



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
—ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837—

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή Κατεύθυνση»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Αξιολόγηση της νέας παραλλαγής c.92+7A>G (IVS-I-7A>G)
στο γονίδιο της β-σφαιρίνης (HBB) μέσω μελέτης RNA με
RT-PCR σε ανώριμα ερυθρά κύτταρα**

Κλεάνθη Ε. Σάπκα

Επιβλέπουσα

Joanne Traeger Συνοδινού, Καθηγήτρια Γενετικής

ΑΘΗΝΑ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2018

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Αξιολόγηση της νέας παραλλαγής c.92+7A>G (IVS-I-7A>G) στο γονίδιο της β-σφαιρίνης (HBB) μέσω μελέτης RNA με RT-PCR σε ανώριμα ερυθρά κύτταρα

Κλεάνθη Ε. Σάπκα

A.M.: 20160655

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: Joanne Traeger Συνοδινού, Καθηγήτρια Γενετικής

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ **Joanne Traeger Συνοδινού, Καθηγήτρια Γενετικής**
Ελένη Φρουσίρα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής
Γενετικής
Μαρία Τζέτη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής

Σεπτέμβριος 2018

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι αιμοσφαιρινοπάθειες είναι μια ετερογενή ομάδα μονογονιδιακών νοσημάτων που προκύπτουν από μεταλλάξεις στα γονίδια των σφαιρινών στον άνθρωπο. Λόγω της μεγάλης συχνότητας των φορέων τους παγκοσμίως, αποτελούν το πιο κοινό μονογονιδιακό νόσημα. Χαρακτηρίζονται από διαταραχές στη σύνθεση και τη δομή των υπομονάδων της αιμοσφαιρίνης.

Η β-θαλασσαιμία είναι ένα αυτοσωμικό υπολειπόμενο νόσημα που είναι αποτέλεσμα απουσίας ή μειωμένης σύνθεσης της β-αλυσίδας. Περισσότερες από 200 μεταλλάξεις που σχετίζονται με την β-Θαλασσαιμία έχουν περιγραφεί και η πλειοψηφία τους αφορά σημειακές μεταλλάξεις, μεταξύ άλλων και ένα ευρύ φάσμα μεταλλάξεων που εμπλέκονται στην επεξεργασία του πρόδρομου mRNA, επηρεάζοντας τη φυσιολογική συρραφή.

Η παρούσα εργασία σκοπεύει στη διερεύνηση της παθογένειας μιας καινούρια παραλλαγής c.92+7A>G (IVS-I-7A>G) στο γονίδιο της β-σφαιρίνης. Η συγκεκριμένη παραλλαγή ταυτοποιήθηκε σε ένα παιδί με αιματολογικά ευρήματα για πιθανή εκδήλωση ενδιάμεσης β-Θαλασσαιμίας και επίσης, κληρονόμησε σε trans μια κοινή μετάλλαξη για β-Θαλασσαιμία, την *HBB:c.118C>T*. Η αξιολόγηση της παθογένειας βασίζεται σε μια πλειάδα παραμέτρων στις οποίες περιλαμβάνονται οι μελέτες οικογενειακού διαχωρισμού, οι μελέτες πληθυσμιακής συχνότητας, in-silico προγράμματα και σε πειραματικές μελέτες. Οι προσεγγίσεις αυτές περιλαμβάνονται σε κατευθυντήριες οδηγίες όπως αυτές του ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics).

Η παραλλαγή *HBB:c.92+7A>G* εδράζεται κοντά στη θέση δότη του εξονίου 1 του β-γονιδίου και πιθανά να επηρεάζει τη συρραφή του μετάγραφου του β-γονιδίου. Με βάση αυτή την υπόθεση, διερευνήθηκε η ύπαρξη μη φυσιολογικά συρραμένου mRNA σε πρόδρομα ερυθροκύτταρα τα οποία εκφράζουν υψηλά επίπεδα RNA των σφαιρινών.

Μονοπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος του υπό μελέτη ατόμου και του πατέρα του, που ήταν ετερόζυγος για την παραλλαγή c.92+7A>G, καθώς και δείγματα από άτομο με φυσιολογική εικόνα σε σχέση με τις αιμοσφαιρινοπάθειες, απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν. Απομονώθηκε το συνολικό RNA από τα ανώριμα ερυθροκύτταρα και πραγματοποιήθηκε αντίστροφης μεταγραφής PCR (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR). Για να διαπιστωθεί η ύπαρξη προϊόντων από μη φυσιολογική συρραφή, χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα

πολυακρυλαμίδης (polyacrylamide gel electrophoresis ,PAGE), αλληλούχιση και PCR με φθορίζοντα εκκινητή (F-PCR).

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μεθόδους PAGE και αλληλούχισης, δεν παρουσίασαν κάποιο παραπροϊόν από μη φυσιολογική συρραφή. Από την F-PCR, μόνο από το ένα ζευγάρι εκκινητών ανιχνεύθηκε μια πολύ μικρή κορυφή που πιθανά θα μπορούσε να ανήκει σε μη φυσιολογικά συρραμένου RNA. Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα δεν οδηγούν σε σίγουρο συμπέρασμα, υποδεικνύοντας τις προκλήσεις που χαρακτηρίζουν την παθογένεια των νέων παραλλαγών στο DNA.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Επεξεργασία πρόδρομου mRNA

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: β-Θαλασσαιμία, συρραφή, mRNA

ABSTRACT

Hemoglobinopathies are a heterogeneous group of monogenic diseases resulting from mutations in the globin genes. Due to high carrier frequencies worldwide, they consist the commonest monogenic disorders. They are characterized by abnormal synthesis and structure of hemoglobin chains.

β -Thalassemia is inherited in autosomal recessive manner and it is resulted from absent or reduced synthesis of β -chain. More than 200 mutations of β -Thalassemia have been described and most of them are point mutations. A wide variety of mutations interfere with mRNA processing which affected the normal splicing.

The present thesis aimed to investigate the pathogenicity of a novel variant *HBB:c.92+7A>G* (IVS-I-7A>G). The variant was identified in a child with hematological findings indicative of a possible state of β -Thalassemia Intermediate who had also inherited in trans a common typical beta-thalassemia mutation *HBB:c.118C>T* (traditionally called codon 39C>T). The evaluation of the pathogenicity of novel DNA variants is challenging and very important in the light of the new DNA technologies such as next-generation sequencing. The evaluation of pathogenicity can be based on many parameters including family segregation studies, population frequency studies, *in-silico* model studies and finally experimental studies; these approaches are incorporated into various guidelines, such as those of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). The specific variant *HBB:c.92+7A>G* is located very close to the donor splice site of exon 1 of *HBB*. Thus it could potentially affect splicing of the beta-globin RNA transcript. Based on this assumption, investigating the presence of abnormally spliced mRNA of red-cell precursors which express very high levels of globin RNA. To this end mononuclear cells from peripheral blood from the proband and his father, who was heterozygous for the novel variant *HBB:c.92+7A>G* were isolated and cultured. The total RNA was isolated from the precursor erythroid cells and reverse transcription PCR (RT-PCR) was performed. To determine the present of aberrantly spliced RNA, polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), sequencing and Fluorescence PCR (F-PCR) were used.

Based on the results of analysis using by PAGE and Sanger sequencing no abnormally spliced beta-globin mRNA were detected. However, the analysis of beta-globin mRNA transcripts using fragment analysis of fluorescently labeled RNA indicated a very small peak which could represent a tiny amount of abnormally spliced RNA. Overall, the

results are inconclusive, highlighting the challenges of characterizing the pathogenicity of novel DNA variants.

SUBJECT AREA: mRNA processing

KEYWORDS: β -Thalassemia, splicing, mRNA

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	12
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	13
1.1 Αιμοποιητικό σύστημα.....	13
1.2 Ερυθροποίηση.....	15
1.2.1 Παράγοντες που επιδρούν στην ερυθροποίηση:	17
1.3 Ερυθρά αιμοσφαίρια	19
1.4 Αιμοσφαιρίνη	21
1.4.1 Αλλαγές της αιμοσφαιρίνης κατά την οντογένεση	24
1.4.2 Συμπλέγματα γονιδίων σφαιρινών	25
1.4.3 Ρύθμιση γονιδίων σφαιρίνης	28
1.5 Αιμοσφαιρινοπάθειες	37
1.5.1 Δομικές παραλλαγές	39
1.5.2 ΗΡΦΗ.....	39
1.5.3 Θαλασσαιμίες.....	40
1.6 Συρραφή.....	50
1.7 Σκοπός της εργασίας	54
2. ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ	55
3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	59
3.1 Αξιολόγηση της παραλλαγής <i>HBβ:c.92+7A>G</i>	59
3.2 Πρωτόκολλο ημιστερέης καλλιέργειας μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος για τη δημιουργία αποικιών της ερυθράς σειράς (BFU-E)	60
3.3 Συλλογή κυττάρων	61
3.4 Απομόνωση RNA	62
3.5 Αντίστροφης μεταγραφής αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)	63

3.5.1	Σύνθεση cDNA.....	63
3.5.2	Σχεδιασμός εκκινητών για πολλαπλασιασμό του cDNA του επιθυμητού τμήματος....	65
3.5.3	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR).....	67
3.6	Ηλεκτροφόρηση	68
3.6.1	Πήκτωμα αγαρόζης 1.5% w/v.....	68
3.6.2	Πήκτωμα πολυακρυλαμιδής (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 10%.....	69
3.7	Αλληλούχιση κατά Sanger	71
3.7.1	Ενζυμικός καθαρισμός του προϊόντος PCR	72
3.7.2	Αντίδραση αλληλούχισης	72
3.7.3	Καθαρισμός αντίδρασης αλληλούχισης	73
3.8	Ανάλυση τμημάτων PCR με χρήση φθορίζοντα εκκινητή (F-PCR) σε αυτόματο αναλυτή (Fragment Analysis).....	73
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	75
4.1	Αξιολόγηση της παραλλαγής c.92+7A>G	75
4.2	Καλλιέργεια μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος για τη δημιουργία αποικιών της ερυθράς σειράς (BFU-E).....	76
4.3	Αξιολόγηση της απόδοσης της RT-PCR με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης.....	80
4.4	Αξιολόγηση της απόδοσης της RT-PCR με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδής (PAGE) 10%	81
4.5	Αλληλούχιση κατά Sanger	82
4.6	Ανάλυση τμημάτων PCR με χρήση φθορίζοντα εκκινητή (F-PCR) σε αυτόματο αναλυτή (Fragment Analysis).....	84
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	87
	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	92
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	93

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 Αλλαγές στην τοπολογία της αιμοποίησης κατά την ανάπτυξη του ανθρώπινου εμβρύου.....	14
Εικόνα 2 Γενεαλογία κυττάρων του αίματος και του ανοσοποιητικού συστήματος	15
Εικόνα 3 Οντογένεση των ερυθροκυττάρων στην κυκλοφορία	16
Εικόνα 4 Διαφοροποίηση των HSCs σε ώριμα ερυθροκύτταρα σε κυτταρικές καλλιέργειες.....	17
Εικόνα 5 Μικρογραφία των ερυθρών κυττάρων.....	19
Εικόνα 6 Δομή αιμοσφαιρίνης.....	21
Εικόνα 7 Δομή αίμης.....	22
Εικόνα 8 Μετάβαση από την κατάσταση T στην κατάσταση R	23
Εικόνα 9 Παραγωγή αλυσίδων αιμοσφαιρίνης κατά την οντογένεση του ανθρώπου.....	24
Εικόνα 10 Πολυγονιδιακά συμπλέγματα σφαιρινών	26
Εικόνα 11 Σειρά έκφρασης των σφαιρινών κατά την ανάπτυξη και ρυθμιστικά στοιχεία συμπλεγμάτων	27
Εικόνα 12 Δομή α-τύπου και β-τύπου γονιδίων Μεταξύ κωδικονίου 31 και 32 όπως και 99 και 100 παρεμβάλλονται τα εσόνια στα γονίδια α-τύπου. Στα γονίδια β-τύπου τα εσόνια βρίσκονται μεταξύ κωδικονίου 30 και 31 και των κωδικονίων 104 και 105.....	27
Εικόνα 13 Μοτίβα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων στην περιοχή του ενισχυτή HS-40	29
Εικόνα 14 Οργάνωση υποκινητών γονιδίων γ- και β-σφαιρίνης Διαφορές των ρυθμιστικών στοιχείων CACCC (κόκκινο κύκλο) και CAAT (μπλε κύκλο).....	31
Εικόνα 15 Διαγραμματική απεικόνιση του συμπλέγματος γονιδίων των σφαιρινών β-τύπου.....	32
Εικόνα 16 Πιθανά μοντέλα του LCR Με μπλε χρώμα απεικονίζεται το γονίδιο, με πράσινο ο υποκινητής του, οι HS θέσεις με κόκκινα μικρά κουτάκια και οι μεταγραφικοί παράγοντες με χρωματιστά οβάλ και κυκλικά μικρά σχήματα.	35
Εικόνα 17 Παγκόσμια κατανομή των διαταραχών της αιμοσφαιρίνης με βάση τη γέννηση πασχόντων παιδιών ανά 1000 γεννήσεις	38
Εικόνα 18 Συσχέτιση φαινοτύπου-γονοτύπου στην α-Θαλασσαιμία.....	41

Εικόνα 19 Σχηματική αναπαράσταση του συμπλέγματος των γονιδίων των α-αλυσίδων, όπου εμφανίζονται οι περιοχές με τις πιο συχνές ελλείψεις της α-Θαλασσαιμίας στη Μεσόγειο	41
Εικόνα 20 Παγκόσμια κατανομή της α ⁺ και α ⁰ -Θαλασσαιμίας.....	42
Εικόνα 21 Παγκόσμια κατανομή μεταλλάξεων της β-Θαλασσαιμίας Με έντονη γραφή είναι οι πιο συχνές μεταλλάξεις.....	45
Εικόνα 22 Οι πιο συχνές μεταλλάξεις στη Μεσόγειο.....	46
Εικόνα 23 Σημειακές μεταλλάξεις που προκαλούν β-Θαλασσαιμία Απεικόνιση του β-γονιδίου στο πάνω μέρος της εικόνας. Τα πλαίσια που ακολουθούν εμφανίζουν τις διαφορετικές κατηγορίες μεταλλάξεων και οι γραμμές μέσα στα πλαίσια αναφέρονται στις θέσεις των διαφορετικών μεταλλάξεων.....	48
Εικόνα 24 Παθοφυσιολογία της β-Θαλασσαιμίας	49
Εικόνα 25 Συναινετικές αλληλουχίες στα όρια ιντρονίων-εξονίων.....	51
Εικόνα 26 Μηχανισμός συρραφής.....	52
Εικόνα 27 Γενεαλογικό δένδρο του ατόμου προς μελέτη.....	56
Εικόνα 28 Αλληλουχία γονιδίου β-σφαιρίνης και σημεία πρόσδεσης εκκινητών	66
Εικόνα 29 Μεγέθη τμημάτων DNA απο μάρτυρα μοριακών μεγεθών φΧ174DNA_HaeIII Digest	69
Εικόνα 30 Εικόνες αποικιών BFU-E κυττάρων απο φυσιολογικό άτομο.....	77
Εικόνα 31 Εικόνες αποικιών BFU-E κυττάρων του υπο μελέτη ατόμου.....	78
Εικόνα 32 Εικόνες αποικιών του ατόμου II-1	79
Εικόνα 33 Προϊόν RT-PCR για το άτομο II- 1 και το φυσιολογικό	80
Εικόνα 34 Προϊόν RT-PCR για το άτομο III-2 και το φυσιολογικό	81
Εικόνα 35 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα PAGE 10%.....	82
Εικόνα 36 Ενδεικτικές εικόνες απο την αλληλούχιση κατά Sanger.....	83
Εικόνα 37 Αποτελέσματα για το τμήμα με μέγεθος 187bp.....	85
Εικόνα 38 Αποτελέσματα για το τμήμα με μέγεθος 384bp.....	86

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 Οι πιο συχνές μεταλλάξεις στο <i>HBB</i> γονίδιο στην Ελλάδα.....	46
Πίνακας 2 Αιματολογικά δεδομένα και γονοτυπικά στοιχεία των μελών της οικογένειας	57
Πίνακας 3 Αντιδραστήρια πρώτου μείγματος για τη σύνθεση του cDNA	63
Πίνακας 4 Αντιδραστήρια δεύτερου μείγματος για τη σύνθεση του cDNA	64
Πίνακας 5 Αλληλουχίες εκκινητών πρώτου ζευγαριού	65
Πίνακας 6 Αλληλουχίες εκκινητών δεύτερου ζευγαριού	66
Πίνακας 7 Αντιδραστήρια για την PCR	67
Πίνακας 8 Περιεκτικότητα αγαρόζης στο πήκτωμα σε σχέση με τα μεγέθη των τμημάτων DNA.....	68
Πίνακας 9 Συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης και εύρος τμήματος που διαχωρίζονται.....	70
Πίνακας 10 Αλληλουχίες τμημάτων φάγου M13	71
Πίνακας 11 Αντιδραστήρια για F-PCR	74
Πίνακας 12 Μέσος όρος τιμών αιματολογικών δεικτών σε ετερόζυγα άτομα για τη μετάλλαξη c.118C>T	75
Πίνακας 13 Αριθμός αποικιών σε κάθε δείγμα κατά προσέγγιση.....	76

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εκπονήθηκε στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών: «Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή Κατεύθυνση» της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών υπο την επίβλεψη της καθηγήτριας Γενετικής, κ.Ι. Traeger-Συνοδινού. Τα πειράματα διενεργήθηκαν στο χώρο του εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής στο Χωρέμειο ερευνητικό εργαστήριο κατά το εαρινό εξάμηνο του ακαδημαϊκού έτους 2017-2018.

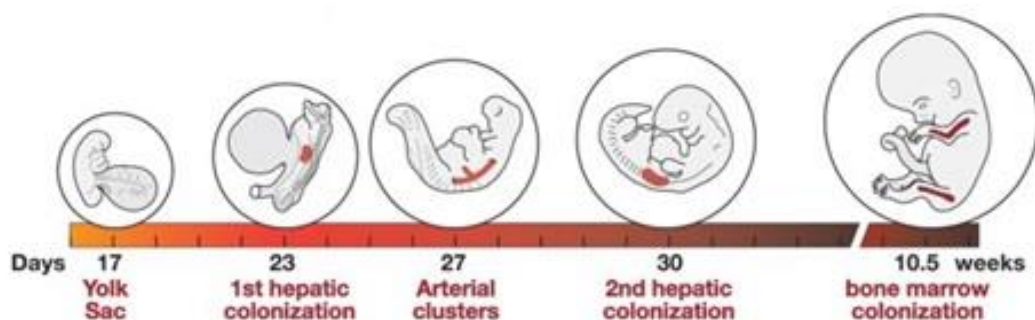
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αιμοποιητικό σύστημα

Η αιμοποίηση αποτελεί τη διαδικασία παραγωγής και ανάπτυξης των ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων. Έχει παρατηρηθεί διαφοροποίηση στη θέση της αιμοποίησης κατά τη διάρκεια των ποικίλων αναπτυξιακών σταδίων στον άνθρωπο. Αναλυτικότερα, στα ενήλικα θηλαστικά η διαδικασία της αιμοποίησης πραγματοποιείται στον μυελό των οστών σε αντίθεση με τα έμβρυα όπου το αιμοποιητικό σύστημα αρχικά δραστηριοποιείται στο λεκιθικό σάκο, έναν εξωεμβρυϊκό ιστό, και εν συνεχεία στο εμβρυϊκό ήπαρ.

Στο εμβρυϊκό στάδιο, μεσοδερμικά κύτταρα που μεταναστεύουν από την αρχική λωρίδα του άκρου της επιβλάστης, εισέρχονται στο λεκιθικό σάκο και παράγουν αρχέγονα κύτταρα της ερυθράς σειράς καθώς και μακροφάγα και μεγακαρυοκύτταρα κατά την 3-4 εβδομάδα κύησης. Με την έναρξη του κυκλοφορικού συστήματος στο έμβρυο, κατά βάση με την έναρξη του καρδιακού παλμού μετά την 4^η εβδομάδα κύησης, άρχεται και η είσοδος των αρχέγονων κυττάρων από το λεκιθικό σάκο στους ιστούς του εμβρύου. Το πρώτο όργανο που εποικίζεται είναι το εμβρυϊκό ήπαρ το οποίο παραμένει το κέντρο αιμοποίησης μέχρι έβδομο μήνα της κύησης όπου το αιμοποιητικό σύστημα μεταφέρεται στο μυελό των οστών και παραμένει εκεί καθόλη τη διάρκεια της ζωής. Τα κύτταρα που εξέρχονται από το λεκιθικό σάκο ακολουθούν μια περιορισμένη μυελο-ερυθροειδή ανάπτυξη (1,3).

Στην ενήλικη ζωή, τα λεμφοειδή, μυελοειδή και ερυθροειδή κύτταρα που απαιτούνται για την επιβίωση προέρχονται από μία συστάδα αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (hematopoietic stem cells, HSCs). Η προέλευση των HSCs είναι ανεξάρτητη των μεσοδερμικών κυττάρων που μεταναστεύουν στο λεκιθικό σάκο και εμφανίζονται αργότερα. Την 25^η μέρα ανιχνεύονται συστάδες των 2-3 κυττάρων στην περιοχή αορτής-γονάδας-μεσόνεφρου (aorta-gonad-mesonephros, AGM). Η περιοχή της αορτής προέρχεται από την σπλαχνοπλευρά, το σπλαχνικό μεσόδερμα μαζί με το παρακείμενο ενδόδερμα, όπου τα πολυδύναμα μυελο-λεμφοειδή βλαστικά κύτταρα προέρχονται. Τα HSCs αυτά είναι αποτέλεσμα της μετάβασης αιμογενικών (hemogenic) ενδοθηλιακών κυττάρων σε πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα. Στην συνέχεια, υφίστανται ένας δεύτερος εποικισμός του εμβρυϊκού ήπατος από τις συστάδες των HSCs που σχηματίζονται στην περιοχή AGM (εικ.1).

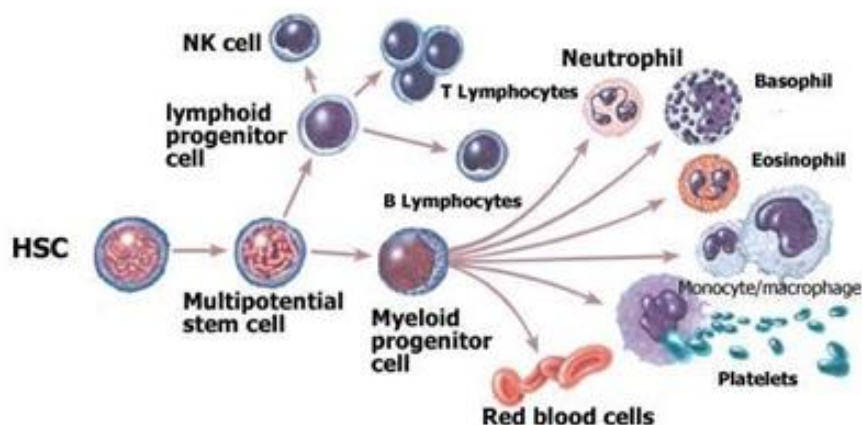


Εικόνα 1 Αλλαγές στην τοπολογία της αιμοποίησης κατά την ανάπτυξη του ανθρώπινου εμβρύου

Τέλος, η διαφοροποίηση των αρχέγονων κυττάρων μεταφέρεται στο μυελό των οστών όπου γίνεται και το κέντρο της αιμοποίησης μετά τη γέννηση. Ο μυελός των οστών αποτελεί το κύριο ιστό για την αιμοποίηση στα ενήλικα θηλαστικά, ωστόσο αναπτύσσεται πολύ αργότερα στο σχηματισμό του εμβρύου, την χρονική περίοδο που η αιμοποίηση παύει να συμβαίνει στο λεκιθικό σάκο και συνεχίζεται, κυρίως, στο ήπαρ και δευτερευόντως στο σπλήνα και στους λεμφαδένες.

Τα HSCs έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε πολλούς κυτταρικούς τύπους, να αυτο-ανανεώνονται και να διατηρούν σταθερά τα επίπεδα του κυτταρικού τους πληθυσμού μέσω των κυτταρικών διαιρέσεων. Συναντώνται σε μικρό αριθμό με αναλογία ένα αρχέγονο κύτταρο ανά 5×10^4 κύτταρα μυελού των οστών (2).

Τα αρχέγονα κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε προγονικά λεμφοειδή κύτταρα ή σε προγονικά μυελοειδή κύτταρα. Η κατεύθυνση που θα ακολουθήσουν εξαρτάται από τα είδη και τις ποσότητες των μεταγραφικών παραγόντων που βρίσκονται στο περιβάλλον τους. Τα προγονικά λεμφοειδή κύτταρα θα δώσουν γένεση σε B-, T-λεμφοκύτταρα και NK (Natural Killer) κύτταρα ενώ τα προγονικά μυελοειδή κύτταρα θα διαφοροποιηθούν σε ερυθροκύτταρα, μονοκύτταρα, κοκκιοκύτταρα και μεγακαρυοκύτταρα, τα τελευταία διασπώνται δίνοντας τα αιμοπετάλια (εικ.2).



Εικόνα 2 Γενεαλογία κυττάρων του αίματος και του ανοσοποιητικού συστήματος

Λόγω του μικρού αριθμούς τους, η μελέτη των HSCs αποτελούσε δύσκολο αντικείμενο και τα δεδομένα για την ύπαρξη τους προήλθαν από πειράματα ανασύστασης μυελού των οστών. Πειράματα στα οποία ακτινοβολήθηκαν ποντίκια και στην συνέχεια τους χορηγήθηκαν κύτταρα από μυελό ενός φυσιολογικού ποντικού-δότη, τα κύτταρα αυτά εγκαταστάθηκαν στο μυελό του δέκτη όπου άρχισαν να πολλαπλασιάζονται έχοντας ως αποτέλεσμα να αποκατασταθεί το αιμοποιητικό σύστημα και να επιβιώσουν τα ποντίκια.

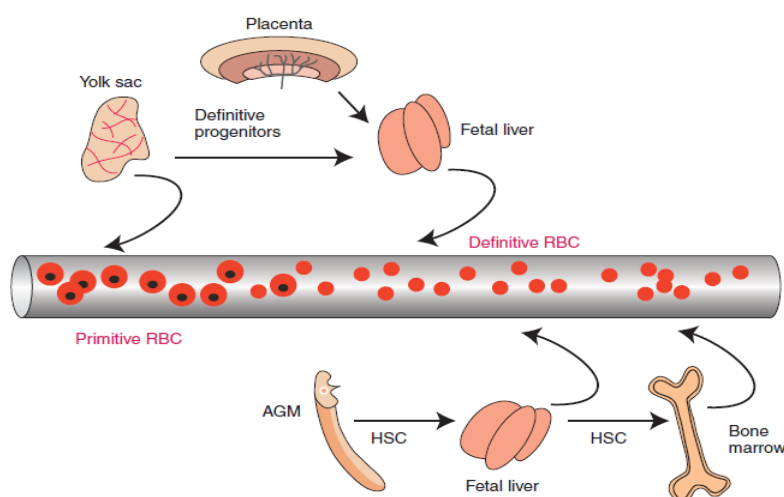
1.2 Ερυθροποίηση

Το οξυγόνο αποτελεί ένα απαραίτητο μόριο για την επιβίωση και ανάπτυξη των χορδωτών. Τα κύτταρα που είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά του οξυγόνου σε όλου τους ιστούς είναι τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Τα ερυθροκύτταρα αποτελούν τον πρώτο κυτταρικό τύπο που προσδιορίστηκε στα έμβρυα των θηλαστικών και εκτελούν σημαντικές λειτουργίες τόσο κατά τη διάρκεια της κύησης όσο και στη μετέπειτα ζωή. Η ερυθροποίηση αποτελεί τη διαδικασία παραγωγής των ερυθρών κυττάρων από τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα και ακολουθεί την κύρια πορεία της αιμοποίησης που περιγράφηκε πρωτίτερα(4,6).

Περίπου πριν από ένα αιώνα περιγράφηκε στα θηλαστικά, η ύπαρξη δυο διακριτών αναπτυξιακών και μορφολογικών ερυθρών σειρών, στην εμβρυϊκή και στην ενήλικη ζωή αντίστοιχα. Τα πρώιμα ερυθροκύτταρα (primitive erythroid cells, EryP) παράγονται, αρχικά, στο λεκιθικό σάκο και εισέρχονται στην κυκλοφορία. Τα EryP είναι σχετικά

μεγάλα κύτταρα, εκφράζουν διαφορετικά γονίδια αιμοσφαιρινών και εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια με το οξυγόνο το οποίο μεταφέρουν. Επιπρόσθετα, διαθέτουν πυρήνα τον οποίο χάνουν στην πορεία καθώς ωριμάζουν μετά την είσοδο τους στην κυκλοφορία του εμβρύου και ο οποίος πιθανά φαγοκυτταρώνεται.

Στη συνέχεια, διαφοροποιημένα προγονικά ερυθροκύτταρα (definitive progenitors) παράγονται, τόσο από το λεκιθικό σάκο όσο και από τον πλακούντα, τα οποία εποικίζουν το εμβρυικό ήπαρ (εικ.1). Στο εμβρυικό ήπαρ, τα διαφοροποιημένα προγονικά κύτταρα φτάνουν στο τελικό στάδιο της διαφοροποίησής τους και εισέρχονται στη κυκλοφορία. Την ίδια χρονική περίοδο, η περιοχή αορτής-γονάδας-μεσόνεφρου παράγει τα πρώτα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, τα οποία μεταναστεύουν στο εμβρυικό ήπαρ (2^{ος} ηπατικός εποικισμός, εικ.1), διαφοροποιούνται και εισέρχονται στην κυκλοφορία στο τελικό στάδιο της διαφοροποίησής τους ομοίως με τα διαφοροποιημένα προγονικά κύτταρα του λεκιθικού σάκου.



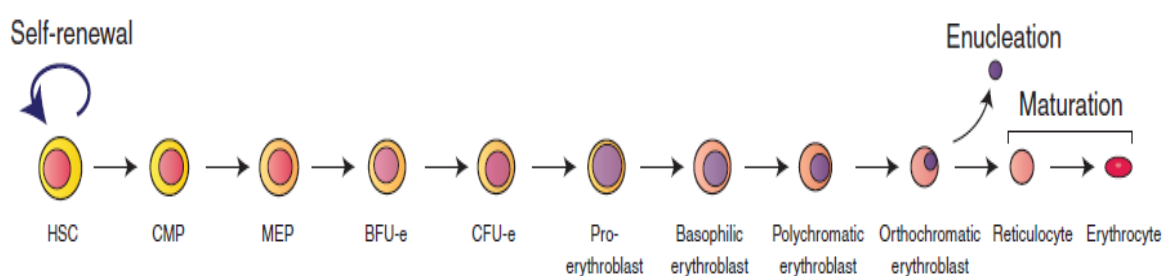
Εικόνα 3 Οντογένεση των ερυθροκυττάρων στην κυκλοφορία

Τα HSCs, που βρίσκονται στο ήπαρ του εμβρύου, μεταναστεύουν στο μυελό των οστών από όπου θα παροχετεύουν στην κυκλοφορία διαφοροποιημένα ερυθρά κύτταρα καθόλη τη διάρκεια της ζωής του ζώντα οργανισμού.

Η πρώιμη ερυθροποίηση αποτελεί έναν άκρως διατηρημένο μηχανισμό στα χορδωτά γεγονός που υπογραμμίζει τη σημαντικότητά της. Η δυσκολία της μελέτης της έγκειται στη δύσκολη πρόσβαση στο έμβρυο κατά τη διάρκεια σχηματισμού EryP καθώς το έμβρυο είναι ιδιαίτερα μικρό.

1.2.1 Παράγοντες που επιδρούν στην ερυθροποίηση:

Η ερυθροποίηση είναι μια δυναμική κατάσταση που ρυθμίζεται σε πολλαπλά επίπεδα από διάφορους αναπτυξιακούς και μεταγραφικούς παράγοντες, κυτταροκίνες, τροποποιητές της χρωματίνης και miRNAs. Η μετάβαση από ένα στάδιο της διαφοροποίησης στο επόμενο πραγματοποιείται χάρη στην ικανότητα των κυττάρων να ανταποκρίνονται στους διάφορους παράγοντες του μικροπεριβάλλοντος τους (5). Σε κυτταρικές καλλιέργειες των ερυθρών κυττάρων, τα πρώιμα ερυθροκύτταρα αντιστοιχούν σε κύτταρα BFU-E και CFU-E που θα αναλυθούν παρακάτω.



Εικόνα 4 Διαφοροποίηση των HSCs σε ώριμα ερυθροκύτταρα σε κυτταρικές καλλιέργειες

a) Αναπτυξιακοί παράγοντες:

Τα BFU-E (burst forming unit- erythroid)(εικ. 4) εμφανίζουν ομοιότητα με τα διαφοροποιημένα προγονικά κύτταρα τα οποία μεταναστεύουν από το λεκιθικό σάκο στο εμβρυικό ήπαρ (εικ.3) και η ανάπτυξη τους εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες όπως ο παράγοντας των βλαστοκυττάρων (stem cell factor, SCF), η θρομβοποιητίνη (thrombopoietin, TPO), η ιντερλευκίνη-3 (interleukin 3, IL3),η ιντερλευκίνη-11 (interleukin 11, IL11), ο αυξητικός παράγοντας που μοιάζει με την ινσουλίνη (insulin like growth factor, IGF-1), τα γλυκοκορτικοειδή (glucocorticoids, GCs) και η ερυθροποιητίνη (erythropoietin, EPO).

