 bp Alela T: 194 bp
<i>Cac8 I</i>	Pr2 (-1050 C/G)	GCN [^] NGC	401	Alela C: 90 bp, 179 bp, 132 bp Alela G: 90 bp , 311 bp

Fragmentele obținute în urma reacțiilor de restricție enzimatică au fost verificate prin separare în urma migrării electroforetice în gel de agaroză 2%, vizualizate în UV și secvențializate.

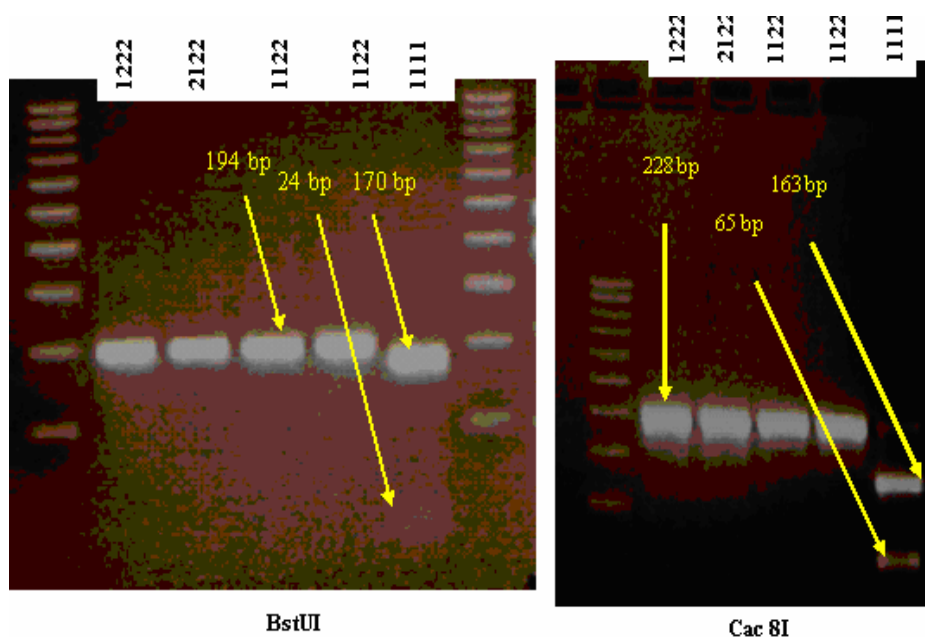


Fig. 89. Vizualizarea fragmentelor ADN rezultate în urma reacției de digestie cu enzimele BstUI și Cac8I; Markerul ADN pentru compararea mărimii fragmentelor ADN este Superladder low 100 bp (ABgene)

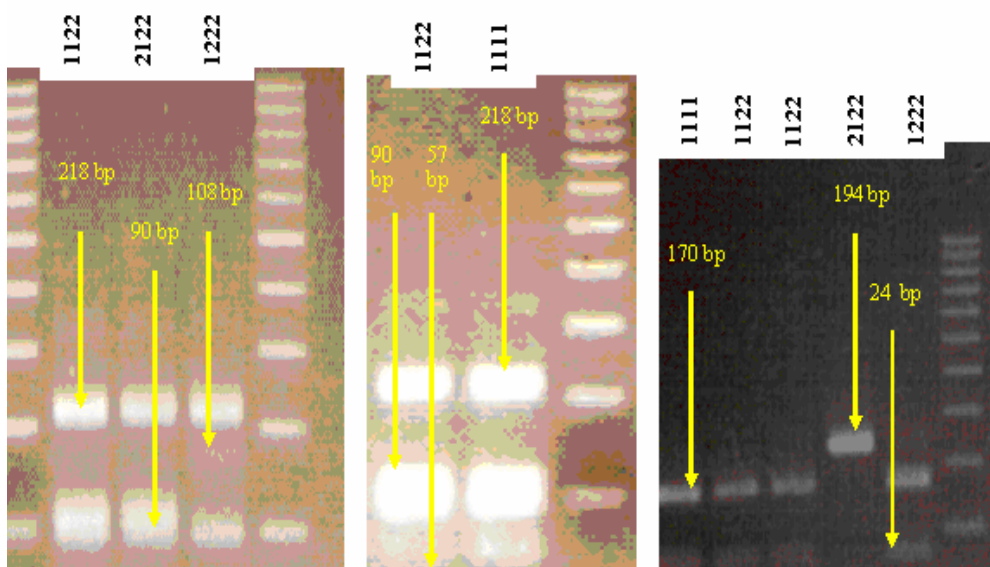


Fig. 90 . Vizualizarea fragmentelor ADN rezultate în urma reacției de digestie cu enzimele BamHI și Fok I; Markerul ADN pentru compararea mărimii fragmentelor ADN este Superladder low 100 bp (ABgene)

S-a constatat că fiecare construct plasmidial conține insertul dorit și alela de interes corespunzătoare haplotipului considerat.

Rezultatele analizei activității genei reporter aflată sub controlul regiunii promotor C/EBPa în construcții plasmidici -3038 C/EBPa pGL3-bazic folosind metoda Dual-Luciferase® Reporter Assay System

Expresia genei reporter s-a determinat în două momente de timp diferite: după obținerea transfectanților stabili în preadipocite și după confirmarea diferențierii celulare prin colorarea cu Oil Red O (II.5.3.1.3.3). S-au transfectat simultan două seturi independente de celule cu fiecare tip de construct plasmidial, în condițiile descris la capitolul (II.5.3.1.3.4). . Trasfectanții stabili au conținut haplotipurile prezentate în fig.91.

În cursul perioadei de cultivare a preadipocitelor din fiecare set s-au prelevat câte trei alte seturi de celule cotransfectate cu pcDNA3 și fiecare din construcții plasmidiali amintiți mai sus. Din fiecare lizat celular s-au analizat cu luminometrul câte două probe de câte 20 μ l pentru a urmări reproductibilitatea metodei analitice, făcându-se media celor două valori corespunzătoare activității genei reporter exprimată în unități internaționale de măsură. În calcule s-a ținut cont de concentrația totală a proteinelor din lizatul celular raportându-se activitatea luciferazei la această valoare a proteinelor totale din fiecare lizat celular analizat. Cele 6 seturi de valori independente obținute în urma măsurării luminescenței separat pentru preadipocite și adipocite diferite s-au folosit pentru compararea între construcții corespunzătoare haplotipurilor 1, 2, 3 și 4 (sau 1222, 1122, 1111 și, respectiv 2122) printr-o metodă One-way ANOVA cu o analiză LSD *Post hoc* (vezi tabelul 76). Comparațiile au demonstrat că între construcții 1, 2 și 3 nu există diferențe semnificative manifestate la nivelul expresiei luciferazei, dar există diferențe semnificative din punct de vedere statistic între constructul 4 și fiecare dintre construcții 2, 3 atât la preadipocite cât și la adipocite, ceea ce sugerează faptul că polimorfismul -2970 G/A s-ar putea să fie funcțional.

Tabel 76. Rezultatele analizei One-way ANOVA LSD *Post hoc* efectuată separat în preadipocitele 3T3-F442A și adipocitele diferențiate prin care se compară activitatea luciferazei în celulele transfectate stabil cu construcții 1111, 1122, 2122 și 1222. Cu culoare verde este notat numărul haplotipului prezent în fiecare construct

Adipocite mature				Predipocite 3T3-F442A			
Construct (I)	Construct (J)	Diferența între valorile medii (I-J)	p	Construct (I)	construct (J)	Diferența între valorile medii (I-J)	p
1222 (1)	1122 (2)	-2.1824833	.955	1222(1)	1122(2)	-5.7874360	.849
	1111 (3)	-13.1214167	.737		1111 (3)	-.9940860	.974
	2122 (4)	-90.5950833(*)	.029		2122 (4)	-69.5231360(*)	.038
1122 (2)	1222 (1)	2.1824833	.955	1122(2)	1222(1)	5.7874360	.849
	1111 (3)	-10.9389333	.779		1111 (3)	4.7933500	.875
	2122 (4)	-88.4126000(*)	.033		2122 (4)	-63.7357000	.053
1111 (3)	1222 (1)	13.1214167	.737	1111 (3)	1222(1)	.9940860	.974
	1122(2)	10.9389333	.779		1122(2)	-4.7933500	.875
	2122 (4)	-77.4736667	.058		2122(4)	-68.5290500(*)	.040
2122 (4)	1222 (1)	90.5950833(*)	.029	2122(4)	1222 (1)	69.5231360(*)	.038
	1122 (2)	88.4126000(*)	.033		1122(2)	63.7357000	.053
	1111 (3)	77.4736667	.058		1111 (3)	68.5290500(*)	.040

Expresia luciferazei semnificativ mai mare la adipocitele diferențiate transfectate cu constructul 3 comparativ cu cele transfectate cu constructul 1 (wild type) sugerează influența pe care prezența celor trei alele rare -2970A, -1801T, -1050G ar putea-o exercita asupra activității promotorului CEBP α în contextul celular. Același trend se observă și în preadipocitele 3T3-F442A transfectate cu construcții plasmidice respective.

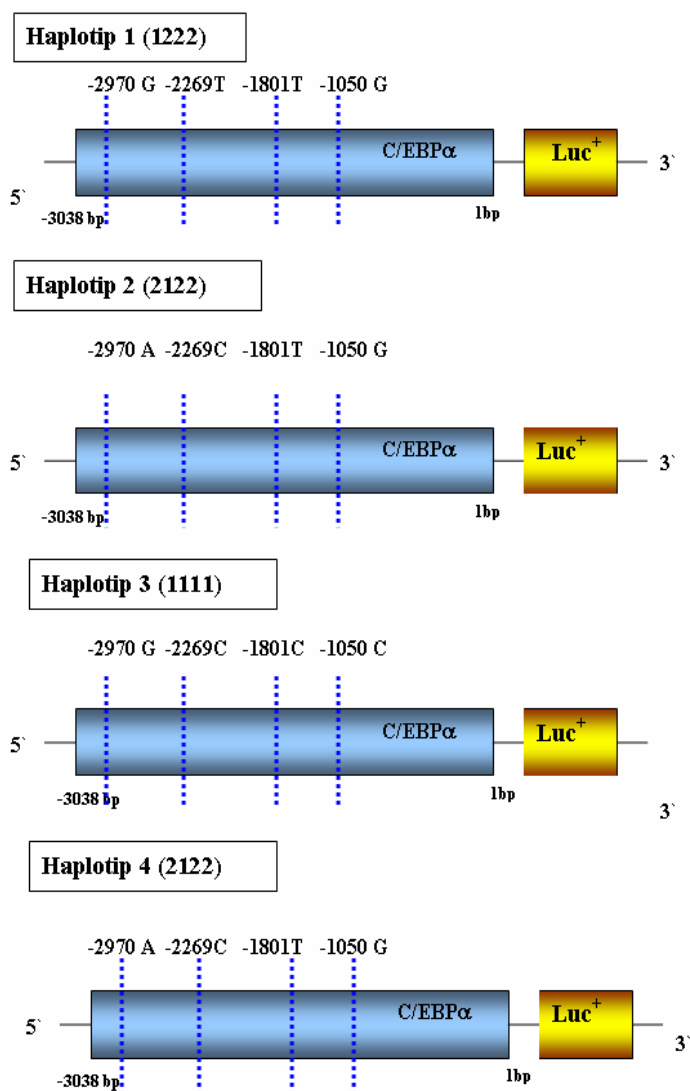


Fig.91 . Insertul ce conține haplotipurile analizate introduse în plasmidul pGL-bazic

Analiza activității luciferazei a relevat următoarele aspecte:

- varianta promotorului C/EBP α care conține alelele rare -2970 A, -1801 T, -1050 G și alela comună -2269 C a indus o creștere a activității luciferazei în preadipocite semnificativ mai mare comparativ cu celelalte variante analizate și comparativ cu varianta ce conține secvența sălbatică a promotorului. În mod normal, activitatea promotorului C/EBP α este inhibată în preadipocite, ceea ce arată că aceste variante alelice induc o deblocare a activității promotorului.
- Comparând activitatea luciferazei în preadipocite și adipocitele mature s-a observat o scădere a expresiei luciferazei în adipocitele mature comparativ cu adipocitele în cazul variantei promotorului C/EBP α care conține alelele rare -2970 A, -1801 T, -1050 T și alela comună -2269 C, în timp ce varianta ce conține secvența ADN de tip sălbatic a înregistrat o creștere a activității luciferazei și implicit o creștere a activității promotorului.
- În cazul preadipocitelor
 - varianta ce a conținut alelele rare -2970A, -1801 T, -1050 T și alela comună -2269 C a avut activitatea aproape semnificativ mai mare comparativ cu varianta care a conținut alele -2970G, -1801 T, -1050 T și alela comună -2269 C ($p=0.053$) ceea ce indică faptul că varianta alelică -2970A induce creșterea activității promotorului C/EBP α . Acest lucru e surprinzător cu atât mai mult cu cât situsul polimorfic nu se suprapune peste nici un situs de recunoaștere a factorilor de transcripție. Datorită faptului că situsul polimorfic este la 4 baze distanță de secvența centrală GATA este posibil ca factorul GATA1 în contextul existenței alelei A să aibă afinitate mai mare pentru secvența respectivă și să activeze expresia genei aflată sub controlul promotorului C/EBP α .

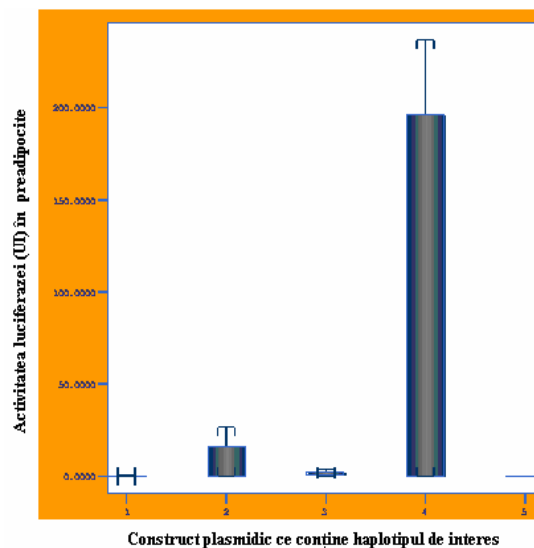


Fig.92 . Activitatea comparativă a luciferazei în preadipocitele transfectate cu plasmidele de interes 1 (haplotip 1222), 2 (haplotip 1122), 3 (haplotip 1111), 4 (haplotip 2122), 5 martor

- varianta ce a conținut alelele rare -2970A, -1801 T, -1050 T și alela comună -2269 C a avut activitatea semnificativ mai mare comparativ cu varianta de tip sălbatic ($p=0.040$) și cu cea care a conținut alele -2970G, -1801 T, -1050 T și alela comună -2269 T (0.038)
- La compararea activității reporterului în cazul folosirii construcțiilor plasmidice ce conțin alelele -2970G, -1801 T, -1050 T și alela comună -2269 T și -2970G, -1801 T, -1050 T și alela comună -2269 C s-a constatat că activitatea promotorului C/EBP α este repressată în cazul primei variante, ceea ce sugerează că existența mutației -2269 C>T influențează negativ activitatea promotorului C/EBP α . Acest situs polimorfic este poziționat la nivelul unui situs de recunoaștere pentru factorul de transcripție MZF1 care este cunoscut drept represor al genelor țintă.
- Prezența alelelor rare -1801 T, -1050 T determină o activare a promotorului C/EBP α comparativ cu varianta sălbatică (ns). Alela -1050 T distruge situsul de legare a proteinei p53 și crează un nou situs Gli-1. Proteina p53 este cunoscută ca represor al unor gene implicate în ciclul celular oprind proliferarea celulară. Este posibil ca distrugerea situsului p53 în cazul variantei să ducă la anularea blocajului indus de p53 și activarea promotorului C/EBP α . Oricum prezența alelei rare -1801T determină crearea unui situs Oct-1 pe catena complementară. Acest experiment sugerează că prezența ambelor mutații simultan se manifestă pozitiv asupra exprimării C/EBP α în preadipocitele, deși Oct-1 are efect represor situsul acestuia nou creat nu este conservat și la om și la șoarece ceea ce face probabil ca legarea acestuia să fie slabă, iar efectul său ca represor să fie mai mic comparativ cu cel al p53 care nu se mai leagă de secvența specifică din promotorul C/EBP α în cazul existenței alelei. Nu se știe ce fel de rol poate juca Gli-1 în preadipocite și adipocite atâta timp cât nu se știe dacă se exprimă sau nu în acest tip de celule.
- În cazul adipocitelor mature

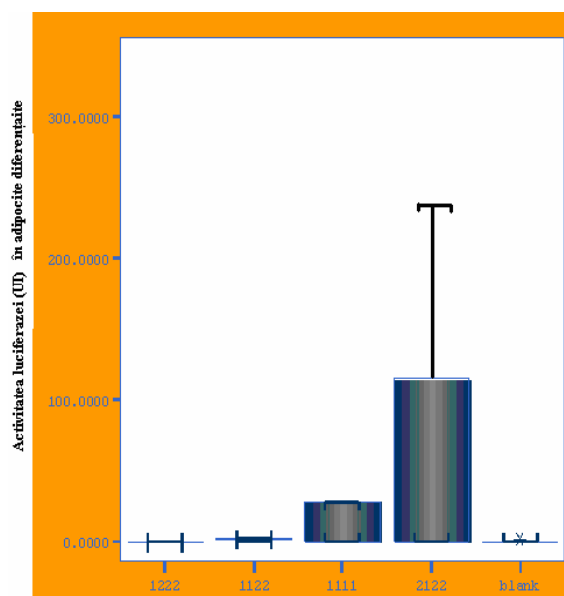


Fig.93. Activitatea comparativă a luciferazei în adipocitele mature ce provin din preadipocitele transfectate cu plasmidele de interes

- varianta ce a conținut alelele rare -2970A, -1801 T, -1050 T și alela comună -2269 C a avut activitatea semnificativ mai mare comparativ cu varianta care a conținut alele -2970G, -1801 T, -1050 T și alela comună -2269 C ($p=0.033$) ceea ce indică faptul că varianta alelică -2970A induce creșterea activității promotorului C/EBP α .
- varianta ce a conținut alelele rare -2970A, -1801 T, -1050 T și alela comună -2269 C a avut activitatea mai mare comparativ cu varianta de tip sălbatic ($p=0.058$) și cu cea care a conținut alele -2970G, -1801 T, -1050 T și alela comună -2269 T (0.029)
- La nivelul adipocitelor se constată o scădere a activității reporterului în cazul în care promotorul investigat conține -2970G, -1801 T, -1050 T și alela comună -2269 C sau varianta ce -2970G, -1801 T, -1050 T și alela comună -2269 T comparativ cu varianta de tip sălbatic ceea ce indică faptul că ambele alele mutante -1801 T, -1050 T contribuie la represarea expresiei luciferazei, ceea ce se poate explica prin aceea că există un represor care acționează în prezența acestor alele rare asupra promotorului.

Evaluarea capacității reglatoare a promotorului C/EBP α (sălbatic și mutant) prin investigarea interacției secvențelor ADN de interes cu proteinele nucleare din adipocitele diferențiate

Tehnica diferenței de electromobilitate EMSA s-a utilizat pentru a investiga interacțiunile dintre proteinele nucleare și diferitele secvențe de ADN care cuprind alelele comune sau cele rare ale polimorfismelor investigate cu scopul de a evidenția efectul prezenței polimorfismului respectiv în recunoașterea și legarea factorilor de transcripție. Optimizarea cantității de primeri și de extract nuclear s-a realizat pentru ambele tipuri de celule. Pentru adipocitele mature, după procedeele de obținere a extractului nuclear (N.E.) s-au cuantificat cele 16 probe conținând un total de proteine între 4,68 și 6,10 mg/ml. S-a realizat optimizarea cantității de extract nuclear cu primeri marcați fluorescent corespunzători alelei -2970 G, -1050 C și G, 1801 C și T. În continuare s-a folosit extractul nuclear din celulele preadipocite 3T3-F442A folosindu-se 45 μ l extract nuclear. Rezultatele EMSA pentru acest tip de celule (fig.98) arată o legare specifică a competitorului specific încrucișat (secvența de oligonucleotide care conține alela -2970 A) care competiționează cu secvența ADN marcată fluorescent ce conține alela -2970 G ce duce la scăderea intensității benzii corespunzătoare complexului comparativ cu banda corespunzătoare complexului dintre proteinele nucleare și secvența fluorescentă conținând alela -2970G. Acest lucru demonstrează că atât în prezența alelei G dar mai ales în prezența alelei rare A corespunzătoare polimorfismului -2970 G/A, secvența ADN care conține situsul polimorfic se leagă de proteinele nucleare. Spre deosebire de analiza polimorfismului -2970 G/A, care sugerează competiția dintre cele două alele pentru legarea proteinelor nucleare, analiza polimorfismului -1050 C/G prin EMSA arată că prezența alelei G face ca legarea secvenței de oligonucleotide la proteinele nucleare să fie mai slabă; nu se observă nici o diferență între cele două alele în legarea complexului proteic la concentrații de 1x și 3x unde se pare că ele competiționează puternic cu primerul fluorescent, dar la 5x se observă că legarea alelei G este mai slabă decât legarea secvenței ce conține alela comună.

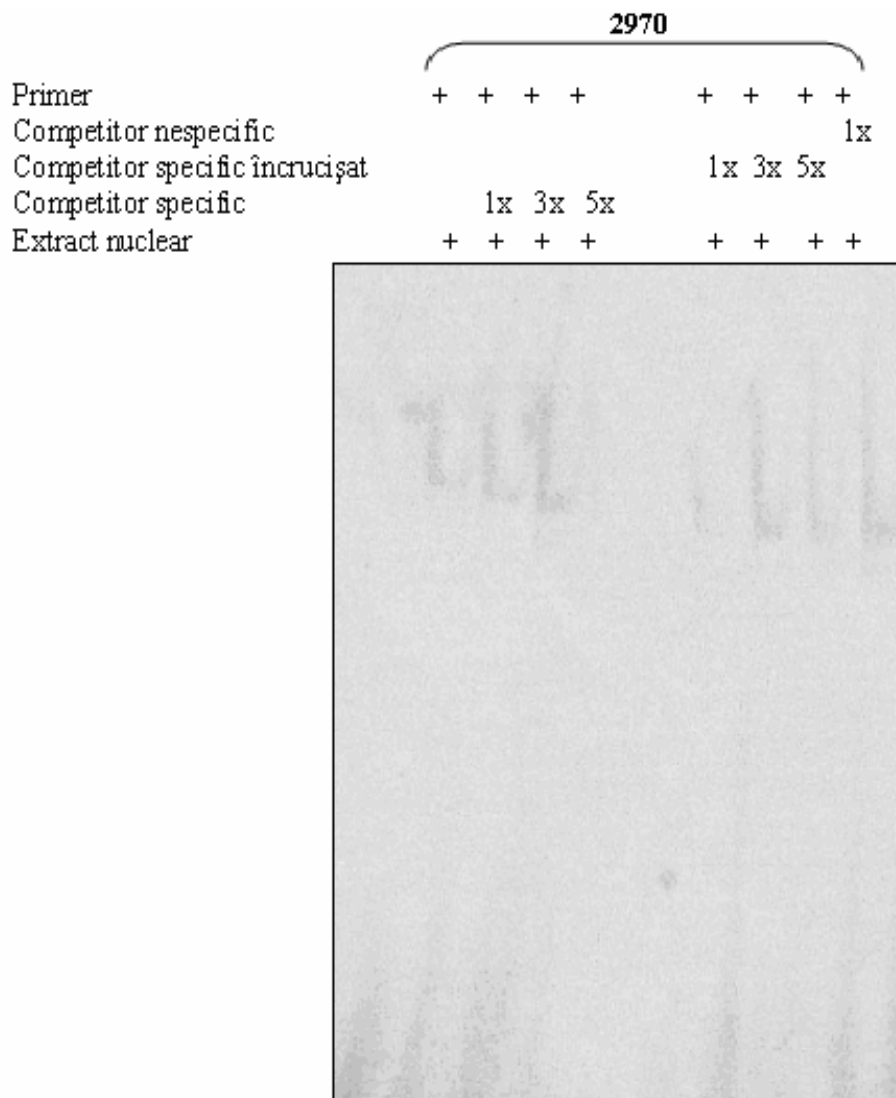


Fig. 94. EMSA pentru investigarea capacității de legare a secvențelor ADN ce conțin alelele G și A corespunzătoare polimorfismului -2970 G/A la proteinele nucleare din preadipocitele 3T3-F442A: 1-primer fluorescent; 2- complex proteic-primer fluorescent; 3-complex proteic primer specific (G) 1x; 4-complex proteic - primer specific (G) 3x; 5-complex proteic - primer specific (G) 5x; 6- complex proteic – primer competitor încrucișat (G) 1x; 7- complex proteic – primer competitor încrucișat (G) 3x; 8- complex proteic – primer competitor încrucișat (G) 5x; 9- complex proteic – competitor nespecific 1x; ; 10-complex proteic – competitor nespecific 3x; ; 11-complex proteic – competitor nespecific 5x;

	-1050						
Primer	+	+	+	+	+	+	+
Competitor specific încrucișat	5x	3x	1x				
Competitor specific				5x	3x	1x	
Extract nuclear	+	+	+	+	+	+	+



Fig. 95b . EMSA pentru investigarea capacității de legare a secvențelor ADN ce conțin alelele C și G ale corespunzătoare polimorfismului-1050 C/G la proteinele nucleare din preadipocitele 3T3-F442A: 12-primer fluorescent; 11- compex proteic-primer fluorescent; 10- complex proteic primer specific (C) 1x; 10-complex proteic - primer specific (C) 3x; 9-complex proteic - primer specific (C) 5x; 8- complex proteic – primer competitor încrucișat (G) 1x; 7- complex proteic – primer competitor încrucișat (G) 3x; 6- complex proteic – primer competitor încrucișat (G) 5x; 9-complex proteic – competitor nespecific 1x; ; 10-complex proteic – competitor nespecific 3x; ; 11-complex proteic – competitor nespecific 5x;

II.5.3.3. CONCLUZII

În cadrul acestui obiectiv s-a investigat atât secvența ADN de tip sălbatic (wild-type) a 3000 bp din promotorul *C/EBP α* cât și secvența mutantă ce conține polimorfismele -2970 G/A, -2269 C/T, -1801 C/T, -1050 C/G în vederea identificării factorilor de transcripție cu probabilitatea cea mai mare de a fi funcționali in vivo. Au fost identificați următorii factori (vezi fig. 101) :

Situsul GATA (proteine de legare a secvenței GATA) a fost identificat conservat și conform secvenței de recunoaștere (5`-WGATAR-3`, [272]) la nivelul celor trei secvențe între pozițiile nucleotidice -2962 și -2958. Factorul de transcripție GATA-1 identificat reglează expresia unor gene implicate în maturarea granulocitelor și monocitelor [356] printre care se numără și *C/EBP α* . GATA-1 nu este exprimat nici în preadipocite, nici în adipocitele mature [357]. În schimb GATA-2 și GATA-3 sunt exprimate în preadipocite, fiind represori ai PPAR γ și implicit ai *C/EBP α* (între cei doi existând un feed-back pozitiv). Identificarea situsului GATA conservat la toate cele trei specii indică o probabilitate mare de a fi funcțional. Situsul polimorfic -2970 G/A nu crează și nici nu distruge prin existența celor două variante alelice nici un situs de recunoaștere al vreunui factor de transcripție. Acesta este poziționat în imediata vecinătate a situsului pentru proteina GATA și se poate să influențeze capacitatea de legare a a GATA la situsul corespunzător din secvența ADN a *C/EBP α*

Situsul USF (upstream stimulatory factor). S-au identificat două situsuri USF la toate cele trei conforme secvenței de recunoaștere descrisă în literatură (5`-NNCACGTGNN -3` ;[307]). Aceste situsuri sunt poziționate în secvența umană între nucleotidele -1206 și -1200, respectiv între -271 și -265. Acest situs este implicat în reglarea negativă a genei *C/EBP α* în urma cooperării cu AP-4 și caseta E-box a *C/EBP α* [358]. Timcenko și colab. au demonstrat că USF stimulează autoreglarea expresiei *C/EBP α* în linia de hepatocite Hep3B2 [359].

Caseta GC și situsurile Sp-1. Caseta GC a fost identificată la nivelul secvenței umane între nucleotidele -644 și -639 și situsul corespunzător a fost conservat la toate cele trei specii fiind conform secvenței de recunoaștere (5`-GGGNG -3`, [269]). S-a demonstrat că factorii Sp-1 pot lega caseta GC aflată în secvența promotorului *C/EBP α* . De asemenea au fost identificate mai multe situsuri pentru legarea factorilor Sp1 dintre care s-au selectat două care se află în regiuni conservate. Primul situs, identificat la nivelul secvenței umane între -1310 și -1316 este conform secvenței de recunoaștere descrisă în literatură (5`-GGGCGGG-3`, [310]), iar celălalt este poziționat la nivelul secvenței umane între -379 și -373 pe catena complementară și diferă față de secvența de recunoaștere descrisă de Nardelli și colab. la secvența murină și cea de la șobolan. Studiile din literatură privind activitatea factorilor Sp-1 și Sp-3 asupra reglării expresiei *C/EBP α* , au arătat că acestea au un rol dual prin aceea că pot activa sau pot inhiba expresia *C/EBP α* . Unele studii au arătat că acești factori reduc expresia *C/EBP α* în preadipocite [360,361], în timp ce în adipocitele mature expresia genei și a proteinei *C/EBP α* este stimulată [362]. Nu se știe momentan cum influențează acești factori de transcripție expresia *C/EBP α* în contextul desfășurării adipogenezei.

Caseta TATA box a fost conservată la toate secvențele analizate și este conformă cu secvența de recunoaștere (5`-TATAA-3`, [269]). La secvența umană, situsul TATA funcțional s-a identificat la nivelul secvenței umane între nucleotidele -30 și -25.

Situsul WT-1(supresorul tumorii Wilms-Wilms tumor supressor) este un factor de transcripție ce reglează proliferarea, diferențierea celulară și apoptoza celulară. Datorită mutațiilor frecvente la nivelul acestei gene, acest factor de

transcripție a fost asociat cu tumorile Wilms, dar a fost identificat și în alte tipuri de tumori. Acest factor de transcripție poate funcționa nu numai ca supresor tumoral dar și ca factor de supraviețuire. WT1 este exprimat în rinichi și splină. Expresia acestuia specifică unui număr restrâns de tipuri de celule face ca în adipocite probabilitatea existenței unei interacții cu *C/EBP α* să fie foarte mică.

Situsul dual p53/ AhR:ARNT identificat la secvența umană între pozițiile nucleotidice -1058 și -1048 este conservat la toate cele trei specii ceea ce sugerează un important rol funcțional. Acest situs dual este compus dintr-un situs heterodimeric pentru heterodimerii AhR : ARNT (translocatorul nuclear al receptorului pentru hidrocarburi aromatice) care se suprapune peste un situs corespunzător legării proteinei p53. AhR : ARNT se leagă la elementele DRE/XRE (elemente de răspuns xenobiotic) ca răspuns la legarea de liganzi de tip hidrocarburi aromatice. Situsul identificat la secvența umană corespunde cu cel descris în literatură [353] Legarea AhR : ARNT este un răspuns la factorii poluanți din mediu. Unul dintre liganzii pentru acestia este dioxina [363,364]. AhR devine funcțional numai în condițiile expunerii la dioxină sau alți liganzi poluanți [365,366]. Studii recente au arătat că liganzii AhR inhibă adipogeneza prin inhibarea diferențierii adipocitelor [355,356] represând PPAR γ și izoformele *C/EBP α* -p42 ^{*C/EBP α*} și p30 ^{*C/EBP α*} [365]. În condiții normale, în care nu există expunere la liganzi poluanți AhR nu se leagă de secvența corespunzătoare din promotorul *C/EBP α* . În acest fel situsul dual p53/AhR:ARNT poate fi utilizat de p53. Proteina p53 este o proteină cheie a ciclului celular ce induce faza G1 arrest pentru a preveni diviziunea celulară [367]. Este cunoscută ca supresor tumoral. Kubicka și colab. [368] au evidențiat că p53 suprimă transactivarea genei albuminei de către *C/EBP α* . La ora actuală nu este cunoscut dacă proteina p53 are un efect direct în reglarea expresiei *C/EBP α* . Situsul polimorfic -1050 C/G se află în secvența de recunoaștere a acestuia. Alela comună C menține situsul p53, în timp ce alela rară G crează un situs Gli-1 care s-a regăsit și la celelalte două secvențe.

Situsul Gli-1 (glioma associated oncogene homology) identificat la secvența umană a fost este diferit la nivelul a două baze față de secvența de recunoaștere descrisă în literatură (5`-AGGGTGCTC-3` ,[354]). Proteina Gli-1 este exprimată în foliculii din păr și plămâni în răspuns la semnalizarea Sonic-hedgehog [354]. Este supraexprimat în celulele bazale din piele. Cum *C/EBP α* nu se exprimă în celulele bazale și cum nu este cunoscut dacă Gli-1 se exprimă în adipocite, este posibil ca acest factor să nu fie funcțional în adipocite sau dacă este atunci să fie un nou element reglator pentru *C/EBP α* .

Situsul HNF4 (factorul nuclear hepatic 4) a fost identificat la nivelul tuturor celor trei secvențe analizate. S-au identificat două situsuri de legare a HNF4 care la secvența umană sunt poziționate între -1602 și -1597 respectiv între -77 și -72. La nivelul secvenței umane ambele situsuri pentru HNF4 diferă la o bază față de secvența descrisă în literatură (5`-CAWAR-3` ,[316]). La *C/EBP α* există două situsuri duale HNF4/PPAR γ :RXR (poziționate între -2482și -2417 respectiv între -1066 și -1059). Este posibil ca acest situs să fie funcțional, iar HNF4 să se lege la acest situs în hepatocite, iar PPAR γ : RXR în adipocite pentru reglarea expresiei *C/EBP α* . Situsul situat între -1066 și -1059 este adiacent cu situsul p53 și s-ar putea să se influențeze reciproc pentru reglarea expresiei *C/EBP α* .

Situsul E2F identificat la secvența umană între pozițiile -591 și -583 diferă față de secvența descrisă în literatură la nivelul unei singure baze (5`-SGCSSAAA-3` ,[276]). Rolul E2F în reglarea expresiei *C/EBP α* nu este încă elucidat. Expresia factorilor E2F-1, 2 și 3 este crescută în preadipocite unde stimulează producția de

PPAR γ [369] care permite diferențierea preadipocitelor și stimularea C/EBP α . Acești factori se pot lega la C/EBP α și pot stimula expresia acesteia în adipocitele mature.

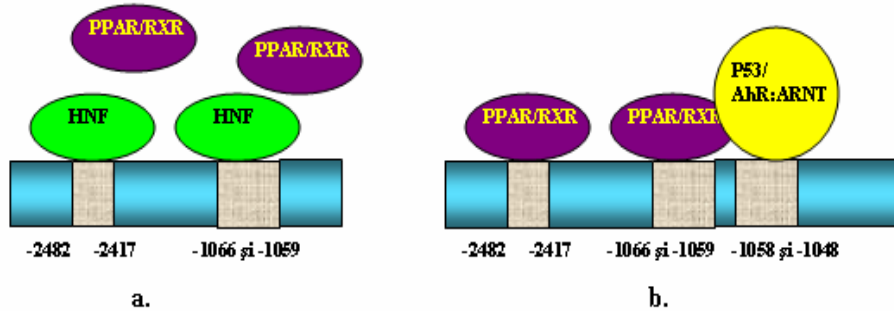


Fig. 96. Mecanism posibil de reglare prin intermediul factorilor de transcripție HNF4 și PPAR γ în hepatocite (a) și adipocite (b)

Situsul MZF1 (mieloid zinc finger) care cuprinde situsul polimorfic -2269 C/T diferă la nivelul a două baze față de secvența de recunoaștere descrisă în literatură (5`-GAGGGGAA-3`, [282]). MZF1 este cunoscut mai mult ca supresor al expresiei genelor țintă, dar poate acționa și ca activator. Până în prezent nu a fost descrisă în literatură implicarea MZF în reglarea expresiei C/EBP α . Studiul de față sugerează posibila implicare a MZF ca activator atât în preadipocite cât și în adipocitele mature. În prezența alelei -2269 T acest situs de legare MZF1 este distrus. Situsul MZF-1 este parțial suprapus peste situsurile GATA-1 și GATA-2. GATA-2 este descris în literatură ca represor al expresiei C/EBP α . Este posibil ca legarea factorului MZF-1, în prezența alelei comune C la situsul descris să influențeze capacitatea de reprimare a factorului GATA-2. Factorii de transcripție cu probabilitatea cea mai mare de a fi funcționali sunt reprezentați schematic în fig.97.

