

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ *cis*-ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΤΟΥ  
ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ β-ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ  
ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ ΣΤΗΝ  
ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΙΚΩΝ  
γ-ΓΟΝΙΔΙΩΝ**

ΘΕΟΔΩΡΟΣ Π. ΚΩΣΤΕΑΣ

ΜΑΡΤΙΟΣ 2001

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ *cis*-ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ  
ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ β-ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΠΟΥ  
ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΙΚΩΝ γ-  
ΓΟΝΙΔΙΩΝ**

**ΘΕΟΔΩΡΟΣ Π. ΚΩΣΤΕΑΣ**

ΜΕΛΗ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

Ν. Π. ΑΝΑΓΝΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
Γ. ΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
Δ. ΚΑΡΔΑΣΗΣ, ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Ν. ΜΟΣΧΟΝΑΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
Ι. ΠΑΠΑΜΑΤΘΑΙΑΚΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
Χ. ΣΑΒΒΑΚΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
Γ. ΜΑΥΡΟΘΑΛΑΣΣΙΤΗΣ, ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΜΑΡΤΙΟΣ 2001



Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Ιατρικό τμήμα της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Κρήτης δεν σημαίνει και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα.

(Ν. 5343/1932, άρθρο 202)

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η Διατριβή αυτή πραγματοποιήθηκε εξ ολοκλήρου στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Καθηγητή Ν. Π. Ανάγνου στον Τομέα Βασικών Επιστημών του Ιατρικού Τμήματος, Πανεπιστημίου Κρήτης. Το Εργαστήριο αποτελεί και συνεργαζόμενο μέλος της ομάδας των Θηλαστικών του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB) του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ).

Επιθυμώ να ευχαριστήσω **θερμά** τον Καθηγητή Ν. Π. Ανάγνου για την ευκαιρία που μου προσέφερε για την εκπόνηση της Διατριβής αυτής παράλληλα με τα καθήκοντα μου ως τεχνικός του εργαστηρίου. Εκτός από τη συνεχή πολυετή επίβλεψη και επιστημονική καθοδήγηση του, τον ευχαριστώ και για την δυνατότητα που μου προσέφερε για συμμετοχή μου σε πολλαπλά διεθνή και πανελλήνια συνέδρια που ήταν καθόριστικά για την ερευνά μου στις αιμοσφαιρινοπάθειες.

Ευχαριστό τον Καθηγητή Ν. Μοσχονά για την πολυετή συνέργασία του και για την βοήθεια του με τις λειτουργικές δοκιμασίες. Περαιτέρω ευχαριστό τα υπολοιπά μέλη της επταμελούς επιτροπής τον Κον. Ηλιοπουλό, τον Κον. Καρδάση, τον Κον. Παπαματθαϊάκη, τον Κον. Σαββάκη και τον Κον. Μαυροθαλασσίτη για τίς διορθώσεις και τα πολύτιμα τους σχόλια.

Επίσης ευχαριστώ όλους τους φίλους και συνεργάτες από τους οποίους η Antonella Palena κατέχει μία ξεχωριστή θέση. Ευχαριστώ την φίλη Νεκταρία Κελαϊδή για την πολύτιμη βοήθεια της στην τελική διαμόρφωση του κειμένου καθώς και την Λ. Χριστέλη για τα πρώτα της σχόλια.

Ευχαριστώ την οικογένεια μου και την οικογένεια του Ιωάννη Ταμπακάκη για την αδιάκοπη ηθική και υλική υποστηρίξη τους.

Τέλος, ευχαριστώ την Ευγενία Ταμπακάκη για την αρχική ανάγνωση του κειμένου και την συνεχή συμπαράστασή της.

Στην Ευγενία

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

## SUMMARY

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ I: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΕΤΑΣΤΡΟΦΗΣ ΤΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ	1
Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ β-ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ	3
ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΥ DNA ΣΤΟ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ ΤΗΣ β-ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ	4
Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΗΡΦΗ ΚΑΙ δβ-ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑΣ	4
ΜΗ-ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΗΡΦΗ	5
ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΗΡΦΗ ΚΑΙ δβ-ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑΣ	7
ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ	11
ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ	11
GATA-1	11
FOG	12
NUCLEAR FACTOR-ERYTHROID 2 (NF-E2)	13
YY1	14
ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΩΝ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ	14
ΤΟ ΠΡΩΪΜΟ ΕΜΒΡΥΪΚΟ ε-ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ β-ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ	14
ΤΑ ΟΨΙΜΑ ΕΜΒΡΥΪΚΑ γ-ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ β-ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ	17
ΤΟ ΕΝΗΛΙΚΟ δ-ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ β-ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ	20
ΤΟ ΕΝΗΛΙΚΟ β-ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ β-ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ	20
ΤΟ ζ-ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ α-ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ	22
ΤΟ α-ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ α-ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ	23
Η ΠΕΡΙΟΧΗ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥ ΤΟΠΟΥ ΤΟΥ β-ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ (LCR)	23
ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ LCR ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ΤΗΣ β-ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ	24
ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΜΟΝΩΤΩΝ	25
ΘΕΣΕΙΣ ΥΠΕΡΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ LCR	26
Η ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΗS ΘΕΣΕΩΝ	27
ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΤΟ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ ΤΩΝ β-ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΣΕ ΚΛΩΝΟΥΣ ΤΕΧΝΗΤΩΝ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΩΝ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ (βΥΑC)	29
ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ LCR	30
ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΑ ΚΥΡΙΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΗS ΘΕΣΕΩΝ	30
Η ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ HS-40 ΤΗΣ α-ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ	31
ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΡΥΘΜΙΖΟΥΝ ΤΗ ΜΕΤΑΣΤΡΟΦΗ ΤΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ	33

Η ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ	33
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΞΥ ΓΟΝΙΔΙΩΝ	34
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ	35
ΤΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΤΗΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΑΓΚΥΛΗΣ (LOOPING)	35
ΤΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΤΗΣ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ (TRACKING)	36
ΤΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΤΗΣ ΔΥΑΔΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ (BINARY ACTIVATION)	36
ΤΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΤΗΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ (LINKING)	36
ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΥΒΡΙΔΙΑ	37

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ II: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

ΥΛΙΚΑ	38
ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΥΛΙΚΩΝ	38
ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ, ΣΤΕΛΕΧΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ, ΓΕΝΩΜΙΚΑ DNA ΚΑΙ RNA	38
ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	39
ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ	39
ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ	39
ΜΕΘΟΔΟΙ	40
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	40
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΜΙΚΡΗ ΚΛΙΜΑΚΑ	40
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΜΕΓΑΛΗ ΚΛΙΜΑΚΑ ΜΕ ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΛΥΣΗ	40
ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΟΙ ΤΡΟΠΟΙ	41
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΟΥΡΑ ΠΟΝΤΙΚΟΥ	41
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	42
ΗΛΕΚΤΡΟΕΚΛΟΥΣΗ	42
ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΧΑΜΗΛΗΣ ΤΗΞΗΣ	42
ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΟΙ ΤΡΟΠΟΙ	42
ΡΑΔΙΟΣΗΜΑΝΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA	42
ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΗΣ ΣΗΜΑΝΣΗΣ ΜΕ ΤΥΧΑΙΟΥΣ ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ (RANDOM PRIMING)	42
ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΥΠΟΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA	43
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΑΚΡΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΜΕ KLENOW	43
ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΣΥΜΠΛΗΡΩΣΗ ΤΩΝ 5' ΑΚΡΩΝ	43
ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΣΥΜΠΛΗΡΩΣΗ ΤΩΝ 3' ΑΚΡΩΝ	44
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΑΚΡΩΝ ΤΟΥ ΦΟΡΕΑ ΜΕ ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ	44
ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA (LIGATION)	44
ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΓΙΑ ΣΥΜΒΑΤΑ ΑΚΡΑ	44
ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΓΙΑ ΤΥΦΛΑ ΑΚΡΑ	44
ΠΡΟΟΔΕΥΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA	45



ΣΗΜΕΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ	45
ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	45
ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΕ ΦΙΛΤΡΟ ΝΙΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ	46
ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΣΕ ΦΙΛΤΡΟ ΝΙΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ	46
ΤΕΧΝΙΚΗ ΚΑΤΑ SOUTHERN	47
ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΛΩΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΡΑΔΙΟΣΗΜΑΣΜΕΝΟΥ DNA	47
ΠΡΟΪΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΦΙΛΤΡΩΝ	47
ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ DNA	48
ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	48
ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗΣ DNA ΜΕ ΦΩΣΦΟΡΙΚΟ ΑΣΒΕΣΤΙΟ	48
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗΣ	48
ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ	49
ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ β-ΓΑΛΑΚΤΟΣΙΔΑΣΗΣ	49
ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ LAC Z	49
ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ	
ΑΚΕΤΥΛΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΧΛΩΡΑΜΦΑΙΝΙΚΟΛΗΣ (CAT ASSAY)	49
ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (PROTEIN ASSAY)	50
ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ	
ΜΕ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ	51
ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ Taq DNA ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	51
ΚΛΑΣΣΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ PCR	51
ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΛΟΓΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΛΩΝΩΝ	51
ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ PCR ΓΙΑ ΤΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΣΗΜΕΙΑΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ	52
ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΤΟΥ mRNA	
ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ PCR	52
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ RNA ΜΕ DNASE I	52
ΠΙΝΑΚΑΣ: ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	53

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΙΙΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: ΙΑ	55
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΗΡΦΗ-3 ΣΕ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ	55
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ 3' ΔΙΑΜΕΤΑΤΙΘΕΜΕΝΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ	56
ΕΝΙΣΧΥΤΗΣ ΗΡΦΗ-3: ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΕ ΕΤΕΡΟΛΟΓΟΥΣ ΚΑΙ	
ΜΗ-ΕΤΕΡΟΛΟΓΟΥΣ ΥΠΟΚΙΝΗΤΕΣ	58
ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ ΕΝΙΣΧΥΤΗ ΗΡΦΗ-3 ΚΑΙ ΤΙΣ	
ΔΙΑΜΕΤΑΤΙΘΕΜΕΝΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ	59
ΗΡΦΗ-4: ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΓΕΦΥΡΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ	61
ΗΡΦΗ-4: ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	63

ΓΕΡΜΑΝΙΚΗ (Αγδβ) <sup>ο</sup> ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ: ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ	64
ΓΕΡΜΑΝΙΚΗ (Αγδβ) <sup>ο</sup> ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ: ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΗΜΕΙΩΝ ΑΠΟΚΟΠΗΣ	66
ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ β-ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕΛ	70
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: ΙΒ</b>	<b>72</b>
ΟΛΛΑΝΔΙΚΗ (β) <sup>ο</sup> ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ	
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ 3' ΔΙΑΜΕΤΑΤΙΘΕΜΕΝΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ	72
ΙΣΠΑΝΙΚΗ (δβ) <sup>ο</sup> ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ	
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ 3' ΔΙΑΜΕΤΑΤΙΘΕΜΕΝΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ	73
ΔΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ 3' ΔΙΑΜΕΤΑΤΙΘΕΜΕΝΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ	75
ΚΙΝΕΖΙΚΗ ΚΑΙ ΤΑΪΛΑΝΔΙΚΗ (Αγδβ) <sup>ο</sup> ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ	
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ 3' ΔΙΑΜΕΤΑΤΙΘΕΜΕΝΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ	75
<b>ΗΡΦΗ-6</b>	
ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΓΕΦΥΡΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ	78
ΔΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΕΝΙΣΧΥΤΟΥ ΤΗΣ ΗΡΦΗ-6	83
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΟΣ ΑΝΟΙΚΤΟΥ ΑΝΑΓΝΩΣΤΙΚΟΥ ΠΛΑΙΣΙΟΥ (ORF)	
ΕΝΤΟΣ ΤΟΥ ΕΝΙΣΧΥΤΗ ΤΗΣ ΗΡΦΗ-6	86
ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΕ ΕΞΕΛΙΞΗ	90
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: ΙΙ</b>	<b>91</b>
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ Αγ ΚΑΙ δ-ΓΟΝΙΔΙΩΝ	91
ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΣΥΝΔΕΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟΥΣ ΑΠΟΣΙΩΠΗΤΕΣ ΕΝΗ ΚΑΙ F	93
ΑΜΕΡΙΚΑΝΙΚΗ (δβ) <sup>ο</sup> ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ	
ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΓΕΦΥΡΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ	95
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΣΙΩΠΗΤΩΝ Ο ΚΑΙ Ρ ΣΤΗΝ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΗΡΦΗ	
ΕΝΑΝΤΙ ΕΚΕΙΝΟΥ ΤΗΣ δβ-ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑΣ	96
ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΕ ΕΞΕΛΙΞΗ	100
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV: ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΩΤΟΥ ΜΕΡΟΥΣ	102
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΜΕΡΟΥΣ	119
ΕΠΙΛΟΓΟΣ	
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ V: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>128</b>
<b>ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ</b>	<b>152</b>

## Περίληψη

Το σύμπλεγμα των γονιδίων της β-σφαιρίνης του ανθρώπου με τους σύνθετους μηχανισμούς που ελέγχουν το φαινόμενο της μεταστροφής της αιμοσφαιρίνης, εξακολουθεί να αποτελεί ιδεώδες πειραματικό σύστημα για τη μελέτη του ελέγχου της γονιδιακής δραστηριότητας κατά την διάρκεια της οντογένεσης και της ερυθροποιητικής διαφοροποίησης. Ένα σημαντικό και πολύτιμο στοιχείο στην μελέτη του φαινομένου της μεταστροφής, είναι οι πολυάριθμες μεταλλάξεις από ποικίλα ελλείμματα του συμπλέγματος που οδηγούν στην εμφάνιση συγκεκριμένων κλινικών συνδρόμων που συνοδεύονται από την αυξημένη και συνεχή παραγωγή εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης στην ενήλικη ζωή. Μελέτες από τα προκύπτοντα δύο διάκριτα σύνδρομα, ήτοι τη δβ-θαλασσαιμία και την κληρονομική παραμονή της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (hereditary persistence of fetal hemoglobin ή HPFH) έχουν εντοπίσει στο σύμπλεγμα διάφορες *cis*-ρυθμιστικές αλληλουχίες που τροποποιούν την έκφραση των επιμέρους γονιδίων της σφαιρίνης. Η ανακάλυψη αυτών των *cis* αλληλουχιών έχει βοηθήσει στην κατανόηση ορισμένων φαινομένων της γονιδιακής έκφρασης και της μεταστροφής της αιμοσφαιρίνης.

Σκοπός της παρούσας Διατριβής ήταν να ελεγχθούν πειραματικά οι σημερινές δύο υποθέσεις που έχουν διατυπωθεί για να εξηγήσουν τους φαινοτύπους της δβ-θαλασσαιμίας και της HPFH (δηλ. της διαμετάθεσης ενισχυτών ή/και της αφαίρεσης αποσιωπητών), μέσω της ανίχνευσης νέων *cis*-ρυθμιστικών αλληλουχιών στο σύμπλεγμα της β-σφαιρίνης που τροποποιούν την έκφραση των γ-γονιδίων σε αυτές τις μεταλλάξεις και ενδεχομένως συμμετέχουν στο φαινόμενο της μεταστροφής της αιμοσφαιρίνης. Οι μελέτες είχαν ως αποτέλεσμα την ανακάλυψη μιας σειράς νέων στοιχείων ενισχυτών και αποσιωπητών. Ανιχνεύτηκαν δύο νέοι ενισχυτές 3' των ελλειμάτων της HPFH-3 και HPFH-6, καθώς και τέσσερις αποσιωπητές, δύο 3' του Αγ-γονιδίου και δύο 5' του δ-γονιδίου.

Στο πρώτο μέρος της Διατριβής διερευνήθηκε η αξία της υπόθεσης ότι η αύξηση στην έκφραση των γ-γονιδίων οφείλεται στη διαμετάθεση ενισχυτών από το 3' άκρο του συμπλέγματος σε γειτνίαση με τα γ-γονίδια. Για τον σκοπό αυτό, αρχικά μελετήθηκε *in vivo* το γεφυρικό τμήμα της μετάλλαξης HPFH-3 που αποτελείται από το εμβρυϊκό Αγ-γονίδιο και περίπου 6.2 kb αλληλουχιών από το 3' άκρο του συμπλέγματος. Δύο ποντίκια παρουσίασαν παρατεταμένη έκφραση του Αγ-γονιδίου τόσο στον λεκιθικό ασκό όσο και στο εμβρυϊκό ήπαρ. Η έκφραση αυτή ευρίσκεται σε αντίθεση με το πρότυπο έκφρασης των Αγ-γονιδίων όταν εισάγονται χωρίς επιπρόσθετες αλληλουχίες και εκφράζονται μόνο στην πρώιμο εμβρυϊκή ζωή. Με εκτεταμένες λειτουργικές δοκιμασίες CAT τόσο σε ερυθροποιητικά κύτταρα K562 όσο σε μη-ερυθροποιητικά κύτταρα HeLa εντοπίσαμε τον ενισχυτή σε τμήμα μήκους 0.7 kb αμέσως μετά το 3' σημείο αποκοπής της HPFH-3. Ο ενισχυτής της HPFH-3 ελέγχθηκε περαιτέρω για την οντογενετική του εξειδίκευση σε υποκινητές ετερόλογων γονιδίων της σφαιρίνης (ε, δ και β) καθώς και στον μη-ετερόλογο υποκινητή της διϋδροφυλικής αφυδρογονάσης (DHFR). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η δράση του ενισχυτή της HPFH-3 περιορίζεται κυρίως στον υποκινητή του όψιμου εμβρυϊκού γονιδίου. Η ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του ενισχυτή έδειξε ότι περιέχει ένα σύμπλεγμα από επαναληπτικές αλληλουχίες που παριστά μέρος μιας μακράς τελικής επαναληπτικής αλληλουχίας (LTR) ενός ενδογενούς ρετροϊού της οικογένειας ERV-9, που παρουσιάζει ομολογία με ένα δεύτερο στοιχείο ERV-9 με παρόμοια δράση ενισχυτού και εντοπίζεται 5' της περιοχής LCR. Η αντίστοιχη περιοχή ERV-9 είναι παρούσα και στο DNA του γίββονα, του ουραγκουτάγκου και του γορίλλα. Η δομική ανάλυση επεκτάθηκε περαιτέρω κατά 5,337 bp ολοκληρώνοντας έτσι την ανάλυση της διαμετατιθέμενης περιοχής των 6,261 bp που είχε ελεγχθεί λειτουργικά. Η ανάλυση της περιοχής εντόπισε πολλαπλές δυναμικές θέσεις δέσμωσης για διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, πολλαπλά ανοικτά μεταγραφικά πλαίσια (ORFs) καθώς και μία νέα αλληλουχία τύπου Mammalian apparent LTR-Retrotransposons (MaLRs) η οποία εμφανίζει δομικές ομοιότητες προς τους ενδογενείς ρετροϊούς.

Στην συνέχεια μελετήθηκαν δομικά και λειτουργικά άλλες δύο μεταλλάξεις, η HPFH-4 και η Γερμανική (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι συγκρίσιμες τόσο στα σημεία αποκοπής όσο και στο μέγεθος τους εν σχέσει με την HPFH-3. Με λειτουργικές δοκιμασίες τόσο σε K562 όσο και σε HeLa κύτταρα, αποκλείστηκε η παρουσία ενός νέου ενισχυτή στην διαμετατιθέμενη περιοχή 2,255 bp που

βρίσκεται ανοδικά του 3' σημείου αποκοπής του ελλείμματος της HPFH-3. Τα ανωτέρω αποτελέσματα τεκμηριώνουν ότι η ενεργοποίηση των εμβρυϊκών γ-γονιδίων στις τρεις συγκρίσιμες μεταλλάξεις, δημιουργείται από ένα κοινό ρυθμιστικό μηχανισμό μέσω του ενισχυτή της HPFH-3. Περαιτέρω, με κυτταρικά υβρίδια MEL μελετήθηκαν *in vivo* οι μηχανισμοί που οδηγούν στην ενεργοποίηση των εμβρυϊκών γονιδίων *cis* των ελλειμμάτων αυτών *in vivo*. Υβρίδια με το έλλειμμα της Γερμανικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας x MEL εξέφρασαν γ-σφαιρίνη κατανεμημένη σε 2-3% των κυττάρων, αποτέλεσμα που ευρίσκεται σε αντίθεση με προηγούμενη μας μελέτη όπου στα κυτταρικά υβρίδια HPFH-1 και HPFH-2 x MEL η κατανομή της γ-σφαιρίνης ήταν πανκυτταρική. Η διαφορά που παρατηρείται στην έκφραση των γ-γονιδίων στα δύο σύνδρομα, οφείλεται όπως πρόσφατα αποδείξαμε, στην παρουσία ενός δεύτερου νέου μεταγραφικού ενισχυτή 3' του ελλείμματος της HPFH-2, καθώς και στην διαφορά ισχύος μεταξύ των δύο διαμετατιθέμενων ενισχυτών (HPFH-1 έναντι HPFH-3).

Στη συνέχεια ελέγξαμε λειτουργικά την 3' διαμετατιθέμενη περιοχή σε άλλες δύο μεταλλάξεις, την Ολλανδική (β)<sup>ο</sup> και την Ισπανική (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία. Λειτουργικές δοκιμασίες CAT σε κύτταρα K562 και κύτταρα HeLa απέκλεισαν την παρουσία ενισχυτή στις διαμετατιθέμενες περιοχές τους. Επομένως, η ενεργοποίηση των γ-γονιδίων σε αυτές τις μεταλλάξεις θα πρέπει να δημιουργείται μέσω άλλου μηχανισμού. Δεδομένου ότι η διαμετατιθέμενη περιοχή της Ισπανικής (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας επεκτείνεται πέρα από το 3' άκρο των περισσότερων μεταλλάξεων, προχωρήσαμε στην δομική της ανάλυση. Η ανάλυση της αλληλουχίας μήκους 3,077 bp, έδειξε ότι η περιοχή περιέχει κυρίως πολλαπλές επαναληπτικές αλληλουχίες των οικογενειών LINE 1 και Alu.

Συγχρόνως ελέγξαμε λειτουργικά την 3' διαμετατιθέμενη περιοχή σε άλλες δύο συγκρίσιμες μεταλλάξεις, την Κινεζική και την Ταϊλανδική (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία. Τα αποτελέσματα μας μετά από διαμόλυνση σε κύτταρα K562, έδειξαν ότι ένα τμήμα αμέσως μετά από το σημείο αποκοπής της Ταϊλανδικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας, βρέθηκε να ενισχύει την δραστηριότητα της CAT κατά 5-6 φορές. Σημαντικό ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η αφαίρεση του ενισχυτή στη περίπτωση της Κινεζικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας, οδηγεί σε φαινότυπο (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας, ενώ η διατήρηση του στην Ταϊλανδική (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία οδηγεί σε φαινότυπο HPFH. Με βάση τα ανωτέρω, προτείναμε η Ταϊλανδική (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία να μετονομασθεί σε HPFH-6. Στη συνέχεια, ο ενισχυτής HPFH-6 ελέγχθηκε για την οντογενετική του εξειδίκευση σε υποκινητές ετερόλογων γονιδίων της σφαιρίνης (ε, δ και β) καθώς και στον μη-ετερόλογο υποκινητή της DHFR. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η δράση του ενισχυτή της HPFH-6 περιορίζεται στον υποκινητή του όψιμου εμβρυϊκού γονιδίου. Η δομική ανάλυση του ενισχυτού, συνολικού μήκους 1,476 bp απεκάλυψε την ύπαρξη πολλαπλών θέσεων αναγνώρισης για διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες. Μία σειρά προοδευτικών μεταλλάξεων-ελλειμμάτων του ενισχυτή, έδειξαν σε κύτταρα K562 ότι μειώνουν σημαντικά την δραστηριότητα του, γεγονός που υποδηλώνει τη συνεργιστική δράση και αλληλεπίδραση των επί μέρους παραγόντων για την πλήρη δραστηριότητα του ενισχυτή. Η δομική ανάλυση επεκτάθηκε καθοδικά έως και μετά το σημείο αποκοπής της Κινεζικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας. Η ανάλυση, συνολικής έκτασης 3,157 bp, έδειξε ότι το 3' άκρο αποκοπής της HPFH-6 εντοπίζεται 2,809 bp ανοδικά από το 3' άκρο της Κινεζικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας. Ακολούθησε επεξεργασία της αλληλουχίας του ενισχυτή και εντοπίστηκε ένα ORF 230 αμινοξέων που αποτελεί μέρος ενός γονιδίου που κωδικοποιεί για υποδοχέα του οσφρητικού βολβού (olfactory receptor ή OR). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι άλλο ένα παρόμοιο γονίδιο με 37% ομολογία σε επίπεδο αμινοξέων, εντοπίζεται εντός του ενισχυτή 3' της HPFH-1, ενώ αλλά τρία OR γονίδια εντοπίζονται στην 5' περιοχή της LCR ο ρόλος των οποίων ακόμα δεν έχει διευκρινιστεί. Η έκφραση του HPFH-6 OR γονιδίου (OR-6H) αναλύθηκε με την αντίστροφη μεταγραφή του mRNA, όπου βρέθηκε ότι εκφράζεται σε διάφορες αιμοποιητικές σειρές (K562, MEL και HL60). Αρνητική ήταν η ανάλυση κατά Northern λόγω των χαμηλών επιπέδων της έκφρασης. Ακολούθως, ελέγχθηκε με PCR, μία cDNA βιβλιοθήκη από ανθρώπινο ιστό οσφρητικού βολβού, όπου όμως δεν προέκυψε κανένα προϊόν PCR, υποδηλώνοντας ότι το OR-6H είτε δεν εκφράζεται σε αυτή την βιβλιοθήκη, είτε ότι αντιπροσωπεύει μια υποκατηγορία OR γονιδίων που εκφράζονται ειδικά στις ανωτέρω κυτταρικές σειρές.

Στο δεύτερο μέρος της Διατριβής, διερευνήθηκε η αξία της δεύτερης υπόθεσης για την δημιουργία των φαινοτύπων δβ-θαλασσαιμίας και HPFH που αφορά την αφαίρεση λόγω ελλείματος, αρνητικών *cis*-ρυθμιστικών αλληλουχιών ή αποσιωπητών που εδράζονται μεταξύ των Αγ και δ-γονιδίων. Εκτεταμένες λειτουργικές δοκιμασίες CAT και λουσιφεράσης στην περιοχή 13.4 kb μεταξύ των Αγ και δ-γονιδίων,

απεκάλυψαν την παρουσία τεσσάρων τμημάτων με ιδιότητες αποσιωπητού. Η δραστηριότητα των πλασμιδίων που περιείχαν τις περιοχές αυτές ήταν κατά 30-40% χαμηλότερη του πλασμιδίου αναφοράς. Δύο τμήματα (Eh και F) εντοπίστηκαν 0.4 kb και 1.6 kb από το 3' άκρο του Αγ-γονιδίου, αντίστοιχα, ενώ δύο άλλα τμήματα (O και P) εντοπίστηκαν 2.3 και 0.7 kb 5' του δ-γονιδίου, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι συμβατά με τα δεδομένα σε διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία έδειξαν αυτόνομη καταστολή των γ-γονιδίων αμέσως μετά την γέννηση σε κατασκευές DNA που περιείχαν τις αλληλουχίες Eh και F. Περαιτέρω μελετήσαμε τους παράγοντες που συνδέονται με τον αποσιωπητή F. Η ανάλυση έδειξε ότι το τμήμα F μήκος 364 bp συνδέεται σε έξι θέσεις με τον παράγοντα YY1 με διαφορετική ισχύ. Στην συνέχεια δημιουργήθηκε μία σειρά από μεταλλάξεις στις τρεις ισχυρές θέσεις σύνδεσης (26, 108 και 311) του παράγοντα YY1. Λειτουργικές δοκιμασίες λουσιφεράσης έδειξαν ότι μόνο η μετάλλαξη στην YY1 θέση 108 αναστέλλει τη δράση του αποσιωπητή, γεγονός που υποδηλώνει ότι αποτελεί σημαντική παράμετρο για τη δράση του.

Στην τελευταία μελέτη διερευνήθηκε περαιτέρω ο ρόλος των αποσιωπητών O και P στη δημιουργία του φαινοτύπου δύο συγκρίσιμων μεταλλάξεων, της Αμερικανικής (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία και της Ιταλικής HPFH-5. Τα γεφυρικά τμήματα των δύο μεταλλάξεων καθώς και μία σειρά αλληλοκαλυπτομένων τμημάτων από τις περιοχές των σημείων αποκοπής ελέγχθηκαν με δοκιμασίες CAT τόσο σε κύτταρα K562 όσο και σε κύτταρα COS-7. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το γεφυρικό τμήμα της HPFH-5, που περιλαμβάνει ένα μικρό τμήμα του κολοβωμένου αποσιωπητού O σε σύντηξη με ένα σχεδόν άθικτο τμήμα του ενισχυτού που βρίσκεται 3' του β-γονιδίου, αύξησε την δραστηριότητα CAT κατά 4-5 φορές. Αντίθετα, το συγκρίσιμο γεφυρικό τμήμα της Αμερικανικής (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας, που περιέχει ένα άθικτο τμήμα του αποσιωπητού O σε σύντηξη με ένα άθικτο τμήμα του ενισχυτού 3' του β-γονιδίου παρουσίασε δραστηριότητα χαμηλότερη του πλασμιδίου αναφοράς γ-CAT. Στη συνέχεια δημιουργήσαμε προοδευτικά ελλείμματα επί του γεφυρικού τμήματος της Αμερικανικής (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας στην θέση του αποσιωπητού O. Η αφαίρεση της εσωτερικής αλληλουχίας οδήγησε στην επανενεργοποίηση του γ-CAT γονιδίου κατά τέσσερις φορές. Τα αποτελέσματα αυτά μιμούνται επαρκώς την *in vivo* κατάσταση και τεκμηριώνουν την άποψη ότι η διατήρηση και η παρουσία του αποσιωπητή O είναι υπεύθυνη για τις φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ των δύο ελλειμμάτων.

Με βάση τα ανωτέρω αποτελέσματα, βρίσκεται σε εξέλιξη η *in vivo* ανάλυση των νέων *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων ως προς την έκφραση των γ-γονιδίων. Η απόκτηση νέων γνώσεων που προέκυψαν από την παρούσα Διατριβή, όσον αφορά τους μηχανισμούς της μεταστροφής, αναμένεται να οδηγήσει όχι μόνο στην καλύτερη ερμηνεία των βασικών βιολογικών ερωτημάτων που σχετίζονται με τη γονιδιακή έκφραση, αλλά και στην δυνατότητα ανάπτυξης νέων μεθόδων γονιδιακής θεραπείας με την ενσωμάτωση των ανωτέρω στοιχείων σε κατασκευές ρετροϊών ή/και την αδρανοποίηση των αποσιωπητών με ομόλογο ανασυνδυασμό, με στόχο την αποτελεσματική και οριστική θεραπεία σοβαρών κληρονομικών νόσων όπως είναι η β-θαλασσαιμία και η δρεπανοκυτταρική αναιμία.

## Summary

The human  $\beta$ -globin gene cluster and the mechanisms which control hemoglobin switching constitute an ideal model for the study of gene function and regulation during ontogeny and erythropoietic differentiation. A unique feature of hemoglobin switching in humans, is the availability of many mutants associated with continued HbF production in the adult life. Studies of the resulting mutants called  $(\delta\beta)^0$  thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH), has offered important insights into the understanding of the control of globin gene expression and hemoglobin switching.

The purpose of this Thesis, was to test experimentally the validity of two hypotheses which have been formulated to explain the resulting phenotypes of  $\delta\beta$ -thalassemia and HPFH (i.e. the juxtaposition of enhancers and/or the deletion of silencers), through the identification of novel *cis*-acting regulatory elements located within the cluster, which activate  $\gamma$ -gene expression and are possibly involved in the mechanisms of hemoglobin switching. Our studies resulted in the identification of several novel regulatory elements. We identified two enhancers located 3' to the breakpoints of the HPFH-3 and HPFH-6 deletions and four silencers two of which are located 3' of the  $A\gamma$  gene and two 5' of the  $\delta$  gene.

The first part of the Thesis focuses on the hypothesis, which assumes that the increased levels of  $\gamma$ -gene expression is due to the juxtaposition of an enhancer element from the 3' end of the cluster. We started by studying *in vivo* the role of the bridging fragment of the HPFH-3 deletion which contains the fetal  $A\gamma$ -gene with about 6.2 kb of juxtaposed sequence normally residing at the 3' end of the cluster. Two mice were found to express  $A\gamma$  mRNA in both embryonic and fetal liver erythroid cells. Since the  $A\gamma$ -gene is normally expressed only in embryonic cells of transgenic mice, the data suggest that the juxtaposed sequences partially altered the  $\gamma$ -gene developmental specificity, by shifting the  $A\gamma$ -gene expression beyond the embryonic stage. We subsequently examined whether these juxtaposed sequences contained a transcriptional enhancer. Transient assays were performed in K562 and HeLa cells which showed that a fragment 0.7 kb located immediately 3' of the breakpoint enhanced CAT activity 3-fold. The HPFH-3 enhancer element was further tested on its ability to increase transcription from other globin promoters ( $\epsilon$ ,  $\delta$  and  $\beta$ ) or non-globin promoters (DHFR) in K562 cells. The data indicated that the HPFH-3 enhancer element is restricted mainly to the fetal globin gene promoter. Sequence analysis of the enhancer element revealed a complex array of repeated sequences which represents part of an LTR belonging to the family of human endogenous retroviruses ERV-9. A second copy of an ERV-9 element with a 87% homology and similar enhancer activity, is located within the 5' region of the LCR. The same ERV-9 region is present in the DNA of gibbon, orangutan and gorilla. To further gain insights for novel regulatory elements flanking the HPFH-3 breakpoint region, we extended the sequence analysis for 5,337 bp downstream of the breakpoint, thus completing the analysis of the 6,261 bp region tested in transient assays. Sequence analysis of the novel 5,337 bp region, has identified several potential binding sites for various transcription factors, 30 open reading frames (ORFs) ranging from 102 to 369 bp, and the presence of a novel transposable element exhibiting structural similarities to retroviruses designated as Mammalian apparent LTR-retrotransposons (MaLRs).

We then proceeded with the structural and functional analysis of the HPFH-4 and German ( $A\delta\gamma\beta$ )<sup>o</sup> thalassemia deletions. The location and the size of these two deletions is comparable with that of the HPFH-3 deletion. A region of 2,255 bp which was sequenced and is located between the HPFH-4 and HPFH-3 deletion breakpoints, was analyzed by functional assays in K562 and HeLa cells using a luciferase reporter gene. None of the fragments tested showed any detectable enhancer activity. Thus, these data documented that the above three comparable deletions, share a common regulatory mechanism *via* the HPFH-3 enhancer. To further elucidate the mechanisms leading to fetal gene activation by these mutations, we generated somatic cell hybrids for the German ( $A\delta\gamma\beta$ )<sup>o</sup> thalassemia deletion. Two of these hybrids expressed  $\gamma$ -globin, distributed in 2-3% of the cells, unlike the HPFH-1 and HPFH-2 x MEL hybrids previously reported by us, where the distribution of the  $\gamma$ -globin was pancellular. The differences in the pattern of  $\gamma$ -gene expression between the two syndromes, is due to the presence of a novel enhancer which we identified 3' of the HPFH-2 breakpoint and to the strength of the individual juxtaposed enhancers (HPFH-1 vs. HPFH-3).

We next tested the 3' juxtaposed sequences of the Dutch ( $\beta$ )<sup>o</sup> and Spanish ( $\delta\beta$ )<sup>o</sup> thalassemia deletions for the presence of an enhancer element. Functional assays were carried out in K562 and HeLa cells. None of the fragments tested showed any detectable enhancer activity excluding the presence of an enhancer element in the juxtaposed sequences. Thus the activation of the  $\gamma$ -gene in these deletions, must be operating through a mechanism other than that of an imported enhancer. Since the 3' juxtaposed sequence of the Spanish ( $\delta\beta$ )<sup>o</sup> thalassemia extends beyond the available deletions, we proceeded with its sequencing. The analysis of the 3,077-bp fragment indicated that this region is composed of several repeat elements belonging to the LINE 1 and Alu families.

We then proceeded with the structural and functional analysis of the comparable Chinese and Thai ( $A\gamma\delta\beta$ )<sup>o</sup> thalassemias. The juxtaposed region was analyzed by functional CAT assays in K562 cells. All fragments except one, lacked enhancer activity. The single fragment (HPFH-6 enhancer) located downstream of the Thai deletion, enhanced CAT activity by 5-6 fold. This fragment is deleted in the Chinese thalassemia but it is preserved in the Thai deletion. Based on the resulting phenotypes ( $\delta\beta$  thalassemia vs. HPFH) we proposed that the Thai ( $A\gamma\delta\beta$ )<sup>o</sup> thalassemia should be renamed HPFH-6. The HPFH-6 enhancer element was further tested on its ability to increase transcription from other globin promoters ( $\epsilon$ ,  $\delta$  and  $\beta$ ) or non-globin promoters (DHFR) in K562 cells. Results indicated that the HPFH-6 enhancer element is restricted mainly to the fetal globin gene promoter. Sequence analysis of the 1,476 bp HPFH-6 enhancer, revealed the presence of multiple consensus binding sites for several transcription factors. Deletion mutagenesis on the original fragment from both the 5' and 3' ends and in transient assays in K562 cells, suggested a synergistic role of the individual motifs and the putative binding factors for the maximum effect of the enhancer. Our sequence analysis for a total of 3,157 bp, was extended downstream past the Chinese ( $A\gamma\delta\beta$ )<sup>o</sup> thalassemia breakpoint. Our analysis indicated that the 3' end breakpoint of the HPFH-6 deletion is located 2,809 bp upstream from the 3' end breakpoint of the Chinese ( $A\gamma\delta\beta$ )<sup>o</sup> thalassemia. Analysis of the HPFH-6 enhancer sequence indicated that it contains an ORF of 230 amino acids with homology to the olfactory receptor (OR) genes. It is of interest that one more OR gene is located within the HPFH-1 enhancer element. Three more OR genes located in the 5' LCR region have also been identified, though their function remains to be determined. By employing RT-PCR analysis, we obtained and sequenced several PCR products from various RNA samples from established hematopoietic cell lines (K562, MEL and HL60). These products were identical with the orthologous genomic sequence of the  $\beta$ -cluster, suggesting that this OR gene (OR-6H) is indeed expressed in these hematopoietic cell lines. However, expression of the OR-6H gene was not detected by Northern analysis possibly due to the low expression of the OR gene. We also screened by PCR a unique human olfactory tissue library. No cDNA clone was obtained, indicating that this

OR gene is not expressed in this tissue and might represent a subset of OR genes with a specific repertoire for hematopoietic tissues.