Η EPO είναι μια κυτταροκίνη που παράγεται στους νεφρούς και αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της ερυθροποίησης. Παίζει σημαντικό ρόλο στη ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση, την απόπτωση και την ενεργοποίηση συγκεκριμένων ερυθροειδικών γονιδίων. Τα διαφοροποιημένα προγονικά CFU-E (colony forming unit-erythroid) (εικ. 4) εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στο συγκεκριμένο παράγοντα από τα BFU-E. Λόγω αυτής της ικανότητας τους, σε συνθήκες υποξίας, η αυξημένη παραγωγή της EPO διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση τους με σκοπό να επαναφέρουν τα επίπεδα του οξυγόνου στον οργανισμό. Ωστόσο σε περιπτώσεις χρόνιου στρες, τα CFU-E δεν

επαρκούν για να παράγουν τις απαιτούμενες ποσότητες των ερυθροκυττάρων παρά τα υψηλά επίπεδα EPO και ο οργανισμός ξεκινάει την παραγωγή CFU-E από BFU-E. Οι παράγοντες που επιδρούν για την διαφοροποίηση των BFU-E σε CFU-E και την αυτοανανέωση τους δεν είναι ακόμα γνωστοί.

Εκτός από την EPO, η ύπαρξη και άλλων αυξητικών παραγόντων συνδέεται με την αυτοανανέωση των BFU-E. Πιο συγκεκριμένα, η μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών 4 (bone morphogenetic protein 4, BMP4) και ο μεταγωγέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής 5 (signal transducer and activator of transcription 5, STAT5) εμπλέκονται στη διαδικασία.

b) Μεταγραφικοί παράγοντες:

Ένα ευρύ φάσμα μεταγραφικών παραγόντων εμπλέκεται στην παραγωγή mRNAs κριτικής σημασίας για την ερυθροποίηση. Η πρωτεΐνη δακτυλίου ψευδαργύρου GATA-1, ο μεταγραφικός παράγοντας T-κυττάρων στην οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία (T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1, TAL1) και η πρωτεΐνη που περιλαμβάνει μια LIM περιοχή (LIM-domain only protein 2, LMO2) αποτελούν ενδεικτικά παραδείγματα ρυθμιστών της μεταγραφικής δραστηριότητας των γονιδίων που σχετίζονται με την πρώιμη και τελική ερυθροποίηση. Οι παράγοντες αυτοί συμμετέχουν σε πρωτεϊνικά σύμπλοκα και η δυσλειτουργία των σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται οδηγεί στην εμφάνιση νοσημάτων σχετικών με την ερυθροποίηση.

c) Επιγενετικές τροποποιήσεις:

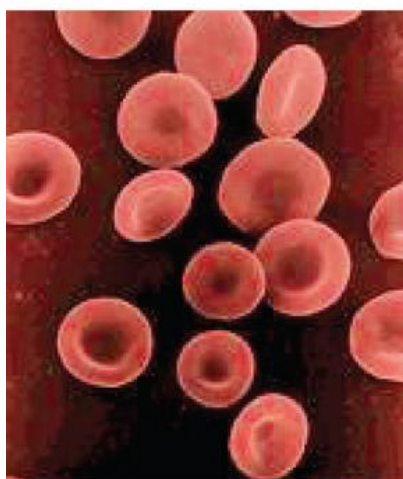
Στην γονιδιακή έκφραση σημαντικό ρόλο έχουν και οι τροποποιήσεις των ιστονών. Χαρακτηριστικά, η μεθυλίωση της ιστόνης H3K79 επηρεάζει την πρώιμη και τελική ερυθροποίηση στο λεκιθικό σάκο καθώς και το μέγεθος και τον αριθμό των αποικιών των BFU-E. Επιπρόσθετα, η ακετυλίωση των ιστονών συνδέεται με τη σταθεροποίηση της χρωματίνης και την αποβολή του πυρήνα των ώριμων ερυθροκυττάρων.

d) miRNAs:

Τα miRNAs συμμετέχουν στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων με την ρύθμιση των mRNAs των γονιδίων στόχων τους. Αναστέλλουν την μετάφραση, αποδομούν το mRNA αλλά και συνδυασμό των δύο. Για παράδειγμα, η αναστολή των miR-221 και miR-222 είναι απαραίτητη στον πολλαπλασιασμό και στην τελική διαφοροποίηση των προγονικών ερυθροειδικών κυττάρων σε αντίθεση με τα miR-144 και miR451 που επάγεται η λειτουργία τους.

1.3 Ερυθρά αιμοσφαίρια

Τα ερυθροκύτταρα αποτελούν τον πιο κοινό κυτταρικό τύπο στο αίμα. Η βασική λειτουργία τους είναι η μεταφορά του οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς και στα όργανα. Επιπρόσθετα, απομακρύνουν το διοξείδιο του άνθρακα που παράγεται από τα κύτταρα. Έχουν αμφίκωλο σχήμα, τα ώριμα ερυθροκύτταρα δεν διαθέτουν πυρήνα και έχουν διάμετρο 6-8 μm. Το μικρό μέγεθος του ερυθρού κυττάρου σε συνδυασμό με το ιδιαίτερο σχήμα του, τους προσδίδουν αυξημένη αναλογία επιφάνειας προς όγκο με αποτέλεσμα να διαχέονται γρήγορα το οξυγόνο και το διοξείδιο του άνθρακα από και προς το εσωτερικό του κυττάρου και ,τέλος, του επιτρέπει και την είσοδο στα τριχοειδή αγγεία των ιστών (7).



Εικόνα 5 Μικρογραφία των ερυθρών κυττάρων

Τα ερυθρά κύτταρα έχουν χρόνο ζωής 120 μέρες, στη συνέχεια φαγοκυτταρώνονται και διασπώνται από τα μακροφάγα στο σπλήνα. Στο ανθρώπινο αίμα περιέχονται $\sim 5 \times 10^6$ ερυθρά αιμοσφαίρια ανά ml, αναλυτικότερα, 4.7×10^6 - 6.1×10^6 για τους άνδρες και 4.2×10^6 - 5.4×10^6 για τις γυναίκες. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το 1% των ερυθροκυττάρων, $\sim 2 \times 10^{11}$, αποσύρεται και αντικαθίσταται κάθε μέρα. Σε περιόδους οξέως ή χρόνιου στρες όπως ο οξύς τραυματισμός ή η αιμόλυση, η παραγωγή των ερυθροκυττάρων αυξάνεται ώστε να αντισταθμιστούν οι απώλειες και να καλυφθούν οι ανάγκες του οργανισμού σε οξυγόνο. Τα τελικού σταδίου διαφοροποιημένα ερυθροκύτταρα έχουν αποβάλλει τον πυρήνα, το ενδοπλασματικό δίκτυο και τα μιτοχόνδρια με αποτέλεσμα να χάνουν την ικανότητα τους να πολλαπλασιάζονται.

Τα ερυθροκύτταρα περιέχουν μεγάλες ποσότητες μιας πρωτεΐνης, της αιμοσφαιρίνης που έχει την ικανότητα να δεσμεύεται με το οξυγόνο και σε μικρότερο βαθμό με το διοξείδιο του άνθρακα. Η μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνη είναι 14 g/ml για τις γυναίκες και 16 g/ml για τους άνδρες και η συγκέντρωση της μέσα στο κύτταρο είναι ~34g/dl ή 5mM (8).

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των ερυθρών κυττάρων είναι η ικανότητα τους να παραμορφώνουν το σχήμα τους ώστε να διέρχονται από τα τριχοείδη τα οποία έχουν διάμετρο ίση με το 1/3 των ερυθροκυττάρων. Έχει παρατηρηθεί ότι μειωμένη ικανότητα παραμόρφωσης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση χρόνου ζωής των ερυθρών κυττάρων και την αιμολυτική αναιμία, σε ορισμένες διαταραχές των ερυθροκυττάρων όπως η δρεπανοκυτταρική αναιμία και μερικές μεμβρανοπάθειες και ενζυμοπάθειες. Το χαρακτηριστικό αυτό οφείλεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των ερυθρών κυττάρων. Στην συγκεκριμένη, οφείλονται ποικίλα αντιγονικά, μεταφορικά και μηχανικά χαρακτηριστικά των ερυθροκυττάρων.

Οι παραμορφώσεις των ερυθρών κυττάρων είναι αναστρέψιμες και διατηρούν τη δομική ακεραιότητα τους κατά την τετράμηνη τους στην κυκλοφορία. Παρά την ικανότητα τους αυτή, η αύξηση της επιφάνειας τους κατά 3-4% έχει ως αποτέλεσμα τη λύση του κυττάρου. Άρα, συνεπάγεται ότι η διατήρηση του σταθερού μεγέθους της επιφάνειας της μεμβράνης είναι κριτικής σημασίας παρά την παραμόρφωση του σχήματος τους.

Η κυτταροπλασματική μεμβράνη των ερυθρών κυττάρων περιλαμβάνει ~20 κύριες πρωτεΐνες και διαθέτει μια σύνθετη δομή. Η μεμβράνη περιλαμβάνει χοληστερόλη και φωσφολιπίδια που είναι αγκυρωμένα σε ένα δυσδιάστατο ελαστικό δίκτυο από πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού μέσω των διαμεμβρανικών τμημάτων της λιπιδικής διπλοστιβάδας.

Βιοφυσικές μελέτες κατέδειξαν ότι οι παράγοντες που ρυθμίζουν την ικανότητα των ερυθροκυττάρων να παραμορφώνουν το σχήμα τους είναι:

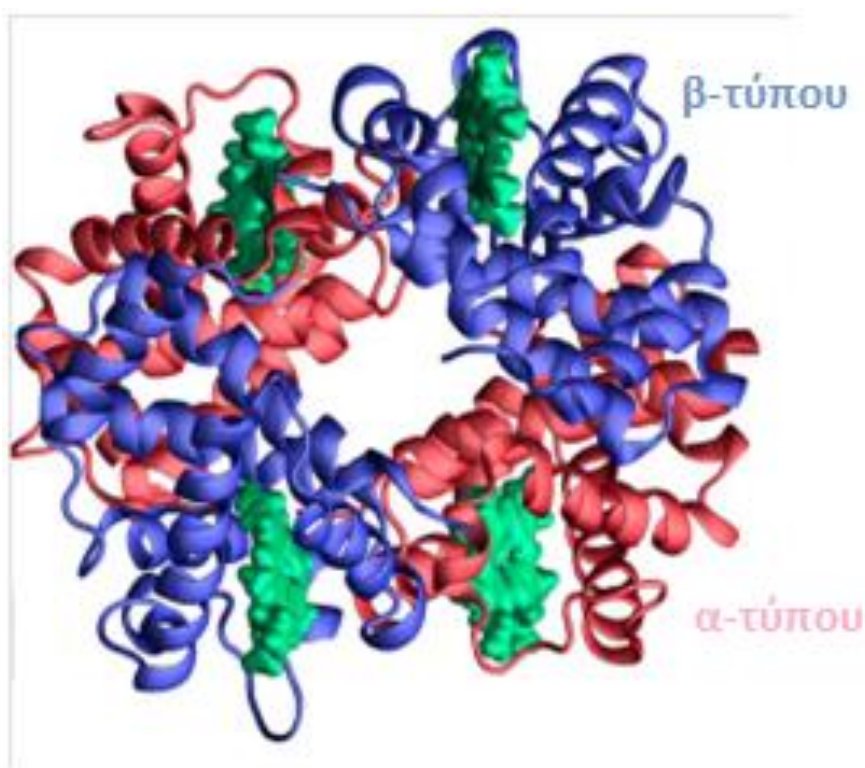
- η γεωμετρία του κυττάρου και πιο συγκεκριμένα η μεγάλη αναλογία επιφάνειας προς όγκο που διαθέτει το ερυθροκύτταρο, του δίνει τη δυνατότητα να τροποποιήσει το σχήμα του.
- το κυτταροπλασματικό ιξώδες και ο κυτταρικός όγκος. Το κυτταροπλασματικό ιξώδες καθορίζεται από την συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης. Η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης μέσα στο κύτταρο ρυθμίζεται πολύ αυστηρά στα 30-35 g/dL. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια μειώνουν τη διασπορά του κυτταροπλασματικού ιξώδες κατά

την τροποποίηση του σχήματος τους. Η αύξηση της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης επηρεάζει, επίσης, την ικανότητα κάμψης του κυττάρου κατά την παραμόρφωση, κατά συνέπεια επηρεάζεται η ικανότητα του να μεταφέρει οξυγόνο καθώς επηρεάζεται ο όγκος του.

- η ικανότητα της μεμβράνης να παραμορφώνεται. Τα ερυθρά κύτταρα στα οποία η μεμβράνη τους έχει χάσει την ικανότητα να παραμορφώνεται οδηγούνται σε φαγοκυττάρωση, φαινόμενο που παρατηρείται κατά τη γήρανση τους ή σε παθολογικές καταστάσεις.

1.4 Αιμοσφαιρίνη

Η αιμοσφαιρίνη αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη των ερυθροκυττάρων. Είναι μεταφορέας του οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς. Επιπρόσθετα, διαθέτει την ικανότητα να προσδένει, σε μικρότερο βαθμό, το διοξείδιο του άνθρακα, το μονοξείδιο του άνθρακα και το μονοξείδιο του αζώτου. Αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες ανα δύο όμοιες, πιο συγκεκριμένα διαθέτει δυο αλυσίδες α-τύπου και δύο αλυσίδες β-τύπου (εικ.6).

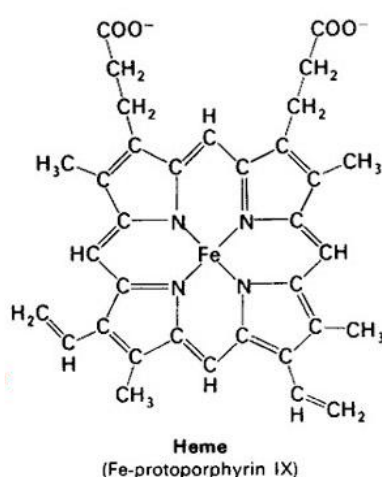


Εικόνα 6 Δομή αιμοσφαιρίνης

Στη διάρκεια της δεκαετίας του 1950, οι μέθοδοι για τον καθορισμό της αλληλουχίας των πρωτεϊνών και η X-ray χρωματογραφία κατέστησε δυνατό τον καθορισμό της αμινοξική αλληλουχίας των διαφόρων αιμοσφαιρινών. Η αιμοσφαιρίνη ήταν από τις πρώτες πρωτεΐνες που αναλύθηκαν. Η δομική ανάλυση της, που έγινε στα τέλη της δεκαετίας του 1960 από τον Max Perutz και τους συνεργάτες του, έδωσε καθοριστικές πληροφορίες για τη λειτουργία της ως μεταφορέα οξυγόνου και για τον κλινικό φαινότυπο που σχετίζεται με διάφορες μεταλλάξεις στα γονίδια της.

Η ικανότητα της αιμοσφαιρίνης να προσδένει το οξυγόνο οφείλεται στην ομάδα της αίμης που διαθέτει και προσδίδει το χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα στο αίμα. Η προσθετική αυτή ομάδα αποτελείται από ένα οργανικό συστατικό, την πρωτοπορφυρίνη, και ένα κεντρικό άτομο σιδήρου. Η πρωτοπορφυρίνη αποτελείται από τέσσερις πυρρολικούς δακτυλίους ενωμένους με γέφυρες μεθανίου με αποτέλεσμα να σχηματίζεται ένας τετραπυρρολικός δακτύλιος όπου βρίσκονται προσκολλημένες τέσσερις μεθυλικές ομάδες, δυο βινυλικές ομάδες και δύο προπιονικές πλευρικές αλυσίδες (εικ.7). Το άτομο του σιδήρου είναι ενωμένο με τα τέσσερα πυρρολικά άτομα αζώτου και είναι σε κατάσταση οξειδωσης Fe^{+2} . Η κάθε υπομονάδα της αιμοσφαιρίνης διαθέτει μια ομάδα αίμης.

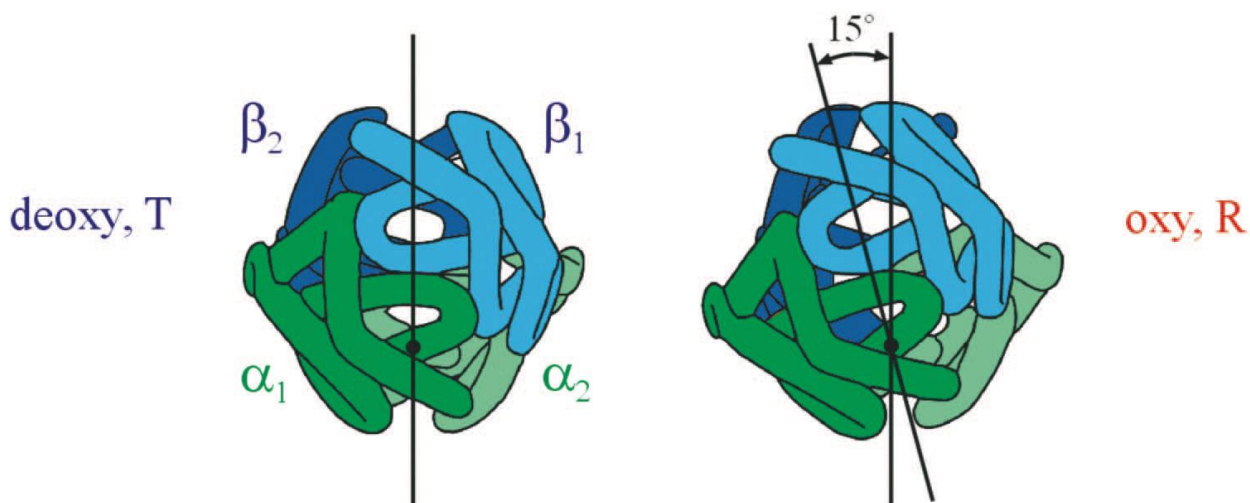
Η ύπαρξη των τεσσάρων μορίων της αίμης στην αιμοσφαιρίνη, καθιστά των πρωτεΐνη χαρακτηριστικό παράδειγμα για την περιγραφή των ιδιοτήτων του αλλοστερισμού. Το φαινόμενο αυτό αναφέρεται στην ιδιότητα της αιμοσφαιρίνης να περιέχει πολλαπλές υπομονάδες (α- και β-αλυσίδες) και να περιλαμβάνει πολλαπλά ενεργά κέντρα (9-11).



Εικόνα 7 Δομή αίμης

Η δομή της αιμοσφαιρίνης, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, αποτελείται από ένα τετραμερές που σχηματίζεται από δύο αλυσίδες α-τύπου και δύο αλυσίδες β-τύπου, οι οποίες ενώνονται σε δύο διμερή των $\alpha\beta$ ($\alpha_1\beta_1$ και $\alpha_2\beta_2$) ώστε να διαμορφωθεί το τετραμερές. Η α-αλυσίδα διαθέτει 7 δομές α-έλικας, σε αντίθεση, η β-αλυσίδα αποτελείται από 8 δομές α-έλικας.

Το μόριο της αιμοσφαιρίνης βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ δύο τεταρτοταγών δομών. Οι δομές αυτές αφορούν την πρόσδεση του οξυγόνου στην αιμοσφαιρίνη και τις αλλαγές που επιφέρει στην στεροδιάταξη της. Αναλυτικότερα, η κατάσταση T (Tense) αναφέρεται στη δομή στην οποία το οξυγόνο έχει τη μικρότερη συγγένεια με την αιμοσφαιρίνη και το μόριο είναι σε δεοξυ-μορφή (δεοξυαιμοσφαιρίνη). Σε αντίθεση, η κατάσταση R (Relaxed), η αιμοσφαιρίνη εμφανίζει υψηλή συγγένεια με το οξυγόνο και ονομάζεται οξυαιμοσφαιρίνη. Στην δεοξυαιμοσφαιρίνη, τα δύο διμερή $\alpha\beta$ διαθέτουν μια εκτεταμένη περιοχή επαφής μεταξύ τους. Με την πρόσδεση του οξυγόνου, τα διμερή στρέφονται κατά 15° μεταξύ τους, έχοντας ως αποτέλεσμα να επηρεάζεται η μεταξύ τους επιφάνεια επαφής (εικ 8) (12,13).



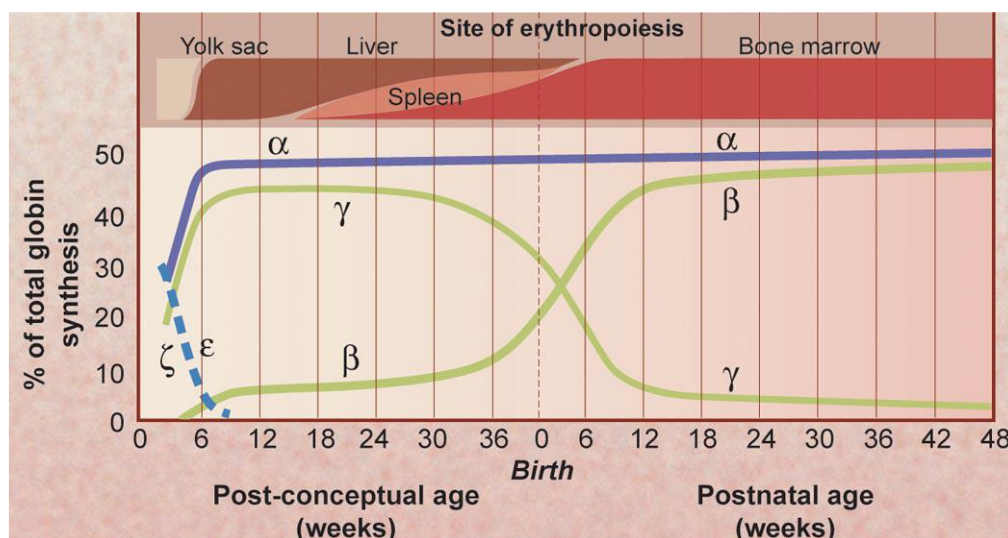
Εικόνα 8 Μετάβαση από την κατάσταση T στην κατάσταση R

Το εναρμονισμένο αυτό μοντέλο προτάθηκε από τους Monod, Wyman και Chageaux το 1965 και περιγράφει τη συνεργειακότητα (cooperativity) μεταξύ των θέσεων πρόσδεσης του οξυγόνου στην αιμοσφαιρίνη. Η ιδιότητα αυτή προσδίδει τη δυνατότητα στην αιμοσφαιρίνη να μεταφέρει περισσότερο οξυγόνο καθώς στην κατάσταση R αυξάνεται η συγγένεια των ανοιχτών θέσεων πρόσδεσης του οξυγόνου.

1.4.1 Αλλαγές της αιμοσφαιρίνης κατά την οντογένεση

Στις αρχές του 19^{ου} αιώνα παρουσιάστηκαν τα πρώτα ευρήματα για την ύπαρξη αλλαγών στο μόριο της αιμοσφαιρίνης που συνδέονται με τα αναπτυξιακά στάδια του οργανισμού. Η ιδιότητα της τροποποίησης της αιμοσφαιρίνης στα πρώιμα και στα όψιμα στάδια της ανάπτυξης, αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό μεταξύ των οργανισμών που διαθέτουν την αιμοσφαιρίνη ως μεταφορέα οξυγόνου.

Στα πρώτα στάδια της ερυθροποίησης στον άνθρωπο, τα πρώιμα ερυθροκύτταρα, που εξέρχονται από το λεκιθικό σάκο, σταδιακά αρχίζουν να παράγουν και να συσσωρεύουν μόρια αιμοσφαιρίνης. Οι εμβρυονικές αιμοσφαιρίνες που παράγονται κατά τα πρώιμα αυτά στάδια είναι οι Hb Gower 1 ($\zeta_2\varepsilon_2$), Hb Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$), Hb Portland 1 ($\zeta_2\gamma_2$) και Hb Portland 2 ($\zeta_2\beta_2$). Οι αιμοσφαιρίνες Hb Gower 1 και Hb Portland περιλαμβάνουν μια ζ-αλυσίδα η οποία έχει μεγάλη ομολογία με την α-αλυσίδα των ενηλίκων. Η Hb Gower 1 και η Hb Gower 2 διαθέτουν μια ε-αλυσίδα η οποία εμφανίζει μεγάλη ομολογία με την β-αλυσίδα και α-ή ζ-αλυσίδα από τις α-τύπου. Η αιμοσφαιρίνη Hb Portland 2 ανιχνεύεται σπάνια και κυρίως σε μια μορφή α-θαλασσαιμίας, τον εμβρυικό ύδρωπα. Με την διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών στο εμβρυικό ήπαρ, κατά την 6^η εβδομάδα κύησης, ξεκινάει η σύνθεση της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης HbF ($\alpha_2\gamma_2$) όπου η γ-αλυσίδα έχει, επίσης, μεγάλη ομολογία με την β-αλυσίδα.



Εικόνα 9 Παραγωγή αλυσίδων αιμοσφαιρίνης κατά την οντογένεση του ανθρώπου

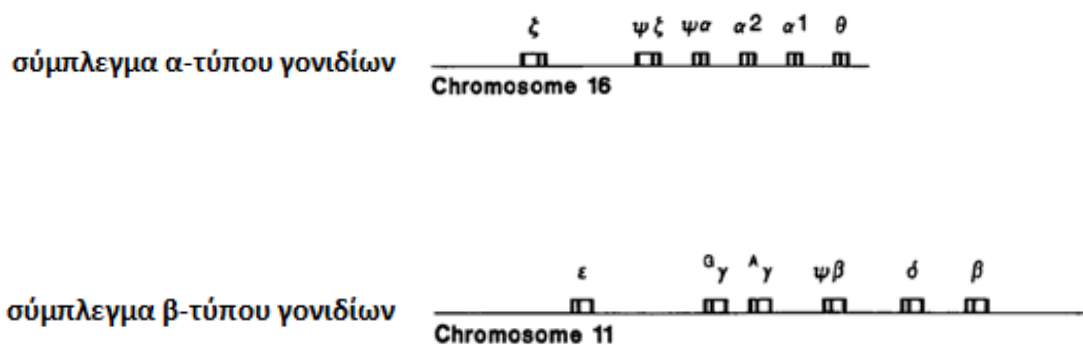
Μια δεύτερη μεταστροφή στην έκφραση των γονιδίων της σφαιρίνης πραγματοποιείται κατά την περιγεννητική περίοδο. Η εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη HbF μειώνεται και αυξάνεται η παραγωγή της ενήλικης αιμοσφαιρίνης HbA ($\alpha_2\beta_2$), η οποία κυριαρχεί σε όλη τη διάρκεια της ζωής. Στα ενήλικα ερυθροκύτταρα, εμφανίζεται η HbA₁($\alpha_2\beta_2$) σε ποσοστό ~97% ενώ οι αιμοσφαιρίνες HbA₂($\alpha_2\delta_2$) και HbF σε ποσοστά ~2% και ~1%, αντίστοιχα. Η έκφραση της αιμοσφαιρίνης ποικίλει κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ώστε να προσαρμόζεται στις διαφορετικές συνθήκες οξυγόνου, στο γεγονός αυτό οφείλεται η διαφορετική συγγένεια των αλυσίδων με το οξυγόνο. Οι αιμοσφαιρίνες που παράγονται κατά την εμβρυονική περίοδο καθώς και η εμβρυϊκή HbF έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με το οξυγόνο από την HbA (14-17).

1.4.2 Συμπλέγματα γονιδίων σφαιρινών

Οι διαφορετικές αλυσίδες των σφαιρινών α- και β-τύπου, που παράγονται κατά τα αναπτυξιακά στάδια, κωδικοποιούνται από τα αντίστοιχα γονίδια. Τα γονίδια αυτά εδράζονται σε δύο διαφορετικά συμπλέγματα, σε δυο διαφορετικά χρωμοσώματα, ένα για τα γονίδια των αλυσίδων α-τύπου και ένα για τα γονίδια β-τύπου (εικ.10).

Ο γενετικός τόπος που είναι υπεύθυνος για την παραγωγή των α-τύπου αλυσίδων εδράζεται στο χρωμόσωμα 16 στην περιοχή p13.3. Διαθέτει το γονίδιο για την εμβρυϊκή αλυσίδα ζ, δύο γονίδια της α-αλυσίδας, α1 και α2, και δύο ψευδογονίδια, ψζ και ψα, μεταξύ των ζ και α2 γονιδίων. Επιπρόσθετα, υπάρχει και το γονίδιο για τη θ-αλυσίδα της οποίας η λειτουργία δεν είναι ακόμα γνωστή. Οι πρωτεϊνικές αλυσίδες α-τύπου έχουν μήκος 141 αμινοξέων .

Τα γονίδια α1 και α2 κωδικοποιούν δύο πανομοιότυπες πρωτεϊνικές αλυσίδες που διαφοροποιούνται στο 3'-άκρο και προέρχονται από το διπλασιασμό στο αρχικό γονίδιο. Το α2 γονίδιο παράγει διπλάσια ποσότητα αλυσίδων από το α1 λόγω διαφορετικών αλληλουχιών που ρυθμίζουν το ρυθμό μεταγραφής κοντά στον υποκινητή. Ο φυσιολογικός αριθμός γονιδίων των α-σφαιρινών είναι 4. Ο αριθμός των γονιδίων των α-σφαιρινών ανά χρωμόσωμα 16 μπορεί να ποικίλει από 0-4 γεγονός που οφείλεται στον ανασυνδιασμό. Το φαινόμενο αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο συνολικός αριθμός γονιδίων και στα δύο χρωμοσώματα 16 να κυμαίνεται μεταξύ 0 μέχρι 7-8 και να οδηγήσει στην γενετική ποικιλομορφία.



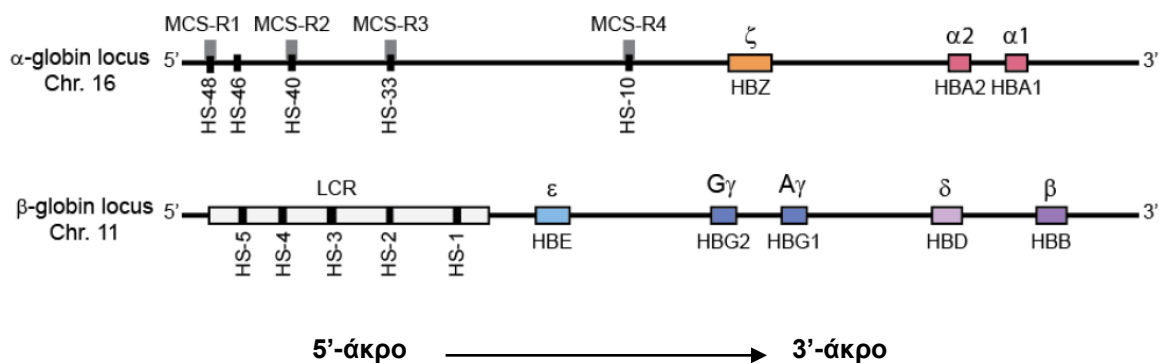
Εικόνα 10 Πολυγονιδιακά συμπλέγματα σφαιρινών

Το σύμπλεγμα των β-τύπου γονιδίων βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11 στην περιοχή p15.4 και περιλαμβάνει πέντε γονίδια. Αναλυτικότερα, εδράζονται το γονίδιο που κωδικοποιεί την εμβρυονική σφαιρίνη ε, το γονίδιο της εμβρυϊκή σφαιρίνη γ, για την οποία υπεύθυνα είναι δύο πανομοιότυπα γονίδια Γγ και Αγ που έχουν προκύψει από διπλασιασμό του αρχικού και διαφοροποιούνται στο αμινοξύ στη θέση 136 καθώς το ένα διαθέτει το αμινοξύ γλυκίνη και το δεύτερο το αμινοξύ αλανίνη. Επιπρόσθετα, το γονίδιο της δ-σφαιρίνης και το γονίδιο της β-αλυσίδας σφαιρίνης. Οι σφαιρινικές αλυσίδες β-τύπου έχουν μέγεθος 146 αμινοξέων. Ανάμεσα στα γονίδια Αγ και δ βρίσκεται ένα ψευδογονίδιο, το ψβ.

Τα ψευδογονίδια που περιλαμβάνονται και στις δύο συστάδες γονιδίων εμφανίζουν ομοιότητα της τάξεως του 75-80% με τα φυσιολογικά, λειτουργικά γονίδια τόσο στην αλληλουχία των εξονίων όσο και στην αλληλουχία των ιντρονίων. Θεωρείται ότι έχουν προέλθει από φαινόμενα διπλασιασμού μέσα στα συμπλέγματα και λόγω μεταλλάξεων στο μεταφραστικό τους πλαίσιο ανάγνωσης, κυρίως μικρό-ελλειμμάτων και μικρο-διπλασιασμών, απενεργοποιήθηκαν.