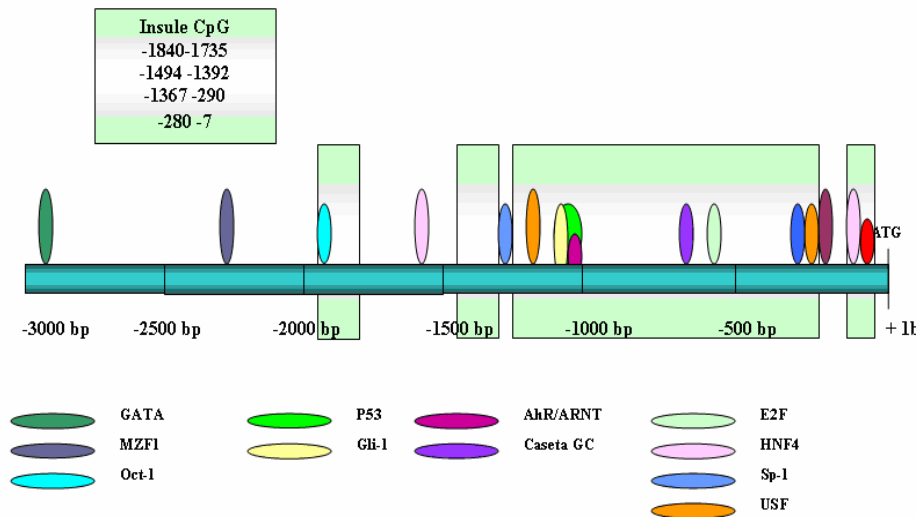


Fig. 97. Factorii de transcripție posibili reglatori ai C/EBP α .

Analiza funcțională a celor patru polimorfisme -2970 G/A, -2269 C/T, -1801 C/T, -1050 C/G in vitro prin analiza activității luciferazei aflată sub controlul promotorului

C/EBP α mutant în celulele 3T3-F442A [370], a sugerat posibilitatea ca proteina p53 să funcționeze ca un activator al expresiei *C/EBP α* în adipocitele mature, în timp ce factorii de transcripție Oct-1 și Gli-1 au fost identificați ca posibili represori ai expresiei *C/EBP α* în adipocitele mature. Rezultatul EMSA privind interacțiunea in vivo între proteinele nucleare și secvențele nucleotidice ce cuprind alela -1050 C și alela -1050 G, deși nu este edificator, sugerează o competiție între cele două alele la legarea proteinelor nucleare. Rezultatele analizei activității luciferazei au sugerat posibilitatea MZF-1 și GATA-2 de a funcționa ca represori ai *C/EBP α* . În ceea ce privește polimorfismul -2970 G/A rezultatele au fost contrariante, în sensul că rezultatele studiului populațional din Leeds au indicat că polimorfismul este funcțional, rezultatele analizei activității genei reporter au indicat o creștere semnificativă a activității reporterului atât în preadipocite cât și în adipocitele mature în prezența alelei rare -2970 A, dar analiza computațională nu a evidențiat nici un situs de legare care să includă situsul polimorfic. A fost identificat un situs GATA-1 în vecinătatea situsului polimorfic. Rezultatele EMSA au demonstrat legarea ambelor secvențe ce conțin alelele -2970 G și -2970 A la proteinele nucleare, ceea ce demonstrează că polimorfismul -2970G/A este totuși funcțional. Prin urmare, exista posibilitatea ca situsul polimorfic să creeze sau să distrugă un situs pentru un factor de transcripție neidentificat cu programul MatInspector. În consecință, am încercat utilizarea unui alt program TFSearch [371]. Rezultatele au indicat plasarea situsului polimorfic în vecinătatea unor situsuri GATA-1, GATA-2 și GATA-3. În prezența alelei rare A se creează un nou situs pentru HSF (pentru legarea proteinelor de șoc termic). Aceste rezultate sugerează că în prezența alelei -2970 G, proteinele GATA-2 și GATA-3 s-ar putea lega la secvența ADN corespunzătoare, manifestându-și efectul represor în preadipocite, în timp ce în prezența alelei -2970 A s-ar putea lega factorii de transcripție din categoria proteinelor de șoc termic ce stimulează expresia *C/EBP α* atât în preadipocite cât și în adipocite (vezi fig. 98).

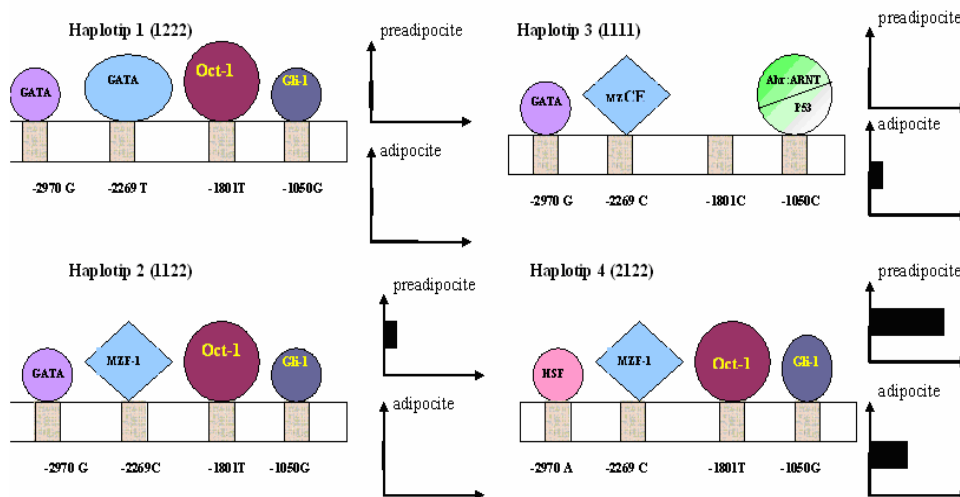


Fig.98. Reglarea expresiei *C/EBP α* în preadipocite nediferențiate și adipocite mature de către factorii de transcripție GATA; Oct-1, MZF, Gli-1, Ahr:ARNT, p53 și proteinele de șoc termic.

VI. CONCLUZII FINALE

Prima parte a acestui studiu s-a centrat pe cercetarea unor compuși naturali de extracție în scopul selectării unei diete vegetariene pe bază de alimente multicomponent care să asigure un aport cât mai mare de compuși antioxidanți și pe urmărirea efectelor acestei diete asupra unor parametri metabolici și de progresie a ateroscleorzei la subiecții cu sindrom metabolic. S-au obținut și caracterizat din punct de vedere al conținutului în acizi fenolici mai mulți compuși naturali de extracție. Pe baza rezultatelor analizei spectroscopiei UV-VIS și HPLC a compușilor naturali de extracție în alcool 35% și acid acetic 9% obținute din cătină, rozmarin, ghimbir, coacăze negre, armurariu, busuioc, salvie, ghimbir și angelica, oțet de mere cu miere, au fost selectate 8 extracte (angelica, armurariu, busuioc, coacăze negre, frunze de cătină, ghimbir, rozmarin și salvie) cu un conținut variat în polifenoli și cu activitate antioxidantă mai mare. Analiza capacității antioxidante a extractelor folosind metodele DPPH și FRAP a arătat că extractele alcoolice au o capacitate antioxidantă mai mare decât cele în acid acetic, iar extractul etanolic de coacăze negre, de frunze de cătină, rozmarin și salvie au activitatea antioxidantă cea mai ridicată. S-au analizat din punct de vedere al conținutului metalic următoarele plante aromatice și medicinale: cătină (fructe), rozmarin (frunze), arnică (flori), coacăze negre (fructe), armurariu(fructe), busuioc (tulpină și frunze), salvie (tulpină și frunze), pufuliță (tulpină și frunze) și păpădie (frunze). Excluzându-se din studiu plantele care au un conținut peste limitele admise în metalele analizate (pufulița, păpădia și arnica) s-a concluzionat că celelalte plante rămase (coacăze negre, armurariu, busuioc, salvie, cătină, rozmarin) conferă un aport echilibrat de oligoelemente necesare organismului și concomitent cu acest aspect, extractele acestora în etanol 35% și oțet de mere cu miere și cătină 9% au activitate antioxidantă mare, care le recomandă cu succes în scopul obținerii de alimente îmbogățite cu macro- și microelemente.

Rezultatele obținute s-au folosit pentru selectarea sau producerea unor alimente multicomponent ce conțin plante aromatice medicinale cu activitate antioxidantă mare. Alimentele respective au fost integrate într-o dietă vegetariană; componentele dietei furnizează un amestec complex și echilibrat de antioxidanți care oferă o mai bună protecție antioxidantă organismului.

S-a investigat capacitatea antioxidantă a alimentelor îmbogățite cu compuși de extracție naturali în patologia endotelului vascular. Studiul s-a realizat pe 90 de subiecți umani. După o prealabilă tipizare metabolică și analiza toleranțelor alimentare, s-au constituit trei loturi intervenționale și un lot control : *lotul A* (alimente funcționale multicomponent + omega 3), *lotul B* (alimente funcționale), *lotul C* (omega 3), iar *lotul D* a servit ca lot de control. S-au analizat parametrii de *efect metabolic* (scorul IR-HOMA al rezistenței la insulina, profilul lipidic, adiponectina, leptina, IL-6, TNF- α , nivelul de radicali liberi din sângele periferic și antioxidanții totali hidro- și liposolubili), precum și *parametrii de progresie a aterosclerozei* (grosimea intima-medie la nivelul arterei carotide comune).

Acest studiu a relevat faptul că cele mai bune rezultate se obțin prin administrarea dietei vegetariene alese în combinație cu o doză de 500 mg/zi de acizi grași omega-

La subiecții care au urmat această strategie terapeutică s-a observat o îmbunătățire a parametrilor metabolici comparativ cu celelalte loturi și cu lotul control: indicele de rezistență la insulină a scăzut după înrolare, nivelul de adiponectină a crescut semnificativ după înrolare cu consecințe pozitive directe asupra funcției endoteliale, nivelul de hidroperoxizi din sângele periferic a scăzut semnificativ la 3 luni după înrolare simultan cu scăderea activității antioxidanților

liposolubili plasmatici puse pe seama creșterii activității antioxidante la nivel celular, nivelul de TNF- α a scăzut semnificativ la 3 luni de la înrolare ceea ce sugerează o influență a terapiei și asupra procesului inflamator cu consecințe la nivele endoteliale. La lotul care a urmat numai dieta vegetariană propusă (B), deși s-a observat o creștere a activității antioxidantilor hidrosolubili semnificativă și o scădere semnificativă a antioxidantilor liposolubili (după 6 luni) cu scăderea semnificativă a nivelului de hidroxizi din sânge (după 3 luni) cu efect direct asupra funcției endoteliale (scădere semnificativă la nivelul peretelui arterial al carotidei) s-a constatat totuși o creștere semnificativă a leptinei la 3 luni de la înrolare, iar nivelul de adiponectină, deși crește după înrolare, nu este semnificativ crescut cu momentul înrolării. La subiecții din lotul B s-a observat o creștere temporară a indicelui de rezistență la insulină (IR-HOMA) atribuită creșterii semnificative a nivelului de insulină, dar creșterea este temporară căci diferența semnificativă nu se mai menține după 6 luni. La lotul care a primit numai suplimente omega-3, s-a constatat o scădere semnificativă a atât la 3 luni, cât și la 6 luni de la înrolare. Ca și la lotul de subiecți care au urmat dieta suplimentată cu omega-3, nivelul de TNF- α a fost semnificativ mai scăzut la 3 luni comparativ cu momentul înrolării. Aceste rezultate sugerează că folosirea unei diete vegetariene cum este cea propusă în acest studiu, suplimentată cu omega-3 duce la îmbunătățirea funcției endoteliale și contribuie la scăderea parametrilor inflamatori care sunt factori importanți în procesele și mecanismele de semnalizare în sindromul metabolic, în timp ce folosirea dietei simple se reflectă în scăderea concentrației radicalilor liberi, și mai puțin în modularea parametrilor inflamatori, dar cu efect pozitiv asupra funcției endoteliale. Folosirea suplimentelor omega-3 în absența dietei a avut influență asupra parametrilor inflamatori, dar și asupra nivelului de radicali peroxidici din sângele periferic. În concluzie, folosind o dietă ce cuprinde un amestec echilibrat de antioxidanți care acționează cumulativ, funcția endotelială a fost îmbunătățită nu numai ca urmare a neutralizării radicalilor liberi, dar cel mai probabil prin mecanisme moleculare de reglare fină a unor factori cheie implicați în procesele la interfața dintre sindromul metabolic, bolile cardiovasculare și diabetul zaharat tip 2. În cea de-a doua parte a studiului, focalizarea a fost pe cercetarea unor aspecte moleculare privind procesele de reglare a **EC-SOD, C/EBP α și C/EBP β** utilizând metode *in silico*, *in vitro* și *in vivo* pentru investigarea relației secvență ADN-funcționalitate a unor polimorfisme la nivelul acestor gene. Rezultatele s-au materializat prin:

Stabilirea de markeri genetici pentru ateroscleroză și diferiți factori de risc cardiovascular și metabolic:

Studiul populațional efectuat în vederea evidențierii acestor polimorfisme la nivelul secvenței ADN s-a efectuat pe 294 de subiecți umani distribuiți în două loturi în funcție de prezența/absența unei plăci de aterom semnificativ. Teza de față s-a materializat cu identificarea a 5 polimorfisme la nivelul genelor analizate: Thr40Ala EC-SOD, Arg213Gly EC-SOD, -3429 C/T C/EBP β și -411/-412 CG/TT C/EBP β . Dintre acestea varianta Thr40 EC-SOD a fost asociată cu hipertensiunea arterială și diabetul zaharat tip 2, iar în cazul studiului comparativ femeii versus bărbați, varianta Thr40 este asociată nu numai cu diabetul și hipertensiunea arterială, dar și cu prezența plăcii de aterom ce obturează mai mult de 50% din diametrul arterial. Varianta -3429 C C/EBP β a fost asociată cu un nivel crescut de colesterol și o tendință de asociere cu obezitatea. Rezultatele studiului indică faptul că aceste două polimorfisme Thr40Ala EC-SOD și -3429 C/T C/EBP β sunt funcționale în condițiile existenței aterosclerozei și pot fi folosite ca markeri genetici pentru factorii de risc

respectivi, iar polimorfismul -411/-412 CG/TT C/EBP β poate fi și el funcțional în condițiile absenței limitărilor acestui studiu populațional (numărul redus de cazuri precum și posibilitatea ca indivizii fără ateros semnificativ să dezvolte placa de ateros ulterior).

Analiza modului în care anumite variante ale secvenței genice duc la reglarea expresiei genelor respective

A. Posibilități de reglare a EC-SOD

La nivelul promotorului EC-SOD, nefiind identificate noi polimorfisme la nivelul secvenței ADN cuprinsă între pozițiile nucleotidice -469 și +16 la cei 100 de indivizi sănătoși, s-a realizat numai analiza *in silico* (computațională) a secvenței ADN. Analiza computațională efectuată pe cele 2000 bp a evidențiat existența a numeroase situsuri de legare a factorilor de transcripție. În urma selecției efectuate prin identificarea regiunilor omoloage la nivelul secvenței ADN a promotorilor **SOD3** la om, șoarece și șobolan s-a selecționat un număr restrâns de factori de transcripție care ar putea influența transcripția **SOD**: SMARCA3 (între -1113 și -1093), c-Myb (-783 și -771), NRF2 sau GABP (-584 și -591), un situs dual GABP/ELK-1 (între -153 și -160), un alt un situs dual GABP/GKLF (între -147 și -139), SREB (între -1275 și -1286), STAT5 (un situs poziționat între pozițiile nucleotidice -1042 și -1043, celălalt între pozițiile -622 și -613), caseta GC (între -282 și -275), Ets-1 (între -199 și -206), SF1 (între -1005 și -1013), CHOP&C/EBP (între -764 și -754), C/EBP (între -785 și 777), MZF (între -260 și -254). Din analiza *in silico* a secvenței ADN corespunzătoare promotorului **SOD3** care conține polimorfismele rs3471066 G/A, rs17885921 G/A, rs17885306 G/A și rs34841282 C/T existente în literatură în baza de date NCBI GeneBank s-au identificat situsurile GABP/GKLF, COMP1 și SOX5 de asemenea cu o probabilitate mai mare de a fi funcționale. Ținând cont de rezultatele analizei computaționale (*in silico*) se pot formula anumite ipoteze privind mecanisme posibile de reglare a expresiei **SOD3** care pot fi verificate în cadrul unor proiecte de cercetare viitoare. Aceste posibilități de reglare sunt:

1. Existența casetei GC ar putea furniza un mecanism de reglare prin legarea acesteia de factorul de transcripție Sp-1. Prin cooperarea acestuia din urmă cu STAT5 și C/EBP β este posibilă activarea **SOD3**. O altă variantă de activare este aceea ca în condițiile unui proces inflamator, la semnalul dat de citokine și anumiți factori de creștere, STAT5 să se activeze și să fie translocată din citoplasmă în nucleu unde se leagă de situsul corespunzător al **SOD3**. Este posibil ca, în aceste condiții ale existenței inflamației, STAT5 să coopereze la nivel de interacțiune proteină-proteină cu C/EBP β și/ori Sp1 pentru creșterea expresiei **SOD3**. În condițiile în care la situsul dual C/EBP β / c-myb situat între pozițiile nucleotidice -783-771 se leagă c-myb, este posibilă represia expresiei **SOD3** ca și în situația în care în situsul corespunzător poziționat între -764 și -754 se leagă heterodimeri CHOP/ C/EBP α .
2. Un alt mecanism posibil de reglare este prin intermediul factorilor de transcripție din familia de oncogene Ets, care în cazul unor situsuri duale competiționează cu factorii din familia Krueppel-like pentru legarea acestor situsuri. Spre exemplu, secvența GABP (NRF2) aflată într-o regiune cu potențial reglator ridicat (între -591 și -584), în vecinătatea altor situsuri PEA3 poate contribui la inițierea transcripției **SOD3** la fel ca și în cazul COX.
3. O a treia posibilitate majoră de reglare este aceea a reglării epigenetice prin procese de metilare-demetilare la resturile de citozină aflate în regiuni bogate în dinucleotide CG (insulele CpG). Analiza insulelor CpG a indicat existența a 4

insule CpG la om susceptibile la procesul de metilare-demetilare (între -279 și -119, -605 și -511, -733 și -676, -1046 și 839). Două regiuni se suprapun ca și poziție peste insulele CpG la șoarece și șobolan: între -279 bp și -197 bp respectiv între -558 și -511 ceea ce crește capacitatea reglatoare a acestor regiuni.

B. Posibilități de reglare a C/EBP β

Analiza computațională a unui fragment de 3500 bp din secvența ADN a promotorului C/EBP β a identificat mai multe situsuri de legare a factorilor de transcripție CREB, SREB, NRSE și EGR-1 care se cunosc ca fiind parteneri de interacțiune ai C/EBP β . În afară de acestea s-au identificat situsuri de recunoaștere și legare pentru Sp-1, GATA-1, Oct-1, p53, c-Myb, AP-1, AP-2 și AP-4. S-au identificat de asemenea mai multe situsuri de legare a proteinelor din familia C/EBP. De remarcat sunt situsurile multiple la nivelul cărora se pot lega mai mulți factori de transcripție din categoria Kruppel-like sau din categoria proteinelor deget de zinc (ZIC2, ZNF219, ZBP89). Numărul mare de factori de transcripție identificați cu ajutorul programului MatInspector a fost restrâns prin utilizarea Clustal W și FootPrinter la numai 13 factori de transcripție care pot fi implicați, cu foarte mare probabilitate, în reglarea C/EBP β : IRF7 (între -1114 și -1108), GC (între -448 și -443), Sp1 (situsuri multiple între: -1604 și -1596, -228 și -222, -286 și -280 precum și situsuri duale Sp1/Egr-1 între -274 și -269 respectiv -379 și -370), TATA (între -30 și -25), AML1/ CBFA (între -3425 și -3418), MZF (situsuri multiple între: -3248 și -3240, -3071 și -3065, -2364 și -2372, -2443 și -2433), GATA (între -2737 și -2733, -2743 și -2739, -1690 și -1684), CP2 (între -1671 și -1667, -1666 și -1662, 1700 și -1694), IK-1 (între -2109 și -2103), AP-1 (între -840 și -833), AP-2 (între -1345 și -1336), HNF4/PPAR: RXR (între -1011 și -999), NUDR (între -452 și -447), CREB (între -747 și -472), TCF/LEF (între -1571 și -1566), USF (între -2664 și -2658). În urma analizei datelor din literatură și a datelor furnizate de analiza computațională, adițional la mecanismele descrise în literatură, se pot sugera următoarele mecanisme de reglare a expresiei C/EBP β :

1. Prin intermediul factorilor de transcripție Sp1 și Egr-1

Este posibil ca legarea Sp-1 la unul dintre cele 3 situsuri specifice sau la caseta GC identificată la nivelul fragmentului de promotor analizat să aibă loc in vivo. Faptul că Sp-1 este exprimată mai târziu în procesul de diferențiere a preadipocitelor, iar C/EBP β este exprimată încă din etapele timpurii fiind represată în adipocitele mature, sugerează faptul că legarea Sp-1 poate avea efect represor asupra expresiei C/EBP β în adipocitele mature. Prezența celor două situsuri duale Sp-1/Egr-1 poate duce la competiția dintre cei doi factori pentru situsul respectiv și, așa cum este descris în anumite situații în literatură, la acțiuni antagoniste a celor doi factori. În aceste condiții modularea expresiei C/EBP β depinde de nivelul de expresie a celor doi factori la nivel celular.

2. Prin intermediul factorilor de transcripție GATA

În fragmentul din promotorul genei C/EBP β analizat s-au identificat un situs GATA2 și două situsuri GATA1. Un situs GATA1 este adiacent cu o triadă de situsuri CP2. Aceste situsuri CP2/GATA au fost identificate la mai multe gene eritroid specifice și, fiind situsuri conservate în secvența ADN a C/EBP β de-a lungul evoluției, este posibil să moduleze expresia C/EBP β . GATA1 nu este exprimat în preadipocite și adipocitele mature; în schimb, există studii în literatură care au investigat rolul GATA2 și GATA3 la procesul de diferențiere a preadipocitelor. Există studii de literatură care au demonstrat legarea in vivo a GATA2 și GATA3 atât la C/EBP α cât și la C/EBP β . Toate acestea sugerează că în absența expresiei constitutive a GATA1 în preadipocite și

adipocitele mature, este posibil ca la situsurile GATA1 să se lege GATA2 sau GATA3 pentru modelarea expresiei $C/EBP\beta$ în preadipocite. În cazul celulelor progenitoare hematopoietice, în care GATA1 este constitutiv exprimată, legarea proteinei GATA1 la situsurile corespunzătoare duce la modularea expresiei $C/EBP\beta$, iar existența simultană a situsurilor CP2 și GATA1 sugerează o posibilă activare a factorului de transcripție $C/EBP\beta$ în acest tip de celule.

3. Prin intermediul factorului de transcripție TCF/LEF-1

Acest mod de reglare a $C/EBP\beta$ implică semnalizarea Wnt. Analiza datelor de literatură privind rolul căii de semnalizare Wnt în procesul de adipogeneză, au indicat un rol represor exercitat de TCF/LEF-1 asupra procesului de adipogeneză, prin efectul represor direct asupra expresiei $C/EBP\alpha$ și $PPAR\gamma$, neavând nici o influență asupra expresiei temporare a $C/EBP\beta$ în preadipocite. În aceste condiții este posibil ca influența semnalizării Wnt, sau influența altor mecanisme care inhibă adipogeneza să aibă efect asupra capacității $C/EBP\beta$ de a induce $PPAR\gamma$ și $C/EBP\alpha$, sau asupra feed-back-ului pozitiv de reglare a expresiei $C/EBP\alpha$ prin intermediul $PPAR\gamma$. Urmărindu-se situsurile adiacente situsului pentru TCF/LEF-1 s-a remarcat existența unui situs $C/EBP\beta$ în imediata vecinătate a situsului TCF/LEF-1. Este posibil ca legarea TCF/LEF-1 la situsul corespunzător din promotorul $C/EBP\beta$ să afecteze capacitatea $C/EBP\beta$ de a interacționa cu el însuși sau cu alți factori din familia C/EBP care pot lega acest situs adiacent TCF/LEF-1 și acest lucru s-ar putea reflecta în capacitatea de reglare a $PPAR\gamma$ și $C/EBP\alpha$ de către $C/EBP\beta$.

4. Prin intermediul complexului AML1/MDS/EVI-1

Prin existența alelei rare corespunzătoare polimorfismului **-3429 C/T** se creează un nou situs pentru factorul MELI. MEL-1 (MDS-EVI I -like factor) nou creat se află în vecinătatea unui situs AML1/CBFA2 deja existent, pe care nu îl modifică, dar existența acestor două situsuri vicinale este posibil să ducă la legarea de oligomeri AME (AML1/MDS/EVI-1) în cazul leucemiilor acute mieloide și a sindromului displastic. Legarea acestor oligomeri poate duce la represarea $C/EBP\beta$. În condiții fiziologice normale, factorul MEL-I nu este activat transcripțional, ceea ce sugerează ideea că acest polimorfism nu este funcțional în condiții fiziologice normale, ci numai în leucemiile acute mieloide și sindromul displastic. În studiul de față s-a realizat distrugerea situsului polimorfic MEL I care ar putea deveni activ în cazul leucemiilor, folosind un plasmid care conținea varianta alelică rară **-3429T** a promotorului $C/EBP\beta$ la care s-a aplicat reacția de mutagenză dirijată la nivelul situsului polimorfic pentru transformarea **-3429 T→C**. Aceasta deschide cel puțin două căi noi de cercetare: identificarea capacității de legare a secvenței ADN nou create de complexul AML1/MDS/EVI-I în cazul leucemiilor acute mieloide și a sindromului displastic sau cercetarea influenței celor două variante alelice ale promotorului $C/EBP\beta$ asupra expresiei luciferazei în preadipocite și adipocitele mature.

5. Prin intermediul factorului de transcripție NUDR

Cele două polimorfisme adiacente -411/-412CG/TT $C/EBP\beta$ crează premisele legării factorului de transcripție NUDR cu o mai mare probabilitate deoarece crează o a doua unitate NUDR în vecinătatea uneia existente deja. NUDR este represor al proliferării celulare acționând prin legarea la elementele de răspuns la acidul retinoic-RARE. Este posibil ca legarea NUDR să inhibe expresia $C/EBP\beta$ afectând în acest fel procesul de adipogeneză. Tendința asocierii inverse a existenței alelelor rare T cu nivelul de colesterol și obezitatea la subiecții cu probleme cardiovasculare considerați în cadrul acestui studiu sugerează o posibilă represare a $C/EBP\beta$ prin intermediul NUDR care duce la modificarea expresiei unor gene implicate în metabolismul colesterolului așa încât nivelul de colesterol din sânge scade, iar procesul de adipogeneză este inhibat.

6. Prin procese de metilare-demetilare

Analiza insulelor CpG a indicat existența a 2 regiuni cu un conținut mare de dinucleotide CpG la om, susceptibile la procesul de metilare-demetilare (între -794 și -516, -514 și -62).

C.Posibilități de reglare a C/EBPα

În cadrul acestui obiectiv s-a investigat atât secvența ADN de tip sălbatic (wild-type) a 3000 bp din promotorul *C/EBPα* cât și secvența mutantă generate de polimorfismele -2970 G/A, -2269 C/T, -1801 C/T, -1050 C/G, în vederea identificării factorilor de transcripție cu probabilitatea cea mai mare de a fi funcționali in vivo. Au fost identificați următorii factori cu probabilitate mare de a fi funcționali: GATA (între -2961 și -2957), HNF4 (între -1602 și -1597 respectiv între -77 și -72), situsuri duale HNF4/ PPARγ:RXR (între -2482 și -2417 respectiv între -1066 și -1059), USF (între -1206 și -1200 respectiv între -271 și -265), caseta GC (între -644 și -639) și două situsuri Sp-1 (între -1310 și -1316 respectiv între -379 și -373), caseta TATA (între -30 și -25), WT-1 (între -261 și -263), situsul dual p53/Ahr:ARNT (între -1058 și -1048), E2F (între -591 și -583) și MZF-1 (-2272 și -2265), Oct-1 (între -1802 și -1795) și Gli-1 (între -1052 și -1043)

Analiza funcțională in vitro a celor patru polimorfisme -2970G/A, -2269C/T, -1801C/T, -1050C/G prin analiza activității luciferazei aflată sub controlul promotorului *C/EBPα* mutant în celulele 3T3-F442A a sugerat posibilitatea ca proteina p53 să funcționeze ca un activator al expresiei *C/EBPα* în adipocitele mature, în timp ce factorii de transcripție Oct-1 și Gli-1 au fost identificați ca posibili represori ai expresiei *C/EBPα* în adipocitele mature, sugerând astfel că polimorfismele -1801C/T și -1050C/G sunt funcționale. Rezultatele analizei activității luciferazei au sugerat posibilitatea MZF-1 și GATA-2 de a funcționa ca represori ai *C/EBPα* și indică posibilitatea ca situsul -2269C/T să fie funcțional. În ceea ce privește polimorfismul -2970G/A, rezultatele EMSA au demonstrat legarea ambelor secvențe ce conțin alelele -2970G și -2970A la proteinele nucleare, ceea ce demonstrează că polimorfismul -2970G/A este funcțional. În prezența alelei rare A se creează un nou situs HSF (pentru legarea proteinelor de șoc termic). Rezultatele analizei activității reporterului sugerează că în prezența alelei -2970G, proteinele GATA-2 și GATA-3 s-ar putea lega la secvența ADN corespunzătoare, manifestându-și efectul represor în preadipocite, în timp ce în prezența alelei -2970A s-ar putea lega factorii de transcripție din categoria proteinelor de șoc termic ce stimulează expresia *C/EBPα* atât în preadipocite cât și în adipocite. Ca urmare a analizei in silico, in vitro și in vivo se pot sugera următoarele modalități de reglare a expresiei *C/EBPα*:

1. Reglarea prin procese de metilare-demetilare

Posibilitatea reglării epigenetice prin procese de metilare-demetilare la resturile de citozină aflate în regiuni bogate în dinucleotide CG (insulele CpG). Analiza insulelor CpG a indicat existența a 4 insule CpG la om susceptibile la procesul de metilare-demetilare (între -1840 și -1735, -1494 și -1392, -1367 și -290, -280 și -7).

2. Reglarea prin intermediul factorilor de transcripție p53, Ahr:ARNT și Gli-1

În secvența ADN wild-type a promotorului *C/EBPα* analizată s-a identificat un situs dual p53/Ahr:ARNT. În condiții bazale, când celulele nu sunt expuse la dioxină sau la alți liganzi aromatici, situsul dual poate fi utilizat de proteina p53 pentru modularea expresiei *C/EBPα*. Rezultatele prezentului studiu indică p53 ca un potențial activator al expresiei *C/EBPα* în adipocitele mature. În condițiile expunerii la poluanți din mediu cu structură aromatică, situsul dual p53/Ahr:ARNT poate fi

utilizat de către heterodimeri Ahr:ARNT și acționând astfel ca inhibitori ai adipogenezei așa cum s-a indicat în alte studii descrise în literatură. În condițiile existenței alelei rare a polimorfismului -1050C/G s-a creat un nou situs pentru Gli-1. Studiul de față a relevat posibilitatea ca Gli-1 să fie un nou factor care acționează ca represor al expresiei *C/EBP α* în adipocitele mature.

3. Reglarea prin intermediul factorului nuclear hepatic HNF4 și a PPAR γ

La nivelul fragmentului din promotorul *C/EBP α* analizat s-au identificat două situsuri duale HNF4/ PPAR γ :RXR. Probabilitatea ca aceste situsuri să fie funcționale este foarte mare, atâta timp cât este descrisă în literatură reglarea feed-back pozitivă a genelor PPAR γ și *C/EBP α* . Este posibil ca, în hepatocite, HNF4 să se lege la acest situs dual, în timp ce în adipocite, pe măsură ce expresia PPAR γ crește, acesta să se lege ca heterodimer la situsul dual și să activeze expresia *C/EBP α* . Unul dintre situsurile HNF4/ PPAR γ :RXR este adiacent situsului dual p53/Ahr:ARNT și este posibil ca legarea PPAR γ la situsul dual să influențeze totodată legarea proteinei p53, care așa cum indică rezultatele studiului de față are un efect reglator pozitiv asupra expresiei *C/EBP α* în adipocitele mature.

4. Reglarea prin intermediul factorilor de transcripție GATA-2 și GATA-3

Un situs GATA, care se suprapune peste situsul MZF-1, cuprinde situsul polimorfic -2269 C/T. Studiul de față sugerează că MZF-1 are un efect represor mai puțin puternic prin comparație cu factorii GATA în preadipocite. În prezența alelei rare -2269 T, situsul MZF-1 este distrus rămânând posibilitatea legării factorilor de transcripție GATA. Datele din literatură indică faptul că GATA-1 nu este exprimat nici în preadipocite, nici în adipocitele diferențiate. În aceste condiții, la situsul GATA se pot lega proteinele GATA-2 sau GATA-3 care sunt descrise în literatură ca factori preadipocitari, care reprimă expresia PPAR γ și implicit pe cea a *C/EBP α* . Rezultatele studiului de față au sugerat efectul represor al acestora asupra expresiei *C/EBP α* în preadipocite. Pe de altă parte, un alt situs GATA aflat în imediata vecinătate a polimorfismului -2970G/A poate modula expresia *C/EBP α* . În prezența alelei rare A se creează un nou situs pentru HSF (pentru legarea proteinelor de șoc termic-HSP). Aceste rezultate sugerează că în prezența alelei -2970G, proteinele GATA-2 și GATA-3 s-ar putea lega la secvența ADN corespunzătoare, manifestându-și efectul represor în preadipocite, în timp ce în prezența alelei -2970A s-ar putea lega factorii de transcripție din categoria proteinelor de șoc termic ce stimulează expresia *C/EBP α* atât în preadipocite cât și în adipocite.

În teza de față s-au identificat multiple posibilități de reglare a genelor *EC-SOD*, *C/EBP β* , *C/EBP α* atât în condiții bazale cât și în condițiile existenței anumitor polimorfisme asociate cu factori implicați în procesele care au loc la interfața între sindromul metabolic, diabet și bolile cardiovasculare. S-a evidențiat experimental posibila implicare a GATA-2 sau GATA-3, MZF-1, HSP, Oct-1, p53, Gli-1 și a proteinelor de șoc termic în procesul de adipogeneză. Totuși, trebuie ținut cont de faptul că analiza activității genei reporter este o analiză *in vitro* pe culturi celulare murine, iar EMSA este o metodă care dă informații cu privire la legarea secvenței ADN (normale sau modificate) la proteinele nucleare dar nu demonstrează interacțiunea directă a unui anumit factor de transcripție cu secvența ADN corespunzătoare. Acest lucru constituie o nouă direcție de cercetare ce va putea fi investigată în viitor, folosind metoda imunoprecipitării cromatinei (ChIP). Multe din cercetările realizate conțin elemente de noutate la nivel național. În acest sens, trebuie menționat ca o nouă strategie de analiză funcțională a promotorilor genelor studiate, aplicarea analizei computaționale pentru cele trei gene în scopul identificării unor posibilități de reglare a acestora. Pe baza rezultatelor obținute în urma analizei computaționale efectuate s-a rezolvat în fond o problemă de

optimizare utilizând metode de căutare adecvate. În același context, s-a realizat și o analiză de sensibilitate în vederea clasificării influenței diferiților parametri asupra nivelului speciilor reactive ale oxigenului în organismul uman.

