

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ
ΥΔΡΟΞΥΟΥΡΙΑΣ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ
ΑΛΛΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ
ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

ΛΥΚΟΥΣΗ ΣΟΦΙΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2008

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 7562/1
Ημερ. Εισ.: 30-09-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιδετικός Κωδικός: Δ
616.15
ΛΥΚ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000083717

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ
ΥΔΡΟΞΥΟΥΡΙΑΣ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ
ΑΛΛΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ
ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

ΛΥΚΟΥΣΗ ΣΟΦΙΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2008

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

● ΚΟΛΛΙΑ ΠΑΝΑΓΟΥΛΑ

Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου
Πανεπιστημίου Αθηνών

..1.1.1.1.1.1.1 ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

● ΣΤΑΘΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

Καθηγητής Παθολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

● ΚΟΛΛΙΑ ΠΑΝΑΓΟΥΛΑ

Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου Πανεπιστημίου Αθηνών

● ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ

Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

..1.1.1.1.1.1.2 ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

● ΒΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

Καθηγητής Βιολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

● ΚΟΥΚΟΥΛΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

● ΣΤΑΘΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

Καθηγητής Παθολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

● ΜΑΤΣΟΥΚΑ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αιματολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

● ΚΟΛΛΙΑ ΠΑΝΑΓΟΥΛΑ

Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου Πανεπιστημίου Αθηνών

● ΚΥΡΙΑΚΟΥ ΔΕΣΠΟΙΝΑ

Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικών Μεταγγίσεων Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

● ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι θαλασσαιμίες είναι μια ετερογενής ομάδα γενετικών διαταραχών σύνθεσης της αιμοσφαιρίνης. Ένας τρόπος θεραπευτικής αντιμετώπισης των θαλασσαιμιών είναι η προσπάθεια παραγωγής μεγάλου ποσού HbF με βάση την παρατήρηση ότι η παρουσία HbF σε ασθενείς με β-θαλασσαιμία και δρεπανοκυτταρική αναιμία βελτιώνει την κλινική τους εικόνα. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε εδώ και χρόνια τους ερευνητές να αναζητήσουν φάρμακα που θα μπορούσαν να επάγουν τη σύνθεση της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης, όπως η υδροξυουρία. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τους μηχανισμούς δράσης της υδροξυουρίας σε συνδυασμό με άλλες κυτταροκίνες σε καλλιέργειες αρχέγονων CD34⁺ κυττάρων από περιφερικό αίμα ενηλίκων.

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε υπό την εποπτεία της Επίκουρης Καθηγήτριας κας Κόλλια Παναγούλας στο Εργαστήριο Βιολογίας και Μοριακής Γενετικής και Κυτταρογενετικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κα . Κόλλια Παναγούλα, Επίκουρη Καθηγήτρια, για την εμπιστοσύνη, την καθοδήγηση και τη στήριξη που μου έδειξε κατά την εκπόνηση της διατριβής. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Παθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Ν. Σταθάκη, για τη συμμετοχή του στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή της διδακτορικής διατριβής μου και για τις εύστοχες παρατηρήσεις του κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής και μέλος της Τριμελούς Επιτροπής της διατριβής κα. Α. Τσέζου, για την εμπιστοσύνη της. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της επταμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: τον Καθηγητή Βιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Ν. Βαμβακόπουλο, τον Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Γ. Κουκούλη, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αιματολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κα. Π. Ματσουκά και την Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικών Μεταγγίσεων του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κα. Δ. Κυριάκου.

Για την πολύτιμη συνδρομή τους στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής ευχαριστώ θερμά τους συνεργάτες και φίλους μου:

- κα. Β. Μέριανου, και κα. Μ. Κατελανή Διευθύντριες Μονάδας Αιμοδοσίας και Αιματολογικού Εργαστηρίου, αντίστοιχα, του Νοσοκομείου "Αγ. Ολγα", για την παροχή των ασκών αιμοδοσίας από υγιείς αιμοδότες για την απομόνωση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων

- την κα. Κ. Σέκερη, Ερευνητής Α', Εργαστήριο Βιοχημείας Ιστωνών, τον κ. Δ. Κλέτσα, Ερευνητής Β', Εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας, του Ινστιτούτου "Δημόκριτος" και τον Ε. Γουσέτη, Αν. Διευθυντής Μ.Μ.Μ.Ο. του Νοσοκομείου "Αγ. Σοφία" για την πολύτιμη εργαστηριακή υποστήριξη στη φάση διεξαγωγής των κυτταροκαλλιεργειών
- τον κ. Γ. Πατεράκη, Επιμελητή Α', στο Εργαστήριο Κυτταρομετρίας Ροής του Ανοσολογικού Τμήματος του Νοσοκομείου "Γ. Γεννηματάς" για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξη στη διεξαγωγή των πειραμάτων κυτταρομετρίας ροής
- τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τις Βιολόγους κα. Μαρία Σαμαρά και κα. Ιωάννα Χιώτογλου, για τη βοήθεια και την ψυχολογική συμπαράσταση που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια της διατριβής και κυρίως για τις ατελείωτες ώρες που στάθηκαν δίπλα μου ανιδιοτελώς
- και ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου για την ηθική συμπαράσταση και κατανόηση απέναντι στις πολλές ώρες απουσίας μου.

Λάρισα, Ιούλιος 2008

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1. ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΕΣ.....	8
1.1.1. Ιστορική προσέγγιση.....	8
1.1.2. Το μόριο της αιμοσφαιρίνης.....	9
1.1.3. Η αιμοσφαιρίνη κατά την οντογένεση.....	10
1.1.4. Η οργάνωση των γονιδίων σφαιρίνης.....	13
1.1.5. Ρύθμιση της έκφρασης των σφαιρινικών γονιδίων.....	14
1.1.6. Ελεγκτική περιοχή του συμπλέγματος των γονιδίων β-τύπου (LCR).....	17
1.1.7. Το γ γονίδιο της σφαιρίνης.....	20
1.1.8. Εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη στους ενήλικες.....	21
1.1.8.1. Προέλευση F κυττάρων.....	22
1.2. ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΜΒΡΥΪΚΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ.....	25
1.2.1. Επαγωγικοί παράγοντες της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης.....	26
1.2.1.1. 5'-αζακυτιδίνη.....	26
1.2.1.2. Υδροξουρία. (H ₂ ON - C - NH - OH).....	27
1.2.1.3. Ερυθροποιητίνη (Epo) και άλλες κυτοκίνες.....	32
1.2.1.4. Βουτυρικό οξύ και λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας ατόμων άνθρακα και τα παράγωγά τους.	35
• Αναστολείς αποακετυλίωσης των ιστονών (HDAC).....	36
1.2.1.5. Αίμη.....	37
1.2.1.6. Αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης β (TGF-β).....	39
1.3. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	41
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	43
A.ΥΛΙΚΟ.....	44
B. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	44
2.1. Κυτταροκαλλιέργειες.....	44
2.1.1. Καλλιέργειες ανθρώπινων προγονικών κυττάρων (CD34+) Διαφοροποίηση προς την ερυθρά σειρά.....	45
➤ Απομόνωση ανθρώπινων προγονικών κυττάρων CD34 ⁺ από περιφερικό αίμα φυσιολογικών ενηλίκων ατόμων.....	45
➤ Καλλιέργεια των CD34 ⁺ κυττάρων	46

2.2. Κυτταρομετρία ροής (τριπλός ανοσοφθορισμός).....	47
2.2.1. Χαρακτηρισμός των κυττάρων και προσδιορισμός του αριθμού των μορίων των κυτταρικών αντιγόνων επιφανείας CD34, CD71, CD117 (c-Kit/SCFr) και γλυκοφορίνης , καθώς και των μορίων γ σφαιρίνης, με κυτταρομετρία ροής.....	47
2.3. HPLC. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης Με Στήλη Αντίστροφης Φάσης C8 (RP-HPLC).....	48
2.4. Απομόνωση κυτταροπλασματικού RNA.....	49
2.4.1. Απομόνωση κυτταροπλασματικού RNA από κύτταρα καλλιέργειας.....	49
2.4.2. Σύνθεση cDNA	50
2.5. Μοριακή ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων α-, β- και γ-σφαιρίνης....	52
• α- και β- γονίδια σφαιρίνης.....	53
• γ- Σφαιρίνη.....	54
2.6. Ανάλυση της έκφρασης των mRNA μεταγράφων με την τεχνική της PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR).....	56
2.6.1. Γενικές αρχές PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR).....	56
2.6.2. Ανάλυση RQ-PCR με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I.....	58
2.6.3. Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υδρόλυσης.....	60
2.6.4. Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υβριδισμού.....	61
2.7. Ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων σφαιρίνης με την τεχνική RQ-PCR και ανιχνευτές υβριδοποίησης.....	66
2.7.1. Απομόνωση RNA και προετοιμασία cDNA.....	66
2.7.2. Πρωτόκολλο αντίδρασης RQ-PCR.....	67
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	71
3.1. Μελέτη της διαδικασίας ωρίμανσης των CD34⁺ κυττάρων σε πρωτογενείς καλλιέργειες ερυθροκυττάρων ενηλίκου.....	72

3.1.1. Επίδραση των κυτταροκινών EPO και SCF στην ωρίμανση της καλλιέργειας (EPO 4 ή 10 u/ml και παρουσία ή απουσία SCF).....	76
3.2. Επίδραση της υδροξυουρίας (HU) σε πρωτογενείς καλλιέργειες ερυθροκυττάρων.....	81
3.2.1. Μέτρηση αριθμού κυττάρων.....	81
3.2.2. Μελέτη της απόπτωσης των κυττάρων μετά την επίδραση 100μM, 300μM HU και ταυτόχρονης παρουσίας act-D στις καλλιέργειες CD34 ⁺ κυττάρων.....	83
3.2.3. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων EPO στο ποσοστό των CD71 ⁺ , GPA ⁺ , CD117 ⁺ και των F ⁺ κυττάρων μετά τη δράση 100 και 300 μM HU για 1 ημέρα με παλμό, παρουσία SCF σε όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας.....	84
3.2.4. Μελέτη των CD71 ⁺ , GPA ⁺ , CD117 ⁺ και των F ⁺ κυττάρων παρουσία ή απουσία του SCF και EPO (4→10 u/ml) και παράλληλη δράση 100μM και 300μM HU για 1 ημέρα με παλμό.....	89
3.2.5. Μέτρηση των CD71 ⁺ , CD117 ⁺ , GPA ⁺ και των F ⁺ κυττάρων μετά την προσθήκη HU και act-D.....	91
3.3. Μελέτη των αλυσίδων σφαιρίνης με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης, HPLC, μετά την προσθήκη HU.....	94
3.4. Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων σφαιρίνης.....	98
3.4.1. Ποιοτική έκφραση των γονιδίων σφαιρινών.....	98
3.4.2. Επίδραση της υδροξυουρίας (HU) στα γονίδια σφαιρινών.....	99
3.4.2.1. Ποσοτικοποίηση των mRNA μεταγράφων των γονιδίων των σφαιρινών γ-mRNA μετάγραφα.....	99
3.4.3. Επίδραση της HU στην παραγωγή αιμοσφαιρινών HbF και HbA.....	102
3.4.4. Επίδραση της υδροξυουρίας (HU) στους μηχανισμούς μετα-μεταγραφικής τροποποίησης των β- και γ-μεταγράφων σφαιρίνης.....	105
3.4.5. Επίδραση της υδροξυουρίας στη μετάφραση των γονιδίων σφαιρίνης.....	108
3.4.6. Επίδραση της παρουσίας των κυτταροκινών, SCF και EPO στην έκφραση των γονιδίων σφαιρινών.....	110
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	113
5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	126
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	135

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΕΣ

1.1.1. Ιστορική προσέγγιση.

Το 1925 οι Thomas Cooley και George Pearl Lee περιέγραψαν για πρώτη φορά διάφορες αναιμίες που εμφανίζονται σε άτομα πολύ μικρής ηλικίας και συνοδεύονται από σπληνομεγαλία και χαρακτηριστικές αλλαγές στα οστά.⁽¹⁾ Αργότερα, ο Whipple ονόμασε τις αναιμίες αυτές θαλασσαιμίες, καθώς οι ασθενείς που μελετήθηκαν προέρχονταν όλοι από τη Μεσόγειο Θάλασσα. Στη συνέχεια έγινε κατανοητό ότι οι θαλασσαιμίες δεν περιορίζονται μόνο στην περιοχή της Μεσογείου αλλά εκτείνονται αρκετά ευρέως. Το 1940 κατανοήθηκε πλήρως ότι η γενετική βάση της νόσου οφείλεται σε ένα αυτοσωμικό υπολειπόμενο γονίδιο. Ο όρος θαλασσαιμία αναφέρεται σε μια ασθένεια με μεγάλη ετερογένεια και η ανάλυση της σύνθεσης της αιμοσφαιρίνης ασθενών έδειξε ότι υπάρχουν δύο τύποι, οι α- και β-θαλασσαιμίες.⁽²⁾ Ο καθένας από αυτούς τους τύπους αποτελεί ετερογενή ομάδα με γενετικές διαταραχές της σύνθεσης της αιμοσφαιρίνης, που οφείλονται σε απουσία ή μείωση της παραγωγής μιας ή περισσοτέρων αλυσίδων σφαιρίνης.

Η ταξινόμησή τους μπορεί να γίνει:

- α. σε κλινικό επίπεδο, ανάλογα με τη βαρύτητα του νοσήματος,
- β. σε πρωτεϊνικό επίπεδο, ανάλογα με την αλυσίδα της σφαιρίνης, που συντίθεται με ελαττωμένο ρυθμό και
- γ. σε μοριακό επίπεδο, με βάση τη μεταλλαγή, που είναι υπεύθυνη για την ελαττωμένη σύνθεση ή πλήρη έλλειψη της αλυσίδας σφαιρίνης.⁽³⁾

Οι θαλασσαιμίες είναι οι πιο κοινές μονογονιδιακές ασθένειες παγκοσμίως. Είναι το πρώτο νόσημα που μελετήθηκε με μεθόδους Μοριακής Βιολογίας και παραμένει το μοντέλο για την κατανόηση των σχέσεων μεταξύ φαινοτύπου και γονοτύπου.

Το πρώτο στοιχείο που φανέρωσε την ύπαρξη αναπτυξιακών αλλαγών στην αιμοσφαιρίνη παρατηρήθηκε στο τέλος του 19^{ου} αιώνα, όταν βρέθηκε ότι η αιμοσφαιρίνη των νεογέννητων ήταν ανθεκτική στο αλκαλικό περιβάλλον, ενώ του ενήλικα ήταν ευαίσθητη. Στην αρχή του 20^{ου} αιώνα, στη δεκαετία του 1930, ανακαλύφθηκαν οι διαφορές των δύο τύπων αιμοσφαιρινών στην συγγένεια τους με το οξυγόνο. Στο τέλος του 1940 παρατηρήθηκε για πρώτη φορά ότι η ύπαρξη HbF βελτιώνει την εικόνα των ασθενών με δρεπανοκυτταρική αναιμία.

1.1.2. Το μόριο της αιμοσφαιρίνης

Ο Perutz και Kendrew με τη βοήθεια της κρυσταλλογραφίας και ακτίνες Χ μελέτησαν τη δομή και λειτουργία του μορίου της αιμοσφαιρίνης.⁽⁴⁾

Η αιμοσφαιρίνη είναι μία σύνθετη σφαιρική πρωτεΐνη, η οποία περιέχει και μη πρωτεϊνικά στοιχεία. Το πρωτεϊνικό τμήμα αντιστοιχεί σε τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες σφαιρίνης, δύο α-τύπου (α και ζ σφαιρίνες) με 141 αμινοξέα και δύο β-τύπου (β, γ, δ, ε σφαιρίνες) με 146 αμινοξέα.

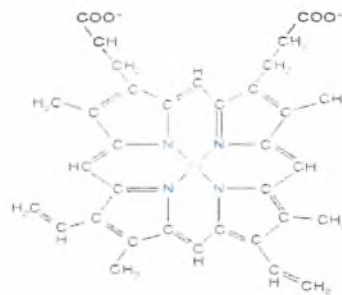
Η κύρια αιμοσφαιρίνη στους ενήλικες είναι η HbA, η οποία αποτελείται από τις $\alpha_2\beta_2$ υπομονάδες. Σε ένα μικρό ποσοστό (~2%) οι ενήλικες διαθέτουν και ένα άλλο είδος αιμοσφαιρίνης την HbA₂, με αντίστοιχα τις υπομονάδες $\alpha_2\delta_2$. Η κύρια εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη είναι η HbF με σύνθεση $\alpha_2\gamma_2$, ενώ κατά τα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης εμφανίζονται οι Hb Gower1 ($\zeta_2\varepsilon_2$) και Hb Gower2 ($\alpha_2\varepsilon_2$) και Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$).

Η τριτοταγής δομή του μορίου εξασφαλίζει τη δέσμευση άλλων μορίων και την ανταπόκριση σε περιβαλλοντικά μηνύματα. Η κάθε αλυσίδα σφαιρίνης περιλαμβάνει μία χαρακτηριστική προσθετική ομάδα αίμης και μία θέση δέσμευσης του οξυγόνου (O₂) (Εικόνα 1.1A). Η αίμη, αποτελείται από τέσσερις πυρρολικούς δακτυλίους, οι οποίοι διατάσσονται σταυροειδώς σε ένα επίπεδο, στο κέντρο του οποίου στερεώνεται ένα άτομο δισθενούς σιδήρου (Εικόνα 1.1B). Η προσθετική ομάδα της αίμης διευκολύνει την αντιστρεπτή σύνδεση του οξυγόνου μέσω αλλοστερικών αλληλεπιδράσεων. Σε αυτό, επίσης, συμβάλλει και η θέση του δακτυλίου μέσα σε μία αναδίπλωση προς το εσωτερικό υδρόφοβο τμήμα του μορίου της αιμοσφαιρίνης.

Κρυσταλλογραφικές μελέτες με ακτίνες Χ έδειξαν ότι η τεταρτοταγής δομή της αιμοσφαιρίνης αλλάζει σημαντικά με την οξυγόνωση. Το οξυγονωμένο μόριο είναι πιο συμπαγές. Η οξυγόνωση μέσα σε μία υπομονάδα μεταφράζεται σε δομικές αλλαγές στα σημεία επαφής των υπομονάδων. Η πλήρωση και των τεσσάρων θέσεων με μόρια οξυγόνου διαφέρει ενεργειακά. Η συγγένεια δέσμευσης για το δεύτερο και τρίτο οξυγόνο είναι μεταξύ αυτών του πρώτου (λιγότερο ευνοϊκή ενεργειακά) και του τέταρτου.



A)



B)

Αιμη
(Σιδηροπρωτοπορφυρίνη IX)

Εικόνα 1.1: A) Στερεοδιάταξη της αλυσίδας β της αιμοσφαιρίνης. B) Το μόριο της αίμης (Σιδηροπρωτοπορφυρίνη IX).

1.1.3. Η αιμοσφαιρίνη κατά την οντογένεση.

Η διαδικασία της ερυθροποίησης στον άνθρωπο αποτελεί μια πολύ βασική λειτουργία ξεκινώντας από την εμβρυϊκή ζωή και συνεχίζει μέχρι την ενήλικη φάση του ανθρώπου με τη συμμετοχή διαφορετικών οργάνων.

Ο εμβρυϊκός σάκος είναι το πρώτο αιμοποιητικό όργανο έως την 5^η εβδομάδα της κύησης, ο οποίος αντικαθίσταται από το εμβρυϊκό ήπαρ έως την 20^η εβδομάδα. Στη συνέχεια συμμετέχει ο σπλήνας και λίγο πριν τη γέννηση ενεργοποιείται ο μυελός των οστών που παραμένει το αιμοποιητικό όργανο σε όλη την υπόλοιπη ενήλικη ζωή (Εικόνα 1.2).⁽⁵⁻⁸⁾

Η διαδικασία παραγωγής της ανθρώπινης αιμοσφαιρίνης (Hb) χαρακτηρίζεται από 2 μεγάλες αλλαγές ως προς τη σύνθεση των σφαιρινικών αλυσίδων. Πρώτη, η αντικατάσταση των πρωτοεμβρυϊκών από την εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη (HbF), η οποία συμπίπτει με την αλλαγή του οργάνου ερυθροποίησης από τον εμβρυϊκό σάκο στο ήπαρ. Δεύτερη αλλαγή, από την εμβρυϊκή στην αιμοσφαιρίνη του ενήλικα, η οποία γίνεται λίγο πριν τη γέννηση όπου ο μυελός των οστών έχει ξεκινήσει να συμμετέχει στην ερυθροποίηση, ενώ παράλληλα εξακολουθούν το ήπαρ και ο σπλήνας να αποτελούν αιμοποιητικά όργανα. Οι αντικαταστάσεις των εκφραζομένων γονιδίων στο β σύμπλεγμα, του ε από το γ γονίδιο και ακολούθως του γ από το β γονίδιο, ελέγχονται αποκλειστικά σε επίπεδο μεταγραφής.⁽⁹⁾ Η αντικατάσταση του ζ από το α γονίδιο

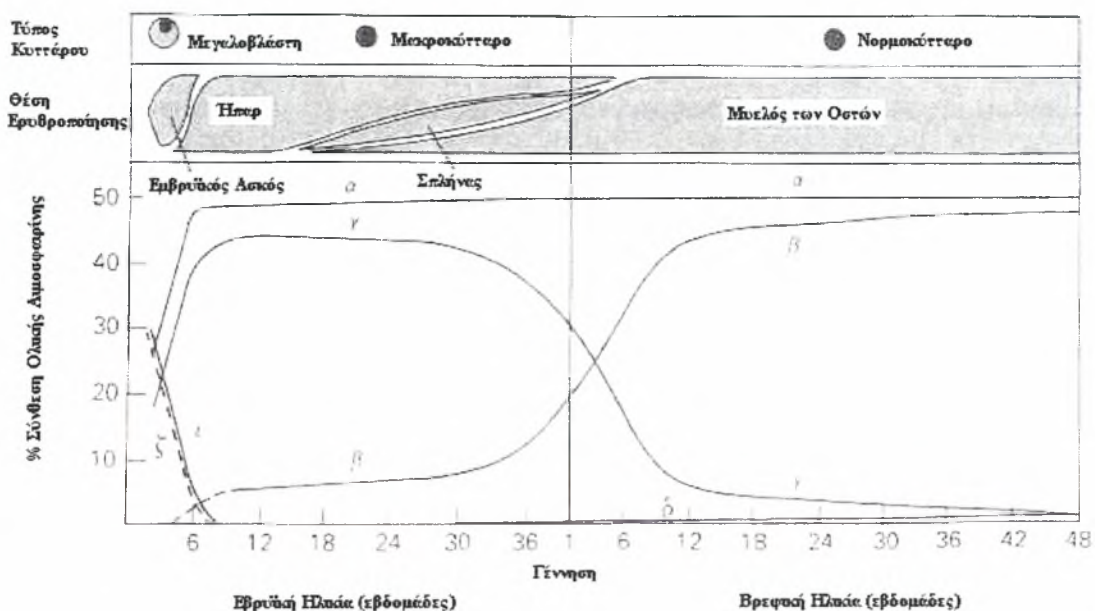
ελέγχεται κατά κύριο λόγο σε επίπεδο μεταγραφής, υπάρχουν όμως και μετα-μεταγραφικές διαδικασίες οι οποίες επηρεάζουν δευτερευόντως.⁽¹⁰⁾

Στους πρώτους μήνες κύησης τα ερυθροκύτταρα περιέχουν κυρίως τις πρωτοεμβρυϊκές αιμοσφαιρίνες (Hb Gower1 και Hb Portland 1), οι οποίες κατά τους 6 τελευταίους μήνες έχουν πλήρως αντικατασταθεί από την εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη (HbF). Τα διαφορετικά μόρια αιμοσφαιρίνης που χαρακτηρίζουν τις μεταβολές αυτές στην ερυθροποίηση κατά την εμβρυϊκή και την ενήλικη ζωή του ανθρώπου φαίνονται στον Πίνακα 1.1.

Όπως φαίνεται από τη σύνθεση όλων των μορίων αιμοσφαιρίνης, με εξαίρεση τις αιμοσφαιρίνες των αρχικών εβδομάδων της εμβρυογένεσης (Hb Gower1: $\zeta_2\epsilon_2$ και Hb Portland1: $\zeta_2\gamma_2$), σε όλες τις άλλες περιλαμβάνονται 2α αλυσίδες και 2 μη-α. Το έμβρυο διαθέτει μία χαρακτηριστική μη-α αλυσίδα, τη γ-αλυσίδα, η οποία μετά τη γέννηση αντικαθίσταται από μία άλλη μη-α αλυσίδα, τη β, χαρακτηριστική για τον ενήλικα. Ενώ αρχικά η ζ σφαιρίνη είχε χαρακτηριστεί απλά ως ένα νέο μόριο σφαιρινικής αλυσίδας και ότι προέρχεται από διαφορετικό γονιδιακό σύμπλεγμα, περαιτέρω μελέτες απέδειξαν δομικές ομοιότητές της με την α-σφαιρίνη οι οποίες οδήγησαν τελικά στην κατάταξή της ως μίας α-τύπου σφαιρίνης.^(11,12) Έτσι κάθε μόριο αιμοσφαιρίνης του οργανισμού διαθέτει δύο α-τύπου και δύο β-τύπου αλυσίδες.

Στη γέννηση η HbF αποτελεί το 60-80% της παραγόμενης αιμοσφαιρίνης. Στα βρέφη 16-20 εβδομάδων συναντάται σε ποσοστό 3% της ολικής αιμοσφαιρίνης και μπορεί να απαιτηθούν και 2 χρόνια για να σταθεροποιηθεί στα φυσιολογικά για τον ενήλικα επίπεδα (0,5-1%). Η HbF συναντάται μέσα σε μικρό αριθμό ερυθροκυττάρων, τα F κύτταρα, τα οποία αποτελούν το 3-7% των ερυθροκυττάρων που παράγονται από το μυελό των οστών.⁽¹³⁾ Η δομική διαφορά της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (HbF) από την αιμοσφαιρίνη του ενήλικου (HbA) οδηγεί σε λειτουργικές διαφοροποιήσεις. Μία ουσιαστική ιδιότητα της HbF είναι ότι έχει υψηλότερη συγγένεια με το οξυγόνο κάτω από φυσιολογικές συνθήκες σε σχέση με την HbA. Έτσι μεγιστοποιεί τη μεταφορά του οξυγόνου από τη μητρική κυκλοφορία στο έμβρυο, οξυγονώνοντας την HbF από την άλλη πλευρά του πλακούντα σε βάρος της HbA. Η αναλογία σύνθεσης των γ αλυσίδων ($^G\gamma/\gamma$) είναι χαρακτηριστική και αλλάζει κατά τη διάρκεια της οντογένεσης του ανθρώπου, ξεκινώντας 3:1 στο έμβρυο και αλλάζοντας σε 2:3 στον ενήλικα.⁽¹⁴⁾

Στα ερυθροκύτταρα ενήλικου η κύρια αιμοσφαιρίνη είναι η HbA καθώς και μικρές ποσότητες HbA₂ και HbF.⁽⁹⁾



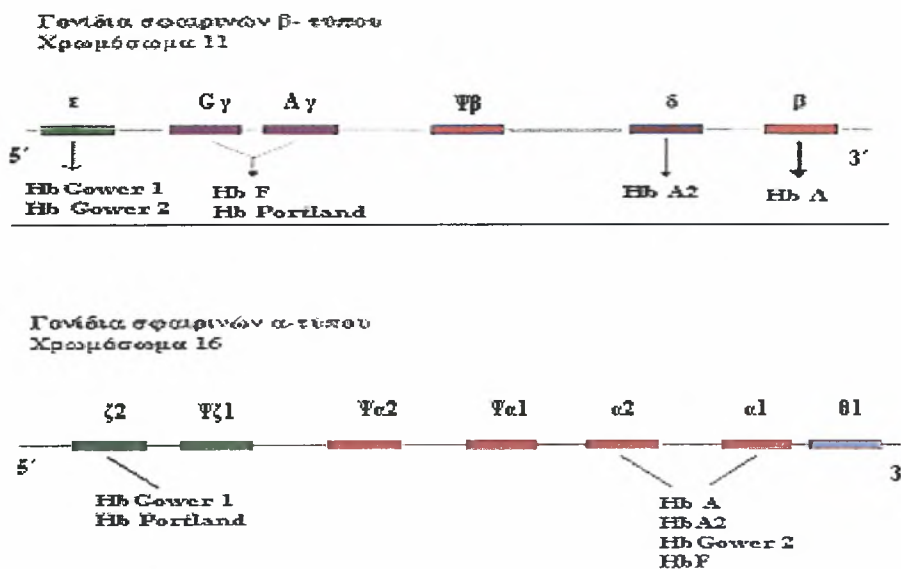
Εικόνα 1.2: Η σύνθεση των αλυσίδων των αιμοσφαιρινών και τα αντίστοιχα όργανα που συμμετέχουν κατά τη διάρκεια της οντογένεσης του ανθρώπου.

Αιμοσφαιρίνες Ανθρώπου		
Πρωτοεμβρυϊκές Αιμοσφαιρίνες	Εμβρυϊκή Αιμοσφαιρίνη	Αιμοσφαιρίνη Ενηλίκου
Hb Gower 1: ζ ₂ ε ₂ Hb Gower 2: α ₂ ε ₂ Hb Portland I: ζ ₂ γ ₂ Hb Portland II: ζ ₂ β ₂	Hb F: α ₂ γ ₂	Hb A: α ₂ β ₂ Hb A ₂ : α ₂ δ ₂

Πίνακας 1.1: Σύνθεση των μορίων των αιμοσφαιρινών του ανθρώπου.

1.1.4. Η οργάνωση των γονιδίων σφαιρίνης.

Τα γονίδια των σφαιρικών αλυσίδων διακρίνονται σε α- και β- τύπου. Τα γονίδια α- τύπου εκτείνονται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 16 (σύμπλεγμα γονιδίων α-τύπου), ενώ τα γονίδια β-τύπου στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 11 (σύμπλεγμα γονιδίων β-τύπου). Η διάταξη των γονιδίων από το 5' προς το 3' άκρο, είναι όμοια με τη σειρά με την οποία εκφράζονται τα γονίδια κατά την οντογένεση των αιμοσφαιρίνων στον άνθρωπο (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3: Διάταξη των γονιδίων σφαιρίνης β- και α-τύπου στα χρωμοσώματα 11 και 16, αντίστοιχα

Στα γονίδια του συμπλέγματος α-τύπου περιλαμβάνονται κατά σειρά, τα διπλασιασμένα α_1 και α_2 , το πρωτοεμβρυϊκό ζ_2 . Μεταξύ των α_1 και α_2 εμφανίζεται υψηλή ομολογία και ουσιαστικά κωδικοποιούνται όμοιες πρωτεΐνες. Οι διαφορές τους είναι μόνο σε νουκλεοτίδια των μη κωδικών περιοχών (IVS-2 και στην 3' μη κωδική περιοχή). Η ομολογία μεταξύ των γονιδίων α και ζ μειώνεται στο 58% των αμινοξέων τους (επί συνόλου 141), καθώς φαίνεται ότι έχουν προκύψει από κοινό πρόγονο, μετά από μία σειρά διπλασιασμών με πολλές αποκλίσεις στην αλληλουχία τους. ⁽¹⁵⁾

Στα γονίδια του συμπλέγματος β-τύπου ανήκουν τα ε, Gγ, Aγ, ψβ, δ και β γονίδια. Τα ε και γ γονίδια είναι αποκλειστικά εμβρυϊκά γονίδια, από τα οποία το γ μπορεί να παραμένει σε πολύ μικρή έκφραση για μικρό διάστημα και μετά τη γέννηση. Τα δ και β είναι γονίδια του ενήλικα, όπου το δ εκφράζεται φυσιολογικά σε χαμηλά επίπεδα.

Στον άνθρωπο το δ γονίδιο της αιμοσφαιρίνης έχει υψηλή ομολογία με το β γονίδιο, αν και παράγεται σε πολύ μικρότερο ποσοστό από το β γονίδιο σφαιρίνης. Η αστάθεια του δ-mRNA, η έλλειψη ενός ενισχυτή στο εσωτερικό του γονιδίου, καθώς και η απουσία των συντηρητικών αλληλουχιών του υποκινητή CAAT και CACCC, είναι η πιθανή μοριακή ερμηνεία που μπορεί να δικαιολογήσει τα μικρά ποσοστά έκφρασής του. ⁽⁶⁾ Η έλλειψη της λειτουργικής δομής CACCC στον υποκινητή του δ γονιδίου και η αδυναμία πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα EKLF είναι αρκετή για να οδηγήσει τον υποκινητή του δ γονιδίου σε μειωμένη λειτουργικότητα. ⁽¹⁶⁾

Τα ^Gγ και ^Aγ γονίδια δίνουν δομικά όμοια προϊόντα και είναι αποτέλεσμα γονιδιακού διπλασιασμού και μεταστροφής. ⁽⁵⁾ Οι αλυσίδες των δύο γ γονιδίων διαφέρουν μόνο στο αμινοξύ της θέσης 136, όπου υπάρχει γλυκίνη (Gly) και αλανίνη (Ala) για τη ^Gγ και ^Aγ αλυσίδα, αντίστοιχα.

Η ομοιότητα στη δομή και η παρουσία ψευδογονιδίων οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η ομάδα αυτή των γονιδίων των σφαιρινών προέρχεται από διπλασιασμούς ενός προγονικού γονιδίου. ⁽¹⁴⁾

1.1.5. Ρύθμιση της έκφρασης των σφαιρινικών γονιδίων.

Η ιστοειδική έκφραση των γονιδίων των σφαιρινών καθώς και η ειδικότητα εμφάνισης σε συγκεκριμένο οντογενετικό στάδιο εξασφαλίζεται με τη συμμετοχή κατάλληλων ρυθμιστικών στοιχείων, υποκινητών, ενισχυτών, αποσιωπητών και πρωτεϊνικών παραγόντων. Τα στοιχεία αυτά αλληλεπιδρούν με περιοχές, όπως η ελεγκτική περιοχή (Locus Control Region, LCR) του συμπλέγματος των γονιδίων β-τύπου και η υπερευαίσθητη περιοχή, HS-40, στο σύμπλεγμα α-τύπου γονιδίων, οι οποίες αν και βρίσκονται σε μεγάλη απόσταση από τα αντίστοιχα γονίδια, έχουν τη δυνατότητα να επηρεάζουν και να επιτυγχάνουν υψηλά επίπεδα γονιδιακής έκφρασης. ⁽¹⁷⁾ Οι αλλαγές στη δομή της χρωματίνης, που σταθεροποιούνται από πολυμερή σύμπλοκα μεταγραφικών παραγόντων, επιτρέπουν αυτές τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ απομακρυσμένων περιοχών. Τα σύμπλοκα αυτών των δομών αρχικά σχηματίζονται σε

συγκεκριμένες θέσεις των γονιδίων, όπως τα TATA-box, CAAT-box και CACCC-box. Ακολούθως σημαντικός αριθμός μεταγραφικών παραγόντων αλληλεπιδρά με το DNA προκειμένου να ολοκληρωθεί η διαδικασία της ιστοειδικής έκφρασης των γονιδίων των σφαιρινών.

Το ζ γονίδιο διαθέτει στον υποκινητή του περιοχές, όπως οι TATA- (-28), CAAT- (-66) και CACCC- (-95), ανάλογες με αυτές οι οποίες συναντώνται και σε άλλα γονίδια. Σε αυτές τις θέσεις προσδένονται οι μεταγραφικοί παράγοντες CP-2, Sp-1, GATA-1 και άλλοι, μέσω των οποίων ρυθμίζεται η έκφραση του γονιδίου κατά την οντογένεση των αιμοσφαιρινών. ⁽¹⁸⁾ Η αναπτυξιακή ρύθμιση του ζ γονιδίου είναι αυτόνομη, καθώς οι διάφορες αλληλουχίες που απαιτούνται για την αποσιώπηση του γονιδίου βρίσκονται εντός ή κοντά στο γονίδιο. Η αποσιώπηση του ζ γονιδίου ελέγχεται από μεταγραφικές και μετα-μεταγραφικές διαδικασίες. ⁽¹⁹⁾

Ο υποκινητής του α γονιδίου παρουσιάζει ορισμένες εμφανείς διαφορές σε σχέση με τα άλλα γονίδια. Δεν διαθέτει CACCC περιοχή και έχει μία περιοχή, πλούσια σε CG-επαναλήψεις, η οποία είναι μέρος της νησίδας που δεν γίνεται μεθυλίωση και εκτείνεται μέσα στο γονίδιο, ενώ είναι τμήμα του υποκινητή. Στον υποκινητή προσδένονται μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι είναι κοινοί και για τα β-τύπου γονίδια, όπως GATA-1, CP-1, καθώς και διαφορετικές πρωτεΐνες, όπως η CP-2 και η πρωτεΐνη αντίστροφων επαναλήψεων (inverted repeat protein).

Ορισμένοι από τους σημαντικότερους μεταγραφικούς παράγοντες για τα γονίδια των σφαιρινών είναι οι ακόλουθοι: ⁽⁹⁾

1. *GATA-1*: Ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων GATA και στην ομάδα των πρωτεϊνών τύπου "δάκτυλο ψευδαργύρου" (zinc - finger). ⁽²⁰⁾ Ο κύριος λόγος που οδήγησε τους μελετητές να τον συσχετίσουν με τον πρωτεϊνικό παράγοντα GATA-2, είναι η ύπαρξη υψηλής ομολογίας στις δύο περιοχές σύνδεσης με το DNA που διαθέτουν οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίες ονομάζονται «δάκτυλα ψευδαργύρου». Επίσης η περιοχή αυτή εμφανίζει υψηλή ομολογία στα αντίστοιχα μόρια διαφορετικών ειδών οργανισμών. Η περιοχή πρόσδεσης στο DNA είναι η αλληλουχία (T/A)GATA(A/G). Η έκφραση του GATA-1 έχει συνδεθεί ισχυρά με το αιμοποιητικό σύστημα, με άφθονη παρουσία στα προγονικά κύτταρα των ερυθρών (erythroid progenitors), στα μεγακαρυοκύτταρα, τα ηωσινόφιλα και στα μαστικά κύτταρα (mast cell). Στα πολυδύναμα προγονικά κύτταρα εκφράζεται σε μικρότερες ποσότητες. ⁽²¹⁾ Αρχικά είχε χαρακτηριστεί ως πυρηνικός παράγοντας, ο

οποίος συνδέεται με τον υποκινητή ή τους ενισχυτές των σφαιρικών γονιδίων όλων των ειδών. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η πλειονότητα των γονιδίων που ειδικά εκφράζονται στα μεγακαρυοκύτταρα, τα ηωσινόφιλα και τα μαστικά κύτταρα, ελέγχονται εν μέρει από τον GATA-1.⁽²²⁾ Έτσι παρόλο που ο GATA-1 έχει χαρακτηριστεί ως «ερυθροειδικός» μεταγραφικός παράγοντας, λειτουργεί σε πολλαπλούς κυτταρικούς τύπους, οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους μέσω κοινών προγόνων και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε δύο ή τρεις διαφορετικούς τύπους κυττάρων.⁽²³⁾ Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο τρόπος με τον οποίο ο GATA-1 ασκεί μεταγραφικό έλεγχο. Οι θέσεις πρόσδεσης του GATA-1 βρίσκονται συνήθως μέσα σε υποκινητές ή σε ρυθμιστικές περιοχές που βρίσκονται σε απόσταση από το γονίδιο που ελέγχουν, όπως το LCR των γονιδίων β-τύπου και διαμορφώνει κατάλληλα σύμπλοκα σχετιζόμενα με τη χρωματίνη. Μελέτες έδειξαν ότι πρόκειται για έναν αντιστρεπτό μεταγραφικό ενεργοποιητή και η δράση του στα ερυθροειδικά κύτταρα και πολύ πιθανόν και στα μεγακαρυοκύτταρα περιλαμβάνει την ύπαρξη συμπαραγόντα ή ομάδας συμπαραγόντων.⁽²⁴⁾ Η δομή του, ως πρωτεΐνη τύπου «δάκτυλα ψευδαργύρου», ευνοεί τη συνεργασία του με άλλες πυρηνικές πρωτεΐνες. Είναι γνωστή η συνεργασία του με την οικογένεια πρωτεϊνών τύπου Kruppel, οι οποίες έχουν επίσης τη δομή τύπου «δάκτυλα ψευδαργύρου», όπως τον ερυθροειδικό παράγοντα EKLF, το γενικό μεταγραφικό παράγοντα Sp1, καθώς και το γενικό μεταγραφικό συμπαραγόντα p300/CBP.⁽²⁵⁾ Επομένως, η αλληλοεπίδραση του GATA-1 με τις άλλες πρωτεΐνες είναι απαραίτητη για να ολοκληρωθεί η διαφοροποίηση των ερυθροκυττάρων και για το λόγο αυτό δε θεωρείται ένας απλός μεταγραφικός παράγοντας αλλά ο «αρχιτέκτονας» της μεταγραφικής ρύθμισης στην ερυθροποίηση.

2. *CREB*: Ονομάζεται η ομάδα των πρωτεϊνών οι οποίες αναγνωρίζουν ως θέσεις πρόσδεσης μία αλληλουχία που ανταποκρίνεται στο cAMP (cAMP response element-[CRE]-binding protein). Σε αυτήν την ομάδα ανήκει και ο συμπαραγόντας CBP/p300. Πρόκειται για μόριο το οποίο συνδέεται με πυρηνικούς υποδοχείς ορμονών⁽²⁶⁾ και επιδρά στην ακετυλίωση καθώς έχει συνδεθεί με την ενεργότητα της ακετυλοτρανσφεράσης των ιστονών.⁽²⁷⁾ Η ακετυλίωση είναι απαραίτητη προκειμένου να παραμείνει ανοικτή η χρωματίνη και να διατηρηθεί η μεταγραφική δραστηριότητα. Αρκετές μελέτες υπεδείκνυαν την ομάδα αυτών των πρωτεϊνών ως πιθανούς συμπαραγόντες του GATA-1⁽²⁸⁾ και τελικά απέδειξαν ότι πρωτεΐνες CREB

συνεργάζονται με τον GATA-1 και είναι απαραίτητες για τη διαφοροποίηση των ερυθροκυττάρων, καθώς ο GATA-1 φαίνεται να «στρατολογεί» τον ευρύτερης έκφρασης συμπαράγοντα CBP προς στοχευμένη κυτταροειδική, γονιδιακή έκφραση και διαφοροποίηση. ⁽²⁹⁾

3. *Oct*: Πρόκειται για δύο πρωτεΐνες (οκταμερή), μέλη της οικογένειας POU, Oct-1 και Oct-2, η πρώτη ευρύτατης έκφρασης και η δεύτερη κυρίως εμπλέκεται στην έκφραση των B-λεμφοκυττάρων (B cells). Είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος συμμετέχει στη ρύθμιση μεγάλου αριθμού γονιδίων με ιστοειδική ή ευρύτερη έκφραση, σε ρόλο ενεργοποιητή ή καταστολέα. ⁽³⁰⁾ Πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι συμμετέχει ουσιαστικά στην ανάπτυξη του εμβρύου και στην ερυθροποίηση. ⁽³¹⁾
4. *NF-E2*: πρωτεΐνη που προσδένεται στην αλληλουχία DNA (T/C)/GCTGA(C/G) TCA(T/C) και απαντάται σε ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων σφαιρινών. Είναι πρωτεΐνη 45 kD και ανήκει στις πρωτεΐνες τύπου "φερμουάρ - λευκίνης". Είναι ένας παράγοντας βασικός για την ανάπτυξη των μεγακαρυοκυττάρων και τη παραγωγή των αιμοπεταλίων, χωρίς να είναι απόλυτα απαραίτητος για την ερυθροποίηση. ⁽³²⁾ Ο ρόλος του NF-E2 στην ερυθροποίηση δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί.
5. *EKLF (erythroid Kruppel-like factor)*: Είναι μέλος της οικογένειας των SP1 πρωτεϊνών, οι οποίες είναι τύπου "δάκτυλα ψευδαργύρου" (zinc-finger). Συνήθως αποτελούνται από 3 δομές-δάκτυλα, η καθεμία από τις οποίες αναγνωρίζει μία αλληλουχία DNA 3 βάσεων. Συγκεκριμένα ο EKLF αναγνωρίζει την αλληλουχία CCA CAC CCT, η οποία βρίσκεται στην υποκινητή του β γονιδίου. ⁽³³⁾ Ο EKLF δρα ως ενεργοποιητής της μεταγραφής του β γονιδίου, είναι απαραίτητος για την έκφρασή του και για την τελική ωρίμανση των ερυθροκυττάρων. ⁽³⁴⁾ Υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι παίζει ρόλο στην ενεργοποίηση του LCR, μέσω της αλληλεπίδρασης του με περιοχή πλούσια σε G-υπομονάδες μέσα στην HS3 αλληλουχία. ⁽³⁵⁾
6. *FKLF και FKLF-2 (fetal Kruppel-like factor)*: Θεωρούνται μέλη της οικογένειας των Sp1 πρωτεϊνών και αλληλεπιδρούν με την CACCC αλληλουχία που βρίσκεται στον υποκινητή του ε και γ γονιδίου σφαιρίνης. ⁽³⁶⁾

1.1.6. Ελεγκτική περιοχή του συμπλέγματος των γονιδίων β-τύπου (LCR)

Η ρύθμιση της ερυθροποίησης στον άνθρωπο ελέγχεται επιπλέον και από την περιοχή LCR (Locus Control Region), η οποία συμμετέχει καθοριστικά στη διαδικασία της μεταστροφής της αιμοσφαιρίνης, η οποία πραγματοποιείται δύο φορές κατά την οντογένεση του ανθρώπου. Η περιοχή αυτή αλληλεπιδρά με καθένα από τα γονίδια των σφαιρινών προκειμένου να εξασφαλιστεί η έκφρασή του στο κατάλληλο οντογενετικό στάδιο. ⁽¹⁷⁾

Η περιοχή LCR βρίσκεται περίπου 20 kb 5' του ε γονιδίου και περιλαμβάνει θέσεις υπερευαίσθητες στην DNase I (DNase I hypersensitive sites, HS). Η πρώτη ένδειξη για την ύπαρξη σημαντικών ρυθμιστικών αλληλουχιών μακριά από τα γονίδια σφαιρινών ήταν η περιγραφή μεταλλαγών-ελλείψεων τμημάτων του συμπλέγματος γονιδίων β-τύπου που δεν επηρέαζαν τη δομή του β γονιδίου αλλά προκαλούσαν εικόνα β θαλασσαιμίας (γδβ⁰ θαλασσαιμία) στα άτομα που την έφεραν.⁽⁹⁾ Σε πειράματα με διαγονιδιακά ζώα αποδείχτηκε ότι η περιοχή LCR αποτελείται από πέντε HS περιοχές, HS-1 έως HS-5, και η ενεργότητα τους εντοπίζεται σε έκταση 250 έως 500 bp η κάθε μία. ⁽³⁷⁾ Η HS-2 ευθύνεται για το 40-50% της δράσης της περιοχής LCR, ενώ η HS-1 και η HS-4 για το 5-10%. ⁽³⁷⁾ Μία πέμπτη HS περιοχή έχει βρεθεί στο 3' άκρο του συμπλέγματος β-τύπου και απέχει 21.8 kb από το β γονίδιο, αν και ο ρόλος της παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστος. ⁽³⁸⁾ Επιπλέον, έχουν βρεθεί άλλες δύο θέσεις HS (6 και 7) στην περιοχή μεταξύ 3' άκρου του β-γονιδίου και της πέμπτης HS και έτσι το σύμπλεγμα των γονιδίων β-τύπου εκτείνεται σε μία περιοχή 170kb. ⁽³⁹⁾

Η περιοχή LCR διατηρώντας τη χρωματίνη «ανοιχτή» στη συγκεκριμένη περιοχή εξασφαλίζει την πρόσβαση των διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων στους υποκινητές των σφαιρινικών γονιδίων. Επίσης θεωρείται ότι μπορεί να λειτουργεί και ως απομονωτής της χρωματίνης για προστασία του συμπλέγματος των γονιδίων β-τύπου. ⁽⁴⁰⁾ Στη νουκλεοτιδική αλληλουχία του LCR έχουν αναγνωρισθεί θέσεις σύνδεσης του GATA-1 και του NF-E2, καθώς επίσης και οι χαρακτηριστικές περιοχές CACC στις οποίες, όπως έχει αναφερθεί, προσδένεται ποικιλία μεταγραφικών παραγόντων ευρείας δράσης, όπως ο Sp-1. ⁽⁴¹⁻⁴²⁾

Μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον υπήρξε για τη μελέτη του μηχανισμού μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η ρύθμιση της έκφρασης των σφαιρινικών γονιδίων κατά την οντογένεση

του ανθρώπου. Σημαντικός αριθμός μελετών κατέληξαν στη διατύπωση ενός διπλού μηχανισμού ελέγχου της μεταστροφής της αιμοσφαιρίνης με τη συμμετοχή του LCR. Αυτό επιτυγχάνεται αφενός καταρχήν με την αποσιώπηση ορισμένων γονιδίων και αφετέρου με το συναγωνισμό μεταξύ γονιδίων στη διεκδίκηση της περιοχής LCR με την οποία θα εξασφαλιστούν υψηλά επίπεδα μεταγραφής.⁽⁴²⁾ Έτσι τελικά το LCR μπορεί και επιτελεί το ρόλο του, αν και βρίσκεται σε μεγάλη απόσταση. Για τη διαδικασία αυτή έχουν προταθεί τρία διαφορετικά μοντέλα⁽¹³⁾:

- Δυαδικό μοντέλο ενεργοποίησης (binary activation model), σύμφωνα με το οποίο τα γονίδια συνδέονται με τους μεταγραφικούς παράγοντες στοχαστικά. Όταν η περιοχή ελέγχου είναι ενεργή, καθένα γονίδιο έχει τη δυνατότητα να συνδεθεί με τους μεταγραφικούς παράγοντες χωρίς να λαμβάνει χώρα ανταγωνισμός μεταξύ τους. Το μοντέλο δέχεται ότι τα κοντινά γονίδια έχουν προβάδισμα έναντι των απομακρυσμένων γονιδίων. Η μεταγραφή των κοντινών γονιδίων οδηγεί σε δομικές αλλαγές, μη αναγνωρισμένες, οι οποίες με τη σειρά τους εμποδίζουν τη μεταγραφή των πιο απομακρυσμένων γονιδίων. Αναπτυξιακά καθώς σιωπούν τα πρώτα γονίδια, χάνονται και οι προαναφερόμενες επιδράσεις και είναι δυνατή η μεταγραφή των επόμενων γονιδίων.⁽⁴³⁾
- Μοντέλο Ιχνηλασίας (tracking model), προτείνει ότι το LCR λειτουργεί ως σημείο εισόδου για ορισμένα από τα συστατικά της μεταγραφικής μηχανής, τα οποία κινούμενα κατά μήκος του DNA εντοπίζουν το γονίδιο που πρέπει να μεταγραφεί. Έτσι σαφώς τα κοντινότερα σε αυτό γονίδια προηγούνται στη μεταγραφή.⁽⁴⁴⁾
- Μοντέλο Θηλιάς (looping model), το οποίο προτείνει ότι η έναρξη της μεταγραφής επιτυγχάνεται μετά από αλληλεπίδραση μεταξύ του LCR και των γονιδίων, όπου η ενδιάμεση αλληλουχία του DNA αναδιπλώνεται με τη μορφή θηλιάς. Τελικά η μεταγραφή παραμένει ενεργή για όσο χρονικό διάστημα διατηρείται αυτή η αλληλεπίδραση, ενώ το ποσοστό της μεταγραφής των γονιδίων σφαιρίνης είναι αποτέλεσμα της συχνότητας και της σταθερότητας αυτών των αλληλεπιδράσεων με το LCR.⁽⁴⁵⁾

1.1.7. Το γ γονίδιο της σφαιρίνης

Στις πρώτες εβδομάδες της κύησης εκφράζονται οι κατάλληλοι μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι, συνδεδεμένοι με τους υποκινητές των γ γονιδίων και την ελεγκτική περιοχή (LCR), ενεργοποιούν την παραγωγή των εμβρυϊκών γονιδίων των σφαιρινών.

Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι μεταγραφικοί παράγοντες, όπως οι SSP (stage selector protein), FKLf (fetal Kruppel-like factor), FKLf-2 και NF-E4 (nuclear factor erythroid-4), παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης των γ γονιδίων σφαιρίνης (Εικόνα 1.4).^(46-47,48) Η μελέτη των μεταγραφικών αυτών παραγόντων και η συνεχής αναζήτηση νέων πρωτεϊνικών παραγόντων καθώς και των ενεργοποιούμενων σηματοδοτικών μονοπατιών αποσκοπεί στην κατανόηση του ακριβή μηχανισμού ενεργοποίησης και αποσιώπησης των εμβρυϊκών γονιδίων.^(49,50)

Ο υποκινητής αποτελεί περιοχή πρόσδεσης για μεγάλο αριθμό μεταγραφικών παραγόντων. Οι υποκινητές των δύο γ γονιδίων (G γ και A γ) είναι ταυτόσημοι και αναγνωρίζονται πολλές από τις χαρακτηριστικές θέσεις πρόσδεσης πρωτεϊνών, όπως μία CAC θέση, δύο CCAAT θέσεις (μέσα σε μια διπλασιασμένη περιοχή 27bp) και μία TATA θέση.⁽¹³⁾ Η περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων -40 και -60 στο 5' άκρο του γ γονιδίου περιέχει θέση πρόσδεσης για δύο πρωτεΐνες, τις Sp1 και SSP (stage selector protein). Επιπλέον, δύο CpG δινουκλεοτίδια μεταξύ των θέσεων -50 έως -55 του 5' άκρου του γ γονιδίου είναι μεθυλιωμένα σε ερυθροβλάστες εμβρυονικού και ενήλικου σταδίου αλλά σπάνια σε εμβρυϊκούς.⁽⁵¹⁾

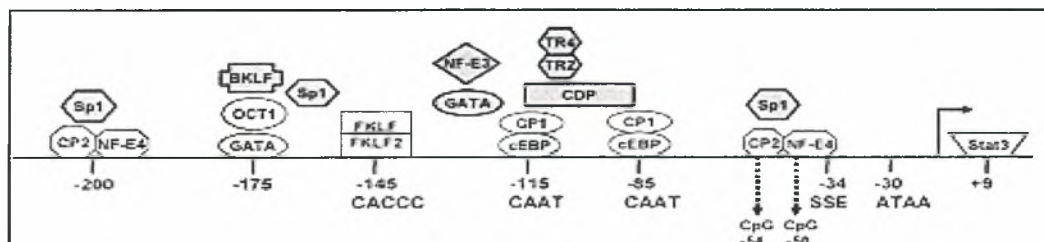
Η περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων -53 και -34 στο 5' άκρο του γ γονιδίου, όπου βρίσκεται η θέση έναρξης της μεταγραφής του γ γονιδίου, λειτουργεί ως περιοχή επιλογής της έκφρασης στο αντίστοιχο οντογενετικό στάδιο (stage selector element, SSE). Πρόκειται για θέση ανάλογη με αυτήν που βρέθηκε στον υποκινητή του β γονιδίου σφαιρίνης του κοτόπουλου, η οποία αλληλεπιδρά με τον β/ϵ ενισχυτή σε ερυθροκύτταρα ενήλικου με τη συμμετοχή της πρωτεΐνης SSP.⁽⁵²⁾

Η ρύθμιση της έκφρασης του γ γονιδίου επηρεάζεται σημαντικά από την περιοχή LCR, η οποία ενισχύει τη μεταγραφή του γ γονιδίου στο κατάλληλο οντογενετικό στάδιο.⁽⁵³⁾

Υπάρχει μάλιστα γονιδιακή εξειδίκευση στη δράση των HS περιοχών. Συγκεκριμένα η HS3 του LCR ενισχύει επιλεκτικά το γ γονίδιο και η έλλειψή της από τη βασική αλληλουχία οδηγεί σε αποσιώπηση της έκφρασης του γ γονιδίου κατά την εμβρυϊκή ζωή.

⁽⁵⁴⁾

Ο έλεγχος της έκφρασης του γ γονιδίου ουσιαστικά γίνεται μέσω του μηχανισμού αποσιώπησής του. Οι αλληλουχίες που σχετίζονται με την αποσιώπηση του γ γονιδίου είναι οι περιοχές CACCC και CCAAT που βρίσκονται στον υποκινητή του γ γονιδίου. Η περιοχή του υποκινητή έχει αποδειχθεί απαραίτητη για τον έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου στην εμβρυϊκή ζωή και για τη διακοπή της παραγωγής γ -σφαιρίνης στον ενήλικα. Έχει προταθεί ότι η μεθυλίωση μπορεί να ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση αλληλεπιδρώντας με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα η μεθυλίωση του CpG προκαλεί 10 φορές αύξηση στη δράση της πρωτεΐνης Sp1, με παράλληλη μείωση ρυθμού πρόσδεσης του παράγοντα SSP. ⁽⁵¹⁾ Οι δύο πρωτεΐνες ανταγωνίζονται για την πρόσδεσή τους καθώς επικαλύπτονται οι θέσεις πρόσδεσης και με τον ανταγωνισμό αυτό επιτυγχάνεται η ενεργοποίηση και η αποσιώπηση του γονιδίου στο κατάλληλο οντογενετικό στάδιο. ⁽⁵³⁾



Εικόνα 1.4: Ο υποκινητής του γ γονιδίου και οι μεταγραφικοί παράγοντες που προσδένονται σε αυτόν.

1.1.8. Εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη στους ενήλικες.

Η γ σφαιρίνη εκφράζεται σε μικρό ποσοστό στους ενήλικες σε φυσιολογικές συνθήκες και απαντάται σε εξειδικευμένα κύτταρα, τα F κύτταρα ⁽⁵⁵⁾ Η παραγωγή της F μπορεί να αυξηθεί μετά από την πρόκληση οξέος ερυθροποιητικού stress. Ευνοϊκές συνθήκες για την αύξηση της HbF δημιουργούνται σε ασθενείς μετά από χημειοθεραπεία, όπου συμβαίνει συρρίκνωση του μυελού των οστών. Επίσης ενίσχυση της παραγωγής των F κυττάρων παρατηρούμε κατά την αναγέννηση του μυελού των οστών μετά από μεταμόσχευση ή σε οξεία αιμόλυση, σε αντίθεση με τη χρόνια αναιμία όπου δεν παρατηρείται αύξηση του ποσοστού της. Η διαφορά στο ρυθμό παραγωγής των F κυττάρων μεταξύ οξέος και χρόνιου ερυθροποιητικού stress υποδηλώνει ότι η κινητική

της αναγέννησης των ερυθροκυττάρων επηρεάζει την παραγωγή ή μη Α ή F κυττάρων.⁽⁵⁶⁾

Η αύξηση της παραγωγής των F κυττάρων στο δεύτερο τρίμηνο της εγκυμοσύνης σχετίζεται με την αύξηση του όγκου του αίματος (παραγωγή ερυθροκυττάρων), γεγονός το οποίο μπορεί να σχετιστεί με οξεία ερυθροποίηση.

Μία από τις πρώτες παρατηρήσεις στο προφίλ της αιμοσφαιρίνης παιδιών με ομόζυγη β-θαλασσαιμία, ήταν η αυξημένη ποσότητα HbF τόσο στην παιδική όσο και στην ενήλικη φάση της ζωής. Ο έλεγχος του περιφερικού αίματος με ειδικές χρώσεις για την παρουσία HbF έδειξε ότι η αιμοσφαιρίνη αυτή κατανέμεται ετερογενώς στα ερυθροκύτταρα. Οι μέχρι τώρα μελέτες για το μηχανισμό παραμονής των γ αλυσίδων στις β θαλασσαιμίες οδηγούν στη σκέψη ότι η παραγωγή των γ αλυσίδων μπορεί να επηρεάζεται από το φαινόμενο επιλογής κυττάρων καθώς επίσης και από γενετικούς παράγοντες.⁽⁹⁾

Οι παράγοντες που σχετίζονται με αυξημένη ποσότητα γ σφαιρίνης στην ενήλικη ζωή παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον και διερευνώνται σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία και άλλα μεσογειακά σύνδρομα καθώς η παρουσία αυξημένης HbF είναι καθοριστική για την ποιότητα ζωής του πάσχοντα.

1.1.8.1. Προέλευση F κυττάρων

Στις αρχές της δεκαετίας του 1970 με τη βοήθεια ανοσοχημικών χρώσεων έγινε δυνατή η ανίχνευση ερυθροκυττάρων με αιμοσφαιρίνη F. Έτσι δείχτηκε ότι η εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη εντοπίζεται σε λίγα ερυθροκύτταρα, τα ονομαζόμενα F κύτταρα.⁽⁵⁷⁾

Η διαπίστωση αυτή οδήγησε στη διατύπωση ερωτημάτων όπως:

- από πού προέρχονται τα F κύτταρα,
- γιατί η αιμοσφαιρίνη F εμφανίζει κυτταρική απομόνωση.

Πολλές ερευνητικές ομάδες μελέτησαν το φαινόμενο καθώς και τη σχέση του με τη μεταστροφή της αιμοσφαιρίνης.⁽⁷⁾ Διατυπώθηκε αρχικά η θεωρία ότι στον άνθρωπο η μεταστροφή της αιμοσφαιρίνης λαμβάνει χώρα προκειμένου δύο κυτταρικές σειρές αρχέγονων κυττάρων να πραγματοποιήσουν το διακριτό πρόγραμμα έκφρασης των σφαιρινικών γονιδίων. Πρόκειται για μία σειρά «εμβρυϊκών» αρχέγονων κυττάρων δεσμευμένων να παράγουν εμβρυϊκή σφαιρίνη, η οποία λίγο πριν τη γέννηση αντικαθίσταται από μία δεύτερη σειρά αρχέγονων κυττάρων «ενηλικού» δεσμευμένων να παράγουν τη σφαιρίνη του ενήλικα.⁽⁵⁸⁾ Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο τα F κύτταρα που

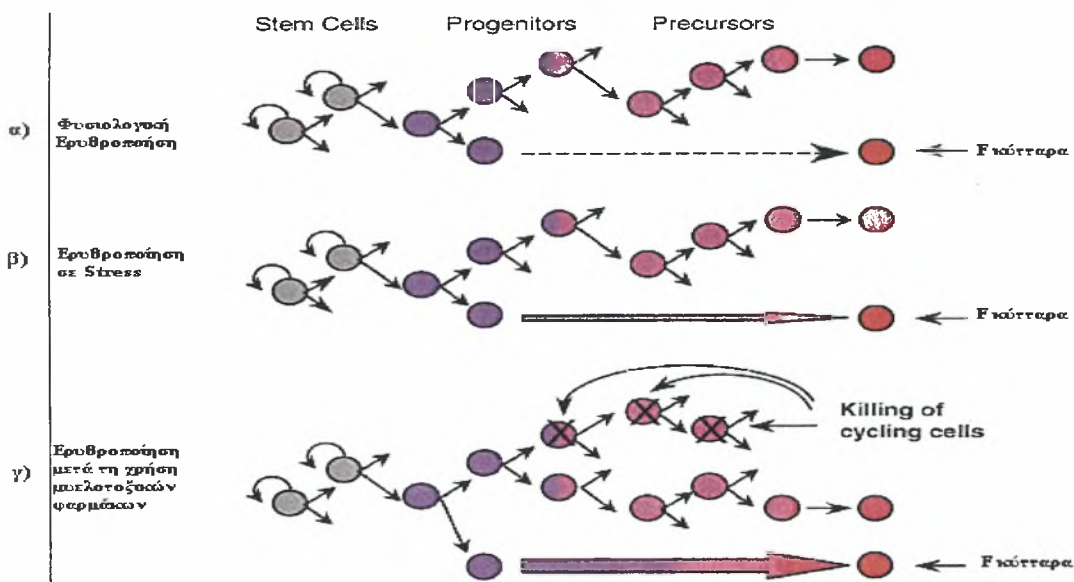
απαντώνται στους ενήλικες είναι τα λίγα εναπομείναντα στο μυελό των οστών από την εμβρυϊκή σειρά.

Τη δεκαετία του 1970 με την εφαρμογή των καλλιιεργειών ερυθροειδικών κλώνων και την ανάπτυξη απομονωμένων BFUe αποικιών, προερχόμενες από ένα κύτταρο, απορρίφθηκε η προηγούμενη υπόθεση. Στις αποικίες αυτές των BFUe κυττάρων, με τη χρήση αντι-γ και αντι-β αντισωμάτων ήταν δυνατή η αναγνώριση των παραγόμενων αιμοσφαιρινών. Βρέθηκε, επίσης, ότι η πλειονότητα των αποικιών αποτελούνταν από μικτό πληθυσμό F και A κυττάρων (για παραγωγή HbF και HbA, αντίστοιχα), ⁽⁵⁹⁾ γεγονός που αποτελεί απόδειξη ότι η εμβρυϊκή και η αιμοσφαιρίνη του ενήλικα παράγονται από κύτταρα προερχόμενα από την ίδια σειρά. Οπότε, σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, η μεταστροφή της αιμοσφαιρίνης δεν αντιστοιχεί σε αλλαγή στον πληθυσμό των αρχέγονων κυττάρων, τα οποία διαθέτουν ένα αμετάβλητο πρόγραμμα έκφρασης των σφαιρινικών γονιδίων, αλλά πρόκειται για μία αλλαγή στο ρυθμό μεταγραφής των διαφορετικών γονιδίων σφαιρίνης, η οποία μπορεί να συμβεί σε καθένα κύτταρο προερχόμενο από την ίδια κυτταρική σειρά. ^(59,60) Η θεωρία αυτή επιβεβαιώθηκε σε μελέτες που ακολούθησαν, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε καλλιέργειες κυττάρων ασθενών με αιματολογικά νοσήματα που χαρακτηρίζονται από κλωνικότητα, όπως πολυκυτταραιμία νερα και χρόνια μυελογενή λευχαιμία. ⁽⁶¹⁾ Επίσης κατά τη δεκαετία του 1980, επιβεβαιώθηκε η προηγούμενη υπόθεση με πειράματα σε σωματικά υβριδικά κύτταρα. ⁽⁶²⁾

Άλλες προσπάθειες διατύπωσης θεωριών για την ερμηνεία της μεταστροφής της αιμοσφαιρίνης και του σχηματισμού των F κυττάρων, οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι κύτταρα τα οποία εκφράζουν HbF επιλέγονται κατά τη διαφοροποίηση των BFUe κλώνων. Μελέτες που ακολούθησαν έδειξαν ότι η «απόφαση» για την παραγωγή F κυττάρων σχετίζεται με το βαθμό διαφοροποίησης των προγονικών κυττάρων από τα οποία ξεκινά η καλλιέργεια. ^(63, 53) Τέτοιες παρατηρήσεις οδήγησαν στη διατύπωση μιας πιο μηχανιστικής σχέσης μεταξύ της έκφρασης της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης και της διαδικασίας διαφοροποίησης κατά την ερυθροποίηση του ενήλικα.

Η αλλαγή στο μεταγραφικό πρόγραμμα των σφαιρινικών γονιδίων μπορεί να θεωρηθεί ως μία πρόοδος κατά τη διαφοροποίηση, καθώς από ένα πρόγραμμα με κύρια εκφραζόμενο το γ γονίδιο οδηγούμαστε σε αυτό που υποστηρίζει μόνο την έκφραση του β γονιδίου. Στους φυσιολογικούς ενήλικες η πλειονότητα των ερυθροκυττάρων ωριμάζει φυσιολογικά και παράγονται ερυθροβλάστες, οι οποίοι συνθέτουν μόνο αιμοσφαιρίνη του ενήλικα. Μικρός όμως αριθμός προγονικών κυττάρων οδηγούνται πρώιμα σε τελική

ωρίμανση πριν λάβει χώρα η αλλαγή στο πρόγραμμα με αποτέλεσμα να παράγονται F κύτταρα (Εικόνα 1.5α). Αυτή η υπόθεση συμφωνεί και ερμηνεύει πολλές in vivo παρατηρήσεις σε ανθρώπινα και ζωικά μοντέλα και ερμηνεύει την αύξηση της HbF κατά την ερυθροποίηση υπό stress (Εικόνα 1.5β).^(55,56) Αποτέλεσμα της βεβιασμένης ερυθροποίησης είναι η παραγωγή της HbF, καθώς επιταχύνεται η διαφοροποίηση και προάγεται η παραγωγή κυττάρων τελικού σταδίου ωρίμανσης, χωρίς να έχει ολοκληρωθεί ακόμη το πρόγραμμα παραγωγής αιμοσφαιρίνης.⁽⁵⁶⁾ Αυτό υποστηρίζεται από πειράματα σε μπαμπούνους που χορηγείται ερυθροποιητίνη.⁽⁶⁴⁾ Επίσης, η αναστολή της παραγωγής κυττάρων μετά τη δράση των κυτταροτοξικών φαρμάκων ακολουθείται από ένα κύμα αναγέννησης των ερυθροκυττάρων, το οποίο εξαναγκάζει τα προγονικά κύτταρα σε γρήγορη ωρίμανση, με επακόλουθη την αύξηση της παραγωγής HbF⁽⁶⁵⁾ (Εικόνα 1.5γ).



Εικόνα 5: Μοντέλο για τη ρύθμιση της παραγωγής HbF στον ενήλικα.

Η τρίτη θεωρία, που προσπάθησε να ερμηνεύσει την προέλευση των F κυττάρων, συνδέει τον έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων γ και β με την πρόοδο της ανάπτυξης και διαφοροποίησης του κυττάρου κατά τον κυτταρικό κύκλο. Η έκφραση του β γονιδίου καθορίζεται από τη συσσώρευση μεταγραφικών ενεργοποιητικών παραγόντων σε οριακά επίπεδα προς το τέλος της G1 φάσης. Τα ταχέως διαιρούμενα κύτταρα

πιστεύεται ότι συσσωρεύουν ανεπαρκή για την έκφραση του β ποσά μεταγραφικών παραγόντων με αποτέλεσμα να υπερισχύει η σύνθεση γ αλυσίδων. Πιστεύεται ότι υπάρχει ένας ενεργοποιητικός παράγοντας, ο οποίος θα επιτρέψει την έκφραση του β γονιδίου εφόσον η συγκέντρωσή του υπερβεί συγκεκριμένη ποσότητα και δευτερογενώς θα κατασταλεί η έκφραση του γ γονιδίου. ⁽⁶⁶⁾

1.2. ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΜΒΡΥΪΚΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

Έχει παρατηρηθεί ότι στους ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία, η αύξηση των επιπέδων της HbF βελτιώνει την κλινική τους εικόνα. Αυτό επιτυγχάνεται γιατί η συνύπαρξη των F και S μορίων αιμοσφαιρίνης και ο σχηματισμός των υβριδίων $\alpha^2\beta^S\gamma$ μειώνει το ποσοστό πολυμερισμού των μορίων της HbS και γενικότερα μειώνεται το ποσοστό των δρεπανοκυττάρων. ⁽⁶⁷⁾ Στη β Μεσογειακή αναιμία, η επιπλέον παραγωγή γ αλυσίδων στα ερυθρά αιμοσφαίρια εξισορροπεί την περίσσεια των α αλυσίδων και βελτιώνει το χαμηλό MCH των ασθενών αυτών, με αποτέλεσμα την καλύτερη επιβίωση αφενός των ερυθροβλαστών στο μυελό και αφετέρου των ερυθρών αιμοσφαιρίων στο περιφερικό αίμα. ⁽⁶⁷⁾ Για το λόγο αυτό, υπάρχει αμείωτο ενδιαφέρον αφενός μεν για την εύρεση φαρμακολογικών παραγόντων που αυξάνουν την παραγωγή της HbF, αφετέρου δε για τη μελέτη των μηχανισμών δράσης των φαρμάκων αυτών και ρύθμισης της έκφρασης του γ γονιδίου. ⁽⁶⁸⁾

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχει επιτευχθεί σημαντική πρόοδος στην επαγωγή της σύνθεσης HbF μετά από χορήγηση φαρμακευτικών ουσιών σε πειραματόζωα αρχικά και ακολούθως σε ασθενείς με β θαλασσαιμικά σύνδρομα.

Οι παράγοντες αυτοί κατατάσσονται στις ακόλουθες ομάδες:

- I. Ουσίες που επάγουν τη σύνθεση της HbF αναστέλλοντας τη μεθυλίωση των αλληλουχιών DNA, όπως η 5' αζακυτιδίνη. ⁽⁶⁹⁾
- II. Ουσίες που αυξάνουν την HbF με επιλεκτική προαγωγή των κυττάρων BFU-EF, τα οποία διατηρούν το πρόγραμμα παραγωγής γ αλυσίδων και παράλληλη απουσία των φυσιολογικών BFU-E. Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει την υδροξουρία, την κυτοσίνη της αραβινοσίδης και άλλα κυτταροστατικά φάρμακα. ⁽⁷⁰⁾

- III. Ουσίες που επιλεκτικά προάγουν τον πολλαπλασιασμό ερυθροποιητικών προγονικών κυττάρων οδηγώντας σε αύξηση της HbF, όπως ερυθροποιητίνη, IL-3, GM-CSF. ⁽⁷¹⁾
- IV. Ουσίες που επιδρούν στους υποκινητές των γ-γονιδίων, αυξάνοντας την παραγωγή του γ-mRNA και των επιπέδων της HbF, όπως το βουτυρικό και τα παράγωγά του. ⁽⁷²⁾

1.2.1. Επαγωγικοί παράγοντες της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης.

1.2.1.1. 5'-αζακυτιδίνη

Η πρώτη προσπάθεια φαρμακευτικής επαγωγής της HbF έγινε από τους DeSimone και συνεργάτες σε αναιμικούς μπαμπούινους με τη χορήγηση διαφορετικών συγκεντρώσεων 5'-αζακυτιδίνης. ⁽⁶⁹⁾ Ακολούθησε εφαρμογή σε ασθενείς με ομόζυγη β θαλασσαιμία, δρεπανοκυτταρική και μικροδρεπανοκυτταρική αναιμία. Σημαντικές όμως υπόνοιες για πρόκληση καρκινογένεσης οδήγησαν στην αναστολή της χορήγησης του φαρμάκου αυτού ως θεραπευτικού μέσου. ⁽⁷³⁾

Η 5'-αζακυτιδίνη αναστέλλει τη δράση της μεθυλοτρανσφεράσης με αποτέλεσμα την υπομεθυλίωση του DNA σε περιοχές πλούσιες σε κυτοσίνη-γουανίνη (CpG). Είναι γνωστό ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της μεθυλίωσης της κυτοσίνης και της έκφρασης των γονιδίων. Τα ενεργά εκφραζόμενα γονίδια είναι συνήθως υπομεθυλιωμένα ενώ τα ανενεργά μεθυλιωμένα, αν και υπάρχουν κάποιες εξαιρέσεις. ⁽⁴⁾ Η έκφραση των γονιδίων των σφαιρινών σχετίζεται με τη μεθυλίωση του DNA, αν και αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η μεθυλίωση δεν είναι ο πρωταρχικός μηχανισμός ελέγχου της μεταστροφής της έκφρασης των γονιδίων των σφαιρινών. ⁽⁵³⁾

Η υπομεθυλίωση του γ γονιδίου μετά από τη χρήση 5'-αζακυτιδίνης συμμετέχει στην επανενεργοποίησή του, αν και το γ γονίδιο δεν αποτελεί στόχο επιλεκτικής δράσης του φαρμακευτικού παράγοντα. Η αδυναμία της 5'-αζακυτιδίνης να δράσει καθοριστικά στην έκφραση του β γονιδίου μπορεί να εξηγηθεί από τις λιγοστές θέσεις μεθυλίωσης του β γονιδίου που απαντώνται μέσα στην περιοχή των εξωνίων ή στην 3' περιοχή του γονιδίου.

Λαμβάνοντας υπόψιν το μοντέλο που διατυπώθηκε για τη ρύθμιση της παραγωγής HbF στο ενήλικα (Εικόνα 5), η δράση πλέον της 5'-αζακυτιδίνης αποδίδεται στην καταστροφή

των κυκλοφορούντων ερυθροκυττάρων που έχει ως αποτέλεσμα τη γρήγορη ενεργοποίηση της ερυθροποίησης, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή F κυττάρων.⁽⁷⁴⁾ Τελικά είναι αποδεκτό ότι η 5'-αζακυτιδίνη αυξάνει την παραγωγή της HbF μέσω συνδυασμένης δράσης στην ερυθροποίηση και στη μεθυλίωση των ρυθμιστικών περιοχών του συμπλέγματος των γονιδίων β-τύπου.⁽⁷⁵⁾

1.2.1.2. Υδροξουρία. (H₂ON - C - NH - OH)

Η επίδραση της 5'-αζακυτιδίνης στην ερυθροποίηση και ιδιαίτερα στην παραγωγή της HbF, μέσω καταστροφής των κυκλοφορούντων κυττάρων, οδήγησε στη σκέψη ότι και άλλα κυτταροτοξικά φάρμακα μπορεί να έχουν ανάλογη δράση. Η σκέψη αυτή επιβεβαιώθηκε με τη χρήση παραγόντων οι οποίοι δεν δρουν μέσω υπομεθυλίωσης του DNA. Ένας τέτοιος κυτταροτοξικός-κυτταροστατικός παράγοντας της S φάσης που δε σχετίζεται με υπομεθυλίωση του DNA είναι η υδροξουρία (HU).⁽⁷⁶⁾ Είναι μία ουσία που συντέθηκε στη Γερμανία το 1869 από τους Dr. W.F.C. Dresler και Dr. R. Stein of Heidelberg.⁽⁷⁶⁾ Μεσολάβησαν περίπου 100 χρόνια μέχρι να αποκτήσει κλινική εφαρμογή και να αποτελέσει ένα από τα πολλά υποσχόμενα φάρμακα. Κύριες εφαρμογές της είναι στη θεραπεία του καρκίνου και σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία. Τα τελευταία χρόνια δε, έχει δείχτει ότι έχει ανασταλτική δράση έναντι του ιού HIV τύπου 1.⁽⁷⁶⁾

Η κύρια χημική δράση της ουσίας είναι η αναστολή του ενζύμου ριβονουκλεοτιδική αναγωγή, η οποία καταλύει τη μετατροπή των ριβονουκλεοτιδίων σε δεοξυριβονουκλεοτίδια προκαλώντας αναστολή στη σύνθεση του DNA.⁽⁷⁷⁾

Η αρχική χρήση της υδροξουρίας σε πειραματόζωα έγινε μετά τη διεξοδική μελέτη της δράσης της σε κυτταροκαλλιέργειες καλά ελεγχόμενες ως προς την ωρίμανση.⁽⁷⁸⁾ Οι μελέτες της δεκαετίας του 1970 έδειξαν ότι η επίδραση της υδροξουρίας στην κινητική της ερυθροποίησης πιθανώς να προάγει την παραγωγή της HbF, αποτελέσματα που οδήγησαν στη χρήση αυτού του παράγοντα σε πειραματόζωα. Οι πρώτες κλινικές δοκιμές για αύξηση της HbF μετά από χορήγηση HU έγιναν σε πιθήκους και μπαμπούινους.^(64, 79) Καθώς τα αποτελέσματα ήταν θετικά, έγινε δυνατή η χορήγηση του φαρμάκου σε δρεπανοκυτταρικούς ασθενείς. Τα τελευταία χρόνια η υδροξουρία εφαρμόζεται ευρέως σε ομάδες δρεπανοκυτταρικών και μικροδρεπανοκυτταρικών ασθενών καθώς η επαγωγή της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης περιορίζει το φαινόμενο της δρεπάνωσης.⁽⁸⁰⁾

Αρχικά έγινε προσπάθεια να ερμηνευθεί η δράση της μέσω της αύξησης που προκαλεί στον αριθμό των F κυττάρων. Θεωρήθηκε ότι επάγει επιλεκτικά την παραγωγή αρχέγονων κυττάρων της ερυθράς σειράς, τα οποία αν και διατηρούν το “πρόγραμμα” παραγωγής γ αλυσίδων, δεν το εκφράζουν κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Είναι γενικά αποδεκτό ότι η επίδραση κυτταροτοξικών ουσιών στο μυελό των οστών σε δόσεις που μπορούν να προκαλέσουν μυελοκαταστολή επιφέρει κατάσταση έντονου stress, η οποία ακολουθείται από πολλαπλασιασμό των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, τα οποία στην πλειονότητα είναι F κύτταρα.

Εκτός από τη δράση της HU στην επαγωγή της HbF, θεωρείται ότι συμμετέχει στη δημιουργία μακροκυττάρων και στη βελτίωση της παραμόρφωσης της κυτταρικής μεμβράνης και της κατάστασης αφυδάτωσης των ερυθροκυττάρων.

Στους ασθενείς που λαμβάνουν HU η αύξηση της παραγόμενης HbF θεωρείται ο κύριος λόγος μείωσης των κρίσεων δρεπανώσεως και της αιμόλυσης. Η μη ανταπόκριση ασθενών μετά τη λήψη υδροξουρίας στην αύξηση των επιπέδων της HbF οδήγησε στην αναζήτηση άλλων μηχανισμών δράσης της HU.⁽⁷³⁾ Πρωτοπόροι οι Styles και συνεργάτες μελέτησαν τη μείωση της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης στα ερυθροκύτταρα ασθενών που λαμβάνουν θεραπεία με υδροξουρία.⁽⁸¹⁾ Ακολούθησαν πληθώρα μελετών που υποστήριξαν το ρόλο της υδροξουρίας στη μείωση των επεισοδίων απόφραξης αγγείων λόγω της ελάττωσης των αλληλεπιδράσεων μορίων προσκόλλησης.^(82,83,84) Βεβαίως παραμένουν ακόμα πολλά να διευκρινισθούν ώστε να είναι πλήρως κατανοητός ο μηχανισμός δράσης της υδροξουρίας στην έκφραση των μορίων προσκόλλησης, αν και οι ερευνητές εκφράζουν την υπόθεση ότι η υδροξουρία μπορεί να μειώνει την προσκόλληση των ερυθροκυττάρων στους δρεπανοκυτταρικούς ασθενείς μέσω επιδράσεων σε μονοπάτια μετάδοσης σήματος, τα οποία σχετίζονται με την ενεργοποίηση των υποδοχέων των μορίων προσκόλλησης και όχι μέσω μείωσης της έκφρασης αυτών.⁽⁸⁵⁾

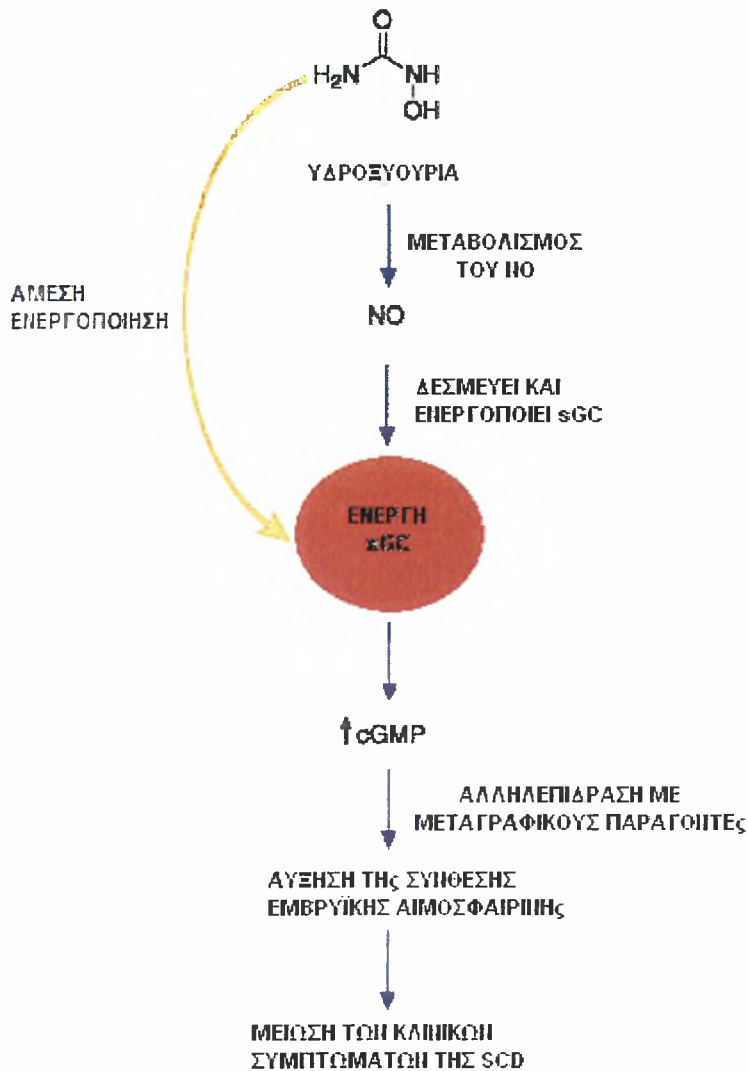
Μελέτες της τελευταίας δεκαετίας έδειξαν ότι η υδροξουρία μπορεί να υποστεί οξειδωση από ομάδες αίμης και να παράγει την ελεύθερη ρίζα του αερίου μορίου NO, τόσο in vitro⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾ όσο και in vivo.⁽⁸⁹⁻⁹¹⁾ Έχουν μετρηθεί τα προϊόντα αντιδράσεων του NO στο πλάσμα και στα ερυθροκύτταρα (νιτρική, νιτρώδης και αζωτούχος αιμοσφαιρίνη) σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία και βρέθηκε ότι τα επίπεδα τους αυξάνονται πολύ μετά από τη χορηγούμενη από το στόμα δόση υδροξουρίας, ανάλογα με την απελευθέρωση των ριζών NO από τον παράγοντα.⁽⁹²⁾

Έτσι ενώ στη δεκαετία του 1960 η δράση της υδροξυουρίας ως κυτταροστατικός παράγοντας αποδόθηκε στην αναστολή του ενζύμου ριβονουκλεοτιδική αναγωγή, αργότερα ο μηχανισμός αυτός διερευνήθηκε περαιτέρω. Στη δεκαετία του 1990, αποδείχθηκε η υπόθεση ότι η ρίζα NO^(93,94) και οι αζωτο-αγγειοδιαστολείς ⁽⁹⁵⁾ μεσολαβούν ώστε να επιτευχθεί η απενεργοποίηση της υπομονάδας τυροσίνης της ριβονουκλεοτιδικής αναγωγής και με τον τρόπο αυτό θεωρείται ότι η υδροξυουρία επιδρά στη σύνθεση του DNA. ^(96,97) Σε αρκετές μελέτες φάνηκε ότι το παραγόμενο NO από το μεταβολισμό της HU ενεργοποιεί τη διαλυτή γουανυλ-κυκλάση (sGC), η οποία ακολούθως αυξάνει την εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη (Εικόνα 1.6). ⁽⁹⁸⁾ Η ομάδα των Ikuta και συνεργατών το 2001 έδειξε ότι υπάρχει σύνδεση μεταξύ των ενεργοποιητών της διαλυτής γουανυλ-κυκλάσης (sGC) ή των αναλόγων της και της αύξησης της έκφρασης του γ γονιδίου της σφαιρίνης σε ερυθρολευχαιμικά κύτταρα και ερυθροβλάστες ανθρώπου. ⁽⁶⁸⁾ Αρχικά υπέθεσαν ότι παράγοντες που αυξάνουν την έκφραση του γ γονιδίου, όπως η υδροξυουρία και το βουτυρικό, πιθανώς να επιστρατεύουν ενδοκυττάρους δευτερογενείς μεταφορείς σήματος που έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση του γ γονιδίου. Αυτές οι μελέτες στηρίχθηκαν σε προηγούμενα δεδομένα τα οποία αποδείκνυαν ότι η επίδραση αίμης ή βουτυρικού οξέος στην αύξηση της γ σφαιρίνης σταματά μέσω αναστολής της sGC ή μιας πρωτεΐνης-κινάσης εξαρτώμενης από το cGMP (PKG).⁽⁶⁸⁾ Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν τη συμμετοχή του NO στο μηχανισμό επαγωγής της HbF από την υδροξυουρία.

Οι Cokic και συνεργάτες απέδειξαν ότι εκτός από την υδροξυουρία και δύο άλλοι διαφορετικοί δότες NO αυξάνουν την έκφραση του γ γονιδίου στα K567 ερυθρολευχαιμικά κύτταρα και σε προγονικά κύτταρα ανθρώπου. Πληθώρα πειραμάτων συνδέουν την υδροξυουρία και την S-αζωτοκυστεΐνη (CysNO) – γνωστός δότης NO – με την αύξηση των επιπέδων εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης και cGMP σε πρωτογενείς καλλιέργειες, δράση που αναστέλλεται με την παρουσία αναστολέων της sGC. ^(98,99) Τελικά απέδειξαν ότι η αύξηση στην έκφραση του γ γονιδίου σφαιρίνης συνδέεται ισχυρά με την προσφορά ριζών-NO από την υδροξυουρία, οι οποίες δρουν μέσω του μονοπατιού δράσης sGC/cGMP/PKG. ⁽⁹⁹⁾

Άλλες μελέτες σχετικά με την κατανόηση του μηχανισμού δράσης της HU έδειξαν ότι η HU δρα σε επίπεδο μεταγραφής και έτσι σε κανονικά πολλαπλασιαζόμενα ερυθροποιητικά κύτταρα η δράση της οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του γ γονιδίου. ⁽¹⁰⁰⁾ Διάφορες άλλες μελέτες έχουν προτείνει και άλλους μηχανισμούς μέσω των οποίων η υδροξυουρία μπορεί να επάγει την παραγωγή της HbF. Σε καλλιέργειες

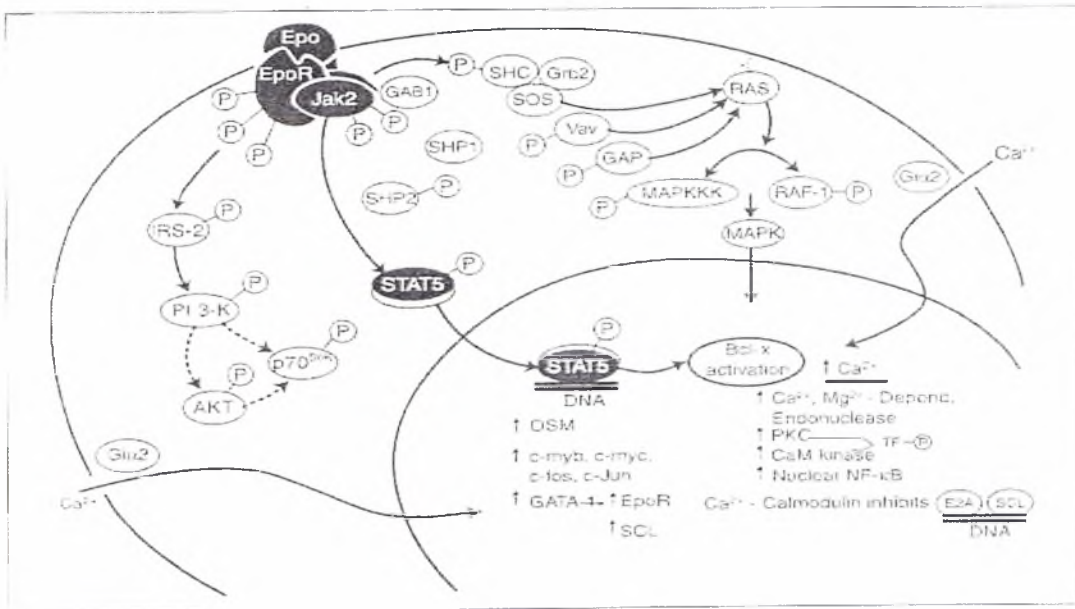
ερυθροκυττάρων ενηλίκου (hAEC κύτταρα) έχει δειχτεί ότι μετά από επίδραση υδροξυουρίας αυξάνεται όχι μόνο η μεταγραφή αλλά και η αποτελεσματικότητα του ματίσματος του mRNA στα χαμηλής έκφρασης γονίδια σφαιρίνης. ⁽¹⁰¹⁾ Καθώς η αναπτυξιακή ρύθμιση των αιμοσφαιρινών σχετίζεται με μεταβολές στα επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων των σφαιρινών και πιθανά και με μεταβολές στη διαδικασία ωρίμανσης του RNA, η περαιτέρω μελέτη της μετα-μεταγραφικής τροποποίησης των μεταγράφων των γονιδίων των σφαιρινών θεωρείται αναγκαία.



Εικόνα 1.6: Μηχανισμός αύξησης της HbF από την HU. Η HU, μέσω ενός άγνωστου μονοπατιού, μεταβολίζεται σε NO το οποίο δεσμεύει και ενεργοποιεί την sGC. Εναλλακτικά η υδροξουρία δύναται να ενεργοποιήσει απευθείας την sGC. Ακολουθεί αύξηση της παραγωγής του cGMP, η οποία πιθανότατα επηρεάζει ορισμένους μεταγραφικούς παράγοντες που οδηγούν στην αύξηση της σύνθεσης της HbF.

1.2.1.3. Ερυθροποιητίνη (Epo) και άλλες κυτοκίνες.

Η ερυθροποιητίνη (Epo) παράγεται στους νεφρούς και η δράση της γίνεται μέσω της σύνδεσής της με τον υποδοχέα της (EpoR). Η σύνδεση αυτή ενεργοποιεί ενδοκυττάρια μονοπάτια μετάδοσης σήματος (Εικόνα 1.7). Η Epo είναι ο πρωταρχικός ρυθμιστικός παράγοντας για την παραγωγή των ερυθροκυττάρων στον άνθρωπο και επιδρά στην επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των ερυθροβλαστών.

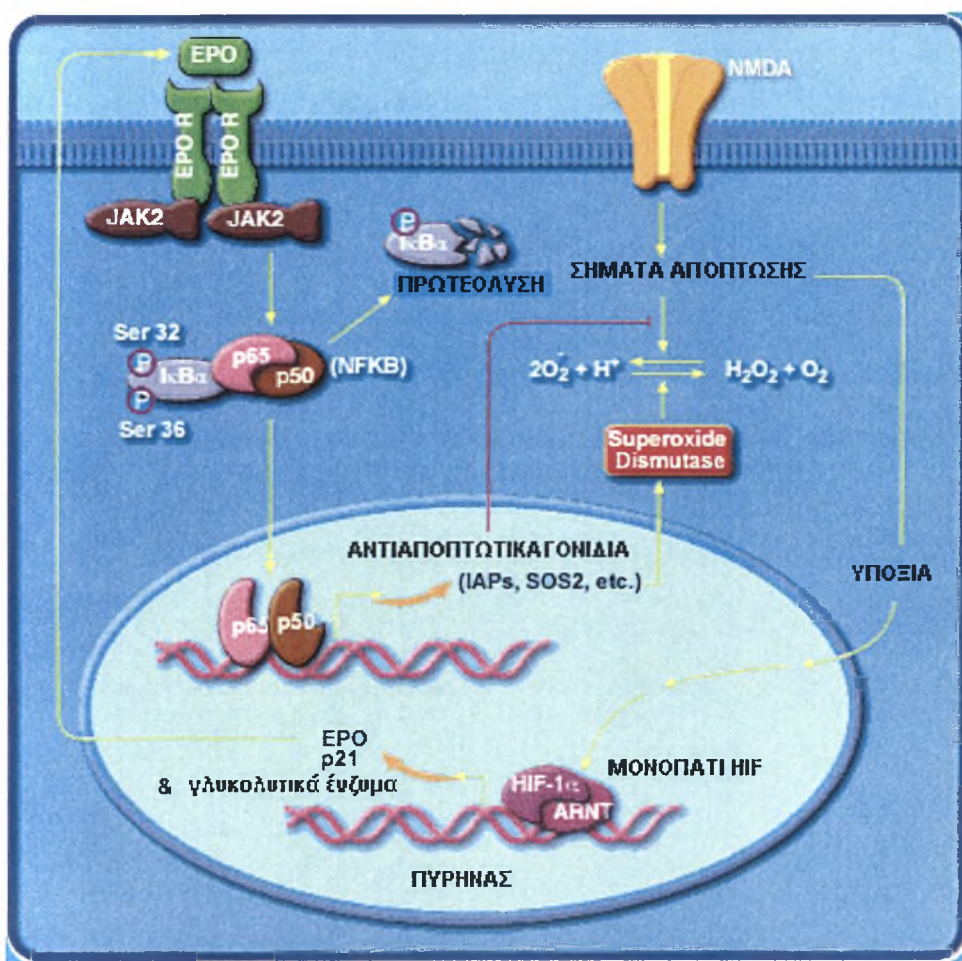


Εικόνα 1.7: Μονοπάτι “JAK2/STAT5/Bcl-x” ενδοκυττάριας μετάδοσης σήματος από τον υποδοχέα της ερυθροποιητίνης (EpoR)

Σε καταστάσεις υποξίας τα επίπεδα του mRNA και των πρωτεϊνικών μορίων της ερυθροποιητίνης αυξάνονται 1000 ή και περισσότερες φορές. Η παραγωγή τους ελέγχεται από το μονοπάτι που επηρεάζεται από τα επίπεδα του οξυγόνου. Κύριος μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει αυτή τη διαδικασία είναι ο επαγωγικός από την υποξία παράγοντας (hypoxia-inducible factor, HIF) (Εικόνα 1.8).⁽¹⁰²⁾

Η χορήγηση σχετικά μικρών δόσεων Epo σε μπαμπουίνους απέτυχε να αυξήσει τα F κύτταρα.⁽⁶⁴⁾ Αντιθέτως, υψηλή δόση αποδείχθηκε ότι επάγει την ενεργοποίηση των ερυθροκυττάρων, η οποία τελικά οδηγεί στην αύξηση της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης.⁽¹⁰³⁾

Σε δρεπανοκυτταρικούς ασθενείς οι οποίοι λαμβάνουν υδροξυουρία, η ενδοφλέβια χορήγηση Epo επέφερε μεγαλύτερη αύξηση των F κυτάρων και της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης.⁽¹⁰⁴⁾ Ο συνδυασμός και των δύο φαρμάκων ενισχύει το θεραπευτικό αποτέλεσμα μειώνοντας τον ενδοκυττάριο πολυμερισμό της HbS και βελτιώνοντας τα γενικότερα μορφολογικά χαρακτηριστικά των ερυθροκυττάρων.⁽⁶⁴⁾



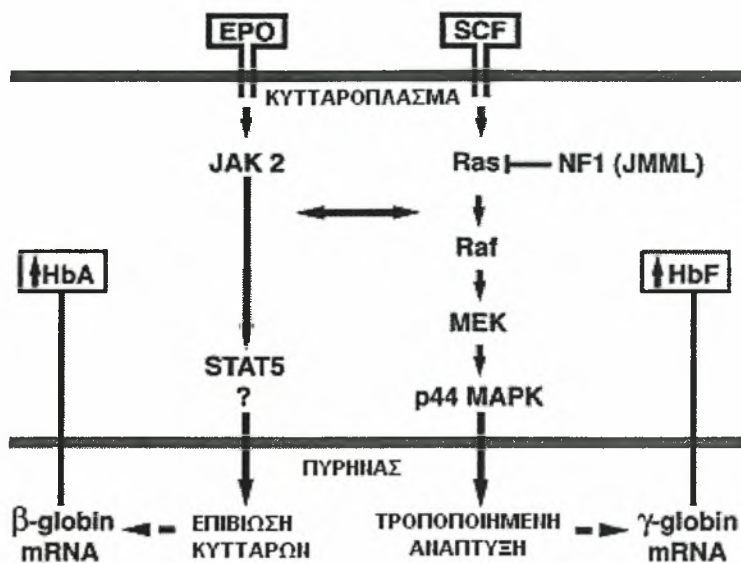
Εικόνα 1.8: Ενεργοποίηση της μεταγραφής της Epo και άλλων παραγόντων μέσω του επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα (HIF) σε περιπτώσεις έλλειψης O_2 .

Η Ερο είχε προταθεί ως θεραπεία σε ασθενείς με ενδιάμεση μεσογειακή αναιμία, όπου παρατηρήθηκε σχετική αύξηση στην αιμοσφαιρίνη των περισσότερων ασθενών αλλά μικρή αύξηση στη σύνθεση της HbF.⁽¹⁰²⁾ Η αύξηση της HbF σταματά να παρατηρείται μετά από χρόνια χρήση της ερυθροποιητίνης.

Άλλες κυτοκίνες, όπως GM-CSF, IL-3, SCF, που προάγουν το πολλαπλασιασμό των αρχέγονων κυττάρων πάνω στα οποία δρα η Ερο, χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με Ερο για την αύξηση της HbF χωρίς όμως σημαντικά αποτελέσματα.

Ο παράγοντας ανάπτυξης των αρχέγονων κυττάρων (Stem Cell Factor, SCF) είναι μία κυτοκίνη που παράγεται από τα σιτευτικά κύτταρα (mast cells) και είναι απαραίτητος για την ερυθροποίηση. Σε καλλιέργειες κυττάρων ομφαλοπλακουντικού αίματος και περιφερικού αίματος ενηλίκων, ο SCF έχει δείξει ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην αύξηση της παραγωγής HbF. Ο SCF προσδένεται στον υποδοχέα του, γνωστός ως SCFR ή c-kit ή CD117. Ο CD117 είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας τυροσίνης κινάσης τύπου III.⁽¹⁰⁶⁾ Η πρόσδεση του SCF με τον υποδοχέα του γίνεται στην εξωκυτάρια περιοχή των πέντε IgG περιοχών του υποδοχέα, το οποίο έχει ως συνέπεια την αυτοφωσφοριλίωσή του και μετάδοση δευτερογενών σημάτων που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση μιας ομάδας πρωτεϊνών από τα σηματοδοτικά μονοπάτια των Ras/Raf/MAPK ή PI3 ή JAK2 κινασών, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο.⁽¹⁰⁷⁻¹⁰⁸⁾

Ο SCF δείχνει μία έντονη βιολογική δράση στα πρώτα στάδια των προερυθροβλαστών, όπου και συνδέεται με τον υποδοχέα του CD117. Με τη σύνδεση τους ο υποδοχέας διμερίζεται και ενεργοποιείται το μονοπάτι μετάδοσης σήματος του c-kit, το οποίο είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς (Εικόνα 1.9).⁽¹⁰⁶⁻¹⁰⁸⁾



Εικόνα 1.9: Αύξηση της HbF μέσω ενεργοποίησης από το SCF μονοπατιών μετάδοσης σήματος.

