

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Καθ. Ν. Βαμβακόπουλος

***«ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΗΣ ΠΑΡΑΜΟΝΗΣ
ΕΜΒΡΥΪΚΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΣΕ ΕΝΗΛΙΚΕΣ ΚΑΙ
ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΣΥΝΔΕΟΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΩΝ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ »***

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΤΟΥ

ΑΓΓΕΛΟΥ Γ. ΚΑΛΑΜΑΡΑ

Βιολόγου

**ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

ΛΑΡΙΣΑ 2010

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

- ΚΟΛΛΙΑ ΠΑΝΑΓΟΥΛΑ

Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου

Πανεπιστημίου Αθηνών

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- ΒΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

Καθηγητής Βιολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- ΚΟΛΛΙΑ ΠΑΝΑΓΟΥΛΑ

Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου Πανεπιστημίου Αθηνών

- ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- ΒΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

Καθηγητής Βιολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- ΚΟΥΚΟΥΛΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- ΣΤΑΘΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

Καθηγητής Παθολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- ΚΥΡΙΑΚΟΥ ΔΕΣΠΟΙΝΑ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικών Μεταγγίσεων Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- ΜΑΤΣΟΥΚΑ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αιματολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- ΚΟΛΛΙΑ ΠΑΝΑΓΟΥΛΑ

Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου Πανεπιστημίου Αθηνών

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	ΣΕΛΙΔΕΣ
Περιεχόμενα	5
Πρόλογος	13
1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	15
1.1. Το μόριο της αιμοσφαιρίνης	15
1.2. Δομή της αιμοσφαιρίνης	15
1.3. Οι αιμοσφαιρίνες του ανθρώπου	16
1.4. Η οργάνωση των γονιδίων σφαιρίνης.	19
1.5. Ρύθμιση της έκφρασης των σφαιρινικών γονιδίων.	20
1.5.1. Ρυθμιστική περιοχή του συμπλέγματος των γονιδίων β-τύπου (LCR)	23
1.6. Το γ- γονίδιο της σφαιρίνης	25
1.7. Εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη στους ενήλικες.	27
1.7.1. Προέλευση F κυττάρων	28
2. ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΟΠΑΘΕΙΕΣ	31
2.1. Γενικά	31
2.2. Μη φυσιολογικές πρωτεΐνες	33
2.3. α- Θαλασσαιμία	34

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	171
4.1 Η επιλογή και η κατηγοριοποίηση των δειγμάτων	171
4.2 Το μέγεθος και η καταλληλότητα του υπο μελέτη πληθυσμού	171
4.3 Η επιλογή των ετεροζυγωτών της β-MA	171
4.4 Σύγκριση αποτελεσμάτων των μεταλλαγών σε φορείς β-MA, δβ-MA και ΗΡFH, στο νομό Καρδίτσας σε σχέση με τα γενικά της Θεσσαλίας και της Ελλάδας	172
4.5 Συσχέτιση επιπέδων HbF με μεταλλαγές στο β-Cluster (είτε για β-MA, είτε για δβ-MA) και ΗΡFH	174
4.6 Συχνότητα της δβ-MA στον Ελληνικό πληθυσμό	174
4.7 Ο Ελληνικός τύπος της μη-ελλειπτικής Κληρονομικής Παραμονής Εμβρυϊκής Αιμοσφαιρίνης ΗΡFH. Αποτελέσματα από την ταυτοποίηση μιας νέας μετάλλαξης (g.- 109 G>T) στην HBG ₂	175
4.8 Η διπλή ετεροζυγωτία μη ελλειπτικής (non-deletional)ΗΡFH και δβ-μεσογειακής αναιμίας	178
4.9 Ο συνδυασμός της Κληρονομικής Παραμονής Εμβρυϊκής Αιμοσφαιρίνης Κρητικού μη-ελλειπτικού τύπου, με β-Μεσογειακή Αναιμία.	179
4.10 Η 5΄ ρυθμιστική περιοχή των ανθρώπινων γονιδίων της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης, ως ένα σημείο γονιδιακής σημειακής αναστροφής.	181
Περίληψη	183
Summary	185
Βιβλιογραφία	187

Στην Κατερίνα

Στη Γιούλη

Στο Βαγγέλη

Στη Μυρτώ

Στους γονείς μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η μεσογειακή αναιμία και τα θαλασσαιμικά σύνδρομα αποτελούν τα γενετικά νοσήματα με τη μεγαλύτερη συχνότητα, τόσο στους πληθυσμούς της Μεσογείου όσο και σε άλλες περιοχές της γης. Η κατανόηση της μοριακής τους βάσης και των εμπλεκόμενων μηχανισμών στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων σφαιρίνης στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια του ανθρώπου θα βοηθήσει στην περαιτέρω κατανόηση των μηχανισμών αλληλορύθμισης των συμπλεγμάτων των γονιδίων σφαιρίνης και στην αποτελεσματικότερη πρόληψη, διάγνωση και θεραπεία των ατόμων με θαλασσαιμικά σύνδρομα. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι cis-αλληλουχίες του γ-γονιδίου σφαιρίνης για την ταυτοποίηση μεταλλαγών υπεύθυνων για την παρουσία αυξημένης εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης σε ασθενείς με θαλασσαιμικά σύνδρομα [β-θαλασσαιμία, δβ-θαλασσαιμία και κληρονομική παραμονή εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (HPFH)] με σκοπό την κατανόηση των μηχανισμών αλληλεπίδρασης έκφρασης των γονιδίων σφαιρίνης.

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 Βιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Ν. Βαμβακόπουλο, 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 Παθολογίας κ. Ν. Σταθάκη, τον Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Γ. Κουκούλη, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αιματολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κα. Π. Μασσουκά και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικών Μεταγίσεων του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κα. Δ. Κυριάκου.

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

- τους συναδέλφους Βιολόγους του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας κα. Μαρία Σαμαρά, κα.

Μαρία Σάτρα, κα. Παγώνα Οικονόμου, κα. Σοφία Λυκούση, κα. Ιωάννα Χιώτογλου, κα. Ανδρομάχη Βαγενά και ιδιαίτερος τον κ. Χρήστο Χασανίδη Μοριακό Βιολόγο για την επιστημονική συνεργασία και ανιδιοτελή βοήθεια

- τους συναδέλφους κ. Μάνο Παπαδάκη, κα. Φωτεινή Καράμπαμπα και την κα. Κλειώ Σινοπούλου του Κέντρου Μεσογειακής Αναιμίας, Λαϊκό Νοσοκομείο, για την πολύτιμη υποστήριξη και συνδρομή στη διάγνωση “δύσκολων περιστατικών”
- τους συναδέλφους Χρήστο Βαγενά και Βέρα Μπαλαμίσα των Μονάδων Πρόληψης Μεσογειακής Αναιμίας στα Νοσοκομεία Λάρισας και Τρικάλων, αντίστοιχα, για τα στατιστικά στοιχεία τα οποία μου παραχώρησαν
- την τεχνολόγο του Εργαστηρίου της Μονάδας Πρόληψης Μεσογειακής Αναιμίας του Γενικού Νοσοκομείου Καρδίτσας κα. Πέτρα Κροσιμπλά για τη συνδρομή στη συλλογή του υλικού και της ανάλυσης των αιματολογικών στοιχείων
- τους τεχνολόγους του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας κα. Ασπασία Παπαγιαννοπούλου, Ασπασία Κυριτσάκα για το άριστο κλίμα συνεργασίας
- τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στη σύζυγό μου και τα τρία παιδιά μου, για την κατανόησή τους όλα αυτά τα χρόνια.

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Το μόριο της αιμοσφαιρίνης

Η αιμοσφαιρίνη (Hb) (ο όρος δόθηκε από Horpe-Seyler 1864), είναι η μια από τις σημαντικότερες και διεξοδικά μελετημένες πρωτεΐνες του ανθρώπου. Η βασική λειτουργία της είναι η μεταφορά του O_2 από τους πνεύμονες στους ιστούς και αντίστροφα του CO_2 αλλά και η διατήρηση-ρύθμιση σταθερού pH στο αίμα.

Αποτελείται από το πρωτεϊνικό μέρος, δύο ζεύγη πολυπεπτιδικών αλυσίδων, των σφαιρινών (ένα ζεύγος τύπου α και ένα ζεύγος τύπου β) και μια σιδηρούχο χρωστική την αίμη, υπεύθυνη για το ερυθρό χρώμα της αιμοσφαιρίνης.

Κάθε μόριο σφαιρίνης είναι ενωμένο με ένα μόριο αίμης, που αποτελείται από ένα πρωτοπορφυρινικό δακτύλιο με ένα άτομο Fe^{++} στο κέντρο, όπου γίνεται η πρόσδεση του O_2 . Έτσι το σύμπλεγμα των 4 υπομονάδων συγκροτεί το τεταρτοταγούς δομής αιμοσφαιρινικό μόριο ελλειψοειδούς μορφής με διαστάσεις $64\text{\AA} \times 55\text{\AA} \times 50\text{\AA}$ και M.B. 67.000 Da. Το μόριο της αίμης είναι δισκοειδές με διαστάσεις $14\text{\AA} \times 17\text{\AA}$ και M.B. 2.720 Da.

Οι δύο σφαιρίνες τύπου α (α - like globin chains) αποτελούνται από 141 αμινοξέα εκάστη και οι δύο τύπου β (β -like globin chains) από 146 αντίστοιχα.

1.2. Δομή της αιμοσφαιρίνης

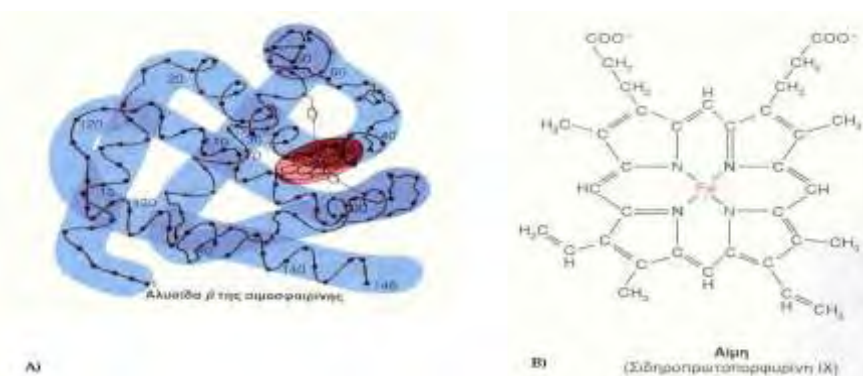
Η αιμοσφαιρίνη είναι μία σύνθετη σφαιρική πρωτεΐνη, η οποία περιέχει και μη πρωτεϊνικά στοιχεία. Το πρωτεϊνικό τμήμα αντιστοιχεί σε τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες σφαιρίνης, δύο α -τύπου (α και ζ σφαιρίνες) με 141 αμινοξέα και δύο β -τύπου (β , γ , δ , ϵ σφαιρίνες) με 146 αμινοξέα.

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 ($\zeta_2\epsilon_2$) και Hb Gower2 ($\alpha_2\epsilon_2$) 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) (Εικ. 1Α). Η αίμη, αποτελείται από τέσσερις πυρρολικούς δακτυλίους, οι οποίοι διατάσσονται σταυροειδώς σε ένα επίπεδο, στο κέντρο του οποίου στερεώνεται ένα άτομο δισθενούς σιδήρου (Εικ. 1Β). 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.



Εικόνα 1Α. Στερεοδιάταξη της αλυσίδας β της αιμοσφαιρίνης. Β. Το μόριο της αίμης (Σιδηροπρωτοπορφυρίνη IX)

1.3. Οι αιμοσφαιρίνες του ανθρώπου

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 λεκιθικός ασκός 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 (Εικ. 2).⁽²⁻⁴⁾

Η διαδικασία παραγωγής της ανθρώπινης αιμοσφαιρίνης (Hb) χαρακτηρίζεται από 2 μεγάλες αλλαγές ως προς τη σύνθεση των σφαιρικών αλυσίδων. Πρώτη, η

αντικατάσταση των πρωτοεμβρυϊκών από την εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη (HbF), η οποία συμπίπτει με την αλλαγή του οργάνου ερυθροποίησης από τον λεκιθικό ασκό 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.⁽⁵⁾ 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.⁽⁸⁾

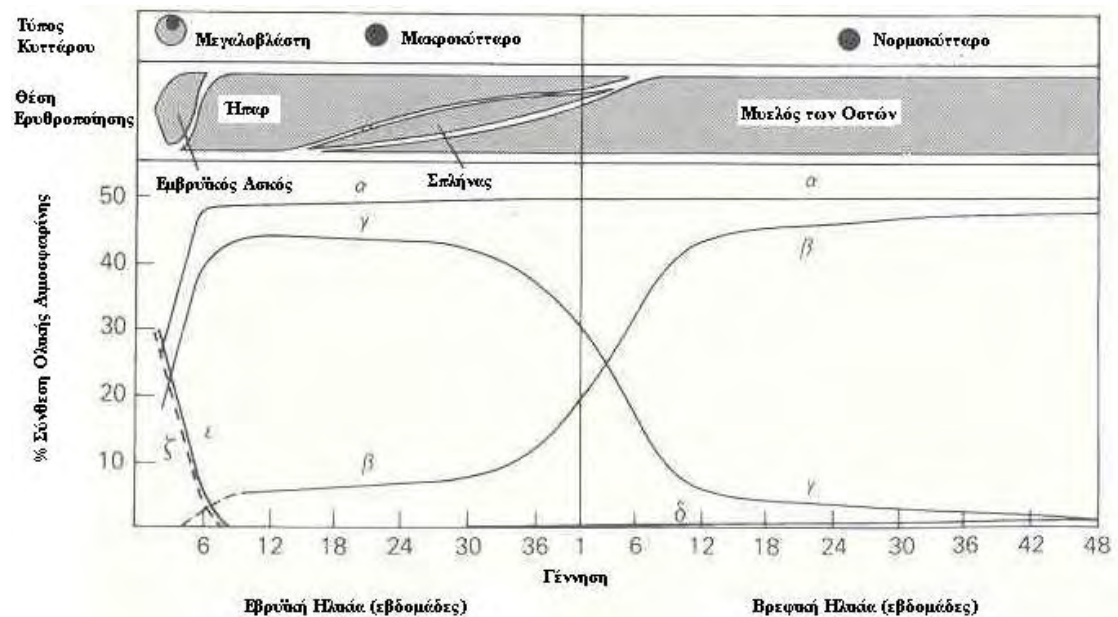
Στους πρώτους μήνες κύησης τα ερυθροκύτταρα περιέχουν κυρίως τις πρωτοεμβρυϊκές αιμοσφαιρίνες (Hb Gower1 και Hb Portland 1), οι οποίες κατά τους 6 τελευταίους μήνες έχουν πλήρως αντικατασταθεί από την εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη (HbF). Τα διαφορετικά μόρια αιμοσφαιρίνης που χαρακτηρίζουν τις μεταβολές αυτές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

Όπως φαίνεται από τη σύνθεση όλων των μορίων αιμοσφαιρίνης, με εξαίρεση τις αιμοσφαιρίνες των αρχικών εβδομάδων της εμβρυογένεσης (Hb Gower1: ζ₂ε₂ και Hb Portland1: ζ₂γ₂), 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.^(6,7) 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.⁽⁵¹⁾ 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 ($^G\gamma/A\gamma$) 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 ενηλίκου η κύρια αιμοσφαιρίνη είναι η HbA καθώς και μικρές ποσότητες HbA₂ και HbF.⁽⁵⁾



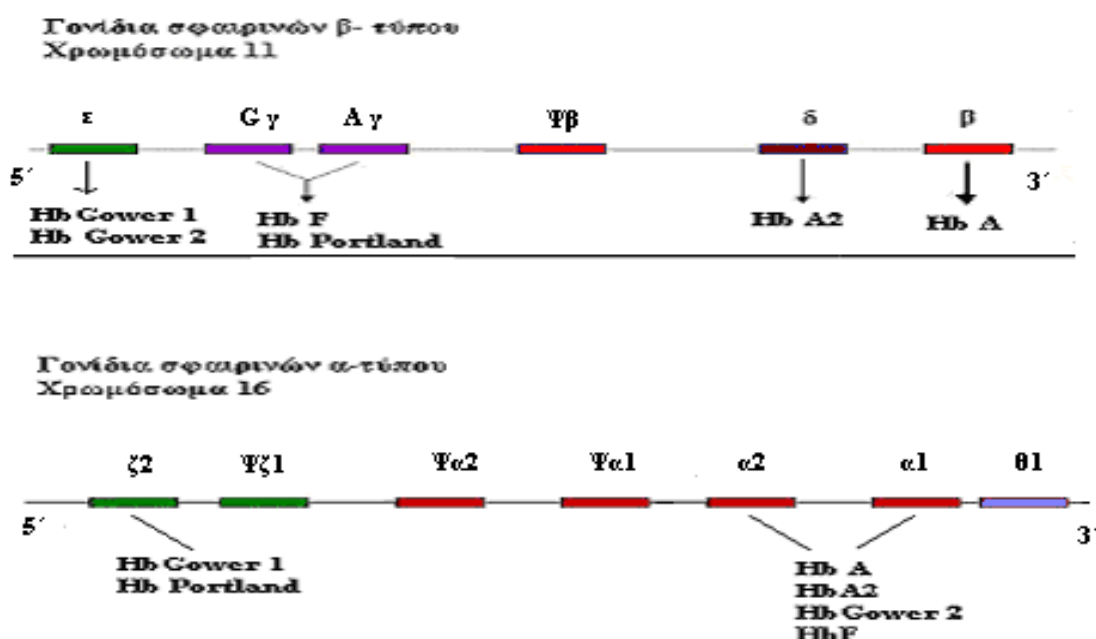
Εικόνα 2. Η σύνθεση των αλυσίδων των αιμοσφαιρινών και τα αντίστοιχα όργανα που συμμετέχουν κατά τη διάρκεια της οντογένεσης του ανθρώπου.

Πίνακας 1. Σύνθεση των μορίων των αιμοσφαιρινών του ανθρώπου.

Αιμοσφαιρίνες Ανθρώπου		
Πρωτοεμβρυϊκές Αιμοσφαιρίνες	Εμβρυϊκή Αιμοσφαιρίνη	Αιμοσφαιρίνη Ενηλίκου
HbGower1: $\zeta_2\varepsilon_2$ HbGower2: $\alpha_2\varepsilon_2$ Hb Portland I: $\zeta_2\gamma_2$ Hb Portland II: $\zeta_2\beta_2$	Hb F: $\alpha_2\gamma_2$	HbA: $\alpha_2\beta_2$ Hb A ₂ : $\alpha_2\delta_2$

1.4. Η οργάνωση των γονιδίων σφαιρίνης.

Τα γονίδια των σφαιρινικών 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 αιμοσφαιρινών στον άνθρωπο (Εικ.3).



Εικόνα 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 α₁ και α₂, το πρωτοεμβρυϊκό ζ₂. Μεταξύ των α₁ και α₂ 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.⁽¹⁾

Στα γονίδια του συμπλέγματος β-τύπου ανήκουν τα ε, Γγ, Αγ, 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.⁽³⁾ 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.⁽¹⁾

Τα $^G\gamma$ και $^A\gamma$ γονίδια δίνουν δομικά όμοια προϊόντα και είναι αποτέλεσμα γονιδιακού διπλασιασμού και μεταστροφής.⁽²⁾ Οι αλυσίδες των δύο γ γονιδίων διαφέρουν μόνο στο αμινοξύ της θέσης 136, όπου υπάρχει γλυκίνη (Gly) και αλανίνη (Ala) για τη $^G\gamma$ και $^A\gamma$ 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⁾

1.5. 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 ρυθμιστική 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.⁽¹⁵⁾ Η αναπτυσσόμενη 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.⁽¹⁶⁾

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:⁽⁵⁾

1. **GATA-1:** Ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων GATA και στην ομάδα των πρωτεϊνών τύπου “δάκτυλο ψευδαργύρου”(zinc - finger). 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.⁽¹⁸⁾ Αρχικά είχε χαρακτηριστεί ως πυρηνικός παράγοντας, ο οποίος συνδέεται με τον υποκινητή ή τους ενισχυτές των σφαιρινικών 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.⁽¹⁹⁾ 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.⁽²⁰⁾ 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 συμπαράγοντα ή ομάδας συμπαραγόντων.⁽²¹⁾ 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 συμπαράγοντα p300/CBP.⁽²²⁾ 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 συμπαράγοντας 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.⁽²⁹⁾ 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 συμπαράγοντες του GATA-1⁽²⁵⁾ 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.⁽²⁷⁾
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.⁽³²⁾ Πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι συμμετέχει ουσιαστικά στην ανάπτυξη του εμβρύου και στην ερυθροποίηση.⁽³³⁾

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.⁽²³⁾ 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” (zing-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.⁽²⁴⁾ Ο EKLF δρα ως ενεργοποιητής της μεταγραφής του β γονιδίου, είναι απαραίτητος για την έκφρασή του και για την τελική ωρίμανση των ερυθροκυττάρων.⁽²⁸⁾ 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.⁽³⁰⁾
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.⁽³¹⁾, που μεταφέρει τη γενετική πληροφορία από τα γονίδια του πυρήνα στα ριβοσώματα.

1.5.1. Ρυθμιστική 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.⁽⁵⁾ 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.⁽³⁴⁾ 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%. 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.⁽³⁴⁾ 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.⁽³⁵⁾

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.⁽³⁶⁾ 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.^(37,38)

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.⁽³⁸⁾ 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⁽³⁹⁾:

- 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.⁽⁴⁰⁾

- 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.⁽⁴¹⁾
- 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.⁽⁴²⁾

1.6. 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 ρυθμιστική 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 (Εικ. 4).^(114-115,127) 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.^(113, 116)

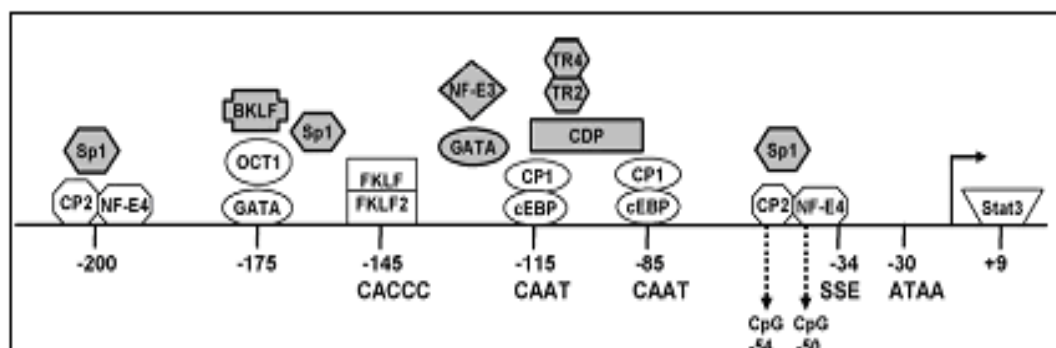
Ο υποκινητής αποτελεί περιοχή πρόσδεσης για μεγάλο αριθμό μεταγραφικών παραγόντων. Οι υποκινητές των δύο γ γονιδίων (Gγ και Aγ) είναι ταυτόσημοι και αναγνωρίζονται πολλές από τις χαρακτηριστικές θέσεις πρόσδεσης πρωτεϊνών, όπως μία CAC θέση, δύο CCAAT θέσεις (μέσα σε μια διπλασιασμένη περιοχή 27bp) και μία TATA θέση.⁽³⁹⁾ 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.⁽⁵⁵⁾

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.⁽⁴⁴⁾

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.⁽⁴⁶⁾ 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.⁽⁴⁵⁾

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.⁽⁵⁵⁾ 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.⁽⁴⁶⁾



Εικόνα 4. Ο υποκινητής του γ γονιδίου και οι μεταγραφικοί παράγοντες που προσδένονται σε αυτόν.

1.7. Εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη στους ενήλικες.

Η γ σφαιρίνη εκφράζεται σε μικρό ποσοστό στους ενήλικες σε φυσιολογικές συνθήκες και απαντάται σε εξειδικευμένα κύτταρα, τα F κύτταρα.⁽⁴⁷⁾ 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 A ή F κυττάρων.⁽⁴⁸⁾

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.⁽⁵⁾

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.

1.7.1. 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.⁽⁹⁾

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. 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. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο τα F κύτταρα που απαντώνται στους ενήλικες είναι τα λίγα εναπομείναντα στο μυελό των οστών από την εμβρυϊκή σειρά.

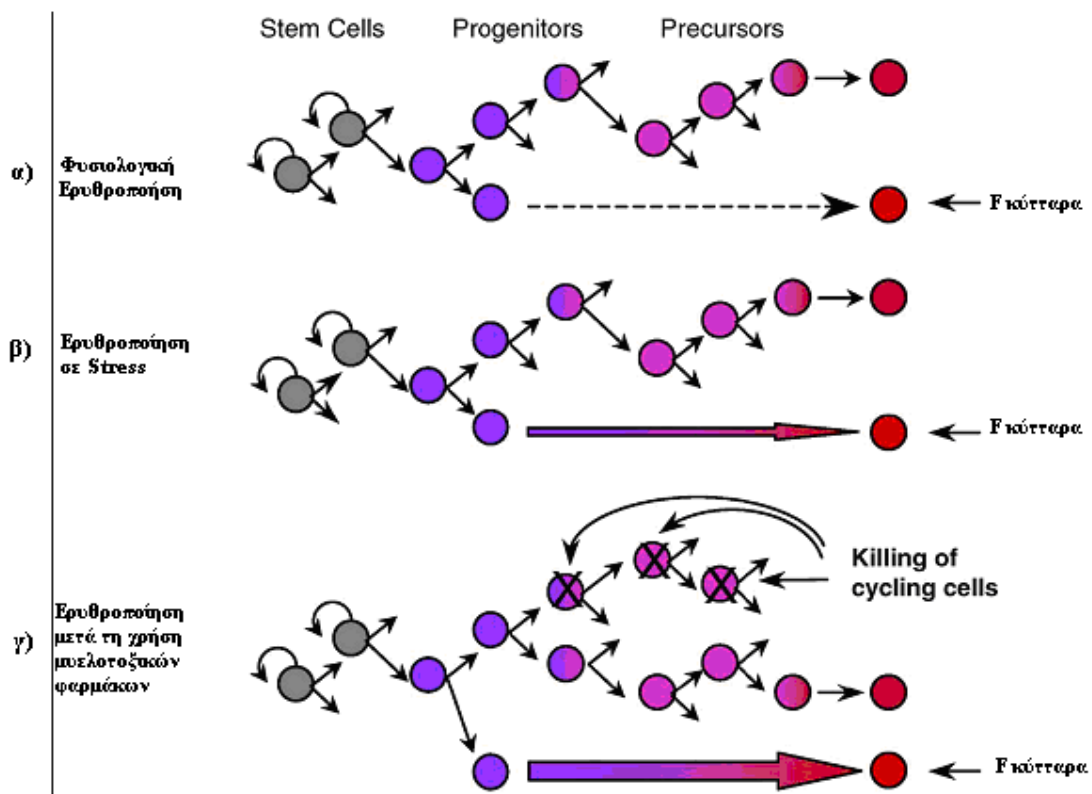
Τη δεκαετία του 1970 με την εφαρμογή των καλλιεργειών ερυθροειδικών κλώνων και την ανάπτυξη απομονωμένων BFUe αποικιών, προερχόμενες από ένα κύτταρο, απορρίφθηκε η προηγούμενη υπόθεση. Στις αποικίες αυτές των BFUe κυττάρων, με τη χρήση αντι-γ και αντι-β αντισωμάτων ήταν δυνατή η αναγνώριση των παραγόμενων αιμοσφαιρινών. Βρέθηκε, επίσης, ότι η πλειονότητα των αποικιών αποτελούνταν από μικτό πληθυσμό F και A κυττάρων (για παραγωγή HbF και HbA, αντίστοιχα),⁽¹¹⁾ 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.⁽¹¹⁾ Η θεωρία αυτή επιβεβαιώθηκε σε μελέτες που ακολούθησαν, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε καλλιέργειες κυττάρων ασθενών με αιματολογικά νοσήματα που χαρακτηρίζονται από κλωνικότητα, όπως πολυκυτταραιμία vera και χρόνια μυελογενή λευχαιμία.⁽²¹⁾ Επίσης κατά τη δεκαετία του 1980, επιβεβαιώθηκε η προηγούμενη υπόθεση με

πειράματα σε σωματικά υβριδικά κύτταρα.⁽¹²⁾

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.^(13,46) 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 (Εικ. 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 (Εικ. 5β).^(47,48) 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.⁽⁴⁸⁾ Αυτό υποστηρίζεται από πειράματα σε μπαμπούνους που χορηγείται ερυθροποιητίνη.⁽⁵¹⁾

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⁽⁵⁰⁾ (Εικ. 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.

(49)

2. ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΟΠΑΘΕΙΕΣ

2.1. Γενικά

Οι αιμοσφαιρινοπάθειες οφείλονται σε κληρονομικές διαταραχές που επηρεάζουν τη δομή ή/και το επίπεδο σύνθεσης των σφαιρινικών αλυσίδων. Οι αιμοσφαιρινοπάθειες μπορούν κατά βάση να χωρισθούν σε τέσσερις ομάδες. Η πρώτη αφορά αλλαγές στη δομή των σφαιρινικών αλυσίδων, η δεύτερη τα θαλασσαιμικά σύνδρομα, δηλαδή, την μείωση της σύνθεσης μιας ή περισσότερων αλυσίδων της σφαιρίνης, η τρίτη αλλαγές στην σύνθεση των σφαιρινικών αλυσίδων και τέλος η τέταρτη ομάδα αφορά την αυξημένη σύνθεση της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης στην ενήλικη ζωή.

Οι περισσότερες αλλαγές της δομής των αιμοσφαιρινών είναι σπάνιες και χωρίς κλινική σημασία. Ωστόσο μερικές από αυτές καταλήγουν σε μη φυσιολογική λειτουργία ή αστάθεια των πρωτεϊνικών μορίων, που έχει σαν αποτέλεσμα την μειωμένη μεταφορά οξυγόνου ή αιμολυτική αναιμία. Τέτοιες αλλαγές δημιουργούν τις αιμοσφαιρίνες HbS, HbC, HbE και είναι η αιτία των αιμοσφαιρινοπαθειών της πρώτης ομάδας, που περιγράφονται περαιτέρω.

Η δεύτερη ομάδα αφορά τα θαλασσαιμικά σύνδρομα, που χαρακτηρίζονται από μη ισόρροπη σύνθεση των αλυσίδων της σφαιρίνης α και β του ανθρώπου, λόγω μερικής ή πλήρους αναστολής της σύνθεσης της κάθε μίας ή και των δύο εξ αυτών.

Μετά από ανάλυση γενεαλογικών δένδρων αποδείχθηκε, ότι οι θαλασσαιμίες κληρονομούνται με αυτοσωμικά υπολειπόμενα γονίδια. Τα θαλασσαιμικά σύνδρομα διακρίνονται σε α- και β-θαλασσαιμίες, στις οποίες υπάρχει μείωση της σύνθεσης των α ή β-αλυσίδων, αντίστοιχα. Οι θαλασσαιμίες εμφανίζουν μεγάλη φαινοτυπική ετερογένεια που μπορεί να είναι αποτέλεσμα του ότι ο φαινότυπος καθορίζεται από ένα πλήθος παραγόντων, την υποκείμενη μετάλλαξη, τη συνύπαρξη ή μη άλλων αιμοσφαιρινοπαθειών και την επίδραση άλλων γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων.

Η δεύτερη και τρίτη ομάδα αιμοσφαιρινοπαθειών περιλαμβάνουν διαταραχές με κλινική εικόνα θαλασσαιμίας. Οι αιμοσφαιρινοπάθειες αυτές προέρχονται από σημειακές μεταλλάξεις στο τρίτο εξόνιο του β- γονιδίου. Ορισμένες από αυτές τις μεταλλάξεις δημιουργούν μεταλλάξεις χωρίς νόημα. Συνέπεια των μεταλλάξεων αυτών είναι η δημιουργία αλυσίδων β- σφαιρίνης με μέγεθος διαφορετικό του φυσιολογικού. Οι αλυσίδες αυτές είναι εξαιρετικά ασταθείς, με αποτέλεσμα ο χρόνος

ζωής να είναι μικρότερο αυτού που χρειάζεται για τη δημιουργία του τετραμερούς της αιμοσφαιρίνης.

Η τέταρτη ομάδα αιμοσφαιρινοπαθειών περιλαμβάνει σύνδρομα, τα οποία οφείλονται στο ότι δεν έγινε η μεταστροφή της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης σε αυτή των ενηλίκων. Τα σύνδρομα αυτά χαρακτηρίζονται ως «κληρονομική παραμονή της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης» (HPFH). Άτομα που φέρουν συνδυασμό HPFH συνδρόμου και θαλασσαιμίας εμφανίζουν γονοτυπική αλλά και φαινοτυπική ετερογένεια.

Θεωρείται ότι η υψηλή συχνότητα των θαλασσαιμικών και άλλων αιμοσφαιρινοπαθειών οφείλεται στη φυσική επιλογή μέσω του παρασίτου *Plasmodium falciparum* της ελονοσίας. Την υπόθεση αυτή διατύπωσε πρώτος ο Haldane το 1949 και προκειμένου να επιβεβαιωθεί πραγματοποιήθηκαν πολλές μελέτες. Έτσι μελετήθηκε η κατανομή των θαλασσαιμιών σε περιοχές που υπήρχε ή υπάρχει ελονοσία. Στις περιοχές αυτές βρέθηκε, ότι οι ετεροζυγώτες έχουν επιλεκτικό πλεονέκτημα ως προς τους ομοζυγώτες φυσιολογικούς ή πάσχοντες, έναντι της ελονοσίας. Το επιλεκτικό πλεονέκτημα των ετεροζυγωτών οφείλεται στην καλύτερη προσαρμοστικότητα τους σε περιοχές που υπάρχει ελονοσία. Δηλαδή, η μόλυνση των ετεροζυγωτών από το παράσιτο *Plasmodium falciparum* σε σχέση με τους φυσιολογικούς ομοζυγώτες εκδηλώνεται ηπιότερα με αποτέλεσμα να πεθαίνει μικρότερος αριθμός ετεροζυγωτών και οι ετερόζυγες μέλλουσες μητέρες να εμφανίζουν μικρότερο ποσοστό αποβολών. Συνέπεια αυτού του πλεονεκτήματος είναι να συντηρούνται μέσω των ετεροζυγωτών και τα δύο αλληλόμορφα (παθολογικό και φυσιολογικό) σε υψηλές συχνότητες στο πληθυσμό αν και οι πάσχοντες πεθαίνουν πρόωρα και δεν αναπαράγονται. Υπάρχει, δηλαδή, στη δεδομένη περίπτωση ισόρροπος πολυμορφισμός.

Σε *in vitro* κυτταροκαλλιέργειες μελετήθηκε η αλληλεπίδραση του παρασίτου με τα θαλασσαιμικά ερυθροκύτταρα, ο μηχανισμός που αυξάνει την ανθεκτικότητά τους στη μόλυνση από το παράσιτο, οι συνέπειες της μόλυνσης στα όργανα του ξενιστή, τα διάφορα στάδια του κύκλου ζωής του παρασίτου, διαφορετικές τροφικές συνθήκες κ.α. Τα αποτελέσματα των μελετών έδειξαν ότι μολυσμένα ερυθρά αιμοσφαίρια έχουν περισσότερες πιθανότητες να υποστούν φαγοκυττάρωση, ενώ η παρουσία HbF και HbC ή μειωμένη παραγωγή σφαιρίνης καθυστερεί την ανάπτυξη του παρασίτου.

2.2. Μη φυσιολογικές αιμοσφαιρίνες

Από το 1949 οπότε ο Pauling και οι συνεργάτες του ανακάλυψαν την HbS, έχουν ανακαλυφθεί πολλές διαφορετικές αιμοσφαιρίνες. Η πλειονότητα αυτών των διαφορετικών αιμοσφαιρινών προέρχεται από αντικατάσταση ενός αμινοξέος, λόγω αντικατάστασης μιας βάσης στην αλληλουχία του DNA τους. Μερικές όμως από αυτές τις αιμοσφαιρίνες προκύπτουν από ελλείψεις τμημάτων DNA, προσθήκες νουκλεοτιδίων ή ανακατατάξεις στο DNA.

Η περισσότερο γνωστή μη φυσιολογική αιμοσφαιρίνη είναι η HbS που διαφέρει της HbA σε ένα αμινοξύ, δηλαδή στη θέση 6 μία βαλίνη αντικαθιστά ένα γλουταμινικό οξύ. Ο πολυμερισμός των μορίων της αιμοσφαιρίνης S, που συμβαίνει σε χαμηλές πιέσεις οξυγόνου στα τριχοειδή, δημιουργεί επιμήκεις ίνες, στις οποίες οφείλεται το τυπικό δρεπανοειδές σχήμα των ερυθροκυττάρων. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια που έχουν αποκτήσει δρεπανοειδές σχήμα είναι άκαμπτα και η μεταφορά τους δυσχεραίνεται διά μέσω των τριχοειδών, δημιουργώντας συσσωματώματα στην μικροκυκλοφορία και αγγειακές αποφράξεις. Η αυξημένη τους μηχανική ευθραυστότητα οδηγεί στην πρώιμη καταστροφή τους, η οποία καταλήγει σε χρόνια αιμόλυση. Ο ετεροζυγώτης σπάνια εμφανίζει κλινικά συμπτώματα, ενώ ο ομοζυγώτης έχει αιμολυτική αναιμία και άλλα κλινικά συμπτώματα.

Η αιμοσφαιρίνη C προέρχεται από την αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος στη θέση 6 από μία λυσίνη. Η μειωμένη διαλυτότης της HbC σε σχέση με αυτή της HbA, είναι η αιτία του σχηματισμού ενδοκυτταρικών ψευδοκρυστάλλων και της απώλειας της πλαστικότητας των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Αυτή είναι και η κύρια αιτία που οι ομοζυγώτες για τη HbC πάσχουν από αιμολυτική αναιμία.

Η αιμοσφαιρίνη E συναντάται κυρίως στους πληθυσμούς της Ν.Α. Ασίας και προέρχεται από την αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος από τη λυσίνη στο κωδικόνιο 26. Η μετάλλαξη που είναι υπεύθυνη για την HbE δεν επηρεάζει μόνο τη δομή αλλά και το ποσοστό σύνθεσης των βE αλυσίδων και για αυτό εμφανίζει φαινότυπο σαν αυτό της ήπιας β θαλασσαιμίας. Αυτό συμβαίνει γιατί η αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου είναι υπεύθυνη αφενός για την αλλαγή ενός αμινοξέος στην πρωτεΐνη, αφετέρου για την ενεργοποίηση μιας κρυφής θέσης δότη για μάτισμα. Αυτή η νέα θέση ματίσματος επιδρά στον μηχανισμό του ματίσματος με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός μη φυσιολογικού RNA μορίου, το οποίο δεν μπορεί να μεταφραστεί σε φυσιολογική σφαιρίνη β. Οι ομοζυγώτες για την HbE παρουσιάζουν ήπια αναιμία.

2.3. α- Θαλασσαιμία

Η α-θαλασσαιμία είναι κληρονομική διαταραχή της σύνθεσης των α-αλυσίδων σφαιρίνης, με αποτέλεσμα την μειωμένη παραγωγή τους στα έμβρυα και στους ενήλικες. Τα φυσιολογικά άτομα φέρουν δύο α- γονίδια στο χρωμόσωμα 16. Πάνω από το 95% των γνωστών α-θαλασσαιμιών οφείλονται σε ελλείψεις του ενός ή και των δύο α- γονιδίων.

Οι ελλείψεις της οικογένειας των α γονιδίων, οι οποίες προκαλούν φαινότυπο α-μεσογειακής αναιμίας οφείλονται στην:

- Έλλειψη ενός α γονιδίου, μερικώς ή πλήρως, (-α, α+-Μεσογειακή αναιμία). Οι ελλείψεις αυτές οφείλονται, είτε σε ενδοχρωμοσωμικό ανασυνδυασμό, είτε σε άνισο αμοιβαίο ανασυνδυασμό μεταξύ των διπλασιασμένων α γονιδίων, γεγονός που επιβεβαιώνεται με την ύπαρξη χρωμοσωμάτων με τριπλασιασμό των α γονιδίων.⁽⁵²⁾
- Έλλειψη των δύο α γονιδίων (-/-, α⁰-Μεσογειακή αναιμία), με αποτέλεσμα την αδυναμία παραγωγής α αλυσίδων. Οι ελλείψεις που περιλαμβάνουν και τα δύο α-γονίδια κυμαίνονται σε μέγεθος από 5.2 kb έως και περισσότερο από 30 kb και προκύπτουν από ανασυνδυασμό στην περιοχή που περιλαμβάνει την οικογένεια των α-γονιδίων.^(53,54)
- Επίσης ένα πολύ μικρό ποσοστό α-θαλασσαιμιών, δεν οφείλονται σε ελλείψεις ενός ή περισσότερων γονιδίων α και χαρακτηρίζονται ως «μη ελλειμματικές» α-θαλασσαιμίες. Η πιο συχνή, από αυτές τις α-θαλασσαιμίες, είναι μία μικρή έλλειψη πέντε μόνο νουκλεοτιδίων στο 5' άκρο της IVSI του γονιδίου της σφαιρίνης α₂, με αποτέλεσμα την απώλεια της σταθερότητας του συγκεκριμένου RNA.^(55,56)

2.4. β- Θαλασσαιμία

2.4.1. Γενικά

Οι β-θαλασσαιμίες είναι μία ομάδα αιμοσφαιρινοπαθειών, οι οποίες οφείλονται στην πλήρη (β⁰) ή μειωμένη (β⁺) σύνθεση β αλυσίδων.

Το 1925 οι Cooley και Lee περιέγραψαν τη β-θαλασσαιμία βάσει της κλινικής εικόνας που παρουσίαζαν πέντε παιδιά που έπασχαν από βαριά αναιμία. Τα παιδιά αυτά παρουσίαζαν εκτός από βαριά αναιμία, ωχρότητα, σπληνομεγαλία, ηπατομεγαλία, σκελετικές αλλοιώσεις, καθώς επίσης και διεύρυνση των οστών του

κρανίου και του προσώπου. Τα ερυθρά τους αιμοσφαίρια παρουσίαζαν αυξημένη ωσμωτική αντίσταση και μία μέτριοι μεγέθους λευκοκυττάρωση, ενώ εμφανίζονταν εμπύρηννα ερυθρά στο περιφερικό αίμα. Η βαριά αυτή αναιμία έγινε γνωστή ως αναιμία του Cooley και συμπίπτει απόλυτα με την κλινική εικόνα της ομόζυγης β-θαλασσαιμίας ή β-Μεσογειακής αναιμίας⁽⁵⁷⁾. Η β-θαλασσαιμία εμφανίζει μεγάλη φαινοτυπική ετερογένεια ωστόσο ιστορικά διακρίνεται στη μείζονα και την ενδιάμεση β-θαλασσαιμία, ανάλογα με την κλινική εικόνα που εμφανίζουν οι ασθενείς.

2.4.2. Κλινική εικόνα των πάσχόντων από ομόζυγη β-θαλασσαιμία

Άτομα με ομόζυγη β-θαλασσαιμία δίνουν μία τυπική εικόνα της αναιμίας Cooley. Οι ασθενείς εμφανίζουν εκτός από αναιμία, μη φυσιολογική ερυθροκυτταρική μορφολογία (υποχρωμία, ανισοκυττάρωση, ποικιλοκυττάρωση, στοχοκυττάρωση, πολυχρωματοφιλία και βασεόφιλη στίξη), καθώς και χαμηλότερους σε σχέση με τα φυσιολογικά επίπεδα αιματολογικούς δείκτες (μέσος όγκος ερυθρών MCV, μέσος όρος αιμοσφαιρίνης MCH). Τα ερυθρά τους αιμοσφαίρια περιέχουν έγκλειστα, που οφείλονται στην κατακρήμνιση της περίσσειας αλυσίδων σφαιρίνης α και παρουσιάζουν αυξημένη ωσμωτική αντίσταση. Εξ αιτίας της ατελούς ερυθροποίησης εμφανίζονται εμπύρηννα ερυθρά στο περιφερικό αίμα. Τα επίπεδα των αιμοσφαιρινών A_2 και F είναι αυξημένα ενώ το επίπεδο της αιμοσφαιρίνης A είναι ελάχιστο ή μηδενικό. Η ομόζυγη β-θαλασσαιμία προέρχεται είτε από β^+ ή β^0 μεταλλαγές είτε από συνύπαρξη β^+ και β^0 μεταλλαγών. Η ασθένεια εμφανίζεται μετά τους πρώτους μήνες της ζωής των νεογνών (3-24 μήνες), επειδή κατά το διάστημα αυτό οι γ αλυσίδες ελαττώνονται και δεν αντικαθίστανται πλήρως από τις β-αλυσίδες. Τα παιδιά αυτά για να επιβιώσουν έχουν ανάγκη μεταγγίσεων αίματος. Ανάλογα με τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης των ασθενών, οι μεταγγίσεις αρχίζουν στην ηλικία των 3 μηνών ή και αργότερα στην ηλικία 3 έως 5 το πολύ ετών και συνεχίζονται σε τακτά χρονικά διαστήματα ανάλογα με τις ανάγκες τους.

2.4.3. Κλινική εικόνα των πάσχόντων από ενδιάμεση β-θαλασσαιμία

Ορισμένοι πάσχοντες από β-θαλασσαιμία εμφανίζουν κλινικά και αιματολογικά ευρήματα που δεν είναι συμβατά με τον φαινότυπο της ομόζυγης β-θαλασσαιμίας. Τα άτομα αυτά χαρακτηρίζονται ως πάσχοντες από ενδιάμεση β-θαλασσαιμία και παρουσιάζουν βαρύτερο φαινότυπο από εκείνο των ετεροζυγών της β-θαλασσαιμίας και εμφανίζουν ήπια αναιμία και σπανίως σπληνομεγαλία. Άτομα που πάσχουν από ενδιάμεση β-θαλασσαιμία φέρουν και στα δύο τους αλληλόμορφα

μεταλλάξεις β-θαλασσαιμίας. Τα άτομα αυτά δίνουν με βάση την κλινική εικόνα τους:

- Άτομα που εμφανίζουν μέτρια αναιμία και μη ομαλή ερυθροκυτταρική μορφολογία. Το επίπεδο της αιμοσφαιρίνης τους διατηρείται σταθερό περί τα 8 g/dl. Τα άτομα αυτά εμφανίζουν υπερσπληνισμό, όχι καλή ανάπτυξη και σκελετικές αλλοιώσεις. Η ανάγκη για μεταγγίσεις αίματος παρουσιάζεται από ηλικία 6 έως 12 χρόνων.
- Άτομα που εμφανίζουν πιο ήπια αναιμία και ομαλότερους ερυθροκυτταρικούς δείκτες. Το επίπεδο της αιμοσφαιρίνης τους διατηρείται σταθερό μεταξύ των τιμών από 8-10 g/dl. Τα άτομα αυτά αναπτύσσονται καλά μέχρι την ενηλικίωσή τους και δεν εμφανίζουν έντονες σκελετικές αλλοιώσεις. Συνήθως έχουν ανάγκη μεταγγίσεων αίματος μόνο μετά από κάποια λοίμωξη ή όταν παρουσιάζουν υπερσπληνισμό.

2.4.4. Στοιχεία της παθοφυσιολογίας της ομόζυγης β-θαλασσαιμίας

Η μερική ή ολική μείωση της παραγωγής β αλυσίδων σφαιρίνης έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη περίσσειας α αλυσίδων και συνεπώς την διαταραχή της αναλογίας α και β αλυσίδων. Εξ άλλου παρατηρείται αύξηση της παραγωγής αλυσίδων γ και κατ' επέκταση αύξηση της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης στα πρόδρομα κύτταρα της ερυθράς σειράς. Η αύξηση αυτή όμως, δεν επαρκεί για να καλύψει όλη την έλλειψη των αλυσίδων β, με αποτέλεσμα η περίσσεια των αλυσίδων α να καθιζάνει και να εμφανίζονται τα έγκλειστα στα πρόδρομα κύτταρα της ερυθράς σειράς. Η ύπαρξη εγκλείστων στους πρώιμους ερυθροβλάστες των πασχόντων από βαριά β-θαλασσαιμία προκαλεί κυτταρική βλάβη, η οποία εκδηλώνεται είτε με την επιμήκυνση της G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου, είτε με την πλήρη αδυναμία ολοκλήρωσης του κυτταρικού τους κύκλου, με αποτέλεσμα τον θάνατό τους. Συνέπεια του πρόωρου θανάτου των ερυθροβλαστών εμφανίζεται η ατελής ερυθροποίηση. Ο μικρός χρόνος ζωής των θαλασσαιμικών ερυθρών αιμοσφαιρίων οφείλεται στην παγίδευσή τους στον σπλήνα λόγω των εγλείστων τους.

Η β-θαλασσαιμία είναι πρωτίστως δυσερυθροποιητική αναιμία αλλά και συγχρόνως αιμολυτική. Η βαριά αναιμία που προκαλείται από τους παραπάνω μηχανισμούς δημιουργεί υπερπλασία του μυελού των οστών, με αποτέλεσμα την εμφάνιση σκελετικών αλλοιώσεων, που χαρακτηρίζουν τα ομόζυγα άτομα. Τα άτομα αυτά εμφανίζουν επίσης σπληνομεγαλία, ηπατομεγαλία και διαταραχές κατά την ανάπτυξη.

2.4.5. Στοιχεία της παθοφυσιολογίας της ενδιάμεσης β-θαλασσαιμίας

Η παθοφυσιολογία της ενδιάμεσης β-θαλασσαιμίας προκαλείται από τους ίδιους μηχανισμούς με αυτούς της ομόζυγης β-θαλασσαιμίας. Τα φαινόμενα είναι πιο ήπια στην ενδιάμεση β-θαλασσαιμία, επειδή παράγονται διάφορα, κατά περίπτωση, ποσά αλυσίδων β, με αποτέλεσμα την αύξηση της σύνθεσης της αιμοσφαιρίνης Α και την μείωση της περίσσειας των αλυσίδων α. Σε μερικές περιπτώσεις παρατηρείται επαρκής παραγωγή των αλυσίδων γ, με αποτέλεσμα την απάλειψη των εγκλείστων στα πρόδρομα κύτταρα των ερυθρών και στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Επί πλέον η αυξημένη παραγωγή των αλυσίδων γ, προκαλεί αύξηση της αιμοσφαιρίνης F. Η HbF έχει μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης του οξυγόνου, με αποτέλεσμα να δημιουργείται υποξία που προκαλεί αύξηση της ερυθροποιητίνης, η οποία με την σειρά της προκαλεί υπερπλασία του μυελού των οστών. Τα προβλήματα στα άτομα με ενδιάμεση β-θαλασσαιμία εμφανίζονται συνήθως μεταξύ της 3^{ης} και 5^{ης} δεκαετίας της ζωής τους. Οι ασθενείς αυτοί φαίνεται ότι επιβιώνουν έχοντας χαμηλό επίπεδο αιμοσφαιρίνης. Όμως, λοιμώξεις ή υπερσπληνισμός είναι δυνατόν να προκαλέσουν απορρύθμιση με αποτέλεσμα την απότομη πτώση σε ακόμα πιο χαμηλά επίπεδα της αιμοσφαιρίνης έτσι ώστε να χρειάζονται μεταγγίσεις αίματος.

2.4.6. Η ύπαρξη εγκλείστων στα ερυθρά αιμοσφαίρια

Τα έγκλειστα είναι χαρακτηριστικό της β-θαλασσαιμίας και η σύστασή τους προσδιορίστηκε αρχικά από τον Φ. Φέσσα (1963) και αργότερα από τον Weatherall D.J. (1973) είναι κυρίως αποτέλεσμα της περίσσειας αλυσίδων σφαιρίνης α, που καθιζάνουν στη μεμβράνη των πρόδρομων κυττάρων της ερυθράς σειράς, προκαλώντας την πρώιμη καταστροφή τους στον μυελό των οστών. Τα έγκλειστα βρίσκονται μέσα στα ερυθρά αιμοσφαίρια των ασθενών που πάσχουν από β-θαλασσαιμία.

Διαπιστώθηκε επίσης η ύπαρξη εγκλείστων, που προέρχονται από καθίζηση αλυσίδων β, σε ετεροζυγώτες για Hb Geneva, των οποίων ο λόγος σύνθεσης α/β αλυσίδων ήταν ελάχιστα αυξημένος. Η ανάλυση του β- γονιδίου αυτών των ασθενών έδειξε, ότι ο φαινότυπος αυτός προέρχεται από μεταλλάξεις στο τρίτο εξόνιο του β-γονιδίου. Αποτέλεσμα αυτού είναι η δημιουργία ασταθών β- αλυσίδων σφαιρίνης, οι οποίες καθιζάνουν στα πρόδρομα κύτταρα των ερυθρών και δημιουργούν δυσερυθροποίηση και βαριά αναιμία.

2.5. Η Μοριακή βάση της β-θαλασσαιμίας

2.5.1. Γενικά

Στο σύμπλεγμα των γονιδίων β- τύπου, μήκους μεγαλύτερου από 60 kb, έχει κλωνοποιηθεί και έχει προσδιορισθεί μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων, που οδηγούν σε δυσλειτουργία του γονιδίου.

Η β-θαλασσαιμία προκαλείται κυρίως από σημειακές μεταλλάξεις. Οι μεταλλάξεις αυτές μελετήθηκαν από το 1980 έως το 1987 με ανάλυση των απλοτύπων του β- γονιδίου. Μετά την κλωνοποίηση και τον προσδιορισμό των αλληλουχιών του μεταλλαγμένου β- γονιδίου, προσδιορίστηκαν διεθνώς περίπου 40 σημειακές μεταλλάξεις.

Το 1987 έγινε δυνατή η εκλεκτική ενίσχυση της περιοχής του β- γονιδίου της σφαιρίνης β και ο προσδιορισμός της πρωτοταγούς δομής χρησιμοποιώντας DNA γονιδιώματος από λευκά αιμοσφαίρια. Ο συνολικός αριθμός των σημειακών μεταλλάξεων που βρέθηκε να προκαλούν β-θαλασσαιμία είναι περίπου 120. Η μελέτη του συμπλέγματος των β- τύπου γονιδίων σε β-θαλασσαιμικά άτομα έδωσε πολλές πληροφορίες για τις αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων που είναι σημαντικές για την έκφραση των γονιδίων αυτών. Ο μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν μέχρι σήμερα, ομαδοποιήθηκαν με βάση τη λειτουργία την οποία επηρεάζουν.

2.5.2. Μεταλλάξεις που επηρεάζουν την μεταγραφή του β- γονιδίου

2.5.2.1. Μεταλλάξεις στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου β

Στην περιοχή του υποκινητή του β- γονιδίου ανιχνεύθηκε ένας μεγάλος αριθμός σημειακών μεταλλάξεων σε αλληλουχίες που εδράζονται κατά μήκος της περιοχής του υποκινητή και παίζουν σημαντικό ρόλο στην έκφραση του β-γονιδίου. Πάσχοντες που φέρουν τέτοιες μεταλλάξεις εμφανίζουν ήπιο φαινότυπο β+ θαλασσαιμίας, δεδομένου ότι η έκφραση του β- γονιδίου μειώνεται μόνο κατά 20-30% σε σχέση με την έκφραση του φυσιολογικού γονιδίου. Οι μεταλλάξεις αυτές εμφανίζονται κοντά στο CACCC και στο TATA box, που εκτείνονται από την -93 έως την -85 θέση και από την -31 έως την -25 θέση ως προς τη θέση cap, αντίστοιχα. Ενδεικτικά μερικές από αυτές τις μεταλλάξεις βρίσκονται στις θέσεις -87 (C→T), -87 (C→G), -90 (C→T), -29 (A→G) κλπ. Οι μεταλλάξεις αυτές σε ομοζυγωτία δίνουν έναν ήπιο φαινότυπο ενδιάμεσης β-θαλασσαιμίας, ενώ όταν συνυπάρχουν με κάποια μετάλλαξη που συνδέεται με ομόζυγη β-θαλασσαιμία δίνουν επίσης μέτριο έως ήπιο

φαινότυπο β-θαλασσαιμίας.

Μεταλλάξεις από την -108 έως την -101 θέση ως προς τη θέση cap, όπου εδράζεται και το δεύτερο CACC box του β- γονιδίου χαρακτηρίζονται ως «σιωπηλές», γιατί δίνουν πολύ ήπιο φαινότυπο. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η συγκεκριμένη αλληλουχία δεν είναι τόσο σημαντική για την έκφραση του γονιδίου όσο η ίδια μικρή αλληλουχία που βρίσκεται πιο κοντά (-93 έως -85). Η πιο συχνή μετάλλαξη της περιοχής αυτής είναι στη θέση -101 ως προς τη θέση cap. Οι ετεροζυγώτες γι' αυτή τη μετάλλαξη εμφανίζουν φυσιολογικούς αιματολογικούς δείκτες, ενώ διπλοί ετεροζυγώτες για τη μετάλλαξη αυτή και για άλλη που συνδέεται με ομόζυγη β-θαλασσαιμία εμφανίζουν φαινότυπο ενδιάμεσης β-θαλασσαιμίας.

2.5.2.2. Μεταλλάξεις στην 5' αμετάφραστη περιοχή (5' UTR) του β- γονιδίου

Στη 5' αμετάφραστη περιοχή, η οποία εκτείνεται από τη θέση cap έως το κωδικόνιο της έναρξης της μετάφρασης (ATG), υπάρχουν δύο μικρές συντηρημένες αλληλουχίες, από τη +6 θέση έως την +13 και από την +47 θέση έως την +53 ως προς τη θέση cap.

Οι μεταλλάξεις που βρίσκονται στην 5' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου πιθανόν μειώνουν τη μεταγραφή ή επιβραδύνουν τη διαδικασία κάλυψης, μειώνοντας τη σταθερότητα του β- mRNA. Η μετάλλαξη στη θέση +1 ως προς τη θέση cap σε ομοζυγωτία δίνει ήπιο φαινότυπο β-θαλασσαιμίας, ενώ σε συνύπαρξη με άλλη μετάλλαξη που συνδέεται με ομόζυγη β-θαλασσαιμία δίνει φαινότυπο ομόζυγης β-θαλασσαιμίας. Αντιθέτως, μία μετάλλαξη, έλλειψη θυμίνης στην +10 θέση ως προς τη θέση cap, που ανιχνεύτηκε πρόσφατα, δίνει σε αντίστοιχη διπλή ετεροζυγωτία φαινότυπο ενδιάμεσης β-θαλασσαιμίας, ενώ απλοί ετεροζυγώτες εμφανίζουν φυσιολογικούς αιματολογικούς δείκτες. Άλλες μεταλλάξεις που ανιχνεύτηκαν στην 5' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου β και συνδέονται με ήπια β-θαλασσαιμία αφορούν σημειακές μεταλλάξεις στις θέσεις +20 (C→G), +22 (G→A) και μία έλλειψη από τη θέση +40 έως την +43 (-AAAC).

2.5.3. Μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη διαδικασία ωρίμανσης του RNA

Κατά την διαδικασία ωρίμανσης του πρόδρομου RNA, απομακρύνονται παρεμβαλόμενες αλληλουχίες (splicing) προκειμένου να δημιουργηθεί το ώριμο β-mRNA, το οποίο θα μεταφρασθεί στο κυτταρόπλασμα. Η διαδικασία της σωστής ωρίμανσης του πρόδρομου RNA διαταράσσεται είτε από μεταλλάξεις, κυρίως

σημειακές σε διατηρημένες κατά την εξέλιξη μικρές αλληλουχίες που εκτείνονται μεταξύ εξονίων και ιντρονίων είτε από μεταλλάξεις μέσα στα εξόνια ή στα ιντρόνια, οι οποίες δημιουργούν νέες θέσεις ματίσματος. Οι μεταλλάξεις αυτές, ανάλογα με τη θέση τους στις συγκεκριμένες περιοχές, συνδέονται με φαινότυπο β° ή β^{+} θαλασσαιμίας.