In the second part of the Thesis, we examined the second hypothesis for the generation of the  $\delta\beta$ -thalassemia and HPFH phenotypes, whereby the main cause for the  $\gamma$ -gene activation is the deletion of silencers located between the  $A\gamma$  and  $\delta$  gene region. Extended functional CAT and luciferase analysis of the 13.4 kb region revealed the presence of four silencer elements. These elements were found to exhibit an average activity, which was 30-40% of the control vector. Two elements were located 0.4 and 1.6 kb (Enh and F) from the 3' end of the  $A\gamma$ -gene, respectively, while the other two were located 2.3 and 0.7 kb (O and P) 5' of the  $\delta$ -gene, respectively. Our results are in agreement with previous studies in transgenic mice, where the  $A\gamma$ -gene was autonomously silenced in the adult stage when the construct contained the Enh and F silencers. We then proceeded with identifying the binding factors of the F-silencer. Our analysis indicated that the F-silencer 364 bp was found to contain several binding sites, with varying binding affinity for the ubiquitous transcription factor YY1. We then characterized the functional role of the three strong binding sites (26, 108 and 311), using site-directed mutagenesis to introduce specific substitutions within the YY1 motif. Following transient assays in K562 cells we observed that substitution at site 108 resulted in a loss of the silencers negative effect, suggesting that this site might be an important parameter for its function.

In the last study, we further examined the regulatory role of the O and P silencers on the levels of expression of the  $\gamma$ -genes, using comparable deletion mutants such as the Italian HPFH-5 and the US Black ( $\delta\beta$ )<sup>o</sup> thalassemia. The bridging fragments of both deletions along with various bridging fragments were analyzed by functional assays in K562 and COS-7 cells. Our results indicated that the bridging fragment of the HPFH-5 deletion, which includes a small region of the truncated O silencer fragment, fused with an almost intact fragment of the 3'  $\beta$  enhancer was found to increase CAT activity by 4-5 fold. On the contrary, the comparable bridging fragment of the  $\delta\beta$ -thalassemia deletion, containing an almost intact O silencer fragment fused with the intact 3'  $\beta$  enhancer could not override the negative effect of the O fragment, which was found to have an average CAT activity even lower of that of the  $\gamma$ -CAT reporter gene. To document further whether the presence of the O silencer was the reason for this diminished activity, we performed a systematic deletion mutagenesis of the O silencer fragment of the  $\delta\beta$ -thalassemia bridging fragment, which resulted in the reactivation of the  $\gamma$ -CAT reporter gene by 4-fold. These results mimic closely the *in vivo* situation regarding the levels of  $\gamma$ -globin gene, and support the conclusion that the presence of the O silencer fragment is responsible for the phenotypic difference of the two syndromes. Based on these results we are in the process of analyzing these novel *cis*-elements *in vivo* in terms of their effect on  $\gamma$ -globin gene expression. These results are expected to provide new insights into the mechanisms of hemoglobin switching which will help us understand the regulation of these genes, but also they will further facilitate us to devise new strategies for gene therapy of severe hereditary disorders such as  $\beta$ -thalassemia and sickle cell anemia by incorporating the enhancer elements in constructs of retroviral vectors and/or the inactivation of the silencers by homologous recombination.



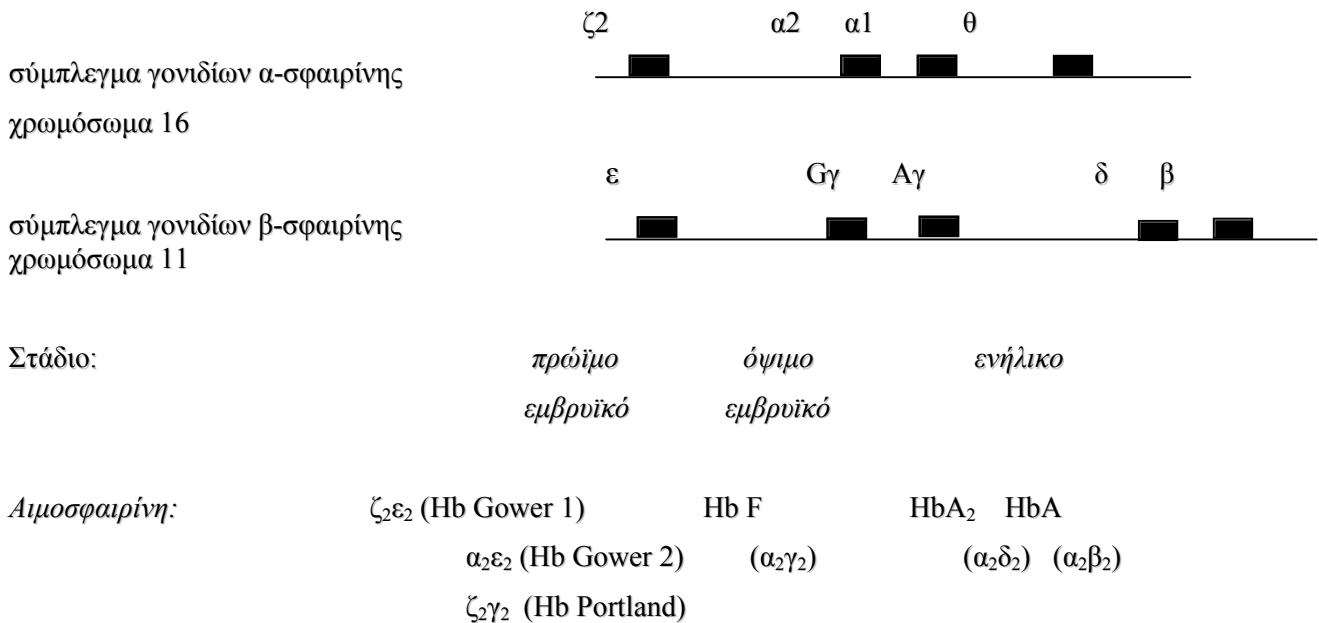
# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι**

## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## Η βιολογία της μεταστροφής της αιμοσφαιρίνης

Το φαινόμενο της μεταστροφής της αιμοσφαιρίνης αποτελεί ένα υποδειγματικό πειραματικό σύστημα για τη μελέτη του ελέγχου της γονιδιακής δραστηριότητας κατά τη διάρκεια της οντογένεσης και της ερυθροποιητικής διαφοροποίησης. Στον άνθρωπο, δύο συμπλέγματα γονιδίων το  $\alpha$  και  $\beta$  είναι υπεύθυνα για την σύνθεση της αιμοσφαιρίνης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Το σύμπλεγμα των γονιδίων της  $\alpha$ -σφαιρίνης εδράζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 16p13.3 και αποτελείται από τρία λειτουργικά γονίδια, το εμβρυϊκό  $\zeta$ -γονίδιο, τα δύο ενήλικα  $\alpha$ -γονίδια,  $\alpha 2$  και  $\alpha 1$  καθώς και το  $\theta$ -γονίδιο που εκφράζεται κυρίως στην εμβρυϊκή και λιγότερο στην ενήλικη ζωή (Higgs 1993; Mamalaki *et al.*, 1990; Ley 1987; Liebhaber 1987).

Το σύμπλεγμα της  $\beta$ -σφαιρίνης εδράζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 11p15.5 και αποτελείται από πέντε λειτουργικά γονίδια, το πρώιμο εμβρυϊκό  $\epsilon$ -γονίδιο, τα δύο διπλασιασμένα  $G\gamma$  και  $A\gamma$  όψιμα εμβρυϊκά γονίδια καθώς και τα ενήλικα  $\delta$  και  $\beta$ -γονίδια (Σχήμα 1A). Η έκφραση των γονιδίων αυτών ελέγχεται και στα δύο συμπλέγματα από κύριες ρυθμιστικές περιοχές που εντοπίζονται ανοδικά του συμπλέγματος. Η περιοχή ελέγχου του γονιδιακού τύπου (LCR) της  $\beta$ -σφαιρίνης εδράζεται 6 έως 20 kb ανοδικά του  $\epsilon$ -γονιδίου ενώ η ρυθμιστική περιοχή του  $\alpha$ -συμπλέγματος HS-40, εδράζεται 40 kb ανοδικά του  $\zeta$ -γονιδίου.



**Σχήμα 1A.** Η οργάνωση των λειτουργικών γονιδίων της σφαιρίνης με τις τετραμερείς αιμοσφαιρίνες που παράγονται κατά τα διάφορα στάδια της ανάπτυξης (Stamtoyannopoulos and Nienhuis 1994).

Η λειτουργία και η σημασία των ρυθμιστικών αυτών περιοχών καθώς και οι γενικές διαφορές στη δομή της χρωματίνης των συμπλεγμάτων της  $\alpha$ - και  $\beta$ -σφαιρίνης, συνοψίζονται παρακάτω και αναπτύσσονται αναλυτικά αργότερα (Viprakasit *et al.*, 2000). Επίσης υπάρχει και διαθέσιμη ιστοσελίδα στο

διαδίκτυο που καλύπτει θέματα σχετιζόμενα με την έκφραση των γονιδίων της σφαιρίνης, συντηρημένες περιοχές καθώς και τις φυσιολογικές μεταλλάξεις στη διεύθυνση (<http://www.globin.cse.psu.edu>) (Hardison *et al.*, 1994; Rjemer *et al.*, 1998).



**Σχήμα 1B:** Η οργάνωση και εξέλιξη του συμπλέγματος των γονιδίων της β-σφαιρίνης στα θηλαστικά, τα πτηνά και τα αμφίβια.

**Πίνακας 1:** Δομικές και λειτουργικές διαφορές μεταξύ των συμπλεγμάτων της α- και β-σφαιρίνης

	Σύμπλεγμα α-σφαιρίνης 16p13.3	Σύμπλεγμα β-σφαιρίνης 11p15.5
Ρυθμιστικό στοιχείο	HS-40	LCR
Κύριες μεταλλάξεις	Ελλειμματικές	Σημειακές
Χρωματίνη	Ανοικτή	Κλειστή-> Ανοικτή
Αντιγραφή	Νωρίς	Αργά -> Νωρίς
Έκφραση σε υβρίδια	Νωρίς	Αργά
Έκφραση <i>in vitro</i>	Παρουσία ενισχυτή	Παρουσία ενισχυτή
Αλληλουχίες Alu	25%	Περίπου 5%
Μεταθετά στοιχεία LINE 1	Σπάνια	Παρόντα
Θέσεις σύνδεσης με το χρωμοσωμικό Σκελετό (matrix attachment sites)	Δεν έχουν ανιχνευτή	Συχνές
Περιεχόμενο GC	54%	39.5%
CpG νησίδες	Συχνές	Ουδεμία
Επιρροή στη χρωματίνη από Μεταλλάξεις στην HS40 ή LCR	Όχι	Ναι

τον ενήλικο τύπο. Η ερυθροποίηση στον άνθρωπο ξεκινάει στον λεκιθικό ασκό αλλά μετά από πέντε περίπου εβδομάδες κύησης, ακολουθεί η πρώτη μεταστροφή της αιμοσφαιρίνης όπου ο τόπος παραγωγής μεταφέρεται από τον λεκιθικό ασκό στο εμβρυϊκό ήπαρ. Το ήπαρ παραμένει ο κύριος τόπος ερυθροποίησης στο έμβρυο έως την δωδέκατη εβδομάδα της κύησης, όπου και ακόλουθη αλλαγή του τόπου της αιμοποίησης στον σπλήνα και στο μυελό των οστών. Κατά τη διάρκεια της περιγεννητικής περιόδου, ακολουθεί η δεύτερη μεταστροφή της αιμοσφαιρίνης η οποία ολοκληρώνεται τις πρώτες εβδομάδες μετά τη γέννηση, όπου ο μυελός των οστών παραμένει το κύριο όργανο αιμοποίησης κατά τη διάρκεια της ενήλικου ζωής (Σχήμα 2).

**Σχήμα 2.** Αλλαγές που παρατηρούνται στις αλυσίδες των σφαιρινών με την αλλαγή του τόπου αιμοποίησης κατά την διάρκεια της ανάπτυξης (Stamatoyannopoulos and Nienhuis 1994).

Κατά το εμβρυϊκό στάδιο της αιμοποίησης, τα ερυθροκύτταρα συνθέτουν κυρίως εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη (HbF) ενώ συνθέτουν ενήλικο αιμοσφαιρίνη (HbA) σε πολύ μικρές ποσότητες. Κατά τη διάρκεια της περιγεννητικής περιόδου, εμφανίζεται μια αντίστροφη μεταβολή στην σύνθεση της σφαιρίνης, ο ρυθμός της οποίας επηρεάζεται προφανώς από τον αναπτυξιακό χρόνο. (Boyer *et al.*, 1975; Wood *et al.*, 1975). Στην γέννηση η HbF αποτελεί το 60-80% της συνολικής αιμοσφαιρίνης. Σε νεογνά 16 έως 20 εβδομάδων η HbF μειώνεται περίπου στο 3%, ενώ στον ενήλικο αποτελεί λιγότερο από το 0.5 έως 1% της συνολικής αιμοσφαιρίνης. Όταν πλέον συμπληρωθεί η μεταστροφή, ένας μικρός πληθυσμός ερυθροκυττάρων (3 έως 7%), τα λεγόμενα F-κύτταρα (F-cells), που συνεκφράζουν εμβρυϊκή και ενήλικο αιμοσφαιρίνη (HbF και HbA) παραμένουν στο περιφεριακό αίμα του ενήλικου (Schroeder *et al.*, 1968). Ο αριθμός και η ποσότητα της HbF ανά F-κύτταρο, αυξάνεται από διάφορες μεταλλάξεις του συμπλέγματος όπως αναφέρεται αργότερα.

Η δομή του συμπλέγματος των β-γονιδίων

ευρίσκεται το πρώιμο εμβρυϊκό ε-γονίδιο, ακολουθούμενο από τα διπλασιασμένα Gγ και Αγ όψιμα εμβρυϊκά γονίδια, το ψευδογονίδιο ψβ και τέλος τα γονίδια της ενήλικου ζωής δ και β (Εικ.3).

Το σύμπ

**Σχήμα 3:** Το σύμπλεγμα των γονιδίων της β-σφαιρίνης.

Τα εμβρυϊκά γ-γονίδια διαφέρουν μόνο στην κωδικοποιούσα περιοχή του αμινοξυ στη θέση 136, όπου το Gγ-γονίδιο κωδικοποιεί για γλυκίνη ενώ το Αγ γονίδιο για αλανίνη. Ο λόγος σύνθεσης των Gγ:Αγ

αλυσίδων κατά τη διάρκεια της περιγεννητικής περιόδου είναι 3:1 και μετατρέπεται σε 2:3 στο μικρό αριθμό των F-κυττάρων του ενήλικου. Μία παρόμοια δυσαναλογία έκφρασης παρατηρείται και στα γονίδια της α-σφαιρίνης, όπου το α2-γονίδιο εκφράζεται υψηλότερα (60%) από το α1-γονίδιο (40%). Η υψηλότερη έκφραση των Gγ και α2 γονιδίων πιθανόν να είναι αποτέλεσμα της πλησιέστερης θέσης τους εν σχέση με την περιοχή LCR και HS-40 αντίστοιχα (Stamatoyannopoulos and Nienhuis 1994, Stamatoyannopoulos and Grosveld 2001). Οι μηχανισμοί που συμμετέχουν στην αναπτυξιακή ρύθμιση των γονιδίων της σφαιρίνης θα συζητηθούν παρακάτω.

## Μεταθετά στοιχεία του DNA στο σύμπλεγμα της β-σφαιρίνης

Η δομική ανάλυση του συμπλέγματος έχει προσδιορίσει την ακριβή αλληλουχία των νουκλεοτιδίων σε έκταση 73,308 bp η οποία είναι διαθέσιμη από την βάση δεδομένων (GenBank Acc. No. U01317) καθώς και από το διαδίκτυο (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> Acc. No. U01317.1). Η μέχρι στιγμής ανάλυση έχει επεκταθεί και περιέχει συνολικά 113,568 bp. Οι δομικές μελέτες αποκάλυψαν και την παρουσία διαφόρων οικογενειών από επαναληπτικές αλληλουχίες, όπως οι οικογένειες Alu, LINE 1 (long interspersed nuclear elements) (Stamatoyannopoulos and Nienhuis 1994; Bunn and Forget 1986; Karlson and Nienhuis 1985) και πρόσφατα οι οικογένειες HERV (human endogenous retroviruses) και MaLR (mammalian apparent LTR-retrotransposons) (Smit 1996; Smit 1999; Kazazian 1998). Ο λειτουργικός τους ρόλος στο φαινόμενο της μεταστροφής δεν έχει εξακριβωθεί, ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι είναι μεταγραφικά ενεργοί τόσο in vivo όσο και in vitro. Οι αλληλουχίες Alu και LINE 1 φαίνεται ότι αποτελούν συχνά σημεία αποκοπής των διαφόρων ελλειμμάτων που συνοδεύονται από αυξημένη σύνθεση HbF στον ενήλικο, προφανώς διότι ευνοούν συνθήκες ομόλογου ή μη-ομόλογου ανασυνδυασμού. Η λειτουργία και σημασία των περιοχών αυτών αναφέρεται αργότερα.

## Η σημασία των μεταλλάξεων HPFH και δβ θαλασσαιμίας

Οι πρώτες περιπτώσεις HPFH εντοπίστηκαν το 1955 σε δύο ενήλικα άτομα από την Δυτική Αφρική (Edington and Lehman 1955) που παράλληλα ήταν και ετεροζυγώτες για το β<sup>s</sup> γονίδιο της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας. Σε μεταγενέστερες μελέτες κατά την διάρκεια της δεκαετίας του 1960 και αρχές του 1970, εντοπίστηκαν οι τρεις κύριες μορφές τύπου HPFH: i) η Ελληνική Αγ HPFH (Fessas and Stamatoyannopoulos 1963) που παρουσιάζει ηυξημένη Αγ σφαιρίνη χωρίς ανίχνευση της Gγ σφαιρίνης, ii) η Αμερικανική GγAg HPFH που έχει ηυξημένες και τις δύο σφαιρίνες και η iii) Αμερικανική GγHPFH που παρουσιάζεται αύξηση μόνο στην Gγ σφαιρίνη (Huisman *et al.*, 1969; Huisman *et al.*, 1970). Περίπου την ίδια περίοδο είχαν περιγραφεί και οι κύριες φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ της HPFH και της δβ-θαλασσαιμίας.

Μοναδικό στοιχείο της μεταστροφής της αιμοσφαιρίνης στον άνθρωπο αποτελεί η μεγάλη διαθεσιμότητα πολλών μεταλλάξεων του συμπλέγματος των β-γονιδίων. Περισσότερες από εξήντα ελλειματικές μεταλλάξεις έχουν εντοπισθεί στο σύμπλεγμα των β-γονιδίων (Bollekens and Forget 1991; Stamatoyannopoulos and Nienhuis 1994; Rochette *et al.*, 1994; Stamatoyannopoulos and Grosveld 2001). Οι αιματολογικοί δείκτες από αυτές τις μεταλλάξεις εμφανίζουν διάκριτους φαινότυπους. Αρκετοί παράμετροι και δείκτες χρησιμοποιούνται ώστε να διαχωριστούν αυτές οι μεταλλάξεις σε δβ-θαλασσαιμία ή HPFH. Οι δύο μεταλλάξεις εμφανίζουν διάκριτους φαινότυπους όσον αφορά τα επίπεδα της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης, την κατανομή της στα ερυθροκύτταρα, την μορφολογία των ερυθροκυττάρων, τον αιματοκρίτη, καθώς και τον δείκτη MCH (Μέση ποσότητα αιμοσφαιρίνης κατά ερυθροκύτταρο) (Πίνακας 2).



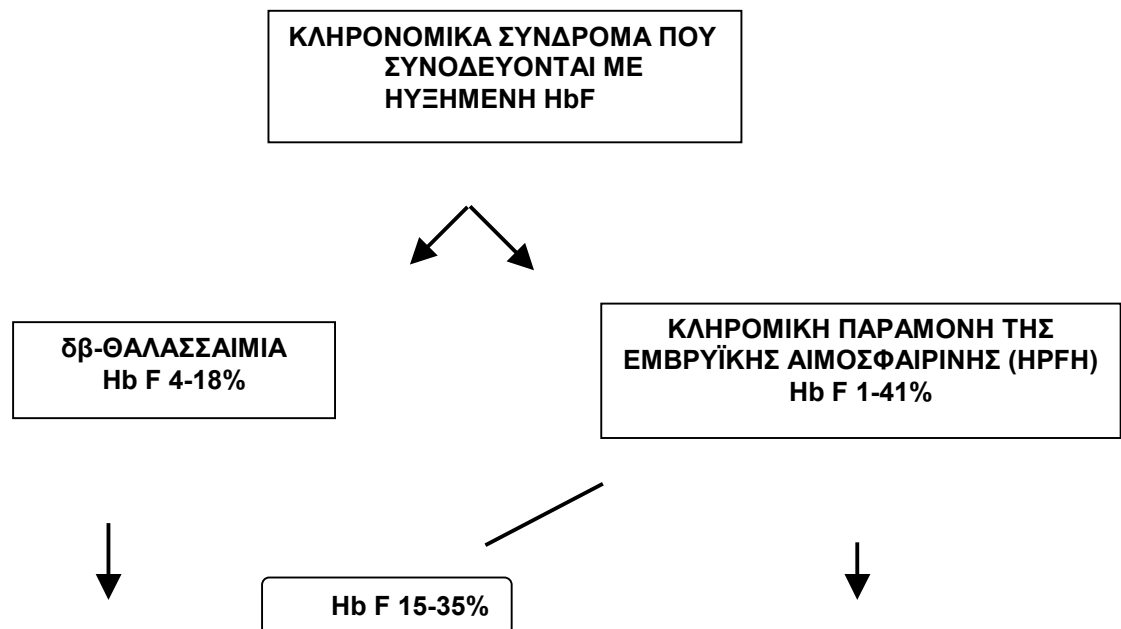
**ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Φαινότυπος δβ-θαλασσαιμίας και ΗΡFH σε ετεροζυγώτες (Stamatoyannopoulos and Nienhuis 1994)**

	<u>δβ-θαλασσαιμία</u>	<u>ΗΡFH</u>
HbF	4-18%	15-35%
Κατανομή	Ετεροκυτταρική	Πανκυτταρική
Ερυθροκύτταρα	Μή φυσιολογικά	Φυσιολογικά
Ht:	Ελάχιστα μειωμένος	Φυσιολογικός
MCH:	Μειωμένη	Σχεδόν φυσιολογική

Οι μεταλλάξεις αυτές είτε επισυμβαίνουν σε κάποιο σημείο του συμπλέγματος κυρίως στην περιοχή του υποκινητή, είτε αφαιρούν διάφορες περιοχές από το σύμπλεγμα των γονιδίων. Οι μεταλλάξεις αναφέρονται ως μη-ελλειματικές (Πίνακας 3) ή ελλειματικές (Πίνακας 4) αντίστοιχα και οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα HbF. Η κατανομή της HbF και στις δύο μεταλλάξεις μπορεί να είναι ίδια σε όλα τα ερυθροκύτταρα (πανκυτταρική) ή μόνο σε ορισμένα ερυθροκύτταρα (ετεροκυτταρική). Ορισμένες μεταλλάξεις οδηγούν σε αύξηση της Γγ σφαιρίνης, άλλες σε αύξηση της Αγ σφαιρίνης, ενώ άλλες σε αύξηση και των δύο.

### Μή ελλειματικές μεταλλάξεις ΗΡFH

Οι μεταλλάξεις αυτές είναι κυρίως σημειακές στην περιοχή του υποκινητή των Γγ ή Αγ γονιδίων (Σχήμα 11). Η περιοχή του υποκινητή περιέχει αλληλουχίες απαραίτητες τόσο για την άριστη μεταγραφή του γονιδίου όσο και για την ιστική του εξειδίκευση. Ατομα με μή ελλειματικές μεταλλάξεις ΗΡFH παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα HbF με πανκυτταρική ή ετεροκυτταρική κατανομή. Τα ερυθροκύτταρα τους είναι φυσιολογικά τόσο σε μορφολογία όσο και σε αριθμό χωρίς καμία άλλη κλινική ανωμαλία, ενώ εκφράζονται και τα δύο ενήλικα δ και β-γονίδια (Poncz *et al.*, 1989; Bollekens and Forget 1991; Stamatoyannopoulos and Nienhuis 1994).

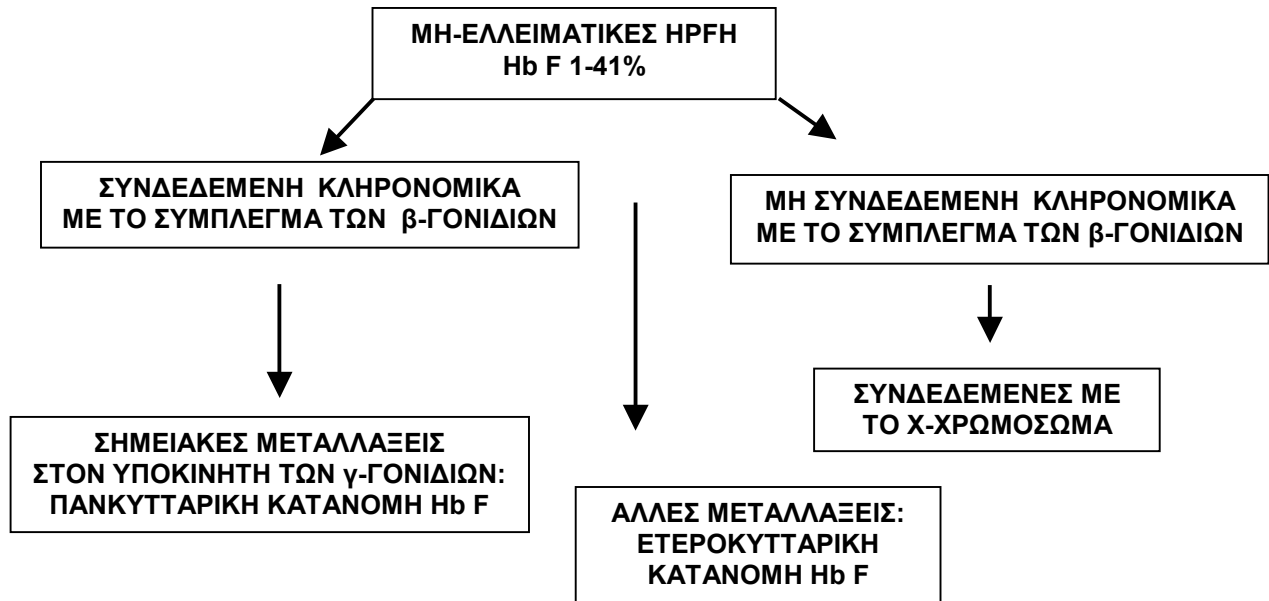




Σχήμα 4. **Κληρονομικά σύνδρομα που συνοδεύονται με ηυξημένη HbF στην ενήλικη ζωή (Rochette *et al.*, 1994).**

Υπάρχουν όμως και μη ελλειματικές μεταλλάξεις οι οποίες δεν είναι συνδεδεμένες κληρονομικά με το σύμπλεγμα των β-γονιδίων (Σχήμα 5), όπου οι ετεροζυγώτες παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα HbF με ετεροκυτταρική κατανομή. Η μοριακή βάση αυτών των ελλειμάτων δεν είναι γνωστή. Γενετικές μελέτες σε Αφρο-Τζαμαϊκανές οικογένειες πιθανολογούν ότι υπάρχει ένα γονίδιο το οποίο αυξάνει τον αριθμό των κυττάρων F το οποίο βρίσκεται στο X χρωμόσωμα στην περιοχή Xp22.2 (Dover *et al.*, 1992). Άλλες μελέτες σε μία μεγάλη Ινδική οικογένεια έχουν εντοπίσει και ένα γονίδιο το οποίο προκαλεί ετεροκυτταρική κατανομή της Hb F που εδράζεται στην περιοχή 6q23 (Craig *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 2000).

Ο σημαν



**Σχήμα 5:** Μη-ελλειμματικές μεταλλάξεις HPFH (Rochette *et al.*, 1994).

Ενας σημαντικός αριθμός από μη ελλειμματικές μεταλλάξεις στην περιοχή του υποκινητή έχει συστηματικά χαρακτηριστεί (Huisman 1992). Η μελέτη της έκφρασης των μεταλλάξεων αυτών σε ερυθροποιητικά κύτταρα απέδειξε ότι οι αλληλουχίες μέχρι 260 bp ανοδικά από τη θέση έναρξης της μεταγραφής, είναι αρκετές τόσο για την ιστική εξειδίκευση όσο και για το φαινόμενο της επαγωγής (Anagnou *et al.*, 1986; Stamatoyannopoulos and Nienhuis 1994). Αυτή η περιοχή περιέχει πολλαπλές θέσεις αλληλεπίδρασης και σύνδεσης με διάφορους ερυθροποιητικούς και μη-ερυθροποιητικούς trans-μεταγραφικούς παράγοντες (GATA-1, SSP, SSE, Sp1, CDP, NFE3, και YY1) οι οποίοι τροποποιούν την έκφραση των γ-γονιδίων τόσο στην εμβρυϊκή όσο και στην ενήλικη ζωή.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.** Μη ελλειμματικές μεταλλάξεις HPFH (Stamatoyannopoulos and Nienhuis 1994; Rochette *et al.*, 1994; Forget 1998).

Τύπος-εθνικότητα	Μετάλλαξη	% HbF σε ετεροζυγώτες
<b>Γγ HPFH</b>		
Ιαπωνική	Gγ -114 C σε T	11-14
Αυστραλιανή	Gγ -114 C σε G	8.6
Αμερικανική-Σαρδινίας	Gγ -175 T σε C	17-30
Τυνησιακή	Gγ -200 + C	18-49
Αμερικανική	Gγ -202 C σε G	15-2
<hr/>		
Τύπος-εθνικότητα	Μετάλλαξη	% HbF σε ετεροζυγώτες
<b>Αγ HPFH</b>		

Αμερικανική	Αγ -114 C σε T	3-6.5
Αμερικανική	Αγ -114 έως -112 έλλειμμα	30-32
Ελληνική	Αγ -117 G σε A	10-20
Κρητική	Αγ -158 C σε T	2.9-5.1
Αμερικανική	Αγ -175 T σε C	36-41
Βραζιλιανή	Αγ -195 C σε G	4.5-7
Κινεζική-Ιταλική	Αγ -196 C σε T	14-21
Αγγλική	Αγ -198 T σε C	3.5-10
Αμερικανική	Αγ -202 C σε T	1.6-3.9

Πολλές από τις μη-ελλειματικές μεταλλάξεις συμβαίνουν σε θέσεις αλληλεπίδρασης με μεταγραφικούς παράγοντες και οδηγούν είτε σε ισχυρότερη σύνδεση του υποκινητή του γ-γονιδίου με ένα επαγωγικό παράγοντα του ενήλικου σταδίου, που φυσιολογικά συνδέεται με το β-γονίδιο, είτε στην παρεμπόδιση σύνδεσης ενός καταστολέα ο οποίος φυσιολογικά συνδέεται με τον υποκινητή του γ-γονιδίου στην ενήλικη ζωή και προκαλεί την αδρανοποίηση του (Stamatoyannopoulos and Nienhuis 1994). Σαν παράδειγμα μπορούμε να αναφέρουμε την Ελληνική μορφή της Αγ-HPFH η οποία περιέχει μία μετάλλαξη από γουανίνη (G) σε αδενίνη (A) στη θέση -117 από την θέση έναρξης της μεταγραφής. Η μετάλλαξη αυτή ελαττώνει κατά οκτώ φορές την ικανότητα σύνδεσης του ερυθροποιητικού παράγοντα GATA-1 (Gumucio *et al.*, 1988). Στην αντίθετη περίπτωση της Ιταλικής Gγ-HPFH μια μετάλλαξη από θυμίνη (T) σε κυτοσίνη (C) στη θέση -175, αυξάνει κατά 40 φορές την έκφραση του γ-γονιδίου σε ενήλικα ερυθροκύτταρα. Πειράματα διαμόλυνσης έχουν αποδείξει ότι αυτό οφείλεται κυρίως στην σύνδεση του παράγοντα GATA-1 (Ottolenghi *et al.*, 1988; Montum *et al.*, 1993). Πειράματα που αποδεικνύουν ότι οι σημειακές μεταλλάξεις στον υποκινητή του γ-γονιδίου συνοδεύονται από φαινότυπο HPFH, έχουν γίνει και *in vivo*, χρησιμοποιώντας διαγονιδιακά ποντίκια και αναφέρονται αργότερα. Οι σημειακές μεταλλάξεις που παρουσιάζουν φαινότυπο Gγ HPFH ή Αγ HPFH συνοψίζονται στον Πίνακα 3.

### Ελλειματικές μεταλλάξεις HPFH και δβ-θαλασσαιμίας

Όπως αναφέρθη προηγουμένως ένα μοναδικό στοιχείο στον άνθρωπο είναι η μεγάλη διαθεσιμότητα πολυάριθμων μεταλλάξεων στο σύμπλεγμα της β-σφαιρίνης (Πίνακας 4). Η ετερογένεια των σημείων αποκοπής των διαφόρων ελλειμάτων και κυρίως αυτών που συνοδεύονται με φαινότυπο HPFH και δβ-θαλασσαιμία, υποδηλώνει ότι ένας αριθμός διαφόρων ρυθμιστικών *cis*-αλληλουχιών κατανέμονται κατά μήκος του συμπλέγματος. Αρκετές υποθέσεις έχουν προταθεί για να εξηγήσουν γιατί στην HPFH η έλλειψη των δ- και β-γονιδίων συνδέεται με αύξηση στην HbF με κατανομή σε όλα τα ερυθροκύτταρα, ενώ στην δβ-θαλασσαιμία παρατηρούνται χαμηλότερα επίπεδα HbF με ετεροκυτταρική κατανομή.

**Σχήμα 6.** Οι δύο υποθέσεις που έχουν διατυπωθεί για να εξηγήσουν την διαταραχή της μεταστροφής της αιμοσφαιρίνης.

Δύο από τις υποθέσεις (Σχήμα 6) που έχουν διατυπωθεί για να εξηγήσουν αυτούς τους φαινότυπους περιλαμβάνουν την δυνητική διαμετάθεση ενισχυτών από το 3' άκρο του συμπλέγματος προς τα γ-γονίδια (Feingold and Forget 1989) ή/και την αφαίρεση δυνητικών αποσιωπητών στην περιοχή μεταξύ των Αγ και δ γονιδίων (Huisman *et al.*, 1974). Οι μηχανισμοί των δύο αυτών υποθέσεων είναι δυνατόν να ισχύουν συγχρόνως.

Αρκετές από αυτές της μεταλλάξεις μελετήθηκαν κατά την διάρκεια της διατριβής με σκοπό την ανίχνευση νέων *cis*-ρυθμιστικών αλληλουχιών δεδομένου ότι παίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην μεταστροφή της αιμοσφαιρίνης.

**Σχήμα 7.** Μεταλλάξεις τύπου HPFH και δβ-θαλασσαιμίας. Τα σκούρα κουτιά απεικονίζουν το σημείο αποκοπής και μέγεθος του ελλείμματος.

Οι ελλειμματικές μεταλλάξεις τύπου **HPFH** έχουν βρεθεί σε άτομα με Αφρικανική, Ασιατική καθώς και Ευρωπαϊκή καταγωγή. Οι μεταλλάξεις αυτές χαρακτηρίζονται από την έλλειψη έκφρασης των δ και β-γονιδίων *cis* του ελλείματος HPFH. Οι ετεροζυγώτες εμφανίζουν 14-30% Hb F με πανκυτταρική κατανομή και κλινικά είναι φυσιολογικοί. Συνολικά επτά HPFH μεταλλάξεις έχουν περιγραφεί και παρουσιάζονται στο Σχήμα 7. Οι περισσότερες μελετήθηκαν κατά την διάρκεια της διατριβής και αναφέρονται στα αποτελέσματα.

Οι ελλειμματικές μεταλλάξεις τύπου **(δβ)<sup>ο</sup>** θαλασσαιμίας εμφανίζονται κυρίως σε Μεσογειακούς πληθυσμούς όπου οι ετεροζυγώτες εμφανίζουν 2-15 % Hb F με ετεροκυτταρική κατανομή. Παρουσιάζουν ήπια αναιμία καθώς και ελαφρές αλλοιώσεις στη μορφολογία των ερυθροκυττάρων. Επίσης υπάρχει και έλλειψη έκφρασης των δ και β-γονιδίων *cis* του ελλείματος στην ενήλικη ζωή. Τρεις μεταλλάξεις τύπου **(δβ)<sup>ο</sup>** θαλασσαιμίας μελετήθηκαν και συγκρίθηκαν με τις HPFH για την ανίχνευση νέων *cis*-ρυθμιστικών και αναφέρονται στα αποτελέσματα (Σχήμα 7).

Οι ελλειμματικές μεταλλάξεις τύπου **(Αγδβ)<sup>ο</sup>** θαλασσαιμίας έχουν τεκμηριωθεί σε διάφορες εθνικότητες. Οι ετεροζυγώτες παράγουν 6-23% Hb F ενώ οι ομοζυγώτες παράγουν Hb F που αποτελείται μόνο από Gγ αλυσίδες. Δύο μεταλλάξεις τύπου **(Αγδβ)<sup>ο</sup>** θαλασσαιμίας μελετήθηκαν στη παρούσα Διατριβή και αναφέρονται στα αποτελέσματα (Σχήμα 8).

Οι ελλειμματικές μεταλλάξεις τύπου **(εγδβ)<sup>ο</sup>** θαλασσαιμίας αφαιρούν όλα τα γονίδια από το σύμπλεγμα της β-σφαιρίνης και επομένως χαρακτηρίζονται από την έλλειψη παραγωγής των ε,γ,δ και β αλυσίδων.