1.2.1.4. Βουτυρικό οξύ και λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας ατόμων άνθρακα και τα παράγωγά τους. Αναστολείς αποακετυλίωσης των ιστονών (HDAC).

Ένας άλλος τρόπος φαρμακευτικής επαγωγής της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης είναι η χρήση του βουτυρικού οξέος και άλλων λιπαρών οξέων μικρής αλυσίδας (2-9 άνθρακες) καθώς και των παραγώγων τους.⁽¹⁰⁹⁾

Μελέτες έδειξαν ότι το βουτυρικό οξύ επάγει την παραγωγή γ σφαιρίνης σε αποικίες αρχέγονων κυττάρων ερυθράς σειράς, σε ενήλικες μπαμπούινους και σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία.⁽¹¹⁰⁾ Η Perrine και συνεργάτες της χρησιμοποίησαν για πρώτη φορά τη βουτυρική αργινίνη για επαγωγή της HbF σε έξι ασθενείς με β-θαλασσαιμία. Το βουτυρικό οξύ επέφερε αύξηση στη σύνθεση της γ σφαιρίνης σε όλες τις περιπτώσεις μετά από ενδοφλέβια έγχυση του φαρμάκου για δυο εβδομάδες.⁽¹¹¹⁾

Παράγωγα των λιπαρών οξέων μικρής αλυσίδας ατόμων άνθρακα, όπως το φαινυλοβουτυρικό οξύ και το βαλπροϊκό οξύ, αυξάνουν την παραγόμενη HbF. Στην περίπτωση, βέβαια, του φαινυλοβουτυρικού οξέος αυξήθηκε η παραγωγή και των τριών σφαιρινών α, β και γ.

Σε πειραματικά μοντέλα όπου μελετήθηκε ο μηχανισμός δράσης του βουτυρικού και των μικρής αλυσίδας λιπαρών οξέων, αποδείχτηκε ότι δρουν σε επίπεδο μεταγραφής με αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης των εμβρυονικών και εμβρυϊκών γονιδίων σφαιρίνης. Με ανάλυση πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων (footprints assays), ως περιοχή δράσης των ουσιών αυτών θεωρείται μία περιοχή του υποκινητή του γ γονιδίου,⁽¹¹⁰⁾ όπου ταυτοποιήθηκαν τέσσερις αλληλουχίες οι οποίες περιέχουν στοιχεία ανταπόκρισης στο βουτυρικό οξύ (Butyrate Response Element, BRE-G1-4). Στις περιπτώσεις θετικής ανταπόκρισης στη θεραπεία με βουτυρικό οξύ, παρατηρήθηκε η πρόσδεση δύο ερυθροειδικών πρωτεϊνών και μία γενικής δράσης (αCP2) στις αλληλουχίες αυτές,⁽¹¹²⁾ ενώ η απουσία της πρόσδεσης συνδέεται με την έλλειψη ανταπόκρισης στη θεραπεία με βουτυρικό. Με βάση τα παραπάνω θεωρήθηκε ότι η δράση του βουτυρικού στη μεταγραφή του γ γονιδίου ρυθμίζεται μέσω αυτών των αλληλουχιών.⁽¹¹³⁾

Παρά τα θετικά αποτελέσματα της δράσης του βουτυρικού οξέος τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, η θεραπευτική χρήση του φαρμάκου αυτού είναι περιορισμένη λόγω του τρόπου και χρόνου θεραπείας που απαιτείται.

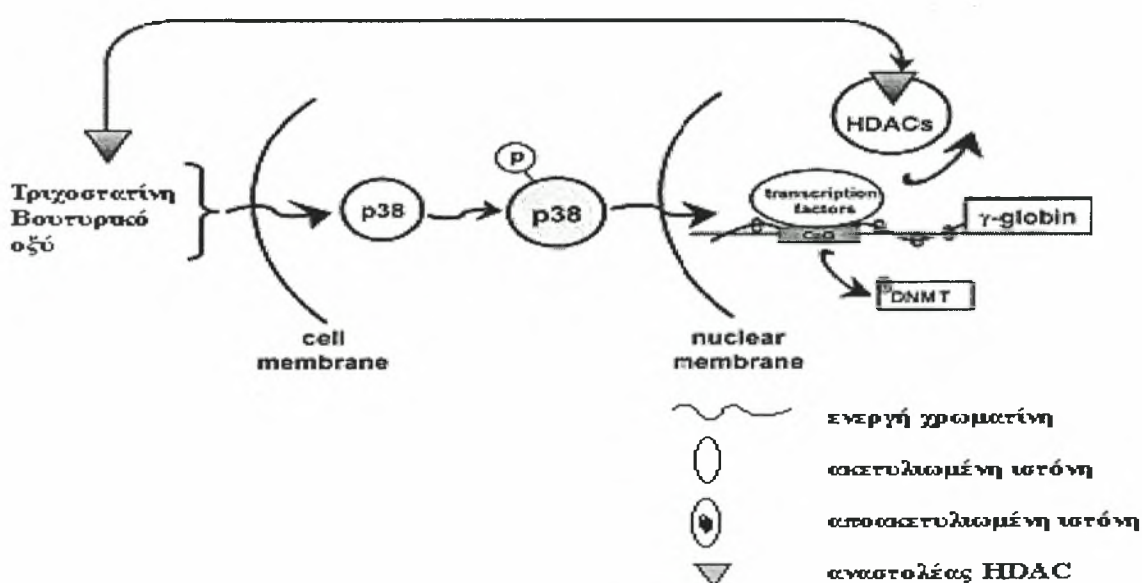
- *Αναστολείς των αποακετυλασών των ιστονών (histone deacetylase, HDAC).*

Οι αναστολείς της αποακετυλάσης των ιστονών (HDAC), παράγωγα του βουτυρικού οξέος, θεωρείται ότι επάγουν τη σύνθεση της HbF τροποποιώντας το επίπεδο ακετυλίωσης της χρωματίνης, αφού η ακετυλίωση των ιστονών συνδέεται με τη μεταγραφική ενεργότητα των ευκαρυωτικών κυττάρων. Οι τροποποιήσεις της δομής της χρωματίνης μέσω ακετυλίωσης και αποακετυλίωσης των ιστονών ελέγχουν τη γονιδιακή έκφραση επιδρώντας στην ενεργοποίηση και καταστολή των γονιδίων, αντίστοιχα.
(49,127A)

Οι αναστολείς αποακετυλασών των ιστονών περιλαμβάνουν διάφορα μόρια με χαρακτηριστικά λιπαρών οξέων, όπως υδροξυαμικό οξύ, κυκλικά τετραπεπτίδια (τραποξίνη, απισιδίνη και δισπεψιπεπτιδίο) και βενζολαμίδια (MS-27-275). Οι αναστολείς περιέχουν υδροξυαμικά οξέα, τα οποία συνδέονται με την ενεργό περιοχή των αποακετυλασών και δρουν ως ανταγωνιστικοί αναστολείς του υποστρώματος. Η ενεργός συγκέντρωσή τους ποικίλει από mM (π.χ. βουτυρικό οξύ) έως nM (π.χ. τριχοστατίνη).

Οι HDAC, είναι ένζυμα που προκαλούν συμπύκνωση της χρωματίνης και επακόλουθη μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας. Πολλοί αναστολείς των αποακετυλασών των

ιστονών, όπως το βουτυρικό Na, η τριχοστατίνη A, η αντισπιρίνη και το σκριπτικό έχουν χρησιμοποιηθεί και έχουν αυξήσει τα επίπεδα της σύνθεσης της HbF in vitro. ⁽¹¹⁴⁾ Οι προαναφερόμενοι παράγοντες, αν και προωθούν την υποακετυλίωση των ιστονών, είναι γεγονός ότι κατά τη δράση τους ενεργοποιείται το μονοπάτι μετάδοσης του σήματος της φωσφορυλίωσης της p38 κινάσης (Εικόνα 1.10). Έτσι εξασφαλίζεται η παραγωγή παραγόντων που αλληλεπιδρούν με τον υποκινητή του γ γονιδίου και ενισχύουν την μεταγραφή του γ γονιδίου. ⁽¹¹⁴⁾

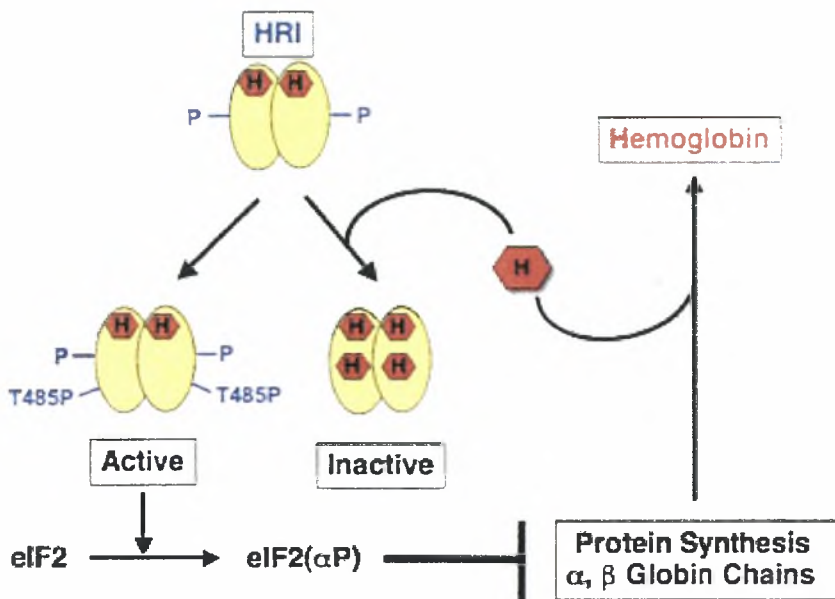


Εικόνα 1.10: Μοντέλο δράσης των αναστολέων αποακετυλασών των ιστονών στο γ γονίδιο.

1.2.1.5. Αίμη.

Η αίμη είναι μία πρωτοπορφυρίνη που συναντούμε στο εσωτερικό του μορίου της αιμοσφαιρίνης. Συντίθεται από τη γλυκίνη στο ενζυμικό σύστημα των μιτοχονδρίων. ⁽⁵⁰⁾ Η ύπαρξή της θεωρείται καθοριστική. Η εξωγενής παροχή της κατά τα πρώιμα στάδια της ωρίμανσης των ερυθροβλαστών προάγει το πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους και ταυτόχρονα αυξάνει τη συσσώρευση της αιμοσφαιρίνης με εκλεκτική αύξηση της HbF. Η αυξημένη παραγωγή της αιμοσφαιρίνης F, η οποία διατηρείται σε υψηλά επίπεδα ακόμα και μετά την ωρίμανση των ερυθροβλαστών, σχετίζεται με την επιτάχυνση που προκαλεί η αίμη στη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης. ⁽¹⁰¹⁾ Η εκλεκτική

αύξηση της HbF που παρατηρείται μετά την επίδραση της αίμης συνοδεύεται από αύξηση του mRNA της γ σφαιρίνης, γεγονός που υποδηλώνει τη δράση της σε επίπεδο μεταγραφής και συγκεκριμένα στο ρυθμό μεταγραφής των γ και ε γονιδίων σφαιρίνης.⁽¹²²⁾ Εκτός από το ρόλο της ως προσθετική ομάδα στην αιμοσφαιρίνη, η αίμη ρυθμίζει τη μεταγραφή των γονιδίων σφαιρίνης μέσω της σύνδεσής της με το μεταγραφικό παράγοντα Bach1 κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των ερυθροειδικών κυττάρων.^(115,116) Επίσης, έχει δειχτεί ότι η αίμη έχει και μετα-μεταγραφική επίδραση στο γονίδιο της γ σφαιρίνης.⁽¹¹⁷⁾ Συγκεκριμένα, σε hAEC κύτταρα που προστίθεται αίμη εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα ώριμων (μετά τη διαδικασία της αποκοπής των ενδιάμεσων αλληλουχιών) mRNA μεταγράφων των γ και ε γονιδίων σφαιρίνης, χωρίς να επηρεάζονται τα επίπεδα των β mRNA μεταγράφων.⁽¹¹⁸⁾ Η αίμη ελέγχει και τη μετάφραση στα προγονικά κύτταρα των ερυθροκυττάρων και θεωρείται ότι επηρεάζει τη σύνθεση των σφαιρινικών αλυσίδων καθορίζοντας την ενεργότητα της κινάσης (HRI) του αρχέγονου ευκαρυωτικού παράγοντα-2^α (eukaryotic initiation factor 2^α - eIF-2^α) (Εικόνα 9).⁽¹¹⁹⁾ Αυτή η οδός ρύθμισης μέσω της HRI επιδρά σημαντικά στη μείωση της περίσσειας σύνθεσης σφαιρινικών αλυσίδων σε αναιμίες, όπως ερυθροποιητική πρωτορορφυρία, έλλειψη σιδήρου και β θαλασσαιμία (Εικόνα 1.11).⁽¹¹⁹⁾ Σε ασθενείς με αιμοσφαιρινοπάθειες (β μεσογειακή αναιμία και δρεπανοκυτταρική αναιμία), όπου έχει χρησιμοποιηθεί η αίμη με στόχο την αύξηση της HbF, οδηγεί σε βελτίωση της κλινικής τους εικόνας. Στους ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία, αφενός αυξάνεται η περιεκτικότητα των κυττάρων σε HbF, αφετέρου ελαττώνεται ο πολυμερισμός των α αλυσίδων.⁽¹²⁰⁾ Στους ασθενείς με β θαλασσαιμία η αύξηση των γ αλυσίδων μπορεί εν μέρει να αντισταθμίσει τη μειωμένη σύνθεση των β έναντι των α αλυσίδων.⁽⁴⁷⁾ Ένα πρόβλημα στη χρήση αίμης σε ασθενείς που μεταγγίζονται είχε θεωρηθεί ότι θα ήταν η υπερφόρτωση με σίδηρο.⁽¹²¹⁾ Πρόσφατα όμως ανακαλύφθηκε ότι η αυξημένη ερυθροποίηση σε τέτοιους ασθενείς απαιτεί συμπληρώματα σιδήρου⁽¹²²⁾ και καθώς η αίμη παρέχει σίδηρο, μπορεί να επιτελεί και αυτή τη λειτουργία. Έτσι το όφελος των ασθενών αυτών από την λήψη αίμης μπορεί να είναι τετραπλό: α) αυξάνεται η μάζα των κυττάρων της ερυθράς σειράς διεγείροντας την αύξηση των προγονικών κυττάρων, β) επιταχύνεται η σύνθεση της σφαιρίνης επηρεάζοντας το ρυθμό της μετάφρασης^(48,129), γ) αποτελεί πηγή σιδήρου και, δ) αυξάνεται επιλεκτικά η ποσότητα της αιμοσφαιρίνης F.⁽¹⁰¹⁾

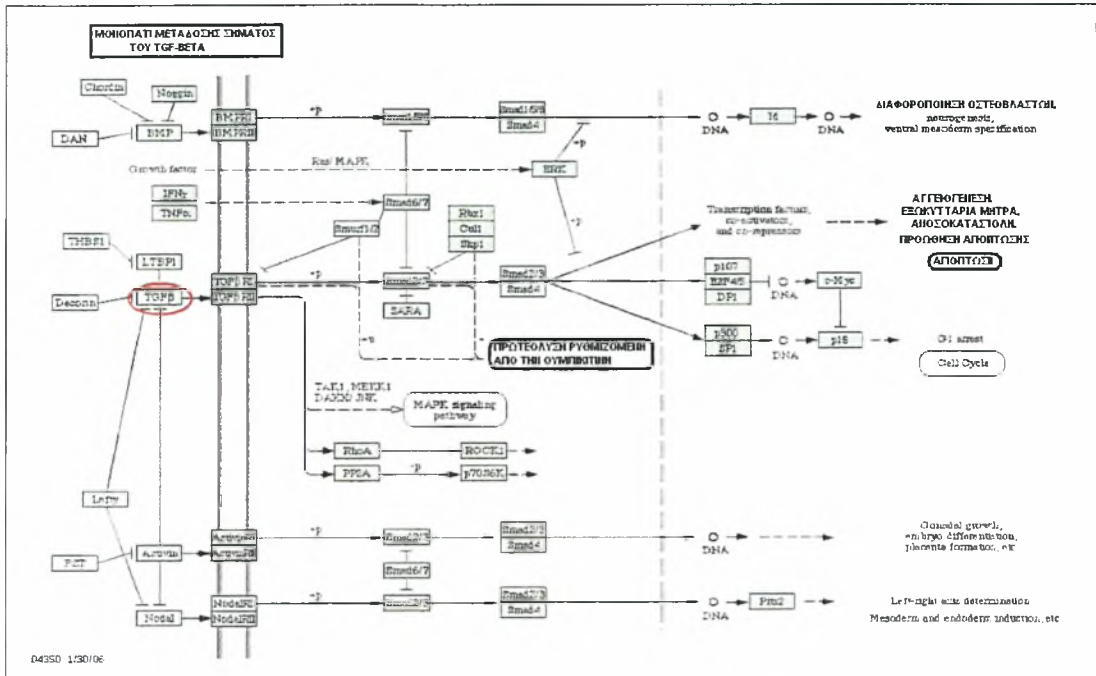


Εικόνα 1.11: Έλεγχος σύνθεσης σφαιρινικών αλυσίδων από την αίμη (H) μέσω της ενεργότητας του παράγοντα eIF-2.

1.2.1.6. Αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης β (TGF-β).

Η προσθήκη αυξητικού παράγοντα μεταμόρφωσης-β (TGF-β) σε καλλιέργειες προγονικών κυττάρων που λαμβάνονται από ενήλικες έχει προκαλέσει θεαματική αύξηση στην αναλογία των κυττάρων που παράγουν αιμοσφαιρίνη F.⁽¹²³⁾ Ο αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης-β έχει κυρίως ανασταλτική επίδραση στην αιμοποίηση. Συγκεκριμένα, προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης και πρώιμη ωρίμανση ερυθροκυττάρων σε καλλιέργειες κυττάρων της ερυθράς σειράς, αυξάνει τη συσσώρευση της αιμοσφαιρίνης σε ερυθροειδικές κυτταρικές σειρές, ενώ μειώνει την ερυθροποίηση *in vivo*.⁽¹²⁴⁾ Είναι πιθανό ότι ο TGF-β να παίζει ρόλο στη ρύθμιση της ερυθροποίησης, αφού έχει παρατηρηθεί ότι ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία, που έχουν αυξημένα επίπεδα TGF-β στον ορό του αίματος, έχουν αυξημένη εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη.⁽¹²³⁾ Ο πιθανότερος μηχανισμός δράσης του TGF-β που προτείνεται είναι επανεργοποίηση του προγράμματος έκφρασης του γ γονιδίου, η οποία συνδυάζεται με την αλληπάλληλη διέγερση και αναστολή της ερυθροποίησης που προκαλεί ο TGF-β και

ενεργοποίηση του σηματοδοτικού του μονοπατιού, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.12.



Εικόνα 1.12: Μονοπάτι μετάδοσης σήματος του TGF-β.

1.3. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η μεταστροφή της αιμοσφαιρίνης στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια του ανθρώπου αποτυπώθηκε για πρώτη φορά στη δεκαετία του 1950, ενώ αργότερα ανακαλύφθηκαν πολλές μεταλλαγές οι οποίες οδηγούσαν σε παραμονή της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης στον ενήλικα. Ο παθοφυσιολογικός ρόλος της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης στη θαλασσαιμία περιγράφηκε στην αρχή του 1960. Ποικίλες γενετικές και βιοχημικές μελέτες έδειξαν ότι η επιβίωση ασθενών με σοβαρές ανωμαλίες στη β αλυσίδα μπορεί να αποδοθεί στην ύπαρξη HbF, η οποία βελτιώνει σημαντικά την κλινική τους εικόνα.

Ο στόχος της έρευνας των τελευταίων 30-40 ετών είναι η εύρεση φαρμακευτικών ουσιών που επάγουν την εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη, αν και οι δυσκολίες και οι περιορισμοί που προκύπτουν από τη χρήση αυτών των φαρμάκων, όπως κυτταροτοξικότητα, καρκινογένεση, διαφορετική ανταπόκριση των ασθενών, χρόνος και τρόπος θεραπείας, έχουν οδηγήσει τους επιστήμονες σε αναζήτηση ολοένα νέων φαρμακευτικών ουσιών.⁽¹²⁵⁻¹²⁸⁾ Σε τέτοιες προσπάθειες εφαρμογής νέων φαρμακευτικών ουσιών, η διερεύνηση και κατανόηση των μηχανισμών δράσης των ήδη γνωστών φαρμάκων θα αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο στην κατανόηση των μηχανισμών μεταστροφής της αιμοσφαιρίνης του ανθρώπου καθώς και στην επιλογή νέων και αποτελεσματικότερων φαρμακευτικών ουσιών-επαγωγέων της HbF.

Οι μηχανισμοί δράσης των χρησιμοποιούμενων μέχρι τώρα επαγωγικών ουσιών της HbF επικεντρώνονται στην αύξηση της μεταγραφής του γ γονιδίου και στη δράση συγκεκριμένων αλληλουχιών-θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων. Οι βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τη συμμετοχή μετα-μεταγραφικών και μεταφραστικών μηχανισμών δράσης των επαγωγικών για την HbF ουσιών είναι περιορισμένες.^(129,48,130)

Για το λόγο αυτό στην παρούσα μελέτη το ενδιαφέρον μας επικεντρώνεται στη διερεύνηση του μηχανισμού δράσης της υδροξουρίας, ευρέως χρησιμοποιούμενου φαρμάκου σε ασθενείς με θαλασσαιμικά σύνδρομα, στην επαγωγή της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης, προστιθέμενη μόνη της ή και με παράλληλη χορήγηση κυτταροκινών, ερυθροποιητίνης και SCF σε επίπεδο μεταγραφικό, μετα-μεταγραφικό και μεταφραστικό. Η μελέτη του μοριακού μηχανισμού δράσης ενός φαρμάκου απαιτεί τη χρήση κατάλληλου συστήματος καλλιεργούμενων κυττάρων, το οποίο να προσομοιάζει το ανθρώπινο σύστημα ερυθροποίησης. Για το σκοπό αυτό στην παρούσα εργασία

χρησιμοποιούμε πρωτογενείς καλλιέργειες CD34+ κυττάρων από περιφερικό αίμα ενηλίκων που διαφοροποιούνται προς την ερυθρά σειρά. ⁽¹³¹⁻¹³³⁾

Στο κυτταρικό αυτό σύστημα θα μελετηθούν οι μηχανισμοί δράσης της HU και των συνδυασμών της με Epo και SCF μέσω μέτρησης:

α) των F-κυττάρων με κυτταρομετρία ροής,

β) των επιπέδων CD117,

γ) των επιπέδων έκφρασης των β- και γ-mRNA μεταγράφων με Real-Time PCR,

δ) του ποσοστού γ-αλυσίδων (Gγ και Aγ) με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC),

ε) του ποσοστού HbF και HbA με HPLC,

στ) της έκφρασης του γ και β γονιδίου μετά την προσθήκη ακτινομυκίνης, αναστολέα της μεταγραφής, και/ή προσθήκη κυκλοεξαμίδης, αναστολέα πρωτεϊνοσύνθεσης.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

A. ΥΛΙΚΟ

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες αρχέγονων κυττάρων (CD34⁺) περιφερικού αίματος φυσιολογικών ατόμων. Από 45 υγιείς αιμοδότες λαμβάνεται η στιβάδα των μονοπύρηνων κυττάρων (Buffy Coat). Τα κύτταρα αναπτύσσονται παρουσία κατάλληλου θρεπτικού υλικού και προσθήκη κατάλληλων παραγόντων που εξασφαλίζουν τη καλλιέργεια για 14 ημέρες και τη διαφοροποίηση των κυττάρων προς την ερυθρά σειρά.

B. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1. Κυτταροκαλλιέργειες.

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήσαμε ένα κατάλληλο σύστημα κυτταροκαλλιεργειών, τις πρωτογενείς καλλιέργειες CD34⁺ κυττάρων που διαδοροποιούνται προς την ερυθρά σειρά, το οποίο προσομοιάζει το ανθρώπινο σύστημα ερυθροποίησης. Προκειμένου να μελετήσουμε την επίδραση συγκεκριμένων παραγόντων στα κύτταρα ενδιαφέροντος, χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό StemSpan™ SFEM, το οποίο είναι απαλλαγμένο από την παρουσία ορού.

Αρχικά μελετήθηκε και εξασφαλίσθηκε ότι η καλλιέργεια αναπτύσσεται και εξελίσσεται ομαλά, αφού καθορίστηκαν οι κατάλληλες συγκεντρώσεις κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων που πρέπει να προστεθούν για να επιτευχθεί ομαλή ανάπτυξη και διαφοροποίηση των ερυθροειδικών κυττάρων.

2.1.1. Καλλιέργειες ανθρώπινων προγονικών κυττάρων (CD34⁺). Διαφοροποίηση προς την ερυθρά σειρά.

➤ Απομόνωση ανθρώπινων προγονικών κυττάρων CD34⁺ από περιφερικό αίμα φυσιολογικών ενηλίκων ατόμων:

- Λαμβάνουμε το αίμα σε φιαλίδιο το οποίο περιέχει αντιπηκτικό.
- Αραιώνουμε σε αναλογία 1:1 με διάλυμα PBS που περιέχει αντιπηκτικό (ACD) σε συγκέντρωση 0.6% και αλβουμίνη ανθρώπινου ορού (HSA) σε συγκέντρωση 0.1%.
- Επιστοίβαση 25 ml αίματος στάγδην σε 12-15 ml φικόλης (Ficoll-Hystopaque d=1.077 gr/ml).
- Φυγοκέντρηση 30' σε θερμοκρασία δωματίου σε 1700 στροφές (rpm).
- Λαμβάνουμε τη μεσόφαση που περιέχει τα μονοπύρρηνα κύτταρα και ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων 2 φορές με το διάλυμα PBS σε 1:1 αναλογία.
- Φυγοκέντρηση για 10' σε θερμοκρασία δωματίου σε 1700 rpm.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε στο ίζημα διάλυμα PBS με αντιπηκτικό ACD σε συγκέντρωση 0.6% .
- Αναδεύουμε με πιπέτα pasteur και μετράμε τον αριθμό κυττάρων του διαλύματος.
- Φυγοκέντρηση για 10' σε θερμοκρασία δωματίου σε 1700 rpm.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και για κάθε 10⁸ κύτταρα προσθέτουμε:
 - 300 μl διαλύματος PBS που περιέχει 0.6% ACD και 0.5% HSA
 - 100 μl διαλύματος FcR για την αποφυγή μη ειδικής σύνδεσης
 - 100μl διαλύματος CD34⁺ μικροσφαιρίδια (Microbeads)
- Παραμονή 30' σε θερμοκρασία 4°C.
- Προσθέτω διάλυμα PBS (+ ACD + HSA) σε αναλογία 10:1 ως προς το διάλυμα σήμανσης.
- Φυγοκέντρηση για 10' σε θερμοκρασία δωματίου στις 1700 rpm.
- Επαναδιάλυση σε 500 μl διάλυμα PBS (+ ACD + HSA) για κάθε 10⁸ κύτταρα.
- Διέλευση του διαλύματος των κυττάρων μέσα από τη στήλη η οποία βρίσκεται υπό την επίδραση μαγνητικού πεδίου.

Η απομόνωση των CD34⁺ με μαγνητικά μικροσφαιρίδια (MACS CD34⁺ Microbeads), που αναγνωρίζουν τον συγκεκριμένο δείκτη επιφανείας και σημαίνουν τα CD34⁺ κύτταρα, πραγματοποιείται καθώς επιλέγονται και συγκρατούνται στη στήλη υπό την επίδραση ισχυρότατου μαγνητικού πεδίου, ενώ τα CD34⁻ κύτταρα εκλούνται από τη στήλη.

- Η στήλη απομακρύνεται από το μαγνητικό πεδίο και τα CD34⁺ κύτταρα εκλούνται σε αποστειρωμένο φιαλίδιο με τη χρήση διαλύματος PBS (+ ACD + HSA).
- Φυγοκέντρηση για 10' σε θερμοκρασία δωματίου στις 1700 rpm.
- Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε πλήρες θρεπτικό υλικό και καλλιεργείται σε επωαστικό θάλαμο 37 °C και 5% CO₂.

➤ Καλλιέργεια των CD34⁺ κυττάρων

Με τα μαγνητικά μικροσφαιρίδια (MACS CD34 Microbeads) αποκτούμε έναν ομοιογενή πληθυσμό CD34⁺ κυττάρων (καθαρότητα 70-85%), τα οποία μετρώνται στη συνέχεια με κυτταρομετρία ροής. Καλλιεργούνται σε συγκέντρωση 10-50 x 10⁴ κύτταρα. Η υγρή καλλιέργεια διαρκεί 14 συνεχόμενες ημέρες. Χρησιμοποιείται πλήρες θρεπτικό υλικό StemSpan, απουσία ορού, ενώ οι απαιτούμενες κυτταροκίνες προστίθενται ξεχωριστά. Χρησιμοποιείται ερυθροποιητίνη (EPO) και αυξητικός παράγοντας SCF (Stem Cell Factor). Οι χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις είναι 4-10U/ml για την Epo και 100U/ml για τον SCF. Η ανάπτυξη των κυττάρων παρατηρείται καθημερινά σε ανάστροφο μικροσκόπιο και πραγματοποιείται επανακαλλιέργεια και προσθήκη νέου υλικού κάθε 1-2 ημέρες. Η συλλογή των κυττάρων γίνεται σε διαφορετικές ημέρες (0, 3, 6, 9, 12, 14) με φυγοκέντρηση για 10' σε 1600rpm, όπου διαχωρίζεται το ίζημα των κυττάρων, πλένεται 2 φορές με PBS και φυλάσσεται στους -20°C (προκειμένου να ακολουθήσει μέτρηση σε HPLC) ή στους -80°C (προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για απομόνωση RNA).

2.2. Κυτταρομετρία ροής (τριπλός ανοσοφθορισμός).

2.2.1. Χαρακτηρισμός των κυττάρων και προσδιορισμός του αριθμού των μορίων των κυτταρικών αντιγόνων επιφανείας CD34, CD71, CD117 (c-Kit/SCF), γλυκοφορίνης και των μορίων γ σφαιρίνης, με κυτταρομετρία ροής.

Για τη μελέτη των αντιγόνων επιφανείας και της έκφρασης του μορίου της γ σφαιρίνης στο εσωτερικό των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του ανοσοφθορισμού με κυτταρομετρία ροής και χρήση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι :

- γ αλυσίδα της αιμοσφαιρίνης (HBF-1/FITC, mouse IgG1 anti-human, Invitrogen)
- Γλυκοφορίνη A
- CD34 PE Coulter(B4)/Caltag T56/14
- CD45, κοινό λευκοκυτταρικό αντιγόνο
- CD71(Transferrin Receptor, T56/14 mouse IgG1 anti-human, Invitrogen)
- CD117 (104D2, mouse IgG1 anti-human, Invitrogen)

Η επεξεργασία των δειγμάτων έγινε σε ολικό αίμα και τα μονοκλωνικά αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Για τη μελέτη της απόπτωσης χρησιμοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής και η χρωστική 7-αμινο-ακτινομυκίνη D (7-amino-actinomycin-D, 7-AAD)(PN IM3422, Beckman Coulter).

Το 7-AAD είναι μία φθορίζουσα ουσία (μήκος κύματος 660nm) με ικανότητα πρόσδεσης στο DNA. Ο βαθμός πρόσδεσης εξαρτάται από το βαθμό βλάβης της κυτταρικής μεμβράνης. Συγκεκριμένα τα ζωντανά με την ακέραια κυτταρική μεμβράνη δεν επιτρέπουν την είσοδο της χρωστικής, ενώ τα αποπτωτικά και τα νεκρά επιτρέπουν σε μέτριο και σε μεγάλο βαθμό, αντίστοιχα την είσοδο της χρωστικής.

Αναγνωρίζονται 3 πληθυσμοί κυττάρων: α) τα ζωντανά κύτταρα(7-AAD neg), β) τα αποπτωτικά(7-AAD dim) και γ) τα κύτταρα σε προχωρημένη απόπτωση ή νεκρά (7-AAD bright).

Τα στάδια της ανάλυσης έχουν ως εξής:

- Επώαση ολικού αίματος με το μονοκλωνικό αντίσωμα σε θερμοκρασία δωματίου επί 15 λεπτά.
- Λύση των κυττάρων χωρίς πλύσιμο με χλωριούχο αμμώνιο.
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 2000 στροφές (rpm).
- Διάλυση του ιζήματος σε 0.5 ml PBS.
- Ανάλυση του δείγματος στον κυτταρομετρητή Coulter Epics XL-MCL.
- Στον πληθυσμό των γλυκοφορίνη-θετικών (Gly+) κυττάρων μετράται το ποσοστό των θετικών κυττάρων για το μονοκλωνικό αντίσωμα.

Έχουμε τη δυνατότητα να επικεντρωνόμαστε στο πληθυσμό που μας ενδιαφέρει, αφού μαζί με κάθε μονοκλωνικό αντίσωμα έχουμε προσθέσει το αντίσωμα για τη γλυκοφορίνη. Το ισουτυπικό κοντρόλ ορίζεται στο 1,5 – 2 % (θετικός ουδός, "cut-off").

Η ένταση έκφρασης των δεικτών ποσοτικοποιείται με ένα νέο δείκτη που ονομάστηκε «δείκτης θετικότητας» (positivity index, pi). Αυτός ο «δείκτης θετικότητας» για το μονοκλωνικό αντίσωμα είναι ο λόγος της μέσης έντασης του φθορισμοχρώματος για το συγκεκριμένο δείκτη προς την αντίστοιχη μέση ένταση φθορισμοχρώματος του κοντρόλ. Σε περιπτώσεις κυτταρικών δεικτών με δείκτη θετικότητας μικρότερο του 2 ($pi < 2$), η έκφραση ορίζεται ως ασθενής (dim). Αντίθετα, οι κυτταρικοί δείκτες που εκφράζονται έντονα (bright) έχουν δείκτη θετικότητας μεγαλύτερο του 2 ($pi > 2$).

2.3. HPLC. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης Με Στήλη Αντίστροφης Φάσης C8 (RP-HPLC).

Η υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC) είναι η αρχαιότερη τεχνική για την ανάλυση και τον καθαρισμό ενός ευρέους φάσματος των μορίων. Ειδικότερα, η HPLC στις διάφορες τροποποιήσεις της έχει γίνει η κεντρική τεχνική στο χαρακτηρισμό των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών. Τα πεπτιδία και οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τη χρωματογραφική επιφάνεια με συγκεκριμένο προσανατολισμό, κατά τον οποίο ο χρόνος διατήρησής τους καθορίζεται από τη μοριακή σύνθεση των συγκεκριμένων περιοχών επαφών. Για μεγαλύτερα πολυπεπτιδία και πρωτεΐνες η χρωματογραφική περιοχή επαφών περιλαμβάνει ένα μικρό ποσοστό της συνολικής μοριακής επιφάνειας. Ως εκ τούτου, ο μοναδικός προσανατολισμός ενός πεπτιδίου ή μιας πρωτεΐνης σε μια ιδιαίτερη

επιφάνεια στάσιμης φάσης αποτελεί τη βάση της άριστης επιλεκτικότητας που μπορεί να επιτευχθεί με τις τεχνικές HPLC. Όλες οι βιολογικές διαδικασίες εξαρτώνται από τις συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων και η χρωματογραφία συγγένειας εκμεταλλεύεται αυτές τις συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις για να επιτρέψει τον καθαρισμό ενός βιομορίου βάσει της βιολογικής λειτουργίας ή της μεμονωμένης χημικής δομής της. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε στήλη αντίστροφης φάσης C8 (RP-HPLC) (5μm διάμετρος κόκκων) και πραγματοποιήθηκε ανίχνευση των εκλουόμενων κλασμάτων στο υπεριώδες (214 nm).⁽¹⁴³⁾

Τα επίπεδα παραγωγής της γ σφαιρίνης στην καλλιέργεια υπολογίζονται ως πηλίκο «G γ /A γ » και « γ / γ + β ». Με τη μέτρηση της παραγωγής των σφαιρινικών αλυσίδων μπορεί να υπολογιστεί το ποσοστό παραγωγής της αιμοσφαιρίνης, για μεν την εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη (HbF) υπολογίζεται ως το πηλίκο «G γ +A γ)/ α », για δε την αιμοσφαιρίνη ενηλίκου (HbA) ως το πηλίκο « β / α ». ⁽⁶³⁾ Η συλλογή των κυττάρων για μέτρηση των αλυσίδων έγινε κατά την 11η και 14η ημέρα της καλλιέργειας.

2.4. Απομόνωση κυτταροπλασματικού RNA.

2.4.1. Απομόνωση κυτταροπλασματικού RNA από κύτταρα καλλιέργειας:

Ημέρα πρώτη:

- Συλλογή της υγρής καλλιέργειας σε αποστειρωμένο σωληνάριο.
- Έκπλυση με διάλυμα PBS.
- Φυγοκέντρηση 1600rpm για 10 min.
- Απόρριψη του υπερκειμένου.
- Έκπλυση με διάλυμα PBS.
- Επανάληψη του προηγούμενου σταδίου φυγοκέντρησης και έκπλυσης με PBS.
- Φύλαξη των κυττάρων στους -80°C.

Την επόμενη ημέρα:

- Ακολουθείται το πρωτόκολλο απομόνωσης κυτταροπλασματικού RNA RNeasy Mini Kit της Qiagen (Cat. No. 74104)
- Αποθήκευση στους -80°C .
- Έλεγχος της ποιότητας του RNA με ηλεκτροφόρηση σε 2% gel αγαρόζης.
- Ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA με φωτομέτρηση στα 260 και 280nm. Για τη φωτομέτρηση αραιώνουμε το RNA (1:100). Ο λόγος της απορρόφησης στα 260nm προς την απορρόφηση στα 280 nm πρέπει να κυμαίνεται από 1,7 έως 1,9. Η συγκέντρωση του RNA ($\mu\text{g/ml}$) βρίσκεται από τον τύπο $\text{OD}_{260} \times 40 \times \text{αραιώση}$.

2.4.2. Σύνθεση cDNA.

Η σύνθεση του cDNA έγινε με αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription, RT) in vitro χρησιμοποιώντας ως εκκινητές ολιγονουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας (random primers, 500 $\mu\text{g/ml}$). Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση είναι η αντίστροφη μεταγραφάση MML-V (Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase, 1200U/ μl). Για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκαν επίσης ρυθμιστικό διάλυμα (RT buffer) (5x) και δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) σε συγκέντρωση 40 mM. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε ολικό κυτταρικό RNA, το οποίο αρχικά διαλύθηκε σε ddH₂O. Το διάλυμα RNA αρχικά θερμάνθηκε στους 65°C για 10' προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αποδιάταξη δευτεροταγών δομών του RNA. Ακολούθησε παραμονή στον πάγο για 5' και προσθήκη στη συνέχεια της αντίστροφης μεταγραφάσης, του 5x διαλύματος και των δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) (Πίνακας 2.1).

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 40 μl και οι συνθήκες οι εξής:

1. 37°C για 60 λεπτά
2. 94°C για 2 λεπτά
3. Φύλαξη στους 4°C

Αντιδραστήρια	Όγκοι /συγκεντρώσεις
RT buffer 5x*	8 μl
dNTPs (40 mM)	4 μl
Τυχαία ολιγονουκλεοτίδια (3 μg/μl)	2 μl
MML-V RT (1200U/μl)	2 μl
Υπόστρωμα:	
RNA	** μg
ddH ₂ O	*** μl

Πίνακας 2.1: Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις για τη σύνθεση cDNA μορίων.

* Σύνθεση ρυθμιστικού διαλύματος (RT buffer) 5x: 250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0,5 M EDTA

** Ο όγκος του RNA υπολογίζεται έτσι ώστε η τελική συγκέντρωσή του να είναι 1μg/ 20 μl σε τελικό όγκο.

*** Ο όγκος του H₂O είναι τέτοιος ώστε ο τελικός όγκος σε κάθε δείγμα να είναι 40μl.

Το ενδεχόμενο ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων από αδυναμία ενίσχυσης του RNA μπορεί να αποκλεισθεί με ενίσχυση αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε μετάγραφα γονιδίων τα οποία εκφράζονται πάντοτε στον υπό ανάλυση ιστό (μετάγραφα “αναφοράς”). Στην παρούσα μελέτη, ως μετάγραφο “αναφοράς” χρησιμοποιείται το mRNA του γονιδίου RARα (retinoic acid receptor α) το οποίο κωδικοποιεί έναν από τους υποδοχείς του ρετινοϊκού οξέος. Έτσι, ως μάρτυρας για την αποτελεσματικότητα της σύνθεσης cDNA, 3μl του προϊόντος cDNA ενισχύθηκαν με PCR (Πίνακας 2.2) χρησιμοποιώντας τους ειδικούς εκκινητές για τις αλληλουχίες του RARα cDNA (RAR6/RAR8, Πίνακας 2.7).

Συνθήκες αντίδρασης:

-αρχική αποδιάταξη: 94°C, 5 λεπτά

-κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 40 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:

- φάση αποδιάταξης: 94°C, 1 λεπτό
- φάση σύνδεσης εκκινητών: 53°C, 1 λεπτό
- φάση επέκτασης μορίων DNA: 72°C, 1 λεπτό

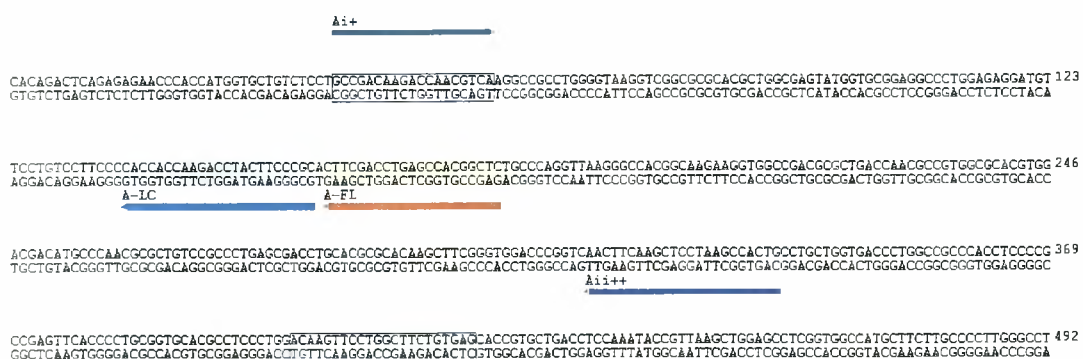
-τελική επέκταση συντεθειμένων μορίων DNA: 72°C, 10 λεπτά

Αντιδραστήρια	Όγκοι / συγκεντρώσεις
Υπόστρωμα: cDNA	3 μ l
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x	5 μ l
MgCl ₂ (50mM)	2 μ l
dNTPs (40mM)	1 μ l
RAR6 (10 μ m/μl)	2 μ l
RAR8 (10 μ m/μl)	2 μ l
Taq DNA πολυμεράση (5 units/μl)	0,4 μ l
ddH ₂ O	34,6
Τελικός Όγκος	50 μ l

Πίνακας 2.2: Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις για την αντίδραση ενίσχυσης RAR α .

2.5. Μοριακή ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων α -, β - και γ -σφαιρίνης.

Η ενίσχυση των γονιδίων α -, β - και γ -σφαιρίνης έγινε με RT-PCR, όπως φαίνεται στους Πίνακες 2.3 και 2.4 αντίστοιχα, και με κατάλληλους εκκινητές που αποτυπώνονται στις Εικόνες 2.1, 2.2 και 2.3, αντίστοιχα.

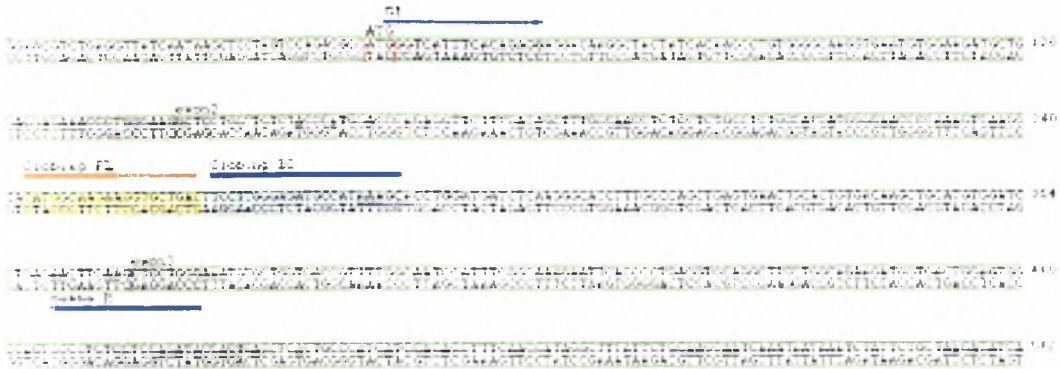


Εικόνα 2.1: Αλληλουχία στόχος του $\alpha 2$ - γονιδίου σφαιρίνης.

Bi+
 CACATTTGCTTCTGACACACACCTGTGTTCACTGCAAOCTCAAACACACACCATGGTGCACCTGACTCCTGAGGAGAAAGTCTGCCCTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAACTTGGTGGTGAAG 133
 CTGTAAACGAAAGACTGTGTGACACAAAGTGTCTGTTGGAGTTTCTCTGTGGTACCACGGTGGACTGAGGACTCCTCTTCAGACGGCAA TGACGGGACACCCCGTTCOACTTGCACTACTTCAACCACCACTTC
 B-IC B-FE
 CCTGGGCAGGCTCCTGGTGTCTACCCITGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCTCTTGGGGATCTGTCCACCCTGTATGCTGTTATGGGCAACCCTAAAGGTGAAGGCTCATGGCAAGAAAGTGTCTGGTGCCTT 266
 GGGACCGTCCSAAGACCACAGATGGAAACCTGGGTCTCCAGAAACTCAGGAAACCCCTAGACAGGTGGGGACTACGACAAATACCCGTTGGGATTCACACTTCOGAGTACGGTTCCTTTACGGACCCACGGAA
 Bi++
 TAGTGATGGCCTGGCTCACCTGGACAACTCAAGGGCACTTTGCCACACTGAGTGAGCTGCCACTGTGACAAAGCTGCACGTGGATCCTGAGAACTTCAGGCTCCTGGGCAACGTGTCTGTCTGTCTGCC 399
 ATCACTACCCGACCGAGTGGAOCTGTTGGAGTCCCGTGGAAACGGTGTGACTCACTGACAGGTGACACTGTTTCAGCAGTGCACCTAGGACTCTTGAAGTCCGAGGACCCGTTTCAGCAGCAGACACACGACCGG

 CATCACTTTGGCAAAGATTCACCCCAACGACTGACGGTGCCTATCAGAAAGTGTGGCTGTGGTGTGGTAAATGCCCTGGCCCAAGATATCACTAAAGTGCCTTTCTTCTCTCCAACTTCTATTAAGGCTTC 532
 CTATGTCAGCCCTTCTTAACTGCGGTGTCTCAGCTCCGACGGATAGTCTTTCAACCACCGACCCACACCGGATTACGGGACCGGGTGTTCATAGTGAATTGGAGCGAAAGACGACAGGTAAAGAT&ATTTCC&AG

Εικόνα 2.2: Αλληλουχία στόχος του β- γονιδίου σφαιρίνης.



Εικόνα 2.3: Αλληλουχία στόχος του γ γονιδίου σφαιρίνης.

α- και β- γονίδια σφαιρίνης

	α και β σφαιρίνη
Υπόστρωμα	cDNA: 500 ng
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x *	10 μl
dNTPs (40 mM)	2 μl
Εκκινητές** (10 pm/μl)	(Ai+, All++),(Bi+, Bi++)
Ένζυμο	Taq Πολυμεράση: 2.5 U
ddH ₂ O	μέχρι τελ. όγκου 100 μl

Πίνακας 2.3: Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις για την αντίδραση ενίσχυσης του β γονιδίου σφαιρίνης.

* Σύνθεση διαλύματος 10x: 10 mM Tris-HCL pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂

** Αλληλουχίες εκκινητών: βλ. Πίνακα 2.7.

Συνθήκες αντίδρασης:

-αρχική αποδιάταξη: 94⁰ C, 5 λεπτά

-κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 35 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:

φάση αποδιάταξης: 94⁰ C, 1 λεπτό

φάση σύνδεσης εκκινητών: 55⁰ C, 1 λεπτό

φάση επέκτασης μορίων DNA: 72⁰ C, 1 λεπτό

-τελική επέκταση συντεθειμένων μορίων DNA: 72⁰ C, 10 λεπτά

γ- γονίδιο σφαιρίνης

	γ σφαιρίνη
Υπόστρωμα	cDNA: 500 ng
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x *	10 μl
dNTPs (40 mM)	2 μl
Εκκινητές** (10 pm/μl)	G1 , GR
Ενζυμο	Taq DNA Πολυμεράση: 2.5 U
ddH ₂ O	μέχρι τελ. όγκου 100 μl

Πίνακας 2.4: Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις για την αντίδραση ενίσχυσης του γ γονιδίου.

* Σύνθεση διαλύματος 10x: 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂

** Αλληλουχίες εκκινητών: βλ. Πίνακα 2.7.

Συνθήκες αντίδρασης:

-αρχική αποδιάταξη: 94⁰ C, 5 λεπτά

-κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 30 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:

φάση αποδιάταξης: 94⁰ C, 1 λεπτό

φάση σύνδεσης εκκινητών: 58⁰ C, 1 λεπτό

φάση επέκτασης μορίων DNA: 72⁰ C, 1 λεπτό

-τελική επέκταση συντεθειμένων μορίων DNA: 72⁰ C, 10 λεπτά

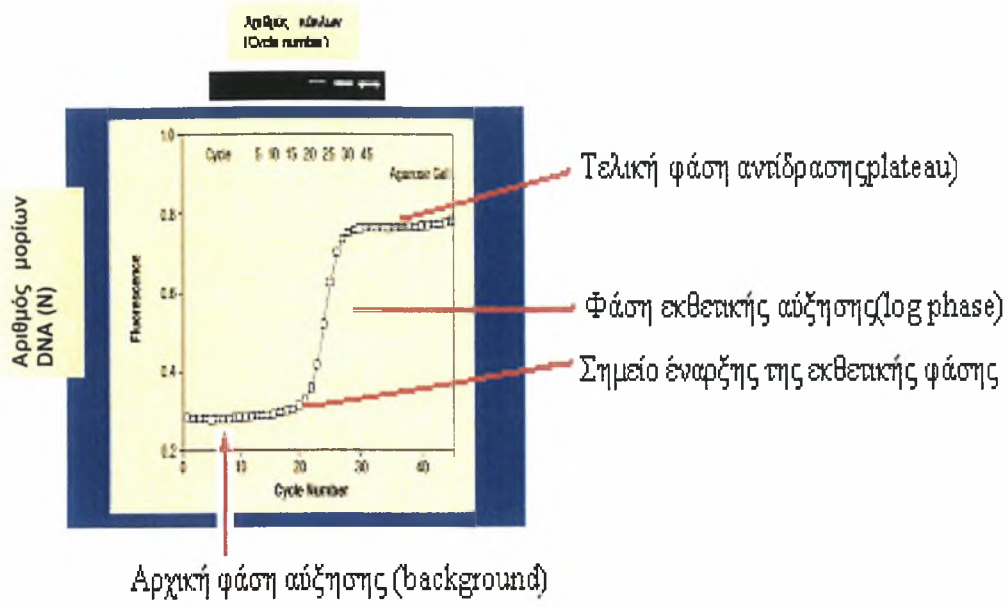
Για τον έλεγχο της ακρίβειας της αντίδρασης και τον έλεγχο τυχόν επιμόλυνσης των αντιδραστηρίων, σε κάθε πείραμα περιλαμβανόταν ένα σωληνάριο που περιείχε όλα τα αντιδραστήρια εκτός από υπόστρωμα (PCR control). Η επιτυχής ενίσχυση του επιθυμητού γονιδίου, ελέγχεται με τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR σε πηκτική αгарόζης 3%, και τα τμήματα του γονιδίου που ενισχύθηκαν ανιχνεύονται σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) αφού προηγουμένως είχαν υποβληθεί σε χρώση βρωμιούχου αιθιδίου. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο φάγος φΧ174 DNA-Hae III Digest (Biolabs). Τα παραγόμενα από την αντίδραση PCR τμήματα έχουν μέγεθος:

- γ γονίδιο -> 320bp
- α γονίδιο -> 298bp
- β γονίδιο -> 168 bp

2.6. Ανάλυση της έκφρασης των mRNA μεταγράφων με την τεχνική της PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR).