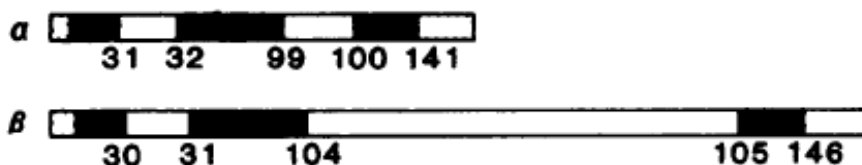
Ένα ακόμα χαρακτηριστικό και των δύο συμπλεγμάτων είναι η διάταξη των γονιδίων μέσα σε αυτά. Πιο συγκεκριμένα, βρίσκονται διατεταγμένα με τη σειρά που εκφράζονται κατά την ανάπτυξη. Τα γονίδια που βρίσκονται εγγύτερα στο 5'-άκρο εκφράζονται νωρίτερα κατά την ανάπτυξη του ανθρώπου ενώ τα γονίδια πλησιέστερα στο 3'-άκρο εκφράζονται στα τελικά στάδια της ανάπτυξης του εμβρύου.

Αξιολόγηση της νέας παραλλαγής c.92+7A>G (IVS-I-7A>G) στο γονίδιο της β-σφαιρίνης (HBB) μέσω μελέτης RNA με RT-PCR σε ανώριμα ερυθρά κύτταρα



Εικόνα 11 Σειρά έκφρασης των σφαιρινών κατά την ανάπτυξη και ρυθμιστικά στοιχεία συμπλεγμάτων

Όλα τα γονίδια των σφαιρινών στον άνθρωπο διαθέτουν 3 εξόνια που διαχωρίζονται από 2 εσόνια (introns) ή παρεμβαλλόμενες αλληλουχίες (intervening sequences, IVS) χαρακτηριστικό που πιθανά οφείλεται στην κοινή τους προέλευση. Το πρώτο εσόνιο (IVSI) είναι μικρότερο από το δεύτερο (IVSII), τόσο στις α-τύπου όσο και στις β-τύπου αλυσίδες, με μέγεθος 122-130 ζεύγη βάσεων το πρώτο και 850-900 ζεύγη βάσεων το δεύτερο. Στις α-τύπου αλυσίδες το πρώτο εσόνιο βρίσκεται ανάμεσα στο 31 και 32 κωδικόνιο και το δεύτερο εσόνιο μεταξύ 99 και 100 κωδικονίου. Σε παρόμοιες θέσεις βρίσκονται και στις αλυσίδες β-τύπου, πιο συγκεκριμένα, το πρώτο IVS μεταξύ 30 και 31 κωδικονίου και το δεύτερο μεταξύ 104 και 105 κωδικονίου (εικ.11). Η διατήρηση της συγκεκριμένης δομής στα γονίδια των σφαιρινών, τόσο ανάμεσα στα γονίδια του ανθρώπου όσο και ανάμεσα στα διαφορετικά θηλαστικά, πιθανά να σχετίζεται με τη διατήρηση της δομής της πρωτεΐνης.



Εικόνα 12 Δομή α-τύπου και β-τύπου γονιδίων Μεταξύ κωδικονίου 31 και 32 όπως και 99 και 100 παρεμβάλλονται τα εσόνια στα γονίδια α-τύπου. Στα γονίδια β-τύπου τα εσόνια βρίσκονται μεταξύ κωδικονίου 30 και 31 και των κωδικονίων 104 και 105.

Τα εσόνια αφαιρούνται από το πρόδρομο mRNA και τα άκρα ενώνονται ώστε να δώσουν το ώριμο mRNA. Σημαντική προϋπόθεση για τη σωστή αφαίρεση των εσονίων είναι η ύπαρξη συγκεκριμένων συντηρημένων αλληλουχιών στα άκρα των εσονίων. Τα δινουκλεοτίδια GU και AG στο 5'-άκρο και στο 3'-άκρο, αντίστοιχα, απαιτούνται για τη ομαλή επεξεργασία του mRNA. Μεταλλάξεις στις αναφερόμενες αλληλουχίες οδηγούν στην εμφάνιση νοσηρών καταστάσεων όπως κάποιες μορφές θαλασσαιμίας (18,19).

1.4.3 Ρύθμιση γονιδίων σφαιρίνης

Τα γονίδια των σφαιρινών αποτελούν ένα καλό μοντέλο για την μελέτη και τη περιγραφή της ρύθμισης της έκφρασης των ευκαρυωτικών γονιδίων καθώς παρουσιάζουν μεταβολές στην έκφραση τους κατά την ανάπτυξη του ανθρώπου και, επιπρόσθετα, οι αλλαγές αυτές αφορούν μόνο τα κύτταρα της ερυθράς σειράς, άρα επιδεικνύουν ιστοειδικότητα.

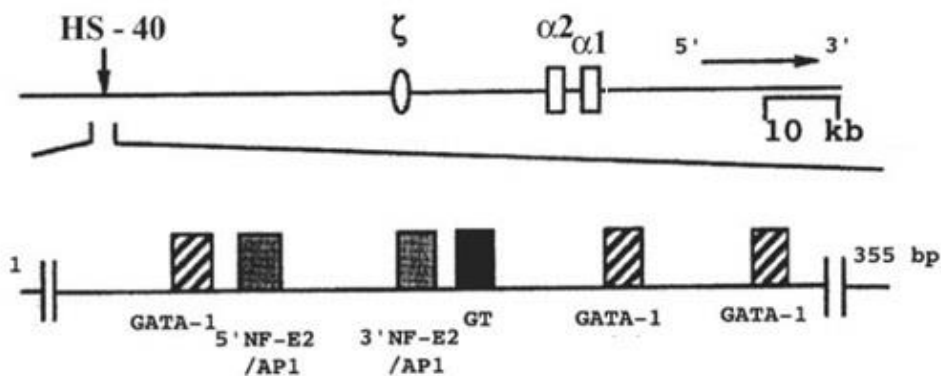
a) Σύμπλεγμα α-τύπου αλυσίδων:

Στη ρύθμιση των γονιδίων εμπλέκονται ενισχυτές, αλληλουχίες ανοδικά του υποκινητή, μεταγραφικοί παράγοντες καθώς και η δομή της χρωματίνης στην περιοχή όπου εδράζονται τα γονίδια.

Ανοδικά του γονιδίου που κωδικοποιεί τη ζ αλυσίδα εντοπίζονται υπερευαίσθητές θέσεις (hypersensitive sites, HS) στην DNase I (εικ.11) με κυριότερη την HS-40, η οποία συνδέεται με την ρύθμιση των γονιδίων των σφαιρινών. Η HS-40 εντοπίζεται 40kb ανοδικά της θέσης έναρξης μεταγραφής του γονιδίου της ζ αλυσίδας και εκτείνεται σε μήκος 350bp. Μελέτες έχουν δείξει ότι αποτελείται από 6 μοτίβα αλληλουχιών που αναγνωρίζονται από μεταγραφικούς παράγοντες (εικ.13). Οι μεταγραφικοί παράγοντες που προσδένονται στα μοτίβα αυτά έχουν κυρίως ερυθροειδική δράση. Αναλυτικότερα, οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι ο NF-E2 (nuclear factor erythroid 2), ο AP1 (activating protein 1), ο GATA-1 και ο SP1, μέλος της οικογένειας παραγόντων παρόμοιων με τον Krüppel,.

Η κύρια λειτουργία της HS-40 είναι ως ερυθροειδικός μεταγραφικός ενισχυτής. Οι υπόλοιπες HS στο σύμπλεγμα των α-τύπου γονιδίων δεν διαθέτουν κάποια παρόμοια ιδιότητα με την HS-40. Επιπρόσθετα, πιθανά διαθέτει κάποια λειτουργία στην διατήρηση της ανοιχτής μορφή της χρωματίνης.

Η HS-40 και οι ερυθροειδικοί μεταγραφικοί παράγοντες που προσδένονται στα μοτίβα που διαθέτει, ρυθμίζουν τη έκφραση τόσο του γονιδίου για την α αλυσίδα όσο και για τη ζ αλυσίδα στα ερυθροκύτταρα.



Εικόνα 13 Μοτίβα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων στην περιοχή του ενισχυτή HS-40

Τα γονίδια των α-σφαιρινών ρυθμίζονται τόσο σε επίπεδο ιστού όσο και σε αναπτυξιακό επίπεδο. Όπως έχει αναλυθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο, στην αρχή της ανάπτυξης εκφράζεται η ζ αλυσίδα ενώ σε επόμενο στάδιο μεταβαίνει στην έκφραση της α αλυσίδας. Η ρύθμιση αυτής της μετάβασης πραγματοποιείται με την συνεισφορά τόσο της HS-40 όσο και αλληλουχιών στο 5'- και 3'-άκρο των γονιδίων καθώς και το ίδιο το μετάγραφο.

Αναλυτικότερα, περιλαμβάνονται πλαίσια TATA, CAAT, CACC ανοδικά του υποκινητή στο 5'-άκρο, τα οποία συνδέονται με ερυθροειδικούς παράγοντες όπως ο GATA και ο Sp1. Επιπρόσθετα, η αποσιώπηση του γονιδίου της ζ αλυσίδας πραγματοποιείται μέσω της αλληλεπίδρασης τόσο του υποκινητή με μεταγραφικούς παράγοντες όσο και με το 3'-άκρο. Σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, το 3'-UTR άκρο του mRNA της ζ-σφαιρίνης αδυνατεί να σταθεροποιήσει το μόριο στο στάδιο της ωρίμανσης του ερυθρού κυττάρου με αποτέλεσμα να οδηγείται στην αποδόμηση και να δίνει τη θέση του στο σταθερότερο πλέον mRNA της α-αλυσίδας.

Το σύμπλεγμα των γονιδίων που κωδικοποιεί τις αλυσίδες α-τύπου βρίσκεται 130kb από το τελομερές του χρωμοσώματος 16. Στην περιοχή κοντά στα γονίδια των αλυσίδων α-τύπου υπάρχουν περιοχές πλούσιες σε G+C καθώς και αμεθυλίωτες CpG νησίδες. Τα δύο αυτά χαρακτηριστικά υποδηλώνουν ότι η περιοχή, στην οποία περιλαμβάνεται και το σύμπλεγμα των γονιδίων των αλυσίδων α-τύπου, αποτελεί πάντα μεταγραφικά ενεργή χρωματίνη.

Στις τελομερικές περιοχές είναι συχνό να περιλαμβάνονται γονίδια τα οποία συμβάλλουν σημαντικά στο κυτταρικό μεταβολισμό και την κυτταρική φυσιολογία με χαρακτηριστικά παραδείγματα το γονίδιο MPG που κωδικοποιεί μια μεθυλο-πουρινική γλυκοζυλάση, ένα ένζυμο επιδιόρθωσης του DNA, και το γονίδιο *POLR3K* που κωδικοποιεί μια υπομονάδα της RNA πολυμεράσης III. Γονίδια που συμμετέχουν στη φυσιολογική ανάπτυξη και επιβίωση του κυττάρου είναι απαραίτητο να εκφράζονται συνέχεια με αποτέλεσμα να διατηρείται ανοιχτή η περιοχή της χρωματίνης όπου εδράζονται.

Εκτός από την ανοιχτή χρωματίνη λόγω γονιδίων ή αλληλουχιών κοντά σε γονίδια, έχει παρατηρηθεί ότι στα ερυθροκύτταρα, οι ιστόνες κοντά στις περιοχές των συμπλεγμάτων και των δύο τύπων σφαιρινών, είναι υπερακετυλιωμένες που αποτελεί μια ακόμα ένδειξη για μεταγραφικά ενεργή περιοχή (20,21). Όμως τα γονίδια σφαιρινών εκφράζονται μόνο στα ερυθροκύτταρα.

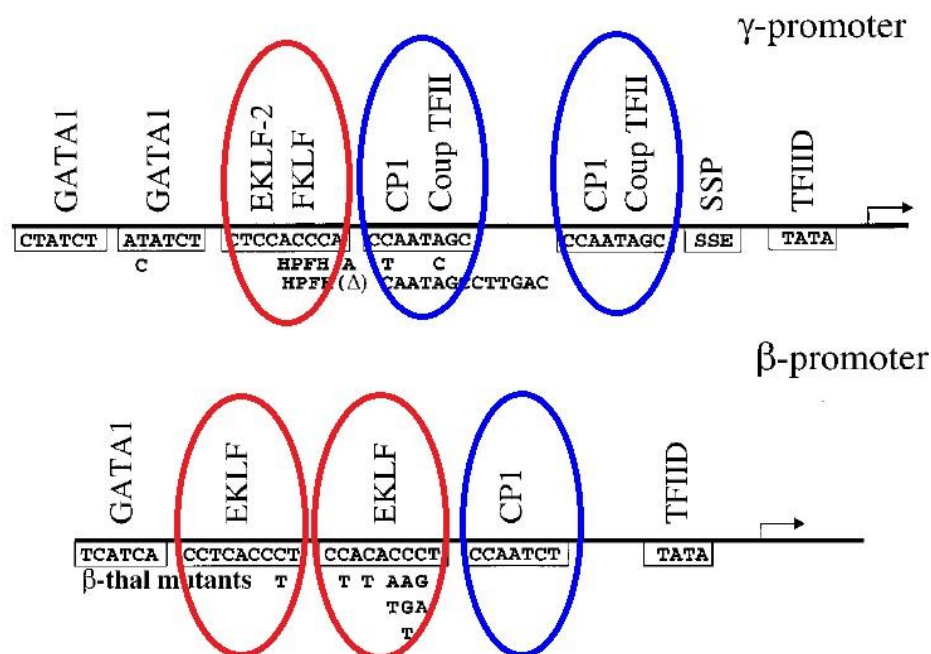
b) Σύμπλεγμα β-τύπου αλυσίδων:

Η ρύθμιση της έκφρασης των β-τύπου γονιδίων αποτελεί μια περίπλοκη διαδικασία. Απαιτείται η συμμετοχή μοτίβων αλληλουχιών του DNA, τόσο μέσα στην περιοχή των υποκινητών όσο και ανοδικότερα στο 5'-άκρο της των γονιδίων, μια πλειάδα μεταγραφικών παραγόντων καθώς και ενισχυτών ώστε να επιτευχθεί η ρύθμιση στην έκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν στο αντίστοιχο αναπτυξιακό στάδιο αλλά και στο συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο.

Οι υποκινητές των γονιδίων αποτελούνται από ένα σύνολο στοιχείων τα οποία αναγνωρίζονται από την RNA πολυμεράση II ώστε να καθοριστεί το σημείο έναρξης της μεταγραφής και να ξεκινήσει η διαδικασία. Τα στοιχεία που απαντώνται στους υποκινητές των γονιδίων των β-τύπου αλυσίδων είναι το πλαίσιο TATA, τα στοιχεία BRE, Inr και DPE και το μοτίβο ATAAA. Τα στοιχεία αυτά αναγνωρίζονται από μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι με τη σειρά τους προσελκύουν την RNA πολυμεράση II στον υποκινητή με αποτέλεσμα την έναρξη της μεταγραφής.

Οι υποκινητές των γονιδίων των σφαιρινών παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ομολογία ως προς την αλληλουχία τους αλλά διαθέτουν και ορισμένες διαφορές που ευθύνονται για την διαφορετική έκφραση σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα ρυθμιστικά πλαίσια CAAT και CACCC που απαιτούνται για την πλήρη έκφραση των σφαιρινών. Στον υποκινητή του γονιδίου της β-σφαιρίνης έχει

παρατηρηθεί η ύπαρξη ενός πλαισίου CAAT ενώ το πλαίσιο CACCC είναι διπλασιασμένο, σε αντίθεση με τον υποκινητή του γονιδίου της γ-σφαιρίνης όπου το πλαίσιο CACCC είναι σε ένα αντίγραφο ενώ το πλαίσιο CAAT είναι διπλασιασμένο (εικ.14). Τέτοιες διαφοροποιήσεις πιθανά να σχετίζονται με την αναπτυξιακή ρύθμιση. Επιπρόσθετα, μεταλλάξεις στα προαναφερθέντα στοιχεία οδηγούν στην εμφάνιση διαφόρων μορφών θαλασσαιμίας (22).



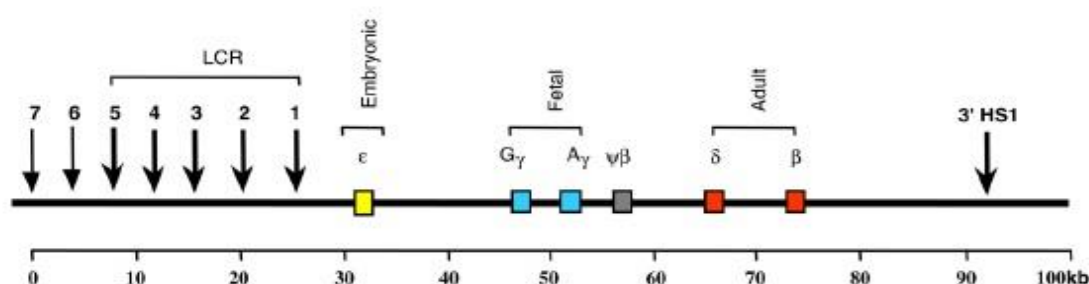
Εικόνα 14 Οργάνωση υποκινητών γονιδίων γ - και β -σφαιρίνης Διαφορές των ρυθμιστικών στοιχείων CACCC (κόκκινο κύκλο) και CAAT (μπλε κύκλο).

Αλληλουχίες ανοδικά της περιοχής του υποκινητή, στα γονίδια των σφαιρινών από τις θέσεις -40 έως -250, έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκονται στη λειτουργία του υποκινητή. Η ύπαρξη πλαισίων CAAT όπου προσδένονται πρωτεΐνες όπως οι NF- γ και CP1, οι οποίοι δρουν ως ενεργοποιητές. Τα πλαίσια CACC και GATA είναι σημαντικά καθώς συνδέονται με πρωτεΐνες που μετέχουν στη ερυθροειδική ενεργοποίηση των γονιδίων των σφαιρινών και την διαφοροποίησή τους κατά την ανάπτυξη.

Επιπρόσθετα, εκτός από τις αλληλουχίες που αναφέρθηκαν, στην έκφραση των γονιδίων σημαντική συσχέτιση παρουσιάζει και η ίδια η δομή της χρωματίνης στην περιοχή καθώς και το γονιδιακό περιβάλλον του συμπλέγματος, δηλαδή τα γονίδια που το πλαισιώνουν. Σε αντίθεση με τα γονίδια του α -τύπου, που όπως αναφέρθηκε παραπάνω, εδράζονται σε περιοχή της χρωματίνης που είναι συνεχώς ενεργή, τα γονίδια των αλυσίδων β -τύπου έχουν αυξημένη προσβασιμότητα μόνο στα κύτταρα στα οποία εκφράζονται, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται η ιστοειδική τους έκφραση.

Διαφοροποίηση, επίσης, παρουσιάζεται και στο γονιδιακό περιβάλλον που βρίσκονται τα συμπλέγματα αιμοσφαιρινών α-τύπου και β-τύπου. Όπως περιγράφεται παραπάνω, το σύμπλεγμα των αλυσίδων α-τύπου περιβάλλεται από γονίδια που συμμετέχουν στη φυσιολογική ανάπτυξη και επιβίωση του κυττάρου σε αντίθεση με το σύμπλεγμα των αλυσίδων β-τύπου που περιβάλλεται από γονίδια οσφρητικών υποδοχέων. Αναλυτικότερα, τα συγκεκριμένα γονίδια κωδικοποιούν υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνες στο οσφρητικό επιθήλιο. Συμπλέγματα οσφρητικών γονιδίων βρίσκονται διάσπαρτα στο γονιδίωμα και περιλαμβάνουν εκατοντάδες γονίδια και ψευδογονίδια. Το σύμπλεγμα που περιβάλλει τα γονίδια των αλυσίδων β-τύπου εκτείνεται σε μήκος 1 εκατομμυρίου βάσεων μετά το γονίδιο της β-αλυσίδας και 3 εκατομμύρια βάσεις από το γονίδιο της ε-αλυσίδας προς το κεντρομερίδιο.

Καθώς το σύμπλεγμα των σφαιρινών β-τύπου βρίσκεται σε γονιδιακό περιβάλλον που επηρεάζεται κυρίως από την έκφραση των γονιδίων των οσφρητικών υποδοχέων, θα πρέπει να διαθέτει ένα ισχυρό ενισχυτή με σκοπό να καθορίζει την ερυθροειδική έκφραση των γονιδίων και να περιορίζει την επίδραση της ρύθμισης των υποδοχέων στα γονίδια των σφαιρινών. Στα μέσα της δεκαετίας του 1980 ταυτοποιήθηκε μια σειρά υπερευαίσθητων θέσεων στη DNase I ανοδικά του γονιδίου της ε-αλυσίδας και προτάθηκε ότι αυτές οι HS ήταν υπεύθυνες για την ενεργοποίηση του γενετικού τόπου των β-τύπου αλυσίδων. Οι αναφερόμενες HS αποτελούν μια περιοχή απομακρυσμένου ελέγχου (distal control region) κριτικής σημασίας για τη ρύθμιση της έκφρασης των β-τύπου σφαιρινών και ονομάζονται περιοχή ελέγχου γενετικού τόπου (locus control region, LCR) (εικ.15). Η LCR έχει βρεθεί και σε άλλα γονίδια, όμως, πρώτη φορά ταυτοποιήθηκε στον γενετικό τόπο των β-τύπου σφαιρινών (23-26).



Εικόνα 15 Διαγραμματική απεικόνιση του συμπλέγματος γονιδίων των σφαιρινών β-τύπου

Αναλυτικότερα, η LCR περιλαμβάνει 5 HS θέσεις που εντοπίζονται 6 με 20kb ανοδικά του γονιδίου της β-σφαιρίνης. Η υπερευαισθησία που επιδεικνύουν στην DNase I οι HS1-4 υπομονάδες της LCR αφορά μόνο τα ερυθροκύτταρα σε αντίθεση με την HS5 που έχει βρεθεί σε πολλαπλές κυτταρικές σειρές. Η κύρια λειτουργία της LCR είναι η ενίσχυση της δραστηριότητας και πιθανά το «άνοιγμα» της χρωματίνης στην περιοχή των β-τύπου γονιδίων ώστε να επιτρέπεται η έκφραση των γονιδίων.

Κάθε HS θέση διαθέτει ένα «πυρήνα» με μήκος περίπου 250 νουκλεοτιδίων και αποτελείται από ένα συνδυασμό DNA μοτίβων που αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς παράγοντες κυρίως ερυθροειδικούς. Τρία μοτίβα DNA αλληλουχιών είναι παρόντα και στις 5 HS θέσεις :

1. GATA μοτίβο, στο οποίο προσδένεται ο μεταγραφικός παράγοντας GATA-1.
2. CACCC μοτίβο, αναγνωρίζεται από μια οικογένεια πρωτεϊνών δακτύλων ψευδαργύρου που περιλαμβάνει τον EKLF και Sp1.
3. AP-1 ή MARE (Maf recognition element), στο οποίο προσδένονται πρωτεΐνες που περιέχουν μοτίβο φερμουάρ λευκίνης όπως ο NF-E2 και ο AP1.

Η λειτουργία της κάθε HS θέσης διαφέρει, πιο συγκεκριμένα, μόνο η HS2 συμπεριφέρεται ως κλασικός ενισχυτής σε αντίθεση με τις HS3 και HS4 ενισχύουν τη δράση της HS2. Η λειτουργία της HS1 ακόμα παραμένει αδιευκρίνιστη ενώ η HS5 έχει το ρόλο του «μονωτή» για τη συστάδα των β-γονιδίων.

Επιπρόσθετα, η LCR φαίνεται ότι επηρεάζει και το χρόνο της αντιγραφής των γονιδίων κατά τη μίτωση , καθώς ο γενετικός τόπος των β-τύπου αλυσίδων αντιγράφεται αργότερα κατά τη φάση S του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα στα οποία δεν εκφράζεται σε αντίθεση με τα ερυθρά κύτταρα όπου η αντιγραφή τους πραγματοποιείται στην αρχή της φάσης S. Το φαινόμενο αυτό πιθανά να οφείλεται στο γεγονός ότι η χρωματίνη στο συγκεκριμένο σημείο είναι ανενεργή στους υπολοίπους κυτταρικούς τύπους ενώ στα ερυθροκύτταρα στα οποία είναι ενεργοποιημένη έχει τη δυνατότητα να αντιγραφεί στην αρχή της φάσης S.

Ένα σημαντικό ερώτημα αναφορικά με την LCR που παραμένει ακόμα αναπάντητο τα τελευταία 10 με 15 χρόνια είναι σχετικά με τον ακριβή μηχανισμό δράσης της. Έχουν προταθεί τέσσερα μοντέλα:

- Βρόγχου (looping) (εικ.16A)

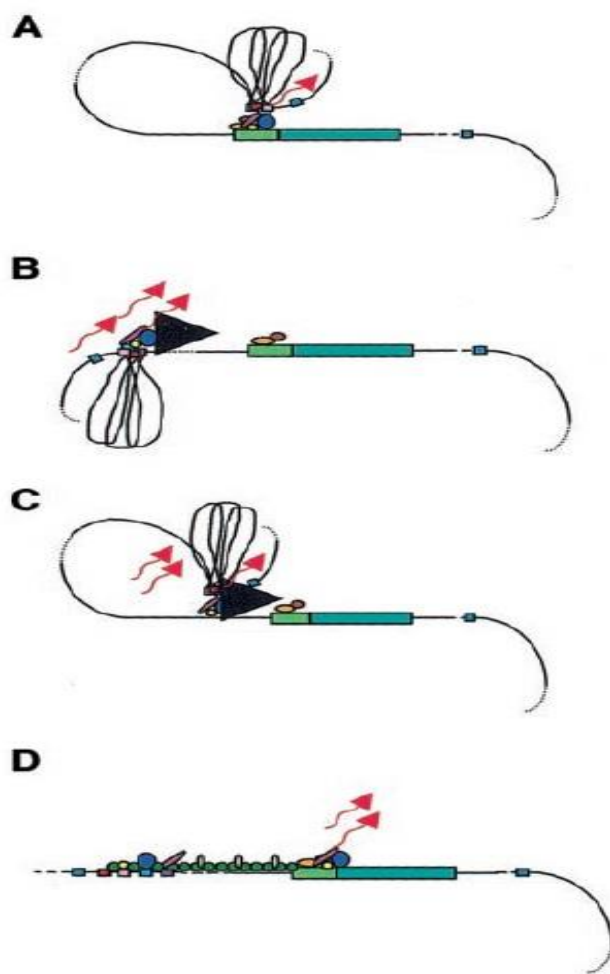
- Ανίχνευσης (tracking) (ει.16B)
- Διευκολυνόμενης ανίχνευσης (facilitated tracking) (εικ.16C)
- Σύνδεσης (linking) (εικ.16D)

Το μοντέλο του βρόγχου προτείνει την αναδίπλωση των HS θέσεων της LCR με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός συμπλόκου όπου ο πυρήνας των HS συνδέεται με μεταγραφικούς παράγοντες. Η δομή αυτή αναδιπλώνεται δημιουργώντας βρόγχο και πλησιάζει τον κατάλληλο υποκινητή. Ενισχυτές και συνενεργοποιητές σταθεροποιούν τη δομή και ενισχύουν τη έκφραση του γονιδίου.

Το μοντέλο της ανίχνευσης βασίζεται στην αναγνώριση των αλληλουχιών της LCR από ερυθροειδικούς και γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο το οποίο μεταναστεύει ανιχνεύοντας τον μεταγραφικό μηχανισμό. Ο μηχανισμός είναι στον υποκινητή του γονιδίου που απαιτείται η έκφραση του στο συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο αλλά δεν είναι ολοκληρωμένος. Με την άφιξη του συμπλόκου, συντίθεται ο ολοκληρωμένος μηχανισμός και ξεκινάει η μεταγραφή.

Το μοντέλο της διευκολυνόμενης ανίχνευσης αποτελεί ένα συνδυασμό του μοντέλου του βρόγχου της ανίχνευσης. Πραγματοποιείται η δημιουργία βρόγχου μεταξύ HS-μεταγραφικών παραγόντων, αναδιπλώνονται και ξεκινάει το σύμπλοκο την ανίχνευση του κατάλληλου υποκινητή, στον οποίο έχουν προσδεθεί οι απαραίτητες πρωτεΐνες.

Τέλος, το μοντέλο της σύνδεσης βασίζεται στην πρόσδεση πρωτεϊνών, ειδικές για το συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο, σε κατάλληλες αλληλουχίες στη χρωματίνη ώστε να οριστεί το τμήμα που πρέπει να μεταγραφεί. Συνδετικές πρωτεΐνες προσδένονται στο γονίδιο το οποίο θα ξεκινήσει να μεταγράφεται.



Εικόνα 16 Πιθανά μοντέλα του LCR Με μπλε χρώμα απεικονίζεται το γονίδιο, με πράσινο ο υποκινητής του, οι HS θέσεις με κόκκινα μικρά κουτάκια και οι μεταγραφικοί παράγοντες με χρωματιστά οβάλ και κυκλικά μικρά σχήματα.

Η διαδικασία της μεταστροφής κατά την ανάπτυξη του ανθρώπου, που περιγράφηκε πρωτύτερα, εμπλέκει δύο μηχανισμούς στους οποίους συμμετέχουν η LCR και πληθώρα μεταγραφικών παραγόντων και αλληλουχιών. Αναλυτικότερα, ο πρώτος μηχανισμός αναφέρεται στην ανταγωνιστική ρύθμιση. Τα γ-γονίδια και β-γονίδιο ανταγωνίζονται για την αλληλεπίδραση με την LCR. Κατά το εμβρυικό στάδιο ευνοείται η αλληλεπίδραση με τα γ-γονίδια και την LCR ενώ το β-γονίδιο είναι πλήρως απενεργοποιημένο. Σε αντίθεση, στο ενήλικο στάδιο, το β-γονίδιο ευνοείται να αλληλεπιδράσει με την LCR ενώ το γ-γονίδιο αποσιωπάται πλήρως. Επιπλέον, η ανταγωνιστική δράση μεταξύ των ε-γονιδίου με τα γ-γονίδια εμπλέκεται στην αποσιώπηση του β-γονιδίου.

Ο δεύτερος μηχανισμός αναφέρεται στην αυτόνομη αποσιώπηση. Η διαδικασία αυτή βασίζεται κυρίως στην δράση των αποσιωπητών στα ε-γονίδιο και γ-γονίδια. Οι

μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες με την αρνητική δράση προσδένονται σε αλληλουχίες στους υποκινητές ή σε κοντινές περιοχές. Η αποσιώπηση της έκφρασης του ε-γονιδίου πιθανά να επιτυγχάνεται με την αναστολή της αλληλεπίδρασης μεταξύ του ε-γονιδίου και της LCR. Το μοτίβο CACCC πιθανά να σχετίζεται με την αυτόνομη αποσιώπηση του γ-γονιδίου.

Σε συνέχεια με τα μέχρι τώρα δεδομένα, μια ευρεία γκάμα μεταγραφικών παραγόντων εμπλέκονται στην γονιδιακή ρύθμιση και μεταστροφή των γονιδίων των αιμοσφαιρινών. Στο τμήμα αυτό θα αναφερθούν ενδεικτικά 3: GATA-1, EKLF και NF-E2. Ο GATA-1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας δακτύλου ψευδαργύρου με ενεργοποιητική όσο και αποσιωπητική δράση σε γονίδια που περιλαμβάνουν το μοτίβο GATA το οποίο αναγνωρίζει και προσδένεται. Τα GATA μοτίβα βρίσκονται στα συμπλέγματα των γονιδίων α-τύπου και β-τύπου αλυσίδων καθώς και σε άλλα γονίδια που εμπλέκονται στην ερυθροποίηση. Ο συγκεκριμένος μεταγραφικός παράγοντας είναι κριτικής σημασίας για την ωρίμανση των ερυθρών αιμοσφαιρίων αλλά και την αποσιώπηση του γ-γονιδίου (27).

Ο παράγοντας παρόμοιος με τον Krüppel (erythroid Krüppel-like factor, EKLF) αναγνωρίζει και προσδένεται στο μοτίβο CACCC. Το β-γονίδιο, όπως έχει αναφερθεί ήδη, διαθέτει το μοτίβο CACCC διπλασιασμένο με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται σε μεγαλύτερο βαθμό από το γ-γονίδιο και οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της μεταστροφής από το γ-γονίδιο στο β-γονίδιο. Ο EKLF αλληλεπιδρά με σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, έχοντας ως πιθανή συνέπεια τη συμμετοχή του στη ρύθμιση της χρωματίνης. Παρά το γεγονός ότι εκφράζεται σε όλα τα στάδια της ερυθροποίησης, δεν είναι απαραίτητος για την εμβρυονική ερυθροποίηση.

Τέλος, ο παράγοντας NF-E2, ο οποίος προσδένεται στο μοτίβο AP1 ή MARE, είναι μια πρωτεΐνη με μοτίβο φερμουάρ λευκίνης που σχηματίζει ετεροδιμερή. Ο συγκεκριμένος μεταγραφικός παράγοντας συμμετέχει στην ερυθροποίηση, στην ωρίμανση των ερυθροκυττάρων και στην έκφραση των σφαιρινών α- και β-τύπου.