**Σχήμα 8.** Ελλειμματικές μεταλλάξεις τύπου (γδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας.

Οι ελλειμματικές μεταλλάξεις τύπου (β)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας αφαιρούν ολόκληρο ή ένα τμήμα του β-γονιδίου (Cao *et al.*, 1994). Οι μεταλλάξεις που αναφέρονται στον Πίνακα 4 αφορούν μεταλλάξεις που περιλαμβάνουν και τον υποκινητή του β-γονιδίου. Σε όλες τις περιπτώσεις, εκτός από μία, παρατηρείται αύξηση της Hb F που υποστηρίζει τον συναγωνιστικό μηχανισμό μεταξύ των β και γ-γονιδίων, ο οποίος αφορά την αλληλεπίδραση των δύο γονιδίων με την περιοχή LCR και αναφέρεται αργότερα. Περαιτέρω οι μεταλλάξεις (β)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας είναι πολύ πληροφοριακές διότι επιβεβαιώνουν τον ρόλο των δύο αποσιωπητών που εντοπίστηκαν 5' του δ-γονιδίου. Μία μετάλλαξη τύπου (β)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας μελετήθηκε και αναφέρεται μαζί με αυτούς τους δύο νέους αποσιωπητές στα αποτελέσματα (Kosteas *et al.*, 1994).

Τέλος, αναφέρονται και οι ελλειμματικές μεταλλάξεις που αφαιρούν την περιοχή LCR. Οι μεταλλάξεις αυτές ήταν πολύ χρήσιμες για την ανακάλυψη καθώς και για την λειτουργία της περιοχής LCR.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 4.** Ελλειμματικές μεταλλάξεις δβ-θαλασσαιμίας και HPFH (Stamatoyannopoulos and Nienhuis 1994; Rochette *et al.*, 1994).

Τύπος	Εθνικότητα	% HbF σε ετεροζυγότες	
<b>A. HPFH</b>			
HPFH-1	Αμερικανική	20-30	
	HPFH-2	ΓΚΑΝΑ	20-30
HPFH-3	Ινδική	22-23	
HPFH-4	Ιταλική	14-30	
HPFH-5	Σικελική	16-20	
HPFH-6	Ταϊλανδική	17-30	
HPFH-7	Βιετναμική	18-27	
Hb Kenya	Κενυατική	5-15	
<b>B. (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία</b>			
1	Ιαπωνική	5-7	
2	Ισπανική	5-15	
3	Ινδική	5-15	
4	Τουρκική	15	
5	Μακεδονική/Τουρκική	7-14	
6	Αμερικανική	25	
7	Ανατολικής Ευρώπης	13-18	

8	Λαοτινή	11	
9		ΤΑΪΛΑΝΔΙΚΗ	10
10	Μεσογειακή/Σικελική	2-15	
11	Hb Lepore	1-5	
<b>Γ. (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία</b>			
1	Καντονεζική	19-20	
2	Μαλαισιανή (1)	άγνωστο	
3	Μαλαισιανή (2)	άγνωστο	
4	Κινεζική	9-20	
5	Κινεζική (Yunnanese)	9-17	
6	Γερμανική	10-13	
7	Βελγική	14-15	
9	Ιταλική		
10	Τουρκική	10-14	11
Αμερικανική	6-21		
12	Ινδική	10-18	
<b>Δ. (εγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία</b>			
1	Μεξικανική		
2	Σκωτική/Ιρλανδική		
3	Γιουγκοσλαβική		
4	Καναδική		
5	Ιρλανδική		
6	Ολλανδική		
<b>Ε. (β)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία</b>			
0.3 kb	Τουρκική/Βουλγαρική	2.7-3.3	
0.5 kb	Αφρικανική-Αμερικανική	0.2	
1.6 kb	Κροατική	5.8-8.5	
1.4 kb	Αφρικανική-Αμερικανική	1.8-7.1	
3.5 kb	Ταϊλανδική	4.5	
4.2 kb	Τσεχική	3.3-5.7	
7.6 kb	Τουρκική	1.0-1.9	
10.3 kb	Ινδική	3.2-4.7	
12.0 kb	Αυστραλιανή	2.5-7.2	
12.6 kb	Ολλανδική	4.1-10.9	
27.0 kb	Ασιατική	4.1-23.8	
45.0 kb	Φιλιππινεζική	3.8-9.1	
67.0 kb	Ιταλική	9.0	
<b>Ζ. Μεταλλάξεις στην περιοχή LCR</b>			
HS 1 έως 5	Ολλανδική		
HS 1 έως 5	Αγγλο-Σαξωνική		
HS 1 έως 5	Αγγλική		
HS 2 έως 5	Ισπανική		

---



## Ρύθμιση των γονιδίων της σφαιρίνης

Τα γονίδια της σφαιρίνης είναι σχετικώς μικρά και αποτελούνται από τρία εξόνια και δύο ιντρόνια υποδηλώνοντας ότι έχουν προέλθει από ένα κοινό προγονικό γονίδιο (Efstratiadis *et al.*, 1980). Τα εξόνια κωδικοποιούν για 141 και 146 αμινοξέα στο μόριο της α- και β-σφαιρίνης αντίστοιχα, ενώ τα ιντρόνια αποτελούνται από 117 έως 1,264 bp (Stamatoyannopoulos and Nienhuis 1994). Οι συντηρημένες αλληλουχίες που είναι απαραίτητες για την λειτουργία των γονιδίων βρίσκονται μέσα και δίπλα από τα γονίδια της σφαιρίνης. Οι αλληλουχίες αυτές βρίσκονται μέσα στην περιοχή του υποκινητή, στα σημεία μετάπτωσης μεταξύ εξονίων και ιντρονίων, καθώς και στο 3' άκρο της mRNA αλληλουχίας (Karlson and Nienhuis 1985).

Η ιστική και αναπτυξιακή εξειδίκευση των γονιδίων της σφαιρίνης επιτυγχάνεται μέσω της αλληλεπίδρασης μεταγραφικών παραγόντων με *cis*-ρυθμιστικές αλληλουχίες κοντά στα γονίδια καθώς και με της περιοχές LCR και HS-40 που είναι σημαντικές για τη ρύθμιση όλων των γονιδίων του συμπλέγματος. Οι μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν τα γονίδια της σφαιρίνης έχουν ιστική ή μη ιστική εξειδίκευση αναλόγως την έκφραση τους. Προς το παρόν μόνο ένας μικρός αριθμός παραγόντων έχει μελετηθεί εκτεταμένα όσον αφορά τον ρόλο τους στη μεταγραφή των γονιδίων της σφαιρίνης. Επιπλέον, υπάρχουν παράγοντες που επηρεάζουν την μεταγραφή των γονιδίων μέσω της συμμετοχής τους στην διαφοροποίηση των κυττάρων του αιμοποιητικού συστήματος (Sieweke and Graf 1998). Η ανίχνευση δυνητικών θέσεων δέσμευσης από διάφορους παράγοντες σε *cis*-ρυθμιστικές αλληλουχίες γίνεται με την χρήση διαφόρων προγραμμάτων όπως το TRANSFAC από το διαδίκτυο στην διεύθυνση (<http://www.transfac.gdf.de>). Μερικοί από αυτούς τους παράγοντες που έχουν μελετηθεί όσο αφορά την ρύθμιση των γονιδίων της σφαιρίνης αναφέρονται παρακάτω.

### Ερυθροποιητικοί παράγοντες στη ρύθμιση των γονιδίων της σφαιρίνης

**GATA-1.** Ο παράγοντας GATA-1 ήταν ο πρώτος που εντοπίστηκε από μία οικογένεια παραγόντων που προσδέονται στη συμβατική αλληλουχία σύνδεσης WGATAR (όπου W=A ή T και R= A ή G) (Orkin 1992). Προς το παρόν, άλλα πέντε GATA γονίδια (GATA-2 έως 6) έχουν εντοπιστεί βάση της ομολογίας τους στις δομές των δακτύλων ψευδαργύρου με την GATA-1. Από αυτά μόνο η GATA-2 και GATA-3 εκφράζονται στο αιμοποιητικό σύστημα καθώς και σε πολλούς άλλους ιστούς (Leonard *et al.*, 1993; Koutsourakis *et al.*, 1999). Οι παράγοντες GATA-4, GATA-5 και GATA-6 εκφράζονται κυρίως στην καρδιά και στο έντερο (Laverriere *et al.*, 1994). Οι πρώτες θέσεις δέσμευσης του παράγοντα GATA-1 εντοπίστηκαν στους υποκινητές των β-γονιδίων στο κοτόπουλο (Evans *et al.*, 1988) καθώς και σε μία σειρά από επαναλαμβανόμενες GATA-1 θέσεις μέσα στον ενισχυτή που εντοπίζεται 3' του β-γονιδίου (Wall *et al.*, 1988). Αρχικά πειράματα σε μία μη ελλειμματική μετάλλαξη τύπου HPFH έδειξαν ότι ο παράγοντας GATA-1 είναι απαραίτητος για την υπερέκφραση του γ-γονιδίου (Martin *et al.*, 1989). Αναλυτικότερες μελέτες απέδειξαν την συμμετοχή του παράγοντα GATA-1 στην ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων της σφαιρίνης (Orkin 1992). Πολλαπλές θέσεις δέσμευσης GATA-1 έχουν εντοπιστεί στο σύμπλεγμα της α- και β-σφαιρίνης καθώς και σε πολλά άλλα γονίδια. Θέσεις δέσμευσης GATA-1 υπάρχουν στα περισσότερα ρυθμιστικά στοιχεία των γονιδίων της σφαιρίνης που έχουν εντοπισθεί. Αρχικά θεωρήθηκε ότι η πρωτεΐνη GATA-1 είχε ερυθροποιητική εξειδίκευση, αλλά αργότερα απεδείχθη ότι συμμετέχει και στη διαφοροποίηση κυττάρων του αιμοποιητικού συστήματος όπως τα μαστοκύτταρα και τα μεγακαρυοκύτταρα (Martin *et al.*, 1990, Romeo *et al.*, 1990, Mouthon *et al.*, 1993) καθώς και στα κύτταρα Sertoli στους όρχεις ποντικού (Ito *et al.*, 1993). Στις ερυθροειδικές αλληλουχίες, η συμβατική αλληλουχία σύνδεσης της GATA συνοδεύεται από μία περιοχή πλούσια σε γουανίνη (Philipsen *et al.*, 1990) υποδηλώνοντας ότι η ερυθροποιητική εξειδίκευση της GATA-1 σχετίζεται με τις πρωτεΐνες της οικογένειας Krüppel όπως την SPI και την EKLF (Merika *et al.*, 1995). Η οικογένεια GATA-1 χαρακτηρίζεται από δύο δομές δακτύλων ψευδαργύρου, οι οποίες πραγματοποιούν επαφή με την μεγάλη αύλακα της έλικας του DNA (Omichinski *et*

*al.*, 1993). Το καρβοξυλικό άκρο της πρωτεΐνης είναι απαραίτητο για τη δέσμευση της αλληλουχίας GATA η οποία σταθεροποιείται από το N-τελικό άκρο του δακτύλου της πρωτεΐνης (Whyatt *et al.*, 1993).

**Η GATA-1 ανιχνεύτηκε ως μεταγραφικός παράγοντας με βάση την μεταγραφική ενεργοποίηση ενός ελάχιστου υποκινητή σε μη-ερυθροποιητικά κύτταρα, δεδομένου ότι περιείχε το N-τελικό και C-τελικό άκρο δακτύλων ψευδαργύρου (Evans *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 1992). Όλοι οι GATA παράγοντες έχουν αποδειχθεί *in vitro* ότι δρουν σαν μεταγραφικοί ενεργοποιητές, κυρίως όμως οι GATA-1 και GATA-4 (Orkin 1992). Πολλά άλλα *in vivo* και *in vitro* πειράματα έχουν δείξει μεταξύ άλλων ότι η GATA-1 είναι απαραίτητη για την ερυθροποιητική διαφοροποίηση (Pevny *et al.*, 1991; Pevny *et al.*, 1995). Η GATA-2 είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, αλλά όχι για την τελική διαφοροποίηση των ερυθροκυττάρων (Tsai *et al.*, 1994). Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι η GATA-2 δεν συνδέεται άμεσα με την έκφραση των γονιδίων της σφαιρίνης. Η αδρανοποίηση της GATA-3 οδηγεί σε αιμοποιητικές ανωμαλίες (Pandolfi *et al.*, 1995) αλλά δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι συμμετέχει στην ρύθμιση των γονιδίων της σφαιρίνης. Κάθε GATA θέση έχει κάποια ειδική λειτουργία παρόλο που όλοι οι παράγοντες GATA προσδένονται στην ίδια συμβατική αλληλουχία. Μέχρι στιγμής παραμένει ασαφές το πώς επιτυγχάνεται αυτή η ειδικότητα και εάν οι GATA παράγοντες μπορούν λειτουργικά να αναπληρώνουν ο ένας τον άλλο. Μελέτες πραγματοποιούνται σε διαγονιδιακά ποντίκια για να απαντήσουν σε αυτό το ερώτημα (Rottier *et al.*, 2000; Shimizu *et al.*, 2000).**

**FOG. Διάφορες λειτουργικές μελέτες έδειξαν ότι η GATA-1 χρειάζεται κάποιο συνπαράγοντα για την μεταγραφική ρύθμιση ορισμένων γονιδίων κατά την διάρκεια της διαφοροποίησης των ερυθροκυττάρων και των μεγακαρυοκυττάρων. Χρησιμοποιώντας το σύστημα δύο υβριδίων στη ζύμη (yeast two-hybrid system) ανιχνεύτηκε η πρωτεΐνη FOG (Friend of GATA-1) η οποία συνεκφράζεται μαζί με την GATA-1 κατά την διάρκεια της ανάπτυξης στο εμβρυϊκό ήπαρ (Tsang *et al.*, 1997). Αναλυτικές μελέτες έχουν δείξει ότι η αλληλεπίδραση της GATA-1 με την FOG-1 είναι απαραίτητη για την διαφοροποίηση των ερυθροκυττάρων (Crispino *et al.*, 1999). Η αδρανοποίηση της FOG *in vivo* όπως και με την GATA-1 εμφανίζει τον ίδιο θανατηφόρο φαινότυπο με αναιμία στο όψιμο εμβρυϊκό στάδιο της αιμοποίησης (Tsang *et al.*, 1998). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η FOG-1 έχει και την ικανότητα καταστολής των GATA παραγόντων (Deconinck *et al.*, 2000). Ένας δεύτερος FOG παράγοντας, ο FOG-2 έχει ανιχνευθεί και εκφράζεται κυρίως στην καρδιά και τον εγκέφαλο.**

**Λειτουργικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο FOG-2 έχει την ικανότητα να λειτουργεί είτε ως ενεργοποιητής είτε ως καταστολέας (Lu *et al.*, 1999).**

**NUCLEAR FACTOR-ERYTHROID 2 (NF-E2).** Ο παράγοντας NF-E2 προσδένεται στη συμβατική αλληλουχία σύνδεσης YGCTGASTCAY (όπου Y=T/C και S=T/C) η οποία αναφέρεται και ως Maf recognition element ή MARE (Motahashi *et al.*, 1997). Ο NF-E2 (αρχική ονομασία NF-E1) ήταν ο δεύτερος παράγοντας που ανιχνεύτηκε από πειράματα κινητικότητας και αποτύπωσης *in vitro* μετά από την GATA-1. Αρχικά θεωρήθηκε ότι η πρωτεΐνη NF-E2 είχε ερυθροποιητική εξειδίκευση, αλλά αργότερα βρέθηκε ότι εκφράζεται και σε άλλα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος. Εντοπίστηκε μέσω της αλληλεπίδρασης της με τον παράγοντα AP-1 (Mignotte *et al.*, 1989a; Mignotte *et al.*, 1989b) και προσήλκυσε το ενδιαφέρον των ερευνητών μετά την απόδειξη ότι αλληλεπιδρά με την HS2 θέση στην περιοχή LCR (Ney *et al.*, 1990a; Ney *et al.*, 1990b). Η ενεργοποίηση της LCR μέσω του NF-E2 απαιτεί και τον συνενεργοποιητή CBP/p300 (Forsberg *et al.*, 1999). Μεταλλάξεις στις θέσεις NF-E2 και GATA-1 έχουν δείξει ότι αυτοί οι παράγοντες είναι απαραίτητοι για την δημιουργία της HS2 θέσης (Pomerantz *et al.*, 1998). Η πρωτεΐνη NF-E2 εκφράζεται στα ερυθροκύτταρα, μαστοκύτταρα καθώς και στα μεγακαρυοκύτταρα (Andrews *et al.*, 1993; Ney *et al.*, 1993). Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει την απευθείας αλληλεπίδραση του παράγοντα NF-E2 με την HS2 μέσα σε λειτουργικά κύτταρα (Forsberg *et al.*, 1999; Forsberg *et al.*, 2000). Η αλληλουχία σύνδεσης της AP-1 σε αυτή την περιοχή είναι κυρίως υπεύθυνη για την δράση της HS2 που λειτουργεί ως ισχυρός ενισχυτής τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Η HS2 περιέχει δύο συνεχόμενες NF-E2/MARE θέσεις πάνω στις οποίες προσδένεται και ο παράγοντας Bach1. Σε πειράματα διαμόλυνσης ερυθροποιητικών κυττάρων έχει αποδειχθεί ότι ο Bach1 έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί την μεταγραφή μέσω των NF-E2/MAREs θέσεων αλλά ο ρόλος του στην ερυθροποίηση παραμένει αδιευκρίνιστος (Oyake *et al.*, 1996). Ο Bach1 έχει επίσης την ικανότητα να

δημιουργεί αγκύλη πάνω στο DNA που προσδένεται, υποδηλώνοντας ότι ενδεχομένως να συμμετέχει στο μηχανισμό λειτουργίας της LCR όπως αναφέρεται αργότερα (Yoshida *et al.*, 1999; Forsberg *et al.*, 2000).

**EKLF.** Ο ερυθροποιητικός παράγοντας EKLF (erythroid Krüppel-like factor) είναι παρόμοιος με τον παράγοντα Krüppel της *Drosophila melanogaster* και μέλος της SP1 οικογένειας πρωτεϊνών με δομές δακτύλων ψευδαργύρου. Ο EKLF συνδέεται στις συμβατικές αλληλουχίες NCNCNCCCN καθώς και με την αλληλουχία CCACACCCCT που βρίσκεται μέσα στον υποκινητή του β-γονιδίου. Η ειδική σύνδεση του παράγοντα EKLF με το κουτί CACC (ή GT) του υποκινητή του β-γονιδίου (CCA-CAC-CCT) αλλά όχι με το κουτί CACC του γ-γονιδίου (CTC-CAC-CCA) επηρεάζεται από την διευθέτηση καθώς και από άλλα στοιχεία του υποκινητή (Asano *et al.*, 1998). Σημειακές μεταλλάξεις στο κουτί CACC οδηγούν σε μείωση της έκφρασης του β-γονιδίου *in cis* σε ασθενείς με β-θαλασσαιμία, υποδηλώνοντας ότι ο EKLF είναι σημαντικός ενεργοποιητής του β-γονιδίου (Orkin *et al.*, 1984; Feng *et al.*, 1994). Η ειδική σύνδεση του EKLF με το κουτί CACC έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον αρκετών εργαστηρίων που ασχολούνται με την ρύθμιση των γονιδίων της σφαιρίνης. Ένας προτεινόμενος μηχανισμός, αναφέρει ότι παρουσία του EKLF το β-γονίδιο συναγωνίζεται καλύτερα το γ-γονίδιο για την αλληλεπίδραση του με την περιοχή LCR (Wijgerde *et al.*, 1996; Perkins *et al.*, 1996). Μία διαφορά μεταξύ των δύο υποκινητών είναι και η επαναληπτική αλληλουχία CCTTG που υπάρχει στον υποκινητή του γ αλλά λείπει από τον υποκινητή του β-γονιδίου. Η εισαγωγή της επαναληπτικής αλληλουχίας CCTTG στον υποκινητή του β-γονιδίου μειώνει την σύνδεση του EKLF καθώς και την δράση του υποκινητή, υποδηλώνοντας ότι η επαναληπτική αλληλουχία λειτουργεί ως αποσιωπητής (Lee *et al.*, 2000). Μέχρι στιγμής ο EKLF είναι ο πιο περιορισμένος παράγοντας ως προς την έκφραση του. Εκφράζεται σε αρχέγονα ερυθροποιητικά κύτταρα αλλά μόνο το β-γονίδιο της σφαιρίνης επηρεάζεται από την σύνδεση του. Αντιθέτως, οι υποκινητές των ε και γ-γονιδίων δεν εξαρτώνται από τον EKLF για την έκφρασή τους. Η άποψη αυτή επιβεβαιώθηκε και από πειράματα αδρανισμού του γονιδίου (knock-out). Τα EKLF<sup>-/-</sup> διαγονιδιακά ποντίκια πεθαίνουν *in utero* στο όψιμο εμβρυϊκό στάδιο λόγω απουσίας έκφρασης των β<sup>maj</sup> και β<sup>min</sup> γονιδίων (Nuez *et al.*, 1995; Perkins *et al.*, 1995; Perkins *et al.*, 2000). Σε EKLF<sup>+/-</sup> ποντίκια, η χαμηλότερη συγκέντρωση του EKLF οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του γ έναντι του β-γονιδίου. Δεδομένο ότι η έκφραση του γ-γονιδίου δεν επηρεάζεται άμεσα από τον EKLF, τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η αύξηση έκφρασης του γ-γονιδίου είναι αποτέλεσμα της μεγαλύτερης διαθεσιμότητας της LCR λόγω του μειωμένου χρόνου που αλληλεπιδρά με το β-γονίδιο. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν την άποψη ότι υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ των γ και β-γονιδίων για την αλληλεπίδραση τους με την περιοχή LCR. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η αφαίρεση της περιοχής γCACCC είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση του β-γονιδίου στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης ενισχύοντας περαιτέρω την ιδέα ότι υπάρχει ανταγωνισμός (Ryan *et al.*, 2000). Άλλα δεδομένα αποδεικνύουν ότι ο EKLF πιθανώς να ενεργοποιεί την περιοχή LCR (Wijgerde *et al.*, 1996) με το να προσδένεται εντός της HS3 σε μία περιοχή πλούσια σε γουανίνη (GT) (Gillemans *et al.*, 1998; Tewari *et al.*, 1998) η οποία είναι ικανή να διαμορφώνει κατάλληλα τη δομή της χρωματίνης (Ellis *et al.*, 1996). Η αλλαγή στην συγκέντρωση του παράγοντα EKLF έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει την διαμόρφωση της χρωματίνης καθώς και τον αριθμό κυττάρων που ενεργοποιούν το σύμπλεγμα, άμεσα αποδεικνύοντας ότι η περιοχή LCR ενεργοποιεί το σύμπλεγμα (Grosveld 1999; McMorrow *et al.*, 2000).

Έχει επίσης αναφερθεί ότι ο EKLF καθώς η GATA-1 και η Sp1 αλληλεπιδρούν με τα μέλη της οικογένειας SWI/SNF πρωτεϊνών και δημιουργείται το σύμπλεγμα EKLF coactivator-remodeling complex 1 (E-RC1). Το σύμπλεγμα E-RC1 οδηγεί στην διαμόρφωση ανοικτής δομής χρωματίνης στην περιοχή του υποκινητή του β-γονιδίου (Armstrong *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999) η οποία είναι απαραίτητη για την μεταγραφή του (Kadam *et al.*, 2000; Bieker *et al.*, 2000).

**YY1.** Ο παράγοντας YY1 (Ying Yang-1) ανήκει στην GL1-Krüppel οικογένεια πρωτεϊνών και ονομάστηκε έτσι γιατί έχει την ικανότητα να δρα είτε σαν μεταγραφικός ενεργοποιητής είτε ως καταστολέας σε γονίδια του ανθρώπου, του ποντικού και του σακχαρομύκητα. (Park *et al.*, 1991; Shi *et al.*, 1991; Shrivastava *et al.*, 1994; Bushmeyer *et al.*, 1995; Hyde-DeRuyscher *et al.*, 1995). Χρειάστηκαν πολλά πειράματα ώστε να προσδιορισθεί η συμβατική αλληλουχία σύνδεσης του παράγοντα YY1 (VDCCATNWy) η οποία έχει διατηρηθεί κατά την διάρκεια της εξέλιξης στο σύμπλεγμα της β-σφαιρίνης (Hyde-DeRuyscher *et al.*, 1995; Yant *et al.*, 1995). Αρκετοί παράγοντες έχουν χαρακτηριστεί ως κατασταλτικοί και συμμετέχουν στη αποσιώπηση των πρώιμων εμβρυϊκών και όψιμων εμβρυϊκών γονιδίων. Σαν παράδειγμα μπορούμε να

αναφέρουμε τον αποσιωπητή του ε-γονιδίου (βλ. παρακάτω) πάνω στον οποίο συνδέεται ο πανταχού (ubiquitous) εκφραζόμενος παράγοντας YY1 (γνωστός και ως NF-E1, δ ή UCRBP) καθώς και ο παράγοντας GATA-1. (Raich *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1997; Wada-Kiyama *et al.*, 1992; Peters *et al.*, 1993). Αρκετά πειράματα αναφέρουν ότι ο YY1 συνεργάζεται με άλλους παράγοντες όπως την GATA-1 και τον Sp1 (Lee *et al.*, 1993). Μέσα στο σύμπλεγμα της β-σφαιρίνης (73 kb) έχουν εντοπιστεί 179 δυνητικές θέσεις σύνδεσης του παράγοντα YY1. (Yant *et al.*, 1995) Τρεις νέες ισχυρές θέσεις σύνδεσης εντοπίστηκαν (Soultanas *et al.*, 1996) κατά την διάρκεια της Διατριβής μέσα στον αποσιωπητή F που εδράζεται 1.6 kb 3' του Αγ-γονιδίου και αναφέρεται αργότερα (Kosteas *et al.*, 1993; Kosteas *et al.*, 1994). Ο ρόλος του παράγοντα YY1 και των υπολοίπων θα αναφερθούν παρακάτω ως προς την συμμετοχή τους στην έκφραση των γονιδίων της σφαιρίνης.

### Μεταγραφικοί παράγοντες των επιμέρους γονιδίων της σφαιρίνης

Κάθε γονίδιο της σφαιρίνης περιέχει ρυθμιστικά στοιχεία όπως τον υποκινητή, ενισχυτές ή/και αποσιωπητές που είναι σημαντικά για την αναπτυξιακή του ρύθμιση. Τα στοιχεία αυτά αλληλεπιδρούν με τη περιοχή LCR της β-σφαιρίνης καθώς και με τη ρυθμιστική περιοχή HS-40 του α-συμπλέγματος ώστε να προσδίδουν υψηλό επίπεδο έκφρασης των γονιδίων. Όπως προαναφέρθηκε, κάθε ρυθμιστικό στοιχείο περιέχει πολλαπλές θέσεις δέσμησης για διάφορους ερυθροποιητικούς ή μη-ερυθροποιητικούς παράγοντες που δρουν ως ενεργοποιητές ή καταστολείς της μεταγραφής. Οι παράγοντες αυτοί αλληλεπιδρούν και συνδέονται μεταξύ τους, με τον TFIIID καθώς και με άλλους βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες, όπου μετά από την πρόσδεση τους στο κουτί TATA του υποκινητή συναρμολογούν το μεταγραφικό σύμπλοκο το οποίο αλλάζει τη δομή της χρωματίνης και οδηγεί στην έναρξη της μεταγραφής (Lewin 1990; Alberts *et al.*, 2000).

**Το πρώιμο εμβρυϊκό ε-γονίδιο της β-σφαιρίνης.** Ο υποκινητής του ε-γονιδίου περιέχει ένα ποικίλο αριθμό θέσεων δέσμησης για διάφορους ερυθροποιητικούς ή μη-ερυθροποιητικούς παράγοντες οι οποίοι μαζί με την περιοχή LCR είναι υπεύθυνοι για την ιστική του έκφραση. Το κουτί TATA βρίσκεται 30 bp ανοδικά από το σημείο έναρξης της μεταγραφής και ακολουθείται από τα κουτιά CAAT και CACCC περίπου 70 και 110 bp αντίστοιχα από το σημείο έναρξης της μεταγραφής. Πειράματα διαμόλυνσης έδειξαν ότι τα στοιχεία αυτά μαζί με τις θέσεις GATA του υποκινητή είναι απαραίτητες για την έκφραση του ε-γονιδίου (Gong *et al.*, 1991; 1993. Walters *et al.*, 1992). Ωστόσο, δεν είναι γνωστό ποιοί παράγοντες αλληλεπιδρούν με αυτές της αλληλουχίες *in vivo*.

**Σχήμα 9.** Ο υποκινητής του ε-γονιδίου με τα συντηρημένα κουτιά (TATA, CAAT, CACCC) και τις θέσεις δέσμησης για διάφορους παράγοντες.

Είναι γνωστό ότι το κουτί CACC είναι απαραίτητο για την έκφραση του γονιδίου (Yu *et al.*, 1991; Motmed *et al.*, 1993) όπου και προσδέεται ο παράγων SP1. Η απουσία του Sp1 σε ποντίκια Sp1<sup>-/-</sup> βρέθηκε ότι ελάχιστα μειώνει την έκφραση του ε-γονιδίου (Marin *et al.*, 1997). Επομένως, είτε κάποιος άλλος

παράγοντας είναι υπεύθυνος για την φυσιολογική έκφραση του ε-γονιδίου ή υπάρχουν πολλαπλοί παράγοντες που φυσιολογικά προσδένονται στο κουτί CACCC και αναπληρώνουν τον SP1.

Στο κουτί CACCC του ε-γονιδίου συνδέεται και ο πανταχού εκφραζόμενος παράγοντας CP1 ή NF-Y/CBF (Liberati *et al.*, 1998) όπως επίσης ονομάζεται. Μετάλλαξη της θέσης CACCC οδηγεί σε σημαντική μείωση της έκφρασης του ε-γονιδίου στα εμβρυϊκά ερυθροκύτταρα διαγονιδιακών ποντικών, υποδηλώνοντας ότι ο CP1 ενεργοποιεί την έκφραση του ε-γονιδίου. (Filipe *et al.*, 1999). Στην περιοχή του κουτιού CACCC στα ε και γ-γονίδια, συνδέεται και ο παράγοντας NF-E3 όπου σε *in vivo* πειράματα λειτουργεί ως καταστολέας. Πρόσφατα έχει αποδειχθεί ότι ο COUP-TF που είναι υποδοχέας μιας πυρηνικής ορμόνης αποτελεί μέρος του παράγοντα NF-E3. Μετάλλαξη σε μία από της δύο COUP-TF θέσεις στην περιοχή του ε-υποκινητή οδηγεί στην επανενεργοποίηση της έκφρασης του ε-γονιδίου στα εμβρυϊκά ερυθροκύτταρα διαγονιδιακών ποντικών, υποδηλώνοντας ότι το σύμπλεγμα NF-E3/COUP-TF δρα ως καταστολέας στον υποκινητή του ε-γονιδίου (Filipe *et al.*, 1999; Ronchi *et al.*, 2000).

Ο υποκινητής του ε-γονιδίου περιέχει πολλαπλές θέσεις GATA-1 (Gong *et al.*, 1991) οι οποίες έχουν διαφορετική δράση. Μεταλλάξεις στις θέσεις -163 και -269 μειώνουν την έκφραση του ε-γονιδίου στα εμβρυϊκά κύτταρα διαγονιδιακών ποντικών ενώ μεταλλάξεις στη θέση -208 αποτρέπουν την αποσιώπηση του ε-γονιδίου (Raich *et al.*, 1995). Ενδεχομένως όταν η GATA-1 προσδένεται στη θέση -208 δρα σαν καταστολέας ενώ όταν συνδέεται στη θέση -163 ή -269 δρα ως ενεργοποιητής. Ο μηχανισμός όμως της αδρανοποίησης των GATA-1 θέσεων -163 και -269 είναι πιο περίπλοκη, γιατί δεν οδηγεί σε απώλεια έκφρασης του ε-γονιδίου.

Πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια έχουν δείξει ότι το ε-γονίδιο χρειάζεται την περιοχή LCR για να εκφραστεί (Raich *et al.*, 1990; Lindenbaum and Grosveld 1991; Shih *et al.*, 1990). Η συμμετοχή της LCR προς την ενεργοποίηση του ε-γονιδίου έχει αποδεικτική και σε μελέτες τεχνητών χρωμοσωμάτων του σακχαρομύκητα (YAC), που περιέχουν το σύμπλεγμα των β-γονιδίων του ανθρώπου (βYAC) σε διαγονιδιακά ποντίκια. Η αφαίρεση της HS3 από το βYAC οδηγεί σε απώλεια έκφρασης του ε-γονιδίου σε 9 ημερών ερυθροκύτταρα, επιδεικνύοντας ότι οι κύριες αλληλουχίες της περιοχής HS3 είναι απαραίτητες για αλληλεπίδραση με το ε-γονίδιο και για την ενεργοποίηση της μεταγραφής του. Η έκφραση του ε-γονιδίου περιορίζεται στα κύτταρα του αμνιακού σάκου. Η αναπτυξιακή ρύθμιση του ε-γονιδίου ακόμα απουσίας των γ ή β-γονιδίων είναι αυτόνομη, δηλαδή όλες η απαραίτητες αλληλουχίες για την αποσιώπηση του στο ενήλικο στάδιο περιέχονται στις αλληλουχίες ανοδικά του γονιδίου (Raich *et al.*, 1990; Shih *et al.*, 1990; Shih *et al.*, 1993; Lindenbaum 1990). Ρυθμιστικές αλληλουχίες εκτός από τον αποσιωπητή που μεσολαβούν στη αυτόνομη ρύθμιση του γονιδίου όπως η PRE (positive regulatory element) και η NRE (negative regulatory element) έχουν εντοπιστεί στις περιοχές -3000 (299 Li *et al.*, 1998), μεταξύ -2000 και -460 (300 Li *et al.*, 1998), μεταξύ -460 και -180 (Raich *et al.*, 1990, Wada-Kiyama *et al.*, 1992, Li *et al.*, 1998, Li *et al.*, 1998) καθώς και στην περιοχή του υποκινητή (Baron 1997; Li *et al.*, 1998). Ελλείμματα (Li *et al.*, 1998) ή σημειακές μεταλλάξεις (Raich *et al.*, 1990) στα αρνητικά στοιχεία NRE έχουν ως αποτέλεσμα την ανίχνευση ε-σφαιρίνης στα ενήλικα κύτταρα διαγονιδιακών ποντικών. Ο παράγοντας PREIBF (PREII-binding factor) που συνδέεται στην περιοχή PREII του υποκινητή έχει την ικανότητα να λυγίζει το DNA και ενδεχομένως να συμμετέχει στην ρύθμιση του υποκινητή μέσω του μοντέλου της δημιουργίας αγκύλης (looping) που αναφέρεται αργότερα. (Trepicchio *et al.*, 1993. Dyer *et al.*, 1996; Dyer *et al.*, 1998).

Ο αποσιωπητής του ε-γονιδίου μήκος 215 bp, αρχικά είχε εντοπιστεί στην περιοχή -392 και -177 από το σημείο έναρξης της μεταγραφής. Πειράματα διαμόλυνσης έδειξαν ότι μειώνει την έκφραση του γονιδίου αναφοράς κατά τρεις φορές σε ερυθροποιητικά και κατά δέκα φορές σε μη-ερυθροποιητικά κύτταρα (Cao *et al.*, 1989). Το ίδιο τμήμα χρησιμοποιήθηκε και σαν αλληλουχία αναφοράς για την παρουσία αποσιωπητή σε πειράματα διαμόλυνσης κατά την διάρκεια της Διατριβής και αναφέρεται αργότερα (Kosteas *et al.*, 1993; Kosteas *et al.*, 1994). Ο πρώτος αποσιωπητής που μελετήθηκε σε διαγονιδιακά ποντίκια (Raich *et al.*, 1992) μετά από πειράματα διαμόλυνσης και αποτύπωσης ήταν η περιοχή μεταξύ -467 και -182 bp του ε-γονιδίου που περιέχει τρεις σημαντικές θέσεις δέσμευσης για την καταστολή του ε-γονιδίου: μία GATA-1 στη θέση -208, μία YY1 στη θέση -269 καθώς και ένα μοτίβο CACCC στη θέση -379 (Raich *et al.*, 1995; Gumucio *et al.*, 1993; Peters *et al.*, 1993). Η καταστροφή της θέσης GATA-1 ή YY1 είναι αρκετή ώστε να οδηγήσει σε μειωμένη έκφραση του ε-γονιδίου σε ενήλικα ποντίκια (Raich *et al.*, 1995). Περαιτέρω πειράματα, όπως η μετατόπιση της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (electrophoretic mobility shift assay) και αποτύπωση με

DNaseI (DNaseI footprinting) έδειξαν ότι ο κεντρικός πυρήνας ή το κεντρικό στοιχείο (core element) του αποσιωπητή είναι 44 bp στην περιοχή από -294 έως -251 (Gutman *et al.*, 1992). Η υπερέκφραση της GATA-1 σε διαγονιδιακά ποντίκια έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη έκφραση του ε-γονιδίου, ενώ καμία αλλαγή δεν παρατηρήθηκε στην έκφραση των γ ή β-γονιδίων. (Li *et al.*, 1997). Όπως προαναφέρθηκε, ο παράγοντας YY1 δρα και ως καταστολέας (Park *et al.*, 1991; Shi *et al.*, 1991) αλλά το εύρημα ότι και η GATA-1 μπορεί να έχει κατασταλτικό ρόλο, *in vivo* μετά από την υπέρ έκφραση της ήταν έκπληξη (Li *et al.*, 1997). Πρόσφατα, στο 5' άκρο της περιοχής LCR εντοπίστηκε μία αλληλουχία 40 bp που περιλαμβάνει επτά θέσεις GATA. Πειράματα διαμόλυνσης σε ερυθροποιητικά κύτταρα έδειξαν ότι και αυτή η αλληλουχία GATA λειτουργεί ως αποσιωπητής (Ramchandran *et al.*, 2000). Επομένως, αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες φαίνεται ότι παίζουν ρόλο στη καταστολή του ε-γονιδίου, προφανώς μέσω ανατροπής της αλληλεπίδρασης μεταξύ του υποκινητή και της περιοχής LCR. Ένα θετικό ρυθμιστικό στοιχείο, το ε-*PRE I* πιθανώς να περιλαμβάνεται στην περιοχή του αποσιωπητή (Trepicchio *et al.*, 1993; Baron 1997). Με βάση αυτά τα δεδομένα μία άλλη ομάδα αφαίρεσε μόνο 125 bp από την κατασταλτική περιοχή (-304 έως -179) από το βYAC, ένα γενωμικό κλώνο σε τεχνητά χρωμοσώματα σακχαρομύκητα που περιέχει το σύμπλεγμα της β-σφαιρίνης. Η περιοχή αυτή περιέχει της κατασταλτικές YY1 και GATA-1 θέσεις που προαναφέρθηκαν. Η αφαίρεση αυτής της κατασταλτικής περιοχής δεν οδήγησε όπως αναμενόταν σε συνεχιζόμενη έκφραση του ε-γονιδίου έως το ενήλικο στάδιο, αλλά βρέθηκε να οδηγεί σε σχεδόν ολοκληρωτική μείωση στην έκφραση του ε-γονιδίου, υποδηλώνοντας ότι η περιοχή αυτή περιέχει και στοιχεία σημαντικά για την ενεργοποίηση του ε-γονιδίου (Liu *et al.*, 1997). Η αφαίρεση του αποσιωπητή οδήγησε και σε μειωμένη έκφραση του γ-γονιδίου κάτι που όμως δεν αναμενόταν. Η περιοχή αυτή ενδεχομένως να επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων στο πρώιμο εμβρυϊκό στάδιο. Πρόσφατα έχει προταθεί ότι επιλεκτικές ελλείψεις *cis* στοιχείων παρουσία του β-YAC δεν επαρκούν για να παρατηρήσουμε την δράση ενός ενισχυτή ή καταστολέα που βρίσκεται κοντά σε γονίδιο. Τα στοιχεία αυτά λειτουργούν σε συγκεκριμένο στάδιο της ανάπτυξης και περιορίζονται από την δομή της χρωματίνης (Gribnau *et al.*, 2000). Επομένως, η αφαίρεση του ε-αποσιωπητή παρουσία ολόκληρου του συμπλέγματος δεν παρουσίασε αύξηση στην έκφραση του ε-γονιδίου ενδεχομένως λόγω της χρωμοσωμικής καταστολής του ε-γονιδίου στα ενήλικα κύτταρα.