2.6.1. Γενικές αρχές PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR).

Η ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης των γονιδίων συμβάλλει ουσιαστικά στη μελέτη των βιολογικών διεργασιών και στην κατανόηση της παθογένειας των ασθενειών. Για το σκοπό αυτό, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR, RQ-PCR) που αντικατέστησαν την πολύπλοκη και χρονοβόρα ημιποσοτική, συναγωνιστική ανάλυση PCR (competitive PCR). Πρόκειται για τη διαδικασία ενίσχυσης μιας DNA αλληλουχίας με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR) και ταυτόχρονα της ανίχνευσης του παραγόμενου προϊόντος σε πραγματικό χρόνο σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης (Real-time PCR). Η ποσοτική αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου συνίσταται σε αξιόπιστη ανίχνευση και μέτρηση των προϊόντων που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια κάθε κυτταρικού κύκλου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, τα οποία αντιστοιχούν άμεσα στο ποσό του αρχικού μητρικού μορίου κατά την έναρξη της PCR. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να μετρηθεί η ποσότητα του προϊόντος PCR ενώ η αντίδραση βρίσκεται ακόμη στην εκθετική φάση (Εικόνα 2.4). Για να επιτευχθεί αυτό, χρειάζεται να έχουμε μια μέθοδο για την ανίχνευση της ποσότητας του προϊόντος PCR και ένα μηχάνημα στο οποίο να καταγράφονται τα αποτελέσματα κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου PCR. Οι εφαρμογές της RQ-PCR πραγματικού χρόνου είναι πολυάριθμες. Περιλαμβάνουν μελέτες για την έκφραση του mRNA, μετρήσεις αριθμού αντιγράφων σε γενωμικό ή ιικό DNA, μετρήσεις αριθμού διαγονιδιακών αντιγράφων, αναφορές για διάκριση αλληλομόρφων και επιβεβαίωση δεδομένων από μικροσυστοιχίες, ποσοτικοποίηση χιμαιρικών μεταγράφων για την ανίχνευση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες και ανάλυση της έκφρασης των κυτταροκινών και πολλών άλλων παραγόντων. Απαραίτητη προϋπόθεση για την ποσοτικοποίηση είναι η ανάλυση γονιδίων αναφοράς. Ως γονίδια αναφοράς έχουμε χρησιμοποιήσει το hHPRT και το G6PDH. Το γονίδιο αναφοράς δεν πρέπει να διαφέρει ως προς τον αριθμό των αντιγράφων ή το επίπεδο έκφρασης σε σχέση με τα δείγματα υπό μελέτη. ⁽¹³⁴⁾

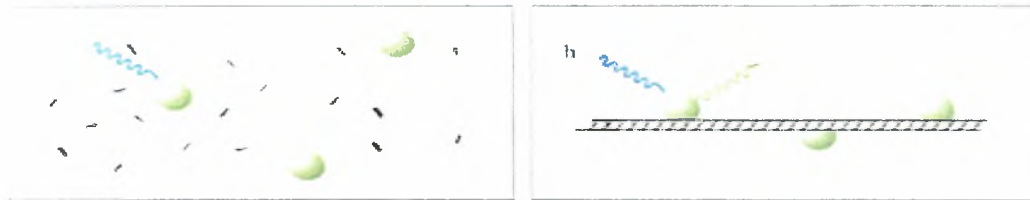


Εικόνα 2.4: Κινητική της αντίδρασης της PCR.

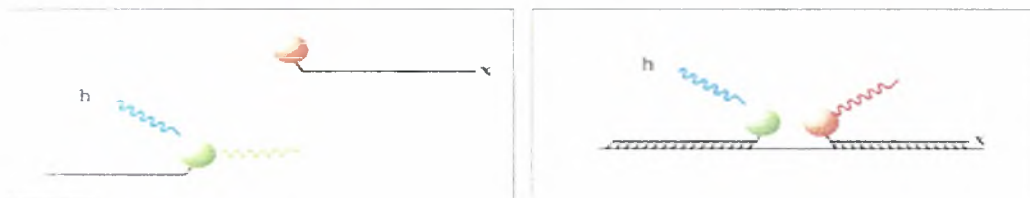
Σήμερα, είναι διαθέσιμες τρεις κύριες παραλλαγές τεχνικών PCR πραγματικού χρόνου (RQ-PCR) (Εικόνα 2.5):

- Ανάλυση με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I
- Ανάλυση με ανιχνευτές υδρόλυσης
- Ανάλυση με ανιχνευτές υβριδισμού (Hybprobes)

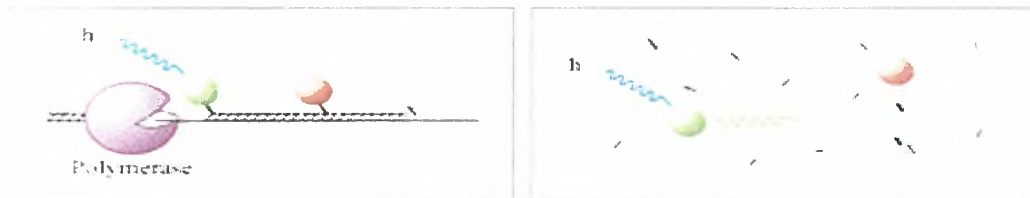
I. SYBR Green



II. Hybridization Probes



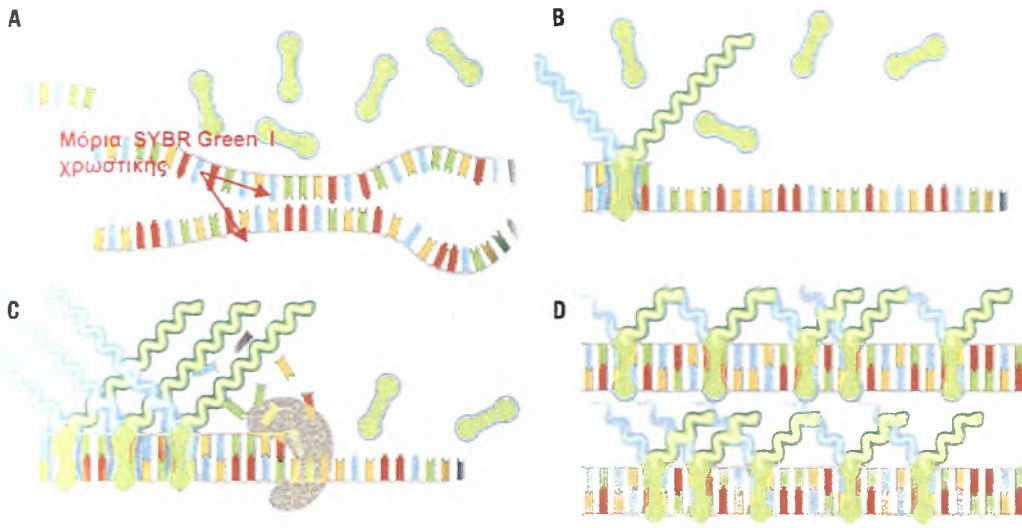
III. TaqMan Probes



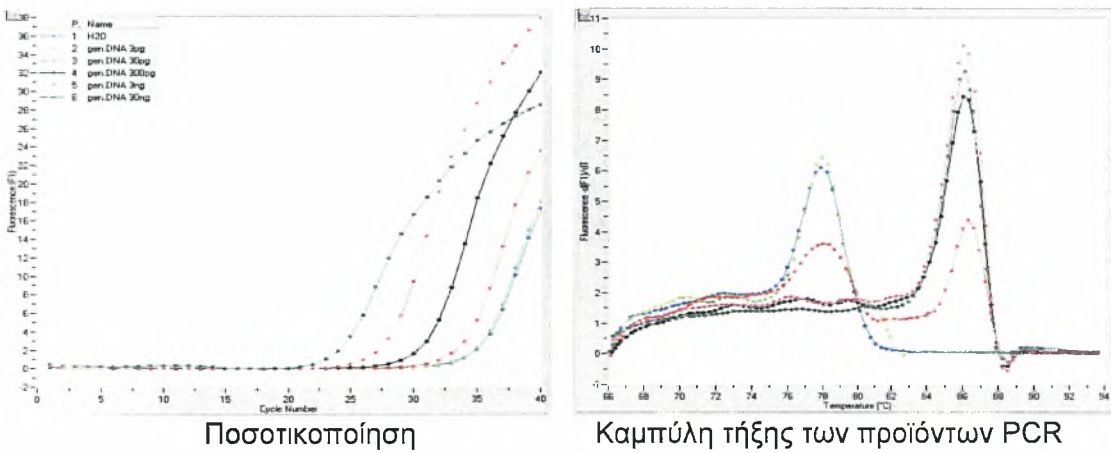
Εικόνα 2.5: Παραλλαγές PCR πραγματικού χρόνου. I. Χρωστική SYBR Green. II. Ανιχνευτές υβριδισμού. III. Ανιχνευτές υδρόλυσης.

2.6.2. Ανάλυση RQ-PCR με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I.

Η απλούστερη τεχνική RQ-PCR βασίζεται στην ανίχνευση των προϊόντων της PCR μετά την ενσωμάτωση της χρωστικής SYBR Green I στο DNA. Η χρωστική αυτή μπορεί να προσδένεται στη μικρή αύλακα του δίκλωνου DNA, όπου ενισχύει σημαντικά τον φθορισμό του (Εικόνα 2.6). Το σήμα φθορισμού αυξάνει σταδιακά κατά τη διάρκεια της φάσης επιμήκυνσης, γίνεται μέγιστο στο τέλος κάθε αντίστοιχης φάσης και μειώνεται ή εκλείπει κατά τη φάση αποδιάταξης. Πρέπει να σημειωθεί ότι αυτή η τεχνική δεν παρουσιάζει απόλυτη εξειδίκευση και ότι ταυτόχρονα μπορεί ν' ανιχνευθούν διμερή των εκκινητών και μη ειδικά προϊόντα PCR. Προκειμένου να εκτιμηθεί αν έχουν σχηματιστεί ειδικά προϊόντα PCR, πραγματοποιείται ανάλυση της καμπύλης τήξης (melting curve). Αν έχει σχηματιστεί μόνο το ειδικό προϊόν PCR, θα είναι ορατή μόνο μια κορυφή στην εικόνα ενδείξεων των σημείων τήξης (Εικόνα 2.7).⁽¹³⁵⁻¹³⁷⁾



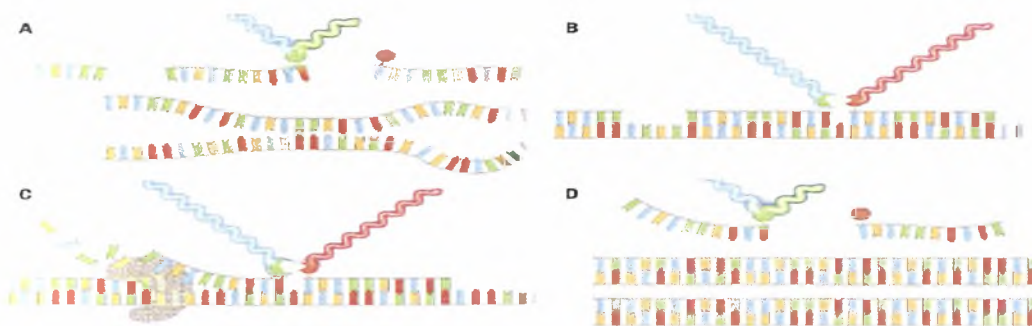
Εικόνα 2.6: Η χρωστική SYBR Green I παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και εκπέμπει φθορισμό που ανιχνεύεται από το μηχάνημα.



Εικόνα 2.7: Παρακολούθηση της PCR με τη χρήση της SYBR Green I χρωστικής.

2.6.3. Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υδρόλυσης.

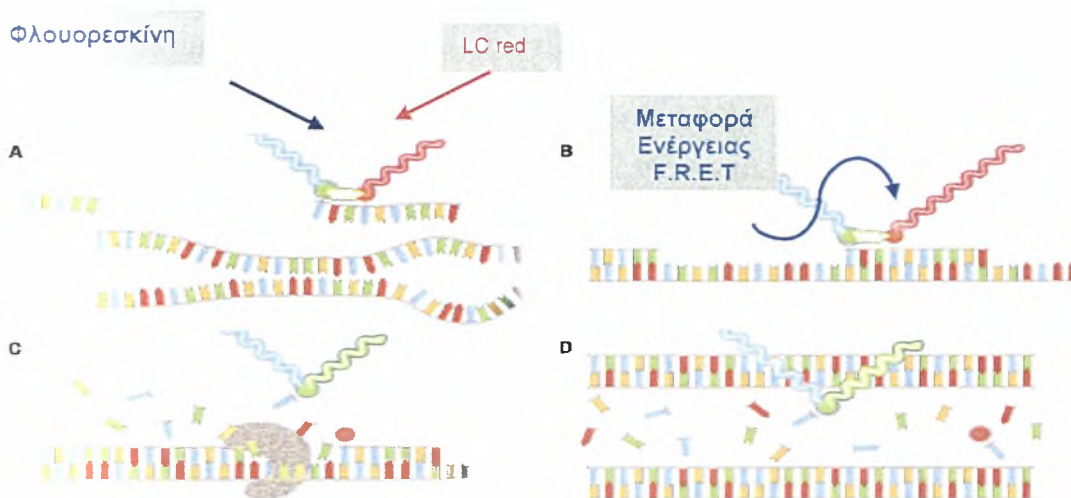
Η ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υδρόλυσης (hydrolysis probes) εκμεταλλεύεται την 5'-3' ενεργότητα εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης για να ανιχνεύσει και να ποσοτικοποιήσει τα ειδικά προϊόντα PCR που παράγονται καθώς εξελίσσεται η αντίδραση. Ο ανιχνευτής υδρόλυσης είναι συζευγμένος με ένα φθορισμόχρωμα αναφοράς (π.χ. FAM, VIC ή JOE) και μ' έναν καταστολέα φθορισμοχρώματος (π.χ. TAMRA), ο οποίος θα βρίσκεται μέσα στην αλληλουχία-στόχο. Καθώς τα δύο φθορισμοχρώματα βρίσκονται σε μικρή απόσταση, όσο ο ανιχνευτής είναι άθικτος, ο φθορισμός που εκπέμπεται από το φθορισμόχρωμα αναφοράς απορροφάται από τον καταστολέα φθορισμού. Για το λόγο αυτό, κατά την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου, ο ανιχνευτής υδρόλυσης αντικαθίσταται αρχικά από την αλυσίδα DNA μέσω της Taq πολυμεράσης και σταδιακά υδρολύεται από αυτή λόγω της ενεργότητας εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό του φθορισμοχρώματος αναφοράς και του καταστολέα του και επιτρέπει τη σταδιακή ανίχνευση του φθορισμού που εκπέμπει το φθορισμόχρωμα αναφοράς (Εικόνα 2.8).
(137)



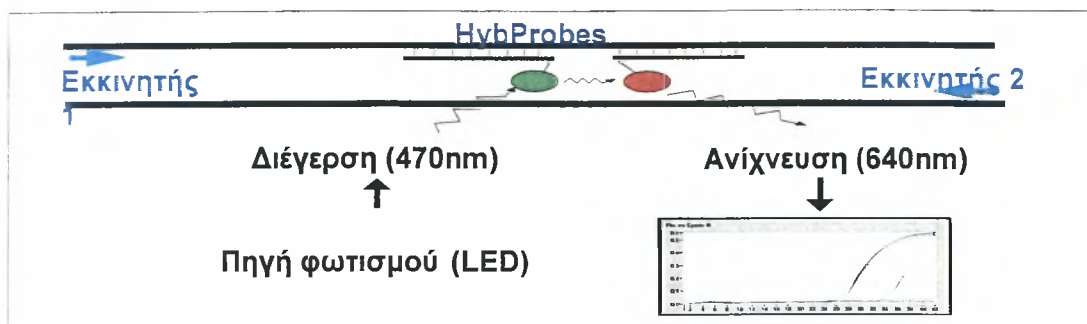
Εικόνα 2.8: Ανάλυση RQ-PCR με το πρωτόκολλο των ανιχνευτών υδρόλυσης.

2.6.4. Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υβριδισμού.

Η ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτή υβριδισμού χρησιμοποιεί δύο αλληλοεπικαλυπτόμενους ανιχνευτές συγκεκριμένης αλληλουχίας, ο ένας σημασμένος στο 3' άκρο μ' ένα φθορισμόχρωμα-δότη (π.χ. FAM) και ο άλλος σημασμένος στο 5' άκρο μ' ένα φθορισμόχρωμα-δέκτη (π.χ. LC Red 640, LC Red 705). Οι δύο ανιχνευτές υβριδίζονται σε γειτονικές αλληλουχίες-στόχους στο πολυμερισμένο τμήμα DNA: έτσι τα δύο φθορισμοχρώματα συμπλησιάζουν (η απόσταση μεταξύ τους κυμαίνεται από 1-5 νουκλεοτίδια). Κατά τη διέγερση του φθορισμοχρώματος-δότη, εκπέμπεται ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος. Όταν τα δύο φθορισμοχρώματα βρίσκονται κοντά, το φως που εκπέμπεται από τον δότη θα διεγείρει το φθορισμόχρωμα-δέκτη, διαδικασία που αναφέρεται και ως μεταφορά συντονισμένης ενέργειας φθορισμού (fluorescence resonance energy transfer, FRET). Αυτό οδηγεί σε εκπομπή του φθορισμού, ο οποίος ανιχνεύεται κατά το στάδιο υβριδοποίησης και στο πρώτο μέρος του σταδίου επιμήκυνσης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) (Εικόνα 2.9-2.10).⁽¹³⁵⁻¹³⁷⁾

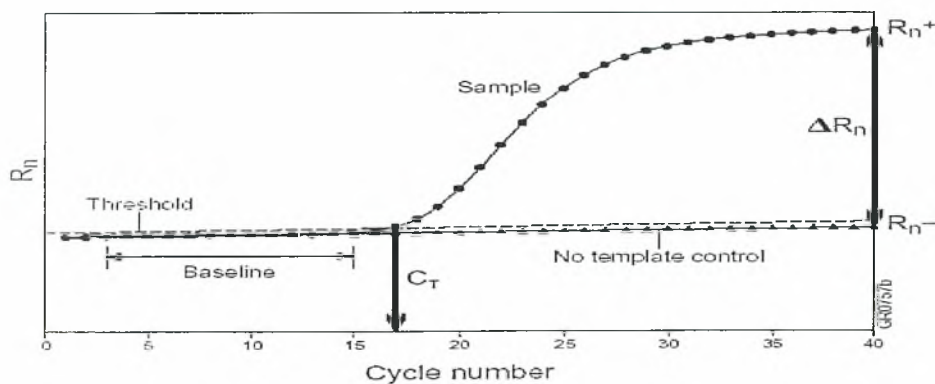


Εικόνα 2.9: Ανάλυση RQ-PCR με το πρωτόκολλο των ανιχνευτών υβριδισμού.



Εικόνα 2.10: Ένταση σήματος φθορισμού με βάση τη φάση της αντίδρασης.

Σε όλους τους προαναφερόμενους τύπους RQ-PCR ανάλυσης η ένταση του σήματος φθορισμού αυξάνει εκθετικά κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης. Με βάση την ένταση του φθορισμού χωρίς ειδικότητα (background), καθορίστηκε το διαχωριστικό σημείο ή ουδός (cut-off level) για τον ειδικό φθορισμό. Αυτό το όριο (ή γραμμή μετάπτωσης) χρησιμοποιείται για να υπολογιστεί ο κύκλος μετάπτωσης (C_t) κάθε δείγματος, που είναι ο κύκλος της αντίδρασης PCR στον οποίο ο φθορισμός υπερβαίνει για πρώτη φορά τον ουδό μετάβασης. Η τιμή μετάπτωσης είναι ευθέως ανάλογη προς το ποσό της αλληλουχίας-στόχου που περιέχεται στο δείγμα (Εικόνα 2. 11).⁽¹³⁸⁻¹³⁹⁾

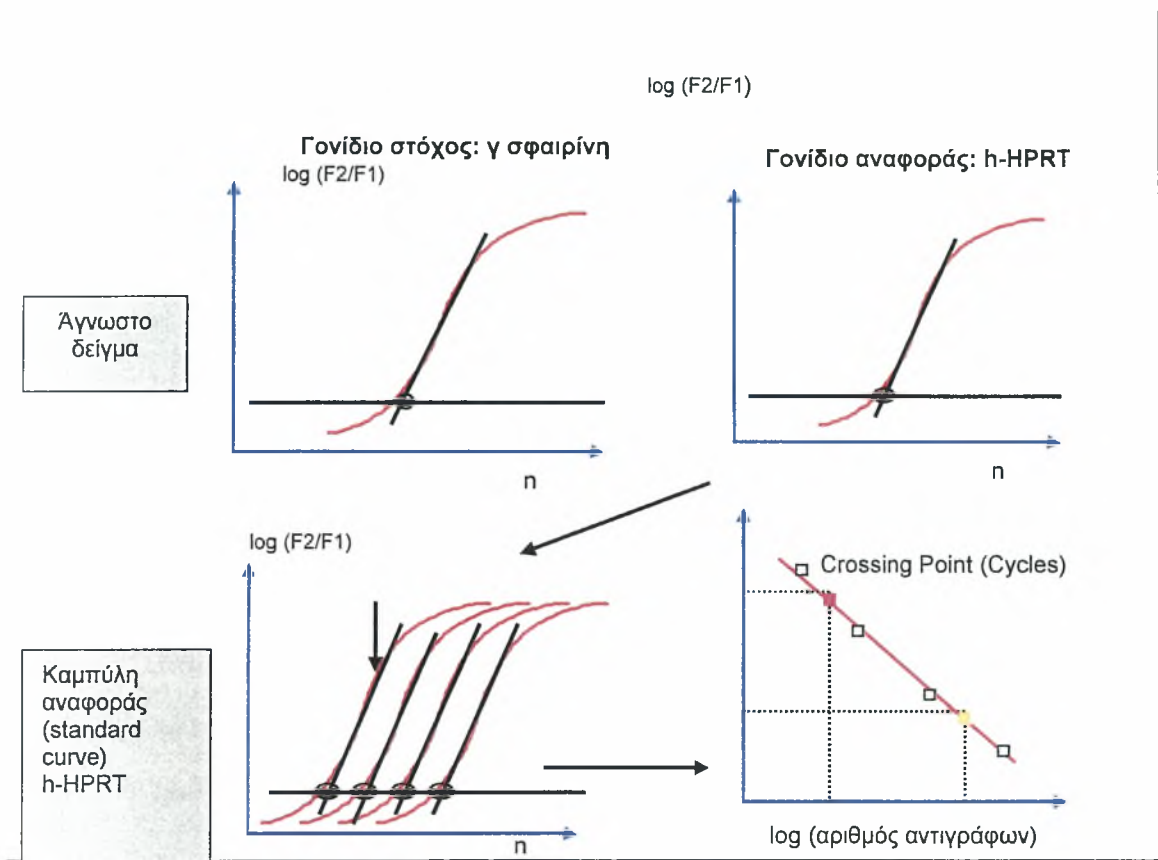


Εικόνα 2.11: Ανίχνευση του σήματος φθορισμού. Το σημείο κατά το οποίο το κάθε δείγμα εισέρχεται στην εκθετική φάση της αντίδρασης ορίζεται ως το “κατώφλι” μεταβολής του ρυθμού αύξησης της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος (Threshold Cycle ή C_t), είναι στατιστικά σημαντικό και αποτυπώνεται (μετράται) ως σήμα φθορισμού. Η μεταβολή αυτή της συγκέντρωσης γίνεται σε συγκεκριμένο κύκλο και εξαρτάται απόλυτα από την αρχική συγκέντρωση του κάθε δείγματος.

Ένα δείγμα μπορεί να θεωρηθεί θετικό, εάν η ελάχιστη τιμή μετάπτωσης ενός ή περισσότερων αντιγράφων του δείγματος αυτού είναι καθαρά εκτός κλίμακας των τιμών μετάπτωσης των αρνητικών δειγμάτων (π.χ. τουλάχιστον κατά έναν κύκλο χαμηλότερα από την κατώτερη ένδειξη που παρουσιάζει ένα μη ειδικά πολυμερισμένο δείγμα) και σε ορισμένη απόσταση (π.χ. τέσσερις κύκλοι) από το τελικό στάδιο διάλυσης που χρησιμοποιείται για να εξασφαλίσει μέγιστη ευαισθησία.

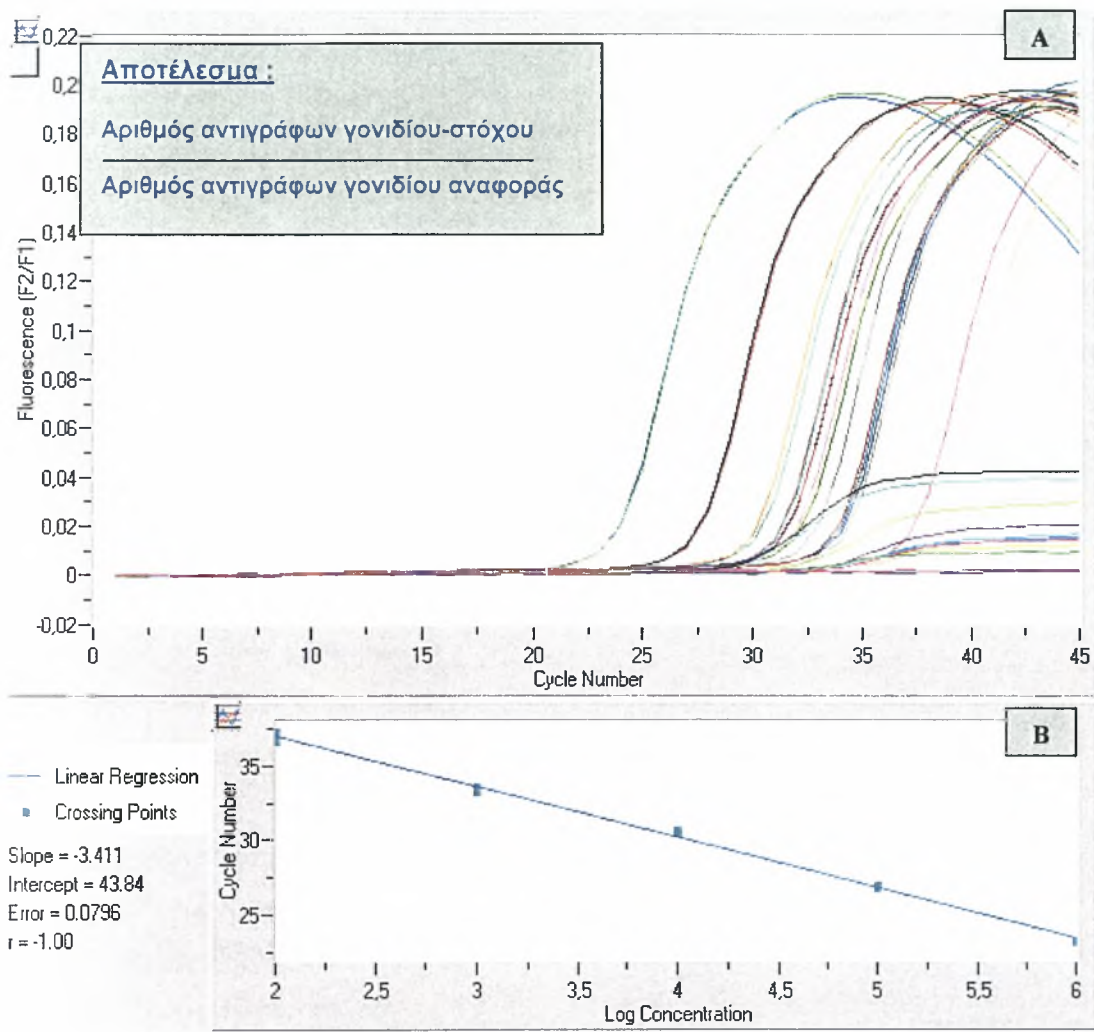
Ένα δείγμα μπορεί να θεωρηθεί αρνητικό, εφόσον δεν παρατηρείται καθόλου ενίσχυση και όταν η κατώτερη τιμή μετάπτωσης του συγκεκριμένου δείγματος βρίσκεται εντός ή κοντά στην κλίμακα τιμών μετάπτωσης των αρνητικών δειγμάτων. Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι ανάλυσης με την RQ-PCR: η «σχετική» ποσοτικοποίηση και η ποσοτικοποίηση μέσω «πρότυπης καμπύλης» που καλείται επίσης και «απόλυτη» ποσοτικοποίηση.⁽¹⁴⁰⁾

Στη σχετική ποσοτικοποίηση γίνεται σύγκριση ανάμεσα στο δείγμα (DNA ή cDNA) που αφορά το γονίδιο που μας ενδιαφέρει και στο αντίστοιχο δείγμα που χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς. Για να ληφθεί μια στρογγυλοποιημένη τιμή για κάθε δείγμα, διαιρείται η συγκέντρωση των μεταγράφων του γονιδίου που μας ενδιαφέρει προς τη συγκέντρωση των μεταγράφων του γονιδίου αναφοράς. Ο λόγος που προκύπτει είναι ο αριθμός των μεταγράφων του γονιδίου προς μελέτη ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς.⁽¹⁴¹⁾



Εικόνα 2.12: Σχετική ποσοτικοποίηση αριθμού αντιγράφων με τη χρήση πρότυπης καμπύλης.

Η μέθοδος ποσοτικοποίησης με χρήση πρότυπης καμπύλης εφαρμόζεται επιτυχώς για να μετρηθεί μικρός αριθμός γονιδίων σε λίγα ή πολλά δείγματα καθώς και για να μετρηθεί ο αριθμός των ιικών αντιγράφων σ' ένα δεδομένο δείγμα. Για να ποσοτικοποιηθούν οι στόχοι στα δείγματα υπό μελέτη, κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη (standard curve) με αραιώσεις (πενταπλάσια ή δεκαπλάσια διαδοχική αραιώση) γνωστών δειγμάτων, συνήθως πλασμιδιακού DNA που φέρει το γονίδιο που μας ενδιαφέρει (Εικόνα 2.12 - 2.13).⁽¹⁴²⁾



Εικόνα 2.13: Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υβριδισμού στο μηχάνημα LightCycler (Roche).

A. Κάθε καμπύλη αντιστοιχεί σε διαφορετικό δείγμα και αντικατοπτρίζει τη συγκέντρωση των mRNA μεταγράφων στο συγκεκριμένο δείγμα. Η σχετική ποσοτικοποίηση επιτυγχάνεται με το λόγο του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου στόχου που μελετάται προς τον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου αναφοράς. **B.** Η πρότυπη καμπύλη (standard curve) του γονιδίου αναφοράς που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση.

2.7. Ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων σφαιρίνης με την τεχνική RQ-PCR και ανιχνευτές υβριδοποίησης.

2.7.1. Απομόνωση RNA και προετοιμασία cDNA.

Κυτταροπλασματικό RNA απομονώνεται από δείγματα κυττάρων από καλλιέργειες (η μέθοδος περιγράφηκε παραπάνω) και μεταγράφεται *in vitro* σε cDNA με τη βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού AMV (AMV kit) τηρώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο τελικός όγκος του cDNA (20 μl) αραιώνεται σε αναλογία 1:10 σε τελικό όγκο 200 μl όπως συνιστάται.

Πρωτόκολλο σύνθεσης cDNA με την AMV αντίστροφη μεταγραφάση

- Ανάμειξη του RNA με το ddH₂O
- Επώαση στους 65 °C για 10 min
- Τα δείγματα παραμένουν για 5 λεπτά στον πάγο
- Προσθήκη των υπολοίπων αντιδραστηρίων (παρατίθενται στον Πίνακα 2.6). Οι ποσότητες του υποστρώματος RNA και του νερού υπολογίζονται κατάλληλα ώστε να εξασφαλίζεται 1 μg RNA σε τελικό όγκο cDNA 20 μl.

Συνθήκες της αντίδρασης:

1. 25 °C για 10 λεπτά
2. 42 °C για 60 λεπτά
3. 99°C για 5 λεπτά
4. 4°C

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΣ / ΔΕΙΓΜΑ
cDNA	3.0 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	4.0 μ l
ddH ₂ O	9,2 μ l
Random Primers	2.0 μ l
RNAase inhibitor (50 μ /μl)	1.0 μ l
AMV (50 μ /μl)	0.8 μ l
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	20 μl

Πίνακας 2.6: Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις για τη σύνθεση cDNA με AMV KIT.

2.7.2. Πρωτόκολλο αντίδρασης RQ-PCR

Για την εκτίμηση της έκφρασης των mRNA μεταγράφων των γονιδίων σφαιρίνης χρησιμοποιήθηκε το kit "Light Cycler FastStart DNA Master Hybridization Probes" ενώ όλα τα πειράματα επιτεύχθηκαν στο μηχάνημα Light Cycler (Roche) (Εικόνα 2.14).



Εικόνα 2.14: Α. Μηχάνημα Light Cycler ((Roche). Β. Δίσκος τοποθέτησης τριχοειδών (carousel) Γ. Υάλινα τριχοειδή (Glass capillaries)

Η έναρξη της PCR σε υψηλές θερμοκρασίες συμβάλλει στην εξειδίκευση και ευαισθησία της μεθόδου και το συγκεκριμένο kit προσφέρεται ιδιαίτερα για τέτοιες εφαρμογές. Κάθε δείγμα αναλύεται τόσο ως προς το γονίδιο που μας ενδιαφέρει όσο και ως προς το γονίδιο αναφοράς (στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο HPRT, ως γονίδιο αναφοράς στη μέτρηση των γ - μεταγράφων και το ένζυμο G6PDH, ως γονίδιο αναφοράς στη μέτρηση των β - και α - μεταγράφων). Στο πρωτόκολλο περιλαμβάνεται και η ενίσχυση προτύπων δειγμάτων RNA των γονιδίων h-HPRT και G6PDH, που περιέχουν καθορισμένο αριθμό αντιγράφων (5×10^6 – 5×10^2 ανά 5 μ l δείγματος).

□ Διάλυμα αντίδρασης (mix) για το γονίδιο αναφοράς (h-HPRT ή G6PDH):

- Δις απεσταγμένο νερό : 7.6 μ l
- $MgCl_2$ 25 mM : 2.4 μ l
- Διάλυμα ανίχνευσης h-HPRT ή G6PDH (10X) : 2.0 μ l
- Διάλυμα FastStart DNA Master ανιχνευτών υβριδισμού (10X) : 2.0 μ l
- Ουρακίλη-DNA γλυκοζυλάση (UNG) : 1.0 μ l

Στον τελικό όγκο του κυρίου διαλύματος της αντίδρασης που είναι 15 μ l προστίθενται 5 μ l cDNA του δείγματος (αραίωση 1:10).

□ Διάλυμα αντίδρασης για το γονίδιο-στόχο (γ , β και α γονίδιο):

- Δις απεσταγμένο νερό : 9.4 μ l
- Διάλυμα FastStart DNA Master ανιχνευτών υβριδισμού (10X) : 2.0 μ l
- Εκκινήτης gamma 1 ή Bi+ή Ai (Πίνακας 2.7) : 1.0 μ l
- Εκκινήτης gamma R ή Bii++ ή Aii (Πίνακας 2.7) : 1.0 μ l
- $MgCl_2$ 25 mM : 1.6 μ l
- Ανιχνευτής Globin FL ή B-FL (Πίνακας 2.7) : 1.0 μ l
- Ανιχνευτής Globin LC ή B-LC (Πίνακας 2.7) : 1.0 μ l
- Ουρακίλη-DNA γλυκοζυλάση (UNG) : 1.0 μ l

Στον τελικό όγκο του κυρίου διαλύματος της αντίδρασης που είναι 18 μ l προστίθενται 2 μ l cDNA του δείγματος (αραίωση 1:10).

Το παραπάνω πρωτόκολλο, αναφέρεται στην προετοιμασία του κυρίου διαλύματος των δύο γονιδίων (γονίδιο στόχος και γονίδιο αναφοράς).

Το πρωτόκολλο αποτελείται από τρία προγράμματα :

- Πρόγραμμα 1: Προ-επώαση (ενεργοποίηση του ενζύμου) επί 10 λεπτά και αποδιάταξη του cDNA στους 95°C επί 10 λεπτά, για έναν κύκλο.
- Πρόγραμμα 2: Η ενίσχυση της cDNA αλληλουχίας-στόχου πραγματοποιείται σε τρία στάδια επί 45 κύκλους :
 - Αποδιάταξη στους 95°C επί 5 δευτερόλεπτα ανά κύκλο
 - Σύνδεση με τον εκκινητή σε διαφορετική θερμοκρασία ανάλογα με το είδος του εκκινητή και του ανιχνευτή που χρησιμοποιούνται.
Gamma 1/ Gamma R : 55°C επί 15 δευτερόλεπτα
Ai /Aii και Bi/ Bii : 57°C επί 15 δευτερόλεπτα
 - Επιμήκυνση στους 72°C επί 20 δευτερόλεπτα
- Πρόγραμμα 3: Ψύξη στους 40°C επί 30 δευτερόλεπτα για ένα κύκλο.

G1	gggTCATTTCACAgAgg
gamma R	CCCAGgAgCTTgAAgTT
Globing FL	CATggCAAgAAggTgCTgAC-FL
Globing LC	640-TCCTTgggAgATgCCATAAAgC p
Ai+	gCCgACAAgACCAACgTCA
Aii++	CAGTggCTTAggAgCTTgAAgTT
A-FL	gAgCCgTggCTCAggTCgAAg X
A-LC	gCgggAAgTAggTCTTggTggTg p
Bi+	TTCTgACACAActgTgTTCActAgC
Bii++	AgAACCTCTgggTCCAAgg
B-FL	CAGTAACggCAgACTTCTCCTCAggAgTC X
B-LC	ggTgCACCATggTgTCTgTTTgAgg p A
RAR6	5'-GGTGCCTCCCTACGCCTTCT-3'
RAR8	5'-GGCGCTGACCCCATAGTGGT-3'

Πίνακας 2.7 : Αλληλουχίες εκκινητών και ανιχνευτών υβριδισμού.

Τα αποτελέσματα περιγράφονται ως στρογγυλοποιημένες τιμές σε σχέση με το ενδογενώς εκφραζόμενο γονίδιο αναφοράς h-HPRT ή G6PDH. Τα ποσά των μεταγράφων του γονιδίου-στόχου και των αντίστοιχων του γονιδίου-αναφοράς καθορίζονται για κάθε δείγμα με εκτίμηση του μέσου όρου των τιμών των δύο αντιγράφων του κάθε δείγματος. Στη συνέχεια, το ποσό των μεταγράφων που μας ενδιαφέρουν (γονίδιο-στόχος) διαιρείται με το ποσό των μεταγράφων του γονιδίου αναφοράς και ο λόγος που προκύπτει είναι μια στρογγυλοποιημένη τιμή μεταγράφων του γονιδίου-στόχου ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς.

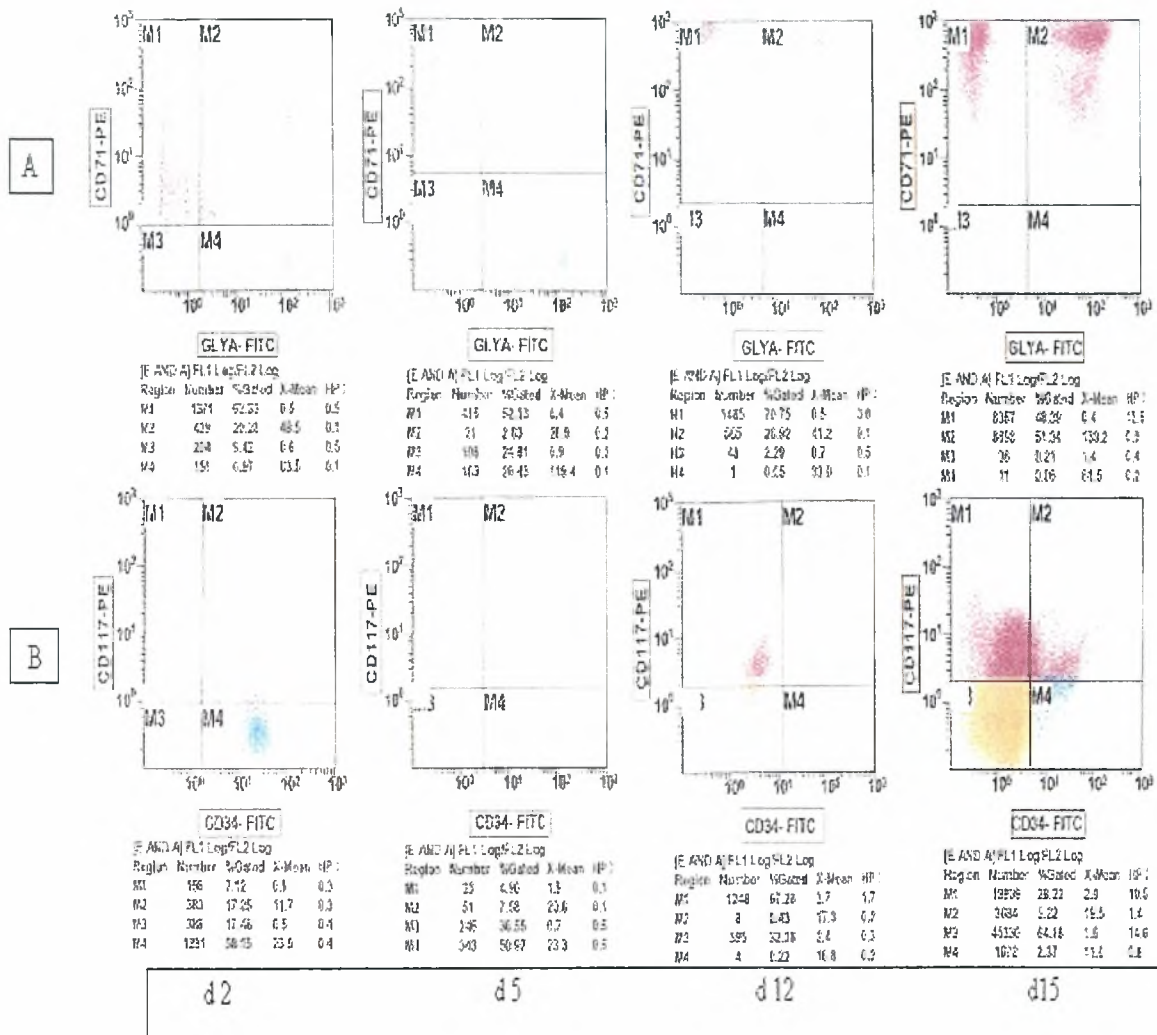
Η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων σφαιρίνης κατά την οντογένεση των αιμοσφαιρινών στον άνθρωπο πραγματοποιείται με ένα πολύπλοκο πρόγραμμα το οποίο αποτέλεσε στόχο των ερευνητών για αρκετές δεκαετίες. Η μελέτη της ρύθμισης της έκφρασης του γ γονιδίου αποτέλεσε ένα σημαντικό ερευνητικό αντικείμενο καθώς δύναται να αξιοποιηθεί θεραπευτικά σε ασθενείς με θαλασσαιμικά σύνδρομα, όπου η αύξηση της παραγωγής της HbF βελτιώνει αφενός την κλινική εικόνα τους, αφετέρου την ποιότητα της ζωής τους.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Μελέτη της διαδικασίας ωρίμανσης των CD34⁺ κυττάρων σε πρωτογενείς καλλιέργειες ερυθροκυττάρων ενηλίκου.

Ο πληθυσμός των CD34⁺ κυττάρων απομονώνεται από το περιφερικό αίμα υγιών αιμοδοτών και ελέγχεται για την ομοιογένειά του με κυτταρομετρία ροής. Η ομοιογένεια του πληθυσμού σε κύτταρα θετικά για το CD34 αντιγόνο πλησιάζει το 75%. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε STEM-SPAN καλλιεργητικό υλικό παρουσία SCF (100ng/μl) και EPO (4u, 10u/ml). Μετά την 7^η ημέρα της καλλιέργειας διαχωρίζουμε τους κυτταρικούς πληθυσμούς σε αυτούς που παραμένει η δράση του SCF και σε αυτούς που διακόπτεται η χορήγησή του.

Η διαφοροποίηση των κυττάρων μελετάται με ανάλυση των αντιγόνων επιφανείας CD34, CD71, CD117 και Γλυκοφορίνη Α (GPA) σε κύτταρα που λαμβάνονται διαφορετικές ημέρες της καλλιέργειας (d2, d5, d12, d15) (Εικόνα 3.1). Στην αρχή της καλλιέργειας ο πληθυσμός των κυττάρων χαρακτηρίζεται ομοιογενής (71% CD34⁺, 83% CD71⁺, 29% CD117 και 17% GPA), αν και παρατηρείται ένας πολύ μικρός αριθμός ερυθροκυττάρων να παραμένει από το περιφερικό αίμα, τα οποία χάνονται μετά την πέμπτη ημέρα καλλιέργειας (Εικόνα 3.1/A).



Εικόνα 3.1: Μελέτη της διαφοροποίησης των CD34⁺ κυττάρων περιφερικού αίματος φυσιολογικών δοτών προς την ερυθρά σειρά σε υγρή καλλιέργεια. Παρουσίαση της μεταβολής στη συνέκφραση των CD71⁺ /GPA⁺ (A) και των CD117⁺ /CD34⁺ (B) καθώς η καλλιέργεια ωριμάζει (d2-d5-d12-d15).

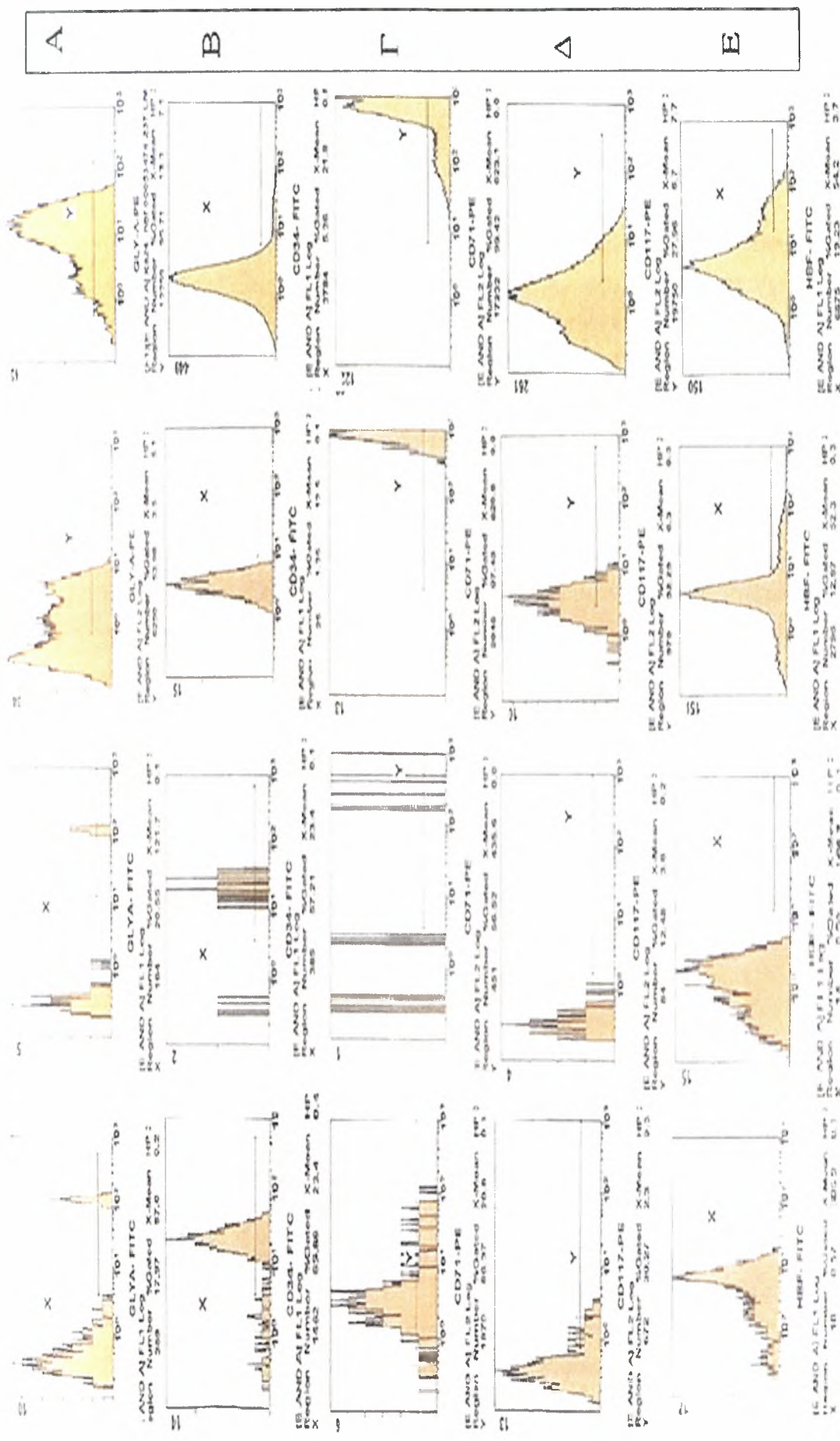
Κατά τη διαφοροποίηση των κυττάρων, το ποσοστό των CD34⁺ κυττάρων μειώνεται σταδιακά από 71% που είναι στην αρχή της καλλιέργειας σε 5% τη 15^η ημέρα.