1.5 Αιμοσφαιρινοπάθειες

Με το πέρασμα των χρόνων, η μελέτη των διαταραχών της αιμοσφαιρίνης αποτέλεσε πολύτιμη πηγή πληροφοριών τόσο για την κυτταρική και μοριακή βιολογία όσο και για την παθοφυσιολογία και τις κληρονομούμενες διαταραχές. Μέχρι σήμερα πάνω από 1000 διαταραχές στη σύνθεση και δομή της αιμοσφαιρίνης έχουν ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί. Οι διαταραχές αυτές προκύπτουν από μεταλλάξεις στα γονίδια των σφαιρινών με αποτέλεσμα τη δημιουργία βλαβών κατά τη σύνθεση ή αλλαγή στη δομή των υπομονάδων της αιμοσφαιρίνης, καθώς και βλάβες στη διαλυτότητα της αιμοσφαιρίνης, τη μη φυσιολογική πρόσδεση του οξυγόνου και τέλος, αλλαγές στο κοίλωμα που βρίσκεται η αίμη. Οι αιμοσφαιρινοπάθειες συνθέτουν μια ετερογενή ομάδα μονογονιδιακών διαταραχών που χωρίζονται σε 3 αλληλεπικαλυπτόμενες υποομάδες:

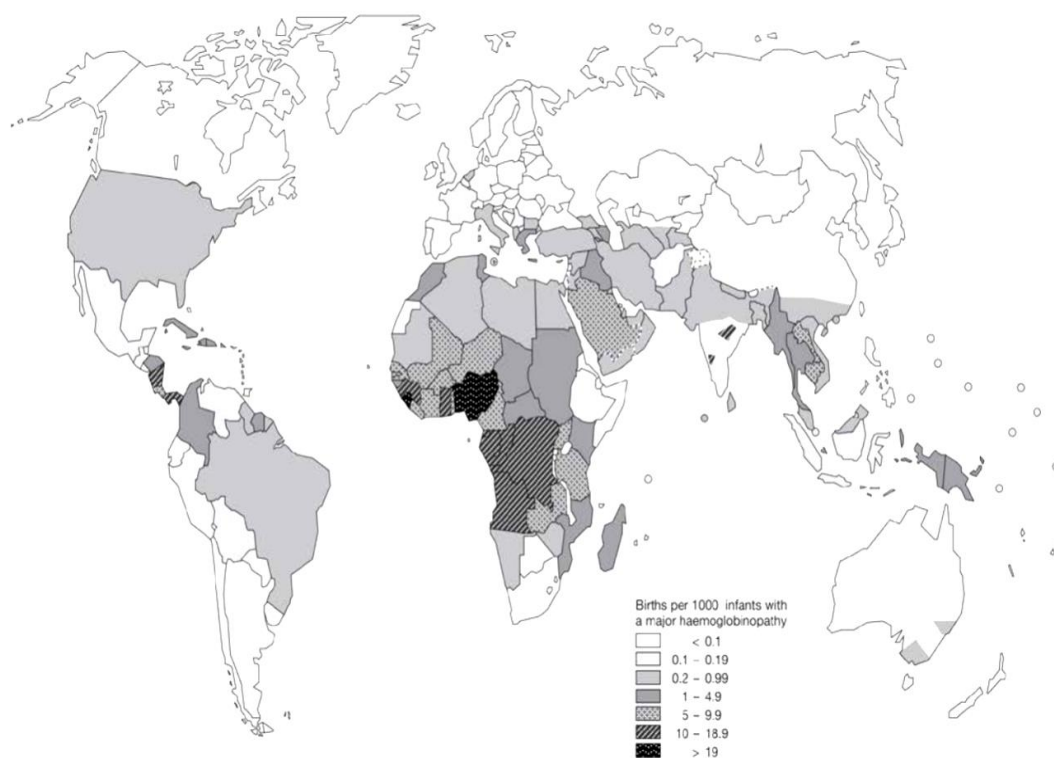
1. Δομικές παραλλαγές
2. Καταστάσεις υψηλής αντοχής της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (high persistence of fetal hemoglobin, H_{PFH}) στην ενηλικίωση
3. Θαλασσαιμίες

Το ~7% του παγκόσμιου πληθυσμού είναι φορείς διαφόρων κληρονομούμενων διαταραχών της αιμοσφαιρίνης, γεγονός που τις καθιστά το πιο συχνό μονογονιδιακό νόσημα παγκοσμίως και κληρονομούνται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο εκτός ορισμένων εξαιρέσεων. Κάθε χρόνο γεννιούνται 300.000-400.000 νεογνά με σοβαρές διαταραχές της αιμοσφαιρίνης. Ο υψηλός επιπολασμός των συγκεκριμένων διαταραχών πιθανά να οφείλεται στο πλεονέκτημα των φορέων να προστατεύονται από την θνησιμότητα που μπορεί να προκαλέσει η ελονοσία. Οι περιοχές με την υψηλότερη συχνότητα είναι η λεκάνη της Μεσογείου, η υποσαχάρια Αφρική, η Μέση Ανατολή, η νοτιοανατολική Ασία, η Ινδονησία και η Ινδία.

Η συχνότητα των φορέων ποικίλει μεταξύ των περιοχών που εμφανίζονται, μεταξύ του 3-10% , φτάνοντας και σε κάποιες περιπτώσεις αρκετά υψηλότερα ποσοστά με χαρακτηριστικό παράδειγμα κάποιες φυλές στην Ινδία που το ποσοστό των φορέων φτάνει το 80-90%. Άνιση κατανομή των φορέων παρατηρείται όχι μόνο μεταξύ των διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών αλλά και μέσα στην κάθε χώρα. Ορισμένα παραδείγματα αποτελούν η Ιταλία και η Κύπρος. Στην βόρεια Ιταλία το ποσοστό των φορέων είναι 1-2% ενώ στο νότιο τμήμα είναι ~12% και ο μέσος όρος σε όλη τη χώρα φτάνει το 15%. Στην Κύπρο, στο νοτιοανατολικό τμήμα του νησιού το ποσοστό των γονιδίων για την α⁰-θαλασσαιμία είναι ιδιαίτερα αυξημένο σε αντίθεση με το βόρειο όπου κυριαρχεί η δρεπανοκυτταρική αναιμία.

Αξιολόγηση της νέας παραλλαγής c.92+7A>G (IVS-I-7A>G) στο γονίδιο της β-σφαιρίνης (HBB) μέσω μελέτης RNA με RT-PCR σε ανώριμα ερυθρά κύτταρα

Λόγω των αυξημένων συχνοτήτων φορείας, διαφορετικές αιμοσφαιρινοπάθειες μπορεί να συγκληρονομηθούν με αποτέλεσμα να εμφανίζονται εξαιρετικά σύνθετοι γονοτύποι και κλινικοί φαινότυποι. Ένας ακόμα παράγοντας που αυξάνει την ετερογένεια των διαταραχών της αιμοσφαιρίνης είναι η μετανάστευση. Η συνεχή μετανάστευση των τελευταίων δεκαετιών έχει ως συνέπεια την εμφάνιση αιμοσφαιρινοπαθειών σε περιοχές στις οποίες δεν ήταν ενδημικές αλλά και την εισροή νέων μορφών από περιοχές με διαφορετικών προφίλ μεταλλάξεων, σε χώρες όπου ήδη υπήρχαν, αυξάνοντας την ετερογένεια στην εκάστοτε περιοχή (28-31).



Εικόνα 17 Παγκόσμια κατανομή των διαταραχών της αιμοσφαιρίνης με βάση τη γέννηση πασχόντων παιδιών ανά 1000 γεννήσεις

1.5.1 Δομικές παραλλαγές

Πάνω από 700 δομικές παραλλαγές της αιμοσφαιρίνης έχουν ταυτοποιηθεί. Η συχνότητα εμφάνισης τους ποικίλει στους διαφορετικούς πληθυσμούς, 3 παραλλαγές συναντώνται με μεγάλη συχνότητα σε διαφορετικούς πληθυσμούς:

1. HbS που είναι υπεύθυνη για τη δρεπανοκυτταρικής αναιμίας και εμφανίζεται στην υποσαχάρια Αφρική, στη Μεσόγειο, στη Μέση Ανατολή και σε κάποιες περιοχές της Ινδίας
2. HbC περιορίζεται στην Δυτική Αφρική και σε συγκεκριμένα τμήματα της Μεσογείου
3. HbE αποτελεί την πιο κοινή δομική παραλλαγή της αιμοσφαιρίνης και εμφανίζεται με μεγάλη συχνότητα σε τμήματα της Ινδίας, στην Μιανμάρ και στην Νότια Ασία.

Η εμφάνιση της πλειοψηφίας των παραλλαγών οφείλεται σε υποκατάσταση ενός αμινοξέως σε κάποια από τις αλυσίδες των σφαιρινών αλλά κάποιες σπάνιες περιπτώσεις παραλλαγών περιγράφονται επιμηκυνόμενες ή βραχείες αλυσίδες σφαιρίνης. Επιπρόσθετα, έχουν βρεθεί και περιπτώσεις υβριδισμού ή σύντηξης αλυσίδων σφαιρινών όπως η Hb Lepore που περιλαμβάνει τα δ- και β-γονίδια σφαιρίνης. Όλες οι περιπτώσεις παραλλαγών έχουν τη δομή α₂β₂ εκτός από τις Hb Bart και HbH που σχηματίζονται από ομοτετραμερή γ₄ και β₄, αντίστοιχα.

1.5.2 HRFH

Οι καταστάσεις υψηλής αντοχής της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης ή HRFH, αποτελούν μια ετερογενή ομάδα κληρονομούμενων ατελειών στην μεταστροφή από την παραγωγή της εμβρυικής στην παραγωγή της ενήλικης αιμοσφαιρίνης. Στην HRFH, το ποσοστό της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης ξεπερνάει το 1-2% που συναντάται φυσιολογικά στα ενήλικα άτομα. Ο αριθμός του υποπληθυσμού των ερυθροκυττάρων, που φυσιολογικά παράγουν την εμβρυική αιμοσφαιρίνη κατά την ενήλικη ζωή, υπόκεινται σε γενετικό έλεγχο, η ποσότητα της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης ποικίλει σε κάθε ασθενή γεγονός που συμβάλει στη διαφοροποίηση της επιβάρυνσης τους.

Οι περισσότερες μορφές HRFH οφείλονται σε απάλειφες στο σύμπλεγμα των γονιδίων των β-αλυσίδων ή σε σημειακές μεταλλάξεις σε περιοχές ανοδικά του υποκινητή ή στην καθαυτή περιοχή του υποκινητή των γονιδίων της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης. Σημειακές μεταλλάξεις σε περιοχές που προσδένονται μεταγραφικοί παράγοντες πιθανά να

εμπλέκονται στο μηχανισμό της μεταστροφής ή στην αποσιώπηση του γονιδίου της γ-αλυσίδας.

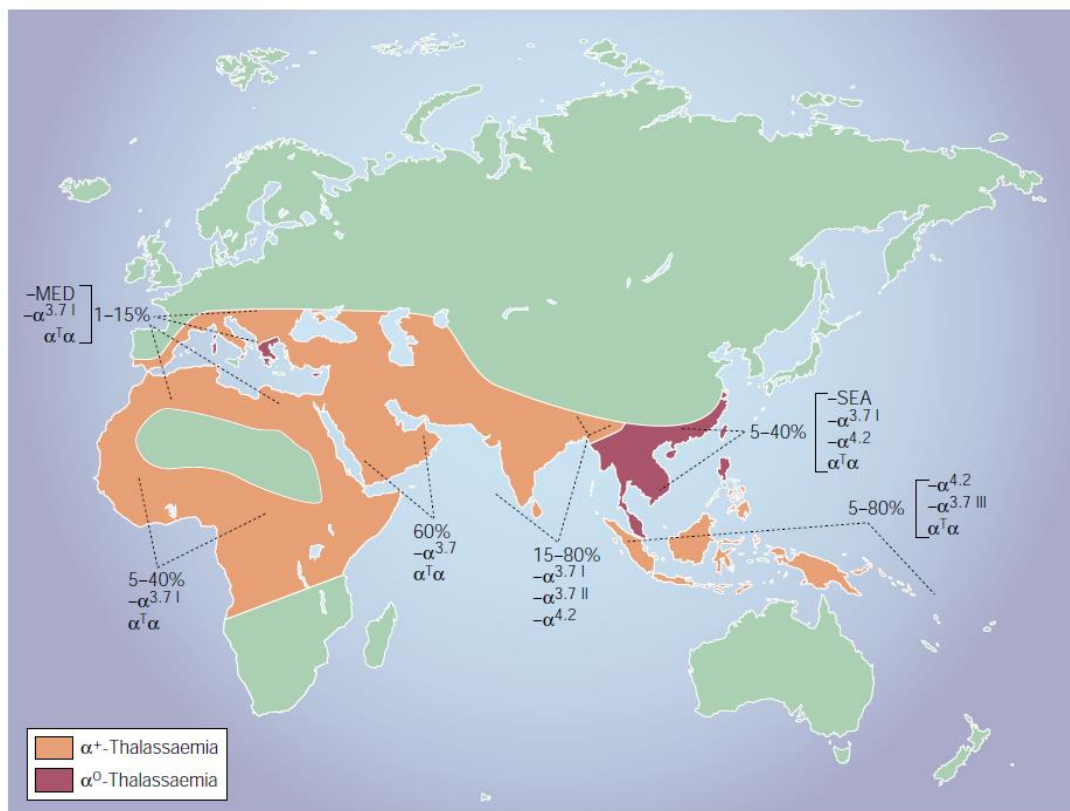
1.5.3 Θαλασσαιμίες

Οι Θαλασσαιμίες αποτελούν από τις πρώτες διαταραχές που χαρακτηρίστηκαν σε μοριακό επίπεδο. Βρίσκονται μεταξύ των λίγων γενετικών διαταραχών στις οποίες έχει κατανοηθεί η σχέση ανάμεσα στους διαφορετικούς κλινικούς φαινότυπους και τη μοριακή παθολογία τους. Αποτελούν μια ετερογενή ομάδα διαταραχών στη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης και χαρακτηρίζονται από την απουσία ή τη μειωμένη σύνθεση μιας ή περισσότερων αλυσίδων αιμοσφαιρινών (32).

a) α-Θαλασσαιμία:

Η α-Θαλασσαιμία χαρακτηρίζονται από την έλλειψη ή τη μειωμένη παραγωγή α-αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης. Είναι το αποτέλεσμα κυρίως ελλειμμάτων σε ένα ή περισσότερα γονίδια των α-σφαιρινών αλλά σπανιότερα δύναται να προκύψει και από σημειακές μεταλλάξεις. Περισσότερα από 80 διαφορετικά ελλείμματα ή σημειακές μεταλλάξεις έχουν συνδεθεί με την εμφάνιση διαφόρων μορφών α-Θαλασσαιμίας. Η α-Θαλασσαιμία κατηγοριοποιείται σε α⁺-Θαλασσαιμία, όπου υπάρχει μερική σύνθεση από το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, α⁰-Θαλασσαιμία, όπου το αλληλόμορφο που φέρει τη μετάλλαξη δεν παράγει καθόλου α-αλυσίδες, HbH νόσος, με έλλειμμα 3 γονιδίων, και τέλος, εμβρυικός ύδρωπας με Hb Bart's, στον οποίο και τα 4 α-γονίδια απουσιάζουν.

Το έλλειμμα ενός μόνο α-γονιδίου (ετεροζυγώτης α⁺) δεν σχετίζεται με σημαντικές αιματολογικές ανωμαλίες. Το στίγμα για α-Θαλασσαιμία χαρακτηρίζεται είτε από τον συνδυασμό ενός φυσιολογικού απλοτύπου με α⁺ ή α⁰ είτε από ομοζυγωτία για α⁺ (εικ. 18). Οι φορείς με έλλειμμα 2 γονιδίων εμφανίζουν ήπια υποχρωμική, μικροκυτταρική αναιμία. Το έλλειμμα των 2 γονιδίων αφορά τα δύο γονίδια του ίδιου χρωμοσώματος (cis) ή διαφορετικών χρωμοσωμάτων (trans) (ομοζυγώτης α⁺). Ο cis γονότυπος είναι πολύ συχνός στους ασιατικούς πληθυσμούς ενώ ο trans εμφανίζει μεγάλη συχνότητα σε άτομα με αφρικανική καταγωγή.



Εικόνα 20 Παγκόσμια κατανομή της α^+ και α^0 -Θαλασσαιμίας

Η νόσος αιμοσφαιρίνης Η (HbH disease) σχετίζεται με τη λειτουργία ενός α-γονιδίου και οι ασθενείς εμφανίζουν μέτρια αιμολυτική αναιμία και σπληνομεγαλία. Η εκτεταμένη συσσώρευση β-αλυσίδων οδηγεί τη δημιουργία ομοτετραμερών (β_4) ή αιμοσφαιρίνης Η (HbH). Η HbH είναι διαλυτή και ασταθής με αποτέλεσμα να κατακρημνίζεται καθώς γερνάνε τα ερυθροκύτταρα, σχηματίζοντας έγκλειστα που τραυματίζουν τα κύτταρα και μειώνουν τη διάρκεια ζωής τους.

Η απουσία και των τεσσάρων γονιδίων της α-αλυσίδας οδηγεί στην εμφάνιση του εμβρυικού ύδρωπα με αιμοσφαιρίνη Bart's, που αποτελείται από 4 γ-αλυσίδες, και δεν είναι συμβατός με τη ζωή. Το ομοτετραμερές αυτό είναι αναποτελεσματικό στη μεταφορά του οξυγόνου καθώς διαθέτει υψηλή συγγένεια με το οξυγόνο και δεν μπορεί να το απελευθερώσει στους ιστούς οδηγώντας τον οργανισμό σε υποξία με αποτέλεσμα τον εμβρυικό ύδρωπα.

Η εμφάνιση της α-Θαλασσαιμίας εκτός από τα ελλείμματα σε ορισμένες περιπτώσεις οφείλεται και σε σημειακές μεταλλάξεις που επηρεάζουν την έκφραση ενός α-γονιδίου. Οι μεταλλάξεις που επιδρούν στο α_2 γονίδιο επηρεάζουν περισσότερο την έκφραση των

α-γονιδίων καθώς το α₂ εκφράζεται 2 φορές περισσότερο από το α₁. Οι σημειακές μεταλλάξεις που έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα, πιθανά, να έχουν κάποια συσχέτιση με την επεξεργασία του RNA, με την μετάφραση του ή με τη σταθερότητα της πρωτεΐνης. Επιπρόσθετα, οι σημειακές μεταλλάξεις έχουν μεγαλύτερη επίδραση στο φαινότυπο από τα ελλείμματα –α καθώς έχει παρατηρηθεί ότι ελλείμματα στο α₂-γονίδιο οδηγούν σε αύξηση της σύνθεσης αλυσίδων από το α₁-γονίδιο ενώ σημειακές μεταλλάξεις στο α₂-γονίδιο, δεν εμφανίζεται αύξηση στην έκφραση του α₁-γονιδίου.

Ένα παράδειγμα σημειακής μετάλλαξης αποτελεί η αιμοσφαιρίνη Constant Spring (HbCs) που εμφανίζεται με μεγάλη συχνότητα στη νοτιοανατολική Ασία. Η HbCs προκαλείται από μια μετάλλαξη στο κωδικόνιο τερματισμού με αποτέλεσμα την αρνητική ρύθμιση του α₂ γονιδίου και τη δημιουργία μια επιμηκυμένης α-αλυσίδας, η οποία συσσωρεύεται σε χαμηλά επίπεδα στα κύτταρα. Η συγκληρονόμηση της προαναφερθείσας μετάλλαξης με α⁰ έλλειμμα, οδηγεί στην εμφάνιση μιας σοβαρότερης μορφής νόσου HbH.

b) β-Θαλασσαιμία:

Η β-Θαλασσαιμία χαρακτηρίζεται από ποσοτική μείωση στην παραγωγή της β-αλυσίδας, είτε με παντελή απουσία είτε με σημαντική μείωση της παραγωγής. Η σοβαρότητα της β-Θαλασσαιμία μπορεί να καθοριστεί με βάση τον τύπο του β αλληλόμορφου:

1. β⁰, στην οποία οι μεταλλάξεις έχουν απενεργοποιήσει πλήρως το β-γονίδιο με αποτέλεσμα να μην παράγεται η β-αλυσίδα.
2. β⁺, στην οποία παρατηρείται σημαντική μείωση στην παραγωγή της β-αλυσίδας.
3. β⁺⁺, η οποία χαρακτηρίζεται από ήπια μείωση στη σύνθεση της β-αλυσίδας.

Η β-Θαλασσαιμία κλινικά περιλαμβάνει 3 κύριες μορφές:

- i. Μείζων Θαλασσαιμία: οι ασθενείς είναι ομοζυγώτες ή σύνθετοι ετεροζυγώτες δύο β⁰-Θαλασσαιμίας αλληλόμορφα.
- ii. Ενδιάμεση Θαλασσαιμία: οι ασθενείς είναι ομοζυγώτες για το β⁺-Θαλασσαιμίας αλληλόμορφο ή σύνθετοι ετεροζυγώτες για ένα ήπιο β- αλληλόμορφο και ένα β⁰ αλληλόμορφο.
- iii. Ελάσσονα Θαλασσαιμία

Η μείωση στην παραγωγή της β-αλυσίδας έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση α-αλυσίδων. Η σοβαρότητα του φαινότυπου συχνά σχετίζεται με το ποσοστό της μη

ισορροπημένης σύνθεσης α- και μη α-αλυσίδων. Η συγκληρονόμηση της β-Θαλασσαιμίας με α-Θαλασσαιμία οδηγεί στην εμφάνιση ηπιότερου φαινοτύπου καθώς μειώνεται ο αριθμός των ελεύθερων α-αλυσίδων. Επιπρόσθετα, ένας κοινός πολυμορφισμός στην περιοχή του υποκινητή του γ-γονιδίου αυξάνει την σύνθεση της γ-αλυσίδας και κατά συνέπεια της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης HbF σε συνθήκες στρες κατά την ερυθροποίηση όπως συμβαίνει στην β-Θαλασσαιμία. Με αποτέλεσμα, συμβάλλει στην μείωση των ελεύθερων α-αλυσίδων οδηγώντας στην εμφάνιση ηπιότερου φαινότυπου.

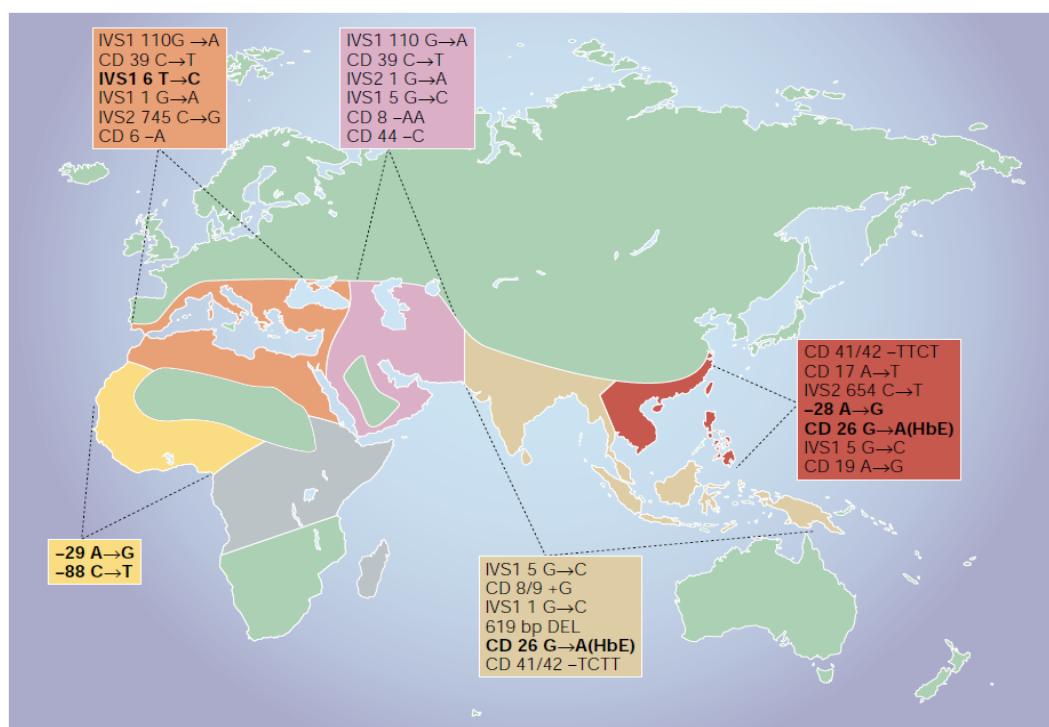
Σε αντίθεση με την α-Θαλασσαιμία και την αυξημένη σύνθεση της γ-αλυσίδας, η μεταβλητότητα του γενετικού τύπου της α-αλυσίδας έχει την ικανότητα να επιδεινώσει το φαινότυπο. Σε ορισμένα άτομα ο γενετικός τύπος του α-γονιδίου δεν είναι διπλασιασμένος όπως αναμένεται φυσιολογικά, αλλά είναι τριπλασιασμένος ή τετραπλασιασμένος (ααα ή αααα, αντίστοιχα). Η συγκεκριμένη αναδιάταξη δεν έχει κάποια επίπτωση στο φαινότυπο των φυσιολογικών ατόμων αλλά σε φορείς της β-Θαλασσαιμίας έχει παρατηρηθεί η εμφάνιση φαινότυπου ενδιάμεσης σοβαρότητας (33-35).

Περίπου το 3% του πληθυσμού παγκοσμίως είναι ετεροζυγώτες για τη β-Θαλασσαιμία. Η συχνότητα των φορέων εμφανίζει ένα ευρύ φάσμα τιμών που διαφοροποιείται ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή. Στη Μεσόγειο, το ποσοστό των φορέων φτάνει το 15% , γεγονός που πιθανά να οφείλεται στην επιλεκτική πίεση λόγω της ελονοσίας, σε αντίθεση με το Ιράκ και το Ιράν όπου το ποσοστό δεν ξεπερνά το 5%. Η μετανάστευση και οι γάμοι μεταξύ των διαφόρων εθνικών ομάδων έχουν αλλάξει τη γεωγραφική κατανομή της β-Θαλασσαιμίας. Οι χώρες τις βόρειας Ευρώπης αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα καθώς στις συγκεκριμένες η β-Θαλασσαιμία ήταν εξαιρετικά σπάνια. Με την εισροή πληθυσμών στους οποίους η β-Θαλασσαιμία είναι ενδημική, στις βόρειες χώρες της Ευρώπης, έχει ξεκινήσει η συχνή εμφάνιση της β-Θαλασσαιμίας.

Η διαφοροποίηση στην κατανομή των φορέων δεν παρατηρείται αποκλειστικά ανάμεσα σε μεγάλες γεωγραφικές περιοχές αλλά και μέσα σε κάθε κράτος. Η Ελλάδα διαθέτει κατά μέσον όρο 7.4% φορείς β-Θαλασσαιμίας. Σε περιοχές όπως η Θεσσαλία, η δυτική Πελοπόννησος, η δυτική Ήπειρος, η Ρόδος, η Λέσβος και η Κέρκυρα παρουσιάζουν συχνότητα φορέων που φτάνει το 15%. Σε αντίθεση, οι περιοχές σε υψηλότερο υψόμετρο και η Μακεδονία, το ποσοστό είναι σημαντικά χαμηλότερο.

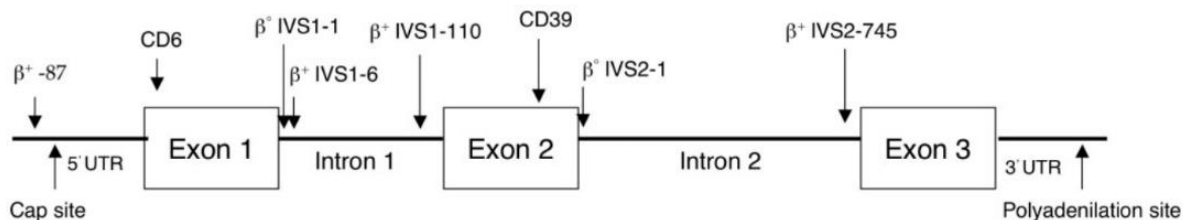
Αξιολόγηση της νέας παραλλαγής c.92+7A>G (IVS-I-7A>G) στο γονίδιο της β-σφαιρίνης (HBB) μέσω μελέτης RNA με RT-PCR σε ανώριμα ερυθρά κύτταρα

Το μοριακό υπόβαθρο της β-Θαλασσαιμίας είναι ιδιαίτερα ετερογενές. Περισσότερες από 200 μεταλλάξεις έχουν συσχετιστεί με την β-Θαλασσαιμία. Η πλειοψηφία τους περιλαμβάνει σημειακές μεταλλάξεις δηλαδή αλλαγή μιας βάσης, μικρά ελλείμματα ή ενθέσεις και , σε αντίθεση με την α-Θαλασσαιμία, τα ελλείμματα αποτελούν σπάνιες περιπτώσεις (εικ.21).



Εικόνα 21 Παγκόσμια κατανομή μεταλλάξεων της β-Θαλασσαιμίας Με έντονη γραφή είναι οι πιο συχνές μεταλλάξεις

Κάποιες από τις μεταλλάξεις της β-Θαλασσαιμίας εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα συγκριτικά με κάποιες άλλες. Μελέτες πληθυσμών έχουν δείξει ότι 20 αλληλόμορφα που συνδέονται με τη β-Θαλασσαιμία είναι υπεύθυνα για >80% των μεταλλάξεων. Επιπρόσθετα, κάθε πληθυσμός έχει το δικό του φάσμα μεταλλάξεων (εικ. 22)



Εικόνα 22 Οι πιο συχνές μεταλλάξεις στη Μεσόγειο

Η μεγάλη ετερογένεια στις μεταλλάξεις εμφανίζεται και στον ελληνικό πληθυσμό με περισσότερες από 30 μεταλλάξεις να έχουν περιγραφεί. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 μαζί με τη συχνότητα εμφάνισής τους στην Ελλάδα.

Πίνακας 1 Οι πιο συχνές μεταλλάξεις στο *HBB* γονίδιο στην Ελλάδα

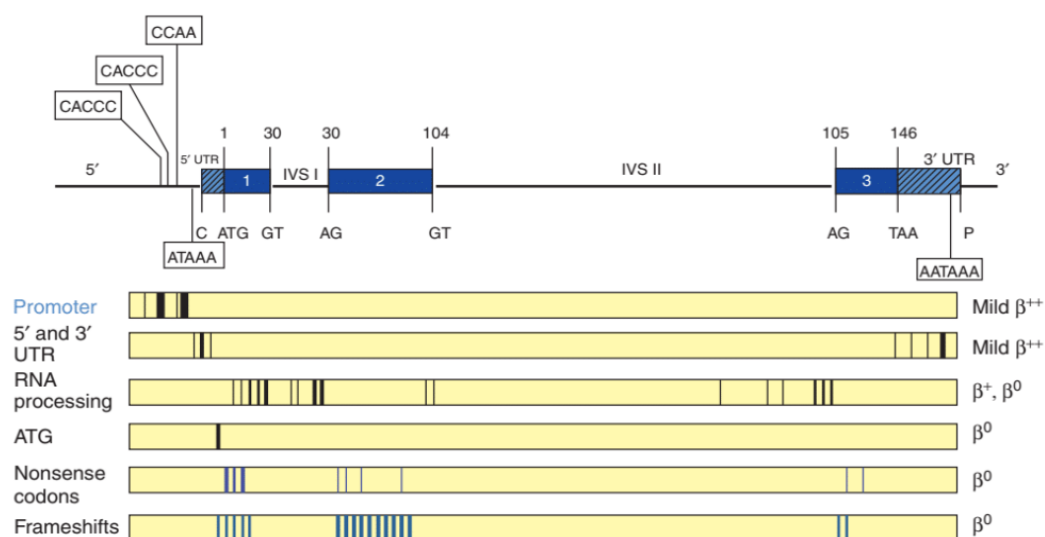
<u>Μεταλλάξεις</u>	<u>Συχνότητα</u>
c.93-21G>A (IVS-I-110)	43.8%
c.118C>T (Cd39)	18%
c.92+1G>A (IVS-I-1)	12.7%
c.92+6T>C (IVS-I-6)	6.9%
c.316-106G>A (IVS-II-745)	4.7%
c.315+1G>A (IVS-II-1)	3%

Οι μεταλλάξεις που έχουν περιγραφεί αφορούν αλληλουχίες στα εξόνια, στα εσόνια, στην περιοχή του υποκινητή καθώς το 5'- και 3'- αμετάφραστο άκρο. Η επίδραση τους είναι εμφανής σε κάθε στάδιο της έκφρασης του γονιδίου. Αναλυτικότερα, επηρεάζουν τόσο τη μεταγραφή του γονιδίου όσο την επεξεργασία του RNA και την μετάφραση του mRNA (εικ.23).

A. Μεταγραφή

Σημειακές μεταλλάξεις που πραγματοποιούνται σε συντηρημένες αλληλουχίες του υποκινητή όπως είναι τα CACCC και CAAT πλαίσια, το 5'-αμετάφραστο άκρο και τη θέση έναρξης της μεταγραφής έχουν ταυτοποιηθεί σε ασθενείς με ήπια μορφή β-Θαλασσαιμίας. Οι μεταλλάξεις του 5'-UTR είναι τόσο ήπιες που οι ετεροζυγώτες δεν εμφανίζουν κάποιο ιδιαίτερο φαινότυπο. Αναφορικά με τις μεταλλάξεις στη θέση έναρξη της μεταγραφής, δεν έχει διαλευκανθεί ακόμα αν οι μεταλλάξεις προκαλούν β-Θαλασσαιμία μέσω μείωσης της μεταγραφικής δραστηριότητας του β-γονιδίου ή μείωσης της αποτελεσματικότητας κάλυψης του 5'-άκρου του mRNA και της μετάφρασης του. Μεγάλη ετερογένεια παρατηρείται ανάμεσα στην ίδια ομάδα μεταλλάξεων. Ασθενείς με αφρικανική προέλευση ομόζυγοι για την -29 A>G εμφάνισαν ηπιότερο φαινότυπο από ασθενείς με κινεζική προέλευση ομόζυγους για την ίδια μετάλλαξη όπου έπασχαν από μείζονα Θαλασσαιμία. Η διαφοροποίηση που παρατηρείται στο φαινότυπο πιθανά να οφείλεται στο διαφορετικό χρωμοσωμικό υπόβαθρο των ασθενών.