Πρόσφατα δύο νέοι παράγοντες ο FKLf (embryonic/fetal β-like globin gene-activating Krüppel-like factor) (Asano *et al.*, 1999) και ο FKLf-2 (Asano *et al.*, 2000) της οικογένειας EKLF/SP1 βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν με το CACC κουτί των ε και γ-γονιδίων και να αυξάνουν την έκφραση τους σε πειράματα διαμόλυνσης. Ο FKLf επηρεάζει ελάχιστα άλλους ερυθροποιητικούς υποκινητές υποδηλώνοντας ότι δεν είναι γενικός ενεργοποιητής γονιδίων με το κουτί CACCC. Ο FKLf-2 αυξάνει την έκφραση του γ-γονιδίου και σε μικρότερο βαθμό των ε και β-γονιδίων. Πειράματα αντικατάστασης είναι απαραίτητα ώστε να προσδιορισθεί εάν ο FKLf επηρεάζει την έκφραση του ε-γονιδίου *in vivo*.

**Τα όψιμα εμβρυϊκά γ-γονίδια της β-σφαιρίνης.** Ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών προσδένεται στις πρώτες 300 bp των υποκινητών των γ-γονιδίων. Η ρύθμιση τους παρουσιάζει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον, με δεδομένη την βελτίωση που παρατηρείται από την σύνθεση της HbF σε ασθενείς με β-θαλασσαιμία και δρεπανοκυτταρική αναιμία.

Πολλές σημειακές μεταλλάξεις που προκαλούν φαινότυπο HPFH επισυμβαίνουν στις θέσεις σύνδεσης μεταγραφικών παραγόντων και ως αποτέλεσμα δημιουργούν νέες θέσεις δέσμευσης ή καταστρέφουν ήδη υπάρχοντες (Σχήμα 11) (Fucharoen *et al.*, 1990; Mantovani *et al.*, 1989; Gumucio *et al.*, 1988; Mantovani *et al.*, 1988; McDonagh *et al.*, 1991; Berry *et al.*, 1992). Οι υποκινητές των γ-γονιδίων είναι ομόλογοι στην πρωτοταγής δομή τους. Ο κάθε υποκινητής περιέχει ένα κουτί TATA, ένα διπλασιασμένο κουτί CAAT καθώς και ένα κουτί CACCC.

Η περιοχή μεταξύ των κουτιών CAAT και TATA, περιέχει και μια περιοχή πλούσια σε γουανίνη, πάνω στη οποία συνδέεται ο παράγοντας Sp1, καθώς και η πρωτεΐνη stage selector protein (SSP) (Jane *et al.*, 1992). Ο παράγοντας Sp1 όπως προαναφέρθηκε, πιθανώς να μην είναι λειτουργικά σημαντικός *in vivo* ή να υπάρχουν παράγοντες που τον αναπληρώνουν δεδομένου ότι το γ-γονίδιο εκφράζεται σε Sp1<sup>-/-</sup> διαγονιδιακά ποντίκια (Marin *et al.*, 1993). Ο παράγοντας SSP είχε εντοπισθεί με βάση την ομολογία του με το *cis* στοιχείο SSE (stage selector element) που βρίσκεται στον υποκινητή του β-γονιδίου στο κοτόπουλο (Choi *et al.*, 1988).

Στο ενήλικο στάδιο ο παράγοντας NF-E4 αλληλεπιδρά με τον SSE και δίνει ένα προβάδισμα στον υποκινητή του β-γονιδίου έναντι του ε-γονιδίου για την αλληλεπίδραση του με τον ενισχυτή του β-γονιδίου (Choi *et al.*, 1988). Η αλληλουχία μεταξύ -53 και -34 του γ-υποκινητή είναι συντηρημένη στα είδη που εκφράζουν το γ-γονίδιο στο εμβρυϊκό στάδιο, αλλά αποκλίνει στα είδη που το ομόλογο γ-γονίδιο εκφράζεται στα εμβρυϊκά κύτταρα (Gumucio *et al.*, 1992). Η αλληλουχία αυτή θεωρείται ανάλογη με του κοτόπουλου την SSE πάνω στην οποία προσδένεται ο παράγοντας SSP. Πειράματα διαμόλυνσης υποδηλώνουν ότι ο παράγοντας SSE του γ-γονιδίου είναι παρόμοιος με τον παράγοντα SSE του β-γονιδίου του κοτόπουλου όπου όταν προσδένεται ο SSP στον SSE εξασφαλίζει πλεονέκτημα για τον υποκινητή του γ-γονιδίου έναντι τον υποκινητή του β-γονιδίου (Jane *et al.*, 1992). Πρόσφατα κλωνοποιήθηκε και το ανθρώπινο γονίδιο NF-E4. Πειράματα διαμόλυνσης έδειξαν ότι ο παράγοντας NF-E4 αυξάνει την έκφραση των ε- και γ-γονιδίων κατά 5 έως 10 φορές αντίστοιχα, ενώ καμία επίπτωση δεν παρατηρείται με το β-γονίδιο (Zhou *et al.*, 2000). Η σύνδεση των πρωτεϊνών Sp1 και SSP πάνω στο *cis* στοιχείο SSE φαίνεται ότι έχει αμοιβαία αποκλειστικότητα (Jane *et al.*, 1993). Η ισορροπία αυτού του ανταγωνισμού φαίνεται ότι ρυθμίζεται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης μέσω της μεθυλίωσης των δύο CpG δινουκλεοτιδίων που υπάρχουν μεταξύ -55 και -50 bp της περιοχής αυτής. Αυτά τα δινουκλεοτίδια συχνά είναι μεθυλιωμένα σε ανθρώπινα εμβρυϊκά και ενήλικα κύτταρα, αλλά όχι σε εμβρυϊκά ερυθροποιητικά κύτταρα. Η μεθυλίωση των CpG αλληλουχιών προκαλεί δεκαπλάσια αύξηση στην ενεργότητα σύνδεσης του παράγοντα Sp1, υποδηλώνοντας και σύμφωνα με τα δεδομένα από τις μεταλλάξεις του SSE, ότι ο SSP μπορεί να δρα ως ενεργοποιητής στο εμβρυϊκό στάδιο και πιθανώς να αναπληρώνεται από τον Sp1 ως αποσιωπητής στο ενήλικο στάδιο. Αυτή η επιρροή θα ήταν δευτερεύουσα εφόσον και τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι τα γ-γονίδια αποσιωπούνται πριν την μεθυλίωση (Enver *et al.*, 1988b).

**Σχήμα 10.** Ο υποκινητής του γ-γονιδίου με τα συντηρημένα κουτιά (TATA, CAAT, CACCC) και της θέσεις δέσμευσης για διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες.

Η CAAT displacement protein (CDP) συνδέεται στην ευρύτερη περιοχή περιλαμβανομένων και των κουτιών CAAT, εκτοπίζοντας ανταγωνιστικά τον παράγοντα CPI/ NF-Y. Η CDP δρα ως μεταγραφικός καταστολέας (Skalnik *et al.*, 1991). Με βάση τα αποτελέσματα διαμόλυνσης σε κύτταρα K562, έχει υποδηλωθεί ότι η καταστολή των γ-γονιδίων από βουτυρικό οξύ είναι συνδεδεμένη με την μείωση της CDP (McDonagh *et al.*, 1991b). Άλλα δεδομένα από διαγονιδιακά ποντίκια υποδηλώνουν ότι η επανενεργοποίηση έχει σχέση με το ανώτερο τμήμα του υποκινητή (Pace *et al.*, 1996). Αυτή η αντίφαση αποτελεσμάτων μπορεί να επιλυθεί με την επανενεργοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την CDP και να ελεγχθεί η επίπτωση για καταστολή των γ-γονιδίων σε διαγονιδιακά ποντίκια. Οι παράγοντες NF-E3 και GATA-1 έχουν σχετισθεί με την καταστολή του γ-γονιδίου, δεδομένου ότι η σύνδεση τους μειώνεται στην -117 θέση από G σε A μετάλλαξη στο κουτί CAAT (Gumucio *et al.*, 1988; Mantovani *et al.*, 1988; Roncchi *et al.*, 1995; Berry *et al.*, 1992). Η εισαγωγή νέων μεταλλάξεων που μειώνουν τη σύνδεση είτε της GATA-1 ή της NF-E3 στο κουτί CAAT, οδήγησε είτε σε πολύ μικρή παραμονή της έκφρασης του γ-γονιδίου (μεταλλάξεις NF-E3) στο ενήλικο στάδιο σε διαγονιδιακά ποντίκια είτε σε απουσία παραμονής του γ-γονιδίου (GATA-1) (Ronchi *et al.*, 1996). Ένας τελευταίος παράγοντας είναι ο NF-E6 που προσδένεται στο κουτί CACCC (Berry *et al.*, 1992) και είναι μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών cEBP (Wall *et al.*, 1996; Zafarana *et al.*, 2000) που πιθανώς να δρα ως θετικός ρυθμιστής των γ-γονιδίων.

Μετάλλαξη ή αφαίρεση του κουτιού CACCC οδηγεί σε μικρή μείωση στην έκφραση του  $\gamma$ -γονιδίου στα πρώιμα εμβρυϊκά ερυθροκύτταρα διαγονιδιακών ποντικών, αλλά είναι δραστικά μειωμένη στα όψιμα εμβρυϊκά και ενήλικα ερυθροκύτταρα (Stamatoyannopoulos *et al.* 1993; Duan *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001). Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι αυτή η περιοχή καθώς και η σύνδεση του παράγοντα CP-1 παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην έκφραση του  $\gamma$ -γονιδίου στο εμβρυϊκό στάδιο της τελικής διαφοροποίησης, όπου και επισυμβαίνει η κύρια σύνθεση της αιμοσφαιρίνης στον άνθρωπο. Η αφαίρεση του κουτιού CACCC επηρεάζει και την διαθεσιμότητα του κουτιού CAAT υποδηλώνοντας ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών που συγκεντρώνονται σε αυτά τα δύο ρυθμιστικά στοιχεία ( Duan *et al.*, 2000). *In vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι οι παράγοντες Sp1 και Sp3 συνδέονται με το κουτί CACCC, αλλά δεν φαίνεται ότι επηρεάζουν *in vivo* (Marin *et al.*, 1997). Η BKLF (Basic Krüppel-Like Factor) και η TEF2 μία πρωτεΐνη που συνδέει τον παράγοντα GT-1 είναι ομόλογες (Crossley *et al.*, 1996; Xiao *et al.*, 1987) και εκφράζονται σε αρκετά κύτταρα συμπεριλαμβανόμενων και των ερυθροκυττάρων αλλά δεν υπάρχουν ενδείξεις εάν ο BKLF επηρεάζει την έκφραση του  $\gamma$ -γονιδίου (Perkins *et al.*, 1997). Ο FKLF (Asano *et al.*, 1999) και ο FKLF-2 (Asano *et al.*, 2000) συνδέονται με το κουτί CACCC όπως προαναφέρθηκε αλλά ο ρόλος τους στη ρύθμιση της έκφρασης του  $\gamma$ -γονιδίου *in vivo* ακόμα δεν έχει τεκμηριωθεί .

Η περιοχή ανοδικά του υποκινητή περιέχει επιπλέον θέσεις σύνδεσης για παράγοντες που εντοπίστηκαν μέσω φυσικών μεταλλάξεων με φαινότυπο HPFH. Μια μετάλλαξη από θυμίνη (T) σε κυτοσίνη (C) στη θέση -175 αυξάνει την έκφραση του  $\gamma$ -γονιδίου σε ενήλικα ερυθροκύτταρα (Surrey *et al.*, 1988; Stoming *et al.*, 1989). Η -175 μετάλλαξη μεταβάλλει την αλληλεπίδραση της GATA-1 και αφαιρεί μία θέση δέσμευσης για οκταμερείς πρωτεΐνες *in vitro*. Ο συσχετισμός μεταξύ σύνδεσης και λειτουργίας του υποκινητή είναι δύσκολο να γίνει και υπάρχει η πιθανότητα να συμμετέχει και κάποιος άλλος παράγοντας (McDonagh *et al.*, 1991; Magis *et al.*, 1995).

**Σχήμα 11.** Σημειακές μεταλλάξεις σε μη ελλειμματικές μορφές HPFH και οι θέσεις σύνδεσης διαφόρων *trans* μεταγραφικών παραγόντων (Bollekens and Forget 1991).

Η περιοχή -200 περιέχει αρκετές μεταλλάξεις που αυξάνουν το επίπεδο έκφρασης των  $\gamma$ -γονιδίων. Μερικές από αυτές όπως η -198 T σε C ή -202 C σε G διαμορφώνουν νέες ισχυρότερες θέσεις σύνδεσης για



τους παράγοντες Sp1 και SSP αντίστοιχα (Jane *et al.*, 1993; Ronchi *et al.*, 1989). Η καλύτερη δέσμευση του Sp1 σχετίζεται με αύξηση στην ενεργότητα του υποκινητή (Gumucio *et al.*, 1991) ενώ η νέα SSP θέση μπορεί λειτουργικά να αντικαταστήσει την θέση -50 σε πειράματα διαμόλυνσης σε MEL κύτταρα (Jane *et al.*, 1993). Μια πιθανή εξήγηση για τα αποτελέσματα αυτά, είναι η παρουσία νέων θέσεων που μπορούν εν μέρει να καταβάλουν την καταστολή του  $\gamma$ - υποκινητή στο ενήλικο στάδιο. Μία δεύτερη εξήγηση είναι ότι η μεταλλάξεις αυτές αλλάζουν την διαμόρφωση του DNA. Η περιοχή του υποκινητή είναι ικανή να σχηματίζει μία τριπλή δομή και να αφήνει την περιοχή από -206 έως -217 περιοχή του  $\gamma$ -υποκινητή ως τη μονή δομή (Ulrich *et al.*, 1992). Πιστεύεται ότι αυτή η δομή βρίσκεται πάνω σε θέση δέσμευσης για ένα κατασταλτικό σύμπλεγμα το οποίο μετατοπίζεται από μεταγραφικούς παράγοντες που συνδέονται στις νέες αλληλουχίες που διαμορφώνονται από τις μεταλλάξεις HPFH (Ulrich *et al.*, 1992; Bacolla *et al.*, 1995). Η ύπαρξη αυτού του καταστολέα, υποστηρίζεται και από την μετάλλαξη που προσθέτει μία κυτοσίνη στη θέση -200, που δεν αλλάζει το προφίλ δέσμευσης *in vitro*, αλλά αποσταθεροποιεί την δημιουργία της τριπλής δομής (Pissard *et al.*, 1996). Η δύο αυτές επιπτώσεις, δηλ. η αποτροπή δημιουργίας της τριπλής δομής και η δημιουργία νέων θέσεων δέσμευσης, μπορούν να αλληλεπιδρούν ώστε να αυξάνουν το επίπεδο έκφρασης των  $\gamma$ -γονιδίων. Ακόμα πιο ανωδικά του υποκινητή υπάρχουν αρκετές πιθανές θέσεις δέσμευσης για πρωτεΐνες (Gumucio *et al.*, 1992; Crossley *et al.*, 1996; Ponce *et al.*, 1991). Πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια έχουν αποδείξει τον ρόλο αυτών των περιοχών καθώς έχουν εντοπίσει μία περιοχή που πιθανώς να είναι απαραίτητη για την σωστή καταστολή του γονιδίου (Stamatoyannopoulos *et al.*, 1993). Η περιοχή του υποκινητή περιέχει και πολυμορφισμούς που συσχετίζονται με την παραμονή έκφρασης του  $\gamma$ -γονιδίου στον ενήλικο (Gilman *et al.*, 1985; Lanclos *et al.*, 1991; Sampietro *et al.*, 1991; Harvey *et al.*, 1992; Ballas *et al.*, 1991; Peri *et al.*, 1997).

Πειράματα διαμόλυνσης έχουν εντοπίσει ένα “ενισχυτή” 750 bp που εδράζεται 0.4 kb καθοδικά από το Αγ-γονίδιο (Bodine *et al.*, 1987). Όμως, πειράματα διαμόλυνσης κατά την διάρκεια της διατριβής έδειξαν ότι ο ενισχυτής αυτός (Enh) καθώς και ένα άλλο τμήμα (F) που βρίσκεται καθοδικότερα, λειτουργούν ως αποσιωπητές. Οι δύο νέοι αυτοί αποσιωπητές (F και Enh) ενδεχομένως να συμμετέχουν στην καταστολή του  $\gamma$ -γονιδίου (Kosteas *et al.*, 1993; Kosteas *et al.*, 1994). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και με τα *in vivo* πειράματα σε ποντίκια που περιείχαν το  $\gamma$ -γονίδιο με τους δύο αποσιωπητές, όπου το  $\gamma$ -γονίδιο παρουσίασε αυτόνομη καταστολή (Dillon *et al.*, 1991). Περαιτέρω, μία άλλη μελέτη σε ποντίκια με κατασκευές που δεν περιλαμβάνουν αυτά τα στοιχεία, παρουσιάζουν έκφραση του  $\gamma$ -γονιδίου ως και το ενήλικο στάδιο (Enver *et al.*, 1989). Τα αποτελέσματα αυτά δεν είναι απολύτως συγκρίσιμα, δεδομένου ότι υπάρχουν διαφορές μεταξύ των δύο DNA κατασκευών στην περιοχή LCR (mini LCR 20 kb έναντι micro LCR 2.5 kb αντίστοιχα) που χρησιμοποιήθηκαν. Το τμήμα Enh είναι ευαίσθητο σε πέψη με νουκλεάση σε ερυθροποιητικά κύτταρα (Forrester *et al.*, 1986) και περιέχει θέσεις δέσμευσης για τους παράγοντες GATA-1 και SATB1, μια πρωτεΐνη που σχετίζεται με τον χρωμοσωμικό σκελετό (Dickinson *et al.*, 1992; Purucker *et al.*, 1990). Πρόσφατα πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια έδειξαν ότι η αφαίρεση αυτού του στοιχείου από το  $\beta$ YAC δεν παίζει κανένα ρόλο στην ενεργοποίηση των  $\gamma$ -γονιδίων (Liu *et al.*, 1998). Είναι πιθανόν όμως ότι το στοιχείο αυτό παίζει κάποιο ρόλο, γιατί η παρουσία του σε κατασκευές  $\mu$ LCR- $\gamma$ -γονίδιο προστατεύει το  $\gamma$ -γονίδιο από τη θέση ενσωμάτωσης του (Li *et al.*, 1994) πιθανώς μέσω της σταθεροποίησης της αλληλεπίδρασης μεταξύ της περιοχής LCR και του  $\gamma$ -γονιδίου (Stamatoyannopoulos *et al.*, 1997).

**Το ενήλικο  $\delta$ -γονίδιο της  $\beta$ -σφαιρίνης.** Το  $\delta$ -γονίδιο φυσιολογικά εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα (περίπου το 1/5 της έκφρασης του  $\beta$ -γονιδίου) ενώ παράγει περίπου 2.5-3.0 % της ενήλικου Hb. Η χαμηλή του έκφραση μπορεί να οφείλεται είτε στην αστάθεια του  $\delta$ -mRNA εντός του πυρήνα (περίπου το 1/3 του χρόνου υποδιπλασιασμού εν σχέση με το  $\beta$ -γονίδιο) (Wood *et al.*, 1978), είτε στην απουσία κάποιου ενισχυτή (Ross and Pizarro 1983; Kosche *et al.*, 1985;) αλλά κυρίως στην απουσία λειτουργικού κουτιού CACCC στην περιοχή του υποκινητή. (Donze *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1997). Η εισαγωγή του κουτιού CACCC από το  $\beta$ -γονίδιο στην φυσιολογική θέση του  $\delta$ -γονιδίου βρέθηκε ότι αυξάνει κατά δέκα φορές την έκφραση του  $\delta$ -γονιδίου υποδηλώνοντας ότι η απουσία σύνδεσης του παράγοντα EKLF ευθύνεται εν μέρει για την χαμηλή έκφραση του  $\delta$ -γονιδίου (Donze *et al.*, 1996). Πειράματα διαμόλυνσης έχουν περαιτέρω δείξει ότι η περιοχή του υποκινητή από τις θέσεις -230 έως -458, περιέχει ένα θετικό στοιχείο (PRE) πάνω στο οποίο προσδένεται ο παράγοντας GATA-1. Ενώ στην περιοχή από -450 έως -612, υπάρχει ένα αρνητικό στοιχείο (NRE) το οποίο προσδένεται με τον κατασταλτικό παράγοντα BP2 (Ebb *et al.*, 1998). Ενδεχομένως οι παράγοντες αυτοί να συμμετέχουν στην *in vivo* στην ρύθμιση του  $\delta$ -γονιδίου.

**Το ενήλικο β-γονίδιο της β-σφαιρίνης.** Η περιοχή κοντά στον υποκινητή, περιέχει την αφετηρία της μεταγραφής το κουτί TATA στη θέση -30, μία περιοχή πλούσια σε γουανίνη στη θέση -50, ένα κουτί CAAT στο -75 και δύο κουτιά CACCC από τη θέση -90 έως τη θέση -110. Η αλληλουχία της μεταγραφής εντοπίστηκε μέσω της *in vitro* ανάλυσης μεταλλάξεων στον υποκινητή καθώς και από μία σημειακή μετάλλαξη στη θέση +1 του γονιδίου που προκαλεί β-θαλασσαιμία (Antoniou *et al.*, 1995, Lewis *et al.*, 1995). Φυσιολογικές μεταλλάξεις στα κουτιά TATA και CACC προκαλούν β<sup>+</sup> θαλασσαιμία υποδηλώνοντας ότι η αλληλουχίες αυτές είναι απαραίτητες για την λειτουργία του γονιδίου.

Το κουτί CAAT είναι σημαντικό για την λειτουργία του υποκινητή σε ερυθροποιητικά κύτταρα (Antoniou *et al.*, 1990) και έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται με διάφορους παράγοντες όπως τους CP1, GATA-1 και τον παράγοντα NF-E6 (Antoniou *et al.*, 1990; Antoniou *et al.*, 1988; deBoer *et al.*, 1988; Berry *et al.*, 1992; Wall *et al.*, 1996). Πιστεύεται ότι ο παράγοντας CP1 δρα ως θετικός ρυθμιστής του κουτιού CAAT αλλά όπως και στην περίπτωση των γ-γονιδίων ακόμα δεν έχει αποδειχθεί *in vivo*. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί στα γ-γονίδια, όπου η GATA-1 προσδένεται ελαφρώς στο κουτί CAAT και επομένως δεν φαίνεται να είναι λειτουργικά σημαντική σε αυτή την θέση (Roncchi *et al.*, 1995).

**Σχήμα 12.** Ο υποκινητής του β-γονιδίου με τα συντηρημένα κουτιά (TATA, CAAT, CACCC) και τις θέσεις δέσμευσης για διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες.

Μία περιοχή πλούσια σε γουανίνη μεταξύ των κουτιών CCAAT και TATA, ονομάζεται β-direct repeat element (βDRE) και αποτελείται από επαναληπτικές αλληλουχίες που βρίσκονται σε ομόλογη θέση με την αλληλουχία σύνδεσης του παράγοντα SSE του γ-γονιδίου, το οποίο έχει, διατηρηθεί κατά τη διάρκεια της εξέλιξης (Stuve *et al.*, 1990). Μεταλλάξεις σε αυτές τις επαναληπτικές αλληλουχίες, επηρεάζουν την λειτουργία του υποκινητή σε πειράματα διαμόλυνσης σε ερυθροποιητικά κύτταρα, καθώς έχει παρατηρηθεί και δέσμευση του DNA με αυτό το στοιχείο (Myers *et al.*, 1989).

Από τα δύο κουτιά CACCC, αυτό στη θέση -110 από το σημείο έναρξης, φαίνεται ότι είναι πιο σημαντικό. Το κουτί CACCC προσδένει αρκετούς παράγοντες *in vitro* (Hartzog *et al.*, 1993) αλλά η λειτουργική πρωτεΐνη *in vivo* είναι ο μεταγραφικός παράγοντας EKLF (Miller *et al.*, 1993; Feng *et al.*, 1994). Είναι δεδομένο ότι το κουτί CACCC του β-γονιδίου έχει ισχυρότερη θέση δέσμευσης, όπως προαναφέρθηκε για τον παράγοντα EKLF από εκείνη των ε και γ-γονιδίων. Μεταλλάξεις στο κουτί CACCC που μειώνουν την σύνδεση με τον παράγοντα EKLF, παρουσιάζουν φαινότυπο θαλασσαιμίας (Donze *et al.*, 1995). Η αδρανοποίηση της EKLF<sup>-/-</sup> σε ποντίκια οδηγεί σε θανατηφόρα αναιμία στο όνιμο εμβρυϊκό στάδιο λόγω απουσία έκφρασης των β-γονιδίων του ποντικού. (Nuez *et al.*, 1995; Perkins *et al.*, 1995; Perkins *et al.*, 2000). Όταν διασταυρώνονται με EKLF<sup>+/-</sup> ποντίκια που περιέχουν το σύμπλεγμα της β-σφαιρίνης, η μειωμένη συγκέντρωση του EKLF επηρεάζει την έκφραση του β-γονιδίου αλλά όχι των ε ή γ-γονιδίων (Wijgerde *et al.*, 1996; Perkins *et al.*, 1996) παρόλο που ο EKLF είναι παρών και λειτουργικός έως τα εμβρυϊκά στάδια της ανάπτυξης (Tewari *et al.*, 1998). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα ποντίκια που είναι ετεροζυγώτες για τον EKLF, εκφράζουν σε χαμηλά επίπεδα το β-γονίδιο αλλά μόνο όταν ανταγωνίζεται το γ-γονίδιο. Η απουσία ή η μείωση του EKLF δεν επηρεάζει τον χρόνο που αποσιωπείται το γ-γονίδιο (Wijgerde *et al.*, 1996; Perkins *et al.*, 1996).

Το ανοδικό τμήμα του υποκινητή περιέχει επιπλέον θέσεις δέσμωσης για τους παράγοντες GATA-1 (στις θέσεις -120 και -200) και CP1 (στη θέση -160) οι οποίοι φαίνεται ότι εμφανίζουν επαγωγή στον υποκινητή σε ερυθρολευχαιμικά κύτταρα (Antoniou *et al.*, 1990; deBoer *et al.*, 1988). Σε αντίθεση, το γονίδιο παραμένει επαγόμενο όταν η LCR συνδέεται με τον ελάχιστο (-100 bp) υποκινητή (Antoniou *et al.*, 1990). Επομένως ο πραγματικός ρόλος αυτών των αλληλουχιών μέσα στο σύμπλεγμα παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστος.

Πειράματα διαμόλυνσης έχουν δείξει ότι η ανοδική περιοχή του υποκινητή περιέχει και δύο αποσιωπητές. Ο αποσιωπητής I (silencer I) εδράζεται στις θέσεις από -550 έως -527 bp και προσδένεται με τον κατασταλτικό παράγοντα BP1 (Berg *et al.*, 1989) καθώς και με την κατασταλτική πρωτεΐνη high mobility group proteins ή HMG I/Y (Ebb *et al.*, 1998). Ο δεύτερος αποσιωπητής (silencer II), εδράζεται στην περιοχή από τη θέση -338 έως -233 bp και προσδένεται με τους κατασταλτικούς παράγοντες BP1 (-302 έως -294) και BP2 (-275 έως -294) (Berg *et al.*, 1989). Ένας ασθενής με β-θαλασσαιμία παρουσίασε τέσσερις μεταλλάξεις στην 5' περιοχή του γονιδίου. Μία από τις μεταλλάξεις βρίσκεται πάνω στην θέση -550 bp. Αποτέλεσμα αυτών είναι η αύξηση της δέσμωσης του παράγοντα BP1 κατά εννέα φορές (Berg *et al.*, 1989). Οι HMG I/Y πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να δημιουργούν αγκύλη στο DNA και ενδεχομένως να λειτουργούν ως συν-παράγοντες και να μεσολαβεί η καταστολή του β-γονιδίου μέσω της σύνδεσης του με τον παράγοντα BP1. Πρόσφατα έχει αποδειχθεί ότι η πρωτεΐνη HMG I/Y έχει την ικανότητα να καταστέλλει ή να ενεργοποιεί ένα υποκινητή από απόσταση (Bagga *et al.*, 2000).

Το β-γονίδιο περιέχει και δύο ενισχυτές. Ο ένας βρίσκεται στην ένωση μεταξύ του δεύτερου ιντρονίου με του τρίτου εξονίου και ο άλλος 550 έως 800 bp μετά την θέση poly A του γονιδίου (Antoniou *et al.*, 1988; deBoer *et al.*, 1988; Behringer *et al.*, 1987). Η δράση του πρώτου ενισχυτή έχει καθιερωθεί μετά από πειράματα διαμόλυνσης σε ερυθρολευχαιμικά κύτταρα (Antoniou *et al.*, 1988) καθώς και σε διαγονιδιακά ποντίκια (Behringer *et al.*, 1987). Ο ρόλος όμως αυτού του πρώτου ενισχυτή δεν έχει επιβεβαιωθεί παρουσία ολόκληρου του συμπλέγματος, κάτι που είναι δύσκολο να μελετηθεί διότι το 3' άκρο του ιντρονίου περιέχει σημαντικές αλληλουχίες για την πολυαδενυλίωση και την απελευθέρωση του μεταγράφου από το εκμαγείο (Antoniou *et al.*, 1998). Ο δεύτερος ενισχυτής μήκος 250 bp, περιέχει τέσσερις θέσεις σύνδεσης του παράγοντα GATA-1 και αυξάνει την δράση ενός συνδεδεμένου υποκινητή σε πειράματα διαμόλυνσης (Antoniou *et al.*, 1988). Το ίδιο τμήμα χρησιμοποιήθηκε και σαν θετική αλληλουχία για την παρουσία ενισχυτή σε πειράματα διαμόλυνσης κατά την διάρκεια της Διατριβής και αναφέρεται αργότερα (Kosteas *et al.*, 1996). Ο ενισχυτής αυτός λειτουργεί και ως ενεργοποιητής στο ενήλικο στάδιο του ποντικού σε κατασκευές που δεν περιέχουν την περιοχή LCR (Behringer *et al.*, 1987; Kollias *et al.*, 1986; Kollias *et al.*, 1987; Trudel *et al.*, 1987a; Trudel *et al.*, 1987b; Magram *et al.*, 1989). Όταν ο 3' ενισχυτής αφαιρείται από το βYAC το οποίο περιέχει ολόκληρο το σύμπλεγμα, τότε η έκφραση του β-γονιδίου επηρεάζεται σημαντικά σε διαγονιδιακά ποντίκια. Η έκφραση του γ-γονιδίου παρέμεινε σταθερή και δεν παρατηρήθηκε στο ενήλικο στάδιο της ερυθροποίησης, υποδηλώνοντας ότι ο ενισχυτής 3' του β-γονιδίου δεν συμμετέχει στον ανταγωνισμό μεταξύ των γ και β-γονιδίων. Επομένως, ο ενισχυτής αυτός παίζει σημαντικό ρόλο μόνο ως προς την έκφραση του β-γονιδίου (Liu *et al.*, 1997).

**Το ζ-γονίδιο της α-σφαιρίνης.** Η περιοχή κοντά στον υποκινητή του ζ-γονιδίου περιέχει το κουτί TATA στη θέση -30, ένα κουτί CAAT στη θέση -66 και ένα κουτί CACCC στη θέση -95, ανάλογα με αυτά που βρίσκονται στα άλλα γονίδια της σφαιρίνης. Το κουτί CAAT συνδέεται με τον παράγοντα CP2 (Lim *et al.*, 1992) και η περιοχή με το κουτί CACCC συνδέεται με παράγοντες της οικογένειας των πρωτεϊνών Sp1 (Watt *et al.*, 1990; Yu *et al.*, 1990). Όπως και με τον υποκινητή του ε-γονιδίου, έτσι και ο υποκινητής του ζ-γονιδίου περιέχει τις επαναληπτικές αλληλουχίες DR-1 (Filipe *et al.*, 1999). Η θέση δέσμωσης του παράγοντα Sp1 συμπίπτει με μία ισχυρή θέση δέσμωσης του παράγοντα GATA-1. Οι δύο παράγοντες ανταγωνίζονται για να προσδεθούν στην ίδια θέση. Μία άλλη GATA-1 θέση βρίσκεται πιο ανοδικά στη θέση -230 bp. Πειράματα διαμόλυνσης έχουν δείξει ότι οι δύο GATA-1 θέσεις είναι απαραίτητες για την αλληλεπίδραση με την περιοχή HS-40 (Zhang *et al.*, 1993). Ένα θετικό ρυθμιστικό στοιχείο έχει εντοπιστεί στην περιοχή μεταξύ -207 και -417 bp (Sabath *et al.*, 1995). Η περιοχή αυτή περιέχει μία θέση GATA-1 στη θέση -230 bp που ακολουθείται στο 3' άκρο από ένα κουτί CACCC το οποίο προσδένεται ο Sp1 και κάποιος άγνωστος παράγοντας από την οικογένεια Sp1/XKLF (Philipsen *et al.*, 1999) έκτος τους EKLF ή

BKLF (Sabath *et al.*, 1996). Άλλος ένας άγνωστος παράγοντας ο URE-BF, ο οποίος μπορεί και αλληλεπιδρά με την GATA-1 προσδένεται 5' της θέσεις GATA-1.

Η αναπτυξιακή ρύθμιση του ζ-γονιδίου είναι αυτόνομη, δηλαδή όλες οι αλληλουχίες απαραίτητες για την αποσιωπηση του περιέχονται στο γονίδιο ή στις αλληλουχίες που το περιλαμβάνουν (Sabath *et al.*, 1993; Albitar *et al.*, 1991; Pondel *et al.*, 1992b). Όταν συνδέεται με την περιοχή LCR το ζ-γονίδιο εκφράζεται σε αρχέγονα ερυθροποιητικά κύτταρα, αλλά όχι σε διαφοροποιημένα κύτταρα σε διαφοροποιημένα ποντίκια. Η ίδια έκφραση παρατηρείται ακόμα και με 128 hr του υποκινητή, υποδηλώνοντας ότι τουλάχιστον μερικές από τις αλληλουχίες που είναι απαραίτητες για την καταστολή του γονιδίου σε διαφοροποιημένα κύτταρα, βρίσκονται κοντά στο γονίδιο (Sabath *et al.*, 1993). Ανάλυση της περιοχής του υποκινητή δεν ανέδειξε στοιχεία που να συμμετέχουν στην καταστολή του γονιδίου. Επιπρόσθετες *in vitro* και *in vivo* μελέτες, εντόπισαν πρόσφατα μία αλληλουχία αποσιωπητή μήκος 108 bp 1.2 kb 3' του ζ-γονιδίου, στην οποία συνδέεται ο παράγοντας NF-κB, υποδηλώνοντας ότι εν μέρει συμμετέχει στην καταστολή του γονιδίου (Liebhaber 2000; Wang and Liebhaber 1999).