2.5.3.1. Μεταλλάξεις σε υπάρχουσες θέσεις ματίσματος

Όπως σε όλα τα ευκαρυωτικά γονίδια, έτσι και στο β - γονίδιο η διατηρημένη αλληλουχία περιλαμβάνει τα τρία τελευταία νουκλεοτίδια του εξονίου και τα πρώτα έξι νουκλεοτίδια του ιντρονίου, καθώς επίσης και το δινουκλεοτίδιο GT στο 5' άκρο του ιντρονίου και το δινουκλεοτίδιο AG στο 3' άκρο του ιντρονίου. Σημειακές μεταλλάξεις σε αυτά τα δύο δινουκλεοτίδια στα ιντρόνια I και II του β - γονιδίου συνδέονται με φαινότυπο β° θαλασσαιμίας.

Μετάλλαξη τέτοιου είδους είναι η IVSI-1. Η IVSI-1 είναι μια αντικατάσταση βάσης (G→A) στο πρώτο νουκλεοτίδιο του ιντρονίου I του γονιδίου της σφαιρίνης β που εμποδίζει το μάτισμα του β - RNA, με αποτέλεσμα να μην παράγονται καθόλου β - αλυσίδες. Η μετάλλαξη αυτή, που προκαλεί β° θαλασσαιμία, απαντάται στην Ελλάδα σε συχνότητα 16,1% και λειτουργεί σε χρωμοσωμικό υπόστρωμα που ανήκει στον απλότυπο V με τον οποίο είναι γενετικά συνδεδεμένη. Η μετάλλαξη IVSII-1 με αντικατάσταση βάσης στο πρώτο νουκλεοτίδιο του ιντρονίου II (G→A) έχει ως αποτέλεσμα την μη σωστή επεξεργασία του mRNA. Η αντικατάσταση αυτή καταστρέφει το GT δινουκλεοτίδιο, που βρίσκεται στο 5' άκρο της δεύτερης παρεμβαλλόμενης αλληλουχίας. Η θέση αυτή είναι η θέση ωρίμανσης του β - RNA με αποτέλεσμα να μην παράγονται καθόλου αλυσίδες σφαιρίνης β . Προκαλεί β° θαλασσαιμία, απαντάται στον ελληνικό πληθυσμό σε συχνότητα 2,3% όπως επίσης και σε άλλους πληθυσμούς της Μεσογείου και συνδέεται με τον απλότυπο III. Οι πάσχοντες που φέρουν την συγκεκριμένη μετάλλαξη στο ένα αλληλόμορφο τους εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα HbF, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός ήπιου φαινοτύπου ανεξαρτήτως εάν στο άλλο αλληλόμορφο συνυπάρχει μια μετάλλαξη που συνδέεται με ομόζυγη β -θαλασσαιμία.

Τέλος, σημειακές μεταλλάξεις μέσα στις μικρές διατηρημένες εξελικτικά αλληλουχίες που αφορούν το μάτισμα έχουν ως αποτέλεσμα το επίπεδο του β - mRNA να μειώνεται 25-50% σε σχέση με αυτό των φυσιολογικών β - mRNA. Οι μεταλλάξεις προκαλούν β^{+} θαλασσαιμία.

2.5.3.2. Μεταλλάξεις που δημιουργούν ή ενεργοποιούν θέσεις ματίσματος

Αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίου μέσα στα ιντρόνια μπορούν να δημιουργήσουν νέες θέσεις δότη ή δέκτη ματίσματος οι οποίες ανταγωνίζονται ή καθυστερούν την ωρίμανση RNA. Για παράδειγμα, η IVSI-110 μετάλλαξη αφορά την αντικατάσταση μιας βάσης (G→A) και έχει ως αποτέλεσμα τη μη σωστή ωρίμανση του RNA. Η μετάλλαξη αυτή είναι συνδεδεμένη κυρίως με τον απλότυπο I και είναι η πιο συχνή στην Ελλάδα (41,94) και τις άλλες μεσογειακές χώρες. Είναι μια β⁺ μετάλλαξη, η οποία επηρεάζει την σωστή ωρίμανση του β- RNA κατά 90%, με αποτέλεσμα την εμφάνιση φαινοτύπου ομόζυγης θαλασσαιμίας⁽⁵⁸⁾.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, όταν δε συμβαίνει φυσιολογικό μάτισμα ανιχνεύονται πολύ χαμηλά επίπεδα β- mRNA, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται ένας βαρύς β⁺ θαλασσαιμικός φαινότυπος. Η αντικατάσταση νουκλεοτιδίου σε ένα από τα εξόνια μπορεί να αλλάξει την αλληλουχία με αποτέλεσμα να εμφανίζεται μια νέα ίδια θέση δότη κατά τη διάρκεια του ματίσματος. Η χρήση αυτής της κρυφής θέσης ως θέσης δότη για το μάτισμα δίνει προϊόντα μη φυσιολογικού ματίσματος του mRNA. Στην περίπτωση αυτή το επίπεδο του mRNA είναι χαμηλότερο του φυσιολογικού. Τέτοιες μεταλλάξεις προκαλούν αντικατάσταση ενός αμινοξέος όπως στις HbE, Hb Κνωσός, Hb Malay και μας δίνουν έναν ήπιο φαινότυπο β-θαλασσαιμίας.

Η IVSI-6 είναι σημειακή μετάλλαξη (T→C) στο νουκλεοτίδιο 6 της πρώτης παρεμβαλλόμενης αλληλουχίας του β- γονιδίου και ενεργοποιεί μία κρυφή θέση ματίσματος. Η θέση αυτή δεν επηρεάζει σημαντικά την σωστή ωρίμανση του RNA επιτρέποντας έτσι ικανή παραγωγή β- αλυσίδων και κατ' επέκταση ικανοποιητική παραγωγή HbA, με αποτέλεσμα ομοζυγώτες για την συγκεκριμένη μετάλλαξη να εμφανίζουν ήπια κλινική εικόνα. Η IVSI-6 μετάλλαξη προσδιορίστηκε αρχικά σε πάσχοντες στη νότια Πορτογαλία και γι' αυτό ονομάζεται «Πορτογαλικού τύπου». Είναι κυρίως συνδεδεμένη με τον απλότυπο VI ή τον απλότυπο VII. Η συχνότητα της στην Ελλάδα είναι 11,52%. Τα άτομα που αρχικά μελετήθηκαν ήταν ομοζυγώτες για την IVSI-6 μετάλλαξη και για τον απλότυπο VI και κύριο χαρακτηριστικό τους ήταν το αυξημένο επίπεδο της HbA₂ 5% έως 8% και το χαμηλό επίπεδο της HbF 3,8% έως 20% της συνολικής Hb. Η αύξηση του επιπέδου της HbF (έως 20%) σε ομοζυγώτες για την IVSI-6 μετάλλαξη είχε συνδεθεί με την συνύπαρξη του απλοτύπου VII. Πρόσφατα όμως βρέθηκε ότι το επίπεδο της HbF σε ομοζυγώτες για την IVSI-6 μετάλλαξη φτάνει έως και το 47%. Τα αυξημένα αυτά επίπεδα της HbF βελτιώνουν ακόμα περισσότερο την καλή αιματολογική εικόνα των ομοζυγωτών.

Σε μελέτη που είχε σκοπό τον εντοπισμό διαφορών σε πρωτεϊνικά συμπλέγματα που βρίσκονται σε σημαντικές περιοχές για την έκφραση του

συμπλέγματος των γονιδίων β- τύπου εξετάσθηκε μία ομάδα ατόμων ομοζυγώτες για την IVSI-6 και τον απλότυπο VI ή τον απλότυπο VII. Το επίπεδο της HbF στα άτομα αυτά κυμαίνονταν από 2-47%, ενώ το επίπεδο της HbA₂ ήταν υψηλό (5-8%) και ήταν σε αντίστροφη σχέση με το επίπεδο της HbF. Η μελέτη αυτή όμως δεν αποκάλυψε διαφορές που να δικαιολογούν τα αυξημένα επίπεδα της HbF στα άτομα αυτά.

2.5.4. Μεταλλάξεις χωρίς νόημα ή αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης

Οι μεταλλάξεις χωρίς νόημα είναι σημειακές μεταλλάξεις που δημιουργούν κωδικόνια τερματισμού της μετάφρασης. Μεταλλάξεις που οφείλονται σε ελλείψεις μιας ή περισσότερων βάσεων αλλάζουν το πλαίσιο ανάγνωσης και καταλήγουν όπως και οι μεταλλάξεις χωρίς νόημα στην μη παραγωγή β- αλυσίδων. Πάσχοντες που φέρουν στο ένα τους αλληλόμορφο μία τέτοια μετάλλαξη και στο άλλο μία άλλη μετάλλαξη β⁺ θαλασσαιμίας εμφανίζουν φαινότυπο ομόζυγης β-θαλασσαιμίας. Η έλλειψη ενός δινουκλεοτιδίου (-AA) στο κωδικόνιο για το αμινοξύ 8 (FSC-8) δημιουργεί ένα κωδικόνιο τερματισμού στο νέο 21 κωδικόνιο. Η μετάλλαξη FSC-8 οδηγεί σε πρόωρο τερματισμό της σύνθεσης των β- αλυσίδων. Είναι δηλαδή, μία β⁰ μετάλλαξη η οποία συνδέεται με τον απλότυπο IV και με αυξημένη παραγωγή HbF. Λόγω της αυξημένης παραγωγής της τελευταίας άτομα που είναι διπλοί ετεροζυγώτες γι' αυτή την μετάλλαξη και μία άλλη β⁰ μετάλλαξη εμφανίζουν φαινότυπο ενδιάμεσης β θαλασσαιμίας.

Η β-39 είναι σημειακή (C→T) μετάλλαξη χωρίς νόημα, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μη λειτουργικού β- mRNA. Το επίπεδο του β- mRNA κυμαίνεται από 1% έως 3% σε σχέση με το επίπεδο του φυσιολογικού, δηλαδή είναι περίπου 50 φορές χαμηλότερο της φυσιολογικής τιμής. Συνήθως πάσχοντες οι οποίοι στο ένα αλληλόμορφο φέρουν την συγκεκριμένη μετάλλαξη και στο άλλο μία μετάλλαξη β⁺ εμφανίζουν φαινότυπο ομόζυγης β-θαλασσαιμίας.

2.5.5. Μεταλλάξεις που επηρεάζουν την αποκοπή και την πολυαδενυλίωση του RNA

Η αλληλουχία AAUAAA κοντά στο 3' άκρο των ευκαρυωτικών mRNAs φαίνεται να είναι σημαντική γιατί δίνει το σήμα για την αποκοπή του RNA στο 3' άκρο. Μετά την αποκοπή του RNA ακολουθεί η πολυαδενυλίωση που συμβάλλει στην σταθερότητα του mRNA. Μεταλλάξεις στην αλληλουχία AAUAAA επιδρούν στη αποκοπή του RNA με αποτέλεσμα να παράγονται πιο επιμήκη και πιθανόν ασταθή

μόρια mRNA. Στις περιπτώσεις αυτές εμφανίζεται ένας β^+ θαλασσαιμικός φαινότυπος.

Οι μεταλλάξεις αυτές βρίσκονται στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3' UTR) του γονιδίου και εντοπίζονται συνήθως στην αλληλουχία που δίνει το σήμα πολυαδενυλίωσης. Ο ρόλος της περιοχής 3' UTR του mRNA δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί και δεν είναι γνωστό σε ποια διαδικασία ελέγχου της έκφρασης του γονιδίου συμμετέχει. Είναι δυνατό να αλλάζουν την δευτεροταγή δομή του DNA με αποτέλεσμα να σχηματίζεται φουρκέτα η οποία παρεμβάλλεται στη συνέχεια στη διαδικασία πολυαδενυλίωσης ή/και στη μεταφορά του μηνύματος στο κυτταρόπλασμα.

2.5.6. Μεταλλάξεις που εντοπίζονται σε άλλα χρωμοσώματα

Πρόσφατα στο χρωμόσωμα X έχουν βρεθεί γενετικοί τόποι που επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων των σφαιρινών. Ένας τέτοιος γενετικός τόπος για παράδειγμα, βρίσκεται στο μικρό σκέλος του χρωμοσώματος X (Χρ21-11) και αφορά την GATA-1 πρωτεΐνη. Ένας δεύτερος γενετικός τόπος που βρίσκεται επίσης στο μικρό σκέλος του χρωμοσώματος X (Χρ22,2), ελέγχει τη παραγωγή F-κυττάρων σε φυσιολογικά και δρεπανοκυτταρικά άτομα.

2.5.7. Ελλείψεις που προκαλούν β-θαλασσαιμία

Ελλείψεις σε γονίδια που ανήκουν στο σύμπλεγμα των γονιδίων β- τύπου επηρεάζουν την έκφραση και των άλλων γονιδίων του συμπλέγματος αυτού. Πολλές από αυτές τις ελλείψεις περιλαμβάνουν τα δ- και β- γονίδια, δημιουργώντας τις δβ θαλασσαιμίες και σε αρκετές περιπτώσεις την εμφάνιση συνδρόμου ΗΡFH (κληρονομικής παραμονής HbF).

Ελάχιστες και σπάνιες είναι οι ελλείψεις που αφορούν μόνο το β- γονίδιο και προκαλούν β-θαλασσαιμία. Η πιο κοινή από αυτές είναι μια έλλειψη 610 bp που περιλαμβάνει την IVSII, το τρίτο εξόνιο και αλληλουχίες μετά το 3' άκρο του β- γονιδίου. Η έλλειψη αυτή απαντάται στους πληθυσμούς της Ινδίας και αφορά το 1/3 των πασχόντων από β-θαλασσαιμία.

3. Η δβ-Μεσογειακή αναιμία

Στη δβ-MA παρατηρούνται ελλείψεις τμημάτων DNA, που αφαιρούν τα δ- και β- γονίδια. Είναι μικρότερες σε μέγεθος (7,2-115 Kb) από τις ελλείψεις HPFH.

Στους ετεροζυγώτες δβ-MA έχουμε αυξημένα επίπεδα HbF (2%-25%), επίπεδα HbA₂ φυσιολογικά (2,1%-2,3%) και φαινότυπο φορέων β-MA καθώς και μορφολογία ερυθροκυττάρων. Η HbF έχει ετεροκυτταρική (ανομοιογενή) κατανομή στα ερυθροκύτταρα (Bollekens και Forget, 1991).

Έχουμε τις εξής περιπτώσεις δβ-MA (Baysal, 1993).

- α. GγAγ(δβ)^ο - MA με έλλειψη στα δ- και β- γονίδια και αναλογία Gγ/Aγ=4/6.
- β. (δβ)^ο-MA μη ελλειπτικού τύπου, που χαρακτηρίζεται από μεταλλαγές στο β- και Aγ- γονίδιο και τον 3' Aγ-ενισχυτή και έχει φαινότυπο των ελλειπτικών δβ-MA.
- γ. Gγ(Aγδβ)^ο-MA. Εδώ οι ελλείψεις παρατηρούνται στα δ τα β- και το Aγ- γονίδιο και παράγονται μόνο Gγ-αλυσίδες.
- δ. (εγδβ)^ο-MA. Έχουμε έλλειψη σε όλο το σύμπλεγμα των γονιδίων της β-σφαιρίνης καθώς και στην περιοχή Ελέγχου Γενετικού Τύπου LCR (Locus Control Region). (Πίνακες 2, 3, 4).

Πίνακας 2. Οι γνωστές μορφές Gγ Ay (δβ)^ο – μεσογειακής αναιμίας.

α/α	Τύπος	Μήκος Έλλειψης	Hb F (%)	Gγ (%)	Βιβλιογραφία
1	Ινδικός	32,6 kb	16,6	79	Mishima et al,1989
2	Ιαπωνικός ¹	100 kb	7 – 8	49	Matsunaga et al,1985
3	Ελληνικός	7.2 kb	1	34	Kulozik et al, 1988
4	Ισπανικός	115 kb	5 – 13	30 – 45	Ottolenghi και Giglioni, 1982
5	Νεγρικός ²	12 kb	14,7	50	Waye et al, 1994
6	Ανατολικής Ευρώπης	9.5 kb	13 – 18	13	Palena et al, 1994
7	Λαοτιανός	12.5 kb	11,5	60	Zhang et al, 1988
8	Ταϋλανδικός	12.5 kb	9,9	-	Trent et al, 1988
9	Σικελικός	13.4 kb	4 – 18,6	25 – 56	Fritsch et al, 1979 Ottolenghi et al, 1979
10	Μακεδονικός Τουρκικός ³	11.5 kb-1.6 kb, 7.6 kb αναστ/φή	6,7 – 12,8	40	Efremov et al, 1994 Kulozik et al, 1992
11	Βιετνάμ	12,6 kb	20	-	Craig et al, 1994
12	Σαρδηνίας ⁴		10 – 20	0	Pirastu et al, 1984a Ottolenghi et al, 1987
13	Κινέζικος ⁵		11,3 - 22,3	40	Atweh et al, 1986,1987 Balta et al, 1994

1: Το 3' άκρο της έλλειψης αυτής δεν έχει χαρακτηριστεί.

2: Ο Νεγρικός τύπος δβ- μεσογειακής αναιμίας πρωτοχαρακτηρίστηκε από τους Anagnou et al (1985) σε συνδυασμό με Hb S, η οποία όμως τροποποιούσε τον παραγόμενο φαινότυπο, μάλλον προς HPFH

3: Ο Μακεδονικός και Τουρκικός τύπος της δβ- μεσογειακής αναιμίας χαρακτηρίζεται από την ίδια μοριακή βλάβη (Craig et al, 1995).

4: Η μοριακή βλάβη περιλαμβάνει μεταλλαγές στο Ay-γονίδιο (Ay-196 C→ T) και στο β-γονίδιο (β^ο-39 C→T).

5: Η μοριακή βλάβη περιλαμβάνει μεταλλαγές στον 3' Ay ενισχυτή (C→T), 2,4 kb 3' της θέσης πολυαδενυλίωσης του Ay-γονιδίου και στο β- γονίδιο (β^ο -29 A → G).

Πίνακας 3. Οι γνωστές μορφές Gγ(Αγδβ)^ο μεσογειακής αναιμίας που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα.

α/α	Τύπος	Μήκος έλλειψης	Hb F (%)	Gγ (%)	Βιβλιογραφία
1	Ινδικός	8,5 kb, 15,5 kb αναστ/φή	13	>90	Jones et al, 1981
2	Γερμανικός	52 kb	10-13	84	Anagnou et al, 1988
3	Μαλαισίας -1	85 kb ¹	25	100	Trent et al, 1984
4	Τουρκικός	36,2 kb	10-13	>95	Fritsch et al, 1979
5	Μαλαισίας -2	80 kb ¹	-	-	George et al, 1986
6	Βελγικός	50 kb	14-15	100	Losekoot et al, 1991
7	Νεγρικός	35,7 kb	11,2	93,2	Henthorn et al, 1985
8	Κινεζικός	100 kb	11,8	-	Mager et al, 1985
9	Yannanese	90 kb	9-17	72-90	Znang et al, 1993

1: Τα όρια της έλλειψης αυτής δεν είναι γνωστά με ακρίβεια, παρά μόνο κατά προσέγγιση, μετά από χαρτογράφηση με περιοριστικά ένζυμα.

Πίνακας 4. Οι γνωστές μορφές (εγδβ)^ο –μεσογειακής αναιμίας.

α/α	Τύπος	Μήκος έλλειψης	Βιβλιογραφία
1	Κροατικός	148 kb	Diaz-Chico et al, 1988
2	Καναδικός	185 kb ¹	Diaz-Chico et al, 1988
3	Αγγλοσαξ/κός	95,9 kb	Orkin et al, 1981b
4	Βρετανικός	100 kb ¹	Curtin et al, 1985
5	Ολλανδικός	99,4 kb	Van der Ploeg et al, 1980b
6	Σκωτσέζικος	205 kb ¹	Trent et al, 1990
7	Μεξικανικός	105 kb ¹	Fearon et al, 1983
8	Ισπανικός	30 kb ²	Driscoll et al, 1989
9	Ιρλανδικός	205 kb ¹	Fortina et al, 1991

1: Τα όρια της έλλειψης αυτής δεν είναι γνωστά με ακρίβεια, παρά μόνο κατά προσέγγιση, μετά από χαρτογράφηση με περιοριστικά ένζυμα.

2: Η έλλειψη αυτή αφαιρεί τις τρεις από τις πέντε DNaseI υπερευαίσθητες θέσεις της περιοχής LCR, ενώ αφήνει ανέπαφα τα γονίδια του συμπλέγματος της β-σφαιρίνης.

4. Κληρονομική Παραμονή Εμβρυϊκής Αιμοσφαιρίνης (Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin-HPFH)

Με τον όρο Κληρονομική Παραμονή Εμβρυϊκής Αιμοσφαιρίνης (Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin-HPFH) χαρακτηρίζονται οι περιπτώσεις εκείνες κατά τις οποίες η έκφραση των εμβρυϊκών Gγ- και Αγ- γονιδίων διατηρείται σε υψηλά επίπεδα και στη ενήλικη ζωή, με αποτέλεσμα το ποσοστό της HbF να υπερβαίνει το 1% και να κυμαίνεται μεταξύ 10%-50%. Η κατανομή της HbF στα ερυθροκύτταρα είναι ομοιογενής (πανκυτταρική κατανομή), η μορφολογία των ερυθροκυττάρων παραμένει αναλλοίωτη, ενώ ο αιματολογικός φαινότυπος είναι κατά τα άλλα φυσιολογικός.⁽⁵⁹⁾ Στις περισσότερες περιπτώσεις HPFH το υψηλό ποσοστό της HbF συνοδεύεται από μειωμένο ποσοστό της HbA₂.

Οι περιπτώσεις HPFH παρουσιάζουν τεράστιο ερευνητικό ενδιαφέρον, επειδή η εκάστοτε μοριακή βλάβη έχει σαν αποτέλεσμα τη συνεχιζόμενη παραγωγή HbF σε ενήλικες, με συνέπεια να αποτελούν μοντέλο για τη μελέτη του μοριακού μηχανισμού, που εμπλέκεται στη μεταστροφή της έκφρασης των εμβρυϊκών και ενήλικων γονιδίων της β-σφαιρίνης του ανθρώπου.

Το γεγονός αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία, μιας και η διαλεύκανση του ρυθμιστικού αυτού μηχανισμού βοηθά στην κατανόηση του τρόπου ρύθμισης της έκφρασης των β-σφαιρινικών γονιδίων, με αποτέλεσμα την αποτελεσματικότερη θεραπευτική αντιμετώπιση των διαφόρων τύπων αιμοσφαιρινοπαθειών.

Οι περιπτώσεις HPFH ταξινομούνται, ανάλογα με το είδος της μοριακής βλάβης που τις προκαλεί, σε ελλειπτικού και μη ελλειπτικού τύπου και περιγράφονται εκτενέστερα στις παρακάτω παραγράφους.

4.1. HPFH ελλειπτικού τύπου (deletional HPFH)

Οι περιπτώσεις ελλειπτικού τύπου HPFH χαρακτηρίζονται από εκτεταμένες ελλείψεις τμημάτων DNA (12,9 έως 105 kb), που περιλαμβάνουν κυρίως τα δ- και β-γονίδια, αλλά και ρυθμιστικές περιοχές του συμπλέγματος των β-γονιδίων.

Είναι φανερό ότι λόγω της έλλειψης των ενήλικων δ- και β-γονιδίων, τα γονίδια εξακολουθούν να είναι μεταγραφικά ενεργά και στην ενήλικη ζωή με αποτέλεσμα την συνεχιζόμενη παραγωγή HbF σε υψηλά επίπεδα (16%-30%)⁽⁵⁹⁾ ενώ για τον ίδιο λόγο τα επίπεδα της HbA₂ είναι ελαττωμένα.

Η αύξηση των επιπέδων της HbF στις περιπτώσεις ελλειπτικού τύπου HPFH οφείλεται στο ότι η αφαίρεση συγκεκριμένων τμημάτων DNA από το σύμπλεγμα

των β-σφαιρινικών γονιδίων φέρνει σε γειτονία με τα εμβρυικά γ-γονίδια αλληλουχίες-ενισχυτές που σε φυσιολογικές συνθήκες βρίσκονται πολύ μακρύτερα. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση της HPFH-1 όπου η περιοχή 3' της έλλειψης βρέθηκε να λειτουργεί σαν ενισχυτής με πειράματα παροδικής έκφρασης⁽⁶⁰⁾.

Παραπλήσια αποτελέσματα περιγράφονται για την περίπτωση της έλλειψης που ευθύνεται για την HPFH-3.⁽⁶¹⁾ Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι μια περιοχή 700 bp, η οποία περιέχει μια αλληλουχία SV40 και μια αλληλουχία CCAAT, προκαλεί αύξηση στην έκφραση του γονιδίου αναφοράς CAT 6-7 φορές, σε κύτταρα K562 με πειράματα παροδικής έκφρασης κι αύξηση της μεταγραφής του γ-γονιδίου στο εμβρυικό συκώτι διαγονιδιακών ζώων.

Μελέτη της έλλειψης, που ευθύνεται για την HPFH-5⁽⁶²⁾ δείχνουν ότι ο φαινότυπος HPFH πιθανά να οφείλεται στη γεινίαση του ενισχυτή 3' του β-γονιδίου (Behringer et al. 1987, Kollia et al, 1987) με τα γ-γονίδια.

Τέλος κλωνοποιήθηκε⁽⁶³⁾ μια αλληλουχία-ενισχυτής που πιθανά να ευθύνεται για το φαινότυπο της HPFH-6. Η αλληλουχία αυτή περιέχει μια σειρά από θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων GATA-1, GT-I/II, AP-1, YY1, C/EBP, TFIID, GCRE και HNF-1, οι οποίοι όπως δείχνουν πειράματα παροδικής έκφρασης φαίνεται ότι δρουν συνεργιστικά για την πλήρη ενεργότητα της περιοχής αυτής ως ενισχυτή.

Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση που αφορά τις ελλείψεις που προκαλούν ελλειπτικού τύπου HPFH είναι ότι ορισμένες από αυτές έχουν παραπλήσια μήκη, ενώ το ίδιο ισχύει και για διάφορες περιπτώσεις ελλείψεων που προκαλούν δβ-μεσογειακή αναιμία. Το γεγονός αυτό πιθανά να οφείλεται στη γεινίαση των σημείων αποκοπής πριν τη δημιουργία της έλλειψης, ίσως μέσω της πρόσδεσης τους σε σημεία του πυρηνικού φακέλου κατά την αντιγραφή του DNA⁽⁶⁴⁾. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται και από δεδομένα των Henthorn et al.⁽⁶⁵⁾ σύμφωνα με τα οποία τα σημεία αποκοπής των ελλείψεων που προκαλούν β- ή δβ-μεσογειακή αναιμία και ελλειπτικού τύπου HPFH βρίσκονται, ως επί το πλείστον, μέσα σε μεταγραφόμενες περιοχές του συμπλέγματος των β-σφαιρινικών γονιδίων.

Στον πίνακα 5 παρατίθενται οι ελλείψεις που προκαλούν τις γνωστές μορφές ελλειπτικού τύπου HPFH και τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά τους.

Πίνακας 5. Συνοπτική παράθεση των ελλείψεων τμημάτων DNA που ευθύνονται για τις γνωστές μορφές ελλειπτικού τύπου HPFH.

α/α	Τύπος	Μήκος έλλειψης	Hb F(%)	Gγ (%)	Βιβλιογραφία
1	HPFH-1	106 kb	24,8	50,7	Tuan et al, 1980,1983
2	HPFH-2	105 kb	24,4	32,3	Tuan et al, 1983
3	HPFH-3	48,5 kb	22,6	69,3	Henthorn et al, 1986
4	HPFH-4	40 kb	17 – 30	31 – 39	Saglio et al, 1986
5	HPFH-5	12,9 kb	16 – 20	15	Carnaschella et al, 1990
6	HPFH-6	70 kb	17,2 – 20,9	-	Winichagoon et al, 1990
7	HPFH-7	30 kb	18,6 – 27	60	Moturn et al, 1993

4.2. HPFH μη ελλειπτικού τύπου (non-deletional HPFH)

Οι περιπτώσεις μη ελλειπτικού τύπου HPFH χαρακτηρίζονται από σημειακές μεταλλαγές ή μικρές ελλείψεις στην περιοχή του υποκινητή του Gγ ή του Αγ γονιδίου. Οι μεταλλαγές αυτές έχουν σαν αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η συγγένεια πρόσδεσης των ερυθροειδικών ή μη ρυθμιστικών πρωτεϊνών⁽⁶⁶⁾, η νουκλεοτιδική αλληλουχία η/και η υπερμοριακή δομή ρυθμιστικών περιοχών⁽⁶⁷⁾ με αποτέλεσμα τη συνεχιζόμενη έκφραση των γ-γονιδίων στην ενήλικη ζωή.

Οι περιπτώσεις μη ελλειπτικού τύπου HPFH χαρακτηρίζονται από μικρότερα, κατά μέσο όρο, ποσοστά HbF σε σχέση με τις ελλειπτικού τύπου HPFH, ενώ η συνεχιζόμενη έκφραση των γ- γονιδίων στις περιπτώσεις αυτές συνδέεται με χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης των ενήλικων δ- και β- γονιδίων. Το γεγονός αυτό οφείλεται στη μερική λειτουργική αναστολή των τελευταίων, λόγω της μεταλλαγής του συνδεδεμένου (in cis) γ-γονιδίου, η οποία φαίνεται να παρεμβάλλεται στη φυσιολογική διαδικασία μεταστροφής της έκφρασης των εμβρυικών, ως προς τα ενήλικα γονίδια⁽⁶⁸⁾.

Οι μεταλλαγές που προκαλούν μη ελλειπτικού τύπου HPFH εντοπίζονται σε ρυθμιστικές αλληλουχίες του υποκινητή των γ-γονιδίων. Οι μεταλλαγές στις θέσεις -202 και -200 του Gγ-γονιδίου και -202, -198, -196, -195 του Αγ-γονιδίου εντοπίζονται σε μια περιοχή πλούσια σε γουανίνες και κυτοσίνες, στην οποία προσδένεται η πρωτεΐνη Sp1⁽⁶⁹⁾, η οποία αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα. Επιπλέον η περιοχή αυτή είναι ευαίσθητη στη DNaseI⁽⁷⁰⁾, γεγονός που αποδεικνύει ότι πρέπει να είναι μεταγραφικά ενεργή.

Οι Sykes και Kaufman⁽⁶⁹⁾ έδειξαν ότι η μεταλλαγή Gγ -202 (C→G) αυξάνει 5-

10 φορές την πρόσδεση της πρωτεΐνης Sp1, λόγω αύξησης της ομολογίας με την αλληλουχία Sp1, ενώ η αντίστοιχη μεταλλαγή Αγ -202 (C→T) μειώνει την ομολογία με την αλληλουχία Sp1, με αποτέλεσμα τα επίπεδα της HbF στην τελευταία περίπτωση να είναι ελαφρώς μικρότερα. Επιπρόσθετα οι Jane et al.⁽⁷¹⁾ έδειξαν ότι η πρωτεΐνη SSP (Stage Selector Protein), που προσδένεται φυσιολογικά στη θέση -50, προσδένεται και στη θέση -202 στη περίπτωση της μεταλλαγής Gγ -202 (C→G). Η τελευταία αναστέλλει τη μεθυλίωση της περιοχής αυτής, με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη Sp1 να μη μπορεί να προσδεθεί για να καταστείλει φυσιολογικά την έκφραση του Gγ γονιδίου. Η μεθυλίωση των γ-γονιδίων, έπεται της μεταστροφής της έκφρασης των εμβρυικών στα ενήλικα γονίδια, όπως έχει αποδειχτεί άλλωστε και από πειράματα των Enver et al.⁽⁶⁸⁾

Οι Fischer and Nowock⁽⁷²⁾ έδειξαν ότι η μεταλλαγή Αγ -198 (T→C) δημιουργεί δυο αλληλοεπικαλυπτόμενες θέσεις πρόσδεσης των πρωτεϊνών Sp1 και της ερυθροειδικής πρωτεΐνης GF-1, με συνέπεια η αλληλεπίδραση των τελευταίων να προκαλεί αύξηση της μεταγραφής του μεταλλαγμένου Αγ-γονιδίου. Αξιοσημείωτο τέλος είναι και η παρατήρηση των Bacolla et al.⁽⁶⁷⁾ οι οποίοι διαπίστωσαν ότι η περιοχή -217 έως -209 των γ-γονιδίων αλληλεπιδρά με την περιοχή -203 έως -194 και λαμβάνει κάτω από συγκεκριμένες *in vitro* συνθήκες μια μορφή ενδομοριακή τριπλής έλικας. Η τελευταία σε συνδυασμό με την πρωτεΐνη BP-8 που σταθεροποιεί την παραπάνω μακρομοριακή δομή, φαίνεται ότι σχετίζεται με την αποσιώπηση της έκφρασης των γ-γονιδίων στην ενήλικη ζωή. Μεταλλαγές, οι οποίες προκαλούν μη ελλειπτικού τύπου HPFH, φαίνεται ότι τροποποιούν αυτή τη μακρομοριακή δομή και αναστέλλουν την αποσιώπηση των γ-γονιδίων.

Η μεταλλαγή στη θέση -175, τόσο του Gγ όσο και του Αγ-γονιδίου, τροποποιεί τη θέση πρόσδεσης του παράγοντα OTF-1 (Octamer factor-1)⁽⁷²⁾ ο οποίος καταστέλλει φυσιολογικά τη μεταγραφή των γ-γονιδίων, ενώ παράλληλα ενισχύει την πρόσδεση του παράγοντα NF-E1⁽⁷³⁾. Τα παραπάνω οδηγούν στην αύξηση των επιπέδων μεταγραφής του μεταλλαγμένου γονιδίου.

Οι μεταλλαγές στις θέσεις -114 του Gγ-γονιδίου και αυτές στις θέσεις -117 και -114 του Αγ-γονιδίου τροποποιούν την δεύτερη αλληλουχία CCAAT. Οι Superti-Furga et al.⁽⁷⁴⁾ παρατήρησαν ότι η μεταλλαγή Αγ-117 (G→A) επιδρά στην πρόσδεση τριών πρωτεϊνικών παραγόντων, των CP-1 (CCAAT-binding Protein-1), CDP (CCAAT Displacement Protein) και της ερυθροειδικής NF-E3⁽⁷⁵⁾ ενώ η μεταλλαγή Gγ -114 (C→T) αποτρέπει την πρόσδεση της πρωτεΐνης CP1 και ευθύνεται για το φαινότυπο HPFH σε διαγονιδιακά ζώα⁽⁷⁶⁾. Το ερώτημα ποια από τις παραπάνω πρωτεΐνες παίζει το σημαντικότερο ρόλο στο φαινότυπο HPFH είναι ακόμα ανοικτό. Πάντως δεδομένα των Rixon και Gelinias⁽⁷⁷⁾ δείχνουν ότι οι

μεταλλαγές Αγ-117 (G→A) και Αγ-196 (C→T) είχαν ελάχιστη ως μηδενική έκφραση με πειράματα παροδικής έκφρασης σε μη ερυθροειδικά κύτταρα. Τα παραπάνω προσδίδουν στις ερυθροειδικές πρωτεΐνες έναν πρωτεύοντα ρόλο στην παραγωγή φαινότυπου ΗΡFΗ.

Τέλος, οι μεταλλαγές Gγ -161 (G→A), Gγ -158 (C→T) και η Αγ-158 (C→T) έχουν μικρότερη επίδραση στην έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων. Το γεγονός αυτό οφείλεται πιθανά στην απουσία ρυθμιστικών αλληλουχιών από την περιοχή αυτή, ή στο γεγονός ότι βρίσκονται στα όρια ρυθμιστικών περιοχών, όπως η περιοχή -182 έως -175 (octamer motif) και -144 έως -140 (CACCC motif). Αποτελέσματα του Gilman⁽⁷⁸⁾ δείχνουν ότι στην περιοχή γ-161/-158 θα πρέπει να προσδένεται μια πρωτεΐνη τετραμερές, μοριακού βάρους 210 kDa, η οποία δρα ως ενεργοποιητής της μεταγραφής του γ γονιδίου. Η πρωτεΐνη αυτή αλληλεπιδρά ισχυρότερα με τον μεταλλαγμένο, για τις θέσεις αυτές υποκινητή, γεγονός που πιθανά εξηγεί εν μέρει τα αυξημένα επίπεδα των αντίστοιχων σφαιρινικών αλυσίδων και της HbF. Πάντως η αύξηση των επιπέδων της HbF στις περιπτώσεις της ΗΡFΗ «Ελβετικού τύπου» σε συνδυασμό με την παρουσία των μεταλλαγών Gγ -161 (G→A) ή Gγ -158 (C→T) φαίνεται να είναι πιο σύνθετο φαινόμενο, το οποίο πιθανά περιλαμβάνει, εκτός των παραπάνω μεταλλαγών και άλλους γενετικούς τόπους (Craig et al. 1996).

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω δεν έχουν αναφερθεί μεταλλαγές σε ρυθμιστικές αλληλουχίες, όπως η αλληλουχία ATA ή CCAAT στη θέση -84 (proximal CCAAT box), πιθανά λόγω του ότι οι μεταλλαγές αυτές προκαλούν βαριά μορφής γ-μεσογειακή αναιμία οδηγώντας στο θάνατο των εμβρύων κατά την ενδομήτριο ζωή. Η εκδοχή αυτή φαίνεται να ενισχύεται και από το ότι η αδρανοποίηση του 5' του γ-γονιδίου στους πιθήκους του Νέου Κόσμου οφείλεται, εκτός των άλλων, σε μεταλλαγές της ίδιας αλληλουχίας.

ΣΚΟΠΟΣ

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.

Η κληρονομική παραμονή εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (HPFH) και δβ-θαλασσαιμία είναι γενετικά νοσήματα, τα οποία χαρακτηρίζονται από σταθερή έκφραση των γ-γονιδίων και υψηλή HbF στην ενήλικη ζωή. Αν και οι περιπτώσεις των HPFH είναι χωρίς συμπτώματα, οι δβ-θαλασσαιμίες έχουν ένα τυπικό θαλασσαιμικό φαινότυπο με ενδιάμεση αναιμία και μειωμένα αιματολογικά στοιχεία. Μεγάλες ελλείψεις που απομακρύνουν το δ- και β-γονίδιο οδηγούν σε δβ-θαλασσαιμία ή HPFH ελλειπτικού τύπου, ενώ μεταλλαγές στους υποκινητές των γ-γονιδίων οδηγούν σε μη ελλειπτικού τύπου (nd-) HPFH. Και οι δύο περιπτώσεις είναι σπάνιες, αλλά ο συνδυασμός τους βοηθά σημαντικά στη μελέτη και διερεύνηση των μηχανισμών που ρυθμίζουν την έκφραση των γ-γονιδίων και κατ' επέκταση στη χρησιμοποίησή τους σε νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις των θαλασσαιμικών συνδρόμων.

Στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν οι μεταλλαγές ή/και ελλείψεις που ανιχνεύονται στο β- και γ-γονίδιο, για δβ-θαλασσαιμία και HPFH ελλειπτικού ή μη ελλειπτικού τύπου σε άτομα- ετεροζυγώτες/ ομοζυγώτες ή και διπλούς ετεροζυγώτες για β-θαλασσαιμία, δβ-θαλασσαιμία, δρεπανοκυτταρική αναιμία που έφεραν υψηλή HbF καθώς και άτομα με HPFH.

Στη συνέχεια συσχετίστηκαν οι συγκεκριμένες θαλασσαιμικές μεταλλαγές είτε στο β- είτε στο γ-γονίδιο με τα αιματολογικά στοιχεία ώστε να διεξαχθούν συμπεράσματα για την ορθότερη πρόληψη, διάγνωση και θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών με θαλασσαιμικά σύνδρομα.

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1. Επιλογή δειγμάτων

Κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής επιλέχθηκαν οι εξής κατηγορίες περιστατικών:

α. Ετεροζυγώτες(φορείς) δβ-Μεσογειακής Αναιμίας

β. Ετεροζυγώτες (φορείς) ΗΡFH

γ. Ετεροζυγώτες (φορείς) β-Μεσογειακής Αναιμίας (με αυξημένη HbF).

Οι ανωτέρω κατηγορίες αφορούν άτομα ενήλικα, από τα προσερχόμενα για προγεννητικό έλεγχο στη Μονάδα Πρόληψης Μεσογειακής Αναιμίας του Γενικού Νοσοκομείου Καρδίτσας.

2.2. Μελέτη αιμοσφαιρινών- φαινοτυπική εικόνα με βάση τα αιματολογικά δεδομένα

2.2.1. Αιμοληψία

Γίνεται λήψη 10 ml περιφερικού ολικού αίματος (φλεβικού), με ηπαρινισμένη σύριγγα, σε αντιπηκτικό K_3EK_3EDTA και απευθείας, από τη σύριγγα, παρασκευή λεπτών επιστρώσεων σε αντικειμενοφόρες πλάκες, για μικροσκοπική παρατήρηση μετά από χρώση May-Grunwald, Giemsa. Τα δείγματα αποθηκεύονται σε θερμοκρασία ψυγείου ($4^{\circ} C$).

2.2.2. Χρώση May-Grunwald, Giemsa

Ρυθμιστικό διάλυμα

1. $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 3,25 gr

KH_2PO_2 6,63 gr

Συμπληρώνεται στα 100 cm^3 με απεσταγμένο H_2O (έλεγχος pH=6,4).

2. Αραίωση του ανωτέρω διαλύματος 1/10 σε απεσταγμένο H_2O

(100+900 H_2O) (έλεγχος pH=6,4)

Χρωστικές (α) May-Grunwald 100 cm^3 και 100 cm^3 διαλύματος 2.

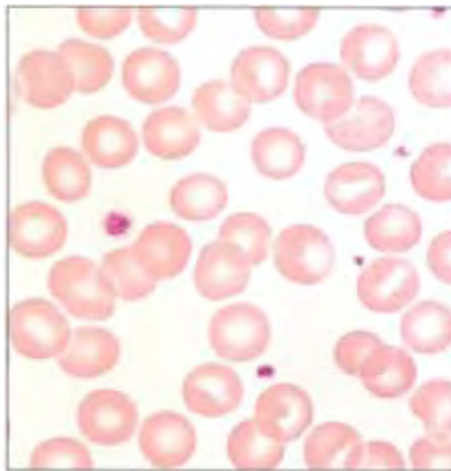
(β) Giemsa $2,8\text{ cm}^3$ μέχρι 100 cm^3 διαλύματος 2.

Τεχνική

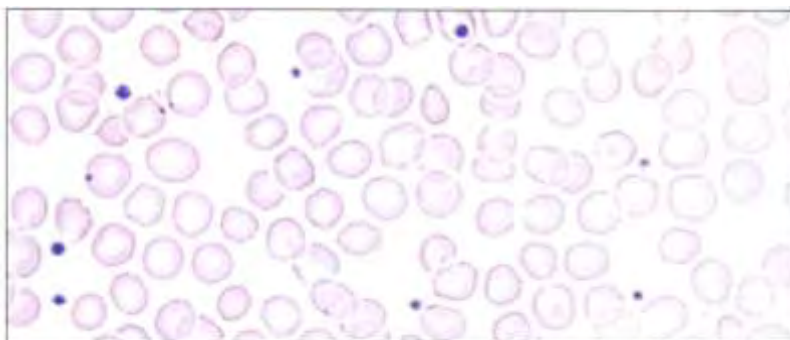
- Μονιμοποίηση των παρασκευασμάτων σε 6' με μεθανόλη (CH₃OH)
- Χρώση με May-Grunwald (α) επί 10'
- Απόρριψη της χρωστικής
- Χρώση με Giemsa (β) επί 40'
- Απόρριψη, καλό ξέβγαλμα με νερό βρύσης
- Καθάρισμα της κάτω επιφάνειας των αντικειμενοφόρων.
- Στέγνωμα σε θερμοκρασία δωματίου.

2.2.3. Μικροσκοπική παρατήρηση επιχρίσματος περιφερικού αίματος

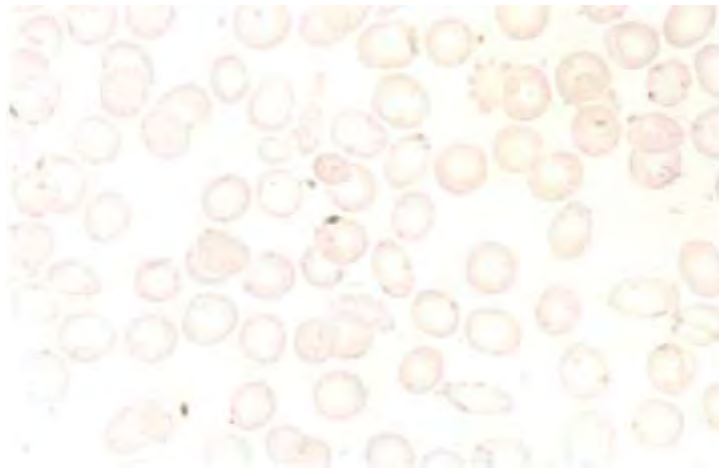
Περιγράφεται η ύπαρξη ή μη: υποχρωμίας, μικροκυττάρωσης, ανισοκυττάρωσης, ποικιλοκυττάρωσης, βασεόφιλης στίξης (καθίζηση ριβοσωμάτων), στοχοκυττάρωσης, πολυχρωματοφιλίας, μακροκυττάρωσης, στοματοκυττάρωσης, ανισοχρωμίας, σφαιροκυττάρωσης (Εικόνες 6α, β, γ, δ).



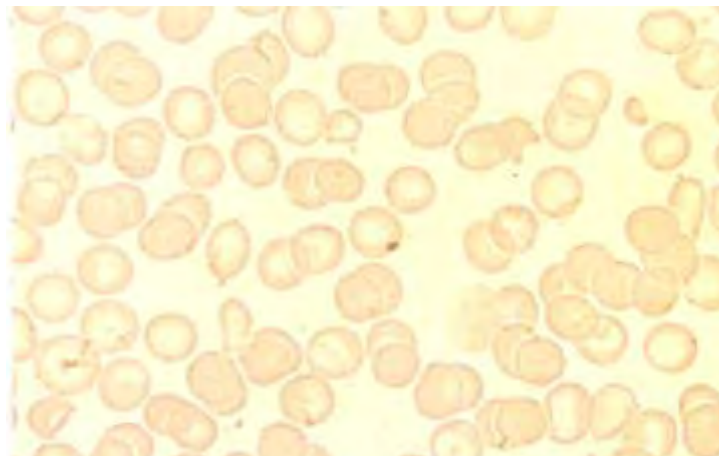
Εικόνα 6α. Μορφολογία ερυθροκυττάρων υγιούς ατόμου



Εικόνα 6β. Μορφολογία ερυθροκυττάρων ατόμου με ετερόζυγη β-ΜΑ



Εικόνα 6γ. Μορφολογία ερυθροκυττάρων ατόμου με ετερόζυγη β-MA και ↑ HbF. Διακρίνουμε μικροκυττάρωση, ανισοκυττάρωση και ποικιλοκυττάρωση.



Εικόνα 6δ. Μορφολογία ερυθροκυττάρων ατόμου με ετερόζυγη δβ-MA. Διακρίνουμε μικροκυττάρωση και ανισοκυττάρωση.

2.2.4. Αξιολόγηση αιματολογικών δεδομένων

Οι μετρήσεις της γενικής αίματος πραγματοποιήθηκαν σε αυτόματους αιματολογικούς αναλυτές, τύπου Sysmex K-1000 αρχικά και Sysmex K-4500 στη συνέχεια και αξιολογήθηκαν οι παρακάτω παράμετροι:

Αιμοσφαιρίνη (Hb): Αντιστοιχεί στην ποσότητα της αιμοσφαιρίνης που εμπεριέχεται στα ερυθροκύτταρα ενός καθορισμένου όγκου ολικού αίματος (Φ.Τ. Άνδρες $15,4 \pm 1,0$ και Γυναίκες $13,3 \pm 0,7$).

Αιματοκρίτης (Hct): Αντιστοιχεί στο ποσοστό (%) του όγκου που καταλαμβάνουν τα ερυθροκύτταρα σε σχέση με το συνολικό όγκο του αίματος (Φ.Τ. Άνδρες $47,4 \pm 3,2$ και Γυναίκες $41,2 \pm 2,2$).

Αριθμός ερυθροκυττάρων (RBC): Αντιστοιχεί στον αριθμό των ερυθροκυττάρων που περιέχονται σε μια μονάδα ολικού όγκου αίματος (Φ.Τ. Άνδρες 5.170±0.39 και Γυναίκες 4.490±0.32).

Επίσης αξιολογούνται οι ερυθροκυτταρικοί δείκτες:

MCH: Μέση ποσότητα αιμοσφαιρίνης ανά ερυθροκύτταρο (Mean Corpuscular Hemoglobin) (Φ.Τ. > 27,5 pg).

$$MCH = \frac{\text{αιμοσφαιρίνη σε gr ανά 100 ml αίματος (Hb)}}{\text{αριθμός ερυθροκυττάρων ανά 100 ml αίματος (RBC)}}$$

MCV: Μέσος όγκος ερυθροκυττάρων (Mean Corpuscular volume) (Φ.Τ. >81,0 fl)

$$MCV = \frac{\text{όγκος ερυθροκυττάρων σε 100 ml αίματος (Hct \%)}}{\text{αριθμός ερυθροκυττάρων ανά 100 ml αίματος (RBC)}}$$

MCHC: Μέση πυκνότητα (συγκέντρωση) αιμοσφαιρινών στα ερυθροκύτταρα (Mean corpuscular Hemoglobin concentration) (Φ.Τ. > 32,5)

$$MCHC = \frac{\text{αιμοσφαιρίνη σε 100 ml αίματος (Hb)}}{\text{όγκος ερυθροκυττάρων σε 100 ml αίματος (Hct)}}$$

RDW: Εύρος κατανομής του όγκου των ερυθροκυττάρων.

Ο νέος αυτός δείκτης των αιματολογικών αναλυτών εκφράζει την ομοιογένεια ή ετερογένεια του όγκου των ερυθροκυττάρων. Αύξησή του υποδηλώνει διπλό ερυθροκυτταρικό πληθυσμό.

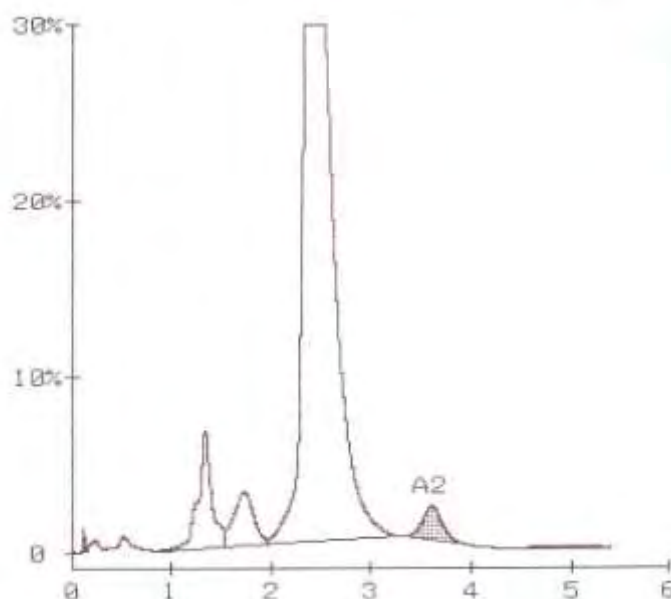
Με τη μέθοδο υπολογισμού RDW-CV έχουμε φυσιολογικές τιμές 13±1% και με τη μέθοδο RDW-SD (Φ.Τ. 42±5 fl).

2.2.5. Ποσοτικός προσδιορισμός αιμοσφαιρινών με τη μέθοδο HPLC

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των αιμοσφαιρινών HbA, HbA₂, HbF, HbS, HbC, HbO-Arab, HbD-Punjab, HbG-Philadelphia κ.λπ. έγινε αυτόματα με χρωματογραφικό διαχωρισμό σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και οπτικών ανιχνευτών (HPLC) (High Performance Liquid Chromatography), (Variant™-Bio-Rad).

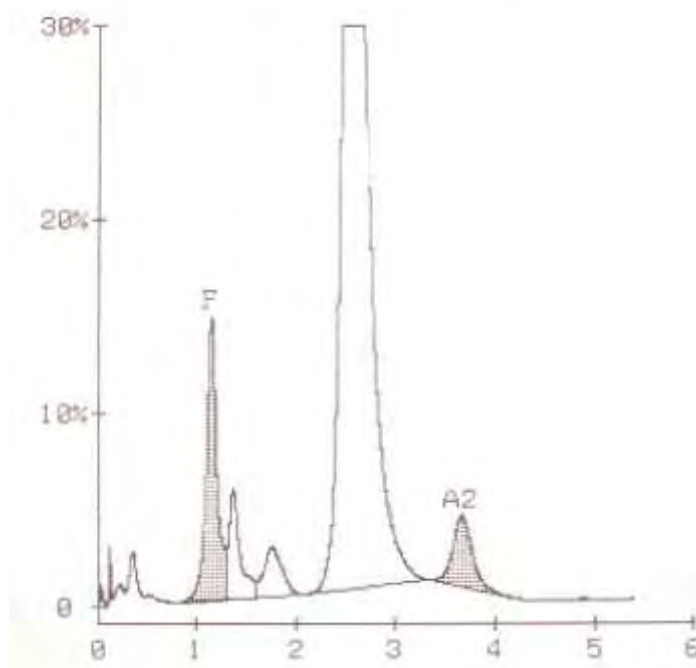
Η όλη διαδικασία υποστηρίζεται από κατάλληλο υπολογιστικό και λειτουργικό σύστημα, όπως φαίνεται από τα χρωματογραφήματα στις παρακάτω εικόνες (Εικόνες 7,8,9,10).

ANALYTE ID	%	TIME	AREA
P2	6.4	1.33	151789
P3	4.4	1.72	103177
A0	86.4	2.39	2039021
A2	2.7	3.60	64713
TOTAL AREA			2358700
F	0.0%	A2	2.7%



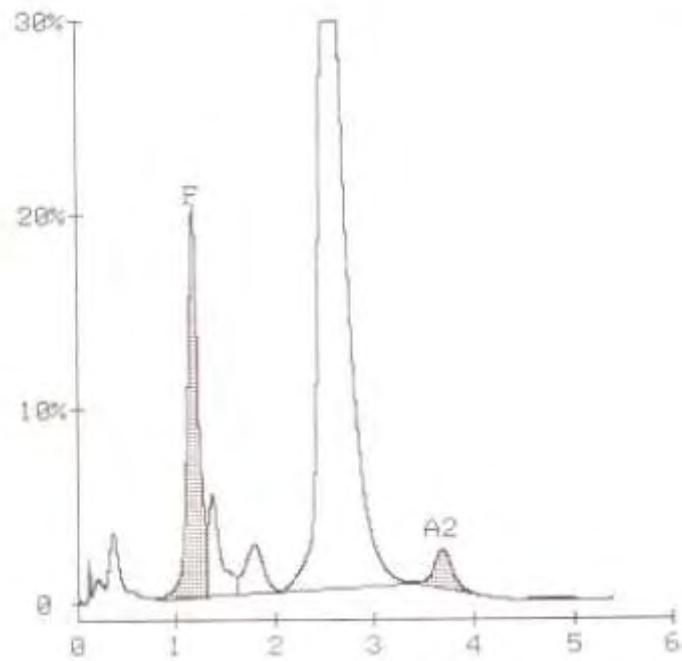
Εικόνα 7. Χρωματογράφημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης σε φυσιολογικό δείγμα ενήλικα. Η φυσιολογική αιμοσφαιρίνη (Hb A) αντιστοιχεί στην υψηλή κορυφή και έχει χρόνο έκλουσης (retention time) περίπου 2,5 λεπτά (2,39 στο συγκεκριμένο δείγμα). Η αιμοσφαιρίνη A₂ (HbA₂) έχει χρόνο έκλουσης 3.3 -3.9 λεπτά (3,60). Οι δύο μικρές κορυφές που εμφανίζονται πριν την HbA (P₂, P₃) αντιστοιχούν στη γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη (A₁C) (Variant™-Bio – Rad).

ANALYTE ID	%	TIME	AREA
F	10.6	1.14	127640
P2	4.3	1.36	55712
P3	3.0	1.75	39499
Ao	78.2	2.53	1015860
A2	4.8	3.65	60859
TOTAL AREA			1299570
F	10.6%	A2	4.8%



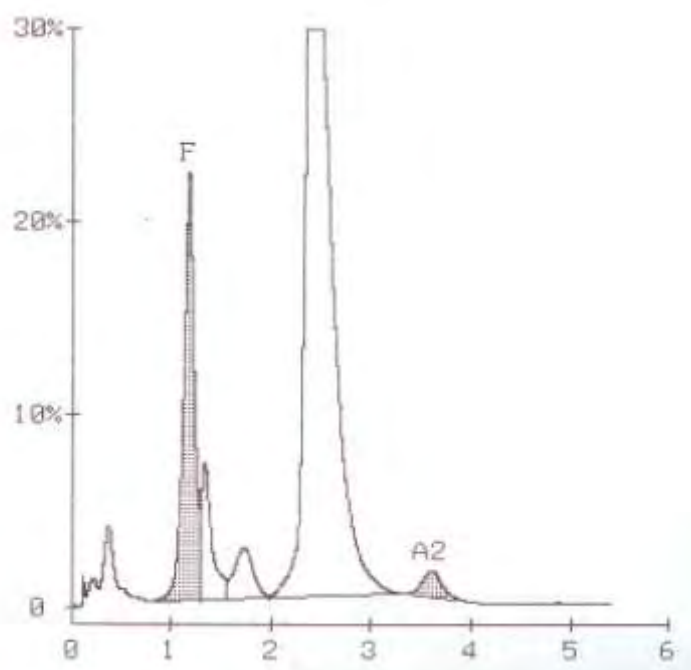
Εικόνα 8. Χρωματογράφημα ετεροζυγώτη β -MA' με αυξημένη αιμοσφαιρίνη F. Διακρίνεται η HbF (χρόνος έκλουσης 1,14min), η HbA (χρόνος έκλουσης 2,53 min) και η HbA₂ (χρόνος έκλουσης 3,65 min).

ANALYTE ID	%	TIME	AREA
F	15.1	1.18	269864
P2	4.6	1.36	79466
P3	3.2	1.78	55750
A _α	73.9	2.52	1277340
A ₂	2.8	3.68	47182
TOTAL AREA			1729602
F	15.1%	A ₂	2.8%



Εικόνα 9. Χρωματογράφημα ετεροζυγώτη δβ-MA. Η αιμοσφαιρίνη A₂ (HbA₂) βρίσκεται σε φυσιολογικά όρια (2.0 -3.2% στο συγκεκριμένο μηχάνημα). Διακρίνονται στη σειρά: HbF (χρόνος έκλουσης 1,18 min), HbA (χρόνος έκλουσης 2,52min) και η αιμοσφαιρίνη A₂ (χρόνος έκλουσης 3,68 min).

ANALYTE ID	%	TIME	AREA
F	17.2	1.17	452209
P2	5.5	1.33	144088
P3	3.7	1.72	97292
A ₀	71.4	2.40	1859193
A ₂	2.0	3.60	52839
TOTAL AREA			2605621
F	17.2%	A ₂	



Εικόνα 10. Χρωματογράφημα στην HPFH (Κληρονομική Παραμονή Εμβρυϊκής Αιμοσφαιρίνης F). Διακρίνονται στη σειρά: HbF (χρόνος έκλουσης 1,17min), HbA (χρόνος έκλουσης 2,40min) και η αιμοσφαιρίνη A₂ (χρόνος έκλουσης 3,60min).

2.2.6. Ποσοτικός προσδιορισμός της αιμοσφαιρίνης A₂ (HbA₂)

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της HbA₂ έγινε παράλληλα με τον οπτικό ποιοτικό έλεγχο των αιμοσφαιρινών: HbA, HbS, HbD, Hb Lepore κ.α. σε στήλες χρωματογραφίας δαιθυλαμινοκυτταρίνης (DEAE) με χρήση ρητίνης DE 52 Whatman.

Προετοιμασία ρητίνης

- Πλύσιμο 2 φορές με απεσταγμένο νερό
- Πλύσιμο με διάλυμα Tris 3 φορές. Το ίδιο διάλυμα χρησιμοποιείται για όλη τη διεργασία της χρωματογραφίας.