Rezultatele cercetării din teză au fost publicate sau comunicate după cum urmează:

- 3 articole în reviste cotate ISI:
- Conform referinței [254] **SAMOILA C.**, CARTER A., FUTERS T.S., OTIMAN G., ANGHEL A., TĂMAȘ L., E.SECLAMAN, *Biochemical Genetics*, 46 (9-10): 634-643, 2008
- Conform referinței [149] **C. SAMOILĂ**, A.X.LUPEA, A.MOTOC, A.ANGHEL, L.TĂMAȘ, *Revista de Chimie*, 58 (12):1253-1256, 2007
- Conform referinței [277] **SAMOILA C.**, LUPEA A.X., ANGHEL A., MOTOC M., OTIMAN G., MOTOC A., TĂMAȘ L., *Rev. Chim.*, 59 (7), 773-778, 2008
 - un articol publicat în reviste de categorie B⁺
- conform referinței [326] **C. SAMOILĂ**, A. X. LUPEA, M.MOTOC, *Scientific and Technical Bulletin, Chemistry, Food Science & Engineering XII*, Vol.11, p.98-106, ISSN 1582-1021, 2006
 - un articol în revistă națională medicală:
- conform referinței [172] **C.SAMOILĂ**, F.SFRIJAN, A.POPESCU, M.MOTOC, *Revista de Igienă și Sănătate Publică*, vol. XLXIV, nr.1-2, p.95-100, ISSN 1221-2520, 2004
 - 2 monografii în edituri naționale:
- conform referinței [137] F.SFRIJAN, L.TĂMAȘ, **C.SAMOILĂ**, *Ed. Marineasa*, ISBN 978-973-631-445-2, 2007
- conform referinței [138] **C. SAMOILĂ**, F.SFRIJAN, L.TĂMAȘ, *Ed. Marineasa*, 2007, ISBN 978-973-631-443-8, 2007
 - 6 comunicări la conferințe internaționale și naționale:
- conform referinței [245] S.DRĂGAN, C.SOCACIU, S.URSONIU, M.RADA, **C.SAMOILĂ**, D.KAYCSA, *Journal of Clinical Lipidology*, vol.1, nr.5, 2007, p.513, ISSN 1933-2874
- conform referinței [246] S. DRĂGAN, S. URSONIU, M. RADA, D. VELIMIROVICI, D. KAYCSA, **C. SAMOILĂ**, S. MANCAS, 3rd International Congress on Complementary Medicine Research, 29-31 March 2008, Sydney Convention Centre Darling Harbour, Australia
- conform referinței [247] S. DRĂGAN, S. URSONIU, D. KAYCSA, **C. SAMOILĂ**, M. RADA, C. SOCACIU, Greece, 2008
- conform referinței [370] **C.SAMOILĂ**, L.TĂMAȘ, E.ȘECLAMAN, A.NEGHINĂ, The Annual Conference of the Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 6-8 September Timișoara, Annals of West University of Timisoara, Series of Chemistry, p35, 2007, ISSN 1224 9513
- conform referinței [327] **C.SAMOILĂ**, A.ANGHEL, **A.X.LUPEA**, M.MOTOC, The Annual Conference of the Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 6-8 September Timișoara, Annals of West University of Timisoara, Series of Chemistry, p37, 2007, ISSN 1224 9513
- conform referinței [170] **C.SAMOILĂ**, G.OTIMAN, A.CARTER, S. FEUTERS, A.ANGHEL, *Atherosclerosis*, XIV International Symposium on Atherosclerosis, Rome, Italy, vol.7 suppl., nr.3, p.293, ISSN 1567-5688, 2006

VII. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. WOLIN MS. Interaction of oxidants with vascular signaling systems. Brief review. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 20(6):1430-42, 2000
2. MCINTYRE M., BOHR DF., DOMINICZAK AF., Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion, *Hypertension* 34(4 Pt 1):539-45.1999
3. IWAI K., DRAKE S.K., WEHR N.B., WEISSMAN A.M., LAVAUTE T., MINATO N., KLAUSNER R.D., LEVINE R.L., ROUAULT T.A., Iron dependent oxidation, ubiquitination, and degradation of iron regulatory protein-2: implications for degradation of oxidized proteins, *Proc.Natl. Sci.USA* , 95: 4924-4928,1998
4. STADTMAN E.R., OLIVER C.N. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences, *J.Biol. Chem.*, 266:2005-2008, 1991
5. HALLIWELLA B., CLEMENT MV., LONGA LH. Minireview: Hydrogen peroxide in the human body, *FEBS Lett.* ;486(1):10-3, 2000
6. FENTON , H.J.H., "Oxidation of tartaric acid in presence of iron", *J.Chem. Soc.*,65: 899, 1894
7. YANG M-X, CEDERBAUM AI., Role of cytochrome b5 in NADH dependent microsomal reduction of ferric complexes, lipid peroxidation and hydrogen peroxide generation , *Arch. Biochem.Biophys.*, 324:282-292, 1995
8. HABER F., WEISS J., The Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Iron Salts, *Proc. R. Soc. London*, 1934,147,332
9. GRIENGLING KK., SORESCU D., USHIO-FUKAI M., NAD(P)H oxidase: Role in cardiovascular biology and disease, *Circulation*, 17;86(5):494-501. 2000
10. CAI H., HARRISON D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidant stress. *Circulation*, 0;87(10):840-4., 2000
11. IRANI K., Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: A review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling, *Circulation* 4;87(3):179-83.2000
12. IDE T., TSUTSUI H., KINUGAWA S. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium, *Circulation*;85(4):357-63. 1999
13. PAGANO PJ., TORNHEIM K., COHEN RA. Superoxid anion production by rabbit thoracic aorta: efect of endothelium-derived nitric oxide. *Am J Physiol.*, 265(2 Pt 2):H707-12. ,1993
14. FREEMAN BA., CRAPO JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury, *Lab Invest.* 47(5):412-26, 1982
15. BARETT EG, JOHNSTON C., OBERDORSTER G., FINKELSTEIN JN, Silica-induced chemokine expression in alveolar type II cells is mediated by TNF- α -induced oxidant stress, *Am.J.Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 276: L979-988,1999
16. GRIENGLING KK., USHIO - FUKAI M., Redox control of vascular smooth muscle proliferation, *J Lab Clin Med.* 132(1):9-15, 1998
17. PAGANO PJ., CHANOCK SJ., SIWIK DA., COLLUCI WS., CLARK JK. Angiotensin II induces P67phox mRNA expression and NADPH oxidase

- superoxide generation in rabbit aortic adventitial fibroblasts, *Hypertension*, 32(2):331-7, 1998
18. OHARA Y., PETERSON TE., HARRISON DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest.*, 91(6):2546-51, 1993
 19. BHUNIA AK., HAN H., SNOEDEN A., CHATTERJEE S. Redox - regulated signaling by lactosylceramide in the proliferation of human aortic smooth muscle cell. *J Biol Chem.*, 272(25):15642-9, 1997
 20. GRIENGLING KK., MINIERI CA., OLLERENSHAW JD., ALEXANDER RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cell. *Circ Res.*, 74(6):1141-8, 1994
 21. HOLLAND JA., MEYER JW., CHANG MM., O'DONNELL RW., JOHNSON DK., ZIEGLER LM., Thrombin stimulated reactive oxygen species production in cultured human endothelial cells, *Endothelium*, 6(2):113-21, 1998
 22. MARUMO T., SCHINI - KERTH VB., FISSLTHALER B., BUSSE R., Platelet - derived growth factor - stimulated superoxide anion production modulates activation of transcription factor NF - kappa B and expression of monocyte chemoattractant protein - 1 in human aortic smooth muscle cell, *Circulation*, 96(7):2361-7, 1997
 23. GRIENGLING KK., SORESCU D., LASSEQUE B., USHIO-FUKAI M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 20(10):2175-83, 2000
 24. DUPOND GP., HUECKSTEADT TP., MARSCALL BC., RYAN US., MICHAEL JP., HOIDAL JR. Regulation of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity and gene expression in cultured rat pulmonary endothelial cells. *J Clin Invest.*, 89(1):197-202, 1992
 25. SANDERS SA, EISENTHAL R, Harrison R, NADH oxidase activity of human xanthin oxidoreductase - generation of superoxide anion, *Eur. J. Biochem.*, 245:541-548, 1997
 26. ROSEN GM., Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem.*, 267(34):24173-6., 1992
 27. HEINZEL B., JOHN M., KLATT P., BOHME E., MAYER B. Ca²⁺/calmodulin - dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem J.*, 281 (Pt 3):627-30, 1992
 28. VASQUEZ - VIVAR J., KALYANAMARAN B., MARTASEK P., HOGG N., MASTERS BS., KAROUI H., TORDO P., PRITCHARD KA JR., Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 95(16):9220-5, 1998
 29. DAVIGNON J., GANZ P., Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis, *Circulation*, 109(23 Suppl 1):III27-32, 2004,
 30. KUKREJA RC, KONTOS HA, HESS ML, ELLIS EF, PGH synthetase and lipooxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH., *Circ. Res.*, 1986; 59:612-619
 31. THANNICKAL V.J., FANBURG B.L., Reactive oxygen species in cell signaling, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 279: L1005-L1028, 2000
 32. GUPTA S, RUPAWALLA BA, PHILLIBERT D., WOLIN MS., Regulation of NO elicited pulmonary artery relaxation and guanilate cyclase activation by NO. *Am J. Physiol.*, 276: H1535-H1542, 1999

33. NYENGAARD JR, VAN DEN ENDEN M., KILO C., TILTON RG, Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications, *Diabetes*, 42:801-813, 1993
34. DAS SK., WHITE AC, FANBURG BL, Modulation of transforming growth factor-beta-1 antiproliferative effects on endothelial cells by cysteine, cystine and N-acetylcysteine, *J. Clin. Invest.*, 90:1649-1656, 1992
35. DAS SK., WHITE AC, FANBURG BL, Reduction of glutathione is associated with growth restriction or enlargement of bovine pulmonary artery endothelial cells produced by transforming growth factor-beta-1, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 6: 364-368, 1992
36. CANTIN AM, LARIVÉE P, BEGIN RO, Extracellular glutathione suppresses human lung fibroblast proliferation. *Am. J. Cell. Mol. Biol.* 3: 79-85, 1990
37. CHEESEN KH, HOLLEY AE, KELLY FJ, WASIL M, HUGHES L., BURTON G. Biokinetics in humans of RRR- α -tocopherol: the free phenol, acetate ester and succinate ester forms of vitamin E, *Free Radic. Biol. Med.*, 19: 591-598, 1995
38. SATO K, NIKI E, SHIMASAKI H, Free radical-mediated chain oxidation of low density lipoprotein and its synergistic inhibition by vitamin E and vitamin C, *Arch. Biochem. Biophys.*, 279: 402-405, 1990
39. SMITH TL, KUMMEROW FA, Effect of dietary vitamin E on plasma lipids and atherogenesis in restricted ovulator chickens, *Atherosclerosis*, 87:9-16, 1991
40. WILLINGHAM AK, NOLANOS C, BOHANNAN E, CANEDELLA RJ, The effects of high levels of vitamin E on the progression of atherosclerosis in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits, *J. Nutr. Biochem* 4: 651-654, 1993
41. ARUOMA OI, Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants, *Food Chem Toxicol* 32: 671-683, 1994
42. WATSON RR, LEONARD TK, Selenium and vitamins A, E and C: nutrients with cancer prevention properties, *J. Am. Diet Assoc*, 86:505-510, 1986
43. PRASAD KN, EDWARDS-PRASAD J., Effect of tocopherol (vitamin E) acid succinate on morphological alterations and growth inhibition in melanoma cells in culture. *Cancer Res.* , 42:550-555, 1982
44. LLOYD JK, The importance of vitamin E in human nutrition, *Acta Paediatr. Scand.*, 79:6-11, 1990
45. SHKLAR G., SCHWARTZ J., TRICKLER D., REID S., Regression of experimental cancer by oral administration of combined alpha-tocopherol and beta-carotene. *Nutr. Cancer.*, 12:321-325, 1989
46. WILLETT WC, STAMPFER MJ, UNDERWOOD BA, TAYLOR JO, HENNEKENS CH, Vitamins A, E and carotene: effects of supplementation on their plasma levels. *Am. J. Clin. Nutr.* , 38:559-556, 1983
47. PERCHELLET JP, ABNEY NL, THOMAS RM, GUISLAIN YL, PERCHELLET EM, Effects of combined treatment with selenium, glutathione, and vitamin E on glutathione peroxidase activity, ornithine decarboxylase induction, and complete and multistage carcinogenesis in mouse skin, *Cancer Res.* 47: 477-485, 1987
48. SHKLAR G., SCHWARTZ J., TRICKLER D., REID S., Prevention of experimental cancer and immunostimulation by vitamin E (immunosurveillance), *J. Oral Pathol. Med.* , 19:60-64, 1990
49. KNEKT P, AROOMA A, MAATELA J, AARAN RK, NIKKARI T, HAKAMA M, HAKULINEN T, PETO R, SAXEN E, TEPPU L, Serum vitamin E and risk of

- cancer among Finnish men during a 10-year follow-up. *Am. J. Epidemiol* , 127:28-41, 1998
50. LESTER PACKER, ENRIQUE CADENAS, Handbook of antioxidants, 2nd edition, Marcel Dekker. Inc., 2002
 51. SERBINOVA E, KAGAN V., HAN D., PACKER L., Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Free Radic. Biol. Med.*, 10:263- 275, 1991
 52. SUZUKI YJ., TSUCHIYA M., WASSALL SR, CHOO YM, GOVIL G., KAGAN V.E., PACKER L., Structural and dynamic membrane properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol: implication to the molecular mechanism of their antioxidant potency. *Biochemistry* 32: 10692-10699, 1993
 53. QURESHI AA, QURESHI N, HASLER-RAPACZ J.O. ET AL. Dietary tocotrienols reduce concentrations of plasma cholesterol, apoprotein B, tromboxan B₂, and platelet factor 4 in pigs with inherited hyperlipidemias, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991; 53:1042S-1046S
 54. QURESHI A.A., QURESHI N., HASLER-RAPACZ ET AL., Dietary tocotrienols reduce concentrations of plasma cholesterol, apoprotein B, tromboxane B₂, and platelet factor 4 in pigs with inherited hyperlipidemias, *Am. J. Clin. Nutr.*, 53: 1042S-1046S, 1991
 55. MENSINK R.P., VAN HOUWELINGEN A.C., KROMHOUT D., HORNSTRA G., A vitamin E concentrate rich in tocotrienols had no effect on serum lipids, lipoproteins, or platelet function in men with mildly elevated serum lipids concentrations. *J. Biol. Chem.*, 261: 10544-10550, 1986
 56. BUETTNER GR, MOSELEY PL, EPR spin trapping of free radicals produced by bleomycin and ascorbate. *Free Radic. Res. Commun.* 19:S89-S93, 1993
 57. FREI B., STOCKER R., ENGLAND L, AMES BN. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma, *Adv. Exp. Med. Biol* 264:155-163, 1990
 58. HALLBERG L., BRUNE M., ROSSANDER- HULTHEN L., Is there a physiological role of vitamin C in iron absorption?, *Ann. NY Acad Sci* 498: 324-332, 1987
 59. HALLBERG L., BRUNE M., ROSSANDER- HULTHEN L., Is there a physiological role of vitamin C in iron absorption?, *Ann. NY Acad Sci* 498: 324-332, 1987
 60. HORNING D. Distribution of ascorbic acid, metabolites and analogues in man and animals. *Ann. NY Acad Sci* 258:103-118, 1975
 61. KEITH MO, PELLETIER O., Ascorbic acid concentrations in leukocytes and selected organs of guinea pigs in response to increasing ascorbic acid intake. *Am J. Clin. Nutr.* 27:368-372, 1974
 62. HORNING D., WEBER F., WISS O., Tissue distribution of labelled material in vitamin C-deficient guinea pigs after intravenous injection of (1-¹⁴C) ascorbic acid or (1-¹⁴C) dehydroascorbic acid, *Int. J., Vitam. Nutr. Res.* 42: 511-523, 1972
 63. CHINOY NJ., Ascorbic acid levels in mammalian tissues and its metabolic significance. *Comp. Biochem. Physiol. A.*, 42: 945-952, 1972
 64. PARKER R.S., SWANSON J.E., YOU C.S., EDWARDS A.J., HUANG T., Bioavailability of carotenoids in human subjects, *Proc. Nutr. Soc.* 58: 1-8, 1999

65. DEMING D.M., ERDMAN J.W.JR, Mammalian carotenoid absorption and metabolism, *Pure Appl. Chem.*, 71 (12): 2213-2223, 1999
66. WISEMAN H., Dietary influences on membrane function. Importance in protection against oxidative damage and disease, *Nutr. Biochem.*, 7:2-15, 1996
67. GRUSZECKI WI, SUJAK A., STRZALKA K., RADUNZ A., SCHMIS G.H., Organization of xanthophyll-lipid membranes studied by means of specific pigment antisera, spectrophotometry and monomolecular layer technique: lutein versus zeaxanthine, *Z. Naturforsch.*, 54: 517-525, 1999
68. STAHL W, NICOLAI S., BRIVIBA K., HANUSCH M., Biological activities of natural and synthetic carotenoids: induction of gap junctional communication and singlet oxygen quenching, *Carcinogenesis* 18:89-92, 1997
69. BRITTON G., Structure and properties of carotenoids in relation to function, *FASEB J.*, 9: 1551-1558, 1995
70. HIRAYAMA O., NAKAMURA K., HAMADA S., KOBAYASI Y., Singlet oxygen quenching ability of naturally occurring carotenoids, *Lipids*, 29: 149-150, 1994
71. DI MASCIO P., KAISER S., SIES H., Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher, *Arch. Biochem. Biophys.* 1989; 274: 532-538, 1989
72. MILLER N.J., SAMPSON J., CANDEIAS L.P., BRAMLEY P.M., RICE-EVANS CA., Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls, *FEBS Lett* 384: 240-242, 1996
73. WOODALL AA., BRITTON G., JACKSON M.J., Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: relationship between carotenoid structure and protective ability, *Biochim. Biophys. Acta*, 1336:575-586, 1997
74. LEVIN G, YESHURUN, MOKADY S., In vivo antiperoxidative effect of 9-cis - β -carotene compared with that of all-trans isomer. *Nutr. Cancer.* 27: 293-297, 1997;
75. PALOZZA P., KRINSKY N.I., β -Carotene and α -tocopherol are synergistic antioxidants, *Arch. Biochem. Biophys.* 297:184-187, 1992
76. HOLLANDER D., PAUL E., RUBLE J., β -Carotene intestinal absorption: bile, fatty acid, pH and flow rate effects on transport. *Am. J. Physiol.*, 235: E686-E691, 1978
77. BOREL P., GROLIER P., ARMAND M., PARTIER A., LAFONE H., LAIRON D., AZAIS -BRAESCO V., Carotenoids in biological emulsions: solubility, surface to core distribution, and release from lipid droplets, *J.Lipid.Res.*, 37: 250-261, 1996
78. BOILEAU AC., MERCHEN N.R., WASSON K., ATKINSON C.A., ERSMAN JW JR., cis-Lycopene is more bioavailable than trans-lycopene in vitro and also in vivo in the lymph cannulated ferret, *J. Nutr.* 129: 1176-1181, 1999
79. JOHNSON EJ., RUSSELL RM., Distribution of orally administered β -Carotene among lipoproteins in healthy men, *Am.J.Clin. Nutr.*, 56: 128-135, 1992
80. TRABER MG., DIAMOND DR, LANE JC, BRODY RI, KAYDEN JH., β -Carotene transport in human lipoproteins. Comparisons with α -tocopherol., *Lipids.* 29:665-669; 1994

81. PATEAU I., KHACHIK F., BROWN E.D., BEECHER G.R., KRAMER T.R., CHITTANS J., CLEVIDENCE BA., Chronic ingestion of lycopene-rich tomato juice or lycopene supplements significantly increases plasma concentrations of lycopene and related tomato carotenoids in humans, *Am.J. Clin.Nutr.* 68: 1187-1195, 1998
82. CLEVIDENCE BA, BIERI J.G., Association of carotenoids with human plasma lipoproteins, In: Abelson J., Simon MI., eds. *Methods in Enzymology.*, San Diego:Academic Press, 33-46, 1993
83. REDDY P.P., CLEVIDENCE BA, BERLIN E., TAYLOR P.R., BIERI J.G., SMITH J.C., Plasma carotenoid content and vitamin E profile of lipoprotein fractions of men fed a controlled typical U.S.diet., *FASEB J.*, 3:A955, 1989
84. PARKER R.S., Absorbtion, metabolism and transport of carotenoids, *FASEB J.*, 10:542-551, 1996
85. KRINSKY N.I., RUSSETT M.D., HANDELMAN G.J., SNODDERLY D.M., Structural and geometrical isomers of carotenoids in human plasma, *J. Nutr.* 120:1654-1662, 1991
86. STAFFORD HA. The metabolism of aromatic compounds. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 25: 459-486, 1974
87. RICE- EVANS C.A., MILLER N.J., PAGANGA G., Structure antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids, *Free Radic. Biol. Med.* 20-933-956, 1996
88. JOVANOVIC S.V., STEENKEN S., TOSIC M. ET AL., Flavonoids as antioxidants, *J. Am. Chem.Soc.*, 116: 4846-4851, 1994
89. BARLETT D., CHURCH D., BOUNDS P., KOPPENOL W., The kinetics of the oxidation of L-ascobic acid by peroxynitrite, *Free Radic. Biol. Med* 18: 85-92, 1995;
90. GIULIVI C., CADENAS E., Ferrylmyoglobin: formation and chemical reactivity toward electron-donating compounds, *Methods Enzymol.* 233: 189-202, 1994
91. UPSTON J., TARENTIS A., STOCKER R., Tocopherol-mediated peroxidation of lipoproteins: implications for vitamin E as potential antiatherogenic supplement, *FASEB J.*, 13: 977-994, 1999
92. SCARPA M., RIGO A., MAIORINO M. , ORSINI F., GREGOLIN C., Formation of α -tocoferol by ascorbate during peroxidation of phosphatidyl choline liposomes, *Biochim. Biophys. Acta*, 801: 215-219, 1984
93. NIKI E., KAWAKAMI A., YAMMAMOTO Y., KAMIYA Y., Oxidation of lipids. VIII. Synergistic inhibition of oxidation of phosphatidyl choline liposome in aqueous dispersion by vitamin E and C, *Bull. Chem. Soc. Jpn*, 58: 1971-1975, 1985
94. DOBA T., BURTON G., INGOLD K., Antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C either alone or in the presence of vitamin E or water soluble analogue upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*; 801:215-219, 1984
95. KAGAN V., SERBINOVA E., FORTE T., SCITA G, PACKER L., Recycling of vitamin E in human low density lipoproteins. *J.Lipid. Res.* 33:385-397, 1992
96. NARDINI M., NATELLA, GENTILI V.ET AL., Effect of caffeic acid dietary supplementation on antioxidant defence system in rat: an in vivo study. *Arch. Biochem. Biophys.*, 342: 157-160, 1997

97. STOCKER R., BOWRY V. Tocopherol-mediated peroxidation of lipoprotein lipids and its inhibition by co-antioxidants. In: Cadenas E., Packer L., eds. *Handbook of antioxidants*. New York: Marcel Dekker, 27-41, 1996
98. WITTING PK., WESTERLUND C., STOCKER R., A rapid and simple screening test for potential inhibitors of tocopherol-mediated peroxidation of LDL lipids. *J.Lipid. Res.* 37: 853-867, 1996
99. LANRANJINHA J., CADENAS E., Redox cycles of caffeic acids, α -tocopherol, and ascorbate: implications for protection of low density lipoproteins against oxidation. *IUBMB Life* 1999; 48:1-9
100. VIEIRA O, ESCARGUUEIL-BLANC I., MEILHAC O. ET AL., Effect of dietary phenolic compound son apoptosis of human cultured endothelial cells induced by oxidized LDL, *Br.J.Pharmacol.* , 123:565-573, 1998
101. Choudhury R., Srail S., Debnam E., Rice-Evans C., Urinary excretion of hydroxycinnamates and flavonoids after oral and intravenous administration, *Free. Radic. Biol.Med.* 27:278-286, 1999
102. BOURNE L, RICE-EVANS C., Urinary detection of hydroxycinnamates and flavonoids in human after high dietary intake of fruit. *Free Radic. Res.*, 28:429-438, 1998
103. Hagherman A.E., Butler L.G., The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J.Biol. Chem.*, 156: 4494-4498, 1981
104. AVIRAM M., FUHRMAN B., Polyphenolic flavonoids inhibit macrophage – mediated oxidation of LDL and attenuate atherogenesis. *Atherosclerosis* 137 (supplement)S45-S50, 1998
105. AVIRAM M., ROSENBALT M., BILLECKE S., EROGUL J., SORENSON R., BISGAIER C.L., NEWTON R.S., LA DU B., Human serum paraoxonase (PON-1) is inactivated by oxidized LDL low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free. Radic.Biol.Med.*, 26:892-904, 1999
106. STOLAR M., Metabolic Syndrome: controversial, but useful, *Cleveland Clinical Journal of Medicine*, 74 (3):199-208, 2007
107. NAIDOO DP, The link between microalbuminuria, endothelial dysfunction and cardiovascular disease in diabetes, *CV J South Africa*, 13 (4): 194-9, 2002
108. HALLER H., Epidemiologie und assoziierte Risikofaktoren der Hyperlipoproteinämie, *Z. Gesamte Inn.Med.*, 32, 124-128, 1977
109. REAVEN G.M., Sindrom X. *Blood Press Suppl.*, 4:13-16,1992
110. DEFRONZO R.A., FERRANNINI E., Insulin resistance:A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease, *Diabetes Care.*, Mar 14(3): 173-94, 1991
111. GINSBERG H.N., Insulin resistance and cardiovascular disease, *J.Clin. Invest.*, 106(4):453-8, 2000
112. ZIMMET P., ALBERTI K.G., SHAW J., Global and Societal Implications of the diabetes epidemic, *Nature*, 414 (6865): 782-7, 2001
113. BEASER RS, LEVY P., Metabolic syndrome: a work in progress, but a useful construct., *Circulation*, 115:1806-1818, 2007
114. DREXLER H, Endothelial dysfunction: clinical implications, *Prog. Cardiovasc.Dis* 39: 287-324, 1997
115. WHEATCROFT SB, WILLIAMS IL, SHAH AM, KEARNEY MT, Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function, *Diabet Med* 20:255-68, 2003

116. CUSI K, MAEZONO K, OSMAN A. ET AL. Insulin resistance differentially affects the PI-3-kinase-and MAP Kinase-mediated signaling in human muscle, *J.Clin.Invest* 105:311-20, 2000
117. RICHARD CUBBON, ADIL RAJWANI, STEPHEN WHEATCROFT, The impact of insulin resistance on endothelial function, progenitor cells and repair, *Diabetes and Vascular Disease Research*, 4:103-111, 2007
118. CABALLERO AE, Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance; a road to diabetes and heart disease, *Obes Res* 11:1278-89, 2003
119. JANSSON P.A., Endothelial dysfunction in insulin resistance and type 2 diabetes, *Journal of Internal Medicine* 262; 173-183, 2007
120. ROSS R., Atherosclerosis – an inflammatory disease, *N. Engl. J. Med*, 340:115-126, 1999
121. MALLAT Z, BENAMER H, HUGEL B ET AL., Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes, *Circulation* 101:841-3, 2000
122. STERN, M.P. Diabetes and cardiovascular disease – the 'common soil' hypothesis. *Diabetes* 44, 369-371, 1995.
123. BANFI C., ERIKSSON P., GRANDOMENICO G., MUSSONI L., SIRONI L., HAMSTEN A., TREMOLI E., Transcriptional regulation of plasminogen activator inhibitor type I gene by insulin: insights into the signaling pathway, *Diabetes*, 50 (7): 1522-30, 2001
124. ROSITO G.A., D`AGOSTINO R.B., MASSARO J., LIPINSKA I., MITTLEMAN MA, SUTHERLAND P., WILSON P.W., LEVY D., MULLER J.E., TOFLER G.H., Association between obesity and prothrombotic state: the Framingham Offspring Study, *Thromb, Haemostudy* 91(4): 683-9, 2004
125. CASTRO J.P., EL-ATAT F.A., MCFARLANE S.I., ANEJA A., SOWERS J.R., Cardiometabolic syndrome: pathophysiology and treatment , *Curr. Hypertens. Rep.*, 5(5): 393-401, 2003
126. GYLLENHAMMR H, Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide production, *J. Immunol. Methods*, 97: 209-213, 1987
127. HALLIWELL B., GUTTERINGE JM, AND CROSS CE, Free radicals antioxidants, and human disease: where are we now? , *J. Lab.Clin. Med.*, 119: 598-620, 1992
128. MARSHALL JJ, KONTOS HA, Endothelium and cerebral vascular disease, In: Rubanyi GM, ed. *Cardiovascular Significance of Endothelium-Derived Vasoactive Factors*, Mount Kisco, Ny: Futura Publishing Co., 125-145, 1991
129. CHANCE B., SIES H., BOVERIS A., Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiol. Rev.*, 59: 527-605, 1979
130. WINK DA., MITCHELL J.B., Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide, *Free Radic. Biol.Med.* 1998; 25: 434-456
131. WOLIN M.S., DAVIDSON CA, KAMINSKI PM., FAYNGERSH RP, MOZZAB HKM, Oxidant –nitric oxide signalling mechanisms in vascular tissue, *Biochemistry (Mosc.)*; 63: 810-816, 1998
132. MUGGE A., ELWELL G.H., PETERSON TE., HARRISON DG, Release of intact endothelium-derived relaxing factor depends on endothelial superoxide dismutase activity, *Am. J. Physiol.*, 260:C219-C225, 1991

133. YANG M-X., CEDERBAUM AI., Role of cytochrome b₅ în NADH-dependent microsomal reduction of ferric complexes, lipid peroxidation and hydrogen peroxide generation, *Arch. Biochem. Biophys.*, 324: 282-292, 1995
134. SAHI M., FUJII J., SUZUKI K., SEO H.G., KUZUYA T., HORI M., TADA M., FUJI S., TANIGUCHI M., Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide, *J.Biol.Chem.*, 270:21035-21039,1995
135. ISCHIROPOULOS H., ZHU L., CHEN J., TSAI M., MARTIN J.C., SMITH C.D., BECKMAN J.S., Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalized by superoxide dismutase, *Arch.Biochem. Biophys.*, 298:431-437, 1992
136. DREXLER H., Factors involved in the maintenance of endothelial function, *Am.J.Cardiol.*, 82:3S-4S, 1998
137. F.SFRIJAN, L.TĂMAȘ, **C.SAMOILĂ**, Markeri de risc coronarian în ateroscleroză, *Ed. Marineasa*, ISBN 978-973-631-445-2 , 2007
138. **C. SAMOILĂ**, F.SFRIJAN, L.TĂMAȘ, Metode de investigare a funcționalității mutațiilor și polimorfismelor naturale și induse la nivelul secvenței ADN, *Ed. Marineasa*, 2007, ISBN 978-973-631-443-8
139. SUNG-HAE LEE KANG,VIEIRA K, BUGERT J., Combining chromatin immunoprecipitation and DNA footprinting: a novel method to analyze protein-interaction in vivo., *Nucleic Acids Research*, 2002, 30, No 10.
140. WEINMANN A. S., Novel ChIP-based strategies to uncover transcription factor target genes in the immune system, *Immunology* , 4, 381-386, 2004
141. COCKERILL, P.N., Identification of DNase I hypersensitive sites within nuclei. *Methods in Molecular Biology.* ed. Tymms, M.J. pp28-46. *Human Press Inc.* 2000
142. SCHENA, M., SHALON, D., DAVIS, R.W. & BROWN, P.O., Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray, *Science*, 270, 467-470, 1995
143. ZAWEL L., REINBERG, D., Common themes in assembly and function of eukaryotic transcription complexes, *Annu.Rev. Biochem.*, 64, 533-561, 1992
144. KLINGENHOFF, A., FRECH, K., QUANDT, K., WERNER, T. Functional promoter modules can be detected by formal models independent of overall nucleotide sequence similarity, *Bioinformatics*, 15, p 180-186, 1999
145. KLINGENHOFF, A., FRECH, K., WERNER, T., Regulatory modules shared within gene classes as well as across gene classes can be detected by the same in silico approach, *In Silico Biol.* 2, S17-S26, 2002
146. WERNER, T., FESSELE, S., MAIER, H ., NELSON, P. J. Computer modeling of promoter organization as a tool to study transcriptional coregulation, *FASEB J.* 17, p 1228-1237, 2003
147. FIRULLI, A. B., OLSON, E. N., Modular regulation of muscle gene transcription: a mechanism for muscle cell diversity, *Trends Genet.* 13, p364-369, 1997
148. QIU P., Recent advances in computational promoter analysis in understanding the transcriptional regulatory network, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 309, p495-501, 2003
149. **C.SAMOILĂ**, **A.X.LUPEA**, A.MOTOC, A.ANGHEL, L.TĂMAȘ, Functional Analysis of Human Gene Promoters, *Revista de Chimie*, vol 58, Nr.12, 2007, ISSN 00347752

150. HENDRICKSON, D.J.; FISHER J.H., JONES C., HO Y.S., Regional localization of human extracellular superoxide dismutase gene to 4pter-q21, *Genomics*, 8: 736-738, 1990
151. FATTMAN C.L., SCHAEFER L.M, OURY, T.D., Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine, *Free Radic. Biol. Med.*, 35, 3: 236-256, 2003
152. MARKLUND,S.L., Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species, *Biochem. J.* 222, 649-655, 1984
153. FOLZ R.J., CRAPO J.D., Extracellular superoxide dismutase (SOD3): tissue-specific expression, genomic characterization, and computer-assisted sequence analysis of the human EC SOD gene, *Genomics*, 22 : 162-171, 1994
154. STRALIN,P., KARLSSON,K., JOHANSSON,B.O., MARKLUND,S.L. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 2032-2036, 1995
155. HORIUCHI M., TSUTSIN M., TASAKI H., MORISHITA T., SUDA O., SEI N., SHUN-ICHI, MASAHARU M., KOUZUMA R., OKAZAKI M., YANGIHARA N., ADACHI T., NAGAKASHIMA Y, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24:106 , 2004
156. MARKLUND,S.L.,Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species, *Biochem. J.* 222, 649-655, 1984
157. MARKLUND,S.L., Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines, *J. Clin. Invest* 74, 1398-1403, 1984
158. MARKLUND,S.L., Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight , *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 79 , p7634-7638, 1982
159. OURY,T.D., DAY,B.J. & CRAPO,J.D. Extracellular superoxide dismutase in vessels and airways of humans and baboons, *Free Radic. Biol. Med.* 20, 957-965, 1996
160. HJALMARSSON K., MAKLUND S.L., ENGSTROM A., EDLUND T., Isolation and sequence of complementary DNA encoding human extracellular superoxide dismutase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:6340-4, 1987
161. PETERSEN,S.V ENGHILD,J.J., Extracellular superoxide dismutase: structural and functional considerations of a protein shaped by two different disulfide bridge patterns, *Biomed. Pharmacother.* 59, 175-182, 2005
162. ADACHI T., OHTA H., HIRANO K., Non-enzymatic glycation of human extracellular superoxide dismutase, *Biochem. J.*, 279:263-7, 1991
163. KARLSSON L.M., LINDHAL U., MARKLUND S.L., Binding of human extracellular superoxide dismutase C to sulphated glycosaminoglycans, *Biochem.*, 256:29-33,1988
164. ADACHI T., MARKLUND S.L., Interactions between human extracellular superoxide dismutase C and sulfated polysaccharides, *J. Biol. Chem.*, 264: 8537-41,1989
165. FATTMAN C.L., CHANG L.Y., TERMIN T.A., PETERSEN L., ENGHILD J.J., OURY T.D., Enhanced bleomycine induced pulmonary damage in mice lacking extracellular superoxide dismutase, *Free Radic. Biol. Med.*, 35 (7):763-771, 2003

166. PETERSEN S., VALNICKOVA Z., OURY T.D., CRAPO J.D., NIELSEN N.C., ENGHILD J.J., The subunit composition of human extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) regulates enzymatic activity, *BMC Biochemistry*, 8:19, 1-7, 2007
167. SANDSTROM J., KARLSSON K., EDLUND T., MARKLUND S.L., Heparin-affinity patterns and composition of extracellular superoxide dismutase in human plasma and tissues, *Biochem J.*, 294: 853-857, 1993
168. ENGHILD J.J., THOGENSEN I.B., OURY T.D., VALNICKOVA Z., HOJRUP P., CRAPO J.D., The heparin-binding domain of extracellular superoxide dismutase is proteolytically processed intracellularly during biosynthesis, *J. Biol. Chem.*, 274: 14818-14 822, 1999
169. BOWLER R.P., NICKS M., OLSEN D.A., TOGERSEN I.B., VALNICKOVA Z., HOJRUP P., FRANZUSOFF A., ENGHILD J.J., CRAPO J.D., Furin proteolytically processes the heparin-binding region of extracellular superoxide dismutase, *J. Biol. Chem.*, 277: 16505-16 511, 2002
170. **C. SAMOILĂ**, A.ANGHEL, G.OTIMAN, L.TĂMAȘ, Extracellular superoxide dismutase and atherosclerosis, *The Annual Conference of the Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology*, 6-8 September Timișoara, **p15**, Ed. Univ. de Vest, Timișoara, ISSN 1224 9513, 2007
171. ZELKO, I.N., MARIANI, T.J. & FOLZ, R.J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.* 33: 337-349, 2002
172. **C.SAMOILĂ**, F.SFRIJAN, A.POPESCU, M.MOTOC, Mutații ale genei SOD cu implicații în patologia cardiovasculară, *Revista de Igienă și Sănătate Publică*, vol. XLIV, nr.1-2, p.95-100, ISSN 1221-2520, 2004
173. LEKSTROM-HIMES J.A., XANTHOPOULOS K.G., The role of C/EBP ϵ in the terminal stages of granulocyte differentiation, *J. Biol. Chem.*, 273 (44): 28545-28548, 1998
174. TANAKA T., YOSHIDA N., KISHIMOTO T., AKIRA S., Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBP β and/or C/EBP δ gene, *EMBO J.*, 16:7432-7443, 1997
175. AKIRA, S., ISSHIKI, H., SUGITA, T., TANABE, O., KINOSHITA, S., NISHIO, Y., NAKAJIMA, T., HIRANO, T., KISHIMOTO, T. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family, *EMBO J.* 9, 1897-1906, 1990
176. TAKIGUCI M., The C/EBP family of transcription factors in the liver and other organs, *Int. J. Exp. Pat.*, 79:369-391, 1998
177. BURGESS-BEUSSE, B.L., TIMCHENKO, N.A. AND DARLINGTON, G.J. CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α) is an important mediator of mouse C/EBP β protein isoform production, *Hepatology*, 29 : 597-601, 1999
178. ANTONSON, P., STELLAN, B., YAMANAKA, R. AND XANTHOPOULOS, K.G. A novel human CCAAT/enhancer binding protein gene, C/EBP ϵ , is expressed in cells of lymphoid and myeloid lineages and is localized on chromosome 14q11.2 close to the T-cell receptor α/δ locus, *Genomics* 35: 30-38, 1996
179. FLODBY, P., BARLOW, C., KYLEFJORD, H., AHRLUND-RICHTER, L. AND XANTHOPOULOS, K.G., Increased hepatic cell proliferation and lung abnormalities in mice deficient in CCAAT/enhancer binding protein α , *J. Biol. Chem.* 271: 24753-24760, 1996