Το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν το αντιγόνο CD71 είναι υψηλό από τα αρχικά στάδια της καλλιέργειας και μεταβολή σημειώνεται κυρίως στην κυτταρική του κατανομή. Τη δεύτερη ημέρα της καλλιέργειας ανιχνεύεται σε ποσοστό 86% των κυττάρων με μικρή περιεκτικότητα ανά κύτταρο, όπως αυτό εκφράζεται από τον δείκτη X-mean (X-mean: 20,8) (Εικόνα 3.2/Γ). Την πέμπτη ημέρα η κυτταρική κατανομή αλλάζει και γίνεται σαφώς πολλή υψηλότερη (X-mean: 435,6) (Εικόνα 3.2/Γ). Μετά την πρώτη εβδομάδα της καλλιέργειας (στάδιο μετά την προερυθροβλάστη), τα κύτταρα εκφράζουν σε ποσοστό 97% CD71 αντιγόνο με πανκυτταρική κατανομή, όπως δείχνει η αντίστοιχη αύξηση του σήματος που λαμβάνουμε (X-mean: 820/623 (d12)/(d15), αντίστοιχα) (Εικόνα 3.2/Γ).

Η γλυκοφορίνη Α (GPA) αποτελεί τον πλέον σημαντικό δείκτη ερυθροποίησης. Τη 12η ημέρα της καλλιέργειας ανιχνεύεται σε ποσοστό 54% των κυττάρων (Εικόνα 3.2/Α, d12). Με την εξέλιξη της καλλιέργειας (15^η ημέρα) ανιχνεύονται κύτταρα 96% GPA⁺ και 100% CD71⁺ (GPA⁺/CD71⁺), (Εικόνα 3.2/ Α και Γ, d15), γεγονός που υποδεικνύει έναν ομοιογενή πληθυσμό ερυθροβλαστών.

Ο πληθυσμός των CD117⁺ κυττάρων αυξάνεται σταδιακά και τη 12^η ημέρα ανιχνεύεται σε ποσοστό 53% (Εικόνα 3.2/Δ, d12). Ακολουθεί μείωση του πληθυσμού και τη 15^η ημέρα ανιχνεύεται στο 28% του πληθυσμού (Εικόνα 3.2/ Δ, d15).

Η έκφραση των αντιγόνων αυτών κατά τις διάφορες ημέρες καλλιέργειας των κυττάρων στο σύστημα υγρής καλλιέργειας αρχέγονων CD34⁺ κυττάρων περιφερικού αίματος φυσιολογικών δοτών, οδηγεί στο συμπέρασμα για την παρουσία ενός ομοιογενούς πληθυσμού κυττάρων με διαφοροποίηση προς την ερυθρά σειρά (Εικόνες 3.1,3.2).



Εικόνα 3.2: Έκφραση αντιγονικών δεικτών επιφανείας, GRA (A), CD34 (B), CD71 (Γ), CD117 (Δ), HbF (E) χαρακτηριστικών της ερυθράς σειράς d12 κατά τη διάρκεια ωρίμανσης των CD34⁺ κυττάρων προς την ερυθρά σειρά. d15

3.1.1. Επίδραση των κυτταροκινών EPO και SCF στην ωρίμανση της καλλιέργειας (EPO 4 ή 10 u/ml και παρουσία ή απουσία SCF).

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση που προκαλεί στη διαφοροποίηση των κυττάρων της καλλιέργειας η μεταβολή της συγκέντρωσης της ερυθροποιητίνης (EPO) και η παρουσία ή απουσία του παράγοντα των αρχέγονων κυττάρων, Stem Cell Factor (SCF). Χρησιμοποιούνται δύο συγκεντρώσεις ερυθροποιητίνης 4 και 10 u/ml, ενώ ο SCF αρχικά χορηγείται στα κύτταρα σε συγκέντρωση 100ng/ml και ακολούθως, μετά το στάδιο της προερυθροβλάστης, απομακρύνεται από την καλλιέργεια.

Για τη μελέτη αυτή τα κύτταρα χωρίζονται σε δύο ομάδες, Α και Β. Στην ομάδα Α στην αρχή της καλλιέργειας προστίθενται EPO 4u/ml και SCF 100ng/ml και διατηρούνται σταθερά ως το τέλος της καλλιέργειας. Στα κύτταρα της ομάδας Β, κατά την 7^η ημέρα καλλιέργειας, αυξάνεται η συγκέντρωση της EPO σε 10u/ml διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση του SCF. Τα κύτταρα για περαιτέρω ανάλυση των εκφραζόμενων αντιγόνων επιφανείας συλλέγονται τη 12^η και 15^η ημέρα καλλιέργειας.

Στα κύτταρα της ομάδας Α (4u/ml EPO, 100ng/ml SCF), τη 12^η ημέρα καλλιέργειας ανιχνεύονται 54% GPA⁺ κύτταρα και το ποσοστό τους αυξάνεται σε 89% τη 15^η ημέρα (Εικόνα 3.3/Α). Τα κύτταρα με συνέκφραση GPA⁺/HbF⁺ ανέρχονται σε 8% του πληθυσμού τη 12^η ημέρα καλλιέργειας, ποσοστό το οποίο διπλασιάζεται κατά τη 15^η ημέρα (Εικόνα 3.3/Γ).

Το ποσοστό των GPA⁺ κυττάρων μετά τη χορήγηση EPO 10u/ml (ομάδα Β) είναι 80% και 96% κατά τη 12^η και 15^η ημέρα καλλιέργειας, αντίστοιχα (Εικόνα 3.3/Α). Τα επίπεδα της συνέκφρασης των GPA⁺/HbF⁺ είναι 11% και 19% κατά τη 12^η και τη 15^η ημέρα καλλιέργειας αντίστοιχα (Εικόνα 3.3/Γ).

Επομένως, η αύξηση της ερυθροποιητίνης από 4 σε 10 u/ml προκαλεί σημαντική αύξηση των GPA⁺ κυττάρων καθώς και του ποσοστού συνέκφρασης GPA⁺/HbF⁺ κυττάρων τόσο κατά τη 12^η όσο και κατά τη 15^η ημέρα.

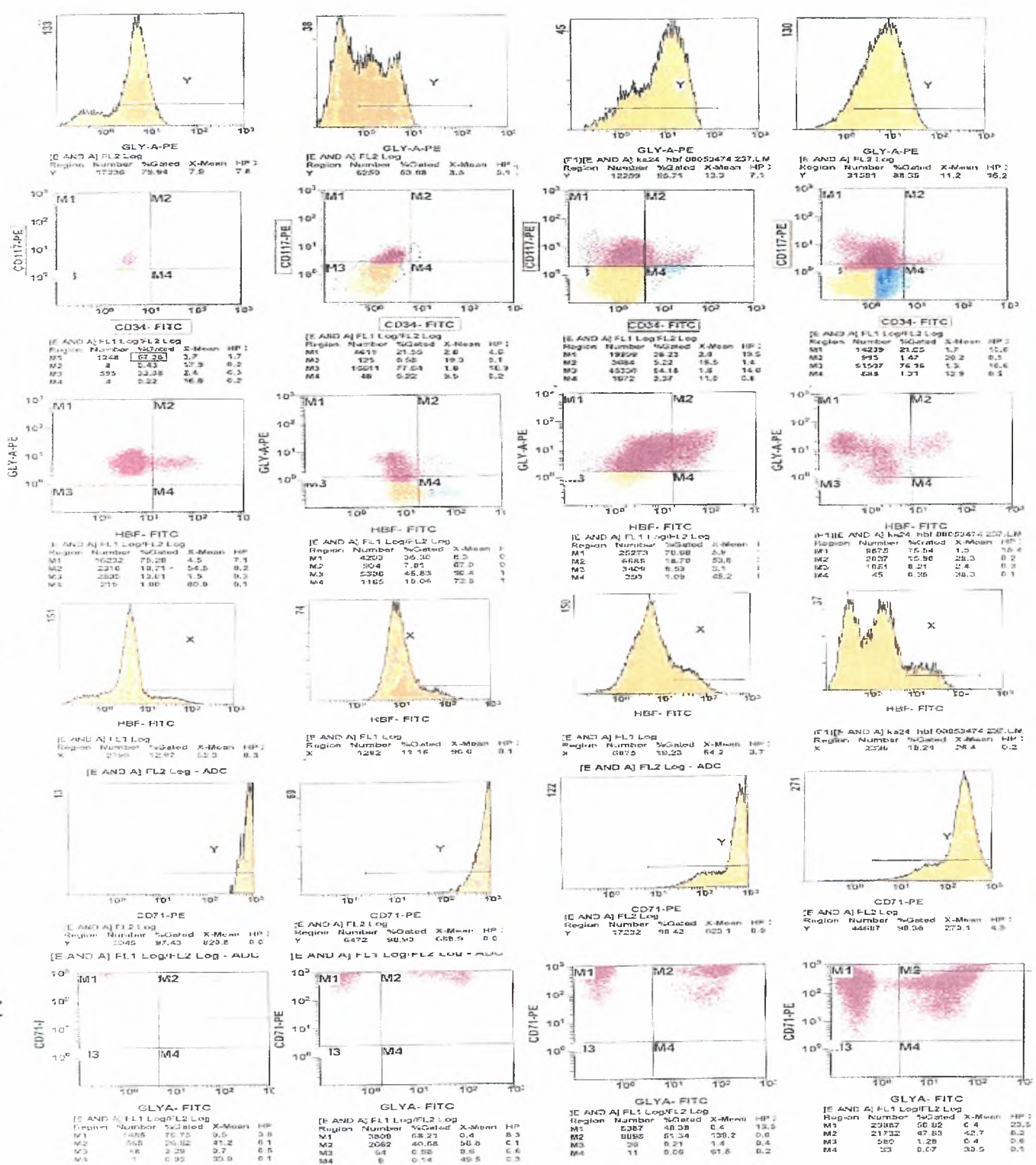
Στην ομάδα Α, τα F⁺ κύτταρα είναι 11.16% τη 12^η ημέρα και 18.24% τη 15^η ημέρα, ενώ στην ομάδα Β, το ποσοστό των F κυττάρων ανέρχεται σε 12.97% και 19.23% τις αντίστοιχες ημέρες (Εικόνα 3.3/Δ).

Τα επίπεδα έκφρασης του CD71 είναι μεγαλύτερα του 97% για τις ημέρες 12 και 15 και στις δύο συγκεντρώσεις ερυθροποιητίνης (Εικόνα 3.3/Ε). Η αύξηση της συγκέντρωσης της EPO επηρεάζει μόνο τα επίπεδα ενδοκυτταρικής κατανομής {X-mean: 688/820 (EPO 4/10 u/ml, αντιστοίχως) τη 12^η ημέρα καλλιέργειας/ X-mean: 270/623 (EPO 4/10 u/ml,

αντιστοίχως) τη 15^η ημέρα καλλιέργειας} (Εικόνα 3.3/Ε). Τα επίπεδα συνέκφρασης CD71⁺/GPA⁺ αυξάνονται κατά τη 15^η ημέρα από 47.8% σε 52% μετά την αύξηση της ερυθροποιητίνης (Εικόνα 3.3/Ζ).

Επομένως, η προσθήκη Epo 10u/ml οδηγεί σε υψηλότερα ποσοστά GPA⁺, GPA⁺/HbF⁺ και F⁺ κυττάρων. Η αύξηση των GPA⁺ κυττάρων και των ενδοκυττάρων επιπέδων έκφρασης του CD71 υποδηλώνει ταχύτερη ωρίμανση των κυττάρων. Με βάση τα παραπάνω και για να εξασφαλισθεί η ομαλή πορεία ανάπτυξης, διαφοροποίησης και ωρίμανσης των κυττάρων στις καλλιέργειες της παρούσας εργασίας, η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση της Epo που προστίθεται στις καλλιέργειες είναι 4u/ml.

Εικόνα 3.3: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων Epo (4 και 10 units) στην έκφραση των GPA⁺ (Α), CD34⁺/CD117 (Β), GPA⁺/HbF⁺ (Γ), HbF⁺ (Δ), CD71 (Ε) και GPA⁺/CD71 κατά τη 12^η και 15^η ημέρα καλλιέργειας.



d 12 Epo 10 units

d 12 Epo 4 units

d 15 Epo 10 units

d 15 Epo 4 units

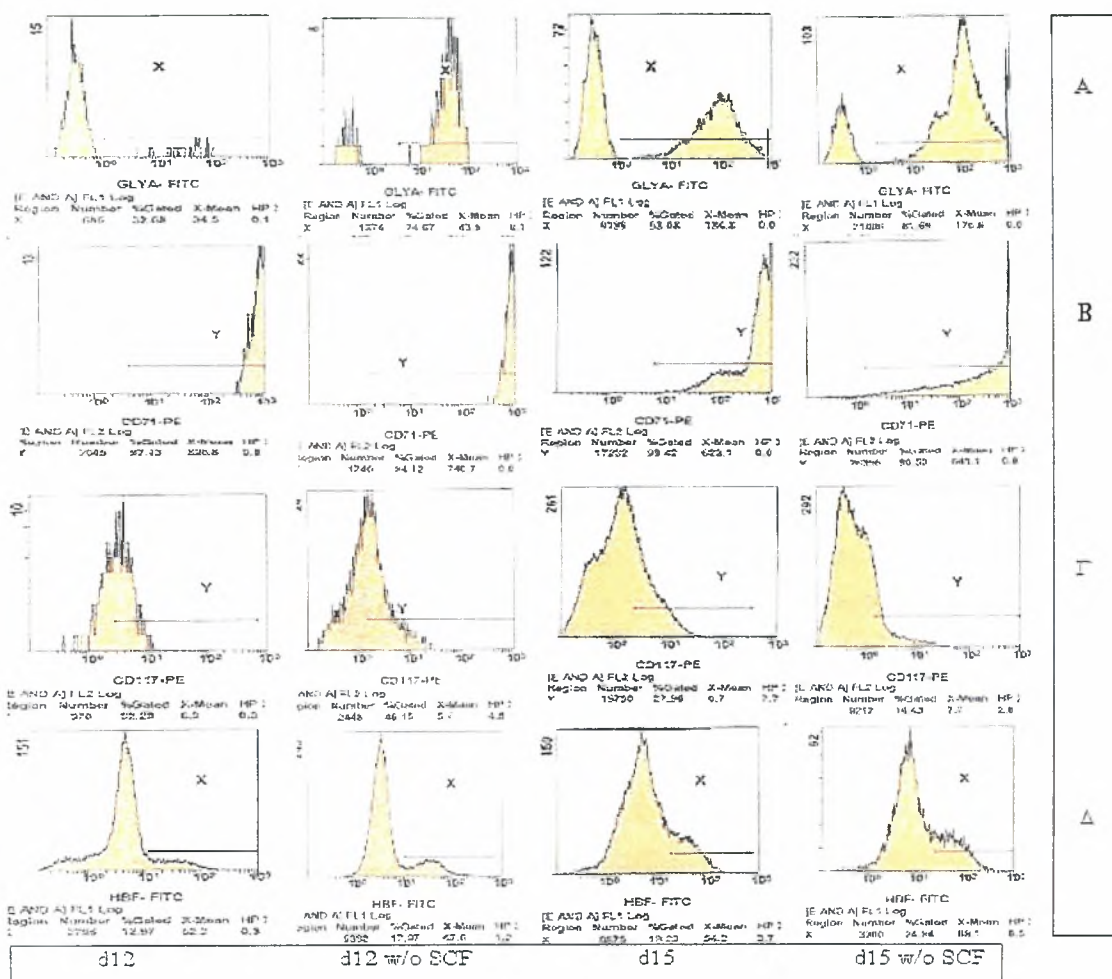
Η επίδραση της παρουσίας ή απουσίας του SCF στα κύτταρα μελετάται με βάση τη μεταβολή των GPA, CD71 και CD117 αντιγόνων επιφανείας και του ποσοστού των F⁺ κυττάρων. Η διακοπή της χορήγησης του SCF γίνεται μετά την 7^η ημέρα της καλλιέργειας, δηλαδή μετά το στάδιο της προερυθροβλάστης.

Τα επίπεδα της γλυκοφορίνης αυξάνονται ελάχιστα στα κύτταρα τα οποία κατά τη 12^η ή τη 15^η ημέρα δεν λαμβάνουν SCF (Εικόνα 3.4/A), ενώ το CD71 αντιγόνο είναι σταθερά υψηλά εκφραζόμενο παρουσία ή απουσία του SCF και τη 12^η και τη 15^η ημέρα καλλιέργειας (Εικόνα 3.4/B).

Είναι γνωστό ότι τα επίπεδα του CD117 μειώνονται φυσιολογικά κατά την ωρίμανση των κυττάρων. Παρατηρείται όμως ότι το ποσοστό έκφρασης του υποδοχέα του SCF (CD117) ρυθμίζεται από την παρουσία ή όχι του ίδιου του παράγοντα. Τη 12^η ημέρα καλλιέργειας, σε κύτταρα όπου διεκόπη η χορήγησή του, τα επίπεδα του CD117 μειώνονται κατά 1.3 φορές (από 62% σε 48%), ενώ κατά τη 15^η ημέρα η μείωση είναι μεγαλύτερη (περίπου 2 φορές, από 27% σε 14%). Η απουσία του SCF οδηγεί, επομένως, σε μείωση της έκφρασης του CD117 (Εικόνα 3.4/Γ).

Επίσης, το ποσοστό των F⁺ κυττάρων παρουσιάζει μια μικρή αύξηση μετά τη διακοπή του SCF, από 13% σε 18% και από 18% σε 25% κατά τη 12^η και 15^η ημέρα καλλιέργειας, αντίστοιχα (Εικόνα 3.4/Δ). Παρόμοια μικρή αύξηση παρατηρείται και στα επίπεδα της συνέκφρασης GPA⁺/HbF⁺ κυττάρων μετά τη διακοπή του SCF, τόσο κατά τη 12^η ημέρα όσο και κατά τη 15^η ημέρα καλλιέργειας (10.71% σε 13.47%/ 18.70% σε 28.35%, αντίστοιχα).

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η δράση του SCF σε σχέση με την παραγωγή της HbF περιορίζεται στα αρχικά στάδια ωρίμανσης του κυττάρου, πριν το στάδιο της προερυθροβλάστης, και η απουσία του δεν επηρεάζει την περαιτέρω ωρίμανση και παραγωγή εμβρυϊκών κυττάρων.



Εικόνα 3.4: Μεταβολή των αντιγόνων επιφάνειας GPA (A), CD71 (B), CD117 (Γ) και των F⁺ κυττάρων (Δ) κατά τη 12^η και 15^η ημέρα καλλιέργειας παρουσία και απουσία του SCF (100ng/ml) μετά την 7^η ημέρα καλλιέργειας.

3.2. Επίδραση της υδροξυουρίας (HU) σε πρωτογενείς καλλιέργειες ερυθροκυττάρων.

Η προσθήκη HU στα κύτταρα γίνεται την 5^η ημέρα της καλλιέργειας, όπου τα κύτταρα βρίσκονται σε εκθετική φάση. Χρησιμοποιούνται 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις HU (25, 50, 100 και 300μM) για μία και τρεις ημέρες, με συνεχή επίδραση ή κατά παλμό (παλμός: δράση για 1 ημέρα, ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων και επανακαλλιέργεια σε νέο θρεπτικό υλικό χωρίς την παρουσία HU).

Μετά την επίδραση της HU για το προκαθορισμένο χρονικό διάστημα, πραγματοποιείται συλλογή του δείγματος αφενός μεν για άμεση μέτρηση του αριθμού των κυττάρων, αφετέρου δε για άμεση απομόνωση RNA και ακόλουθη μοριακή μελέτη των μεταγράφων των γονιδίων σφαιρίνης. Για τις μετρήσεις με κυτταρομετρία ροής ή HPLC, μετά το καθορισμένο διάστημα δράσης της HU, τα κύτταρα επανακαλλιεργούνται σε νέο θρεπτικό υλικό χωρίς την παρουσία HU και ακολουθεί συλλογή κυττάρων και μετρήσεις των αντιγόνων επιφανείας ή των αλυσίδων σφαιρινών τη 12^η και 15^η ημέρα της καλλιέργειας.

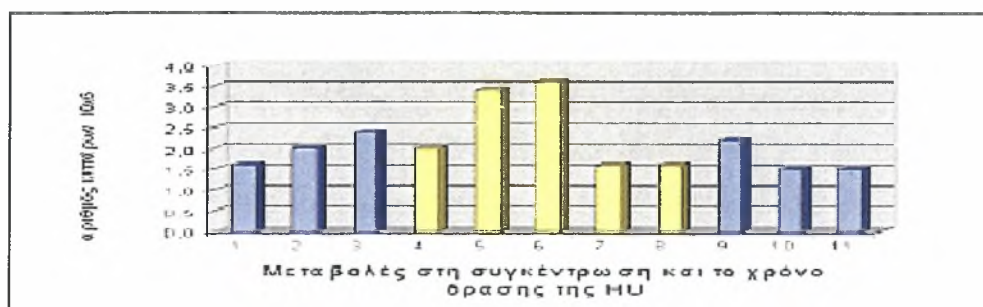
Η μελέτη του μηχανισμού δράσης της HU και η διερεύνηση της πιθανής επίδρασής της σε μετα-μεταγραφικό ή/και μεταφραστικό επίπεδο στα γονίδια των σφαιρινών πραγματοποιείται μετά την προσθήκη ακτινομυκίνης-D σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (2-5μg/ml) καθώς και κυκλοξαμίδης σε συγκέντρωση 4μg/ml. Η προσθήκη ακτινομυκίνης έγινε μία ημέρα μετά τη δράση της υδροξυουρίας (ημέρα 6), παραμένει στα κύτταρα επί 24 ή 48 ώρες (7^η -8^η ημέρα καλλιέργειας) και ακολουθεί είτε άμεση συλλογή του υλικού για μετρήσεις σε επίπεδο RNA είτε έκπλυση-επανακαλλιέργεια των κυττάρων και συλλογή των κυττάρων (12^η και 15^η ημέρα) για μέτρηση με κυτταρομετρία ροής ή HPLC.

3.2.1. Μέτρηση αριθμού κυττάρων.

Η μελέτη της μεταβολής του αριθμού των κυττάρων μετά από τη δράση της HU αποτελεί καθοριστικό στοιχείο για την επιλογή της καταλληλότερης συγκέντρωσης HU στα κύτταρα. Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιείται χρωστική μπλε του τρυπανίου (trypan blue) και με παρατήρηση στο φωτονικό μικροσκόπιο καταγράφεται ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων. Τα αποτελέσματα αποτυπώνονται στον πίνακα και το διάγραμμα της Εικόνας 5. Μία ημέρα μετά την προσθήκη HU (100 μM) παρατηρείται αύξηση 1.3 φορές στον

αριθμό των κυττάρων, η οποία είναι μεγαλύτερη μετά την τρίτη ημέρα δράσης της (1.7 φορές). Η παραμονή της HU (300 μ M) στην καλλιέργεια για 1 και 3 ημέρες επιφέρει αύξηση στον αριθμό των κυττάρων, 1.5 και 1.8 φορές, αντίστοιχα (Εικόνα 3.5).

Όταν η HU (100 μ M και 300 μ M) χορηγείται με παλμό προκαλείται μείωση του αριθμού των κυττάρων, τόσο στις καλλιέργειες όπου τα κύτταρα μετρώνται 2 ημέρες μετά την έκπλυση του φαρμάκου (1.3 φορές) (6^η ημέρα καλλιέργειας) καθώς και στα κύτταρα που συλλέγονται 6 ημέρες μετά τη διαδικασία έκπλυσης (1.5 φορές) (12^η ημέρα καλλιέργειας).



	Πίνακας 3.1	ημέρα καλλιέργειας	αριθμός κυττάρων x10 ⁶	Αύξηση ή μείωση
1	Control (d6)	d6	1.6	
2	100 μ M HU (1d)	d6	2.0	1.3 \uparrow
3	300 μ M HU(1d)	d6	2.4	1.5 \uparrow
4	Control (d8)	d8	2.0	
5	100 μ M HU (3d)	d8	3.4	1.7 \uparrow
6	300 μ M HU (3d)	d8	3.6	1.8 \uparrow
7	100 μ M HU (1d)-wash->2d	d8	1.6	1.3 \downarrow
8	300 μ M HU(1d)-wash->2d	d8	1.6	1.3 \downarrow
9	Control (d12)	d12	2.2	
10	100 μ M HU (1d)-wash->6d	d12	1.5	1.5 \downarrow
11	300 μ M HU(1d)-wash->6d	d12	1.5	1.5 \downarrow

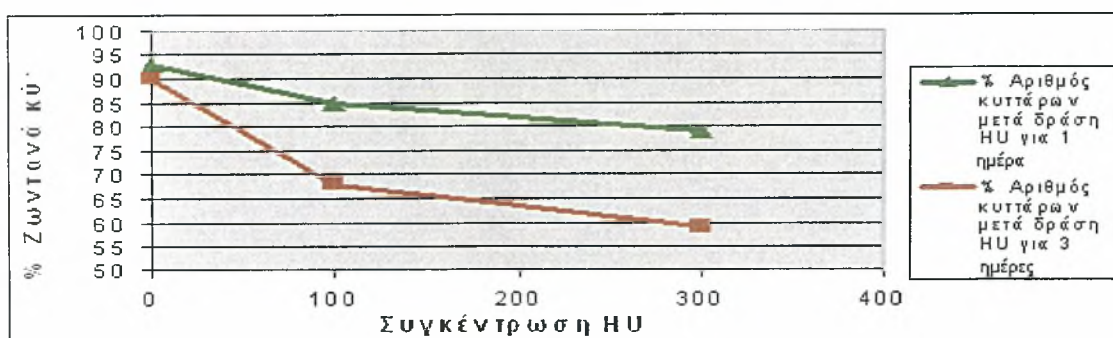
Εικόνα 3.5: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων και χρόνου δράσης της HU στον αριθμό των κυττάρων της καλλιέργειας

Από τα παραπάνω πειράματα φαίνεται ότι η συγκέντρωση των 100 μM και 300 μM HU είναι οι καλύτερες και οι επιλεγόμενες συγκεντρώσεις για τα περαιτέρω πειράματα.

3.2.2. Μελέτη της απόπτωσης των κυττάρων μετά την επίδραση 100 μM , 300 μM HU και ταυτόχρονης παρουσίας act-D στις καλλιέργειες CD34⁺ κυττάρων.

Για τη μελέτη της απόπτωσης χρησιμοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής και η χρωστική 7-αμινο-ακτινομυκίνη D (7-amino-actinomycin-D, 7-AAD). Αναγνωρίζονται 3 πληθυσμοί κυττάρων: α) τα ζωντανά κύτταρα (7-AAD^{neg}), β) τα αποπτωτικά (7-AAD^{dim}) και γ) τα κύτταρα σε προχωρημένη απόπτωση ή νεκρά (7-AAD^{bright}). Μετράμε το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων την 6^η και 8^η ημέρα της καλλιέργειας (1 και 3 ημέρες δράσης HU).

Για τα κύτταρα-μάρτυρες λαμβάνουμε 90% ζωντανά κύτταρα την 6^η ημέρα καλλιέργειας. Η χορήγηση 100 και 300 μM HU για μία ημέρα (1d) προκαλεί μείωση του ποσοστού των «ζωντανών κυττάρων» στο 85% και 79% των κυττάρων, αντίστοιχα (Εικόνα 3.6). Η παραμονή της HU για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (3 ημέρες) στην καλλιέργεια προκαλεί τοξικότητα με αποτέλεσμα την περαιτέρω μείωση των ζωντανών κυττάρων. Συγκεκριμένα, η δράση 300 μM HU για 3 ημέρες μειώνει το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων στο 60% (Εικόνα 3.6). Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν μία δόσο- και χρονο- εξαρτώμενη δράση της HU στον αριθμό των ζωντανών κυττάρων σε πρωτογενείς καλλιέργειες ερυθροκυττάρων φυσιολογικών ατόμων.

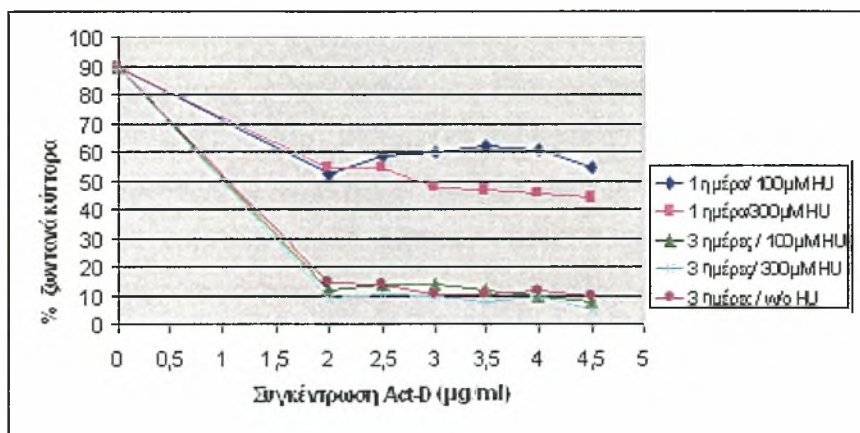


Εικόνα 3.6: Μελέτη της επίδρασης HU για 1 και 3 ημέρες στην απόπτωση των κυττάρων με κυτταρομετρία ροής.

Η προσθήκη της ακτινομυκίνης γίνεται 1 ημέρα μετά την προσθήκη της HU. Η μέτρηση πραγματοποιείται την 6^η και την 9^η ημέρα της καλλιέργειας. Η προσθήκη της ακτινομυκίνης είναι η σημαντική μείωση του αριθμού των κυττάρων. Για τα κύτταρα-

μάρτυρες, το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων ανέρχεται στο 90%. Η μία ημέρα παράλληλης δράσης HU και act-D (2μg/ml) έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ποσοστού των ζωντανών κυττάρων στο 50% (Εικόνα 3.7), ποσοστό πολύ χαμηλότερο από αυτό που λάβαμε μετά τη δράση μόνο της HU για το ίδιο χρονικό διάστημα (85% ζωντανά κύτταρα) .

Η προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων act-D, από 2 έως 5μg/ml, παρουσιάζει μία δόσο- και χρόνο-εξαρτώμενη επίδραση με το μικρότερο ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων (10%) μετά από παράλληλη δράση 300μM HU για 3 ημέρες και act-D (2-4.5μg/ml).



Εικόνα 3.7: Μελέτη απόπτωσης των κυττάρων μετά την ταυτόχρονη δράση HU και act-D.

3.2.3. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων Ero στο ποσοστό των CD71⁺, GPA⁺, CD117⁺ και των F⁺ κυττάρων μετά τη δράση 100 και 300 μM HU για 1 ημέρα με παλμό, παρουσία SCF σε όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας.

Μελετήθηκε η επίδραση 100 και 300 μM HU για 1 ημέρα με παλμό στον αριθμό των CD71⁺, CD117⁺ (ckit/SCF), γλυκοφορίνης A (GPA⁺) και F⁺ κυττάρων. Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω η προσθήκη HU στα κύτταρα γίνεται την 5^η ημέρα της καλλιέργειας, παραμένει στα κύτταρα για 1 ημέρα, απομακρύνεται με έκπλυση και τα κύτταρα επανακαλλιεργούνται σε νέο θρεπτικό υλικό χωρίς την παρουσία HU. Στη συνέχεια έχουμε δύο πληθυσμούς κυττάρων, όπου στον ένα έχουν προστεθεί 4u/ml

Ερο, ενώ στον άλλο, μετά το στάδιο της προερυθροβλάστης (d5) αυξάνεται η συγκέντρωση της Ερο σε 10u/ml.

Για να είναι εφικτή η μέτρηση των προαναφερόμενων αντιγόνων επιφανείας με κυτταρομετρία ροής, η συλλογή κυττάρων και οι μετρήσεις γίνονται 6 και 9 ημέρες μετά, δηλαδή τη 12^η και 15^η ημέρα της καλλιέργειας.

Τη 12^η ημέρα καλλιέργειας στα κύτταρα-μάρτυρες, το ποσοστό των CD71⁺ κυττάρων ξεπερνά το 90% και στις δύο συγκεντρώσεις ερυθροποιητίνης με μεγάλη κατανομή ανά κύτταρο (υψηλή ένταση φθορισμού, CD71^{bright}). Η προσθήκη HU δεν τροποποιεί τα ποσοστά σημαντικά σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρα (Εικόνα 3.8). Παρόμοια αποτελέσματα για το CD71, έχουμε και τη 15^η ημέρα της καλλιέργειας σε όλους τους συνδυασμούς ερυθροποιητίνης και υδροξυουρίας (Εικόνα 3.9, Πίνακας 3.2).

Τη 12^η ημέρα καλλιέργειας, παρουσία 4u/ml Ερο, το ποσοστό των GPA⁺ κυττάρων αυξάνονται από 54% στα κύτταρα-μάρτυρα σε 85% και 86% μετά την προσθήκη 100μM και 300μM HU, αντίστοιχα. Στα κύτταρα που χορηγείται 10 u/ml Ερο, η γλυκοφορίνη είναι ήδη σε υψηλά επίπεδα για τα κύτταρα-μάρτυρα, μεγαλύτερο του 70% και δεν επηρεάζεται περαιτέρω από την προσθήκη της HU (Εικόνα 3.8, Πίνακας 3.2). Τη 15^η ημέρα τα επίπεδα γλυκοφορίνης είναι μεγαλύτερα από 90% σε όλους τους συνδυασμούς Ερο και HU (Εικόνα 3.9, Πίνακας 3.2) .

Το CD117 εκφράζεται στο 31% των κυττάρων-μαρτύρων με μέτρια επίπεδα φθορισμού τη 12^η ημέρα καλλιέργειας. Η προσθήκη 100μM HU στα κύτταρα παρουσία 4u/ml Ερο δε μεταβάλλει τα επίπεδα του CD117. Η αύξηση της HU σε 300 μM προκαλεί σημαντική μείωση του CD117 (κύτταρα-μάρτυρας/ κύτταρα+100μM HU/ κύτταρα+300μM HU: 31% / 38% / 12%) (Εικόνα 3.8, Πίνακας 3.2). Στις καλλιέργειες με αυξημένη συγκέντρωση Ερο (10u/ml), αφενός στα κύτταρα-μάρτυρες αυξάνεται η έκφραση του CD117, αφετέρου η προσθήκη της HU (100μM/ 300μM) μειώνει την έκφραση του CD117 [(κύτταρα-μάρτυρας)/ (κύτταρα+100μM HU) / (κύτταρα+300μM HU): 52% / 41% / 22%]) (Εικόνα 3.8, Πίνακας 3.2).

Παρόμοια μεταβολή στην έκφραση του CD117 παρατηρείται επίσης κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης της καλλιέργειας (d15), όπου η προσθήκη 100 και 300μM HU μειώνει επιπλέον την έκφραση του υποδοχέα του SCF (Εικόνα 3.9).

Τη 12^η ημέρα στα κύτταρα με 4u/ml Ερο, το ποσοστό των F⁺ κυττάρων στα κύτταρα-μάρτυρα είναι 11% και αυξάνεται σε 42% και 29% μετά από προσθήκη 100μM και 300μM HU, αντίστοιχα (F⁺ κύτταρα, 100/300μM HU: x3.7- / x2,6-φορές, αντίστοιχα). Η αύξηση της ερυθροποιητίνης σε 10u/ml Ερο επηρέασε περαιτέρω την παραγωγή F

κυττάρων και παρουσιάζεται μία μικρή αύξηση από 13% στα κύτταρα –μάρτυρα σε 39% και 35% μετά από προσθήκη 100μM και 300μM HU (F⁺ κύτταρα 100/300μM HU: x3-/x2,6-φορές, αντίστοιχα) (Εικόνα 3.8, Πίνακας 3.2).

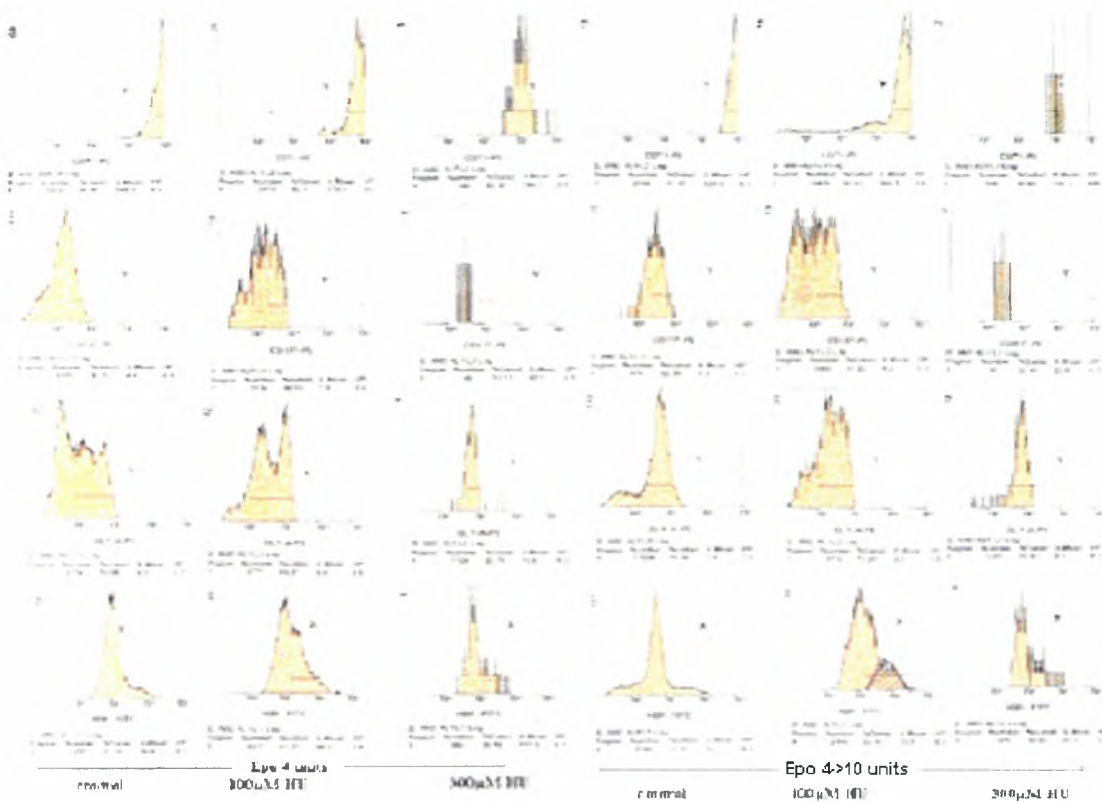
Επομένως τη 12^η της καλλιέργειας των κυττάρων και για τις δύο συγκεντρώσεις της χορηγούμενης Epo σε συνδυασμό με 100μM και 300μM HU το ποσοστό των F⁺ κυττάρων αυξάνεται σε παρόμοια επίπεδα.

παρουσία SCF	d12			d12		
	Epo 4			Epo 4-->10		
	control	100μMHU	300μMHU	control	100μMHU	300μMHU
CD71	98,9	98,11	88,49	97,43	92,47	90,89
CD117	30,53	38,55	12,11	52,29	31,22	22,45
GPA	53,98	84,87	85,79	79,94	71,34	74,82
HbF	11,16	41,77	29,18	12,97	39,47	34,63
παρουσία SCF	d15			d15		
	Epo 4			Epo 4-->10		
	control	100μMHU	300μMHU	control	100μMHU	300μMHU
CD71	98,36	97,56	98,28	99,42	98,12	97,62
CD117	34,68	21,81	10,08	27,96	23,15	20,67
GPA	95,71	95,64	94,17	88,35	98,03	97,17
HbF	18,24	24,09	16,19	19,23	22,93	20,42

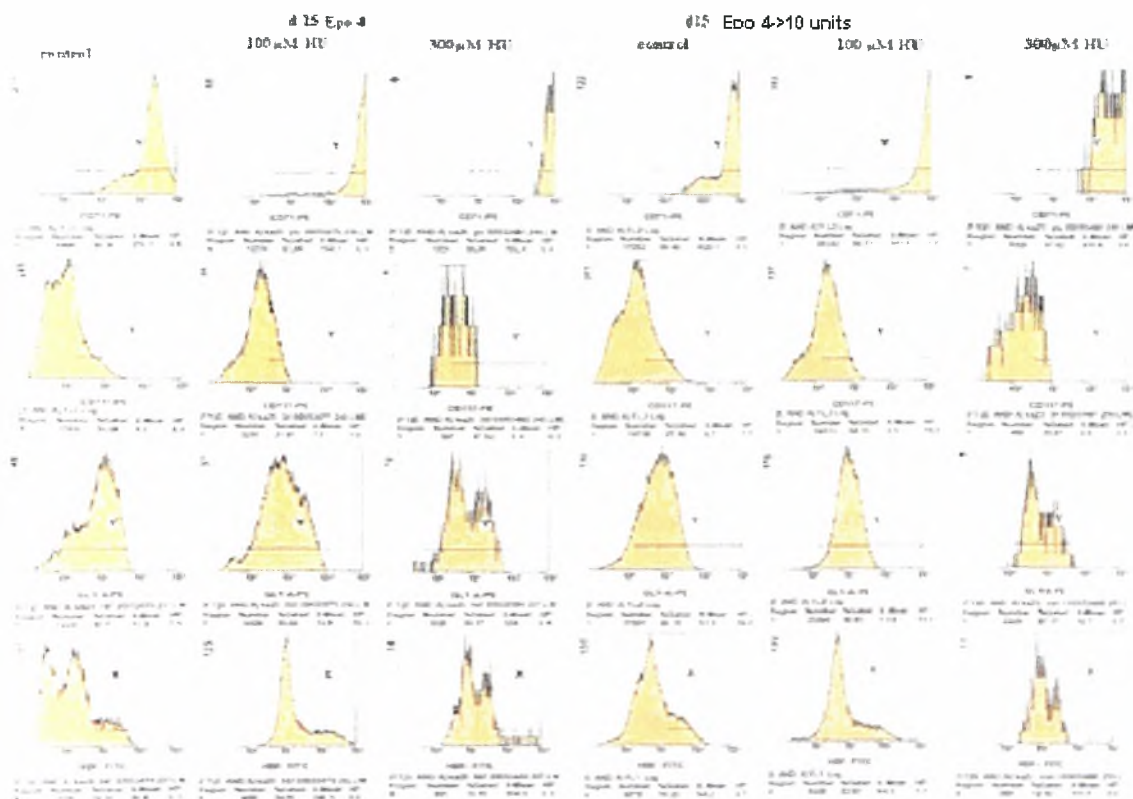
Πίνακας 3.2: Μελέτη της επίδρασης 4 και 10u/ml Epo στο ποσοστό έκφρασης των αντιγονικών δεικτών CD71, CD117, γλυκοφορίνη A και HbF σε κύτταρα καλλιέργειας παρουσία 100 και 300 μM HU για 1 ημέρα με παλμό και συλλογή κυττάρων τη 12^η και 15^η ημέρα της καλλιέργειας.

Στα κύτταρα-μάρτυρα τη 15η ημέρα καλλιέργειας, το ποσοστό των F⁺ κυττάρων, αυξάνεται σε σύγκριση με τη 12^η ημέρα. Συγκεκριμένα στα κύτταρα-μάρτυρα το ποσοστό των F⁺ κυττάρων ανέρχεται σε 18% και 19% με προσθήκη Epo 4 και 10 u/ml, αντίστοιχα, ενώ τη 12^η ήταν 11 και 13% αντίστοιχα.

Μετά την επίδραση 100μM HU τη 15^η ημέρα, συγκριτικά με το μάρτυρα, το ποσοστό αυξάνεται σε 24% και 22%, αντίστοιχα για προσθήκη Epo 4 και 10 u/ml, ενώ με την επίδραση 300μM HU παραμένει στα ίδια επίπεδα, 16% και 20%, αντίστοιχα. (Εικόνα 3.9, Πίνακας 3.2).



Εικόνα 3.8: Μέτρηση των CD71⁺, CD117⁺, γλυκοφορίνης A⁺ και HbF⁺ κυττάρων σε πρωτογενείς καλλιέργειες φυσιολογικών ερυθροκυττάρων παρουσία 100 και 300μM HU για 1 ημέρα με παλμό και μέτρηση 6 ημέρες αργότερα (12^η ημέρα καλλιέργειας) και την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων Epo (4 και 10 unit/ml).



Εικόνα 3.9: Μελέτη της επίδρασης 4 και 10u/ml Epo στον αριθμό των θετικών για CD71, CD117, γλυκοφορίνη A και HbF κυττάρων σε καλλιέργειες CD34⁺ κυττάρων παρουσία 100 και 300 μM HU για 1 ημέρα με παλμό και συλλογή κυττάρων 9 ημέρες αργότερα (15^η ημέρα καλλιέργειας).

3.2.4. Μελέτη των CD71⁺, GPA⁺, CD117⁺ και των F⁺ κυττάρων παρουσία ή απουσία του SCF και Epo (4→10 u/ml) και παράλληλη δράση 100μM και 300μM HU για 1 ημέρα με παλμό.

Η καλλιέργεια πραγματοποιείται όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως και ο SCF προστίθεται από την αρχή στην καλλιέργεια. Μετά το στάδιο της προερυθροβλάστης, την 5^η ημέρα της καλλιέργειας, προστίθεται HU για μία ημέρα. Ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων και επανακαλλιέργεια σε νέο θρεπτικό υλικό απουσία της HU. Στη συνέχεια χωρίζουμε τα κύτταρα σε δύο πληθυσμούς και στον ένα πληθυσμό σταματά η δράση του SCF με έκπλυση των κυττάρων, ενώ στον άλλη ομάδα εξακολουθεί σταθερά η δράση του. Προκειμένου να λάβουμε δείγματα για κυτταρομετρία ροής μετά την απομάκρυνση της ουσίας, τα κύτταρα παραμένουν στο νέο θρεπτικό υλικό για 6 ή 9 ημέρες επιπλέον και τα κύτταρα συλλέγονται τη 12^η και 15^η ημέρα της καλλιέργειας, αντίστοιχα.

Στα κύτταρα-μάρτυρες και τις δύο χρονικές στιγμές, 12^η και 15^η ημέρα καλλιέργειας, τα ποσοστά έκφρασης των αντιγόνων CD71 και γλυκοφορίνης δεν επηρεάζονται από την παρουσία ή μη του SCF (Πίνακας 3.3). Επίσης σε κύτταρα που προστέθηκε 100 ή 300μM HU, η παρουσία ή απουσία του SCF δεν επηρεάζει τα ποσοστά των CD71⁺ κυττάρων. Τα GPA⁺ κύτταρα αυξάνονται απουσία SCF και με παράλληλη προσθήκη 100μM και εντονότερα με 300μM HU.

Η μείωση του CD117 κατά την ωρίμανση της καλλιέργειας παρατηρείται παρουσία ή απουσία του SCF, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως. Στα κύτταρα-μάρτυρες παρουσία του SCF, η έκφραση του CD117 είναι 52% κατά τη 12^η και 28% τη 15^η ημέρα, ενώ απουσία του SCF λαμβάνουμε 46% και 14%, αντίστοιχα (Πίνακας 3.3). Η προσθήκη 100μM και 300μM HU μειώνει περαιτέρω την έκφραση του CD117 σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες παρουσία ή απουσία SCF (Πίνακας 3.3). Η προσθήκη όμως της HU στις υποομάδες κυττάρων παρουσία ή απουσία SCF καθώς ωριμάζουν τα κύτταρα από 12^η σε 15^η ημέρα καλλιέργειας διατηρεί σταθερά τα επίπεδα έκφρασης του CD117. Τη 12^η και 15^η ημέρα καλλιέργειας των κυττάρων-μάρτυρας, η απουσία SCF αυξάνει το ποσοστό των F⁺ κυττάρων.

Μετά όμως από την προσθήκη 100μM και 300μM HU για 1 ημέρα με παλμό, τη 12^η ημέρα της καλλιέργειας, η απουσία του SCF μειώνει το ποσοστό των F⁺ κυττάρων από 39% σε 22% και από 35% σε 27%, αντίστοιχα (Πίνακας 3.3). Τη 15^η ημέρα της καλλιέργειας, η προσθήκη 100μM HU απουσία του SCF δεν επηρεάζει το ποσοστό των F⁺ κυττάρων. Αντιθέτως στα δείγματα όπου προστίθεται 300μM HU για 1 ημέρα με

παλμό, απουσία του SCF, μειώνεται το ποσοστό των F⁺ κυττάρων από 20,42% σε 15,86%.

Η επίδραση της υδροξυουρίας έχει τον πρωταρχικό ρόλο στην αύξηση του ποσοστού των F⁺ κυττάρων καθώς αυτή παρατηρείται έντονα κατά την παρουσία και απουσία του SCF, τόσο κατά την 12^η όσο και κατά την 15^η ημέρα της καλλιέργειας.

Epo 4→10 u/ml	d12			d12		
	παρουσία SCF			απουσία SCF		
	control	100μMHU	300μMHU	control	100μMHU	300μMHU
CD71	97,43	92,47	90,89	94,12	96,36	96,72
CD117	52,29	31,22	22,45	46,15	13,35	26,00
GPA	79,94	71,34	74,82	74,07	81,57	91,63
HbF	12,97	39,47	34,63	17,97	22,4	27,06
Epo 4→10 u/ml	d15			d15		
	παρουσία SCF			απουσία SCF		
	control	100μMHU	300μMHU	control	100μMHU	300μMHU
CD71	99,42	98,12	97,62	98,51	97,68	97,19
CD117	27,96	33,15	20,67	14,43	18,56	39,96
GPA	88,35	98,03	97,17	91,42	91,05	97,45
HbF	19,23	22,93	20,42	24,94	22,13	15,86

Πίνακας 3.3: Επίδραση της παρουσίας και απουσίας SCF στο ποσοστό των θετικών για CD71, CD117, GPA και HbF κυττάρων μετά την επίδραση 100μM και 300μM για 1 ημέρα με παλμό και συλλογή των κυττάρων τη 12^η και 15^η ημέρα καλλιέργειας.

3.2.5. Μέτρηση των CD71⁺, CD117⁺, GPA⁺ και των F⁺ κυττάρων μετά την προσθήκη HU και act-D.

Στα πειράματα με την ακτινομυκίνη D χρησιμοποιήθηκε η συγκέντρωση 100μM HU για 1 ημέρα, όπου παρατηρήθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό ζωντανών κυττάρων. Η επίδραση HU γίνεται την 5^η ημέρα και την επόμενη ημέρα προστίθεται ακτινομυκίνη για 24 ώρες και τα κύτταρα συλλέγονται τη 12^η και 15^η ημέρα της καλλιέργειας. Με την προσθήκη της ακτινομυκίνης δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στο ποσοστό GPA⁺ κυττάρων, καθώς επίσης και στην κυτταρική κατανομή της τόσο κατά τη 12^η όσο και κατά τη 15^η ημέρα της καλλιέργειας και στα κύτταρα-μάρτυρες και στα κύτταρα που προστέθηκε HU (Πίνακας 3.4).

Τόσο στα κύτταρα-μάρτυρας, όσο και στα κύτταρα που προστίθεται HU και act-D, το ποσοστό των CD71⁺ κυττάρων εξακολουθεί να παραμένει υψηλό (90-99%). Σημαντική όμως είναι η αλλαγή στην κυτταρική κατανομή του CD71 στις δύο αυτές ομάδες. Τόσο η προσθήκη ακτινομυκίνης όσο και η ταυτόχρονη χορήγηση HU και act-D μειώνει σημαντικά το ποσοστό των CD71 μορίων ανά κύτταρο τη 12^η και τη 15^η ημέρα της καλλιέργειας (Πίνακας 3.4).