Αξιολόγηση της νέας παραλλαγής c.92+7A>G (IVS-I-7A>G) στο γονίδιο της β-σφαιρίνης (HBB) μέσω μελέτης RNA με RT-PCR σε ανώριμα ερυθρά κύτταρα



Εικόνα 23 Σημειακές μεταλλάξεις που προκαλούν β-Θαλασσαιμία Απεικόνιση του β-γονιδίου στο πάνω μέρος της εικόνας. Τα πλαίσια που ακολουθούν εμφανίζουν τις διαφορετικές κατηγορίες μεταλλάξεων και οι γραμμές μέσα στα πλαίσια αναφέρονται στις θέσεις των διαφορετικών μεταλλάξεων.

B. Επεξεργασία mRNA

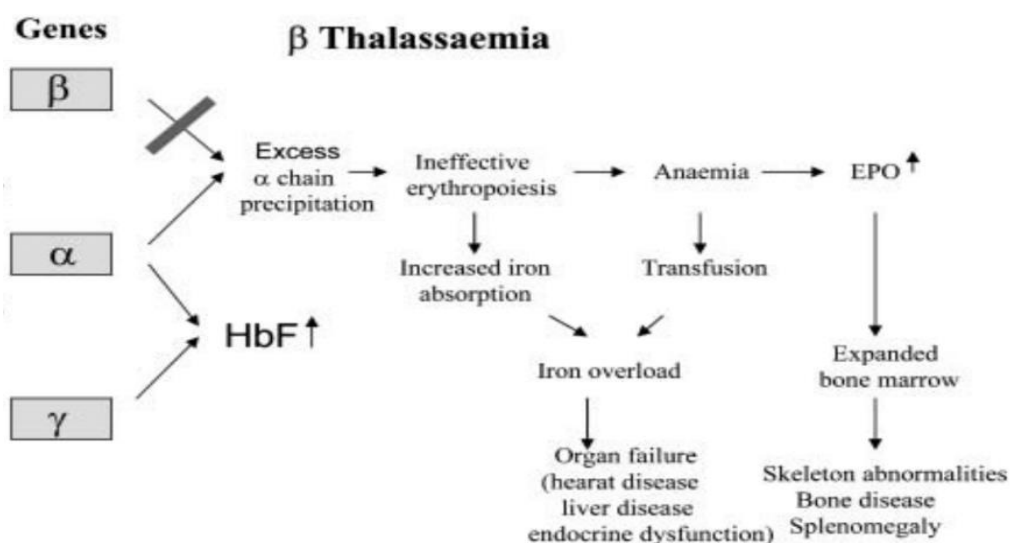
Ένα ευρύ φάσμα μεταλλάξεων επιδρά στην επεξεργασία του πρώιμου mRNA. Επηρεάζουν τα συντηρημένα δινουκλεοτίδια GU στο 5'-άκρο και AG στο 3'-άκρο στα χώρισμα των εξονίων-εσονίων, με αποτέλεσμα να καταργείται η φυσιολογική συρραφή και να δημιουργείται ο φαινότυπος β⁰-Θαλασσαιμίας. Μεταλλάξεις στις συναινετικές αλληλουχίες κοντά στα συντηρημένα δινουκλεοτίδια, δημιουργούν ελάττωμα κατά τη συρραφή και προκύπτει ηπιότερος φαινότυπος. Επιπρόσθετα, μεταλλάξεις μέσα στις εξονικές και εσονικές περιοχές μπορεί να ενεργοποιήσουν κρυφές θέσης συρραφής έχοντας ως συνέπεια την ανώμαλη συρραφή του mRNA και την εμφάνιση εύρους φαινοτύπων που κυμαίνονται από το ήπιο μέχρι το σοβαρό.

C. Μετάφραση

Έχουν ταυτοποιηθεί μεταλλάξεις και στις τρεις βάσεις του κωδικονίου έναρξης της μεταγραφής που σχετίζονται με την εμφάνιση της β⁰-Θαλασσαιμίας. Θεωρητικά θα ήταν πιθανό να ξεκίνησε η μετάφραση από κάποιο κωδικόνιο καθοδικότερα αλλά το ελλιπές mRNA αποδομείται μέσω της διαδικασίας αποσύνθεσης των mRNA μεσολαβούμενη από ανερμηνεύσιμο κωδικόνιο (nonsense-mediated mRNA decay, NMD).

Μια συχνή κατηγορία μεταλλάξεων περιλαμβάνει τα πρόωρα κωδικόνια λήξης. Το αποτέλεσμα των συγκεκριμένων μεταλλάξεων είναι ο πρόωρος τερματισμός της μετάφρασης ή η αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης. Παρατηρούνται στο κυτταρόπλασμα των ερυθροκυττάρων μικρές ποσότητες των μη φυσιολογικών μεταγράφων λόγω της

δράσης του μηχανισμού NMD. Προκαλούν την εμφάνιση β⁰ φαινοτύπου, με εξαίρεση τις μεταλλάξεις του εξονίου 3. Τα ελαττωματικά προϊόντα των μεταλλάξεων αυτών δεν υπόκεινται στο μηχανισμό NMD με αποτέλεσμα να οδηγούν στην εμφάνιση της μοναδικής κατηγορίας β-Θαλασσαιμίας που μεταβιβάζεται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο.



Εικόνα 24 Παθοφυσιολογία της β-Θαλασσαιμίας

Η πλειοψηφία των κλινικών ευρημάτων και τα συμπτώματων στη β-Θαλασσαιμία οφείλονται στην περίσσεια των α-αλυσίδων που συσσωρεύονται στα πρόδρομα ερυθροκύτταρα λόγω μεταλλάξεων στο β-γονίδιο από το οποίο παράγεται μειωμένη ή μηδενική ποσότητα β-αλυσίδων (εικ. 24). Η σύνθεση της γ-αλυσίδας να πραγματοποιείται, συνεχίζει σε ορισμένες περιπτώσεις, χωρίς όμως να επαρκεί για να συναγωνιστεί στην σύνθεση της α-αλυσίδας και τη δημιουργία της HbF. Το αποτέλεσμα είναι η κατακρήμνιση των ασταθών α-αλυσίδων στα πρόδρομα ερυθροκύτταρα και στους απογόνους τους.

Η αναιμία που παρατηρείται στη β-Θαλασσαιμία προκύπτει από την αναποτελεσματική ερυθροποίηση και από το μικρό προσδόκιμο επιβίωσης των ερυθροκυττάρων. Η μικρή διάρκεια επιβίωσης των ερυθροκυττάρων είναι αποτέλεσμα βλαβών στον κυτταροσκελετό τους που έχουν προκληθεί από ενεργές ρίζες οξυγόνου και ενισχύονται

από το σίδηρο, την ομάδα της αίμης και το αιμόχρωμα που προέρχονται από τις συσσωρευμένες α-αλυσίδες.

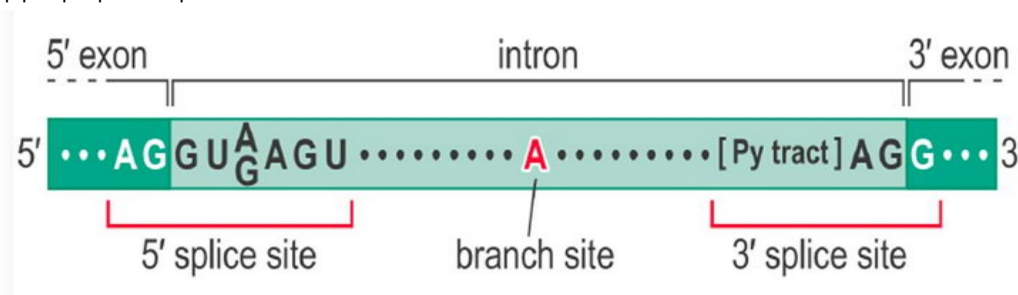
Η εμφάνιση της αναιμίας οδηγεί σε αύξηση της ερυθροποιητίνης και κατά συνέπεια την αύξηση του πολλαπλασιασμού των ερυθροκυττάρων και την επέκταση της ερυθροποίησης στο μυελό των οστών. Η αυξημένη αυτή δραστηριότητα στο μυελό των οστών δημιουργεί σκελετικές ανωμαλίες όπως η οστεοπενία, η οστεοπόρωση και οι παραμορφώσεις του προσώπου και του κρανίου.

Σε ορισμένους ασθενείς, η εκτεταμένη, εξωμυελική ερυθροποίηση συμβαίνει στον πνεύμονες και κοντά στην σπονδυλική στήλη. Επίσης, αποτελεί την κύρια αιτία εμφάνισης σπληνομεγαλίας. Παρατηρείται, ακόμα, αύξηση του όγκου του πλάσματος λόγω της σπληνομεγαλίας και από το αίμα του διευρυμένου μυελού, έχοντας ως συνέπεια την πρόκληση αιμοδιάλυσης και αναιμίας.

Η μετάγγιση αίματος και η αναποτελεσματική ερυθροποίηση δημιουργούν σταδιακά υπερφόρτωση σιδήρου η οποία αποτελεί την κύρια αιτία παθογένειας και θνησιμότητας στην β-Θαλασαιμία. Τα όργανα που είναι ευαίσθητα την τοξικότητα του σιδήρου εμφανίζουν βλάβες στις οποίες περιλαμβάνονται η καρδιακή ανεπάρκεια, η κίρρωση του ήπατος και οι ανωμαλίες του ενδοκρινικού συστήματος.

1.6 Συρραφή

Η συρραφή (splicing) του RNA αποτελεί τη διαδικασία κατά την οποία απομακρύνονται τα ιντρόνια (ή εσόνια) από το πρόδρομο mRNA και παράγεται το ώριμο mRNA. Τα όρια μεταξύ των ιντρονίων και εξονίων καθορίζονται από διατηρημένες αλληλουχίες που είναι απαραίτητες για τη σωστή συρραφή του mRNA και καλούνται συναινετικές αλληλουχίες. Το όριο μεταξύ εξονίου-ιντρονίου (5'-άκρο ιντρονίου) διαθέτει μια χαρακτηριστική αλληλουχία που καλείται 5' θέση συρραφής (splice site) ή θέση δότη. Αντίστοιχα, το όριο μεταξύ ιντρονίου-εξονίου (3'-άκρο ιντρονίου) φέρει επίσης μια χαρακτηριστική αλληλουχία που καλείται 3' θέση συρραφής ή θέση δέκτη (εικ.25).

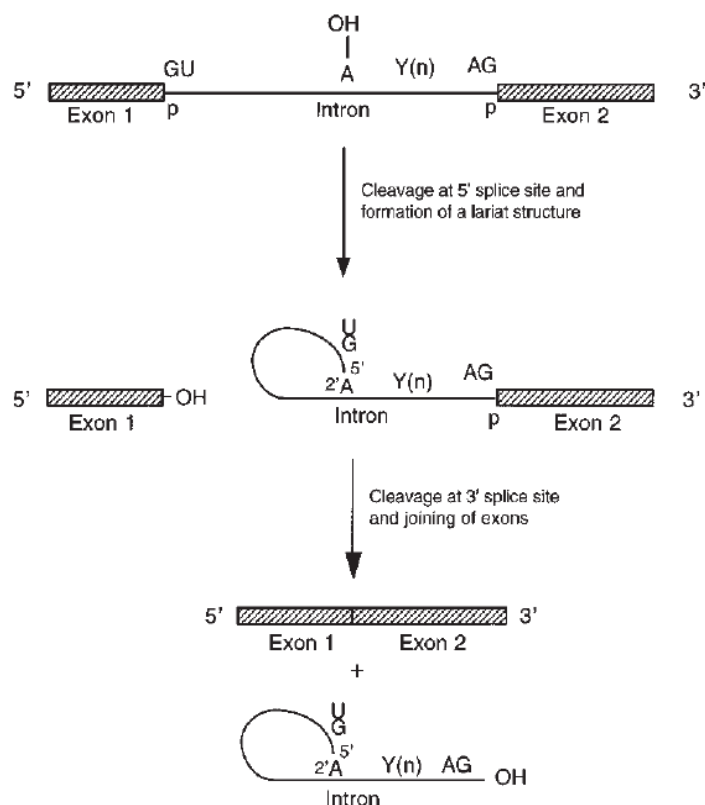


Εικόνα 25 Συναινετικές αλληλουχίες στα όρια ιντρονίων-εξονίων

Οι περισσότερο συντηρημένες αλληλουχίες είναι η -GU στη 5' θέση συρραφής και η -AG στη 3' θέση συρραφής. Επιπρόσθετα, μια αλληλουχία απαραίτητα για τη σωστή είναι η θέση σημείου διακλάδωσης (branch point site) και ακολουθείται από μια περιοχή πλούσια σε πυριμιδίνη (Py tract). Το κατάλοιπο αδενοσίνης που περιλαμβάνεται στη θέση σημείου διακλάδωσης αποτελεί και αυτό μια ιδιαίτερα συντηρημένη θέση.

Αναφορικά με το μηχανισμό της συρραφής, πραγματοποιείται σε δύο στάδια (εικ.26). Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την πυρηνόφιλη προσβολή της φωσφορυλομάδας της συντηρημένης γουανίνης στη 5' θέση συρραφής από την 2'-υδροξυλομάδα του συντηρημένου καταλοίπου αδενοσίνης στη θέση διακλάδωσης. Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα να απελευθερωθεί το 5'-άκρο του εξονίου. Στο δεύτερο στάδιο, η ελεύθερη 3'-υδροξυλομάδα του 5'-άκρου του εξονίου προσβάλλει τη φωσφορυλομάδα της 3' θέσης συρραφής. Με την δεύτερη αυτή αντίδραση, συρράπτονται μαζί τα δύο εξόνια και ελευθερώνεται το ιντρόνιο.

Το σωματίο συρραφής (spliceosome) είναι υπεύθυνο για την πραγματοποίηση των παραπάνω αντιδράσεων και αποτελείται από 150 πρωτεΐνες και 5 RNA. Τα πέντε RNA, σχηματίζει το καθένα σύμπλοκο με πρωτεΐνες και ονομάζονται μικρές πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (small nuclear ribonuclear proteins, snRNPs). Οι snRNPs αναγνωρίζουν την 5' θέση συρραφής, τη θέση διακλάδωσης και τις φέρνουν κοντά. Επίσης, συμμετέχουν στη διάσπαση και σύνδεση του RNA. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η U1 snRNP και η U2AF, από τις οποίες η πρώτη αναγνωρίζει τη 5' θέση συρραφής ενώ η δεύτερη προσδένεται στο πολυπυριμιδικό τμήμα μεταξύ της θέσης διακλάδωσης και της 3' θέσης συρραφής.



Εικόνα 26 Μηχανισμός συρραφής

Κριτικής σημασίας για την αντίδραση αποτελούν και παράγοντες διαφορετικοί από τις snRNPs. Οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν ρυθμιστές που ευνοούν την αναγνώριση των θέσεων συρραφής καθώς και παράγοντες που ανταγωνίζονται τη δράση των θετικών ρυθμιστών και τις θέσεις πρόσδεσης των U1 snRNP και U2AF.

Η ικανότητα του σωματίου συρραφής να αναγνωρίζει τις φυσιολογικές θέσεις συρραφής καθορίζεται από τις συναινετικές αλληλουχίες στις θέσεις συρραφής. Πιο συγκεκριμένα, κύρια αιτία αποτελεί η αλληλεπίδραση των συναινετικών αλληλουχιών με τους παράγοντες συρραφής. Η συναινετική αλληλουχία 5'-CAG/GUAAGU-3' στην 5'θέση συρραφής εμφανίζει συμπληρωματικότητα με το 5'-άκρο της U1 snRNP. Αντίθετα, η επιλογή των 3' θέσεων συρραφής είναι λιγότερο κατανοητές. Ένας παράγοντας που επιδρά στην ικανότητα αναγνώρισης των 3' θέσεων συρραφής είναι η απόσταση μεταξύ του σημείου διακλάδωσης και της 3' θέσης συρραφής.

Μια ευρεία γκάμα μεταλλάξεων που επηρεάζουν τη συρραφή έχει μελετηθεί. Οι αλλαγές αυτές επηρεάζουν τη συρραφή με μείωση της λειτουργικότητας ή ειδικότητας των θέσεων συρραφής, αλλαγές στη συναινετική αλληλουχία ή αλλαγές στη φυσιολογική σειρά των εξονίων. Μεταλλάξεις στο γονίδιο της β-σφαιρίνης που επηρεάζουν τη συρραφή διαταράσσουν τις θέσεις συρραφής, τις συναινετικές

αλληλουχίες ή ενεργοποιούν κρυφές θέσεις συρραφής (cryptic splice sites) μέσα σε ιντρονικές όσο και εξονικές περιοχές.

Οι κρυφές θέσεις συρραφής αποτελούν αλληλουχίες που παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με τις φυσιολογικές θέσεις συρραφής. Με σκοπό να αποφευχθεί η συρραφή στις κρυφές θέσεις, ο μηχανισμός της συρραφής έχει εξελιχθεί με τέτοιο τρόπο ώστε να διατηρείται η πιστότητα στη διαδικασία, γεγονός που αποδεικνύεται από την αναποτελεσματική ικανότητα έναρξης συρραφής στις κρυφές θέσεις συρραφής. Τα προϊόντα λαθών στις θέσεις συρραφής σε ορισμένες περιπτώσεις είναι «ανεχτά» από το κύτταρο και δεν επιτελούν κάποια λειτουργία. Επιπρόσθετα, ορισμένα που φέρουν πρώιμο κωδικόνιο λήξης καταστρέφονται από το μηχανισμό NMD.

Η φύση της μετάλλαξης, που πραγματοποιείται στην 5' θέση συρραφής, επιδρά στην χρησιμότητα μιας κρυφής 5' θέσης συρραφής που ενεργοποιείται, καθώς επηρεάζει τη επιλογή της. Επιπρόσθετα, η επιλογή μιας κρυφής θέσης δεν αποτελεί ένα πλήρως τυχαίο γεγονός αλλά ρυθμίζεται από την φύση του υποκινητή του γονιδίου, cis-δρώντες παράγοντες και το γενετικό υπόβαθρο του κυττάρου. Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε από παρατηρήσεις σχετικά με διαφοροποιημένα πρότυπα συρραφής μεταξύ ασθενών και κυτταρικών κλώνων.

Αναφορικά με το γονίδιο της β-σφαιρίνης, οι μεταλλάξεις που επηρεάζουν τις περισσότερες συντηρημένες περιοχές -GU και -AG στις 5' και 3' θέσεις συρραφής, αντίστοιχα, καταργούν τελείως τη φυσιολογική συρραφή με αποτέλεσμα να μην παράγεται φυσιολογικό β mRNA και να εμφανίζεται ο φαινότυπος που χαρακτηρίζει το β⁰ αλληλόμορφο. Οι μεταλλάξεις αυτές αφορούν την μονονουκλεοτιδική αντικατάσταση κάποιων από τις δύο βάσεις ή μικρά ελλείμματα που τις περιλαμβάνουν. Η μετάλλαξη IVS-I-1G>A ή T στην θέση 1 του ιντρονίου 1 καταργεί τη φυσιολογική θέση συρραφής ομοίως και οι μεταλλάξεις μεταξύ των σημείων ένωσης των ιντρονίου 1/εξονίου 2 και εξονίου 2/ιντρονίου 2. Επίσης, η μετάλλαξη στη θέση 1 του ιντρονίου 2 από G σε A απενεργοποιεί τη φυσιολογική συρραφή, οδηγώντας στην παραγωγή δύο μη φυσιολογικών μεταγράφων και στην εμφάνιση φαινοτύπου β⁰-Θαλασαιμίας.

Μεταλλάξεις στην συναινετική αλληλουχία συμβάλουν στην εμφάνιση μη φυσιολογικά συρραμένου mRNA με το φαινότυπο να κυμαίνεται από ήπιο έως σοβαρό. Η μετάλλαξη IVS-I-5G>C,T ή A μειώνει τη σωστή συρραφή και ενεργοποιεί κρυφές θέσεις συρραφής. Η IVS-I-6C>T εμφανίζει ηπιότερη επίδραση στη συρραφή, όμως σχετίζεται και σοβαρότερες μορφές γεγονός που εξαρτάται από το γενετικό υπόβαθρο του ατόμου. Η IVS-1-110 είναι η αντικατάσταση βάσης που ταυτοποιήθηκε το 1981 στην β-

Θαλασσαιμία. Ενεργοποιεί μια κρυφή θέση συρραφής 19 βάσεις πριν από τη φυσιολογική 3' θέση συρραφής. Με την συγκεκριμένη μετάλλαξη μόνο το 10-20% από το παραγόμενο mRNA είναι φυσιολογικό και ως εκ τούτου εμφανίζεται σοβαρή μορφή β-Θαλασσαιμίας.

Οι κρυφές θέσεις συρραφής μπορούν να ενεργοποιηθούν και από μεταλλάξεις μέσα στα εξόνια. Στο β-γονίδιο των σφαιρινών, 3 μεταλλάξεις στο εξόνιο 1 είναι υπεύθυνες για την ενεργοποίηση κρυφών θέσεων συρραφής. Η CD24 GGT->GGA είναι μια σιωπηλή μετάλλαξη σε αντίθεση με τις CD26 GAG->AAG και CD27 GCC->TCC οι οποίες κωδικοποιούν τις σφαιρίνες HbE και Hb Κνωσσός, αντίστοιχα. Στις δύο τελευταίες μεταλλάξεις, δεν χρησιμοποιούνται πολύ οι κρυφές θέσεις συρραφής, με αποτέλεσμα να παράγεται επαρκής ποσότητα φυσιολογικά συρραμένου mRNA και να εμφανίζεται ηπιότερος φαινότυπος β-Θαλασσαιμίας.

1.7 Σκοπός της εργασίας

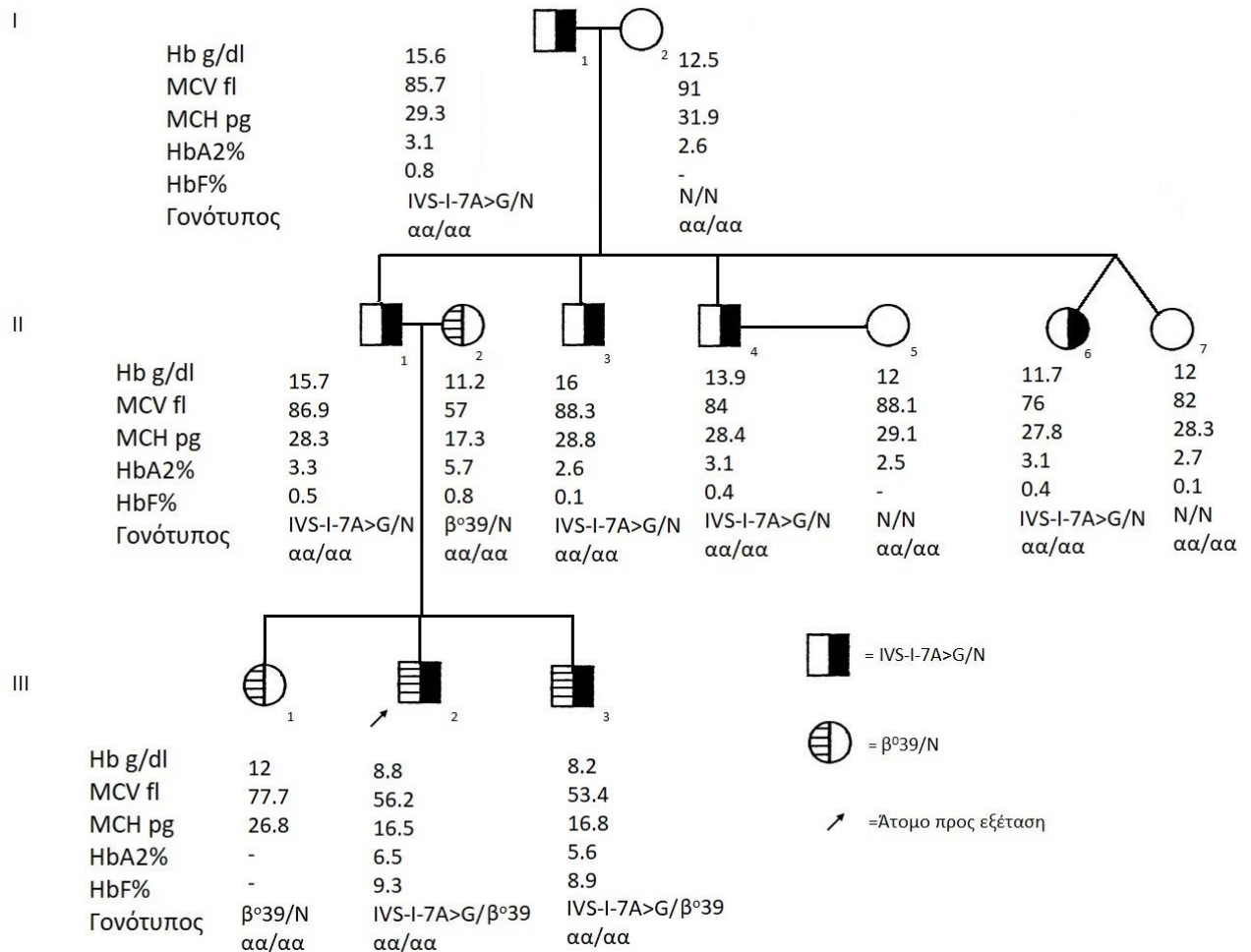
Τα γονίδια των σφαιρινών στον άνθρωπο αποτελούν μοντέλο μελέτης των μοριακών μηχανισμών καθώς η διαταραχές τους στην εκδήλωση μιας νόσου. Οι αιμοσφαιρινοπάθειες αποτελούν το πιο κοινό μονογονιδιακό νόσημα παγκοσμίως . Οι μεταλλάξεις που είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση των αιμοσφαιρινοπαθειών συνδέονται τόσο με την έκφραση των γονιδίων όσο και με την επεξεργασία του RNA και την μετάφραση του. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η παραλλαγή c. 92+7A>G (IVS-I-7A>G) στο γονίδιο της β-σφαιρίνης σε επίπεδο RNA σε ανώριμα ερυθρά κύτταρα. Το παιδί που έφερε την παραλλαγή σε διπλή ετεροζυγωτία, έχει αιματολογικά ευρήματα που ήταν πιθανά ενδεικτικά για μελλοντική εκδήλωση της ενδιάμεσης β-Θαλασσαιμίας. Η συγκεκριμένη παραλλαγή είναι πολύ σπάνια και δεν έχει μελετηθεί ο συσχετισμός της με αλλαγές στη διαδικασία της συρραφής του RNA. Σύμφωνα με *in silico* προγράμματα, η παραλλαγή IVS-I-7A>G δεν συνδέεται με αλλαγές στη συρραφή του mRNA αλλά μια πιο σωστή και ολοκληρωμένη απόδειξη επιτυγχάνεται με την πειραματική μελέτη του RNA από περιστατικά που φέρουν την σπάνια παραλλαγή.

2. Ιστορικό οικογένειας

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ένα παιδί με αιματολογικά ευρήματα που ήταν πιθανά ενδεικτικά για μελλοντική εκδήλωση της ενδιάμεσης β-Θαλασσαιμίας. Από τον έλεγχο του DNA βρέθηκε ότι είχε το γονότυπο *HBB*: c.[118C>T]+[92+7A>G] (cd39C>T/IVS-I-7A>G) στο γονίδιο της β-σφαιρίνης. Στην εικόνα 27 παρουσιάζεται το γενεαλογικό δένδρο του παιδιού στο οποίο εμφανίζονται ορισμένα αιματολογικά στοιχεία καθώς και ο γονότυπος για το γονίδιο της α- και β-σφαιρίνης των ατόμων. Στον Πίνακα 2 που ακολουθεί, παρατίθενται τα πλήρη αιματολογικά δεδομένα των ατόμων.

Η γονοτύπηση του περιστατικού και των μελών της οικογένειας του έγινε με τις μεθόδους GAP-PCR, restriction enzyme PCR για τα α-γονίδια, ενώ για το β-γονίδιο ARMS-PCR, HRMA και επιβεβαίωση των μεταλλάξεων/παραλλαγών με αλληλούχιση κατά Sanger (41-44).

Αξιολόγηση της νέας παραλλαγής c.92+7A>G (IVS-I-7A>G) στο γονίδιο της β-σφαιρίνης (HBB) μέσω μελέτης RNA με RT-PCR σε ανώριμα ερυθρά κύτταρα



Εικόνα 27 Γενεαλογικό δένδρο του ατόμου προς μελέτη

Πίνακας 2 Αιματολογικά δεδομένα και γονοτυπικά στοιχεία των μελών της οικογένειας

A/A	Ημ/νια Γέννησης	RBC (x10 ⁶ / μl)	Hb (g/dl)	HCT (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	RDW (%)	HbA ₂ (%)	HbF (%)	Γονότυπος β	Γονότυπος α	Σίδηρος (μg/dl)	Έγκλειστα HbH	Φερριτίνη Ορού (μg/dl)
I-1	10/7/1957	5.33	15.6	45.7	85.7	29.3	34.2	14.1	3.1	0.8	IVS-I- 7A>G/N	αα/αα	98	-	103.2(ng/ml)
I-2	8/1/1963	4.13	12.5	37.5	91	31.9	33.1	14.7	2.6	-	N/N	αα/αα	63	-	78.6(ng/ml)
II-1	12/12/1983	5.53	15.7	48.1	86.9	28.3	32.6	13.7	3.3	0.5	IVS-I- 7A>G/N	αα/αα	165	αρνητικά	100
II-2	12/6/1981	6.45	11.2	36.8	57	17.3	30.4	17.7	5.7	0.8	β ⁰ 39/N	αα/αα	111	αρνητικά	17
II-3	15/6/1985	5.47	16	48.2	88.3	28.8	32.6	14.4	2.6	0.1	IVS-I- 7A>G/N	αα/αα	149	-	132.5
II-4	6/3/1990	4.90	13.9	41.2	84	28.4	33.7	13.7	3.1	0.4	IVS-I- 7A>G/N	αα/αα	57	αρνητικά	119

Αξιολόγηση της νέας παραλλαγής c.92+7A>G (IVS-I-7A>G) στο γονίδιο της β-σφαιρίνης (HBB) μέσω μελέτης RNA με RT-PCR σε ανώριμα ερυθρά κύτταρα

A/A	Ημ/νια Γέννησης	RBC (x10 ⁶ / μl)	Hb (g/dl)	HCT (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	RDW (%)	HbA ₂ (%)	HbF (%)	Γονότυπος β	Γονότυπος α	Σίδηρος (μg/dl)	Έγκλειστα HbH	Φερριτίνη Ορού (μg/dl)
II-5	28/6/1986	4.12	12	36.3	88.1	29.1	33.1	-	2.5	-	N/N	αα/αα	23	-	50
II-6	10/1/1999	4.35	11.7	35	76	27.8	35.5	14.5	3.1	0.4	IVS-I- 7A>G/N	αα/αα	77.4	-	12.1
II-7	10/1/1999	4.08	12	36.2	82	28.3	34.5	13.7	2.7	0.1	N/N	αα/αα	162	-	13.9
III-1	5 (ετών)	4.49	12	35.5	77.7	26.8	34	13.3	-	-	β ⁰ 39/N	αα/αα	-	-	-
III-2	3/7/2015	5.35	8.8	30	56.2	16.5	29.4	22.5	6.5	9.3	IVS-I- 7A>G/ β ⁰ 39	αα/αα	125	Λεπτά σε αρκετά ερυθρά	-
III-3	7/3/2017	4.87	8.2	26	53.4	16.8	31.4	20.3	5.6	8.9	IVS-I- 7A>G/ β ⁰ 39	αα/αα	68	-	92

3. Μέθοδοι και υλικά

Με σκοπό να διερευνηθούν οι πιθανές επιπτώσεις στη συρραφή του mRNA από την παραλλαγή c.92+7A>G, αρχικά έπρεπε να πραγματοποιηθούν καλλιέργειες ανώριμων ερυθροκυττάρων από ολικό αίμα, ώστε να μπορεί να ληφθεί το ολικό mRNA σε ικανή ποσότητα. Στην συνέχεια, με την αντίστροφη μεταγραφή μετατρέπεται σε cDNA το επιθυμητό mRNA και αναλύεται με PAGE, αλληλούχιση και F-PCR.

3.1 Αξιολόγηση της παραλλαγής *HBB:c.92+7A>G*

Η αξιοποίηση της αλληλούχισης επόμενης γενιάς, την τελευταία δεκαετία, έχει ως αποτέλεσμα την ραγδαία αύξηση της καταγραφής παραλλαγών στο ανθρώπινο γονιδίωμα και την ανάδειξη ενός προβλήματος που αφορά την σωστή αξιολόγηση τόσο των νέων δεδομένων όσο και των παλαιότερων και τον συσχετισμό τους με την εμφάνιση παθολογικού φαινότυπου.