180. YEH, W.C., CAO, Z., CLASSON, M. AND MCKNIGHT, S.L. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins, *Genes Dev.* 9: 168-181, 1995
181. DESCOMBES P., SHIBLER U., A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA, *Cell*, nr 67(3): 569-79, 1991
182. OSSIPOV, V., DESCOMBES, P. AND SCHIBLER, U. CCAAT/enhancer binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 8219-8223, 1993
183. TIMCHENKO, N.A., WILDE, M., IAKOVA, P., ALBRECHT, J.H. AND DARLINGTON, G.J. E2F/p107 and E2F/p130 complexes are regulated by C/EBP α in 3T3-L1 adipocytes. *Nucleic Acids Res.* 27:3621-3630, 1999b
184. KOZAK M., Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes, *Cell*, 44:283-292, 1986
185. RAMJI, D.P. AND FOKA, P. CCAAT/enhancer binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem. J.* 365: 561-575, 2002.
186. BIRKENMEIER, E.H., GWYNN, B., HOWARD, S., JERRY, J., GORDON, J.I., LANDSHULZ, W.H. AND MCKNIGHT, S.L. Tissue-specific expression, developmental regulation, and genetic mapping of the gene encoding CCAAT/enhancer binding protein, *Genes Dev.* 3:1146-115, 1989
187. ROSEN, E.D., HSU, C.H., WANG, X., SAKAI, S., FREEMAN, M.W., GONZALEZ, F.J. AND SPIEGELMAN, B., C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway. *Genes Dev.* 16 : 22-26, 2002
188. NTAMBI, M.J. AND KIM, Y.C. Adipocyte differentiation and gene expression. *J. Nutrition* 130: 3122S-3126S, 2000
189. TANG, Q.Q., OTTO, T.C. AND LANE, M.D. CCAAT/enhancer-binding protein β is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 850-855, 2003
190. TONTONAZ P., HU E., DEVINE J., BEALE E.G., SPIEGELMAN B.M., PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene, *Mol. Cell. Biol.*, 15 (1): 351-357, 1995
191. Cao, Z., Umek, R.M. and McKnight, S.L., Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells, *Genes Dev.* 5:1538-1552, 1991
192. MANDRUP S., LANE M.D., Regulating adipogenesis, *J. Biol. Chem*, 272(9): 5367-5370, 1997
193. LANE M.D., TANG Q.Q., JIANG M.S., Role of the CCAAT enhancer binding proteins (C/EBPs) in adipocyte differentiation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 266 (3): 677-683, 1999.
194. MACDOUGALD O.A., CORNELIUS P., LIU R., LANE M.D., Insulin regulates transcription of the CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) alpha, beta, and delta genes in fully-differentiated 3T3-L1 adipocytes, *J. Biol. Chem.*, 270:647-654, 1995
195. FAJAS L., SCHOONJANS K., GELMAN L., KIM J.B., NAJIB J., MARTIN G., FRUCHART J.C., BRIGGS M., SPIEGELMAN B., AUVERX J., Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism, *Mol. Cell. Biol.*, 19 (8): 5495-5503, 1999

196. BASTARD J.P., CARON M., VIDAL H., JAN V., AUCLAIR M., VIGOUROUX C., LUBOINSKI J., LAVILLE M., MAACHI M., JIRARD P.M., ROZENBAUM W., LEVAN P., CHAPEAU J., Association between altered expression of adipogenic factor SREBP1 in lipotrophic adipose tissue from HIV-1-infected patients and abnormal adipocyte differentiation and insulin resistance *Lancette*, 359 (9311) : 1026-1031, 2002
197. ROSEN E.D., WALKER C.J., PUIGSERVER P., SPIEGELMAN B., Transcriptional regulation of adipogenesis, *Genes Dev.*, 14 (11): 1293-1307, 2000
198. Wu Z., ROSEN E.D., BRUN R., HAUSER S., ADELMANT G., TROY A.E., McKEON C., DARLINGTON G.J., SPIEGELMAN B.M., Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity, *Mol. Cell.*, 3: 151-158, 1999
199. WERTHEIM N., CAI Z., MCGRAW T.E., The transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein alpha is required for the intracellular retention of GLUT4, *J.Biol.Chem.*, 2004, 279: 4468-4476, 2004
200. TRAVERS M.T., WALLANCE A.J., GOURLAY H.T., GILL C.A., KLEIN I., BOTTEMA C.B.K., BARBER N.C., Promoter I of the ovine acetyl-CoA carboxylase-alpha gene: an E-box motif at -114 in the proximal promoter binds upstream stimulatory factor (USF)-1 and USF-2 and acts as an insulin-response sequence in differentiating adipocytes, *Biochem J.*, 359: 273-284, 2001
201. SEO J.B., NOH M.J., YOO E.J., PARK S.Y., PARK J., LEE I.K., PARK S.D., KIM J.B., Functional characterization of the human resistin promoter with adipocyte determination- and differentiation-dependent factor 1/sterol regulatory element binding protein 1c and CCAAT enhancer binding protein-alpha, *Mol. Endocrinology* , 17: 1522-1533, 2003
202. KREMPLER F., BREBAN D., OBERKOFER H., ESTERBAUER H., HELL E., PAULWEBER B., PATSH W., Leptin, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, and CCAAT/enhancer binding protein-alpha mRNA expression in adipose tissue of humans and their relation to cardiovascular risk factors, *Arterioscler. Tromb. Vasc.Biol.*, 20: 443-449, 2000
203. Park S., OH S.I., LEE M.Y., YOON S., KIM K.S., KIM J., CCAAT/enhancer binding protein and nuclear factor-Y regulate adiponectin gene expression in adipose tissue, *Diabetes*, 53: 2757-2766, 2004
204. CHRISTY R.J., KAESTNER K.H., GEIMAN D.E., LANE M.D., CCAAT/enhancer binding protein gene promoter: binding of nuclear factors during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:2593-2597, 1991
205. ROSS S.E., ERICKSON R.L., GERIN I., DeROSE P.M., BAJNOK L., LONGO K.A., MISEK D.E., KUICK R., HANASH S.M., ATKINS K.B., ANDERSEN S.M., NEBB H.I., MADSEN L., KRISTIANSEN K., Mac DOUGALD O.A., Microarray analyses during adipogenesis: understanding the effects of Wnt signaling on adipogenesis and the roles of liver X receptor alpha in adipocyte metabolism , *Molec.Cell. Biol.*, 2002, 22: 5989-5999
206. STEFFENSEN K.R., SCHUSTER G.U., PARINI P., HOLTER E., SADEK C.M., KASSEL T., ESKILD W., GUSTAFSSON J.A., *Biochem. Biophys. Res. Comms.*, 2002, 293, 1333-1340
207. STEFFENSEN K.R., SCHUSTER G.U., PARINI P., HOLTER E., SADEK C.M., KASSEL T., ESKILD W., GUSTAFSSON J.A., Different regulation of the

- LXRalpha promoter activity by isoforms of CCAAT/enhancer-binding proteins, *Biochem. Biophys. Res. Comms.*, 293, 1333-1340, 2002
208. TAMORI Y., MASUGI J., NISHINO N., KASUGA M., Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes, *Diabetes*, 51, 2045-2055, 2002
209. ROSS R., Atherosclerosis--an inflammatory disease, *N.Engl.J. Med.*, 340, 115-125, 1999
210. ARIZMENDI C., LIU S., CRONIGER C., POLI V., FRIEDMAN J.E., The transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein beta regulates gluconeogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription during diabetes, *J.Biol.Chem.*, 274 (19):13033-40, 1999
211. GHOSH A.K., LACSON R., LIU P., CICHY S.B., DANIELKOVICH A., GUO S., UNTERMAN T.G., A nucleoprotein complex containing CCAAT/enhancer-binding protein beta interacts with an insulin response sequence in the insulin-like growth factor-binding protein-1 gene and contributes to insulin-regulated gene expression, *J.Biol.Chem.*, 276 (11), 8507-8515, 2001
212. ROESLER W.J., What is a cAMP response unit? *Mol. Cell. Endocrinol.*, 162(1-2), 1-7, 2000
213. NIEHOF M., MANNS M.P., TRAUTWEIN C., CREB controls LAP/C/EBP beta transcription, *Mol.Cell.Biol.*, 17 (7), 3600-3613, 1997
214. BOSCH F., SABATER J., VALERA A., Insulin inhibits liver expression of the CCAAT/enhancer-binding protein beta, *Diabetes*, 44 (3), 267-271, 1995
215. DUONG D.T., WALTNER -LAW M.E., SEARS R., SEALY L., GRANNER D.K., Insulin inhibits hepatocellular glucose production by utilizing liver-enriched transcriptional inhibitory protein to disrupt the association of CREB-binding protein and RNA polymerase II with the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter, *J.Biol. Chem.*, 2002, 277(35), 32234-32242
216. AKIRA S., KISHIMOTO T., The evidence for interleukin-6 as an autocrine growth factor in malignancy, *Semin. Cancer Biol.*, 1992, 3(1), 17-26
217. RIBEREAU-GAYON, P., Plant Phenolics, New York, USA: Hafner, 1972
218. PUSSAYANAWIN V., WETZEL D., L., High performance liquid chromatographic determination of ferulic acid in wheat milling fractions as a measure of brain contamination, *J. Chromatogr.* 391:243-255, 1987;
219. ROBARDS K., ANTOLOVICH M., Analytical chemistry of fruit bioflavonoids: a review, *Anal.*, 122:11R-34R, 1997;
220. TORRES A.M., MAU-LASTOVICKA T., REZAAIYAN R., Total phenolics and high-performance liquid-chromatography and phenolic acid of avogado, *J.Agric. Food Chem.*, 35:921-925, 1987
221. RAPORT DE ȘTIINȚIFIC ȘI TEHNIC, CEEX 10/2005 „ Studiul bioactivității sinergice a alimentelor funcționale antioxidante în reversibilitatea sindromului metabolic (MET-ANTIOX), faza de execuție decembrie, 2007
222. SOCACIU C., Antioxidant Phytochemicals: chemical characterization, function and actions, *Bul.USAMV- A*, 57, 22-29, 2002
223. HĂRMĂNESCU M., DRĂGAN S., BORDEAN D., GHERGHEN I., Metals composition of some medicinal plants, Proceedings of the International Conference „Agricultura land Food Science ” *Processes and Technologies*, 26-27 Aprilie, Sibiu, 2007

224. MOLYNEUX P., The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakar J. Sci. Technol.*, 26 (2), 211-219, 2004
225. BLOIS M. S., Antioxidants determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 191, 1199-1200, 1958
226. RAPORT DE CERCETARE, PROGRAM CEEX 44/2007 „Impactul alimentelor functionale multicomponent in combaterea obezitatii si aterosclerozei”, Faza de executie III/ Noiembrie, 2007
227. FOLIN , O., CIOCĂLTEU V., Tyrosine and tryptophan determinations proteins; *J. Biol. Chem* , 1927,73, 627, 1927
228. SINGLETON , V., L., ORTHOFER , R., LAMUELA RAVENTOS, R.M., Analysis of total phenols and other oxidative substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagents, *Methods Enzymol.*, 299: 152-178, 1999
229. ESPOSITO K., MARFELLA R., CIOTOLA M., DI PALO C., GIULIANO F., D`ARMIENTO M., D`ANDREA F., GIULIANO D., Effect of Mediterranean – Style Diet on Endothelial Dysfunction and Markers of vascular Inflammation, in the metabolic syndrome, *JAMA*, 292 (12): 1440-1446, 2004
230. TRICOPOULU A., CONSTANCOU T., BARNIA C., TRICHOPOULOS D., Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population, *N.Engl. J. Med.*, 348:2599-2608, 2003
231. WILLETT W.C., SACKS F., TRICHOPOULOU A. ET AL., Mediterranean diet pyramid : a cultural model for healthy eating, *Am.J., Clin., Nutr.*, 61: Suppl 6:S1402-S1406, 1995
232. VON SHACKY C., N-3 fatty acids and pevention of coronary atherosclerosis, *Am.J.Clin. Nutr.* 71:224S-7S, 2000
233. BROWN A.A., HU FB. Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease, *Am.J.Clin. Nutr.* 73:673-86, 2001
234. RUANO J., LOPEZ-MIRANDA J., FUENTES F., MORENO J.A., BELLINDO C., PEREZ MARTINEZ P., LOZANO A., GOMEZ P., PEREZ JIMENEZ F., Fenolic content of virgin olive oil improves ischemic reactive hyperemia in hypercholesterolic patients, *J.Am.Coll.Cardiol.*, 46 (10): 1464-8, 2005
235. FUENTES F., LOPEZ-MIRANDA J., SANCHEZ E., ET AL., Mediterranean diet and low-fat diets improve endothelial function in hzpercholesterolemic men *Ann. Intern. Med.*, 134:1115-19, 2001
236. HU F.B., WILLET WC., Diet, nutrition and coronary heart disease, In: Douglas P.S., editor. *Cardiovascular Health and Disease in Women*. 2nd edition , Philadelphia, PA:WB Saunders, 71-92, 2002
237. RISSANEN T.H., VOUTILAINEN S., VIRTANEN J.K., ET AL., Low intake of fruits, vegetables is associated with excess of mortality in men : the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factors (KIHD) Study, *J. Nutr.*, 133:199-204, 2003
238. BRIGHENTI F., VALTUENA S., PELLEGRINI N. ET AL., Total antioxidant capacity of the diet is inversely and independently related to plasma concentration of high –sensitivity C-reactive protein in adult Italian subjects, *Br. J.Nutr.*, 93:619-25, 2005
239. VAN HERPEN-BROEKMANS V.M., KLOPPING –KETELAARS I.A., BOTS M.L. ET AL., Serum carotinoids and vitamins in relation to markers of endothelial function and inflammation, *Eur. J. Epidemiol.*, 19:915-21, 2004

240. BLOMHOFF R., Dietary antioxidants and cardiovascular disease, *Curr.Opin. Lipidol.*, 16:47-54, 2005
241. SCHINDER C., The metabolic syndrome as an endocrine disease: is there an effective pharmacotherapeutic strategy optimally targeting the pathogenesis?, *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, 1: 7-26, 2007
242. SENN J.J., KLOVER P.J., NOWAK I.A., MOONEY R.A., Interleukin-6, induces cellular insulin resistance in hepatocytes, *Diabetes*, 51(12): 3391-9, 2002
243. SALTIEL A.R., KAHN C.R., Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism, *Nature*, 414 (6865): 799-806, 2001
244. RUAN H., HACOEN N., GOLUB T.R., VAN PARIJS L., LODISH H.F., Tumor necrosis factor- α suppresses adipocyte specific genes and activates expression of preadipocytes genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor kappa-B activation by TNF-alpha is obligatory, *Diabetes*, 51(5):1319-36, 2002
245. S.DRĂGAN, C.SOCACIU, S.URSONIU, M.RADA, **C.SAMOILĂ**, D.KAYCSA, Effects on therapeutic nutrition with antioxidant functional foods in obese patients with metabolic syndrome, *Journal of Clinical Lipidology*, vol.1, nr.5, 2007, p.513, ISSN 1933-2874
246. S. DRĂGAN, S. URSONIU, M. RADA, D. VELIMIROVICI, D. KAYCSA, **C. SAMOILĂ**, S. MANCAS, Functional foods with vegetal bioactive ingredients in the metabolic syndrome: The Antiathero-Alim Study, 3rd International Congress on Complementary Medicine Research, *Sydney Convention Centre Darling Harbour, Australia, 29-31 March 2008*
247. S. DRĂGAN, S. URSONIU, D. KAYCSA, **C. SAMOILĂ**, M. RADA, C. SOCACIU, The Antiathero-Alim Study: Effects of functional foods with vegetal bioactive ingredients in the metabolic syndrome, Greece, 2008
248. WANG Y.W., JONES P.J., Conjugated linolic acid and obesity control: efficacy and mechanisms, *Int.J.Obes. Relat.Metab. Disord*, 28, 941-945, 2004
249. HSU C.-L., HUANG S.-L., YEN G.-C., Inhibitory effect of phenolic acids on the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes in relation with their antioxidant activity, *J.Agric.Food.Chem*, 54: 4191-4197, 2006
250. HSU C.-L., YEN G.-C., Effects of flavonoids and phenolic acids on the inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes., *J.Agric. Food.Chem.*, 55, 8404-8410, 2007.
251. GRAY, I.C., CAMPBELL, D.A. AND SPURR, N.K. Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics, *Human Molecular Genetics* 9:2403-2408, 2000
252. HUBER, C.G., OEFNER, P.J. AND BONN, G.K., Rapid and accurate sizing of DNA fragments by ion-pair chromatography on alkylated nonporous poly(styrene-divinylbenzene) particles. *Anal. Chem.* 67: 578-585, 1995
253. HUBER, C.G., OEFNER, P.J., PREUSS, E., BONN, G.K. High-resolution liquid chromatography of DNA fragments on non-porous poly(styrene-divinylbenzene) particles. *Nucleic Acids Res.* 21: 1061-1066, 1993
254. **SAMOILA C.**, CARTER A., FUTERS T.S., OTIMAN G., ANGHEL A., TĂMAȘ L., E.SECLAMAN, Extracellular superoxide dismutase genes polymorphic variants in the Romanian population with atheroma, *Biochemical Genetics*, 46 (9-10): 634-643, 2008

255. QUANDT, K., FRECH, K., KARAS, H., WINGENDER, E., WERNER, T. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data, *Nucleic Acids Res.* 23: 4878-4884, 1995
256. KERSTIN QUANDT, KORNELIE FRECH, HOLGER KARAS, EDGAR WINGENDER AND THOMAS WERNER, MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data, *Nucleic Acids Res.*, 23: 4878-4884, 1995
257. WINGENDER, E., DIETZE, P., KARAS, H., KNUPPEL, R. TRANSFAC: a database on transcription factors and their binding sites, *Nucleic Acids Res.* 24, 238-241, 1996
258. THOMPSON J.D., HIGGINS D.G., GIBSON T.J., CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680, 1994
259. SCHWARTZ, S., ZHANG, Z., FRAZER, K.A., SMIT, A., RIEMER, C., BOUCK, J., GIBBS, R., HARDISON, R. AND MILLER, W. PipMaker - A web server for aligning two genomic DNA sequences, *Genome Res.* , 10: 577-586, 2000
260. BLANCHETTE, M., TOMPA, M., FootPrinter: a program designed for phylogenetic footprinting, *Nucleic Acids Res.* 31: 3840-3842, 2003
261. RICE, P., LONGDEN, I., BLEASBY, A. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suit, *TIG* 16:276-277, 2000
262. STERN, L.F., CHAPMAN, N.H., WIJSMAN, E.M., ALTHERR M.R., ROSEND.R., Assignment of SOD3 to human chromosome band 4p15.3-->p15.1 with somatic cell and radiation hybrid mapping, linkage mapping, and fluorescent in-situ hybridization, *Cytogenet.Genome Res.* 101: 178C, 2003
263. AWELINE H., HEWETSON A., HENDRIX E.C., MANSHARAMANI M., LEE V.H., CHILTON B.S., Identification of the RUSH consensus-binding site by cyclic amplification and selection of targets: demonstration that RUSH mediates the ability of prolactin to augment progesterone dependent gene expression, *Mol. Endocrinol.*, 16 (9): 2101-12, 2002
264. KUO T.C., CALAME K.L., B lymphocyte-induced maturation protein (Blimp)-1, IFN regulatory factor (IRF)-1, and IRF-2 can bind to the same regulatory sites, *J.Immunol.*, 173 (9): 5556-63, 2004
265. VAN LEEUWEN, H.C., STRATING, M.J., RENSEN, M., DE LAAT, W. AND VAN DER VLIET, P.C. Linker length and composition influence the flexibility of Oct-1 DNA binding, *EMBO J.* , 16: 2043-2053, 1997
266. LUNDBACK, .T., CHANG, J.F., PHILLIPS, K., LUISI, B. AND LADBURY, J.E. Characterization of sequence-specific DNA binding by the transcription factor Oct-1, *Biochemistry* , 39:7570-7579, 2000
267. MAGANA, M.M., LIN, S.S., DOOLEY, K.A., OSBORNE, T.F., Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase promoter requires two interdependent binding sites for sterol regulatory element binding proteins, *J. Lipid Res.*, 38:1630-1638, 1997
268. SATO, R., INOUE, J., KAWABE, Y., KODAMA, T., TAKANO, T., MEADA, M., Sterol-dependent transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-2, *J. Biol. Chem*, 271: 26461-26464,1996

269. BUCHER, P. Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences, *J. Mol. Biol.* 212: 563-578, 1990
270. HORVATH, C.M., WEN, Z., DARNELL JR, J.E., A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes & Development* 9: 984-994, 1995
271. BUSYGINA T.V., IGNATIEVA E.V., OSADCHUK, A.V., Consensus sequence of transcription factor SF-1 binding site and putative binding site in the 5' flanking regions of genes encoding mouse steroidogenic enzymes 3betaHSDI and Cyp17, *Biochemistry (Mosc.)*, 68 (4): 377-84, 2003
272. KO L.J., YAMMANMOTO M., LEONARD M.W., GEORGE K.M., TING P.P., ENGEL J.D., Murine and human T-lymphocyte GATA3 factors mediate transcription through a cis-regulatory element within the human T-cell receptor delta gene enhancer, *Mol.Cell.Biol.*, 11 (5): 2778-84, 1991
273. HOWE K.M., REAKES C.F., WATSON R.J., Characterization of the sequence specific interaction of mouse c-myb protein with DNA, *EMBO J.*, 9(1):161-916,1989
274. VINSON G.R., SINGLER P.B., MCKNIGHT, Scissors-grip model of DNA recognition by a family of leucine zipper proteins, *Science*, 246 (4932): 911-916,1989
275. UBEDA U., WANG X.Z, ZINSZER H., WU I., HABENER J.F., RON D., Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element, *Mol. Cell Biol*, 16: 1479-89, 1996
276. NEVINS J.R., E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins, *Science*, 258(5081): 424-429, 1992
277. **SAMOILĂ C.**, LUPEA A.X., ANGHEL A., MOTOC M., OTIMAN G., MOTOC A., TĂMAȘ L., Denaturing High Performance Liquid Chromatography and Bioinformatics-Two Modern Tools for Extracellular Superoxide Dismutase (SOD3) Gene Promoter Analysis, *Rev. Chim.*, 59 (7), 773-778, 2008
278. SEMENTCHENKO, V.I., WATSON , D.K., Ets target genes: past, present and future, *Oncogene*, 19, 6533-6548,2000
279. MARTIN M., CHINENOV Y., YU M., SCHMIDT K., YANG X.-Y., Redox Regulation of GA Binding Protein- α DNA binding Activity, *The Journal of Biological Chemistry*, 271 (41), 25617-25623, 1996
280. SHIELDS J.M. AND YANG V.W., Identification of the DNA sequence that interacts with the gut-enriched Krüppel-like factor, *Nucleic Acids Res*, 26(3): 796-802, 1998
281. ZELKO I., FOLZ R., Myeloid zinc finger (MZF)-like Kruppel-like and Ets families of transcription factors determine the cell-specific expression of mouse superoxide dismutase, *Biochem. J.*, 369:375-386, 2003
282. MORRIS J.F., HROMAS R., RAUSCHER F.J. 3rd, Characterization of the DNA-binding properties of the myeloid zinc finger protein MZF1: two independent DNA-binding domains recognize two DNA consensus sequences with a common G-rich core, *Mol Cell Biol*, 14(3): 1786-1795, 1994
283. **C.SAMOILĂ**, G.OTIMAN, A.CARTER, S. FEUTERS, A.ANGHEL, Thr40Ala and Arg213Gly polymorphisms of extracellular superoxide dismutase EC-SOD gene in the Caucasian population from Western Romania, *Atherosclerosis, XIV International Symposium on Atherosclerosis, Rome, Italy*, vol.7 suppl., nr.3, p.293, ISSN 1567-5688, 2006

284. TAMAI,M.. FURUTA,H.; KAWASHIMA,H.; DOI,A.; HAMANISHI,T.; SHIMOMURA, H.; SAKAGASHIRA,S.; NISHI,M.; SASAKI,H.; SANKE,T., NANJO,K. Extracellular superoxide dismutase gene polymorphism is associated with insulin resistance and the susceptibility to type 2 diabetes, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 71, 140-145. 2006
285. DEBAUVE G., NONCLERQ D., , RIBAUCCOUR F., WIEDIG M., GERBAUX C., LEO OBERDAN, LAURENT G., JOURNE F., BELAYEW A., TOUBEAU G., Early expression of the Helikase-like transcription factor (HLTF/SMARCA3) in an experimental model of estrogen induced renal carcinogenesis, *Molecular Cancer*, 5:23, 2006
286. CHEN Y.,XU H., LIU J., ZANG C., LENTZ A., MO X., The c-Myb functions as a downstream target of PDGF- mediated survival signal in vascular smooth muscle cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 360(2):433-6, 2007
287. WASYLYC B., HAHN S.L., GIOVANE A., The Ets family of transcription factors, *Eur.J.Biochem.*, 211(1-2): 7-18, 1993
288. TREISMAN R., MARAIS R., WYNNE J., Spatial flexibility in ternary complexes between SRF and its accessory proteins, *EMBO J*, 11(12): 4631-40, 1992
289. YE H M., COLE A., CHOI J., LIU Y., TULCHINSKY D., QIAO J.H.M FISHBEIN M., DOOLEY A., HOVNANIAN T., MOUILLESEAU X., DEVENDRA V., YANG W.P., GARGALOVIC P., KIRCHGESSER T., SHYY J., BERLINER J., Role of Sterol Regulatory Element Binding Protein in Activation of endothelial cells by Phospholipid oxidation products, *Circ. Res.*, 95; 780-788, 2004
290. WYSZOMIERSKI S.L, ROSEN J.M, Cooperative Effects of STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5) and C/EBP {beta} (CCAAT/Enhancer-Binding Protein-{beta}) on {beta}-Casein Gene Transcription Are Mediated by the Glucocorticoid Receptor, *Mol Endocrinol*, 15: 228-240, 2001
291. MARTINO A.,HOLMES J.H 4TH., LORD J.D., MOON J.J., NELSON B.H., Stat5 and Sp1 regulate transcription of the cyclin D2 response to IL-2, *J. Immunol.*, 166(3): 1723-9, 2001
292. UCHIDA S., SASAKI S. AND MARUMO S., Isolation of a novel zinc finger repressor that regulates the kidney-specific CLC-K1 promoter, *Kidney International*, 60: 416-421 2001
293. DWYER J., LI H., XU D., LIU J.P., Transcriptional regulation of telomerase activity: roles of the the Ets transcription factor family, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1114: 36-47, 2007
294. OIKAWA T., YAMADA T., Molecular biology of the Ets family of transcription factors, *Gene*, 303: 11-34, 2003
295. FUNK W.D., PAK D.T., KARAS R.H., WRIGHT W.E., SHAY J.W., A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes, *Mol Cell Biol*, 12(6): 2866-71, 1992
296. PIERROU,S., HELLQVIST, M., SAMUELLSON, L., ENERBACK, S., CARLSSON P., Cloning and characterization of seven human forkhead proteins: binding site specificity and DNA bending, *Embo.J.*, 30 (20), 1994, 5002-12
297. LAVERY, D.J., SCHIBLER,U., Circadian transcription of the cholesterol 7 alpha hydroxylase gene may involve the liver-enriched bZIP protein DBP, *Genes Dev.*, 7(10):1871-84, 1993

298. ODENWALD W.F., GARBERN, J., ARNHEITER, H., TOURNIER-LASSERVE, E., LAZZARINI, R.A., The Hox-1.3 homeo box protein is a sequence-specific DNA-binding phosphoprotein, *Genes Dev.*, 3(2):158-72, 1989
299. FUNK WD, WRIGHT WE, Cyclic amplification and selection of targets for multicomponent complexes: myogenin interacts with factors recognizing binding sites for basic helix-loop-helix, nuclear factor 1, myocyte-specific enhancer-binding factor 2, and COMP1 factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 (20): 9484-8, 1992
300. Denny P., Swift S., Connor F., Ashworth A., An SRY-related gene expressed during spermatogenesis in the mouse encodes a sequence-specific DNA-binding protein, *EMBO J.*, 11(10): 3705-12, 1992
301. NEUTEBOOM, S.T., MURRE, C., Pbx raises the DNA binding specificity but not the selectivity of antennapedia Hox proteins, *Mol. Cell. Biol.*, 17 (8): 4696-706, 1997
302. MILLER I.J., BIEKER J.J., A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Krüppel family of nuclear proteins, *Mol Cell Biol*, 13(5): 2776-86, 1993
303. SATAKE M., INUZUKA M., SHIGESADA K., OIKAWA T., ITO Y., Differential expression of subspecies of polyomavirus and murine leukemia virus enhancer core binding protein, PEBP2, in various hematopoietic cells, *Jpn J Cancer Res*, 83(7): 714-22, 1992
304. NUCHPRAYOON I., MEYERS S., SCOTT L.M., SUZOW J., HIEBERT S., FRIEDMAN A.D., PEBP2/CBF, the murine homolog of the human myeloid AML1 and PEBP2 beta/CBF beta proto-oncoproteins, regulates the murine myeloperoxidase and neutrophil elastase genes in immature myeloid cell, *Mol Cell Biol.*, 14(8):5558-68, 1994
305. TREISMAN J., DESPLAN C., The products of the Drosophila gap genes hunchback and Kruppel bind to the hunchback promoters, *Nature*, 341: 335-7, 1989
306. WHYATT D.J., DEBOER E., GROSVELD F., The two zinc finger-like domains of GATA-1 have different DNA binding specificities, *EMBO J*, 12: 4993-5005, 1993
307. BENDALL A.J. AND MOLLOY P.L., Base preferences for DNA binding by the bHLH-Zip protein USF: effects of MgCl₂ on specificity and comparison with binding of Myc family members, *Nucleic Acids Res*, 22(14): 2801-10, 1994
308. MOLNAR A. AND GEORGOPOULOS K., The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins, *Mol Cell Biol*, 14: 8292-8303, 1994
309. BOSÈ F., FUGAZZA C., CASALGRANDI M., CAPELLI A., CUNNINGHAM J.M., ZHAO Q., JANE S.M., OTTOLENGHI S., RONCHI A., Functional Interaction of CP2 with GATA-1 in the Regulation of Erythroid Promoters, *Mol Cell Biol*, 26(10): 3942-54, 2006
310. NARDELLI J., GIBSON T.J., VESQUE C., CHARNAY P., Base sequence discrimination by zinc-finger DNA-binding domains, *Nature*, 349(6305): 175-8, 1991
311. SHTUTMAN M., ZHURINSKY J., SIMCHA I., ALBANESE C., D'AMICO M., PESTELL R., and BEN-ZE'EV A., The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 5522-27, 1999

312. WILLIAMS T., TJIAN R., Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2, *Genes Dev*, 5: 670-82, 1991
313. WILLIAMS T. AND TJIAN R., Characterization of a dimerization motif in AP-2 and its function in heterologous DNA-binding proteins, *Science*, 251: 1067-71, 1991
314. MUCHART C., SEELER J.S., NIRULA A., GONG S., GAYNOR R., Transcription factor AP-2 activates gene expression of HTLV-I, *EMBO J*, 11(7): 2573-81, 1992
315. SODERHOLM J., KOBAYASHI H., MATHIEU C., ROWLEY J.D., NUCIFORA G., The leukemia-associated gene MDS1/EVI1 is a new type of GATA-binding transactivator, *Leukemia*, 11(3): 352-8, 1997
316. COURTOIS G., BAUMHUETER S., CRABTREE G.R., Purified hepatocyte nuclear factor 1 interacts with a family of hepatocyte-specific promoters, *Proc Natl Acad Sci USA*, 85(21): 7937-41, 1988
317. PALMER C.N.A., HSU M.H., GRIFFIN H.J., AND JOHNSON E.F., Novel sequence determinants in peroxisome proliferator signalling, *J Biol Chem*, 270: 16114-21, 1995
318. MORIN, P., BRAGANÇA J., BANDU M.-T., LIN R., HISCOTT J., DOLY J., AND CIVAS A., Preferential binding sites for interferon regulatory factors 3 and 7 involved in interferon- α gene transcription, *J Mol Biol*, 316: 1009-22, 2002
319. LEE W., MITCHELL P., TJIAN R., Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements, *Cell*, 49(6): 741-52, 1987
320. SWIRNOFF H. AND MILBRANDT J., DNA-binding specificity of NGFI-A and related zinc finger transcription factors, *Mol Cell Biol*, 15(4): 2275-87, 1995
321. MICHELSON R.J., COLLARD M.W., ZIEMBA A.J., PERSINGER J., BARTHOLOMEW B., AND HUGGENVIK J.I., Nuclear DEAF-1-related (NUDR) Protein Contains a Novel DNA Binding Domain and Represses Transcription of the Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2/B1 Promoter, *J Biol Chem*, 274(43): 30510-9, 1999
322. PACA-UCCARALERTKUN S., ZHAO L.J., ADYA N., CROSS J.V., CULLEN B.R., BOROS I.M., GIAM C.Z., In vitro selection of DNA elements highly responsive to the human T-cell lymphotropic virus type I transcriptional activator, *Tax, Mol Cell Biol*, 14(1): 456-62, 1994
323. BRESLIN M.B., ZHU M., NOTKINS A.L., LAN M.S., Neuroendocrine differentiation factor, IA-1, is a transcriptional repressor and contains a specific DNA-binding domain: identification of consensus IA-1 binding sequence, *Nucleic Acids Res*, 30(4): 1038-45, 2002
324. CALKHOVEN C.F., MÜLLER C., AND LEUTZ A., Translational control of C/EBP α and C/EBP β isoform expression, *Genes Dev*, 14(15): 1920-32, 2000
325. LINCOLN A.J., MONCZAK Y., WILLIAMS S.C., AND JOHNSON P.F., Inhibition of CCAAT/Enhancer-binding Protein α and β Translation by Upstream Open Reading Frames, *J Biol Chem*, 273(16): 9552-60, 1998
326. **C.SAMOILĂ**, A. X. LUPEA, M.MOTOC, Transgenomic Wave™ DNA fragment analysis – a screening method applied in investigation of a C/EBP β gene promoter region to identify new polymorphisms in the caucasian population from Western Romania characterized for atheroma,