Η προσθήκη ακτινομυκίνης D για 24h έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ποσοστού των CD117⁺ κυττάρων στα κύτταρα-μάρτυρες (από 51.20% σε 10.75%) όταν η συλλογή των κυττάρων γίνεται τη 12^η ημέρα καλλιέργειας. Στα κύτταρα που προστίθεται 100μM HU παρατηρείται επίσης μείωση (από 51.20% στα κύτταρα-μάρτυρες σε 39.83% παρουσία HU και 14.19% μετά από προσθήκη HU+act-D). Παρόμοια ελάττωση παρατηρείται και τη 15^η ημέρα της καλλιέργειας στο ποσοστό των CD117⁺ κυττάρων όταν προστίθεται act-D (κύτταρα-μάρτυρες/κύτταρα+act-D: 36.09/7.25). Η παρουσία HU μειώνει σχετικά τον αριθμό των θετικών CD117 κυττάρων σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρας, ενώ η ταυτόχρονη παρουσία της με act-D διατηρεί υψηλότερο το ποσοστό των CD117⁺ κυττάρων (κύτταρα-μάρτυρας/ κύτταρα+HU/ κύτταρα-μάρτυρας+act/ κύτταρα+HU+act-D: 36.09 / 26.17 / 7,25 / 12.67) (Πίνακας 3.4)

Στα κύτταρα που συλλέγονται τη 12^η ημέρα, η προσθήκη ακτινομυκίνης στα κύτταρα μάρτυρες είχε ως αποτέλεσμα μία μικρή μείωση στα ποσοστά των F⁺ κυττάρων από 18.7% σε 14.4% (1.3 φορές). Η προσθήκη HU προκάλεσε αύξηση του ποσοστού των θετικών για Hb F κυττάρων κατά 2.5 φορές (από 19% αυξάνει σε 47%) ενώ, σε κύτταρα με την ταυτόχρονη επίδραση ακτινομυκίνης και HU, το ποσοστό των F⁺ κυττάρων

διατηρείται σε παρόμοια επίπεδα (16.25%) με αυτό των κυττάρων μαρτύρων με προσθήκη ακτινομυκίνης (14.38%).

Τη 15^η ημέρα της καλλιέργειας η προσθήκη ακτινομυκίνης είχε ως αποτέλεσμα παρόμοια μείωση στα ποσοστά των F⁺ κυττάρων από 28% σε 20% (1.4 φορές) με αυτή της 12^η ημέρας καλλιέργειας. Η παρουσία HU αυξάνει κατά 2 φορές τον αριθμό των F⁺ κυττάρων και η συνύπαρξη ακτινομυκίνης με HU οδηγεί σε μείωση του ποσοστού των HbF⁺ κυττάρων, 1.3 φορές (από 19.85% σε 15.22%),

	CD 71	CD 117	GPA	F	GPA+/ HbF-	GPA+/ HbF+	GPA-/ HbF-	GPA-/ HbF+	CD71 X-mean
(d12) 1	99.15	51.20	71.34	18.70	52.00	32.64	13.28	2.07	844,6
2	94.94	10.75	80.07	14.38	58.37	24.85	13.75	3.03	438,5
3	94.28	39.83	80.56	46.76	46.57	43.24	6.59	3.60	777,6
4	88.23	14.19	71.41	16.25	61.65	20.57	15.40	2.38	394,1
(d15) 8	99.87	36.09	90.33	22.25	49.89	38.88	7.03	4.20	754,2
9	95.97	7.25	92.63	19.85	69.50	19.17	8.89	2.44	328,3
10	99.48	26.17	92.28	26,15	50.88	48.07	0.66	0.39	572,4
11	91.44	12.67	87.37	15.22	78.82	13.45	6.63	1.10	261,4

Πίνακας 3.4: Έκφραση των αντιγονικών δεικτών CD71, CD117, GPA και των HbF* κυττάρων και μεταβολή της έντασης του φθορισμού του CD71 (CD71 X-Mean) μετά την επίδραση ακτινομικίνης και 100μM HU για 1 ημέρα με παλμό και συλλογή κυττάρων τη 12^η και 15^η ημέρα της καλλιέργειας.

3.3. Μελέτη των αλυσίδων σφαιρίνης με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης, HPLC, μετά την προσθήκη HU.

Με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) μελετήθηκαν τα επίπεδα των παραγόμενων σφαιρινικών αλυσίδων α , β και γ σε κυτταροκαλλιέργειες CD34⁺ κυττάρων περιφερικού αίματος υγιών ατόμων. Το δείγμα της μελέτης χωρίστηκε σε 3 ομάδες, ανάλογα με τη συγκέντρωση της χορηγούμενης ερυθροποιητίνης. Στα κύτταρα της ομάδας A προστίθενται 4u/ml ερυθροποιητίνης καθόλη τη διάρκεια της καλλιέργειας, στην ομάδα B και Γ αρχικά προστίθενται 4u/ml Epo και την 7^η ημέρα καλλιέργειας αυξάνεται η συγκέντρωση Epo σε 10u/ml. Η μέτρηση των σφαιρινικών αλυσίδων έγινε για τις ομάδες A και B την 11^η ημέρα της καλλιέργειας, ενώ για την ομάδα Γ τη 14^η ημέρα της καλλιέργειας. Για όλες τις ομάδες μελετήθηκαν δείγματα παρουσία ή απουσία SCF και η HU προστέθηκε την 5^η ημέρα καλλιέργειας σε συγκέντρωση 100μM για μία ημέρα με παλμό. Η συγκεκριμένη συγκέντρωση της HU επιλέχθηκε ως η πλέον κατάλληλη συγκέντρωση από προηγούμενα πειράματα.

Στα κύτταρα της ομάδας A (4 u/ml Epo-d11), η προσθήκη 100μM HU οδηγεί σε αύξηση του πηλίκου Gγ/Αγ κατά 2.2 φορές (κύτταρα-μάρτυρες / κύτταρα+HU: 1.30/2.83). Η προσθήκη 100μM HU στα κύτταρα της ομάδας B (4→10u/ml Epo-d11) οδηγεί σε μικρότερη αύξηση του λόγου Gγ/Αγ (1.2 φορές). Τα κύτταρα της ομάδας Γ συλλέγονται την 14^η ημέρα της καλλιέργειας, όπου η προσθήκη HU προκαλεί αύξηση του λόγου Gγ/Αγ κατά 1,3 φορές. (Πίνακας 3.5)

		Παρουσία SCF HU 100μM 1d		Gγ globin (%)	Αγ globin (%)	Gγ/Αγ	Αύξηση Gγ/Αγ	Hb F Gγ+Αγ/α	Hb A β/α
1	D11	w/o HU	Epo 4 u	9,2	7,06	1,3		0,39	1,01
2	D11	100HU	Epo 4 u	9,88	3,49	2,83	2,18	0,31	1,02
3	D11	w/o HU	Epo 4 -10	10,35	5,28	1,96		0,35	0,91
4	D11	100HU	Epo 4 -10u	8,22	3,73	2,2	1,12	0,26	0,91
5	D14	w/o HU	Epo 4 -10u	7,93	3,36	2,36		0,27	1,14
6	D14	100HU	Epo 4 -10u	11,86	3,05	3,89	1,60	0,35	1,02

Πίνακας 3.5: Επίδραση της HU (100μM) στην έκφραση των Gγ, Αγ, β και α αλυσίδων σφαιρινών και των υπολογιζόμενων αιμοσφαιρινών HbF και HbA σε καλλιέργειες φυσιολογικών CD34⁺ κυττάρων παρουσία SCF και διαφορετικών συγκεντρώσεων Epo.

Η προσθήκη της HU στις καλλιέργειες των CD34⁺ κυττάρων αυξάνει το πηλίκo Gγ/Αγ αλυσίδων και την 11^η και τη 14^η ημέρα καλλιέργειας σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρας. Η μεγαλύτερη αύξηση του λόγου Gγ/Αγ (2.2-φορές) λόγω της παρουσίας HU παρατηρείται την 11^η ημέρα καλλιέργειας των κυττάρων παρουσία της μικρότερης συγκέντρωσης Epo (4u/ml). Η επιπλέον αύξηση της συγκέντρωσης Epo από 4 σε 10u/ml δεν επιφέρει καμία αλλαγή στο λόγο των Gγ/Αγ αλυσίδων είτε στα κύτταρα-μάρτυρας είτε στα κύτταρα+HU. Τη 14^η ημέρα καλλιέργειας παρουσία της αυξανόμενης συγκέντρωσης Epo η προσθήκη της HU επιφέρει μία αύξηση στο πηλίκo των αλυσίδων Gγ/Αγ (1.6-φορές). Η αύξηση του πηλίκου Gγ/Αγ υποδηλώνει πριμοδότηση της παραγωγής της Gγ αλυσίδας, το οποίο αντιστοιχεί στο εμβρυϊκό πρότυπο παραγωγής αιμοσφαιρίνης.

Τη 14^η ημέρα καλλιέργειας, καθώς η ερυθροποίηση έχει προχωρήσει αρκετά, στα κύτταρα-μάρτυρες η παραγωγή της HbF μειώνεται και αυξάνεται η HbA (Πίνακας 3.5), αν και η παρουσία HU προκαλεί μία μικρή αύξηση της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης.

Στην περίπτωση όμως της διακοπής της χορήγησης του SCF την 7^η ημέρα της καλλιέργειας, το πρότυπο παραγωγής της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης αλλάζει και ο λόγος των Gγ/Αγ αλυσίδων μειώνεται παρουσία HU (Πίνακας 3.6). Η μείωση αυτή είναι μεγαλύτερη τη 14^η ημέρα καλλιέργειας παρουσία HU και με αυξανόμενη συγκέντρωση

Ερο από 4 σε 10u/ml (Πίνακας 3.6), σε αντίθεση με τα αντίστοιχα πειράματα παρουσία SCF.

Η απουσία όμως του SCF δεν επηρεάζει την παραγωγή της HbF, όπου η προσθήκη HU αυξάνει κατά 1.5 φορές την παραγόμενη HbF στα κύτταρα της ομάδας A (Ερο 4u/ml), ενώ το ποσοστό της HbF επηρεάζεται ελάχιστα ή καθόλου στις ομάδες κυττάρων B και Γ μετά την προσθήκη της HU (Πίνακας 3.6). Είναι χαρακτηριστικό ότι στα κύτταρα της ομάδας Γ τη 14^η ημέρα της καλλιέργειας απουσία SCF το ποσοστό της HbF παρουσία HU μειώνεται σε 19% σε αντίθεση με τα αντίστοιχα κύτταρα της καλλιέργειας όπου με παρουσία του SCF και HU το ποσοστό της HbF διατηρείται σε 36%.

		Απουσία SCF		Gγ globin(%)	Aγ globin (%)	Gγ/Aγ	Μείωση Gγ/Aγ	Hb F Gγ+Αγ/α	Hb A β/α
1	D11	w/o HU	Ερο 4 unit	8,38	1,33	6,30		0,2	0,89
2	D11	100HU (1d)	Ερο 4 unit	11,06	3,01	3,67	1,71	0,3	0,83
3	D11	w/o HU	Ερο 4 -10unit	9,87	2,1	4,70		0,26	0,94
4	D11	100HU (1d)	Ερο 4 ->10unit	11,28	2,54	4,44	1,06	0,32	0,99
5	D14	w/o HU	Ερο 4 ->10unit	8,23	0,27	30,48		0,19	1,02
6	D14	100HU (1d)	Ερο 4 ->10unit	8,8	0,68	12,94	2,36	0,19	0,86

Πίνακας 3.6: Επίδραση της HU (100μM) με παλμό στις παραγόμενες αλυσίδες σφαιρινών και αιμοσφαιρινών σε καλλιέργειες φυσιολογικών CD34⁺ κυττάρων μετά από διακοπή χορήγησης SCF και μεταβολή συγκέντρωσης της ερυθροποιητίνης (4 και 10 u/ml).

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η προσθήκη HU σε καλλιέργειες φυσιολογικών CD34⁺ κυττάρων επηρεάζει διαφορετικά το λόγο των Gγ/Aγ αλυσίδων παρουσία SCF ή μετά τη διακοπή χορήγησής του μετά από το στάδιο της προερυθροβλάστης.

Ουσιαστικά παρουσία του SCF η χορηγούμενη HU πριμοδοτεί τη σύνθεση Gγ αλυσίδας και αυξάνει την παραγόμενη HbF τη 14^η ημέρα της καλλιέργειας. Αντιθέτως απουσία του η δράση της HU αυξάνει τη σύνθεση της Αγ και από την 11^η ημέρα της καλλιέργειας παρατηρείται η αύξηση της HbF.

Ουσιαστικά παρουσία του SCF σε ώριμα κύτταρα παράγεται λιγότερη ποσότητα HbF με πριμοδότηση των Gγ αλυσίδων. Είναι γνωστό ότι η παρουσία του SCF σε ώριμους ερυθροβλάστες αυξάνει τον πολλαπλασιασμό τους και καθυστερεί τη διαφοροποίησή τους. Αντιθέτως η διακοπή της χορήγησής του μετά την 7^η ημέρα της καλλιέργειας επιτρέπει στο κύτταρο να προχωρήσει στην παραγωγή σφαιρινικών αλυσίδων και μάλιστα πριμοδοτώντας την Αγ σφαιρίνη.

Παρουσία του SCF την αύξηση τη μετράμε τη 14^η ημέρα της καλλιέργειας.

Με τη κυτταρομετρία ροής την αύξηση με τη δράση της HU την βλέπω κυρίως παρουσία SCF και απουσία του απλά διατηρούνται τα επίπεδα σταθερά.

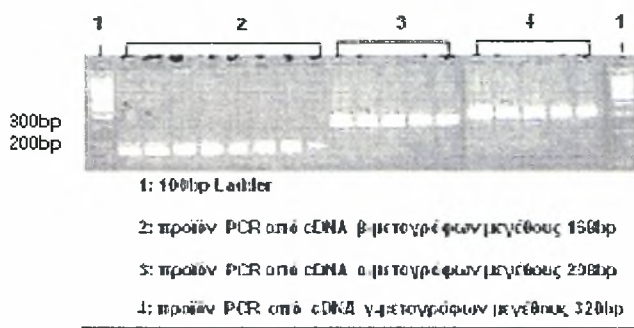
3.4. Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων σφαιρίνης.

Η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων των σφαιρινών έγινε σε CD34⁺ φυσιολογικά κύτταρα παρουσία διαφορετικών συνδυασμών των παραγόντων HU, Epo και SCF για διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Η υδροξυουρία, προστίθεται στα κύτταρα στο στάδιο της προερυθροβλάστης (5^η ημέρα καλλιέργειας), παραμένει για μία ή τρεις ημέρες με συνεχόμενη δράση ή με παλμό και ακολούθως απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό που περιέχει την HU και η καλλιέργεια συνεχίζεται για 1 ή 3 ημέρες σε νέο υλικό. Η συλλογή των κυττάρων γίνεται την 6^η και 8^η ημέρα της καλλιέργειας.

Αρχικά έγινε ανίχνευση και ταυτοποίηση των γονιδίων σφαιρίνης. Στη συνέχεια ποσοτικός προσδιορισμός αυτών με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης των παραγόντων στα γονίδια σφαιρινών και κατ' επέκταση στην παραγωγή των αιμοσφαιρινών F και A με τελικό στόχο τη μελέτη των μηχανισμών δράσης της HU στα γονίδια των σφαιρινών.

3.4.1. Ποιοτική έκφραση των γονιδίων σφαιρινών.

Τα cDNA των δειγμάτων-κυττάρων που απομονώθηκαν από τις καλλιέργειες με τις διαφορετικές παραμέτρους (HU 100μg/ml για 1 ή 3 ημέρες, Epo 4u/ml και SCF 100ng/ml) ενισχύθηκαν για τα α-, β- και γ-γονίδια σφαιρινών (Εικόνα 3.10). Συγκεκριμένα στην Εικόνα 3.10 παρουσιάζουμε το αποτέλεσμα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και για τα τρία γονίδια όπου αναγνωρίζουμε αρχικά την καλή ποιότητα του παραγόμενου cDNA και την ύπαρξή του αντίστοιχου mRNA στο δείγμα μας.



Εικόνα 3.10: Αποτύπωση των προϊόντων PCR για τα β- (2), α- (3) και γ-γονίδια σφαιρινών (4) σε φυσιολογικά CD34⁺ κύτταρα μετά την προσθήκη διαφορετικών παραμέτρων. Μάρτυρας μεγέθους ζωνών (1): 100bp ladder.

3.4.2. Επίδραση της υδροξυουρίας (HU) στα γονίδια σφαιρινών.

3.4.2.1. Ποσοτικοποίηση των mRNA μεταγράφων των γονιδίων των σφαιρινών

γ-mRNA μετάγραφα

Μετά την προσθήκη της υδροξυουρίας (HU) στις καλλιέργειες σε συγκεντρώσεις 25μM, 50μM, 100μM και 300μM ακολούθησε η ποσοτικοποίηση των γ-mRNA μεταγράφων.

Οι δύο μικρότερες συγκεντρώσεις (25μM και 50μM) HU μετά από δράση μίας ή τριών ημερών δεν επηρέασαν τα επίπεδα των γ-mRNA μεταγράφων και για το λόγο αυτό δεν χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω (Πίνακας 3.7).

	γ / h-HPRT mRNA	Μεταβολή
κύτταρα-μάρτυρες	0.41	
κύτταρα+ HU 25μM (1d)	0.35	x 0.86
κύτταρα+ HU 50μM (1d)	0.35	x 0.83
κύτταρα-μάρτυρες	0.90	
κύτταρα+ HU 25μM (3d)	0.93	x 1.02
κύτταρα+ HU 50μM (3d)	0.91	x 1.01

Πίνακας 3.7: Επίδραση HU (25μM και 50μM) για 1 και 3 ημέρες στα επίπεδα των γ-mRNA μεταγράφων

Στα πειράματα με συνεχόμενη δράση, η HU (100 και 300 μM) προστίθεται για 1 και 3 ημέρες και τα κύτταρα συλλέγονται την 6^η και 8^η ημέρα της καλλιέργειας, αντίστοιχα. Την 6^η ημέρα (1 ημέρα δράσης HU) τα κύτταρα παρουσιάζουν αύξηση του ποσοστού έκφρασης των γ -mRNA μεταγράφων κατά 1.25 φορές και 1.23 φορές, αντίστοιχα. Την 8^η ημέρα (3 ημέρες δράσης HU), τα επίπεδα των γ -mRNA μεταγράφων είναι 1.84 φορές αυξημένα και 1.22 φορές μειωμένα μετά από δράση 100 μM και 300 μM HU, αντίστοιχα (Πίνακας 3.8).

	γ /h-HPRT mRNA					
	6η ημέρα καλλιέργειας			8η ημέρα καλλιέργειας		
	1d			3d		
N=3	control	100 μM HU	300 μM HU	control	100 μM HU	300 μM HU
Average	11.90	14.81	14.65	24.68	45.36	20.20
S.D.	5.50	8.10	0.50	1.60	7.10	1.90
Fold		1.25 \uparrow	1.23 \uparrow		1.84 \uparrow	1.22 \downarrow
	γ /h-HPRT mRNA					
	8η ημέρα καλλιέργειας			12η ημέρα καλλιέργειας		
	(1d) HU wash ->+2d			(1d) HU wash ->+6d		
	control	100 μM HU	300 μM HU	control	100 μM HU	300 μM HU
Average	24.68	51.33	37.02	20.20	35.96	35.15
S.D.	1.70	10.80	4.80	4.90	5.30	5.60
Fold		2.10 \uparrow	1.50 \uparrow		1.78 \uparrow	1.74 \uparrow

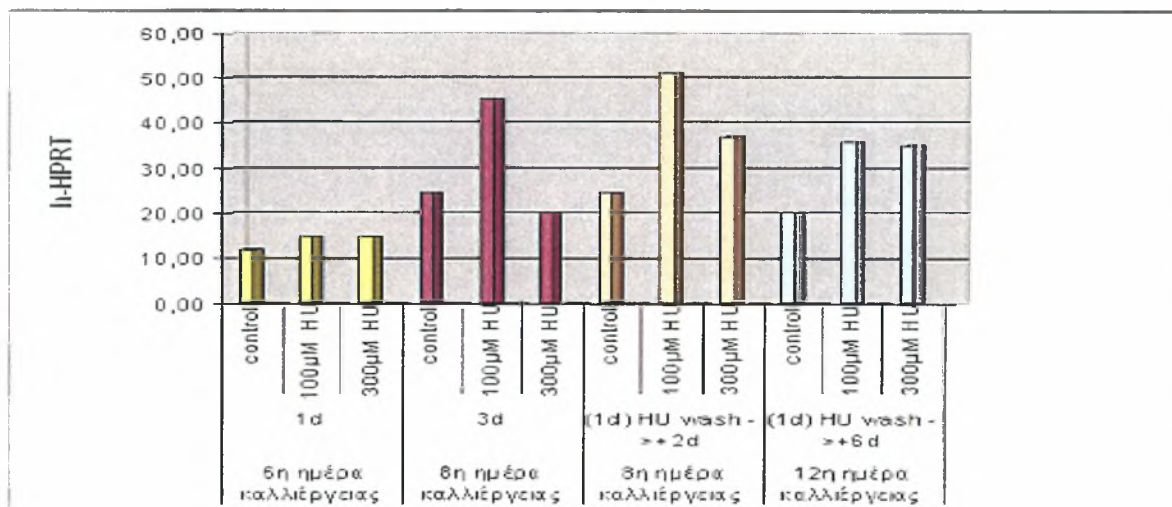
Πίνακας 3.8: Επίδραση HU στην έκφραση του γ γονιδίου σφαιρίνης είτε μετά από συνεχή δράση για 1 και 3 ημέρες είτε με παλμό (δράση HU 1 ημέρα και συλλογή κυττάρων μετά από 2 και 6 ημέρες)

Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι η επίδραση 100 μM HU οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων των γ μεταγράφων τόσο μετά από 1 όσο και μετά από 3 ημέρες δράσης, αν και η σημαντικότερη αύξηση παρατηρείται μετά την προσθήκη 100 μM HU για 3 ημέρες. Για την υψηλότερη συγκέντρωση HU (300 μM), η μία ημέρα προσθήκη HU αυξάνει επίσης τα επίπεδα των γ -mRNA μεταγράφων σε μικρότερο όμως ποσοστό από αυτό της

συγκέντρωσης 100 μ M HU. Η επίδραση για 3 ημέρες έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης του γ γονιδίου. Είναι επομένως φανερό ότι η HU έχει χρόνο- και δόσο-εξαρτώμενη επίδραση στα επίπεδα των γ -mRNA μεταγράφων (Εικόνα 3.11).

Η δράση της HU με παλμό μελετήθηκε στα κύτταρα όπου η HU προστέθηκε την 5^η ημέρα καλλιέργειας, παρέμεινε για 1 ημέρα, ακολούθησε έκπλυση των κυττάρων και επανακαλλιέργεια για 2 και 6 ημέρες (κύτταρα συλλέγονται την 8^η και 12^η ημέρα καλλιέργειας, αντίστοιχα). Τα επίπεδα των γ -mRNA μεταγράφων, μετά την επίδραση 100 μ M HU με παλμό για 1 ημέρα και συλλογή κυττάρων την 8^η ημέρα καλλιέργειας, αυξάνονται κατά 2.1 φορές (Πίνακας 3.8, Εικόνα 3.11).

Τη 12^η ημέρα καλλιέργειας, 1 ημέρα δράση HU και 6 ημέρες επανακαλλιέργειας, ο αριθμός των γ -mRNA μεταγράφων είναι επίσης αυξημένος, αν και τα κύτταρα βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο ωρίμανσης και παρατηρείται μία μικρή μείωση της έκφρασης του γ γονιδίου στα κύτταρα-μάρτυρα.



Εικόνα 3.11: Επίδραση 100 μ M και 300 μ M HU για 1 και 3 ημέρες μετά από συνεχή δράση ή με παλμό στον αριθμό των γ -mRNA μεταγράφων.

Η επίδραση 300 μ M HU με παλμό, 1 ημέρα δράση και συλλογή 2 ημέρες αργότερα (8^η ημέρα της καλλιέργειας), επέφερε αύξηση των επιπέδων των γ -mRNA μεταγράφων κατά 1.5 φορές. Τη 12^η ημέρα της καλλιέργειας, 1 ημέρα δράση 300 μ M HU και επανακαλλιέργεια για 6 ημέρες, η έκφραση του γ γονιδίου συνεχίζει να παραμένει σε υψηλά επίπεδα (Πίνακας 3.8, Εικόνα 3.11), αν και η αύξηση που παρατηρείται είναι μικρότερη από την αντίστοιχη με προσθήκη 100 μ M HU.

Επομένως, η προσθήκη HU σε συγκέντρωση 100μM είτε με συνεχή δράση είτε με παλμό προκαλεί τη μεγαλύτερη αύξηση στα γ-mRNA μετάγραφα και με τη μικρότερη κυτταροτοξική δράση και για το λόγο αυτό επιλέγεται ως η πλέον χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση στην πειραματική διαδικασία της εργασίας αυτής.

β-mRNA μετάγραφα

Η έκφραση των β-mRNA μεταγράφων την 6^η ημέρα καλλιέργειας, μετά από μία ημέρα δράσης της 100μM HU, είναι παρόμοια με αυτή των κυττάρων-μάρτυρα (αύξηση 1.1 φορές). Η αύξηση των β-mRNA μεταγράφων την 8^η ημέρα της καλλιέργειας όπου λαμβάνουμε κύτταρα μετά από συνεχή δράση 100μM HU για 3 ημέρες ή μετά από δράση με παλμό (1 ημέρα παραμονής του φαρμάκου, έκπλυση κυττάρων και επανακαλλιέργεια για ακόμα δύο ημέρες) είναι 1.45 και 1.5 φορές, αντίστοιχα. Τη 12^η ημέρα μετά από δράση με παλμό (μία ημέρα παραμονής του φαρμάκου και στη συνέχεια έκπλυση και επανακαλλιέργεια για 6 ημέρες) επιτυγχάνεται ποσοστό αύξησης των β-mRNA μεταγράφων κατά 1.9 φορές.

α-mRNA μετάγραφα

Παρόμοια εικόνα λαμβάνουμε για τη μεταβολή των α-mRNA μεταγράφων μετά από μία ημέρα δράσης 100μM HU. Η έκφραση των α-mRNA μεταγράφων την 6^η ημέρα καλλιέργειας είναι μόνο κατά 1.15 φορές μεγαλύτερη. Την 8^η ημέρα της καλλιέργειας λαμβάνουμε κύτταρα μετά από συνεχή δράση 100μM HU για 3 ημέρες ή μετά από δράση με παλμό (1 ημέρα παραμονής του φαρμάκου, έκπλυση κυττάρων και επανακαλλιέργεια για δύο επιπλέον ημέρες). Και στις δύο περιπτώσεις η αύξηση των επιπέδων των α-mRNA μεταγράφων είναι 1.28 και 2.09 φορές, αντίστοιχα. Την 12^η ημέρα μετά από δράση με παλμό (μία ημέρα παραμονής του φαρμάκου και στη συνέχεια έκπλυση και επανακαλλιέργεια για 6 ημέρες) επιτυγχάνεται ποσοστό αύξησης των α-mRNA μεταγράφων κατά 1.63 φορές.

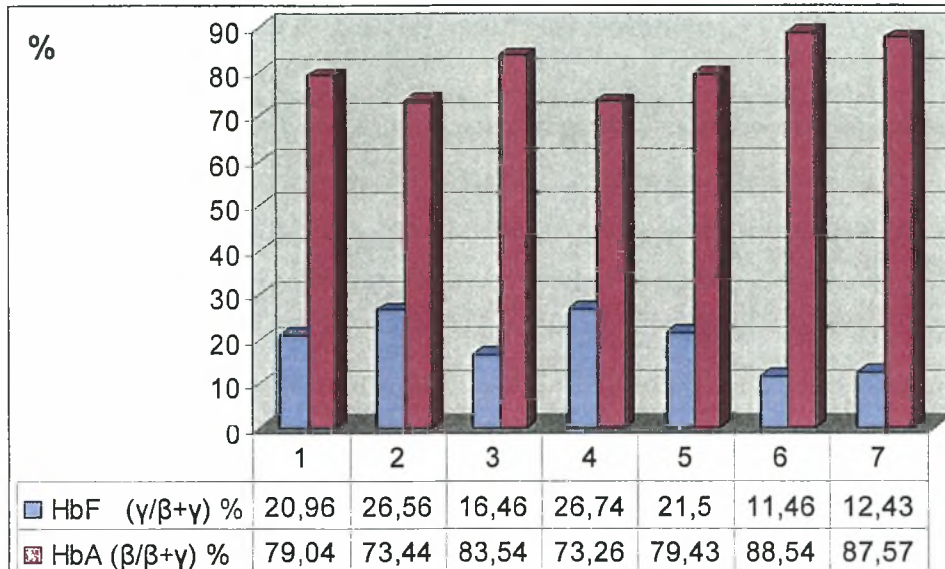
3.4.3. Επίδραση της HU στην παραγωγή αιμοσφαιρινών HbF και HbA.

Όπως είναι γνωστό, η έκφραση του καθενός γονιδίου των σφαιρικών αλυσίδων δεν είναι ανεξάρτητη και με βάση τη βιβλιογραφία ⁽¹⁰⁸⁾ υποστηρίζεται ότι σε προχωρημένο στάδιο καλλιέργειας (ημέρα 12-14) η μεταβολή του λόγου των $\gamma/\gamma+\beta$ μεταγράφων είναι παρόμοια με την έκφραση πρωτεΐνης ως % ποσοστό HbF/HbA+HbF. Επομένως, η επίδραση της HU στην παραγωγή των HbF και HbA μπορεί να μελετηθεί ως πηλίκο του αριθμού των γ - και β -mRNA μεταγράφων προς το σύνολο των μεταγράφων β τύπου, ($\gamma/\beta+\gamma$) και ($\beta/\beta+\gamma$), αντιστοίχως.

Η παραγωγή της HbF, όπως αυτή εκφράζεται από το λόγο ($\gamma/\beta+\gamma$) μεταγράφων, αυξάνεται 1.3 και 1.05 φορές μετά από συνεχή επίδραση 100 μ M HU για 1 και 3 ημέρες, αντίστοιχα. Η επίδραση 100 μ M HU με παλμό φαίνεται να επηρεάζει περισσότερο την παραγόμενη HbF (1.62 φορές). Οπότε η πρώτη ημέρα δράσης της υδροξουρίας (HU) οδηγεί σε αύξηση της παραγόμενης HbF (Εικόνα 3.12).

Η παραγόμενη HbA, ως ο λόγος $\beta/\beta+\gamma$ μετάγραφα, από τα φυσιολογικά CD34⁺ κύτταρα μετά τη δράση 100 μ M HU για 1 και 3 ημέρες είναι 74% και 79% ενώ για τους μάρτυρες είναι 80% και 83%, αντίστοιχα. Παρόμοια επίπεδα έκφρασης HbA με τα κύτταρα-μάρτυρας παρατηρούνται και στις καλλιέργειες που προστέθηκε 100 μ M HU με παλμό και συλλογή κυττάρων είτε 2 είτε 4 ημέρες μετά την προσθήκη HU (Εικόνα 3.12).

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι μία ημέρα δράσης 100 μ M HU με παλμό αυξάνει τα επίπεδα των παραγόμενων γ -mRNA μεταγράφων και η αύξηση αυτή αντιστοιχεί σε παραγωγή HbF υψηλότερη κατά 1,6 φορές. Αντιθέτως δεν επηρεάζει την HbA ($\beta/\beta+\gamma$). Η εικόνα της αύξησης που λαμβάνουμε μελετώντας μεμονωμένα την παραγωγή των β -μεταγράφων δεν αντιστοιχεί σε αύξηση της HbA. Με την πάροδο των ημερών και την ωρίμανση της καλλιέργειας αυξάνονται ασφαλώς τα επίπεδα των παραγόμενων β -μεταγράφων αλλά με την επίδραση της υδροξουρίας προιμοδοτείται το γ γονίδιο και η παραγόμενη εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη.



		Πίνακας 3.9	HbF (γ/β+γ) %	HbA (β/β+γ) %	Μεταβολή γ	Μεταβολή β
1	d6	control w/o HU	20,96	79,04		
2	d6	100μM(1d) HU	26,56	73,44	1,27	1,08
3	d8	control w/o HU	16,46	83,54		
4	d8	100HU (1d)-> wash +2d	26,74	73,26	1,62	1,14
5	d8	100HU 3d	21,5	79,43	1,31	1,05
6	d12	control w/o HU	11,46	88,54		
7	d12	100HU (1d)-> wash +4d	12,43	87,57	1,08	1,01

Εικόνα 3.12: Επίδραση HU 100μM για 1 και 3 ημέρες είτε με συνεχόμενη δράση είτε με παλμό στις παραγόμενες HbF και HbA αιμοσφαιρίνες [εκφραζόμενες ως γ/(β+γ) και β/(β+γ), αντίστοιχα] σε φυσιολογικά CD34⁺ κύτταρα.

3.4.4. Επίδραση της υδροξυουρίας (HU) στους μηχανισμούς μετα-μεταγραφικής τροποποίησης των β- και γ-μεταγράφων σφαιρίνης.

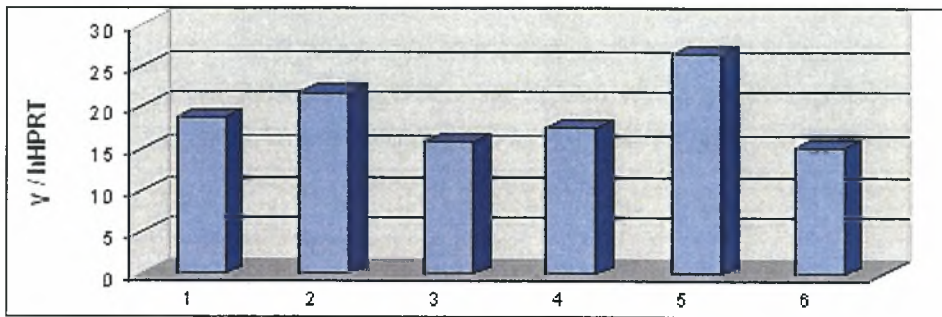
Για τη μελέτη της επίδρασης της HU σε επίπεδο μετα-μεταγραφικής τροποποίησης είναι απαραίτητη η χρήση της ακτινομυκίνης D (act D), αναστολέα της μεταγραφής.

Αρχικά προστίθεται 100μM HU για 1 και 2 ημέρες και ακολουθεί η χορήγηση ακτινομυκίνης για 1, 2, 4, 24 και 48 ώρες (act-D: 4μg/ml). Ακολουθεί απομόνωση κυτταροπλασματικού RNA και ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων σφαιρίνης.

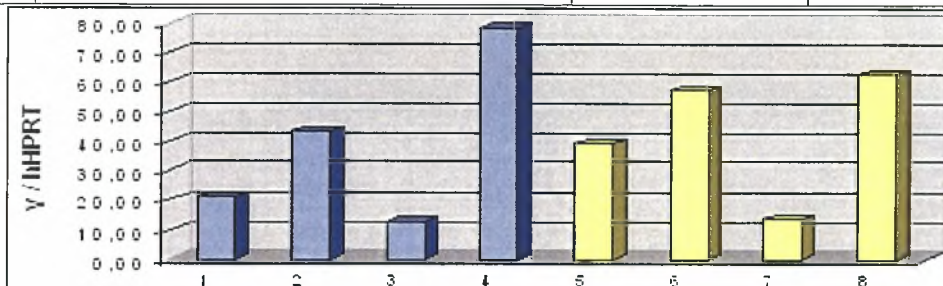
Για τις πρώτες δύο ώρες δεν παρατηρείται μεταβολή στα επίπεδα των παραγόμενων γ-mRNA μεταγράφων. Στα κύτταρα που προστίθεται 100μM HU για 1 ημέρα και ακολουθεί δράση της ακτινομυκίνης για 4 ώρες παρατηρείται μικρή αύξηση των επιπέδων των γ-μεταγράφων (HU/ HU + act-D: 1.16 / 1.40) (Πίνακας 3.10, Εικόνα 3.13A).

Παράλληλα μελετάται η δράση της ακτινομυκίνης για 24 και 48 ώρες στα κύτταρα όπου έχει προστεθεί 100μM HU για 2 ημέρες, οπότε λαμβάνουμε κύτταρα με συνολική δράση HU για 3 και 4 ημέρες, αντίστοιχα (Πίνακας 3,11, Εικόνα 3.13B). Στα κύτταρα όπου υπάρχει μόνο η δράση της ακτινομυκίνης για 24 και 48 ώρες είναι σαφής η μείωση των γ-μεταγράφων (Εικόνα 3.13B No3 και No7). Κατά το πρώτο 24ωρο της αναστολής της μεταγραφής, παρατηρείται μία μείωση των γ-μεταγράφων (1.67 φορές), ενώ μεγαλύτερη επίπτωση παρατηρούμε μετά από 48 ώρες δράση της ακτινομυκίνης, όπου η παραγωγή των γ-μεταγράφων ελαττώνεται σημαντικά (2.88 φορές).

Στα κύτταρα που χορηγείται ταυτόχρονα HU και ακτινομυκίνη (24 hrs) παρατηρείται μία επιπλέον αύξηση του αριθμού των γ-μεταγράφων από αυτή που παρατηρείται στα κύτταρα με προσθήκη μόνο HU (1.82 φορές). Η παραμονή της ακτινομυκίνης για 48 ώρες στα κύτταρα που έχει προστεθεί HU δεν προκαλεί ουσιαστική μεταβολή στην έκφραση (1.1 φορές) των γ-mRNA μεταγράφων σε σχέση με τα κύτταρα με HU για 4 ημέρες, αν και παρατηρείται μεγάλη μείωση αριθμού κυττάρων μετά τη δράση της act-D για 48 ώρες (Πίνακας 3.11, Εικόνα 3.13B).



A	Πίνακας 3.10	γ / h-HPRT	Μεταβολή
1	control	18,96	
2	100μM HU (1d)	21,96	1,16↑
3	100μM HU (1d)+ act 1h	16,01	1,18↓
4	100μM HU (1d)+ act 2h	17,61	1,08↓
5	100μM HU (1d)+ act 4h	26,55	1,40↑
6	control + act 4h	15,17	1,25↓

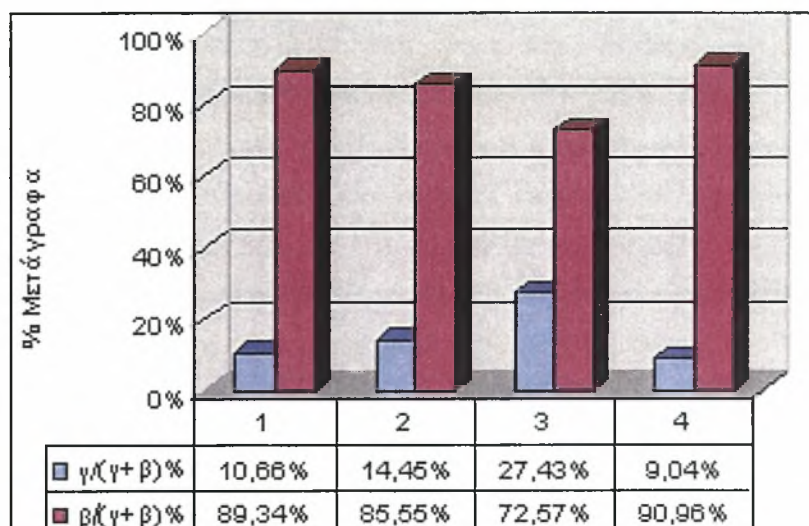


B	Πίνακας 3.11	γ/h-HPRT	Μεταβολή HU/control	Μεταβολή λόγο Act
1	control (3d)	21,01		
2	100 HU(3d)	43,17	2,05↑	
3	control + act 24h (3d)	12,61		1,67↓
4	100 HU(2d)+ act 24h (3d)	78,75	6,25↑	1,82↑
5	control (4d)	39,3		
6	100 HU (4d)	57,3	1,46↑	
7	control + act 48h (4d)	13,65		2,88↓
8	100 HU (2d) + act 48h (4d)	62,9	4,61↑	1,10↑

Εικόνα 3.13: Μεταβολή των επιπέδων των γ-mRNA μεταγράφων μετά από επίδραση ακτινομυκίνης για 1-4h (A) , 24 και 48h (B) σε CD34⁺ φυσιολογικά κύτταρα που αρχικά χορηγήθηκε 100μM HU για 1 και 2 ημέρες

Με την έκφραση των γ -mRNA μεταγράφων ως πηλίκο γ/β , μετά την επίδραση HU και act-D στα κύτταρα, λαμβάνουμε παρόμοια αποτελέσματα (Πίνακας 3.12, Εικόνα 3.14). Η αντίστοιχη μελέτη στα β -mRNA μεταγράφα, εκφραζόμενα ως πηλίκο β/β , δεν έδειξε να επηρεάζεται από τη δράση της ακτινομυκίνης.

Η προσθήκη 300 μ M HU με παράλληλη προσθήκη ακτινομυκίνης στα κύτταρα είχε μεγάλη τοξική επίδραση, με σημαντική μείωση τόσο στον αριθμό των κυττάρων όσο και στον αριθμό των μεταγράφων.



	Πίνακας 3.12	$\beta /$ GAPDH	μεταβολή (x φορές)	$\gamma /$ h-HPRT	μεταβολή (x φορές)	$\gamma /$ ($\gamma+\beta$)%	$\beta /$ ($\gamma+\beta$)%	Μεταβολή γ (x φορές)	Μεταβολή β (x φορές)
1	control (3d)	111,27		13,28		10,66%	89,34%		
2	+100HU(3d)	141,68	1,27 \uparrow	23,93	1,80 \uparrow	14,45%	85,55%	1,36 \uparrow	1,04 \downarrow
3	+100HU(2d) + act 24 h	210,78	1,89 \uparrow	79,68	6,0 \uparrow	27,43%	72,57%	2,57 \uparrow	1,23 \downarrow
4	control + act 24h	84,57	1,32 \downarrow	8,4	1,58 \downarrow	9,04%	90,96%	1,18 \downarrow	1,02 \uparrow

Εικόνα 3.14: Μελέτη της επίδρασης 100 μ M HU για 3 ημέρες και παράλληλη δράση ακτινομυκίνης D για 24 ώρες στην έκφραση των γ - και β -μεταγράφων.

3.4.5. Επίδραση της υδροξυουρίας στη μετάφραση των γονιδίων σφαιρίνης.

Η χρήση HU σε ασθενείς, όπως είναι γνωστό, οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (HbF) και για το λόγο αυτό μελετούμε την πιθανή δράση της HU στο στάδιο της μετάφρασης των γ -mRNA μεταγράφων. Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιούμε έναν αναστολέα της πρωτεϊνσύνθεσης, την κυκλοεξαμίδη (CX).

Τα CD34⁺ κύτταρα περιφερικού αίματος φυσιολογικών αιμοδοτών καλλιεργούνται όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως και την 5^η ημέρα χορηγείται 100 μ M HU. Μετά από 24 ώρες δράσης της προστίθεται κυκλοεξαμίδη (10 μ g/ml), η οποία παραμένει στα κύτταρα για 15 ώρες και ακτινομυκίνη D (4 μ g/ml) για 5 και 24 ώρες. Οι συνδυασμοί των παραγόντων που έχουν χρησιμοποιηθεί φαίνονται στην Εικόνα 3.15.

Καθώς η δράση της HU ξεκινά την 5^η ημέρα και μετά την παρέλευση των 24 ωρών προστίθεται CX η οποία παραμένει για 15 ώρες ακόμη, η συλλογή των κυττάρων θα γίνει την 7^η ημέρα όπου η δράση της HU παραμένει για 2 ημέρες. Το ίδιο ισχύει και για τα δείγματα που λαμβάνουν επιπρόσθετα και 5 ώρες ακτινομυκίνη. Εάν μετά τη δράση των προαναφερόμενων παραγόντων εξακολουθήσουμε με δράση ακτινομυκίνης για 24 ώρες, τελικά η συλλογή των κυττάρων θα γίνει την 8^η ημέρα και η HU θα έχει δράσει 3 ημέρες. Τα κύτταρα συλλέγονται την ημέρα 7 και 8 της καλλιέργειας, απομονώνεται κυτταροπλασματικό RNA και γίνεται ανίχνευση των μεταγράφων των γ γονιδίων.

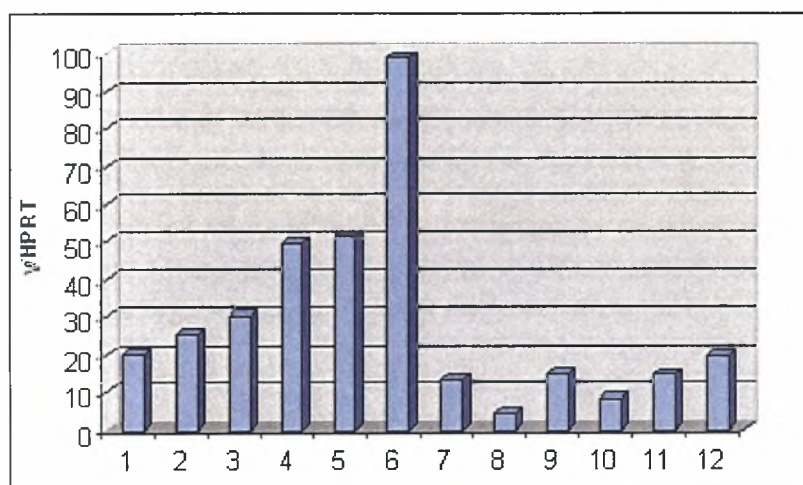
Η μεταβολή του πηλίκου γ/h -HPRT για τα δείγματα που λαμβάνουν HU και ακτινομυκίνη είναι όπως προηγούμενα αναφέρθηκαν (Εικόνα 3.15). Παρατηρείται τόσο το φαινόμενο ενίσχυσης της παραγωγής των γ -μεταγράφων μετά την προσθήκη HU (1,5 και 1,96 φορές, αντίστοιχα, για τις 2 και 3 ημέρες δράσης HU), όσο και η σταθεροποιητική της δράση μετά την προσθήκη act-D (αύξηση κατά 2,53 και 3,90 φορές, αντίστοιχα, για 2 και 3 ημέρες δράσης HU).

Τα δείγματα που λαμβάνουν HU, ακτινομυκίνη και CX συγκρινόμενα με τους μάρτυρες που δεν έχουν λάβει καμία επίδραση και έχουν την ίδια ανάπτυξη εμφανίζουν πτώση στην έκφραση του γ γονιδίου. Μεγαλύτερη πτώση (κατά 5,74 φορές) έχουμε στο μάρτυρα 8 [control (1d)+CX (15+24)] όπου παραμένει CX το μεγαλύτερο διάστημα (Εικόνα 3.15).

Μελετώντας τα δείγματα που λαμβάνουν CX και λαμβάνοντας ως μάρτυρες για τα δύο στάδια ανάπτυξης τους μάρτυρες 7 [control (1d)+CX (15+5)] και 8 [control (1d)+CX (15+24)] παρατηρούμε ότι μετά την προσθήκη HU για 2 και 3 ημέρες τα γ -mRNA μετάγραφα παραμένουν περίπου ίδια ή παρατηρείται μία μικρή αύξηση (κατά 1,12 και

1,89 φορές, αντίστοιχα), οπότε η HU φαίνεται να μην επηρεάζει μεταφραστικά την παραγωγή του γ γονιδίου. Η περαιτέρω αύξηση των επιπέδων των γ-μεταγράφων παρουσία HU και ταυτόχρονη προσθήκη CX αλλά και act-D (δείγμα 12/δείγμα 10, Εικόνα 3.15) μπορεί να αποδοθεί στη δράση της υδροξυουρίας σε επίπεδο μεταγραφής και μετα-μεταγραφικής ωρίμανσης, αν και σε λίγες ώρες δράσης act-D (5 ώρες, δείγμα 11), δε φαίνεται έντονη η σταθεροποιητική δράση της HU.

Είναι επομένως φανερό ότι το σταθεροποιητικό αποτέλεσμα της υδροξυουρίας επιτυγχάνεται χωρίς τη μεσολάβηση κανενός πρωτεϊνοσυνθετικού μηχανισμού, καθώς η διακοπή της μετάφρασης δεν επηρέασε τη δράση του παράγοντα.



		μεταβολή των γ μεταγράφων ως προς τους μάρτυρες 1 και 2	μεταβολή των γ μεταγράφων ως προς τους μάρτυρες που λαμβάνουν CX (7 και 8)
1	control (1d+15h+5h)	20,37	
2	control (1d+15h+24h)	25,39	
3	100 HU (1d+15h 5h)	30,48	1,50
4	100 HU (1d+15h 24h)	49,53	1,95
5	100 HU (1d + 15h) + act 5h	51,64	2,53
6	100 HU (1d + 15h) + act 24h	98,92	3,90
7	control (1d) + cycloheximide (15h+5h)	13,42	1,52
8	control (1d) + cycloheximide (15h + 24h)	4,41	5,74
9	100 HU (1d) + cycloheximide (15h) + 5h	15,03	1,36
10	100 HU (1d) + cycloheximide (15h + 24h)	8,35	3,03
11	100 HU (1d) + cycloheximide (15h) + act 5h	14,77	1,39
12	100 HU (1d) + cycloheximide (15h) + act 24h	19,53	1,29

Εικόνα 3.15: Μελέτη των μηχανισμών δράσης της HU στην έκφραση των γ-mRNA μεταγράφων μετά από την επίδραση act-D και CX.

3.4.6. Επίδραση της παρουσίας των κυτταροκινών, SCF και Epo στην έκφραση των γονιδίων σφαιρινών.

Η επίδραση των δύο βασικών κυτταροκινών της ερυθροποίησης (SCF και Epo) μελετήθηκε χωριστά η κάθε μία ή και σε συνδυασμό μεταξύ τους και με την παρουσία της HU στην έκφραση των γονιδίων β τύπου σφαιρινών (γ- και β-γονίδια).

Στην καλλιέργεια προστίθεται 4u/ml Epo και 100ng/ml SCF και την 5^η ημέρα προστίθεται 100μM HU για 1 ημέρα. Παράλληλα καλλιεργούνται κύτταρα-μάρτυρες χωρίς την προσθήκη HU και SCF. Η πρώτη συλλογή κυττάρων γίνεται την 6^η ημέρα της καλλιέργειας και ένα τμήμα των κυττάρων από όλους τους συνδυασμούς εκπλένονται και επανακαλλιεργούνται σε νέο θρεπτικό υλικό για επιπλέον 6 ημέρες (12^η ημέρα καλλιέργειας). Σε ορισμένους συνδυασμούς (δείγματα 9-12) αυξάνεται η συγκέντρωση της χορηγούμενης ερυθροποιητίνης σε 10u/ml. Τη 12^η ημέρα της καλλιέργειας συλλέγονται κύτταρα από όλους τους συνδυασμούς με τους αντίστοιχα κύτταρα-μάρτυρες και ακολουθεί ποσοτικοποίηση των γ- και β- μεταγράφων.