**Το α-γονίδιο της α-σφαιρίνης.** Η περιοχή του υποκινητή των α1- και α2-γονιδίων έχουν τις ίδιες ρυθμιστικές αλληλουχίες στις πρώτες 600 bp αλλά εμφανίζουν κάποιες εξαιρέσεις εν σχέση με τα άλλα γονίδια της σφαιρίνης. Δεν περιέχει το κουτί CACCC, αλλά περιέχει μία περιοχή πλούσια σε CG που αποτελεί μέρος μιας μη-μεθυλιωμένης CpG νησίδας που επεκτείνεται έως και το 5' του ζ-γονιδίου (Flint *et al.*, 1997; Shewchuk *et al.*, 1997). Οι νησίδες CpG σχηματίζουν διαφορετική δομή χρωματίνης. Ο παράγοντας Sp1 προσδένεται με την περιοχή που είναι πλούσια σε CG, η οποία όπως φαίνεται είναι σημαντική για την υψηλή έκφραση του α-γονιδίου. Πειράματα διαμόλυνσης έδειξαν ότι το α-γονίδιο σε αντίθεση με τα β-γονίδια, εκφράζεται μετά από διαμόλυνση σε μη-ερυθροποιητικά κύτταρα απουσία ενισχυτή (Humphries *et al.*, 1982; Brickner *et al.*, 1991). Το α-γονίδιο όμως χρειάζεται είτε την περιοχή HS-40 ή και των LCR ώστε να εκφραστεί σε διαγονιδιακά ποντίκια (Higgs *et al.*, 1990; Sharpe *et al.*, 1993; Blom *et al.*, 1989; Ryan *et al.*, 1989; Talbot *et al.*, 1989). Ο υποκινητής του α-γονιδίου συνδέεται με τους ίδιους παράγοντες που προσδένονται και στους υποκινητές των β-γονιδίων, όπως τους GATA-1 (-185 bp), CP1 (-90 bp), CP2 καθώς και η αIRP (a inverted repeat protein) (Lim *et al.*, 1990; 391 Kim *et al.*, 1990; Lim *et al.*, 1993; Swedeman *et al.*, 1994).

## Η περιοχή ελέγχου του γονιδιακού τόπου του β-συμπλέγματος (LCR)

Αρχικά πειράματα υπερευαισθησίας με DNaseI εντόπισαν την προσοχή των ερευνητών στην περιοχή που ευρίσκεται ανοδικά του ε-γονιδίου. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι η περιοχή που βρίσκεται 5 έως 25 kb 5' του ε-γονιδίου αποτελείται από πέντε θέσεις υπερευαισθησίας (DNase I hypersensitive sites ή HS) που όλες μαζί σχηματίζουν την περιοχή LCR. Οι HS θέσεις έχουν εντοπισθεί -21.5, -18, -14.7, -10.9 και -6.1 kb εν σχέση με την αφετηρία μεταγραφής του ε-γονιδίου και αντίστοιχα αριθμούνται με κατεύθυνση 5' προς 3' ως HS5 έως HS1. Άλλη μία HS θέση (3'HS1) βρίσκεται 20 kb 3' του β-γονιδίου. Οι θέσεις HS1 έως HS4 έχουν ερυθροποιητική εξειδίκευση (Forrester *et al.*, 1986; Tuan *et al.*, 1985) ενώ η θέση HS5 εκφράζεται κυρίως σε αιμοποιητικά κύτταρα (Li *et al.*, 1999; Zafarana *et al.*, 1995). Η 3'HS1 βρίσκεται μόνο σε ερυθροποιητικά κύτταρα και η λειτουργία της ακόμα δεν είναι γνωστή. Πρόσφατα δύο νέες θέσεις υπερευαισθησίας οι HS6 και HS7 έχουν εντοπιστεί 6 και 12 kb ανοδικά της HS5 (Bulger *et al.*, 1999a; Engel and Tanimoto, 2000), ακόμα όμως δεν είναι γνωστό εάν αποτελούν μέρος της περιοχής LCR.

Η πρώτη ένδειξη ότι η περιοχή LCR πιθανώς να περιέχει σημαντικές ρυθμιστικές αλληλουχίες προήλθε από την ανάλυση δύο μεταλλάξεων τύπου (εγδβ)<sup>ο</sup>θαλασσαιμίας και οδήγησε στην ανακάλυψη της LCR (Van *et al.*, 1980; Vanin *et al.*, 1983; Orkin *et al.*, 1981; Curtin *et al.*, 1985; Driscoll *et al.*, 1989; Kulozik *et al.*, 1991). Η Ολλανδική (εγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία αφαιρεί περίπου 100 kb που περιλαμβάνει ολόκληρη την περιοχή LCR μαζί με τα ε, γ Kollias *et al.*, και δ-γονίδια ενώ το β-γονίδιο παραμένει άθικτο. Το β-γονίδιο είναι λειτουργικό *in vitro* (Wright *et al.*, 1984) αλλά όχι *in vivo* λόγω της ενσωμάτωσης του σε ετεροχρωματίνη (Kioussis *et al.*, 1983). Στην Ισπανική (εγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία (Driscoll *et al.*, 1989) το έλλειμα ξεκινάει 8 kb 5' του ε-γονιδίου και αφαιρεί τις θέσεις HS2 έως HS5 καθώς και 27 kb από την ανοδική

περιοχή. Το υπόλοιπο σύμπλεγμα της β-σφαιρίνης από την HS1 και καθοδικά της παραμένει άθικτο (Σχήμα 13). Ως αποτέλεσμα του ελλείματος της περιοχής LCR το σύμπλεγμα της β-σφαιρίνης στην Ισπανική (εγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία δεν εκφράζεται (Kioussis *et al.*, 1983; Forrester *et al.*, 1990) και δεν παρουσιάζει ευαισθησία στην DNase I, δηλαδή αποκτά μία κλειστή δομή χρωματίνης.

### **Σχήμα 13.** Μεταλλάξεις τύπου (εγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας που αφαιρούν την περιοχή LCR

Η πρώτη μελέτη που καθιέρωσε την περιοχή LCR αφορούσε την συνδεσή της περιοχής minilocus control region (mLCR, που αποτελείται από της θέσεις HS4 έως HS1) με το ενήλικο β-γονίδιο (Grosveld *et al.*, 1987). Αυτή και περαιτέρω μελέτες σε κυτταρικά συστήματα και διαγονιδιακά ποντίκια έδειξαν ότι η περιοχή LCR προσδίδει υψηλού επιπέδου ερυθροποιητική έκφραση στα γονίδια που συνδέονται μαζί της. Το επίπεδο της έκφρασης των γονιδίων εξαρτάται από τον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου, αλλά όχι από τη θέση της ενσωμάτωσής του, ενώ η δράση της LCR είναι επικρατούσα, δηλαδή έχει την ικανότητα να ενισχύει την μεταγραφική δραστηριότητα γονιδίων τόσο σφαιρινών, όσο και ετερόλογων γονιδίων (Assendelft *et al.*, 1989). Για παράδειγμα, ο υποκινητής της κινάσης της θυμιδίνης του ιού του απλού έρπητα (HSV-tk) εμφανίζει ερυθρο-ειδική έκφραση σε ποντίκια όταν είναι συνδεδεμένος με την περιοχή LCR. Περαιτέρω ο υποκινητής επάγεται κατά την ωρίμανση των ερυθροκυττάρων. Άλλα πειράματα έχουν δείξει ότι κάθε HS θέση περιέχει πολλαπλές θέσεις αλληλεπίδρασης και σύνδεσης με διαφόρους ερυθροποιητικούς και μη trans-παράγοντες που περιλαμβάνονται κυρίως σε μία περιοχή 300 bp όπως αναφέρεται παρακάτω.

Τα προβλήματα συχνά που επικρατούν για την ανίχνευση μίας περιοχής LCR είναι ότι μπορεί να αποτελείται από αρκετά στοιχεία και να εξαπλώνεται σε μεγάλη περιοχή (πάνω από 20 kb) καθώς και ότι δεν είναι απαραίτητο να εδράζεται είτε ανοδικά είτε καθοδικά από τα γονίδια που ελέγχει (Grosveld 1999). Η περιοχή LCR της β-σφαιρίνης με την σχετικά απλή δομή της ήταν η πρώτη που ανακαλύφθηκε. Στην συνέχεια μια άλλη ερυθρο-ειδική HS εντοπίστηκε 40 kb ανοδικά του ζ-γονιδίου η οποία είναι απαραίτητη για την έκφραση του συμπλέγματος της α-σφαιρίνης (Higgs *et al.*, 1990). Η HS-40 είναι τύπου LCR, δεν έχει όμως τα κύρια χαρακτηριστικά της περιοχής LCR της β-σφαιρίνης που προαναφέρθηκαν, κυρίως στο ότι το επίπεδο της έκφρασης των γονιδίων εξαρτάται από τον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου, αλλά όχι από τη θέση της ενσωμάτωσής του (Sharpe *et al.*, 1992). Αρκετές άλλες περιοχές LCR έχουν εντοπιστεί και σε άλλα γονίδια που εκφράζονται σε διάφορους ιστούς (Kioussis *et al.*, 1997).

### **Στοιχεία της περιοχής LCR του συμπλέγματος της β-σφαιρίνης.**

Ένα μοναδικό στοιχείο της περιοχής LCR που την διακρίνει από ένα κλασικό ενισχυτή είναι η ικανότητα έκφρασης των γονιδίων που συνδέονται μαζί της ανεξάρτητα από τη θέση ενσωμάτωσής τους (Fraser *et al.*, 1998; Grosveld *et al.*, 1987). Αρχικά πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια έδειξαν ότι απουσία

της LCR η έκφραση των  $\epsilon$ ,  $\text{A}\gamma$  και  $\beta$  γονιδίων στα μισά ποντίκια ήταν χαμηλή δηλαδή 0.1-3% εν σχέση με τη φυσιολογική έκφραση των γονιδίων της σφαιρίνης του ποντικού (Kollias *et al.*, 1986; Trudel *et al.*, 1987; Magram *et al.*, 1989; Townes *et al.*, 1985; Behringer *et al.*, 1987). Στα άλλα μισά ποντίκια τα γονίδια δεν εκφράζοντο. Η απουσία και η διαφορά στην έκφραση αυτών των γονιδίων οδήγησε στην σκέψη ότι οφείλεται στην δομή της χρωματίνης ή/και στην επηρεάσει ρυθμιστικών στοιχείων που βρίσκονται κοντά στη θέση ενσωματώσεις τους (Milot *et al.*, 1996).

Είναι γνωστό ότι η ετεροχρωματίνη παραμένει ασυνήθιστα συμπυκνωμένη και μεταγραφικά ανενεργή ενώ έχει την ικανότητα να αποσιωπή τα γονίδια που βρίσκονται κοντά της. Η καταστολή ενός γονιδίου με αυτό τον τρόπο ονομάζεται *position effect variegation* (PEV) (Karpen 1994) και αρχικά είχε ανιχνευτή στην *Drosophila* (Alberts and Sternglanz 1990) και πρόσφατα στον σακχαρομούκητα (Allshire *et al.*, 1994) και τα θηλαστικά (Milliot *et al.*, 1996; Festenstein *et al.*, 1996; Festenstein and Kioussis 2000). Η PEV χαρακτηρίζεται από την στοχαστική αποσιώπηση ενός γονιδίου σε μία αναλογία κυττάρων όπου φυσιολογικά αναμένεται να εκφραστή. Η παρουσία *cis*-ρυθμιστικών περιοχών επηρεάζει εάν ένα γονίδιο θα εκφραστή ή όχι. Σε ορισμένες περιπτώσεις έχει αποδειχθεί ότι οι ενισχυτές έχουν την ικανότητα να αυξάνουν την πιθανότητα να εκφραστή ένα γονίδιο με μη ιστοειδικό πρότυπο έκφρασης (Walters *et al.*, 1995; Walters *et al.*, 1996) όπου παρουσία της περιοχής LCR μπορούν να καταβάλουν πλήρως την αποσιωποποίηση του από την ετεροχρωματίνη (Festenstein *et al.*, 1996; Milot *et al.*, 1996). Πρόσφατη μελέτη έχει δείξει ότι η PEV επηρεάζεται από την ετεροχρωματική πρωτεΐνη SUV39H1 καθώς και από την ομάδα των πρωτεϊνών polycomb όπως τις M33 και BMI-1 (McMorrow *et al.*, 2000). Πιστεύεται ότι η PEV είναι αποτέλεσμα ανταγωνισμού μεταξύ των κατασταλτικών πρωτεϊνών της χρωματίνης (SUV39H1, M33, BMI-1) με πρωτεΐνες ενεργοποίησης. Μέχρι στιγμής έχει αποδειχθεί ότι η συγκέντρωση των κατασταλτικών πρωτεϊνών επηρεάζει τον αριθμό των κυττάρων που ενεργοποιούν και εκφράζουν το σύμπλεγμα της  $\beta$ -σφαιρίνης (McMorrow *et al.*, 2000).

Η σύνδεση της περιοχής LCR με τα  $\epsilon$ ,  $\text{A}\gamma$ , και  $\beta$  γονίδια βρέθηκε ότι αυξάνει την έκφραση τους, ανεξάρτητα από την θέση ενσωμάτωσής τους (Fraser *et al.*, 1998; Festenstein *et al.*, 1996; Milot *et al.*, 1996). Επομένως η περιοχή LCR έχει την ικανότητα να δημιουργεί μία ενεργή δομή χρωματίνης, ανεξάρτητα της θέσης ενσωμάτωσής της, ενεργοποιώντας έτσι τα κοντινά γονίδια. Μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια, με επιλεγμένες ελλείψεις των επιμέρους HS θέσεων, οδήγησε σε σημαντική μείωση της λειτουργίας της LCR, με αποτέλεσμα να χάνεται η ικανότητα έκφρασης των γονιδίων, ανεξάρτητα από την θέση ενσωμάτωσής (Festenstein *et al.*, 1996; Milot *et al.*, 1996).

## Στοιχεία μονωτών

Η ικανότητα υπερίσχυσης της περιοχής LCR από την θέση ενσωματώσεως της διαφέρει από τα “συνοριακά” στοιχεία Specialized Chromatin Structures (scs) και την περιοχή καταστολής της Hairy wing (su[Hw]) που έχουν περιγραφεί στην *Drosophila melanogaster* (Kellum *et al.*, 1991; 1992; Roseman *et al.*, 1993) τα οποία όπως φαίνεται δρουν με το να απομονώνουν το γονίδιο και να το προστατεύουν από την επιρροή της χρωματίνης που το περιλαμβάνει. Αυτό όμως δεν αποκλείει την παρουσία παρόμοιων στοιχείων μέσα στην περιοχή LCR. Πειράματα σταθερής διαμόλυνσης έχουν δείξει ότι η 1.2 kb HS4 θέση από το σύμπλεγμα της  $\beta$ -σφαιρίνης του κοτόπουλου, διαθέτει στοιχεία απομονωτών (Chung *et al.*, 1993; Chung *et al.*, 1997). Πρόσφατα πειράματα έχουν δείξει ότι η δράση των απομονωτών περιορίζεται σε ένα μικρότερο τμήμα DNA 250 bp σε μία CpG νησίδα πάνω στο οποίο προσδένονται αρκετοί παράγοντες καθώς και ο CTCF. Άλλη μία CTCF θέση έχει εντοπιστεί στο 3' ακρό του συμπλέγματος στο κοτόπουλο, υποδηλώνοντας ότι λειτουργούν ως συνοριακά στοιχεία ενδεχομένως μέσω την αλληλεπίδραση τους για την δημιουργία και διατήρηση της δομής της χρωματίνης (Saitoh *et al.*, 2000; Felsenfeld *et al.*, 2000). Το αντίστοιχο στοιχείο στον άνθρωπο, πιστεύεται ότι είναι η θέση HS5 από την περιοχή LCR. Σε πειράματα διαμόλυνσης η HS5 εμφανίζει στοιχεία απομονωτών προς την HS3 (Chung *et al.*, 1993; Li and Stamatoyannopoulos 1994). Όμως έχει βρεθεί ότι δεν λειτουργεί παρουσία ολόκληρης της περιοχής LCR σε διαγονιδιακά ποντίκια (Zafarana *et al.*, 1994; Bender *et al.*, 1998). Πρόσφατα πειράματα έδειξαν ότι η HS5 προστατεύει και το  $\epsilon$ -γονίδιο (Tanimoto *et al.*, 1999) και το  $\gamma$ -γονίδιο (Engel and Tanimoto 2000) από την θέση ενσωμάτωσής του, υποδηλώνοντας ότι υπάρχουν

επιπλέον στοιχεία απομονωτών στην περιοχή ανοδικά από την HS5 (Li *et al.*, 2000). Επιπρόσθετες μελέτες απαιτούνται για την πλήρη διερεύνηση του ρόλου της HS5.

Το μεγάλο όμως ενδιαφέρον με ορισμένα στοιχεία μονωτών όπως την HS4 του κοτόπουλου, είναι ότι όταν τοποθετηθούν στις άκρες του ανθρώπινου β-γονιδίου το προστατεύουν από τα άλλα στοιχεία που βρίσκονται κοντά στην θέση ενσωμάτωσης του. Η ικανότητα αυτή επιτρέπει την υψηλότερη έκφραση του β-γονιδίου κάτι που είναι σημαντικό για τον σχεδιασμό φορέων για την γονιδιακή θεραπεία (Neff *et al.*, 1997; Persons and Nienhuis 2000; Emery *et al.*, 2000). Περαιτέρω πειράματα με το σύμπλεγμα της λυσοζύμης του κοτόπουλου σε διαγονιδιακά ποντίκια, έδειξαν ότι το σύμπλεγμα περιέχει στοιχεία απομονωτών καθώς και δύο αλληλουχίες ενεργοποίησης τύπου LCR (Bonifer *et al.*, 1994; Neff *et al.*, 1997). Τα στοιχεία μονωτών του γονιδίου της λυσοζύμης (A-elements) φαίνεται ότι δεν επηρεάζονται από την θέση ενσωμάτωσης τους σε ιστούς όπου το γονίδιο της λυσοζύμης δεν εκφράζεται (Fraser and Grosveld 1998; Bonifer *et al.*, 1994). Επομένως η πρώτη δραστηριότητα του LCR είναι η ενεργοποίηση συνδεδεμένου γονιδίου που θα το επιτρέψει να εκφραστεί σε ερυθροποιητικούς ιστούς. Η δράση ενεργοποίησης του LCR οδηγεί σε δομικές αλλαγές της χρωματίνης πριν την έναρξη της μεταγραφής (Forrester *et al.*, 1987).

Πρόσφατα όμως έχει αμφισβητηθεί η ιδέα ότι η περιοχή LCR είναι απαραίτητη για το άνοιγμα της δομής της χρωματίνης του συμπλέγματος *in vivo* (Starck *et al.*, 1994; Reik *et al.*, 1998; Erner *et al.*, 1998; Bender *et al.*, 2000; Schübeler *et al.* 2000). Η ιδέα αυτή είναι αντίθετη με της θαλασσαιμίες που προκαλούνται από μεταλλάξεις στην περιοχή της LCR οι οποίες δείχνουν ότι η περιοχή LCR είναι απαραίτητη ώστε να ανοίξει μία κλειστή δομή χρωματίνης κατά την διάρκεια της ανάπτυξης. Εάν δεν επισυμβεί αυτό, τότε δεν υπάρχει μεταγραφή *in vivo*. Διάφορες μεταλλάξεις στην περιοχή LCR του ποντικού μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού σε εμβρυικά πολυδύναμα κύτταρα έχουν δείξει ότι τα γονίδια εκφράζονται αλλά σε πολύ χαμηλά επίπεδα (Erner *et al.*, 1998; Bender *et al.*, 2000). Πρόσφατες μελέτες με επιλεγμένες ελλείψεις των επιμέρους HS2, HS3 ή HS5,6 θέσεων μειώνουν την έκφραση του ενήλικου βmin έναντι του βmaj γονιδίου του ποντικού (Alami *et al.*, 2000).

Τα αποτελέσματα από πειράματα αντικατάστασης της περιοχής LCR στον άνθρωπο (HS5-HS2) και το ποντίκι (HS6-HS1) έχουν ερμηνευθεί ότι υποδηλώνουν ότι η LCR δεν είναι απαραίτητη για το άνοιγμα της δομής της χρωματίνης. Η αφαίρεση της LCR από το σύμπλεγμα του ανθρώπου έδειξε ότι τα γονίδια δεν εκφράζονται, ενώ διατηρείτε η ευαισθησία σε DNase I κάτι που είναι ενδεικτικό μίας ανοιχτής δομής χρωματίνης. Αντιθέτως όμως στην Ισπανική (εγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία τα γονίδια δεν εκφράζονται (Kioussis *et al.*, 1983; Forrester *et al.*, 1990) και δεν παρουσιάζει ευαισθησία στην DNase I, κάτι που είναι ενδεικτικό μίας κλειστής δομής χρωματίνης. Οι λόγοι για τα διάφορα αυτά αποτελέσματα που παρατηρούνται δεν είναι ακόμα σαφείς. Ίσως να υπάρχουν λειτουργικές διαφορές μεταξύ των δύο LCR, παρόλο που έχουν παρόμοια γονιδιακή οργάνωση ή απλώς να οφείλετε στην διαφορετική ερμηνεία των αποτελεσμάτων (Higgs 1998; Grosveld 1999). Ενδεχομένως όμως να υπάρχει και ένα δεύτερο σύμπλεγμα με στοιχεία απομονωτών που να εδράζεται 5' της Ισπανικής (εγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας ικανό να διαμορφώνει και να διατηρεί μία ανοικτή δομή χρωματίνης (Engel and Tanimoto 2000).

## Θέσεις υπερευαισθησίας της περιοχής LCR

Η χαρτογράφηση των HS θέσεων έχει δείξει ότι 250 έως 500 bp του DNA είναι εκτεθειμένο στην δράση της DNase I. Η κεντρική αλληλουχία κάθε HS θέσης έχει διατηρηθεί κατά την διάρκεια της εξέλιξης, υποδηλώνοντας ότι είναι σημαντική για την λειτουργία της περιοχής LCR (Hardison *et al.*, 1997). Κάθε HS θέση περιέχει μία ή παραπάνω θέσεις σύνδεσης για τους δύο ερυθροποιητικούς μεταγραφικούς παράγοντες GATA-1 και NF-E2, καθώς και για άλλους πανταχού (ubiquitous) εκφραζόμενους παράγοντες, κυρίως τους EKLF και Sp1.

Μόνο μία από τις HS θέσεις, η HS2 φαίνεται ότι έχει την ισχυρή δράση ενός κλασσικού ενισχυτή (Ney *et al.*, 1990; Tuan *et al.*, 1989) σε πειράματα διαμόλυνσης με ερυθροποιητικά κύτταρα. Αυτό οφείλεται κυρίως στην παρουσία δύο συνεχόμενων θέσεων σύνδεσης του παράγοντα NF-E2/AP1 (Ney *et al.*, 1990; Pruzina *et al.*, 1991) το οποίο όμως δεν βρίσκεται, τουλάχιστον να συνεχίζεται σε άλλη HS θέση. Το ίδιο HS2

τμήμα χρησιμοποιήθηκε και σαν θετική αλληλουχία για την παρουσία ενισχυτή σε πειράματα διαμόλυνσης κατά την διάρκεια της διατριβής και αναφέρεται αργότερα (Kosteas *et al.*, 1998). Η κεντρική αλληλουχία της HS2 εντοπίζεται μέσα σε ένα τμήμα 26 bp που περιλαμβάνει της δύο συνεχόμενες NF-E2 θέσεις. Εάν χωριστούν αυτές οι θέσεις, τότε υπάρχει απώλεια της λειτουργίας (Tuan *et al.*, 1992). Οι άλλες θέσεις έχουν μικρή έως καθόλου δράση ενός κλασσικού ενισχυτή. Τα άλλα στοιχεία έχουν ενεργοποιητικές ικανότητες είτε σε πειράματα διαμόλυνσης (HS2 και HS3) είτε σε διαγονιδιακά ποντίκια (HS2, HS3 και HS4). Οι HS1 και HS5 θέσεις φαίνεται ότι δεν έχουν καμία επίπτωση στην έκφραση σε αυτές της δοκιμασίες (Grosveld *et al.*, 1993).

Η θέση HS3 1.9 kb, φαίνεται ότι είναι το πιο ισχυρό στοιχείο ικανό να δημιουργεί μία ενεργό δομή της χρωματίνης. Πρόσφατα πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια έχουν περαιτέρω δείξει ότι ένα μικρότερο τμήμα της HS3 850 bp είναι ικανό να ενεργοποιεί το β-γονίδιο παρουσία όμως των δύο ενισχυτών του β-γονιδίου που αναφέρθηκαν (Rubin *et al.*, 2000). Εκτός από την HS3, οι άλλες HS θέσεις πρέπει να είναι παρούσες σε πολλαπλά αντίγραφα ώστε να ενεργοποιήσουν την γονιδιακή έκφραση (Ellis *et al.*, 1996; Ellis *et al.*, 1993). Η δράση των επιμέρους HS θέσεων είναι προστιθέμενη και αυξάνεται όταν ενώνονται όλες μαζί (Grosveld *et al.*, 1993) στο ίδιο επίπεδο που παρατηρείτε με την 20 kb LCR γενωμική περιοχή που περιλαμβάνει και της τέσσερις HS θέσεις.

## Η δομή των επιμέρους HS θέσεων

Κάθε HS θέσει έχει ελεγχθεί εκτεταμένα για τους παράγοντες που προσδένονται μαζί τους τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Talbot *et al.*, 1990; Talbot *et al.*, 1991; Pruzina *et al.*, 1991; Lowrey *et al.*, 1992; Stamatoyannopoulos *et al.*, 1995; Walters *et al.*, 1991; Strauss *et al.*, 1992; Ikuta *et al.*, 1991; Reddy *et al.*, 1991; Stamatoyannopoulos *et al.*, 1995; Pomerantz *et al.*, 1998). Οι διάφοροι παράγοντες που προσδένονται στις HS θέσεις είναι ιστό-ειδικοί ή πανταχού εκφραζόμενοι.

Μία ή περισσότερες θέσεις δέσμευσης του παράγοντα GATA-1 βρίσκονται μέσα σε κάθε HS θέση. Οι δύο αναστρεφόμενες θέσεις GATA-1 μέσα στην HS4 είναι υπεύθυνες για την δημιουργία της θέσεις υπερευαισθησίας (Lowrey *et al.*, 1992; Stamatoyannopoulos *et al.*, 1995). Δύο από τις GATA-1 θέσεις στο ελάχιστο τμήμα της HS3 είναι απαραίτητοι για την λειτουργία της περιοχής LCR σε διαγονιδιακά ποντίκια (Philipsen *et al.*, 1993). Μεταλλάξεις στις GATA-1 θέσεις στην περιοχή από 230 έως 250 bp της HS2, μειώνει την δράση της σε σύνδεση με το β-γονίδιο σε πειράματα διαμόλυνσης σε ερυθρολευχαιμικά κύτταρα ποντικού MEL (Ellis *et al.*, 1993). Η ίδια μετάλλαξη δεν έχει καμία επίπτωση στην έκφραση του β-γονιδίου σε διαγονιδιακά ποντίκια ή στην έκφραση συνδεδεμένου γ-γονιδίου σε ανθρώπινα ερυθρολευχαιμικά κύτταρα. Η διαφορά αυτή που παρατηρείται δείχνει πιθανούς περιορισμούς τέτοιων δοκιμασιών. Γενικός όμως, τα αποτελέσματα επιδεικνύουν την σημασία που έχει η GATA-1 προς την δράση της περιοχής LCR τόσο στην δομή της χρωματίνης όσο και στην γονιδιακή έκφραση. Παρόλο που γίνεται αναφορά στην GATA-1, πρέπει να αναφερθεί ότι και η GATA-2 εκφράζεται σε αρχέγονα ερυθροποιητικά κύτταρα.



**Σχήμα 14.** Θέσεις δέσμευσης για τους διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες εντός των HS θέσεων.

Ο συνδυασμός μιας GATA-1 θέσης και της αλληλουχίας με το μοτίβο GGTGG, βρίσκεται αρκετά συχνά και φαίνεται ότι είναι συνδεδεμένο με την ερυθροποιητική εξειδίκευση. Κάθε χαρακτηρισμένη HS θέση εμφανίζει τέτοια μοτίβα. Τα GT μοτίβα σε κάθε HS θέση έχουν προσθεμένες πρωτεΐνες σε κύτταρα όπως έχουν δείξει *in vivo* πειράματα αποτύπωσης (Reddy *et al.*, 1994; Ikuta *et al.*, 1996). Πρόσφατα πειράματα με την HS3 σε διαγονιδιακά ποντίκια έχουν δείξει ότι ο παράγοντας EKLF συνδέεται στην θέση GT *in vivo* και ότι η σύνδεση του προκαλεί μία αλλαγή στην δομή της χρωματίνης που ανιχνεύεται με ευαισθησία στην DNase I (Gillemans *et al.*, 1998). Αυτό το αποτέλεσμα είναι συμβατό με το δεδομένο ότι ο παράγοντας EKLF προσδένεται σε πρωτεΐνες της οικογένειας SWI/SNF που τροποποιούν την δομή της χρωματίνης (Kadam *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 1999). Ο μεταγραφικός παράγοντας Sp1 δεν έχει τέτοιο ρόλο στην ελάχιστη θέση HS3 και δεν φαίνεται να έχει κάποια λειτουργία στην έκφραση των γονιδίων της σφαιρίνης (Marin *et al.*, 1997). Προς το παρόν δεν είναι γνωστό εάν ο παράγοντας EKLF είναι ο μόνος από τις “GT” πρωτεΐνες που δρα σε αυτές της θέσης. Αρκετές δραστηριότητες έχουν εντοπιστεί στην σύνδεση με αυτές της θέσεις, πάντως δεν είναι γνωστό εάν κάποια από αυτές είναι λειτουργικές *in vivo*.

Μία άλλη σημαντική θέση σύνδεσης είναι η AP1/NF-E2. Η θέση δέσμευσης του παράγοντα NF-E2 βρίσκεται σε κάθε χαρακτηρισμένη HS θέση (Stamatoyannopoulos J., *et al.*, 1995). Μέσα στην HS2 στην περιοχή LCR, τα μοτίβα βρίσκονται το ένα μετά το άλλο σε κάθε 10 bp, δημιουργώντας θέσεις δεσμεύσεις σε κάθε διαδοχική περιστροφή στη διπλή έλικα του DNA. (Ney *et al.*, 1990a; Ney *et al.* 1990b; Talbot *et al.*, 1991; Caterina *et al.*, 1991; Moi *et al.*, 1990). Οι θέσεις σύνδεσης του παράγοντα NF-E2 είναι απαραίτητες για την επαγωγή της δράσης του ενισχυτού της HS2 όπως έχει αποδειχθεί σε πειράματα διαμόλυνσης μετά από την εισαγωγή γονιδίου σε ερυθρολευχαιμικά κύτταρα. Περαιτέρω, η σύνθεση της NF-E2 σε αυτές τις θέσεις είναι απαραίτητη για την LCR δράση της θέσης HS2 σε διαγονιδιακά ποντίκια. (Caterina *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1992). Μεταλλάξεις που αφαιρούν την θέση NF-E2 αλλά διατηρούν άθικτη την AP-1, μειώνουν ελάχιστα τη δράση της HS2. Ο ρόλος των θέσεων NF-E2/AP-1 στο β 5’HS3, HS4 και HS5 ακόμα δεν έχει διευκρινισθεί.

Περίληπτικά, η περιοχή LCR είναι μία συλλογή από δομικά και λειτουργικά διαφορετικές HS θέσεις όπου η κάθε μία περιέχει θέσεις δεσμεύσεις για διάφορους παράγοντες. Τρεις μεταγραφικοί ενεργοποιητές οι GATA-1, EKLF και NF-E2, έχουν περιορισμένη κυτταρική έκφραση που περιλαμβάνει τα ερυθροκύτταρα, και έχουν άμεσα συνδεθεί με την ρύθμιση της ανάπτυξης των ερυθροποιητικών κυττάρων και την παραγωγή της αιμοσφαιρίνης. Άλλες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την περιοχή LCR είναι πανταχού εκφραζόμενες. Κάποιες αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης με DNA που έχουν περιγραφή *in vitro* μπορεί να μην είναι σημαντικές ή να μην πραγματοποιούνται *in vivo*. Μόνο η HS2 έχει την ισχυρή δράση ενός κλασσικού ενισχυτή, ενώ η HS3 φαίνεται ότι έχει την ισχυρή ικανότητα διαμόρφωσης ανοιχτής χρωματίνης.

### **Διαγονιδιακά ποντίκια που περιέχουν το σύμπλεγμα των β-γονιδίων του ανθρώπου με τη μορφή των τεχνητών χρωμοσωμάτων σακχαρομύκητα (βΥAC).**

Η ρύθμιση του συμπλέγματος της β-σφαιρίνης μπορεί να διερευνηθεί σε διαγονιδιακά ποντίκια χρησιμοποιώντας κατασκευές που περιέχουν την περιοχή LCR και τα γονίδια της σφαιρίνης στην φυσιολογική τους κατάταξη και απόσταση μεταξύ τους. Αυτό έχει επιτευχθεί με την κατασκευή κοσμιδίων που περιέχουν 70 kb της β-σφαιρίνης (Strouboulis *et al.*, 1992) ή με την χρήση τεχνητών χρωμοσωμάτων σακχαρομύκητα ή yeast artificial chromosomes (YAC) (Peterson *et al.*, 1993; Gaensler *et al.*, 1993; Peterson *et al.*, 1997; Peterson *et al.*, 1997; Porcu *et al.*, 1997; Peterson *et al.*, 1998). Η εισαγωγή μεγάλων τμημάτων DNA με τη μορφή YAC που περιέχουν το σύμπλεγμα της β-σφαιρίνης του ανθρώπου (βΥAC) σε διαγονιδιακά ποντίκια, εμφανίζουν την σωστή αναπτυξιακή ρύθμιση των επιμέρους γονιδίων της σφαιρίνης. Ποντίκια με το βΥAC εκφράζουν β αλλά όχι γ-σφαιρίνη στο ενήλικο στάδιο (Peterson *et al.*, 1993; Gaensler *et al.*, 1993). Η έκφραση των γονιδίων της σφαιρίνης είναι ανεξάρτητη από την θέση ενσωμάτωσής τους και το επίπεδο έκφρασης ανά αντίγραφο γονιδίου, είναι περίπου αντίστοιχο με εκείνο των ενδογενών γονιδίων του ποντικού (Peterson *et al.*, 1998). Αντίθετα, ποντίκια που περιέχουν βΥAC με την σημειακή μετάλλαξη στη θέση -117 (G → A) στον υποκινητή του Αγ γονιδίου, συνεχίζουν να εκφράζουν το Αγ-γονίδιο έως το ενήλικο στάδιο και παρουσιάζουν φαινότυπο Αγ-HPFH. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ένα YAC 248 kb που περιείχε ένα EcoRI τμήμα 230 kb που περιλαμβάνει 82 kb με ολόκληρο το σύμπλεγμα της β-σφαιρίνης από την 5' HS5 έως την 3' HS1 θέση. Επίσης περιελάμβανε 39 kb από την ανοδική αλληλουχία, καθώς και περίπου 109 kb αλληλουχίας καθοδικά του συμπλέγματος της β-σφαιρίνης (Peterson *et al.*, 1993; Peterson *et al.*, 1998). Τα YACs είναι πολύτιμα για την μελέτη της αναπτυξιακής ρύθμισης των γονιδίων λόγω την ευκολία εισαγωγής μεταλλάξεων στο σύμπλεγμα της σφαιρίνης με την χρήση του συστήματος ομόλογου ανασυνδυασμού του σακχαρομύκητα (Peterson *et al.*, 1993b; Peterson *et al.*, 1998). Με αυτό τον τρόπο σημειακές μεταλλάξεις (Peterson *et al.*, 1993a) οι μεταλλάξεις διαφόρων μεγεθών έχουν γίνει πάνω στο β-YAC. Δύο αποσιωπητές που εδράζονται 5' του δ-γονιδίου εντοπίστηκαν κατά την διάρκεια της Διατριβής (Kosteas *et al.*, 1994). Σε συνεργασία με τον K. Peterson οι δύο αποσιωπητές αφαιρέθηκαν από το βΥAC. Η εργασία αυτή βρίσκεται σε εξέλιξη, όπου απουσία των δύο αποσιωπητών αναμένεται έκφραση των γ-γονιδίων στο ενήλικο στάδιο. Ένα πρόβλημα με την χρήση των YACs είναι η τάση ανασυνδυασμού που παρουσιάζουν κατά την διάρκεια της απομόνωσης του DNA ή κατά την διάρκεια της μικροένεσης του στον πυρήνα ωάριου του ποντικού (Peterson *et al.*, 1998). Επομένως τα YACs χρειάζονται προσεκτική ανάλυση ως προς την ακεραιότητα του συμπλέγματος.

**Σχήμα 15.** Το 248 kb β-YAC εμφανίζει την σωστή αναπτυξιακή ρύθμιση των επιμέρους γονιδίων της σφαιρίνης.

Πρόσφατα έχει αναφερθεί εναλλακτικός τρόπος απομόνωσης YAC DNA (Bauchwitz and Constantini 1998) ενώ έχει κατασκευαστεί ένα μικρότερο τροποποιημένο YAC 150 kb το οποίο παρουσιάζει παρόμοια έκφραση με το μεγαλύτερο YAC (Gaensler *et al.*, 1993; Peterson *et al.*, 1998). Το μικρότερο YAC είναι πιο σταθερό και επιπλέον περιέχει μία σπάνια θέση πέψης του ενζύμου SfiI μέσα στον δεξί βραχίονα του, το οποίο ευκολύνει την δομική του ανάλυση (Peterson *et al.*, 1998; Tanimoto *et al.*, 1999). Η χρήση των YACs έχει επεκταθεί για την μελέτη και άλλων συμπλεγμάτων σε διαγονιδιακά ποντίκια. Η τάση όμως του ανασυνδυασμού και ο αργός τρόπος απομόνωσης του YAC DNA με χαμηλή τελική συγκέντρωση έχει οδηγήσει τους ερευνητές σε εναλλακτικές λύσεις όπως αυτή των BACs (Shizuya *et al.*, 1992) καθώς και PACs (Ioannou *et al.*, 1994) τα οποία είναι πιο εύκολα στο χειρισμό τους και χρησιμοποιούνται όλο και πιο συχνά σε μελέτες με το σύμπλεγμα της β-σφαιρίνης (Westphal *et al.*, 1998; Kaufman *et al.*, 1999; Imam *et al.*, 2000; Orford *et al.*, 2000).