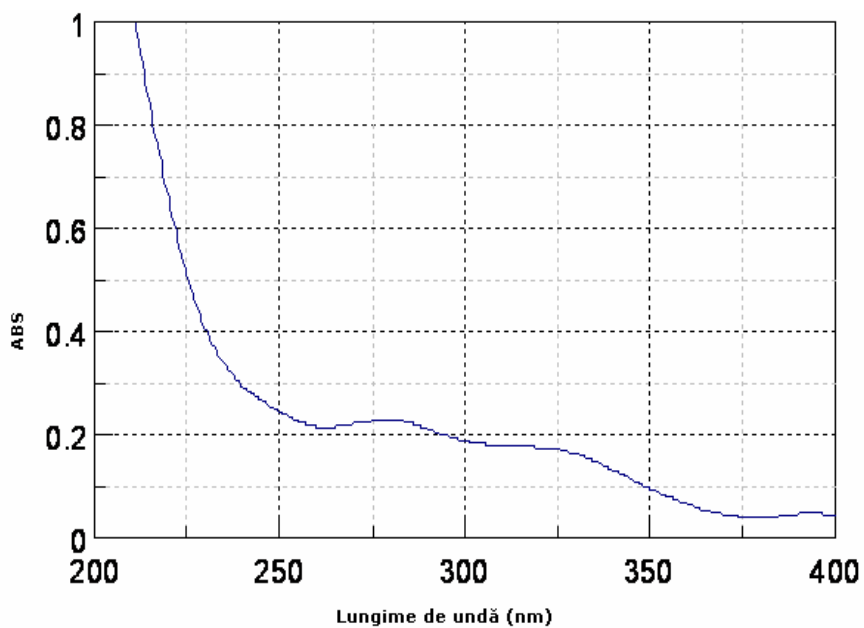
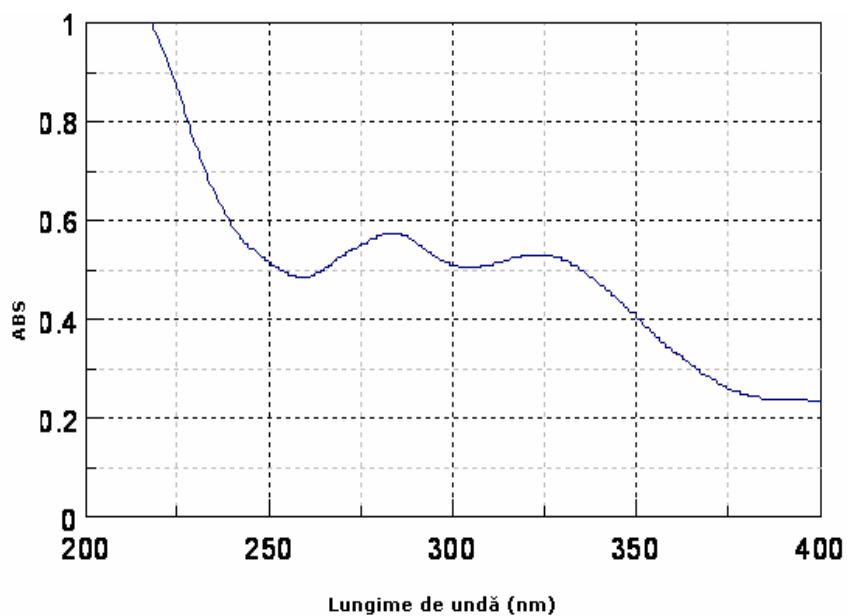
- Scientific and Technical Bulletin, Chemistry, Food Science & Engineering XII*, Vol.11, p.98-106, ISSN 1582-1021, 2006
327. **C.SAMOILA**, A.ANGHEL, A.X.LUPEA. M.MOTOC, Transgenomic Wave™DNA Fragement Analysis of a C/EBPβ gene promoter fragment, The Annual Conference of the Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 6-8 September Timișoara, 2007, p37, ISSN 1224 9513
 328. LU R., MOORE P.A., PITHA P.M., Stimulation of IRF-7 gene expression by tumor necrosis factor alpha: requirement for NFkappa B transcription factor and gene accessibility, *J Biol Chem*, 277: 16592-98, 2002
 329. SGARBANTI M., MARSILI G., REMOLI A.L., ORSATTI R., BATTISTINI A., IRF-7: new role in the regulation of genes involved in adaptive immunity, *Ann N Y Acad Sci*, 1095: 325-33, 2007
 330. CAO X., MAHENDRAN R., GUY G.R., AND TAN Y.H., Detection and characterization of cellular EGR-1 binding to its recognition site, *J Biol Chem*, 268(23): 16949-57, 1993
 331. SILVERMAN E.S., LE L., BARON R.M., HALLOCK A., HJOBERG J., SHIKANAI T., VAN'S GRAVESANDE K.S., AURON P.E., AND LU W., Cloning and Functional Analysis of the Mouse 5-Lipoxygenase Promoter, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 26(4): 475-83, 2002
 332. HUANG R.P., FAN Y., NI Z., MERCOLA D., ADAMSON E.D., Reciprocal modulation between Sp1 and Egr-1, *J Cell Biochem*, 66(4): 489-99, 1997
 333. KLEMPNAUER K.H., ARNOLD H., BIEDENKAPP H., Activation of transcription by v-myb: evidence for two different mechanisms, *Genes Dev*, 3(10): 1582-9, 1989
 334. MINK S., KERBER U., AND KLEMPNAUER K-H., Interaction of C/EBPβ and v-Myb is required for synergistic activation of the *mim-1* gene, *Mol Cell Biol*, 16: 1316-25, 1996
 335. ZENT C.S., MATHIEU C., CLAXTON D.F., ZHANG D.E., TENEN D.G., ROWLEY J.D., NUCIFORA G., The chimeric genes AML1/MDS1 and AML1/EAP inhibit AML1B activation at the CSF1R promoter, but only AML1/MDS1 has tumor-promoter properties, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(3): 1044-8, 1996
 336. HSIEH Y-H., WU T-T., HUANG C-Y., HSIEH Y-S., AND LIU J-Y., Suppression of Tumorigenicity of Human Hepatocellular Carcinoma Cells by Antisense Oligonucleotide MZF-1, *Chinese Journal of Physiology*, 50(1): 9-15, 2007
 337. SUN L., LIU A., GEORGOPOULOS K., Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development, *EMBO J*, 15(19): 5358-69, 1996
 338. WANG J., YOUNG I.G., Eosinophilic inflammation: mechanisms regulating IL-5 transcription in human T lymphocytes, *Allergy*, 62(10): 1131-1138, 2007
 339. YE M., LIU B.C., SHI X.L., YOU B.R., DU H.J., JIA X.W., SHEN F.H., Different patterns of cyclin D1/CDK4-E2F-1/4 pathways in human embryo lung fibroblasts treated by benzo[a]pyrene at different doses, *Biomed Environ Sci*, 21(1): 30-6, 2008
 340. JIANG M.S., TANG Q.Q., MCLENITHAN J., GEIMAN D., SHILINGLAW W., HENZEL W.J., AND LANE M.D., Derepression of the C/EBPalpha gene during adipogenesis: Identification of AP-2alpha as a repressor, *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 3467-71, 1998

341. WATT A.J., GARRISON W.D., DUNCAN S.A., HNF4: a central regulator of hepatocyte differentiation and function, Review, *Hepatology*, 37(6): 1249-53, 2003
342. POLLAK, E.S., HUNG, H.L., GODIN, W., OVERTON, G.C. AND HIGH, K.A. Functional characterization of the human Factor VII 5'-flanking region, *J. Biol. Chem.* 271, 1738-1747, 1996
343. FRASER, J.D., MARTINEZ, V., STRANEY, R. AND BRIGGS, M.R. DNA binding and transcription activation specificity of hepatocyte nuclear factor 4. *Nucleic Acids Res.* 26, 2702-2707, 1998
344. HUQQENVIK J.I, MICHELSON R.J., COLLARD M.W., ZIEMBA A.J., GURLEY P., MOWEN K.A., Characterization of a nuclear deformed epidermal autoregulatory factor-1 (DEAF-1)-related (NUDR) transcriptional regulator protein, *Mol.Endocrinol.*, 12 (10):1619-39, 1998
345. FOX K.E., FANKELL D.M., ERICKSON P.F., MAJKA S.M., CROSSNO J.T. JR, AND KLEMM D.J., Depletion of CREB/ATF1 inhibits adipogenic conversion of 3T3-L1 cells ectopically expressing C/EBP α , C/EBP β , or PPAR γ 2, *J Biol Chem*, 281(52): 40341-53, 2006
346. ZHANG, J.W., TANG, Q.Q., VINSON, C. AND LANE, M.D. Dominant-negative C/EBP disrupts mitotic clonal expansion and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 43-47, 2004
347. AKIYAMA Y., HOSOYA T., POOLE A. M. AND HOTTA Y., The gcm-motif: a novel DNA-binding motif conserved in Drosophila and mammals, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14912-16, 1996
348. NAIT-OUMESMAR B., COPPERMAN A.B. AND LAZZARINI R.A., Placental expression and chromosomal localization of the human Gcm 1 gene, *J Histochem Cytochem*, 48: 915-22, 2000
349. STAAL F.J.T., WEERKAMP F., LANGERAK A.W., HENDRIKS R.W., CLEVERS H.C., Transcriptional Control of T Lymphocyte Differentiation, *Stem Cells*, 19(3): 165-179, 2001
350. WIPER-BERGERON N., WU D., POPE L., SCHILD-POULTER C., HACHÉ R.J., Stimulation of preadipocyte differentiation by steroid through targeting of an HDAC1 complex, *EMBO J*, 22(9): 2135-45, 2003
351. BENNETT C.N., ROSS S.E., LONGO K.A., BAJNOK L., HEMATI N., JOHNSON K.W., HARRISON S.D., MACDOUGALD O.A., Regulation of Wnt Signaling during Adipogenesis, *J Biol Chem*, 277: 30998-31004, 2002
352. SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. AND MANIATIS, T. Expression of cloned genes in cultured mammalian cells, *In Molecular cloning - A laboratory manual ed.* Nolan, C. pp.16.32-16.40. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
353. SWANSON H.I., CHAN W.K., BRADFIELD C.A., DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins, *J Biol Chem*, 270(44): 26292-302, 1995
354. DAHMANE N., LEE J., ROBINS P., HELLER P. , RUIZ I ALTABA A., Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours, *Nature*, 389: 876-81, 1997
355. RAUSCHER F.J. 3RD, MORRIS J.F., TOURNAY O.E., COOK D.M., AND CURRAN T., Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence, *Science* 250(4985): 1259-62, 1990
356. Friedman A.D., Transcriptional regulation of myelopoiesis, *Int J Hematol*, 75(5): 466-72, 2002

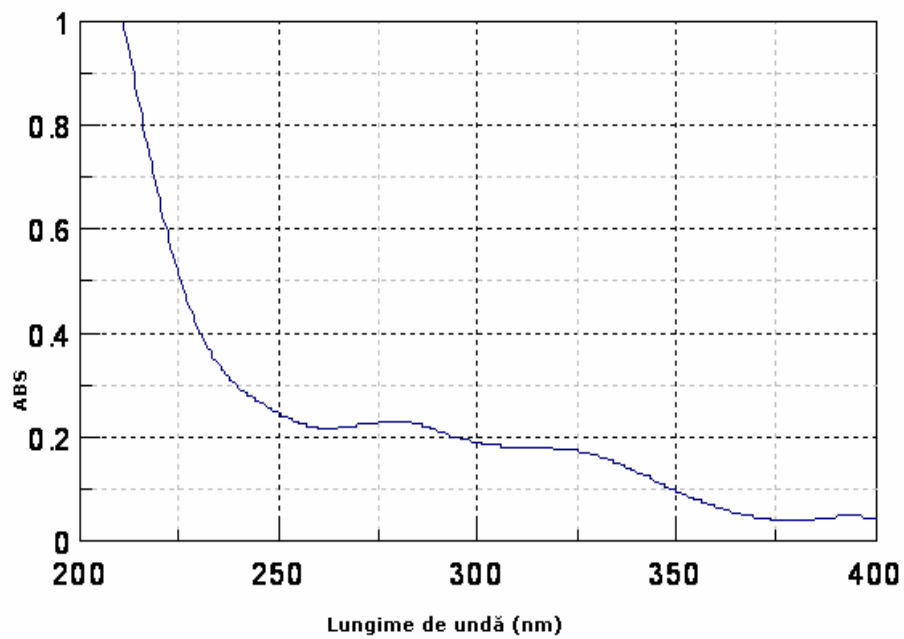
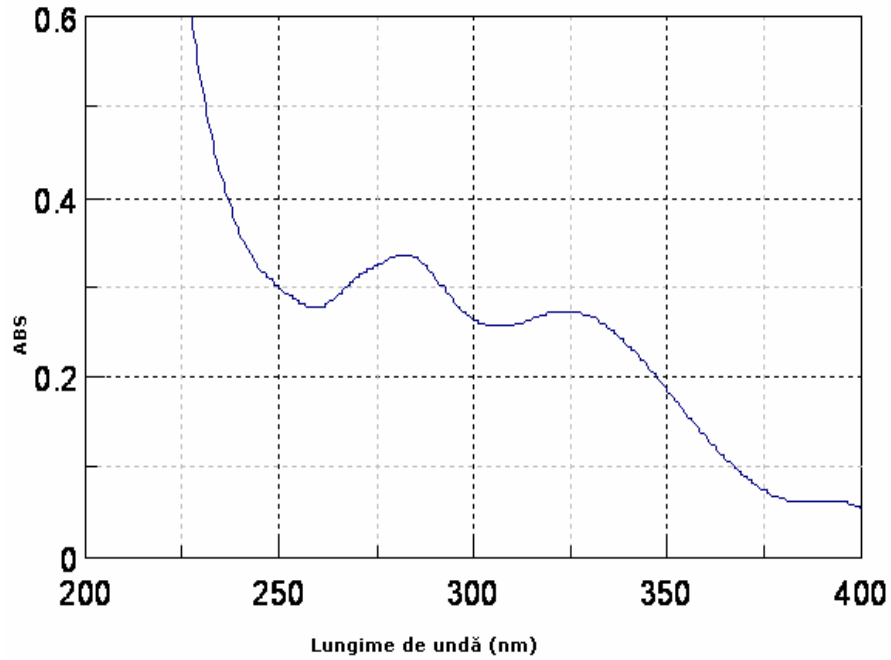
357. TONG Q., TSAI J., TAN G., DALGIN G., HOTAMISLIGIL G.S., Interaction between GATA and the C/EBP family of transcription factors is critical in GATA-mediated suppression of adipocyte differentiation, *Mol Cell Biol*, 25: 706-15, 2005
358. KIM J.W., TANG Q.Q., LI X., LANE M.D., Effect of phosphorylation and S-S bond-induced dimerization on DNA binding and transcriptional activation by C/EBPb, *Proc Nat Acad Sci USA*, 104: 1800-04, 2007
359. TIMCHENKO, N., WILSON, D.R., TAYLOR, L.R., WILDE, S.A.M., SAWADOGO, M. AND DARLINGTON, G.J. Autoregulation of the human C/EBPa gene by stimulation of upstream stimulatory factor binding, *Molec. Cell. Biol.* 15, 1192-1202, 1995
360. TANG Q.Q., JIANG M.S., LANE M.D., Repressive effect of Sp1 on the C/EBPalph gene promoter: role in adipocyte differentiation, *Mol Cell Biol*, 19(7): 4855-65, 1999
361. VASSEUR-COGNET, M. AND LANE, M.D. CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBPa) undifferentiated protein: A developmentally regulated nuclear protein that binds to the C/EBPa gene promoter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7312-7316, 1993.
362. JIANG, M.S. AND LANE, M.D. Sequential repression and activation of the CCAAT enhancer binding protein- α (C/EBPa) gene during adipogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 12519-12523, 2000
363. JACOBS, M.N., DICKINS, M. AND LEWIS, D.F.V. Homology modelling of the nuclear receptors: human oestrogen receptor β (hER β), the human pregnane-X-receptor (PXR), the Ah receptor (AhR) and the constitutive androstane receptor (CAR) ligand binding domains from the human oestrogen receptor α (hER α) crystal structure, and the human oestrogen peroxisome proliferator activated α (PPAR α) ligand binding domain from the PPAR γ crystal structure, *J. Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 84, 117-132, 2003
364. ALEXANDER D.L., GANEM L.G., FERNANDEZ-SALGUERO P., GONZALEZ F., JEFEOATE C.R., Aryl-hydrocarbon receptor is an inhibitory regulator of lipid synthesis and of commitment to adipogenesis, *J Cell Sci*, 111(Pt 22): 3311-22, 1998
365. HANLON P.R., GANEM L.G., CHO Y.C., YAMAMOTO M., JEFEOATE C.R., AhR- and ERK-dependent pathways function synergistically to mediate 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin suppression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ 1 expression and subsequent adipocyte differentiation, *Toxicol Appl Pharmacol*, 189: 11-27, 2003
366. SHIMBA S., WADA T., TEZUKA M., Arylhydrocarbon receptor (AhR) is involved in negative regulation of adipose differentiation in 3T3-L1 cells: AhR inhibits adipose differentiation independently of dioxin, *J Cell Sci*, 114(Pt 15): 2809-17, 2001
367. LEVINE A.J., p53, the cellular gatekeeper for growth and division, *Cell*, 88(3): 323-31, 1997
368. KUBICKA S., KÜHNEL F., ZENDER L., RUDOLPH K.L., PLÜMPE J., MANNS M., AND TRAUTWEIN C., p53 Represses CAAT Enhancer-binding Protein (C/EBP)-dependent Transcription of the Albumin Gene, A molecular mechanism involved in viral liver infection with implications for hepatocarcinogenesis, *J Biol Chem*, 274(4): 32137-44, 1999

-
369. FAJAS L., EGLER V., REITER R., MIARD S., LEFEBVRE A.M., AND AUWERX J., PPAR γ controls cell proliferation and apoptosis in an RB-dependent manner, *Oncogene* 22:4186-93, 2003
370. C.SAMOILĂ, L.TĂMAȘ, E.ȘECLAMAN, A.NEGHINĂ, Functional Analysis Of Four Selected C/EBP α gene promoter polymorphisms previously associated with features of insulin resistance syndrome/T2D, The Annual Conference of the Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 6-8 September Timișoara, p35, *Annals of West University of Timisoara, Series of Chemistry, 2007 ISSN 1224 9513*
371. HEINEMEYER T., WINGENDER E., REUTER I., HERMJAKOB H., KEL A.E., KEL O.V., IGNATIEVA E.V., ANANKO E.A., PODKOLODNAYA O.A., KOLPAKOV F.A., PODKOLODNY N.L. AND KOLCHANOV N.A., Databases on Transcriptional Regulation: TRANSFAC, TRRD, and COMPEL, *Nucleic Acids Res*, 26: 364-70, 1998

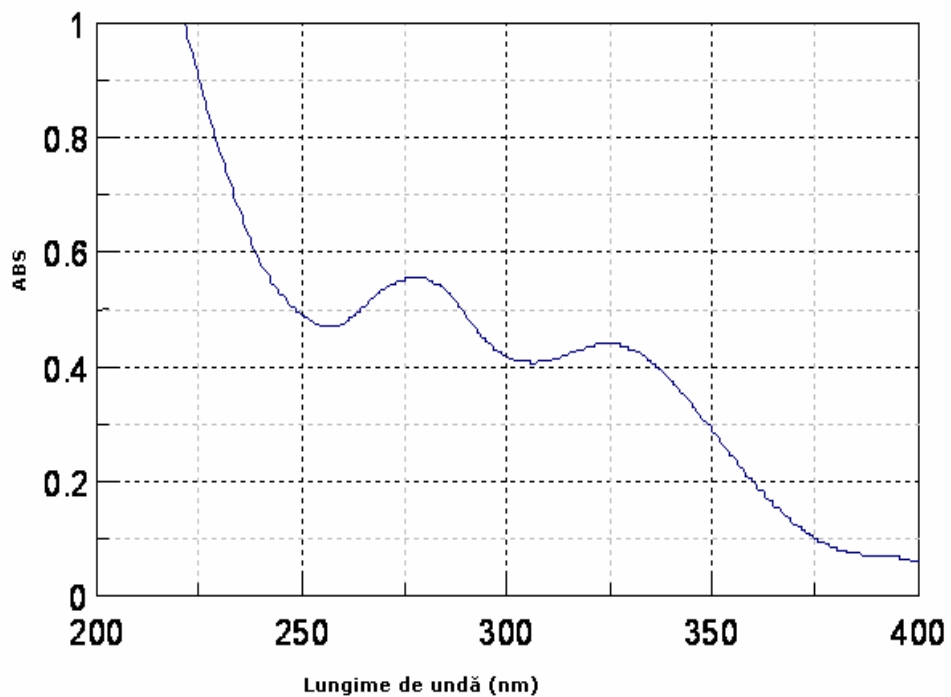
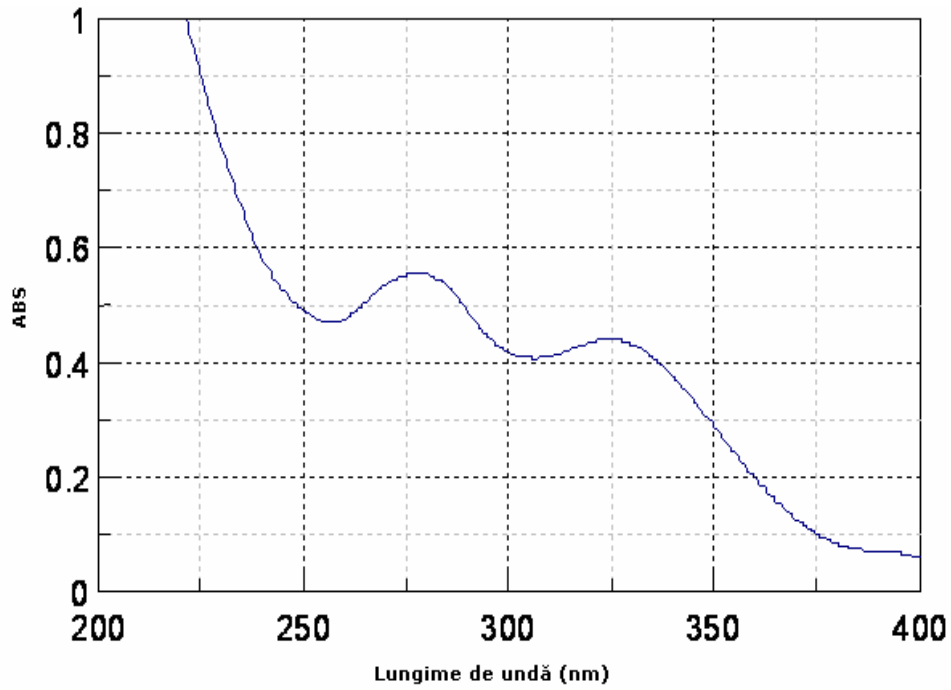
Anexa 1. Rezultatele spectroscopiei UV-VIS



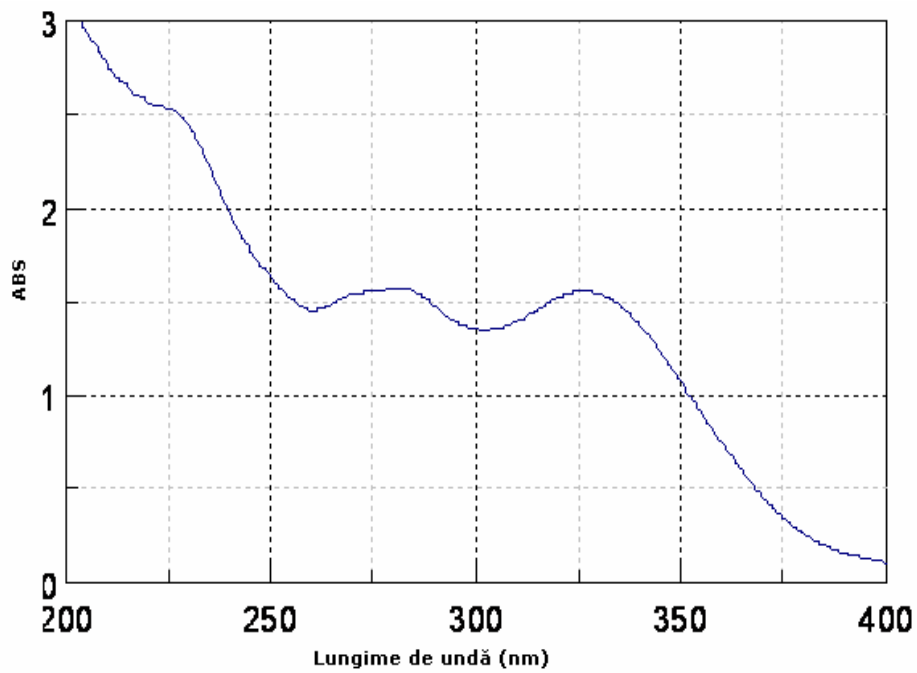
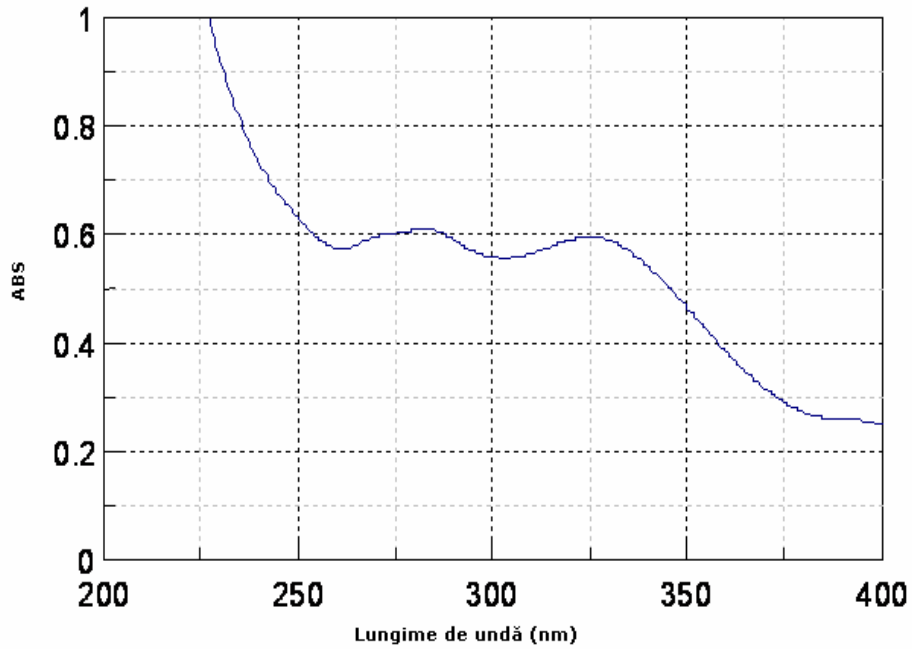
Anexa 1.1. Spectrul UV-VIS al extractelor de busuioc în : A. Etanol 35% și B. Oțet de mere, diluate 1:1000



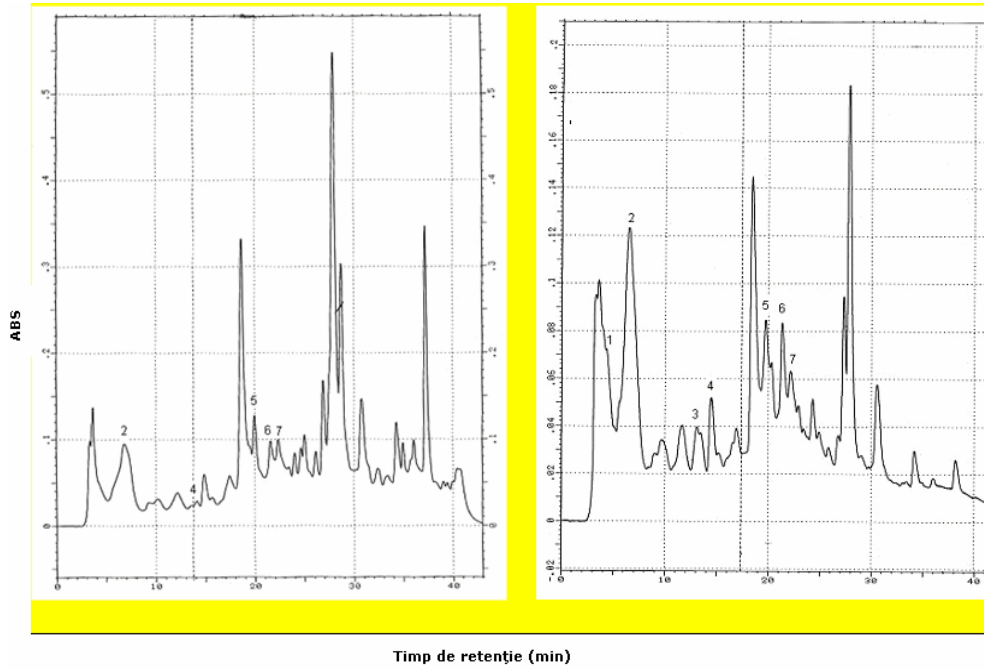
Anexa 1.2. Spectrul UV-VIS al extractelor de măghiran în : A. Etanol 35% și B. Oțet de mere, diluate



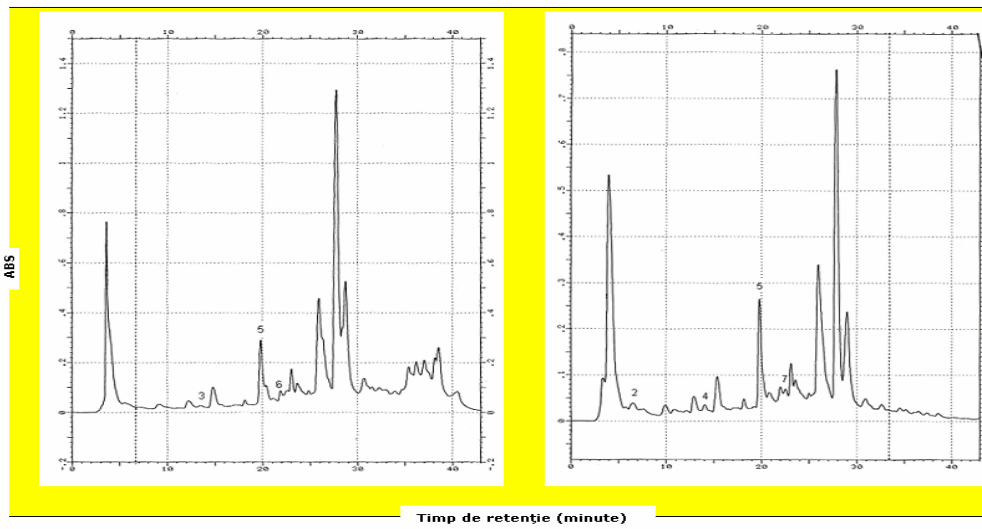
Anexa 1.3. Spectrul UV-VIS al extractului de rozmarin în: A. alcool etilic diluat 1:1000 și B. Oțet de mere cu miere diluat 1:1000



Anexa 1.4. Spectrul UV-VIS al extractului de salvie în: A. alcool etilic diluat 1:1000 și B. Oțet de mere cu miere diluat 1:100

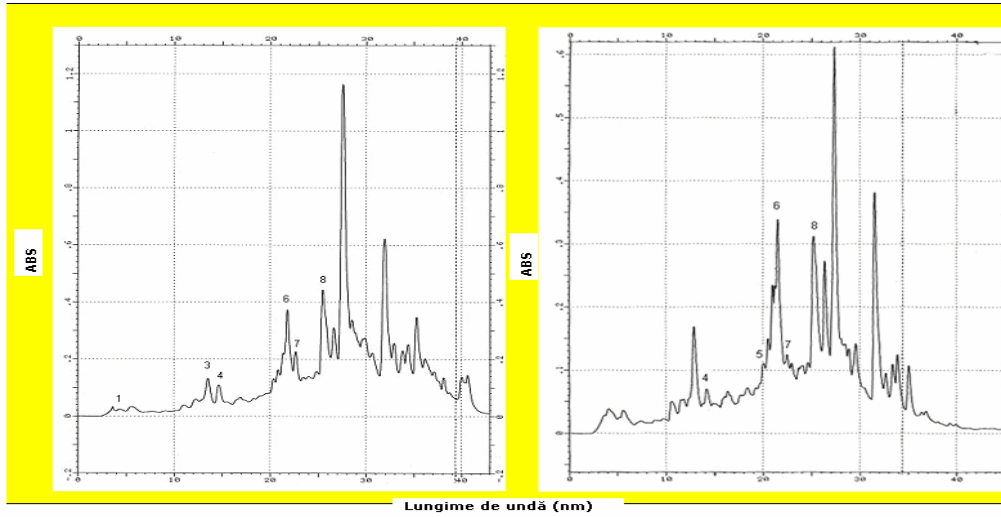


Cromatograma HPLC a extractului de busuioc: A. în etanol 35% (tinctură) și B. în oțet de mere cu miere 9%

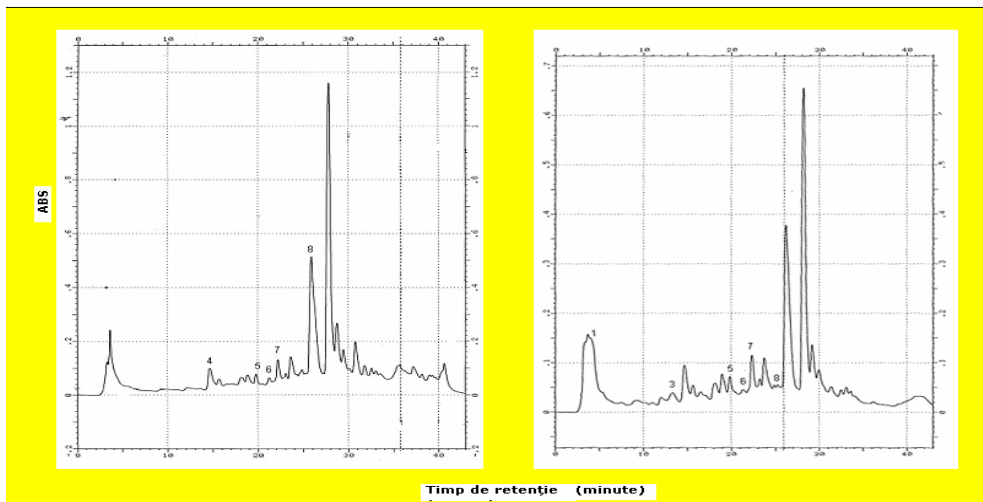


romatograma HPLC a extractului de măghiran : A. în etanol 35% (tinctură) și B. în oțet de mere cu miere 9%

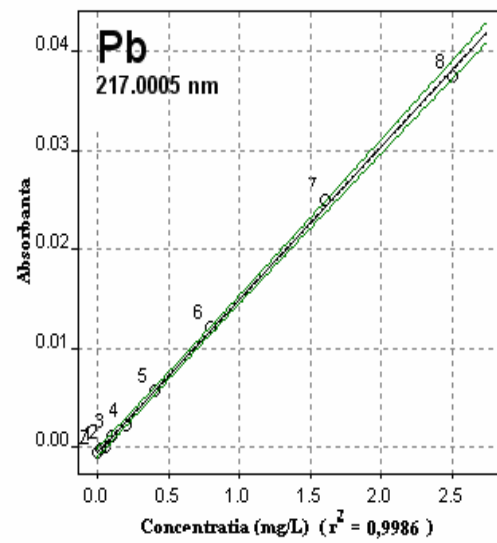
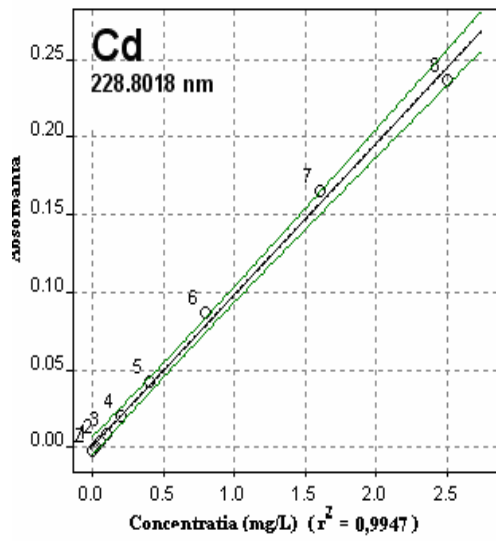
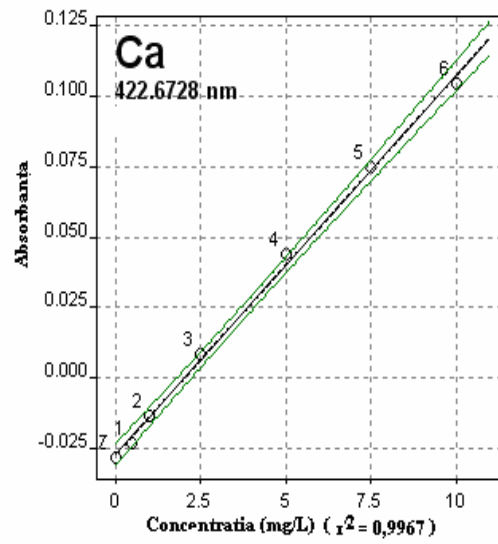
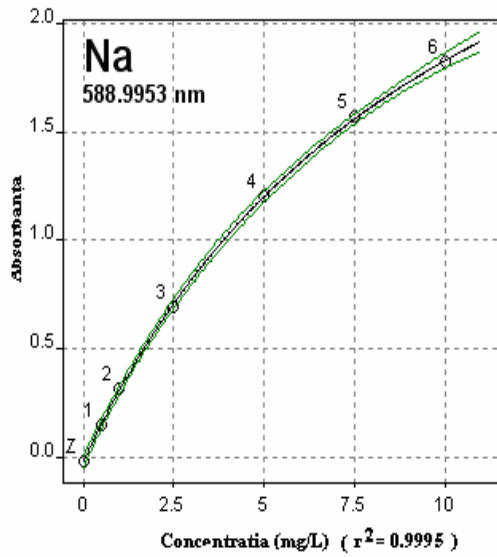
C



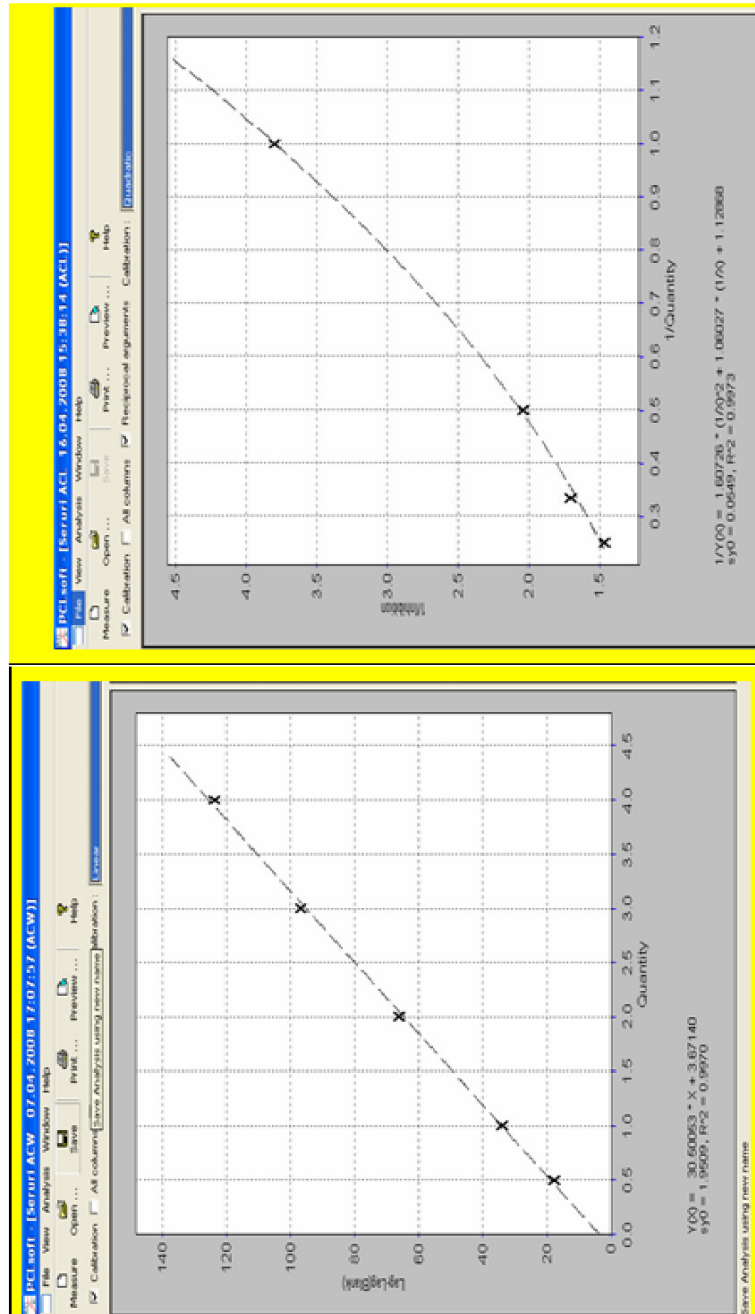
Cromatograma HPLC a extractului de rozmarin: A. în etanol 35% (tinctură) și B. în oțet de mere cu miere 9%



Cromatograma HPLC a extractului de salvie: A. în etanol 35% (tinctură) și B. în oțet de mere cu miere 9%

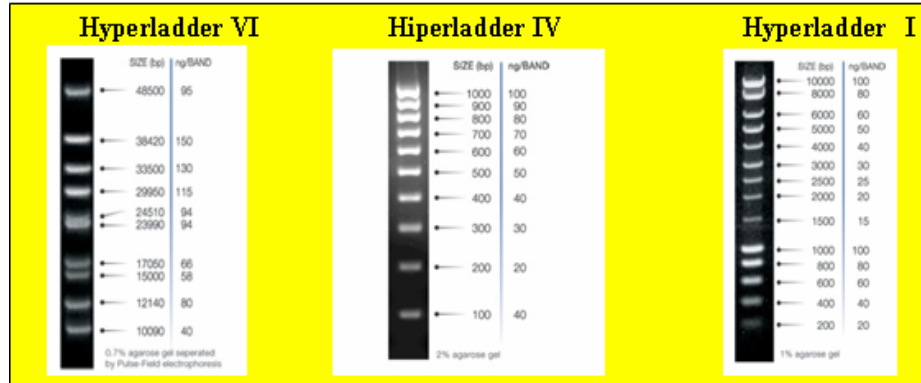


Anexa 3. Curbe standarde metale



Anexa 4. Curba de calibrare pentru determinarea antioxidantilor hidrosolubili (anexa 4.1 stânga) și liposolubili (anexa 4.2 dreapta) din plasmă

Anexa 5.