Διάλυμα A: (6,1 gr Tris+100 mgr KCN) σε 1 lt απεσταγμένο H₂O και ρύθμιση pH=8,3 με οξικό οξύ (CH₃COOH).

Το πλύσιμο της ρητίνης γίνεται με το διάλυμα πριν ρυθμιστεί το pH. Η ρύθμιση γίνεται στο ίδιο το τελευταίο εναιώρημα της ρητίνης.

Ετοιμασία στηλών: Με το εναιώρημα της ρητίνης σχηματίζεται στήλη διαμέτρου 1 και ύψους 8 cm περίπου, διαμέσου της οποίας διηθείται συνεχώς το διάλυμα.

2.2.7. Τεχνική χρωματογραφίας

Δημιουργία αιμολύματος (σε θερμοκρασία δωματίου)

Σε ποσότητα διαλύματος A ίση με τα 2/10 της αιμοσφαιρίνης κάθε δείγματος, προσθέτουμε 250 ml ολικού όγκου αίματος, φυγοκεντρούμε για 10 min στις 3.000 στροφές και από το υπερκείμενο αιμόλυμα:

α. 500 ml επιστοιβάζεται στη στήλη της ρητίνης αφήνεται να προσροφηθεί και εκλούεται με διάλυμα A. Η HbA₂ αποχωρίζεται από το κύριο κλάσμα της HbF καθώς και από τα κλάσματα HbS, HbD, Hb Lepore κ.λπ. (εάν υπάρχουν) στα 10 ml και φωτομετρείται στα 418 nm. Η απορρόφηση καθορίζεται ως OD. HbA₂.

β. 50 ml διαλύεται σε 10 ml διάλυμα A και φωτομετρείται στα 418 nm. Η απορρόφηση αντιστοιχεί στην ολική αιμοσφαιρίνη του αιμολύματος.

Ο υπολογισμός του ποσοστού της HbA₂ γίνεται με τον τύπο:

$$\text{HbA}_2 (\%) = \frac{\text{OD HbA}_2 \times 10}{\text{OD ολικής αιμοσφαιρίνης}}$$

(Φυσιολογικές τιμές: 1,8-3,0%)

2.2.8. Ποιοτικός έλεγχος αιμοσφαιρινών, με ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης σε ταινίες οξικής κυτταρίνης (Cellogel 7,8x15 cm)

Αντιδραστήρια

3. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (pH=8,5)

TRIS 3,00 gr

EDTA-Na₂ 0,39 gr

Βορικό οξύ (H₃BO₃) 2,50 gr

Συμπληρώνεται στα 1000 ml με απεσταγμένο H₂O

4. Διαλύματα παρασκευής αιμολύματος

(α) Νιτρώδες Νάτριο (NaNO₂) 2,0 gr

Χλωριούχο Νάτριο (NaCl) 8,5 gr

Συμπληρώνεται στα 100 ml με απεσταγμένο H₂O

(β) Κυανιούχο Κάλιο (KCN) 1,0 gr

Χλωριούχο Νάτριο (NaCl) 8,5 gr

Συμπληρώνεται στα 1000 ml με απεσταγμένο H₂O

5. Χρωστική light-green 500 mg στο ακόλουθο διάλυμα.

Μεθανόλη (CH₃OH) 50 ml, οξικό οξύ (CH₃COOH) 10 ml και 40 ml H₂O.

Παρασκευή αιμολυμάτων

- Σε ογκομετρικό κωνικό σωληνάριο που περιέχει ποσότητα 10 ml διαλύματος 2α, προσθήκη 200 ml ολικού αίματος.
- Φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές επί 15 λεπτά.
- Απόρριψη υπερκείμενου.
- Πλύσιμο των ερυθρών με 10 ml διαλύματος 2β.

- Φυγοκέντρωση-απόρριψη υπερκείμενου.
- Στον τελικό όγκο των ερυθρών προσθέτουμε απεσταγμένο νερό σε όγκο ίσο με το 1/10 της τιμής της αιμοσφαιρίνης του όγκου αίματος (π.χ. Hb 12 gr, όγκος H₂O 1,2 ml).
- Καλός πωματισμός του κωνικού σωληναρίου και ανακίνηση σε ανακινητήρα (shaker) επί 20 λεπτά.
- Το αιμόλυμα είναι έτοιμο για ηλεκτροφόρηση.

2.2.8.1. Τεχνική ηλεκτροφόρησης

Χρησιμοποιούνται σαν ηλεκτροφορητικό μέσο ταινίες οξικής κυτταρίνης (cellogel 7,8x15 cm σε CH₃OH 30%).

- Πριν από την χρήση τους παραμένουν στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης επί 15΄
- Στέγνωμα της ταινίας με διηθητικό χαρτί λίγο πριν από τη χρήση της.
- Τοποθέτηση του αιμολύματος από τη θαμπή πλευρά της ταινίας προς την κάθοδο. Η τοποθέτηση γίνεται με λεπτή πιπέττα ή με ειδική συσκευή (applicator).
- Τοποθέτηση της ταινίας στη γέφυρα του λουτρού.
- Αναμονή επί 5 λεπτά. Η συσκευή της ηλεκτροφόρησης καλύπτεται με το κάλυμμά της.
- Ρευματοδότης 1 mA ανά cm πλάτους ταινίας.
- Διαχωρισμός αιμοσφαιρινικών κλασμάτων.
- Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί 1 ώρα και 15 λεπτά.
- Ακολουθεί χρώση με χρωστική Light Green για 3΄ και στη συνέχεια διαδοχικές εκπλύσεις σε διάλυμα οξεικού οξέος 5% σε διαδοχικά δοχεία, μέχρι αποχρωματισμού των ταινιών.

Τα αιμοσφαιρινικά κλάσματα χρωματίζονται πράσινα και δεν αποχρωματίζονται.

2.2.8.2. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Στην ηλεκτροφόρηση ενός αιμολύματος με τις παραπάνω συνθήκες διακρίνουμε τα ακόλουθα κλάσματα:

- Αιμοσφαιρίνη A, που αποτελεί το κύριο κλάσμα και κινείται γρήγορα προς την άνοδο.
- Αιμοσφαιρίνη A₂, που αποτελεί το 1,8-3% και κινείται αργά προς την άνοδο.
- Αιμοσφαιρίνη F. Όταν υπάρχει κινείται προς την άνοδο λίγο αργότερα από την αιμοσφαιρίνη A.

Στις αιμοσφαιρινοπάθειες και στις Μεσογειακές αναιμίες:

- Οι αιμοσφαιρίνες E, C, O κ.α. κινούνται στο ίδιο ύψος με την HbA₂.
- Οι αιμοσφαιρίνες S, Lepore (Πύλος) και O κινούνται σε ίση απόσταση ανάμεσα στις HbA και HbA₂.
- Η αιμοσφαιρίνη H, ελεύθερες β αλυσίδες στη «βαριά» α-Μεσογειακή αναιμία, κινείται ταχύτερα από όλες και βρίσκεται αρκετά εμπρός από την αιμοσφαιρίνη A.

2.2.9. Ποσοτικός προσδιορισμός HbF με τη μέθοδο Betke

Παρασκευή αιμολύματος

- Φυγοκέντρηση αίματος σε 2000 στροφές/λεπτό επί 10 λεπτά. Αφαίρεση πλάσματος.
- Έκπλυση και φυγοκέντρηση ερυθροκυττάρων σε ισότονο διάλυμα (0,9%) χλωριούχου νατρίου (NaCl) τρεις φορές.
- Απομάκρυνση υπερκείμενης στοιβάδας λευκών αιμοσφαιρίων με προσεκτική αναρρόφηση.
- Προσθήκη απεσταγμένου νερού σε όγκο ίσο με τον όγκο των ερυθροκυττάρων.
- Ανάμειξη και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου επί 30 λεπτά.
- Προσθήκη 1 ml τολουόλης. Έντονη ανακίνηση σε vortex και ανάδευση σε shaker επί 20'.
- Φυγοκέντρηση σε 3000 στροφές/λεπτό επί 30 λεπτά. Οι μεμβράνες των ερυθροκυττάρων σχηματίζουν συμπαγή λεπτή στοιβάδα πάνω από το διαυγές αιμόλυμα.
- Απόληψη αιμολύματος με πιπέττα Pasteur, που διαπερνούμε «τρυπώντας» τη στοιβάδα των στρωμάτων, και περαιτέρω καθαρισμός του με διήθηση

μέσα από χάρτινο ηθμό (π.χ. Whatman 3 mm).

2.2.9.1. Μέτρηση εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης HbF (κατά Betke)

Στηρίζεται στην ιδιότητα της HbF να αντέχει στην επίδραση αλκαλικών διαλυμάτων καλύτερα από τις άλλες αιμοσφαιρίνες που καταστρέφονται εύκολα.

Αντιδραστήρια

- A. Σιδηροκυανιούχο κάλιο $K_3Fe(CN)_6$ 200 mg
Κυανούχο κάλιο (KCN) 200 mg
Συμπληρώνονται στα 1000 ml με απεσταγμένο H_2O
- B. Καυστικό νάτριο (NaOH) 1,2 N. Παρασκευάζεται με ανάλογη αραιώση προτυπωμένης φύσιγγας διαλύματος NaOH σε απεσταγμένο H_2O .
- Γ. Κεκορεσμένο διάλυμα θειικού αμμωνίου $(NH_4)_2SO_4$ σε απεσταγμένο H_2O .

Τεχνική μέτρησης

- 0.4 ml αιμολύματος αραιώνονται στα 8,0 ml με διάλυμα A.
- Σε 2,8 ml του αραιωμένου αιμολύματος προστίθενται 0,2 ml διαλύματος B και αναμειγνύονται αμέσως καλά. Συγχρόνως αρχίζει η χρονομέτρηση.
- Μετά 2 λεπτά ακριβώς προστίθενται 2 ml διαλύματος Γ. Καλή ανάμειξη. Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου επί 5 λεπτά. Η μετουσιωμένη αιμοσφαιρίνη κατακρημνίζεται.
- Διήθηση με απλό διηθητικό ηθμό.
- Φωτομέτρηση του διηθήματος σε μήκος κύματος φωτός 540 nm.
- Η ένδειξη OD_α αντιστοιχεί στη μη μετουσιωμένη αιμοσφαιρίνη.
- Μάρτυρας. 0,28 ml αρχικού αιμολύματος και προσθήκη 4,72 ml H_2O .
- Φωτομέτρηση στα 540. Ένδειξη OD_β . Αυτή αντιστοιχεί στο σύνολο της αιμοσφαιρίνης του αιμολύματος.
- Υπολογισμός ποσοστού εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης.

$$HbF(\%) = \frac{OD_\alpha \times 10}{OD_\beta}$$

2.2.10. Κυτταροχημικός διαχωρισμός HbF

Διαλύματα

1. Διάλυμα εκλούσεως
FeCl₃ 14,8 mmol/L και αιματοξυλίνη 16,5 mmol/L
2. Διάλυμα χρώσεως
Ερυθροσίνη 0,1 gr/100 ml

Παρασκευάσματα

- Λεπτές επιστρώσεις αίματος σε αντικειμενοφόρες πλάκες.
- Στέγνωμα στον αέρα επί 20΄.
- Μονιμοποίηση με 80% αιθυλική αλκοόλη (CH₃CH₂OH) για 5΄.
- Ξέβγαλμα αμέσως με άφθονο νερό βρύσης.
- Στέγνωμα.

Τεχνική

- Βύθιση των μονιμοποιημένων παρασκευασμάτων μέσα στο διάλυμα (1) (20-25°C) για 20 δευτερόλεπτα.
- Ξέβγαλμα με νερό της βρύσης.
- Χρώση με το διάλυμα (2) για 2 λεπτά.
- Ξέβγαλμα καλά με νερό βρύσης και στέγνωμα στον αέρα.
- Εξέταση στο μικροσκόπιο.

Τα κύτταρα με F είναι χρωματισμένα, ενώ τα χωρίς F έχουν χάσει την αιμοσφαιρίνη τους και φαίνονται σαν σκιές ερυθροκυττάρων.

2.2.11. Χρώση για αναζήτηση εγκλείστων στα ερυθροκύτταρα

1. Διαπίστωση ενδοκυτταρίων ιζημάτων αιμοσφαιρίνης (χρώση εγκλείστων).

Χρησιμεύει για τη διάγνωση της ομόζυγης β-MA, ετερόζυγης β-MA,

ετερόζυγης δβ-MA, ετερόζυγης γδβMA, όπου οι α αλυσίδες που βρίσκονται σε περίσσεια, καθιζάνουν μόνες τους μέσα στους ερυθροβλάστες.

Αντιδραστήριο Α

Διάλυμα 1% της χρωστικής ιώδες του μεθυλίου Methyl Violet (Οίκου Merck) σε ισότονο διάλυμα NaCl (1 gr/100 ml), ανάδευση σε υδατόλουτρο 37° C επί 24ωρο μέχρι πλήρους διαλύσεως και επαναλαμβανόμενες διηθήσεις.

Τεχνική

- Μικρός όγκος αίματος (μερικές σταγόνες) προστίθεται σε ίσο όγκο αντιδραστηρίου Α σε μικρό σωληνάριο.
 - Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου επί 30΄.
 - Στη συνέχεια από το εναιώρημα παρασκευάζονται επιστρώσεις σε αντικειμενοφόρες πλάκες, οι οποίες ξηραίνονται στον αέρα.
 - Η παρατήρηση στο μικροσκόπιο γίνεται κατά προτίμηση με καταδυτικό φακό (μεγάλη μεγέθυνση 1000 χ).
 - Όταν υπάρχουν έγκλειστα, φαίνονται σαν μικρά ή μεγάλα μωβ άμορφα κοκκία μέσα στο πρωτόπλασμα.
2. Κατακρήμνιση ασταθών αλυσίδων αιμοσφαιρίνης μέσα στα ερυθροκύτταρα.

Χρησιμεύει για τη διαπίστωση ασταθών αιμοσφαιρινών και αλυσίδων β, όταν αυτές βρίσκονται σε περίσσεια μέσα στα ερυθροκύτταρα (αιμοσφαιρινοπάθεια Η, ετερόζυγη α-MA).

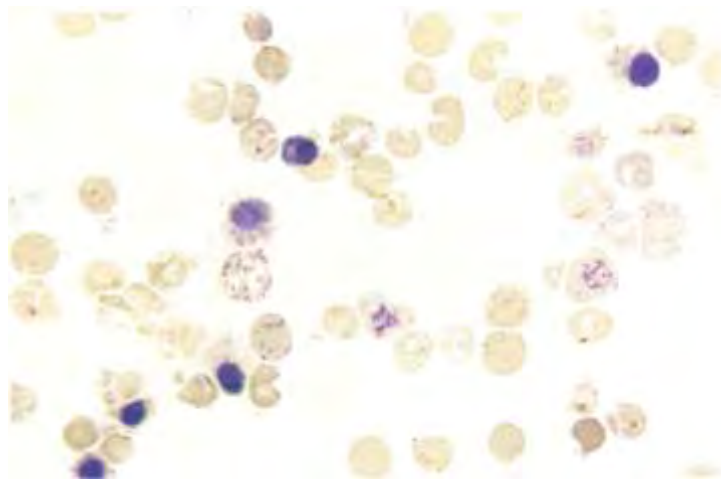
Αντιδραστήριο Β

1280 mg νιτρώδους νατρίου (NaNO_2) διαλύονται σε 100 ml απεσταγμένου νερού.

Τεχνική

- 0,5 ml αίματος επωάζεται με 0,1 ml αντιδραστηρίου Β για 30΄ στους 37° C.
- Στη συνέχεια σε μερικές σταγόνες, από το επωασμένο αίμα με το αντιδραστήριο Β, προσθέτουμε ίσο όγκο του αντιδραστηρίου Α.
- Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου επί 30΄ και επίστρωση σύμφωνα με την παραπάνω τεχνική.

Τα έγκλειστα που σχηματίζονται μετά την επώαση μοιάζουν με αδρά κοκκία έντονα μωβ χρωματισμένα (Εικ.11).



Εικόνα 11. Έγκλειστα ερυθροκυτάρων στην ετερόζυγη β-ΜΑ.

2.2.12. Ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης σε άγαρ

Ρυθμιστικά διαλύματα

2. (α) Κιτρικό Νάτριο

(C₆H₅Na₃O₇H₂O) 147 gr

(β) Κιτρικό Οξύ

(H₃C₆H₅O₇H₂O) 25 ml 20%

Συμπληρώνεται στα 1000 cm³ με H₂O

3. Αραίωση 1/10 του διαλύματος 1 (1 ml διαλύματος 1 + 9 ml H₂O AD)

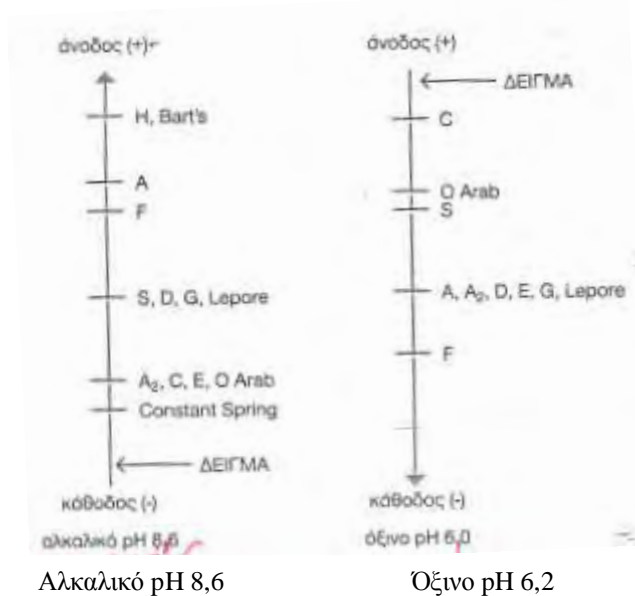
Ταινίες ηλεκτροφόρησης, ταινίες κιτρικού άγαρ (citrate agar gel-Corning 12x10 cm).

Τεχνική

- Ετοιμασία λουτρού ηλεκτροφόρησης με το διάλυμα 2 (pH=5,9).
- Τοποθέτηση με τριχοειδές σωληνάριο, ελάχιστης ποσότητας αιμολύματος στην ειδική υποδοχή της ταινίας.
- Τοποθέτηση της ταινίας στις γέφυρες του λουτρού.
- Ρευματοδότηση (200 V) επί ½-1 ώρα.
- Χρώση με Light Green, όπως τις ταινίες οξεικής κυτταρίνης (Cellogel).

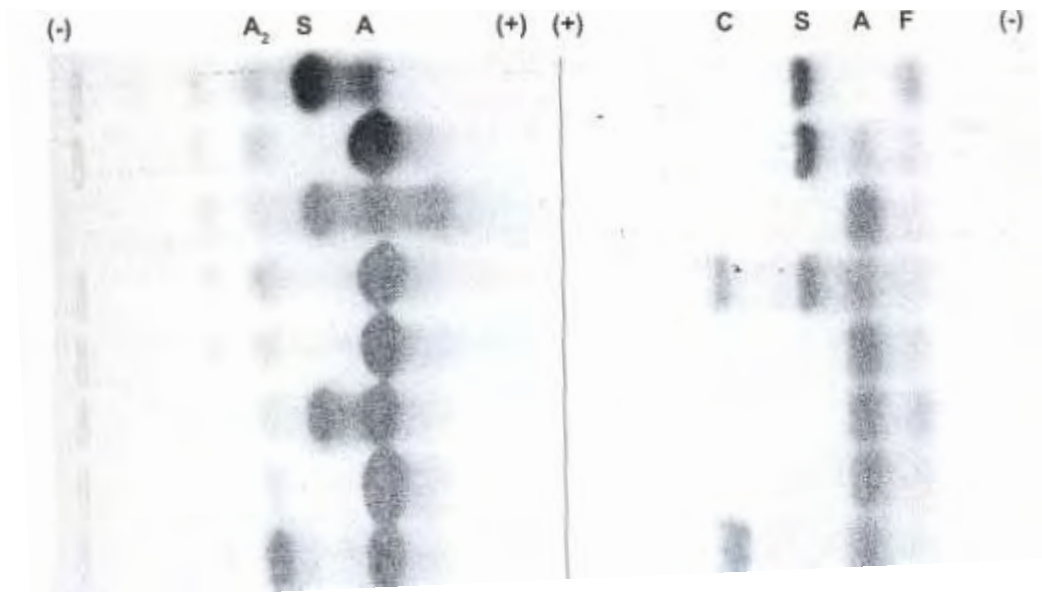
Αναγνώριση κλασμάτων

Οι HbA, HbA₂, HbD και άλλες αιμοσφαιρίνες κινούνται ελάχιστα μαζί. Η HbS διαχωρίζεται προς την άνοδο και η HbF προς την κάθοδο (Εικ. 12A, B).



Εικόνα 12A. Διαχωρισμός φυσιολογικών και παθολογικών αιμοσφαιρινών σε αλκαλικό και όξινο pH

Αλκαλική ηλεκτροφόρηση (pH 8,6) Όξινη ηλεκτροφόρηση (pH 6,2)



Εικόνα 12B. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων αιμοσφαιρίνης σε αλκαλικό και όξινο pH

2.3. Μελέτη σε γονιδιακό επίπεδο (DNA)

2.3.1 Απομόνωση γενωμικού DNA από περιφερικό αίμα με εξαλάτωση

Η απομόνωση γίνεται από τους πυρήνες των λευκοκυττάρων (WBC) με τη διαδικασία που περιγράφεται από τους Ρονοζ et al (1982).

Αντιδραστήρια

Λυτικό διάλυμα I	155 mM NH ₄ Cl
(για ερυθροκύτταρα)	10 mM KHCO ₃
	1 mM EDTA
	pH=7,4

Λυτικό διάλυμα II	10 mM Tris-HCl pH=7,5
(για ερυθροκύτταρα)	400 mM NaCl
	2 mM EDTA

Πρωτεΐνάση Κ	10 mg/ml
SDS	10%
NaCl	6M

Πρωτόκολλο

1. Τοποθετούμε το ολικό αίμα σε σωληνάριο των 15 ml και αραιώνουμε ως 12 ml περίπου με ddH₂O αναδεύοντας με πιπέτα pasteur.
2. Φυγοκεντρούμε για 15 min στις 3000 rpm, στους 4°C.
3. Αδειάζουμε το υπερκείμενο. Τα κύτταρα αραιώνονται με ddH₂O ως 12 ml περίπου. Ανακινούμε έντονα σε vortex.
4. Φυγοκεντρούμε για 15 min στις 3000 rpm, στους 4°C.
5. Αδειάζουμε το υπερκείμενο. Προσθέτουμε διάλυμα λύσης λεμφοκυττάρων (διάλυμα λύσης I) μέχρι τα 12 ml. Το διάλυμα λύσης I σπάει τα WBC.
6. Φυγοκεντρούμε για 15 min στις 3000 rpm, στους 4°C.
7. Επαναλαμβάνουμε τα στάδια 5,6 με διάλυμα λύσης II.
8. Αδειάζουμε το υπερκείμενο. Προσθέτουμε διάλυμα λύσης των πυρήνων των λεμφοκυττάρων (διάλυμα λύσης II) μέχρι τα 6 ml. Το διάλυμα λύσης II σπάει τους πυρήνες. Ανακινούμε καλά και επωάζουμε για 15-30 min.
9. Προσθέτουμε 750 μl SDS 10% και 100 μl πρωτεΐνάση Κ. Το SDS ανοίγει την πυρηνική μεμβράνη. Η πρωτεΐνάση Κ κάνει πεπτιδική υδρόλυση ή αποδόμηση των πρωτεϊνών.
10. Επωάζουμε στους 37°C O/N (overnight) σε υδατόλουτρο.
11. (Την επόμενη ημέρα): Προσθέτουμε 2 ml 6 M NaCl. Αναδεύουμε ισχυρά για 15 sec.
12. Φυγοκεντρούμε για 15 min σε 3500 rpm, στους 4°C.
13. Στο υπερκείμενο υπάρχει το DNA. Μεταγγίζουμε το υπερκείμενο σε καθαρό κωνικό σωληνάριο των 50 ml.
14. Φυγοκεντρούμε για 15 min σε 3500 rpm, στους 4°C.
15. Ακολουθεί καταβύθιση με 2 όγκους αιθανόλης 100% και 1/10 όγκου του υπερκείμενου CH₃COONa (οξικό νάτριο) 3M pH 5,2. Ανακινούμε.
16. Τοποθετούμε τα δείγματα στους -20°C O/N (overnight).
17. (Την επόμενη ημέρα): Φυγοκεντρούμε για 50 min σε 3500 rpm, στους 4°C ή για 30 min σε 8000 rpm. Αφαιρούμε το υπερκείμενο.

18. Ξεπλένουμε το ίζημα με 70% CH₃CH₂OH (αιθανόλη) και ξαναφυγοκεντρούμε για 30 min (δύο) και για 20 min, σε 12000 rpm, στους 4°C.
 19. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
 20. Διαλύουμε το τελικό ίζημα σε 200-300 μl ddH₂O.
 21. Στη συνέχεια γίνεται έλεγχος ποιότητας DNA σε πήκτωμα αγαρόζης: 3-4 μl DNA και 12 μl αραιή χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης.
 22. Επίσης φωτομετρούμε για ποσοτικό έλεγχο του DNA: 5 μl DNA και 495 μl ddH₂O (αραίωση 1:100) στα 260 nm και 280 nm μήκος κύματος. Ο λόγος οπτικών πυκνοτήτων (O.D. 260/O.D. 280) θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1,7 και 1,9.
- Η συγκέντρωση DNA υπολογίζεται με βάση τον τύπο: αραιώση X O.D. 260 X 50.
(Θεωρούμε ότι η O.D. 1 αντιστοιχεί σε 50 μg DNA/ml σε μήκος κύματος 260 nm.)

2.3.2. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός (έλεγχος συγκέντρωσης) DNA

Η ποσότητα και η ποιότητα (καθαρότητα) του DNA εκτιμώνται με φωτομέτρηση γνωστού όγκου διαλύματος DNA, που αραιώνεται σε τελικό όγκο 500 μl με ddH₂O. Το αραιωμένο διάλυμα DNA τοποθετείται σε κυβέτα χαλαζία.

Η φωτομέτρηση γίνεται σε μήκος κύματος 260 nm και 280 nm. Από την οπτική πυκνότητα (O.D.) του δείγματος υπολογίζεται η συγκέντρωση του DNA σ' αυτό.

Ο λόγος της οπτικής απορρόφησης 260 nm προς 280 nm ($\frac{O.D.260}{O.D.280}$) καταδεικνύει και την ποιότητα του DNA.

Το καθαρό DNA δίνει λόγο $\frac{O.D.260}{O.D.280} = 1.80$ (αποδεκτά όρια 1,70-1,90)

Παράλληλα, ποσότητα δείγματος DNA (3 μl) ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης κατάλληλης σύστασης. Στο πήκτωμα αγαρόζης περιέχεται βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) σε συγκέντρωση 0,5 μg/ml, το οποίο συγκρατείται μεταξύ των βάσεων του δίκλωνου DNA και φθορίζει όταν εκτεθεί σε UV ακτινοβολία. Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του κάθε δείγματος.

2.3.2.1 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

Υλικά

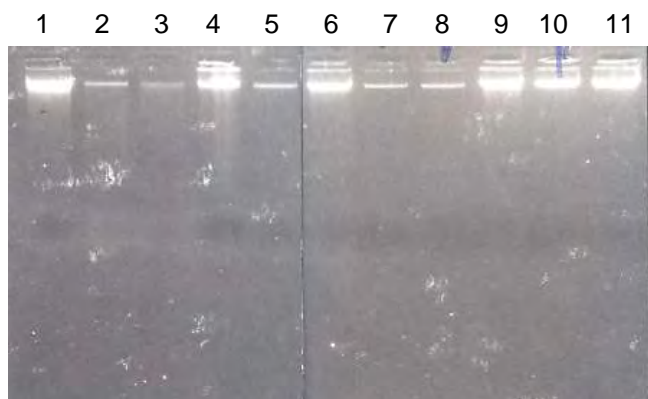
- Αγαρόζη (SIGMA A 6013)
- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1xTBE
- Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) σε συγκέντρωση 0,5 µg/ml

Πρωτόκολλο

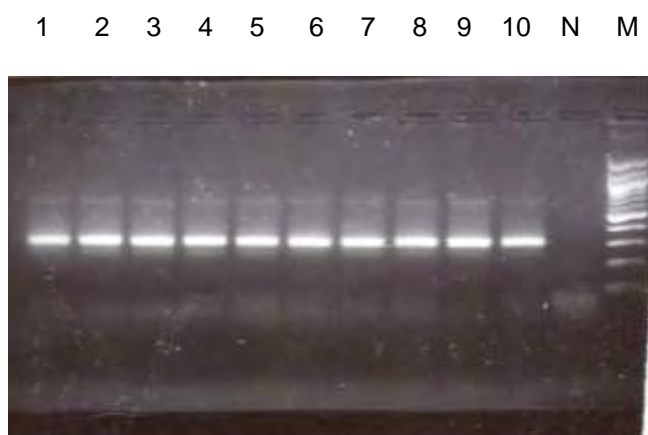
- Χρησιμοποίηση ειδικού εκμαγείου.
- Προστίθενται 60 ml ρυθμιστικού διαλύματος σε κωνική φιάλη Erlenmeyer.
- (Για δημιουργία gel: 1%, 2%, 3% προσθέτουμε αντίστοιχα: 3 gr, 6 gr, 9 gr αγαρόζης σε διάλυμα 1xTBE όγκου 300 ml).
- Η φιάλη τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων για 2-3 min και αναδεύεται με κυκλικές ανακινήσεις της φιάλης κατά διαστήματα, ώστε να διαλυθούν οι σβώλοι της αγαρόζης.
- Προσθέτουμε 15 µl EtBr και αναδεύουμε το διάλυμα για ομοιόμορφη κατανομή του βρωμιούχου αιθιδίου.
- Ψύχεται το διάλυμα σε θερμοκρασία 5-10°C ανώτερη από το σημείο πήξεως της αγαρόζης.
- Αφήνεται το πήκτωμα αγαρόζης για 1-2 ώρες περίπου σε θερμοκρασία δωματίου για να πήξει και στη συνέχεια αποθηκεύεται στους 4°C.

2.3.2.2 Ηλεκτροφόρηση γενωμικού DNA, προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Το βρωμιούχο εθίδιο (EtBr) ενσωματώνεται μεταξύ των βάσεων του DNA και φθορίζει σε υπεριώδη ακτινοβολία. Με αυτόν τον τρόπο ανιχνεύονται η επιτυχής απομόνωση γενωμικού υλικού και η επιλεκτική ενίσχυση τμημάτων DNA (προϊόντα PCR) (Εικ. 13A, B).



Εικόνα 13Α. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων γενωμικού DNA 1-11



Εικόνα 13Β. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR δειγμάτων 1-10. N: αρνητικός μάρτυρας M: μάρτυρας γνωστού μεγέθους (100 bp ladder, New England Biolabs)

2.3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού (Polymerase Chain Reaction, PCR), είναι μια δυναμική μέθοδος στον τομέα της μοριακής βιολογίας και δίνει τη δυνατότητα πολλαπλασιασμού ενός τμήματος DNA μέχρι και πάνω από 100 δισεκατομμύρια αντίγραφα, σε μια *in vitro* ενζυματική αντίδραση και σε χρονικό διάστημα 3-4 ωρών.

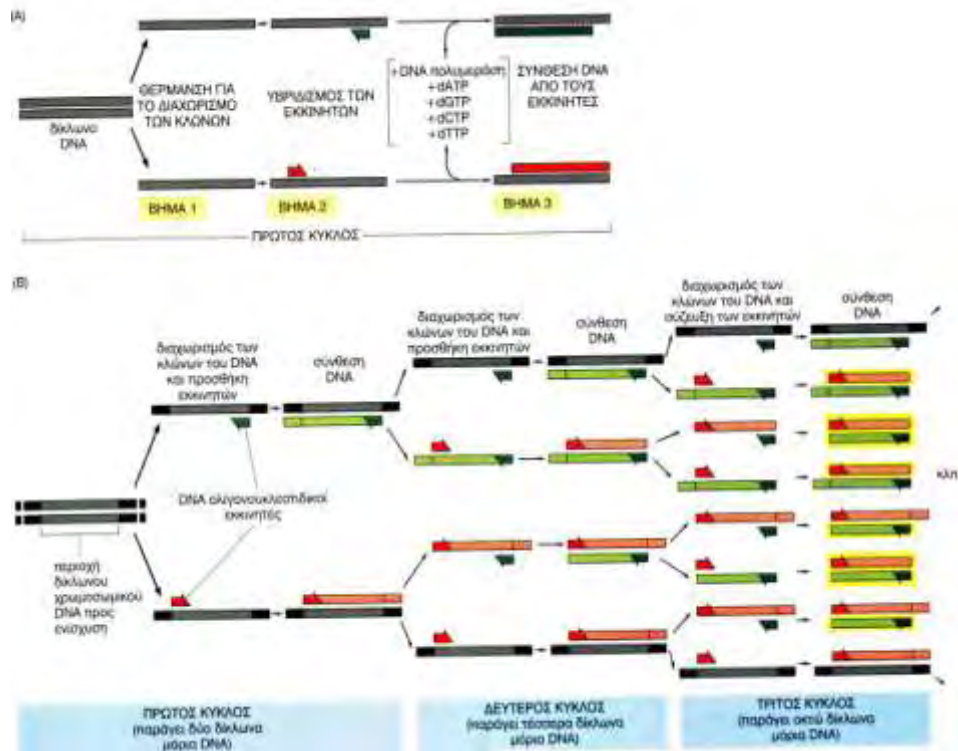
Η τεχνική περιγράφηκε από τους Kary and Mullis (1985), Mullis and Faloona (1987) και στηρίζεται στη χρήση μιας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (Taq πολυμεράση, Saiki et al., 1988), που απομονώνεται από τον μικροοργανισμό *Thermus aquaticus* και δεν υφίσταται απώλεια της ενεργότητάς της με

επαναλαμβανόμενα στάδια θέρμανσης στους 94-96°C.

Η αρχή της αντίδρασης PCR βασίζεται στον ενζυματικό πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA, έως 3 Kb, που οριοθετείται δεξιά και αριστερά από δύο εκκινητές-ολιγονουκλεοτίδια (primers), μήκους 20-28 bp. Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή είναι συμπληρωματική προς τη μια από τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου εκμαγείου και χρησιμεύει ως σημείο έναρξης της σύνθεσης της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA από την πολυμεράση. Απαιτούνται επίσης ελεύθερα δεοξυριβονουκλεοτίδια, ως δομικοί λίθοι του πολλαπλασιασμού του αρχικού μορίου DNA (template DNA) και επίσης κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα με ιόντα μαγνησίου και καλίου.

Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε ειδικό θερμικό κυκλοποιητή (thermalcycler) σε 20-40 επαναλαμβανόμενους κύκλους αποδιάταξης του δίκλωνου DNA (denaturation step) σε θερμοκρασία 94-96°C, υβριδοποίησης των εκκινητών στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες (annealing step) σε θερμοκρασία 53-60°C και επιμήκυνσης της θυγατρικής αλυσίδας του DNA (elongation step) από την Taq πολυμεράση σε θερμοκρασία έως 72°C (ρυθμός ενσωμάτωσης νουκλεοτιδίων 1000/sec).

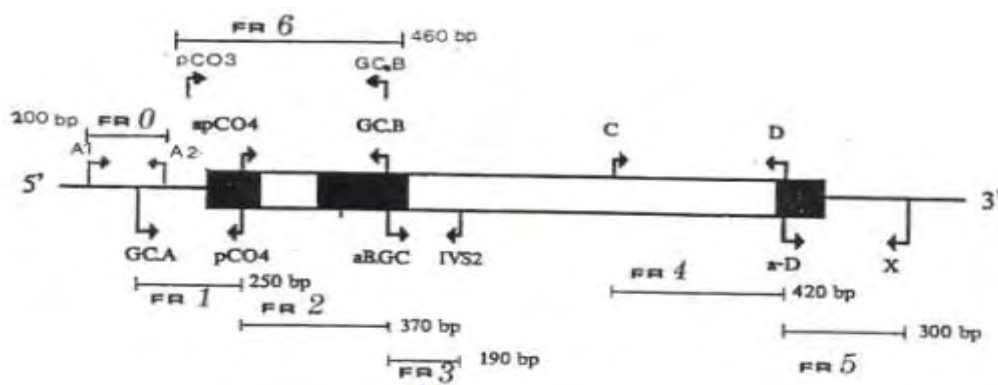
Η θερμοκρασία τήξης (T_m) του κάθε εκκινητή, δηλαδή η θερμοκρασία στην οποία το 50% ενός πληθυσμού μορίων DNA βρίσκεται σε μονόκλωνη μορφή, ορίζει και τη θερμοκρασία υβριδοποίησής τους στην αλυσίδα του DNA και κυμαίνεται μεταξύ 55-80°C. Κάθε κύκλος αποτελείται από τρία στάδια (Εικ. 14).



Εικόνα 14. Τα τρία στάδια του κύκλου της αντίδρασης PCR

2.3.4. Εκλεκτικός πολλαπλασιασμός αλληλουχιών του β-γονιδίου (PCR)

Για να γίνει έλεγχος των μεταλλάξεων του β γονιδίου σφαιρίνης, το γονίδιο έχει χωριστεί σε έξι τμήματα μεγέθους 200-500 νουκλεοτιδίων που καλύπτουν όλο το γονίδιο καθώς και τις αλληλουχίες των 5' και 3' μη μεταφραζόμενων περιοχών του.



Εικόνα 15. Σχηματική απεικόνιση της θέσης των ζευγών εκκινητών στο γονίδιο της β-σφαιρίνης. Μαύρα κουτιά-εξώνια, λευκά κουτιά-εσώνια.

Χρησιμοποιώντας κατάλληλα ζεύγη εκκινητών ενισχύεται εκλεκτικά η επιθυμητή αλληλουχία, η οποία βρίσκεται ανάμεσα στις αλληλουχίες των βάσεων του DNA, οι οποίες είναι συμπληρωματικές προς τους ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές (Εικ. 15).

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία κάθε εκκινητή, είναι η εξής:

A1	:	5'-TTTAGTAGCAATTTGTA CTGA-3'	(21 nts)
A2	:	5'-GCCCTGGCTCCTGCCCTCCC-3'	(20 nts)
A	:	5'-GTACGGCTGTCATCACTTAGACCTCA-3'	(26 nts)
pCO4	:	5'-CAACTTCATCCACGTT CACC-3'	(20 nts)
apCO4	:	5'-GGTGAACGTGGATGAAGTT-3'	(19 nts)
B	:	5'-TGCAGCTTGT CACAGTGCAGCTCACT-3'	(26 nts)
C	:	5'-GTGTACACATATTGACCAA-3'	(20 nts)
D	:	5'-AGCACACAGACCAGCACGTT-3'	(20 nts)
aD	:	5'-AACGTGCTGGTCTGTGTGCT-3'	(20 nts)
X	:	5'-AAATGCACTGACCTCCCACA-3'	(20 nts)
pCO3	:	5'-ACACA ACTGTGTTCACTAGC-3'	(20 nts)

Οι εκκινητές A2, A, και B έχουν στο 5' άκρο τους ένα GC-clamp μήκους 65 νουκλεοτιδίων.

Η αλληλουχία του GC-clamp, είναι:

5'-GCCCCGCCCCGCCCCCGTGCCCCCGCGCCGCCCCGCCCCGCCCC-3'

Για την αντίδραση της PCR απαιτούνται:

1. Γενωμικό DNA.
2. Εκκινητές συγκέντρωση 12,5 pmoles/μl και διατηρούνται στους - 20°C.
3. α) ένζυμο Taq πολυμεράση διαλυμένο σε διάλυμα 50% γλυκερόλη, 20mM Tris HCl με pH 8, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 200μg/ml ζελατίνη. Τελική συγκέντρωση ενζύμου : 5 u/μl.
β) 10X buffer ενζύμου: 200 mM Tris με pH 8,4, 500 Mm KCl, 0,1 % ζελατίνη.
γ) διάλυμα MgCl₂ : 50 mM.
δ) αποδιατακτικό διάλυμα W1%.
4. Μίγμα των 4 δεοξυνουκλεοτιδίων συγκέντρωσης 40 mM (10 mM ως προς το καθένα).
5. ddH₂O.

Πρωτόκολλο αντίδρασης PCR

1. Παρασκευή διαλύματος σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου erpendorf 0,5 ml με τη διαδοχική προσθήκη :

- 10 X buffer τελικής συγκέντρωσης 1 X	= 5,00 μl
- διάλυμα Mg Cl ₂ τελικής συγκέντρωσης 2,5 mM	= 2,50 μl
- διάλυμα W-1 τελικής συγκέντρωσης 0,05%	= 2,50 μl
- 12,5 pmoles εκκινητή 1	= 1,00 μl
- 12,5 pmoles εκκινητή 2	= 1,00 μl
- 2 mM d NTPs	= 0,40 μl
- 1 u Taq πολυμεράση	= 0,16 μl
- Συνολικός όγκος	=12,56 μl
2. Προσθήκη 0,5-1 μg γενωμικού DNA.
3. Συμπλήρωση του όγκου με ddH₂O μέχρι τα 50 μl.
Τοποθέτηση των δειγμάτων στο ειδικό μηχάνημα για την αντίδραση PCR.

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιείται για PCR των τμημάτων του β-γονιδίου περιέχει συνθήκες οι οποίες τροποποιούνται ανάλογα με τα υπό μελέτη τμήματα και είναι γενικά:

STEP-1:	94°C για 4 min.
STEP-2:	94°C για 1 min (αποδιάταξη)
STEP-3:	60°C για 1,5 min (πρόσδεση εκκινητών)
STEP-4:	70°C για 2 min (επιμήκυνση)
STEP-5:	επανάληψη των 2,3,4, σταδίων για 34 φορές
STEP-6:	70°C για 7 min.
STEP-7:	4°C για 24 hrs.

Λόγω του διαφορετικού T_m των εκκινητών του τμήματος 0, για τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό του τμήματος αυτού η θερμοκρασία πρόσδεσης το είναι 55°C.

Στο τέλος της αντίδρασης το προϊόν της PCR ελέγχεται σε πήκτωμα αγαρόζης 3%.

2.3.5. Παρασκευή – ηλεκτροφόρηση - παρατήρηση αποδιατακτικού πηκτώματος ακρυλαμίδης (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)

2.3.5.1 Αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Για την παρασκευή πηκτωμάτων διαχωρισμού μικρών τμημάτων DNA, ως πρώτη ύλη χρησιμοποιείται το οργανικό μόριο $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ (ακρυλαμίδα). Το μονομερές της ακρυλαμίδης παρουσία TEMED (N,N,N',N'-τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη) και υπερθειικού αμμωνίου (APS) σχηματίζει αλυσίδες. Αν στην αντίδραση πολυμερισμού υπάρχει το διμερές $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{C}-\text{N}-\text{CH}_2-\text{N}-\text{C}-\text{CH}=\text{CH}_2$ (N,N'-μεθυλένδισακρυλαμίδα), οι αλυσίδες συνδέονται διασταυρωτά μεταξύ τους και σχηματίζουν πηκτώματα με μέγεθος πόρων που καθορίζεται από τις συγκεντρώσεις των δύο μορίων. Συνήθως χρησιμοποιείται ακρυλαμίδα σε συγκέντρωση 3,5-20% και δις ακρυλαμίδα σε κατάλληλη αναλογία ώστε να υπάρχει ένα μόριο για κάθε 20 μονομερή. Το υπερθειικό αμμώνιο (APS), βοηθά την έναρξη πολυμερισμού της ακρυλαμίδης, και πρέπει

να έχει παρασκευασθεί πρόσφατα, ενώ το TEMED, αποτελεί τον επιταχυντικό παράγοντα του πολυμερισμού και χρησιμοποιείται ισομοριακά με τον εναρκτή.

Όσον αφορά τα αποδιατακτικά πηκτώματα, αυτά πολυμερίζονται παρουσία παραγόντων που καταστέλλουν το ζευγάρωμα των βάσεων, ώστε να είναι δυνατός ο διαχωρισμός μονόκλωνων τμημάτων DNA. Κατάλληλοι τέτοιοι παράγοντες, είναι η ουρία και το φορμαμίδιο. Η ουρία (NH_2CONH_2) είναι μόριο χωρίς φορτίο, ικανό να διασπά δεσμούς υδρογόνου σε νουκλεϊκά οξέα και πρωτεΐνες, και χρησιμοποιείται ώστε να ενισχύσει την αποδιάταξη. Το φορμαμίδιο έχει την ιδιότητα να διακόπτει τους δεσμούς υδρογόνου.

Τα μικρού πάχους πηκτώματα θεωρούνται καλύτερα, γιατί τα μεγάλα πάχους (0,5-2 mm) θερμαίνονται κατά την ηλεκτροφόρηση. Η ακρυλαμίδη είναι νευροτοξική και απορροφάται από το δέρμα έχοντας συσσωρευτική δράση, γι' αυτό η χρήση της απαιτεί προσοχή. Η πολυμερισμένη ακρυλαμίδη δεν είναι τοξική αλλά μπορεί να περιέχει μικρή ποσότητα μη πολυμερισμένης.

Τα αποδιατακτικά πηκτώματα ακρυλαμίδης φτιάχνονται πάντα ανάμεσα σε δύο τζάμια, έτσι ώστε να προστατεύονται από το οξυγόνο, το οποίο εμποδίζει τον πολυμερισμό, καθώς η επαφή με τον αέρα περιορίζεται σε μια λεπτή λωρίδα, στην κορυφή του πηκτώματος. Τα τζάμια που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι πολύ καθαρά, προκειμένου να είναι εύκολη η απομάκρυνση του πηκτώματος από αυτά.

Ο πολυμερισμός πραγματοποιείται σε 60 περίπου λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και το πήκτωμα μπορεί να διατηρηθεί σε θερμοκρασία 4°C για 1-2 ημέρες.

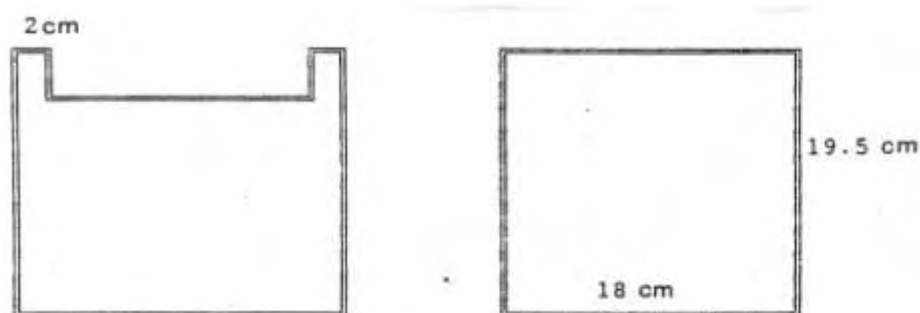
Στα διαλύματα DNA (προϊόντα PCR) που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν στο πήκτωμα προστίθεται ένα διάλυμα που περιέχει i) χρωστική και ii) ένα υλικό όπως η γλυκόζη, γλυκερόλη, σουκρόζη ή Ficoll για να καθιζάνουν και να μη διαχέονται τα δείγματα από τις θέσεις του πηκτώματος, όπου τοποθετούνται. Η χρωστική έχει κινητικότητα στο πήκτωμα ως μόριο γνωστού μοριακού βάρους, και χρησιμεύει για τον εντοπισμό των θέσεων των άχρωμων μορίων που ηλεκτροφορούνται κάθε στιγμή στο πήκτωμα. Οι πιο κοινές από τις χρωστικές που χρησιμοποιούνται είναι το μπλε της βρωμοφαινόλης και το κυανού ξυλένιου που αναμειγνύονται με όλους τους κοινούς διαλύτες, εκτός του νερού.

Μετά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων DNA, το πήκτωμα βάφεται με διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου προκειμένου να γίνουν ορατές οι ζώνες του DNA μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Το πήκτωμα που χρησιμοποιήθηκε στο πλαίσιο της συγκεκριμένης πρακτικής εργασίας, είναι αποδιατακτικό, και παρασκευάζεται έτσι ώστε να παρουσιάζει κατά μήκος του γραμμική κλίση συγκέντρωσης αποδιατακτικών παραγόντων, αυξανόμενης από πάνω προς τα κάτω στο πήκτωμα.

2.3.5.2. Εξοπλισμός για την παρασκευή, ηλεκτροφόρηση και παρατήρηση του πηκτώματος

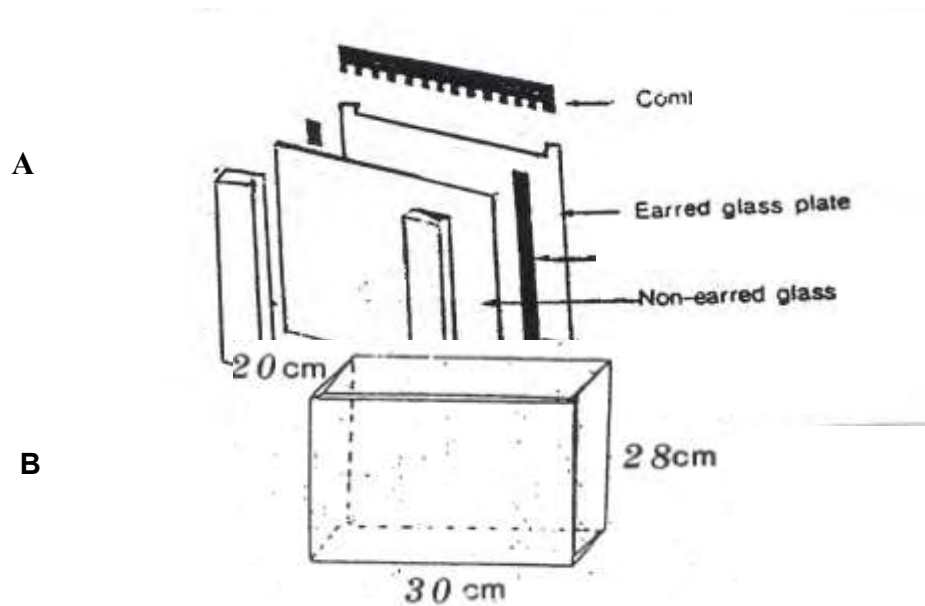
- 2 τζάμια: Ένα διαστάσεων 19,5 cm x 18 cm, πάχους 4 mm και ένα με προεξοχές διαστάσεων 19,5 cm x 18 cm πάχους 4 mm (οι προεξοχές έχουν διαστάσεις 2 cm x 2 cm).
- Spacers πάχους 0,8 cm.
- Χτένα πάχους 0,8 cm με δόντια πλάτους 0,5 cm.
- Συσκευή για την παρασκευή πηκτώματος με κλίση συγκέντρωσης αποδιατακτικού παράγοντα με χωρητικότητα 25 ml. Πρόκειται για δύο γυάλινα ομόκεντρα κυλινδρικά δοχεία που επικοινωνούν μεταξύ τους με λεπτό σωλήνα (διαμέτρου 0,4cm) ενώ ταυτόχρονα διαθέτουν και έναν επιπλέον σωλήνα (διαμέτρου 0,4cm) για την έξοδο του διαλύματος, μετά την ανάδευση που υπόκειται.
- Μαγνητικός αναδευτήρας – Techne MS1.
- Μαγνήτης μήκους 1 cm.
- Δεξαμενή ηλεκτροφόρησης: Χρησιμοποιήθηκε δεξαμενή διαστάσεων 20x28x30cm χωρητικότητας 7 lt διαλύματος ηλεκτροφόρησης δυο πηκτωμάτων ταυτόχρονα (Εικ. 16).



Εικόνα 16. Ζεύγος τζαμιών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή πηκτώματος

- Συσκευή ηλεκτροφόρησης από plexiglas διαστάσεων: 22 cm x 20 cm x 8

cm. Στο πάνω τμήμα της συσκευής βρίσκεται η κάθοδος και στο κάτω η άνοδος (Εικ. 17Α, Β).



Εικόνα 17Α. Εξοπλισμός για την παρασκευή πηκτώματος. Β. Σχηματική απεικόνιση της δεξαμενής ηλεκτροφόρησης

2.3.5.3. Αντιδραστήρια

- Ακρυλαμίδη ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) (Invitrogen)
- Ν', Ν' μεθυλέν δις ακρυλαμίδη (Invitrogen)
- Ουρία (NH_2CONH_2) (Applichem)
- Φορμαμίδιο (HCONH_2) (Invitrogen)
- TEMED (Applichem)
- Υπερθεϊκό αμμώνιο (APS) (Gimco BRL)
- Tris HCl (Invitrogen)
- EDTA Na_2 (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ) (Applichem)
- Οξικό NA (Applichem)
- Οξικό οξύ (CH_3COOH) (Applichem)
- Mixed Bed Resin AG 501-X8 (BIORAD)
- Ficoll-400 (Applichem)
- Bromophenol Blue (BB) (BDH Electran)
- Xylene cyanol (XC, FF), $\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)_2$ (BDH Electran)
- Διάλυμα Διμεθυλοχλωροσιλάνη (BDH GPR)

- Βρωμιούχο αιθίδιο (Aplichem)
- Απόλυτη Αιθανόλη (CH₃CH₂OH) (Panreac)

2.3.5.4. Διαλύματα

1. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE (Tris EDTA Οξικό οξύ), pH=8,0
Παρασκευάζεται σε συγκέντρωση 20X. Για την παρασκευή 1lt διαλύματος απαιτούνται:

-Tris (0,8 M)	:	96.912 g
-Na ₂ EDTA (0,02 M)	:	7.445 g
-Na ₂ acetate (0,4 M)	:	54.432 g

Γίνεται ρύθμιση του pH με πυκνό οξικό οξύ μέχρι pH=8,0 (36 ml) συμπληρώνεται ο όγκος με H₂O μέχρι 1lt και ακολουθεί διήθηση

2. Διάλυμα ακρυλαμίδης 40% κ.β. (διάλυμα stock).

Για παρασκευή 500 ml διαλύματος απαιτούνται:

- Ακρυλαμίδη : 200 g
- N, N' μεθυλέν δις ακρυλαμίδη: 5.35 g
(ακρυλαμίδη : δις ακρυλαμίδη = 37.5 : 1)

Συμπληρώνεται ο όγκος με H₂O μέχρι 500 ml, ακολουθεί διήθηση.

3. 80% αποδιατακτικό διάλυμα (stock διάλυμα)

Για παρασκευή 500 ml απαιτούνται:

- Ακρυλαμίδη (6%) : 75 ml από το 40% stock
- Ουρία (5.6 M) : 170 g
- Φορμαμίδιο (32%) : 160 ml (απιονισμός με ρητίνη : 2 g ρητίνης/100 ml διαλύματος- ανάδευση 30 min-φιλτράρισμα)
- TAE (IX) : 25 ml από το stock 20X

Συμπληρώνεται ο όγκος με H₂O μέχρι 500ml, ακολουθεί διήθηση.

4. 0% αποδιατακτικό διάλυμα (stock διάλυμα)

Για παρασκευή 500 ml απαιτούνται:

- Ακρυλαμίδη (6%): 75 ml από το 40% stock
- TAE (IX): 25 ml από το stock 20X
- Συμπληρώνεται ο όγκος με H₂O μέχρι 500 ml, ακολουθεί διήθηση

5. Διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου (APS) 10%

Για 10 ml διαλύματος απαιτείται διάλυση 1 g APS σε 10 ml H₂O

6. TEMED

7. Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 0,5 μg/ml

8. Διάλυμα χρωστικής (loading buffer)

- 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης
- 0.25% κυανού του ξυλένιου
- 15% Ficoll σε ddH₂O

2.3.5.5. Παρασκευή πηκτώματος - Πολυμερισμός

Όπως έχει ήδη αναφερθεί χρησιμοποιούνται αποδιατακτικά πηκτώματα ακρυλαμίδης που περιέχουν διαβάθμιση συγκέντρωσης ουρίας και φορμαμίδιου, αυξανόμενης από την κορυφή προς τη βάση. Στα συγκεκριμένα πηκτώματα μπορεί να ηλεκτροφορηθεί μεγάλος αριθμός δειγμάτων.

Για την παρασκευή του πηκτώματος ακολουθούνται τα εξής βήματα:

- Προσεκτική πλύση με σαπούνι, νερό και αλκοόλη των δύο τζαμιών που χρησιμοποιούνται και προσεκτικό στέγνωμα τους ώστε να είναι εύκολη η αποκόλληση του πηκτώματος και η παρατήρηση του.
- Ένωση των δύο τζαμιών μεταξύ τους με τοποθέτηση των spacers μεταξύ τους και στεγανοποίηση τους με κάλυψη τους με ταινία στις τρεις πλευρές τους. Τοποθέτηση του ζεύγους των τζαμιών σε κατακόρυφη θέση.
- Προετοιμασία 5 ml διαλύματος 80% αποδιατακτικού και προσθήκη 80 μl APS 10% και 12 μl TEMED. Το διάλυμα αναδεύεται και χύνεται με πιπέτα Pasteur ανάμεσα στα δυο τζάμια. Σχηματίζεται έτσι μια ζώνη πηκτώματος ύψους 2 cm περίπου στο τέλος των δυο τζαμιών που χρησιμεύει ως επιπλέον προστασία για αποφυγή τυχόν διαρροών του διαλύματος ακρυλαμίδης.
- Χρόνος πολυμερισμού της ζώνης πηκτώματος περίπου 30 λεπτά.
- Προσεκτική τοποθέτηση της χτένας ανάμεσα στα δυο τζάμια, σε βάθος περίπου 1,5 cm, κατά τέτοιο τρόπο ώστε να μπορεί να διαφύγει ο αέρας.

- Τοποθέτηση του σωλήνα εξόδου της συσκευής παρασκευής του πηκτώματος ανάμεσα στα δύο τζάμια (η συσκευή πρέπει να είναι απόλυτα καθαρή και στεγνή). Παρεμπόδιση της ροής στο σωλήνα εξόδου και στο συνδετικό σωλήνα μεταξύ των δύο τμημάτων της συσκευής με την παρεμβολή κατάλληλων σφιγκτήρων.
- Κατασκευή των δύο διαλυμάτων αποδιατακτικών παραγόντων που αντιστοιχούν στις ακραίες τιμές της επιθυμητής κλίσης συγκέντρωσης αποδιατακτικού. Κάθε διάλυμα αποδιατακτικού παρασκευάζεται μετά από ανάμειξη των δύο stock διαλυμάτων αποδιατακτικού (80% και 0%) σε κατάλληλες αναλογίες. Προετοιμασία 16 ml από το κάθε διάλυμα και προσθήκη στο καθένα 120 μl APS 10% (αντιστοιχεί περίπου σε 1/100 του όγκου του διαλύματος) και 14 μl TEMED (αντιστοιχεί περίπου σε 1/2000 του όγκου του διαλύματος).
- Μετά την παρασκευή των διαλυμάτων των αποδιατακτικών παραγόντων ακολουθεί γρήγορη ανάδευση τους και μεταφορά τους στη συσκευή παραγωγής πηκτώματος με κλίση αποδιατακτικού παράγοντα. Το διάλυμα με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αποδιατακτικής ουσίας τοποθετείται στον εσωτερικό κύλινδρο, ενώ στο εξωτερικό δοχείο τοποθετείται το διάλυμα μικρότερης συγκέντρωσης.
- Απελευθέρωση της ροής στο σωλήνα της εξόδου, μέχρι να γεμίσει με διάλυμα, και στη συνέχεια κλείνεται ξανά. Κατόπιν, ελευθερώνεται η ροή των δύο κυλινδρικών δοχείων, ενώ ταυτόχρονα αρχίζει η ανάδευση του διαλύματος στον εσωτερικό κύλινδρο, με τη βοήθεια μικρού μαγνήτη.
- Μόλις παρατηρηθεί ανάμειξη μεταξύ των δύο διαλυμάτων διαφορετικής συγκέντρωσης, ελευθερώνεται η ροή στο σωλήνα εξόδου και διοχετεύεται ανάμεσα στα δύο τζάμια. Προκύπτει τελικά το διάλυμα ακρυλαμίδης με διαβάθμιση συγκέντρωσης αποδιατακτικών παραγόντων. Η διαδικασία διαρκεί περίπου 5-10 λεπτά.
- Το πήκτωμα αφήνεται να πολυμεριστεί περίπου 1 ώρα και μπορεί να ηλεκτροφορηθεί 1 ώρα μετά την παρασκευή του ή να φυλαχθεί στους 4°C για 1 ή 2 μέρες.