### Μεταλλάξεις στην περιοχή LCR

Η αφαίρεση των HS θέσεων από την 70 kb περιοχή του συμπλέγματος έδειξε ότι απαιτείται η περιοχή LCR να είναι άθικτη ώστε να προστατευτεί το σύμπλεγμα από την θέση ενσωμάτωσης του σε περιοχή ετεροχρωματίνης, όπως το κεντρομερίδιο (Milot *et al.*, 1996). Η αφαίρεση της θέσης HS3 από το βYAC μειώνει την έκφραση του ε-γονιδίου σε εμβρυϊκά κύτταρα και την έκφραση του β-γονιδίου στα ερυθροκύτταρα στα ενήλικα διαγονιδιακά ποντίκια, ενώ η αφαίρεση της HS2 προκαλεί μια μικρή μείωση στην έκφραση όλων των ανθρώπινων γονιδίων (Peterson *et al.*, 1996). Μια άλλη στρατηγική είναι η αφαίρεση HS θέσεων από την περιοχή LCR του ποντικού μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Η αφαίρεση των θέσεων HS2 ή HS3 οδήγησε σε ελάχιστη μείωση στην έκφραση του β-γονιδίου (Fiering *et al.*, 1995; Hug *et al.*, 1996). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η περιοχή LCR περιέχει ένα πλεόνασμα από λειτουργικά στοιχεία και ότι ο σχηματισμός του συμπλέγματος LCR δεν απαιτεί όλες της HS θέσεις (Peterson *et al.*, 1996; Fiering *et al.*, 1995; Hug *et al.*, 1996).

### Μεταλλάξεις στα κύρια στοιχεία των HS θέσεων

Σε αντίθεση με την αφαίρεση μεγάλων περιοχών που περιέχουν κάποια HS θέση, σημαντικές φαινοτυπικές συνέπειες παρουσιάζονται όταν αφαιρούνται η κύριες περιοχές των επιμέρους HS θέσεων από το βYAC. Αρχικά είχε αναφερθεί ότι η αφαίρεση 200 έως 300 bp από το κύριο στοιχείο των θέσεων HS3 και HS4 ήταν καταστροφικές για την έκφραση των γονιδίων της σφαιρίνης σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης (Bungert *et al.*, 1995). Μια παρόμοια εικόνα παρατηρείται μετά από την αφαίρεση της HS2 θέσης (Bungert *et al.*, 1999). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η κύριες HS θέσεις αλληλεπιδρούν μεταξύ τους για την δημιουργία ενός ολοσυμπλέγματος (holocomplex). Όταν καταστραφεί μία από της HS θέσεις τότε ολόκληρο το LCR σύμπλεγμα δυσλειτουργεί (Bungert *et al.*, 1995). Πρόσφατες μελέτες με λεπτομερές δομικές αναλύσεις σε μεταλλαγμένα YACs παρουσιάζουν μία διαφορετική εικόνα. Η αφαίρεση 250 bp από το κύριο στοιχείο της θέσης HS4 έδειξε να μην επηρεάζει την έκφραση των ε- και γ-γονιδίων σε εμβρυϊκά κύτταρα με μόνο μία μικρή μείωση στην έκφραση του β-γονιδίου στα ενήλικα κύτταρα (Navas *et al.*, 2000). Η καταστροφική μείωση της έκφρασης που παρατηρήθηκε στην προηγούμενη μελέτη, ενδεχομένως να οφείλεται σε ανασυνδυασμό του YAC DNA. Αντίθετα όμως, η αφαίρεση του κύριου HS3 στοιχείου δημιουργεί ένα ειδικό φαινότυπο με την απουσία έκφρασης του ε-γονιδίου με φυσιολογική έκφραση του γ-γονιδίου σε εμβρυϊκά κύτταρα αλλά την πλήρη απουσία έκφρασης του γ-γονιδίου στα κύτταρα του εμβρυϊκού ήπατος (Navas *et al.*, 1998). Η έκφραση του β-γονιδίου σε αυτά τα ποντίκια επηρεάζεται από την θέση ενσωμάτωσης του. Επομένως φαίνεται ότι η θέση HS3 είναι απαραίτητη για την μεταγραφή του ε-γονιδίου

σε εμβρυϊκά κύτταρα και για την μεταγραφή του  $\gamma$ -γονιδίου στα κύτταρα του ήπατος. Σε μία πρόσφατη μελέτη σε βYAC αφαιρέθηκε η κύρια αλληλουχία της HS2 και αντικαταστάθηκε από την HS3. Η HS3 είχε την ικανότητα να διατηρήσει την ανοικτή δομή χρωματίνης αλλά δεν μπορούσε να αναπληρώσει την μοναδική υψηλή έκφραση που προσδίδει η HS2 (Bungert *et al.*, 1999). Σε άλλη μελέτη αντικαταστάσεις στις κύριες θέσεις HS2, HS3 και HS4 χρησιμοποιήθηκε ένας μεταλλαγμένος ενισχυτής (F101) του ιού πολυόμα (polyoma virus enhancer, PyE) ο οποίος είναι λειτουργικός κατά την διάρκεια της αιμοποίησης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν δημιουργείτε λειτουργική περιοχή LCR και επομένως δεν παρατηρήθηκε έκφραση των γονιδίων. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι οι κύριες ρυθμιστικές HS θέσεις έχουν την ικανότητα διαμόρφωσης λειτουργικής LCR περιοχής που δεν μπορούν να αντικατασταθούν από άλλους ενισχυτές *in vivo* (Tanimoto *et al.*, 1999). Τα αποτελέσματα αυτά καθώς και άλλες μελέτες (Fraser *et al.*, 1993) παρουσιάζουν στοιχεία για την αναπτυξιακή εξειδίκευση των HS θέσεων προς τα γονίδια της σφαιρίνης.

### Η ρυθμιστική HS-40 περιοχή της $\alpha$ -σφαιρίνης

Όπως τα γονίδια της  $\beta$ -σφαιρίνης, έτσι και τα γονίδια της  $\alpha$ -σφαιρίνης παρουσιάζουν ιστό-ειδική έκφραση κατά την διάρκεια της ανάπτυξης. Παρόλο όπως την κοινή τους προέλευση και ομοιότητες στην έκφραση τους υπάρχουν αρκετές διαφορές στους μηχανισμούς που ελέγχουν την έκφραση τους. Το σύμπλεγμα της  $\alpha$ -σφαιρίνης απέχει μικρή απόσταση (170 έως 340 kb) από το τελομερίδιο του χρωμοσώματος 16 (Wilkie *et al.*, 1991) και βρίσκεται σε διαφορετικό περιβάλλον χρωματίνης από αυτό της  $\beta$ -σφαιρίνης (Higgs *et al.*, 1995; Higgs *et al.*, 1998). Μερικές από τις χρωμοσωμικές διαφορές που αναφέρθηκαν (Πίνακας 1) ήταν ότι η περιοχή της  $\alpha$ -σφαιρίνης έχει υψηλό ποσοστό σε περιεχόμενο GC (54%), έχει μεγάλη συγκέντρωση από επαναληπτικές αλληλουχίες Alu (26% της συνολικής αλληλουχίας) και αρκετές CpG νησίδες (Flint *et al.*, 1997; Vyas *et al.*, 1992; Higgs *et al.*, 1989). Σε ένα συνεχές τμήμα των 300 kb το οποίο περιέχει το σύμπλεγμα, της  $\alpha$ -σφαιρίνης, έχει αναλυθεί η πρωτοταγής του δομή (Flint *et al.*, 1997). Τέσσερα ευρέως εκφραζόμενα γονίδια υπάρχουν μεταξύ του συμπλέγματος της  $\alpha$ -σφαιρίνης και του τελομεριδίου, ενώ άλλα πέντε γονίδια υπάρχουν στην κεντρομερή περιοχή της  $\alpha$ -σφαιρίνης. Ένα μεγάλο τμήμα από της 300 kb βρίσκεται με ανοικτή δομή της χρωματίνης (Vyas *et al.*, 1992; 497 Craddock *et al.*, 1995). Αρκετές ερυθροειδικές HS θέσεις βρίσκονται ανοδικά από το  $\alpha$ -σύμπλεγμα της σφαιρίνης μέσα σε ενεργό δομή χρωματίνης. Η υπερευαίσθητη θέση HS-40 είναι το κύριο λειτουργικό στοιχείο που σχετίζεται με την ρύθμιση της  $\alpha$ -σφαιρίνης και εντοπίζεται μέσα στο εξόνιο ενός ευρέως εκφραζόμενου γονιδίου (Higgs *et al.*, 1990; Sharpe *et al.*, 1992; Vyas *et al.*, 1992).

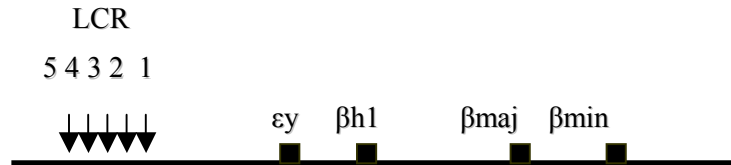
Αρκετά πειράματα έχουν γίνει τα οποία έχουν καθιέρωση την HS-40 ως το κύριο ρυθμιστικό στοιχείο του συμπλέγματος της  $\alpha$ -σφαιρίνης. Αρκετές μεταλλάξεις έχουν περιγραφεί που αφαιρούν τις ανοδικές αλληλουχίες που αφήνουν άθικτο το σύμπλεγμα όμως δεν εκφράζονται τα συνδεδεμένα γονίδια (Higgs *et al.*, 1995; Higgs *et al.*, 1998; Higgs *et al.*, 1989; Romeo *et al.*, 1991; Hatton *et al.*, 1990). Όταν το  $\zeta$ - ή το  $\alpha$ -γονίδιο εισάγονται σε MEL κύτταρα, η έκφραση του  $\alpha$ -γονιδίου δεν ανιχνεύεται ή υπάρχει σε πολύ χαμηλά επίπεδα, ενώ ψηλά επίπεδα  $\alpha$  mRNA παρατηρούνται όταν συνδέεται με την περιοχή HS-40 (Higgs *et al.*, 1990). Η αφαίρεση μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού μιας περιοχής 1 kb που περιλαμβάνει την HS-40 από το ανθρώπινο χρωμόσωμα 16 που βρίσκεται σε MEL κύτταρα, οδηγεί σε δραστική μείωση στην έκφραση των  $\alpha$ -γονιδίων (Bernet *et al.*, 1995). Σε διαγονιδιακά ποντίκια τα  $\alpha$ -γονίδια απουσία της HS-40 δεν εκφράζονται, αλλά εκφράζονται με ερυθροποιητική εξειδίκευση όταν είναι συνδεδεμένα με την HS-40 (Higgs *et al.*, 1990; Filipe *et al.*, 1999; Hanscombe *et al.*, 1989). Επομένως, η HS-40 δρα ως ένας ισχυρός ερυθροποιητικός ενισχυτής σε συνδεδεμένα γονίδια (Higgs *et al.*, 1990; Sharpe *et al.*, 1992; Ren *et al.*, 1993; Pondel *et al.*, 1992). Αντιθέτως όμως όταν τα γονίδια της  $\alpha$ -σφαιρίνης είναι συνδεδεμένα με την περιοχή LCR της  $\beta$ -σφαιρίνης, παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση. Η έκφραση μειώνεται περαιτέρω με την ανάπτυξη και δεν εξαρτάται από τον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου. Σε αντίθεση με της μεταλλάξεις της LCR της  $\beta$ -σφαιρίνης, μεταλλάξεις της HS-40 δεν επηρεάζουν την μεθυλίωση του DNA, ούτε την ευαισθησία σε DNase I, αλλά και ούτε στην δημιουργία υπερευαίσθητων θέσεων στους υποκινητές των  $\alpha$ -γονιδίων (Craddock *et al.*, 1995; Bernet *et al.*, 1995). Η περιοχή HS-40 φαίνεται ότι δρα όπως εκείνη της HS2 της  $\beta$ -σφαιρίνης αντί της

περιοχής LCR. Παρόμοια *in vitro* και *in vivo* πειράματα αποτύπωσης, με της HS θέσεις του βLCR, (Jarman *et al.*, 1991; Strauss *et al.*, 1992; Rombel *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1995) έχουν δείξει ότι το κεντρικό λειτουργικό τμήμα της HS-40 περιέχεται σε μία περιοχή 300 bp που περιλαμβάνει διάφορες θέσεις δεσμεύσεις για διάφορους παράγοντες όπως GATA-1, NFE-2/AP1 και GT πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνοι για την ενεργοποιητική της δράση (Σχήμα 14).

Αναλυτικές μελέτες έχουν δείξει ότι μετάλλαξη της πλησιέστερης GATA-1 θέσης μειώνει κατά 40% την δράση της HS-40. Οι μεταλλάξεις των 5'NF-E2/AP1, 3'NF-E2/AP1, GT και της μεσαίας GATA-1 που περιλαμβάνονται σε μία περιοχή 110 bp, μειώνει την έκφραση του α-γονιδίου κατά 50 έως 90% σε σταθερή διαμόλυνση K562 ερυθροκυττάρων (Wen *et al.*, 2000). Η μετάλλαξη μίας βάσης στην 3' NF-E2/AP1 θέση που καταστρέφει την σύνδεση του παράγοντα NF-E2 αλλά όχι του παράγοντα AP1, μειώνει την λειτουργία του υποκινητή του ζ-γονιδίου σε ερυθροκύτταρα (Zhang *et al.*, 1995). Οι δύο κοντινές NF-E2 θέσεις στην HS-40 (Zhang *et al.*, 1993; Jarman *et al.*, 1991; Strauss *et al.*, 1992; Rombel *et al.*, 1995) έχουν τον ίδιο ρόλο με αυτές της HS2 που είναι να ενεργοποιούν την γονιδιακή έκφραση (Zhang *et al.*, 1993). Έχει προταθεί ένα μοντέλο όπου αυτή η μείωση ρυθμίζεται μέσω των ανταγωνισμό μεταξύ της AP1 και NF-E2 (Wen *et al.*, 2000). Προς το παρόν όμως δεν είναι γνωστό ποιες αλληλουχίες της α-σφαιρίνης είναι απαραίτητες για τη συνεχή και υψηλή έκφραση των γονιδίων της α-σφαιρίνης. Πολλαπλές μελέτες χρησιμοποιώντας διαγονιδιακά ποντίκια με 70 kb κοσμίδια (Gordon *et al.*, 1994) ή 150 kb PACs (Higgs *et al.*, 1995) δεν έχουν εντοπίσει τέτοιες αλληλουχίες. Μία πιθανότητα είναι ότι αλληλουχίες μετά το σύμπλεγμα της α-σφαιρίνης να είναι απαραίτητες για να διατηρούν λειτουργικά τα γονίδια είτε όπως η δράση της HS-40 είτε ως στοιχείο μόνωσης. Πρόσφατα έχει αναφερθεί μία νέα μετάλλαξη που αφαιρεί 18.3 kb από το 3' άκρο του συμπλέγματος και ως αποτέλεσμα τα γονίδια της α-σφαιρίνης δεν εκφράζονται (Barbour *et al.*, 2000). Κανένα νέο ρυθμιστικό στοιχείο όμως δεν βρέθηκε στην διαμετάθεση περιοχή και ενδεχομένως ο φαινότυπος να οφείλεται στην παρουσία των αλληλουχιών Alu. Έχει προταθεί ότι οι αλληλουχίες Alu μπορούν από μόνες τους να δημιουργήσουν μία κατασταλτική δομή χρωματίνης (Barbour *et al.*, 2000). Πιθανός όμως η περιοχή που αφαιρείται να περιέχει κάποιο στοιχείο απομόνωσης το οποίο φυσιολογικά να προστατεύει το σύμπλεγμα από την καταστολή.

## Μοριακή μηχανισμοί που ρυθμίζουν την μεταστροφή της αιμοσφαιρίνης

Η ανάλυση της αναπτυξιακής έκφρασης των γονιδίων της σφαιρίνης του ανθρώπου σε διαγονιδιακά ποντίκια έχει βοηθήσει στην κατανόηση των μηχανισμών που συμμετέχουν στην μεταστροφή της αιμοσφαιρίνης. Το ποντίκι θεωρητικά δεν είναι το ιδανικό σύστημα μελέτης διότι έχει μόνο μία μεταστροφή αυτή από τα πρώιμα εμβρυϊκά στα όνιμα εμβρυϊκά/ενήλικα κύτταρα.



**Σχήμα 16.** Το σύμπλεγμα της β-σφαιρίνης του ποντικού.

Αρχικά τα εμβρυϊκά  $\epsilon\gamma$  και  $\beta h1$  γονίδια εκφράζονται σε αρχέγονα κύτταρα που προέρχονται από τον αμνιακό σάκο. Ακολουθεί μία μεταστροφή στα ενήλικα β-γονίδια ξεκινώντας από της 10.5 ημέρες στο εμβρυϊκό ήπαρ. Τα δύο συμπλέγματα όμως έχουν παρόμοια γονιδιακή οργάνωση εν σχέση με την περιοχή LCR και ενδεχομένως θα ρυθμίζονται από τους ίδιους μηχανισμούς (Engel and Tanimoto, 2000). Τα ανθρώπινα  $\gamma$  και  $\beta$ -γονίδια απουσία της περιοχής LCR, εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα όταν εισάγονται σε διαγονιδιακά ποντίκια, αλλά παρουσιάζουν ιστική και αναπτυξιακή εξειδίκευση (Behringer *et al.*, 1987; Kollias *et al.*, 1987; Kollias *et al.*, 1986; Trudel *et al.*, 1987; Trudel *et al.*, 1987; Townes *et al.*, 1985; Constantini *et al.*, 1985). Η έκφραση των  $\gamma$ - και  $\beta$ -γονιδίων περιορίζεται σε ερυθροποιητικά κύτταρα και οι αλληλουχίες που βρίσκονται δίπλα από τα γονίδια φαίνεται ότι περιέχουν στοιχεία υπεύθυνα για κάθε στάδιο. Μετά από την ανακάλυψη της περιοχής LCR (Grosveld *et al.*, 1987) το κύριο ερώτημα ήταν πως ελέγχεται η αναπτυξιακή ρύθμιση των γονιδίων από αυτό το ισχυρό ρυθμιστικό στοιχείο. Περαιτέρω μελέτες από αρκετά εργαστήρια οδήγησαν στην ανάπτυξη ενός διπλού μηχανισμού υπεύθυνου για την ρύθμιση της μεταστροφής της αιμοσφαιρίνης, την αποσιωποποίηση γονιδίων και τον ανταγωνισμό μεταξύ τους.

## Η αποσιωποποίηση των γονιδίων της σφαιρίνης

Διαγονιδιακά ποντίκια που περιέχουν το πρώιμο εμβρυϊκό  $\epsilon$ -γονίδιο με 2 kb 5' και 150 bp 3' αλληλουχίες, δεν εξέφρασαν το  $\epsilon$ -γονίδιο σε κανένα από τα στάδια της ανάπτυξης. Η σύνδεση όμως της περιοχής mLCR με το  $\epsilon$ -γονίδιο προσδίδει υψηλού επιπέδου έκφραση στα αρχέγονα ερυθροκύτταρα από των αμνιακό σάκο, αλλά σε χαμηλότερα επίπεδα από το  $\epsilon\gamma$  γονίδιο του ποντικού (Raich *et al.*, 1990; Shih *et al.*, 1990). Αυτό το αποτέλεσμα υποδηλώνει ότι το  $\epsilon$ -γονίδιο ρυθμίζεται αυτόνομα. Όταν αφαιρέθηκαν αλληλουχίες που περιέχουν ένα δυνητικό αποσιωπητή (Cao *et al.*, 1989) από το  $\epsilon$ -γονίδιο (Raich *et al.*, 1992) η έκφραση παρατηρήθηκε σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης αλλά σε χαμηλά επίπεδα. Το ζ-γονίδιο ρυθμίζεται αυτόνομα (Sabath *et al.*, 1993; Albitar *et al.*, 1991; Pondel *et al.*, 1996) αλλά η αφαίρεση έως 128 bp στον υποκινητή του (Sabath *et al.*, 1993) δεν έδειξε να υπάρχει κάποιος αποσιωπητής όπως εκείνου του  $\epsilon$ -γονιδίου. Το  $\alpha$ -γονίδιο χρειάζεται στοιχεία από το β-LCR ή το HS-40 από την  $\alpha$ -σφαιρίνη ώστε να εκφραστεί σε διαγονιδιακά ποντίκια. Όταν στην μικροένεση συμπεριλαμβάνετε και ένα μικρότερο β-LCR, τότε το  $\alpha$ -γονίδιο δεν εκφράζεται στην ένατη μέρα της ανάπτυξης αλλά στην ενδέκατη (Albitar *et al.*, 1991). Όταν συνδέεται με την β-LCR και το β-γονίδιο, τότε το  $\alpha$ -γονίδιο είδη εκφράζεται στην ένατη μέρα της ανάπτυξης (Hanscombe *et*

*al.*, 1989) και σε αυξημένα επίπεδα στην ενδέκατη ημέρα. Παρόλο που αυτά τα αποτελέσματα δεν είναι συμβατά, υποδηλώνουν όμως ότι το α-γονίδιο έχει κάποια αυτόνομη ρύθμιση.

Το γ-γονίδιο σιγεί ή εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα σε ενήλικα διαγονιδιακά ποντίκια όταν συνδέεται με την περιοχή LCR (Dillon *et al.*, 1991; Enver *et al.*, 1989; Enver *et al.*, 1990; Behringer *et al.*, 1990) υποδηλώνοντας ότι έλεγχος της έκφρασης του γ-γονιδίου είναι αυτόνομος. Ο υποκινητής του γ-γονιδίου συμμετέχει στην ρύθμιση, διότι μεταλλάξεις που προκαλούν μη ελλειμματική HPFH προκαλούν υψηλά επίπεδα με συνεχή έκφραση του γ-γονιδίου σε ενήλικα ποντίκια (Berry *et al.*, 1992; Ronchi *et al.*, 1996; Peterson *et al.*, 1995). Η φυσιολογική σιγή του Αγ-γονιδίου σε διαγονιδιακά ποντίκια, χάνεται όταν στην κατασκευή προστεθεί και ο ενισχυτής που βρίσκεται 3' από το σημείο αποκοπής του ελλείμματος της HPFH-1 (Arcasoy *et al.*, 1997) ή ο ενισχυτής που βρίσκεται 3' από το σημείο αποκοπής του ελλείμματος της HPFH-3 (Anagnou *et al.*, 1995). Πειράματα που βρίσκονται σε εξέλιξη στο εργαστήριο μας, ελέγχουν με παρόμοιες κατασκευές (Katsantoni *et al.*, 2000) τους ενισχυτές HPFH-6 (Kosteas *et al.*, 1991) και HPFH-2 (McArthur and Anagnou, 1998) που εντοπίστηκαν 3' του σημείου αποκοπής τους. Η προσπάθειες για να εντοπιστούν αλληλουχίες ή/και πρωτεΐνες που να συμμετέχουν στην αποσιώπηση.

Το β-γονίδιο δεν σιγεί στον εμβρυϊκό στάδιο της ανάπτυξης, αλλά ενεργοποιείται αμέσως μετά από την σύνδεση του με την περιοχή LCR (Enver *et al.*, 1990; Behringer *et al.*, 1990) επομένως δεν φαίνεται ότι είναι υπό αυτόνομο έλεγχο. Αντίθετα, χρειάζεται την παρουσία επιπλέον γονιδίων για να παραμείνει σιωπηλό στο εμβρυϊκό στάδιο.

## Ανταγωνισμός μεταξύ γονιδίων

Η ανακάλυψη ότι για να παραμείνει σιωπηλό το β-γονίδιο χρειάζεται την παρουσία του γ-γονιδίου στην φυσιολογική τους κατάταξη, οδήγησε στην ιδέα ότι η ρύθμιση του β-γονιδίου γίνεται μέσω ανταγωνισμού με τα γ-γονίδια (Enver *et al.*, 1990; Behringer *et al.*, 1990; Stamatoyannopoulos 1991; Hanscombe *et al.*, 1991). Είχε προταθεί ότι η πιθανότητα για να αλληλεπιδράσει η περιοχή LCR είτε με τον υποκινητή του γ-γονιδίου ή με τον υποκινητή του β-γονιδίου, καθορίζεται κυρίως από το *trans*-δραστικό περιβάλλον. Το γονίδιο που βρίσκετε πιο κοντά ανταγωνίζεται για την LCR και είναι αυτό που εκφράζεται, ενώ το άλλο γονίδιο εμφανίζει σιγή. Στο πρώιμο εμβρυϊκό στάδιο, η LCR, αλληλεπιδρά με το ε-γονίδιο. Στο όψιμο εμβρυϊκό στάδιο, το ε-γονίδιο εμφανίζει σιγή και η περιοχή LCR αλληλεπιδρά με τα Gγ και Αγ γονίδια. Στον ενήλικο, τα εμβρυϊκά γ-γονίδια σιγούν, και η LCR αλληλεπιδρά με το μόνο διαθέσιμο β-γονίδιο. Η ιδέα ότι υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ των γονιδίων είχε αναφερθεί νωρίτερα από πειράματα διαμόλυνσης με γονίδια αναφοράς (Wasylyk *et al.*, 1983; de Villiers *et al.*, 1983) και με τα γονίδια της σφαιρίνης του κοτόπουλου (Choi *et al.*, 1988).

Ο ανταγωνιστικός μηχανισμός προσφέρει μία απλή λύση για το δεδομένο ότι τα α- και β-συμπλέγματα διατηρούνται σε ισορροπία κατά την διάρκεια της ανάπτυξης. Ο ανταγωνισμός εξασφαλίζει ότι το προϊόν που χάνετε από την σιγή των πρώτων γονιδίων αυτόματα αντικαθίσταται από το επόμενο γονίδιο. Πολύ καλές αποδείξεις για τον ανταγωνιστικό μηχανισμό υπάρχουν από μελέτες από μη ελλειμματικές HPFH που δείχνουν ότι η αύξηση των γ-αλυσίδων ισορροπεί με μείωση των β-αλυσίδων από το γονίδιο *in cis*, αλλά όχι από αυτό *in trans* (Gigliani *et al.*, 1984).

Πειράματα που αφορούσαν μεταβολές στην απόσταση μεταξύ των γονιδίων (Hanscombe *et al.*, 1991; Peterson *et al.*, 1993) οδήγησαν στην πρόταση ότι η πλησιέστερη θέση προς την LCR είναι ένας σημαντικός παράγοντας για την ικανότητα του γονιδίου να ανταγωνίζεται. Η εισαγωγή ενός δεύτερου β-γονιδίου ( $\beta^m$ ) στο σύμπλεγμα της σφαιρίνης έδειξε ότι ο ανταγωνισμός επικρατεί σε όλο το σύμπλεγμα και ότι το β-γονίδιο ήδη εκφράζεται από το πρώιμο εμβρυϊκό στάδιο όταν τοποθετείτε κοντά στην περιοχή LCR (Dillon *et al.*, 1997; Peterson 2000). Σε μία άλλη μελέτη, αναστράφη ολόκληρη η περιοχή του β-συμπλέγματος εν σχέση με την περιοχή LCR. Αποτέλεσμα είναι να παρατηρείτε πρώτα η έκφραση του β-γονιδίου, μία ανατροπή στην σχετική έκφραση των γ-γονιδίων καθώς και η απώλεια έκφρασης του ε-γονιδίου. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν και συμφωνούν με τα παραπάνω, ότι τα πλησιέστερα γονίδια στην LCR εκφράζονται κατά προτίμηση και ότι η έκφραση του β-γονιδίου στα πρώιμα στάδια αποτρέπει από τον ανταγωνιστικό πλεονέκτημα που έχουν τα ε και γ-γονίδια (Tanimoto *et al.*, 1999).

Επόμενος, ένας διπλός μηχανισμός φαίνεται ότι λειτουργεί στο σύμπλεγμα ώστε να επιτευχθεί ιστό-ειδική έκφραση, με τον κύριο μηχανισμό να είναι η αυτόνομη σιγή κυρίως στα πρώτα γονίδια και ο δεύτερος μηχανισμός να είναι αυτός του ανταγωνισμού.

## Μηχανισμοί ρύθμισης των γονιδίων

Το δεδομένο ότι ένας διπλός μηχανισμός ελέγχει την μεταστροφή της αιμοσφαιρίνης έχει μεταφέρει το ενδιαφέρον ώστε να κατανοηθεί ο τρόπος με τον οποίο η περιοχή LCR ρυθμίζει τα γονίδια από απόσταση. Τα αποτελέσματα από διάφορους χειρισμούς του ανθρώπινου συμπλέγματος της σφαιρίνης έχουν δείξει ότι υπάρχει μία απόσταση που είναι απαραίτητη μεταξύ το γονίδιο και την LCR που επηρεάζει τη συχνότητα της μεταγραφής (Dillon *et al.*, 1997; Peterson 2000). Επίσης έχουν δείξει ότι τα γονίδια που είναι στο ίδιο χρωμόσωμα είναι ανεξάρτητα και δεν μεταγράφονται σε στοχαστικό τρόπο, δηλαδή μόνο ένα γονίδιο μεταγράφεται ανά πάσα στιγμή (Wijgerde *et al.*, 1995; Gribnau *et al.*, 1998). Ο ανταγωνισμός είναι δύσκολο να εξηγηθεί από τους προτεινόμενους μηχανισμούς για την δράση των λειτουργικών περιοχών που υπάρχουν σε απόσταση. Τρία διαφορετικά μοντέλα i) το μοντέλο δημιουργίας αγκύλης (looping), ii) το μοντέλο της παρακολούθησης (tracking), καθώς και iii) το μοντέλο δυαδικής ενεργοποίησης (binary activation) έχουν προταθεί για να εξηγήσουν της διαθέσιμες πειραματικές πληροφορίες (Fraser *et al.*, 1998) ενώ πρόσφατα έχει προταθεί και το μοντέλο σύνδεσης (linking) (Bulger and Groudine, 1999). Αποδεκτό από όλα τα μοντέλα είναι ότι η περιοχή LCR συμμετέχει στην διαμόρφωση ανοικτής δομής χρωματίνης του συμπλέγματος.

Το μοντέλο **looping** προτείνει ότι η έναρξη της μεταγραφής ενεργοποιείται από την αλληλεπίδραση της LCR με τα γονίδια μέσω της δημιουργίας αγκύλης του DNA. Δεν είναι εμφανές πως πραγματοποιείται αυτή η αλληλεπίδραση, δηλαδή εάν τα κεντρικά στοιχεία των HS θέσεων από την περιοχή LCR δημιουργούν ένα ολοσύμπλεγμα (holocomplex) (Hanscombe *et al.*, 1991; Wijgerde *et al.*, 1995; Ellis *et al.*, 1996; Fraser *et al.*, 1998;) που αλληλεπιδρά ως μία μονάδα με το γονίδιο ή εάν ένα διαφορετικό τμήμα από την LCR θα αλληλεπιδράσει με άλλες ρυθμιστικές αλληλουχίες που βρίσκονται μέσα ή κοντά στο γονίδιο. Η έναρξη της μεταγραφής θα συνέβαινε μόνο όσο επικρατεί η αλληλεπίδραση και υποδηλώνει ότι το επίπεδο της μεταγραφής των γονιδίων της σφαιρίνης θα είναι αποτέλεσμα το πόσο συχνά η περιοχή LCR θα αλληλεπιδρά με κάθε γονίδιο και πόσο σταθερή θα είναι μία τέτοια αλληλεπίδραση. Με αυτό τον τρόπο, το μοντέλο εξηγεί τον ανταγωνισμό μεταξύ των υποκινητών καθώς και την απαιτούμενη απόσταση για την λειτουργία της LCR. Μια πρόσφατη μελέτη έχει δείξει ότι ο παράγοντας Bach1 αλληλεπιδρά με διάφορα *cis*- ρυθμιστικά στοιχεία όπως τα MAREs τα οποία είναι γνωστά όπως προαναφέρθηκε και ως θέσεις δέσμευσης για τον παράγοντα NF-E2, οι οποίες υπάρχουν στις θέσεις HS4, HS3 και HS2. Χρησιμοποιώντας μια 10.4 kb LCR περιοχή ο παράγοντας Bach1 βρέθηκε ότι δημιουργεί αγκύλες στο DNA έως και 4.1 kb κυρίως με την HS2 υποδηλώνοντας ότι ενδεχομένως να συμμετέχει στην λειτουργία της LCR (Yoshida *et al.*, 1999).



**Σχήμα 17.** Το μοντέλο της δημιουργίας αγκύλης (looping) είναι το πιο αποδεκτό ως προς τον τρόπο με τον οποίο η περιοχή LCR ρυθμίζει τα γονίδια από απόσταση.

Το μοντέλο **tracking** προτείνει ότι η περιοχή LCR και κυρίως η HS2 λειτουργεί ως θέση εισαγωγής ορισμένων παραγόντων (πολυμεράση II) στο μεταγραφικό σύμπλοκο που κατευθύνετε κατά μήκος του DNA έως ότου φθάσει σε κάποιο γονίδιο και να αρχίσει η έναρξη της μεταγραφής. Αυτό δίνει πλεονέκτημα στα κοντινά γονίδια έναντι αυτών που βρίσκονται πιο μακριά (Herendeen *et al.*, 1992; Tuan *et al.*, 1992; Kong *et al.*, 1997). Όπως και σε όλα τα μοντέλα η LCR παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία λειτουργικής δομής χρωματίνης.

Το μοντέλο **binary activation** υποδηλώνει ότι ο μοναδικός ρόλος της LCR είναι να ανοίγει την δομή της χρωματίνης. Όταν το σύμπλεγμα είναι ενεργοποιημένο κάθε γονίδιο έχει την ικανότητα σύνδεσης του με μεταγραφικούς παράγοντες με στοχαστικό τρόπο. Αυτό υποδηλώνει ότι το κάθε γονίδιο θα λειτουργεί ανεξάρτητα από το άλλο και ότι ο ανταγωνισμός δεν θα συνέβη. Αυτό το μοντέλο δεν εξηγεί την απαραίτητη απόσταση και τον ανταγωνισμό μεταξύ των υποκινητών. Για τον λόγο αυτό άλλος ένας παράγοντας έχει προταθεί και αναφέρει ότι τα πλησιέστερα γονίδια έχουν πλεονέκτημα έναντι τα γονίδια που βρίσκονται σε απόσταση. Ενδεχομένως η μεταγραφή των πλησιέστερων γονιδίων οδηγεί σε άγνωστες ως τώρα αλλαγές που αποτρέπουν την μεταγραφή των άλλων γονιδίων (Groudine *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1996).

Μία μελέτη ανταγωνισμού που προαναφέρθηκε μεταξύ των  $\gamma$ - και  $\beta$ -γονιδίων σε EKLF<sup>+/-</sup> ποντίκια, έδειξε ότι η μειωμένη συγκέντρωση του παράγοντα EKLF οδηγεί σε μειωμένη έκφραση του  $\beta$ -γονιδίου και αμοιβαία αύξηση του  $\gamma$ -γονιδίου (Wijgerde *et al.*, 1996). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε αντίθεση με τα μοντέλα tracking και binary activation κυρίως γιατί τα μοντέλα αυτά δεν εξηγούν πως η μεταγραφή ενός καθοδικού 3' γονιδίου προκαλεί αμοιβαία αλλαγή στην έκφραση ενός ανοδικού γονιδίου (Fraser *et al.*, 1999).

Το μοντέλο **linking** υποστηρίζει ότι σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο προσδένονται στο σύμπλεγμα διάφοροι παράγοντες μαζί με διευκολυντές (facilitators) που είναι χρωμοσωμικοί παράγοντες με παράλληλη δράση ενισχυτού και LCR. Μαζί δημιουργούν μία γέφυρα από την περιοχή LCR έως το γονίδιο. Το μοντέλο αυτό όμως δεν διευκρινίζει πώς επιλέγεται να εκφραστή, δηλαδή το  $\beta$ - έναντι του  $\gamma$ -γονιδίου. (Bulger and Groudine, 1999; Engel and Tanimoto, 2000).

Τα αποτελέσματα από διάφορους χειρισμούς του ανθρώπινου συμπλέγματος της σφαιρίνης εξηγούνται καλύτερα με ένα μοντέλο looping όπου η σταθερότητα των αλληλεπιδράσεων είναι σημαντικές για την αναπτυξιακή ρύθμιση με επίσης βασικό ρόλο για παράγοντες καταστολής που θα αποσταθεροποιούν της αλληλεπιδράσεις. Η θέση των γονιδίων εν σχέση με την LCR παίζει δευτερεύοντα ρόλο και διατηρεί την ισορροπία μεταξύ τα διάφορα γονίδια της σφαιρίνης διασφαλίζοντας μια συνεχή παραγωγή ώστε να είναι σε ισορροπία με τα γονίδια του  $\alpha$ -συμπλέγματος.

## Κυτταρικά υβρίδια

Τα σωματικά κυτταρικά υβρίδια που προέρχονται από την σύντηξη μεταξύ ερυθρολευχαιμικά κύτταρα ποντικού (MEL) και λεμφοκύτταρα ετεροζυγώτη έχουν την ικανότητα μετά από επαγωγή να πολλαπλασιάζονται και να διαφοροποιούνται. Υπάρχει ταχύς διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων μετά από την σύντηξη ώστε μετά από αρκετούς κύκλους καλλιέργειας μόνο μερικά χρωμοσώματα διατηρούνται από τα υβρίδια. Ένα ειδικό ανθρώπινο χρωμόσωμα μπορεί να διατηρηθεί εάν χρησιμοποιηθεί θρεπτικό υλικό επιλογής για αυτό το χρωμόσωμα. Δεν υπάρχουν συνθήκες επιλογής για τα υβρίδια με το χρωμόσωμα 11. Ένα

εναλλακτικό σύστημα βασίζεται στην ανίχνευση με ανοσοχημεία του αντιγόνου 53/6 που σχετίζεται με το χρωμόσωμα 11 και με θρεπτικό υλικό επιλογής. Τα κυτταρικά υβρίδια διατηρούνται με εμπλουτισμό για το αντιγόνο με FACS ή με ανοσοπροσκόλληση (panning) (Parayannopoulou *et al.*, 1986). Στην περίπτωση που το ανθρώπινο χρωμόσωμα 11 που μεταφέρεται στα MEL κύτταρα προέρχεται από ενήλικα ερυθροκύτταρα ή μη-ερυθροποιητικά κύτταρα, τότε μόνο το β-γονίδιο ενεργοποιείται (Willing *et al.*, 1979; Pyati *et al.*, 1980; Ley *et al.*, 1984; Chiang *et al.*, 1984; Takegawa *et al.*, 1986) το ανθρώπινο όψιμο εμβρυϊκό γονίδιο της σφαιρίνης δεν εκφράζεται σε αυτά τα υβρίδια. Υπάρχει όμως έκφραση του γ-γονιδίου όταν το ανθρώπινο χρωμόσωμα 11 προέρχεται από ανθρώπινο εμβρυϊκό κύτταρο που παράγει γ-σφαιρίνη (Parayannopoulou *et al.*, 1985). Ανθρώπινη γ-σφαιρίνη παράγεται και όταν το μεταφερόμενο σύμπλεγμα της σφαιρίνης περιέχει μετάλλαξη τύπου HPFH (Parayannopoulou *et al.*, 1988). Επομένως, υβρίδια που περιέχουν μία μετάλλαξη τύπου ΑγΓγ HPFH παράγουν Γγ και Αγ σφαιρίνη, ενώ αυτά που περιέχουν την μετάλλαξη -117 Αγ HPFH παράγουν Αγ και β-σφαιρίνη (Parayannopoulou *et al.*, 1988).