Anexa 5.1 . Cuantificarea ADN folosind markeri DNA

Anexa 5.2. Secvența fragmentelor SOD3 amplificate; cu galben sunt marcate secvențele primerilor (amorșelor folosite) și cu verde este marcată baza schimbată în cazul polimorfismelor

A. Secvența fragmentului din promotorul *EC-SOD (SOD 3)*

ataccagaacggagacgtgctttcttg
 -442 gacctaaacgaaataaaattaggccaagtgaagcaagtgccatttaaaa
 -392 tagtagctatgaatgtatataattaggattcaagaactgaatgaaaata
 -342 taaatgttttaaaaatggaagaagattcacaataaggaactgactgt
 -292 tgcaggggtgggggtgggggtgggtggcatggggaactctgaaaactca
 -242 ttagttgaggataactacgcctaccaacagaatgcagaggtgcaagactg
 -192 agctactggtgcctgagttctcagcgggccagaaggaaggacggtagggg
 -142 ggaaggctggagctcagttctgggaagtctccctcttatctcgagaa
 -92 tgctgtccctgataaagatcattagtttgagttttccaagatgattc
 +1
 -42 taggaagctctgctgtaactaagtacccatcctggggtgggatccag
 +9 agattta

B. Secvența fragmentului din exonul 3 al *EC-SOD (SOD 3)* ce conține polimorfismul Thr40Ala

gacatgtacgc
 +5209 caaggtcacggagatctggcaggaggtcatgcagcggcgggacgacgacg
 +5259 gcgctccacgccgctgccaggtgagccgctcgccacgctggacgcc
 Thr40Ala
 +5309 ggcagccccgggtgaccggcgtcctcttccggcagcttgcgcccg
 +5359 cgcaagctcgacgccttctcgccctggagggtctccgaccgagccga
 +5409 acagctcagccgcgcacccacgtgcaccagtt

C. Secvența fragmentului din exonul 3 al *EC-SOD (SOD 3)* ce conține polimorfismul Arg213Gly

gaggacgacctgggcccgcg
 +5659 cggaaccaggccagcgtggagaacgggaacgcgggcccggcgtgct
 Arg213Gly
 +5709 gctcgtggtggcgtgtgcggccgggctctggagcggcagggcgcg
 +5759 ggagcactcagagcgaagaagcggcggcgcgagagcgagt

Anexa 5.3.**50 x TAE**

484 g Tris
200 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)
114 ml Acid acetic glacial
1200 ml H₂O sterila

1 x TAE

dilutie 1:50 a 50 x TAE

Anexa 5.4.**SOLUTIE DE MIGRARE BROMFENOL (ALBASTRU)**

15 % Ficoll® 400
0.2% albastru de Bromfenol

Anexa 5.5.**SOLUTIE TAMPON 1X TE**

100 ml soluție Tris HCl 100 mM (pH=8)
2ml EDTA 0.5M(pH=8)
898 ml apă Milipore

Anexa 5.6.**SOLUTII TAMPON -Transgenomic Wave****Tampon A**

50 ml 2 M TEAA
250 µl ACN
900 ml H₂O MilliQ

Tampon B

50 ml 2 M TEAA
250 ml ACN
900 ml H₂O MilliQ

Anexa 5.7.**SOLUTII TAMPON – NEB (restrictie enzimatică)****NEB1**

10 mM Bis Tris Propan-HCl
10 mM MgCl₂
1 mM DTT (pH 7.0 la 25°C)

NEB2

50 mM NaCl
10 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
1 mM DTT (pH 7.9 la 25°C)

NEB3

100 mM NaCl
50 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
1 mM DTT (pH 7.9 la 25°C)

NEB4

50 mM Acetat de potasiu
20 mM Tris-acetat
10 mM Acetat de magneziu
1 mM DTT (pH 7.9 la 25°C)

NEBuffer Bam HI

150 mM NaCl
10 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
1 mM DTT (pH 7.9 la 25°C)

NEBuffer Eco RI

50 mM NaCl
100 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
Triton X-100 0.025% (pH 7.5 la 25°C)

Anexa 5.8.**COMPOZITIA SOLUTIILOR TAMPON ALE KITULUI QIAGEN MAXIPREP****Solutia Tampon P1**

50 mM Tris-Cl (pH 8.0)
10 mM EDTA
100 µg ml⁻¹ RNA-ză H

Solutia Tampon P2

200 mM NaOH
1%SDS

Solutia Tampon P3/N3

Acetat de potasiu 3 M (pH 5.5)

Solutia Tampon QBT

750 mM NaCl
50 mM MOPS (pH 7.01)
15% Isopropanol
0.15% Triton® X-100

Solutia Tampon QC

1 M NaCl
50 mM MOPS (pH 7.0)
15%Isopropanol

Solutia Tampon QF

1.25 M NaCl
50 mM Tris-Cl (pH 8.5)
15%Isopropanol

Solutia Tampon EB

10 mM Tris-HCl (pH 8.5)

ANEXA 6. ANALIZA COMPUTAȚIONALĂ A *SOD3* (*EC-SOD*)

Anexa 6.1. Factorii de transcripție posibil funcționali, situsurile corespunzătoare de legare de ADN predictive în secvența promotorului și secvențele de recunoaștere a acestor factori; cu litere mari roșii sunt notate bazele conservate din secvența centrală, cu litere albastre mari bazele din regiunea cu probabilitate mică de conservare, iar cu litere negre mici bazele care nu sunt din secvența centrală de recunoaștere

Factorul de transcripție	Secvența de recunoaștere (5`-3`)	Situsul de legare predictiv în <i>EC-SOD</i>	Poziția în promoterul <i>EC-SOD</i>
GFI 1	YAAATCACWGY Matys V et al. 2003	gta AATC taggcttt	-498 la- 484
SMARCA3.02	MCWTDK Aveline H.et al.2002	tagg ACTT gtg tg CCATT taaa tg TTACTT ggt caat ACTT ttt ta CCATT tttt tc ACATT tggt	-481la -471 -403 la -393 -1484-1474 -1275-1265 -1113-1093 -1589-1579
BCL6	GAAAATTCCTAGAAAGCATA WNCTTTTCNAGGRAT Kawamata N, et al.1994	caag tccTAGA atcca ag cttccTAGA atcatc ac ctcccTAGA aagcca	-479 la -463 -50 la -34 -1850-1834
vMYb	pyAAKG Biedenkapp H et al., 1988	cag AACG gagacg aag AACT gaatga tg CAAC ag tct tag	-464 la -452 -359 la -347 -300 -212
XBP1	GcCTGARGMgr Mai B/ Breeden L, 1997	gaacggag ACGT gctttcttg gggtggcatgg GGA actct	-462 la -442 -269 la -251
HSF-1/2	nGAAn Kroeger et al. 1993 Xie X et al., 2005	g ttta agg tcCAAGaa agca cg tct attaggatt caAGA actga at gaa tgag tttttcCAAG atgatt ct tagg caag at gatt ctAGGA ag ctc ctgc caggag cttctAGAA atcat ct tg	-456 la -432 -370 la -346 -63 la -39 -53 la -29 -54 la -30
EVI1	TGACAAGATAA Perkins et al., 1991	ttt ccAAG atgatt ct a atgag AAG atgaaa aca ttt atAGA aaa ataa ag att at ag agtcGATA c	-56-40 -1465-1449 -1321-1305 -1166-1150
SOX5	AACAAT (Denny P. Et al., 1992)	tgaaaa CAAT taagg tt g cttgaCAAT g ctc att att gaaCAAT g ac ctc gatt caCAAT aag ga ac	-1825-1809 -1630-1614 -1569-1553 -316-300
EVI1	TGACAAGATAA Perkins et al., 1991	ttt ccAAG atgatt ct a atgag AAG atgaaa aca ttt atAGA aaa ataa ag att at ag agtcGATA c	-56-40 -1465-1449 -1321-1305 -1166-1150

R = A sau G, K = G sau T, Y = C sau T, S = C sau G, N = A, C, G sau T, M = A sau C și W = A sau T

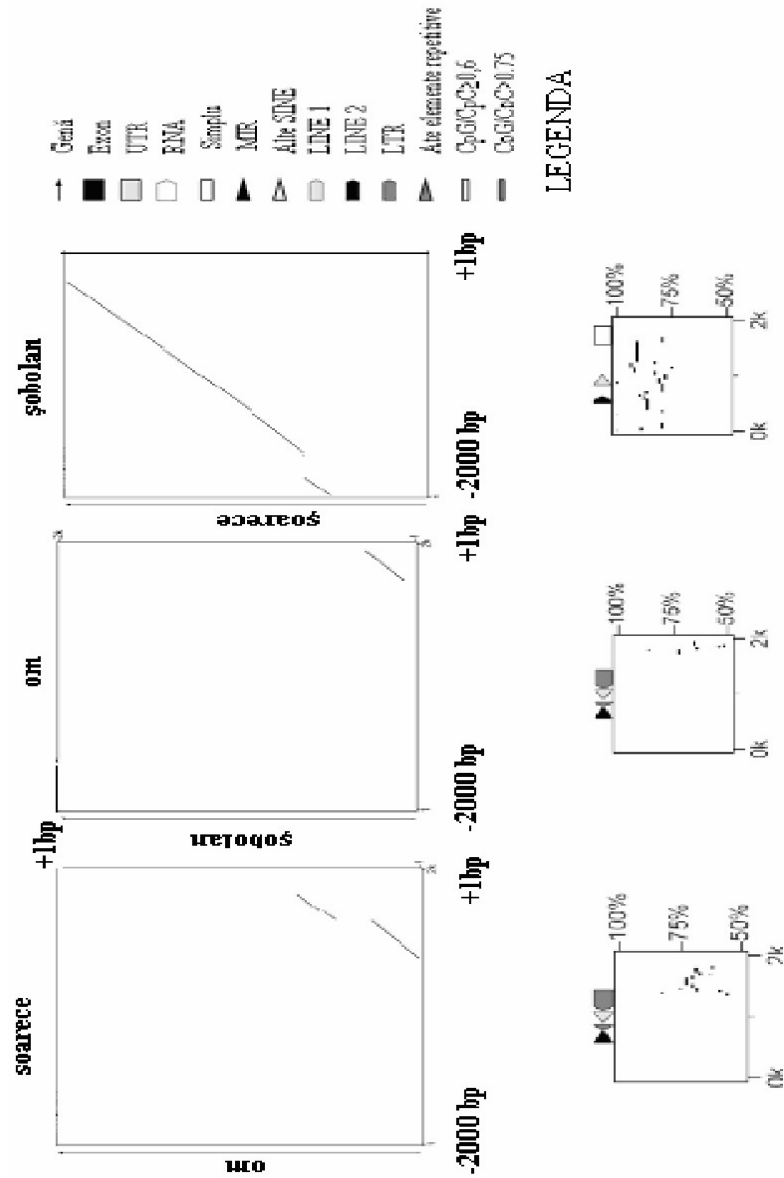
Factorul de transcripție	Secvența de recunoaștere (5`-3`)	Situsul de legare predictiv în <i>EC-SOD</i>	Poziția în promoterul <i>EC-SOD</i>
RORA2	AGGTCA Jetten AM et al., 2001	aa attaGGCC aagtgaag gt aactaAGTC a ^c ccatcc agaataag aGGTC aattgttcaa	-426 la -408 -26 la -8 -1576-1554
BRN2	ATGCAAT Atanasoschi S et al., 1995	attatata catTCAT agct catttatattTCAT tcag ct TATT gtgaatctttctt ctggact ttATT Tcttat	-387 la -369 -354 la -336 -222 la -304 -1326-1308
TATA	TATAAA Bucher, 1990	atgta TATA aattaggat aaata TAAAT gttttaa tctta TAA caaagttg	-379 la -363 -346 la -330 -1313-1297
OCT1	ATGCWAAT Lundback et al., 2000 Van Leuwen et al.,1997	gaa atcctAATT ata tga ATGA aaataaa gag ATGCa atgccac aa CATC caaatttcc tggatatt AATT tgg tta ATAT ccacc tga ATAT tcact gga ATAT tcacag tg CATG gcagtcact	-374 la -362 -353 la -339 -753-749 -612-598 -1296-1282 -1291-1279 -1048-1036 -1045-1033 -1544-1530
PAX1	CCGTCCGCTCTAGACAT Chalepakis G et al., 1991	t CATT cagttctt gaaatc	-365 la -347
YY1	CCWTN TTNNNW Shrivastava A.& Calame K.,1994	tcttc CCAT ttttaaaca ctt gCCAT tttctacctc	-337 la -319 -1374-1356
SPIB	RGAGGAARY Vasylyk C et al. 1992	taaaaatg GGA Agaagattc caca ataaGGA Actagactgt catg aaaaGGA Agctatttac	-322 la -312 -312 la -292 -1744-1724
WT1	CGCCCCGC Ranscher et.al.1990	cagg gTGGG gtggggt	-289 la -273
BKLF	AAGGGGTAA Treisman J & Desplan 1989	ca GGGT gggggtggggt gg GGGT gggggtggg	-289 la -273 -283 la -267
RREB1	CCCCAACCACCCC Thianqalinqam A. et al, 1996	c CCCA accaccct c CCCA tgcaccac c CCCA accctccac	-212 la -226 -229 la -243 -563-549
cMYB	YAACKG Howe KM et al.1990	tg CAAC agtctag tt CAAC agtc ^c ca ac TAA Cagtatgt ta CAAC tggcatt	-300 la - 288 -783-771 -1917-1905 -1726-1714
GC	GGGNGGG Bucher, 1990	gtgg gGGT Ggggtg	-215 la -229

R = A sau G, K = G sau T, Y = C sau T, S = C sau G, N = A, C, G sau T, M = A sau C și
W = A sau T

Factorul de transcripție	Secvența de recunoaștere (5`-3`)	Situsul de legare predictiv în EC-SOD	Poziția în promoterul EC-SOD
SREBP1/2	ATCACCCAC Magana et al.1997 Sato et al. 1996	cca CCAC cccacccc	-282 la -268
ELK-1	mrMMGGAWry Treisman R et al., 1992	ggccagaa GGA Aggacggtag	-165 la -145
GKLF	RRGGYGY Shields J.M, Yang VW 1998	aaggacggt AGGG	-155 la -143
EKLF	CCACACCCCT Miller I.J,Bieker J.J, 1993	gacggt GGGT ggaagg	-152 la -136
GABP	NGMGGAAGG Vasylyk B et al.1993	ggtagggt GGA Aggctggag tccacgtg GGA Agagtgtctt tcccacgt GGA Agagtctct	-149 la -129 -1684-1664 -1674-1654
STAT5	TTNYNNAA (Horvath et al. 1995)	agac TTCC cagaactgaga gagc TTCC tagaatcatct tcct TTCT gagaaaccact tgtt TTCT cagaaaggaaa tcac TTCT gtgaatattcc aata TTCA cagaaagtgatc	-128 la -110 -51 la -33 -628-610 -626-608 -1045-1037 -1043-1035
STAT.01	TTCYNRGAA Soldaini et al 2000	tcagttctg GGA Agcttcc atgat tctaGGA Agctcct	-126 la -108 -48 la -30
NFKB	GGGGAMTTTCC Grilli et al.1993	gg GAG Acttcca	-119 la -107
E2F	SGCSSAAA Nevins et al.1992	attct gcgaGATA aagag cggt gcgaGAAA aagg agtcc cagtGAAA agtg	-107 la -91 -547-531 -776-761
PPAR_RXR	AGGNNAWAGKTSW Palmer et. Al.1995	ctgtccctggataa AGAT catag	-88 la -66
GATA1 GATA 3	WGATAR Yammamoto et al.1991	gcga GATA aagagg gag GATA aggcc gtat GATA aatcg taa AGAT catagt aact GATA gactt	-108 la -96 -890-878 -705-693 -77 la -65 -1766-1754
NFKB/NFKAPPAB65	GGRNTTTC Kunsch C et al., 1992	gcaggagc TTCC t	-41 la -29
MOK2	RCCTTRTCAGGGCCTTR Arranz et al., 1997	gtgctttcttga CCTT aac	-452 la -432
NKx2.5	YAAG Kasahara H. et al., 2001	tggcc TAAT ttatt aatcc TAAT tatata aacct TAAT gtttt	-429 la -415 -376 la -362 -1825-1811

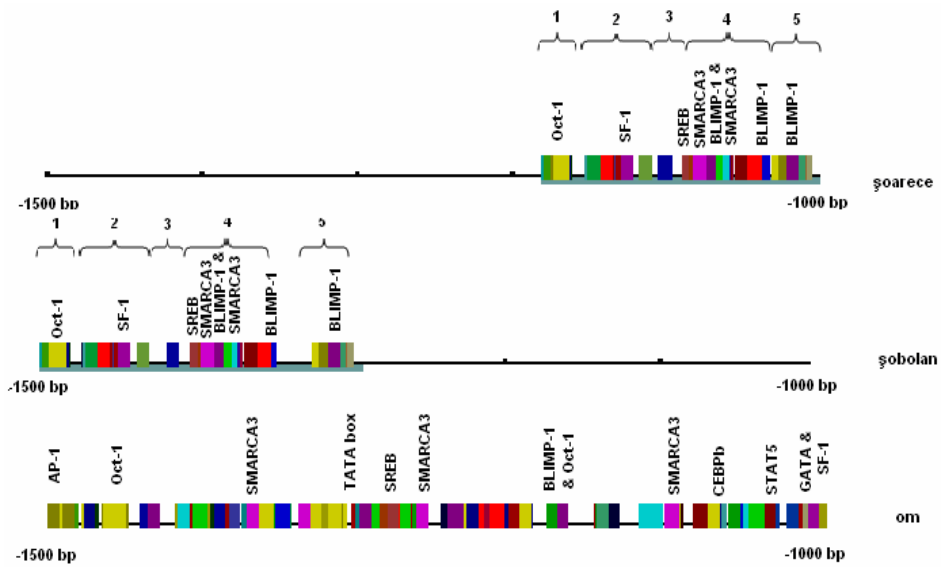
R = A sau G, K = G sau T, Y = C sau T, S = C sau G, N = A, C, G sau T, M = A sau C și
W = A sau T

ANEXA 6.2. Rezultatele analizei PIP Maker pentru 2000 bp din secvența ADN a promotorului EC-SOD (*SOD3*)



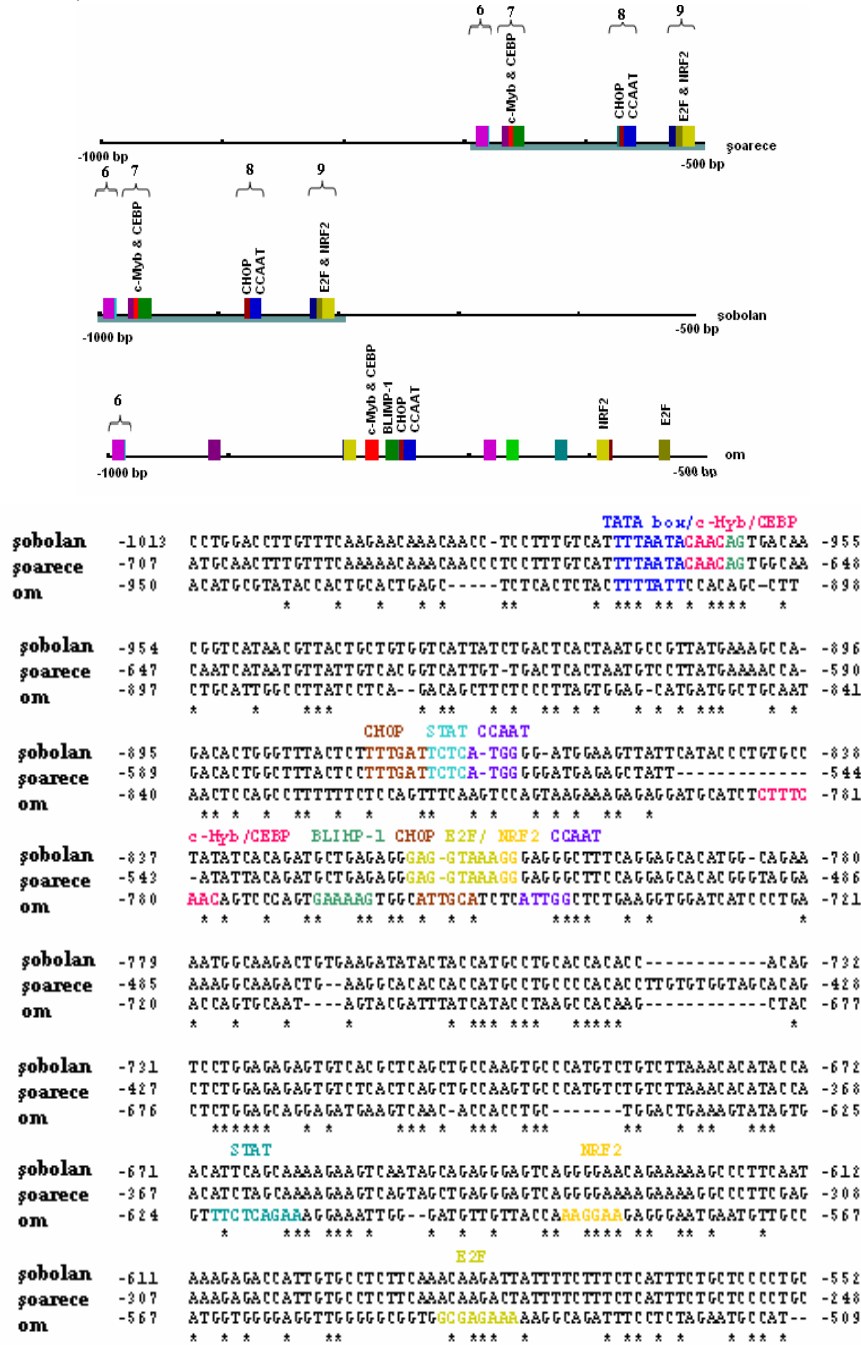
Diagramele Pip (A) și dot-plot (B) rezultate din compararea secvențelor corespunzătoare promotorilor genei *SOD3* la toate cele trei specii : a. Om-șoarece; b. Om-șobolan; c. Șoarece-șobolan

Anexa 6.3.1 Rezultatul alinierii Foot Printer (sus) și Clustal W (jos) a celor 3 secvențe corespunzătoare fragmentului EC-SOD (SOD3) cuprins între -1500-1000 bp ; poziția polimorfismului identificat în baza de date este marcată deasupra secvențelor

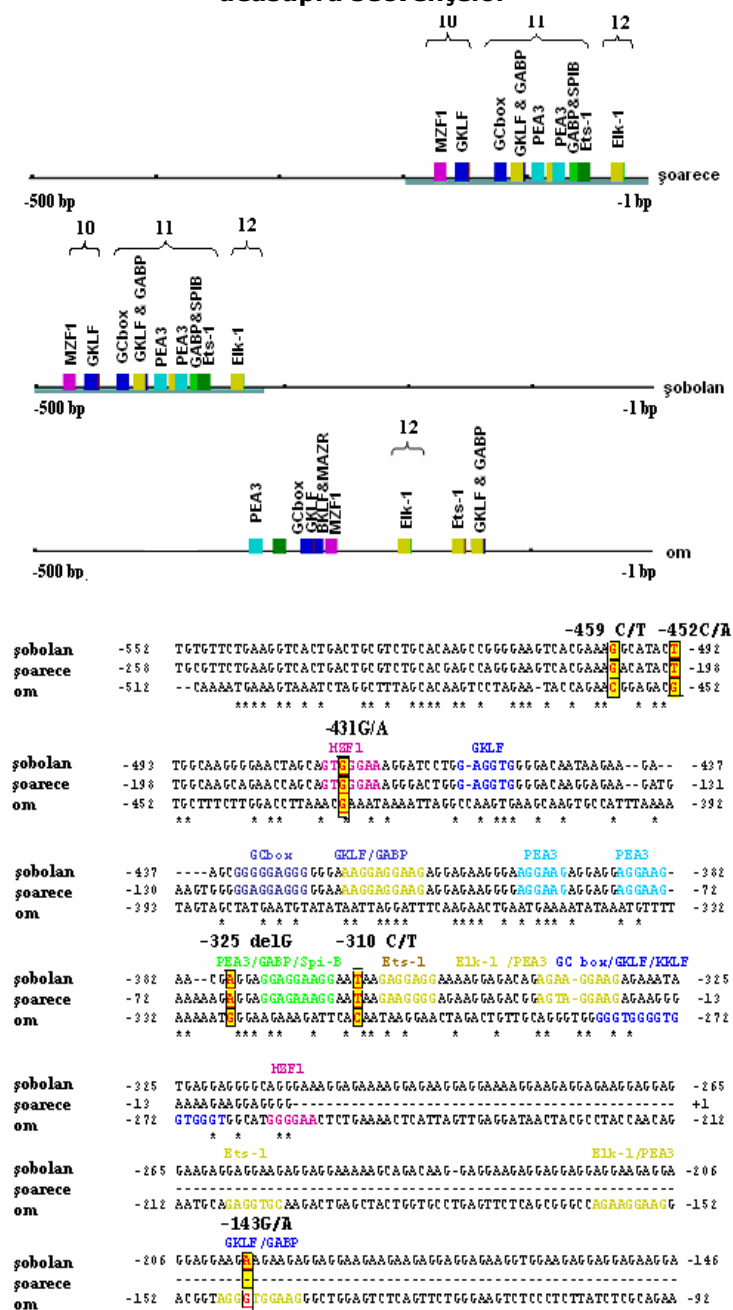


			API		
sobolan	-1556	AGCGACTGGAGGTGTCAGGGGGCATTCTG----	TCCTCTGTCGAGCTGTACCAATTGA	-1500	
soarece	-1228	GGCGACTGGAGGTGTCAGGGGGCATTCTG----	TCTCT-----AGCTGTACCAATTGA	-1180	
om	-1531	TGATGTTACAGAGATCACTGTGAAATGTGAAC	TCTCTGTACTTGTGTTCT	-1471	
		* * * * *	* * * * *		
		Oct-1			
sobolan	1499	TGCTCTGTTTTCTTCT-----	AAAGT--GTAACTACATGGGACAGAAACTT	-1453	
soarece	1179	TGCTCTGTTTCTTCT-----	AAAGT--GTAACTACATGGGACAGAAACTT	-1123	
om	1470	AACTTTGTTTTCACTTCTCATTAGGTTAGCTG	GTAAAGCATAATGATTAAGAACTC	-1411	
		** * * * *	* * * * *		
		SF1	SREB		
sobolan	-1452	AGGC--AGCTTTGAAATCTCTGATGTGGACTG	ATGCCTGGTACGGGAGCAGATACCCAA	-1396	
soarece	-1132	GTGC--AGCTTTGAAATCTCTGATGTGGACTG	ATGCCTGGTACGGGAGCAGATACCCAA	-1083	
om	-1410	AAAGCTTAGGAATCAAATCTTAGGGTTGAATC	TGACTTTGCCATTTCTACCTCTCAA	-1351	
		** * * * *	* * * * *		
		SHARCA3	BLIMP-1/SHARCA3	TATA box	BLIMP-1
sobolan	-1395	-----CAACCATTGTCARAGGAATTCAGGGG	GTCAAGGCAGGCAGCAGCT	-1347	
soarece	-1082	-----TAACCATTGTCARAGGAATTCAGGGG	A-CAGACAAGCCAGCAGCT	-1035	
om	-1350	CTGGGGTCATTACTTTCTTAGGACTTTATTTCT	TATAAACAAAGTTGCAAAT	-1291	
		** * * * *	* * * * *		
		Oct-1P/SREB	SHARCA3	BLIMP-1	
sobolan	-1346	GACTTTTCCCATGGCTGGGGTGGGGTGGTTCTC	TGGGAAAGAGAACTTCTGTTTCTGG	-1287	
soarece	-1034	G-----GGATGCTTCCTGGGAAAGAGAGCC	TTTTATTTCTAG	-996	
om	-1290	TATAACCAACCCAC-----	AAAGTATTGCAGCATTAAATACGATATATGAG	-1238	
		* * * * *	* * * * *		
sobolan	-1286	AAAGAGCTTCT--GTGACTGGCAGGAGTTCTGA	CAACAAAAG--AAATAAGGACCT	-1233	
soarece	-995	A--GAGTTTCT--GTGATGGACAGGAGCTCC	CAACAAAAG--AAATAAGGAGCT	-944	
om	-1237	AAAGTCTTCTATAAAGTCTCAGCTGCACTTC	CAGAAAACCAACTAAACACTTAAAGC	-1178	
		* * * * *	* * * * *		
		BLIMP-1 & Oct-1			
sobolan	-1232	GGGGTTGAAAGGTTCAAGGCACACAGTCATGTAG	ATT--TCAAATTGCTTCTCTGGG	-1176	
soarece	-943	GGGATTTGAGGTTCTCTGGCTCTCAATCTGTGT	AGTTA--TGTAACAATCTCTCTGGG	-886	
om	-1177	AAATGAGGAATGATCCGACTC&AT&AT&A&A&A	TA&G&AG&CATCTG&CC&AT&G&C&G&G&G	-1118	
		* * * * *	* * * * *		
		SHARCA3	CREB		
sobolan	-1175	--CTGACTCAGTTGGCAGACTACTTGCCTAAC	ATGCATG-----TGTTG-CCCCA	-1127	
soarece	-885	--CAGGCTCAGTTGGCAGACTACTTGCCTAAC	CAGGCATGAGGCCCTGTGTTGACCCCA	-828	
om	-1117	TTCAGATTTCACTCTACCACTTTTTTTTTTTA	GAGCAGGGTC--TTGCTACATTTGCCAG	-1059	
		* * * * *	* * * * *		
		Oct-1.P/STAT5	GATA	SF1	
sobolan	-1126	GTGACACAGAAACATGGTGT&CAT&GCT&G&A	TCC&AGC&ATTTGGG&AGCT&AT&G&AGGG	-1066	
soarece	-827	GC&GAC&CAC&AAC>&G&AT>&G&C&AGC	CT&G&CA&ATCC&AGC&ATTTGGG&AGCT&G&AT&G&AGGG	-768	
om	-1058	GC&T&G&AG&T&G&C&AG&T&G&A&T&T-C&A&G&A&A	GT&G&AT&C&A&G&C&C&AT&G&A&G&C&T&G&A&T&T&C	-1000	
		* * * * *	* * * * *		

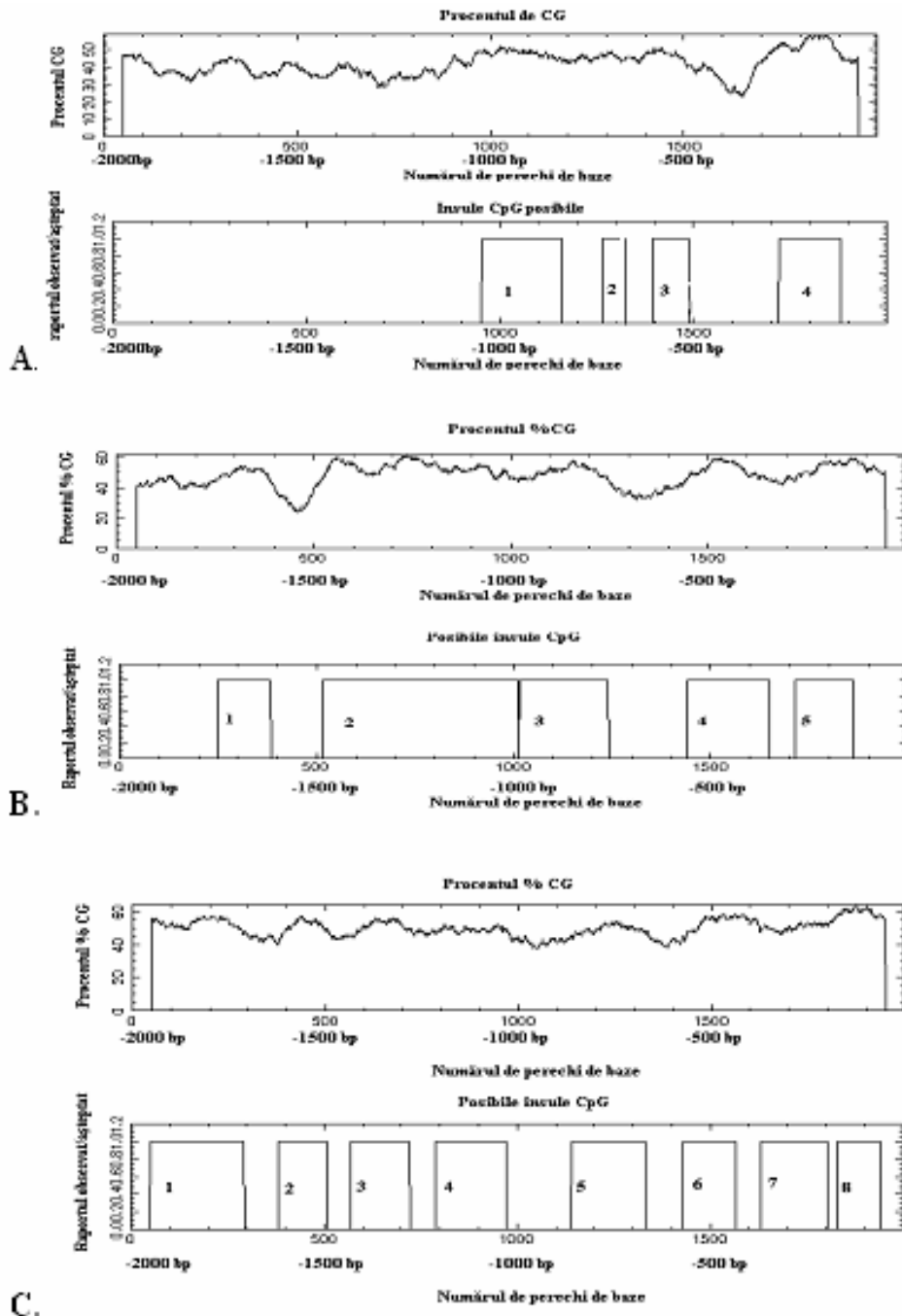
Anexa 6.3.2. Rezultatul analizei FootPrinter și Clustal W a celor 3 secvențe ADN corespunzătoare fragmentului EC-SOD (SOD3) cuprins între -1000 bp-500 bp (șoarece, șobolan și om)