Για τη σωστή αξιολόγηση και κατανόηση των παραλλαγών καθώς και τη συμβολή τους στην εμφάνιση μιας γενετικής ασθένειας απαιτείται η πλήρωση ορισμένων κριτηρίων όπως αυτά που παρατίθενται από το ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics). Τα προαναφερθέντα κριτήρια αφορούν τη χρήση :

1. Μελετών οικογενειακού διαχωρισμού (family segregation studies) για τον καθορισμό την παθογένειας μιας παραλλαγής και το συσχετισμό της με την εμφάνιση μιας ασθένειας σε μια οικογένεια.
2. Μελετών για τη συχνότητα εμφάνισης στον πληθυσμό
3. *In-silico* μελετών
4. Πειραματικές μελέτες

Στην παρούσα μελέτη, έγινε ανάλυση στην οικογένεια του υπό μελέτη ατόμου και την εμφάνιση της παραλλαγής c.92+7A>G. Αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων που σχετίζονται με γενετικές παραλλαγές (ClinVar, dbSNP, Variant Effect Predictor της Ensembl, HbVar) και τον συσχετισμό της c.92+7A>G με παθολογικό φαινότυπο. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε χρήση *in-silico* προγραμμάτων (Human Splicing Finder) για την πρόβλεψη των επιπτώσεων στη συρραφή από την παραλλαγή (46,47).

3.2 Πρωτόκολλο ημιστερεής καλλιέργειας μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος για τη δημιουργία αποικιών της ερυθράς σειράς (BFU-E)

Το πρωτόκολλο ημιστερεής καλλιέργειας μονοπύρηνων κυττάρων βασίζεται στην παρουσία αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα και με την παρουσία συγκεκριμένων αναπτυξιακών παραγόντων πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε ώριμα κύτταρα της ερυθράς σειράς (48).

- 1) Λήψη 10ml περιφερικού αίματος σε αντιπηκτικό EDTA.
- 2) Αραίωση 1:1 με ρυθμιστικό διάλυμα PBS και αναδεύονται καλά ώστε να μην πέσουν τα κύτταρα στον πυθμένα του σωληναρίου.
- 3) Σε ξεχωριστό σωληνάριο προστίθενται Ficoll ίσης ποσότητας με το αραιωμένο αίμα, ώστε να διαχωριστούν τα διάφορα συστατικά του αίματος.
- 4) Ρίχνεται το αίμα με το PBS στη Ficoll αργά στο τοίχωμα για να μην διαταραχθεί η στιβάδα της Ficoll και αναμιχθούν οι δύο στιβάδες μεταξύ τους (Ficoll-αίμα).
- 5) Φυγοκεντρώνεται στα 430 x g για 30 min.
- 6) Συλλέγεται με προσοχή η στιβάδα των μονοπύρηνων που βρίσκεται μεταξύ της ficoll και του πλάσματος και τοποθετείται σε νέο σωληνάριο.
- 7) Αραιώνεται με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ποσότητα PBS για να απομακρυνθούν κατάλοιπα της Ficoll.
- 8) Φυγοκεντρείται στα 430 x g για 10 min. Απορρίπτεται το υπερκείμενο με πιπέτα
- 9) Προστίθενται ~5ml PBS, επαναδιαλυτοποιείται το ίζημα και φυγοκεντρείται 430 x g για 10 min.
- 10) Απορρίπτεται το υπερκείμενο, επαναδιαλυτοποιείται το ίζημα σε ~5ml PBS. Λαμβάνονται 200μl σε ξεχωριστό erpendorf tube και μετράται η συγκέντρωση των κυττάρων σε κυτταρομετρητή.
- 11) Ξεπαγώνεται μεθυλοκυτταρίνη (3ml ανά δείγμα).
- 12) Προστίθενται στο σωληνάκι της μεθυλοκυτταρίνης οι αυξητικοί παράγοντες SCF (stem cell factor) 100ng/ml και ερυθροποιητίνη 7U/ml για να διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των πρόγονων αιμοποιητικών κυττάρων σε κύτταρα της ερυθράς σειράς.
- 13) Στο σωληνάκι προστίθεται κατάλληλη ποσότητα από το διαλυτοποιημένο δείγμα του βήματος 10 ώστε να έχουμε $5 \cdot 10^5$ κύτταρα/ml στη μεθυλοκυτταρίνη.
- 14) Αναδεύονται και μοιράζονται από 1,5ml σε δύο μικρά τρυβλία Petri (35mm).

- 15) Τα δύο μικρά τρυβλία τοποθετούνται σε ένα μεγαλύτερο τρυβλίο Petri (90mm) μαζί με ένα τρίτο μικρό τρυβλίο το οποίο περιέχει από αποστειρωμένο νερό και αφήνεται ανοιχτό ώστε να διατηρείται η υγρασία.
- 16) Τοποθετούνται σε κλίβανο για επώαση στους 37°C και 5% CO₂.
- 17) Συλλογή καλλιεργείων BFU-E (Burst-forming unit erythroid) κυττάρων με το πέρας 12-13 ημερών.

3.3 Συλλογή κυττάρων

1. Μετρήθηκε ο αριθμός των αποικιών σε κάθε μικρό τρυβλίο στο μικροσκόπιο.
2. Προστέθηκε 1ml DMEM στο κάθε μικρό τρυβλίο και αναδεύτηκε με γυάλινη πιπέτα ώστε να αραιωθεί το καλλιεργητικό μέσο (μεθυλοκυτταρίνη) και να αμφορέσουν να συλλεχθούν οι αποικίες.
3. Μεταφέρθηκε σε Falcon, προστέθηκε πάλι DMEM στο τρυβλίο, αναδεύτηκε και μεταφέρθηκε πάλι στο Falcon.
4. Επαναλαμβάνονται τα βήματα 1 και 2 μέχρι να μην υπάρχουν πια αποικίες στο τρυβλίο. Η απουσία αποικιών επιβεβαιώνεται με παρατήρηση του τρυβλίου στο μικροσκόπιο.
5. Φυγοκεντρείται το Falcon στις 2000rpm για 15min, απορρίπτεται το υπερκείμενο και προστίθενται 2ml PBS.
6. Φυγοκεντρείται στις 2000rpm για 10min.
7. Αφαιρείται το υπερκείμενο, προστίθενται 600μl PBS, επαναδιαλυτοποιείται το ίζημα και μοιράζεται από 300μl σε 2 erpendorf tubes.
8. Προστίθενται ακόμα 400μl PBS στο Falcon και μεταφέρονται από 200μl σε κάθε tube.
9. Επαναλαμβάνεται το βήμα 8 1-2 φορές ώστε να μεταφερθούν όλες οι αποικίες.
10. Φυγοκεντρούνται στις 3000rpm για 10min.
11. Απορρίπτεται το υπερκείμενο με πιπέτα, αφήνονται 20-30μl και προστίθενται 300μl RNAProtect (~10 όγκους προστίθενται) και επαναδιαλυτοποιείται το ίζημα σε κάθε tube.
12. Τοποθετούνται στη φυγόκεντρο για γρήγορο spin.
13. Τοποθετούνται στους -80°C.

3.4 Απομόνωση RNA

Για την απομόνωση του ολικού RNA από τα BFU-E κύτταρα χρησιμοποιήθηκε το RNeasy Mini Kit (Qiagen). Η συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία βασίζεται στην ικανότητα του RNA να προσδένεται στη στήλη ενώ δεν κατακρατούνται τα υπόλοιπα συστατικά του κυττάρου.

1. Αφαιρούνται τα δείγματα από τους -80°C και αφήνονται να ξεπαγώσουν σε θερμοκρασία δωματίου μέσα σε απαγωγό για την επεξεργασία του RNA.
2. Φυγοκεντρώνονται τα δείγματα σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στα $7000 \times g$ για 20min στους 4°C .
3. Επαναλαμβάνεται το βήμα 2 ώστε να κατακρημνισθούν όλα τα κύτταρα που αιωρούνταν.
4. Απορρίπτεται το υπερκείμενο με προσοχή να μην διαταραχθεί το ίζημα.
5. Προστίθενται 600μl Buffer RLT σε κάθε δείγμα και αναδεύονται με vortex.
6. Ομογενοποιείται το κάθε δείγμα με χρήση σύριγγα. Το κάθε δείγμα περνάται τουλάχιστον 10 φορές μέσα στη σύριγγα.
7. Προστίθενται 600μl 70% αιθανόλης σε κάθε δείγμα και αναδεύεται καλά με την πιπέτα.
8. Μεταφέρονται 700μl από κάθε δείγμα σε στήλες RNeasy spin. Φυγοκεντρώνονται στα $8000 \times g$ για 15sec στους 4°C και απορρίπτεται το διηθημένο υγρό.
9. Επαναλαμβάνεται το βήμα 8 καθώς τα δείγματα είχαν όγκο μεγαλύτερο από 700μl. Χρησιμοποιείται η ίδια στήλη.
10. Προστίθενται 350μl Buffer RW1 στη στήλη. Φυγοκεντρώνονται στα $8000 \times g$ για 15sec στους 4°C και απορρίπτεται το διηθημένο υγρό.
11. Σε ξεχωριστό σωληνάκι προστίθενται 10μl DNase I και 70μl Buffer RDD για κάθε δείγμα και αναδεύεται απαλά το σωληνάκι.
12. Προστίθενται 80μl από το μείγμα DNase I/Buffer RDD σε κάθε δείγμα απευθείας στη στήλη και αφήνεται για επώαση για 15min σε θερμοκρασία δωματίου.
13. Προστίθενται 350μl Buffer RW1 στη στήλη κάθε δείγματος. Φυγοκεντρώνονται στα $8000 \times g$ για 15sec στους 4°C και απορρίπτεται το διηθημένο υγρό.
14. Προστίθενται 500μl Buffer RPE στη στήλη κάθε δείγματος. Φυγοκεντρώνονται στα $8000 \times g$ για 15sec στους 4°C και απορρίπτεται το διηθημένο υγρό.
15. Προστίθενται 500μl Buffer RPE στη στήλη κάθε δείγματος. Φυγοκεντρώνονται στα $8000 \times g$ για 2min στους 4°C και απορρίπτεται το διηθημένο υγρό.
16. Φυγοκεντρώνονται στην μέγιστη ταχύτητα για 1min.

17. Τοποθετούνται οι στήλες σε καινούρια eppendorf και προστίθενται 25μl RNase-free νερό σε κάθε δείγμα.
18. Φυγοκεντρώνονται στα 8000 x g για 2min στους 4°C , απορρίπτεται η στήλη και τα eppendorf με το απομονωμένο RNA τοποθετούνται σε πάγο .
19. Φωτομετρώνονται στο NanoDrop ND-1000 ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση και η καθαρότητα του RNA.
20. Το RNA φυλάσσεται στους -80°C.

3.5 Αντίστροφης μεταγραφής αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

3.5.1 Σύνθεση cDNA

Η ανακάλυψη της αντίστροφης μεταγραφάσης το 1970, έδωσε τη δυνατότητα μετατροπής του μονόκλωνου RNA σε DNA και στη μελέτη της επίδρασης μεταλλάξεων στη συρραφή του mRNA με την μετατροπή του σε DNA (49). Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκε το PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)

1. Σε eppendorf για κάθε δείγμα προστίθενται:

Πίνακας 3 Αντιδραστήρια πρώτου μείγματος για τη σύνθεση του cDNA

Αντιδραστήρια	Όγκος
Oligo dT Primer (50μM)	1μl
dNTP Mixture (10mM το κάθε ένα)	1μl
RNA	5μl
RNase-free νερό	3μl
Συνολικά	10μl

2. Αφήνονται για επώαση για 5min στους 65oC και έπειτα τοποθετούνται σε πάγο.

3.5.2 Σχεδιασμός εκκινητών για πολλαπλασιασμό του cDNA του επιθυμητού τμήματος

Η περιοχή, που απαιτείται ο πολλαπλασιασμός της, περιλαμβάνει την αλληλουχία τόσο ανοδικά της παραλλαγής όσο και καθοδικά αυτής (εικ.28) ώστε να περιλαμβάνονται οι πιθανές αλλαγές στην αλληλουχία του DNA που έχουν προκύψει από μεταβολές στη συρραφή.

Για τον σχεδιασμό των εκκινητών, αρχικά βρέθηκε η επιθυμητή αλληλουχία cDNA για το γονίδιο της β-σφαιρίνης από τη βάση δεδομένων Ensembl (50). Μεταφέρθηκε στο πρόγραμμα Primer3 από το οποίο προέκυψαν ορισμένα ζευγάρια εκκινητών (51). Επιλέχθηκε το κατάλληλο ζευγάρι με βάση τα παρακάτω κριτήρια:

1. Το μήκος του κάθε εκκινητή να είναι 20-26 βάσεις
2. Η θερμοκρασία αποδιάταξης T_m να είναι 55-65°C
3. Η περιεκτικότητα σε γουανίνη-κυτοσίνη να είναι 40-60%
4. Η βαθμολογία του προγράμματος για τις συμπληρωματικές αλληλουχίες κατά μήκος του ίδιου εκκινητή (self complementarity) και για τη συμπληρωματικότητα μεταξύ των 3'-άκρων των δύο εκκινητών να είναι <5

Στη συνέχεια ελέχθησαν οι αλληλουχίες των εκκινητών στο Blast/Blat της Ensembl ώστε να διαπιστωθεί ότι προσδένονται στο β-γονίδιο και δεν θα πολλαπλασιαστεί κάποιο επιπλέον τμήμα.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 2 ζεύγη εκκινητών (πίνακες 5,6) και ο ευθύς εκκινητής (forward) είναι κοινός και στα δύο ζεύγη (εικ.28 μαύρο πλαίσιο). Στο πρώτο ζευγάρι περιλαμβάνονται τα δυο πρώτα εξόνια του β-γονιδίου και το σημείο στο οποίο βρίσκεται η παραλλαγή. Στο δεύτερο ζεύγος εκκινητών περιλαμβάνονται και τα 3 εξόνια ώστε να διαπιστωθούν, αν έχουν συμβεί, αλλαγές και στο τρίτο εξόνιο.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών είναι:

Πίνακας 5 Αλληλουχίες εκκινητών πρώτου ζευγαριού

Ευθύς (forward, F)	5'-GCAAGGTGAACGTGGATGA-3'
Ανάστροφος (reverse, R)	5'-ACTAAAGGCACCGAGCACT-3'

Πίνακας 6 Αλληλουχίες εκκινητών δεύτερου ζευγαριού

Ευθύς (forward, F)	5'-GCAAGGTGAACGTGGATGA-3'
Ανάστροφος (reverse, R)	5'-GCCACACCAGCCACCACT-3'

aaatattacgtaaatacacttgcaaaggaggatggttttagtagcaatttgtactgatggatggggccaagagatatat
 cttagagggagggctgaggggttgaagtccaactcctaagccagtgccagaagagccaaggacaggtacggctgtcatcA
 CTTAGACCTCACCCCTGTGGAGCCACACCCTAGGGTTGGCCAATCTACTCCCAGGAGCAGGGAGGGCAGGAGCCAGGGCTG
 GGCATAAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGA
 CACCATGGTGCACCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTG
 GTGAGGCCCTGGGCAGGTTGGTA TCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAACTGGGCATGTGGAGACAGA
 GAAGACTCTTGGGTTTCTGATAGGCACTGACTCTCTCTGCCTATTGGTCTATTTTCCCACCCTTAGGCTGCTGGTGGTCT
 ACCCTTGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCTTTGGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTATGGGCAACCCTAAGGTGAAG
 GCTCATGGCAAGAAAGTGCTCGGTCCTTTAGT GATGGCCTGGCTCACCTGGACAACCTCAAGGGCACCTTTGCCACACT
 GAGTGAGCTGCACTGTGACAAGCTGCACGTGGATCCTGAGAATTCAGG GTGAGTCTATGGGACCCTTGATGTTTTCTTT
 CCCCTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAGGGGAGAAGTAACAGGGTACAGTTTAGAATGGGAAACAGACGA
 ATGATTGCATCAGTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTTTAGTTCTTTTATTTGCTGTTTATAACAATGTTTTCTTTTGT
 AATCTTGCTTTCTTTTTTTTTCTTCTCCGCAATTTTTACTATTATACTTAATGCCTTAACATTGTGTATAACAAAAGGA
 AATATCTCTGAGATACATTAAGTAACTTAAAAAAAACCTTTACACAGTCTGCCTAGTACATTACTATTTGGAATATATGT
 GTGCTTATTTGCATATTCATAATCTCCCTACTTTATTTCTTTTATTTTAAATTGATACATAATCATTATACATATTTAT
 GGGTTAAAGTGTAATGTTTTAATATGTGTACACATATTGACCATAACAGGGTAATTTGCATTTGTAATTTTAAAAAATG
 CTTTCTCTTTTAAATATACTTTTTTGTATTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTCTTTCAGGGCAATAATGAT
 ACAATGTATCATGCCTCTTTGCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATTTCTGC
 ATATAAATATTTCTGCATATAAATGTAAGTATGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCAT
 TCTGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGTAAATCATGTTTATACC
 TCTTATCTTCTCCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGAATTCAACCCAC
 CAGTGCAGGCTGCCTATCAGAAAGTGGTGGCTGGTGGCTAATGCCCTGGCCCAAGTATCACTAAGCTCGCTTTCTT
 GCTGTCCAATTTCTATTAAAGGTTCCCTTTGTTCCCTAAGTCCAACCTACTAAACTGGGGGATATTATGAAGGGCCTTGAGC
 ATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGCaatgatgtatttaattatttctgaatattttactaaaa

Εικόνα 28 Αλληλουχία γονιδίου β-σφαιρίνης και σημεία πρόσδεσης εκκινητών

Με ανοιχτό πράσινο αναγράφονται τα 5'- και 3'- αμετάφραστα άκρα, με γαλάζιο παρουσιάζονται οι περιοχές των εξονίων, σε μαύρο πλαίσιο το σημείο πρόσδεσης του ευθύ εκκινητή, σε κόκκινο πλαίσιο το σημείο πρόσδεσης του αναστροφου εκκινητή για το πρώτο ζευγάρι ενώ σε πράσινο πλαίσιο ο εκκινητής του δεύτερου ζευγαριού. Με κόκκινο σημαίνεται η βάση στη θέση που μελετάται.

3.5.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR)

Η PCR αποτελεί την πιο κοινή μέθοδο για τον ενζυματικό πολλαπλασιασμό του DNA (52). Χρησιμοποίηση της συγκεκριμένης μεθόδου για τον πολλαπλασιασμό των επιθυμητών αλληλουχιών . Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται:

Πίνακας 7 Αντιδραστήρια για την PCR

Αντιδραστήρια	Όγκος
HotStart multiplex (Qiagen) 2x	25μl
Primer Mix (F/R, 10μM κάθε ένας)	1μl
H ₂ O	23μl
Μονόκλωνο DNA δείγμα	1μl
Συνολικά	50μl

Το μονόκλωνο DNA έχει αραιωθεί κατάλληλα ώστε η $C_{\text{τελική}}=50-80\text{ng}/\mu\text{l}$. Στη συνέχεια η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή στις ακόλουθες συνθήκες:

Συνθήκες PCR για το πρώτο ζευγάρι:

95°C	15min	} 35 κύκλους
95 °C	30sec	
57 °C	1min	
72 °C	30sec	
72 °C	10min	

Συνθήκες PCR για το δεύτερο ζευγάρι:

95°C	15min	} 35 κύκλους
95 °C	30sec	
58 °C	1min	
72 °C	90sec	
72 °C	10min	

3.6 Ηλεκτροφόρηση

3.6.1 Πήκτωμα αγαρόζης 1.5% w/v

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων PCR αποτελεί μια τεχνική που επιτρέπει το διαχωρισμό, χαρακτηρισμό και απομόνωση τμημάτων DNA ποικίλων μεγεθών από 100bp έως 25kb, ανάλογα με την ιδιότητα του πηκτώματος (53). Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιείται για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της RT-PCR όπου αναμένονται προϊόντα PCR με μέγεθος που κυμαίνεται από 200-400bp. Με βάση τον πίνακα 8, χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα 1.5%w/v αγαρόζης ώστε να διαθέτει το εύρος της διακριτικής ικανότητας που απαιτείται για τον διαχωρισμό των τμημάτων που αναμένονται.

Πίνακας 8 Περιεκτικότητα αγαρόζης στο πήκτωμα σε σχέση με τα μεγέθη των τμημάτων DNA

% (w/v) πήκτωμα αγαρόζης	Εύρος διακριτικής ικανότητας
0.5	1kb-30kb
0.7	800bp-12kb
1	500bp-10kb
1.2	400bp-7kb
1.5	200bp-3kb
2	50bp-2kb

Στο πήκτωμα προστίθενται βρωμιούχο αιθύδιο το οποίο διαθέτει την ικανότητα να παρεμβάλλεται στη μεγάλη αύλακα του DNA και να φθορίζει όταν εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία. Με τον τρόπο αυτό οπτικοποιούνται τα τμήματα DNA στο πήκτωμα.

Υλικά:

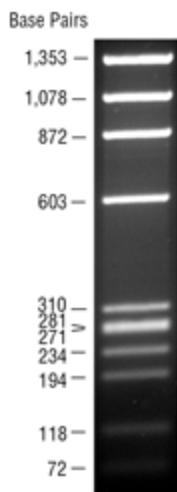
100ml TBE 20x

1.5 gr Certified Molecular Biology Agarose (Bio-Rad)

Βρωμιούχο αιθύδιο

Διάλυμα χρωστικής Ficoll (15% w/v Ficoll 400, 0.05%w/v μπλε της βρωμοφαινόλης)

Μάρτυρας μοριακών μεγεθών φΧ174DNA-Hae III Digest (New England Biolabs) (εικ.29)



Εικόνα 29 Μεγέθη τμημάτων DNA από μάρτυρα μοριακών μεγεθών φΧ174DNA_HaeIII Digest

Το 1.5 gr αγαρόζης διαλύεται σε 100ml TBE 20x με βρασμό και στη συνέχεια προστίθεται βρωμιούχο αιθύδιο. Μεταφορά σε ειδική μήτρα στην οποία τοποθετείται «χτένα» ώστε να δημιουργηθούν πηγαδάκια για να τοποθετηθούν τα δείγματα. Αφήνεται να πήξει για 30min και τοποθετείται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης. Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος χρωστικής Ficoll στα δείγματα και μεταφορά στα πηγαδάκια. Το διάλυμα της χρωστικής Ficoll διαθέτει Ficoll, μια ουσία υψηλής πυκνότητας η οποία εξασφαλίζει ότι τα δείγματα έχουν μεγαλύτερη πυκνότητα από το υδατικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης και θα καθιζάνουν στα πηγαδάκια, και τη χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης, που χρωματίζει τα δείγματα ώστε να διευκολύνεται η φόρτωση τους στα πηγαδάκια και να γίνεται μια αδρή εκτίμηση του ρυθμού μετακίνησης των τμημάτων κατά την ηλεκτροφόρηση. Ακολουθεί προσθήκη μάρτυρα μοριακών μεγεθών σε ένα πηγαδάκι. Εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου 120V για ~30min. Παρατήρηση του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία.

3.6.2 Πήκτωμα πολυακρυλαμιδής (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 10%

Το πήκτωμα PAGE αποτελεί μια πολύ ευαίσθητη μέθοδο διαχωρισμού πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων, με μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα από

την αгарόζη. Μπορεί να διαχωρίσει τμήματα μεγέθους από 10-1000bp καθώς και τμήματα DNA που διαφέρουν μεταξύ τους κατά μια βάση. Χρησιμοποιείται ώστε να διαχωριστούν προϊόντα που θα έχουν προκύψει από αλλαγές στη συρραφή και διαφέρουν έστω και κατά μια βάση. Όπως αναφέρθηκε, τα τμήματα που αναμένονται από την RT-PCR κυμαίνονται από 200-400bp και για αυτό το λόγω επιλέχθηκε η κατασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 10% σύμφωνα με τον πίνακα 9.

Πίνακας 9 Συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης και εύρος τμημάτος που διαχωρίζονται

% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης	Εύρος διακριτικής ικανότητας
3.5	1000-2000bp
5	80-500bp
6	75-2000bp
8	60-400bp
10	30-1000bp
12	40-200bp
15	25-150bp
20	5-100bp
4-20	10-2000bp

Υλικά:

12.5ml ακρυλαμίδη

2.5ml TBE 20x

35ml H₂O

50μl TEMED

450μl APS

Διάλυμα χρωστικής Ficoll

Μάρτυρας μοριακών μεγεθών φX174DNA-Hae III Digest (New England Biolabs)

Σε δοχείο προστίθενται η ακρυλαμίδη, το TBE 20x, το νερό, το TEMED και το APS. Αποχύνονται ανάμεσα σε κατάλληλα τζάμια που καθορίζουν το πάχος του πηκτώματος και αφήνεται να πολυμεριστεί για περίπου μια ώρα. Στη συνέχεια τοποθετείται στη

κατάλληλη συσκευή ηλεκτροφόρησης και φορτώνονται τα δείγματα με τη χρωστική και το μάρτυρα μοριακών μεγεθών. Εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου 80V για 4h. Εμβαπίζεται το πήκτωμα με διάλυμα με βρωμιούχο αιθύδιο ώστε να φθορίζουν τα τμήματα DNA σε υπεριώδη ακτιβολία λόγω παρεμβολή του βρωμιούχου αιθυδίου στο DNA. Παρατήρηση του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία.

3.7 Αλληλούχιση κατά Sanger

Η ενζυμική μέθοδος αλληλούχισης κατά Sanger βασίζεται στη χρήση 2',3'-διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTP) που οδηγούν σε τερματισμό της επιμήκυνσης της αλυσίδας του DNA. Στις σύγχρονες μεθόδους αλληλούχισης, τα τέσσερα ddNTPs είναι σημασμένα με διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές. Τα πορίοντα διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος τους σε τριχοειδές πήκτωμα (capillary electrophoresis) ανάλογα το μέγεθος τους όπως και στις προηγούμενες μεθόδους (54).

Το τριχοειδές πήκτωμα είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ιοντικών θραυσμάτων με βάση το μέγεθος τους. Μια ηλεκτροκινητική «ένεση» χρησιμοποιείται ώστε να περάσουν τα τμήματα DNA από το διάλυμα μέσα σε κάθε τριχοειδές. Εφαρμόζεται φορτίο υψηλής τάσης στα δείγματα αναγκάζοντας τα αρνητικά φορτισμένα τμήματα να εισέλθουν στα τριχοειδή.

Πριν φτάσουν στο θετικό ηλεκτρόδιο, τα σημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές τμήματα DNA, τα οποία έχουν διαχωριστεί με βάση το μέγεθος, κινούνται προς δέσμη λέιζερ. Η δέσμη λέιζερ διεγείρει τις χρωστικές των τμημάτων DNA και φθορίζουν. Ο φθορισμός που εκπέμπουν ανιχνεύεται από ένα σύστημα διάθλασης και μετατρέπεται σε μορφή που αναγνωρίζεται από κατάλληλο λογισμικό. Το λογισμικό μετατρέπει τις εισερχόμενες πληροφορίες σε κορυφές σε χρωματογράφημα.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR φέρουν πρόσθετα την αλληλουχία του φάγου M13 (πίνακας 10) η οποία είναι συμπληρωματική με το ολιγονουκλεοτίδιο που θα αποτελέσει τον εκκινητή για τη σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου κατά την αντίδραση της αλληλούχισης.

Πίνακας 10 Αλληλουχίες τμημάτων φάγου M13

Ευθύς (Forward)	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
Ανάστροφος(Reverse)	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

3.7.1 Ενζυμικός καθαρισμός του προϊόντος PCR

Σε eppendorf για κάθε δείγμα προστίθενται:

ExoI	0.25μl
rSAP	0.5μl
Προϊόν PCR	2.5 μl

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε πάγο.

Εν συνεχεία τοποθετούνται σε θερμοκυκλοποιητή με τις ακόλουθες συνθήκες:

37°C	15min
80 °C	15 min
4 °C	παραμονή

3.7.2 Αντίδραση αλληλούχισης

Χρησιμοποιείται το Big Dye Terminator v3.1 kit (Thermo Fisher Scientific). Η αντίδραση που ακολουθεί είναι ανά δείγμα:

BigDye Term Buffer	1.75μl
BigDye Term (enz)	0.25 μl
Εκκινητής (5μM)	0.32 μl
H ₂ O	6.68 μl
Καθαρισμένο προϊόν PCR	1 μl
Συνολικά	10 μl

Τοποθετούνται σε θερμοκυκλοποιητή με το ακόλουθο πρόγραμμα:

96°C	1min	
96 °C	10sec	} 25 κύκλοι
55 °C	5sec	
60 °C	4min	
4 °C	παραμονή	

3.7.3 Καθαρισμός αντίδρασης αλληλούχισης

1. Μεταφορά των δειγμάτων σε plate 96 θέσεων.
2. Σε σωληνάριο προστίθενται 55 μl αιθανόλη για κάθε δείγμα και 2μl οξικού αμμωνίου. Αναδεύονται ελαφρά.
3. Μεταφορά 29μl σε κάθε πηγαδάκι και καλύπτεται το plate με μεμβράνη.
4. Αφήνεται στους 4 °C για 30min.
5. Φυγοκεντρείται στα 2210 x g για 30min στους 4 °C.
6. Αφαιρείται το κάλυμμα και αναποδογυρίζεται σε χειροπετσέτες και φυγοκεντρείται στα 200 x g για 2min στους 4 °C.
7. Προστίθενται 50μl αιθανόλη 70% ανά δείγμα.
8. Φυγοκεντρείται στα 2210 x g για 3min στους 4 °C.
9. Αφαιρείται το κάλυμμα και αναποδογυρίζεται σε χειροπετσέτες και φυγοκεντρείται στα 200 x g για 3min στους 4 °C.
10. Αφήνεται σε σκιερό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου να στεγνώσει.
11. Προστίθενται 10μl Hi-Di φορμαμίδιο και αναδεύεται 20 φορές.
12. Πραγματοποιείται γρήγορη φυγοκέντρηση.
13. Τοποθετείται στο ABI 3500.

3.8 Ανάλυση τμημάτων PCR με χρήση φθορίζοντα εκκινητή (F-PCR) σε αυτόματο αναλυτή (Fragment Analysis)

Η συγκεκριμένη πειραματική μεθοδολογία διαφοροποιείται στο κομμάτι των εκκινητών σε σύγκριση με την PCR που περιγράφηκε σε προηγούμενη ενότητα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται είναι σημασμένοι με φθορίζουσες χρωστικές ώστε

το προϊόν την αντίδρασης να ανιχνεύεται κατά την ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές πήκτωμα.

Στην παρούσα διαδικασία μόνο ο ευθύς εκκινητής και από τα δύο ζεύγη ήταν σημασμένος με τη χρωστική FAM. Για κάθε δείγμα προστέθηκαν σε eppendorf 1.5ml:

Πίνακας 11 Αντιδραστήρια για F-PCR

Αντιδραστήρια	Όγκος
HotStart multiplex (Qiagen) 2x	25μl
Primer F (100μM)	0.1μl
Primer R (100μM)	0.1μl
H ₂ O	23.8μl
Μονόκλωνο DNA δείγμα	1μl
Συνολικά	50μl

Τοποθετήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή με τις συνθήκες που έχουν περιγραφεί στην ενότητα για την PCR. Εν συνεχεία, σε plate τοποθετηθήκαν 9μl Hi-Di, 0.5 μl ROX, που αποτελεί μάρτυρα μεγεθών, και 0.5 μl προϊόν από την αντίδραση PCR με τον φθορίζοντα εκκινητή. Τα προϊόντα της PCR προστέθηκαν σε πυκνή μορφή αλλά και σε 1/20 αραιωμένα, καθώς όπως παρατηρήθηκε από τις προηγούμενες PCR, η ποσότητα των προϊόντων ήταν πολύ μεγάλη. Πραγματοποιήθηκε γρήγορη φυγοκέντρηση και τοποθετήθηκε στο ABI 3500.

4. Αποτελέσματα

4.1 Αξιολόγηση της παραλλαγής c.92+7A>G

Από τη κατασκευή του γενεαλογικού δένδρου και τα αιματολογικά δεδομένα που συλλέχτηκαν για τα μέλη της οικογένειας (πίνακας 2), το άτομο II-2 (πατέρας υπό μελέτη ατόμου) καθώς και τα αδέρφια του (II-3,4,6) είναι ετεροζυγώτες για την c.92+7A>G και έχουν κληρονομήσει την παραλλαγή από τον πατέρα τους, I-1. Όπως παρατηρείται, όλοι οι ετεροζυγώτες της παραλλαγής δεν εμφανίζουν αιματολογικά ευρήματα παρόμοια με το υπό μελέτη άτομο, το οποίο όμως φέρει και την παραλλαγή c.118C>T που έχει κληρονομήσει από τη μητέρα του, II-2.

Ο αδερφός του υπό μελέτη ατόμου, III-3, είναι και εκείνος διπλός ετεροζυγώτης με γονότυπο *HBB*: c.[118C>T]+[92+7A>G]. Σύμφωνα με τον πίνακα 2 και με τον πίνακα 12, στον οποίο παρουσιάζονται οι τιμές των μέσων όρων των αιματολογικών δεικτών σε ετερόζυγα άτομα για τη μετάλλαξη c.118C>T, το παιδί που μελετάται όπως και το άτομο III-3, εμφανίζουν χαμηλότερες τιμές από τις τιμές τόσο των ενήλικων ατόμων όσο και από των παιδιών. Οι τιμές της HbF του υπό μελέτη ατόμου και του αδερφού του είναι σημαντικά πιο αυξημένες από τους μέσους όρους του που εμφανίζονται στο πίνακα 12.