Τα πιο ενδιαφέροντα αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί από την σύντηξη MEL κυττάρων με ανθρώπινους εμβρυϊκούς ερυθροβλάστες (Parayannopoulou *et al.*, 1986). Τέτοια υβρίδια παράγουν μόνο ή κυρίως ανθρώπινη εμβρυϊκή σφαιρίνη. Ενδεχομένως το ανθρώπινο εμβρυϊκό ερυθροκύτταρο διατηρεί στα υβρίδια ένα πρόγραμμα που καθορίζει ότι θα υπάρχει υψηλή και χαμηλή μεταγραφή των γ και β-γονιδίων αντίστοιχα. Εάν τα υβρίδια θα εκφράσουν αυτό το πρόγραμμα γιατί κληρονομούνε από τα εμβρυϊκά κύτταρα ένα σύμπλεγμα που παράγει κάποιο *trans* μεταγραφικό παράγοντα που επάγει την έκφραση του γ-γονιδίου θα πρέπει να διευκρινιστεί. Όταν αυτά τα υβρίδια πολλαπλασιάζονται σε καλλιέργεια, παρατηρείται μία 'μεταστροφή' από γ σε β- έκφραση (Parayannopoulou *et al.*, 1986; Broyles 1999). Μία εξήγηση για αυτή την μεταστροφή, είναι ότι το χρωμόσωμα που περιέχει το σύμπλεγμα για τον μεταγραφικό παράγοντα απαραίτητο για την έκφραση του γ-γονιδίου αρχικά είναι παρών στα υβρίδια αλλά μετά χάνεται από τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων. Κυτταρογενετικές και RFLP μελέτες (Melis *et al.*, 1987) έχουν αποτύχει να αποδείξουν αυτή την υπόθεση. Άλλες πιθανότητες είναι ότι ένα τέτοιο μεταγραφικό σύμπλεγμα είναι παρόν στο χρωμόσωμα 11 και χάνεται σταδιακά καθώς περνάει ο χρόνος στην καλλιέργεια ή ότι ο μοριακός μηχανισμός που ελέγχει την μεταστροφή λειτουργεί κυρίως *in cis* (Parayannopoulou *et al.*, 1986).

Κάθε υβρίδιο προέρχεται από ένα κύτταρο. Το δεδομένο ότι η μεταστροφή από γ σε β-σφαιρίνη συμβαίνει κατά την διάρκεια του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, προσφέρει ενδείξεις ότι η μεταστροφή παρατηρείται σε κύτταρα από μονήρη σειρά. Τα κυτταρικά υβρίδια MEL έχουν την ικανότητα να αντανακλούν με πιστότητα τα *in vivo* φαινοτυπικά χαρακτηριστικά μεταλλάξεων όπως την HPFH-1 και HPFH-2 (Parayannopoulou *et al.*, 1986) καθώς και της Γερμανικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας (Anagnou *et al.*, 1988; Parayannopoulou *et al.*, 1986) και προσφέρουν ένα υποδειγματικό σύστημα για την μελέτη των μηχανισμών της μεταστροφής της αιμοσφαιρίνης όπως αναφέρεται αργότερα (Kosteas *et al.*, 1997).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## ΥΛΙΚΑ

### Προέλευση αντιδραστηρίων και υλικών

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα Διατριβή προήλθαν κυρίως από τις εταιρίες Aldrich, Sigma και Merck.

Τα περιοριστικά ένζυμα, τα ένζυμα τροποποίησης του DNA καθώς και διάφορα kits αγοράστηκαν από τις εταιρίες Biorad, Roche (Boehringer-Mannheim), Invitrogen, Minotech, New England Biolabs και Promega.

Τα θρεπτικά υλικά καλλιέργειας βακτηριακών στελεχών προήλθαν από τις εταιρείες DIFCO και Merck, ενώ αυτά των κυτταρικών σειρών (DMEM, RPMI, PBS, Trypsin-EDTA, Fetal Calf Serum, Gentamicin, Penicillin/Streptomycin) αποκλειστικά από την Gibco-BRL.

Τα ραδιοσημασμένα νουκλεοτίδια  $\alpha$ [<sup>32</sup>P]-dATP,  $\alpha$ [<sup>32</sup>P]-dCTP,  $\alpha$ [<sup>35</sup>S]-dATP καθώς και η <sup>14</sup>C-χλωραμφαινικόλη προήλθαν από τις εταιρείες Amersham, ICN και NEN.

Οι μεμβράνες από νάυλον και νιτροκυτταρίνη προήλθαν από τις εταιρείες Amersham, Millipore και Schleicher & Schuell. Τα φιλμς αυτοραδιογραφίας ήταν από την KODAK ενώ τα φιλμς φωτογράφισης από την Polaroid.

Τα νουκλεοτίδια (dNTPs) ήταν από τις εταιρείες Pharmacia και Promega. Η ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του DNA έγινε με kit από την United States Biochemical, ενώ μεγάλες περιοχές DNA αναλύθηκαν από το εργαστήριο μικροχημείας του IMBB, ΙΤΕ από το οποίο έγινε και η προμήθεια των συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων.

### Πλασμιδιακοί φορείς, στελέχη βακτηρίων, γενωμικά DNA και RNA

Για την δημιουργία ανασυνδιασμένων κατασκευών χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς:

- pUC 18 και pUC 19 (Pharmacia).
- pBluescript II KS+, YIP-5, pBC (Stratagene).
- pGEM-4, pGEM-5, pGEM-T vector, η σειρά pGL2 και pGL3 της λουσιφεράσης (Promega).

Άλλοι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ευγενικές δωρεές των κάτωθι ερευνητών :

- $\gamma$ -CAT,  $\gamma$ -CAT/3'Αγ 2.3 kb Eco RI [p79], DHFR-CAT (D. Bodine).
- $\epsilon$ -  $\delta$ - και  $\beta$ -CAT (C.T. Noguchi, Π. Κόλλια).
- pET11D GATA-1 (S. Philipsen).
- pCMV-YYI (T. Shenk).
- RSV-CAT, pCMV $\beta$  lac Z (I. Παπαματθαίου).
- Η σειρά pCAT της Promega (Δ. Καρδάσης).

Διάφορα κλωνοποιημένα τμήματα DNA από το σύμπλεγμα της  $\beta$ -σφαιρίνης καθώς και γενωμικό DNA από διάφορους ασθενείς ήταν και αυτά ευγενικές δωρεές:

- Κοσμίδιο της  $\beta$ -σφαιρίνης [ $\mu$ LCR-Αγ- $\psi$  $\beta$ - $\delta$ - $\beta$ ] (K. Peterson).
- Κοσμίδιο της  $\beta$ -σφαιρίνης [mLCR-Αγ- $\beta$ -3'HS] (F. Grosveld).
- Κλώνος p3N10R [3'περιοχή της Κινεζικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> - θαλασσαιμίας] (D. Mager).
- Γεφυρικό τμήμα της Ισπανικής (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας (S. Ottolenghi).
- Γεφυρικό τμήμα της Ολλανδικής (β)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας (J. Gilman).
- Γεφυρικό τμήμα της μετάλλαξης HPFH-3 (11.5 kb Xba I) καθώς και το γεφυρικό τμήμα της Αμερικανικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας (O. Smithies).
- 3' Αγ 2.3 kb Eco RI, με σημειακή μετάλλαξη C σε T στη θέση # 41,806 (G. Atweh).
- 3' Αγ 2.3 kb Eco RI και HS5 3.3 kb Eco RI (F. Grosveld, E. Κατσαντώνη).

- HS2 1.45 kb Kpn I-Bgl II (Γ. Βασιλόπουλος).
  - Γενομικό DNA από τις μεταλλάξεις-ελλείματα HPFH-4 και HPFH-5 (C. Camaschella).
  - Γενομικό DNA της μετάλλαξης-έλλειμα HPFH-6 (P.Fucharoen).
  - Γενομικό DNA της Αμερικανικής (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας ( Ν.Π. Ανάγνου).
  - Υβρίδια σωματικών κυττάρων που προήλθαν από λεμφοκύτταρα ετεροζυγώτου με τη Γερμανική (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία και ερυθρολευχαιμικών MEL κυττάρων (Θ. Παπαγιαννοπούλου).
1. RNA για πειράματα RT-PCR: K562, HHW 105, HL 60, KMOE, και ΑγMEL 620 (Ν.Π. Ανάγνου).
  2. cDNA βιβλιοθήκη K562 (Ν. Μοσχονάς), cDNA βιβλιοθήκη μυελού των οστών (Clonetech).

Όλοι οι φορείς αναπτύχθηκαν σε βακτηριακά στελέχη E.coli K-12. HB101, XL-1 και κυρίως SCS-1 (Stratagene). Οι γονότυποι και οι σχετικές αναφορές αυτών των στελεχών ευρίσκονται στον κατάλογο της Stratagene καθώς και στο εγχειρίδιο των Sambrook *et al.*, 1989.

### Βακτηριακές καλλιέργειες

Για την καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών E.coli K-12 χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά LB (Luria-Bertani) και 2X YT σε υγρή και σε στερεά μορφή.

### Κυτταρικές σειρές

**Ανθρώπου:** Για τα πειράματα διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές K562 και HeLa. Τα ερυθρολευχαιμικά κύτταρα K562 έχουν προέλθει από θηλυκό άτομο με χρόνια μυελογενή λευχαιμία (Lozzio *et al.*, 1975). Τα K562 κύτταρα παράγουν Gγ, Αγ και ε αλυσίδες, αλλά όχι β-αλυσίδες και χρησιμοποιήθηκαν για την ερυθροποιητική εξειδίκευση τον υπό έλεγχο ρυθμιστικών αλληλουχιών (Rutherford *et al.*, 1981; Fordis *et al.*, 1984; Anagnou *et al.*, 1985; Enver *et al.*, 1988). Τα HeLa κύτταρα παράγουν Gγ και Αγ αλυσίδες αλλά όχι β-αλυσίδες και χρησιμοποιήθηκαν όπως και τα COS-7 (βλ. κατωτέρω) ως μη-ερυθροποιητικά κύτταρα (Enver *et al.*, 1988; Martin *et al.*, 1982).

**Πιθήκου:** Ορισμένα κλωνοποιημένα τμήματα ελέγχθηκαν και για την ιστική τους εξειδίκευση σε μη ερυθροποιητικά κύτταρα. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα COS-7 τα οποία είναι επιθηλιακά κύτταρα από νεφρό πιθήκου τα οποία είναι μετασχηματισμένα από τον ιό SV 40.

Πληροφορίες για όλες τις κυτταρικές σειρές, καθώς και σχετικές αναφορές περιέχονται στην ιστοσελίδα της ATCC (<http://www.atcc.org>) η οποία ήταν η προμηθεύτρια εταιρεία.

### ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ

Τα K562 καλλιεργήθηκαν σε RPMI. Οι σειρές HeLa και COS-7 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM (Minimal Essential Medium) που είχε τροποποιηθεί σύμφωνα με τον Dulbecco (Smith *et al.*, 1960). Τα θρεπτικά μέσα περιείχαν επιπρόσθετα 10% εμβρυϊκό ορό βοός (fetal calf serum) καθώς και 50 μg/ml αμπικιλίνη/στρεπτομυκίνη (Promega Transfection Guide, 1998).

## ΜΕΘΟΔΟΙ

### ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

**Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα** (Serghini *et al.*, 1989) με μικρές τροποποιήσεις.

Τα βασικά στάδια της μεθοδολογίας είναι τα εξής:

1. Βακτηριακές καλλιέργειες των 2 ml αναπτύχθηκαν σε γυάλινους σωλήνες με θρεπτικό υλικό LB ή 2X YT και αντιβιοτικό (αμπικιλίνη 60 µg/ml ή τετρακυκλίνη 50 µg/ml) για 14-16 ώρες.
2. Έντονη ανάδευση (vortex) και μεταφορά 1.5 ml της καλλιέργειας σε σωληνάριο Eppendorf και φυγοκέντρηση για 30 sec σε 13 K rpm.
3. Απομάκρυνση με απορρόφηση του υπερκείμενου και πρόσθεση 50 µl 1X TNE (10 mM Tris-Cl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0) καθώς και 50 µl φαινόλη/χλωροφορμίο (1:1). Ακολουθεί έντονη ανακίνηση σε συσκευή vortex για 6 sec και φυγοκέντρηση για 6 min σε 13 K rpm.
4. Μεταφορά 50 µl από το υπερκείμενο σε άλλο σωληνάριο Eppendorf στο οποίο προσθέτουμε 50 µl 4 M οξικό αμμώνιο και 200 µl απόλυτη αιθανόλη (-20°C). Επώαση στον πάγο για 15 min και μετά φυγοκέντρηση για 15 min σε 13 K rpm.
5. Αφαίρεση του υπερκείμενου, ξέπλυμα του DNA με 200 µl 70% αιθανόλη, στέγνωμα για 5 min και το DNA επαναδιαλυτοποιείται σε 20 µl 1X TE.

#### LB (1lt pH 7.5)

Bacto tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g

#### 2X YT (1lt pH 7.5)

16 g
10 g
10 g

**Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα με την αλκαλική μέθοδο**

Ακολουθείται σε γενικές γραμμές το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Sambrook *et al.*, 1989, με μικρές τροποποιήσεις.

1. Βακτηριακές καλλιέργειες του 1 lt αναπτύσσονται για 14-16 ώρες σε LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό.
2. Τα βακτήρια φυγοκεντρώνονται για 10 min στις 5 K rpm στους 4°C.
3. Στη συνέχεια επαναιωρούνται σε 10 ml του διαλύματος I (βλ. κατωτέρω).
4. Προστίθενται 20 ml διαλύματος II. Τα βακτήρια λύνονται με ελαφρά ανάδευση και επώαση στον πάγο για 10 min.
5. Προστίθενται 15 ml διαλύματος III με γρήγορη ανάδευση και επώαση στον πάγο για 15 min.
6. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 min στις 8 K rpm στους 4°C, και το υπερκείμενο διηθείται μέσω υαλοβάμβακα, όπου τα νουκλεϊκά οξέα κατακρημνίζονται με την προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min, και φυγοκεντρώνονται στις 8 K rpm για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη, απομακρύνεται η περίσσεια αλκοόλης και επαναδιαλυτοποιείται σε 1 ml 1X TE. Η ποσότητα του πλασμιδίου ελέγχεται φασματοφωτομετρικά.

<u>Διάλυμα I</u>	<u>Διάλυμα II</u>	<u>Διάλυμα III (100 ml)</u>
50 mM Glucose	0.2 N NaOH	60 ml 5 M CH <sub>3</sub> COOK
25 mM Tris-Cl pH 8	1% SDS	11.5 ml CH <sub>3</sub> COOH
10 mM EDTA pH 8		28.5 ml H <sub>2</sub> O

Σε ορισμένα πειράματα όπου απαιτείται ηξημένη ποιότητα και καθαρότητα του υπερελικωμένου πλαμιδιακού DNA (όπως για μετασχηματισμό κυττάρων σε καλλιέργεια ή για μικρόνευση DNA σε ωάρια ποντικού) ακολουθεί διπλή υπερφυγοκέντρωση με CsCl.

8. Το DNA επαναδιαλυτοποιείται σε 1X TE σε όγκο ανάλογο από το μέγεθος των σωληναρίων που θα χρησιμοποιήσουμε για υπερφυγοκέντρωση. Στη συνέχεια προσθέτουμε 1 g CsCl για κάθε ml TE καθώς και EtBr.
9. Μετά την υπερφυγοκέντρωση συλλέγεται με σύριγγα η ζώνη του υπερελικωμένου DNA. Το EtBr απομακρύνεται με εκχύλιση με ισοπροπανόλη κορεσμένη σε CsCl. Στη συνέχεια προστίθεται ίσος όγκος H<sub>2</sub>O και το DNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη δύο όγκων αιθανόλης. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 10 K rpm για 20 min στους 4°C.
10. Το DNA επαναδιαλυτοποιείται σε 1X TE, εκχυλίζεται με φαινόλη και χλωροφόρμιο και κατακρημνίζεται παρουσία 3 M NaOAc pH 5.4 (1/10 του όγκου) και δύο όγκων αιθανόλης.
11. Η ποσότητα και η ποιότητα του πλασμιδίου ελέγχονται φασματοφωτομετρικά καθώς και με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

### **Εναλλακτικοί τρόποι**

Διάφορες εταιρείες προσφέρουν kits για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή ή μεγάλη κλίμακα. Χρησιμοποιήθηκαν τα kits Plasmid Midi kit από την Qiagen (Cat.# 12144) και Plasmid Midiprep kit από την Biorad (Cat.# 732-6120) καθώς και το Concert της Gibco BRL. Οι στήλες της Qiagen και Gibco BRL μπορούν να ξαναχρησιμοποιηθούν για το ίδιο πλασμίδιο μετά από δύο ή τρία πλυσίματα των στύλων με 3M NaCl, 0.15% Triton X-100 (Chang *et al.*, 1999).

**Απομόνωση γενωμικού DNA από ουρά ποντικού** (Brinster *et al.*, 1985) με μικρές τροποποιήσεις.

1. Μικρό τμήμα (5 mm) από ουρά ποντικού 10 ημερών επωάζεται κατά την διάρκεια της νύχτας σε tail mix buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS) και 25μl Proteinase K (10 mg/ml) στους 55°C.
2. Την επόμενη μέρα προσθέτουμε 10 μl RNase (10 mg/ml) και επωάζουμε για 1-2 ώρες.
3. Ακολουθεί εκχύλιση με δύο όγκους φαινόλης/χλωροφορμίου και ισχυρή ανάδευση για 15 min και φυγοκέντρωση για 20-30 min. Εκχύλιση με χλωροφόρμιο, ισχυρή ανάδευση για 15 min και φυγοκέντρωση για 5 min και κατακρημνιση με ισοπροπανόλη (0.6% του όγκου). Το ίζημα που παρατηρείται μετά από ανάμιξη συλλέγεται με πιπέττα Pasteur της οποίας η άκρη έχει τροποποιηθεί με φλόγα.
4. Το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη, απομακρύνεται η περίσσεια αλκοόλη και επαναδιαλυτοποιείται σε 100-200 μl 1X TE κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 4°C.
5. Η ποσότητα του DNA (50-150 μg) ελέγχεται φασματοφωτομετρικά καθώς και με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

## Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης

### Ηλεκτροέκλωση

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται κυρίως όταν η διαθέσιμη ποσότητα του DNA προς απομόνωση είναι αρκετά μεγάλη (5-20 μg) ή και για την απομόνωση κοσμιδίων για μικροένεση (Sambrook *et al.*, 1989).

1. Το τμήμα του DNA εντοπίζεται με φωτισμό UV και κόβεται από το πήκτωμα αγαρόζης με τη βοήθεια λεπίδος. Τοποθετείται σε μεμβράνη διαπήδησης έτσι ώστε να καλύπτεται από διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X TAE (1lt 50X TAE: 242 g Tris Base, 57.1 ml 100 ml οξικό οξύ, 0.5 M EDTA pH 8.0).
2. Η μεμβράνη εμβαπτίζεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και εφαρμόζεται τάση έως ότου το DNA εκλουσθεί πλήρως από το κομμάτι της αγαρόζης και προσκολληθεί στη μεμβράνη. Αναστρέφουμε την τάση για 1-2 min.
3. Το διάλυμα όπου περιέχεται πλέον το DNA απομακρύνεται από τη μεμβράνη και μεταφέρεται σε σωληνάριο Eppendorf. Ακολουθεί εκχύλιση με 2-βουτανόλη ώστε να μειωθεί ο όγκος.
4. Τέλος, ακολουθεί εκχύλιση με φαινόλη και χλωροφόρμιο, κατακρήμνιση με 3 M NaOAc pH 5.3 και δύο όγκους αιθανόλης.

### Πηκτή αγαρόζης χαμηλής τήξης

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται κυρίως όταν οι διαθέσιμες ποσότητες DNA είναι σχετικά περιορισμένες (Sambrook *et al.*, 1989).

1. Το τμήμα του DNA εντοπίζεται με φωτισμό UV και κόβεται από το πήκτωμα αγαρόζης. Τοποθετείται σε σωληνάριο Eppendorf και ακολουθεί επώαση στους 65°C έως ότου τηχθεί η αγαρόζη. Προστίθενται 20 μl 5M NaCl και H<sub>2</sub>O έως τα 300 μl και ακολουθεί επώαση στους 65°C για 5 min.
2. Το DNA εκχυλίζεται δύο φορές με ζεστή φαινόλη (65°C), μία φορά με φαινόλη-χλωροφόρμιο και τέλος με χλωροφόρμιο.
3. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο Eppendorf όπου το DNA κατακρημνίζεται με 3M NaAc pH 5.3 και δύο όγκους αιθανόλης.

### Εναλλακτικοί τρόποι

Διάφορες εταιρίες προσφέρουν kits για την απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης. Χρησιμοποιήθηκαν τα kits QIAquick Gel Extraction kit από την Qiagen (Cat. #28704) και το Agarose Gel DNA Extraction kit από την Boehringer-Mannheim (Cat. #1696 505).

## Ραδιοσήμανση τμημάτων DNA

### Μέθοδος της σήμανσης με τυχαίους εκκινητές (random priming)

Η μέθοδος αυτή έχει τη δυνατότητα παραγωγής ανιχνευτών με ειδική ενεργότητα (specific activity) περίπου  $>5 \times 10^8$  cpm/μg DNA (Feinberg *et al.*, 1983) και χρησιμοποιείται κυρίως για την ανίχνευση και χαρακτηρισμό κλωνοποιημένων τμημάτων DNA.

1. Το DNA (100 ng σε 5 μl H<sub>2</sub>O) αποδιατάσσεται στους 100°C για 5 min και μεταφέρεται στον πάγο.



2. Προσθέτουμε 11.4 μl 2X LS, 1.0 μl BSA (10 mg/ml), 1.0 μl από τα α[<sup>32</sup>P]-dATP και α[<sup>32</sup>P]-dCTP (ειδική ενεργότητα 800 Ci/mmmole), 1.0 μl από το κλάσμα Klenow της DNA πολυμεράσης I (5 u/μl) και H<sub>2</sub>O έως τα 25 μl.
3. Επώαζουμε στους 25°C για 5-15 ώρες. Η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη 1.0 μl 0.5 M EDTA .
4. Στη συνέχεια ακολουθεί καθαρισμός του ραδιοσημασμένου DNA από τα ελεύθερα νουκλεοτίδια με χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε στήλη Sephadex G-50 fine (Pharmacia) όγκου 1 ml. Η διαδικασία περιγράφεται από τους Sambrook *et al.*, 1989.

#### Διάλυμα TM

250 mM Tris-Cl pH 8.0  
25 mM MgCl<sub>2</sub>  
50 mM β-μερκαπτοαιθανόλη

#### Διάλυμα DTM

0.1mM από dGTP, dTTP σε TM

#### Διάλυμα OL

1 mM Tris-Cl pH 7.5  
1 mM EDTA pH 7.8, και 90u OD τυχαίων εξανουκλεοτιδίων, pd(N<sub>6</sub>) (Pharmacia) ανά 1 ml του διαλύματος.

#### Διάλυμα 2X LS

1 M Hepes pH 6.6/DTM/OL (25:25:7)  
Αποθήκευση στους -20°C.

Διάφορες εταιρίες επίσης προσφέρουν kits για την σήμανση τμημάτων DNA. Για την σήμανση DNA ανιχνευτών με μεγαλύτερη ειδική ενεργότητα για της ανάγκες Southern blot (βλ. κατωτέρω) χρησιμοποιήθηκε το Nick Translation System (Cat.# U1001) της Promega ή προετοιμάζεται σύμφωνα με τους Sambrook *et al.* 1989.

### Τεχνικές υποκλωνοποίησης τμημάτων DNA

**Τροποποίηση των άκρων τμημάτων DNA με Klenow.** (Sambrook *et al.* 1989) με μικρές τροποποιήσεις, καθώς και σύμφωνα με το Protocols and Application Guide της Promega.

Το κλάσμα Klenow της DNA πολυμεράσης I δρα ως πολυμεράση κατά την κατεύθυνση 5'→3' και ως εξανουκλεάση κατά την κατεύθυνση 3'→5'. Επομένως χρησιμοποιείται για την συμπλήρωση τόσο για τα 5' όσο και για τα 3' εισέχοντα (recessive) άκρα ενός τμήματος DNA.

**Αντίδραση για την συμπλήρωση 5' άκρων.** Μέσα σε σωληνάριο Eppendorf προσθέτουμε:

DNA	έως 5 μg DNA
10 X Klenow Buffer	20.0 μl
dNTPs (10 mM)	8.0 μl
Klenow 5 u	1.0 μl (1u/μg DNA)
H <sub>2</sub> O έως τα	200.0 μl

Επώαση στους 15°C για 2 ώρες. Ακολουθεί αδρανοποίηση της Klenow στους 65°C για 15 min, εκχύλιση με φαινόλη και χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με 3 M NaOAc pH 5.3 και δύο όγκους αιθανόλης.

10x Klenow buffer: Προσφέρεται μαζί με το ένζυμο από την εταιρεία.

**Αντίδραση για την συμπλήρωση 3' άκρων.** Μέσα σε σωληνάριο Eppendorf των 0.7 ml προσθέτουμε:

DNA	έως 5 μg DNA
10 X Klenow Buffer	5.0 μl
Klenow 5 u	1.0 μl
H <sub>2</sub> O έως	40.0 μl

Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min μετά προσθέτουμε:

dNTPs (500 μM)	10.0 μl
----------------	---------

Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min. Ακολουθεί αδρανοποίηση της Klenow στους 65°C για 15 min. Εκχύλιση με φαινόλη και χλωροφόρμιο, και κατακρήμνηση με 3 M NaOAc pH 5.3 και δύο όγκους αιθανόλης.

### **Τροποποίηση των άκρων του φορέα με αλκαλική φωσφατάση**

Η τροποποίηση των άκρων ενός φορέα με αλκαλική φωσφατάση αποτρέπει σε μεγάλο βαθμό την επανασύνδεση του. Με αυτό τον τρόπο αυξάνει τις πιθανότητες κλωνοποίησης του ενθέματος. (Sambrook *et al.* 1989) με μικρές τροποποιήσεις.

Το γραμμικό DNA 10-20 μg (ανεξάρτητα από τη φύση των άκρων του) επαναδιαλυτοποιείται σε 90 μl 10 mM Tris-HCl pH 8.3. Προσθέτουμε 10 μl 10X CIP Buffer (προσφέρεται από την εταιρεία) και έως 1 u αλκαλικής φωσφατάσης. Επώαση στους 37°C για 15 min. Προσθέτουμε την ίδια συγκέντρωση ενζύμου (η συγκέντρωση διαφέρει αναλόγως με την ποσότητα του DNA). Επώαση στους 55°C για 45 min. Ακολουθεί αδρανοποίηση της φωσφατάσης παρουσία 5 mM EDTA στους 65°C για 60 min ή στους 75°C για 10 min. Εκχύλιση με φαινόλη, φαινόλη/χλωροφόρμιο και χλωροφόρμιο και ακολουθεί κατακρήμνηση με 3 M NaOAc pH 5.3 και δύο όγκους αιθανόλης.

### **Αντίδραση σύνδεσης τμημάτων DNA (ligation)**

Οι συνθήκες σύμφωνα με τις οποίες πραγματοποιείται η διαδικασία της σύνδεσης τμημάτων DNA (ligation) ποικίλουν και εξαρτώνται τόσο από τα άκρα που πρόκειται να ενωθούν (συμβατά ή τυφλά) καθώς και από το μέγεθος και την αναλογία του φορέα και του ενθέματος (Sambrook *et al.*, 1989).

**Αντίδραση για συμβατά άκρα.** Μέσα σε σωληνάριο Eppendorf 0.7 ml προσθέτουμε:

DNA Φορέα	100 ng	
Ενθέμα	300 ng	(Αναλογία φορέα/ενθέματος 1:3)
10x ligation buffer	1.0 μl	
T4 DNA λιγάση	0.1-0.5 Weiss units	
H <sub>2</sub> O έως	10.0 μl	

Επώαση στους 15°C για 3-12 ώρες. Για μετασχηματισμό βακτηριών χρησιμοποιούνται περίπου 3.0 μl από την αντίδραση.

**Αντίδραση για τύφλα άκρα.** Μέσα σε σωληνάριο Eppendorf 0.7 ml προσθέτουμε:

Φορέα	100 ng
Ενθέμα	500-1,000 ng (Αναλογία φορέα/ενθέματος 1:5 έως 1:10)
10X ligation buffer	1.0 μl

T4 DNA λιγάση                    1.0-2.5 Weiss units  
 H<sub>2</sub>O έως                                    10.0 μl

Επώαση στους 25°C για 5-12 ώρες. Για μετασχηματισμό βακτηρίων χρησιμοποιούνται περίπου 3.0 μl από την αντίδραση.

10X ligation buffer: Προσφέρεται μαζί με το ένζυμο από την εταιρεία.

### Προοδευτικές μεταλλάξεις τμημάτων DNA

Η δημιουργία προοδευτικών μεταλλάξεων-ελλειμμάτων με την χρήση της εξωνουκλέασης III χρησιμοποιείται για την επιμέρους ανάλυση τμημάτων DNA για τις μελέτες της σύνδεσης του με διάφορους trans-μεταγραφικούς παράγοντες. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε το Erase a Base System της Promega (Cat. #E5850). Είναι σημαντικό για το γραμμικό DNA να απομονωθεί από πύκτωμα αγαρόζης (Sambrook *et al.* 1989).

### Σημειακές μεταλλάξεις

Παραπομπή στη χρήση του PCR για τη δημιουργία σημειακών μεταλλάξεων.

## Μετασχηματισμός βακτηρίων

**Προετοιμασία βακτηρίων** (Hanahan and Meselson 1980; Hanahan 1983; Inoue *et al.*, 1990) με μικρές τροποποιήσεις.

1. Την ημέρα που προηγείται του μετασχηματισμού, εμβολιάζουμε μία αποικία βακτηρίων (SCS-1, XL-1) σε υγρό καλλιέργειας LB. Στα XL-1 προσθέτουμε και τετρακυκλίνη. Αναπτύσσουμε την καλλιέργεια στους 37°C κατά τη διάρκεια της νύχτας.
2. Την επόμενη ημέρα εμβολιάζουμε 50 ml LB με 500 μl (ή 1/100 του όγκου) από την καλλιέργεια που αναπτύχθηκε την προηγούμενη νύχτα. Η καλλιέργεια αυτή αναπτύσσεται με έντονο αερισμό στους 37°C μέχρις ότου η οπτική απορρόφηση στα 550 nm να μην υπερβεί την τιμή 0.20-0.45 αναλόγως του στελέχους που χρησιμοποιούμε.
3. Η φιάλη με τα βακτήρια παραμένει στον πάγο για 5 min και μεταφέρεται σε αποστειρωμένους σωλήνες των 50 ml. Φυγοκεντρώνται για 5 min στις 2.5 K rpm και 4°C.
4. Αδειάζουμε το υπερκείμενο, επαναιωρούμε τα βακτήρια σε 20 ml διαλύματος I και τα επωάζουμε στον πάγο για 20 min. Φυγοκεντρώνται πάλι για 5 min στις 2.5 K rpm και 4°C.
5. Αδειάζουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε τα βακτήρια σε 3 ml διαλύματος II. Τα βακτήρια μοιράζονται ανά 300 μl σε σωληνάρια Eppendorf και φυλάσσονται στους -80°C.

#### Διάλυμα I (Για 200 ml)

RbCl<sub>2</sub> 100 mM  
 MnCl<sub>2</sub> 50 mM  
 KOAc 30 mM  
 CaCl<sub>2</sub> 10 mM  
 Glycerol 15%  
 pH 5.8 με 0.2 M CH<sub>3</sub>COOH

#### Διάλυμα II (Για 100 ml)

**MOPS 10 mM**  
 RbCl<sub>2</sub> 10 mM  
 CaCl<sub>2</sub> 75 mM  
 Glycerol 15%  
 pH 7.0 με 1M NaOH

## Μετασχηματισμός βακτηρίων

1. Σε σωληνάριο Eppendorf προσθέτουμε 50 έως 100 μl βακτήρια και περίπου 3 μl από την αντίδραση της λιγάσης.
2. Επωάζουμε στον πάγο για 30 min, ακολουθεί άμεση επώαση στους 42°C (heat shock) για 1 min και 45 sec και στη συνέχεια επώαση στον πάγο για 3 min.
3. Σε κάθε σωληνάριο Eppendorf προσθέτουμε 900 μl LB και επωάζουμε για 1 ώρα στους 37°C.
4. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3 K rpm για 6 min. Αδειάζουμε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναωρείται σε 150 μl LB. Για επιλογή αποικιών που εκφράζουν ή όχι τη β-γαλακτοσιδάση (blue/white) προσθέτουμε 20 μl IPTG 100 mM και 35 μl X-GAL).
5. Στη συνέχεια τα βακτήρια επιστρώνονται σε τρυβλία LB (με το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής) και επωάζονται στους 37°C για 16-18 ώρες και μετά φυλάσσονται στους 4°C.

Την πρώτη φορά που χρησιμοποιούμε τα βακτήρια, τα ελέγχουμε για την αποτελεσματικότητα τους χρησιμοποιώντας διάφορες αραιώσεις από 100 pg έως 1 ng πλασμιδιακού DNA.

**Μονιμοποίηση αποικιών βακτηρίων σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης** (Sambrook *et al.* 1989) με μικρές τροποποιήσεις.

1. Τα τρυβλία Petri με αποικίες βακτηρίων που περιέχουν ανασυνδυασμένα πλασμίδια μεταφέρονται από τους 4°C και σε κάθε τρυβλίο τοποθετείται ένα φίλτρο νιτροκυτταρίνης έτσι ώστε να μη υπάρχουν φυσσαλίδες μεταξύ του φίλτρο και της επιφάνειας ανάπτυξης των αποικιών. Η θέση των αποικιών στα τρυβλία σημειώνεται με σινική μελάνη στα φίλτρα.
2. Κάθε φίλτρο αφαιρείται και τοποθετείται (με τις αποικίες προς τα πάνω) σε ένα κομμάτι απορροφητικού χαρτιού τύπου 3 MM Whatman που έχει διαποτιστεί με 1X αλκαλικού διαλύματος αποδιάταξης (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) όπου παραμένει για 7 min.
3. Στη συνέχεια μεταφέρεται σε άλλο χαρτί Whatman διαποτισμένο με 1X διαλύματος εξουδετέρωσης (1M Tris-Cl pH 7.4 1.5 M NaCl) και παραμένει για 6 min.
4. Τα φίλτρα ξεπλένονται με 2X SSC (1lt 20X SSC: 175.3 g NaCl, 88.2 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) ώστε να απομακρυνθούν τα βακτηριακά υπολείμματα και τα άλατα.
5. Τα φίλτρα ξηραίνονται στον αέρα και στη συνέχεια οι αποικίες μονιμοποιούνται με επώαση στους 80°C για 2 ώρες ή για 3 min με συσκευή UV Crosslinker της Stratagene.
6. Στην συνέχεια τα φίλτρα υβριδοποιούνται με έναν ραδιοσημασμένο DNA ανιχνευτή όπου οι επιθυμητές αποικίες εντοπίζονται με αυτοραδιογραφία (βλ. κατωτέρω).

## Μονιμοποίηση γενωμικού DNA σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του dot/slot blot η οποία είναι εύκολη και γρήγορη για την επιλογή DNA κλώνων ή διαγονιδιακών ποντικών με την χρήση ραδιοσημασμένου DNA. Εάν χρησιμοποιούμε γενωμικό DNA από ποντίκια, τότε η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ώστε να προσδιοριστεί και ο αριθμός αντιγράφων (copy number) του ενθέματος που έχουν ενσωματωθεί στο γένωμα του ποντικού.

1. Σε σωληνάρια Eppendorf μεταφέρουμε 5 μg γενωμικού DNA σε 180 μl H<sub>2</sub>O.
2. Προσθέτουμε 20 μl 4N NaOH, έντονη ανακίνηση σε συσκευή vortex και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min.
3. Προσθέτουμε 200μl 2M NH<sub>4</sub>Ac, vortex και διατήρηση στο πάγο.
4. Κόβουμε δύο χαρτιά Whatman και ένα φίλτρο νιτροκυτταρίνης (στο μέγεθος της συσκευής dot/slot blot) και τα εμποτίζουμε σε 1M NH<sub>4</sub>Ac.

5. Συναρμολογούμε τη συσκευή dot/slot blot, δημιουργούμε κενό αέρος στη συσκευή και στη συνέχεια διηθούμε 350 μl από κάθε δείγμα στο φίλτρο.
6. Το φίλτρο ξηραίνεται στον αέρα και στη συνέχεια το DNA μονιμοποιείται με επώαση στους 80°C για 2 ώρες ή σε συσκευή UV Crosslinker της Stratagene.

Εάν χρησιμοποιούμε ποντίκια, τότε τα θετικά δείγματα θα πρέπει να ελεγχθούν περαιτέρω ως προς τον αριθμό αντιγράφων. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούμε και την τεχνική του στυπώματος κατά Southern. Η ίδια τεχνική χρησιμοποιείται για να ελεγχθούν μεταλλάξεις-ελλείματα όπως δβ-θαλασσαιμία (Palena *et al*, 1994) καθώς και κατασκευές κοσμιδίων που πρόκειται να ελεγχθούν *in vivo*.