2.3.5.6. Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος

Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού, ακολουθεί προσεκτική αφαίρεση της χτένας και αποκάλυψη των θέσεων φόρτωσης των δειγμάτων. Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης τοποθετείται στη δεξαμενή η οποία περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE IX.

Οι θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων καθαρίζονται των δειγμάτων με ρυθμιστικό διάλυμα (με τη βοήθεια σύριγγας), ώστε να απομακρυνθεί η ουρία και η μη πολυμερισμένη ακρυλαμίδα.

Τα δείγματα που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν, είναι προϊόντα PCR που παρασκευάζονται, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Σε κάθε δείγμα, προστίθενται 2-5 μl πυκνής χρωστικής (1μl χρωστικής/10 μl διαλύματος DNA).

Σε κάθε ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται 15-20 μl προϊόντος PCR. Η τοποθέτηση κάθε δείγματος στην αντίστοιχη θέση στην κορυφή του πηκτώματος, γίνεται με ειδικά tips (duck-bill tips).

Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί 16 ώρες, και πραγματοποιείται σε τάση 50 Volts (αντιστοιχεί σε ένταση ρεύματος περίπου 30 mA). Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ηλεκτροφόρηση σε 160 Volts (διάρκεια 5 ώρες)

2.3.5.7. Ανάλυση της πρωτοταγούς αλληλουχίας βάσεων (SEQUENCING)

Αναλύσαμε την αλληλουχία των περιοχών που ενισχύθηκαν επιλεκτικά με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι το εξής:

Το προϊόν PCR καθαρίστηκε με το Qiaquick PCR purification kit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και ηλεκτροφορήθηκε παρουσία μάρτυρα γνωστού μεγέθους και μοριακού βάρους (100bp, New England Biolabs) σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. Με βάση το μοριακό βάρος (ng) κάθε ζώνης του μάρτυρα εκτιμήθηκε η συγκέντρωση των καθαρισμένων προϊόντων PCR. Στη συνέχεια, ποσότητα του καθαρισμένου προϊόντος PCR ενισχύθηκε επιλεκτικά με κατάλληλα σημασμένους εκκινητές για να αναλυθεί στη συνέχεια.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	Καθαρισμένο PCR	Sequencing mix (ABI BigDye Terminators)	Εκκινητές 2F/2R	H ₂ O
ΟΓΚΟΣ/ ΔΕΙΓΜΑ	x [*]	4 μl	1 μl	y [*]

• x^{*} → η ποσότητα (ng) που πρέπει να βάλω από το συγκεκριμένο προϊόν PCR στην αντίδραση ανάλογα με πυκνότητα του δείγματος για να διαβάσει τη συγκεκριμένη αλληλουχία, σύμφωνα με τον κανόνα ng=0,1 x bp που προτείνεται.

• y^{*} → η ποσότητα νερού έτσι ώστε να έχουμε να τελικό όγκο αντίδρασης 10μl

Οι συνθήκες της PCR είναι:

95 °C → 20 δευτερόλεπτα , στάδιο αποδιάταξης	} x 25 κύκλοι
50 °C → 15 δευτερόλεπτα, στάδιο υβριδοποίησης	
60 °C → 60 δευτερόλεπτα, στάδιο επιμήκυνσης	

Ακολουθεί Καθαρισμός των αντιδράσεων με Sephadex ως εξής:

Παρασκευή διαλύματος Sephadex :

- Διαλύω 0,5gr σε 8ml dd H₂O
- Αναδεύω 30 λεπτά σε πάγο.

Καθαρισμός με Sephadex:

- Μεταφέρω 600-700 μl υγρού Sephadex σε στήλη.
- Φυγοκεντρώ για 3 λεπτά στις 3470rpm στους 8 °C.
- Πετάω το νερό που έχει περάσει από τη στήλη και η στήλη είναι έτοιμη.
- Φορτώνω προσεκτικά 10μl του PCR στη στήλη και αφήνω για 15 λεπτά στον πάγο και σε σκοτάδι.
- Φυγοκεντρώ για 3 λεπτά στις 3470rpm στους 8 °C.

Μετά τον καθαρισμό φορτώνω το προϊόν που εκλούεται από τη στήλη σε πλάκα 96 θέσεων και το τοποθετώ σε αναλυτή Megabase 1000 Amersham.

2.4. Μελέτη σε μοριακό επίπεδο της δβ-Μεσογειακής Αναιμίας (δβ-MA) της μεθόδου

Η φαινοτυπική εικόνα των δειγμάτων της δβ-MA μελετήθηκε σε μοριακό επίπεδο με την τεχνική PCR (GAP-PCR Craig et al 1994). Βασίζεται στον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA διαφορετικών σε μέγεθος (φυσιολογικό ή μη χρωμόσωμα).

Η επεξεργασία γίνεται με τρεις εκκινητές, ανά ζεύγη (π.χ. A, B και A, C). Για το φυσιολογικό χρωμόσωμα από τη χρήση των εκκινητών A και B προκύπτει προϊόν PCR, ενώ από τη χρήση των εκκινητών A και C δεν προκύπτει προϊόν PCR, λόγω της μεταξύ τους απόστασης.

Για το χρωμόσωμα με έλλειψη για τη δβ-MA, με τους εκκινητές A και C παίρνουμε προϊόν PCR, ενώ με τους εκκινητές A και B όχι, επειδή λόγω της έλλειψης δε λειτουργεί η συμπληρωματική αλληλουχία του εκκινητή B.

2.5. Πρωτόκολλο εκτέλεσης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για δβ-Μεσογειακή Αναιμία (δβ-MA)

2.5.1. δβ-MA Σικελικού τύπου

1. Σε αποστειρωμένο σωληνάριο erpendorf τοποθετούμε 6 μl διαλύματος DNA (1,5-3 μgr γενωμικού DNA)
2. Παρασκευάζουμε στη συνέχεια διάλυμα (mix) προσθέτοντας διαδοχικά:

- 10 X buffer τελικής συγκέντρωσης 1 X	= 5,0 μl
- διάλυμα Mg Cl ₂ τελικής συγκέντρωσης 2,5 mM	= 2,5 μl
- διάλυμα W-1 τελικής συγκέντρωσης 0,05%	= 2,5 μl
- 12,5 pmoles εκκινητή δβ-sic	= 3,0 μl
- 2 mM d NTP's	= 0,5 μl
- 1 u Taq πολυμεράση	= 0,5 μl
Συνολικός όγκος διαλύματος (mix)	=14,0 μl

Τα υλικά κρατούνται σε πάγο, σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας.

3. Το παραπάνω διάλυμα προστίθεται στο erpendorf μαζί με τα 6 μl διαλύματος DNA και ο όγκος συμπληρώνεται με dd H₂O ώστε να έχουμε τελικό όγκο 50 μl (προσθέτουμε δηλαδή 30 μl dd H₂O).
4. Σε αρνητικό μάρτυρα, που δεν περιέχει DNA, συμπληρώνουμε αντίστοιχα με 36 μl dd H₂O σε erpendorf με 14 μl διαλύματος (mix).

2.5.2. δβ-MA Τουρκικού τύπου A ή B (οι αναλογίες είναι ίδιες)

1. Σε αποστειρωμένο σωληνάριο erpendorf τοποθετούμε 4 μl διαλύματος DNA (1-2 μgr γενωμικού DNA)
2. Παρασκευάζουμε στη συνέχεια διάλυμα (mix) για δβ-MA Turk ή δβ-MA Turk B προσθέτοντας διαδοχικά:

- 10 X buffer τελικής συγκέντρωσης 1 X	= 5,0 μl
- διάλυμα Mg Cl ₂ τελικής συγκέντρωσης 2,5 mM	= 2,5 μl
- διάλυμα W-1 τελικής συγκέντρωσης 0,05%	= 2,5 μl
- 12,5 pmoles εκκινητών δβ-Turk A ή δβ-Turk B	= 1,0 μl
- 2 mM d NTP's	= 0,5 μl
- 1 u Taq πολυμεράση	= 0,5 μl
Συνολικός όγκος διαλύματος (mix)	=12,0 μl

Τα υλικά κρατούνται σε πάγο, σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας.

3. Το παραπάνω διάλυμα προστίθεται στο erpendorf μαζί με τα 4 μl διαλύματος DNA και ο όγκος συμπληρώνεται με dd H₂O ώστε να έχουμε τελικό όγκο 50 μl (προσθέτουμε δηλαδή 34 μl dd H₂O).
4. Σε αρνητικό μάρτυρα συμπληρώνουμε αντίστοιχα με 38 μl dd H₂O σε erpendorf με 14 μl διαλύματος (mix).

Τα παραπάνω δείγματα τοποθετούνται σε θερμοκυκλοποιητές, για πραγματοποίηση της αντίδρασης πολυμερισμού in vitro. Χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα: MJ Research PTC-200, Peltier Thermal cycler.

Τα προγράμματα που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής:

δβ-MA Σικελικού τύπου

- STEP-1: 94°C για 5 min.
- STEP-2: 94°C για 1 min (αποδιάταξη).
- STEP-3: 60°C για 1 min (πρόσδεση εκκινητή).
- STEP-4: 72°C για 1,5 min (επιμήκυνση).
- STEP-5: Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 2,3,4 για 30 φορές
- STEP-6: 72°C για 10 min.
- STEP-7: 4°C για 24 h.

δβ-MA Τουρκικού τύπου A

- STEP-1: 94°C για 5 min.
- STEP-2: 94°C για 1 min (αποδιάταξη).
- STEP-3: 65°C για 1 min (πρόσδεση εκκινητή).
- STEP-4: 72°C για 1 min (επιμήκυνση).
- STEP-5: Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 2,3,4 για 30 φορές
- STEP-6: 72°C για 10 min.
- STEP-7: 4°C για 24 h.

δβ-MA Τουρκικού τύπου B

- STEP-1: 94°C για 5 min.
- STEP-2: 94°C για 1 min (αποδιάταξη).
- STEP-3: 57°C για 1 min (πρόσδεση εκκινητή).
- STEP-4: 72°C για 1 min (επιμήκυνση).
- STEP-5: Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 2,3,4 για 30 φορές
- STEP-6: 72°C για 10 min.
- STEP-7: 4°C για 24 h.

Στο τέλος της εκλεκτικής ενίσχυσης, τα προϊόντα ελέγχονται σε πήκτωμα αγαρόζης 3%, που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 0,5 μg/ml. Η αξιολόγηση του μεγέθους των ζωνών, της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR, γίνεται με σύγκριση με το DNA μάρτυρα που ηλεκτροφορείται παράλληλα.

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των παραπάνω εκκινητών είναι:

δβ-Σικελικού Τύπου:

5'-TTgggTTTCTgATAggCACTg-3'
5'-gTgTCACCCATTAATgCCTTgTAC-3'
5'-TAgATCCCTTTgCCATTATg-3'

δβ-Τουρκικού Τύπου:

5'-gACACACATgACAgAACAgCCAAT-3'
5'-gAAgAgCAggTAAAAGAACCC-3'
5'-TTCCACTATCTTACTTACACAT-3'
5'-CAAAGCAgCAATACTAAACAggAg-3'
5'-TgCTgAggATTgTTTAggTC-3'
5'-gAATAgCAgTggTgAgAgAg-3'

2.6. Μελέτη σε μοριακό επίπεδο της ΗΡΦΗ - Εκλεκτικός πολλαπλασιασμός των αλληλουχιών των Αγ- και Γγ- γονιδίων

Οι υποκινητές των δύο γονιδίων της σφαιρίνης μελετήθηκαν προκειμένου να ανιχνευτούν αλλαγές στην αλληλουχία τους, όπως μεταλλαγές που προκαλούν ΗΡΦΗ φαινότυπο ή πολυμορφισμούς που δίνουν διαφορετικούς απλότυπους. Τα δύο γονίδια παρουσιάζουν εκτεταμένη ομολογία στην αλληλουχία τους.

Η μοριακή μελέτη των γονιδίων αυτών πραγματοποιήθηκε σε όλα τα δείγματα, δηλαδή: Στην δβ-ΜΑ, τη β-ΜΑ με αυξημένα επίπεδα ΗbF καθώς και στην ΗΡΦΗ.

Ο προσδιορισμός της μοριακής βλάβης διερευνήθηκε ενισχύοντας με PCR την περιοχή του υποκινητή των Αγ- και Γγ- γονιδίων.

Αρχικά με τους πρώτους εκκινητές πολλαπλασιάσαμε ένα μεγάλο τμήμα τους και στη συνέχεια 1 μl από το προϊόν αυτό της PCR πολλαπλασιάστηκε για τη δεύτερη αντίδραση PCR με δύο άλλους εκκινητές αντίστοιχα.

- α. Το Αγ- γονίδιο στην 5' περιοχή, αρχικά ενισχύεται με τους εκκινητές: γ₄-GCγ₄ 681bp και στη συνέχεια με τους εκκινητές: γ₄-γ₆-GCγ₄ (327 bp).
- β. Το Γγ- γονίδιο, στην 5' περιοχή, ενισχύεται με τους εκκινητές: γ₁-GCγ₄ (678 bp) και στη συνέχεια με τους εκκινητές: γ₁-γ₆-GCγ₄ (327 bp).
- γ. Η περιοχή του 3' άκρου του Αγ- γονιδίου ενισχύεται με τους εκκινητές: γ₇/α-γ₇ και στη συνέχεια το PCR προϊόν επωάζεται με το ένζυμο Ddel.

Στη συνέχεια έγινε ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του προϊόντος PCR (Sequencing).

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των παραπάνω εκκινητών είναι:

Gamma 4: 5'- ACTgTggTCTTTATgAAAATTgT-3'

Gamma 1: 5'- ACTgTTgCTTTATAggAT-3'

GC gamma 4: 5'- gCgggCggggCgggggCACgggggggCgCgggCggggCCTCAgACgTTCCAgAAgCgA-3'

Gamma 6: 5'- gACTgAATCggAACAAggCAA

Το πρωτόκολλο των αντιδράσεων PCR για τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό των Αγ- και Γγ- γονιδίων είναι:

A. Για το Αγ- γονίδιο στην 5' περιοχή (681 bp)

1. Σε αποστειρωμένο σωληνάριο erpendorf τοποθετούμε 5 μl διαλύματος DNA
2. Παρασκευάζουμε στη συνέχεια διάλυμα (mix) προσθέτοντας διαδοχικά:
 - 10 X buffer = 10,0 μl
 - Mg Cl₂ = 4,0 μl
 - W-1 % = 5,0 μl

- γ_4	= 2,0 μ l
- GC γ_4	= 2,0 μ l
- dNTP'S	= 2,0 μ l
- Ταq πολυμεράση	= 0,5 μ l
Συνολικός όγκος διαλύματος (mix)	= 25,5 μ l

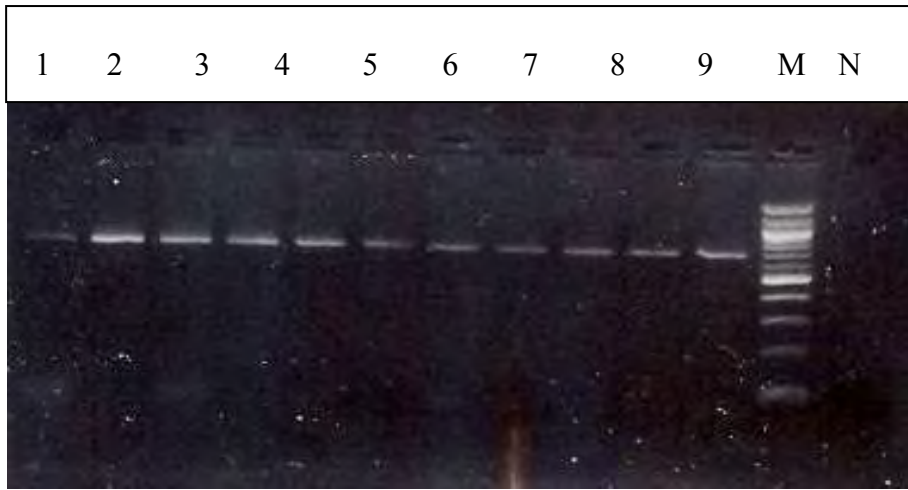
Σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας, τα υλικά κρατούνται σε πάγο.

3. Το παραπάνω διάλυμα προστίθεται στο erpendorf μαζί με τα 5 μ l διαλύματος DNA και ο όγκος συμπληρώνεται με dd H₂O ώστε να έχουμε τελικό όγκο 100 μ l (προσθέτουμε δηλαδή 69,5 μ l dd H₂O).
4. Σε αρνητικό (Negative) μάρτυρα, χωρίς DNA, συμπληρώνουμε αντίστοιχα με 74,5 μ l dd H₂O σε erpendorf με 25,5 μ l διαλύματος (mix).
5. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 1 min.

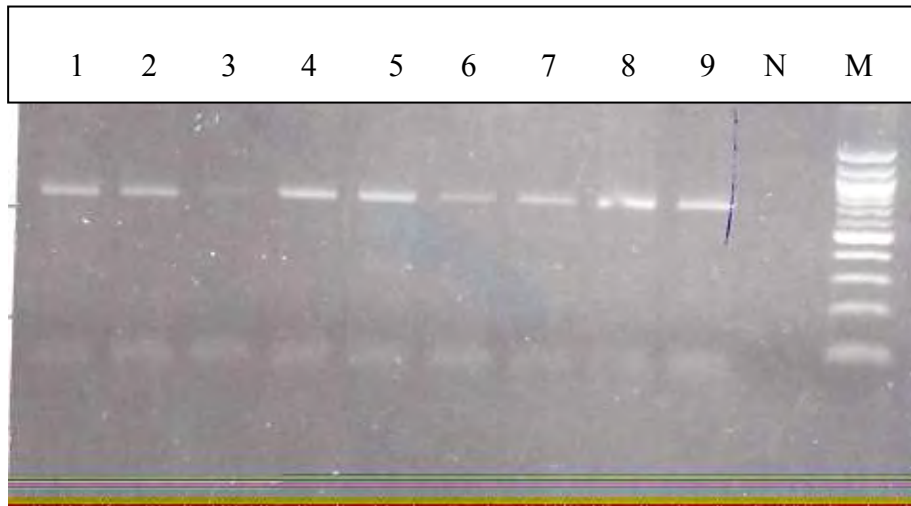
Τα δείγματα τοποθετούνται σε θερμοκυκλοποιητή για την αντίδραση PCR και το πρόγραμμα που ακολουθούμε για την αντίδραση είναι:

STEP-1:	94°C για 5 min.
STEP-2:	94°C για 1 min (αποδιάταξη).
STEP-3:	45°C για 0,5 min (πρόσδεση εκκινήτη).
STEP-4:	60°C για 2 min (επιμήκυνση).
STEP-5:	Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 2,3,4 για 35 φορές
STEP-6:	72°C για 10 min.
STEP-7:	στους 4°C για h.

Το προϊόν ελέγχεται σε πήκτωμα αγαρόζης 2% παρουσία μάρτυρα γνωστού μεγέθους (Εικ. 18, 19).



Εικόνα 18. Επιλεκτική ενίσχυση τμήματος της 5' περιοχής του Αγ γονιδίου με χρήση εκκινητών γ4-GCγ4 (681 bp) (N: αρνητικός μάρτυρας, M: μάρτυρας γνωστού μεγέθους 100 bp, New England Biolabs)



Εικόνα 19. Επιλεκτική ενίσχυση τμήματος της 5' περιοχής του Αγ γονιδίου με χρήση εκκινητών γ4-GCγ4 (681 bp) (N: αρνητικός μάρτυρας, M: μάρτυρας γνωστού μεγέθους 100 bp, New England Biolabs)

A₁. Για εσωτερικά τμήματα του Αγ- γονιδίου στην 5' περιοχή (327 bp)

1. Σε αποστειρωμένο σωληνάριο errendorf τοποθετούμε 2 μl διαλύματος DNA από το προηγούμενο προϊόν PCR product.
2. Παρασκευάζουμε στη συνέχεια διάλυμα (mix) προσθέτοντας διαδοχικά:

- 10 X buffer	= 10,0 μl
- Mg Cl ₂	= 5,0 μl
- W-1 %	= 5,0 μl
- Υ ₆	= 4,0 μl
- GCΥ ₄	= 4,0 μl
- dNTP'S	= 2,0 μl
- Ταq πολυμεράση	= 0,5 μl
Συνολικός όγκος διαλύματος (mix)	= 30,5 μl

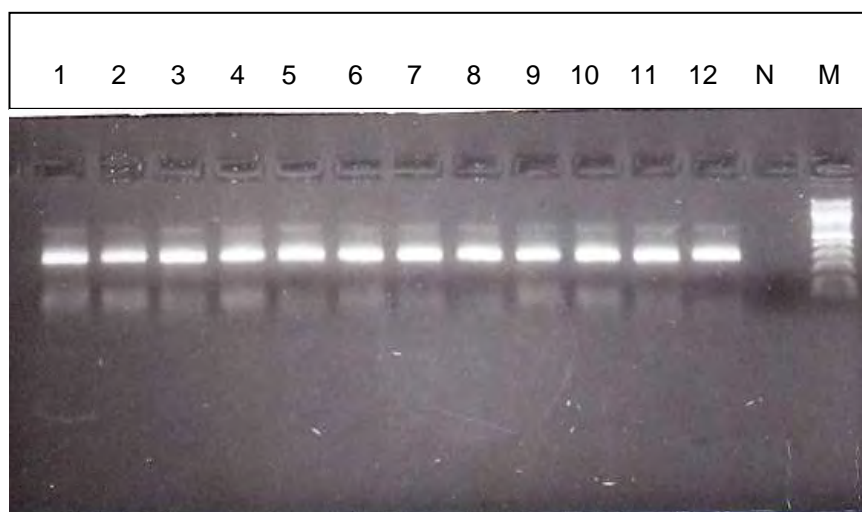
Σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας, τα υλικά κρατούνται σε πάγο.

3. Το παραπάνω διάλυμα προστίθεται στο errendorf μαζί με τα 2 μl διαλύματος DNA και ο όγκος συμπληρώνεται με dd H₂O ώστε να έχουμε τελικό όγκο 100 μl (προσθέτουμε δηλαδή 67,5 μl dd H₂O).
4. Σε αρνητικό μάρτυρα συμπληρώνουμε αντίστοιχα με 69,5 μl dd H₂O σε errendorf με 30,5 μl διαλύματος (mix).
5. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 1 min.

Τα δείγματα τοποθετούνται σε θερμοκυκλοποιητή για την αντίδραση PCR, και το πρόγραμμα που ακολουθούμε για την αντίδραση είναι:

- | | |
|---------|--|
| STEP-1: | 94°C για 5 min. |
| STEP-2: | 94°C για 1 min (αποδιάταξη). |
| STEP-3: | 60°C για 0,5 min (πρόσδεση εκκινητή). |
| STEP-4: | 72°C για 2 min (επιμήκυνση). |
| STEP-5: | Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 2,3,4 για 26 φορές |
| STEP-6: | 72°C για 10 min. |
| STEP-7: | στους 4°C για 24 h. |

Το προϊόν ελέγχεται σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και μάρτυρα γνωστού μεγέθους (100bp, New England Biolabs) (Εικ. 20).



Εικόνα 20. Επιλεκτική ενίσχυση εσωτερικού τμήματος της 5' περιοχής του Gγ γονιδίου με χρήση εκκινητών γ4-γ6-GCγ4 (327 bp) (N: αρνητικός μάρτυρας, M: μάρτυρας γνωστού μεγέθους 100 bp, New England Biolabs)

B. Για το Gγ- γονίδιο στην 5' περιοχή (678 bp)

1. Σε αποστειρωμένο σωληνάριο errendorf τοποθετούμε 5 μl διαλύματος DNA
2. Παρασκευάζουμε στη συνέχεια διάλυμα (mix) προσθέτοντας διαδοχικά:

- 10 X buffer	= 10,0 μl
- Mg Cl ₂	= 4,0 μl
- W-1 %	= 5,0 μl
- γ ₁	= 6,0 μl
- GCγ ₄	= 2,0 μl
- dNTP'S	= 2,0 μl
- Taq πολυμεράση	= 0,5 μl
Συνολικός όγκος διαλύματος (mix)	= 29,5 μl

Σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας, τα υλικά κρατούνται σε πάγο.

3. Το παραπάνω διάλυμα προστίθεται στο errendorf μαζί με τα 5 μl

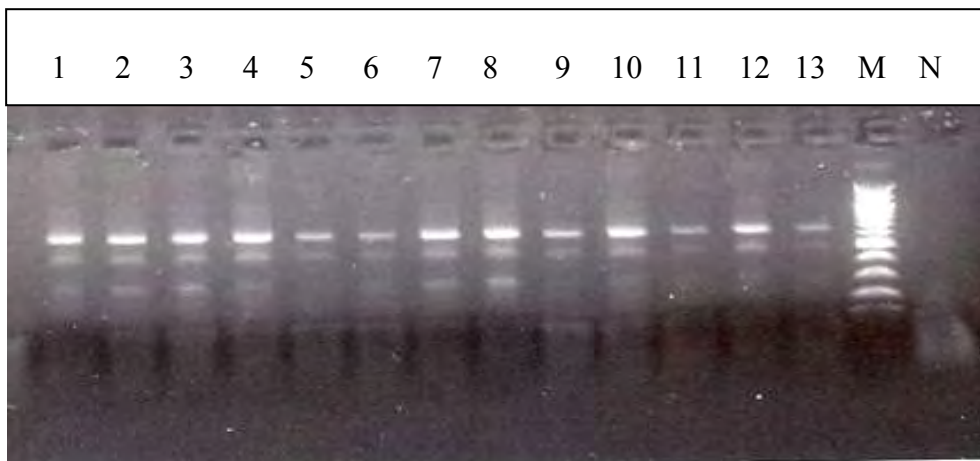
διαλύματος DNA και ο όγκος συμπληρώνεται με dd H₂O ώστε να έχουμε τελικό όγκο 100 μl (προσθέτουμε δηλαδή 65,5 μl dd H₂O).

4. Σε αρνητικό μάρτυρα, συμπληρώνουμε αντίστοιχα με 70,5 μl dd H₂O σε erpendorf με 29,5 μl διαλύματος (mix).
5. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 1 min.

Τα δείγματα τοποθετούνται σε θερμοκυκλοποιητή για την αντίδραση PCR, και το πρόγραμμα που ακολουθούμε για την αντίδραση είναι:

- STEP-1: 94°C για 5 min.
STEP-2: 94°C για 1 min (αποδιάταξη).
STEP-3: 45°C για 0,5 min (πρόσδεση εκκινήτη).
STEP-4: 60°C για 2 min (επιμήκυνση).
STEP-5: Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 2,3,4 για 35 φορές
STEP-6: 72°C για 10 min.
STEP-7: στους 4°C για 24 h.

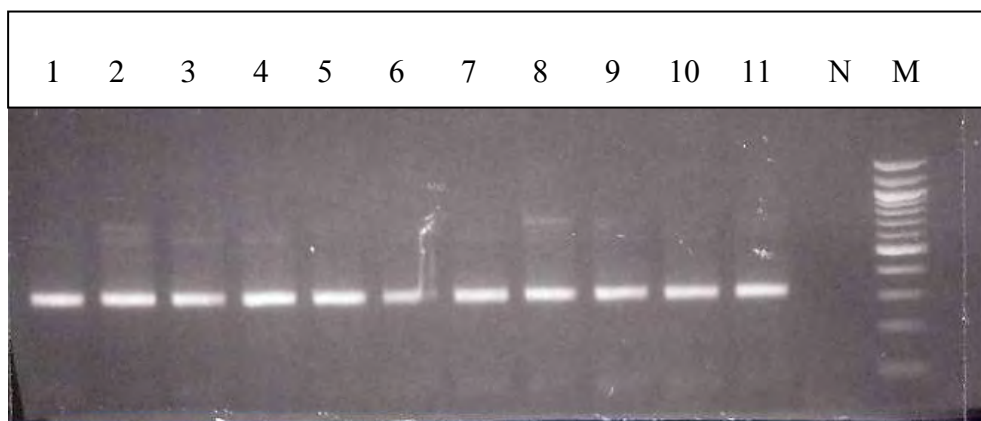
Το προϊόν ελέγχεται σε πήκτωμα αγαρόζης 2% παρουσία μάρτυρα γνωστού μεγέθους (Εικ. 21).



Εικόνα 21. Επιλεκτική ενίσχυση τμήματος της 5' περιοχής του Gγ γονιδίου με χρήση εκκινήτων γ1-GCγ4 (678 bp) (N: αρνητικός μάρτυρας, M: μάρτυρας γνωστού μεγέθους 100 bp, New England Biolabs).

B₁. Για τα εσωτερικά τμήματα του Gγ- γονιδίου στην 5' περιοχή (327 bp)

Ακολουθούμε πανομοιότυπη πορεία όπως και στα εσωτερικά τμήματα του Αγ- γονιδίου στην 5' περιοχή (Εικ. 22).



Εικόνα 22. Επιλεκτική ενίσχυση εσωτερικού τμήματος της 5' περιοχής του Gγ γονιδίου με χρήση εκκινητών γ1-γ6-GCγ4 (327 bp) (N: αρνητικός μάρτυρας, M: μάρτυρας γνωστού μεγέθους 100 bp, New England Biolabs).

Γ. Για το Αγ- γονίδιο στην 3' περιοχή (681 bp)

1. Σε αποστειρωμένο σωληνάριο errendorf τοποθετούμε 5 μl διαλύματος DNA
2. Παρασκευάζουμε στη συνέχεια διάλυμα (mix) προσθέτοντας διαδοχικά:

- 10 X buffer	= 5,0 μl
- Mg Cl ₂	= 2,5 μl
- W-1 %	= 2,5 μl
- γ ₇	= 2,0 μl
- αγ ₇	= 2,0 μl
- dNTP'S	= 1,5 μl
- Taq πολυμεράση	= 0,5 μl
Συνολικός όγκος διαλύματος (mix)	=16,0 μl

Σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας, τα υλικά κρατούνται σε πάγο.

3. Το παραπάνω διάλυμα προστίθεται στο erpendorf μαζί με τα 5 μl διαλύματος DNA και ο όγκος συμπληρώνεται με dd H₂O ώστε να έχουμε τελικό όγκο 50 μl (προσθέτουμε δηλαδή 29 μl dd H₂O).
4. Σε αρνητικό (Negative) μάρτυρα, χωρίς DNA, συμπληρώνουμε αντίστοιχα με 34 μl dd H₂O σε erpendorf με 16 μl διαλύματος (mix).
5. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρωση για 1 min.

Τα δείγματα τοποθετούνται σε θερμοκυκλοποιητή για την αντίδραση PCR, και το πρόγραμμα που ακολουθούμε για την αντίδραση είναι:

- STEP-1: 94°C για 5 min.
- STEP-2: 94°C για 1 min (αποδιάταξη).
- STEP-3: 57°C για 1 min (πρόσδεση εκκινήτη).
- STEP-4: 72°C για 1 min (επιμήκυνση).
- STEP-5: Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 2, 3, 4 για 35 φορές
- STEP-6: 72°C για 10 min
- STEP-7: 4°C για 24 h.

Το προϊόν ελέγχεται σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και μάρτυρα γνωστού μεγέθους (Εικ. 23).

Ακολουθεί πέψη του ανωτέρω προϊόντος PCR product με ένζυμο DdeI με την ακόλουθη διαδικασία (Εικ. 24, 25):

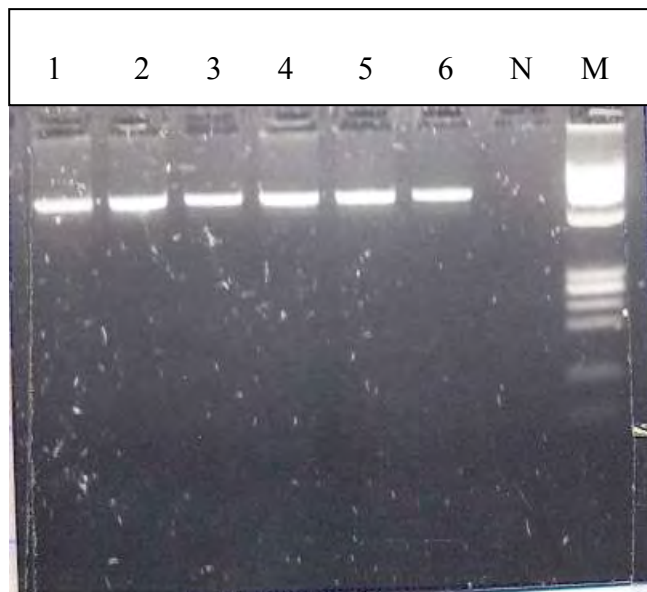
1. Σε αποστειρωμένο σωληνάριο erpendorf τοποθετούμε 30 μl διαλύματος DNA από το προηγούμενο προϊόν PCR product.
2. Παρασκευάζουμε στη συνέχεια διάλυμα (mix) προσθέτοντας διαδοχικά:

- 10 X buffer	= 6,0 μl
- DdeI	= 3,0 μl
- ddH ₂ O	=21,0 μl
Συνολικός όγκος διαλύματος (mix)	=30,0 μl

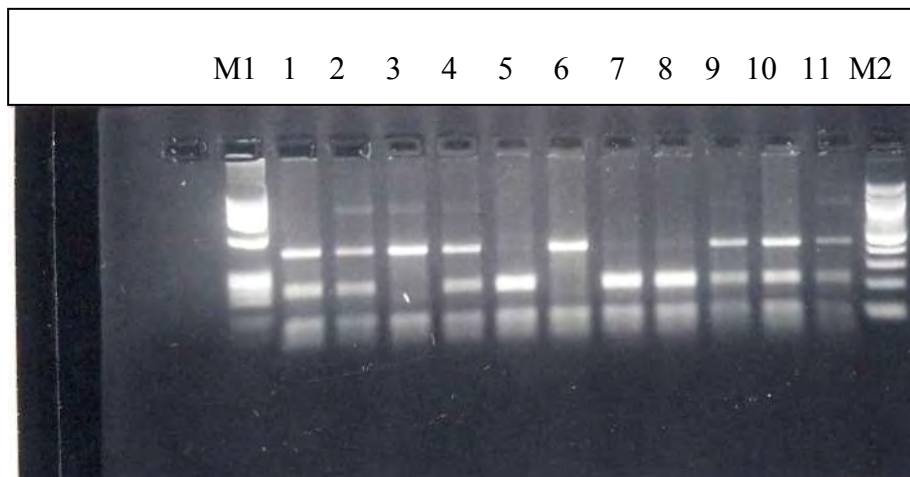
Σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας, τα υλικά κρατούνται σε πάγο.

3. Το παραπάνω διάλυμα προστίθεται στο erpendorf μαζί με τα 30 μl διαλύματος DNA και έτσι έχουμε τελικό όγκο 60 μl.
4. Σε αρνητικό μάρτυρα, χωρίς DNA, τοποθετούμε 30 μl dd H₂O και 30 μl διαλύματος (mix).

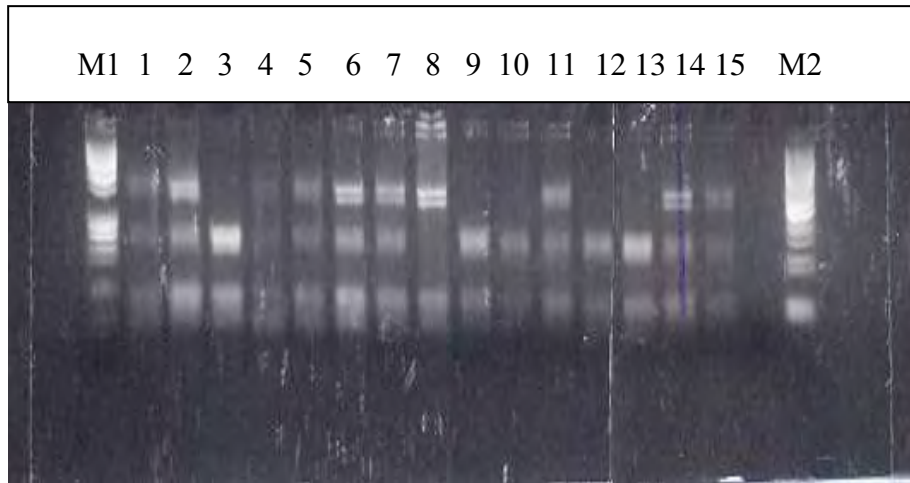
5. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 1 min.
6. Τοποθετούμε τα δείγματα σε υδατόλουτρο στους 37°C για 24 h (overnight)



Εικόνα 23. Επιλεκτική ενίσχυση τμήματος της 3΄ περιοχής του Αγ γονιδίου με χρήση εκκινητών γ7-αγ7 (681 bp) (N: αρνητικός μάρτυρας, M: μάρτυρας γνωστού μεγέθους φΧ/HaeIII, New England Biolabs).



Εικόνα 24. Προϊόν PCR της 3΄ περιοχής του Αγ γονιδίου που έχει υποστεί πέψη με DdeI ένζυμο (Δείγματα 1-10, M1: φΧ/HaeIII, M2: 100 bp, New England Biolabs) Εκτίμηση: 1, 2, 4, 9, 10, 11 (41883 C/A) – 5, 7, 8 (41883 C/C) – 3, 6 (41883 A/A).



Εικόνα 25. Προϊόν PCR της 3΄ περιοχής του Αγ γονιδίου που έχει υποστεί πέψη με DdeI ένζυμο (Δείγματα 1-15, M1: φΧ/HaeIII, M2: 100 bp, New England Biolabs) Εκτίμηση: 1,2,4,5,6,7, 11, 14, 15 (41883C/A) – 8 (41883A/A) - 3,9,10,12,13 (41883C/C)

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Αποτελέσματα σε φαινοτυπικό επίπεδο

3.1.1. Αξιολόγηση των φαινοτυπικών (αιματολογικών-βιοχημικών κ.λπ.) δεδομένων (στα δείγματα της συγκεκριμένης εργασίας).

Η μελέτη περιλαμβάνει 160 δείγματα ενηλίκων επιλεγμένα από το γενικό πληθυσμό των προσερχομένων στη Μ.Π.Μ.Α. (Μονάδα Πρόληψης Μεσογειακής Αναιμίας) του Γενικού Νοσοκομείου Καρδίτσας.

Αυτά ταξινομήθηκαν στις κάτωθι κατηγορίες:

1. Ετεροζυγώτες (φορείς) δβ-Μεσογειακής Αναιμίας
2. Ετεροζυγώτες (φορείς) ΗΡFΗ.
3. Ετεροζυγώτες (φορείς) β-Μεσογειακής Αναιμίας με αυξημένη ΗbF.

Η κατηγοριοποίηση αυτή έγινε (όπως προαναφέρθηκε) με βάση:

- α. Τα αιματολογικά τους δεδομένα, (Hb, Hct, RBC, MCH, MCV, MCHC, RDW)
- β. Τη μορφολογία των ερυθροκυττάρων, αναζήτηση εγκλείστων κ.λπ.
- γ. Τον ποιοτικό έλεγχο των αιμοσφαιρινών (ηλεκτροφόρηση σε ταινίες οξεικής κυτταρίνης και κιτρικό άγαρ).
- δ. Τον ποσοτικό προσδιορισμό της αιμοσφαιρίνης A₂ (%) με χρωματογραφία στηλών (στήλες DEAE) και της ΗbF (%), μέθοδος BETKE.
- ε. Τον ποσοτικό προσδιορισμό των αιμοσφαιρινών A₂, F, S, A, D, (%) με χρωματογραφία στηλών υψηλής πίεσεως (HPLC).

Στον Πίνακα 6, παρατίθενται τα αποτελέσματα των δειγμάτων 160 ατόμων, που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

Πίνακας 6. Δείγματα ετεροζυγωτών, δβ-MA, β-MA με ↑ HbF και HPFH

α/α	ΦΥΛΟ	ΔΙΑΓΝΩΣΗ	Hb	Hct	RBC	MCH	MCV	MCHC	HbA ₂ (%) σε στήλη DEAE	HbF(%) μέθοδος BETKE	HPLC		HbA (%)	DNA - PCR		AY-Y ₄	AY- Y ₆ -Y ₄	GY-Y ₁	GY- Y ₆ - Y ₁	AY-ενισχ. (AY3')		
											Hb A ₂ (%)	Hb F (%)		δβ-MA	β-MA						δβ- Turk	δβ- Sic
1	Αρρεν	HPFH	16.0	47.0	5.270	30.4	89.2	34.0	1.94	15.00												
2	Θήλυ	HPFH	13.1	39.5	4.700	27.9	84.0	33.2	1.29	18.15	2.2	16.9	72.3							41883 C/C		
3	Αρρεν	HPFH	17.7	52.0	5.520	32.1	94.2	34.0	1.50	11.09						-117	-117	-158	-	41883 C/A		
4	Αρρεν	HPFH	15.0	43.3	4.680	32.1	92.5	34.6	1.80	8.35						-117	-117	-158	-	41883 C/A		
5	Αρρεν	HPFH+β-MA	14.6	44.3	6.670	21.9	66.4	33.0	2.64	23.16				-	-	β39				41883 C/C		
6	Θήλυ	HPFH+δ-MA	11.8	35.7	3.990	29.6	89.5	33.1	0.53	17.43						-117	-117	-158	-	41883 C/A		
7	Θήλυ	HPFH	13.4	41.5	4.570	29.3	90.8	32.3	1.41	10.56										41883 C/A		
8	Θήλυ	HPFH	14.9	45.8	5.290	28.2	86.6	32.5	2.31	14.35	2.2	15.8				-117	-117	-158	-	41883 C/A		
9	Αρρεν	HPFH	17.4	51.1	5.910	29.4	86.5	34.1	1.42	15.20						-117	-117	-158	-	41883 C/A		
10	Αρρεν	HPFH+β-MA	11.5	35.9	5.700	20.2	63.0	32.0	2.01	21.00				-	-	β39	-117	-117	NI	NI	41883 C/A	
11	Θήλυ	HPFH	13.9	42.4	4.490	31.0	94.4	32.8	1.89	10.00						-117	-117	-158	-	41883 C/A		
12	Θήλυ	HPFH	13.9	40.9	4.440	31.3	92.1	34.0	2.43	14.56						NI	NI	NI	NI	41883 C/C		
13	Θήλυ	HPFH	13.5	40.7	4.220	32.0	96.4	33.2	1.50	4.48						NI	NI	-158	-	41883 C/A		
14	Αρρεν	HPFH+HbS	14.6	44.2	4.730	30.9	93.4	33.0			2.5	12.5	52.3				-117	-117	-309/ -369	NI	41883 C/A	
15	Αρρεν	β-MA↑F	11.2	35.9	5.150	21.7	69.7	31.2	4.53	3.50						NI	NI	-158	-	41883 A/A		
16	Θήλυ	β-MA↑F	10.7	35.0	5.150	20.8	68.0	30.6	4.94	8.93							IVS1-1		NI	NI	41883 C/C	
17	Θήλυ	β-MA↑F	10.8	35.4	5.230	20.7	67.7	30.5	4.66	9.46	5.9	3.9					FSC-6	-369	-369	-158	-	41883 C/A
18	Αρρεν	β-MA↑F	12.8	40.6	5.760	22.2	70.5	31.5	4.43	6.00							FSC-6	NI	NI	-158	-	41883 C/A
19	Θήλυ	β-MA↑F	11.3	37.2	4.990	22.6	74.5	30.4	5.08	5.00	5.1	6.9	79.7				IVS1- 110	NI	NI	-158	-	41883 C/A
20	Θήλυ	β-MA↑F	10.7	35.7	5.620	19.0	63.5	30.0	4.22	12.52							IVS1- 110	NI	NI	-158	-	41883 C/A
21	Αρρεν	β-MA↑F	12.7	41.1	6.170	20.6	66.6	30.9	4.10	8.00							β39	del4	del4	NI	NI	41883 C/A
22	Θήλυ	β-MA↑F	10.2	33.5	4.950	20.6	67.7	30.4	4.58	16.80	4.5	18.	71.6				IVS1-1			NI	NI	41883 C/C

23	Θήλυ	HPFH	13.5	39.0	4.110	32.8	94.9	34.6	1.83		2.7	2	5.3	84.6			NI	NI	-158/ -158	-158/ -	41883 A/A
24	Θήλυ	δβ-MA	11.7	38.1	5.440	21.5	70.0	30.7	1.98	8.00	2.7	12.	76.5	+	-		NI	NI	NI	NI	41883 C/A
25	Θήλυ	β-MA↑F	9.7	33.6	4.790	20.3	70.1	28.9	4.60	3.70	4.6	4.4	81.8			β39	del4	del4	NI	NI	41883 C/A
26	Θήλυ	β-MA↑F	10.2	33.0	5.270	19.4	62.6	30.9	4.38	7.33	5.3	4.2	82.2			β39	NI	NI	NI	NI	41883 C/C
27	Άρρεν	δβ-MA	12.8	41.9	5.760	22.2	72.7	30.5	2.78	13.04	2.8	10.	77.5	+	-		del4	del4	NI	NI	41883 C/A
28	Άρρεν	β-MA↑F	12.0	40.5	6.130	19.6	66.1	29.6	4.68	1.00	5.2	1.3	82.6			IVS1-1	NI	NI	NI	NI	41883 C/C
29	Άρρεν	δβ-MA	13.4	44.6	6.680	20.1	66.8	30.0	2.11	8.15	3.2	8.4	78.9	-	+		-369	-369	-158/ -158	-158/ -	41883 C/C
30	Θήλυ	δβ-MA	11.9	38.5	5.150	23.1	74.8	30.9	2.24	19.35	2.5	17.	71.2	+	-		del4	del4	NI	NI	41883 C/A

α/α	ΦΥΛΟ	ΔΙΑΓΝΩΣΗ	Hb	Hct	RBC	MCH	MCV	MCHC	HbA ₂ (%) σε στήλη DEAE	HbF(%) μέθοδος BETKE	HPLC		DNA-PCR		Hb A (%)	δβ-MA	β-MA	Aγ-Υ ₄	Aγ- Υ ₆ -Υ ₄	Gγ- Υ ₁	Gγ- Υ ₆ -Υ ₁	Aγ-επισχ (Aγ3')
											Hb A ₂ (%)	Hb F (%)	δβ- Turk	δβ- Sic								
31	Θήλυ	HPFH+β-MA	10.7	34.7	5.040	21.2	68.8	30.8	2.62	6.90	2.7	9.2	80.0	-	-	IVS1-1	NI	NI	NI	NI	41883C/C	
32	Θήλυ	δβ-MA	12.9	42.5	5.600	23.0	75.9	30.4	1.78	9.20	2.5	13.2	75.6	-	+		-369	NI	NI	NI	41883C/C	
33	Άρρεν	δβ-MA	16.3	53.0	6.760	24.1	78.4	30.8	2.12	6.80	2.9	13.3	74.8	-	+		NI	NI	-	-158	41883C/A	
34	Άρρεν	δβ-MA	13.9	45.4	6.790	20.5	66.9	30.6	2.04	7.65	2.8	12.2	76.7	-	+		NI	NI	NI	NI	41883C/C	
35	Θήλυ	β-MA↑F	10.7	35.6	4.860	22.0	73.3	30.1	2.37	7.84	2.9	5.2	82.2	-	-	IVS1-1 +Cd2	-117	-117	NI	NI	41883C/C	
36	Θήλυ	δβ-MA	12.1	37.4	5.190	23.3	72.1	32.4			2.4	13.4	72.4	+	-		del4	del4	NI	NI	41883C/A	
37	Θήλυ	HPFH	14.0	42.9	4.660	30.0	92.1	32.6	2.12	13.00	2.1	14.3	74.1				-117	-117	NI	NI	41883C/C	
38	Άρρεν	δβ-MA	11.7	37.7	5.180	22.6	72.8	31.0	2.84	4.20	2.5	3.9	84.3	+	-		-	del4	NI	NI	41883C/A	
39	Άρρεν	δβ-MA	12.0	38.8	5.790	20.7	67.0	30.9	2.82	6.90	2.8	6.8	81.7	-	+		NI	NI	NI	NI	41883C/C	
40	Άρρεν	δβ-MA	13.0	41.7	6.050	21.5	68.9	31.2	1.87		2.7	9.1	79.1	-	+				-	-158	41883C/A	
41	Άρρεν	δβ-MA	12.4	40.6	6.330	19.6	64.1	30.5	1.83	7.66	2.4	7.9	79.9	+	-		del4	del4	NI	NI	41883C/A	
42	Θήλυ	δβ-MA	12.0	38.3	5.150	23.3	74.4	31.3	1.95	18.32	2.5	22.5	70.6	+	-		NI	NI	NI	NI	41883C/A	
43	Άρρεν	δβ-MA	14.6	45.9	6.220	23.5	73.8	31.8	2.19	12.77	2.5	19.9	73.5	+	-		del4	del4	-	309	41883A/A	
44	Άρρεν	δβ-MA	11.8	38.0	5.170	22.8	73.5	31.1	2.24	10.94	2.4	11.2	76.2	+	-		del4	del4	-	-158	41883A/A	
45	Άρρεν	δβ-MA	11.8	37.9	5.000	23.6	75.8	31.1	3.31	22.65	3.6	25.2	67.3	+	-		NI	NI	NI	NI	41883C/A	
46	Θήλυ	δβ-MA	11.4	35.8	4.770	23.9	75.1	31.8	1.82	10.89	2.5	12.2	75.9	+	-		NI	NI	NI	NI	41883C/A	
47	Άρρεν	β-MA↑F	12.4	40.3	5.920	20.9	68.1	30.8	3.90	5.91	3.6	4.1	82.1	-	-	IVS2-745	NI	NI	-	-158	41883C/A	
48	Άρρεν	δβ-MA	12.3	40.6	5.770	21.3	70.4	30.3	2.66	7.39	2.7	7.6	80.6	+	-	(πολ.+20)	del4	del4	NI	NI	41883A/A	
49	Θήλυ	β-MA↑F	9.9	32.1	4.780	20.7	67.2	30.8	2.73	10.90	2.6	5.9	82.5	-	-	IVS1-1	NI	NI	NI	NI	41883C/C	
50	Θήλυ	β-MA	11.3	37.0	5.670	19.9	65.3	30.5			4.7	1.2	85.5	-	-	IVS1-110	NI	NI	-	-158	41883C/A	
51	Θήλυ	δβ-MA	11.8	37.2	5.040	23.4	73.8	31.7	2.27	14.58	2.5	15.1	73.0	+	-		del4	del4	NI	NI	41883C/A	
52	Άρρεν	δβ-MA	13.6	44.0	5.910	23.0	74.5	30.9	2.50	11.17	2.8	11.2	77.0	+	-		NI	NI	NI	NI	41883A/A	
53	Άρρεν	δβ-MA	13.5	44.0	5.810	23.2	75.7	30.7	2.63	3.93	2.9	5.9	83.1	-	+		NI	NI	NI	NI	41883C/A	
54	Άρρεν	δβ-MA	13.4	44.6	6.330	21.2	70.5	30.0	2.75	10.65	2.2	9.7	71.5	+	-		del4	del4	NI	NI	41883C/A	
55	Θήλυ	δβ-MA	12.7	40.1	5.160	24.6	77.7	31.7	2.84	19.70	2.2	22.1	72.0	+	-		del4	del4	-	-158	41883A/A	

56	Θήλυ	β-MA↑F	9.1	29.2	4.320	21.1	67.6	31.2	4.73	6.50	5.4	6.7	80.1			IVS1-1	NI	NI	-	-	41883C/A
57	Θήλυ	β-MA↑F	11.4	37.6	5.340	21.3	70.4	30.3	4.66	6.85	5.0	6.3	81.2	-	-	IVS1-110	NI	NI	158	158	41883C/A
58	Θήλυ	δβ-MA	12.4	40.9	5.500	22.5	74.4	30.3	2.41	5.70	2.7	5.4	83.2	-	+		NI	NI	158	NI	41883C/C
59	Άρρεν	β-MA↑F	12.8	42.8	6.020	21.3	71.1	29.9	2.38	4.57	2.7	4.3	84.1	-	-	IVS1-1	NI	NI	-	-158	41883C/A
60	Θήλυ	δβ-MA	11.6	37.5	4.800	24.2	78.1	30.9	1.55	20.24	2.2	20.4	73.4	+	-		del4	del4	NI	NI	41883C/A

α/α	ΦΥΛΟ	ΔΙΑΓΝΩΣΗ	Hb	Het	RBC	MCH	MCV	MCHC	HbA ₂ (%) σε σπλήνη DEAE	HbF(%) μέθοδος BETKE	HPLC Hb A ₂ (%)	Hb F (%)	HbA (%)	DNA-PCR δβ-MA		β-MA	Ay-γ ₄	Ay- γ ₆ -γ ₄	Gγ-γ ₁	Gγ- γ ₆ -γ ₁	Ay-επισχ (Ay3')	
														δβ- Turk	δβ- Sic							
61	Άρρεν	δβ-MA	11.5	38.6	5.430	21.2	71.1	29.8	2.34	12.08	2.8	10.1	77.8	+	-		NI	NI	NI	NI	41883C/A	
62	Θήλυ	β-MA↑F	9.6	33.6	4.680	20.5	71.8	28.6	3.15	10.21	5.5	5.2	80.7	-	-	β39+C d2					41883C/A	
63	Θήλυ	δβ-MA	10.6	35.7	5.500	19.3	64.9	29.7	2.70	13.20	2.6	8.1	77.6	+	-				NI	NI	41883C/A	
64	Θήλυ	HPFH	8.6	27.4	2.760	31.2	99.3	31.4	2.29	4.00	2.4	4.0	86.2								41883A/A	
65	Θήλυ	β-MA↑F	11.1	35.7	4.810	23.1	74.2	31.1	5.00	4.90	4.9	5.0	81.9						NI	NI	41883C/C	
66	Άρρεν	β-MA↑F	12.6	40.2	6.180	20.4	65.0	31.3	4.26	4.00	5.6	4.5	81.8			IVS1- 110				NI	NI	41883C/C
67	Άρρεν	β-MA↑F	13.4	43.3	6.170	21.7	70.2	30.9	2.97		2.8	6.6	80.8	-	-	IVS1-1 + Cd2						41883C/A
68	Θήλυ	δβ-MA	12.5	39.0	5.360	23.3	72.8	32.1	2.22	12.50	2.0	14.8	69.0	+	-		NI	NI	NI	NI	41883C/C	
69	Θήλυ	β-MA↑F	10.6	32.5	5.080	20.9	64.0	32.6	3.00		3.3	5.3	83.5	-	-	IVS1- 110	NI	NI				41883C/A
70	Άρρεν	δβ-MA+δ-MA	13.8	43.6	6.020	22.9	72.4	31.7	1.72	5.00	1.1	6.0	83.1	+	-		del4	del4	-158	-158		41883A/A
71	Άρρεν	β-MA↑F	10.2	32.8	5.440	18.8	60.3	31.1	4.36	5.50	5.1	6.4	79.6			β39						41883
72	Άρρεν	β-MA↑F	11.3	36.5	5.190	21.8	70.7	31.0	2.58	6.83	2.6	5.4	83.1	-	-	IVS1-1	NI	NI	NI	NI		41883C/C
73	Άρρεν	HPFH	15.4	47.7	5.220	29.5	91.4	32.3	2.41	12.20	2.0	15.8	71.6				-117	-117	NI	NI		41883C/C
74	Άρρεν	δβ-MA	13.4	43.7	6.370	21.0	68.6	30.7	2.41	10.60	2.7	11.2	77.1	+	-		del4	del4	NI	NI		41883C/A
75	Άρρεν	δβ-MA	13.8	44.2	5.720	24.1	77.3	31.2	2.43	17.29	2.6	16.7	71.3	+	-		del4	del4	NI	NI		41883C/A
76	Θήλυ	δβ-MA	13.6	43.5	5.740	23.7	75.8	31.3	2.38	15.71	2.7	21.9	71.2	+	-		del4	del4	-158	-158		41883A/A
77	Θήλυ	δβ-MA	10.9	36.4	5.070	21.5	71.8	29.9	2.24	8.23	2.6	8.4	79.7	-	+		NI	NI	-158	-158		41883C/A
78	Άρρεν	δβ-MA	13.6	44.0	6.290	21.6	70.0	30.9	2.35	9.07	2.8	10.2	77.1	+	-				NI	NI		41883C/A
79	Θήλυ	δβ-MA+ δβMA	9.6	31.1	5.190	18.5	59.9	30.9	0.53	85.90	0.0	86.3	9.1	-	++		NI	NI	NI	NI		41883C/C
80	Άρρεν	δβ-MA	14.8	45.5	5.720	25.9	79.5	32.5	1.47	10.64				+	-		del4	del4	NI	NI		41883C/A
81	Άρρεν	δβ-MA	13.8	45.7	6.750	20.4	67.7	30.2	2.21	5.64				-	+		NI	NI	-158	-158		41883C/A
82	Θήλυ	δβ-MA	12.6	39.9	5.440	23.2	73.3	31.6	2.06	21.15				+	-		del4	del4	-158	-158		41883A/A
83	Άρρεν	β-MA↑F	13.3	41.6	6.180	21.5	67.3	32.0	5.39	5.45	5.4	5.2	79.4	-	-	IVS2-1 [G>A]				-158	-158	41883C/A
84	Θήλυ	β-MA↑F	11.3	35.9	5.140	22.0	69.8	31.5	1.92		2.6	10.4	78.0	-	-	IVS1-1	NI	NI	NI	NI		41883C/C
85	Θήλυ	β-MA↑F	11.0	35.4	5.190	21.2	68.2	31.1	4.36		5.2	10.4	76.6			β39	NI	NI	-158	-158		41883C/A
86	Θήλυ	δβ-MA	12.5	39.8	5.050	24.8	78.8	31.4	2.02		2.5	15.6	73.7	+	-				NI	NI		41883C/A
87	Θήλυ	β-MA↑F	10.6	34.1	5.080	20.9	67.1	31.1	4.68		5.4	6.8	80.1			B39	del4	del4	NI	NI		41883C/A
88	Θήλυ	δβ-MA	10.7	34.4	4.890	21.9	70.3	31.1	2.33		2.9	10.0	79.8	+	-		del4	del4	NI	NI		41883C/A
89	Άρρεν	δβ-MA	12.1	39.3	5.800	20.9	67.8	30.8	1.99		2.9	6.6	81.8	+	-		del4	del4	NI	NI		41883C/A

90	Θήλυ	β-MA↑F	9.6	30.3	4.770	20.1	63.5	31.7	4.28	4.7	5.9	81.3	IVS1- 110	NI	NI	-158	-158	41883C/A
----	------	--------	-----	------	-------	------	------	------	------	-----	-----	------	--------------	----	----	------	------	----------

α/α	ΦΥΛΟ	ΔΙΑΓΝΩΣΗ	Hb	Het	RBC	MCH	MCV	MCHC	HbA ₂ (%) σε στήλη DEAE	HbF(%) μέθοδος BETKE	HβA ₂ (%)	HPLC HbF (%)	HbA (%)	δβ-MA		β-MA	DNA-PCR		Gγ-γ ₁	Gγ-γ ₆ -γ ₁	Αγ-επισχ (Αγ3')	
														δβ- Turk	δβ- Sic		Αγ-γ ₄	Αγ- γ ₆ -γ ₄				
151	Θήλυ	ΗΡFH	10.8	29.7	3.380	30.2	87.2	43.3	2.77		3.3	3.7	86.5	-	-		NI	NI	-158	-158	41883	
152	Θήλυ	β-MA↑F	9.1	29.4	3.930	23.2	74.8	31.0	3.68		4.9	11.1	76.2			FSC-6	NI	NI	-158	-158	41883C/A	
153	Άρρεν	δβ-MA	11.9	40.2	5.880	20.2	68.4	29.6	2.22		3.2	11.0	77.4	+	-		NI	NI	NI	NI	41883A/A	
154	Θήλυ	δβ-MA	10.2	33.4	5.140	19.8	65.0	30.5	2.58		3.2	2.9	84.9	-	+		NI	NI	NI	NI	41883	
155	Άρρεν	β-MA↑F	10.9	36.4	5.420	20.1	66.6	30.2	4.28		6.4	3.0	81.9			β-39					41883A/A	
156	Θήλυ	δβ-MA	9.8	32.6	5.310	18.5	61.4	30.1	1.36		2.4	18.8	75.3	-	+							41883A/A
157	Θήλυ	β-MA↑F	10.6	33.6	5.080	20.9	66.1	31.5	4.80		5.4	5.3	81.4			IVS1-1						41883
158	Θήλυ	β-MA↑F	10.1	31.2	4.740	21.3	65.8	32.4	5.42		5.8	4.6	82.1			β-39						41883C/A
159	Άρρεν	δβ-MA	12.7	44.2	6.550	19.4	67.5	28.7			2.9	6.5	82.7	-	+							41883
160	Θήλυ	δβ-MA	10.3	34.3	4.860	21.2	70.6	30.0			2.7	6.3	83.7	-	+							41883

Από τα 160 δείγματα καταχωρήθηκαν:

- α. 63 ετεροζυγώτες δβ-Μεσογειακής Αναιμίας
- β. 51 ετεροζυγώτες β- Μεσογειακής Αναιμίας με αυξημένη HbF.
- γ. 30 ετεροζυγώτες ΗΡFΗ (Κληρονομικής Παραμονής Εμβρυϊκής Αιμοσφαιρίνης F).
- δ. 1 διπλός ετεροζυγώτης ΗΡFΗ και Δρεπανοκυτταρικής Αναιμίας (HbS).
- ε. 1 ομοζυγώτης δβ-MA
- στ. 2 διπλοί ετεροζυγώτες ΗΡFΗ και δβ-MA
- ζ. 4 διπλοί ετεροζυγώτες ΗΡFΗ και β-MA
- η. 1 διπλός ετεροζυγώτης β-MA και δβ-MA
- θ. 1 διπλός ετεροζυγώτης ΗΡFΗ και δ-MA
- ι. 1 διπλός ετεροζυγώτης δβ-MA + δ-MA
- κ. 2 διπλοί ετεροζυγώτες β-MA +α-MA
- λ. 1 διπλός ετεροζυγώτης ΗΡFΗ +α-MA
- μ. 2 ετεροζυγώτες β-MA

3.1.2. Αξιολόγηση των φαινοτυπικών (αιματολογικών – βιοχημικών κ.λπ.) δεδομένων (στο γενικό πληθυσμό).