Πίνακας 12 Μέσος όρος τιμών αιματολογικών δεικτών σε ετερόζυγα άτομα για τη μετάλλαξη c.118C>T

Αιματολογικοί δείκτες	Μέσος όρος ενηλίκων	Μέσος όρος παιδιών (2-12 χρονών)
RBC (x10 ⁶ /μl)	6.038	5.202
MCH (pg)	19.94	18.35
MCV (fl)	63.04	58.487
Hb (g/dl)	12.12	9.475
RDW (%)	14.775	20.137
HbF	3.025	3.328
HbA ₂	5.125	5.842

Για τη διερεύνηση της παραλλαγής από *in silico* προγράμματα, χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις Human Splicing Finder και NetGene2. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις δύο αυτές βάσεις, δεν προέβλεπαν κάποια αλλαγή στη συρραφή του mRNA του γονιδίου της β-σφαιρίνης λόγω της παραλλαγής c.92+7A>G.

4.2 Καλλιέργεια μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος για τη δημιουργία αποικιών της ερυθράς σειράς (BFU-E)

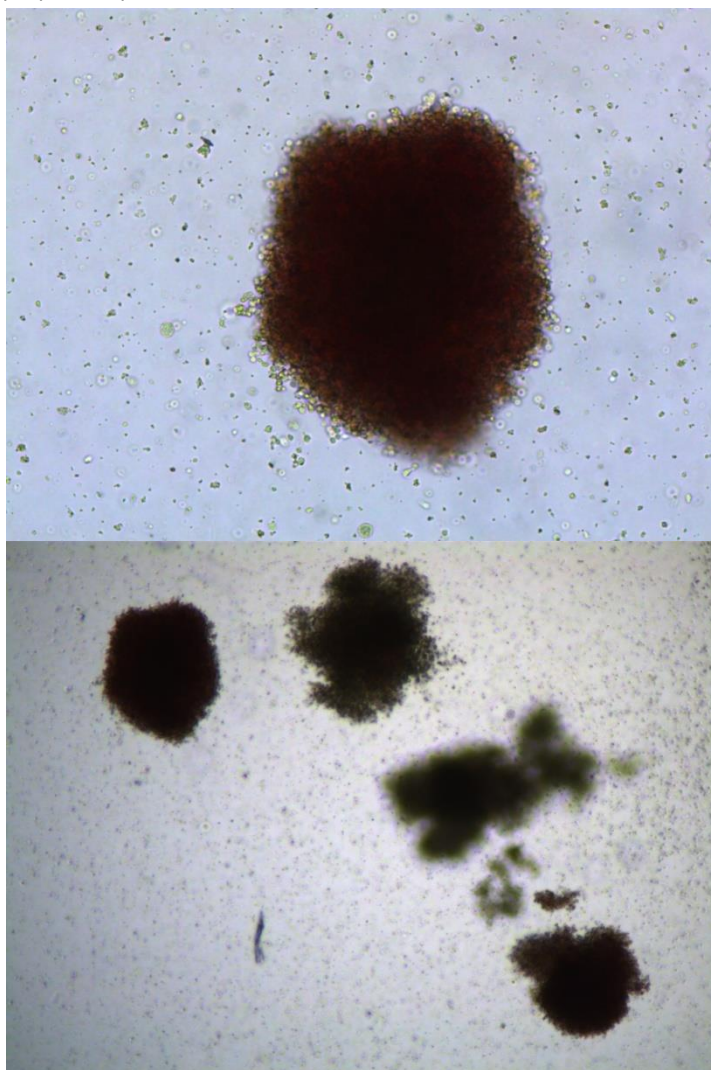
Για την απομόνωση του RNA, χρειάστηκε να πραγματοποιηθούν καλλιέργειες ανώριμων κυττάρων της ερυθράς σειράς καθώς τα ώριμα ερυθροκύτταρα δεν διαθέτουν πυρήνα. Στις φωτογραφίες που ακολουθούν παρουσιάζονται αποικίες BFU-E κυττάρων από φυσιολογικό άτομο, όπως επίσης και από το υπό μελέτη άτομο που φέρει τη παραλλαγή c.92+7A>G και τον πατέρα του (εικ.27 άτομα II-1 και III-2, αντίστοιχα). Η συλλογή των αποικιών έγινε κατά τη 13^η μέρα, την οποία η πλειοψηφία των αποικιών είχε κόκκινο χρώμα που υποδηλώνει την έκφραση της αιμοσφαιρίνης από τα κύτταρα (πίνακας 12). Η κάθε αποικία έχει κατά προσέγγιση 50.000 κύτταρα όπως φαίνεται από προηγούμενες μελέτες.

Στις εικόνες 30-32, δεν παρατηρείται κάποια μορφολογική διαφοροποίηση μεταξύ των κυττάρων των τριών ατόμων. Το υπό μελέτη άτομο έφερε το μεγαλύτερο αριθμό αποικιών συγκριτικά με τα άλλα δύο, γεγονός που οφείλεται στην ηλικία του καθώς είναι το νεαρότερο.

Πίνακας 13 Αριθμός αποικιών σε κάθε δείγμα κατά προσέγγιση

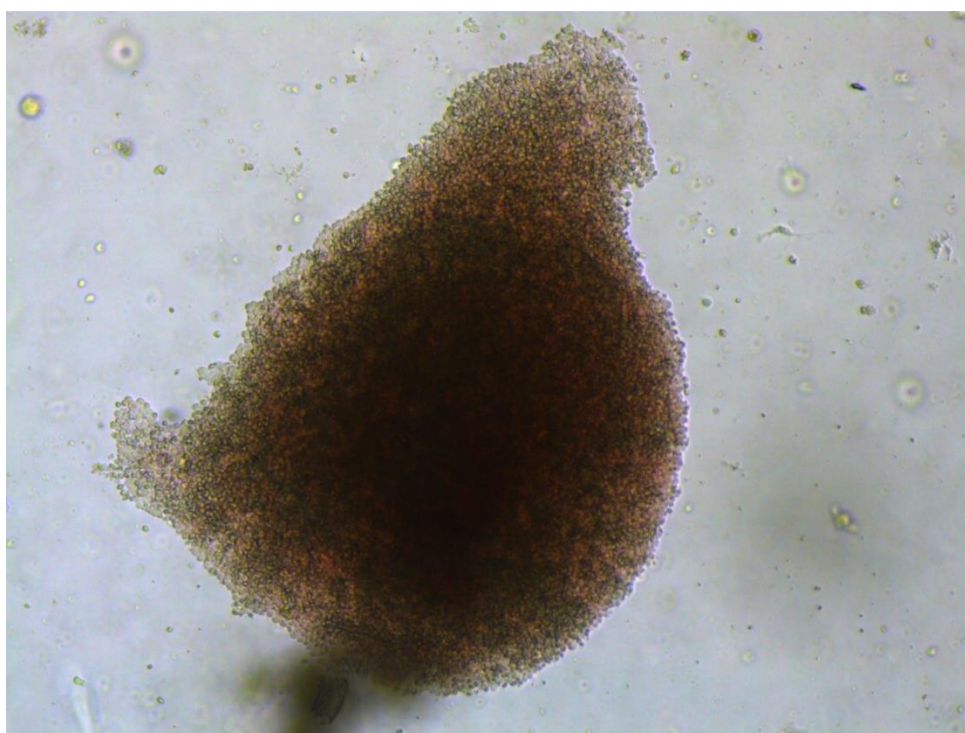
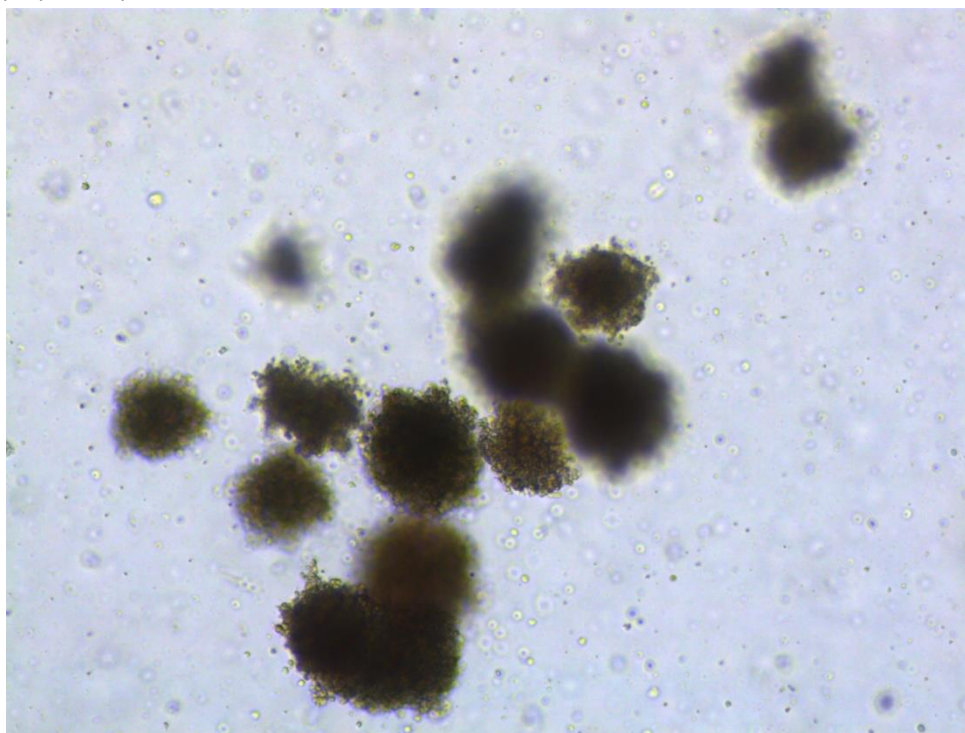
Δείγμα	Αριθμός αποικιών/ μικρό τρυβλίο
III-2	~170-200
II-1	~110-130
Φυσιολογικό άτομο	~60

Αξιολόγηση της νέας παραλλαγής c.92+7A>G (IVS-I-7A>G) στο γονίδιο της β-σφαιρίνης (HBB) μέσω μελέτης RNA με RT-PCR σε ανώριμα ερυθρά κύτταρα



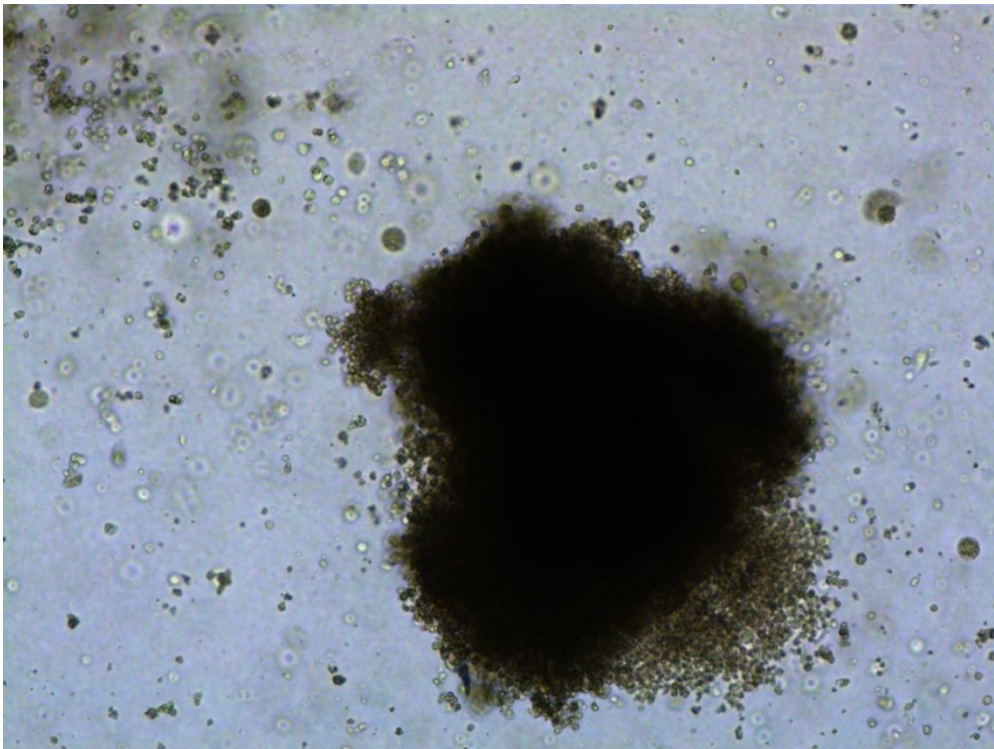
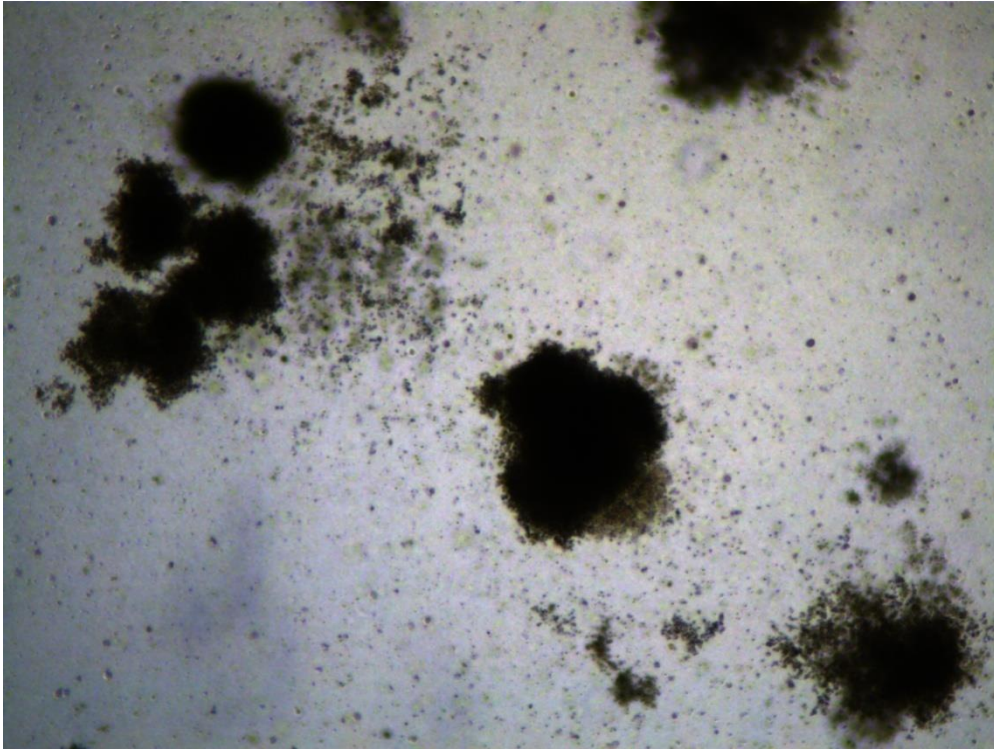
Εικόνα 30 Εικόνες αποικιών BFU-E κυττάρων απο φυσιολογικό άτομο

Αξιολόγηση της νέας παραλλαγής c.92+7A>G (IVS-I-7A>G) στο γονίδιο της β-σφαιρίνης (HBB) μέσω μελέτης RNA με RT-PCR σε ανώριμα ερυθρά κύτταρα



Εικόνα 31 Εικόνες αποικιών BFU-E κυττάρων του υπο μελέτη ατόμου

Αξιολόγηση της νέας παραλλαγής c.92+7A>G (IVS-I-7A>G) στο γονίδιο της β-σφαιρίνης (HBB) μέσω μελέτης RNA με RT-PCR σε ανώριμα ερυθρά κύτταρα

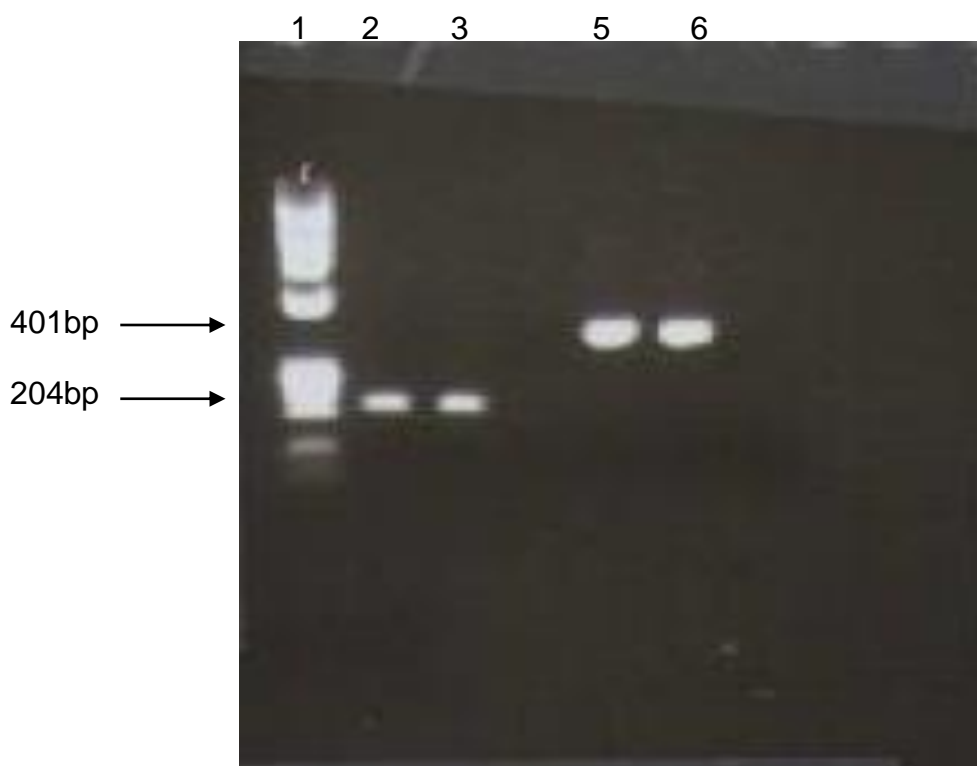


Εικόνα 32 Εικόνες αποικιών του ατόμου II-1

4.3 Αξιολόγηση της απόδοσης της RT-PCR με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης

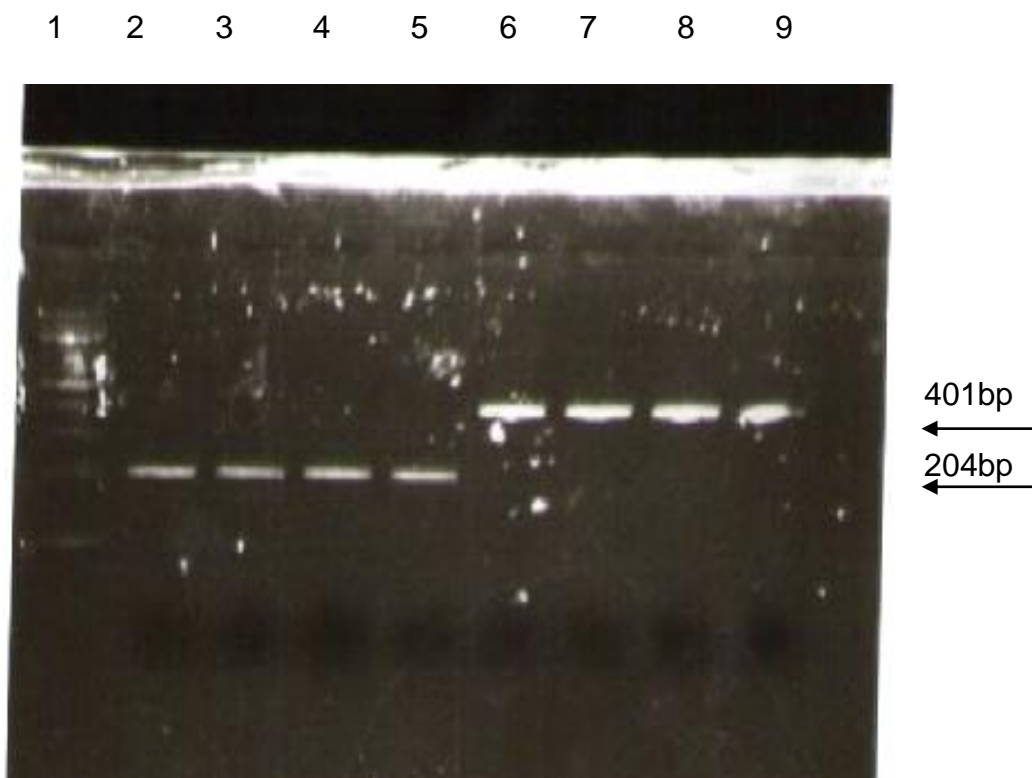
Με σκοπό να διαπιστωθεί η σωστή πραγματοποίηση των σταδίων της RT-PCR, αναλυτικά η απομόνωση RNA από τα BFU-E κύτταρα και εν συνεχεία η σύνθεση cDNA και ο πολλαπλασιασμός του επιθυμητού τμήματος με PCR με κατάλληλους εκκινητές για το γονίδιο της β-σφαιρίνης, ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης και τα αποτελέσματα εμφανίζονται στις εικόνες 31,32.

Σύμφωνα με το τμήμα D.ii από το κεφάλαιο των μεθόδων και υλικών, χρησιμοποιήθηκαν δύο ζεύγη εκκινητών για το γονίδιο της β-σφαιρίνης με σκοπό να περιλαμβάνονται όλα τα εξόνια του γονιδίου καθώς δεν ήταν γνωστό το είδος της αλλαγής που πιθανά να προέκυπτε από τη συγκεκριμένη παραλλαγή. Το προϊόν από το πρώτο ζευγάρι έχει μέγεθος 204bp και το προϊόν από το δεύτερο ζευγάρι 401bp. Όπως παρουσιάζεται από τις εικόνες 33,34, δεν εμφανίζεται κάποια διαφορά μεταξύ των ατόμων II-1, III-2 και του φυσιολογικού.



Εικόνα 33 Προϊόν RT-PCR για το άτομο II- 1 και το φυσιολογικό

Σειρά (από αριστερα) : 1 μάρτυρας μοριακών μεγεθών, 2 φυσιολογικό άτομο (προϊόν 204bp), 3 άτομο II-1 (προϊόν 204bp), 5 φυσιολογικό άτομο (προϊόν 401bp), 6 άτομο II-1 (προϊόν 401bp).

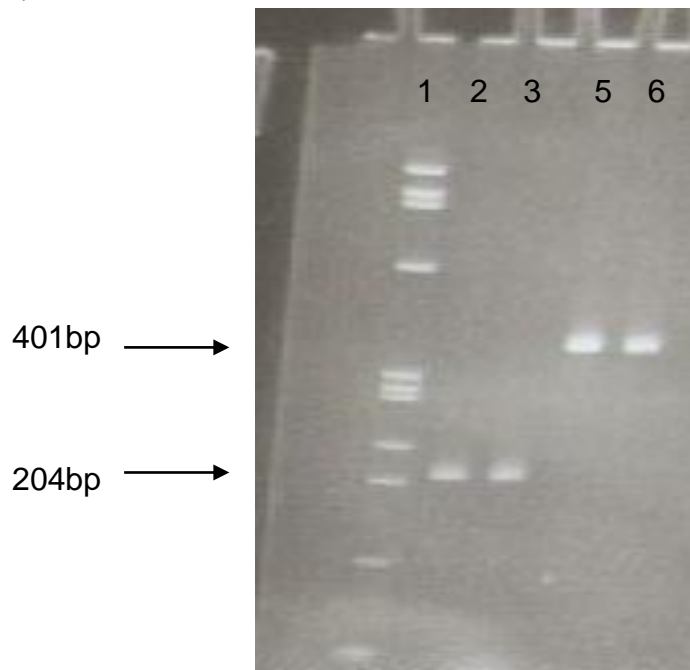


Εικόνα 34 Προϊόν RT-PCR για το άτομο III-2 και το φυσιολογικό

Σειρά (από αριστερα) : 1 μάρτυρας μοριακών μεγεθών, 2,3 άτομο III-2 (προϊόν 204bp), 4,5 φυσιολογικό άτομο (προϊόν 204bp), 6,7 άτομο III-2 (προϊόν 401bp), 8,9 φυσιολογικό άτομο(προϊόν 401bp).

4.4 Αξιολόγηση της απόδοσης της RT-PCR με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα πολυακριλαμίδης (PAGE) 10%

Το πήκτωμα πολυακριλαμίδης χαρακτηρίζεται από την ικανότητα να διαχωρίζει τμήματα DNA που διαφέρουν μεταξύ τους κατά μια βάση. Με βάση το χαρακτηριστικό αυτό, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα PAGE 10% για να μελετηθεί η ύπαρξη διαφοροποιημένων προϊόντων που πιθανόν να προκύψουν από αλλαγές στη συρραφή λόγω της παραλλαγής IVS-I-7A>G. Όπως παρουσιάζεται στην ενδεικτική εικόνα πηκτώματος PAGE (εικ.35), δεν εμφανίζεται κάποιο προϊόν που να διαφέρει από τα αναμενόμενα.



Εικόνα 35 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα PAGE 10%

Σειρά (από αριστερά) : 1 μάρτυρας μοριακών μεγεθών, 2 φυσιολογικό άτομο (προϊόν 204bp), 3 άτομο II-1 (προϊόν 204bp), 5 φυσιολογικό άτομο (προϊόν 401bp), 6 άτομο II-1 (προϊόν 401bp)

4.5 Αλληλούχιση κατά Sanger

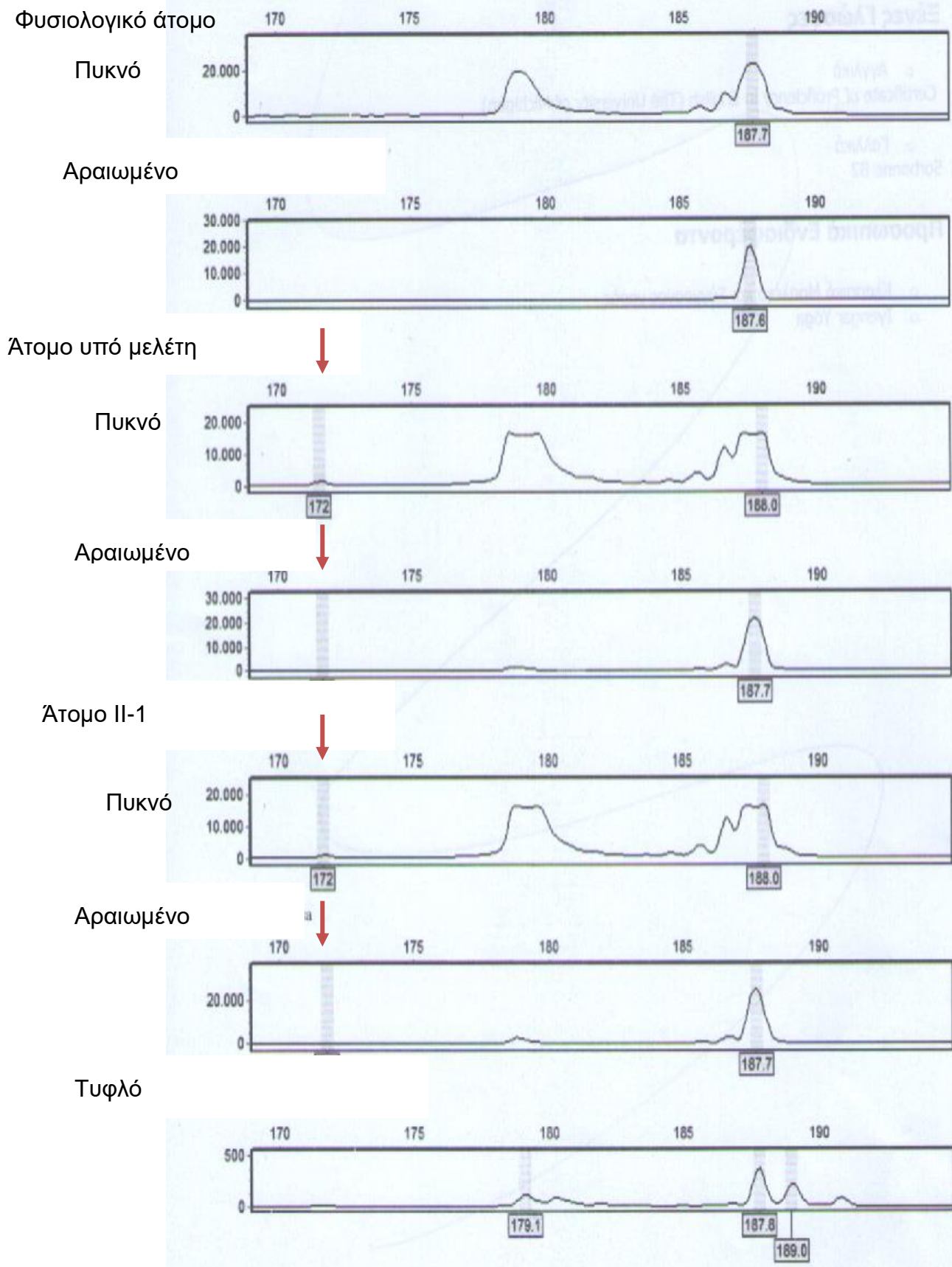
Για να μελετηθεί η ύπαρξη πιθανών παραπροϊόντων από αλλαγές στη συρραφή του RNA πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση κατά Sanger ώστε να διαπιστωθούν αλλαγές στην αλληλουχία. Όπως εμφανίζεται και στην εικόνα 36, δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στην αλληλουχία των ατόμων II-1 και III-2 σε σύγκριση με την αλληλουχία του β-γονιδίου στην βάση δεδομένων της Ensembl, τόσο για το τμήμα με μέγεθος 204bp όσο και για το τμήμα μεγέθους 401bp.

4.6 Ανάλυση τμημάτων PCR με χρήση φθορίζοντα εκκινητή (F-PCR) σε αυτόματο αναλυτή (Fragment Analysis)

Η ανάλυση τμημάτων PCR με χρήση φθορίζοντα εκκινητή αποτελεί μια πολύ ευαίσθητη μέθοδο. Για τη συγκεκριμένη μεθοδολογία, ο ευθύς εκκινητής, και από τα δύο ζευγη εκκινητών, ήταν σημασμένος με τη φθορίζουσα χρωστική FAM και δεν έφερε το τμήμα M13. Οι ανάστροφοι εκκινητές έφεραν την αλληλουχία M13 και δεν ήταν σημασμένοι με φθορίζουσα χρωστική. Τα μεγέθη που αναμένονται είναι διαφοροποιημένα από τα μεγέθη που προέκυψαν στην απλή PCR καθώς μόνο ο ένας εκκινητής φέρει M13. Για το πρώτο ζευγάρι το φυσιολογικό τμήμα έχει μέγεθος 187bp και για το δεύτερο ζευγάρι έχει μέγεθος 384bp. Χρησιμοποιήθηκαν και στη συγκεκριμένη πειραματική προσέγγιση δύο ζευγάρια εκκινητών ώστε να καλυφθεί όλη η έκταση του γονιδίου καθώς μπορεί να έχουν προστεθεί ή αφαιρεθεί τόσο τμήματα των ιντρονίων όσο και τμήματα των εξονίων.

Στις εικόνες 37,38 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πειράματος. Πιο συγκεκριμένα, στην εικόνα 37 στα άτομα II-1 και III-2 εμφανίζεται το φυσιολογικό προϊόν με μέγεθος 187bp καθώς και ένα επιπρόσθετο προϊόν με μέγεθος 172bp τόσο στα πυκνά όσο και στα αραιωμένα δείγματα. Το προϊόν με μέγεθος 172bp δεν ανιχνεύεται στα δείγματα του φυσιολογικού ατόμου. Αναφορικά με τα αποτελέσματα του τμήματος των 384bp, δεν παρατηρείται κάποια διαφοροποίηση μεταξύ των ατόμων II-1, III-2 και του φυσιολογικού.

Αξιολόγηση της νέας παραλλαγής c.92+7A>G (IVS-I-7A>G) στο γονίδιο της β-σφαιρίνης (HBB) μέσω μελέτης RNA με RT-PCR σε ανώριμα ερυθρά κύτταρα

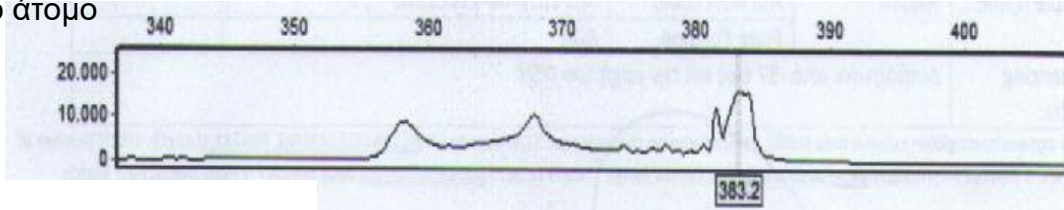


Εικόνα 37 Αποτελέσματα για το τμήμα με μέγεθος 187bp

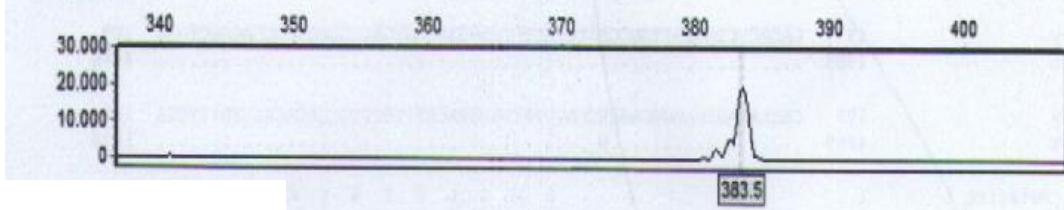
Με κόκκινο βέλος σημαίνεται το παραπροϊόν.