Στον πίνακα 3.13 παρουσιάζεται η μεταβολή που παρατηρείται στα β- και γ-μετάγραφα σε κύτταρα-μάρτυρες καθώς και σε κύτταρα που λαμβάνουν HU, σε σχέση με την παρουσία και την απουσία του SCF. Τα γ-μετάγραφα εκφραζόμενα ως (γ/γ+β) αυξάνονται μετά από την προσθήκη του SCF. Συγκεκριμένα στα κύτταρα-μάρτυρας που προστίθεται 4u/ml Epo και συλλέγονται την 6^η ημέρα της καλλιέργειας η προσθήκη SCF αυξάνει τα επίπεδα των γ-mRNA μεταγράφων κατά 1.15 φορές. Τα επίπεδα των γ-mRNA μεταγράφων στα κύτταρα αυξάνονται περαιτέρω (1.44%) μετά από την προσθήκη 100μM HU για μία ημέρα.

Τη 12^η ημέρα καλλιέργειας, τα επίπεδα των γ-mRNA μεταγράφων στα κύτταρα παρουσία SCF είναι αυξημένα κατά 2.84-φορές σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρας και 3.85-φορές μετά από την παράλληλη δράση 100μM HU και Epo 4u/ml (Πίνακας 3.13).

Η μεγαλύτερη συγκέντρωση Epo (10u/ml) και η παρουσία του SCF αυξάνει την έκφραση του γ γονιδίου (x 6.25 φορές) σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρας. Η παρουσία SCF και HU στα κύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία Epo 10u/ml προκαλεί αύξηση των γ-mRNA μεταγράφων 5.75-φορές (Πίνακας 3.13).

Τα μικρότερα επίπεδα των γ-mRNA μεταγράφων απαντώνται στα κύτταρα-μάρτυρας που απουσιάζει ο SCF και τα κύτταρα συλλέγονται σε προχωρημένο στάδιο ανάπτυξης ερυθροβλαστών (12^η ημέρα καλλιέργειας). Η αύξηση της συγκέντρωσης της EPO από 4 σε 10u/ml επηρεάζει την παραγωγή των γ-mRNA μεταγράφων (αύξηση κατά 2.15

φορές) μόνο παρουσία του SCF στα κύτταρα-μάρτυρας. Η παρουσία HU και η αύξηση της συγκέντρωσης της Epo απουσία και παρουσία του SCF επηρεάζουν τα γ -mRNA μετάγραφα κατά 1.30 και 1.94 φορές, αντίστοιχα (Πίνακας 3.13).

Τα επίπεδα των β -mRNA μεταγράφων ($\beta/\gamma+\beta$) παραμένουν σταθερά ή μειώνονται μετά την προσθήκη SCF στους διάφορους συνδυασμούς που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Η παράλληλη δε δράση 100 μ M HU με 100ng/ml SCF και αυξημένη συγκέντρωση Epo(10u/ml) είχε ως αποτέλεσμα την μείωση των β -μεταγράφων κατά 1.51 φορές, συγκρινόμενο με τον μάρτυρα που δεν λαμβάνει SCF (Πίνακας 3.13).

	1	2	4	5	6	7	8	9
d 6	v/ HPRT	β / G6PDH	γ / (γ+β)	β / (γ+β)	Μεταβολή γ-mRNA λόγω SCF	Μεταβολή β-mRNA λόγω SCF	Μεταβολή γ-mRNA λόγω Epo	Μεταβολή β-mRNA λόγω Epo
control w/o HU w/o SCF, Epo 4u	85,62	573,04	13,00%	87,00%				
control w/o HU with SCF, Epo 4u	39,74	226,79	14,91%	85,09%	1,15 ↑	1,02 ↓		
100HU (1d) w/o SCF, Epo 4	119,87	798,31	13,06%	86,94%				
100HU (1d) with SCF, Epo 4	92,3	398,2	18,82%	81,18%	1,44 ↑	1,07 ↓		
d12								
control w/o HU w/o SCF, Epo 4u	80,54	1987,34	3,89%	96,11%				
control w/o HU with SCF, Epo 4u	27,35	219,92	11,06%	88,94%	2,84 ↑	1,08 ↓		
100HU (1d) w/o SCF, Epo 4	199,9	3704,3	5,12%	94,88%				
100 HU(1d) with SCF, Epo 4u	104,4	425,03	19,72%	80,28%	3,85 ↑	1,18 ↓		
control w/o HU w/o SCF, Epo 10u	106,84	2702,63	3,80%	96,20%			1,02 ↓	1,00 ↓
control w/o HU with SCF, Epo 10u	36,28	116,15	23,80%	76,20%	6,26 ↑	1,26 ↓	2,15 ↑	1,17 ↓
100 HU(1d) w/o SCF, Epo 10u	285,7	3998,6	6,67%	93,33%			1,30 ↑	1,02 ↓
100 HU(1d) with SCF, Epo 10u	291,59	469,12	38,33%	61,67%	5,75 ↑	1,51 ↓	1,94 ↑	1,30 ↓

Πίνακας 3.13: Μεταβολή των επιπέδων των β- και γ-mRNA μεταγράφων [(β/γ+β) και (γ/γ+β)] παρουσία ή απουσία HU (100μM) και SCF (100ng/ml) και παρουσία Epo (4 και 10u/ml).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η διαδικασία της ερυθροποίησης στον άνθρωπο αποτελεί μια πολύ βασική λειτουργία με σημαντικές αλλαγές στη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης στα διαφορετικά οντογενετικά στάδια του ανθρώπου. Η παραμονή ασυνήθιστων υψηλών επιπέδων εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης μετά τη γέννηση είναι γνωστό ότι επηρεάζει τα κλινικά συμπτώματα ασθενών με αιμοσφαιρινοπάθειες. ^(144, 108) Για το λόγο αυτό, πληθώρα ερευνητών έχουν εστιάσει το ενδιαφέρον τους στην εύρεση νέων φαρμακευτικών ουσιών-επαγωγέων της HbF. ⁽¹⁴⁵⁾ Η προσπάθεια αυτή έχει ως αποτέλεσμα την εύρεση πολλών ουσιών που επάγουν την παραγωγή της HbF, όπως κυτταροτοξικά φάρμακα που δρουν είτε απευθείας στη μεταγραφή του γ γονιδίου σφαιρίνης είτε έμμεσα μέσω της αύξησης του πολλαπλασιασμού των ερυθροκυττάρων. ^(146,147) Οι δυσκολίες που παρουσιάζονται λόγω της χρήσης των φαρμάκων αυτών-επαγωγέων της HbF-, όπως κυτταροτοξικότητα, καρκινογένεση, διαφορετική ανταπόκριση των ασθενών, χρόνος και τρόπος θεραπείας έχουν οδηγήσει στην αναζήτηση νέων αποτελεσματικότερων, οικονομικότερων και εύκολα προσβάσιμων θεραπευτικών προσεγγίσεων των θαλασσαιμιών. ⁽⁶⁵⁾ Η πολυετής έρευνα έχει ως στόχο τόσο την αναζήτηση νέων χημικών ουσιών, ενεργοποιητών της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης, όσο και την πλήρη κατανόηση του μηχανισμού δράσης τους. Έντονο παραμένει το ερευνητικό ενδιαφέρον για την αναζήτηση νέων πιθανών στόχων δράσης, που ενέχονται στην ενεργοποίηση και καταστολή της έκφρασης των εμβρυϊκών γονιδίων καθώς και των μεταγραφικών παραγόντων και των σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην παραγωγή της HbF. ⁽¹⁵²⁾

Οι βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τη συμμετοχή μετα-μεταγραφικών και μεταφραστικών μηχανισμών στην έκφραση των γονιδίων σφαιρίνης και στη δράση επαγωγικών για την HbF ουσιών είναι περιορισμένες. ^(101,129,130)

Στην παρούσα μελέτη επικεντρωνόμαστε στη διερεύνηση του μηχανισμού δράσης της υδροξουρίας στην επαγωγή της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης, προστιθέμενη μόνη της ή και με παράλληλη χορήγηση κυτταροκινών, ερυθροποιητίνης και SCF σε επίπεδο μεταγραφικό, μετα-μεταγραφικό και μεταφραστικό.

Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήσαμε ως σύστημα μελέτης τις πρωτογενείς καλλιέργειες CD34⁺ κυττάρων περιφερικού αίματος φυσιολογικών ενηλίκων, όπου η προσθήκη κυτταροκινών και υψηλή συγκέντρωση ερυθροποιητίνης οδηγεί στη δημιουργία τελικά διαφοροποιούμενων ερυθροκυττάρων. Οι μελέτες στο σύστημα αυτό της εκφραζόμενης γλυκοφορίνης με κυτταρομετρία ροής και των παραγόμενων αλυσίδων σφαιρίνης με HPLC έδειξαν ότι τα παραγόμενα κύτταρα στα διάφορα στάδια αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στάδια ωρίμανσης των ερυθροκυττάρων και το σύστημα προσομοιάζει την

in vivo ερυθροποίηση. ^(154,157) Πολλά ανάλογα συστήματα καλλιέργειών έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της ανθρώπινης ερυθροποίησης, αν και τα περισσότερα από τα μέχρι τώρα χρησιμοποιούμενα συστήματα χαρακτηρίζονται από ετερογενή ομάδες κυττάρων και μη τελικά διαφοροποιημένα ερυθροκύτταρα. ^(153,158,159)

Η χρήση των CD34⁺ πρωτογενών καλλιέργειών στην παρούσα εργασία για τη μελέτη της δράσης της HU στην εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη παρουσία ή απουσία των κυτταροκινών Epo και SCF προϋποθέτει την πλήρη μελέτη του συστήματος για την έκφραση χαρακτηριστικών μορίων της ερυθροποίησης σε διαφορετικά στάδια εξέλιξης της καλλιέργειας.

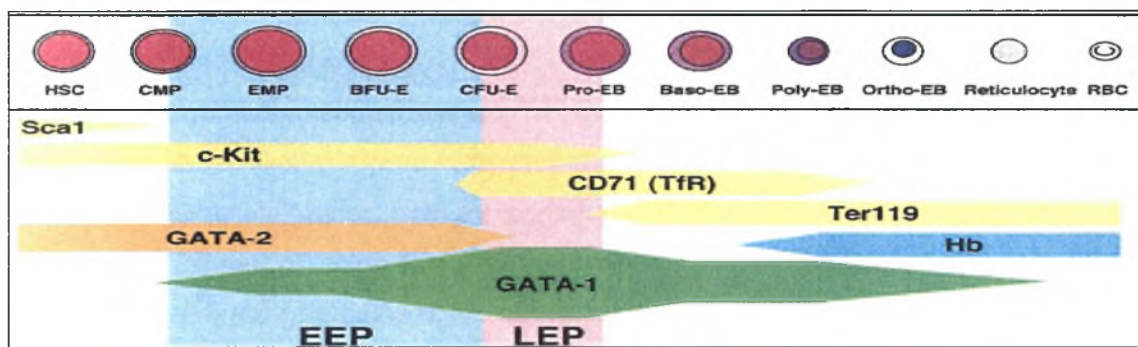
Χαρακτηριστικό της ανάπτυξης και του βαθμού ερυθροποίησης των κυττάρων κατά την εξέλιξη της καλλιέργειας είναι η έκφραση των αντιγονικών δεικτών επιφανείας του υποδοχέα τρανσφερίνης (CD71), της γλυκοφορίνης (GLYA) και του υποδοχέα του SCF (CD117). Σημαντικό στάδιο ανάπτυξης των κυττάρων της καλλιέργειας είναι η προερυθροβλάστη (d5- 5^η ημέρα καλλιέργειας) και στη συνέχεια οι ημέρες 12 και 15 της καλλιέργειας (d12, d15), όπου τα κύτταρα διαφοροποιούνται προς ώριμους ερυθροβλάστες.

Το πρότυπο ανάπτυξης που ακολουθούν τα κύτταρα της μελέτης μας χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα έκφρασης του CD71 από τα αρχικά στάδια της καλλιέργειας.

Η γλυκοφορίνη A (GLYA), ως ο πλέον σημαντικός δείκτης ερυθροποίησης, ξεκινά από χαμηλά επίπεδα και τη 12^η/14^η ημέρα καλλιέργειας έχει αυξηθεί σημαντικά και τα κύτταρα καταλήγουν να εκφράζουν πλήρως GLYA⁺/CD71⁺, γεγονός που αναδεικνύει έναν ομοιογενή πληθυσμό ερυθροειδικών κυττάρων. Επίσης, η έκφραση της GLYA επηρεάζεται από την αύξηση της συγκέντρωσης της ερυθροποιητίνης από 4 σε 10 u/ml, μετά το στάδιο της προερυθροβλάστης. Η αύξηση της ερυθροποιητίνης επιταχύνει χρονικά την παρουσία ωριμότερων ερυθροβλαστών καθώς αυξάνει την έκφραση της GLYA η οποία σχετίζεται με την ωριμότητα των κυττάρων.⁽¹⁵³⁾ Είναι γνωστό ότι η δυνατότητα διαφοροποίησης των CD34⁺ κυττάρων σε ερυθροειδικά κύτταρα, θετικά για τη γλυκοφορίνη, σχετίζεται με την ύπαρξη ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης (PKCa - protein kinase C a). ⁽¹⁵³⁻¹⁵⁵⁾ Οι Marieke von Lindern και συνεργάτες ⁽¹⁵⁶⁾ έδειξαν ότι ενεργοποιημένη πρωτεϊνική κινάση C (PKC) είναι απαραίτητη για το μονοπάτι μετάδοσης σήματος από τον υποδοχέα της ερυθροποιητίνης (EpoR). Είναι γνωστό ότι σε καλλιέργειες προγονικών κυττάρων προκειμένου να εξασφαλιστεί η πραγματοποίηση επαναλαμβανόμενων διαιρέσεων απαιτείται μικρή συγκέντρωση ερυθροποιητίνης, ενώ με την αύξησή της επιτυγχάνεται τελική διαφοροποίηση των ερυθροκυττάρων. ⁽¹⁵⁶⁾ Έτσι,

σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης των Marieke von Lindern, η PKC μπορεί να διατηρεί την ισορροπία μεταξύ διαίρεσης και διαφοροποίησης.

Η έκφραση του υποδοχέα SCF (CD117/ c-kit) θεωρείται ότι φτάνει έως το στάδιο της προερυθροβλάστης (Εικόνα 4.1), οπότε τα κύτταρα στα αρχικά στάδια της καλλιέργειας είναι περισσότερο ευαίσθητα στην παρουσία του SCF. ⁽¹⁵⁵⁾ Αυτό επιβεβαιώνεται και από την παρατήρηση ότι η μετάδοση σήματος από τον υποδοχέα ερυθροποιητίνης, μέσω της ενεργοποιημένης PKC για την ωρίμανση των αρχέγονων CD34⁺ κυττάρων μειώνεται από το CD117(c-Kit/SCFr). ⁽¹⁵⁴⁾



Εικόνα 4.1: Έκφραση του υποδοχέα SCF (CD117/ c-kit) σε διάφορα στάδια διαφοροποίησης των ερυθροκυττάρων.

Κατά την ωρίμανση των ερυθροβλαστών παρατηρούμε τη χαρακτηριστική αρχικά αύξηση του CD117 έως τη 12^η ημέρα της καλλιέργειας, η οποία ακολουθείται από τη μείωση αυτού καθώς οδηγούμαστε πλέον σε ώριμους ερυθροβλάστες. Η αυξημένη έκφραση του CD117 συνδέεται παράλληλα με υψηλή έκφραση της γλυκοφορίνης στη μεμβράνη του κυττάρου, αλλά καθώς τα επίπεδα του CD117 μειώνονται χάνεται και η επίδραση του SCF στα κύτταρα. ^(169,170)

Στα CD34⁺ κύτταρα που λαμβάνουν αυξημένη συγκέντρωση Epo παρατηρούμε το υψηλότερο ποσοστό του CD117, παρατήρηση η οποία συμφωνεί με την επίδραση των κυτταροκινών (Il3, Epo) σε καλλιέργειες κυττάρων από μυελό ασθενών με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο και φυσιολογικών ατόμων. Έχει αποδειχθεί ότι η Epo ασκεί μεγαλύτερη επίδραση στα κύτταρα των φυσιολογικών ατόμων⁽¹⁵⁸⁾ και αυξάνει την έκφραση του CD117. Η αυξημένη έκφραση του CD117 στους ασθενείς με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο χαρακτηρίζεται ως ανώμαλη εκδήλωση των κυττάρων του πάσχοντα, ενώ στους φυσιολογικούς μάρτυρες, η επίδραση των κυτταροκινών στην

έκφραση του CD117 είναι αποτέλεσμα της εσωτερικής διαχείρισης και της αποσύνθεσης μορίων, όπως οι υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων⁽¹⁵⁸⁾. Από τους Brizzi και συνεργάτες έχει αναφερθεί ότι η ρύθμιση της έκφρασης του CD117 από το SCF σε μεταγραφικό επίπεδο φανερώνει ότι η κυτταρική ανταπόκριση σε αυξητικούς παράγοντες ρυθμίζεται εν μέρει μέσω μεταβολών της έκφρασης των ειδικών μεμβρανικών υποδοχέων.⁽¹⁵⁴⁾

Κατά τη διάρκεια ωρίμανσης της καλλιέργειας των CD34⁺ κυττάρων αυξάνεται και ο αριθμός των F⁺ κυττάρων, όπου η αύξηση αυτή είναι μεγαλύτερη αυξανόμενης της χορηγούμενης Epo. Η αύξηση της σύνθεσης της HbF έχει αποδειχθεί ότι είναι αντιστρόφως ανάλογη προς το βαθμό ωρίμανσης των κυττάρων και η απόδοση σε BFU-e κύτταρα είναι μεγαλύτερη από ότι σε CFU-e και σε ωριμότερα HERC κύτταρα (HERC-highly erythropoietin-responsive cells)⁽¹⁶²⁾. Γενικότερα η αύξηση στη σύνθεση της HbF έχει συνδεθεί με την ερυθροποίηση υπό πίεση και οφείλεται στην ταχεία είσοδο των προερυθροβλαστών, άμεσα προερχόμενων από ανώριμους ερυθροβλάστες, στο μυελό των οστών, όπου η σύνθεση των γ-αλυσίδων ρυθμίζεται από αλλαγές στη χορηγούμενη ερυθροποιητίνη και στις διαδικασίες που προωθούν τη «δέσμευση» των κυττάρων.⁽¹⁶²⁾ Επίσης, η σηματοδότηση μέσω Epo έχει αρχικά ως αποτέλεσμα την επιβίωση των κυττάρων σε ερυθροβλάστες ενηλίκου. Η Epo ενεργοποιεί την JAK2 κινάση στα ερυθροκύτταρα με αποτέλεσμα την αύξηση της κυτταρικής επιβίωσης μέσω μηχανισμών που περιλαμβάνουν τη STAT5 ή άλλα μόρια.^(163,164) Μέσω αυτών των μηχανισμών προτείνεται ότι η αύξηση της Epo σε 10u/ml διατηρεί τον αριθμό των F⁺ κυττάρων.

Η διακοπή της δράσης του SCF αυξάνει το ποσοστό των F⁺ κυττάρων σε σχέση με την παρουσία του τη 12^η και 15^η ημέρα καλλιέργειας των κυττάρων-μάρτυρας. Όπως είναι γνωστό, η παροχή SCF σε καλλιέργειες έχει ως αποτέλεσμα τον αυξανόμενο κυτταρικό πολλαπλασιασμό καθώς και την παραγωγή της HbF.^(165,166) Η παρουσία του SCF μέχρι το στάδιο της προερυθροβλάστης δίνει ώθηση στον πολλαπλασιασμό και όχι στη διαφοροποίηση, κάτι που αντιστρέφεται απουσία του SCF και έτσι παρατηρείται η αύξηση στα F⁺ κύτταρα. Πειράματα έχουν δείξει ότι η πρόσδεση του SCF στην επιφάνεια του κυττάρου έχει ως αποτέλεσμα τη MEK φωσφορυλίωση που οδηγεί στην αύξηση της μεταγραφής του γ γονιδίου και της HbF. Το MEK σηματοδοτικό μονοπάτι είναι βασικό για την ανάπτυξη και τη μεταγραφή του γ γονιδίου στους ερυθροβλάστες ενηλίκου. Το Ras/Raf/MEK/p44/p42MAPK μονοπάτι είναι ένα από τα βασικά σηματοδοτικά μονοπάτια που συνδέουν τα σήματα από τον υποδοχέα στην επιφάνεια με την ενεργοποίηση του πυρήνα στους ερυθροβλάστες.⁽¹⁰⁸⁾ Αν αυτό το σηματοδοτικό μονοπάτι προκαλεί

απευθείας επιγενετικές τροποποιήσεις στην περιοχή του γ γονιδίου σφαιρίνης ή δρα έμμεσα μέσω άλλων κυτταρικών και βιοχημικών διαδικασιών δεν είναι πλήρως διευκρινισμένο. Βέβαια ενώ η ενεργοποίηση του MEK μονοπατιού φαίνεται να απαιτείται για την επαγωγή της HbF μέσω SCF, η ενεργοποίηση άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως το μονοπάτι της γουανυλυλ-κυκλάσης ⁽¹⁶¹⁾ που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση της HbF δεν μπορούν να αποκλειστούν. Με βάση τα παραπάνω η πρόσδεση του SCF στον υποδοχέα του στα αρχικά στάδια της ερυθροβλάστης είναι ικανή για την ενεργοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ενώ τα μηνύματα για την ενεργοποίηση της μεταγραφής του γ γονιδίου μπορούν να συνεχίζουν να είναι λειτουργικά και μετά την απομάκρυνση του SCF, κάτι που επιβεβαιώνεται από τα δικά μας ευρήματα με την αύξηση των F⁺ κυττάρων και μετά την απουσία του SCF.

Η προσθήκη της HU, ως επαγωγέας της HbF, επηρεάζει τους κυτταρικούς δείκτες που μελετούμε στις καλλιέργειες των αρχέγονων CD34⁺ κυττάρων. Συγκεκριμένα παρουσία SCF, η προσθήκη HU (100μM) αυξάνει την έκφραση της γλυκοφορίνης στους ώριμους ερυθροβλάστες (12^η ημέρα) και παραμένει ίδια και στα κύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία 300μM HU. Στους πιο ώριμους ερυθροβλάστες (15^η ημέρα) τα επίπεδα έκφρασης GPA είναι υψηλά και δεν τροποποιούνται μετά την προσθήκη HU. Επομένως για τη γλυκοφορίνη, η οποία είναι ένας βασικός δείκτης ερυθροποίησης, η προσθήκη HU δείχνει να προάγει την έκφρασή της μόνο τη 12^η ημέρα και για τη μικρότερη συγκέντρωση Epo (4u/ml). Στους υπόλοιπους συνδυασμούς είναι ήδη προχωρημένη η ωρίμανση των κυττάρων και δεν επηρεάζει περαιτέρω την έκφραση της GPA.

Σε προηγούμενη μελέτη των Cokic και συνεργατών,⁽¹⁶⁷⁾ όπου σε καλλιέργεια προγονικών κυττάρων (υγρή καλλιέργεια δύο φάσεων) προστίθενται οι παράγοντες (HU ή CysNO) δεν συνδέθηκε η δράση της HU με μεταβολές στα ποσοστά των GPA+ κυττάρων, παρόλο που βρήκαν μεγάλη αύξηση των βενζιδίνη θετικών κυττάρων.

Η αύξηση της συγκέντρωσης της ερυθροποιητίνης στα κύτταρα που λαμβάνουν HU και καλλιεργούνται παρουσία SCF δεν μεταβάλλει την έκφραση της γλυκοφορίνης τόσο κατά τη 12^η όσο και κατά τη 15^η ημέρα της καλλιέργειας. Σε αντίθεση, τα κύτταρα τη 12^η ημέρα της καλλιέργειας που συνεχίζουν την ανάπτυξη απουσία του SCF μετά το στάδιο της προερυθροβλάστης, η έκφραση των GPA⁺ κυττάρων αυξάνεται αυξανόμενης της συγκέντρωσης της HU που προστίθεται στα κύτταρα, κάτι που δεν παρατηρείται σε πιο προχωρημένους ερυθροβλάστες (15^η ημέρα της καλλιέργειας).

Είναι γνωστό ότι η παρουσία SCF και Epo σε πρωτογενείς κυτταροκαλλιέργειες ρυθμίζει την επιβίωση των κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους.⁽¹⁶⁸⁾ Οι

ώριμοι ερυθροβλάστες (CFU-E) σε προχωρημένο στάδιο ανάπτυξης, πριν από την τελική διαφοροποίηση, εξαρτώνται εξ ολοκλήρου από την ερυθροποιητίνη. ⁽¹⁶⁸⁾ Επομένως όπως προηγούμενα αναφέραμε για τα κύτταρα μάρτηρες, τα μονοπάτια μετάδοσης σήματος που ενεργοποιούνται με τη δράση της Epo (JAK2 κινάση και STAT5) και τα αντίστοιχα για τον SCF (Ras/Raf/MEK/p44/p42MAPK) προωθούν αντίστοιχα την κυτταρική διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό. ^(161,163,164) Αυτό υποδεικνύουν και τα αποτελέσματα μας σε καλλιέργειες παρουσία HU, όπου μετά τη διακοπή της δράσης του SCF και παράλληλα η αύξηση της συγκέντρωσης της Epo προωθείται η διαφοροποίηση του κυττάρου που συνοδεύεται από αύξηση των γλυκοφορίνη θετικών κυττάρων. Επίσης η Epo είναι απαραίτητα για την παραγωγή των F⁺ κυττάρων, όμως η αύξηση της συγκέντρωσής της στα κύτταρα με συνεχόμενη παρουσία SCF, που λαμβάνουν HU δεν μεταβάλλει σημαντικά την παραγωγή των F⁺ κυττάρων, τόσο κατά τη 12^η όσο και κατά τη 15^η ημέρα της καλλιέργειας. Τελικά η αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που εκφράζουν HbF οφείλεται κυρίως στη δράση της HU και η αύξηση της ερυθροποιητίνης δρα επικουρικά.

Η δράση του SCF στους ώριμους ερυθροβλάστες σαφώς καθορίζει τα επίπεδα της HbF και συνοδεύεται από αύξηση των επιπέδων του CD117. Η δράση όμως της HU επιτυγχάνει αύξηση του ποσοστού των F⁺ κυττάρων και συνοδεύεται από διατήρηση των επιπέδων του CD117 σε υψηλά για το βαθμό ωρίμανσης των κυττάρων επίπεδα που υποδηλώνει τη συμμετοχή του SCF. Σε καλλιέργειες προγονικών κυττάρων έχει αποδειχθεί ότι φαρμακολογικοί παράγοντες που αυξάνουν τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης F, όπως είναι η HU, η 5-αζακυτιδίνη και το βουτυρικό οξύ, αυξάνουν το p21WAF1^(108,171), όπου η αύξηση αυτή λαμβάνει χώρα σε ερυθροβλάστες τελικού σταδίου διαφοροποίησης. ⁽¹⁷²⁻¹⁷³⁾ Μελέτες με μπαμπούνους που πάσχουν από δρεπανοκυτταρική αναιμία και λαμβάνουν θεραπεία με HU+Epo+SCF έχουν δείξει ότι η αύξηση της έκφρασης του p21WAF1 κατέχει ουσιώδη ρόλο στην αύξηση της παραγόμενης αιμοσφαιρίνης F μέσω αύξησης της «στρατολόγησης» περισσοτέρων αρχέγονων κυτταρικών τύπων στις σειρές ερυθροποίησης προς την τελική ωρίμανσή τους.⁽¹⁶⁹⁾ Επιπλέον, η συνύπαρξη της ερυθροποιητίνης είναι απαραίτητη για την επίτευξη του αποτελέσματος επί των F⁺ κυττάρων. Η αύξηση της συγκέντρωσης της χορηγούμενης Epo σε 10u/ml δεν αυξάνει σημαντικά το ποσοστό τους.

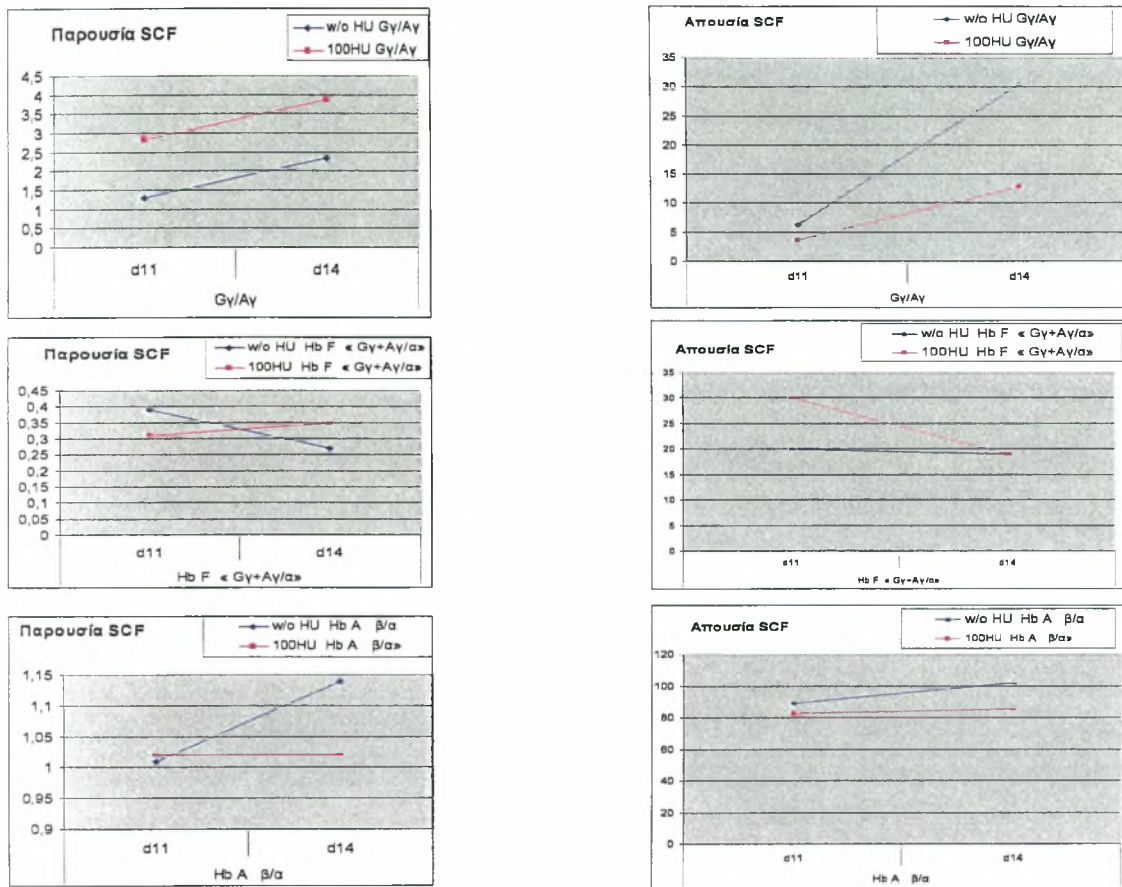
Τη 12^η ημέρα καλλιέργειας στα κύτταρα που σταματάει η χορήγηση του SCF, ο αριθμός των F⁺ κυττάρων αυξάνεται ανάλογα με τη συγκέντρωση HU που προστίθεται στα

κύτταρα. Αντίστοιχη αύξηση δεν παρατηρείται σε πιο ώριμους ερυθροβλάστες (15^η ημέρα της καλλιέργειας).

Η επίδραση HU (100μM και 300μM) προκαλεί μείωση των επιπέδων του υποδοχέα CD117 τη 12^η ημέρα της καλλιέργειας στα κύτταρα που συνεχίζει η δράση του SCF. Είναι γνωστό ότι η φυσιολογική πορεία της ωρίμανσης της καλλιέργειας οδηγεί σε μείωση του ποσοστού των θετικών για το CD117 κυττάρων στους πιο ώριμους ερυθροβλάστες (d15). Η προσθήκη HU παρουσία SCF διατηρεί τα επίπεδα του CD117 σε υψηλά επίπεδα ενώ απουσία του παράγοντα παρατηρείται η μείωση αυτή που θα συνέβαινε φυσιολογικά κατά την ωρίμανση των ερυθροβλαστών. Παρόμοιο αποτέλεσμα στην έκφραση του CD117 λαμβάνεται και όταν αυξάνεται η ερυθροποιητίνη στα κύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία HU. Η διακοπή της δράσης του SCF παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης Epo και διαφορετικών συγκεντρώσεων HU επηρεάζουν την έκφραση του CD117 κατά τη 12^η και 15^η ημέρα καλλιέργειας των κυττάρων. Η έκφραση των θετικών CD117 κυττάρων αυξάνεται αυξανόμενης της συγκέντρωσης της HU και ανάλογα με την ωρίμανση της καλλιέργειας. Παρά την μείωση που παρατηρείται στον αριθμό των CD117⁺ κυττάρων, η παρουσία της HU επιτρέπει να παραμένει ενεργό και χρήσιμο το μονοπάτι SCF/ (c-kit/SCFr), το οποίο ως γνωστόν μεταφέρει σήματα που επηρεάζουν την σύνθεση της Hb F. ⁽¹⁷⁴⁾ Τα ευρήματά μας είναι συμβατά και με παρατηρήσεις από παλιότερες μελέτες ότι το ερυθροκύτταρο φαίνεται να μην έχει ανάγκη το SCF μετά το στάδιο της προερυθροβλάστης. ⁽¹⁷⁵⁻¹⁷⁷⁾ Η παρουσία της HU που αυξάνει την έκφραση του υποδοχέα του SCF χωρίς να είναι απαραίτητη η παρουσία του μορίου-προσδέτη, SCF, πιθανά να εξυπηρετεί τη μεταφορά μηνυμάτων στο εσωτερικό του κυττάρου εκτός από αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στην οποία συμμετέχει ο SCF. Η μελέτη των Wojda και συνεργατών ⁽¹⁶⁶⁾ υποστηρίζει την ύπαρξη της αργοπορημένης επίδρασης του SCF σε καταστάσεις ερυθροποιητικού stress, όπως η παρουσία HU, η οποία συνοδεύεται από την αύξηση του CD117.

Η προσθήκη της HU σε κύτταρα που λαμβάνουν SCF, αυξάνει το πηλίκο Gγ/Αγ την 11^η ημέρα καλλιέργειας, με τη μικρότερη συγκέντρωση Epo και η αύξηση αυτή ακολουθεί και την 14^η ημέρα μετά από την αύξηση της συγκέντρωσης Epo. Ο διπλασιασμός του πηλίκου Gγ/Αγ παρατηρείται μετά την προσθήκη της μικρότερης συγκέντρωσης Epo και αυτό υποδηλώνει την επιλεκτική πριμοδότηση της Gγ αλυσίδας από την παρουσία της HU. Η παρατηρούμενη αύξηση της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης μετά την επίδραση της HU είναι μικρή κατά τη 14^η ημέρα καλλιέργειας όταν παράλληλα παρατηρείται μείωση της HbA.

Η επίδραση της HU σε κύτταρα όπου καλλιεργούνται απουσία SCF μετά το στάδιο προερυθροβλάστης προκαλεί μείωση στο πηλίκο των αλυσίδων Gγ/Αγ σε αντίθεση με τα κύτταρα όπου παραμένει ο SCF καθόλη τη διάρκεια της καλλιέργειας. Η μεγαλύτερη μείωση παρατηρείται στους πιο προχωρημένους ερυθροβλάστες παρουσία της μεγαλύτερης συγκέντρωσης της Epo. Η πριμοδότηση της Αγ αλυσίδας στα κύτταρα όπου προστίθεται HU και διακόπτεται ο SCF, σε αντίθεση με την πριμοδότηση της Gγ αλυσίδας παρουσία SCF καθόλη τη διάρκεια της καλλιέργειας, μπορεί πιθανά να αποδοθεί στη διαφορετική ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, όπως TAL1 και FKLf, που έχουνδειχθεί να εκφράζονται και να ρυθμίζουν την έκφραση της HbF μέσω του μονοπατιού του SCF. ⁽¹⁷⁸⁾ Σε αντίθεση με τα κύτταρα όπου καλλιεργούνται παρουσία HU και SCF, η απουσία του SCF με παρουσία HU δεν επηρεάζει καθόλου ή ελάχιστα την παραγόμενη εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη. Αυτό σημαίνει πιθανά ότι η HU μπορεί να ενεργοποιήσει την παραγωγή του γ γονιδίου μέσω του μονοπατιού Ras/Raf1/MAPK και PI3K όπου συμμετέχει ο SCF.



Εικόνα 4.2: Μεταβολές του πηλίκου $G\gamma/A\gamma$ και των αιμοσφαιρινών HbA και HbF από την 11^η στη 14^η ημέρα καλλιέργειας.

Η προσθήκη της HU στα αρχέγονα φυσιολογικά CD34⁺ κύτταρα είτε συνεχόμενα είτε με παλμό έδειξε ότι επηρεάζει τον αριθμό των γ -mRNA μεταγράφων. Η επίδραση αυτή είναι δοσο- και χρονο-εξαρτώμενη και η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρείται μετά την επίδραση 100 μ M HU για 3 ημέρες είτε συνεχόμενα είτε με παλμό. Η επίδραση με παλμό εμφανίζει λίγο μεγαλύτερη αύξηση σε σχέση με την αντίστοιχη συνεχή και αυτό πιθανά μπορεί να εξηγηθεί από τη μικρότερη κυτταροτοξικότητα που προκαλεί στα κύτταρα η αρχική προσθήκη και στη συνέχεια απομάκρυνση της HU. Τα γ -mRNA μετάγραφα μετά την προσθήκη της HU παραμένουν σε υψηλά επίπεδα μέχρι και τη 12^η ημέρα καλλιέργειας, αλλά σε χαμηλότερα σχετικά επίπεδα μια και τα κύτταρα βρίσκονται σε αρκετά προχωρημένο στάδιο διαφοροποίησης.

Τα μετάγραφα σφαιρινών του ενηλίκου τύπου (α- και β-) παρουσιάζουν μια αύξηση κατά τη 12^η ημέρα καλλιέργειας μετά την προσθήκη HU, αναμενόμενο με το προχωρημένο στάδιο ωρίμανσης των κυττάρων.

Όπως είναι γνωστό, η παραγωγή των αιμοσφαιρινών, HbA και HbF, μπορεί να εκφραστεί ως πηλίκο των β/β+γ και γ/β+γ μεταγράφων, αντίστοιχα. Επιπλέον, επειδή η παραγωγή των μεταγράφων των γονιδίων των σφαιρινών ελέγχεται από μία συνεχή παρουσία ή απουσία της έκφρασής τους, η επίδραση της HU μελετήθηκε και στο λόγο των μεταγράφων των γονιδίων β-τύπου, όπως γ/γ+β και β/γ+β. Η παραγόμενη HbF παρουσιάζει μια μικρή αύξηση μετά την επίδραση 100μM HU για 1 και 3 ημέρες, αν και η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρείται με την προσθήκη της HU με παλμό που συμφωνεί με τα αποτελέσματα υπολογιζόμενη η αύξηση μόνο ως προς τα γ-mRNA μετάγραφα. Ο λόγος των β/γ+β μετάγραφα και κατεπέκταση η παραγωγή της HbA δεν επηρεάζεται από την παρουσία της HU είτε με συνεχή δράση είτε με παλμό. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν μια επιλεκτική επαγωγική δράση της HU στα γ-mRNA μετάγραφα και την εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη.

Στην προσπάθεια κατανόησης των μηχανισμών δράσης της HU στην επαγωγή της HbF, μελετήθηκε η επίδραση της HU στα γ γονίδιο μέσω μετα-μεταγραφικών και μεταφραστικών μηχανισμών. Η επίδραση της HU στην αύξηση των γ-mRNA μεταγράφων υποδηλώνει τη συμμετοχή της μεταγραφικής μηχανής του γ γονιδίου ως ένα από τους κύριους μηχανισμούς δράσης της HU.⁽¹⁷⁹⁾ Ο μηχανισμός της μεταγραφής θεωρείται ένας από τους κύριους μηχανισμούς δράσης όχι μόνο της HU αλλά και άλλων επαγωγικών ουσιών, όπως αίμη⁽¹⁰¹⁾, βαλπροϊκό οξύ.⁽¹⁰¹⁾

Παλιότερες αναφορές σχετικά με τη δράση της HU αλλά και άλλων επαγωγικών για την HbF ουσιών, όπως αίμη, σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο και συγκεκριμένα σε επίπεδο ωρίμανσης των mRNA μεταγράφων,⁽¹⁰¹⁾ οδήγησε στην αναζήτηση και άλλων μηχανισμών δράσης της HU, όπως στη σταθερότητα των γ-mRNA μεταγράφων.

Παράλληλα με τη χρήση του επαγωγικού παράγοντα – υδροξυουρία- χρησιμοποιήθηκε η ακτινομυκίνη D, η οποία ως αναστολέας της μεταγραφής, διακόπτει την παραγωγή νέων mRNA μορίων. Στα κύτταρα που λαμβάνουν HU(100μM και 300μM) για μία ημέρα με παλμό παρουσία SCF και με χρήση 10u/ml Epo μετά την προσθήκη ακτινομυκίνης δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή τόσο στο ποσοστό έκφρασης της GLYA και του CD71, όσο και στην κυτταρική κατανομή τους. Η δράση της ακτινομυκίνης επί του ποσοστού έκφρασης του CD117 και της γ σφαιρίνης δεν αλλοιώνει τα προηγούμενα αποτελέσματα που περιγράφηκαν από την προσθήκη και μόνο της HU, αν και

παρατηρούνται σχετικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης. Η ταυτόχρονη παρουσία της act-D για 24 ώρες μαζί με συνολική δράση HU για 3 και 4 ημέρες έδειξε ότι υπάρχει επιπλέον αύξηση των γ -mRNA μεταγράφων, περίπου 2 φορές, σε σχέση με την αντίστοιχη από την προσθήκη και μόνο της HU. Η παρουσία της act-D για 48 ώρες και παρουσία HU δεν επιφέρει ουσιαστική μεταβολή στην έκφραση του γ γονιδίου πιθανότατα λόγω της σημαντικής κυτταροτοξικότητας που προκαλεί η act-D. Καθώς ο χρόνος ημιζωής των γ -μεταγράφων είναι περίπου 17 ώρες, μετά την παρέλευση των 24 ωρών διακοπής της μεταγραφής με τη χρήση της act-D, συνεχίζουμε να ανιχνεύουμε σημαντικό αριθμό γ -mRNA μεταγράφων. Η αύξηση αυτή πιθανότατα εξηγείται λόγω της μεγαλύτερης σταθερότητας που απέκτησαν τα μετάγραφα αυτά μετά τη δράση της HU. Εάν η δράση της περιοριζόταν μόνο σε μεταγραφικό επίπεδο τότε η χορήγησή της αφενός θα οδηγούσε μόνο σε αύξηση των επιπέδων έκφρασης του γ γονιδίου και αφετέρου η διακοπή της μεταγραφής θα επέτρεπε την διατήρηση των προϊόντων μόνο για όσο χρονικό διάστημα θα παρέμεναν σταθερά.

Η δράση της HU σε μεταφραστικό επίπεδο μετά την προσθήκη κυκλοεξαμίδης δεν επηρέασε τα γ -mRNA μετάγραφα, οπότε η HU δε φαίνεται να συμμετέχει στη μεταφραστική μηχανή των γ γονιδίων σφαιρίνης. Σε αντίθεση με την HU, άλλες επαγωγικές για την HbF ουσίες, όπως η αίμη, επηρεάζουν και το μετα-μεταφραστικό μηχανισμό των μορίων αιμοσφαιρίνης συμμετέχοντας στην ολοκλήρωση και σταθεροποίηση των μορίων αυτών. ⁽¹⁰¹⁾

Με βάση τα παραπάνω μπορούμε να καταλήξουμε ότι η υδροξυουρία:

- δρα σε επίπεδο μεταγραφής και μετα-μεταγραφικής τροποποίησης των γ -mRNA μεταγράφων μέσω της σταθερότητας του γ -mRNA.
- δεν λειτουργεί μέσω της μεταφραστικής οδού που οδηγούν στην αύξηση της σύνθεσης HbF.
- αυξάνει το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν HbF με συνεργική δράση του SCF και όχι με αυξημένη συγκέντρωση Epo
- με την παρουσία του SCF σε ώριμους ερυθροβλάστες πριμοδοτεί τη σύνθεση G γ αλυσίδας (πρότυπο ενηλίκου) και οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα σύνθεσης HbF τη 15^η ημέρα καλλιέργειας
- παράλληλα με τη διακοπή της χορήγησης SCF πριμοδοτεί τη σύνθεση της A γ αλυσίδας (πρότυπο εμβρύου) και αυξάνει τα επίπεδα σύνθεσης της Hb F την 12^η ημέρα της καλλιέργειας.

- παρουσία του SCF, σε ώριμους ερυθροβλάστες, λειτουργεί μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού του SCF.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδωσαν σημαντικές πληροφορίες για τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στη δράση της υδροξυουρίας στα γονίδια των σφαιρινών παρουσία ή απουσία και άλλων κυτταροκινών με στόχο την πιθανή παράλληλη χρήση τους σε ασθενείς με θαλασσαιμικά σύνδρομα. Τα ευρήματα αυτά μπορούν να οδηγήσουν στην αναζήτηση νέων φαρμακευτικών ουσιών που επάγουν την εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη και λειτουργούν με παρόμοιους μηχανισμούς με σκοπό τη θεραπεία ασθενών που δεν ανταποκρίνονται καθόλου ή ελάχιστα στα ήδη χρησιμοποιούμενα φάρμακα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην αρχή του 1960, σε ποικίλες γενετικές και βιοχημικές μελέτες περιγράφηκε ο παθοφυσιολογικός ρόλος της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης στη θαλασσαιμία. Η επιβίωση ασθενών με σοβαρές ανωμαλίες στη β αλυσίδα αποδόθηκε στην ύπαρξη HbF. Έγινε επομένως ξεκάθαρο ότι η παραγωγή σε αφθονία της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης μπορεί να βοηθήσει σημαντικά την κλινική εικόνα ασθενών με β θαλασσαιμία και δρεπανοκυτταρική αναιμία. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν διάφορες φαρμακευτικές ουσίες, αρχικά σε πειραματόζωα και ακολούθως σε ασθενείς, οι οποίες οδήγησαν σε αύξηση της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης.

Το επόμενο στάδιο των ερευνών κατευθύνθηκε στη μελέτη των φαρμακευτικών ουσιών που επάγουν την εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη με στόχο τη διερεύνηση των μηχανισμών δράσης των υποκειμένων. Με τα έως τώρα δεδομένα οι μηχανισμοί δράσης των διαφόρων επαγωγικών ουσιών της HbF ποικίλουν και συνήθως αφορούν επιδράσεις στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων ή άμεσα στη μεταγραφή του γ γονιδίου, με αύξηση των επιπέδων των γ-μεταγράφων καθώς και αλληλεπίδραση ενδοκυτταρικών σημάτων.

Ακόμη και σήμερα υπάρχει αμείωτο ενδιαφέρον αφενός μεν για τη μελέτη του μοριακού μηχανισμού ρύθμισης της έκφρασης του γ γονιδίου, αφετέρου για την εύρεση νέων φαρμακολογικών παραγόντων που αυξάνουν την παραγωγή της HbF.

Οι ουσίες που αυξάνουν την HbF επιτυγχάνουν επιλεκτική προαγωγή των κυττάρων BFU-EF, τα οποία διατηρούν το πρόγραμμα παραγωγής γ αλυσίδων και παράλληλη απουσία των φυσιολογικών BFU-E.

Οι βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τη συμμετοχή μετα-μεταγραφικών και μεταφραστικών μηχανισμών στην έκφραση των γονιδίων σφαιρίνης και στη δράση επαγωγικών για την HbF ουσιών είναι περιορισμένες.

Στην παρούσα μελέτη επικεντρωθήκαμε στη διερεύνηση του μηχανισμού δράσης της υδροξουρίας στην επαγωγή της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης, προστιθέμενη μόνη της ή και με παράλληλη χορήγηση κυτταροκινών, ερυθροποιητίνης και SCF σε επίπεδο μεταγραφικό, μετα-μεταγραφικό και μεταφραστικό.

Οι πρωτογενείς καλλιέργειες CD34⁺ κυττάρων από περιφερικό αίμα ενηλίκων, αποτελεί το σύστημα μελέτης που επιτρέπει τη διαφοροποίηση των κυττάρων προς την ερυθρά

σειρά και υπερτερεί των υπολοίπων συστημάτων καλλιέργειας προκειμένου να μελετηθεί ο μηχανισμός δράσης της HU και των συνδυασμών της με Epo και SCF.

Παρακολουθήσαμε την εξέλιξη της καλλιέργειας και τη μεταβολή των αντιγονικών δεικτών CD34, CD71, CD117, Γλυκοφορίνη A (GPA), καθώς και την παραγωγή κυττάρων που συνθέτουν HbF. Η συνολική διάρκεια της καλλιέργειας είναι 14 ημέρες. Σε αυτό το χρονικό διάστημα τα CD34⁺ κύτταρα διαφοροποιούνται σε ώριμα ερυθροειδικά κύτταρα με υψηλή έκφραση CD71 και γλυκοφορίνης, μειωμένη έκφραση CD117 και μέτρια επίπεδα HbF.

Η αύξηση της συγκέντρωσης της ερυθροποιητίνης (από 4 σε 10u/ml), επηρεάζει τη διαφοροποίηση των κυττάρων και οδηγεί σε αύξηση του ποσοστού έκφρασης των GPA⁺, GPA⁺/HbF⁺ και των F⁺ κυττάρων. Η αύξηση των GPA⁺ κυττάρων και των ενδοκυττάρων επιπέδων έκφρασης του CD71 υποδηλώνει ταχύτερη ωρίμανση των κυττάρων με δυνατότητα αυτών να οδηγηθούν σε τελική διαφοροποίηση.

Με τη χρήση του επαγωγικού παράγοντα (υδροξουρία-HU) στις καλλιέργειες αυξάνετε ο αριθμός των κυττάρων που εκφράζουν HbF και διατηρείται υψηλότερος αυτού των κυττάρων μαρτύρων, ακόμη και τη 14^η ημέρα καλλιέργειας. Όμως τελικά συνδυασμένη δράση υψηλής συγκέντρωσης Epo και HU δεν εξασφαλίζει περαιτέρω αύξηση του ποσοστού των F⁺ κυττάρων.

Η παρουσία του SCF είναι απαραίτητη στα αρχικά στάδια ανάπτυξης της καλλιέργειας των κυττάρων μαρτύρων για τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων καθώς και για την παραγωγή της HbF. Καθώς προχωρά η διαφοροποίηση των κυττάρων και πραγματοποιείται η μεταστροφή της αιμοσφαιρίνης, ελαττώνεται ο αριθμός των F⁺ κυττάρων. Παρατηρήσαμε όμως ότι η παραμονή του SCF στην καλλιέργεια μετά το στάδιο της προερυθροβλάστης σε κύτταρα που εκτελούν φυσιολογική ερυθροποίηση (κύτταρα μάρτυρες), έχει σαν αποτέλεσμα αύξηση του αριθμού των κυττάρων και την μειωμένη παραγωγή HbF⁺ σε σχέση με τα κύτταρα που σταματά η χορήγηση του.