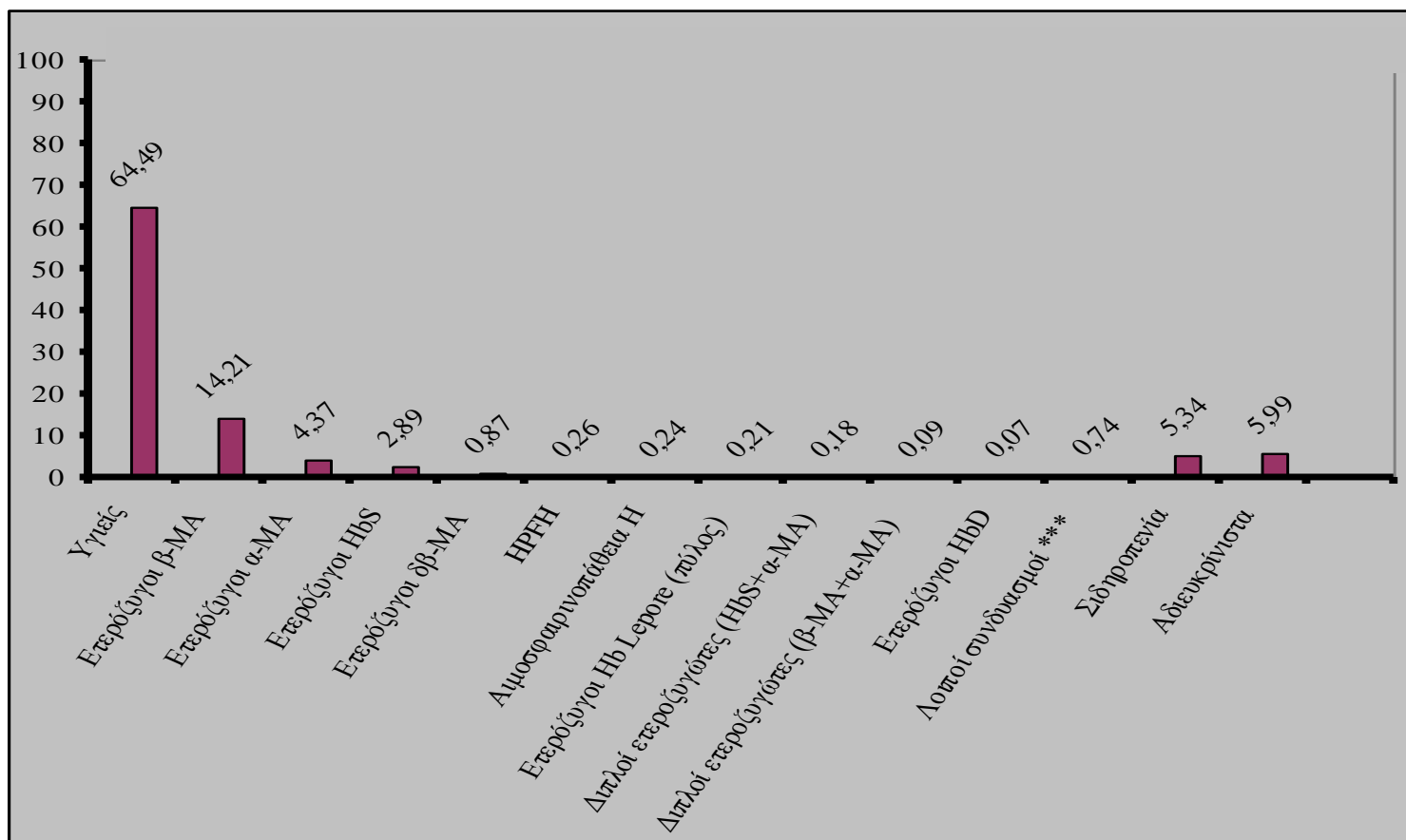
Στους πίνακες 7 και 8 και στα αντίστοιχα Διαγράμματα 1 και 2 αποτυπώνονται τα αποτελέσματα των εξετάσεων, που πραγματοποιήθηκαν στη Μονάδα Πρόληψης Μεσογειακής Αναιμίας (Μ.Π.Μ.Α.) του Γενικού Νοσοκομείου Καρδίτσας, κατά τα έτη 1991 έως 2006, στο γενικό πληθυσμό.

Ο έλεγχος αφορά πρωτίστως ζευγάρια (εγκύους και μη) αλλά και νεαρά άτομα (συνήθως ενήλικα), που πρόκειται να τεκνοποιήσουν.

Επίσης στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων συμπεριλαμβάνονται και άτομα, τα οποία νοσηλεύονταν στις κλινικές του νοσοκομείου, αλλά και άτομα από τη Μονάδα Μεταγγίσεων· όλα σχεδόν μεγαλύτερα των 25-30 ετών. Δεν υπάρχουν δηλαδή γεννήσεις ομοζυγωτών ή διπλών ετεροζυγωτών τα τελευταία 25-30 χρόνια στο Νομό.

Πίνακας 7. Αποτελέσματα εξετάσεων στη Μ.Π.Μ.Α. (Μονάδα Πρόληψης Μεσογειακής Αναιμίας) του Γενικού Νοσοκομείου Καρδίτσας από 1991 έως 2006

ΕΞΕΤΑΣΘΕΝΤΑ ΑΤΟΜΑ (Υγιείς, φορείς κ.λπ.)	ΑΡΙΘΜΗΤΙΚΑ	ΠΟΣΟΤΙΚΑ (%)
Υγιείς	13.180	64,49
Ετερόζυγοι β-MA	3.044	14,21
Ετερόζυγοι α-MA	937	4,37
Ετερόζυγοι HbS	620	2,89
Ετερόζυγοι δβ-MA	187	0,87
ΗΡFH	56	0,26
Αιμοσφαιρινοπάθεια Η	52	0,24
Ετερόζυγοι Hb Lepore (Πύλος)	45	0,21
Διπλοί ετεροζυγώτες (HbS+α-MA)	39	0,18
Διπλοί ετεροζυγώτες (β-MA+α-MA)	20	0,09
Ετερόζυγοι HbD	16	0,07
Λοιποί συνδυασμοί	159	0,74
Σιδηροπενία	1.144	5,34
Αδιευκρίνιστα	1.284	5,99
ΣΥΝΟΛΟ	21.413	100,00



Διάγραμμα 1. Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων του Πίνακα 7.

- * Αναφορικά με τα σιδηροπενικά άτομα, στην επεξεργασία των δεδομένων καταγράφονται από την αρχική εξέταση (όχι μετά από σιδηροθεραπεία) και αφορούν στην πλειονότητά τους εγκύους, αλλά και μικρά παιδιά.
- ** Στους αδιευκρίνιστους περιλαμβάνονται:
 - α) Άτομα με οριακούς αιματολογικούς δείκτες (MCH, MCV, MCHC) και συνήθως χαμηλές αιματολογικές παραμέτρους (Hb, HCl, RBC)
 - β) Άτομα φυσιολογικών παραμέτρων (Hb, Hct) αλλά με σχετικά υψηλά RBC σε σχέση με την αιμοσφαιρίνη και τον αιματοκρίτη.
 - γ) Άτομα με οριακή αιμοσφαιρίνη A₂ (HbA₂) στα ανώτερα φυσιολογικά όρια (περί του 2,3 έως 3,5%), τα οποία ελέγχονται με ανάλυση DNA, σε μοριακό επίπεδο, για ήπιες μεταλλάξεις με συνηθισμένη την -101 μετάλλαξη στα β-γονίδια.
 - δ) Άτομα με οριακή αιμοσφαιρίνη A₂ (HbA₂) στα κατώτερα φυσιολογικά όρια (>2%), τα οποία ελέγχονται με ανάλυση DNA, σε μοριακό επίπεδο, για ήπιες μεταλλάξεις (με συνηθισμένη την Hb Κνωσσός).
 - ε) Άτομα με φυσιολογικές, όλες τις παραμέτρους εξαγωγής συμπερασμάτων, αλλά με όχι φυσιολογική μορφολογία ερυθροκυττάρων.

Όλα τα ανωτέρω άτομα παραπέμπονται στο Κέντρο Μεσογειακής Αναιμίας για περαιτέρω έλεγχο, βιοσύνθεση αιμοσφαιρινών και ανάλυση DNA.

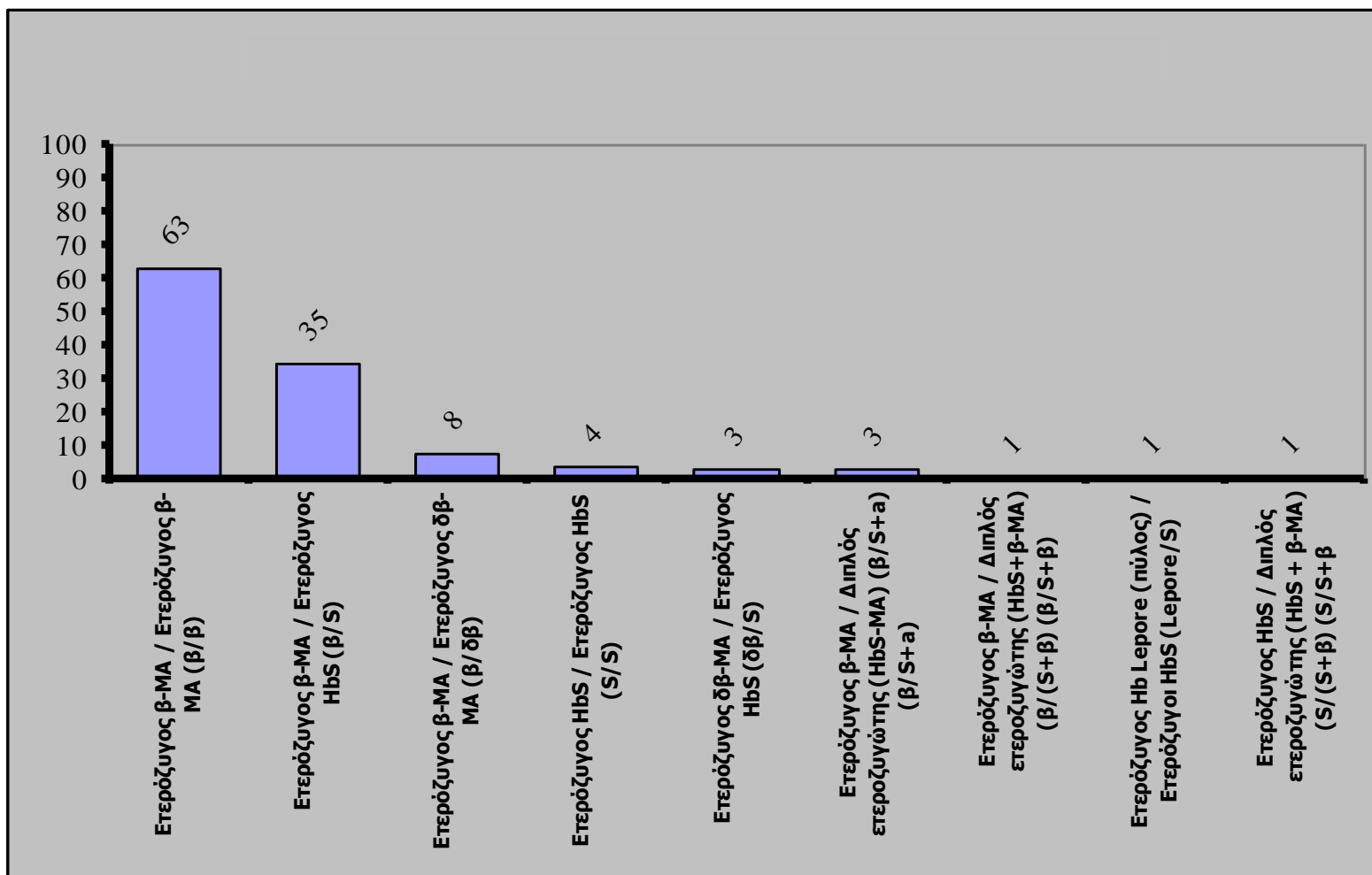
- *** Στους αναφερόμενους ως λοιπούς συνδυασμούς του Πίνακα 7, περιλαμβάνονται: Άτομα από τη Μονάδα Νοσηλείας Μεσογειακής Αναιμίας ήτοι: ομόζυγα Cooley (β-MA και λιγότερα β-MA+δβ-MA), με μικροδεπανοκυτταρική αναιμία (HbS+β-MA και πιο λίγα HbS+δβ-MA), ομόζυγα HbS.

Στα ανωτέρω άτομα πραγματοποιήθηκε, παράλληλα με την παρούσα διατριβή και γονοτυπική ανάλυση DNA.

Περιλαμβάνονται επίσης και πιο «σπάνιοι» συνδυασμοί όπως: Διπλοί ετεροζυγώτες β-MA+HPFH, ετεροζυγώτες Hb AGR (Αγρινίου), διπλοί ετεροζυγώτες β-MA+HbD, διπλοί ετεροζυγώτες β-MA+HbLepore, διπλοί ετεροζυγώτες δβ-MA+HPFH, ομοζυγώτες τύπου AGR, διπλοί ετεροζυγώτες α-MA+δβ-MA.

Πίνακας 8. Προγεννητικός έλεγχος ζευγαριών, με άμεση ανάλυση DNA από τα κύτταρα του εμβρύου (με αμνιοπαρακέντηση ή τροφοβλάστη) κατά την περίοδο από 1991 έως 2006 στη Μονάδα Πρόληψης Μεσογειακής Αναιμίας του Γενικού Νοσοκομείου Καρδίτσας

ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ ΖΕΥΓΑΡΙΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΖΕΥΓΑΡΙΩΝ
Ετερόζυγος β-MA / Ετερόζυγος β-MA (β/β)	63
Ετερόζυγος β-MA / Ετερόζυγος HbS (β/S)	35
Ετερόζυγος β-MA / Ετερόζυγος δβ-MA (β/δβ)	8
Ετερόζυγος HbS / Ετερόζυγος HbS (S/S)	4
Ετερόζυγος δβ-MA / Ετερόζυγος HbS (δβ/S)	3
Ετερόζυγος β-MA / Διπλός ετεροζυγώτης (HbS+α-MA) (β/S+a)	3
Ετερόζυγος β-MA / Διπλός ετεροζυγώτης (HbS+β-MA) (β/S+β)	1
Ετερόζυγος Hb Lepore (Πύλος) / Ετερόζυγος HbS (Lepore/S)	1
Ετερόζυγος HbS / Διπλός ετεροζυγώτης (HbS + β-MA) (S/S+β)	1
ΣΥΝΟΛΟ	119



Διάγραμμα 2. Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων του Πίνακα 8.

Στους Πίνακες 9 (Α-Ξ) αποτυπώνεται η γενική εικόνα υγιών ατόμων και διαφόρων τύπων ετεροζυγωτών.

9Α.

		ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ		
		υγιούς ενηλίκου ανδρός	υγιούς ενηλίκου γυναίκος (μη εγκύου)	υγιούς ενηλ. γυν. (3 ^{ος} μήνας κυήσεως)
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ				
Αιμοσφαιρίνη (Hb)	gr/dl	15,2	13,4	12,2
Αιματοκρίτης (Hct)	%	45,3	40,2	36,8
Ερυθρά αιμοσφαίρια (RBC)	(x10 ³ /cm ³)	5.140	4.460	4.120
MCH	pg	29,6	30,0	29,6
MCV	fl	88,1	90,1	89,3
MCHC	%	33,6	33,3	33,2
Λευκά	(/cm ³)	8.400	5.400	8.500
ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ				
• Ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης σε μεμβράνη οξεικής κυταρρίνης-Αιμοσφαιρινικά κλάσματα		A ₂ A	A ₂ A	A ₂ A
• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης A ₂ (HbA ₂) - Διαχωρισμός σε στήλη DEAE:		2,65%	2,47%	2,75%
• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης F(HbF) - Μέθοδος ΒΕΤΚΕ:		<2%	<2%	<2%
ΕΓΚΛΕΙΣΤΑ ΕΡΥΘΡ/ΡΩΝ	-Πριν από επώαση (αδέσμευτες α- αλυσίδες)	(-)	(-)	(-)
	-Μετά από την επώαση (αδέσμευτες β- αλυσίδες)	(-)	(-)	(-)
• Δοκιμασία Δρεπανώσεως		(-)	(-)	(-)
• Ωσμωτική αντίσταση ερυθροκυττάρων		(-)	(-)	(-)
HPLC				
Hb A ₂		2,8%	2,6%	3,0%
Hb F		0,3%	0,2%	0,6%
Hb S		0,0%	0,0%	0,0%
Hb A		88,6%	89,2%	86,9%
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ				
Υποχρωμία				
Μικροκυττάρωση			±	±
Ανισοκυττάρωση		±		±
Ποικιλοκυττάρωση				
Βεσεόφιλη στίξη				
Πολυχρωματοφιλία				
Στοχοκυττάρωση				
Μακροκυττάρωση				

Στοματοκυττάρωση			
Σφαιροκυττάρωση			

9B.

		ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ		
		ετεροζύγου β-MA ενηλίκου ανδρός	ετεροζύγου β-MA ενηλίκου γυναικός (μη εγκύου)	ετεροζύγου β-MA ενηλ. γυν. (3 ^{ος} μήνας κύησης)
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ				
Αιμοσφαιρίνη (Hb)	gr/dl	13,1	11,0	9,5
Αιματοκρίτης (Hct)	%	42,7	36,5	30,4
Ερυθρά αιμοσφαίρια (RBC)	(x10 ³ /cm ³)	6.540	5.800	4.620
MCH	pg	20,0	19,0	20,6
MCV	fl	65,3	62,9	65,8
MCHC	%	30,7	30,1	31,3
Λευκά	(/cm ³)	8.200	9.200	7.300
ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ				
• Ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης σε μεμβράνη οξεικής κυταρρίνης-Αιμοσφαιρινικά κλάσματα		A ₂ A	A ₂ A	A ₂ A
• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης A ₂ (HbA ₂) - Διαχωρισμός σε στήλη DEAE:		4,85%	4,98%	4,30%
• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης F(HbF) - Μέθοδος ΒΕΤΚΕ:		<2%	<2%	<2%
ΕΓΚΛΕΙΣΤΑ ΕΡΥΘΡ/ΡΩΝ	- Πριν από επώαση (αδέσμευτες α-αλυσίδες)	(+)	(+)	(+)
	- Μετά από την επώαση (αδέσμευτες β-αλυσίδες)	(-)	(-)	(-)
• Δοκιμασία Δρεπανώσεως		(-)	(-)	(-)
• Ωσμωτική αντίσταση ερυθροκυττάρων		(+)	(+)	(+)
HPLC				
Hb A ₂		5,2%	5,6%	4,5%
Hb F		0,4%	0,7%	1,6%
Hb S		0,0%	0,0%	0,0%
Hb A		85,2%	85,2%	84,9%
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ				
Υποχρωμία		++	++	++
Μικροκυττάρωση		+ / ++	++	++
Ανισοκυττάρωση		++	++	++
Ποικιλοκυττάρωση		++	++	++
Βεσέφιλη στίξη		+	+	+
Πολυχρωματοφιλία		+	+	+
Στοχοκυττάρωση		+	+	+
Μακροκυττάρωση				

Στοματοκυττάρωση			
Σφαιροκυττάρωση			

9Γ.

				ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ		
		ετεροζύγου β-MA με αυξημένη HbF ενηλ. ανδρός	ετεροζύγου β-MA με αυξημένη HbF ενηλ. γυν. (μη εγκύου)	ετεροζύγου β-MA με αυξημένη HbF ενηλ. γυν. (3 ^{ος} μήνας κνήσεως)		
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ						
Αιμοσφαιρίνη (Hb)	gr/dl	13,3	10.2	10,6		
Αιματοκρίτης (Hct)	%	41,6	33.0	34.1		
Ερυθρά αιμοσφαίρια (RBC)	(x10 ³ /cm ³)	6.180	5.270	5.080		
MCH	pg	21,5	19,4	20,9		
MCV	fl	67,3	62,6	67,1		
MCHC	%	32,0	30.9	31,1		
Λευκά	(/cm ³)	9.800	6.150	4.900		
ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ						
• Ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης σε μεμβράνη οξεικής κυταρρίνης-Αιμοσφαιρινικά κλάσματα		A ₂ -F-A	A ₂ -F-A	A ₂ -F-A		
• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης A ₂ (HbA ₂) - Διαχωρισμός σε στήλη DEAE:		5,39%	4,80%	4,68%		
• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης F(HbF) - Μέθοδος ΒΕΤΚΕ:		5,45%	4,33%	5,8%		
ΕΓΚΛΕΙΣΤΑ ΕΡΥΘΡ/ΡΩΝ	- Πριν από επώαση (αδέσμευτες α- αλυσίδες)	(+)	(+)	(+)		
	- Μετά από την επώαση (αδέσμευτες β- αλυσίδες)	(-)	(-)	(-)		
• Δοκιμασία Δρεπανώσεως		(-)	(-)	(-)		
• Ωσμωτική αντίσταση ερυθροκυττάρων		(+)	(+)	(+)		
HPLC						
Hb A ₂		5,4%	5,3%	5,4%		
Hb F		5,2%	4,2%	6,8%		
Hb S		0,0%	0,0%	0,0%		
Hb A		79,4%	82,9%	80,1%		
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ						
Υποχρωμία		++	++	++		
Μικροκυττάρωση		++	++	++		
Ανισοκυττάρωση		++	++	++		
Ποικιλοκυττάρωση		++	++	++		

Βεσεόφιλη στίξη	+	+	+
Πολυχρωματοφιλία	+	+	+
Στοχοκυττάρωση	+	+	+
Μακροκυττάρωση			
Στοματοκυττάρωση			
Σφαιροκυττάρωση			

9Δ.

		ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ		
		ετεροζύγου α-MA ενηλίκου ανδρός	ετεροζύγου α-MA ενηλ. γυν. (μη εγκύου)	ετεροζύγου α-MA ενηλ. γυν. (2 ^{ος} μήνας κυήσεως)
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ				
Αιμοσφαιρίνη (Hb)	gr/dl	12,1	11,7	10,1
Αιματοκρίτης (Hct)	%	40,5	38,3	35,9
Ερυθρά αιμοσφαίρια (RBC)	(x10 ³ /cm ³)	5.820	5.280	5.220
MCH	pg	20,8	22,2	19,3
MCV	fl	69,6	72,5	68,8
MCHC	%	29,9	30,5	28,1
Λευκά	(/cm ³)	5.900	5.700	8.300
ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ				
• Ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης σε μεμβράνη οξεικής κυταρρίνης-Αιμοσφαιρινικά κλάσματα		A ₂ A	A ₂ A	A ₂ A
• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης A ₂ (HbA ₂) - Διαχωρισμός σε στήλη DEAE:		2,45%	2,36%	1,85%
• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης F(HbF) - Μέθοδος ΒΕΤΚΕ:		<2%	<2%	<2%
ΕΓΚΛΕΙΣΤΑ ΕΡΥΘΡ/ΡΩΝ	- Πριν από επώαση (αδέσμευτες α- αλυσίδες)	(-)	(-)	(-)
	- Μετά από την επώαση (αδέσμευτες β- αλυσίδες)	(+)	(+)	(+)
• Δοκιμασία Δρεπανώσεως		(-)	(-)	(-)
• Ωσμωτική αντίσταση ερυθροκυττάρων		(+)	(+)	(+)
HPLC				
Hb A ₂		2,6%	2,4%	1,9%
Hb F		0,0%	0,2%	0,3%
Hb S		0,0%	0,0%	0,0%
Hb A		86,7%	88,1%	88,2%
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ				
Υποχρωμία		++	++	++
Μικροκυττάρωση		+ / ++	+ / ++	+ / ++

Ανισοκυττάρωση	++	++	++
Ποικιλοκυττάρωση	++	++	++
Βεσεόφιλη στίξη			
Πολυχρωματοφιλία	+	+	+
Στοχοκυττάρωση	+	+	+
Μακροκυττάρωση			
Στοματοκυττάρωση			
Σφαιροκυττάρωση			

9Ε.

		ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ		
		ετεροζύγου δρεπανοκυ- ττα-ρικής αναιμίας (HbS) ενηλίκου ανδρός	ετεροζύγου δρεπανοκυ- ττα-ρικής (HbS) ενηλ. γυν. (μη εγκύου)	ετεροζύγου δρεπανοκυτ- τα-ρικής αναιμίας (HbS) ενηλ. γυν. (2 ^{ος} μήνας κυήσεως)
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ				
Αιμοσφαιρίνη (Hb)	gr/dl	15,7	13,7	12,5
Αιματοκρίτης (Hct)	%	46,5	41,7	37,2
Ερυθρά αιμοσφαίρια (RBC)	(x10 ³ /cm ³)	5.550	4.820	4.500
MCH	pg	28,3	28,4	27,8
MCV	fl	83,8	86,5	82,7
MCHC	%	33,8	32,9	33,6
Λευκά	(/cm ³)	7.100	6.500	8.400
ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ				
• Ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης σε μεμβράνη οξεικής κυταρρίνης-Αιμοσφαιρινικά κλάσματα		A ₂ -S≈40%- A	A ₂ -S≈40%- A	A ₂ -S≈40%- A
• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης A ₂ (HbA ₂) - Διαχωρισμός σε στήλη DEAE:		2,85%	2,78%	2,85%
• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης F(HbF) - Μέθοδος ΒΕΤΚΕ:		<2%	<2%	<2%
ΕΓΚΛΕΙΣΤΑ ΕΡΥΘΡ/ΡΩΝ	-Πριν από επώαση (αδέσμευτες α- αλυσίδες)	(-)	(-)	(-)
	-Μετά από την επώαση (αδέσμευτες β- αλυσίδες)	(-)	(-)	(-)
• Δοκιμασία Δρεπανώσεως		(+)	(+)	(+)
• Ωσμωτική αντίσταση ερυθροκυττάρων		(+)	(+)	(+)
HPLC				
Hb A ₂ και τμήμα της HbS		4,3%	4,2%	4,5%
Hb F		0,5%	0,5%	0,6%
Hb S		36,3%	38,3%	40,0%
Hb A		50,7%	51,5%	50,6%

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ				
Υποχρωμία		+	+	+
Μικροκυττάρωση		+	+	+
Ανισοκυττάρωση		±	+	+
Ποικιλοκυττάρωση			±	±
Βεσεόφιλη στίξη				
Πολυχρωματοφιλία				
Στοχοκυττάρωση				
Μακροκυττάρωση				
Στοματοκυττάρωση				
Σφαιροκυττάρωση				
9ΣΤ.		ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ		
		ετεροζύγου δβ-ΜΑ ενηλίκου ανδρός	ετεροζύγου δβ-ΜΑ ενηλ. γυν. (μη εγκύου)	ετεροζύγου δβ-ΜΑ ενηλ. γυν. (2 ^{ος} μήνας κυήσεως)
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ				
Αιμοσφαιρίνη (Hb)	gr/dl	12,1	11,3	10,0
Αιματοκρίτης (Hct)	%	39,1	35,9	33,2
Ερυθρά αιμοσφαίρια (RBC)	(x10 ³ /cm ³)	5.860	5.140	4.690
MCH	pg	20,6	22,0	21,3
MCV	fl	66,7	69,8	70,8
MCHC	%	30,9	31,5	30,1
Λευκά	(/cm ³)	8.700	8.900	10.000
ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ				
• Ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης σε μεμβράνη οξεικής κυταρρίνης-Αιμοσφαιρινικά κλάσματα		A ₂ -F-A	A ₂ -F-A	A ₂ -F-A
• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης A ₂ (HbA ₂) - Διαχωρισμός σε στήλη DEAE:		2,22%	1,92%	2,41%
• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης F(HbF) - Μέθοδος ΒΕΤΚΕ:				
ΕΓΚΛΕΙΣΤΑ ΕΡΥΘΡ/ΡΩΝ	-Πριν από επώαση (αδέσμευτες α-αλυσίδες)	(+)	(+)	(+)
	-Μετά από την επώαση (αδέσμευτες β-αλυσίδες)	(-)	(-)	(-)
• Δοκιμασία Δρεπανώσεως		(-)	(-)	(-)
• Ωσμωτική αντίσταση ερυθροκυττάρων		(+)	(+)	(+)
HPLC				
Hb A ₂		2,9%	2,6%	2,9%
Hb F		9,0%	10,4%	6,9%
Hb S		0,0%	0,0%	0,0%
Hb A		78,7%	78,0%	84,0%

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ			
Υποχρωμία	++	++	++
Μικροκυττάρωση	++	++	++
Ανισοκυττάρωση	++	++	++
Ποικιλοκυττάρωση	++	++	++
Βεσεόφιλη στίξη	+	+	+
Πολυχρωματοφιλία	+	+	+
Στοχοκυττάρωση	+	+	+
Μακροκυττάρωση			
Στοματοκυττάρωση			
Σφαιροκυττάρωση			

9Ζ.

					ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ		
					ενηλίκου ανδρός με ΗΡΦΗ	ενηλίκου γυναίκος με ΗΡΦΗ. (μη εγκύου)	ενηλίκου γυναίκος με ΗΡΦΗ (2 ^{ος} μήνας κυήσεως)
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ							
Αιμοσφαιρίνη (Hb)	gr/dl		16,1	12,4	12,3		
Αιματοκρίτης (Hct)	%		47,6	37,1	37,0		
Ερυθρά αιμοσφαίρια (RBC)	(x10 ³ /cm ³)		5.330	4.290	4.060		
MCH	pg		30,2	28,9	30,3		
MCV	fl		89,3	86,5	91,1		
MCHC	%		33,8	33,4	33,2		
Λευκά	(/cm ³)		5.900	8.800	9.500		
ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ							
• Ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης σε μεμβράνη οξεικής κυταρρίνης-Αιμοσφαιρινικά κλάσματα			A ₂ -F-A	A ₂ -F-A	A ₂ -F-A		
• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης A ₂ (HbA ₂) - Διαχωρισμός σε στήλη DEAE:			1,98%	1,47%	1,72%		
• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης F(HbF) - Μέθοδος ΒΕΤΚΕ:							
ΕΓΚΛΕΙΣΤΑ ΕΡΥΘΡ/ΡΩΝ	-Πριν από επώαση (αδέσμευτες α- αλυσίδες)		(-)	(-)	(-)		
	-Μετά από την επώαση (αδέσμευτες β- αλυσίδες)		(-)	(-)	(-)		
• Δοκιμασία Δρεπανώσεως			(-)	(-)	(-)		
• Ωσμωτική αντίσταση ερυθροκυττάρων			(-)	(-)	(-)		
HPLC							

Hb A ₂	1,9%	2,3%	1,8%
Hb F	14,0%	13,3%	16,7%
Hb S	0,0%	0,0%	0,0%
Hb A	74,8%	75,5%	74,3%
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ			
Υποχρωμία			±
Μικροκυττάρωση	+	+	+
Ανισοκυττάρωση	±	±	±
Ποικιλοκυττάρωση			
Βεσεόφιλη στίξη			
Πολυχρωματοφιλία			
Στοχοκυττάρωση			
Μακροκυττάρωση			
Στοματοκυττάρωση			
Σφαιροκυττάρωση			

9Η.

		ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ		
		ενηλίκου ανδρός με Αιμοσφαι- ρινοπάθεια H	ενηλίκου γυναίκος (μη εγκύου) με Αιμοσφαι- ρινοπάθεια H	ενηλίκου γυναίκος (1 ^{ος} μήνας κυήσεως) με Αιμοσφαι- ρινοπάθεια H
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ				
Αιμοσφαιρίνη (Hb)	gr/dl	11,1	9,2	8,2
Αιματοκρίτης (Hct)	%	38,1	34,2	29,3
Ερυθρά αιμοσφαίρια (RBC)	(x10 ³ /cm ³)	6.300	5.130	4.820
MCH	pg	17,6	17,9	17,0
MCV	fl	60,5	66,7	60,8
MCHC	%	29,1	26,9	28,0
Λευκά	(/cm ³)	6.000	6.200	8.600
ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ				
• Ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης σε μεμβράνη οξεικής κυταρρίνης-Αιμοσφαιρινικά κλάσματα		A ₂ -A-H≈10%	A ₂ -A-H≈8%	A ₂ -A-H≈10%
• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης A ₂ (HbA ₂) - Διαχωρισμός σε στήλη DEAE:		1,44%	1,87%	1,56%
• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης F(HbF) - Μέθοδος ΒΕΤΚΕ:		<2%	<2%	<2%
ΕΓΚΛΕΙΣΤΑ ΕΡΥΘΡ/ΡΩΝ	- Πριν από επώαση (αδέσμευτες α-αλυσίδες) - Μετά από την επώαση (αδέσμευτες β-αλυσίδες)	(-) (++++) έγκλειστα στο 90% των	(-) (++++) έγκλειστα στο 90% των	(-) (++++) έγκλειστα στο 90% των κυττάρων

	κυττάρων	κυττάρων	
• Δοκιμασία Δρεπανώσεως	(-)	(-)	(-)
• Ωσμωτική αντίσταση ερυθροκυττάρων	(+)	(+)	(+)
HPLC			
Hb A ₂	1,5%	2,7%	1,7%
Hb F	0,0%	1,3%	0,4%
Hb S	0,0%	0,0%	0,0%
Hb A	91,2%	89,8%	92,2%
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ			
Υποχρωμία	+++	+++	+++
Μικροκυττάρωση	+	+ / ++	++
Ανισοκυττάρωση	+++	+++	+++
Ποικιλοκυττάρωση	++	++	+++
Βεσέοφιλη στίξη	+	+	+
Πολυχρωματοφιλία	+	+	+
Στοχοκυττάρωση	+	+	+
Μακροκυττάρωση	+	+	+
Στοματοκυττάρωση	+	+	+
Σφαιροκυττάρωση	+	+	+

90.

		ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ		
		ετεροζύγου Hb-Lepore ενηλίκου ανδρός	ετεροζύγου Hb-Lepore ενηλίκου γυναίκος (μη εγκύου)	ετεροζύγου Hb-Lepore ενηλίκου γυναίκος (2 ^{ος} μήνας κυήσεως)
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ				
Αιμοσφαιρίνη (Hb)	gr/dl	13.3	12,2	9.0
Αιματοκρίτης (Hct)	%	42.2	35,9	29.6
Ερυθρά αιμοσφαίρια (RBC)	(x10 ³ /cm ³)	5.800	5.840	4.650
MCH	pg	22.9	20,9	19,4
MCV	fl	72.8	61,5	63,7
MCHC	%	31.5	34,0	30,4
Λευκά	(/cm ³)	5.600	8.400	10.100
ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ				
• Ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης σε μεμβράνη οξεικής κυταρρίνης-Αιμοσφαιρινικά κλάσματα		A ₂ -Lepore≈ 10%-A	A ₂ -Lepore≈ 10%-A	A ₂ -Lepore≈ 10%-A
• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης A ₂ (HbA ₂) - Διαχωρισμός σε στήλη DEAE:		2,98%	2,88	2,26%
• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης F(HbF) - Μέθοδος ΒΕΤΚΕ:		<2%	<2%	<2%
ΕΓΚΛΕΙΣΤΑ ΕΡΥΘΡ/ΡΩΝ	- Πριν από επώαση (αδέσμευτες α-	(+)	(+)	(+)

	αλυσίδες) - Μετά από την επώαση (αδέσμευτες β- αλυσίδες)	(-)	(-)	(-)
• Δοκιμασία Δρεπανώσεως				
• Ωσμωτική αντίσταση ερυθροκυττάρων				
HPLC				
Hb A ₂ + Hb Lepore		12,3%	13,4%	11,0%
Hb F		1,4%	2,1%	1,4%
Hb S		0,0%	0,0%	0,0%
Hb A		76,7%	74,1%	77,3%
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ				
Υποχρωμία		++	++	++
Μικροκυττάρωση		++	++	+ / ++
Ανισοκυττάρωση		++	++	++
Ποικιλοκυττάρωση		++	++	+
Βεσεόφιλη στίξη		+	+	+
Πολυχρωματοφιλία		+	+	+
Στοχοκυττάρωση		+	+	+
Μακροκυττάρωση				
Στοματοκυττάρωση				
Σφαιροκυττάρωση				

91.

					ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ		
					διπλού ετεροζυγώτ η (HbS+α- MA) ενηλίκου ανδρός	διπλού ετεροζυγώτ η (HbS+α- MA) ενηλ. γυν. (μη εγκύου)	διπλού ετεροζυγώτ η (HbS+α- MA) ενηλ. γυν. (2 ^{ος} μήνας κυήσεως)
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ							
Αιμοσφαιρίνη (Hb)	gr/dl		14,0	13,0	11,2		
Αιματοκρίτης (Hct)	%		43,9	43,1	36,9		
Ερυθρά αιμοσφαίρια (RBC)	(x10 ³ /cm ³)		6.120	6.130	5.410		
MCH	pg		22,9	21,2	20,7		
MCV	fl		71,7	70,3	68,2		
MCHC	%		31,9	30,2	30,4		
Λευκά	(/cm ³)		5.400	7.200	5.800		
ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ							
• Ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης σε μεμβράνη οξεικής κυταρρίνης-Αιμοσφαιρινικά κλάσματα			A ₂ -S≈25%- A	A ₂ -S≈25%- A	A ₂ -S≈25%- A		
• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης A ₂ (HbA ₂) - Διαχωρισμός σε στήλη DEAE:			2,85%	2,05%	2,25%		
• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης F(HbF)			<2%	<2%	<2%		

- Μέθοδος ΒΕΤΚΕ:				
ΕΓΚΛΕΙΣΤΑ ΕΡΥΘΡ/ΡΩΝ	- Πριν από επώαση (αδέσμευτες α- αλυσίδες)	(-)	(-)	(-)
	- Μετά από την επώαση (αδέσμευτες β- αλυσίδες)	(+)	(+)	(+)
• Δοκιμασία Δρεπανώσεως		(+)	(+)	(+)
• Ωσμωτική αντίσταση ερυθροκυττάρων		(+)	(+)	(+)
HPLC				
Hb A ₂ (+ τμήμα της Hbs)		3,8%	4,3%	4,7%
Hb F		0,7%	0,5%	0,8%
Hb S		24,8%	25,9%	25,3%
Hb A		64,4%	63,4%	63,3%
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ				
Υποχρωμία		++	++	++
Μικροκυττάρωση		++	++	++
Ανισοκυττάρωση		++	++	++
Ποικιλοκυττάρωση		++	++	++
Βεσεόφιλη στίξη				
Πολυχρωματοφιλία		+	+	+
Στοχοκυττάρωση		+	+	+
Μακροκυττάρωση				
Στοματοκυττάρωση				
Σφαιροκυττάρωση				

9Κ.

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ				
		διπλού ετεροζυγώτ η (β-MA+α- MA) ενηλίκου ανδρός	διπλού ετεροζυγώτ η (β-MA+α- MA) ενηλ. γυν. (μη εγκύου)	διπλού ετεροζυγώτη (β-MA+α-MA) ενηλ. γυν. (3 ^{ος} μήνας κυήσεως)
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ				
Αιμοσφαιρίνη (Hb)	gr/dl	11,9	11,2	9,7
Αιματοκρίτης (Hct)	%	40,6	36,3	33,4
Ερυθρά αιμοσφαίρια (RBC)	(x10 ³ /cm ³)	4.780	5.090	5.880
MCH	pg	24,9	22,0	16,4
MCV	fl	84,9	71,3	56,7
MCHC	%	29,3	30,9	29,0
Λευκά	(/cm ³)	4.700	4.800	9.000
ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ				
• Ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης σε μεμβράνη οξεικής κυταρρίνης-Αιμοσφαιρινικά κλάσματα		A ₂ -A	A ₂ -A	A ₂ -A

• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης A ₂ (HbA ₂) - Διαχωρισμός σε στήλη DEAE:		5,11%	4,75%	5,00%
• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης F(HbF) - Μέθοδος ΒΕΤΚΕ:		<2%	<2%	<2%
ΕΓΚΛΕΙΣΤΑ ΕΡΥΘΡ/ΡΩΝ	- Πριν από επώαση (αδέσμευτες α- αλυσίδες)	(+)	(+)	(+)
	- Μετά από την επώαση (αδέσμευτες β- αλυσίδες)	(+)	(+)	(+)
• Δοκιμασία Δρεπανώσεως		(-)	(-)	(-)
• Ωσμωτική αντίσταση ερυθροκυττάρων		(+)	(+)	(+)
HPLC				
Hb A ₂				
Hb F				
Hb S				
Hb A				
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ				
Υποχρωμία		++	++	++
Μικροκυττάρωση		++	++	++
Ανισοκυττάρωση		++	++	++
Ποικιλοκυττάρωση		++	++	++
Βεσέφιλη στίξη		+	+	+
Πολυχρωματοφιλία		+	+	+
Στοχοκυττάρωση		+	+	+
Μακροκυττάρωση				
Στοματοκυττάρωση				
Σφαιροκυττάρωση		+	+	+

9Α.

		ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ		
		ετεροζυγώτ η HbD Punjab ενηλίκου ανδρός	ετεροζυγώτ η HbD Punjab ενηλ. γυν. (μη εγκύου)	ετεροζυγώτ HbD Punjab ενηλ. γυν. (2 ^{ος} μήνας κυήσεως)
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ				
Αιμοσφαιρίνη (Hb)	gr/dl	15,8	12,6	12,9
Αιματοκρίτης (Hct)	%	44,6	38,9	37,8
Ερυθρά αιμοσφαίρια (RBC)	(x10 ³ /cm ³)	5.210	4.800	4.350
MCH	pg	30,3	26,3	29,7
MCV	fl	85,6	81,0	86,9
MCHC	%	35,4	32,4	34,1
Λευκά	(/cm ³)	4.590	5.700	9.100
ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ				
• Ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης σε		A ₂ -D≈40%-	A ₂ -D≈40%-	A ₂ -D≈40%-A

μεμβράνη οξεικής κυταρρίνης-Αιμοσφαιρινικά κλάσματα	A	A	
• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης A ₂ (HbA ₂) - Διαχωρισμός σε στήλη DEAE:	1,95%	1,80%	1,56
• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης F(HbF) - Μέθοδος ΒΕΤΚΕ:	<2%	<2%	<2%
ΕΓΚΛΕΙΣΤΑ ΕΡΥΘΡ/ΡΩΝ	- Πριν από επώαση (αδέσμευτες α-αλυσίδες)	(-)	(-)
	- Μετά από την επώαση (αδέσμευτες β-αλυσίδες)	(-)	(-)
• Δοκιμασία Δρεπανώσεως	(-)	(-)	(-)
• Ωσμωτική αντίσταση ερυθροκυττάρων	(+)	(+)	(+)
HPLC			
Hb A ₂	1,7%	1,9%	1,1%
Hb F	0,6%	0,4%	0,5%
Hb S	38,4%	36,8%	39,5%
Hb A	50,4%	52,1%	52,9%
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ			
Υποχρωμία	+	+	+
Μικροκυττάρωση	+	+	+
Ανισοκυττάρωση	+	+	+
Ποικιλοκυττάρωση		+	-
Βεσεόφιλη στίξη		-	
Πολυχρωματοφιλία			
Στοχοκυττάρωση			
Μακροκυττάρωση			
Στοματοκυττάρωση			
Σφαιροκυττάρωση			

9M.

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ			
διπλού ετεροζυγώτη (β-MA+HbD ενηλίκου ανδρός)	διπλού ετεροζυγώτη (β-MA+HPF H) ενηλίκου ανδρός	διπλού ετεροζυγώτη (β-MA+Hb Lepore) ενηλίκου ανδρός	διπλού ετεροζυγώτη (α-MA+δβ-MA) ενηλίκου ανδρός

ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ					
Αιμοσφαιρίνη (Hb)	gr/dl	9,6	11,6	7,6	13,4
Αιματοκρίτης (Hct)	%	31,2	34,7	24,9	43,4
Ερυθρά αιμοσφαίρια (RBC)	(x10 ³ /cm ³)	4.530	5.960	3.670	5.680
MCH	pg	21,2	19,5	20,7	23,6
MCV	fl	68,9	58,2	6738	76,4
MCHC	%	30,8	33,4	30,5	30,9
Λευκά	(/cm ³)	10.500	9.430	8.300	6.300

ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ					
• Ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης σε μεμβράνη οξεικής κυταρρίνης-Αιμοσφαιρινικά κλάσματα		A ₂ - D≈85%- F≈20%-A ίχνη	A ₂ - F≈30%-A	A ₂ -Lepore- F-A ίχνη	A ₂ --F10%- A
• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης A ₂ (HbA ₂) - Διαχωρισμός σε στήλη DEAE:		3,12%	4,32%	3,50%	2,90%
• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης F(HbF) - Μέθοδος ΒΕΤΚΕ:		19,57 %	29,72%	37,48%	10,56%
ΕΓΚΛΕΙΣΤΑ ΕΡΥΘΡ/ΡΩΝ	-Πριν από επώαση (αδέσμευτες α- αλυσίδες)	(+)	(+)	(+)	(-)
	-Μετά από την επώαση (αδέσμευτες β- αλυσίδες)	(-)	(-)	(-)	(+)
• Δοκιμασία Δρεπανώσεως		(-)	(-)	(-)	(-)
• Ωσμωτική αντίσταση ερυθροκυττάρων		(+)	(+)	(+)	(+)
HPLC					
Hb A ₂					
Hb F					
Hb S					
Hb A					
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ					
Υποχρωμία		+++	++	+++	++
Μικροκυττάρωση		+ / ++	++	+	++
Ανισοκυττάρωση		+++	++	+++	++
Ποικιλοκυττάρωση		++	++	++	++
Βεσέφιλη στίξη		+	+	+	+
Πολυχρωματοφιλία		+	+	+	+
Στοχοκυττάρωση		+	+	+	+
Μακροκυττάρωση		+		+	
Στοματοκυττάρωση		+		+	
Σφαιροκυττάρωση		+	+	+	

9N.

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ					
διπλού ετεροζυγώτ η (δβ- MA+HPFH) ενηλίκου γυναϊκός					
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ					
Αιμοσφαιρίνη (Hb)	gr/dl	12,3			
Αιματοκρίτης (Hct)	%	36,6			
Ερυθρά αιμοσφαίρια (RBC)	(x10 ³ /cm ³)	5.050			
MCH	pg	24,4			
MCV	fl	72,5			

MCHC	%	33,6			
Λευκά	(/cm ³)	9.600			
ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ					
• Ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης σε μεμβράνη οξεικής κυταρρίνης-Αιμοσφαιρινικά κλάσματα		A ₂ -F≈40%-A			
• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης A ₂ (HbA ₂) - Διαχωρισμός σε στήλη DEAE:		1,43%			
• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης F(HbF) - Μέθοδος ΒΕΤΚΕ:		37,03 %			
ΕΓΚΛΕΙΣΤΑ ΕΡΥΘΡ/ΡΩΝ	- Πριν από επώαση (αδέσμευτες α- αλυσίδες)	(+)			
	- Μετά από την επώαση (αδέσμευτες β- αλυσίδες)	(-)			
• Δοκιμασία Δρεπανώσεως		(-)			
• Ωσμωτική αντίσταση ερυθροκυττάρων		(+)			
Hb A₂					
Hb F					
Hb S					
Hb A					
Υποχρωμία					
		++			
Μικροκυττάρωση					
		++			
Ανισοκυττάρωση					
		++			
Ποικιλοκυττάρωση					
		++			
Βεσεόφιλη στίξη					
		+			
Πολυχρωματοφιλία					
		+			
Στοχοκυττάρωση					
		+			
Μακροκυττάρωση					
Στοματοκυττάρωση					
Σφαιροκυττάρωση					

9Ξ.

		ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ		
		ετεροζυγώτ η (Hb Agrinio/NI) ενηλίκου ανδρός	ετεροζυγώτ η (Hb Agrinio/NI) ενηλ. γυναϊκός	ομοζυγώτη (Hb Agrinio/Hb Agrinio ενηλ. γυναϊκός
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ				
Αιμοσφαιρίνη (Hb)	gr/dl	13,9	13,0	6,6
Αιματοκρίτης (Hct)	%	42,3	40,8	23,0
Ερυθρά αιμοσφαίρια (RBC)	(x10 ³ /cm ³)	5.130	5.290	3.800
MCH	pg	27,2	24,8	18,9

MCV	fl	82,5	77,1	65,7
MCHC	%	32,3	31,9	28,7
Λευκά	(/cm ³)	8.300	6.700	7.700
ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ				
• Ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης σε μεμβράνη οξεικής κυταρρίνης-Αιμοσφαιρινικά κλάσματα		A ₂ -A	A ₂ -A	A ₂ -A
• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης A ₂ (HbA ₂) - Διαχωρισμός σε στήλη DEAE:		2,6%	2,75	2,7%
• Μέτρηση αιμοσφαιρίνης F(HbF) - Μέθοδος ΒΕΤΚΕ:		<2%	<2%	1,9%
ΕΓΚΛΕΙΣΤΑ ΕΡΥΘΡ/ΡΩΝ	- Πριν από επώαση (αδέσμευτες α-αλυσίδες)	(-)	(-)	(+)
	- Μετά από την επώαση (αδέσμευτες β-αλυσίδες)	(+)	(+)	(+)
• Δοκιμασία Δρεπανώσεως		(-)	(-)	(-)
• Ωσμωτική αντίσταση ερυθροκυττάρων		(+)	(+)	(+)
HPLC				
Hb A ₂				
Hb F				
Hb S				
Hb A				
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ				
Υποχρωμία		++	++	+++
Μικροκυττάρωση		+	+	++++
Ανισοκυττάρωση		++	++	+++
Ποικιλοκυττάρωση		+	+	+++
Βεσεόφιλη στίξη				+
Πολυχρωματοφιλία		+	+	+
Στοχοκυττάρωση		+	+	+
Μακροκυττάρωση				+
Στοματοκυττάρωση				+
Σφαιροκυττάρωση				+

3.2 Αποτελέσματα σε μοριακό επίπεδο

Ο προσδιορισμός της μοριακής βλάβης έγινε με ενίσχυση του PCR (polymerase chain Reaction):

α. Της περιοχής του β-γονιδίου.

β. Της περιοχής των δ- και β-γονιδίων για την ανίχνευση της έλλειψης για δβ-θαλασσαιμία.

γ. Περιοχής του υποκινητή των Gγ και Αγ-γονιδίων. Για το Αγ-γονίδιο, αρχικά ενισχύεται με τους εκκινητές: γ₄-GCγ₄ [681 base paire (bp)] και στη συνέχεια με τους εκκινητές: γ₄-γ₆-GC γ₄ (327 bp). Για το Gγ-γονίδιο, στην 5' περιοχή, με τους εκκινητές: γ₁-GCγ₄ (678 bp) και στη συνέχεια με τους εκκινητές: γ₁-γ₆-GCγ₄ (327 bp) και

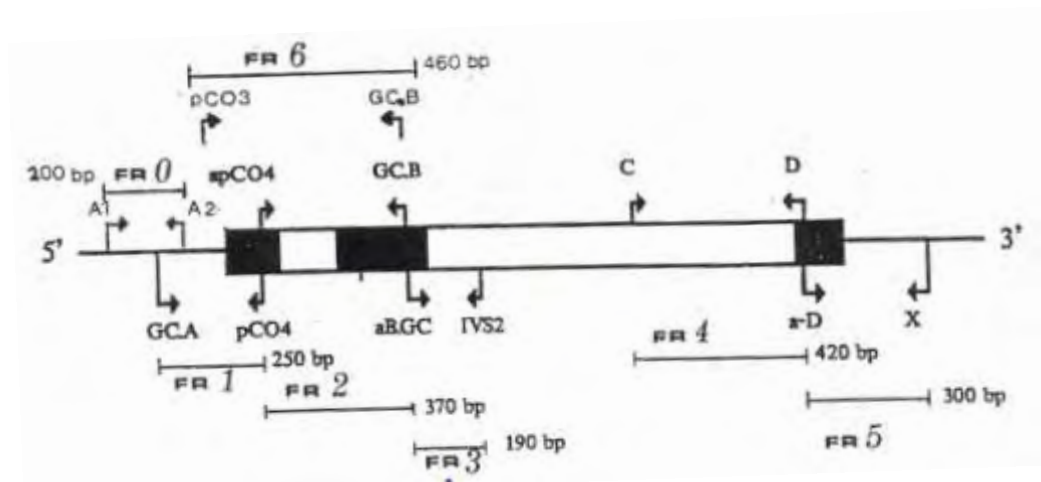
δ. Περιοχής του 3' άκρου του Αγ-γονιδίου. Η 3' περιοχή του Αγ-γονιδίου ενισχύεται με τους εκκινητές: γ₇ / α-γ₇ και στη συνέχεια το PCR προϊόν επωάζεται με το ένζυμο Ddel.

Η μελέτη του προϊόντος του PCR έγινε με DGGE ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα ακρυλαμίδης με κλίση αποδιατακτικών παραγόντων (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).

Επίσης έγινε μελέτη της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του προϊόντος της PCR με DNA Sequencing.

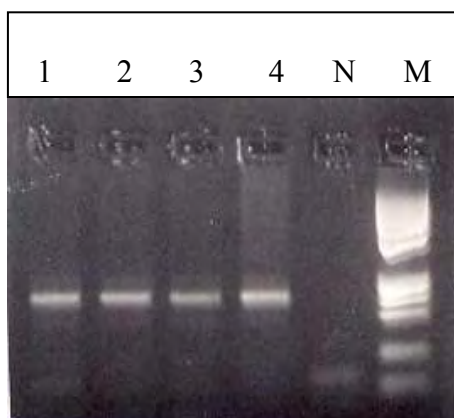
3.2.1 Εκλεκτικός πολλαπλασιασμός του β-γονιδίου

Το γονίδιο της β-σφαιρίνης προκειμένου να μελετηθεί χωρίζεται σε έξι τμήματα τα οποία καλύπτουν όλο το γονίδιο όπως και τις 3' και 5' μη μεταφραζόμενες περιοχές τα οποία πολλαπλασιάστηκαν εκθετικά με τη χρήση αντίστοιχων ζευγών εκκινητών μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Εικ. 26).

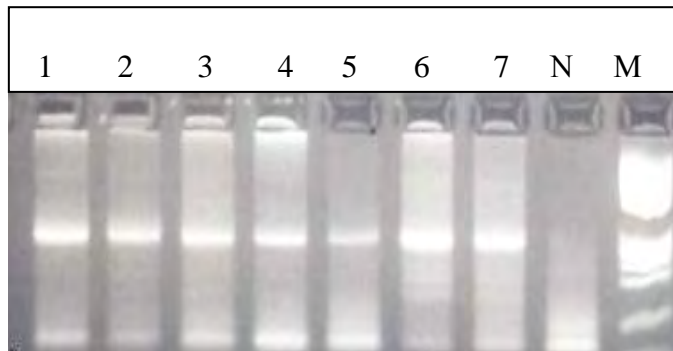


Εικόνα 26. Το γονίδιο της β-σφαιρίνης. Παρατηρούνται τα ζεύγη των ειδικών εκκινητών και ο «χωρισμός» του γονιδίου σε έξι τμήματα.

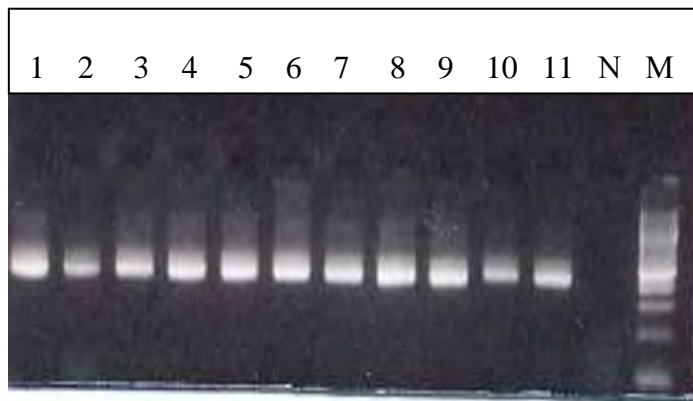
Μετά την εκλεκτική ενίσχυση κάθε τμήματος τα αποτελέσματα της αντίδρασης ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση του προϊόντος PCR σε πήκτωμα αγαρόζης. Ως μάρτυρας μεγέθους χρησιμοποιείται DNA φάγου φΧ174 που έχει υποστεί πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση HaeIII έτσι ώστε να προκύψουν τμήματα DNA με μεγέθη (σε Kb): 1.35, 1.07, 0.87, 0.60, 0.31, 0.27, 0.23, 0.19, 0.11, 0.072. Στις εικόνες 27, 28, 29, 30 που ακολουθούν φαίνονται τα προϊόντα αντίδρασης πολυμερισμού όπως προκύπτουν χρησιμοποιώντας τα αντίστοιχα ζεύγη εκκινητών.



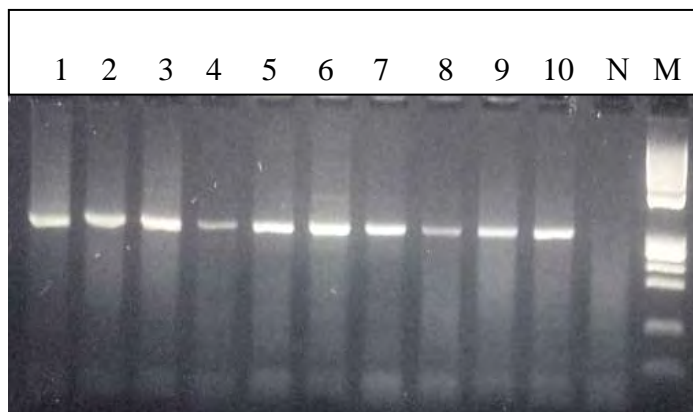
Εικόνα 27. PCR για FR₀ στα δείγματα: 1, 2, 3, 4, N, M: φΧ/HaeIII, New England Biolabs.



Εικόνα 28. PCR για FR₁ στα δείγματα 1-7, N, M: φX/HaeIII, New England Biolabs.



Εικόνα 29. PCR για FR₂ στα δείγματα 1-11, N, M:100bp, New England Biolabs.