Anexa 6.3.3. Rezultatul analizei FootPrinter și alinierii Clustal W a celor 3 secvențe corespunzătoare fragmentului EC-SOD (SOD3) cuprins între -500 bp+1bp; poziția polimorfismului identificat în baza de date este marcată deasupra secvențelor



Anexa 6.3.4. Identificarea insulelor CpG cu programul EMBOSS-CpG în promotorii genelor SOD 3 uman (A), de la șoarece (B) și de la șobolan (C)



Anexa 7. ANALIZA GENEI *C/EBPβ*

Anexa 7.1. Factorii de transcripție posibil funcționali, situsurile corespunzătoare de legare de ADN predictive în secvența promotorului *C/EBPβ* și secvențele de recunoaștere a acestor factori; cu litere mari roșii sunt notate bazele conservate din secvența centrală, cu litere albastre mari bazele din regiunea cu probabilitate mică de conservare, iar cu litere negre mici bazele care nu sunt din secvența centrală de recunoaștere

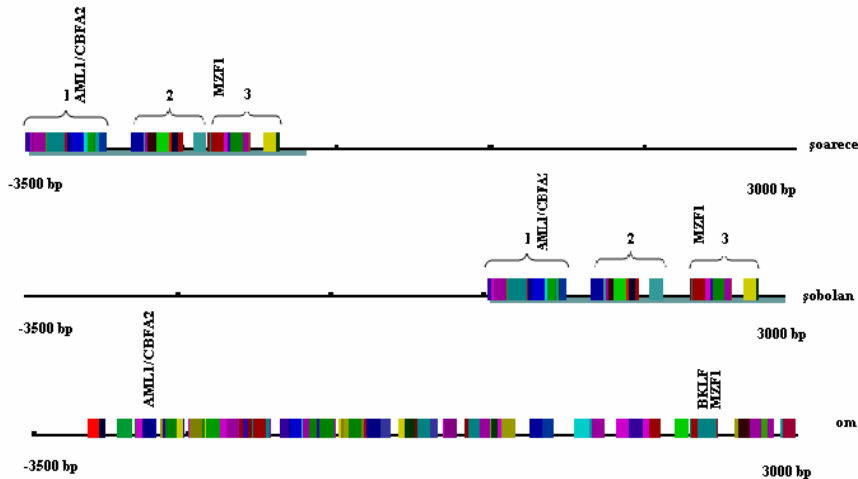
Factorul de transcripție	Secvența de recunoaștere (5`-3`)	Situsul de legare predictiv în <i>C/EBPβ</i>	Poziția în promotorul <i>C/EBPβ</i>
GC box	GGGNG Bucher, 1990	actg GGGT Gggggtg gtgg GGGT Gggggag accg GGGT Gggacct ggtcgaccg CCCC tctcgctc	-3230-3216 -3224-3210 -3074-3060 -268-254
Sp-1	GGGCGG Nardelli et al., 1991	gcgg GGGCGGG gagg ttgg GGGCGGA Ggtc gcag GGGCGGG gggt ctag GGGCGGG Ggctc cagg GGGCGGG ccgg ccgg GGGCGGG gtcg cccg GGGCGGC cggg gcag GGGCGGC ctca	-3621 -3607 -1608-1594 -804-784 -693-679 -382-368 -280-266 -234-220 -208-194
SREBP-1/2	ATCACCCAC Magana et al.1997 Sato et al. 1996	ct GTCACCCAC ctc agg TCACCCA gctc tt TCACCCAC cag	-2044-2028 -1598-1594 -1270-1256
STAT	TTNYNNAA Horvath et al. 1995	cacc TTCTCTGAA ccacat ggct gtctGAA ggcggg	-2508-2490 -318-300
E2F	SGCSSAAA Nevins et al.1992	tggtg GGGTGAAAA aag gcggg GCGCg atcctgc ggcc ccccGAAA acgc	-1269-1253 -655-639 -186-170
CCAAT box	CCAAT Bucher, 1990	acag CCA Ctcacgta	-3314-3300
HNF-4	CAWAR Courtois et al., 1988	tccgggagg CAA ggccctcta gcaagt gtcaGAAG gcctgggcc	-1412-1388 -1363-1339
USF	NNCACGTGNN Bendall and Molloy , 1994	tggtc CACA tggtg tggtc CACG tgggc ggcc CACG tgggc aggt CACA tgaaa aggt CACA tgggc	-3591-3581 -3584-3572 -3583-3571 -2812-2800 -1030-1018
Egr-1	GCGGGGGCG Swirnoff and Milbrandt, 1995	cagt TGGGGGCA gagg gctg GAGGAGGCG gagg ccag CAGGGGGCG ggcc ggag GAGGGGGCG acct	-3619-3603 -341-325 -266-250 -221-205
TATA box	TATAAA Bucher 1990	atc TATAAA gtggagat cct TATAAA taaccggg	-2759-2743 -34-18

R = A sau G, K = G sau T, Y = C sau T, S = C sau G, N = A, C, G sau T, M = A sau C și W = A sau T

Factorul de transcripție	Secvența de recunoaștere (5' -3')	Situsul de legare predictiv în C/EBPβ	Poziția în promoterul C/EBPβ
GATA box	GATAR Whyatt <i>et al.</i> , 1993	gaa GATTT tatt tgga GATAA tgat taat GATAA gact tact GATAA tttg ggga GATAT gggg tggc GATAG ggaa aggg GATAA aaca cag GATGT catt agca GATAA cacc	-2836-2824 -2749-2737 -2743-2731 -2556-2544 -2440-2428 -1884-1872 -1675-1663 -1631-1619 -1583-1472
p53	GGACATGCCC Funk <i>et al.</i> , 1992	gggaaggggtggc AAGCATGTTC c ataattgtagg AGGCAGGTCT t gtgt CAAG tcc AGGCGGCGC Gt aagagaagacc GGGCGTGTCC a	-3058-3036 -2571-2549 -1337-1315 -748-728
AP-2	GCCNNNGGC GCCNNNGGC Williams and Tjian, 1991a and b	ctg GCCTCTGGG gtg aag GCCTTGGC Ctg	-3036-3022 -1351-1337
AP-4	CAGCTG Dang <i>et al.</i> , 1992 Mermod <i>et al.</i> , 1998	agccc CAGCAG gggtct	-3014-2997
Oct-1	ATGCWAAT Lundback <i>et al.</i> , 2000 Van Leuwen <i>et al.</i> , 1997	aaaattca AATT tcc ca CATC aaaattcaa aa TATG aaaaagaa tac ATGC aaagact ct CATT ataatcaga gg CATT tcattggg	-3541-3523 -3531-3512 -2594-2494 -2527-2513 -2187-2173 -1062-1048
c-Myb	GTTR Howe KM <i>et al.</i> 1990	ga CAAC ggccgc ag CAAC cgctgcg	-1323-1311 -56-17
CEBP	RTTGCGYAAY Vinson <i>et al.</i> , 1989	ggaattgt GAAA agc agga tgacGTA agcc aggctgag GCAA gag aaggtga GCA atgc	-3686-3672 -3167-3153 -2685-2671 -1569-1555
MZF1	GAGGGGAA Morris J. <i>Et al.</i> , 1994	gc GGGG agg tt GGGG aaa gt GGGG atg gt GGGG aag tg GGGG aac ga GGGG agc ga GGGG ata ga GGGG agt gg GGGG aag	-3621-3607 -3262-3254 -3250-3242 -3063-3050 -2375-2367 -2223-2215 -1670-1662 -356-348 -291-277

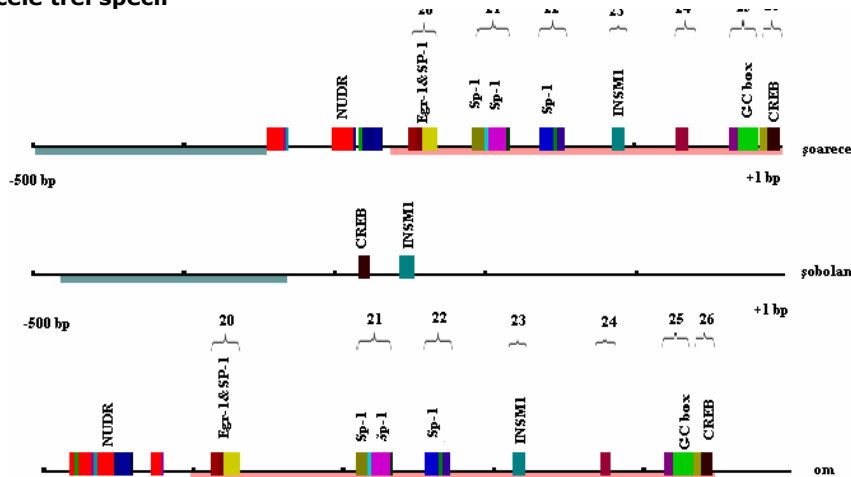
R = A sau G, K = G sau T, Y = C sau T, S = C sau G, N = A, C, G sau T, M = A sau C și W = A sau T

Anexa 7.2. Rezultatul analizei comparative a secvențelor ADN corespunzătoare celor trei specii analizate: A. Rezultatul Foot Printer al fragmentului cuprins între - 3500 bp și -3000 bp; diferitele motive structurale conservate sunt colorate diferit și sunt grupate în clustere. B. Rezultatul analizei Clustal W la cele 500 bp analizate C. Marcarea situsului polimorfic -3429 C/T care modifică o bază care se conservă la toate cele trei specii



Species	Position	Sequence	Position
șoarece	-3618	-----GA--AGGCTGAGAGCTCTT-TCCATCCCTGGACAGCTGTACC	-3660
șobolan	-3459	TGATGAGTACTACCGA--AGGCTGAGAGCTCTT-TCCATCCCTGGACAGCAATACT	-3403
om	-3459	AACTAAAACGCTATGGGCTCAAAATTGAACTATTGTTGCTCTGATTGGCCACTGGCTG	-3400
mouse	-3659	TC--TTGTGGCATGCTCATGTCC-----CACAGTCCAGGCT	-3622
rat	-3402	TCTCTTGGGGCATGCTCCCGTCTTGGAGTGGAGTGTGATACCACAGCCGCTGCT	-3243
human	-3299	CCAGTTGAGATCTTTCCGGCTCT---AGGTTTGGGGCAGGTGACTGGAGAGCTG	-3244
mouse	-3621	CTAC-----TACTCA--AAAAGATCTCA--AGTCACTCCGAGTCCAGGCTG	-3574
rat	-3242	CTCAGAGTGGCTCTCATTTAAAAGATCTGG--AGTCTTCCGAGTCCAGGATCTG	-3284
human	-3243	GGCTAGGGGATCTGGGTTCTGTGCTCAGCAGGCTCACTCACTGACTCTGGGCTTTG	-3284
mouse	-3573	CCAGAGATGTC--AGCATGCAC--ACAGGCAAGTTTACAGAGCAGCTGATGCTGGAG	-3518
rat	-3283	CCACTAGATGTC--AGCATGCAC--ACAGGCAAGTTTACAGAGCAGCTGATGCTGGAG	-3228
human	-3283	GGCTGGGCTGTTCAAGCTCCAGCATCTCCACTTCTGGGGAAAGGCTGAAAGATCTG	-3224
mouse	-3517	AGGCTAATCTTGGACTGAGACTGTTGATGACACTGGGAAATGAGGCTG--AGGAGG	-3459
rat	-3227	--CCATCTGGGACTGAAAGCTGTGAGCAAC--GGGAAATGAGGCTG--AGGAGG	-3172
human	-3223	GGGTGGGGTGGGGGAGCAGAGGCTGGGCTGTTGAGCAA--GAGCTTGTAAAACA	-3167
mouse	-3458	AGGCTGTTGTTTCTCTTGGTTATTTCTTAG--TTGGAAATGAAACAACT	-3403
rat	-3172	AGGCTGGTTTCTCTCTGTTATTTCTTAG--TTGGAAATGAAACAACT	-3118
human	-3166	AGGCTTACTCATCTAGCTTGGAGCTTCCCTGAGGACACTGGGCTGGGCTGGGCTG	-3107
mouse	-3402	GCTTACCC--CCAGCAAAGCTCAGGCTGGTGCACGGCTC-----T	-3265
rat	-3117	GCTTACCC--AACAAAAGCTCAGGCTGGTGCACGGCTC-----T	-3061
human	-3106	GGGACCTGGCTGAGAGGAGATGGTCACTCCAGCAGGGGCTGAGGCTGGGAAAGCT	-3047
mouse	-3264	GGGAGAGTTGTGAGCCACTGAGGCTG--TCTTCAAGCTC-----GCTGATGCA	-3213
rat	-3060	GGGAGAGTTGTGAGCCACTGAGGCTG--TCTTCAAGCTC-----GCTGATGCA	-3010
human	-3046	GGCAGGATGTTCCACCCAGAGGCTCAGAGGCTAGAGCTCCAGGCTGGGCTGGGCTG	-2987
C.	-3429	C/T AML1/CBFA2	
mouse		-----GA--AGGCTGAGAGCTCTT-TCCATCCCTGGACAGCTGTACC	-3660
rat		TGATGAGTACTACCGA--AGGCTGAGAGCTCTT-TCCATCCCTGGACAGCAATACT	-3403
human		AACTAAAACGCTATGGGCTCAAAATTGAACTATTGTTGCTCTGATTGGCCACTGGCTG	-3400

Anexa 7.3. Rezultatul analizei comparative a secvențelor ADN corespunzătoare celor trei specii analizate: A. Rezultatul Foot Printer al fragmentului cuprins între -500bp și +1 bp; B. Rezultatul analizei Clustal W la cele 500 bp analizate C. Marcarea situsurilor polimorfice -412 G/T și -411 C/T care modifică o bază care se conservă la toate cele trei specii



B.

		CREB	INSM1	
mouse	-652	GTC CACG GAG GGA ACT CAG A - - AG C A A A T G A C T C A C C C - - AG A C A C A G T G T G G C A G A R C	-598	
rat	-210	GTC CACG GAG GGA ACT CAG A G A G C A A A T G A C T C A C C C A C A G A C A C A G T T G G C A G A R C	-251	
human	-529	GGA G G A G C T G G G A G T T T A C G G G A G - G A A G G G C C A C G G A G A T G G G T C G T T C T C C T G G A G C	-481	
		* * * * *	* * * * *	* * * * *
		INSM1	NUDR	GC box
mouse	-597	C --- - C C G A G C C C T G C C A C C T T C A T G G A G A G C C G C A G G G A G T G G C G T A G G C A G G T G C G G T	-542	
rat	-250	C --- - C C C A C C C T T G C C A C C T T C G C G G A G A G C G T G G G A G T G G A G T A G G C T G G T G C G G T	-195	
human	-480	T A G A G C T G C G G G C T G G G G T C T C C A G G G T T C G G C C C G G G A G C C G A C C - - C T G G T C G G C C	-424	
		* * * * *	* * * * *	* * * * *
		Sp-1/Egr-1		
mouse	-541	A G G C G G G C C A T A C A T A G G G - - - T G G A G G G C T G G G A T C A G G - A C A G C G A C A T C C C C G G	-487	
rat	-194	G G G C G G G C C A T A C A A A G G G - - - T T G A G G G T T G G G A T C C G G G A C A G T A G C A T C C C C G G	-139	
human	-423	G T C G G G G C T C T G C T C G G G C C T C C T G A A C C T C C G C C T C C A G C A G G G G C G G G C C G G G	-364	
		* * * * *	* * * * *	* * * * *
		NUDR		
mouse	-486	G G T G G G C G T G C A C C - - T G G A G A G T T C T G C T T C C C A G G A G T T G G G G G G G G G T C C C A G A G	-430	
rat	-138	G G T G G G C G T G C A C A G G G T G G A G A T T C T G C T T C C - A G G A G T T G G G G - - - T C T C A G A G	-86	
human	-363	G C C G C G T C T C G G G G G A A G G C G A T C A G G T C G C C C C T C C G A T T C C C C G C C T T C C A G	-304	
		* * * * *	* * * * *	* * * * *
		Sp-1	Sp-1/Egr-1	
mouse	-429	G T G T G G C A G C A C C T G G G T G G G G G A C A T G C A C C C C G T G G A A G G C T G C T T C C A G G G A A T T	-370	
rat	-85	G C G T G G C A G C A C C T G G G T G G G G G A C A T G C A C C G G G T G G A A G G C T G T T C C A G G G A G T T	-26	
human	-303	G - A C A G C C T C A G C C C A G A G G G G C G G T C C G G G G C G G G T C G C A C C G C C C C T C T C G C T C	-245	
		* * * * *	* * * * *	* * * * *
		Sp-1		
mouse	-369	G G G G C C C G G G A C A G C - G G G C A G G A T C C G A G G G T T G G G G T C G T A G C T G G A G G A A C G A T	-311	
rat	-25	G G G G A C C G G G A C A G C - G G G C G G G A T C - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -	-1	
human	-243	C C A A T C C C G G G G C G G C G G G C G G G G T G G G C A G G G G G C T G A G G C C G C C C T T G C T C C G	-185	
		* * * * *		

		INSH1	
mouse	-310	CTGTTTC CCAAGAGTTGGGGTCCGGGACAGCGGACCGGAGCCGGGACGAGCCACCCGCT	-251
rat		-----	
human	-184	GGGGCCCCCGGAAA CGGCTCCGGGTGCCTGGTCCCTCCGCTGGCCCTGCCGCC--GT	-127
		Sp-1/Egr-1	Sp-1
mouse	-250	CTTCCAGCAGGGGGCGGGCGGCGGCGGCTTCTTCTGTTTCCGAGGGGGGGAAAGGGG	-191
rat		-----	
human	-126	CTTCCGGGGTCTCGGGCGGCGGCGGCGGCTTCTTCTGTTTCCGAGGGGGGGAAAGGGG	-67
		CREB	TATAAA
mouse	-190	GC GGGCTGGCTCACCCGCGTCCGTGGCCATCGGGGGCTGGCGGGACGCCCGGGTACC	-131
rat		-----	
human	-66	G -GGGCTGGCTCACCCGCGTCCGTGGCCATCGGGGGCTGGCGGGACGCCCGGGTACC	-10
		TATAAA	
mouse	-130	GCTCAGCTCCCGCGGAGGACCCCGCCCGGCCCACTCCCGCCCGCCCTCTCCGCG	-71
rat		-----	
human	-9	GAGAAACTTTAGC-----	+3
mouse	-70	TCCCGTGGCCGGCAATGACCGCCACCAGCCGGGTGGCGGGCGGCGGGAGGGGCCAG	-10
rat		-----	
human		-----	
		CREB	
mouse	-11	CGTGACGCAGC +1	
rat		-----	
human		-----	

C.

		-412/-411 GC/TT	Sp-1/Egr-1
mouse	-541	AGGCGGCCAT A ATAGGG---TGGAGGGCTGGGATCCAGG-ACAGCCAGCATCCCGG	-481
rat	-194	GGGCGGCCAT A AAAAGGG---TTGAGGGTTGGGATCCGGGGACAGTAAAGCATCCCGG	-124
human	-423	GTCGGGCTCT B TGGGCCCTCTGAAACCTCCGCTCTCTCAG CGAGGGGGGGGG CCGGG	-364

Anexa 7.4. Rezultatele analizei Clustal W ; regiunile de înaltă homologie sunt notate cu steluță; codonul de start este marcat cu roșu pentru toate cele trei specii; domeniul de legare ADN este marcat cu albastru și fermoarul de leucină este marcat cu violet; fiecare rest de leucină este marcat cu verde, codonul stop este marcat cu galben portocaliu

mouse	ACGGAGCGGAGCCCGCGGGCCCGCGTTC	p38	ATGCACCGCCTGCTGGCCTGGGACGCGCAT	136
rat	ACGGAGCGGAGCCCGCGGGCCCGCGTTC		ATGCACCGCCTGCTGGCCTGGGACGCGCAT	480
human	CCCCCTC---CCCG-GGGACCCGCGTTC		ATGCACCGCCTGGTGGCCTGGGACCCGCGAT	226
	* * *		* * *	
mouse	GCCTCCC-----GC	p35	GGGCTGGGARGTGGCCARCTTC TACT	192
rat	GCCTCCC-----GC		GGGCTGGGARGTGGCCARCTTC TACT	534
human	GCTCCCTCCCTGCCCGCGCGCCCTGCC		TTTAAATC CA TGGGARGTGGCCARCTTC TACT	286
	* * * * *		* * * * *	
mouse	ACGAGCCCGACTGCTGGCC-----		TACGGGGCCAGGGCGCCCGCGCCGCGCC-----	241
rat	ACGAGCCCGACTGCTGGCC-----		TACGGGGCCAGGGCGCCCGCGCCGCGCC-----	583
human	ACGAGGCGGACTGCTGGCTGGCTGGCTGG		TACGGGGCCAGGGCGCCCGCGCCCGCGCC	346
	* * * * *		* * * * *	
mouse	-----GC		GGCGCCCGCCCGCGCGCGCCCA---TTGGCGAGCACGAGC	282
rat	-----GC		GGCGCCCGCCCGCGCGCGCCCA---TCGGCGAGCACGAGC	624
human	CGGCCAGACCCGGGGCCCGCCCGCCCGCGCG		CGACTCGGCGAGCATCGGCGACACGAGC	406
	* * * * *		* * * * *	
mouse	GCGCCATCGACTTCAGCCCTTACCTG		GAGCCGCTCG-----CGCCCG	324
rat	GCGCCATCGACTTCAGCCCTTACCTG		GAGCCGCTCG-----CGCCCG	666
human	GCGCCATCGACTTCAGCCCTTACCTG		GAGCCGCTCGGGCGCGCCCGCAGGCCCGCGCCCG	466
	*****		*	

```

mouse      CC-----GCGGAC--TTCG-----CCGGCCCGCGCCCGCGC----- 354
rat        CCGC---CGCGGAC--TTCG-----CCGGCCCGCGCCCGCGC----- 699
human      CCACGGCCACGGACACTTCGAGGCGGCTCCGCCCGCGCCCGCGCCCGCGCTCCT 526
**          *****

mouse      -----ACCACGACTTCCCTCTCCGACCTCTTCGCCGACGACTACGGCCGCCAAGCCGA 405
rat        -----ACCACGACTTCCCTTCGACCTCTTCGCCGACGACTACGGCCGCCAAGCCGA 750
human      CCGGGCAGCACCACGACTTCCCTCTCCGACCTCTTCGCCGACGACTACGGGGGCCAAGACT 586
*****

mouse      GCAAGAAAGCCGGCCGACTACGGTTACGTGAGCCTCGGCCGCGCGGG--CGCCAAGGCCG 462
rat        GCAAGAAAGCCGTCGACTACGGTTACGTGAGCCTCGGCCGCGCGGG--CGCCAAGGCCG 807
human      GCAAGAAAGCCGGCCGAGTACGGCTACGTGAGCCTCGGGGCGCTTGGGGCCGCCAAGGGCG 646
*****

mouse      CGCCGC---CGGCTGCTTC-----CCGGCCCGCGCCCTCCCG 495
rat        CACCGC---CGGCTGCTTC-----CCGGCCCGCGCCCTCCCG 840
human      CGCTGCACCCCGGCTGCTTCGCGCCCTGACCCACCGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGCG 706
* * * * *

mouse      CCGCGCTCAAGGCGGGAGCCGGGCTTCGAAACCCGCGGACTGCAGCGCGCGGA----CG 549
rat        CCGCACTCRAAGCCGAGCCGGGCTTCGAAACCCGCGGACTGCAGCGCGCGGA----CG 894
human      CCGAGCTCAAGGCGGGAGCCGGGCTTCGAGCCCGCGGACTGCAGCGCGAAGGAGGGGCCG 766
**          *****

mouse      ACGCGCC-----CGC---CATGCGCGCCGGTTTCCCGTTCCGCTGCGCGGCTTACC 597
rat        ACGCGCC-----CGC---CATGCGCGCCGGTTCCCGTTCCGCTGCGCGGCTTACC 942
human      GGGCGCCGGGCGGCGCGCGAGGCATGCGCGCGGGCTTCCCGTACGCGCTGCGCGCTTACC 826
*****

mouse      TGGGCTACCAGGCGAGCGCGAGCGGCGAGCAGCGGCGAGCCTGTCGACGTCGTCTGCTCCA 657
rat        TGGGCTACCAGGCGAGCGCGAGCGGCGAGCAGCGGCGAGCCTGTCGACGTCGTCTGCTCCA 1002
human      TCGGCTACCAGGCGGTCCGAGCGGCGAGCGGCGAGCCTGTCGACGTCGTCTGCTCCA 886
* * * * *

mouse      GCCCGCCCGGCGACCGCGAGCCCGCGCGACGCCAAGGCCCGCGCCCGCGCTGCTTCGCGG 717
rat        GCCCGCCCGGCGACCGCGAGCCCGCGCGACGCCAAGGCCCGCGCCCGCGCTGCTTCGCGG 1062
human      GCCCGCCCGGCGACCGCGAGCCCGGCTGACGCGCAAGGCCCGCCCGACCGCTGCTAGCGGG 946
*****

mouse      GGGCGCCCGGCGCGCC-----GCCAAGGCCAAGGCCAAGAAAGCGGTGGACAAAGCTGA 771
rat        GGGCGCCCGGCGCGCC-----GCCAAGGCCAAGGCCAAGAAAGCGGTGGACAAAGCTGA 1116
human      GGGCGCGCCCGCGCCCTCGCAGGTCRAAGGCAAGGCCAAGAAAGCGGTGGACAAAGCA 1006
**          *****

mouse      GCGACGAGTACAAAGTCCGGCGCGAGCGCAACAAATCGCGGTGCGCAAGAGCCCGGACA 831
rat        GCGACGAGTACAAAGTCCGGCGCGAGCGCAACAAATCGCGGTGCGCAAGAGCCCGGACA 1176
human      GCGACGAGTACAAAGTCCGGCGCGAGCGCAACAAATCGCGGTGCGCAAGAGCCCGGACA 1066
*****

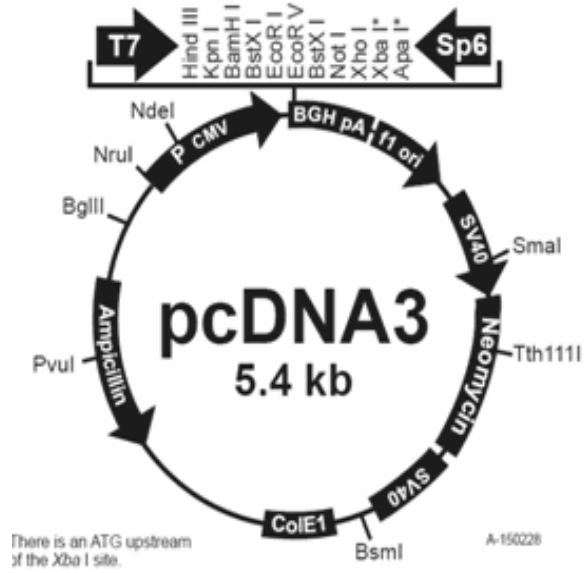
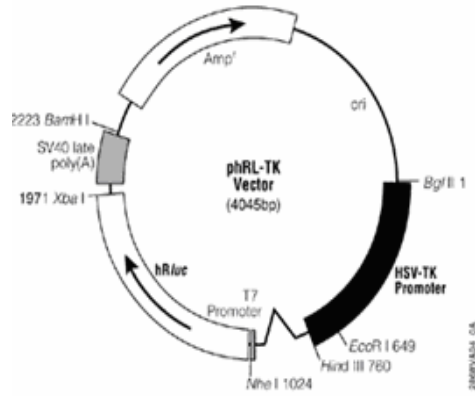
mouse      AGGCCAAGATGCGCAACCCTGGAGACGCGACCAAGGTGCTGGAAGCTGACGGCGGAGAACG 891
rat        AGGCCAAGATGCGCAACCCTGGAGACGCGACCAAGGTGCTGGAAGCTGACGGCGGAGAACG 1236
human      AGGCCAAGATGCGCAACCCTGGAGACGCGACCAAGGTGCTGGAAGCTGACGGCGGAGAACG 1126
*****

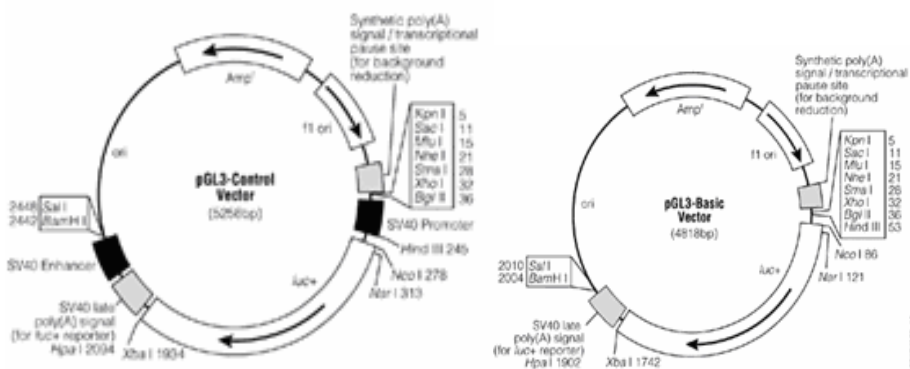
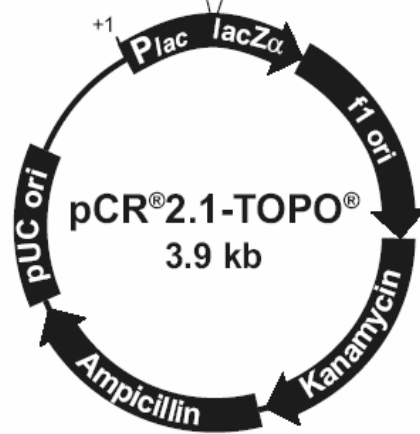
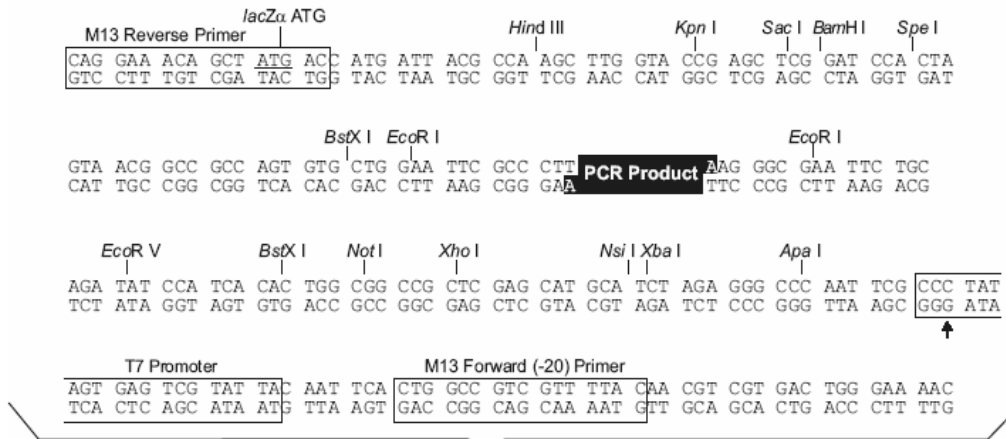
mouse      AGCGGCTGCAGAGAGAGGTGGAGCAGCTGTCGGGAGGCTCAGCACCCTGCGGAACTTGT 951
rat        AGCGGCTGCAGAGAGAGGTGGAGCAGCTGTCGGGAGGCTCAGCACCCTGCGGAACTTGT 1296
human      AGCGGCTGCAGAGAGAGGTGGAGCAGCTGTCGGGAGGCTCAGCACCCTGCGGAACTTGT 1186
*****

mouse      TCAAGCAGCTGCCCGAGCCGCTGCTGGCTCGGCCGGCCACTGCTAGCGCGGGC---GGC 1007
rat        TCAAGCAGCTGCCCGAGCCGCTGCTGGCTCGGCCGGTCACTGCTAGCCCGGC---GGG 1352
human      TCAAGCAGCTGCCCGAGCCGCTGCTGGCTCGGCCGGCCACTGCTAGCGCGGGCCCGCGG 1246
*****

```


Anexa 8**Anexa 8.1. Soluție tampon 1xPBS****8g NaCl****1,44 g Na₂HPO₄****0,24 g KH₂PO₄****Se aduce la pH=7,4****Se ajustează volumul la 1 L****Anexa 8.4. Soluții folosite la metoda EMSA****Gel de migrare 8%****64 ml H₂O****5 ml 5 x TBE****19.4 ml Acrilamidă 40%****10.4 ml Bis 2%****500 μl APS 10% (w/v)****50 μl TEMED****Gel de concentrare 5%****17.1 ml H₂O****7.5 ml 0.5 x TBE****5.1 ml Acrilamidă:bis 30%****150 μl APS 10% (w/v)****30 μl TEMED****Gel de migrare 5%****71.1 ml H₂O****5 ml 5 x TBE****12.5 ml Acrilamidă 40%****10.4 ml Bisacrilamidă 2%****500 μl APS 10% (w/v)****50 μl TEMED****Anexa 8.3. Compoziția soluțiilor
tampon de legare EMSA****Tampon de legare 2 x****400 μl glicerol 100%****20 μl Tris 1 M****100 μl KCl 1 M****2 μl DTT 0.5 M****487 μL H₂O****Soluții tampon pentru
obținerea lizatului celular****Tampon A****Hepes 10 mM (pH 7.9 at 4°C)****MgCl₂·6H₂O 1.5 mM****KCl 10 mM****DTT 0.5 mM și PMSF 0.2 mM adăugat
înainte de folosire****Tampon C****Hepes 15 mM (pH 7.9 at 4°C)****MgCl₂·6H₂O 1.5 mM,****NaCl 0.42 M****EDTA 0.2 M****Glicerol 25%****DTT 0.5 mM și PMSF 0.2 mM adăugat
înainte de folosire****Anexa 8.2. Vectori**





Anexa 8.1. Soluție tampon 1xPBS

8g NaCl

1,44 g Na₂HPO₄

0,24 g KH₂PO₄

Se aduce la pH=7,4

Se ajustează volumul la 1 L

Anexa 8.4. Soluții folosite la metoda EMSA

Gel de migrare 8%

64 ml H₂O

5 ml 5 x TBE

19.4 ml Acrylamide 40%

10.4 ml Bis 2%

500 μl APS 10% (w/v)

50 μl TEMED

Gel de concentrare 5%

17.1 ml H₂O

7.5 ml 0.5 x TBE

5.1 ml Acrylamide:bis 30%

150 μl APS 10% (w/v)

30 μl TEMED

Gel de migrare 5%

71.1 ml H₂O

5 ml 5 x TBE

12.5 ml Acrilamidă 40%

10.4 ml Bisacrilamidă 2%

500 μl APS 10% (w/v)

50 μl TEMED

Anexa 8.3. Compoziția soluțiilor tampon de legare EMSA

Tampon de legare 2 x

400 μl glicerol 100%

20 μl Tris 1 M

100 μl KCl 1 M

2 μl DTT 0.5 M

487 μL H₂O

**Soluții tampon pentru
obținerea lizatului celular**

Tampon A

Hepes 10 mM (pH 7.9 at 4°C)

MgCl₂·6H₂O 1.5 mM

KCl 10 mM

DTT 0.5 mM și PMSF 0.2 mM adăugat

înainte de folosire

Tampon C

Hepes 15 mM (pH 7.9 at 4°C)

MgCl₂·6H₂O 1.5 mM,

NaCl 0.42 M

EDTA 0.2 M

Glicerol 25%

DTT 0.5 mM și PMSF 0.2 mM adăugat

înainte de folosire

Anexa 9. ANALIZA GENEI C/EBPa

9.1. Factorii de transcripție posibil funcționali, situsurile corespunzătoare de legare de ADN predictive în secvența promotorului C/EBPa și secvențele de recunoaștere a acestor factori (litere roșii baze conservate, litere mari secvența centrală, litere albastre secvența centrală baze neconservate, litere negre mici baze neconservate din afara secvenței de recunoaștere