Αντιθέτως στα κύτταρα που εκτελούν ερυθροποίηση υπό stress (λαμβάνουν HU), η παραμονή του οδηγεί σε υψηλότερα ποσοστά F⁺ κυττάρων σε σχέση με τα κύτταρα όπου διακόπτεται η χορήγηση του.

Αποδεικνύεται επομένως ότι το μονοπάτι που ενεργοποιείται με τη σύνδεση του SCF με τον υποδοχέα του CD117, δρα σε κύτταρα σε προχωρημένο στάδιο ανάπτυξης που υπόκεινται σε stress ερυθροποίηση, όπως συμβαίνει παρουσία της HU, γεγονός που σηματοδοτεί συνέργια μεταξύ του SCF και της HU προκειμένου για την αύξηση των F⁺ κυττάρων.

Με τη συνύπαρξη αυτών των παραγόντων πριμοδοτείται ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, με άμεσο αποτέλεσμα την ελάττωση των θρεπτικών αποθεμάτων τους που με τη σειρά του οδηγεί σε καθυστέρηση της διαφοροποίησή τους.

Η παραγόμενη αιμοσφαιρίνη μετράται με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) για ανάλυση αλυσίδων και παρατηρούμε ότι μετά από την επίδραση HU και με παραμονή του SCF μετά από το στάδιο της προερυθροβλάστης, αυξάνεται το πηλίκο Gγ/Αγ το οποίο ισοδυναμεί με πριμοδότηση της Gγ αλυσίδας (εμβρυικό πρότυπο ανάπτυξης). Η ποσότητα όμως της παραγόμενης HbF είναι μειωμένη έως τη 11^η ημέρα της καλλιέργειας, σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες και αυξάνεται τη 14^η.

Τελικά σε καλλιέργεια ώριμων ερυθροβλαστών μετά από τη δράση της HU και με συνεχή προσθήκη SCF αυξάνεται ο αριθμός των F⁺ κυττάρων, παράγεται HbF με πριμοδότηση της Gγ αλυσίδας και η παραγωγή αιμοσφαιρίνης HbF αυξάνεται τη 14^η ημέρα της καλλιέργειας.

Αντιθέτως σε καλλιέργειες όπου διακόπτεται ο SCF μετά το στάδιο της προερυθροβλάστης και προστίθεται HU, το κύτταρο προχωρά τη διαφοροποίησή του πιο γρήγορα. Τη 12^η ημέρα έχει αυξήσει την παραγωγή της HbF, ως αποτέλεσμα της δράσης της HU στα ίδια με προηγουμένως επίπεδα, αλλά με πριμοδότηση της Αγ αλυσίδας (πρότυπο ανάπτυξης ενηλίκου) και ακολουθεί ελάττωση της παραγωγής τη 14^η ημέρα έως τα επίπεδα παραγωγής των μαρτύρων.

Μελετώντας παράλληλα την παραγωγή των γ- μεταγράφων καταγράφεται ότι στα κύτταρα μάρτυρες αυξάνεται η παραγωγή τους μεταξύ 6^{ης} και 8^{ης} ημέρας καλλιέργειας, ενώ τη 12^η ημέρα ελαττώνεται η παραγωγή τους καθώς έχει προχωρήσει η ωρίμανσή τους και έχει αυξηθεί η σύνθεση των β-μεταγράφων. Τα κύτταρα που λαμβάνουν 100μM HU για μία ημέρα με συνεχή χορήγηση ή με παλμό, αυξάνουν τα επίπεδα παραγωγής των γ-μεταγράφων τη 12^η ημέρα της καλλιέργειας.

Η παραγωγή της HbF, όπως αυτή εκφράζεται από το λόγο (γ/β+γ) μεταγράφων, αυξάνεται μετά την επίδραση 100μM HU για μία ημέρα με συνεχή χορήγηση ή με παλμό και είναι υψηλότερη την 8^η ημέρα. Αντιθέτως η προσθήκη της HU δεν επηρεάζει την HbA (β/β+γ).

Μεταβολές των γ- και β-μεταγράφων παρατηρούνται μετά από τη δράση SCF σε ώριμους ερυθροβλάστες και την αύξηση της χορηγούμενης Epo (από 4 σε 10u/ml).

Η παρουσία του SCF αυξάνει τη παραγωγή των γ-μεταγράφων. Η αύξηση αυτή είναι μικρή την 6^η ημέρα για τα κύτταρα που λαμβάνουν HU, αυξάνει σημαντικά την 12^η ημέρα τόσο στα κύτταρα μαρτύρων με δράση και των δύο συγκεντρώσεων Epo (4 και 10u/ml),

όσο και μετά από τη δράση HU. Είναι ξεκάθαρο ότι ο SCF και η Epo δρουν επικουρικά με την HU για την παραγωγή των γ-μεταγράφων .

Εκτός όμως από τη δράση σε μεταγραφικό επίπεδο φάνηκε και δράση της HU στην ωρίμανση των γ-μεταγράφων καθώς αυξάνονται τα γ-μετάγραφα μετά την παράλληλα δράση της HU με έναν αναστολέα της μεταγραφής , την ακτινομυκίνη-D.

Επίσης δεν παρατηρήθηκε ύπαρξη μεταφραστικού μηχανισμού καθώς με διακοπή της μετάφρασης με τη χρήση κυκλοεξαμίδης δεν διαταράχθηκε η επαγωγική δράση της HU επί των γ-μεταγράφων.

Η περαιτέρω αύξηση των επιπέδων των γ-μεταγράφων παρουσία υδροξυουρίας και ταυτόχρονη προσθήκη κυκλοεξαμίδης αλλά και ακτινομυκίνης-D αποδίδεται στη δράση της υδροξυουρίας σε επίπεδο μεταγραφής και μετα-μεταγραφικής ωρίμανσης, με πιθανή τη σταθεροποιητική δράση της HU στα γ-μετάγραφα.

Επομένως στην παρούσα εργασία δείξαμε ότι υπάρχει :

- δράση της HU σε επίπεδο μεταγραφής
- δράση της HU σε μετα-μεταγραφική τροποποίηση. Σταθερότητα του γ-mRNA.
- Η HU δεν χρησιμοποιεί μεταφραστικούς μηχανισμούς μέσω των οποίων να οδηγεί σε αυξημένη σύνθεση HbF.
- Δράση της HU για αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που εκφράζουν HbF. Επικουρικά με την HU σε αυτή την κατεύθυνση δρα η παρουσία του SCF.
- Η προσθήκη αυξημένης συγκέντρωσης Epo δεν συνεργεί προκειμένου να αυξηθεί το ποσοστό των F^+ κυττάρων.
- Η παρουσία του SCF σε ώριμους ερυθροβλάστες πριμοδοτεί την σύνθεση Gγ αλυσίδας (πρότυπο ενηλίκου) και οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα σύνθεσης HbF την 15^η ημέρα της καλλιέργειας.
- Η διακοπή της χορήγησης SCF πριμοδοτεί την σύνθεση της Αγ αλυσίδας (πρότυπο εμβρύου) και αυξάνει τα επίπεδα σύνθεσης της Hb F την 12^η ημέρα της καλλιέργειας.
- Σε ώριμους ερυθροβλάστες που λαμβάνουν HU , stress ερυθροποίηση, το μονοπάτι μετάδοσης σήματός που ενεργοποιείται με τη σύνδεση του SCF με τον υποδοχέα του συνεχίζει να λειτουργεί και επικουρεί στη σύνθεση HbF. Σε ώριμους ερυθροβλάστες των κυττάρων που λαμβάνουν HU χωρίς τη προσθήκη SCF μετά το στάδιο της προερυθροβλάστης, η έκφραση του CD117 μειώνεται με την ωρίμανση των κυττάρων και λόγω της έλλειψης του παράγοντα και τελικά η σύνθεση της HbF είναι μειωμένη.

- Η αύξηση της συγκέντρωσης Epo από 4 σε 10 u/ml οδηγεί σε αύξηση του CD117 στα κύτταρα μάρτυρες που όμως παρουσία του SCF δεν οδηγεί σε αύξηση της παραγόμενης HbF . Επομένως η Epo δεν χρησιμοποιεί το μονοπάτι του SCF/CD117 και προωθεί μόνο την ωρίμανση των κυττάρων.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής μας έδωσε σημαντικές πληροφορίες για τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στη δράση της υδροξουρίας στα γονίδια των σφαιρινών παρουσία ή απουσία και άλλων κυτταροκινών και την πιθανή συνδυαστική χρήση τους σε ασθενείς με θαλασσαιμικά σύνδρομα. Η κατανόηση των μηχανισμών δράσης της υδροξουρίας μπορεί να οδηγήσει στην αναζήτηση άλλων παρόμοιων επαγωγικών ουσιών με στόχο τη χρήση τους σε ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται στις ήδη εφαρμοζόμενες θεραπείες.

SUMMARY

The pathophysiological role of fetal hemoglobin in thalassemia was described in the beginning of the 1960s, when various genetical and biochemical studies attributed the survival of patients suffering severe abnormalities in chain β to the existence of HbF. Thus, it was made clear that abundant production of fetal hemoglobin can considerably improve the clinical picture of patients suffering from β -thalassemia and sickle cell anemia. Hence various pharmaceutical substances were tested – first on animals and subsequently on patients – which led to the increase in fetal hemoglobin.

Research focused on the study of pharmaceutical substances which induced fetal hemoglobin in order to look into the mechanisms of action (MOA) of the subjects. According to hitherto findings, the mechanisms of action (MOA) of various inductive to HbF substances are diverse and usually involve action in cell proliferation and cellular differentiation or directly in the transcription of γ globin gene, increasing the levels of γ -mRNA transcripts, as well as interaction between intercellular signals.

On one hand, there is great interest in the study of the γ globin gene molecular regulation mechanism and, on the other hand, in finding new pharmacology-related factors that increase the production of HbF.

The substances which increase HbF ensure the promotion of BFU-EF cells, which preserve the γ globin chain production program, and the absence of normal BFU-E, at the same time.

Bibliographical references pertaining to the participation of post-transcription and translation mechanisms in the expression of globin genes and the action of inductive to HbF substances are limited.

The aim of this study is to focus on the hydroxyurea mechanism of action to induce fetal hemoglobin, used either alone or in combination with cytokines, erythropoietin and SCF in a transcription, post-transcription and translation level.

The primary CD34⁺ cell cultures of adult peripheral blood compose the study system which allows cellular differentiation towards erythroid lineage and excels all other culture systems so that the mechanism of action of HU and of its combination with Epo and SCF is studied.

We observed the stages of the culture and the modification in the surface markers CD34, CD71, CD117 and glycophorin A (GPA), as well as the production of cells which

compose HbF. The culture lasts 14 days. In this time-span, CD34 cells differentiate in mature erythroid cells expressing high levels of CD71 and glycophorin, low levels of CD117 and moderate levels of HbF.

The increase in the concentration of erythropoietin (from 4 to 10 u/ml) affects cellular differentiation and leads to the increase in the expression ratio of GPA^+ , GPA^+/HbF and F^+ cells. The increase in GPA^+ cells and in the intracellular levels of expression of CD71 indicates faster development of the cells, rendering them possible to end up differentiated.

When the inductive factor (hydroxyurea-HU) is used in cultures, the number of cells which express HbF increases and remains higher than the number of control cells, even on the 14th day of the culture. However, the action of high concentration of Epo and HU in combination does not ensure any further increase in F^+ cells numbers.

SCF administration is important in the former stages of development of the culture of control cell for the proliferation and differentiation of the cells as well as for the production of HbF. As the differentiation of the cells is proceeding and the globin switching takes place, the number of F^+ cells decreases. Nevertheless, we noticed that retaining SCF in cells which conduct normal erythropoiesis (control cells) after the stage of proerythroblast results in the increase in the number of cells and in the decreased production of HbF, in comparison to the cells where the administration of SCF was ceased. On the contrary, retaining it in cells which conduct erythropoiesis under *stress* (they receive HU) results in a higher number of F^+ cells, in comparison to the cells where the administration of SCF was ceased.

It is thus proven that the path activated by the combination of SCF with the receptor of CD117 acts in cells that undergo *stress* erythropoiesis in an advanced stage of development, as it also occurs by using HU. Therefore, it is shown that SCF synergizes with HU in increasing F-cells. The co-existence of the factors mentioned above enhances cell proliferation, directly resulting in the reduction of their nutrient stores, which consequently leads to a delay of differentiation.

The hemoglobin produced is measured with High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) for chain analysis. After HU action and by retaining SCF after the stage of proerythroblast, we notice that the ratio $G\gamma/A\gamma$ increases, which triggers $G\gamma$ globin chain; yet, the amount of the produced HbF is reduced until the 11th day of the culture, compared to the control cells, and increases on the 14th day.

Finally, in cultures of mature erythroblasts with HU action, the number of F-cells increases and HbF is produced triggering γ globin chain, if the administration of SCF continues. The increased production of HbF hemoglobin is noted on the 14th day of the culture.

On the contrary, in cultures where SCF administration is ceased and HU is administrated after the stage of proerythroblast, cell differentiation is proceeding much faster. On the 12th day the cell increases HbF production levels to the ones it was before, because of HU action, but also triggers γ globin chain, and on the 14th day the production decreases to the production levels of the control cells.

Studying γ -mRNA transcripts, at the same time, we also observed that their production in the control cells increases from the 6th to the 8th day of culture, whereas on the 12th day their production decreases as their maturation has proceeded and the synthesis of β -transcripts has increased.

The cells receiving 100 μ M HU for one day, either continuously or pulse treatment increase the production levels of γ -mRNA transcripts on the 12th day of the culture.

The production of HbF, as expressed by $(\gamma/\beta+\gamma)$ transcripts ratio, increases with the action of 100 μ M HU, by continuous or pulse treatment for one day, and is higher on the 8th day. Conversely, HU administration does not affect HbA ($\beta/\beta+\gamma$) whatsoever.

Furthermore, we noticed that SCF action in mature erythroblasts and increase of the administrated Epo (from 4 to 10u/ml) results in modifications in β - and γ -mRNA transcripts. SCF administration increases the production of γ -mRNA transcripts.

On the 6th day, this increase is small in the cells receiving HU, yet on the 12th day the production of γ -mRNA transcripts significantly increases in control cell with the action of both Epo concentrations (4 and 10 μ M), as much as with HU action.

It is clear that SCF and Epo are complementary to HU to produce γ -mRNA transcripts.

Apart from the action in post-transcription level, the action of HU in the maturation of γ -mRNA transcripts was also remarked, since the interaction of HU with a transcription inhibitor, actinomycin D, contributes to the increase of γ -mRNA transcripts.

Moreover, we did not witness action of any translation mechanism, since γ -mRNA transcripts induced by HU was not affected when the translation switched off by using cycloheximide.

Further increase in the levels of γ -mRNA transcripts, by using HU and simultaneously adding CX as well as act-D, may be attributed to hydroxyurea action in the level of transcription and post-transcription maturation, as indicated by its action when the

transcription switches off for 24 hours, where the binding action of HU appears intense in γ -mRNA transcripts.

The outcomes of this study provided crucial information about the mechanisms involved in the action of hydroxyurea in globin genes, both with and without the presence of other cytokines, and significant data in order to study their interaction, too.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Cooley, T.B. and Lee, P: A series of cases of splenomegaly in children with anemia and peculiar bone changes. *Trans. Am. Pediatr. Soc.* 37: 29,1925.
2. Ingram, VM. And Stretton, A.O.W:Genetic basis of the thalassaemia diseases. *Nature* 184: 1903, 1959.
3. Weatherall, D.J., Clegg, J.B., Higgs, D.R., and Wood, W.G.:The hemoglobinopathies. *In* Scriver, C.R.,... Valle, McGraw-Hill Book Co., 1995, pp. 3417-3484.
4. Lubert Stryer. Βιοχημεία. Παν. Εκδ. Κρήτης.3^η Έκδοση 1988
5. <http://sickle.bwh.harvard.edu/hbsynthesis.html> "Hemoglobin Synthesis" April 14, 2002. pp1-3.
6. M.S. Ristaldi, S. Casula, S. Porcu, M.F. Marongiu, M. Piratsu, A. Cao: Activation of the δ -Globin gene by the β -Globin gene CACCC motif. *Blood Cell Molec. And Diseases* (1999)25(14) July 31:193-209
7. G. Stamatogiannopoulos, F. Grosvel : Hemoglobin Switching. *Molecular Basis of Blood Diseases*, 3th edition 135-182. 2001
8. <http://sickle.bwh.harvard.edu/thalover.html> "Thalassemia" October10 1999 pp1-4
9. Stamatoyannopoulos, G., and Grosveld, F., "Hemoglobin Switching " *In* The molecular Basis of Blood Diseases 3rd Edition 2001 pp.135-182.
10. Liebhaber SA, Wang Z., Cash FE., Monks B, Russell JE., : Developmental silencing of embryonic ζ -globin gene: concerted action of the promoter and 3'-flanking region combined with stage-specific silencing by the transcribed segment. *Mol. Cell. Biol.* 1996; 16:2637-2646.
11. Kamuzora, H., and Lehmann, H. (1975) *Nature (Lond.)* 256, 511-513
12. Huehns, E. R., and Farooqui, A. M. (1975) *Nature (Lond.)* 254, 335-337
13. Stamatoyannopoulos G., Grosveld F.: Hemoglobin Switching Part II : 135-182 2001. *The Molecular Basis of Blood Diseases*. 3rd edition
14. M. N. Papadakis, G. P. Patrinos "Contribution of gene conversion in the evolution of the human β -like globin gene family" *Hum. Genetics* 104, 2 March 1999, 117-125.

15. Lauer, J., Shen, C.-K.J., and Maniatis, T.: The chromosomal arrangement of human α -like globin genes: sequence homology and α -globin gene deletions. *Cell* 20:119, 1980.
16. Tang, D., Ebb, D., Hardison, R.C., and Rodgers, G.P.: Restoration of the CCAAT box or insertion of the CACCC motif activates δ -globin expression. *Blood* 90:421, 1997
17. Peterson R., Stamatoyannopoulos G., Role of gene order in developmental control of human γ and β -globin gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 13: 4836, 1993.
18. Lim, L.C., Swendeman, S.L. and Sheffery, M.: Molecular cloning of the α -globin transcription factor CP-2. *Mol. Cell. Biol.* 12:828, 1992
19. Liebhaber, S.A., Wang, Z., Cash, F.E., Monks, B., and Russell, J.E.: Developmental silencing of embryonic ζ -globin gene: concerted action of the promoter and 3' flanking region combined with stage-specific silencing by the transcribed segment. *Mol. Cell. Biol.* 16:2637, 1996.
20. Orkin, S.H.: GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* 80:575. 1992
21. Silver L., and Palis J., Initiation of murine embryonic erythropoiesis: a spatial analysis. *Blood* 89:1154, 1997.
22. Martin, D. Zon, I. Mutter, G. and Orkin, S.H.: Expression of an erythroid transcription factor in megakaryocytic and mast cell lineages. *Nature* 344:444, 1990.
23. Romeo H., Prandini M. Joulin V., Uzan G. : Megakaryocytic and erythrocytic lineages share specific transcription factors . *Nature* 344.447, 1990
24. Weiss MJ, Yu C and Orkin SH: Erythroid-cell-specific properties of transcriptional factor GATA-1 revealed by phenotypic rescue of a gene-targeted cell line. *Mol. Cell. Biol.* 17:1642, 1997
25. Blobel G, Nakajima T, Eckner R, Montminy M and Orkin SH. : CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 2061, 1998
26. Eckner, R., Ewen, M. E., Newsome, D., Gerdes, M., DeCaprio, J. A., Lawrence, J. B. & Livingston, D. M. (1994) *Genes Dev.* 8, 869–884.
27. Spencer, T. E., Jenster, G., Burcin, M. M., Allis, C. D., Zhou, J., Mizzen, C. A., McKenna, N. J., O'Nate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. & O'Malley, B. W. (1997) *Nature (London)* 389, 194–198.

28. Shikama, N., Lyon, J. & La Thangue, N. B. (1997) *Trends Cell Biol.* 7, 230–236.
29. GERD A. BLOBEL, TOSHIHIRO NAKAJIMA, RICHARD ECKNER, MARC MONTMINY, AND STUART H. ORKIN: CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 95, pp. 2061–2066, March 1998
30. Andersen, B., and Rosenfeld, M. G. (2001) *Endocr. Rev.* 22, 2–35
31. Wang, V. E., Schmidt, T., Chen, J., Sharp, P. A., and Tantin, D. (2004)*Mol. Cell. Biol.* 24, 1022–1032
32. Shivadasami R. and Orkin SH.: Erythropoiesis and globin gene expression in mice lacking the transcription factor NF-E2. *Proc.Natl. Acad. Sci.USA* 92:8690,1995.
33. Feng WC., Southwood CM., and Bieker JJ.: Analysis of beta thalassemia mutant DNA interactions with erythroid Krupper-like factor (EKLF), an erythroid cell-specific transcription factor.*J. Biol.Chem.* 269:1493, 1994
34. Southwood CM., Downs KM. and Bieker JJ.: Erythroid Kruppel-like factor exhibits an early and sequentially localized pattern of expression during mammalian erythroid ontogeny. *Dev. Dyn.* 206, 248, 1996
35. Gillemans N., Tewari R., Lindeboom F., Rottier R., de Wit T., Wijgerde M., Grosveld F., and Philipsen S.: Altered DNA-binding specificity mutants of EKLF and Sp1 show that EKLF is an activator on the beta-globin locus control region in vivo. *Genes Dev.* 12: 2863 , 1998
36. Asano H., Li XS., Stamatoyannopoulos G.: FKLf-2 a novel Kruppel-like factor that activates globin and other erythroid lineage genes . *Blood* -2001
37. Forrester WC., Thompson C., Elder JT., and Groudine M.: A developmentally stable chromatin structure in human β -globin gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1359: 1986
38. Tuan D., Solomon W.,Li Q., and London IM.: The β -like globin gene domain in human erythroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82. 6384, 1985
39. Bulger M., von Doorninck JH., Alex R., and Groudine M. : Conservation of sequence and structure flanking the mouse and human β - globin loci. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* 96. 5129, 1999
40. Bender M.A., Bulger M., Halow J., Telling A., Close J., Groudine M.: Globin gene switching and DNase I sensitivity of the endogenous β -globin locus in mice does not require the locus control region . *Mol. Cel.* 2001

41. Orkin, S. H.: Transcription factors and hematopoietic development. *J. Biol. Chem.* 270:4955–4958. 1995
42. Plant, K. E., S. J. Routledge, and N. J. Proudfoot.: Intergenic Transcription in the human beta-globin gene cluster. *Mol. Cell. Biol.* 21:6507–6514. 2001
43. Martin, D.I.: Regulation of beta-globin gene expression: straightening out the locus. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6: 488, 1996.
44. Herendeen DR, Kassavetis GA, and Geiduschek EP: A transcriptional enhancer whose function imposes a requirement that proteins track along DNA. *Science* 256: 1298, 1992.
45. Peterson KR, Navas PA, Stamatogiannopoulos G.: Cis-control of globin gene switching resides in gene-specific sequences, as well as in gene order. *Blood* 94: 614a, 1999.
46. Betty S Pace and Sima Zein: Understanding Mechanisms of γ -globin gene regulation to develop strategies for pharmacological fetal hemoglobin induction. *Dev. Dynamics* 235:1727-1737, 2006
47. Charache S, Dover GJ, Moore RD, Eckert S, Ballas SK, Koshy M, Miller PFA, Orringer ED., Phillips GJ, Platt OS, Thomas GH,: Hydroxyurea: Effect on hemoglobin production in patients with sickle cell anemia. *Blood.* 73:2555, 1992
48. Adamson SD, Herbert E, Kemp SF. Effects of hemin and other porphyrins on protein synthesis in a reticulocyte lysate cell-free system. *J. Mol. Biol.* 1969 Jun 14:42920;247-58.
49. Kuo MH, Allis CD. 1998 Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* 20:615-626
50. P. Karlson «Βιοσύνθεση των πορφυρινών» Κεφάλαιο 9-Βιοχημεία. 11η Έκδοση. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας. (201-205).
51. T Enver, J W Zhang, T Papayannopoulou, and G Stamatoyannopoulos: DNA methylation: a secondary event in globin gene switching? *Gen. Dev* 2:698 706, 1988
52. Jane SM., Ney PA., Vanin EF., Gumucio DL., and Nienhuis AW.: Identification of a stage selector element in the human γ -globin gene promoter that fosters preferential interaction with 5' HS2 enhancer when in competition with the β -promoter. *EMBO J.* 11:2961, 1992.

53. Man Yu, Hemei Han, Ping Xiang, Qiliang Li, and George Stamatoyannopoulos: Autonomous Silencing as Well as Competition Controls γ -Globin Gene Expression during Development *Mol. Cell. Biol.* (13) 2006, p. 4775–4781 Vol. 26,
54. Navas, P. A., K. R. Peterson, Q. Li, E. Skarpidi, A. Rohde, S. E. Shaw, C. H.Clegg, H. Asano, and G. Stamatoyannopoulos.: Developmental specificity of the interaction between the locus control region and embryonic or fetal globin genes in transgenic mice with an HS3 core deletion. *Mol. Cell.Biol.* 18:4188–4196.1998
55. LEONOVA J. YE. ; KAZANETZ E. G.; SMETANINA N. S.; ADEKILE A. D.; EFREMOV G. D.; HUISMAN T. H. J.; “Variability in the fetal hemoglobin level of the normal adult” *Am. J. of Hematol.* 1996, vol. 53, no2, pp. 59-65.
56. Stamatoyannopoylos, G., Veith, R., Galanello, R., and Papayannopoulou,Th.: Hb F production in stressed erythropoiesis: observations and kinetic models. *Ann. N.Y.Acad. Sci.* 445:188,1985
57. Wood WG, Stamatogiannopoulos G., Lim G., Nute PE.: F-cells in the adults: normal values and levels in individuals with hereditary and acquired elevations of Hb F. *Blood* 1975; 46:671-682.
58. WeatherallDJ., Clegg JB., Wood WG., A model for the persistence or reactivation of fetal haemoglobin production. *Lancet.* 1976;2:660-663.
59. Papayiannopoulou Th., Brice M., Stamatogiannopoulos G.: Hemoglobin F synthesis in vitro: evidence for control at the level of primitive erythroid stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977;74:2923-2927.
60. Alter,B.P., Jackson, B.T., Lipton, J.M., Piasecki, G.J., Jackson, P.L., Kudisch, M., and Nathan, D.G.: Control of simian fetal hemoglobin switch at the progenitor cell level. *J. Clin. Invest.*67:458, 1981.
61. Papayiannopoulou Th, Bunn HF., Stamatogianopoulos G.: Cellular distribution of hemoglobin F in a clonal hemopoietic stem-cell disorder. *N. Engl.J. Med.* 1978:298:72-75
62. Papayannopoulou Th, Brice M , Stamatogiannopoulos G: Analysis of human hemoglobin switching in MEL x human fetal erythroid cell hybrids. *Cell.* 1986;46:469-476.
63. Stamatogiannopoulos G., Papayanopoulou Th: Fetal hemoglobin and the erythroid stem cell differentiation proces. In *Cellular and Molecular regulation of hemoglobin switching* . New York 1979 : 323-350

64. A Al-Khatti, T Papayannopoulou, G Knitter, EF Fritsch and G Stamatoyannopoulos :Cooperative enhancement of F-cell formation in baboons treated with erythropoietin and hydroxyurea *Blood* 72, (2), pp. 817-819,1988
65. George Stamatoyannopoulos: Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. *Exp. Hematol.* 33 , 259–271. 2005
66. Miller, B.A., Salameh, M., Ahmed, M., Wainscoat, J.and Nathan D.: High fetal hemoglobin production in sickle cell anemia in the eastern province of Saudi Arabia is genetically determined. *Blood* 67: 1404, 1986.
67. Martin H. Steinberg, Zhi-Hong Lu, Franca B. Barton, Michael L. Terrin, Samuel Charache, George J. Dover, and the Multicenter Study of Hydroxyurea: Fetal Hemoglobin in Sickle Cell Anemia: Determinants of Response to Hydroxyurea *Blood*, Vol. 89 No. 3 (February 1), 1997: pp. 1078-1088
68. Ikuta, T., Ausenda, S., and Cappellini, M.D. 2001. Mechanism for fetal globin gene expression: role of the soluble guanylate cyclase-cGMP-dependent protein kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:1847–1852.
69. DeSimone, J., Heller, P., Hall, L., and Zwiers, D.:5-Azacytidine stimulates fetal hemoglobin synthesis in anemic baboons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:4428 , 1982.
70. Letvin,N.L., Linch, D.C., Beardsley, G.P., McIntyre, K.W., and Nathan, D.G.: Augmentation of fetal hemoglobin production in anemic monkeys by hydroxyurea. *N. Ehgl.J. Med.* 310:869, 1984.
71. McDonagh, K.T., Dover, G.J., Donahue, R.E., Nathan, D.G., Agricola, B., Byrne E., and Nienhuis,A.W.:Hydroxyurea-induced Hb f production in anemic primates: augmentation by erythropoietin, hematopoietic growth factors and sodium butyrate.*Exp.Hematol.*20:1156, 1992.
72. Kruh, J.: Effect of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cell in culture. *Mol. Cell Biochem.* 42:65, 1982.
73. Cao, H.: Pharmacological induction of fetal hemoglobin synthesis using histone deacetylase inhibitors. *Hematology* 2004Jun;9(3):223-33.
74. Humphries, R.K., Dover, G., Young, N.S., Moore, J.G.,Charache, S., Ley, T., and Nienhuis, A.W.:-Azacytidine acts directly on both erythroid precursors and progenitors to increase production of fetal hemoglobin. *J. Clin. Invest.* 75: 547, 1985.

75. R. Mabaera, C. Richardson and CH. Lowrer : 5-Azacytidine induction of human γ -globin gene expression *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 38,(2), 2007, Page 157
76. J.M. Bollinger : Hydroxyurea A Rediscovered miracle or Killer? Report on Hydroxyurea April 1996. <http://members.aol.com/mpdsupport/hhydrox.html>(8/10/2007)
77. Lubert Stryer.: Βιοσύνθεση των νουκλεοτιδίων. Κεφάλαιο 25 σελ. 665. Βιοχημεία. Παν. Εκδ. Κρήτης. 3^η Έκδοση 1988.
78. Galanello R, Stamatoyannopoulos G, Papayannopoulou Th. Mechanism of Hb F stimulation by S-stage compounds: in vitro studies with bone marrow cells exposed to 5-azacytidine, Ara-C or hydroxyurea. *J Clin Invest.* 1988;81:1209–1216.
79. Papayannopoulou, T., Torrealba de Ron, A., Veith, R., Knitter, G., and Stamatoyannopoulos, G.: Arabinosylcytosine induces fetal hemoglobin in baboons by perturbing erythroid cell differentiation kinetics. *Science* 224:617,1984.
80. Veith, R., Galanello, R., Papayanopoulou, Th., and Stamatoyannopoulos. G.,: Stimulation of F-cell production in HbS patients treated with Ara-C or HU. *N. Engl. J. Med.* 313:1571, 1985.
81. Styles, L.A., Lubin, B., Vichinsky, E., Lawrence, S., Hua, M., Test, S., and Kuypers, F.,: Decrease of very late activation antigen-4 and CD36 on reticulocytes in sickle cell patients treated with hydroxyurea. *Blood* 89:2554,1997
82. Covas DT, de Lucena AI, Vianna Bonini Palma P, Zaro MA: Effects of HU on membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. *Haematologica* 2004; 89:273-80.
83. Gabero S, Canalli AA, Traina F, Albuquerque DM, Saad STO, Costa FF et al.: Therapy with HU is associated with reduced adhesion molecule gene and protein expression in sickle red cell , with concomitant reduction in adhesive properties. *Eur. J. Haematol.* 2007;78:144-51.
84. Brun M, Bourdoulous S, Couraud PO, Elion J, Krishnamoorthy R, Lapoumeroulie C.: Hydroxyurea downregulates endothelin-1 gene expression and upregulates ICAM-1 gene expression in cultured human endothelial cells. *Pharmacogenomics J.* 2003; 3: 215-26.

85. Johnson C., Telen JM,: Adhesion molecules and HU in pathophysiology of sickle cell disease. *Haematologica*, 2008; 93(4)481-486.
86. Stolze, K., and Nohl, H. 1990. EPR studies on the oxidation of hydroxyurea to paramagnetic compounds by oxyhemoglobin. *Biochem. Pharmacol.*40:799–802.
87. Pacelli, R., Taira, J., Cook, J.A., Wink, D.A., and Krishna, M.C.1996.Hydroxyurea reacts with heme proteins to generate nitric oxide. *Lancet*. 347:900.
88. Kim-Shapiro, D.B., King, S.B., Bonifant, C.L., Kolibash, C.P., and Ballas, S.K. 1998. Time resolved absorption study of the reaction of hydroxyurea with sickle cell hemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta*. 1380:64–74.
89. Jiang, J., et al. 1997. In vivo production of nitric oxide in rats after administration of hydroxyurea. *Mol. Pharmacol*. 52:1081–1086
90. Glover, R.E., Ivy, E.D., Orringer, E.P., Maeda, H., and Mason, R.P. 1999.Detection of nitrosyl hemoglobin in venous blood in the treatment of sickle cell anemia with hydroxyurea. *Mol. Pharmacol*. 55:1006–1010
91. Nahavandi, M., Wyche, M.Q., Perlin, E., Tavakkoli, F., and Castro, O. 2000. Nitric oxide metabolites in sickle cell anemia patients after oral administration of hydroxyurea; hemoglobinopathy. *Hematology*.5:335–339
92. Gladwin, M.T., et al. 2002. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. *Br. J. Haematol*. 116:436–444.
93. Kwon, N.S., Stuehr, D.J., and Nathan, C.F. 1991. Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J. Exp. Med*.174:761–767
94. Lepoivre, M., Flaman, J.M., Bobe, P., Lemaire, G., and Henry, Y. 1994.Quenching of the tyrosyl free radical of ribonucleotide reductase by nitric oxide. Relationship to cytostasis induced in tumor cells by cytotoxic macrophages. *J. Biol. Chem*. 269:21891–21897.
95. Bundy, R., Marczin, N., Chester, A.H., and Yacoub, M. 1999. Differential regulation of DNA synthesis by nitric oxide and hydroxyurea in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol*. 277:H1799–H1807.
96. Lassmann, G., Thelander, L., and Graslund, A. 1992. EPR stopped-flow studies of the reaction of the tyrosyl radical of protein R2 from ribonucleotide reductase with hydroxyurea. *Biochem. Biophys. Res. Commun*.188:879–887.
97. Yarbro, J.W. 1992.Mechanism of action of hydroxyurea. *Semin.Oncol*.9:1–10.

98. S. Bruce King : A role for nitric oxide in Hydroxyurea-mediated fetal hemoglobin induction. *J.C.I* 2003 (111) 2 , 171-172.
99. VP. Cokic, RD. Smith, BB. Beleslin-Cokic, JM. Njoroge, JL. Miller, MT. Gladwin and AN. Schechter: Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide–dependent activation of soluble guanylyl cyclase. *J.Clin.Invest.*111:231-239 (2003)
100. Shu Bing ZHANG, Qi Ye HE, Hui ZHAO, Chang Yun GUI, Chu JIANG and Ruo Lan QIAN “Function of GATA transcription factors in hydroxyurea-induced HEL cells” *Cell Research* (2001) **11**, 301–310.
101. E Fibach, P Kollia, AN Schechter, CT Noguchi and GP Rodgers:Hemin-induced acceleration of hemoglobin production in immature cultured erythroid cells: preferential enhancement of fetal hemoglobin *Blood Vol* 85, 10, pp. 2967-2974,1995
102. Peter J. Ratcliffe; Hif-1 and Hif2:working alone or together in hypoxia? *The J. of Clin. Inves.*vol 117, (4) April 2007, 862-865.
103. Al-Khatti, A., Veith,R.W.,Papayannopoulou,T., Fritsch,E.F., Goldwasser, E., and Stamatoyannopoulos, G.: Stimulation of fetal hemoglobin synthesis by erythropoietin in babbons. *N. E. J. Med.* 317:415,1987.
104. Rodgers, G.P., Dover, G.J., Uyesaka, N., Noguchi,C.T., Schechter, A.N., and Nienhuis, A.W.:Augmentation by erythropoietin of fetal hemoglobin response to hydroxyurea in sickle cell patients.*N. E.J. Med.*328:73,1993.
105. Rachmilewitz, E.A., and Aker, M.: The role of recombinant human erythropoietin in treatment of thalassemia. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*850:129,1998.
106. B. CANONICO., C. FELICI, S. PAPA “The CD corner.CD117” *J. of Biological Regulators and Homeostatic Agent.*2001
107. C.L. Erickson-Miller, L.M. Pelus, K.A. Lord. Signaling induced by Epo and SCF in UT-7/Epo cells: Transient versus sustained proliferation.
108. N.V. Bhanu, T.A. Trice, Y. Terry Lee and J.L. Miller: A signaling mechanism for growth-related expression of fetal Hemoglobin. *Blood* (2004) 103: 1929-1933
109. Stamatoyannopoulos, G., Blau, C.A., Nakamoto, B., Josephson, B., Li,Q., Liakopoulou, E., Pace,B., Papayannopoulou, T., Brusilow,S.W., Dover,G.,:Fetal hemoglobin induction by acetate, a product of butyrate catabolism. *Blood* 84:3198,1994.

110. Perrine, S.P., Miller, B.A., Greene, M.F., Cohen, R.A., Cook, N., Shackleton, C., and Faller, D.V.: Butyric acid analogues augment gamma globin gene expression in neonatal erythroid progenitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148:694, 1987
111. Perrine, S.P., Ginder, G.D., Faller, D.V., Dover, G., Ikuta, T., Witkowska, H.E., Cai, S., Vichinsky, E., and Olivieri, N.: A short-term trial of butyrate to stimulate fetal globin gene expression in β globin disorders. *N.E.J.Med.* 328:81, 1993.
112. Pace B.S.; Chen Y.-R.; Thompson A.; Goodman S.R.: Butyrate-inducible elements in the human γ -globin promoter. *Exp. Hematol.* 28, (3), 2000pp. 283-293.
113. Tohru Ikuta, Yuet Wai Kan, Paul S. Swerdlow, Douglas V. Faller, and Susan P. Perrine: Alterations in Protein-DNA Interactions in the γ -Globin Gene Promoter in Response to Butyrate Therapy . *Blood*, Vol. 92 No. 8 (October 15), 1998:pp.2924-2933.
114. Hassana Fathallah and George F. Atweh: Induction of Fetal Hemoglobin in the Treatment of Sickle Cell Disease. *Hematology 2006* The American Society of Hematology pp.58-62
115. Taketani S. Acquisition, mobilization and utilization of cellular iron and heme: endless findings and growing evidence of tight regulation. *Tohoku J Exp Med.* 2005;205:297-318.
116. Igarashi K, Sun J. The heme-Bach1 pathway in the regulation of oxidative stress response and erythroid differentiation. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8:107-118.
117. Kollia P, Noguchi CT, Fibach E, Loukopoulos D, Schechter AN: Modulation of globin gene expression in cultured erythroid precursors derived from normal individuals: transcriptional and posttranscriptional regulation by hemin. *Proc Assoc Am Physicians.*, 109(4):420-8(1997).
118. Kollia P., Fibach E., Politou M., Noguchi CT., Schechter AN. And Loukopoulos D. Hydroxyurea and hemin affect both the transcriptional and post-transcriptional mechanisms of some globin genes in human adult erythroid cells. *Ann N.Y.Acad.Sci.* 850, 449-451. (1998).
119. Jane-Jane Chen: Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2_{kinase}: relevance to anemias *Blood* 2007 (109) 2693-2699.
120. Noguchi CT, Schechter AN: The intracellular polymerization of sickle hemoglobin and its relevance to sickle cell disease. *Blood* 58: 1057. 1981

121. Rachmilewitz EA, Goldfarb A, Dover G: Administration of erythropoietin to patients with P-thalassemia. *Blood* 78:1145, 1991
122. Nagel RL, Vichinsky E, Shah M, Johnson R, Spadacino E, Fabry ME, Mangahas L, Abel R, Stamatoyannopoulos G: F reticulocytes response in sickle cell anemia treated with recombinant human erythropoietin: A double-blind study. *Blood* 81:9, 1993
123. Ralph M. Böhmer: Reactivation of Fetal Hemoglobin in Adult Stem Cell Erythropoiesis by Transforming Growth Factor- β . *J. Hem. & Stem Cell Res* Oct 2003, Vol. 12, No. 5: 499-504
124. J. Larsson, U. Blank, H. Helgadottir, J. Mar Björnsson, M. Ehinger, M. Goumans, X. Fan1, P. Levéen and S Karlsson : TGF- β signaling-deficient hematopoietic stem cells have normal self-renewal and regenerative ability in vivo despite increased proliferative capacity in vitro *Blood* First Edition Paper, prepublished online July 3, 2003; DOI 10.1182/blood-2003-04-1300
125. Lampronti I., Bianchi N., Borgatti M., Fibach E., Prus E. and Gambari R.(2003). Accumulation of γ -globin mRNA in human erythroid cells treated with angelicin. *Euro. J. Haematol.* 71, 189-195,2003.
126. Fibach E., Bianchi N., Borgatti M., Prus E. and Gambari, R. (2003). Mithramycin induces fetal hemoglobin production in normal and thalassemic human erythroid precursor cells. *Blood* 102, 1276-1281.
127. Haynes J., Baliga S., Obiako B., Ofori-Acquah S. And Pace B. (2004). Zileuton induces hemoglobin F synthesis in erythroid progenitors: role of the L-arginine-nitric oxide signaling pathway. *Blood* 103, 3945-3950.
- 127 A. Cao H., Stamatoyannopoulos G. and Jung M. (2004). Induction of human γ globin gene expression by histone deacetylase inhibitors. *Blood* 103, 701-709.
128. Vadolas J., Wardan H., Orford M., Williamson R. and Ioannou PA. (2004). Cellular genomic reporter assays for screening and evaluation of inducers of fetal hemoglobin. *Hum. Mol. Genetics* 13, 223-233.
129. P Kollia, E Fibach, S M Najjar, A N Schechter, and C T Noguchi Modifications of RNA processing modulate the expression of hemoglobin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 June 11; 93(12): 5693–5698.

130. N Rodgers, Z Wang, M Kiledjian: Regulated globin mRNA decay is a cytoplasmic event proceeding through 3[prime prime or minute]-to-5[prime prime or minute] exosome-dependent decapping(2002), 8: 1526-1537 Cambridge University Press
131. Haley JD., Smith DE., Schwedes J., Brennan R., Pearce C., Moore C., Wang F., Petti F., Grosveld F., Jane SM., Noguchi CT. and Schechter AN. (2003). Identification and characterization of mechanistically distinct inducers of γ -globin transcription. *Biochemical Pharmacology* 66, 1755-1768.
132. Chiarabelli C., Bianchi N., Borgatti M., Feriotto G., Prus E., Martello D., Mischiati C., Sereni A., Fibach E. and Gambari G. (2003). Induction of γ -globin gene expression by tallimustine analogues in human erythroid cells. *Haematologica* 88, 826-827.
133. Mischiati C., Sereni A., Lampronti I., Bianchi N., Borgatti M., Prus E., Fibach E. and Gambari R. Rapamycin-induced induction of γ -globin mRNA accumulation in human erythroid cells. *Brit. J. Haematol.* (2004).
134. Bernard PS, Wittwer CT. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin Chem* 2002, 48:1178-1185
135. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 2002, 30:503-512
136. Cross, N. Quantitative PCR techniques and applications. *British Journal of Haematology* 1995, 89:693-697
137. Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med* 2002, 8:257-260
138. Ong YL, Irvine A. Quantitative real-time PCR: a critique of method and practical considerations. *Hematology* 2002, 7:59-67
139. Gabert J, Beillard E, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia-A Europe against cancer program, *Leukemia* 2003, 17:2318-2357
140. Lossos IS et al. Optimization of quantitative real-time RT-PCR parameters for the study of lymphoid malignancies. *Leukemia* 2003, 17:789-795
141. van der Velden VHJ, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski t, Gabert J, van Dongen JJM, Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies

by real-time quantitative PCR:principles,approaches, and laboratory aspects, Leukemia 2003, 17:1013-1034

142. Beillard E et al.evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' RQ-PCR - A Europe against cancer program. Leukemia 2003, 17:2474-2486
143. Leone et al. J. Chromatogr. 1985.(15) 321 (2) 19-21.
144. Forget BG. Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin. Ann N Y Acad Sci. 1998; 850:38-44.
145. Atweh GF, Schechter AN. Pharmacologic induction of fetal hemoglobin: raising the therapeutic bar in sickle cell disease. Curr Opin Hematol. 2001;8:123-130.
146. Torrealba-de Ron AT, Papayannopoulou T, Knapp MS, Fu MF, Knitter G, Stamatoyannopoulos G. Perturbations in the erythroid marrow progenitor cell pools may play a role in the augmentation of HbF by 5-azacytidine. Blood.1984; 63:201-210.
147. Blau CA, Constantoulakis P, al-Khatti A, et al. Fetal hemoglobin in acute and chronic states of erythroid expansion. Blood. 1993; 81:227-233.
148. Weatherall DJ: The molecular basis for phenotypic of genetic disease. Ann NY Acad Sci 758:245, 1995.
149. Stephenson JR, Axelrad AA, McLeod DL, Shreeve MM: Induction of colonies of hemoglobin synthesizing cells by erythropoietin in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68:1542,1971
150. Gregory CL, McCulloch EA, Till JE: Erythropoietic progenitors capable of colony formation in culture: State of differentiation. J Cell Physiol. 81: 411. 1973
151. P Malik, T Fisher, L Barsky, L Zeng, P Izadi, A Hiti, K Weinberg, T Coates, H Meiselman and D Kohn: An in vitro model of human red blood cell production from hematopoietic progenitor cells. The American Society of Hematology 1998 pp: 2664-2671.
152. S Goh, Y Terry Lee, G Bouffard, J Miller: Hembase: browser and genome portal for hematology and erythroid biology. Nucleic Acids Research 2004, 32, 572-574
153. Janie A. Ho, Chrisley V. Pickens, Michael P. Gamschik, O. Michael Colvin and Russell E. Ware. "In vitro induction of fetal hemoglobin in human erythroid progenitor cells" Experimental Hematology July 2003, Pages 586-591

154. Brizzi MF, Pavan M, Zini MG, et al. Regulation of c-kit expression in human myeloid cells. *Stem Cells* 1993;11(Suppl 2):42-48.
155. Linnekin D. Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999;31:1053-1074.
156. Marieke von Lindern, Martine Parren-van Amelsvoort, Thamar van Dijk, Evi Deiner, Emile van den Akker, Sjenet van Emst-de Vriesi, Peter Willemsi, Hartmut Beug, and Bob Loewenberg: Protein Kinase C α Controls Erythropoietin Receptor Signaling. *JBC*, Vol. 275, No. 44, Issue Nov 3, pp. 34719–34727, 2000
157. Wojda U, Noel P, and Miller JL: Fetal and adult hemoglobin production during adult erythropoiesis: coordinate expression correlates with cell proliferation. *Blood.* 2002, 99; 3005-3013.
158. SHAO Zonghong, ZHANG Hong, CHEN Guibin, WANG Li, LI Ke, ZHANG Yizhi, LI Li, SUN Juan: Expression and function of c-kit receptor in bone marrow mononuclear cells of patients with myelodysplastic syndromes. *Chinese Medical J.* 2001, 114,(5): 481-485.
159. Fibach E. (2001). Cell culture and animal models to screen for promising fetal hemoglobin-stimulating compounds. *Sem. in Hematology* 38, 374-381.
160. Asano H., Li XS. and Stamatoyannopoulos G. (1999). FKLf, a novel Kruppel-like factor that activates human embryonic and fetal beta-like globin genes. *Mol. Cell Biol.* 19, 3571-3579.
161. Ikuta T., Ausenda S. and Cappellini M. (2001). Mechanism for fetal globin gene expression: role of the soluble guanylate cyclase-cGMP-dependent protein kinase pathway. *PNAS.* 98, 1847-1852.
162. Taylor ML, Metcalfe DD. Kit signal transduction. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2000;14:517-535.
163. Teglund S, McKay C, Schuetz E, et al. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell.* 1998;93:841-850.
164. Socolovsky M, Nam H, Fleming MD, Haase VH, Brugnara C, Lodish HF. Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-) 5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood.* 2001;98:3261- 3273.

165. Peschle C, Gabbianelli M, Testa U, et al. c-kit ligand reactivates fetal hemoglobin synthesis in serum-free culture of stringently purified normal adult burst-forming unit-erythroid. *Blood*. 1993; 81:328-336.
166. Wojda U, Leigh K, Njoroge J, Jackson K, Natarajan B, Stitely M and Miller J: Fetal hemoglobin modulation during human erythropoiesis: stem cell factor has late effect related to the expression pattern of CD117. *Blood* 2003, 101;2:492-497
167. V.P. Cokic, R.D. Smith, B.B. Beleslin-Cokic, J.M. Njoroge, J.L. Miller, M.T. Gladwin and A.N. Schechter " Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase." *J.Clin.Invest* 111(2):231-239 (2003)
168. M Haslauer, K Baltensperger, H Porzig :Epo and SCF induced DNA synthesis in normal human erythroid progenitor cell requires activation of PKC and is strongly inhibited by thrombin. *Blood* 94, 1, 1999,pp:114-126.
169. Panzenbock B, Bartunek P, Mapara MY, Zenke M (1998) Growth and differentiation of human stem cell factor/erythropoietin-dependent erythroid progenitor cells in vitro. *Blood* 92:3658
170. Donald Lavelle, Robert Molokie, Janice Ducksworth, and Joseph DeSimone: Effects of hydroxyurea, stem cell factor, and erythropoietin in combination on fetal hemoglobin in the baboon. *Experimental Hematology* 29 (2001) 156–162
171. Taylor WR, Agarwal ML, Agarwal A, Stacey DW, Stark GR (1999) p53 inhibits entry into mitosis when DNA synthesis is blocked. *Oncogene* 18:283
172. Archer SY, Meng S, Shei A, Hodin RA (1998) p21WAF1 is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6791
173. Macleod KF, Sherry N, Hannon G, et al. (1995) p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev* 9:935
174. Pircher TJ, Geiger JN, Zhang D, et al. Integrative signaling by minimal erythropoietin receptor forms and c-Kit. *J Biol Chem*. 2001;276:8995- 9002.
175. Hiroyuki Sakatoku, Susumu Inoue: In vitro proliferation and differentiation of erythroid progenitors of cord blood. *Stem Cells* 1997;15:268-274

176. Miller BA, Perrine SP, Bernstein A et al: Influence of steel factor on hemoglobin synthesis in sickle cell disease. *Blood* 1992;79;1861-1868
177. Karhi KK, Andersson LC, Voupio P, et al: Expression of blood group A antigen in human bone marrow cells. *Blood* 1981;57;147-151.
178. Gabbianelli M, Testa U, Massa A, et al. Hemoglobin switching in unicellular erythroid culture of sibling erythroid burst-forming units: kit ligand induces a dose-dependent fetal hemoglobin reactivation potentiated by sodium butyrate. *Blood*. 2000;95:3555-3561.
179. R.D.Smith, Jin Li, C.T.Noguchi, A.N.Schechter(2000) Quantitative PCR analysis of HbF inducers in primary human adult erythroid cells. *Blood* (95), 3 863-869