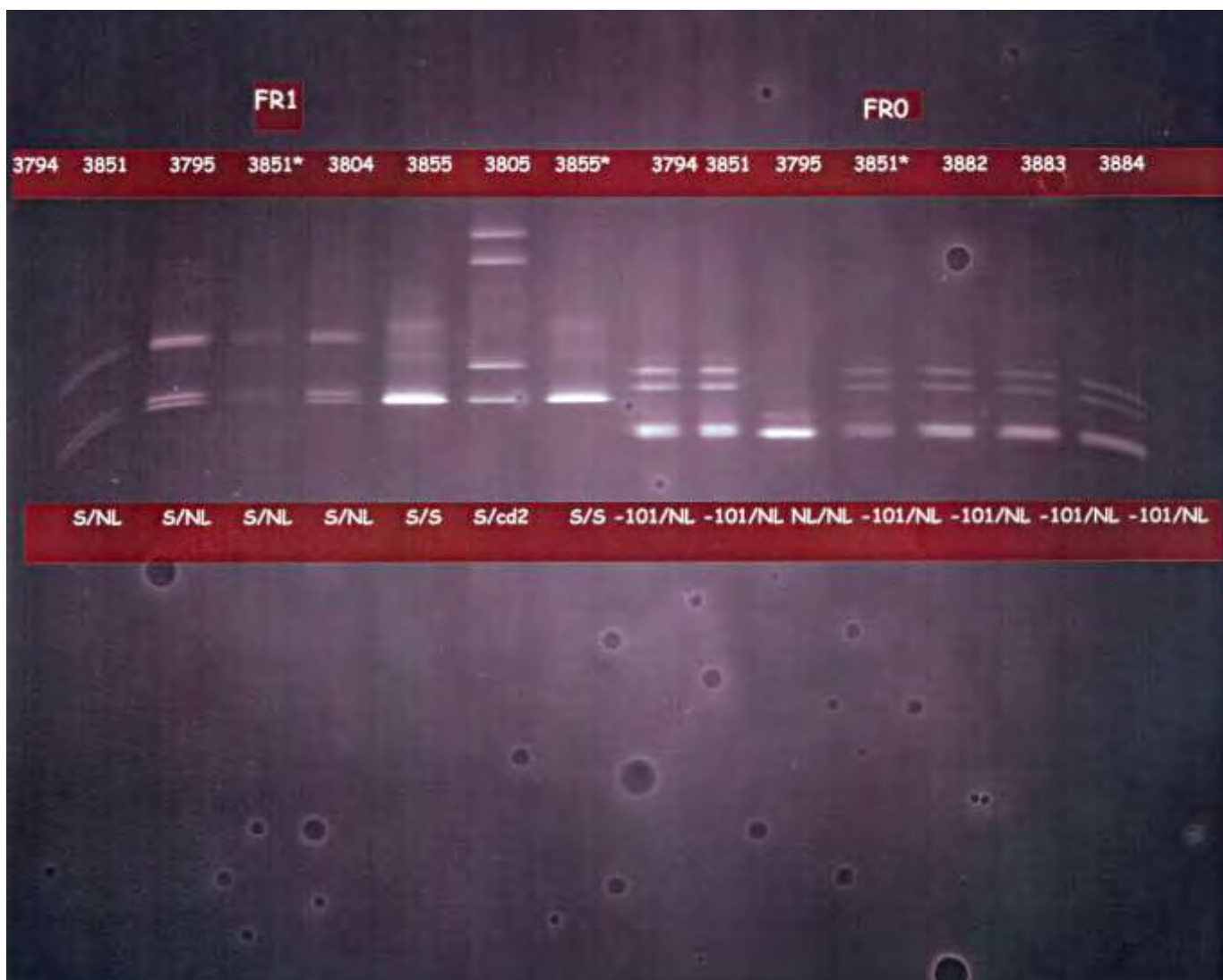


Εικόνα 30. PCR για FR₅ στα δείγματα 1-10, N, M: φX/HaeIII, New England Biolabs.

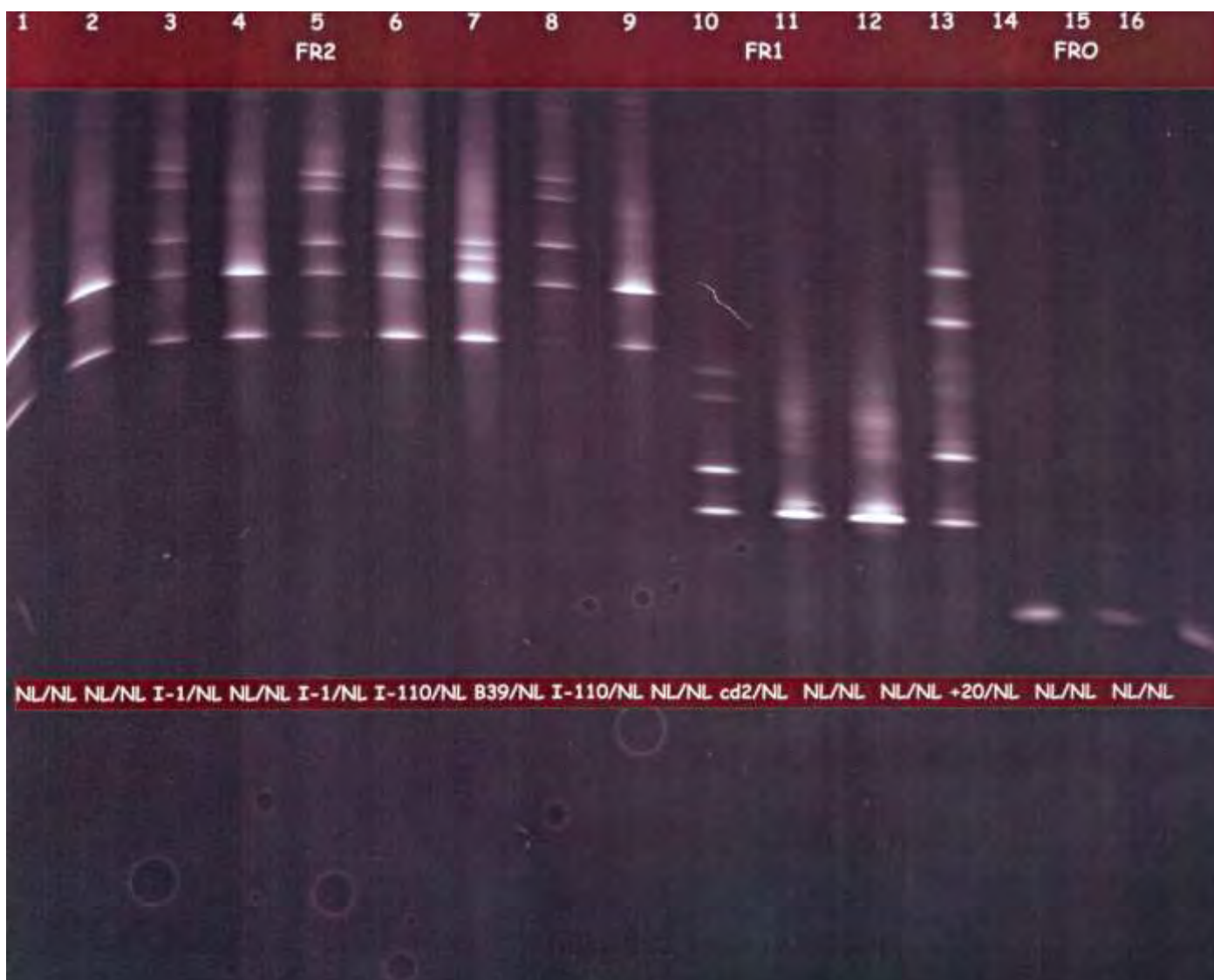
* ΣΤΙΣ θέσεις FR₀ / FR₁ / FR₂ / FR₅, ανιχνεύονται οι κάτωθι βασικές μεταλλάξεις αντίστοιχα: -101,-87 / FSC6 ή Codon6, FSC5, FSC8, IVS2-745, πολυμορφισμός +20,

HbS, Cd₂ / IVS1-1, IVS1-5, IVS1-6, IVS1-110, β39.

Στο σημείο αυτό πρέπει να τονισθεί ότι κατά την εκπόνηση της συγκεκριμένης διατριβής χρησιμοποιήθηκαν κυρίως τέσσερα ζεύγη εκκινήτων πράγμα που σημαίνει πως οι απολύτως αναγκαίες αντιδράσεις πολυμερισμού για την διάγνωση των δειγμάτων των ασθενών ήσαν αυτές των τμημάτων (fragments, FR), FR0, FR1, FR2, FR5. Ήδη από προηγούμενες μελέτες μας ήταν γνωστό το γεγονός πως οι περισσότερες μεταλλάξεις βρίσκονται στα συγκεκριμένα τμήματα του γονιδίου. Στις εικόνες 31, 32, 33, 34, 35 που ακολουθούν, αποτυπώνονται τα αποτελέσματα των μεταλλάξεων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα ακρυλαμίδης με κλίση αποδιατακτικών παραγόντων (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE).



Εικόνα 31. DGGE στα τμήματα FR₀, FR₁. Διακρίνονται οι μεταλλάξεις: -101, HbS



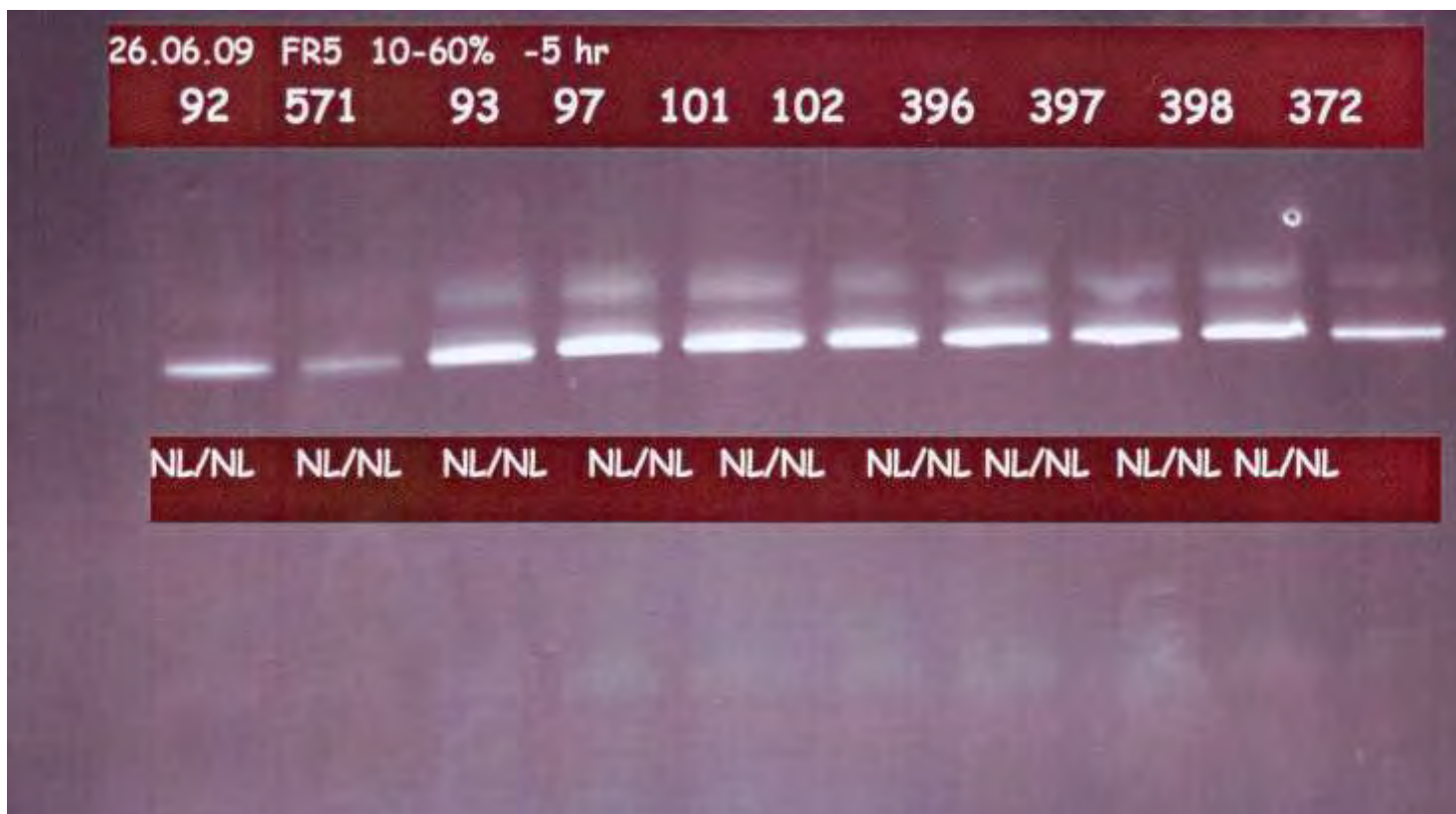
Εικόνα 32. DGGE στα τμήματα FR₀, FR₁ και FR₂. Διακρίνονται οι μεταλλάξεις: πολυμορφισμός +20, Cd₂, IVS1-110, β39, IVS1-1



Εικόνα 33. DGGE στα τμήματα FR₀, FR₂, FR₁ και FR₅. Διακρίνονται οι μεταλλάξεις: -101, IVS1-110, *cd2*.



Εικόνα 34. DGGE στα τμήματα FR₅ (ηλεκτροφόρηση διάρκειας 19 ωρών)



Εικόνα 35. DGGE στα τμήματα FR₅ (ηλεκτροφόρηση διάρκειας 5 ωρών)

3.2. Αποτελέσματα ανάλυσης σε μοριακό επίπεδο των μεταλλαγών του β-γονιδίου

Η ανάλυση με DGGE για το β-γονίδιο ανέδειξε τις παρακάτω μεταλλάξεις (Πίνακας 10, Διάγραμμα 3)

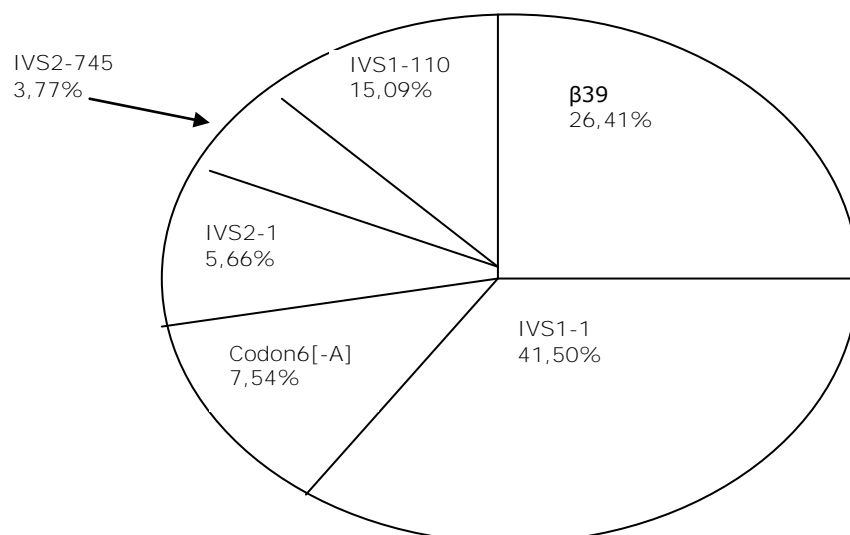
Πίνακας 10. Οι μεταλλάξεις των β-γονιδίων σε ετεροζυγώτες β-MA με αυξημένη HbF.

α/α	Μετάλλαξη	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό %	
1	B39	12	22,64 } 26,41	
2	B39 + Cd2*	2		3,77
3	IVS1-1[G>A]**	19	35,84 } 41,50	
4	IVS1-1[G>A] + α1Cd14[G>A]	1		1,88
5	IVS1-1[G>A]+Cd2	2		3,77
6	IVS1-110[G>A]	8	15,09	
7	IVS2-745[C>G]+ (πολυμορφισμός+20)	2	3,77	
8	IVS2-1[G>A]	2	3,77 } 5,66	
9	IVS2-1-[G>A]+(-3,7) για α-MA	1		1,88
10	Codon 6[-A] ή FSC-6***	4	7,54	
	Σύνολο	53	100,00	

* Cd= Codon (κωδικόνιο)

**IVS= intervening sequences ή intron (παρεμβαλλόμενη αλληλουχία ή εσώνιο)

***FSC=frameshift codon (κωδικόνιο πλαισίου ανάγνωσης), επίσης το αρνητικό πρόσημο αναφέρεται σε μεταλλάξεις στην περιοχή του προαγωγού (promotor), π.χ. -101, -87.



Κυκλικό διάγραμμα 3. Απεικόνιση των μεταλλάξεων των β-γονιδίων του ανωτέρου πίνακα, στους ετεροζυγώτες β-MA με αυξημένη HbF.

Στη συνέχεια αποτυπώνονται στους Πίνακες 11 έως 17 τα ποσοστά (%) των αιμοσφαιρινών A₂F και A καθώς και οι αντίστοιχες μεταλλάξεις στα γ-γονίδια (Aγ5', Gγ5' και Aγ3') στους φορείς β-MA με αυξημένη HbF.

Πίνακας 11. Ποσοστά των αιμοσφαιρινών A₂, F και A σε ετεροζυγώτες β-MA με αυξημένη (↑) HbF, καθώς και οι αντίστοιχες μεταλλάξεις στα γ-γονίδια.

α/α	Αρ. δειγμ.	HbA ₂ (%)	HbF (%)	HbA (%)	Μεταλλάξεις στα γ-γονίδια		
					Aγ5'	Gγ5'	Aγ3'
1	15	4,53	3,5		NI	-158	41883 A/A
2	18	4,43	6,0		NI	-158	CIA
3	19	5,1	6,9	79,7	NI	-158	CIA
4	20	4,22	12,52		NI	-158	CIA
5	47*	3,6	4,1	82,1	NI	-158	CIA
6	50	4,7	1,2	85,5	NI	-158	CIA
7	56	5,4	6,7	80,1	NI	-158	CIA
8	57	5,0	6,3	81,2	NI	-158	CIA
9	59	2,7	4,3	84,1	NI	-158	CIA
10	85	5,2	10,4	76,6	NI	-158	CIA
11	90	4,7	5,9	81,3	NI	-158	CIA
12	97	3,2	5,6	82,3	NI	-158	CIA
13	98**	3,0	5,9	82,3	NI	-158	CIA
14	102	5,6	5,3	79,9	NI	-158	CIA
15	104	5,0	6,0	80,5	NI	-158	CIA
16	117	4,6	6,2	81,8	NI	-158	CIA
17	122	5,1	3,2	83,9	NI	-158	CIA
18	145	5,5	4,6	82,4	NI	-158	
19	148	5,4	5,0	80,5	NI	-158	
20	152	4,9	11,1	76,2	NI	-158	CIA
21	83	5,4	5,2	79,4		-158	CIA
22	96	3,6	5,9	82,5		-158	A/A
23	114	2,4	9,0	80,8	-158	-158	CIA
24	17	5,9	3,9		-369	-158	CIA
25	21	4,1	8,0		del4	NI	CIA
26	25	4,6	4,4	81,8	del4	NI	CIA
27	87	5,4	6,8	80,1	del4	NI	CIA
28	108	2,7	4,9	83,2	del4	NI	CIA
29	113	4,7	4,2	83,4	del4	NI	CIA
30	103	5,7	4,1	81,8	del4		AIA
31	35	2,9	5,2	82,2	-117	NI	CIC
32	107	3,5	4,1	84,4	NI	-109	CIC
33	26	5,3	4,2	82,2	NI	NI	CIC
34	28	5,2	1,3	82,6	NI	NI	CIC
35	49	2,6	5,9	82,5	NI	NI	CIC
36	72	2,6	5,4	83,1	NI	NI	CIC
37	84	2,6	10,4	78,0	NI	N	CIC
38	105	2,8	2,2	85,0	NI	NI	CIC

39	115	5,6	3,4	82,8	NI	NI	C/C
40	123	3,2	5,6	82,8	NI	NI	A/A
41	141	5,3	4,6	81,8	NI	NI	C/C
42	146***	7,2	4,1	81,5	-369	NI	C/C
43	16	4,94	8,93			NI	C/C
44	22	4,5	18,2	71,6		NI	C/C
45	65	4,9	5,0	81,9		NI	C/C
46	66	5,6	4,5	81,8		NI	C/C
47	69	3,3	5,3	83,5	NI		C/A
48	62	5,5	5,2	80,7			C/A
49	126	5,5	6,9	79,1		NI	C/A
50	67	2,8	6,6	80,8			C/A
51	128	6,5	4,2	81,0			C/C
52	140	2,6	3,1	83,9			C/C
53	155	6,4	3,0	81,9			A/A
54	157	5,4	5,3	81,4			
55	158	5,8	4,6	82,1			C/A
56	71	5,1	6,4	79,6			
M.O.		4,53	5,72	81,43			

* IVS2-745+(πολυμορφισμός+20)

** IVS1-1+α₁Cd14[G>A] για α-MA

*** IVS2-1+(-3,7) για α-MA

Αναφορικά με τα επίπεδα της HbF, του ανωτέρου πίνακα, παρατηρούμε τα εξής:

Στις μεταλλάξεις NI /-158 στα Αγ5' / Γγ5' γονίδια, που συνοδεύονται από τις μεταλλάξεις 41883 C/A, ως επί το πλείστον, στα Αγ3' γονίδια, τα επίπεδα της HbF είναι κατά Μ.Ο. 5,99% (με γενικό Μ.Ο. 5,72%).

Επίσης στις μεταλλάξεις del4 / NI στα Αγ5' / Γγ5' γονίδια, που επίσης συνοδεύονται από τις αντίστοιχες 41883 C/A, ως προς τα Αγ3' γονίδια, τα επίπεδα της HbF είναι κατά Μ.Ο. 5,4%.

Οι μεταλλάξεις NI / NI, αντίθετα, συνοδεύονται από τις μεταλλάξεις 41883 C/C στα Αγ3' γονίδια και έχουν κατά Μ.Ο. 5,99% HbF.

Στους συγκεκριμένους ετεροζυγώτες β-MA με αυξημένη HbF, τα ποσοστά που αντιπροσωπεύουν οι μεταλλάξεις Αγ5' / Γγ5' είναι: NI/-158 50%, del4 / NI 13,63% και NI / NI 36,36%.

Παρατηρήθηκαν επίσης οι μεταλλάξεις

α. -369 / -158 με αντίστοιχη 41883 C/A και HbF 3,9%

β. Ο ομοζυγώτης -158 / -158 με 41883 C/A και HbF 9%

γ. Η -117 / NI με 41883 C/C και HbF 5,2% και

δ. Η νέα μετάλλαξη NI / -109 στα Αγ5' / Γγ5' γονίδια και αντίστοιχα 41883 C/C στα Αγ3' γονίδια με HbF 4,1%.

Πίνακας 12. Η μετάλλαξη β39

α/α	Αρ. δειγμ.	HbA2 (%)	HbF (%)	HbA (%)	Μεταλλάξεις στα γ-γονίδια		
					Aγ5'	Gγ5'	Aγ3'
1	21	4,1	8,0		del4	NI	C/A
2	25	4,6	4,4	81,8	del4	NI	C/A
3	87	5,4	6,8	80,1	del4	NI	C/A
4	103	5,7	4,1	81,8	del4		A/A
5	85	5,2	10,4	76,6	NI	-158	C/A
6	104	5,0	6,0	80,5	NI	-158	C/A
7	96	3,6	5,9	82,5		-158	A/A
8	107	3,5	4,1	84,4	NI	-109	C/C
9	26	5,3	4,2	82,2	NI	NI	C/C
10	126	5,5	6,9	79,1		NI	C/A
11	62	5,5	5,2	80,7			C/A
12	158	5,8	4,6	82,1			C/A
13	155	6,4	3,0	81,9			A/A
14	71	5,1	6,4	79,6			
M.O.		5,05	5,71	81,02			

*β39+Cd2

Στη μετάλλαξη β39, ως προς τα Aγ5'/Gγ5' γονίδια παρατηρούνται οι μεταλλάξεις: del4/NI, NI/-158, NI/-109 και NI/NI.

Πίνακας 13. Η μετάλλαξη IVS1-1 [G>A]

α/α	Αρ. δειγμ.	HbA2 (%)	HbF (%)	HbA (%)	Μεταλλάξεις στα γ-γονίδια		
					Aγ5'	Gγ5'	Aγ3'
1	114	2,4	9,0	80,8	-158	-158	C/A
2	117	4,6	6,2	81,8	NI	-158	C/A
3	98*	3,0	5,9	82,3	NI	-158	C/A
4	97	3,2	5,6	82,3	NI	-158	C/A
5	56	5,4	6,7	80,1	NI	-158	C/A
6	59	2,7	4,3	84,1	NI	-158	C/A
7	145	5,5	4,6	82,4	NI	-158	
8	108	2,7	4,9	83,2	del4	NI	C/A
9	113	4,7	4,2	83,4	del4	NI	C/A
10	35**	2,9	5,2	82,2	-117	NI	C/C
11	28	5,2	1,3	82,6	NI	NI	C/C
12	49	2,6	5,9	82,5	NI	NI	C/C
13	72	2,6	5,4	83,1	NI	NI	C/C
14	84	2,6	10,4	78,0	NI	NI	C/C
15	105	2,8	2,2	85,0	NI	NI	C/C
16	115	5,6	3,4	82,8	NI	NI	C/C
17	141	5,3	4,6	81,8	NI	NI	C/C
18	22	4,5	18,2	71,6		NI	C/C
19	16	4,94	8,93			NI	C/C
20	67**	2,8	6,6	80,8			C/A
21	128	6,5	4,2	81,0			C/C
22	157	5,4	5,3	81,4			
M.O.		3,99	6,04	81,58			

*IVS1-1+α₁ Cd14[G>A]

** IVS1-1+Cd2

Στη μετάλλαξη IVS1-1[G>A] επικρατούν αντίστοιχα οι μεταλλάξεις: NI/-158, del4/NI και NI/NI, καθώς και η μετάλλαξη -117/NI.

Πίνακας 14. Η μετάλλαξη IVS1-110 [G>A]

α/α	Αρ. δειγμ.	HbA2 (%)	HbF (%)	HbA (%)	Μεταλλάξεις στα γ-γονίδια		
					Aγ5´	Gγ5´	Aγ3´
1	19	5,1	6,9	79,7	NI	-158	C/A
2	20	4,22	12,52		NI	-158	C/A
3	50	4,7	1,2	85,5	NI	-158	C/A
4	57	5,0	6,3	81,2	NI	-158	C/A
5	90	4,7	5,9	81,3	NI	-158	C/A
6	65	4,9	5,0	81,9		NI	C/C
7	66	5,6	4,5	81,8		NI	C/C
8	69	3,3	5,3	83,5	NI		C/A
M.O		4,69	5,95	82,12			

Πίνακας 15. Η μετάλλαξη IVS2-745 [C>G]

α/α	Αρ. δειγμ.	HbA2 (%)	HbF (%)	HbA (%)	Μεταλλάξεις στα γ-γονίδια		
					Aγ5´	Gγ5´	Aγ3´
1	122	5,1	3,2	83,9	NI	-158	C/A
2	47*	3,6	4,1	82,1	NI	-158	C/A
M.O		4,35	3,65	83,00			

*IVS2-745+(πολυμορφισμός+20)

Πίνακας 16. Η μετάλλαξη IVS2-1 [G>A]

α/α	Αρ. δειγμ.	HbA2 (%)	HbF (%)	HbA (%)	Μεταλλάξεις στα γ-γονίδια		
					Aγ5´	Gγ5´	Aγ3´
1	102	5,6	5,3	79,9	NI	-158	C/A
2	83	5,4	5,2	79,4		-158	C/A
3	146*	7,2	4,1	81,5	-369	NI	C/C
M.O		6,06	4,86	80,26			

*IVS2-1+(-3,7) για α-M.A

Πίνακας 17. Η μετάλλαξη Codon6 [-A] ή FSC-6

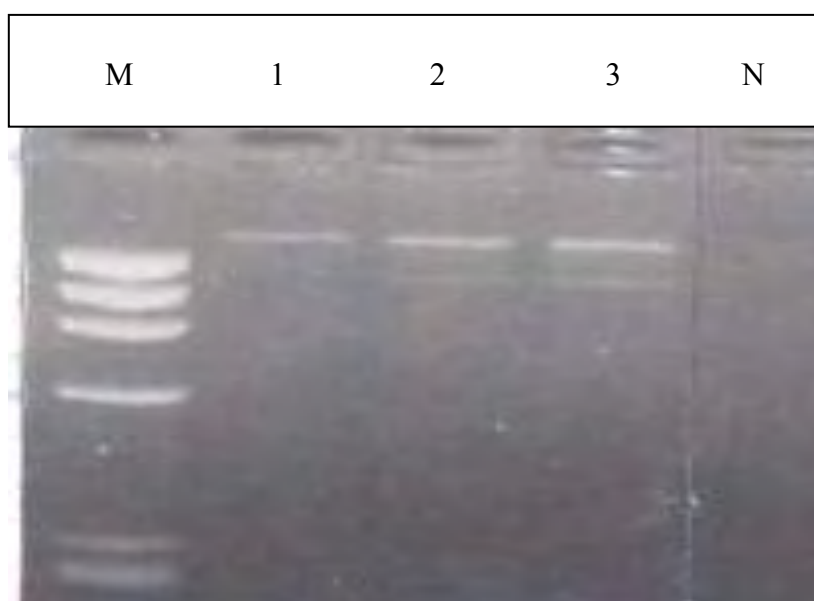
α/α	Αρ. δειγμ.	HbA2 (%)	HbF (%)	HbA (%)	Μεταλλάξεις στα γ-γονίδια		
					Aγ5´	Gγ5´	Aγ3´
1	17	5,9	3,9		-369	-158	C/A
2	18	4,43	6,0		NI	-158	C/A
3	152	4,9	11,1	76,2	NI	-158	C/A
4	148	5,4	5,0	80,5	NI	-158	
M.O		5,15	6,5	78,35			

3.2.3. Αποτελέσματα των μεταλλάξεων σε μοριακό επίπεδο της $\delta\beta$ -MA

Με την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, για τα φυσιολογικά άτομα προκύπτει ένα τμήμα DNA. Για τα ετερόζυγα άτομα $\delta\beta$ -MA προκύπτουν δύο τμήματα DNA, που αντιστοιχούν στο φυσιολογικό χρωμόσωμα και σε αυτό με την έλλειψη.

Επίσης ένα τμήμα DNA μεγαλύτερου όμως μεγέθους προκύπτει και για ένα άτομο ομόζυγο για $\delta\beta$ -MA Σικελικού τύπου.

Με την ανωτέρω διαδικασία πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση ετεροζυγώντων $\delta\beta$ -MA Σικελικού τύπου (Εικ. 36) η οποία οφείλεται σε έλλειψη DNA μήκους 13,4 Kb.



Εικόνα 36. Ανίχνευση ελλείψεων, υπεύθυνων για $\delta\beta$ -MA Σικελικού τύπου. N: αρνητικός μάρτυρας, M: φχ 174/Hae III, New England Biolabs. 1: NI/NI, 2, 3: ετεροζυγώτες $\delta\beta$ -MA Σικελικού τύπου.

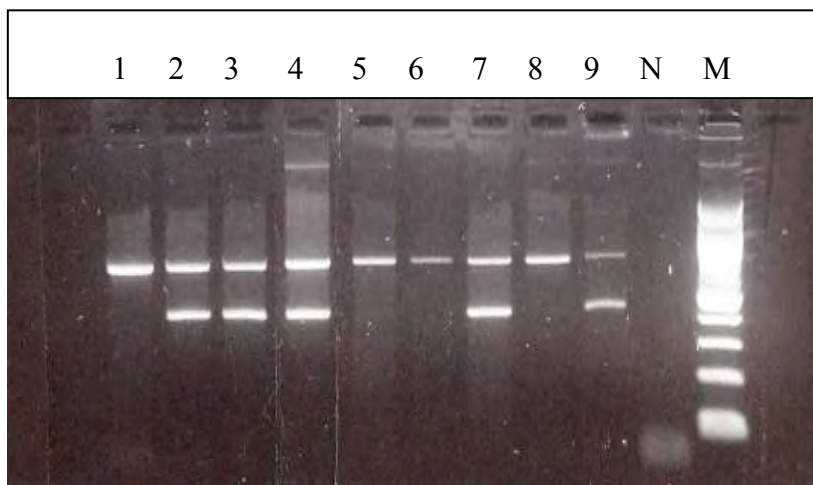
Ο τύπος αυτός, ενώ απαντά σε μεγάλη συχνότητα στο σύνολο του ελληνικού πληθυσμού, σε σχέση με τους ετεροζυγώντες $\delta\beta$ -MA Τουρκικού τύπου, παρατηρείται εντελώς το αντίθετο στους φορείς $\delta\beta$ -MA, που εξετάζονται στην παρούσα διατριβή.

Τα επίπεδα της HbF είναι εξαιρετικά ετερογενή και κυμαίνονται για μεν τους φορείς $\delta\beta$ -MA Τουρκικού τύπου από 3,9% έως 28,5%, με Μ.Ο. 13,42%, για δε τους φορείς $\delta\beta$ -MA Σικελικού τύπου από 3,9% έως 18,8% με Μ.Ο. 10,06%.

Όσον αφορά τις αιματολογικές παραμέτρους, τους αιματολογικούς δείκτες, τις βιοχημικές τιμές κ.λπ. και εν γένει τους φαινοτύπους και των δύο τύπων ετεροζυγώντων $\delta\beta$ -MA που παρατηρήθηκαν αυτοί είναι αντίστοιχοι με τυπικούς

φορείς β-MA με εξαίρετη την HbA₂ που κυμαίνεται σε φυσιολογικά επίπεδα δηλαδή: 2,0-3,2% με μέτρηση σε HPLC (Variant™ του οίκου Bio-Rad) ή 1,8-3% σε κλασσικές στήλες χρωματογραφίας DEAE. Ενίοτε δε προς τα χαμηλότερα φυσιολογικά επίπεδα.

Η δβ-MA Τουρκικού τύπου οφείλεται σε δύο ελλείψεις τμήματος DNA μήκους 11,5 kb και 1,6 Kb καθώς και σε μια αναστροφή τμήματος DNA μήκους 7,6 Kb (Εικ. 37).

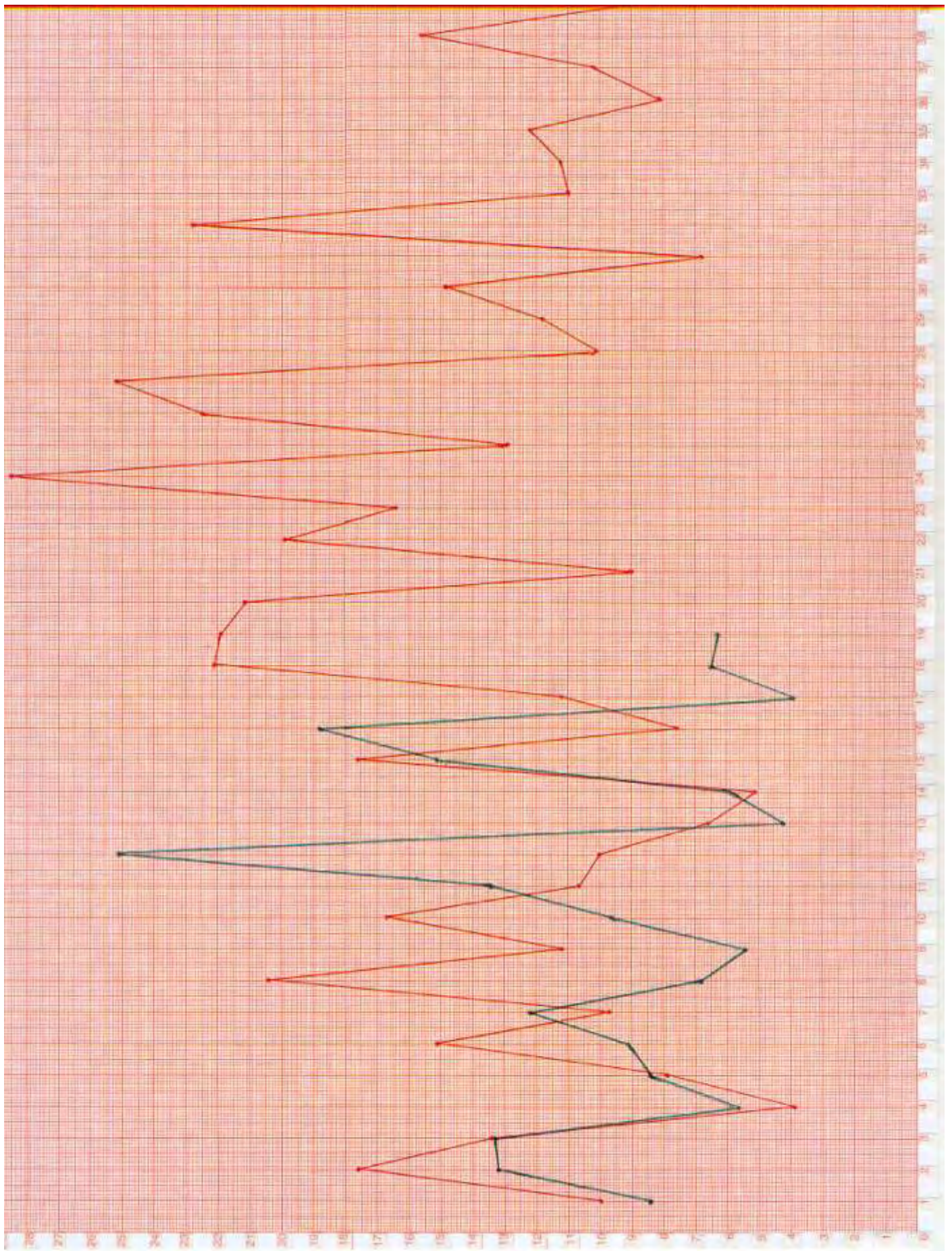


Εικόνα 37. Ανίχνευση ελλείψεων, υπεύθυνων για δβ-MA Τουρκικού τύπου, N: αρνητικός μάρτυρας, M: 100 bp, New England Biolabs. 1, 5, 6, 8: NI/NI, 2, 3, 4, 7, 9: ετεροζυγώτες δβ-MA Τουρκικού τύπου.

Αναφορικά με τα επίπεδα HbF σε ετεροζυγώτες δβ-MA (Σικελικού και Τουρκικού τύπου), (Μέτρηση σε στήλη HPLC σε Variant™ του οίκου Bio-Rad), παρατηρείται μεγάλη διαφοροποίηση στις αντίστοιχες τιμές (Γραφική παράσταση 1). Αντίθετα στα επίπεδα της HbA₂ δεν υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση των ποσοστών, στους δύο τύπους ετεροζυγωτών δβ-MA. Σε ότι αφορά τα επίπεδα της HbA η ελάττωσή της είναι αντίστοιχη της αύξησης της HbF:

M.O. HbF στους φορείς δβ-MA (Turk) 13,42%

M.O. HbF στους φορείς δβ-MA (Sic) 10,06%



Γραφική παράσταση 1. Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων της αιμοσφαιρίνης HbF στους ετεροζυγώτες δβ-ΜΑ.

- Τουρκικού τύπου
- Σικελικού τύπου

3.2.3.1 Μελέτη (γονοτυπική και φαινοτυπική) της δβ-Μεσογειακής Αναιμίας

Η κατανομή των περιπτώσεων της δβ-ΜΑ βάσει των φαινοτυπικών-αιματολογικών δεδομένων είναι: 0,34% στο σύνολο του ελληνικού πληθυσμού* και 0,87% στο σύνολο του πληθυσμού στο Ν. Καρδίτσας**

Αναφορικά με τη μελέτη του προϊόντος του PCR, σε μοριακό επίπεδο, για τους ετεροζυγώτες δβ-ΜΑ, βρέθηκαν οι κάτωθι μεταλλάξεις (Πίνακας 18).

Πίνακας 18: Κατανομή ετεροζυγωτών δβ-ΜΑ στο νομό Καρδίτσας σε σχέση με το σύνολο του ελληνικού πληθυσμού

Τύπος δβ-ΜΑ	Άτομα	Ποσοστό % στο Ν. Καρδίτσας	Ποσοστό % πανελλαδικά
δβ-sic (Σικελικός)	13	23,2	94,9
δβ-Turk (Τουρκικός)	42	76,8	5,1
ΣΥΝΟΛΟ	56	100,0	100,0

* Στοιχεία της Μ.Π.Μ.Α.

** Στοιχεία του Κ.Μ.Α.

Στον Πίνακα 18 παραθέτουμε τις τιμές των αιματολογικών παραμέτρων και δεικτών στους ετεροζυγώτες δβ-MA.

Πίνακας 19. Αιματολογικές παράμετροι και δείκτες σε ετεροζυγώτες δβ-Σικελικού τύπου (δβ-Sik) και δβ- Τουρκικού τύπου (δβ-Turk)

Αιματολογικές Παράμετροι	δβ-sic		δβ-Turk	
	από – έως (Μέσος όρος)		από – έως (Μέσος όρος)	
	Άρρενες	Θήλεις	Άρρενες	Θήλεις
Hb	11,6-16,3(13,2)	9,8-12,9(11,4)	9,3-14,8(12,7)	9,5-13,6(11,5)
Hct	38,7-53,0(43,5)	32,6-42,5(37,2)	30,5-47,8(41,2)	32,5-43,5(37,0)
RBC	5.790- 6.790(6.293)	4.860- 5.730(5.261)	4.690- 6.830(5.839)	4.270- 5.740(5.054)
MCH	19,4-24,1(20,9)	18,5-24,6(21,7)	19,6-25,9(21,8)	19,3-25,3(22,8)
MCV	65,3-78,4(69,1)	61,4-76,6(70,7)	64,1-79,5(70,6)	64,9-79,6(73,4)
MCHC	28,7-31,2(30,3)	30,0-32,1(30,7)	29,5-32,5(30,8)	29,6-32,8(31,2)

Ακολουθώς αποτυπώνονται στους Πίνακες 20, 21 και 22 τα ποσοστά (%) των αιμοσφαιρινών A₂,F και A, καθώς και αντίστοιχες μεταλλάξεις στα γ-γονίδια (Aγ5', Gγ5' και Aγ3') στους φορείς δβ-MA.

Πίνακας 20. Τα ποσοστά των αιμοσφαιρινών A₂, F και A σε ετεροζυγώτες δβ-MA (δβ-Turk) Τουρκικού τύπου, καθώς και οι αντίστοιχες μεταλλάξεις στα γ-γονίδια.

α/α	Αρ. δειγμ.	HbA ₂ (%)	HbF (%)	HbA (%)	Μεταλλάξεις στα γ-γονίδια		
					Aγ5'	Gγ5'	Aγ3'
1	27	2,8	10,0	77,5	del4	NI	41883C/A
2	30	2,5	17,6	71,2	del4	NI	C/A
3	36	2,4	13,4	72,4	del4	NI	C/A
4	38	2,5	3,9	84,3	del4	NI	C/A
5	41	2,4	7,9	79,9	del4	NI	C/A
6	51	2,5	15,1	73,0	del4	NI	C/A
7	54	2,2	9,7	71,5	del4	NI	C/A
8	60	2,2	20,4	73,4	del4	NI	C/A
9	74	2,7	11,2	77,1	del4	NI	C/A
10	75	2,6	16,7	71,3	del4	NI	C/A
11	80	1,47	10,64		del4	NI	C/A
12	88	2,9	10,0	79,8	del4	NI	C/A
13	89	2,9	6,6	81,8	del4	NI	C/A
14	116	2,9	5,1	84,6	del4	NI	C/A
15	142	2,2	17,6	72,0	del4	NI	C/A

16	48	2,7	7,6	80,6	del4	NI	A/A
17	44	2,4	11,2	76,2	del4	-158	A/A
18	55	2,2	22,1	72,0	del4	-158	A/A
19	76	2,7	21,9	71,2	del4	-158	A/A
20	82	2,06	21,15		del4	-158	A/A
21	93	2,9	9,0	78,7	del4	-158	A/A
22	43	2,5	19,9	73,5	del4	-309	A/A
23	110	2,3	16,4	74,2		-158	A/A
24	150	2,4	28,5	65,3		-158	A/A
25	24	2,7	12,9	76,5	NI	NI	C/A
26	42	2,5	22,5	70,6	NI	NI	C/A
27	45	3,6	25,2	67,2	NI	NI	C/A
28	61	2,8	10,1	77,8	NI	NI	C/A
29	118	2,4	11,8	77,7	NI	NI	C/A
30	68	2,0	14,8	69,0	NI	NI	C/C
31	139	2,9	6,8	83,1	NI	NI	A/A
32	144	2,9	22,8	71,3	NI	NI	A/A
33	153	3,2	11,0	77,4	NI	NI	A/A
34	52	2,8	11,2	77,0	NI	NI	A/A
35	46	2,5	12,2	75,9		NI	C/A
36	63	2,6	8,1	77,6		NI	C/A
37	78	2,8	10,2	77,1		NI	C/A
38	86	2,5	15,6	73,7		NI	C/A
39	95	2,7	8,9	78,3		NI	C/A
40	106	2,3	7,6	80,6		NI	C/A
41	119	2,6	8,7	80,4		NI	C/A
42	100	2,9	9,74	78,8			C/A
M.O		2,57	13,42	75,78			

Πίνακας 21. Τα ποσοστά των αιμοσφαιρινών A2, F και A σε ετεροζυγώτες δβ -MA (δβ-Sic) Σικελικού τύπου, καθώς και οι αντίστοιχες μεταλλάξεις στα γ-γονίδια.

α/α	Αρ. δειγμ.	HbA2 (%)	HbF (%)	HbA (%)	Μεταλλάξεις στα γ-γονίδια		
					Αγ5´	Γγ5´	Αγ3´
1	29	3,2	8,4	78,9	-369	-158/-158	11883C/C
2	32	2,5	13,2	75,6	-369	NI	C/C
3	33	2,9	13,3	74,8	NI	-158	C/A
4	81	2,21	5,64		NI	-158	C/A
5	77	2,6	8,4	79,7	NI	-158	C/A
6	40	2,7	9,1	79,1		-158	C/A
7	34	2,8	12,2	76,7	NI	NI	C/C
8	39	2,8	6,8	81,7	NI	NI	C/C
9	58	2,7	5,4	83,2	NI	NI	C/C
10	94	2,7	9,6	78,8	NI	NI	C/C
11	101	2,7	13,4	75,9	NI	NI	C/C
12	138	2,6	25,1	68,0	NI	NI	C/C
13	147	3,1	4,2	84,1	NI	NI	C/C
14	53	2,9	5,9	83,1	NI	NI	C/A
15	137	2,8	15,1	73,9		NI	C/A
16	156	2,4	18,8	75,3			A/A
17	149	3,1	3,9	84,2			

18	159	2,9	6,5	82,7
19	160	2,7	6,3	83,7
M.O		2,75	10,06	78,75

Πίνακας 22. Τα ποσοστά των αιμοσφαιρινών A2, F και A σε διπλούς ετεροζυγώτες δβ-MA και άλλων αιμοσφαιρινοπαθειών.

α/α		Αρ. δειγμ.	HbA2 (%)	HbF (%)	HbA (%)	Μεταλλάξεις στα γ-γονίδια		
						Aγ5´	Gγ5´	Aγ3´
1	δβ-MA(Turk)+ δ-MA	70	1,1	6,0	83,1	del4	-158	41883 A/A
2	Ομόζυγο δβ-MA (δβ-Sic+δβ-Sic)	79	0,0	86,3	9,1	NI	NI	C/C
3	δβ-MA(Turk)+ β-MA (β39)	132	3,7	90,8	2,2			C/A

3.3 Αποτελέσματα των μεταλλάξεων σε μοριακό επίπεδο της ΗΡΦΗ.

Στον Πίνακα 23, απεικονίζονται τα αποτελέσματα των μεταλλάξεων στην ΗΡΦΗ.

Πίνακας 23. Ποσοστά των αιμοσφαιρινών A2, F και A στην ΗΡΦΗ και οι αντίστοιχες μεταλλάξεις στα γ-γονίδια (Aγ5´, Gγ5´, Aγ3´).

α/α	Αρ. δειγμ.	HbA2 (%)	HbF (%)	HbA (%)	Μεταλλάξεις στα γ-γονίδια		
					Aγ5´	Gγ5´	Aγ3´
1	3	1,5	11,09		-117	-158	41883C/A
2	4	1,8	8,35		-117	-158	C/A
3	8	2,2	15,8		-117	-158	C/A
4	9	1,42	15,20		-117	-158	C/A

5	11	1,89	10,00		-117	-158	C/A
6	143	1,8	16,7	74,3	-117	-158	C/A
7	37	2,1	14,3	74,1	-117	NI	C/C
8	73	2,0	15,8	71,6	-117	NI	C/C
9	91	2,1	19,3	75,9	-117	NI	C/C
10	92	2,2	14,1	74,7	-117	NI	C/C
11	111	1,9	14,0	74,0	-117	NI	C/C
12	121	1,8	13,4	75,6	-117	NI	C/C
13	124	2,3	13,3	75,6	-117	NI	C/C
14	13	1,5	4,48		NI	-158	C/A
15	151	3,3	3,7	86,5	NI	-158	
16	23	2,7	5,3	84,6	NI	-158/-158	A/A
17	130	1,9	7,4	79,2	NI	-158/-158	A/A
18	131	3,0	5,1	85,4	NI	-158/-158	A/A
19	120	2,3	2,7	84,9	NI	-158/-158	A/A
20	125	2,8	5,6	84,0	NI	-158/-158	C/A
21	112*	2,96	9,92		del4	NI	C/A
22	12	2,43	14,56		NI	NI	C/C
23	136	3,9	5,9	82,4	NI	NI	C/C
24	133	2,0	19,1	71,5		NI	C/C
25	127	2,7	4,6	87,0	NI		C/A
26	64	2,4	4,0	86,2			A/A
27	2	2,2	16,9	72,3			C/C
28	129	1,5	6,4	77,8			C/A
29	134	2,2	15,2	74,3			C/A
30	7	1,41	10,56				C/A
31	1	1,94	15,00				C/A
M.O.		2,19	10,89	78,66			

*HPFH + α_1 Cd14 [G>A]

Στη συνέχεια καταγράφονται (Πίνακας 24) τα αποτελέσματα των μεταλλάξεων σε μοριακό επίπεδο των διπλών ετεροζυγωτών HPFH και άλλων αιμοσφαιρινοπαθειών.

Πίνακας 24. Ποσοστά των αιμοσφαιρινών A₂, F και A στους διπλούς ετεροζυγώτες HPFH και άλλων αιμοσφαιρινοπαθειών.

α/ α	Αρ. δειγμ.	HbA2 (%)	HbF (%)	HbA (%)	Μεταλλάξεις στα γ-γονίδια			
					Aγ5'	Gγ5'	Aγ3'	
1	HPFH+β39(β-MA)	10	2,01	21,0	-117	NI	C/A	
2	HPFH+β39(β-MA)	5	2,64	23,16			C/C	
3	HPFH+IVS1-1(β-MA)	31	2,7	9,2	80,0	NI	NI	C/C
4	HPFH+IVS1-1(β-MA)	135	4,2	36,2	56,4			C/C
5	HPFH+δβ Turk	99	1,2	46,4	51,8			

6	HPFH+δβ Turk	109	0,7	67,2	34,8	del4/-117	NI	C/A
7	HPFH+HbS	14	2,5	12,5	52,3	-117	-309/ -369	C/A
8	HPFH+α ₁ Cd14[G>A]	112	2,96	9,92		del4	NI	C/A
9	HPFH+δ-MA	6	0,53	17,43		-117	-158	C/A

Ακολούθως καταγράφονται (Πίνακας 25) τα αποτελέσματα των μεταλλάξεων των γ-γονιδίων: Αγ5' και Γγ5' ως προς τις μεταλλάξεις Αγ3' σε δείγματα με υψηλή HbF, ήτοι: φ. δβ-M.A, φ. β-M.A. με ↑ HbF και HPFH.

Πίνακας 25. Οι μεταλλάξεις Αγ5'/ Γγ5', ως προς τις Αγ3', αναλογίες και ποσοστά (%)

Αγ3' \ Αγ5'/Γγ5'	-117	N ℓ	-369	N ℓ	N ℓ	$\frac{del4}{-117}$	-117	N ℓ	-158	-117	-369	del4	-369	del4	del4
Αγ3'	N ℓ	-158	N ℓ	-109	$\frac{-158}{-158}$	N ℓ	-158	N ℓ	-158	$\frac{-309}{-369}$	-158	N ℓ	$\frac{-158}{-158}$	-158	-309
41883 C/A	1	21	0	0	1	1	7	6	1	1	1	21	0	0	0
41883 C/C	8	0	2	1	0	0	0	21	0	0	0	0	1	0	0
41883 A/A	0	1	0	0	4	0	0	4	0	0	0	1	0	6	1
ΣΥΝΟΛΟ	9	22	2	1	5	1	7	31	1	1	1	22	1	6	1
ΑΝΑΛΟΓΙΑ	9/111	22/111	2/111	1/111	5/111	1/111	7/111	31/111	1/111	1/111	1/111	22/111	1/111	6/111	1/111
ΠΟΣΟΣΤΟ %	8,10	19,81	1,80	0,90	4,50	0,90	6,30	27,92	0,90	0,90	0,90	19,81	0,90	5,40	0,90

Ακολουθως δίνονται (Πίνακας 26 έως 41) οι μεταλλάξεις στα γονίδια Αγ5' / Γγ5', σε σχέση με τα ενισχυμένα Αγ3', τους αντίστοιχους φαινοτύπους καθώς και τα ποσοστά (%) της HbF.

Πίνακας 26. Η μετάλλαξη -117/NI (Αγ5'/Γγ5')

α/α	Αριθμός δείγματος	Αγ3'	Γονότυπος	HbF (%)
1	10*	41883 C/A	HPFH + β39	21,0
2	35	41883 C/C	IVS1-1 + Cd2	5,2
3	37	41883 C/C	HPFH	14,3
4	73	41883 C/C	HPFH	15,8
5	91	41883 C/C	HPFH	19,3
6	92	41883 C/C	HPFH	14,1
7	111	41883 C/C	HPFH	14,0
8	121	41883 C/C	HPFH	13,4
9	124	41883 C/C	HPFH	13,3

* HPFH + β39

Παρατηρείται μια σταθερή αναλογία της HbF στη συγκεκριμένη μετάλλαξη, με γενικό Μ.Ο. 14,4% και επιμέρους στην HPFH 14,8%.

Η συγκεκριμένη μετάλλαξη συνοδεύεται από την μετάλλαξη 41883 C/C στα Αγ3' γονίδια.

Πίνακας 27. Η μετάλλαξη NI/-158 (Αγ5'/Gγ5')

α/α	Αριθμός δείγματος	Αγ3'	Γονότυπος	HbF (%)
1	59	41883C/A	IVS1-1	4,3
2	97	C/A	IVS1-1	5,6
3	98*	C/A	IVS1-1	5,9
4	117	C/A	IVS1-1	6,2
5	56	C/A	IVS1-1	6,7
6	145		IVS1-1	4,6
7	19	C/A	IVS1-110	6,9
8	20	C/A	IVS1-110	12,52
9	50	C/A	IVS1-110	1,2
10	57	C/A	IVS1-110	6,3
11	90	C/A	IVS1-110	5,9
12	18	C/A	FSC6ήCodon6[-A]	6,0
13	152	C/A	FSC6ήCodon6[-A]	11,1
14	148		FSC6ήCodon6[-A]	5,0
15	33	C/A	δβ-Sic	13,3
16	81	C/A	δβ-Sic	5,64
17	77	C/A	δβ-Sic	8,4
18	85	C/A	β-39	10,4
19	104**	C/A	β-39 +Cd2	6,0
20	122	C/A	IVS2-745	3,2
21	47***	C/A	IVS2-745+20	4,1
22	102	C/A	IVS2-1	5,3
23	13	C/A	HPFH	4,48
24	151		HPFH	3,7
25	15	A/A		3,5
M.O.				6,2

*IVS1-1+α₁Cd14[G>A]

**β39+Cd2

***IVS2-745+ (πολυμορφισμός +20)

Η μετάλλαξη NI /-158 στα Αγ5'/Gγ5' γονίδια αντίστοιχα, συνοδεύεται από τη μετάλλαξη 41883 C/A στα Αγ3' γονίδια.

Ο Μ.Ο. της HbF είναι συνολικά 6,2% και επιμέρους:

IVS1-1	5,5%
IVS1-110	6,5%
FSC6ήCodon6[-A]	7,3%
δβ-Sic	9,1%

Πίνακας 28. Η μετάλλαξη -369/NI (Αγ5'/Gγ5')

α/α	Αριθμός δείγματος	Αγ3'	Γονότυπος	HbF. (%)
1	32	41883C/C	δβ-Sic	13,2
2	146*	C/C	IVS2-1	4,1

*IVS2-1 + (-3,7) για α-MA

Πίνακας 29. Η μετάλλαξη NI/-109 (Αγ5'/Gγ5')

α/α	Αριθμός δείγματος	Αγ3'	Γονότυπος	HbF (%)
1	107*	41883C/C	β39	4,1

Νέα μετάλλαξη (-109)

Πίνακας 30. Η μετάλλαξη NI / $\frac{-158}{-158}$ (Αγ5'/Gγ5')

α/α	Αριθμός δείγματος	Αγ3'	Γονότυπος	HbF (%)
1	23	41883A/A	HPFH	5,3
2	120	A/A	HPFH	2,7
3	130	A/A	HPFH	7,4
4	131	A/A	HPFH	5,1
5	125	C/A	HPFH	5,6
M.O.				5,2

Η μετάλλαξη NI / $\frac{-158}{-158}$ στα Αγ5'/Gγ5' γονίδια συνοδεύονται από τη μετάλλαξη 41883A/A

στα Αγ3' γονίδια.

Πίνακας 31. Η μετάλλαξη $\frac{del4}{-117}$ / NI (Αγ5'/Gγ5')

α/α	Αριθμός δείγματος	Αγ3'	Γονότυπος	HbF (%)
1	109	41883C/A	HPFH+δβ-Turk	67,2

Πίνακας 32. Η μετάλλαξη -117/-158 (Αγ5'/Gγ5')

α/α	Αριθμός δείγματος	Αγ3'	Γονότυπος	HbF (%)
1	3	41883C/A	HPFH	11,09
2	4	C/A	HPFH	8,35
3	6*	C/A	HPFH	17,43
4	8	C/A	HPFH	14,35
5	9	C/A	HPFH	15,20
6	11	C/A	HPFH	10,00
7	143	C/A	HPFH	16,70
M.O.				13,3

*HPFH+δ-M.A.

Η μετάλλαξη -117/-158 στα Αγ5'/Gγ5' γονίδια συνοδεύεται από τη μετάλλαξη 41883 C/A στα Αγ3' γονίδια.

Πίνακας 33. Η μετάλλαξη NI/NI (Αγ5'/ Gγ5)

α/α	Αριθμός δείγματος	Αγ3'	Γονότυπος	HbF(%)
1	31	41883C/C	HPFH+IVS1-1	9,2
2	28	C/C	IVS1-1	1,3
3	49	C/C	IVS1-1	5,9
4	72	C/C	IVS1-1	5,4
5	84	C/C	IVS1-1	10,4
6	105	C/C	IVS1-1	2,2
7	115	C/C	IVS1-1	3,4
8	34	C/C	δβ-Sic	12,2
9	39	C/C	δβ-Sic	6,8
10	58	C/C	δβ-Sic	5,4
11	94	C/C	δβ-Sic	9,6
12	101	C/C	δβ-Sic	13,4
13	79	C/C	δβ-Sic+δβ-Sic	86,3
14	53	C/A	δβ-Sic	5,9
15	24	C/A	δβ-Turk	12,9
16	42	C/A	δβ-Turk	22,5
17	45	C/A	δβ-Turk	25,2
18	61	C/A	δβ-Turk	10,1
19	118	C/A	δβ-Turk	11,8
20	139	A/A	δβ-Turk	6,8
21	144	A/A	δβ-Turk	22,8
22	153	A/A	δβ-Turk	11,0
23	52	A/A	δβ-Turk	11,2
24	68	C/C	δβ-Turk	14,8
25	12	C/C	HPFH	14,56
26	136	C/C	HPFH	5,9
27	26	C/C	β39	4,2
28	123	C/C		5,6
29	138	C/C	δβ-Sic	25,1

30	141	C/C	IVS1-1	4,6
31	147	C/C	δβ-Sic	4,2
32	154		δβ-Sic	2,9
M.O.				