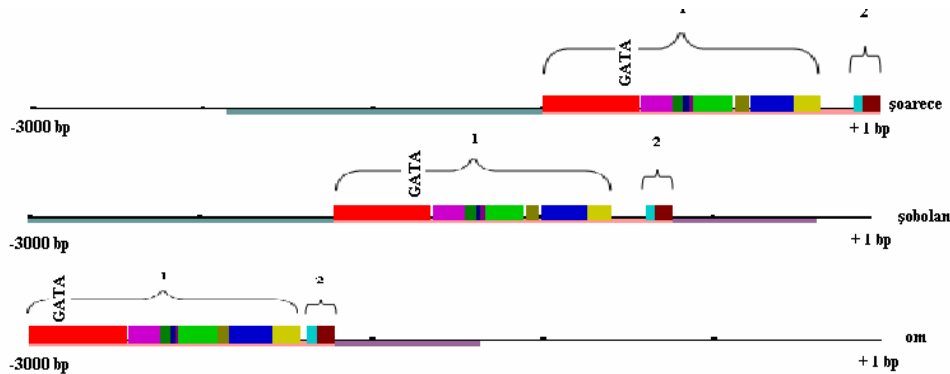
Factorul de transcripție	Secvența de recunoaștere (5`-3`)	Situsul de legare predictiv în C/EBPa	Poziția în promotorul C/EBPa
GC box	GGGNG Bucher, 1990	ggaGGGTGggg acgGGGAGggg tagCGCCctgc catGGGCGgcg cggGGGCGgag	-2949 to -2945 -880 to -876 -643 to -639 -628 to -625 -239 to -235
Sp-1	GGGCGG Nardelli et al., 1991	cctGGGCGGgtc gagGGGCGGcgc gggAGGCGGggg gggGGGCGgagg tagGGGTGGggg	-1440 to -1435 -1315 to -1310 -980 to -974 -378 to -373 -371 to -366
SREBP-1/2	ATCACCCAC Magana et al.1997 Sato et al. 1996	ccCTCACCCACtct	-2941 to -2932
STAT	TTNYNNNA Horvath et al. 1995	gtgTTCTGTTAAcaa aatTTGCTGGAAgga ggcTTTTAGGAAgtc	-2904 to -2893 -2819 to -2811 -2498 to -2490
PPAR/RXR	AGGNNAWAGKTSW Palmer et. Al.1995	cccAGCTCAAAGGTCTg ggcAGGGAACACAGTTCc	-2786 to -2774 -2431 to -2420
E2F	SGCSSAAA Nevins et al.1992	cctGCCCAAAttc tggGGGCGACAatg cggGCTGGAAAact ctgCGCGGAATcac	-2439 to -2432 -2040 to -2033 -727 to -720 -588 to -581
CCAAT box	CCAAT Bucher, 1990	gacCCATTca gctCCAAGct	-1735 to -1731 -231 to -226
HNF-4	CAWAR Courtois et al., 1988	gtgCAAAGtgg gctCAAAGgtc ggcCAAAGcca ggaCACAGttc gccCACAGgtc ggaCAAAGtct gtcCAGAGctc ggcCTAAGgcc ggaCAGAGgcc	-2868 to -2864 -2782 to -2778 -2664 to -2659 -2426 to -2422 -2093 to -2089 -2005 to -2001 -1613 to -1609 -1414 to -1410 -73 to -69
CRE	GNTGACGY Paca-Uccaralertkun et al., 1994	ccaGCTGACGGtcc	-1256 to -1249
USF	NNCACGTGNN Bendall and Molloy , 1994	caGCCACGTGCGtcc cgACCACGTGGGcgc	-1207 to -1198 -271 to -262
NF-κB	GGGGAMTTCC Grilli et al., 1992	tcGGGGCTCTCCAgc ctGGGGGGCCCCGcg tcGGGATACTCTTgg	-1486 to -1476 -842 to -832 -348 to -338
Egr-1	GCGGGGCG	ctGCGGAGGTtta	-2409 to -2401

	Swirnoff and Milbrandt, 1995	ctGGGGGGGGcgg	-92 to -85
TATA box	TATAAA Bucher 1990	gggTATAAAagc	-32 to -26
GATA box	GATAR Whyatt <i>et al.</i> , 1993	ggaGATAAagg aagGATAAagg acgGATAAgtt ctgGATACggg	-3028 to -3024 -2825 to -2821 -2219 to -2215 -318 to -314
p53	GGACATGCC Funk <i>et al.</i> , 1992	ggaGAGCCTGCCAgtg acaGGBCAGGCCggg cctGTGCGTGCTCgga ccgGGACAGGCCTggt	-2884 to -2874 -2137 to -2128 -1053 to -1041 -445 to -436

Factorul de transcripție	Secvența de recunoaștere (5`-3`)	Situsul de legare predictiv în C/EBPa	Poziția în promotorul C/EBPa
AP-2	GCCNNNGGC GCCNNNGGC Williams and Tjian, 1991a and b	gGCCCTGGGGCcc aGCCCGGCGGCct cCCCCACCGGCcc cgCCCCGGCCcg	-1132 to -1123 -1032 to -1024 -502 to -493 -245 to -237
AP-4	CAGCTG Dang <i>et al.</i> , 1992 Mermod <i>et al.</i> , 1998	cgtCAGCTGggc	-1258 to -1253
c-Myb	GTRR Howe KM <i>et al.</i> 1990	caGTTGggc ccGTTGgcg	-1592 to -1589 -1002 to -999
TCF/LEF-1	TCAAAG Shtutman <i>et al.</i> , 1999	gtaACAAAGaac ggaACAAAGaaa cttTCAAAGcca	-2906 to -2901 -1854 to -1846 -427 to -422
Oct-1	ATGCWAAT Lundback <i>et al.</i> , 2000 Van Leuwen <i>et al.</i> , 1997	gtaATGGGAATAag	-1996 to -1989

R = A sau G, K = G sau T, Y = C sau T, S = C sau G, N = A, C, G sau T, M = A sau C și W = A sau T

Anexa 9.2. Analiza comparativă a fragmentului cuprins între -3000 și -2500 bp: A. Rezultatul Foot Printer la fragmentul cuprins între -2500 bp și -2000 bp; B. Rezultatul analizei Clustal W la cele 500 bp analizate în care este marcat situsul polimorfic -2269 C/T; stelutele indică regiuni de omologie ridicată



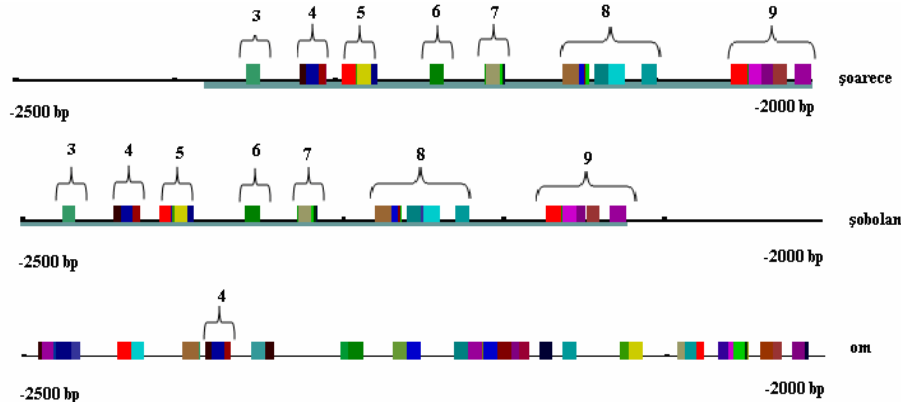
A.

		GATA box	
mouse	-- GC CG CTC CTG GAA GAG GAA GTG GGG GTT GAA ACAA GT CCT TTT GGT GTG G C C TAG A CTG	-29 42	
rat	-----		
human	C C T T G G C C A T C A G C C C A G C C C T G T C T G C G G A T C C A G C C T T A T C T A G G C C C C A C C C T C C C T	-29 40	
mouse	C T G G T G A A C C T G T A A T C C T C C T G C C T C A G C C C T A G A C T G T T G A A G A T A C A G G T A T G T A C	-28 8 2	
rat	-----T A C	-29 9 7	
human	C A C C C C A C T C T C C A G C C G G C C A A C C A T T C T G T T C T T G T T A C C A G A A C A C A T G C A C T G G C	-28 8 0	*
mouse	C A C C A T A C C - T T T T G G G G A C C T C A T G T T T C T C A T C T A G C C A A A A G C T C C T C C A T T C T	-28 2 3	
rat	C A C C A C A C C - C C T T T G T G G A C C C C A T G T T T C T C A C C T A G C C A A A A G C T C C T C C C T T T C T	-29 3 8	
human	A G G C T C T C C A C C T T T G C A C T T A C C A T T C C C T C C T C T A G - - A A G A G C C T T C C C T T A T	-28 2 2	
	* * * * *		
mouse	A G C T G G A G T A G C C T T A A A C C C A A A T G G G A C A A A A T T A A A A A A A A A T T T T T T A A A C C C T	-27 6 3	
rat	A C T G G A G T A G C C T C T C A G A - A A C C C G G A C A G G A A A A A A A A A A - - - - - A A A A C C T	-28 8 5	
human	C C T T C C A G C A A A T T C C T G C T C A A C T T - - T C A A G G C C C A G C T C A A A G G T - - - - - C T G C T	-27 7 1	**
	* * * * *		
mouse	C C C A G A C C A G C C C A C A G A G G A T A A A T G C T C C G T G A G A T A A A G C A G G T T T G T T A C C T G G G	-27 0 3	
rat	C C C A G A C C A G C C C A C A G A G G A T A A A T G C T C T G A G A G A T A A A G C C G G T T T G C T T A C C T G G G	-28 2 5	
human	C C T G C A T G A A G C C C T - - - G T C T C A C C G C G G T T C A G T C C A A G C A G G C T - G C C A T C A T A G A	-27 1 5	**
	* * * * *		
mouse	A T G G C C T T G G C C A T C A A C C C A A C C C T G T C T G T A G A T C C A G C C T T A T C T A G G C C C C T C C C T	-26 4 3	
rat	A T G G C C T T G G C C A T C A A C C C A A C C C T G T C T G T G G A T C C A G C C T T A T C T A G G C C C C T C C C T	-27 6 5	
human	C C T A C C A T A A C A T T T A T T T C - T C A T G G T T C T G G A G C C T G G A T G C C C A A G G C C A A A G C C A	-26 5 6	**
	* * * * *		
mouse	A G C T C T C C C C A C A C T C C A A C - C T G T C A A A C A C C C T T G T C C T T T G T T A C C A G A A C A G G C C A	-25 8 4	
rat	A A C T C T C C C C A C A C T C C A A C - C T G T C A A A C A C C C T T G T C C T T T G T T A C C A G A A C A G G C C A	-27 0 6	
human	A G C T G C C A G C A C C C T C A G G T T C T G G T G A G G G G C C T C T T C C C T G C T T G C A G A C G G C C A C C T	-25 9 6	**
	* * * * *		
mouse	T G C T C C C A G C A G C C T C T C C A C C T T T G C A C C T G T G T T C C C T C C T C C A A A G G G G T G G G G G T	-25 2 4	
rat	T G C T C C C G G C A G C C T C T C C A C C T T T G C A C C T G C T G T T C C C T C C T C C A A A G G G G T G G G G G T	-26 4 6	
human	C C T T T C T G T G C A T G C C C A T G A C A T T G T - T C T T C T G A T A A G G C C A C C A A T C C T A T C A A A T T	-25 3 7	**
	* * * * *		

C

		-2970G/A	
		GATA box	
mouse	3000	-- GC CG CTC CTG GAA GAG GAA GTG GGG GTT GAA ACAA GT CCT TTT GGT GTG G C C TAG A CTG	-29 42
rat		-----	
human	3000	C C T T G G C C A T C A G C C C A G C C C T G T C T G C G A T T C A G C C T T A T C T A G G C C C C A C C C T C C C T	-29 40

Anexa 9.3. Rezultatul analizei comparative a secvențelor ADN corespunzătoare celor trei specii analizate a fragmentului cuprins între -2500 bp și -2000 bp. A. Rezultatul Foot Printer; B. Rezultatul analizei Clustal W la cele 500 bp analizate în care este marcat situsul polimorfic -2269 C/T; steluțele indică regiuni de omologie ridicată

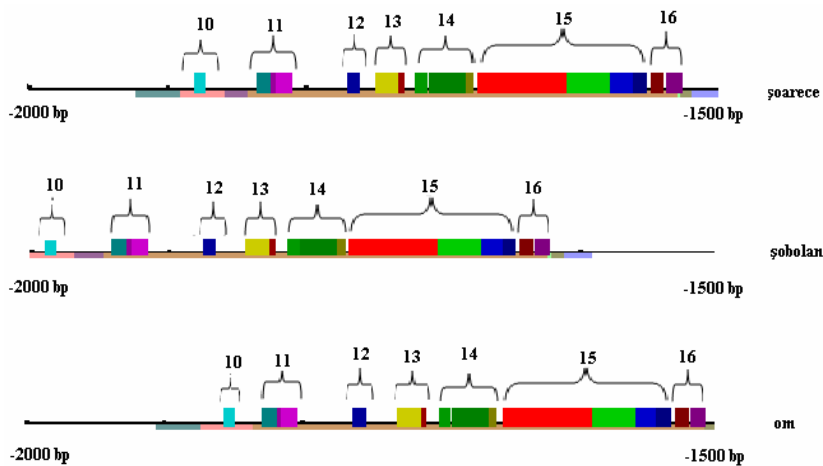


B

-2269 C/T

mouse	- 2274	TGAATACAGCCAT	AATGACCGGTTCCACC	T	CTAACCCATGAGACC	ATTCATGGGTGATG	- 2215
rat	- 2466	TGAATACAGCCTT	AATGAC-GTTCCACC	T	CTAATTCAGAGACC	ATTCATGGGGATG	- 2349
human	- 2296	CATTTGATGAA	TGAAATGA--AGTCC	ATC	CC	TACTCCTTCTGTTCCCTCCCTCCCA	- 2239
		* * *	*****		* * *	* * *	

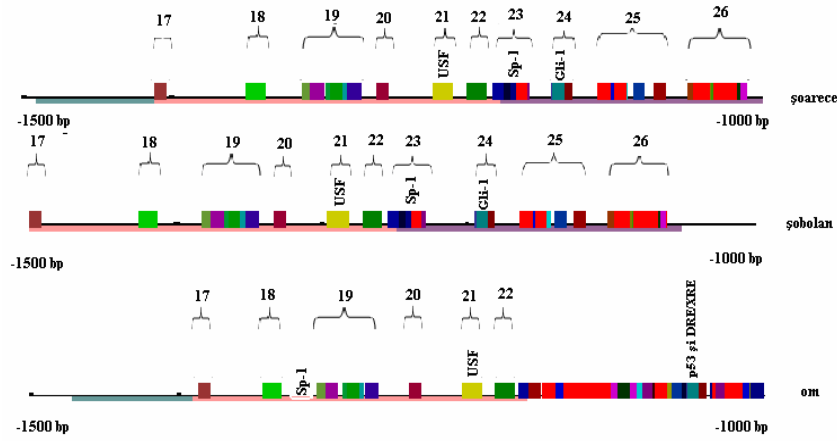
Anexa 9.4. Rezultatul analizei comparative a secvențelor ADN corespunzătoare celor trei specii analizate la fragmentul cuprins între - 2000 bp și -1500 bp: A. Rezultatul Foot Printer - se observă conservarea clusterelor 10-16 la toate cele trei specii și un grad de omologie mare între șoarece, șobolan și om la nivelul secvenței ADN de 500 de bp analizate B. Rezultatul analizei Clustal W la cele 500 bp analizate în care este marcat cu violet situsul de legare HNF-4 conservat la toate cele trei specii; C. Marcarea situsului polimorfic -1801 C/T care nu modifică nici un motiv structural conservat la cele trei specii



B.		
mouse	-2009	ACTTTCCTTG--TTGATG&CTGTAGTG--TGTTCCAGCTTCCTTCA&CCCAAG----- -1959
rat	-2131	ACCCTTTTTCGTTTGGCG&CT&T&TTG--TGCTCTGGCTTCCTCC&A&CCTA&G----- -2079
human	-2026	CCCCCT&TTG&C&A&A>CT&ATTCCT&AT&TAC&G&GGTTCCTTC&AGTC&TA&CG&GGC&G -1966
		* ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
mouse	-1958	--TCCTCTGCTTG&C&A&A&C&G&G&ATG-----TC&AGCTTCCTG&CT&A&T>&TC -1911
rat	-2078	--TCCTCTGCTTG&C&A&A&C&G&G&C&A&C&T&A&A&G&C&C&AT&C&A&G&CTT&C&C&A&T&A&T>&TC -2021
human	-1965	AGTTCCTCGATCTCTGGC&AG&C&A&C&A&G&C&GCTGTG--CA&A&A&A&G&G&C&C&A&G&C&AT&C&G&CTT -1907
		**** * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
mouse	-1910	TTT&AG&CT&AG&A&A&CTTTC&TT&C&AG&T>TCCCTTTCCCTC&G&G&G&A&C-----CA&A&CA -1855
rat	-2020	TTT&AG&CT&AG&A&A&CTTTC&TT&C&AG&T>TCCCTTTCCCTC&G&G&G&A&A&A&CA&A&C&A&CA -1960
human	-1906	CCTC--CC&C&A&C&C&C&C&G&G&G&A&C&G&T&G&AT&G&T&A&G&T&G&G&G&TTCCTT-T>TCC -1849
		** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
mouse	-1854	AG&C&A&A&C&A&A&T&A&A&C&A&T&A&T&T&T&A&C&T&A&G&C&A&G&A&A&G&A&C-T&A&A&G&A&TTCCTC&C&G&G&CTT -1795
rat	-1959	AA&C&A&A&C&A&A&C&A&G&C&A&T&A&T&T&T&A&G&T&C&A&G&T&A&G&A&A&G&A&C-T&A&A&G&A&TTCCTC&C&G&G&CTT -1900
human	-1842	T&A&G&T&A&G&A&A&A&G&C&A&T&T&A&G&T&T&A&G&C&A&C&G&C&A&G&A&A&A&A&A&C&G&C&A&A&T&C&G&C&T&T&G&G&T&G&C -1782
		* ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
mouse	-1794	TT&A&G&G&ATTTTCC&C&C&A&G&G&G&A&C&A&C&T&C&A&G&G&TA-----G&A&T&C&G&G&T&C&A&T -1746
rat	-1899	TT&A&G&G&ATTTCTCTCC&A&G&G&G&A&C&A&C&T&C&A&G&G&T&C&A&T&G&G&T&G&T&A&A&T&G&G&G&T&C&G&G&T&C&A&T -1839
human	-1781	TTTTT&A&TTTTCC&G&T&C&C&T&C&C&C&C&A&G&G&T&G&A&A&T&G&C&T&A&T&G&A&A&T&G&G&G&T&C&G&G&T&C&A&T -1721
		** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
mouse	-1745	CT&G&C&C&A&G&A&G&G&A&T&C&T&C&T&G-C&T&C&A&C&A&G&G&T&G&T&T&A&T&T&T&A&G&T&A&T&C&T&G&T&T -1686
rat	-1828	CT&G&C&C&A&G&A&G&G&A&T&C&C&C&C&G-C&T&C&A&C&A&G&G&T&G&T&T&A&T&T&A&G&T&A&T&C&T&G&T&T -1779
human	-1720	TT&G&G&T&C&A&G&C&A&G&C&A&G&C&T&C&C&G&G&C&A&C&A&T&C&G&G&A&T&A&T&T&T&A&C&G&T&A&T&C&T&G&T&T -1660
		**** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
HMF -4		
mouse	-1685	T&A&T&C&A&C&T&C&T-GTT&C&A&A&A&G&C&A&T&C&A&A&C&T&A&A&A&A&A&T&A&T&C&T&T&T&T&A&T&G&C&G&C&C&C&A -1626
rat	-1778	T&A&T&C&G&C&T&C&T-GTT&C&A&A&A&G&C&A&T&C&A&A&C&T&A&A&A&A&A&A&T&A&T&T&G&T&T&A&T&G&C&G&C&C&G&A&C&C&A -1719
human	-1659	T&A&C&T&C&C&T&C&G&T&C&A&A&A&G&C&G&T&C&A&A&G&T&A&A&A&A&A&A&A&A&A&T&C&T&G&T&T&A&T&G&A&G&C&C&T&G&A&C&C&A -1591
		** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
mouse	-1625	AA&A&T&G&A&G&C&A&G&T&G&A&G&C&A&T&A&A&T&C&A&C&T&G&A&G&A&A&T&G&T&G&A&A&T&G&A&A&T&T&G&A&T&T&A&A&G&T -1565
rat	-1718	AA&A&T&G&A&G&C&A&G&T&G&G&G&C&A&T&A&A&T&C&A&C&T&G&A&G&A&A&T&G&T&G&A&A&T&G&A&A&T&T&G&A&T&T&A&A&G&T -1658
human	-1590	AA&A&C&A&A&G&C&A&G&T&G&G&G&C&A&T&A&A&T&C&A&C&T&G&G&A&C&T&A&T&G&T&G&A&A&T&G&A&A&C&T&T&G&A&T&T&A&A&G&C -1530
		** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
mouse	-1564	AC&AG&AT&G&C&G&T&C&T&C&A&G&C&G&A&G&T&G&G&T&C&T&T--ACT&G&T&A&--CC&G&C&A&G&T&G&A&G&C&A&C&A -1507
rat	-1657	AC&AG&AT&G&C&G&T&C&T&C&C&A&G&C&G&A&G&T&G&G&T&C&T&T&T&A&T&A&C&T&G&T&A&A&C&C&A&G&T&G&A&G&C&A&C&A -1597
human	-1529	GC&AG&T&G&C&G&T&C&C&C&A&G&A&A&C&T&G&C&T&C&T&T--ACT&G&C&A&--TC&G&T&C&G&G&A&G&C&T&C&G -1466
		** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
C.		
-1801C/T		
mouse	-1854	AG&C&A&A&C&A&A&T&A&A&C&A&T&A&T&T&T&A&C&T&A&G&C&A&G&A&A&G&A&C-T&A&A&G&A&TTCCTC&C&G&G&CTT -1795
rat	-1959	AA&C&A&A&C&A&A&C&A&G&C&A&T&A&T&T&T&A&G&T&C&A&G&T&A&G&A&A&G&A&C-T&A&A&G&A&TTCCTC&C&G&G&CTT -1900
human	-1848	T&A&G&T&A&G&A&A&A&G&C&A&T&T&A&G&T&T&T&A&G&C&A&C&G&C&A&G&A&A&A&A&A&G&C&A&A&A&T&C&G&C&T&T&G&G&T&G&C -1782
		* ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Anexa 9.5. Rezultatul analizei comparative a secvențelor ADN corespunzătoare celor trei specii analizate: A. Rezultatul Foot Printer la fragmentul cuprins între – 1500 bp și –1000 bp. Se observă conservarea clusterelor 17-22 la toate cele trei specii și un grad de omologie mare între șoarece și șobolan precum și o slabă omologie între om și rozătoare. B. Rezultatul analizei Clustal W în care sunt marcate situsurile de legare Gli-1 și situsul bipartit p53/ARNT prezent în secvența umană; C. Marcarea situsului polimorfic -1050C/G la care prezența alelei rare G duce la formarea unui situs pentru Gli-1 înalt conservat și la șoarece și șobolan.

A.



B.

Species	Coordinate	Sequence	Coordinate
mouse	-1564	ACAGGATGGTCTTCCAGAGCAAGTGGTCTTTT-ACAGTAA-CCGACGGGAAATCA	-1507
rat	-1537	ACAGGATGGTCTTCCAGAGCAAGTGGTCTTTTATATCTGTAATCCAGAGGAAATCA	-1537
human	-1543	GCAGTGGTCTTCCAGAGTGAAGTCCTCTTTT-ACAGTCA-TCGTCGGGAAATCTCG	-1486
		* * * * *	* * * * *
mouse	-1506	GCAAGCTTCTCAGAGTCTTGAAGTGGTCTTTTGGAGCGTTTGGGAGTCTCTGGGAGTCTGAAAG	-1448
rat	-1536	GCAAGCTTCTCAGAGTCTTGAAGTGGTCTTTTGGAGCGTTTGGGAGTCTCTGGGAGTCTGAAAG	-1538
human	-1485	G-GGCTCTCAGAGTCTTGAAGTGGTCTTTGGAGCGTTTGGGAGTCTCTGGGAGTCTGAAAG	-1427
		* * * * *	* * * * *
mouse	-1447	GCTTTTCCTGGGCTAAGAGTGGTCTTGGAGTGGTCTTGGT-ACCT- - - - -GC	-1401
rat	-1537	GCTTTTCCTGGGCTAAGAGTGGTCTTGGAGTGGTCTTGGT-ACCT- - - - -GC	-1489
human	-1426	GCTTTTCCTGGGCTAAGAGTGGTCTTGGAGTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT	-1367
		* * * * *	* * * * *
mouse	-1400	G-ACC-CTAGAG-CGACGAGCTCAG- - - - -GGAGCAG-CGACAGTGGAGTTG	-1355
rat	-1488	GACCC-CTAGAGTCTGAGAGAGTGGTCTTGGAGTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT	-1421
human	-1386	GCTCTTTCAGGCTGAGAGTGGTCTTGGAGTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT	-1307
		* * * * *	* * * * *
mouse	-1354	AAGAGAGTAAAGTCTCAGAGTGGTCTTGGAGTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT	-1300
rat	-1430	AAGAGAGTAAAGTCTCAGAGTGGTCTTGGAGTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT	-1371
human	-1306	GGCAGAGTAAAGTCTCAGAGTGGTCTTGGAGTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT	-1250
		* * * * *	* * * * *
mouse	-1239	AAGAGTGGTCTCAGAGTGGTCTTGGAGTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT	-1246
rat	-1270	AAGAGTGGTCTCAGAGTGGTCTTGGAGTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT	-1218
human	-1249	GTCCTGAGAGTCTCAGAGTGGTCTTGGAGTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT	-1190
		* * * * *	* * * * *
mouse	-1245	CAGGTTGG-AGGATGAAAGTGGTCTTGGAGTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT	-1193
rat	-1217	CAGGTTGG-AGGATGAAAGTGGTCTTGGAGTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT	-1264
human	-1189	TCGTTGGAGTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT	-1130
		* * * * *	* * * * *
mouse	-1142	CTTACCTCAGAGTCTTGGAGTGGTCTTGGAGTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT	-1146
rat	-1283	CTTACCTCAGAGTCTTGGAGTGGTCTTGGAGTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT	-1210
human	-1129	CAAGAGTCTTGGTCTTGGAGTGGTCTTGGAGTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT	-1070
		* * * * *	* * * * *
mouse	-1145	-----CAGAGGTTGGTCTTGGAGTGGTCTTGGAGTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT	-1101
rat	-1209	GGAGAGTCTTGGTCTTGGAGTGGTCTTGGAGTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT	-1152
human	-1069	GGGAGAGTCTTCTCTTGGTCTTGGTCTTGGAGTGGTCTTGGAGTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT	-1013
		* * * * *	* * * * *
mouse	-1100	AGCTACCCAGAGTTAGTCTCCTTCCTGAGTGA-AGTAGGGGAAAGGAAATCTGCTTCTTCAAG	-1042
rat	-1151	AGCTACCCAGAGTTAGTCTCCTTCCTGAGTGA-AGTAGGGGAAAGGAAATCTGCTTCTTCAAG	-1093
human	-1012	CTCTCCCTCTGCTCCTCTCTGAGTGAAGTCTGAGTGAAGTCTGAGTGAAGTCTGAGTGAAGTCTGAGTGAAGTCTGAGTGAAGTCTGAGTGAAGT	-953
		* * * * *	* * * * *
mouse	-1041	CTCT--GGTATGGGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	-995
rat	-1092	CTCT--GGTATGGGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	-1025
human	-992	CTCTGGGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	-935
		* * * * *	* * * * *

C.

Species	Coordinate	Sequence	Coordinate
mouse	-1145	-----CAGAGGTTGGTCTTGGAGTGGTCTTGGAGTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT	-1101
rat	-1209	GGAGAGTCTTGGTCTTGGAGTGGTCTTGGAGTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT	-1152
human	-1069	GGGAGAGTCTTCTCTTGGTCTTGGTCTTGGAGTGGTCTTGGAGTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGTCTTGGT	-1013
		* * * * *	* * * * *

Anexa 9.6. Rezultatele analizei Clustal W a ARNm a celor 3 gene de la cele trei specii: regiunile de înaltă homologie sunt notate cu steluță; codonul de start este marcat cu roșu pentru toate cele trei specii; domeniul de legare ADN este marcat cu albastru și fermoarul de leucină este marcat cu violet; fiecare rest de leucină este marcat cu verde, codonul stop este marcat cu galben portocaliu

		p42 ^{C/EBPα}		p38 ^{C/EBPα}																									
mouse	TAAC	TC	CCCC	RTG	GATC	GGC	CGACTTC	TAC	GAGG	TC	GA	GCC	GCG	CCCC	GATG	GAG	CAG	176											
rat	TAAC	TC	CCCC	RTG	GATC	GGC	CGACTTC	TAC	GAGG	TC	GA	GCC	GCG	CCCC	GATG	GAG	CAG	180											
human	-----			RTG	GATC	GGC	CGACTTC	TAC	GAGG	TC	GA	GCC	GCG	CCCC	GATG	GAG	CAG	50											

mouse	TCAC	CTC	CA	GAG	CCCC	CC	CG	AC	GC	CC	CA	G	CC	CG	CC	CTT	GG	C	T	T	CCC	GGG	G	CG	C	236			
rat	CCAC	CTC	CA	GAG	CCCC	CC	CG	AC	GC	CC	CA	G	CC	CG	CC	CTT	GG	C	T	T	CCC	GGG	G	CG	C	240			
human	CCAC	CTG	CA	GAG	CCCC	CC	CG	AC	GC	CC	CA	G	CC	CG	CC	CTT	GG	C	T	T	CCC	GGG	G	CG	C	110			

mouse	GGG	CCC	GG	C	CC	CG	CC	CA	C	CC	CA	C	C	CC	CTG	CC	G	CC	C	C	CG	GA	CC	G	C	T	C	296	
rat	GGG	CCC	GG	C	CC	CG	CC	CA	C	CC	CA	C	C	CC	CTG	CC	G	CC	C	C	CG	GA	CC	G	C	T	C	300	
human	GGG	CCC	GG	C	CC	CG	CC	CA	C	CC	CA	C	C	CC	CTG	CC	G	CC	C	C	CG	GA	CC	G	C	T	C	170	

mouse	GCAC	GAG	AG	CTC	TAT	AG	AC	AT	CA	G	CG	CC	TAC	A	T	C	G	AC	CC	GG	CC	CTT	C	A	C	G	A	356	
rat	GCAC	GAG	AG	CTC	TAT	AG	AC	AT	CA	G	CG	CC	TAC	A	T	C	G	AC	CC	GG	CC	CTT	C	A	C	G	A	360	
human	GCAC	GAG	AG	CTC	CAT	CG	AC	T	CA	G	CG	CC	TAC	A	T	C	G	AC	CC	GG	CC	CTT	C	A	C	G	A	230	

mouse	CC	TG	GC	CA	C	TC	T	CC	AG	CA	CA	G	CC	CG	CA	G	AG	AG	GC	CA	AG	CC	GG	CC	GG	CC	C	415	
rat	CC	TG	GC	CA	C	TC	T	CC	AG	CA	CA	G	CC	CG	CA	G	AG	AG	GC	CA	AG	CC	GG	CC	GG	CC	C	420	
human	CC	TG	GC	CA	C	TC	T	CC	AG	CA	CA	G	CC	CG	CA	G	AG	AG	GC	CA	AG	CC	GG	CC	GG	CC	C	290	

mouse	C	G	C	GG	T	GG	C	GG	GG	TG	----	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	470
rat	C	G	C	GG	T	GG	C	GG	GG	TG	----	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	474
human	C	A	C	GG	C	GG	C	GG	C	GG	CG	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	350
	*				*				*			*****		*					*										
mouse	C	G	C	GG	T	GG	C	GG	GG	TG	----	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	470
rat	C	G	C	GG	T	GG	C	GG	GG	TG	----	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	474
human	C	A	C	GG	C	GG	C	GG	C	GG	CG	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	350
	*				*				*			*****		*					*										
mouse	C	G	C	GG	T	GG	C	GG	GG	TG	----	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	470
rat	C	G	C	GG	T	GG	C	GG	GG	TG	----	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	474
human	C	A	C	GG	C	GG	C	GG	C	GG	CG	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	350
	*				*				*			*****		*					*										
mouse	C	G	C	GG	T	GG	C	GG	GG	TG	----	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	470
rat	C	G	C	GG	T	GG	C	GG	GG	TG	----	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	474
human	C	A	C	GG	C	GG	C	GG	C	GG	CG	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	350
	*				*				*			*****		*					*										
mouse	C	G	C	GG	T	GG	C	GG	GG	TG	----	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	470
rat	C	G	C	GG	T	GG	C	GG	GG	TG	----	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	474
human	C	A	C	GG	C	GG	C	GG	C	GG	CG	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	350
	*				*				*			*****		*					*										
mouse	C	G	C	GG	T	GG	C	GG	GG	TG	----	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	470
rat	C	G	C	GG	T	GG	C	GG	GG	TG	----	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	474
human	C	A	C	GG	C	GG	C	GG	C	GG	CG	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	350
	*				*				*			*****		*					*										
mouse	C	G	C	GG	T	GG	C	GG	GG	TG	----	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	470
rat	C	G	C	GG	T	GG	C	GG	GG	TG	----	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	474
human	C	A	C	GG	C	GG	C	GG	C	GG	CG	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	350
	*				*				*			*****		*					*										
mouse	C	G	C	GG	T	GG	C	GG	GG	TG	----	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	470
rat	C	G	C	GG	T	GG	C	GG	GG	TG	----	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	474
human	C	A	C	GG	C	GG	C	GG	C	GG	CG	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	350
	*				*				*			*****		*					*										
mouse	C	G	C	GG	T	GG	C	GG	GG	TG	----	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	470
rat	C	G	C	GG	T	GG	C	GG	GG	TG	----	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	474
human	C	A	C	GG	C	GG	C	GG	C	GG	CG	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	350
	*				*				*			*****		*					*										
mouse	C	G	C	GG	T	GG	C	GG	GG	TG	----	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	470
rat	C	G	C	GG	T	GG	C	GG	GG	TG	----	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	474
human	C	A	C	GG	C	GG	C	GG	C	GG	CG	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	350
	*				*				*			*****		*					*										
mouse	C	G	C	GG	T	GG	C	GG	GG	TG	----	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	470
rat	C	G	C	GG	T	GG	C	GG	GG	TG	----	A	CTT	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	C	474
human	C	A	C	GG	C	GG	C	GG	C	GG	CG	A	CTT	G															

```
mouse CAAAGCCAAAGAGTCGGTGGACRAGRACAGCAACGAGTRCCGGGTACGGCGGGRACGCRA 1004
rat CAAAGCCAAAGAGTCGGTGGATRAGRACAGCAACGAGTRCCGGGTACGGCGGGRACGCRA 1005
human CAAAGCCAAAGAGTCGGTGGACRAGRACAGCAACGAGTRCCGGGTGCGGGCGRAGCGRA 875
*** *****

mouse CAACATCGCGGTGCGCAAGAGCCGAGATAAAGCCAAACRACGCAACGTGGAGACGCACCA 1064
rat CAACATCGCGGTGCGCAAGAGCCGAGATAAAGCCAAACRACGCAACGTGGAGACGCACCA 1065
human CAACATCGCGGTGCGCAAGAGCCGAGACRAGGCCAARGCRGCGCAACGTGGAGACGCACCA 935
*****

mouse GAAGGTGCTGGAGTTGACCAAGTGACRATGACCGCCCTGCGCAAGCGGGTGGAACAGCTGAG 1124
rat GAAGGTGCTGGAGTTGACCAAGTGACRATGACCGCCCTGCGCAAGCGGGTGGAACAGCTGAG 1125
human GAAGGTGCTGGAGCTGACCAAGTGACRATGACCGCCCTGCGCAAGCGGGTGGAACAGCTGAG 995
*****

mouse CCGTGAACTGGACACGCTGCGGGGCRATTCGCGCCAGCTGCCGTGAGAGCTCCTTGGTCRA 1184
rat CCGTGAACTGGACACGCTGCGGGGTRATTCGCGCCAGCTGCCGTGAGAGCTCCTTGGTCRA 1185
human CCGCGAACTGGACACGCTGCGGGGCRATTCGCGCCAGCTGCCAGRAGAGCTCCTTGGTCRA 1055
*** *****

mouse GGC CATGGGC AACTGCGCGTGA GCGCGCGGGCTGCGGGACCGCCTTGGGCCGGCCCCCTG 1244
rat GGC CATGGGC AACTGCGCGTGA GCGCGCGGGCTGCGGGACCGCCTTGGGCCGGCCCCCTG 1245
human GGC CATGGGC AACTGCGCGTGA GCGCGCGGGCTGCGGGACCGCCTTGGGCCAGCCTCC-- 1113
*****
```