Φυσιολογικό άτομο

Πυκνό

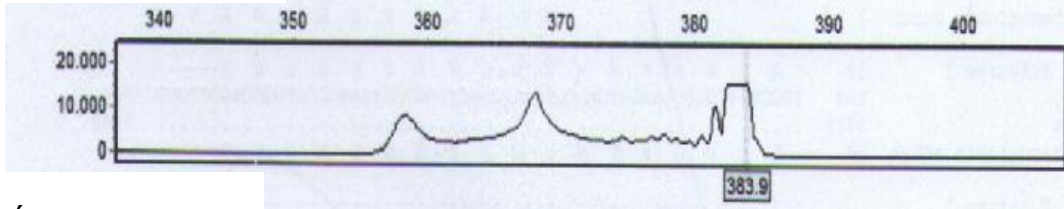


Αραιωμένο

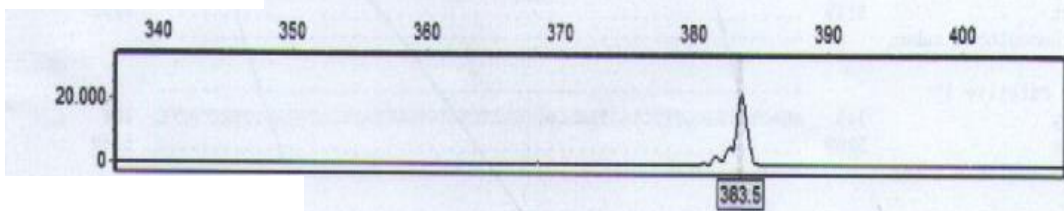


Άτομο υπό μελέτη

Πυκνό

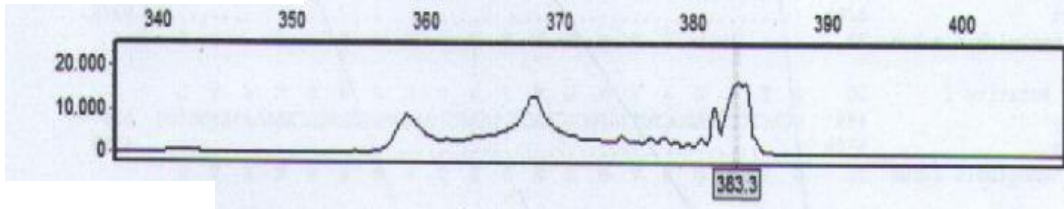


Αραιωμένο

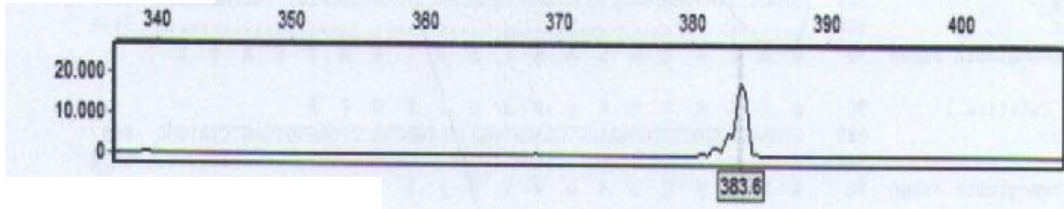


Άτομο II-1

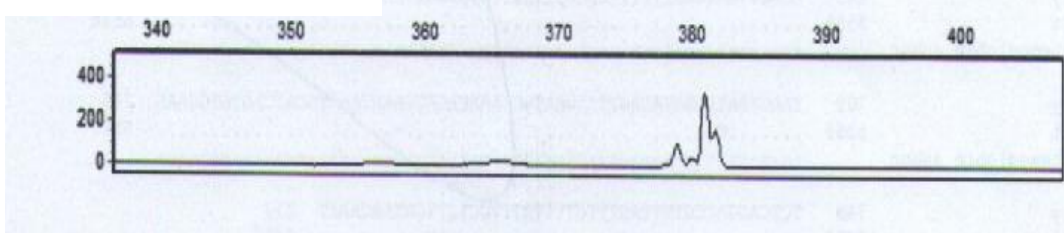
Πυκνό



Αραιωμένο



Τυφλό



Εικόνα 38 Αποτελέσματα για το τμήμα με μέγεθος 384bp

5. Συζήτηση-Συμπεράσματα

Οι αιμοσφαιρινοπάθειες αποτέλεσαν το μοντέλο μελέτης των μηχανισμών της κυτταρικής και μοριακής βιολογίας τις προηγούμενες δεκαετίες. Το εύρος των διαταραχών που συνδέονται με βλάβες στη σύνθεση ή στη δομή των αιμοσφαιρινών, προκύπτουν από μεταλλάξεις στα αντίστοιχα γονίδια. Αποτελούν το πιο συχνό μονογονιδιακό νόσημα παγκοσμίως.

Η β-Θαλασσαιμία είναι αποτέλεσμα μειωμένης ή πλήρους απουσίας παραγωγής της β-αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης. Οι ετεροζυγώτες για β-Θαλασσαιμία αποτελούν ~3% του πληθυσμού παγκοσμίως, με το ποσοστό αυτό να ποικίλει σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές ακόμα και μέσα στην ίδια χώρα. Λόγω μιας πλειάδας παραγόντων, όπως η μετανάστευση, οι συχνότητες εμφάνισης της β-Θαλασσαιμίας έχουν τροποποιηθεί την τελευταία δεκαετία.

Το μοριακό υπόβαθρο της β-Θαλασσαιμίας είναι ιδιαίτερα ετερογενές, με περισσότερες από 200 μεταλλάξεις να έχουν σχετιστεί με την εμφάνιση της (32). Η πλειοψηφία των μεταλλάξεων αυτών περιλαμβάνει σημειακές μεταλλάξεις, μικρές ενθέσεις ή ελλείμματα. Ένας μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων συνδέεται με την επεξεργασία του πρόδρομου mRNA. Οι μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη συρραφή αποτελούν περισσότερο από το 15% των σημειακών μεταλλάξεων που συσχετίζονται την εμφάνιση κάποιας νόσου (55). Μεταλλάξεις στις θέσεις συρραφής των εξονίων-εσονίων, στις συναινετικές αλληλουχίες ακόμα και μέσα στα εξόνια και τα ιντρόνια, ευθύνονται για τη δημιουργία ελαττωματικών ώριμων mRNAs.

Η συνεχόμενη αύξηση των παραλλαγών που εμφανίζονται λόγω της, όλο και πιο συχνά χρησιμοποιούμενης, αλληλούχισης νέας γενιάς έχει δημιουργήσει την ανάγκη για την σωστή και προσεκτική αξιολόγηση τους. Τόσο η χρήση βιβλιογραφικών δεδομένων όσο και η χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων, θα πρέπει να αξιολογούνται με ιδιαίτερη προσοχή καθώς υπάρχει το ενδεχόμενο να οδηγήσουν σε λανθασμένο συμπεράσματα. Η επαλήθευση τους από πειραματικές διαδικασίες ισχυροποιεί το αποτέλεσμα και συμβάλει στην κατανόηση και αξιολόγηση της παραλλαγής.

Τα αποτελέσματα από τη βιβλιογραφία και τις βάσεις δεδομένων για την c.92+7A>G που μελετάται, δεν έδειξαν να υπάρχουν δεδομένα σχετικά με μεταβολές που να επηρεάζουν τη συρραφή του mRNA της β-σφαιρίνης. Τα *in-silico* προγράμματα επίσης δεν έδειξαν να επηρεάζεται η συρραφή από την παραλλαγή c.92+7A>G. Με τη μελέτη της οικογένειας, παρατηρήθηκε ότι τόσο το παιδί που μελετήθηκε όσο και ο αδερφός του, που φέρει τον ίδιο γονότυπο, εμφανίζουν χαμηλότερες τιμές από τις τιμές του

μέσου όρου των αιματολογικών δεικτών παιδιών ετερόζυγων για τη μετάλλαξη c.118C>T. Σε αντιδιαστολή, η HbF και των δυο αυτών παιδιών εμφανίζεται ιδιαίτερα αυξημένη σε σύγκριση με το μέσο όρο των παιδιών που φέρουν σε ετεροζυγωτία την μετάλλαξη c.118C>T. Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές, η παραλλαγή c.92+7A>G πιθανολογείται να επιβαρύνει τα αιματολογικά ευρήματα και ίσως την κλινική εικόνα όταν συγκληρονομείται με μια κλασσική μετάλλαξη της β-Θαλασσαιμία.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση της παραλλαγής c.92+7A>G, που βρίσκεται στην 7^η θέση του πρώτου ιντρονίου στο γονίδιο της β-σφαιρίνης, στην συρραφή του mRNA της β-αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης σε ανώριμα ερυθροκύτταρα. Με τα μέχρι τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα, αλλαγή στη 7^η θέση δεν έχει περιγραφεί να έχει κάποια επίπτωση στη διαδικασία της συρραφής. Οι συντηρημένες αλληλουχίες -GU στην 5' θέση και -AG στην 3' θέση συρραφής καθώς και στις συναινετικές αλληλουχίες αποτελούν τις συνήθεις θέσεις που συμβάλλουν στις διαταραχές της συρραφής.

Πιο αναλυτικά, αλλαγές στην αλληλουχία των συγκεκριμένων θέσεων έχει ως αποτέλεσμα την κατάργηση των φυσιολογικών θέσεων συρραφής ή την ενεργοποίηση κρυφών θέσεων συρραφής. Οι αλλαγές στη συρραφή του mRNA έχει ως συνέπεια την αλλαγή στη βιοσύνθεση της πρωτεΐνης καθώς μπορεί να περιλαμβάνονται τμήματα των ιντρονίων ή να απουσιάζουν τμήματα των εξονίων.

Οι παραλλαγές στην αλληλουχία στα όρια μεταξύ εξονίων-ιντρονίων έχουν τη δυνατότητα να αποδυναμώσουν τις φυσιολογικές θέσεις συρραφής και να ενεργοποιηθούν νέες θέσεις σε γειτονικές αλληλουχίες. Οι αλληλουχίες αυτές εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα με τις φυσιολογικές αλληλουχίες που εμπλέκονται στη συρραφή με αποτέλεσμα να «μπερδεύεται» το σωματίο συρραφής και να «κόβει» σε λανθασμένο σημείο.

Με βάση την πειραματική προσέγγιση που πραγματοποιήθηκε, δηλαδή στην αξιολόγηση των προϊόντων της RT-PCR με PAGE, την αλληλούχιση κατά Sanger και την ανάλυση τμημάτων με F-PCR, δεν υπήρξε διαφοροποίηση στην συρραφή του mRNA μεταξύ των ατόμων που έφεραν την μετάλλαξη και με το φυσιολογικό άτομο. Σύμφωνα με μελέτες, αλλαγές στις συναινετικές αλληλουχίες και στις θέσεις συρραφής ενεργοποιούν κρυφές θέσεις συρραφής στο κωδικόνιο 25 και στη θέση 13 στο ιντρόνιο 1, θέσεις που πιθανά να ενεργοποιούνταν και με την αλλαγή στη θέση 7 του ιντρονίου 1 που μελετάται.

Τα προϊόντα που πιθανά να προέκυπταν από την ενεργοποίηση των κρυφών θέσεων στο κωδικόνιο 25 και στη θέση 13 του ιντρονίου 1, θα είχαν μέγεθος, με το πρώτο

ζευγάρι εκκινητών, 171bp και 200bp αντίστοιχα για την κάθε θέση ενώ για το δεύτερο ζευγάρι 368bp και 397bp. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της F-PCR, εμφανίζεται ένα δεύτερο προϊόν (172bp) στα άτομα II-1 και III-2 που έφεραν την μετάλλαξη, επιπρόσθετο του φυσιολογικού.

Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα αποτελεί μια πιθανή ένδειξη παραπροϊόντος λόγω αλλαγής στη συρραφή. Χρήζει, όμως, περαιτέρω διερεύνησης καθώς το παραπροϊόν εμφανίστηκε μόνο κατά τον πολλαπλασιασμό με το πρώτο ζευγάρι εκκινητών και δεν υπήρχε κάποιο επιπλέον προϊόν πέραν του φυσιολογικού στα αποτελέσματα κατά τον πολλαπλασιασμό με το δεύτερο ζευγάρι, το οποίο περιελάμβανε και το τμήμα που ενίσχυε το πρώτο ζεύγος. Επιπρόσθετα, η ένταση φθορισμού του προϊόντος στις 172bp ήταν πολύ χαμηλή, πιο συγκεκριμένα αποτελούσε το 1% συγκριτικά με την ένταση φθορισμού του φυσιολογικού προϊόντος.

Η μετάλλαξη c.92+7A>G που μελετήθηκε, πιθανά να αποδυναμώνει τη φυσιολογική θέση συρραφής ή/ και να ενεργοποιεί κρυφές θέσεις συρραφής που τροποποιούν τη συρραφή αλλά δεν εμφανίζουν μεγάλη ενεργότητα καθώς δεν μπορούν να ανταγωνιστούν τη φυσιολογική θέση. Μελέτες έχουν δείξει την ύπαρξη τέτοιων κρυφών θέσεων συρραφής που επηρεάζονται από μεταλλάξεις κοντά στα σημεία ένωσης εξονίων-ιντρονίων ή μέσα στα εξόνια. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι ανάλογες μεταλλάξεις c.92+5G>C,T ή A (IVS-I-5), c.92+6C>T (IVS-I-6) στο ιντρόνιο 1 και η c.79G>A ή HbE (GAG->AAG) στο εξόνιο 1 στο κωδικόνιο 26.

Οι μεταλλάξεις IVS-I-5 (G>C) και IVS-I-6 (T>C) σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε με την χρήση πλασμιδιακών φορέων, έδειξε την μείωση της δραστηριότητας της 5' θέσης συρραφής και την ενεργοποίηση 3 κρυφών θέσεων συρραφής, δύο μέσα στο εξόνιο 1, κωδικόνια 18 και 25, και μια στο ιντρόνιο 1, θέση 13. Οι ενεργοποιημένες αυτές θέσεις επηρεάζουν τη δέσμευση της U1 snRNP στην 5' θέση (56) ανταγωνιζόμενες τη φυσιολογική θέση και παράγοντας ώριμο mRNA με μικρότερο μέγεθος από το φυσιολογικό, για τις θέσεις στα κωδικόνια 18 και 25, ή με μεγαλύτερο μέγεθος, για τη θέση θέση 13 στο ιντρόνιο 1.

Πειράματα με διαγονιδιακά ποντίκια που έφεραν τη μετάλλαξη IVS-I-6 (T>C), εμφάνισαν τις ίδιες κρυφές θέσεις συρραφής ενεργοποιημένες και το μετάγραφο που προερχόταν από το κωδικόνιο 25 του εξονίου 1 ήταν μειωμένο σε σύγκριση με προηγούμενες μελέτες. Η μειωμένη παραγωγή του συγκεκριμένου μεταγράφου πιθανά να οφείλεται στη μειωμένη σταθερότητα του που ενεργοποιεί το μηχανισμό NMD (57). Το mRNA που προκύπτει από ενεργοποίηση του κωδικονίου 18, έχει δείχθει ότι δεν

αποικοδομείται μέσω του μηχανισμού NMD, γεγονός που οφείλεται στην μη αναγνώριση του ως «ελαττωματικό» από το μηχανισμό.

Η επιλογή των κρυφών θέσεων που θα ενεργοποιηθούν εξαρτάται από την θέση της μετάλλαξης όπως επίσης και από το χρωμοσωμικό υπόβαθρο του πειραματικού μοντέλου που θα χρησιμοποιηθεί. Σε δικτυοερυθροκύτταρα, μόνο το κωδικόνιο 18 και η θέση +13 έχουν ενεργοποιηθεί από μεταλλάξεις στην αρχή του ιντρονίου 1 ενώ σε κύτταρα HeLa που μελετήθηκε η IVS-I-5 (G>A) μόνο η κρυφή θέση 25 συμμετείχε στην παραγωγή ώριμων mRNA. Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις, οι κρυφές θέσεις που θα ενεργοποιηθούν και ποιες από αυτές θα «προτιμηθούν» από της συρραφής δεν εξαρτάται μόνο από τη μετάλλαξη και τη θέση της στην αλληλουχία του γονιδίου αλλά και από το μοντέλο που θα επιλεγεί για να μελετηθούν καθώς επηρεάζονται από το χρωμοσωμικό υπόβαθρο του μοντέλου(58,59).

Η HbE (cd26 GAG->AAG) σχετίζεται με την ενεργοποίηση κρυφών θέσεων συρραφής και πιο συγκεκριμένα της θέσης στο κωδικόνιο 25. Το προϊόν που προκύπτει από τη νέα αυτή θέση συρραφής αποτελεί μόλις το 5-8% των παραγόμενων μεταγράφων. Η μετάλλαξη στο κωδικόνιο 26 ενισχύει τη συγγένεια της θέσης 25 με το σωματίο συρραφής με αποτέλεσμα να ανταγωνίζεται τη φυσιολογική θέση συρραφής και, επιπρόσθετα, καθυστερεί την αποκοπή του ιντρονίου 1. Η συγκεκριμένη θέση είναι ενεργοποιημένη και στην αντικατάσταση T>A στο κωδικόνιο 24 αλλά και στην Hb Κνωσσός (cd27 GCC->TCC) (60,61,62). Μελέτες σε κύτταρα HeLa που έφεραν τις μεταλλάξεις IVS-I-6 (T>C) και HbE, η κρυφή θέση συρραφή στο κωδικόνιο 25 ενισχύεται από την παρουσία των δύο μεταλλάξεων και ευνοείται η μη φυσιολογική συρραφή του mRNA.

Με βάση τα αποτελέσματα των μελετών που αναλύθηκαν μέχρι τώρα, πιθανά να ευνοείται η κρυφή θέση συρραφής στο κωδικόνιο 25 από την ύπαρξη της υπό μελέτης μετάλλαξης c.92+7A>G αλλά καθώς είναι πολύ αδύναμη σε σύγκριση με την φυσιολογική θέση συρραφής, το προϊόν που παράγεται να είναι σε πάρα πολύ μικρή ποσότητα και είναι εξαιρετικά δύσκολη η ανίχνευση και ταυτοποίηση του.

Συμπληρωματικά, μια μελέτη για τη παραλλαγή *HBB*:c.92+7A>T σε δύο οικογένειες ιταλικής καταγωγής, στις οποίες η παραλλαγή c.92+7A>T μεταβιβάζεται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο, συμπεραίνεται ότι πιθανά η συγκεκριμένη παραλλαγή να είχε κάποια επίδραση στη συρραφή καθώς μειώνει την αποτελεσματικότητα στη συρραφή στη 5' θέση συρραφής και οδηγεί στην εμφάνιση β-Θαλασαιμίας. Η περιγραφή για τη c.92+7A>T αποτελεί συμπέρασμα έρευνας που δεν έχει δημοσιοποιηθεί και χωρίς να

έχει επιβεβαιωθεί από κάποια άλλη μελέτη. Η παραλλαγή c.92+7A>G πιθανά να ενεργοποιεί τον ίδιο μηχανισμό παθογένειας σε μικρότερη κλίμακα και γι αυτό εμφανίζονται τα αιματολογικά ευρήματα στο παιδί που μελετάται.

Στο περιστατικό που μελετήθηκε, το παιδί που παραπέμφθηκε με αιματολογικά ευρήματα για πιθανή εκδήλωση β-Θαλασσαιμίας, μετά από γονιδιακό έλεγχο διαπιστώθηκε ότι έφερε την παραλλαγή c.92+7A>G σε διπλή ετεροζυγωτία με τη μετάλλαξη c.118C>T (Cd39). Την παραλλαγή c.92+7A>G την κληρονόμησε από τον πατέρα του ο οποίος ήταν επίσης ετεροζυγώτης για τη συγκεκριμένη παραλλαγή χωρίς κάποιες αιματολογικές ενδείξεις.

Τα κλινικά ευρήματα και συμπτώματα που παρατηρούνται στη β-Θαλασσαιμία είναι αποτέλεσμα της περίσσειας των α-αλυσίδων που συσσωρεύεται στα πρόδρομα ερυθροκύτταρα λόγω μειωμένης ή μηδενικής ποσότητας β-αλυσίδων. Οι συσσωρευμένες α-αλυσίδες κατακρημνίζονται και απελευθερώνουν τον σίδηρο από την αίμη. Ο σίδηρος που απελευθερώνεται σε συνδυασμό με ενεργές ρίζες οξυγόνου προκαλούν βλάβες στο κυτταροσκελετό και οδηγούν μειώνουν της διάρκειας επιβίωσης των ερυθροκυττάρων. Η αναιμία που εκδηλώνεται στη β-Θαλασσαιμία είναι συνέπεια της μικρής διάρκειας επιβίωσης των ερυθροκυττάρων και της μη αποτελεσματικής ερυθροποίησης.

Ένας πιθανός παράγοντας που θα ενίσχυε την εμφάνιση της ενδιάμεσης β-Θαλασσαιμίας στο υπό μελέτη άτομο είναι και η ύπαρξη τριπλασιασμένου α-γονιδίου. Έχει παρουσιασθεί ότι η κληρονόμηση ομοζυγωτίας τριπλασιασμένων α-γονιδίων και ετεροζυγωτία μεταλλάξεων της β-Θαλασσαιμίας αλληλεπιδρούν και προκαλείται επιδείνωση του φαινοτύπου (63) καθώς υπάρχει αυξημένη συσσώρευση α-αλυσίδων. Η κληρονομία δύο αλληλομόρφων με τριπλασιασμένο το α-γονίδιο μπορεί να μην ανιχνεύθηκε με τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν.

Συμπερασματικά, από τη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης δεν εμφανίζονται αλλαγές στη συρραφή του ώριμου mRNA της β-σφαιρίνης από την παραλλαγή c.92+7A>G, σύμφωνα με τις τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν. Εκτός από αλλαγές στη συρραφή mRNA της β-σφαιρίνης, η ύπαρξη επιπλέον παραγόντων φαίνεται, πιθανά, να συμβάλουν στην επιδείνωση του φαινότυπου της β-Θαλασσαιμίας. Εντούτοις, διαφαίνεται μέσα από την ολοκληρωμένη αυτή διαδικασία, η δυσκολία στο προσδιορισμό της παθογένειας μιας νέας παραλλαγής παρά τη συμβολή των νέων τεχνολογιών.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

HSCs	Hematopoietic stem cells
AGM	Aorta-gonad-mesonephros
EryP	Primitive erythroid cells
SCF	Stem cell factor
IL-3	Interleukin-3
IL-11	Interleukin-11
GCs	Glucocorticoids
BFU-E	Burst forming unit-erythroid
CFU-E	Colony forming unit-erythroid
IGF-1	Insulin-like growth factor
BMP4	Bone morphogenic protein
STAT5	Signal transducer and activator of transcription
TAL1	T-cell acute lymphocytic leukemia protein
LMO2	Lim-domain only protein 2
T	Tense
R	Relaxed
IVS	Intervening sequences
HS	Hypersensitive sites
NF-E2	Nuclear factor erythroid 2
AP1	Activating protein
LCR	Locus control region
EKLF	Erythroid Kruppel-like factor
HPFH	High persistence of fetal hemoglobin
NMD	Nonsense-mediated mRNA decay
PCR	Polymerase chain reaction
RT-PCR	Reverse transcription PCR
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Tavian M., Peault B.: Embryonic development of the human hematopoietic system. *Int J Dev Biol* 2005 49:243-250, doi:10.1387/ijdb.041957mt
2. Goldsby R., Kindt T., Osborne B., Kuby J.: Ανοσολογία. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης 2007
3. Dzierzak E., Philipsen S.: Erythropoiesis: Development and differentiation. *Cold Spring Harb Perspct Med* 2013;3:a011601
4. Baron M., Isern J., Fraser S. : The embryonic origins of erythropoiesis in mammals. *Blood* 2012;119(21):4828-4837,doi:10.1182/blood-2012-01-153486
5. Hattangadi S., Wong P., Zhang L., Flygare J., Lodish H.: From stem cell to red cell: regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs and chromatin modifications. *Blood* 2011;118(24):6258-6268
6. Fernandez K., De Alarcon P.: Development of the hematopoietic system and disorders of hematopoiesis that present during infancy and early childhood. *Pediatr Clin N Am* 60(2013) 1273-1289
7. Vander A., Sherman J., Luciano D.: Φυσιολογία του ανθρώπου, Μηχανισμοί λειτουργίας του οργανισμού. 2011 Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης
8. Mohandas N., Gallagher P. :Red cell membrane: past, present and future. *Blood* 2008;112:3939-3948.
9. Berg J., Tymoczko J., Stryer L.: Βιοχημεία. 2010 Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης
10. Eaton W., Henry E., Hofrichter J., Bettati S., Viappiani C., Mozzarelli A.: Evolution of allosteric models for hemoglobin. *IUBMB Life* 2007, 59-586-599
11. Ronda L., Bruno S., Abbruzzetti S., Viappiani C., Bettati S.: Ligand reactivity and allosteric regulation of hemoglobin-based oxygen carriers. *Bioch and bioph acta* 2008, 1365-1377.
12. Mihailescu MR., Russu I.: A signature of the T R transition in human hemoglobin. *PNAS* 2001,3773-3777.
13. Perutz M., Wilkinson A., Paoli M., Dodson G.: The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1998, 27:1-34
14. Karlsson S., Nienhuis A.: Developmental regulation of human globin genes. *Ann Rev Biochem* 1985 54:1071-108
15. Fernandez K., De Alarcon P.: Development of hematopoietic system and disorder of hematopoiesis that present during infancy and early childhood. *Pediatr Clin N Am* 60 (2013) 1273-1289
16. Schechter A.: Hemoglobin research and the origin of molecular medicine. *Blood* 2008;112:3927-3938
17. Manning L., Russell E., Padovan J., Chait B., Popowicz A., Manning R., Manning J.: Human embryonic, fetal and adult hemoglobins have different subunit interface strengths. Correlation with lifespan in the red cell. *Protein science* (2007) 16:1641-1658

18. Proudfoot N., Shander M., Manley J., Gefer M., Maniatis T.: Structure and in vitro transcription of human globin genes. *Science* 1980, 19;209:1326-1336
19. Waye J., Chui D.: The α -globin gene cluster: genetics and disorders. *Clin Invest Med* 2001; 24:103-109
20. Zhang H., Liu D., Lianh C.: The control of expression of α -globin gene cluster. *Int J Hematol* 2002;76:420-426
21. Steinberg M., Forget B., Higgs D., Weatherall D.: Disorders of hemoglobin: Genetics, pathophysiology and clinical management. Cambridge University Press, 2nd edition, 2009
22. Cao A., Moi P.: Regulation of the globin genes. *Pediatr Res* 51:415-421,2002
23. Stamatoyannopoulos G.: Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. *Exp Hematol* 2005;33(3):259
24. Crossley M., Orkin S.: Regulation of the β -globin locus. *Curr Opin Genet Dev* 1993 3:232-237
25. Orkin S.: Regulation of globin gene expression in erythroid cells. *Eur J Biochem* 1995, 231, 271-281
26. Li Q., Peterson K., Fang X., Stamatoyannopoulos G.: Locus control regions. *Blood* 2002;100:3077-3086
27. Sankaran V., Xu J., Orkin S.: Advances in the understanding of haemoglobin switching. *Br J Haematol* 2010;149:181-194
28. Forget B., Bunn F.: Classification of the disorders of hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3:a011684
29. Grosso M., Sessa R., Puzone S., Storino M.R., Izzo P.: Molecular basis of thalassemia. *Anemia Donald S. Silverberg, IntechOpen, 2012*
30. Angastiniotis M., Modell B.: Global epidemiology of hemoglobin disorders. *Annals of New York Academy of Science,2006*
31. Weatherall D.: Phenotype-genotype relationships in monogenic disease :lessons from thalassaemias. *Nat Rev Genet* 2001;2:245-255
32. Birgens H., Ljung R.: The thalassaemia syndromes. *Scand J Clin Lab Inest* 2007;67:11-26
33. GalanelloR., Origa R.: Beta-thalassemia. *Orphanet Journalof Rare Diseases* 2010,5:11
34. De Sanctis V., Kattamis C., Canatan D., Soliman A., Elsedfy H., Karimi M., Daar S., Wali Y., Yassin M., SolimanN., Sobti P., Al Jaouni S., El Kholy M., Fiscina B., Angastiniotis M.: β -Thalassemia distribution in the old world: an ancient disease seen from a historical standpoint. *Medterr J Hematol Infect Dis* 2017;9:e2017018
35. Thein S.L.: The molecular basis of β -thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3:a011700
36. Joy Ho P., Thein S.L.: Gene regulation and deregulation: a β globin perspective . *Blood Reviews* 2000, 14, 78-93

37. Watson J., Baker T., Bell S., Gann A., Levine M., Losick R.: Μοριακή βιολογία του γονιδίου. Εκδόσεις Utopia 2011
38. Sibley C., Blazquez L., Ule J.: Lessons from non-canonical splicing. *Nat Rev Genet* 2016;17 (7):407-421
39. Haj Khelil A., Deguillien M., Moriniere M., Chibani J.,Baclouti F.: Cryptic splicing sites are differentially utilized in vivo. *FEBS Journal* 2008, 275, 1150-1162
40. Joy Ho P.: The regulation of β-globin gene expression and β-thalassemia. *Pathology* 1999, 31, pp 315-324
41. Ramezanzadeh M., Salehi M., Salehi R.: Assessment of high resolution melt analysis feasibility for evaluation of beta-globin gene mutations as a reproducible, cost-efficient and fast alternative to the present conventional method. *Adv Biomed Res* 2016;5:71
42. Miri-Moghaddam E., Bahrami S., Naderi M., Bazi A., Karimipoor M.: Molecular characterization of β-Thalassemia Intermedia in Southeast Iran. *Hemoglobin* 2016; 40(3):173-8
43. Steinberg-Shemer O., Ulirsch J., Noy-Lotan S., Krasnov T., Attias D., Dgany O., Laor R., Sankaran V., Tmary H.: Whole-exome sequencing identifies an α-globin cluster triplication resulting in increased clinical severity of β-Thalassemia. *Cold Spring Harb Mol Case Stud* 2017;3(6)
44. Islam T., Sarkar S., Sultana N., Begum N et al. : High resolution melting curve analysis targeting the HBB gene mutational hotspot offers a reliable screening approach for all common as well as most of the rare beta-globin mutations in Bangladesh. *BMC Genetics* 2018, 19;1
45. Silva M.R., Sendin S.M., Araujo I., Pimentel F.S., Viana M.B.: Alpha chain hemoglobins with electrophoretic mobility similar to that of hemoglobin S in a newborn screening program. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2013;35(2):109-114
46. MacArthur D., Manolio T., Dimmock D., Rehm H. et al: Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature* 2014
47. Richards S.,Aziz N., Bale S., Bick D., Das S. et al: Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants : a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Gen Med* 2015
48. Law P., Kapoor V., Alsop T., Dooley D.: Culture of colony-forming hematopoietic progenitor cells from human peripheral blood. *J Tiss Cult Meth* 1992, 14:13-20
49. Harbers M.: The current status of cDNA cloning. *Genomics* 2008, 91,232-242
50. Ensembl : <https://www.ensembl.org/index.html>
51. Primer3: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>
52. Rahman MT., Uddin MS., Sultana R.,Moue A., Setu M.: Polymerase Chain Reaction (PCR): a short review. *AKMMC J* 2013: 4(1):30-36
53. Lee P.Y., Costumbrado J., Hsu C.Y., Kim Y. H.: Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp* 2012 (62) e3923
54. Smith L., Sanders J., Kaiser R., Hughes P., Dodd C., Connell C., Heiner C., Kent S., Hood L.: Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 1986
55. Woolfe A., Mullikin J., Elnitski L.: Genomic feature defining exonic variants that modulate splicing. *Genome Biology* 2010, 11:R20

56. Treisman R., Orkin S., Maniatis T.: Specific transcription and RNA splicing defects in five cloned β -thalassaemia genes. *Nature* 1983
57. Breveglieri G., Mancini I., Bianchi N., Lampronti I., Salvatori F. et al.: Generation and characterization of a transgenic mouse carrying a functional human β -globin gene with the IVS-I-6 thalassemia mutation. *Biomed Res Int* 2015 : 687635
58. Lossi A.M., Berge-Lefranc J.L.: The mRNA transcripts from a mutant β -globin gene derived from splicing at preferential cryptic sites. *FEBS Letters* 1989, 256(1-2), 163-166
59. Lapoumeroulie C., Acuto S., Rouabhi F., Labie D., Krishnamoorthy R., Bank A.: Expression of a β -thalassemia gene with abnormal splicing. *Nucleic Acids Research* 1987
60. Steinberg M., Adams J.: Thalassemic Hemoglobinopathies. *Am J Pathol* 1983,113:396-409
61. Orkin S., Kazazian H., Antonarakis S., Ostrer H., Goff S., Sexton J.: Abnormal RNA processing to the exon mutation of β E-globin gene. *Nature* 1982
62. Suwanmanee T., Sierakowska H., Fucharoen S., Kole R.: Repair of a splicing defect in erythroid cells from patients with β -thalassemia /HbE disorder. *Molecular Therapy* 2002
63. Traeger-Synodinos J., Kanavakis E., Vrettou C., Maragoudaki E., Michael T., Metaxotou-Mavromati A.: The triplicated α -globin gene locus in β -thalassaemia heterozygotes: clinical, haematological, biosynthetic and molecular studies. *British journal of haematology* 1996, 95, 467-471