Ο τύπος NI/NI στα Αγ5'/Γγ5' γονίδια, συνοδεύεται κατά κύριο λόγο από τη μετάλλαξη 41883C/C (67,7%) στα Αγ3' γονίδια και δευτερευόντως από τις μεταλλάξεις 41883C/A (19,3%) και 41883A/A (12,9%). Ο Μ.Ο. της αιμοσφαιρίνης της HbF είναι συνολικά 9,9%

και επιμέρους: IVS1-1 4,7%
δβ-Sic 10,6%
δβ-Turk 14,9%

Πίνακας 34. Η μετάλλαξη -158/-158 (Αγ5'/Γγ5')

α/α	Αριθμός δείγματος	Αγ3'	Γονότυπος	HbF(%)
1	114	41883C/A	IVS1-1	9,0

Πίνακας 35. Η μετάλλαξη -117 / ⁻³⁰⁹ (Αγ5'/Γγ5')

α/α	Αριθμός δείγματος	Αγ3'	Γονότυπος	HbF (%)
1	14	41883C/A	HPFH+HbS	12,5

Πίνακας 36. Η μετάλλαξη -369/-158 (Αγ5'/Γγ5')

α/α	Αριθμός δείγματος	Αγ3'	Γονότυπος	HbF(%)
1	17	41883C/A	FSC6ή Codon 6[-A]	3,9

Πίνακας 37. Η μετάλλαξη del4/NI (Aγ5'/Gγ5')

α/α	Αριθμός δείγματος	Aγ3'	Γονότυπος	HbF(%)
1	27	41883C/A	δβ-Turk	10,0
2	30	C/A	δβ-Turk	17,6
3	36	C/A	δβ-Turk	13,4
4	38	C/A	δβ-Turk	3,9
5	41	C/A	δβ-Turk	7,9
6	51	C/A	δβ-Turk	15,1
7	54	C/A	δβ-Turk	9,7
8	60	C/A	δβ-Turk	20,4
9	74	C/A	δβ-Turk	11,2
10	75	C/A	δβ-Turk	16,7
11	80	C/A	δβ-Turk	10,64
12	88	C/A	δβ-Turk	10,00
13	89	C/A	δβ-Turk	6,6
14	116	C/A	δβ-Turk	5,1
15	142	C/A	δβ-Turk	17,6
16	48	A/A	δβ-Turk	7,6
17	21	C/A	β39	8,0
18	25	C/A	β39	4,4
19	87	C/A	β39	6,8
20	108	C/A	IVS1-1	4,9
21	113	C/A	IVS1-1	4,2
22	112*	C/A	HPFH+α ₁ Cd14[G>A]	9,92
M.O.				10,0

* HPFH + α₁Cd14[G>A]

Η μετάλλαξη del4/NI στα (Aγ5'/Gγ5') γονίδια αντίστοιχα στη δβ-Turk συνοδεύεται από μετάλλαξη 41883 C/A στα Aγ3' γονίδια όπως και στη β39 και στην IVS1-1.

Τα ποσοστά της HbF είναι στο γενικό M.O 10,0%
 και επιμέρους: δβ-Turk 11,4%
 β39 6,4%
 IVS1-1 4,5%

Πίνακας 38. Η μετάλλαξη -369 / ⁻¹⁵⁸ (Aγ5'/Gγ5')

α/α	Αριθμός δείγματος	Aγ3'	Γονότυπος	HbF (%)
1	29	41883C/C	δβ-Sic	8,4

Πίνακας 39. Η μετάλλαξη del4/-158 (Αγ5'/Γγ5')

α/α	Αριθμός δείγματος	Αγ3'	Γονότυπος	HbF (%)
1	44	41883A/A	δβ-Turk	11,2
2	55	A/A	δβ-Turk	22,1
3	70*	A/A	δβ-Turk	6,0
4	76	A/A	δβ-Turk	21,9
5	82	A/A	δβ-Turk	21,15
6	93	A/A	δβ-Turk	9,0
M.O.				15,2

*δβ-MA+δ-MA

Η μετάλλαξη del4/-158 στα Αγ5'/Γγ5' γονίδια αντίστοιχα παρατηρείται στη δβ-Turk και συνοδεύεται από τη μετάλλαξη 41883 A/A στα Αγ3' γονίδια με M.O. HbF 15,2%.

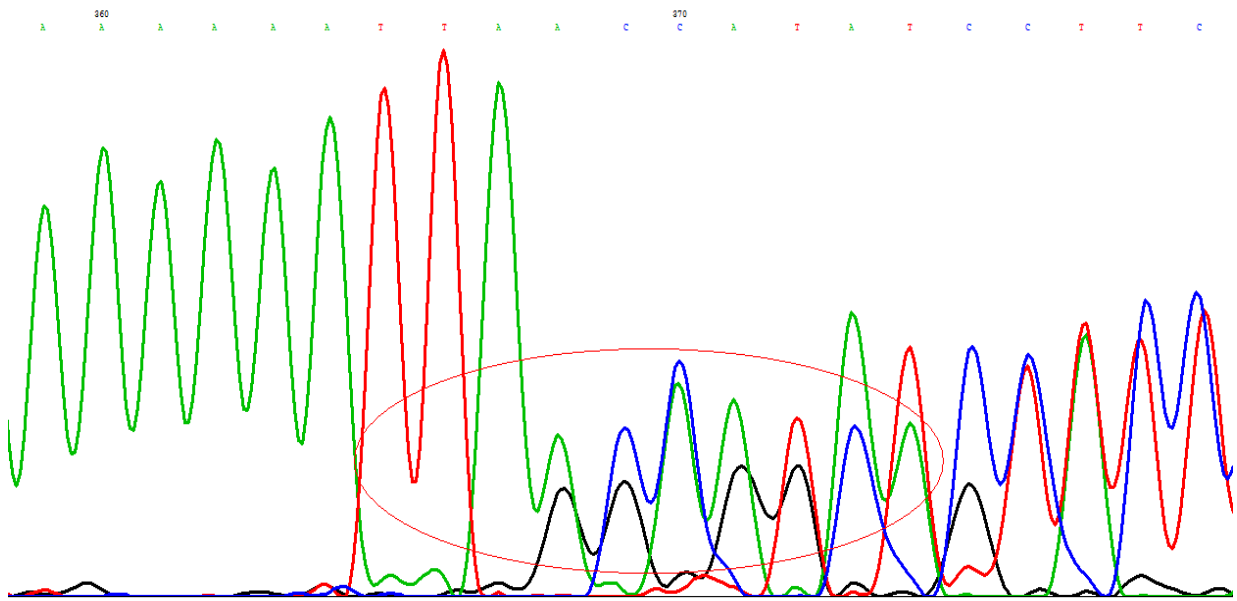
Πίνακας 40. Η μετάλλαξη del4/-309 (Αγ5'/Γγ5')

α/α	Αριθμός δείγματος	Αγ3'	Γονότυπος	HbF (%)
1	43	41883A/A	δβ-Turk	19,9

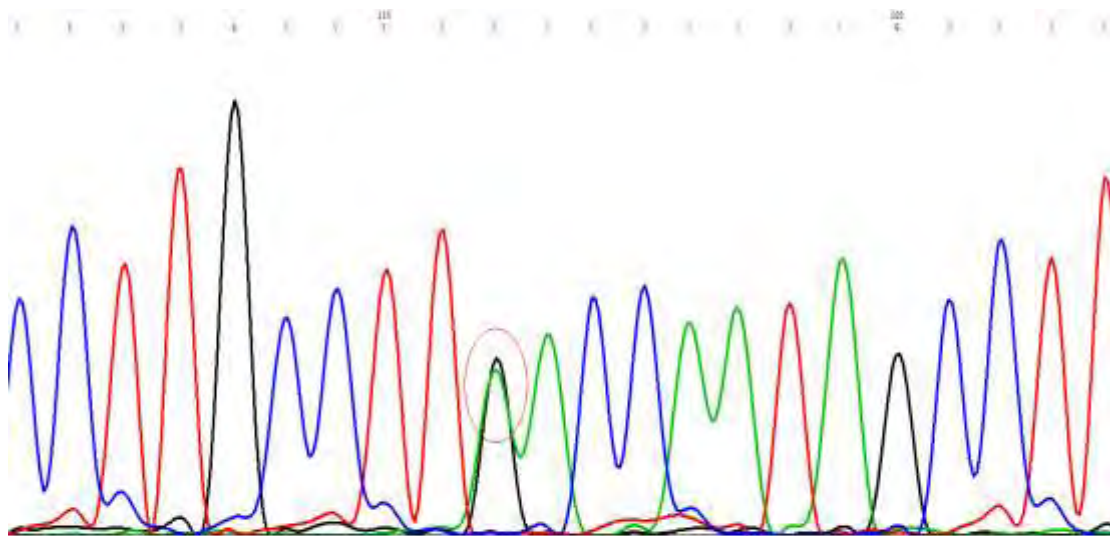
Πίνακας 41. φ.β. M.A. με ↑ HbF, φ.δβ - M.A. και ΗΡFH

Αγ3' ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	φ.β-M.A. με ↑ HbF		φ.δβ-M.A.		ΗΡFH	
	ΑΝΑΛΟΓΙΑ	ΠΟΣΟΣΤΟ%	ΑΝΑΛΟΓΙΑ	ΠΟΣΟΣΤΟ%	ΑΝΑΛΟΓΙΑ	ΠΟΣΟΣΤΟ%
C/C	13/38	34,20%	14/65	22,40	16/44	36,39
A/A	4/38	10,50%	15/65	15,30	6/44	13,60
C/A	21/38	55,20%	36/65	55,30	22/44	56,00

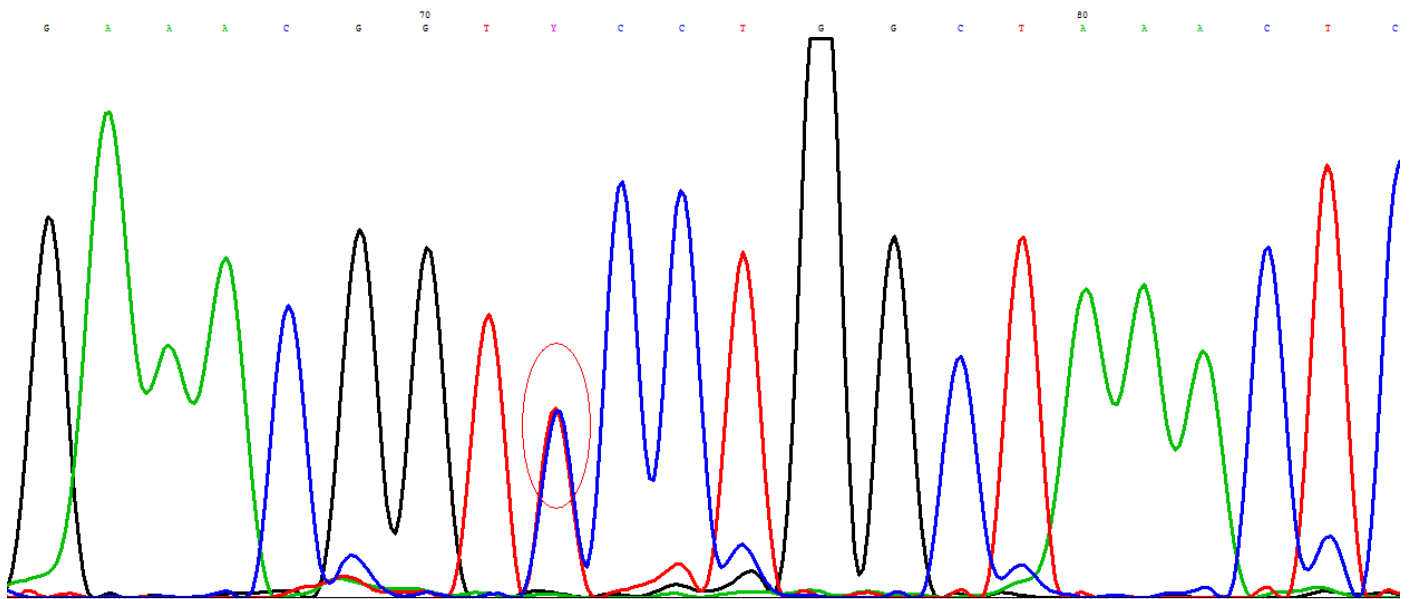
Στις εικόνες 38-43 απεικονίζεται ενδεικτικά η ανάλυση των αλληλουχιών του DNA, που πραγματοποιήθηκε με την τεχνική DNA sequencing για τις μεταλλάξεις που αφορούν τα Αγ5' και Γγ5' γονίδια.



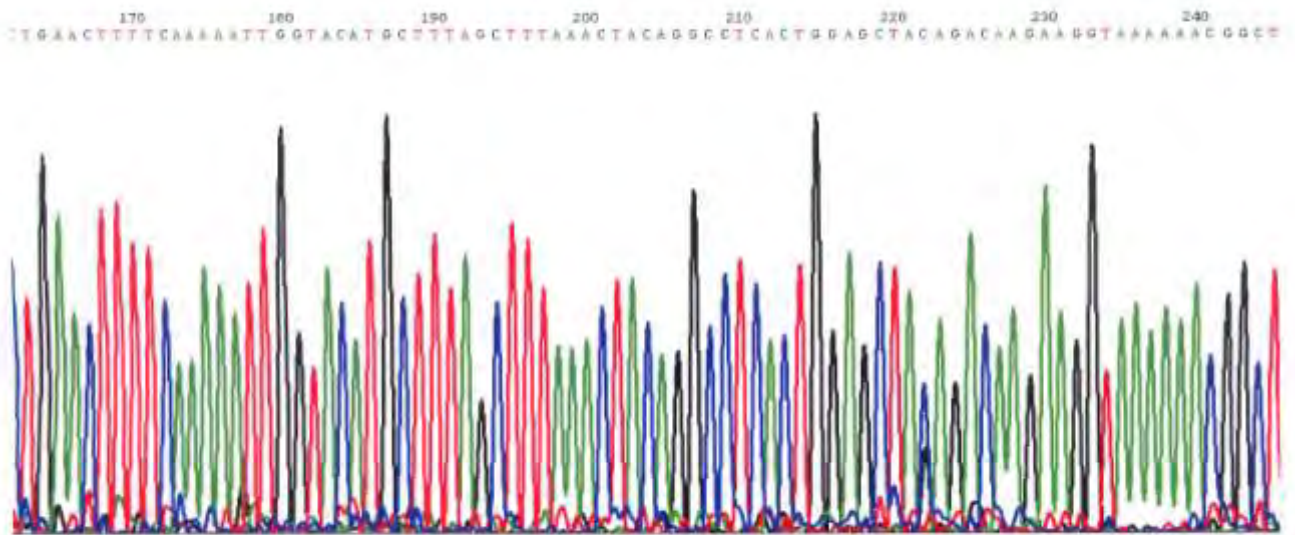
Εικόνα 38. Ετεροζυγώτης για τη μετάλλαξη del4 στα Ag5'γονίδια. Ανάλυση του προϊόντος PCR με DNA Sequencing.



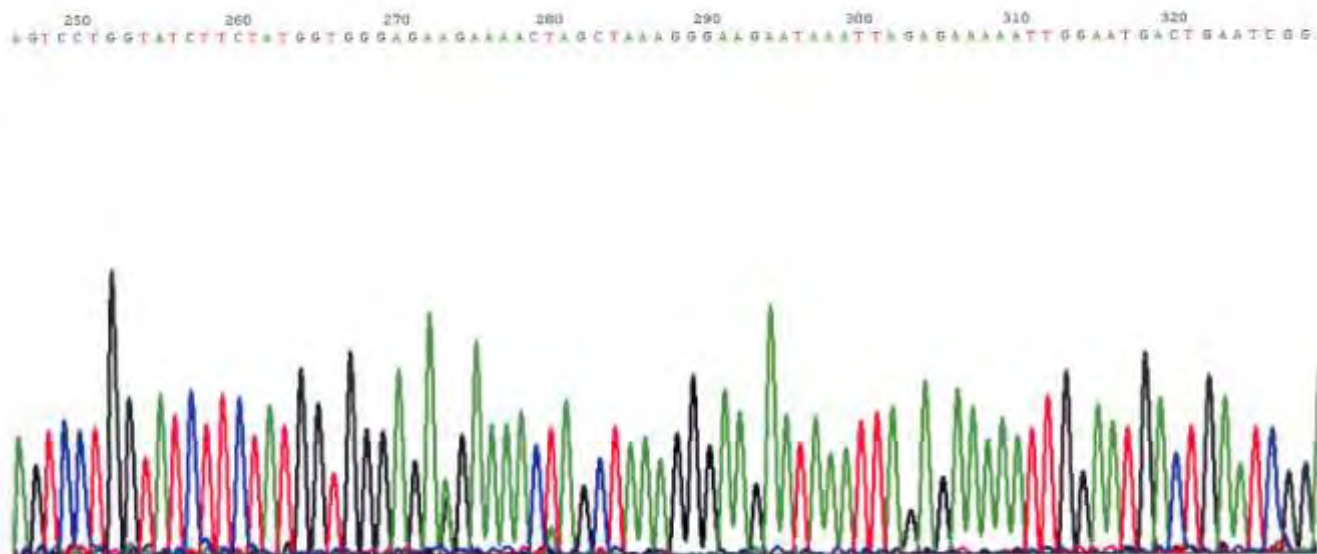
Εικόνα 39. Ετεροζυγώτης για τη μετάλλαξη -158 στα Gγ5'γονίδια. Ανάλυση του προϊόντος PCR με DNA Sequencing.



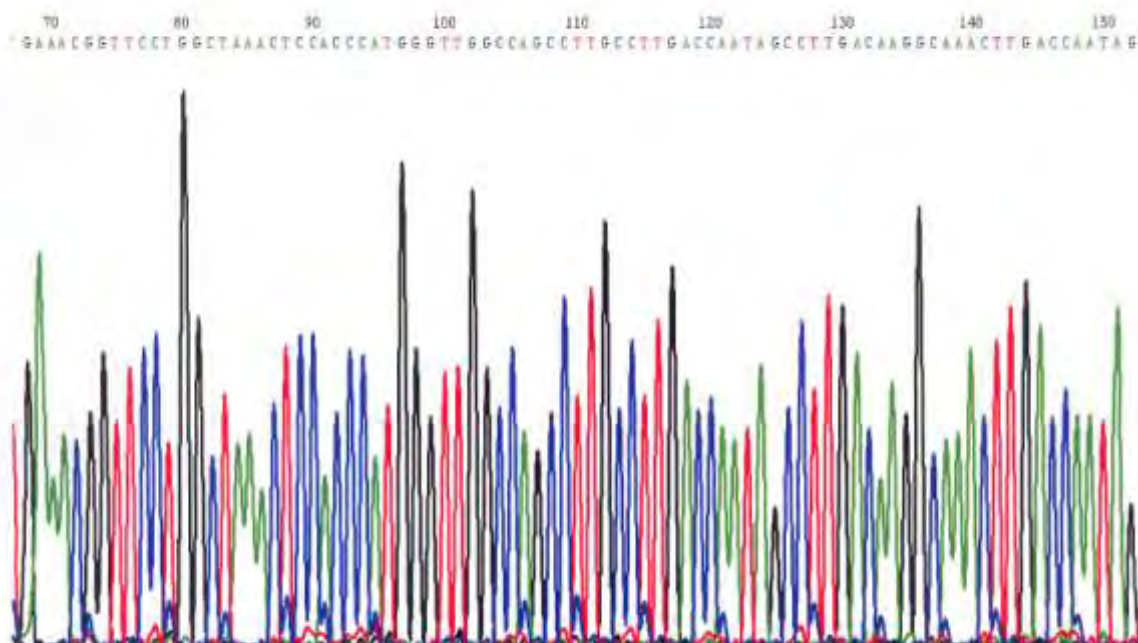
Εικόνα 40. Ετεροζυγώτης για τη μετάλλαξη -117 στα Αγ 5'γονίδια. Ανάλυση του προϊόντος PCR με DNA Sequencing.



Εικόνα 41. Ετεροζυγώτης για τη μετάλλαξη -369 στα Αγ5'γονίδια (θέση 222).



Εικόνα 42. Ετεροζυγώτης για τη μετάλλαξη -309 στα Gγ 5'γονίδια (θέση 273). Ανάλυση του προϊόντος PCR με DNA Sequencing.



Εικόνα 43. Ομοζυγώτης για τη μετάλλαξη -158/-158 στα Gγ5'γονίδια (θέση 76 G→T).

Ανάλυση του προϊόντος PCR με DNA Sequencing.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1. Η επιλογή και η κατηγοριοποίηση των δειγμάτων

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια συγκέντρωσης στοιχείων, σε φαινοτυπικό όσο και κυρίως σε γονοτυπικό επίπεδο, αναφορικά με τους γονιδιακούς παράγοντες που συντελούν στην αύξηση της αιμοσφαιρίνης F, σε ενήλικες φορείς δβ-MA, ΗΡFH και σε κατηγορία ετεροζυγωτών β-MA με αυξημένα επίπεδα HbF, οι οποίοι επελέγησαν από το σύνολο των φορέων της β-MA, στο γενικό πληθυσμό στη Μονάδα Πρόληψης Μεσογειακής Αναιμίας (Μ.Π.Μ.Α) του Γενικού Νοσοκομείου Καρδίτσας.

4.2. Το μέγεθος και η καταλληλότητα του υπό μελέτη πληθυσμού.

Η ανάλυση αφορά δείγματα ενηλίκων εκ των οποίων οι 69 ήταν άρρενες και οι 91 ήταν θήλεις.

Η επιλογή και λήψη των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε επί του συνόλου του γενικού πληθυσμού, των προσερχόμενων ατόμων στη Μ.Π.Μ.Α. του Γενικού Νοσοκομείου Καρδίτσας.

Έγινε προσπάθεια αποφυγής «λαθών» ήτοι πλασματικών στοιχείων αναφορικά με τα επίπεδα της HbF. Για το λόγο αυτό δεν συμπεριελήφθησαν στην παρούσα διατριβή δείγματα ατόμων μικρής ηλικίας, καθώς επίσης και γυναικών σε κατάσταση κυήσεως.

4.3. Η επιλογή των ετεροζυγωτών της β-Μεσογειακής Αναιμίας

Αναφορικά με τα δείγματα των ετεροζυγωτών της β-MA με αυξημένη (↑) HbF, που μελετήθηκαν, αυτά επελέγησαν από το σύνολο των 3.044 δειγμάτων ατόμων ετεροζυγωτών β-MA, **(Πίνακας 8)** εκ των οποίων μόνο τα 85 δείγματα ατόμων ήταν φορείς β-MA με αυξημένα ποσοστά HbF (>2%) ήτοι σε ποσοστά 2,79% **(Πίνακας 44)**.

Πίνακας 44: Ετεροζυγώτες β-MA με αυξημένη HbF (>2%), σε σχέση με τους ετεροζυγώτες β-MA με HbF (<2%). (Στοιχεία της Μ.Π.Μ.Α. του Γ. Νοσοκομείου Καρδίτσας).

	Αριθμητικά	Ποσοστό (%)
Φορείς β-MA με HbF <2%	2.959	97,21
Φορείς β-MA με HbF >2%	85	2,79
ΣΥΝΟΛΟ	3.044	100,00

4.4 Σύγκριση αποτελεσμάτων μεταλλαγών σε φορείς β-MA, δβ-MA και ΗΡFH στον Ν. Καρδίτσας σε σχέση με τα γενικά της Θεσσαλίας και της Ελλάδας.

Πίνακας 45: Αποτελέσματα (ποσοστά %) φαινοτυπικών δεδομένων σε φορείς β-MA, δβ-MA και ΗΡFH στο Ν. Καρδίτσας σε σχέση με τα γενικά ποσοστά (%) στους νομούς Λάρισας και Τρικάλων.

	Ποσοστά (%)		
	Ν. Καρδίτσας	Ν. Λάρισας	Ν. Τρικάλων
Φορείς β-MA	14.21%	11.80%	13.95%
Φορείς δβ-MA	0.87%	0.30%	0.62%
ΗΡFH	0.26%	0.11%	0.10%

Πίνακας 46. (Α,Β,Γ) Αποτελέσματα (Ποσοστά %) γονοτυπικών δεδομένων σε φορείς β-MA, δβ-MA και ΗΡFH στο Ν. Καρδίτσας σε σχέση με τα γενικά ποσοστά στη

	φορείς β-MA (ποσοστά %)		
	Ν. Καρδίτσας	Θεσσαλία	Ελλάδα
IVS1-1 (G→A)	41.50%	13.65%	12.80%
β-39 (C→T)	26.41%	19.51%	18.80%
IVS1-110 (G→A)	15.09%	42.97%	42.10%
Codon6 (-A)	7.54%	2.83%	1.70%
IVS2-1 (G→A)	5.66%	2.02%	3.30%
IVS2-745 (C→G)	3.77%	4.35%	6.30%

Θεσσαλία και πανελληνίως.

Πηγές: (Κέντρο Μεσογειακής Αναιμίας, Μονάδες Πρόληψης Μεσογειακής Αναιμίας Νομών Καρδίτσας, Τρικάλων, Λάρισας, Τμήμα Βιολογίας Ιατρικής σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας)

Πίνακας 46B

Φορείς δβ-MA (Ποσοστά %)		
	N. Καρδίτσας	Ελλάδα
δβ-Sic	23.20%	94.90%
δβ-Turk	76.80%	5.10%

Παρατηρείται μία αντιστροφή των αποτελεσμάτων στο N. Καρδίτσας σε σχέση με τα αποτελέσματα στην υπόλοιπη Ελλάδα, αναφορικά με τους γονοτύπους δβ-Sic και δβ-Turk τύπου.

Πίνακας 46Γ: Συχνότητα των κυριότερων μεταλλαγών του γ-γονιδίου σφαιρίνης και συσχέτιση με τα επίπεδα της HbF αιμοσφαιρίνης στο Νομό Καρδίτσας.

	Συχνότητα μεταλλαγών	Επίπεδα HbF (Μ.Ο.)
HPFH Ελληνικού τύπου (Αγ-117/NI)	23.33%	14.88%
HPFH (Αγ-117/ Γγ-158)	20.00%	12.85%
HPFH Κρητικού τύπου (NI/Γγ-158/Γγ-158)	16.66%	5.22%
HPFH Ελβετικού τύπου (NI/ Γγ-158)	6.66%	4.09%

Μελέτες στο γενικό Ελληνικό πληθυσμό έδειξαν ότι η συχνότητα των περιπτώσεων HPFH είναι 0,05% και στο γενικό πληθυσμό του N. Καρδίτσας 0,18%. Οι συχνότερες μεταλλαγές στην παρούσα εργασία είναι: οι Γγ-158 (C→T) και Αγ -117 (G→A).

4.5 Συσχέτιση επιπέδων HbF με μεταλλαγές στο β- Cluster (είτε για β-MA, είτε για δβ-MA) και HPFH.

Πίνακας 47. Ποσοστά (Μ.Ο.%) της HbF σε φορείς β-MA με ↑ HbF, δβ-MA και HPFH.

Φαινότυπος	HbF ποσοστά (Μ.Ο%)
Φορείς β-MA με ↑ HbF	5.94%

Φορείς δβ-MA	12.10%
Φορείς ΗΡFΗ	10.92%

4.6 Συχνότητα της δβ-MA στον Ελληνικό πληθυσμό.

Η συχνότητα εμφάνισης της δβ-MA στον ελληνικό πληθυσμό, είναι σύμφωνα με μελέτες 0.34% και αντίστοιχα στο Ν. Καρδίτσας είναι 0.87%.

Παρατηρείται επίσης διαφορετική συχνότητα εμφάνισης της δβ-MA Σικελικού τύπου και Τουρκικού τύπου στον γενικό ελληνικό πληθυσμό, σε σχέση με αυτό του Ν. Καρδίτσας. Συγκεκριμένα, η έλλειψη DNA που αντιστοιχεί στη δβ-MA Σικελικού τύπου (**πίνακας 4**) είναι πιο συχνή (94.9%) στον ελληνικό πληθυσμό σε σχέση με την έλλειψη DNA που αντιστοιχεί στη δβ-MA Τουρκικού τύπου (5.10%). Το αντίστροφο παρατηρείται στα δείγματα της συγκεκριμένης διατριβής στο Ν. Καρδίτσας, όπου οι φορείς δβ-MA (Turk) είναι πιο συχνοί (76.80%) σε σχέση με τους φορείς δβ-MA (Sic) (23.20%).

Οι φορείς δβ-MA (Sic) παρουσιάζουν μια ετερογένεια στα επίπεδα της HbF (3,6 % έως 14,2%) με Μ.Ο 10.06%.

Οι αντίστοιχες τιμές στη δβ-MA (Turk) είναι για την HbF (4,8 έως 25,9%) με Μ.Ο 13.42%.

4.7 Ο Ελληνικός τύπος της μη-ελλειπτικής Κληρονομικής Παραμονής Εμβρυϊκής Αιμοσφαιρίνης ΗΡFΗ. Αποτελέσματα από μια νέα μετάλλαξη (g.-109 G>T) στον υποκινητή του γονιδίου.

Η μη-ελλειπτική (non-deletional) (nd-ΗΡFΗ), είναι μια σπάνια κληρονομική κατάσταση, που έχει σαν αποτέλεσμα ανεβασμένα επίπεδα εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (HbF) στους ενήλικες και σχετίζεται με μεταλλάξεις στον υποκινητή των γονιδίων της ανθρώπινης αιμοσφαιρίνης (HBG₁ και HBG₂) (Stamatoyannopoulos G, Grosveld F, 2001). Στην παρούσα διατριβή αναφέρεται ένας νέος τύπος nd-ΗΡFΗ, λόγω της μετάλλαξης στον υποκινητή του γονιδίου HBG₂ (HBG₂: g.-109 G>T).

Αυτή η μετάλλαξη, εντοπίστηκε στο 3' άκρο της HBG₂, του τμήματος CCAAT, ανιχνεύτηκε αρχικά σε ένα ενήλικο θηλυκό άτομο με προέλευση την Κεντρική Ελλάδα

(Καρδίτσα) και δίνει ψηλά επίπεδα HbF (4,1%) και σημαντικά αυξημένη παραγωγή Gγ-σφαιρινικής αλυσίδας (79,2%).

Μελέτη της οικογένειας και ανάλυση του DNA αποκάλυψαν ότι η μετάλλαξη HB G₂:g.-109 G>T, βρέθηκε επίσης και σε άλλα μέλη της οικογένειας: ετεροζυγώτες σε σύνδεση με την HB G₂: g.- 158 C>T (μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός) ή με τη «σιωπηλή» μετάλλαξη HBB: g.-101 C>T β-θαλασσαιμίας, που καταλήγει σε ανεβασμένα ποσοστά HbF (14,3%).

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα ανέδειξε ότι το γονίδιο HB G₂: g.-109 G>T, της μετάλλαξης αυτής και η γουανίνη στη θέση HB G₂/1: g.-109 είναι εξαιρετικής σημασίας στη σύνδεση CP-1/NF-E₃.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η μετάλλαξη στο γονίδιο HB G₂:g.-109 C>T, παίζει λειτουργικό ρόλο στην αύξηση της μεταγραφής του HB G₂ που ευθύνεται για τον HPFH φαινότυπο.

Οι ετεροζυγώτες HPFH, έχουν φυσιολογικό κλινικό φαινότυπο και φυσιολογικές αιματολογικές ενδείξεις, εκτός από τα χαμηλά επίπεδα της αιμοσφαιρίνης A₂ (HbA₂), που αποτελούν ένδειξη της HPFH. Αυτό οφείλεται στην αλληλεπίδραση της Locus Control Region (LCR) περιοχής και του μεταλλαγμένου γ-γονιδίου στον υποκινητή, σε σχέση με τις φυσιολογικές περιπτώσεις. Η αλλαγή στη μεταγραφική ισορροπία οδηγεί τα κατά τα άλλα «σιωπηλά» γονίδια της HbF, με μεταγραφή του γονιδίου HB G, σε χαμηλά επίπεδα HbA₂ (Wijgerde M, Grosveld F, Fraser P 1995).

Υπάρχουν λίγες μεταλλάξεις στον υποκινητή του γονιδίου της HbF, που οδηγούν στη μη ελλειπτική (nd-)HPFH ή σε κοντινή θέση του γ-γονιδίου σε Cis-ρυθμιστική περιοχή (Hardison RC, Chui DH, Giardine B, Reimer C, Patrinos GP, Anagnou N, Miller W, Wajcman H 2002).

Η HB G₂:g.-109 G>T αλλαγή βάσης δεν ήταν ταυτοποιημένη ούτε στις χρωμοσωμικές θέσεις των 31 φορέων β-MA, που φέρνουν τη «σιωπηλή» μετάλλαξη HBB:g.-101 C>T, ούτε στη 209 φυσιολογική χρωμοσωμική θέση, που σημαίνει ότι η νέα HB G₂:g.-109 G>T αλλαγή δεν είναι συνήθης πολυμορφισμός.

Προκειμένου να πιστοποιήσουμε τη λειτουργική σημασία της νέας μετάλλαξης HB G₂:g.-109 G>T μετρήσαμε τα επίπεδα της Gγ-αλυσίδας, χρησιμοποιώντας HPLC αντίστροφης φάσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ποσοστό Gγ/Αγ αλυσίδες, ήταν ιδιαίτερα αυξημένα σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα και τους φορείς για τη μετάλλαξη HBB:g.-101 C>T (79,2/20,8 προς 40/60 αντίστοιχα (Huisman TH, Harris H, Gravelly M, Sehroeder WA, Shelton JR, Shelton JB, Evans L 1997).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει ωστόσο το γεγονός ότι τα επίπεδα της HbF διέφεραν σε κάθε περίπτωση. Πρώτα απ' όλα η ετεροζυγωτία για τη μετάλλαξη

HBG₂:g.-109 G>T κατέληξε σε μέτρια ανεβασμένα επίπεδα HbF στην περίπτωση που μελετήθηκε (4,1%). Επίσης στη διπλή ετεροζυγωτία με τη διπλή μετάλλαξη της HBB:g.-101 C>T της β-θαλασσαιμίας κατέληγε σε υπολογίσιμα αυξημένα επίπεδα HbF (14,3%), όπως αναμένεται για περιπτώσεις διπλής ετεροζυγωτίας για nd-HPFH και β-θαλασσαιμία (Papadakis MN, Patrinos GP, Tsaftraris P, Loutradi-Anagnostou A 2002 και Kollia P, Kalamaras A, Chassanidis C, Samara M, Vamvakopoulos NK, Milena Radmilovic, Sonja Pavlovic, Papadakis MN, Patrinos GP 2008). Υπάρχουν πολύ λίγα παραδείγματα μη ελλειπτικής nd-HPFH / β-θαλασσαιμίας, περιπτώσεων διπλής ετεροζυγωτίας, τα οποία είναι εξαιρετικά σπάνια και μόνο περιστασιακά αναφέρονται στη βιβλιογραφία.

Αντίθετα η διπλή ετεροζυγωτία για τη μετάλλαξη HBG₂:g.-109 G>T και ο πολυμορφισμός HBG₂:g.-158 C>T δεν έχει επίδραση στα επίπεδα της HbF που παρατηρήθηκαν. Υπάρχουν δύο πιθανές εξηγήσεις γι' αυτήν την παρατήρηση (α) ο ίδιος ο πολυμορφισμός HBG₂:g.-158 C>T έχει μια «σιωπηλή» δράση στη μετάλλαξη ή (β) μια άλλη μη ανιχνεύσιμη Cis-ρυθμιστική περιοχή, καταστέλλει την παραγωγή HbF στις αδερφές της περίπτωσης που μελετήθηκε.

Η δεύτερη εξήγηση βρίσκεται σε συμφωνία με την προηγούμενη μελέτη μας (Chen Z, Luo HY, Basran RK, Hsu TH, Mang DW, Nuntakam L, Rosenfield CG, Patrinos GP, Hardison RC, Steinberg MH, Chui DH 2008) και επιβεβαιώνει ότι η ρύθμιση της έκφρασης του γ-γονιδίου και η παραγωγή της HbF είναι πολυπαραγοντικές και ότι πολλοί γενετικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την παραγωγή της HbF στους ενήλικες.

Η μετάλλαξη HBG₂:g.-109 G>T, που βρίσκεται στο 3' άκρο του συμπλέγματος HBG₂ CCAAT, όπου βρίσκονται οι CP₁ και NF-E₃ μεταγραφικοί παράγοντες, που συνδέονται μεταξύ τους (Ronchi AE, Bottardi S, Mazzucchelli C, Ottolenghi S, Santoro C 1995).

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση EMSA κατέδειξαν ότι η μετάλλαξη HBG₂:g.-109 G>T καταστρέφει το πρωτεϊνικό δέσιμο in Vitro. Το γεγονός ότι η γουανίνη στη θέση HBG₂:g.-109 φάνηκε προηγουμένως να έρχεται σε επαφή με NF-E₃ (Ronchi A, Berry M, Raguz S, Imam A, Yannoutsos N, Ottolenghi, Grosveld F, Dillon N 1996), δείχνει ότι η μετάλλαξη HBG₂:g.-109 G>T ενεργοποιεί την παραγωγή HbF πιθανότατα καταστρέφοντας το δέσιμο NF-E₃. Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι τα επίπεδα της Gγ-σφαιρίνης διπλασιάστηκαν στην περίπτωση που μελετήθηκε, τα δεδομένα στοιχεία υποδεικνύουν ότι η μετάλλαξη HBG₂:g.-109 G>T ευθύνεται για το φαινότυπο HPFH.

Ωστόσο, προηγουμένως βρήκαμε ότι οι μεταλλάξεις καταστρέφουν συγκεκριμένα την πρόσδεση και των δύο παραγόντων στο τμήμα CCAAT in Vitro,

αποτυγχάνοντας να δώσουν HPFH φαινότυπο. Αν και δεν απορρίπτουμε την πιθανότητα αυτοί οι παράγοντες να δρουν συνδεδειγμένα μαζί με άλλους για να μετατρέψουν τη λειτουργία του τμήματος CCAAT και έτσι την παραγωγή HbF. Προς το παρόν δεν υπάρχει κανένα στοιχείο που να δείχνει ότι αυτοί οι παράγοντες συμμετέχουν απ' ευθείας στην αποσιώπηση του γονιδίου της γ-σφαιρίνης δίνοντας έμφαση στο ότι η αποσιώπηση είναι το αποτέλεσμα σταδιακής αλλαγής στον παράγοντα περιβάλλον, ο οποίος επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων αυτών HBG₁/HBG₂ και την HBB.

Η καινούργια μετάλλαξη μη ελλειπτικής nd-HPFH, η οποία περιγράφεται εδώ, βρίσκεται στα όρια του γονιδίου HBG₂, στο ακραίο τμήμα CCAAT, είναι φυλογενετικά Cis – περιοχή, που φαίνεται ότι φιλοξενεί πολλούς ερυθροειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες στις περιοχές που συνδέονται (Stamatoyannopoulos G, Grosveld F 2001). Είναι στις 21 μεταλλάξεις μη ελλειπτικής nd-HPFH, που έχουν ανιχνευτεί σε αυτή την περιοχή δείχνοντας ότι αυτό το ρυθμιστικό στοιχείο είναι σημαντικό για τη μεταγραφή του γονιδίου της γ-σφαιρίνης.

Ωστόσο σε αντίθεση με την πλειονότητα αυτών των μεταλλάξεων μη ελλειπτικής nd-HPFH, που επηρεάζουν σημαντικά την παραγωγή της HbF, οι μεταλλάξεις HBG₂:g.-109 G>T nd-HPFH καταλήγουν σε μέτρια μόνο αύξηση των επιπέδων της HbF, πιθανώς λόγω του γεγονότος ότι είναι τοποθετημένο στο άκρο της περιοχής CCAAT.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η γειτονική HBG₂:g.-110 A>C μετάλλαξη, που οδηγεί στην Τσέχικη μη ελλειπτική nd-HPFH έχει αμελητέα επίδραση στην παραγωγή HbF (Indrak K, Intrakova J, Kutlar F, Pospisilova D, Sulovska I, Baysal E, Huisman TH 1991).

4.8 Η διπλή ετεροζυγωτία μη ελλειπτικής (non –deletional) HPFH και δβ-Μεσογειακής Αναιμίας.

Η Κληρονομική Παραμονή Εμβρυϊκής Αιμοσφαιρίνης (Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin, HPFH) και η δβ-Μεσογειακή Αναιμία (δβ-MA) είναι δύο κληρονομικές καταστάσεις, που χαρακτηρίζονται από παραμονή της έκφρασης εμβρυϊκών (γ-) γονιδίων και αυξημένα επίπεδα εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (HbF) στους ενήλικες (Stamatoyannopoulos G, et al 2001).

Στον Ελληνικό πληθυσμό, η ελληνικού μη ελλειπτικού (nd-) τύπου HPFH (HBG₁:g.-117 G>A) και η δβ-MA τουρκικού τύπου είναι δύο από τις πιο συχνά συναντώμενες κληρονομικές μοριακές βλάβες, που συνοδεύονται από υψηλά επίπεδα HbF στον ελληνικό πληθυσμό, αλλά με πολύ χαμηλή συχνότητα στο γενικό

πληθυσμό, <0,1%, (Patrinos GP, Kollia P, Loutradi – Anagnostou A, et al. 1998, Patrinos G P, Van Baal J, Petersen MB, Papadakis MN. 2005). Επιπλέον η εμφάνισή της δβ-MA Τουρκικού τύπου είναι υψηλότερη στην Κεντρική Ελλάδα (Samara M, Chiotoglou I, Kalamaras A, et al 2007, Van Baal S, Kaimakis P, Phommariuh M, et al 2007). Στην εργασία αυτή περιγράφεται, για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, η διπλή ετεροζυγωτία σε συνδυασμό ΗΡΡΗ/δβ-MA.

Οι μελέτες του DNA κατέδειξαν ότι και τα δύο δείγματα θήλεων ατόμων ήταν διπλά ετερόζυγα για την Ελληνική μη ελλειπτική (nd-) ΗΡΡΗ και τη δβ-MA, παρουσιάζοντας εξαιρετικά αυξημένα επίπεδα HbF (46,4% και 67,2% αντίστοιχα) και μειωμένα επίπεδα Hb A₂ (1,2% και 0,7% αντίστοιχα). Οι λοιποί αιματολογικοί δείκτες ήταν παραπλήσιοι με τυπικούς φορείς β-MA. Ανάλυση DNA στον υποκινητή των γ-γονιδίων και των δύο ατόμων κατέδειξε την παρουσία της μεταλλαγής Αγ-117 G>A, που οδηγεί στην ελληνικού μη-ελλειπτικού τύπου ΗΡΡΗ ενώ επιπρόσθετα, στην μία περίπτωση βρέθηκε στο άλλο αλληλόμορφο η πολυμορφική αλλαγή Αγ-225/-222 (ΔΑΓCΑ). Η αλλαγή αυτής της αλληλουχίας ΗΒG₁:g.-225-222 ΑΓCΑ, που συναντάμε πάντα στην Cis μορφή δβ-MA τουρκικού τύπου αλληλομόρφων, συνδέεται με αυξημένα επίπεδα HbF και, ορισμένες φορές με βελτιωμένη κλινική εικόνα, σε φορείς β-MA. (Patrinos GP, Kollia P, Papapanagiotu E, et al. 2001).

Τα αποτελέσματα μας υποδηλώνουν ότι τα επίπεδα HbF ήταν σημαντικά αυξημένα σε σύγκριση με τους τυπικούς φορείς δβ-MA Τουρκικού τύπου (3,2x-5,1x) και τους τυπικούς Ελληνικούς μη ελλειπτικούς (nd-) ΗΡΡΗ και τα επίπεδα HbA₂ ήταν σημαντικά μειωμένα (1,7x-3,7x). Παραδόξως, οι λοιποί αιματολογικοί δείκτες ήταν παραπλήσιοι με εκείνους τυπικών φορέων δβ-MA Τουρκικού τύπου, με εξαίρεση τα επίπεδα της HbA₂, που ήταν ακόμη πιο μειωμένα. Τα παραπάνω μπορούν να εξηγηθούν από τη λειτουργική αναστολή του δ-γονιδίου στο ίδιο χρωμόσωμα με τη μεταλλαγή Αγ-117 G>A (το γονίδιο της ΗΒD βρίσκεται σε Cis μορφή με το γονίδιο της ΗΒ G1). Επιπλέον τα σαφώς αυξανόμενα επίπεδα της HbF δεν είναι ικανά να βελτιώσουν την αιματολογική εικόνα των διπλών ετεροζυγών (nd-) ΗΡΡΗ/δβ-MA. Η κατάσταση αυτή ομοιάζει με τη διπλή ετεροζυγωτία β-MA και Ελληνικού μη-ελλειπτικού (nd-) ΗΡΡΗ τύπου ΗΡΡΗ/β-MA. (Papadakis MN, Patrinos GP, Tsafaridis P, Loutradi- Anagnostou A, 2002).

Συμπερασματικά, ο συνδυασμός μη ελλειπτικού τύπου ΗΡΡΗ και δβ-MA οδηγεί σε τυπική αιματολογική εικόνα δβ-MA, παρά τα αυξημένα επίπεδα της HbF και τα ελαττωμένα επίπεδα της HbA₂. Οι διαφορές στα επίπεδα της HbF και HbA₂ μεταξύ των δύο περιστατικών, μπορούν να αποδοθούν στην απουσία της πολυμορφικής αλλαγής Αγ-225/-222(ΔΑΓCΑ) ΗΒG₁:g. -225-222ΑΓCΑ στο ένα από τα δύο περιστατικά.

4.9 Ο συνδυασμός της Κληρονομικής Παραμονής Εμβρυϊκής Αιμοσφαιρίνης Κρητικού μη-ελλειπτικού τύπου, με β-Μεσογειακή Αναιμία.

Η γενετική αιτιολογία της μη ελλειπτικής nd-HPFH είναι οι σημειακές μεταλλάξεις στον υποκινητή του γονιδίου της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (Gγ- και Αγ-), που έχει ως αποτέλεσμα τη σταθερή έκφραση, των μεταγραφικώς σιωπηλών γονιδίων της γ-σφαιρίνης. Αν και σπάνιες, οι περιπτώσεις της μη ελλειπτικής nd-HPFH είναι εξαιρετικά ενδιαφέρουσες καθώς παρέχουν αποδείξεις in Vivo για το μοριακό μηχανισμό, που διέπει την επανενεργοποίηση της αιμοσφαιρίνης HbF και, επομένως, πολύτιμες γνώσεις για το σχηματισμό και την εφαρμογή νέων θεραπευτικών πρωτοκόλλων για την αντιμετώπιση της β-μεσογειακής αναιμίας. Για το λόγο αυτό ο συνδυασμός β-θαλασσαιμίας/nd-HPFH, σε διπλή ετεροζυγωτία είναι ακόμα πιο σημαντικός καθώς ο αιματολογικός τους φαινότυπος είναι αποτέλεσμα μεταλλαγμένων γονιδίων, που βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα, που δρουν από κοινού σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. Δυστυχώς τέτοιες περιπτώσεις είναι εξαιρετικά σπάνιες και περιστασιακά μόνο αναφέρονται στη βιβλιογραφία.

Ο Κρητικός τύπος μη ελλειπτικής nd-HPFH (Αγ-158 C>T) χαρακτηρίζεται από ελαφρώς αυξανόμενα επίπεδα HbF (2,9-5,1%) (G. P. Patrinos, P. Kollia, A. Loutradi-Anagnoston, D. Loucoroulos, M.N. Papadakis, 1998). Αυτή η μετάλλαξη είναι ιδιαίτερης σημασίας και από την πλευρά της εξέλιξης, καθώς προέκυψε από φαινόμενα μετατροπής δύο ανεξάρτητων γονιδίων (M.N. Papadakis, G.P. Patrinos, 1999). Αυτή η σπάνια μετάλλαξη είναι πανομοιότυπη με την πολυμορφική αλλαγή στο γονίδιο της Gγ-σφαιρίνης, Xmm πολυμορφισμός (Gγ-158 C>T), που απαντάται με υψηλή συχνότητα στα φυσιολογικά (όχι θαλασσαιμικά) άτομα. Η τελευταία αυτή αλλαγή, αν και δεν επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση της γ-σφαιρίνης στα φυσιολογικά άτομα (HbF:1-3%), σχετίζεται συχνά με αυξημένα επίπεδα HbF σε περιπτώσεις ερυθροποιητικού στρες (S.I. Thein, 2005).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε μία περίπτωση διπλής ετεροζυγωτίας για τον Κρητικό τύπο μη ελλειπτικής nd-HPFH σε συνδυασμό με τη β⁰-θαλασσαιμία, IVS1-1 G>A μετάλλαξη. Το περιστατικό αυτό ήταν ετεροζυγώτης β-θαλασσαιμίας, το οποίο εμφάνιζε υψηλότερα επίπεδα HbF (9,0 έναντι <2%), χαμηλότερα επίπεδα HbA₂ σε σχέση με τους τυπικούς ετεροζυγώτες για τη μετάλλαξη IVS1-1 G>A (2,4 έναντι 4,4%) και ελαφρά βελτιωμένους αιματολογικούς δείκτες και τα ελαφρώς αυξημένα επίπεδα HbF (12,8 έναντι 1,3%). Σε σύγκριση των αιματολογικών ενδείξεων του παραπάνω δείγματος, με τυπικούς ετεροζυγώτες Κρητικού μη

ελλειπτικού nd-HPFH τύπου, φάνηκε σχεδόν 3-πλάσια ($3,14 \pm 0,99$) αύξηση στα επίπεδα της HbF. Επίσης, τα επίπεδα της HbA₂ έδειχναν μείωση κατά 45%-60% σε σύγκριση με τους τυπικούς ετεροζυγώτες IVS1-1 G>A. Η ανάλυση της αλληλουχίας έδειξε ότι η Αγ-158 C>T ήταν η μόνη μετάλλαξη nd-HPFH σε υποκινητές του γονιδίου Gγ- και Αγ-σφαιρίνης, ενώ η παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο της δ-σφαιρίνης αποκλείστηκε. Επίσης, μελέτες στην οικογένεια επιβεβαίωσαν ότι η Κρητικού τύπου μετάλλαξη nd-HPFH, ήταν σε trans μορφή με την αντίστοιχη γονιδιακή μετάλλαξη β-σφαιρίνης, ενώ ο πολυμορφισμός X_{hml} ενωνόταν με cis μορφή στην Κρητικού τύπου nd-HPFH, όπως προαναφέρθηκε (G.P. Patrinos, P. Kollia, A. Loutradi – Anagnostou, D. Loucoroulos, M.N. Papadakis, 1998). Υπάρχουν πάνω από 20 μεταλλάξεις nd-HPFH, που έχουν αναφερθεί ως σήμερα (R.C. Hardison, D.H. Chui, B. Ciardine, et al., 2002), με τον Ελληνικό τύπο nd-HPFH (Αγ-117 G>A) να είναι ο πιο συχνός, ιδιαίτερα στον Ελληνικό πληθυσμό (G.P. Patrinos, P. Kollia, A. Loutradi – Anagnostou, D. Loucoroulos, M.N. Papadakis, 1998). Επομένως, δεν είναι άξιο απορίας ότι τα περισσότερα δεδομένα από διπλούς ετεροζυγώτες περιλαμβάνουν nd-HPFH / β-θαλασσαιμία, ενώ παρεμφερή στοιχεία υπάρχουν μόνο για τους δύο άλλους τύπους nd-HPFH, τον Gγ-175 T>C και Gγ-110 A>C (M.N. Papadakis, G.P. Patrinos, P. Tsafaridis, A. Loutradi – Anagnostou, 2002).

Τα αποτελέσματα της εργασίας επιβεβαιώνουν τον λειτουργικό ρόλο της Κρητικού τύπου nd-HPFH στη μεταλλαγή του γονιδίου της Αγ-σφαιρίνης. Οι περιπτώσεις διπλής ετεροζυγωτίας για τη μετάλλαξη Κρητικού τύπου nd-HPFH και την IVS1-1 G>A, που οδηγεί σε β-θαλασσαιμία παρουσιάζουν ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα HbF και μειωμένα επίπεδα HbA₂ σε σύγκριση με τους τυπικούς ετεροζυγώτες. Αυτά τα ευρήματα συσχετίζονται με τις προηγούμενες παρατηρήσεις μας, οι οποίες αναφερόταν σε μια συστηματική μελέτη στους διπλούς ετεροζυγώτες για την Ελληνική nd-HPFH / β-θαλασσαιμία (M.N. Papadakis, G.P. Patrinos, P. Tsafaridis, A. Loutradi – Anagnostou, 2002). Τα παρατηρούμενα αποτελέσματα στην αύξηση της HbF είναι αρκετά χαρακτηριστικά και αναδεικνύουν ότι η μετάλλαξη Αγ-158 C>T παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγραφή του γονιδίου της Αγ-σφαιρίνης. Μια πιθανή εξήγηση θα ήταν η εγγύτητα του γονιδίου της Αγ-σφαιρίνης στα γονίδια της σφαιρίνης των ενηλίκων, σε σύγκριση με το γονίδιο της Gγ-σφαιρίνης, που ευνοεί το πρώτο σε σχέση με το δεύτερο για αλληλεπίδραση με την περιοχή LCR (G. Stamatroyannopoulos, F. Grosveld, 2001). Τα παραπάνω σαφώς καταδεικνύουν το λειτουργικό ρόλο της μεταλλαγής Αγ-158 C>T στη μεταγραφή του Αγ-γονιδίου, σε αντίθεση με την πολυμορφική αλλαγή Gγ-158 C>T και βρίσκονται σε απόλυτη αντιστοιχία με προηγούμενη μελέτη σε διπλούς ετεροζυγώτες β-MA και Ελληνικού μη-ελλειπτικού τύπου HPFH (Papadakis M.N. et al., 2002).

4.10 Η 5' ρυθμιστική περιοχή των ανθρώπινων γονιδίων της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης ως ένα σημείο σημειακής γονιδιακής αναστροφής.

Στις πολυγονιδιακές οικογένειες η γονιδιακή αναστροφή συχνά διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του γονιδίου είτε ομογενοποιώντας αλληλουχίες μεταξύ συσχετιζόμενων γονιδίων που οδηγούν σε εξέλιξη ή προκαλώντας μεταλλάξεις σε συγκεκριμένες θέσεις DNA σε διαφορετικές αλληλουχίες.

Οι πρώτες περιπτώσεις γονιδιακής αναστροφής εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης και η χρησιμότητά τους δεν είναι απλώς το πρώτο παράδειγμα αυτού του μηχανισμού στα κύτταρα θηλαστικών (Slightom JL, Blechi AE, Smithies O, 1980) αλλά επίσης χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, τα οποία σχετίζονται με αλλαγή συγκέντρωσης συγκεκριμένων αλληλουχιών ή με φραγμούς της αντιστροφής παρέχοντας έτσι ένα πρότυπο σύστημα για τη μελέτη της μοριακής εξέλιξης με τη γονιδιακή μεταστροφή (Papadakis MN, Patrinos GP, 1999).

Αυτή η μελέτη περιγράφει τρεις σπάνιες νουκλεοδικές αντικαταστάσεις Gγ-369 (C>G), Aγ-369 (G>C), καθώς και Gγ-309 (A>G) στις 5' ρυθμιστικές περιοχές των αντίστοιχων γονιδίων εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης, που είναι πιθανόν το αποτέλεσμα ανεξάρτητων περιπτώσεων γονιδιακής αντιστροφής.

Σύγκριση αιματολογικών ενδείξεων των περιπτώσεων που μελετήθηκαν με αυτές ετεροζυγωτών για τις αντίστοιχες κληρονομικές περιπτώσεις δεν ήταν σημαντικά διαφορετικές. Επίσης, παροδικής έκφρασης μελέτες που έγιναν προηγουμένως (Lanclos KD, Oner C, Dymovski AJ, Gu Y-C, Huisman THJ, 1991), κατέδειξαν επιπλέον ότι αυτές οι μεταλλαγές δεν έχουν κανένα αντίκτυπο στη μεταγραφή του αιμοσφαιρινικού γονιδίου.

Τα παραπάνω, μαζί με το γεγονός ότι αυτές οι αλλαγές συνδέονται πάντα σε χρωμοσώματα cis σε β^s/Benin και με τη μεταλλαγή Aγ-499 (T>A) (Patrinos GP, Loutradi-Anagnostou A, Papadakis MN, 1996) καταδεικνύουν ότι η Gγ-369 (C>G)/Aγ-369 (G>C) και Gγ-309 (A>G) νουκλεοδικές αντικαταστάσεις είναι λειτουργικά ουδέτερες.

Τα δεδομένα δείχνουν ότι οι Aγ-369 και Gγ-309 μεταλλαγές, όπως και η μεταλλαγή Aγ-499, πιθανότατα προέκυψαν ανεξάρτητα σε cis μορφή, δημιουργώντας ένα αρχέγονο απλότυπο πάνω στον οποίο δημιουργήθηκε η β^s/Benin μεταλλαγή (Patrinos GP, Samperi P, Lo Nigro L, Kollia P, Schiliro G, Papadakis MN, 2005).

Ως επακόλουθο ένα περιστατικό inter-allelic αναστροφής, που περιλαμβάνει ένα μικρό τμήμα DNA(1-10bp) μεταξύ των γονιδίων Gγ-σφαιρίνης μετέφερε τη μεταλλαγή Gγ-309 σε ένα φυσιολογικό (β^A) χρωμόσωμα. Παρόμοια, ένα inter-allelic

περιστατικό γονιδιακής αναστροφής, που περιλάμβανε ένα ελαφρώς μεγαλύτερο τμήμα DNA (1-42bp), κατέληξε στη μεταφορά της μεταλλαγής -369 από το γονίδιο Gγ- στο γονίδιο Αγ-σφαιρίνης, σε ένα φυσιολογικό (β^A) χρωμόσωμα. Παρόμοια, inter-allelic γονιδιακή μεταστροφή μεταξύ γονιδίων αιμοσφαιρίνης Αγ-κατέληξαν τότε στη μεταφορά της ίδια μεταλλαγής σε τουλάχιστον δύο διαφορετικά χρωμοσώματα όπως ορίζουν οι δύο απλότυποι.

Ένα inter-allelic περιστατικό γονιδιακής μεταστροφής που θα μπορούσε να μεταφέρει τη μεταλλαγή Gγ-369 από το χρωμόσωμα β^S /Benin σε β^A χρωμόσωμα είναι επίσης πιθανό, αν και αυτή η μεταλλαγή δε βρέθηκε ποτέ ξεχωριστά πράγμα που δείχνει ότι ένα τέτοιο περιστατικό δε συνέβη ποτέ ή δε βρέθηκε ακόμα.

Εναλλακτικά μπορούμε να συμπεράνουμε ότι αυτές οι αλλαγές στις αλληλουχίες συνέβησαν σαν ανεξάρτητα μεταλλαξογόνα περιστατικά ιδιαίτερα από τη στιγμή που το υποτιθέμενο ελάχιστο σημείο γονιδιακής μεταστροφής έχει μήκος 1bp (Hardiso RC, Chui DHK, Giardine B et al. 2002, Patrinos GP, Giardine B, Riemer C et al., 2004, Patrinos GP, Wajcman H, 2004, Giardine B, van Baals, Kaimakis P, et al, 2007).

Τέλος, τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι περιστατικά γονιδιακής αναστροφής συμβαίνουν συχνά στο 5' ρυθμιστικό άκρο των γονιδίων ανθρώπινης εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης και δείχνουν ότι αυτή η περιοχή μαζί με τις περιοχές κωδικοποίησης είναι ένα σημείο ανασυνδυασμού/γονιδιακής αντιστροφής. Επίσης, η συμμετοχή του γονιδιακού ανασχηματισμού στην εξέλιξη της οικογένειας των γονιδίων της ανθρώπινης β -σφαιρίνης δίνει επιπλέον έμφαση στο ότι αυτή η οικογένεια γονιδίων θα μπορούσε να αποτελεί πρότυπο μοντέλο για μελέτη των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στη γονιδιακή αναστροφή και ανασυνδυασμό.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μεσογειακή αναιμία και τα θαλασσαιμικά σύνδρομα αποτελούν τα γενετικά νοσήματα με τη μεγαλύτερη συχνότητα, τόσο στους πληθυσμούς της Μεσογείου όσο και σε άλλες περιοχές της γης. 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 θαλασσαιμικά σύνδρομα μπορεί να αποδοθεί στην ύπαρξη της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (HbF), η οποία βελτιώνει σημαντικά την κλινική

τους εικόνα, αν και οι υποκείμενες μοριακές βλάβες στα γ-γονίδια και η αλληλεπίδρασή τους με τα γονίδια του συμπλέγματος β-τύπου δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί.

Για το λόγο αυτό στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν οι cis-αλληλουχίες του γ-γονιδίου σφαιρίνης για την ταυτοποίηση μεταλλαγών υπεύθυνων για την παρουσία αυξημένης εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης σε ασθενείς με θαλασσαιμικά σύνδρομα [β-θαλασσαιμία, δβ-θαλασσαιμία και κληρονομική παραμονή εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (HPFH)] με σκοπό την κατανόηση των μηχανισμών αλληλεπίδρασης έκφρασης των γονιδίων σφαιρίνης.

Μελετήθηκαν 160 ασθενείς με β-θαλασσαιμία και αυξημένη HbF (52 άτομα), δβ-θαλασσαιμία (63 άτομα), HPFH (30 άτομα). Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας μπορούν να συνοψιστούν:

α) η κατανομή των θαλασσαιμικών μεταλλαγών στην περιοχή της Κεντρικής Ελλάδος είναι παρόμοια με αυτή της υπόλοιπης Ελλάδος. Παρατηρήθηκε, βέβαια, ότι η έλλειψη –MED του α γονιδίου σφαιρίνης και η έλλειψη/αναστροφή Τουρκικού τύπου αποτελούν τις πιο συχνές γενετικές αναδιατάξεις που οδηγούν σε α- και δβ-θαλασσαιμία, αντιστοίχως. Επιπλέον, η μετάλλαξη -101 (C→T) του υποκινητή του β γονιδίου σφαιρίνης παρουσιάζει σημαντικά υψηλή συχνότητα στην κεντρική Ελλάδα.

β) μέχρι σήμερα, 14 γονιδιακές αναστροφές έχουν περιγραφεί στα Gγ- και Αγ-γονίδια σφαιρίνης του ανθρώπου, η συντριπτική πλειοψηφία των οποίων περιορίζεται στην κωδικοποιούσα αλληλουχία. Στην εργασία αυτή περιγράφηκαν τρεις νέες περιπτώσεις γονιδιακής αναστροφής στην 5' ρυθμιστική περιοχή των εμβρυϊκών γονιδίων σφαιρίνης. Οι αλλαγές αλληλουχίας βάσεων, που προέκυψαν από αυτά τα γεγονότα αναστροφής, αποτελούν μεταγραφικά σιωπηλούς πολυμορφισμούς που δεν συμβάλλουν στην αύξηση των επιπέδων της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης. Αυτό υποδεικνύει ότι η 5' ρυθμιστική περιοχή των ανθρώπινων εμβρυϊκών γονιδίων σφαιρίνης είναι ένα "hotspot" γονιδιακής αναστροφής που εμποδίζει τη μεγάλη ποικιλότητα της αλληλουχίας του υποκινητή των γονιδίων σφαιρίνης, υπογραμμίζοντας περαιτέρω την ανάγκη για δύο λειτουργικά εμβρυϊκά γονίδια σφαιρίνης στο στάδιο της εμβρυϊκής ερυθροποίησης.

γ) περιγράφηκε ένας νέος τύπος nd-HPFH που οφείλεται σε μετάλλαξη στην περιοχή του υποκινητή του HBG2 γονιδίου (HBG2: g.-109G>T). Η μετάλλαξη αυτή, που βρίσκεται στο 3' άκρο του δεύτερου CCAAT κουτί του γονιδίου HBG2, έχει ως αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα HbF και Gγ-σφαιρινικής αλυσίδας. Ηλεκτροφορητική ανάλυση μετατόπισης κινητικότητας έδειξε ότι η μετάλλαξη αυτή καταργεί μια θέση πρόσδεσης του NF-E3 μεταγραφικού παράγοντα. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η HBG2: g.-109G> T μετάλλαξη έχει ένα λειτουργικό ρόλο ενισχύοντας τη

μεταγραφή του HBG2 και είναι υπεύθυνη για το φαινότυπο HRFH.

δ) μία περίπτωση διπλού ετεροζυγώτη για την nd-HRFH Κρητικού τύπου σε συνδυασμό με β⁰-θαλασσαιμία (IVSI-1 G→A) με ελάχιστα επηρεασμένα αιματολογικούς δείκτες, συγκρινόμενα με αυτά του τυπικού ετεροζυγώτη για τη μεταλλαγή IVSI-1 και αυξημένα επίπεδα HbF. Τα αιματολογικά στοιχεία ήταν σχετικά καλύτερα συγκρινόμενα με τους αντίστοιχους βIVSI-1 τυπικούς ετεροζυγώτες. Η αύξηση της HbF είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή που παρατηρείται από την παρουσία της Αγ -158 C>T μεταλλαγής σε ετεροζυγωτία με την πλειονότητα των β-θαλασσαιμικών μεταλλαγών. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν σημαντικά το λειτουργικό ρόλο της -158 C-->T Αγ μεταλλαγής, μη ελλειπτικού Κρητικού τύπου μεταλλαγή, στη μεταγραφή του Αγ-γονιδίου. Αυτό πιθανά εξηγείται από την μικρότερη απόσταση που υπάρχει μεταξύ του Αγ-γονιδίου με τα γονίδια του ενηλίκου παρά με το Gγ-γονίδιο.

ε) αναφέρεται για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία παράδειγμα διπλής ετεροζυγωτίας HRFH/δβ-θαλασσαιμίας. Η γονοτυπική ανάλυση έδειξε ότι ήταν διπλό ετεροζυγώτες για τη μεταλλαγή -117G→A του Αγ-γονιδίου, υπεύθυνη για nd-HRFH, και τη δβ-θαλασσαιμία Τουρκικού τύπου που απαντάται συχνά στην Κεντρική Ελλάδα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα HbF ήταν σημαντικά υψηλότερα από τα αντίστοιχα των τυπικών ετεροζυγωτών για nd-HRFH και δβ-θαλασσαιμία, ενώ τα επίπεδα HbA₂ ήταν σημαντικά μειωμένα. Βέβαια, τα αιματολογικά στοιχεία ήταν αντίστοιχα ενός τυπικού ετεροζυγώτου για δβ-θαλασσαιμία. Επιπλέον, τα υψηλά επίπεδα της HbF δεν κατάφεραν να βελτιώσουν την αιματολογική εικόνα των διπλών ετεροζυγωτών nd-HRFH/δβ. Τα δεδομένα αυτά οδηγούν στη σκέψη ότι η συνύπαρξη nd-HRFH και δβ-θαλασσαιμίας οδηγεί σε μια κλινική εικόνα όμοια με αυτή των δβ-ετεροζυγωτών, παρά τα υψηλά επίπεδα της HbF.

SUMMARY

Thalasseмииs and hemoglobinopathies in general, are genetic disorders with the highest incidence among the Mediterranean populations as well in other parts of the world. Hemoglobin conversion in various human developmental stages was first described in the 1950s, while later, various mutations were discovered, that lead to persistent expression of the fetal globin gene in adults.

The patho-physiological role of human fetal hemoglobin in thalasseмииs was described in the early 1960s. Various genetic and biochemical studies showed that the survival of patients with thalasseмииs could be attributed to the existence of fetal hemoglobin (HbF), which could significantly improve their clinical situation, even

though the underlying molecular damages in the γ - genes and their interaction with the β -cluster genes is unclear.

For this reason, in the present thesis the cis-sequences of the γ -globin genes were studied in order to identify the mutations responsible for the presence of elevated fetal hemoglobin in patients with various thalassemias [β -thalassemia, $\delta\beta$ -thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH)], so that the interaction mechanisms in the expression of the globin genes could be understood.

160 patients with β -thalassemia were studied, including patients with β -thalassemia and elevated HbF (52 subjects), $\delta\beta$ -thalassemia (63 subjects) and HPFH (30 subjects). In synopsis, the results of this thesis can be seen below:

a) the distribution of thalassemic mutations in Central Greece are similar to the ones observed in the rest of the country. It was seen though, that the $-MED$ deletion of the α -globin gene and the deletion/inversion of the Turkish type are the most frequent genetic redistribution leading to α - and $\delta\beta$ -thalassemia, respectively. In addition, the -101 (C \rightarrow T) mutation of the β -globin gene promoter is present in significantly high frequency in Central Greece.

b) To date, 14 gene conversions have been described in the human $G\gamma$ - and $A\gamma$ -globin genes, the vast majority of which are restricted in the coding sequences. Here, we provide evidence for three new gene conversion events in the 5' regulatory region of the human fetal globin genes, identified during a large genetic screening effort in adult individuals with high fetal hemoglobin levels. The sequence variations, resulting from these conversion events, are transcriptionally silent polymorphisms that do not contribute to increased fetal hemoglobin levels. Our results suggest that the 5' regulatory region of the human fetal globin genes is a gene conversion hot spot that prevents globin gene promoter sequence diversification, further underlining the need for two functional fetal globin genes in fetal erythropoiesis.

c) a novel nd-HPFH mutation in the *HBG2* gene promoter (*HBG2:g.-109G>T*). This mutation, located at the 3' end of the *HBG2* distal CCAAT box, is identified in two adult female subjects of Central Greek origin and results in elevated HbF levels (4.1, 14.3%), significantly increased $G\gamma$ -globin chain production (79.2%) and markedly improved hematological indices. Electrophoretic mobility shift analysis revealed that the *HBG2:g.-109G>T* mutation abolishes a transcription factor binding site. These data suggest that the *HBG2:g.-109G>T* mutation has a functional role in increasing *HBG2* transcription and is responsible for the HPFH phenotype observed in this case.

d) One case of an adult compound heterozygote for nd-HPFH Cretan type in combination with β^0 -thalassemia (IVSI-1 G \rightarrow A) characterized by slightly improved

hematological indices, reduced HbA2 levels, compared to typical IVS 1-1 G>A heterozygotes. The increase of HbF levels is higher than the ones observed in the presence of the A γ -158 C>T mutation in heterozygosity with the majority of β -thalassemia mutations.

This fact strongly suggests that the A γ -158 C-->T A γ mutation has a significant role in A γ -globin gene transcription. A possible explanation for this difference might be the closer physical proximity of the A γ -globin gene to the adult globin genes, compared to the G γ -globin gene.

e) it is the first published record of a compound heterozygote cases of HPFH/ $\delta\beta$ -thalassemia. Genotypic analysis proved them to be compound heterozygotes for the -117G→A mutation of the A γ -gene, known to be responsible for the nd-HPFH, and the Turkish type $\delta\beta$ -thalassemia, which is quite frequent in area of central Greece. Our results indicate that HbF levels were considerably higher compared to typical Greek nd-HPFH and Turkish db-thalassemia heterozygotes and the HbA2 levels were markedly reduced. However, the hematological indices resembled that of typical db-thalassemia heterozygotes. Thus, our data suggest that the interaction of nd-HPFH with db-thalassemia results in a clinical picture similar to db-thalassemia carriers, despite the markedly increased HbF levels.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Anagnou NP, Papayannopoulou T, Nienhuis AW (1985). Structurally diverse molecular deletions in the β -globin gene cluster exhibit an identical phenotype on interaction with the β^S gene. *Blood*, 65:1245-1251

Anagnou NP, Papayannopoulou T, Nienhuis AW, Stamatoyannopoulos G (1988). Molecular characterization of a novel form of $(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ thalassemia deletion with a 3' breakpoint close to those of HPFH-3 and HPFH-4: Insights for a common regulatory mechanism. *Nucleic Acids Res*, 16:6057-6066.

Anagnou NP, Perez-Stable C, Gelinas R, Costantini F, Liapaki K, Constantopoylou M, Kosteas T, Moschonas NK, Stamatoyannopoulos G (1995). Sequences located 3' to the breakpoint of the hereditary persistence of fetal haemoglobin-3 deletion exhibit enhancer activity and can modify the developmental expression of the human fetal $\text{A}\gamma$ -globin gene in transgenic mice. *J Biol Chem*, 270:10256-10263

Arous N, Galacteros F, Fessas P, Loukopoulos D, Blouquit Y, Komis G, Sellaye M, Boussiou M, Rosa J (1982). Structural study of haemoglobin Knossos, β^{27} (B9) Ala \rightarrow Ser. A new abnormal haemoglobin presents as a silent β -thalassemia. *FEBS Lett*, 147:247-250.

Athanassiadou A, Papachatzopoylou A, Zoumbos N, Maniatis GM, Gibbs R (1994). A novel β -thalassemia mutation in the 5' untranslated region of the β -globin gene. *Br J Haematol*, 88:307-310.

Athanassiadou A, Zarkadis I, Papahadjopoulou A, Maniatis GM. DNA haplotype heterogeneity of β -thalassaemia in Greece: Feasibility of prenatal diagnosis. *Br J Haematol* 66:379-383, 1987.

Athanassiadou A, Zarkadis I, Papahadjopoulou A, Maniatis GM. DNA haplotype heterogeneity of β -thalassaemia in Greece Feasibility of prenatal diagnosis. *Br J Haematol* 66: 379-383, 1987

Atweh GF, Zhu D, Forget BG (1986). A novel basis for $\delta\beta$ -thalassemia in a Chinese family. *Blood*, 68:1108-1113.

Atweh GF, Zhu XX, Brickner HE, Dowling CH, Kazazian HH Jr, Forget BG (1987). The β -globin gene on the Chinese $\delta\beta$ -thalassemia chromosome carries a promoter mutation. *Blood*, 70:1470-1474.

BOYER S.H., MARGOLET L., BOYER M.L., HUISMAN T.H.J., SCHROEDER W.A., WOOD W.G., WEATHERALL D.J., CLEGG J.B. and CARTNER R. (1977): Inheritance of F cell frequency in heterocellular hereditary persistence of fetal

hemoglobin: An example of allelic exclusion. *Am. J. Hum. Genet* 29,256.

Bacolla A, Ulrich MJ, Larson JE, Ley TJ Wells RD (1985). An intramolecular triplex in the human γ -globin 5' –flanking region is altered by point mutations associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin. *J Biol Chem*, 270:24556-24563.

Balta G, Brickner HE, Takegawa S, Kazazian HH Jr, Papayannopoulou T, Forget BG, Atweh GF (1994). Increased expression of the G γ and A γ globin genes associated with a mutation in the A γ enhancer. *Blood*, 83:3727-3737.

Baysal E (1993). A repository of deletional HPFH and $\delta\beta$ -thalassemia conditions. *Haemoglobin*, 17:569-590.

Baysal E, Carver MFH (1995). The β - and δ -thalassemia repository *Hemoglobin*, 19:213-236.

Berry M, Grosveld F, Dillon N (1992). A single point mutation is the cause of the Greek form of hereditary persistence of fetal haemoglobin. *Nature*, 358:499-502.

Berry M, Grosveld F, Dillon N (1992). A single point mutation is the cause of the Greek form of hereditary persistence of fetal haemoglobin. *Nature* 358:499-502, doi:10.1038/358499a0

Bollekens JA, Forget BG (1991). $\Delta\beta$ Thalassemia and Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin, In *Hemoglobinopathies, Hematology/Oncology Clinics of North America*, Vol.5 No3, pp.399-422.

Bollekens JA, Forget BG (1991) Deltabeta thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Hematol Oncol Clin North Am* 5:399-422.

Boussiou M., Kollia P. et al (1990), prenatal diagnosis of thalassemia by the polymerase chain reaction (PCR) using non radioactive probes *Eur. Soc. Clin. Invest. Meeting, Athens abst.* 19.

BOYER S.H. and DOVER G.J. (1979): The in vivo biology of F-cells in man. In: *Cellular and molecular regulation of hemoglobin switching*. G. Stamatoyannopoulos and A.W. Nienhuis (eds). Grune and Stratton. New York. p.47.

BOYER S.H., BELDING T.K, MARGOLET L., NOYES A.N., BURKE J.P. and BELL R.W. (1975b): Variation in the frequency of fetal hemoglobin bearing erythrocytes (F cells) in well adults, pregnant women and adult leukemics. *John Hopkins Med. J.* 137, 105.

Boyer SH, Belding TK, Margolet L, Noyes AN (1975). Fetal hemoglobin restriction to a few erythrocytes (F-cells) in normal human adults. *Science*, 188:361-363.

Camaschella C, Oggiano L, Sampietro M, Gottardi E, Alfarano A, Pistidda P, Dore F, Tarameli R, Ottolengi S, Longionotti M (1989). The homozygous state of G to A-117 A γ hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Blood*, 73:1999-2002.

Camaschella C, Serra A, Gottardi E, Alfrano A, Revello D, Mazza U, Saglio G (1990). A new hereditary persistence of fetal hemoglobin deletion has the breakpoint withing the 3' β -globin gene enhancer. *Blood*, 73:1000-1005.

Cantor CR, Efstratiadis A (1984). Possible structures of homopurine-homopyrimidine S1-hypersensitive sites. *Nucleic Acids Res*, 12:8059-8072.

Catala F, deBoer E, Habets G, Grosveld F. (1989). Nuclear protein and erythroid transcription of the human A γ -globin gene. *Nucleic Acids Res*, 17:3811-3827.

Chen JM, Cooper DN, Chuzhanova N, Ferec C, Patrinos GP. Gene conversion: Mechanisms, evolution and human disease. *Nat Rev Genet*. 2007; 8(11): 762-775.

Chen Z, Luo HY, Basran RK, Hsu TH, Mang DW, Nuntakam I, Rosenfield CG, Patrinos GP, Hardison RC, Steinberg MH, Chui OH (2008) A T-to-G transversion at nucleotide -567 upstream of HBG2 in a GATA-1 binding motif is associated with elevated hemoglobin F. *Mol Cell Biol* 28:4386-4393, doi: 10.1128/ MCB.00071-08

Chiu CH, Schneider H, Schneider MPC, Sampaio I, Meireles C, Slightom JL, Gumucio DL, Goodman M (1996). Reduction of two functional γ -globin genes to one: An evolutionary trend in New World monkeys (infraorder Platyrrhini). *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:6510-6515.

Coley, 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.

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.

D. Gasperini, R. Galanello, MA Melis, et,al., .Hemoglobin Sabine [β 91 (F7) Leu>Pro]: occurrence in a Sardinian individual with hemolytic anemia and inclusion bodies. *Haematologica* 77 (1992)381-383.

de Vooght KM, van Wijk R, Ploos van Amstel HK, van Solinge WW. Characterization of the -16C > G sequence variation in the promoters of both HBG1 and HBG2: convergent evolution of the human γ -globin genes. *Blood Cells Mol Dis*. 2007; 39(1):70-74.

Efremov DG, Dimovski AJ, Huisman THJ (1994). The -158 (C→T) promoter mutation is responsible for the increased transcription of the 3' γ gene in the Atlanta type of the hereditary persistence of fetal hemoglobin *Blood*, 83:3350-3355.

Efremov DG, Dimovski AJ, Huisman THJ. The -158 (C→T) promoter mutation is responsible for the increased transcription of the 3' γ gene in the Atlanta type of hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Blood*. 1994; 83 (11) :3350-3355.

Fearon ER, Kazazian HH Jr, Waber PG, Lee JI, Antonarakis SE, Orkin SH, Vanin EF, Henthorn PS, Grosveld FG, Scott AF, Buchanan GR (1983). The entire β -globin

gene cluster is deleted in a form of $\gamma\delta\beta$ -thalassemia. *Blood*, 61:1273-1278.

Fei YJ, Lancions KD, Kutlar F, Walker EL III, Huisman THJ (1988). A chromosome with five γ -globin genes. *Blood*, 72:827-829.

FESSAS PH. (1968): The heterogeneity of thalassaemia. 12th Congress of the International Society of Haematology, New York, Plenary session. Papers p.52

FESSAS PH. (1979): Hemoglobin A and Thalassemia. In: Cellular and molecular regulation of hemoglobin switching. G. Stamatoyannopoulos and A.W. Nienhuis (eds). Grune and Stratton. New York. p. 119.

FESSAS PH. (1979): Hemoglobin A and Thalassemia. In: Cellular and molecular regulation of hemoglobin switching. G. Stamatoyannopoulos and A.W. Nienhuis (eds). Grune and Stratton. New York. p. 119.

FESSAS PH. and LOUCOPOULOS D. (1974): The β -thalassaemias. *Clin. Haematology* 3, 411

FESSAS PH. and LOUCOPOULOS D. (1974): The β -thalassaemias. *Clin. Haematology* 3, 411.

FESSAS PH.-(1968): The heterogeneity of thalassaemia. 12th Congress of the International Society of Haematology, New York. Plenary session. Papers p.52.

FINNE P.H. and HALVORSEN S. (1972): Regulation of erythropoiesis in the fetus and newborn. *Arch. Dis child.* 47, 683.

Fischer KD, Nowock J (1990). The T→C substitution at -198 of the $A\gamma$ -globin gene associated with the British form of the HPFH generates overlapping recognition sites for two DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res*, 18:5685-5693.

Fischer SG, Lerman LS (1983). DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80:1579-1583.

Fitch DH, Bailey WJ, Tagle DA, Goodman M, Sieu L, Slightom JL. Duplication of the γ -globin gene mediated by L1 long interspersed repetitive elements in an early ancestor of simian primates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88(16):7396-7400.

Fortina P, Delgrosok, Werner E, Haines K, Rappaport E, Schwartz E, Surrey S (1991). A >200 kb deletion removing the entire β -like globin gene cluster in a family of Irish descent. *Hemoglobin*, 15:23-41.

Fritsch EF, Lawn RM, Maniatis T (1979). Characterization of deletions which affect the expression of fetal globin genes in man. *Nature*, 279:598-603.

Fucharoen S, Shimizu K, Fukumaki Y (1990). A novel C-T transition within the distal CCAAT motif of the $G\gamma$ -globin gene in the Japanese HPFH: Implication of factor binding in elevated fetal globin expression. *Nucleic Acids Res*, 18:5245-5253.

G Stamatoyannopoulos, F, Grosveld, Hemoglobin switching, in: G. Stamatoyannopoulos, P. Majerus, R. Perlmutter, H. Varmus (Eds.), Molecular Basis of Blood Diseases, 3rd ed., W Saunders Publishing Company, Philadelphia, 2001, pp. 135-182.

G. Stamatogiannopoulos, F. Grosvel : Hemoglobin Switching. Molecular Basis of Blood Diseases, 3th edition 135-182.2001 <http://sickle.bwh.harvard.edu/thalover.html>
"Thalassemia" October 1999 PP1-4 1999

G. Stamatogiannopoulos, F. Grosvel: Hemoglobin Switching. Molecular Basis of Blood Diseases, 3th edition 1335-182.2001

Gelinas R, Endlich B, Pfeiffer C, Yagi M, Stamatoyannopoulos G (1985) G to A substitution in the distal CCAAT box of the A gamma-globin gene in Greek hereditary persistence of fetal haemoglobin. Nature 313:323-325, doi:10.1038/313323 a0

George E, Faridan K, Trent RJ, Padanilam BJ, Huang HJ, Huisman THJ (1986). Homozygosity for a new type of G γ (A γ δ β)^o –thalassemia in a Malaysian male. Hemoglobin, . 10:353-363.

Giardine B, van Baal S, Kaimakis P et ai. HbVar database of human haemoglobin variants and thalassemia mutations: 2007 update. Hum Mutat. 2007; 28(2):206 (<http://globin.bx.psu.edu/hbvat>).

Gilman JG (1995). Activator protein binding to -158/-161 region of γ globin gene promoter. Blood, 86 (Suppl.1):5a.

Gilman JG, Johnson ME, Mishima N (1988b). Four base-pair deletion in human A γ -globin gene promoter associated with low A γ expression in adults. Br J Haemat, 68:455-458.

Gilman JG, Mishima N, Wen XJ, Kultar F, Kutlar F, Huisman THJ (1988a). Upstream promoter mutation associated with a modest elevation of the fetal hemoglobin expression in human adults. Bloods, 72: 78-81.

Graig JE, Barneston RA, Pior J, Raven JL, Thein SL. Rapid detection of deletions causing $\delta\beta$ thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin by enzymatic amplification. Blood. 1994; 83(6):1673-1682.

Gumutsio DL, Rood KL, Gray TA, Riordan MF, Sartor CI, Collins FC (1998). Nuclear proteins that bind the human γ -globin gene promoter: Alterations in binding Produced by point mutations associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin. Mol Cell Biol, 8:5310-5322.

Harano K, Harano T, Kutlar F, Huisman THJ (1985). γ -Globin gene triplication and quadruplication in Japanese newborns – evidence for a decreased in novo expression of the 3' A γ globin gene. FEBS lett, 190:45-49.

Harano T, Huisman THJ, Zeng YT, Huang SZ (1985). Two arrangements of the human fetal globin genes are responsible for high G γ values in Chinese newborns – G γ -G γ - δ - β - and –G γ -A γ -G γ -A γ - δ - β -. Am J Hemat, 19:349-353.

Hardison RC, Chui DHK, Giardine B, Reimer C, Patrinos GP, Anagnou N, Miller W, Wajcman H (2002) Hb Var: a relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the globin gene server. Hum Mutat, 19(3):225-233 doi:10.1002/humu.10044 (<http://globin.bx.psu.edu/hbvat>)

Hattori Y, Kutlar F, Chen SS, Huisman THJ, Demuro M, Formato M, Manca L, Masala B (1986). DNA polymorphisms in North Sardinia newborns and their linkage with abnormal γ -globin gene arrangements and with β^0 -thalassemia. Biochem Genet, 24:669-681.

Henthorn PS, Mager DL, Huisman THJ, Smithies O (1986). A gene deletions ending within a complex array of repeated segments 3' to the human β -globin gene cluster. Proc Natl Acad Sci USA, 83:5194-5198.

Henthorn PS, Smithies O, Mager DL, (1990). Molecular analysis of deletions in the human β -globin gene cluster: Deletion junctions and locations of breakpoints. Genomics, 6:226-237.

Henthorn PS, Smithies O, Nakatsuji T, Felice AE, Gardiner MB, Reese AL, Huisman THJ (1985). (A $\gamma\delta\beta$) 0 – Thalassemia in Blacks is due to a deletion of 34 kbp of DNA. Br J Haemat, 59:343-356.

Hoffrand AV, Pettit JE, Essential Haematology, 3rd ed, Oxford: Blackwell scientific Publications, 1993.

Horwitz EM, Maloney KA, Ley TJ (1994). A human protein containing a “cold shock” domain binds specifically to H-DNA upstream from the human γ -globin genes. J Biol Chem, 269:14130-14139.

[Http://sickle.bwh.harvard.edu/thalover.html](http://sickle.bwh.harvard.edu/thalover.html) “Thalassemia” October 10 1999 pp1-4

[Http://sickle.bwh.harvard.edu/hbsynthesis.html](http://sickle.bwh.harvard.edu/hbsynthesis.html) “Hemoglobin Synthesis” April 14, 2002. pp1-3.

Huehns, E.R., and Farooqui, A.M. (1975) Nature (Lond.) 254, 335-337

Huisman THJ, (1987). A short review of human γ -globin gene anomalies. Acta Haematol, 78:80-84.

Huisman THJ, Harris H, Gravely M, Schroeder WA, Shelton JR, Shelton JB, Evans L (1977a). The chemical heterogeneity of fetal hemoglobin in normal newborn infants and in adults. Mol Cell Biochem, 17:45-55

Huisman THJ, Kutar F, Gu LH (1991). Γ Chain abnormalities and γ -globin gene rearrangements in newborn babies of various populations. Hemoglobin, 15:349-379.

Huisman THJ, Reese AL, Gardiner MB, Wilson JB, Lam H, Reynolds A, Nagle S, Trowell P, Zeng YT, Huang SZ, Sukumaran PK, Miwa S, Efremov GD, Petkov G, Sciarratta GV, Sansone G (1983). The occurrence of different levels of G γ chain and of the A γ^T variant of fetal hemoglobin in newborn babies from several countries. *Am J Hematol*, 14:133-148.

Huisman THJ, Schroeder WA, Reese A, Wilson JB, Lam H, Shelton JR, Shelton JB, Baker B (1977b). The γ^T chain of human fetal hemoglobin at birth and in several abnormal hematologic conditions. *Pediatr Res*, 11:1102-1105.

Huisman THJ, Wrightstone RN, Wilson JB, Schroeder WA, Kendall AG (1972). Hemoglobin Kenya, the product of the fusion of the γ - and β -polypeptide chains. *Arch Biochem Biophys*, 153:850-853.

Huisman TH, Harris H, Gravely M, Schroeder WA, Shelton JR, Shelton JB, Evans L (1977) The chemical heterogeneity of fetal hemoglobin in normal newborn infants and in adults. *Mol Cell Biochem* 17:45-55, doi: 10.1007/BF01732554

Indrak K, Indrakova J, Kutlar F, Pospisilova D, Sulovska I, Baysal E, Huisman THJ (1991) Compound heterozygosity for a beta⁰-thalassemia (frameshift codons 38/39; -C) and a nondeletional Swiss type of HPFH (A>C) at NT -110, Gamma) in a Czechoslovakian family. *Ann Hematol* 63:111-115, doi:10.1007/BF01707283

Ingram, VM. And Stretton, A.O.W: Genetic basis of the thalassaemia diseases. *Nature* 184: 1903, 1959.

Ingram, VM.. And Stretton, A.O.W: Genetic basis of the thalassaemia diseases. *Nature* 184: 1903, 1959.

Jane SM, Gumucio DL, Ney PA, Cunningham JM, Nienhuis AW (1993). Methylation-enhanced binding of Sp1 to the stage selector element of the human γ -globin gene promoter may regulate developmental specificity of expression. *Mol Cell Biol*, 13:3272-3281.

Kamuroza, H., and Lehmann, H. (1975) *Nature (Lond.)* 256, 511-513

Kamuzora, H., and Lehmann, H. (1975) *Nature (Lond.)* 256,511-513 Huebns, E. R., and Farooqui, A. M. (1975) *Nature (Lond)* 254, 335-337

Kattamis C, Lagos P, Logona E. Chelation therapy and ferritin levels in patients with homozygous β -thalassaemias. In: Papadatos C, Bartsocas C (eds). *The Management of Genetic Disorders*. New York: Alan R. Liss Inc, P 351, 1979.

Kattamis C, Lagos P, Logona E. Chelation therapy and ferritin levels in patients with homozygous β -thalassaemias. In: Papadatos C, Bartsocas C (eds). *The Management of Genetic Disorders*. New York: Alan R. Liss Inc. p 351, 1979.

Kilmartin JV, Wootton JF (1970). Inhibition of Bohr effect after removal of C-terminal

histidines from haemoglobin β -chains. *Nature*, 228:766-767.

Kollia P, Kalamaras A, Chassanidis C, Samara M, Vamvakopoulos NK, Radmilovic M, Pavlovic S, Papadakis MN, Patrinos GP (2008) Compound heterozygosity for the Cretan type of non-deletional hereditary persistence of fetal haemoglobin and beta-thalassemia or Hb Sabine confirms the functional role of the Agamma-158 C>T mutation in gamma-globin gene transcription. *Blood Cells Mol Dis* 41:263-64

Kollia P, Karababa Ph et al. (1992), β -thalassemia mutations and the underlying β gene cluster haplotypes in the Greek population. *Gene Geog.* 6,5g.

Kosteas T, Moschonas N, Anagnou NP (1996a). The molecular basis for the phenotypic differences between $\delta\beta$ -thalassemia and HPFH: The role of the two silencers upstream of the δ -globin gene. *Blood*, 88 (Suppl.1):150a.

Kosteas T, Pavlou O, Palena A, Moschonas N, Anagnou NP (1996b). Complete sequencing and functional analysis of the HPFH-6 enhancer: Detection of multiple motifs for transcription factors and identification of an open reading frame. *Blood*, 88 (Suppl.1):150a.

Kulozik AE, Bellan-Koch A, Kohne E, Kleinhauer E (1992). A deletion/inversion rearrangement of the β globin gene cluster in a Turkish family with $\delta\beta^0$ -thalassemia intermedia. *Blood*, 79:2455-2459.

Kulozik AE, Yawood N, Jones RW (1988). The Corfu $\delta\beta^0$ thalassemia: A small deletion acts at a distance to selectively abolish β globin gene expression. *Blood*, 71:457-462.

Lanclos KD, Oner C, Dimovski AJ, Gu Y-C, Huisman THJ. Sequence variations in the 5' flanking and IVS-II regions of the $\epsilon\gamma$ - and $\alpha\gamma$ -globin genes of β^S chromosomes with five different haplotypes. *Blood*. 1991; 77(11):2488-2496.

Langlois S (1992), Genetic diagnosis based on molecular analysis. In: *Medical Genetics I. Ped. Clin. North America* 39(1),91:

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.

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.

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.

Lim, L.C., Swende man, S.L. and Sheffery, M., 1992.

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

LOCOPOULOS D., LOUTRADI A. and FESSAS PH. (1978): A unique thalassaemic syndrome: Homozygous α -thalassaemia + Homozygous β -thalassaemia. *Br. J. Haematol.* 39, 377.

Losekkot M, Fodde R, Gerritsen EJA, van de Kuit I, Schreuder A, Giordina PC, Vossen JM, Bernini LF (1991). Interaction of two different disorders in the β globin gene cluster associated with an increased Hb F production: A novel deletion type of $G\gamma$ ($A\gamma\delta\beta$)^o -thalassemia and a hereditary persistence of fetal hemoglobin determinant. *Blood*, 77:861-867.

Losekoot M, Fodde R, Hartveld CL, van Heeren H, Giordano PC, Bernini LF (1990) Denaturing gradient gel electrophoresis and direct sequencing of PCR amplified genomic DNA: a rapid and reliable diagnostic approach to beta thalassemia. *Br J Haematol* 76(2):269-274, doi:10.1111/j.1365-2141.1990.tb07883.x

LOUCOPOULOS D. and FESSAS PH (1965): The distribution of hemoglobin types in thalassaemic erythrocytes. *J. Clin. Invest.* 44, 231.

LOUCOPOULOS D. and FESSAS PH. (1965): The distribution of hemoglobin types in thalassaemic erythrocytes. *J. Clin. Invest.* 44, 231.

Loukopoulos D, Hadji A, Papadakis M, Karababa Ph, Sinopoulou K, Boussiou M, Kollia P, Xenaki M, Antsaklis A, Mesogitis S, Loutradi A, Fessas Ph (1990).

Lubert Stryer. *Βιοχημεία*. Παν. Εκδ. Κρήτης. 3^η Έκδοση 1988

Lubert Stryer. *Βιοχημεία*. Παν. Εκδ. Κρήτης. 3^η Έκδοση 1988
<http://sickle.bwh.harvard.edu/hbsynthesis.html> "Hemoglobin Synthesis" April 14, 2002 pp 1-3.

Luo HY, Mang D, Patrinos GP, Pourfarzad F, Wuc CJY, Eung SH, Rosenfield CG, Daoust PR, Braun A, Grosveld FG, Steinberg MH, Chui OHK (2004) A novel single nucleotide polymorphism (SNP), T>G, in the GATA site at nucleotide (nt) -567 5' to the Ggamma-globin gene may be associated with elevated Hb F. *Blood* 104:145a-146a

M.N. Papadakis, G.P. Patrinos "Contribution of gene convercion in the evolution of the human β -like globin gene family" *Hum. Genetics* 104, 2 March 1999, 117-125.

M.S. Ristaldi, S. Casula, S. Porcu, M.F. Marongiu, M. Piratsu, A. Cao: Activation of the δ -Globin gene CACCC motif. *Blood Cell Molec. And Diseases* (199)25(14) July 31:193-209.

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.

Mager DL, Henthorn PS, Smithies O (1985). A Chinese $G\gamma$ ($A\gamma\delta\beta$)^o -thalassemia deletion: Comparison to other deletions in the human β -globin gene cluster and sequence analysis of the breakpoints. *Nucleic Acids Res*, 13:6559-6575.

Mantovain R, Superti-Furga G, Gliman J, Ottolenghi S (1989). The deletion of the distal CCAAT box region of the $A\gamma$ -globin gene in Black HPFH abolishes the binding of the erythroid specific protein NFE3 and of the CCAAT displacement protein. *Nucleic Acids Res*, 17:6681-6691.

Maragoudaki E, Kanavakis E, Traeger-Synodinos J, et al. Molecular. haematological and clinical studies of the -101 C > T substitution of the β -globin gene promoter in 25 β -thalassaemia intermedia patients and 45 heterozygotes. *Br J Haematol* 1999; 107:699-706.

Matsunaga E, Kimura A, Yamada H, Fukumaki Y, Takagi Y (1985). A novel deletion in $\delta\beta$ -thalassemia found in Japan. *Biochem Biophys Res Commun*, 126:185-191.

Michelson AM, Orkin SH. Boundaries of gene conversion within the duplicated human α -globin genes. Concerted evolution by segmental recombination. *J Biol Chem*. 1983; 258(24): 15245-15254

Mishima N, Landam H, Huisman THJ, JG (1989). The DNA deletion in a Indian $\delta\beta$ -thalassemia begins one Kilobase from the $A\gamma$ globin gene and in an L1 repetitive sequence. *Br J Haemat*, 73:375-379.

Motum PI, Deng ZM, Huong L, Trent RJ (1994). The Australian type of nondeletional $G\gamma$ -HPFH has a C→G substitution at nucleotide -114 of the $G\gamma$ gene. *Br J Haemat*, 86:219-221.

Motum PI, Hamilton TJ, Linedeman R, Le H, Trent RJ (1993). Molecular characterization of Vietnamese HPFH. *Hum Mutat*, 2:179-184.

Mullis KB (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am*, 262:56-65.

Mullis KB, Faloona FA, (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155:335-350.

Mullis KB, Faloona FA, Scharf SJ, Saiki RK, Horn GT, Erlich HA (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 51:263-273.

1Nicolis S, Ronchi A, Margaretti N, Mantovani R, Giglioni B, Ottolenghi S (1989). Increased erythroid-specific expression of a mutated HPFH γ -Globin promoter

requires the erythroid factor NFE-1. *Nucleic Acids Res*, 17:5509-5516.

Nienhuis AW, Maniatis T (1987). Structure and expression of globin genes in erythroid cells, In *The molecular basis of blood diseases*, Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Leader P, Majerus PW eds, WB Saunders Co, Philadelphia, PA, pp.28-65.

Orkin SH, Goff SC, Hechtman RL (1981a). Mutation in an intervening sequence splice junction in man. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78:5041-5045.

Orkin SH, Goff SC, Nathan DG (1981b). Heterogeneity of DNA deletion in $\gamma\delta\beta$ -thalassemia. *J Clin Invest*, 67:878-884.

1Orkin SH, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE, Ostrer H, Goff SC, Sexton JP (1982). Abnormal RNA processing due to the exon mutation of β^E -globin gene. *Nature*, 300:768-769.

Orkin SH, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE, Goff SG, Boehm CD, Sexton JP, Waber PG, Giardino PJV. Linkage of β thalassemia mutations, and β globin gene cluster. *Nature* 296:627-630, 1982.

1Ottolenghi S, Giglioni B, Pulazzini A, Comi P, Camaschella C, Serra A, Guerrasio G (1987). Sardinian $\delta\beta^0$ -thalassemia: A further example of a C to T, substitution at position -196 of the $A\gamma$ globin gene promoter. *Blood*, 69:1058-1061.

Ottolenghi S, Giglioni B (1982). The deletion in a type of $\delta^0\beta^0$ -thalassemia begins in an inverted Alu repeat. *Nature*, 300:770-771.

Ottolenghi S, Giglioni B, Comi P, Gianni AM, Polli E, Acquaye CTA, Oldham JH, Maresa G (1979). Globin gene deletion in HPFH, $\delta^0\beta^0$ thalassemia and Hb Lepore disease. *Nature*, 278:654-657.

1Palena A, Blau A, Stamatoyannopoulos G, Anagnou NP (1994). Eastern European ($\delta\beta$)⁰ thalassemia: Molecular characterization of a novel 9.1 -kb deletion resulting in high levels of fetal hemoglobin in the adult. *Blood*, 83:3738-3745.

1Papachatzopoulou A, Kaimakis P, Pourfarzad F, Menounos PG, Evangelakou P, Kollia P, Grosveld FG, Patrinos GP (2007) Increased gamma-globin gene expression in beta-thalassemia intermedia patients correlates with a mutation in 3'HS1. *Am J Hematol* 82:1005-1009, doi:10.1002/ajh.20979

Papadakis MN, Papapanagiotou E, Kalamaras A, Xenaki M, Drakoulakou O, Loutradi-Anagnostou A, Fessas P (1995). The Greek type of hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH): The homozygote form and the combination with Hb S. *Latriki*, 67:47-51.

Papadakis MN, Papapanagiotou E, Loutradi-Anagnostou A (1997) Scanning method to identify the molecular heterogeneity of the delta-globin gene, especially in delta-

thalassemias: detection of three novel mutations in the promoter region of the gene. Hum Mutat 9:465-472, doi: 10.1002/(SICI) 1098-1004(1997)9:5<465:: AID-HUMU 14> 3.0.CO;2-0

Papadakis MN, Patrinos GP. Contribution of gene conversion in the evolution of the human β -like globin gene family. Hum Genet 1999; 104:117-125.

Papadakis MN, Patrinos GP. Contribution of gene conversion in the evolution of the human β - like globin genes family. Hum Genet. 1999; 104(2):117-125.

Patrinos GP, de Krom M, de Boer E, Langeveld A, Imam AM, Strouboulis J, de Laat W, Grosveld FG (2004) Multiple interactions between regulatory regions are required to stabilize an active chromatin hub. Genes Dev 18:1495-1509, doi:10.1101/gad. 289704

Patrinos GP, Kollia P, Loutradi-Anagnostou A, Loukopoulos D, Papadakis MN (1998) The Cretan type of non-deletional hereditary persistence of fetal hemoglobin [Agamma-158 C> T] results from two independent gene conversion events. Hum Genet 102:629-634, doi: 10.1007/s004390050753

Patrinos GP, Kollia P, Loutradi-Anagnostou A, Loukopoulos D, Papadakis MN. The Cretan type of the non-deletional hereditary persistence of fetal hemoglobin (γ^r -158 C > T) results from two independent gene conversion events. Hum_Genet. 1998; 102(6):629-634

Patrinos GP, Kollia P, Papapanagiotou E, Loutradi-Anagnostou A, Loukopoulos D, Papadakis MN. γ^A -haplotypes: a new group of genetic markers for thalassemic mutations inside the 5' regulatory region of the human γ^A -globin gene. Am J Hematol. 2001; 66(2):99-104.

Patrinos GP, Loutradi-Anagnostou A, Papadakis MN. A new base substitution in the 5' regulatory, region of the human γ^A globin gene is linked with the β^S gene. Hum Genet. 1996; 97(3): 357-358.

Patrinos GP, Loutradi-Anagnostou A, Papadakis MN (1995) A novel DNA polymorphism of the Agamma globin gene

Patrinos GP, Samperi P, Lo Nigro L, Kollia P, Schiliro G, Papadakis MN. Evidence for the molecular heterogeneity of sickle cell anemia chromosomes bearing the β^S /Benin haplotype: Am J Hematol 2005; 80(1):79-80

Patrinos GP, Wajcman H. Recording human globin gene variation. Hemoglobin. 2004; 28(2):v-vii (<http://globin.cse.psu.edu>).

Patrinos GP, Giardine B, Riemer C, Miller W, Chui DH, Anagnou NP, Wajcman H, Hardison RC (2004) Improvements in the HbVar human hemoglobin variants and thalassaemia mutations for population and sequence variation studies. Nucleic Acids

Res 32:D537-D541, doi:10.1093/nar/gkh006 (<http://gbbin.bx.psu.edu/hbrat>)

Patrinos GP, Kolila P, Papapanagiotou E. et al. Agamma-haplotypes: A new group of genetic markers for thalassaemic mutations inside the 5' regulatory region of the human Agamma-globin gene. *Am J Hematol* 2001;66:99-104.

Patrinos GP, van Baal S, Petersen MB, Papadakis MN (2005) Hellenic National Mutation database: a prototype database for mutations leading to inherited disorders in the Hellenic population. *Hum Mutat* 25:327-333, doi: 10.1002/humu.20157

Papadakis MN, Patrinos GP, Tsaftaridis P, Loutraki-Anagnostou A (2002) A comparative study of Greek non-deletional hereditary persistence of fetal haemoglobin and beta-thalassemia compound heterozygotes. *J Mol Med* 80:243-247, doi:10.1007/s00109-001-0312-4

PERUTZ M.F., ROSSMAN M.G., CULLIS A.F., MUIRHEAD H., WILL G. and NORTON R.C.T. (1960): Structure of hemoglobin: A three dimensional fourier synthesis at 5.5 A. resolution obtained by x-ra analysis. *Nature* 185,416.

PERUTZ M.F., ROSSMAN M.G., CULLIS A.F., MUIRHEAD H., WILL G. and NORTON R.C.T. (1960): Structure of hemoglobin: A three dimensional fourier synthesis at 5.5 A. resolution obtained by x-ra analysis. *Nature* 185, 416.

Perutz MF (1987). Hemoglobin structure and respiratory transport. *Sci Am*, 239:68-87.

Perutz MF (1987). Molecular anatomy, physiology and pathology of hemoglobin, in *The molecular basis of blood diseases*, Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Leder P, Majerus PW eds, WB Saunders Co, Philadelphia, PA, pp. 127-178.

Perutz MF, Muirhead H, Cox JM, Coomans LCG (1968). Three-dimensional fourier synthesis of horse oxyhaemoglobin at 2.8 Å resolution: The atomic model. *Nature*, 219:131-139.

Peterson KR, Stamatoyannopoulos G (1993). Role of gene order in developmental control of human γ -globin gene expression. *Mol Cell Biol*, 13:4836-4843.

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.

Pirastu M, Kan YW, Galanello R, Cao A (1984a). Multiple mutations produce $\delta\beta^0$ thalassemia in Sardinia. *Science*, 223:929-930.

Pirastu M, Saglio G, Chang JC, Cao A, Kan YW (1984b). initiation codon mutation as a cause of α -thalassemia. *J Biol Chem*, 259:12315-12317.

Poncz M, Solowiejczyk D, Harpel B, Mory Y, Schwartz E, Surrey S (1982). Construction of human gene libraries from small amounts of peripheral blood. Analysis of β -like globin genes. *Hemoglobin*, 6:27-36.

1 Powers PA, Altay C, Huisman THJ, Smithies O (1984). Two novel arrangements of

the human fetal globin genes: G γ -G γ and A γ -A γ . *Nucleic Acids Res*, 2:7023-7034.

Ronchi AE, Bottardi S, Mazzucchelli C, Ottolenghi S, Santoro C (1995) Differential binding of the NFE3 and CP1/NFY transcription factors to the human gamma- and epsilon-globin CCAAT boxes. *J Biol Chem* 2710:21934-21941, doi:10.1074/jbc.270.37.21934

Ronchi A, Berry M, Raguz S, Iman A, Yannoutsos N, Ottolenghi S, Grosveld F, Dillon N (1996) Role of the duplicated CCAAT box region in gamma-globin gene regulation and hereditary persistence of fetal persistence of fetal haemoglobin. *EMBO J* 15:143-149

S.L Thein, Genetic modifiers of beta-thalassemia, *Hematologica* 90 (2005) 649-660.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higushi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487-491.

Salgio G, Ricco G, Mazza U, Camaschella C, Pich PG, Gianni AM, Gianazza E, Richetti PG, Giglioni B, Comi P, Gusmeroli M, Ottolenghi S (1979). Human $\Gamma\gamma$ globin is a variant of $\Lambda\gamma$ chain ($\Lambda\gamma$ Sardinia). *Proc Natl Acad Sci USA*, 76:3420-3424.

Salgio G, Ricco G, Serra A, Bertero T, Rege Cambrin G, Guerrasio A, Mazza U, Izzo P, Terragni F, Gioglioni S (1986). Italian type of deletional hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Blood*, 68:646-651.

Samara M, Chiotoglou I, Kalamaras A, Likousi S et al. Large-scale population genetic analysis for hemoglobinopathies reveals different mutation spectra in central Greece compared to the rest of the country. *Am J Hematol*. 2007; 82(7):634-636.

Shen S, Slightom JL, Smithies O. A history of the human fetal globin gene duplication. *Cell* 1981; 26(2 Part 2):191-203.

SHEPARD M.K., WEATHERALL D.J. and CONLEY C.L. (1962): Semi-quantitative estimation of the distribution of fetal hemoglobin in red cell populations. *Bull John Hopkins Hosp*. 110,293.

SHEPARD M.K., WEATHERALL D.J. and CONLEY C.L. (1962): Semi-quantitative estimation of the distribution of fetal hemoglobin in red cell populations. *Bull John Hopkins Hosp*. 110. 293.

SHERIDAN B.L., WEATHERALL D.J., CLEGG J.B., PRITCHARD J., WOOD W.G., CALLENDER S.T., DURRANT I.J., McWHIRTER W.R., ALI M., PARTRIDGE. J.W. and THOMPSON E.N. (1976): The patterns of fetal haemoglobin production in leukaemia. *Br. J. Haematol*. 32,487.

SINGER K. and FISHER B. (1952): Studies on abnormal hemoglobins. V. The distribution of type S (Sickle cell) hemoglobin and type F (alkali resistant) hemoglobin

within the red cell population in sickle cell anemia. *Blood* 7, 1216.

SINGER K. and FISHER B. (1952): Studies on abnormal hemoglobins. v. The distribution of type S (Sickle cell) hemoglobin and type F (alkali resistant) hemoglobin within the red cell population in sickle cell anemia. *Blood* 7, 1216.

Slightom JL, Blechi AE, Smithies O. Human fetal G γ - and A γ -globin genes: Complete nucleotide sequences suggest that DNA can be exchanged between these duplicated genes. *Cell*. 1980; 21 (3):627-638.

Smithies O, Engels WR, Devereux JR, Slightom JL, Shen S. Base substitutions, length differences and DNA strand asymmetries in the human G γ and A γ fetal globin gene region. *CELL* 1981; 26(3 Part 1): 345-353.

Stamatogiannopoulos, G., and Grosveld, F., "Hemoglobin Switching" In *The molecular Basis of Blood Diseases* 3rd Edition 2001 pp. 135-182.

Stamatoyannopoulos G., Grosveld F.: Hemoglobin Switching Part II: 135-182, 2001. *The Molecular Basis of Blood Diseases*. 3rd edition.

Stamatoyannopoulos G., Grosveld F.: Hemoglobin Switching Part II: 135-182 2001. *The Molecular Basis of Blood Diseases*. 3rd edition

Stamatoyannopoulos, G., and Gusveld, F., "Hemoglobin Switching " In *The molecular Basis of Blood Diseases* 3rd Edition 2001 PP135-182

Steiberg MH, Adams JG III (1991). Hemoglobin A2: Origin, evolution and aftermath. *Blood*, 78:2165-2177.

Sukumaran PK, Nakatsuji T, Gardiner MB, Reese AL, Gliman JG, Huisman THJ (1993). Gamma-thalassemia resulting from the deletion of a γ -globin gene. *Nucleic Acids Res*, 11:4635-4643.

Swank RA, Stamatoyannopoulos G (1998) Fetal gene reactivation. *Curr Opin Genet Dev* 8:366-370, doi:10.1016/S0959-437X (98) 80095-6

Sykes K, Kaufman R, (1990). A naturally occurring gamma globin gene mutation enhances Sp1 binding activity. *Mol Cell Biol*, 10:95-102.

Tan AS, Quah TC, Low PS, Chong SS (2001) A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. *Blood* 98:250-251, doi: 10.1182/blood. V98. 1 .250

Tang, O., Ebb. O., 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

Tasiopoulos M, Boussiou M, Sinopoulou K, Moraitis G, Loutradi-Anagnostou A, Karababa P (2008) (G) gamma-196 C->T, (A) gamma-201 C->T: two novel mutations in the promoter region of the gamma globin genes associated with, nondeletional

hereditary persistence of fetal hemoglobin in Greece. *Blood Cells, Mol Dis* 40:320-322, doi: 10.1016/j.bcmd.2007.10.007

Thompson W., McLaren R., Willard H. (1991), *Genetics in Medicine* 5th Ed. WB Saunders Philadelphia.

Treisman R, Orkin SH, Maniatis T (1983). Specific transcription and RNA splicing on five clone β -thalassemia genes. *Nature*, 302:591-596.

Trent RJ, Jones RW, Clegg JB, Weatherall DJ, Davidson R, Wood WG (1984). $(A\gamma\delta\beta)^{\circ}$ -Thalassemia: Similarity of phenotype in four different molecular defects, including one newly described. *Br J Haematol*, 57:279-289.

Trent RJ, Svirklys L, Jones P (1988). Thai $(\delta\beta)^{\circ}$ -thalassemia and its interaction with γ -thalassemia. *Hemoglobin*, 12:101-114.

Trent RJ, Williams BG, Kearney A, Wilkinson T, Harris PC (1990). Molecular and hematologic characterization of Scottish-Irish type $(\epsilon\gamma\delta\beta)^{\circ}$ thalassemia. *Blood*, 76:2132-2138.

Trifillis P, Ioannou P, Schwartz E, Surrey S (1991). Identification of four novel δ -globin gene mutations in Greek Cypriots using polymerase chain reaction and automated fluorescence-based DNA sequence analysis. *Blood*, 78:3298-3305.

Tuan D, Feingold E, Newman M, Weissman SM, Forget BG (1983). Different 3' end points of deletions causing $\delta\beta$ -thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin: Implications for the control of γ -globin gene expression in man. *Proc Natl Acad Sci USA*, 810:6937-6941.

Tuan D, London IM (1984). Mapping of DNase I-hypersensitive sites in the upstream DNA of human embryonic ϵ -globin gene K562 leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81:2718-2722.

Tuan D, Murnane MJ, deRiel JK, Forget BG (1980). Heterogeneity in the molecular basis of hereditary persistence of fetal haemoglobin. *Nature*, 285:335-337.

Tuan D, Solomon W, Li Q, London IM (1985). The " β -like-globin" gene domain in human erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82:6384-6388.

Van Baal S, Kaimakis P, Phommavong M, Koumbi D, Cuppens H, Riccardino F, Macek M Jr, Scriver CR, Patrinos GP (2017) FINDbase: a relational database recording frequencies of genetic defects leading to inherited disorders worldwide. *Nucleic Acids Res* 35:D690-D695, doi:10.1093/nar/gk1934

Van der Pijeg LHT, Konings A, Oort M, Roos D, Bernini L, Flavell RA (1980b). $\gamma\delta\beta$ -thalassemia studies showing that deletion of the γ - and δ - genes influences β -globin gene expression in man. *Nature*, 283:637-642.

Viniou N, Georgiou J, Loutradi A, et al. Molecular basis and haplotype analysis of $\delta\beta$ -

thalassemia chromosomes in Greece. *Acta Haematol* 1994; 92:83-87

Vitale M, Di Marzo R, Calzolari R, Acuto S, O' Neil D, Bank A, Maggio A (1994). Evidence for a globin promoter-specific silencer element located upstream of the human δ -globin gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 204:413-318.

WATHERALL D.J. and CLEGG J.B. (1981): *The Thalassaemia syndromes* 3rd ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

WATHERALL D.J. Genetic disorders of haemoglobin. In: Hoffrand AV, Lewis SM, Tuddenham EGD. *Postgraduate Haematology*, 4th edn. Oxford: Butterworth Heinemann, 1998.

WATHERALL D.J., CLEGG J.B. WOOD W.G. (1976): A model for the persistence or reactivation of fetal haemoglobin production. *Lancet* ii, 660.

WATHERALL D.J., CLEGG J.B. WOOD W.G., CALLENDER S.T., SHERIDAN B.L. and PRITCHARD J. (1975): Foetal erythropoiesis in human leukaemia. *Nature* 257, 710.

WATHERALL D.J., PEMBREY M.E. and PRITCHARD J. (1974): Fetal haemoglobin. *Clin. Haematol.* 3, 467.

WATHERALL D.J., WOOD W.G. and CLEGG J.B. (1979): Genetics of fetal haemoglobin production in adult life. In: Cellular and molecular regulation of haemoglobin switching. G. Stamatoyannopoulos and AW. Nienhuis (eds). Grune and Stratton. G. New York. p 3.

Watson JD, Crick FHC (1953b). Genetical implications of the deoxyribonucleic acid. *Nature*, 171:964-967.

Watson JD, Crick FHC (1953a). Molecular structure of nucleic acids: A structure for desoxyribose nucleic acid, *Nature*, 171:737-738.

Waye JS, Eng B, Coleman MB, Steinberg MH, Alter BP (1994). $\delta\beta$ -thalassemia in an African-American: Identification of the deletion endpoints and PRC-based diagnosis. *Hemoglobin*, 18:389-399.

WEATHERALL D.J. and CLEGG J.B. (1981): *The Thalassaemia syndromes* 3rd ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Weatherall D.J. Genetic disorders of haemoglobin, In: Hoffrand AV, Lewis SM, Tuddenham EGD. *Postgraduate Haematology*; 4th edn. Oxford: Butterworth Heinemann, 1998.

WEATHERALL D.J., CLEGG J.B. WOOD W.G., CALLENDER S.T., SHERIDAN B.L. and PRITCHARD J. (1975): Foetal erythropoiesis in human leukaemia. *Nature* 257, 710.

WEATHERALL D.J., PEMBREY M.E, and PRITCHARD J. (1974): Fetal

haemoglobin. Clin. Haematol. 3. 467.

WEATHERALL D.J., WOOD W.G. and CLEGG J.B. (1979): Genetics of fetalhemoglobin production, in adult life. in: Cellular and molecular regulation of hemoglobin switching. G. Stamatoyannopoulos and AW. Nienhuis (eds). Grune and Stratton. New York. p. 3.

Weatherall DJ, Clegg JB (1981). The thalassemia syndroms. Blackwell Scientific Publications, Boston, MA.

Weatherall DJ, Clegg JB, Higgs DR, et al. The hemoglobinopathies. In: Scriver CR, editors. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. New York, NY: McGraw-Hill; 2001. pp 4571-4636.

WEATHERALL, D.J., CLEGG J.B. and WOOD W.G. (1976): A model for the persistence of reactivation of fetal haemoglobin production. Lancet ii 660.

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.

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.

Wijgerde M, Grosveld F, Fraser P (1995). Transcription complex stability and chromatin dynamics in vivo. Nature, 377:209-213.

Wijgerde M, Grosveld F, Fraser P.(1995) Transcription complex stability and chromatin dynamics in vivo. Nature 377:209-213, doi:10.1038/377209a0

Winichagoon P, Fucharoen S, Thonglairoam V, Wasi P (1990). Thai $G\gamma(A\gamma\delta\beta)^0$ -thalassemia and its interaction with a single γ -globin gene on chromosome carrying β^0 -thalassemia. Hemoglobin, 14:185-197.

WOOD W.G., PEMBREY M.E., SERJEANT G, PERRINE R.P. and WEATHERALL D.J. (1980): Haemoglobin F Synthesis in Sickle Cell Anaemia: a Comparison of Saudi Arab Cases with those of African Origin. Br. J. Haematol. 45, 431.

WOOD W.G., PEMBREY M.E., SERJEANT G, PERRINE R.P. and WEATHERALL D.J. (1980): Haemoglobin F Synthesis in Sickle Cell Anaemia: a Comparison of Saudi Arab Cases with those of African Origin. Br. J. Haematol. 45. 431.

Wood WG, Mc Rae IA, Darbre PD, Clegg JB, Weatherall DJ (1982). The British type of non-deletion HPFH: Characterization of developmental changes in vivo and erythroid growth in vitro. Br J Haemat, 50:401-414.

Wood WG, Stamatoyannopoulos G, Lim G, Nute PE (1975). F-cells in the adult: Normal values and levels in individuals with hereditary and acquired elevations of Hb

F. Blod, 46:671-682.

Yank KG, Liu JZ, Kutlar F, Kutlar A, Altay C, Gurgey A, Huisman THJ (1986). β^0 -thalassemia in association with a γ -globin gene quadruplication. Blood, 68:1394-1397.

Zhang JW, Song WF, Zhao YJ, Wu GY, Qiu ZM, Zang FN, Chen SS Stamatoyannopoulos G (1993). Molecular characterization of a novel form of $(A\gamma\delta\beta)^0$ -thalassemia deletion in an Chinese family. Blood, 81:1624-1629.

Zhang JW, Stamatoyannopoulos G, Anagnou NP (1988). Laotian $(\delta\beta)^0$ -thalassemia: Molecular characterization of a novel deletion associated with increased with increased production of fetal hemoglobin. Blood, 72:983-988.