### Τεχνική του στυπώματος κατά Southern (Southern 1975).

1. Κόβουμε 10 μg γενωμικό DNA σε συνολικό όγκο 50 μl με 3-5 u ενζύμου/μg DNA. Λαμβάνουμε 5 μl μείγματος από κάθε δείγμα και το προσθέτουμε σε αντιστοιχό Eppendorf με παρουσία 300 ng λ DNA. Επώαση στους 37°C κατά την διάρκεια της νύχτας.
2. Την άλλη μέρα ελέγχουμε την πέψη με το λ DNA. Στην συνέχεια διαχωρίζουμε τα δείγματα μαζί με δείγμα μεγεθών διαφόρου μοριακού βάρους με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Η πυκνότητα της αгарόζης καθορίζεται από το μέγεθος του κλάσματος του DNA που ελέγχεται.
3. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή αгарόζης επωάζετε με EtBr και επακολουθεί φωτογράφιση μαζί με ένα υποδεκάμετρο, προκειμένου να προσδιορίσουμε με ακρίβεια το μέγεθος του DNA μετά από την υβριδοποίηση.
4. Ακολουθεί η προετοιμασία της πηκτής για μεταφορά των δειγμάτων σε νάυλον μεμβράνη. Η πηκτή μεταφέρεται με προσοχή σε διάλυμα 'αποπουρίνωσης' 0.125 N HCl για ακριβώς 20 min. Συγχρόνως παρατηρούμε και αλλαγή του χρώματος της χρωστικής.
5. Ακολουθεί μεταφορά σε αλκαλικό διάλυμα 0.5 N NaOH και 1.5 M NaCl για 40 min.
6. Στη συνέχεια μεταφέρεται σε διάλυμα εξουδετέρωσης 0.5 M Tris 7.4 και 1.5 M NaCl για 40 min.
7. Η πηκτή αгарόζης τοποθετείται σε μία "γέφυρα" διηθητικού χαρτί που έχει διαποτισθεί με 20X SSC. Στην πηκτή επιστρώνεται πρώτα μία νάυλον μεμβράνη και μετά ένα κομμάτι απορροφητικού χαρτιού τύπου 3 MM Whattman που έχουν διαποτιστεί με 2X SSC. Στην συνέχεια προσθέτουμε μία στοιβία από χαρτοπετσέτες και παραμένει κατά την διάρκεια της νύχτας διαποτισμένο με αλκαλικό διάλυμα 20X SSC.
8. Την επόμενη ημέρα αφαιρούμε τις χαρτοπετσέτες, σημαδεύουμε με μελάνι τα πηγαδάκια της πηκτής, αφαιρούμε την μεμβράνη και την ξεπλένουμε σε 6X SSC. Η μεμβράνη ξηραίνεται στον αέρα και στη συνέχεια επωάζεται στους 80°C για 2 ώρες.

### Επιλογή κλώνων με την χρήση ραδιοσημασμένου DNA

**Προϋβριδοποίηση και υβριδοποίηση φίλτρων** (Sambrook *et al*. 1989) με μικρές τροποποιήσεις, καθώς και από οδηγίες από την προμηθεύτρια εταιρία.

1. Τα φίλτρα προϋβριδοποιούνται για 1 ώρα στους 65°C σε διάλυμα υβριδοποίησης (SSC 6X, SDS 0.5%, 50X Denhardt's, DNA σπέρματος σολομού 100 μg/ml, EDTA 1mM).
2. Ακολουθεί υβριδοποίηση με τις ίδιες συνθήκες. Ο ανιχνευτής αποδιατάσσεται στους 100°C για 5 min. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 5 min και μετά προσθήκη του στο διάλυμα υβριδοποίησης. Συνήθως χρησιμοποιούμε περισσότερο από  $1 \times 10^6$  cpm/ml ανιχνευτή. Ακολουθεί η υβριδοποίηση για 12-18 ώρες.
3. Μετά το τέλος της υβριδοποίησης, τα φίλτρα ξεπλένονται ως ακολούθως: 2X SSC, 5 min σε θερμοκρασία δωματίου, δύο φορές. Κατόπιν 0.3X SSC/0.5% SDS για 30 min στους 65°C, δύο φορές. Στο τέλος εάν κρίνουμε απαραίτητο, ξεπλένουμε με 0.3X SSC για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά ακολουθεί έκθεση της μεμβράνης σε φωτογραφικό φιλμ και εμφάνιση της αυτοραδιογραφίας.

## Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του DNA

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του τερματισμού της επιμήκυνσης της αλυσίδας DNA μέσω της ενσωμάτωσης τριφωσφορικών δι-δεοξυνουκλεοτιδίων (dideoxy chain termination method) των Sanger *et al.*, 1977. Η σήμανση των μορίων έγινε με  $\alpha$ [ $^{35}\text{S}$ ]-dATP. Για τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Sequenase (τροποποιημένη T7 DNA πολυμεράση).

Σε 5  $\mu\text{g}$  DNA προστίθεται 2  $\mu\text{l}$  2M NaOH / 2mM EDTA και επωάζεται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Κατακρήμιση με 3  $\mu\text{l}$  3M NaOAc, 7  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  και 75  $\mu\text{l}$  αιθανόλη. Ακολουθεί επώαση στους  $-80^\circ\text{C}$  για 15 min. Φυγοκέντρωση για 15 min, και καθαρισμός του DNA με 100  $\mu\text{l}$  70% αιθανόλη. Τέλος το μονόκλωνο DNA επαναδιαλυτοποιείται σε 6  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  και μεταφέρεται αμέσως στους  $-20^\circ\text{C}$ . Στη συνέχεια ακολουθείται το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρίας (USB).

## Διαμόλυνση κυττάρων σε καλλιέργεια

### Τεχνική της συγκατακρήμισης DNA με φωσφορικό ασβέστιο

Οι Graham και van der Eb 1973, παρουσίασαν την τεχνική της κατακρήμισης του DNA με φωσφορικό ασβέστιο και την εισαγωγή του ιζήματος στη συνέχεια στα κύτταρα.

### Μεθοδολογία της διαμόλυνσης

1. Την προηγούμενη μέρα πριν από τη διαδικασία της διαμόλυνσης, επιστρέφονται τα κύτταρα (HeLa ή COS). Τα κύτταρα K562 χρησιμοποιούνται την ίδια μέρα. Ο αριθμός κυττάρων διαφέρει αναλόγως την κυτταρική σειρά και το μέγεθος των τρυβλίων. Πριν από την διαμόλυνση (3-6 ώρες) το θρεπτικό υλικό αντικαθίσταται με νέο.
2. Μέσα σε σωληνάριο Eppendorf, παρασκευάζουμε το διάλυμα I ενώ σε 15 ml σωλήνα τύπου Falcon προσθέτουμε 500  $\mu\text{l}$  2X HBS.
3. Το διάλυμα I προστίθεται με πιπέττα του 1 ml στάγδην και με ελαφρά ανάμειξη στο διάλυμα II. Βαθμιαία σχηματίζεται ένα υπόλευκο λεπτόκοκκο ίζημα που οφείλεται στη κατακρήμιση DNA από το  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .

#### Διάλυμα I:

**Πλασμίδιο αναφοράς**  
 PCMV $\beta$  lac Z  
 pUC ή DNA σπέρματος σολομού  
 2.5M  $\text{CaCl}_2$   
 $\text{H}_2\text{O}$

#### Διάλυμα II: 2X HBS

**NaCl 280 mM**  
**KCl 10 mM**  
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5 mM  
**Dextrose 12 mM**  
**Hepes 42 mM pH 7.1**

4. Το ίζημα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min και στη συνέχεια προστίθεται προσεκτικά στα κύτταρα που βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης όπου και παραμένει για 6-8 ώρες. Ο χρόνος διαφέρει ανάλογα με τις κυτταρικές σειρές. Τα κύτταρα πλένονται με ισότονο διάλυμα 1X PBS και επωάζονται με νέο θρεπτικό υλικό στους  $37^\circ\text{C}$  με συνεχή παροχή 5%  $\text{CO}_2$ .
5. Μετά από 48 ώρες από την διαμόλυνση τα κύτταρα πλένονται με 1X PBS ή διάλυμα Hank's και συλλέγονται με φυγοκέντρωση (5 min, 2000 K rpm) και το κυτταρικό ίζημα διατηρείται στους  $-80^\circ\text{C}$ . Στη συνέχεια ακολουθεί ανάλυση της διαμόλυνσης.

## Ενζυμικές δοκιμές

Στο ίζημα των κυττάρων προσθέτουμε 200  $\mu$ l 0.25 M Tris-HCl pH 7.8 και ακολουθεί λύση των κυττάρων με υπέρηχους ή με τρεις κύκλους ψύξης/αποψύξης. Τα δείγματα φυγοκεντρούται για 1 min στους 4°C και το υπερκείμενο χρησιμοποιείται στις ακόλουθες δοκιμασίες (Gorman *et al.*, 1982a Gorman *et al.*, 1982b).

### Ποσοτικός προσδιορισμός της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης

Η αντίδραση αυτή γίνεται σε κάθε πείραμα διαμόλυνσης κυττάρων προκειμένου να γίνει η διόρθωση της αντίστοιχης τιμής CAT (ακετυλτρανσφεράση της χλωραμφαινικόλης) με βάση την αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης (transfection efficiency). Σε κάθε ανεξάρτητη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκε και το πλασμίδιο pCMVβ το οποίο περιέχει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης. Η β-γαλακτοσιδάση είναι ένα ένζυμο το οποίο υδρολύει β-D-γαλακτοσίδια. Τα επίπεδα του ένζυμου μπορούν να μετρηθούν με τη χρησιμοποίηση κατάλληλων άχρωμων υποστρωμάτων τα οποία μετατρέπονται σε έγχρωμα μετά από υδρόλυση τους. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι το ο-νιτροφαινυλο β-D-γαλακτοσίδιο (ONPG). Το γαλακτοσίδιο αυτό είναι άχρωμο αλλά με την παρουσία της β-γαλακτοσιδάσης υδρολύεται σε γαλακτόζη και ο-νιτροφαινόλη, η οποία είναι κίτρινη και μπορεί να μετρηθεί από την απορρόφησή του στα 420 nm. Εάν η συγκέντρωση του ONPG είναι αρκετά υψηλή, τότε το ποσό της ο-νιτροφαινόλης που παράγεται είναι ανάλογο του ποσού της β-γαλακτοσιδάσης που υπάρχει στα κύτταρα και συνεπώς ανάλογο της αποτελεσματικότητας του μετασχηματισμού.

### Αντίδραση της Lac Z

1. Χρησιμοποιούμε 20-65  $\mu$ l από το υπερκείμενο κάθε δείγματος και προσθέτουμε 550  $\mu$ l διάλυμα lac Z, 100  $\mu$ l ONPG (4 mg/ml H<sub>2</sub>O) και 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλη.
2. Επωάζουμε στους 37°C, όπου η διάρκεια της επώασης ποικίλλει ανάλογα με την αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης (περίπου 15 έως 60 min).
3. Μετά την εμφάνιση ενός κίτρινου χρώματος στα δείγματα, διακόπτουμε την αντίδραση με την προσθήκη 200  $\mu$ l 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Η προσθήκη Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του pH στο 11, όπου η β-γαλακτοσιδάση είναι ανενεργή.
4. Μετράμε την οπτική απορρόφηση στα 420 nm. Σαν δείγμα μάρτυρας χρησιμοποιείται μία αντίδραση με 0.25 M Tris-HCl pH 7.8.

### Ποσοτικός προσδιορισμός της ενεργότητας της ακετυλτρανσφεράσης της χλωραμφαινικόλης (CAT assay)

Η ευαίσθητη αυτή δοκιμασία στηρίζεται στο γεγονός ότι το γονίδιο της CAT δεν ανευρίσκεται σε ευκαρυωτικά αλλά μόνο σε πρόκαρυωτικά κύτταρα. Έτσι η εισαγωγή του γονιδίου CAT σε ευκαρυωτικά κύτταρα μετά από μετασχηματισμό με πλασμίδια έκφρασης (γ-CAT, RSV-CAT) επιτρέπει την ενζυμική ανίχνευση σε κυτταρικά εκχυλίσματα με χρωματογραφία λεπτής στιβάδος (thin layer chromatography) (Gorman *et al.*, 1982a Gorman *et al.*, 1982b).

1. Χρησιμοποιούμε 75  $\mu$ l από το εκχύλισμα των κυττάρων και το θερμαίνουμε στους 65°C για 5 min για την αδρανοποίηση των ενδογενών ακετυλασών.
2. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 4 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε σωληνάριο Eppendorf και προσθέτουμε 30  $\mu$ l 1M Tris-HCl pH 7.8, 10  $\mu$ l ακετυλο-συνένζυμο A (CoA) και 1.5-4.0  $\mu$ l <sup>14</sup>C, ανάλογα με την ειδική ενεργότητα.

3. Τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για μία ώρα, και μετά εκχυλίζονται με 200 μl οξείκο αιθύλιο (ethyl acetate) με έντονη ανάδευση. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 4 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η χλωροαφαινικόλη και τα ακετυλιωμένα της παράγωγα βρίσκονται στην οργανική φάση την οποία και συλλέγουμε. Το οξείκο αιθύλιο απομακρύνεται με ξήρανση σε κενό.
4. Τα δείγματα επαναδιαλύονται σε 20 μl οξείκο αιθύλιο και τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύονται σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.

### Ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης (Protein assay)

1. Χρησιμοποιούμε 5 μl από το εκχύλισμα των κυττάρων και προσθέτουμε 800 μl H<sub>2</sub>O και 200 μl Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad).
2. Στη συνέχεια μετράμε την οπτική απορρόφηση στα 595 nm. Σαν δείγμα μάρτυρας χρησιμοποιείται μία αντίδραση με 5 μl 0.25 M Tris-HCl pH 7.8.

Η μέση δραστηριότητα CAT κάθε πλασμιδίου προσδιορίζεται μετά από 3 έως 6 δοκιμασίες. Οι διορθωμένες μετρήσεις προέρχονται από τον υπολογισμό των τιμών CAT, Lac Z, και πρωτεΐνης με τον τύπο:

$$\text{CAT (δείγμα)} \times \text{Lac Z (δείγμα)} \frac{\text{Lac Z (πλασμίδιο αναφοράς)} \times \text{πρωτεΐνη (πλασμίδιο αναφοράς)}}{\text{πρωτεΐνη (δείγμα)} \times \text{CAT (πλασμίδιο αναφοράς)}} \times 100$$

### Τεχνική της συγκατακρήμνισης πλασμιδίων της λουσιφεράσης με λιποσώματα

Διάφορα τμήματα κλωνοποιήθηκαν και ελέγχθηκαν λειτουργικά σε φορείς έκφρασης που περιέχουν τον υποκινητή του εμβρυϊκού Gγ-γονιδίου σε σύντηξη με το γονίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης από το έντομο *Photinus pyralis*. Το ευαίσθητο αυτό σύστημα επιτρέπει την ακριβή εκτίμηση των ιδιοτήτων των υπό ανάλυση τμημάτων και απαιτεί σαφώς λιγότερο χρόνο ανάλυσης από το σύστημα της CAT (Transfection Guide, Promega Corporation 1996; Protocols and Application Guide, Promega Corporation 1998).

Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια μεταφέρθηκαν με διαμόλυνση, με τη βοήθεια συστήματος κατιονικών λιποσωμάτων (Tfx-20 Promega, Cat.# E2392) στα κύτταρα και μελετήθηκε η επίπτωση των επιμέρους αλληλουχιών στην μεταγραφική δραστηριότητα του υβριδικού γονιδίου. Η διόρθωση για την αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης έγινε με τη ταυτόχρονη σύνδιαμόλυνση του πλασμιδίου pRL-TK-Rluc που περιέχει το cDNA της λουσιφεράσης από τον θαλάσσιο οργανισμό *Renilla reniformis*. Οι μετρήσεις έγιναν σε συσκευή φωταύγειας τύπου Turner Designs TD-20/20 χρησιμοποιώντας το Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega Cat.# E1910) σύμφωνα με της οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας που συνοψίζονται κατωτέρω.

1. Μετά την διαμόλυνση τα κύτταρα συλλέγονται και λύνονται με 1X passive lysis buffer (PLB).
2. Προσθέτουμε 100 μl Luciferase Assay Reagent II (LAR II) σε αντίστοιχα σωληνάκια για κάθε δείγμα.
3. Προσθέτουμε 20 μl από το κυτταρικό ίζημα στο LAR II, και ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση στη συσκευή μέτρησης της φωταύγειας. Η πρώτη τιμή είναι αυτή της ενεργότητας της λουσιφεράσης.
4. Στο ίδιο δείγμα προσθέτουμε 100 μl Stop and Glo Reagent, και ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση στη συσκευή μέτρησης της φωταύγειας. Η δεύτερη τιμή είναι αυτή της ενεργότητας της *Renilla* που χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί η αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης. Επανάληψη από το στάδιο 3 για τα υπόλοιπα δείγματα.

### Αλυσιδωτή αντίδραση της Taq DNA πολυμεράσης (PCR)



Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης είναι μία τεχνική που έφερε πραγματική επανάσταση στην Μοριακή Βιολογία (Mullis *et. al.*, 1986). Με την τεχνική PCR, μία μικρή συγκέντρωση DNA από ορισμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων μπορεί να αντιγραφεί από το ένζυμο DNA πολυμεράση σε μεγάλες ποσότητες γρήγορα και εκλεκτικά από οποιοδήποτε δείγμα DNA που την περιέχει. Η μέθοδος έχει πάρα πολλά πλεονεκτήματα εν σχέση με άλλες συμβατικές μεθόδους για την κλωνοποίηση τμημάτων DNA καθώς και πολλές άλλες εφαρμογές της τεχνολογίας του DNA.

### Κλασσική αντίδραση PCR

1. Σε σωληνάριο Eppendorf των 0.7 ml προσθέτουμε:

10X Taq Pol buffer	5.0 μl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3.0 μl
10 mM dNTPs	1.0 μl
Εκκινητής A 25 pm/μl	1.0 μl
Εκκινητής B 25 pm/μl	1.0 μl
Taq DNA πολυμεράσης 5 u/μl	0.5 μl
H <sub>2</sub> O έως τα	50.0 μl

2. Προσθέτουμε δύο σταγόνες παραφινέλαιο και στην συσκευή του PCR (MJ Research) χρησιμοποιούμε το παρακάτω πρόγραμμα:

1. Αρχική αποδιάταξη	95°C για 3-5 min
2. Αποδιάταξη	94°C για 1 min
3. Επαναδιάταξη	55°C για 1 min. Η θερμοκρασία καθορίζεται από το T <sub>m</sub> των εκκινητών.
4. Επιμήκυνση	72°C για 1 min. Ο χρόνος καθορίζεται από το μήκος του DNA που πολλαπλασιάζεται.
5. Επανάληψη	20-29 φορές από το 2 <sup>ο</sup> στάδιο
6. Τελική επιμήκυνση	72°C για 5-10 min
7. Διατήρηση	4°C

### Χρήση του PCR για την επιλογή βακτηριακών κλώνων (Rapley *et al.*, 1992).

1. Σε σωληνάριο Eppendorf των 0.7 ml προσθέτουμε:

10X Taq Pol buffer	5.0 μl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4.0 μl
10 mM dNTPs	1.0 μl
Εκκινητής A	0.1 μM
Εκκινητής B	0.1 μM
Taq DNA πολυμεράσης 5 u/μl	0.5 μl
H <sub>2</sub> O έως τα	50.0 μl

2. Με οδοντογλυφίδα παίρνουμε την αποικία, την ακουμπάμε σε ένα άλλο αριθμημένο τρυβλίο και στη συνέχεια την ακουμπάμε στρίβοντας την στο βάθος ενός αντίστοιχου αριθμημένου

σωληναρίου Eppendorf. Επαναλαμβάνουμε με όσες αποικίες θέλουμε. Το τρύβλιο επωάζεται στους 37°C για περίπου 5 ώρες.

3. Προσθέτουμε δύο σταγόνες παραφινέλαιο σε κάθε σωληνάριο Eppendorf και στη συσκευή του PCR χρησιμοποιούμε το παρακάτω πρόγραμμα:

1. Αρχική αποδιάταξη	95°C για 5 min
2. Αποδιάταξη	94°C για 15 sec.
3. Επαναδιάταξη	55°C για 30 sec. Η θερμοκρασία καθορίζεται από το Tm των εκκινητών.
4. Επιμήκυνση	72°C για 1 min. Ο χρόνος καθορίζεται από το μήκος του DNA που πολλαπλασιάζεται.
5. Επανάληψη	20-29 φορές από το 2 <sup>ο</sup> στάδιο
6. Τελική επιμήκυνση	72°C για 5-10 min
7. Διατήρηση	4°C

### **Χρήση του PCR για τη δημιουργία σημειακών μεταλλάξεων (Higuchi 1990)**

Χρησιμοποιούμε την κλασσική αντίδραση PCR με τις ακόλουθες τροποποιήσεις:

1. Δύο συμπληρωματικοί εκκινητές σχεδιάζονται ώστε να περιέχουν την μεταλλαγμένη περιοχή (1-5 βάσεις προς το 5' άκρο ή στο κέντρο) την οποία θέλουμε να μεταλλάξουμε. Σε συνδυασμό με τους εκκινητές του φορέα επιτελούμε δύο αντιδράσεις PCR. Η κάθε αντίδραση περιέχει ένα εκκινητή του φορέα και τον συμπληρωματικό μεταλλαγμένο εκκινητή της περιοχής.
2. Μετά την αντίδραση της PCR ακολουθεί απομόνωση του αναμενόμενου προϊόντος από το πήκτωμα της αгарόζης.
3. Προσθέτουμε ίσες ποσότητες από κάθε προϊόν και επαναλαμβάνουμε την αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας μόνο τους εκκινητές του φορέα.
4. Τέλος απομόνωνουμε το αναμενόμενο μεγαλύτερο προϊόν από το πήκτωμα της αгарόζης.

### **Ανάλυση με αντίστροφη μεταγραφή του mRNA με την μεθοδολογία της PCR**

Για την ανάλυση μεταγραφής του RNA χρησιμοποιήθηκε το kit Reverse Transcription System της Promega (Cat.# A3500). Επειδή είναι σημαντικός ο αποκλεισμός ίχνους DNA και προκειμένου να διαπιστώσουμε ή να αποκλείσουμε την ύπαρξη DNA στα δείγματα του RNA, επιπρόσθετα επιτελείται αντίδραση PCR, με τη χρήση γενωμικών εκκινητών. Στην περίπτωση πρόσμειξης DNA στο προϊόν PCR εφαρμόζουμε την επεξεργασία του RNA με DNase I.

#### **Επεξεργασία του RNA με DNase I**

Σε 20 µg RNA προσθέτουμε :

15 µl 10X DNase I Buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM MgCl<sub>2</sub>)  
 1.5 µl 0.1M DTT (Προσθέτουμε το DTT μετά το buffer)  
 150 u RNasin, Promega (Cat. # N2111).  
 15 u RQI, RNase-free DNase, Promega (Cat. # M6101).  
 H<sub>2</sub>O DNase free, Promega (Cat.# DP1193) έως τελικό όγκο 150 µl.

Επώαση για 60-75 min στους 37°C. Ακολουθεί εκχύλιση με όξινη φαινόλη, φαινόλη/χλωροφόρμιο και χλωροφόρμιο, κατακρήμνιση με 3 M NaOAc pH 5.3 και δύο όγκους αιθανόλης.

**Πίνακας 1: Εκκινητές**

Εκκινητής	Αλληλουχία	Τοποθεσία
HPFH-4/F	CTG-ACA-TGT-AGC-ATG-AAT-GCT-TGT-G	49,309-49,334
HPFH-4/R	GAC-ACA-GAG-TGC-TGA-TTA-GTG-CAT-T	250 bp 3' από το σημείο αποκοπής της HPFH-4
HPFH-4 F4	AAT-CTA-ATG-CCG-CCA-CTG-CCG	
HPFH-4 F3	AAT-GAT-GTG-CTA-ATA-ATA	188 bp 3' από το σημείο αποκοπής της HPFH-4
HPFH-4 F2	TAC-CAC-CAG-AGT-CCA-GAA	50,330-50,348
HPFH-4 R3	CAC-AGA-TTG-CTG-ATT-GGT-GC	93 bp 3' από το σημείο αποκοπής της HPFH-4
HPFH-3/R	TAG-ACA-TGA-AAG-TTC-TCC-AG	121 bp 3' από το σημείο αποκοπής της HPFH-3
German F4	GCC-ATT-TCT-CTT-CCT-TCT-GGT-GAG-GA	37,172-37,197
German F3	GCC-TGA-TCC-CTT-CTG-TCT-AAC-TTC-GA	37,481-37,506
German F2	GGC-TAC-TTC-ATA-GGC-AGA-GT	37,807-37,826
German F1	ATC-TCC-ACT-TGT-CCT-CTG-TG	37,407-37,426
German R3	GAC-TGC-TGG-TGT-ACA-GTG-AAC-ATC-TG	240 bp 3' από το σημείο αποκοπής της HPFH-4
German R2	CCT-GAA-TCA-TGT-CCT-CTC-AC	161 bp 3' από το σημείο αποκοπής της HPFH-4
German R1	ACT-GGA-CCT-TAG-CTT-TTC-GG	117 bp 3' από το σημείο αποκοπής της HPFH-4
3' Gγ	CTC-TAT-AGG-ACA-GGA-CTC-CTC-AGA	
Chinese A	CTG-CAG-TAG-AGC-CTT-AGG-TAT-TAA-CG	50 bp 3' από την Eco RI θέση του ενισχυτή
690	TTC-CAG-CAG-AAG-ACT-GAC-CCT-TCT	174 bp 3' από την Eco RI θέση του ενισχυτή
THAI	TCA-GAC-TAC-CAA-AGA-GAT-GC	
ChB R2	TTA-ACC-TCC-CCA-AGA-CTC	3' από το σημείο αποκοπής της Κινεζικής (Αγδβ) <sup>ο</sup> θαλασσαιμίας, αντίστροφος
ChB R1	CCA-TTC-TTC-CAT-CTT-TAT-ATC	268-248 bp 3' από το σημείο αποκοπής της Κινεζικής (Αγδβ) <sup>ο</sup> θαλασσαιμίας, αντίστροφος
Ch A R1	TGG-TGC-AAG-GAA-GAG-TCA-ATT-CGG	Τμήμα A της Κινεζικής θαλασσαιμίας 10
Ch B1	TTC-TCC-TGA-GGC-GTC-TGC-CTT-TCT-GT	
Ch B2	GCA-CTC-AAC-ACA-TGT-GTG-TCG-CAC-A	
Ch B3	CCT-GAA-TAT-TAG-CTT-TGC	
Ch A F1	CAT-CCG-AAT-TGA-CTC-TTC-CTT-GCA-CC	Τμήμα A της Κινεζικής θαλασσαιμίας 10
Ch B F4	CTT-GAA-TAC-TCA-ATT-CAG	
ChB F5	ATC-AGA-ACC-CTG-CTT-ACC	
Ch B F6	CTT-CTG-AAT-GAT-AAT-AAT	
Ch B F7	AAT-TAT-ACT-CAG-TGT-GCT	
ORF/F	CAT-CCG-AAT-TGA-CTC-TTC-CTT-GCA-CC	Περιοχή του ενισχυτού της HPFH-6
ORF/R	GGT-ATT-GTG-GCC-ACA-GAA-AGG-CAG-A	
ACT-sence	TGA-CGG-GGT-CAC-CCA-CAC-TGT-GCC-CAT-CTA	
ACT-anti	CTA-GAA-GCA-TTT-GCG-GTG-GAC-GAT-GGA-GGG	
5'GγF1	AAT-CCT-GGA-CCT-ATG-CCT	34,030-34,047
		38,966-38983
γ IVS2	CCT-GTA-TGC-TGT-AGG-CTG	35,629-35,646
γ-globin	TGG-ACC-CAG-GTT-CTT-TGA	34,665-34,682 και 39,801-39,818

β-globin	GGG-GTG-AAT-TCT-TTG-CC	36,000-36016 και 40,916-40,932
Epsilon	GCG-AGA-TGA-ATG-TGG-AAG-A	
Gamma	CCC-AGG-AGC-TTG-AAG-TTC	
g-Gamma	CTT-GGG-AGA-TGC-CAT-AAA-GC	
a-Gamma	GCC-TAT-CCT-TGA-AAG-CTC-TG	
East European	TGC-AGC-TTG-TCA-CAG-TGC-AGC-TCA-C	62,660-62,684
D-Bgl II	GTG-TCA-GAT-CTG-GGA-GTT-TCC-TGG-TGA-TCA	45,739-45,710, αντίστροφος
F-Bgl II	TGG-TAG-AGA-CAT-TGT-CTT	49,808-49,825
u-Xba I	GTA-TAC-CTC-CCA-TAC-CAT-GTG-GCT	51,310
d- Ava I	GAG-GAC-AAG-GAC-CAC-TTG-AGA-CTC-A	
u-AsuII	TAC-CCT-ATC-ATA-GGC-CCA-CCC-CAA-AT	64,730

# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ**

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

Οι μεταλλάξεις που δημιουργούνται από μεγάλα ελλείματα στο σύμπλεγμα της β-σφαιρίνης έχουν ως αποτέλεσμα τη μη ολοκλήρωση της μεταστροφής της αιμοσφαιρίνης και οδηγούν στην δημιουργία δύο φαινοτυπικά διακριτών συνδρόμων: τη δβ-θαλασσαιμία και την HPFH. Η ετερογένεια που παρατηρείται τόσο στο μέγεθος όσο και στα σημεία αποκοπής σε ορισμένες μεταλλάξεις, υποδηλώνει ότι διάφορα *cis* ρυθμιστικά στοιχεία, όπως ενισχυτές ή αποσιωπητές, κατανομούνται φυσιολογικά κατά μήκος του συμπλέγματος. Ενδεχομένως, αυτά τα στοιχεία να συμμετέχουν στο μηχανισμό της μεταστροφής της αιμοσφαιρίνης και να είναι υπεύθυνα για τους προκύπτοντες φαινότυπους.

Η σύγκριση παρόμοιων μεταλλάξεων μας επιτρέπει να εξετάσουμε δύο υποθέσεις που έχουν προταθεί για να εξηγήσουν τους φαινότυπους της δβ-θαλασσαιμίας και HPFH, δηλ. α) ότι η αύξηση στην έκφραση των γ-γονιδίων οφείλεται στη διαμετάθεση ενισχυτών από το 3' άκρο του συμπλέγματος σε γειτνίαση με τα γ-γονίδια ή/και β) στην παρουσία δυνητικών αποσιωπητών μεταξύ των Αγ και δ-γονιδίων οι οποίοι αφαιρούνται από τα ελλείματα του DNA. Οι μηχανισμοί των δύο αυτών υποθέσεων είναι δυνατόν να ισχύουν συγχρόνως.

Στο πρώτο μέρος των αποτελεσμάτων διερευνήθηκε η αξία της πρώτης υπόθεσης, για την διαμετάθεση ενισχυτών, χρησιμοποιώντας ως μοντέλο φυσικώς απαντώσες μεταλλάξεις. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τα συγκρίσιμα ελλείματα της HPFH-3 (Kutlar *et al.*, 1984; Henthorn *et al.*, 1986) της HPFH-4 (Saglio *et al.*, 1986) καθώς και της Γερμανικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας (Anagnou *et al.*, 1988).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: I A

Η πρώτη μετάλλαξη που μελετήθηκε παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα HbF και αναφέρεται ως Ινδική HPFH ή HPFH-3. Οι ετεροζυγώτες παρουσιάζουν HbF 22-23% και αιματολογικούς δείκτες που σχετίζονται με το φαινότυπο (Kutlar *et al.*, 1984). Δύο άλλες μεταλλάξεις, οι HPFH-1 και HPFH-2 είχαν προηγουμένως περιγραφεί οι οποίες όμως διαφέρουν στο λόγο έκφρασης μεταξύ των Γγ και Αγ γονιδίων. Σε προηγούμενη μελέτη είχε προσδιοριστεί ότι το 5' άκρο του ελλείματος της HPFH-3 επισυμβαίνει 3' του Αγ-γονιδίου μέσα σε επαναληπτική αλληλουχία Alu I, ενώ το 3' άκρο του ευρίσκεται μέσα σε επαναληπτική αλληλουχία LINE 1 που εντοπίζεται 30 kb 3' του β-γονιδίου. Με βάση αυτά τα δεδομένα, το ολικό μήκος του ελλείματος προσδιορίστηκε ότι είναι 48.5 kb (Henthorn *et al.*, 1986). Η ίδια ομάδα είχε προτείνει ότι η διαφορά που παρατηρείται στο λόγο Γγ:Αγ στις τρεις HPFH μεταλλάξεις ενδεχομένως να οφείλεται σε διαφορές στις διαμετατιθέμενες περιοχές από το 3' άκρο του συμπλέγματος. Η ανωτέρω μελέτη μας επέτρεψε να ελέγξουμε λειτουργικά τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* την 3' περιοχή της HPFH-3 για την παρουσία ενισχυτού που θα εξηγούσε τον προκύπτοντα φαινότυπο της HPFH.

### Λειτουργική ανάλυση της Αγ-HPFH-3 σε διαγονιδιακά ποντίκια

Το επανασυσταθέν γεφυρικό τμήμα 13.6 kb (Not I-Xba I) από την κλωνοποίηση DNA ετεροζυγώτου με HPFH-3 χρησιμοποιήθηκε σε *in vivo* μελέτες. Το ανασυνδυασμένο τμήμα περιέχει το εμβρυϊκό Αγ-γονίδιο με τις πλευρικές του αλληλουχίες καθώς και περίπου 6.2 kb αλληλουχιών που προέρχονται από το 3' άκρο του συμπλέγματος (Σχήμα 1).

**Σχήμα 1.** Στάδια της επανασύστασης του DNA της HPFH-3, μετά από σύνδεση του κλωνοποιημένου τμήματος 11.5 kb Xba I με το τμήμα 2.0 kb Hind III-Xba I, που περιλαμβάνει το 5' άκρο του Αγ-γονιδίου. Η θέση Hind III μετατράπηκε σε θέση Not I μετά από προσθήκη των αντίστοιχων συνδετών (linkers).

Σε συνεργασία με το εργαστήριο του Δρ. F. Constantini (Columbia University, N.Y.) έγινε εισαγωγή του επανασυσταθέντος τμήματος με μικροένεση σε γονιμοποιημένα ωάρια ποντικού. Προέκυψαν δώδεκα διαγονιδιακά ποντίκια θετικά για την ενσωμάτωση του ανθρώπινου τμήματος Αγ HPFH-3. Χρησιμοποιώντας δοκιμασίες προστασίας της RNase (RNase protection assay) αναλύθηκαν δείγματα από λεκιθικό ασκό 11.5 ημερών, εμβρυϊκό ήπαρ 16 ημερών καθώς και από περιφερικό αίμα από ενήλικα ποντίκια. Τρία ποντίκια ήταν αρνητικά στο πρώιμο εμβρυϊκό στάδιο, που οφείλεται ενδεχομένως στην ενσωμάτωση του Αγ HPFH-3 σε μη ευνοϊκή χρωμοσωμική θέση ή στην επιρροή από τα φαινόμενα θέσεως (position effect variegation, PEV) όπως προαναφέρθηκε προηγουμένως. Τέσσερα ποντίκια εξέφρασαν το Αγ γονίδιο μόνο στον λεκιθικό ασκό, ενώ δύο ποντίκια εξέφρασαν τόσο στον λεκιθικό ασκό όσο και στο εμβρυϊκό ήπαρ. Η έκφραση του Αγ γονιδίου στο εμβρυϊκό ήπαρ στα δύο ποντίκια ευρίσκεται, σε αντίθεση με το πρότυπο έκφρασης των Αγ-γονιδίων όταν εισάγονται χωρίς επιπρόσθετες αλληλουχίες και εκφράζονται μόνο στην πρώιμο εμβρυϊκή ζωή (Enver *et al.*, 1990). Τα ανώτερα δεδομένα ενισχύουν έντονα την άποψη, ότι οι 3' διαμετατιθέμενες αλληλουχίες στο έλλειμα της HPFH-3 κατέχουν ιδιότητες μεταγραφικού ενισχυτού με την επιπρόσθετη ικανότητα να τροποποιούν την αναπτυξιακή ρύθμιση των εμβρυϊκών Αγ-γονιδίων (Anagnostou *et al.*, 1995).

### **Λειτουργική ανάλυση της 3' διαμετατιθέμενης περιοχής**

Στη συνέχεια θελήσαμε να διερευνήσουμε περαιτέρω με *in vitro* λειτουργικές δοκιμασίες παροδικής διαμόλυνσης (CAT assays) την παρουσία του ανώτερου ενισχυτή και να εντοπίσουμε την αλληλουχία που τον περιλαμβάνει. Για τον σκοπό αυτό, απομονώθηκαν δέκα διάφορα συνεχόμενα (A, B, C, D και F) και αλληλοκαλυπτόμενα τμήματα (F1, G, H, J και I) που περιλαμβάνουν τις 6.2 kb από την 3' διαμετατιθέμενη περιοχή (Σχήμα 2).

**Σχήμα 2.** Στρατηγική που ακολουθήθηκε για τη ανίχνευση στοιχείων ενισχυτών στην 3' διαμετατιθέμενη περιοχή (γραμμοσκιασμένο τμήμα) του ελλείμματος της HRFH-3. Δέκα συνεχόμενα ή αλληλοκαλυπτόμενα τμήματα από την περιοχή αυτή ελέγχθηκαν με την δοκιμασία CAT.

Όλα τα τμήματα υποκλωνοποιήθηκαν σε διαφορετικούς προσανατολισμούς εν σχέσει με το υβριδικό γονίδιο  $\gamma$ -CAT (Anagnostou *et al.*, 1995) που περιλαμβάνει το γονίδιο της μεταφοράς της ακετυλχλωραμφοαινικόλης (CAT) συνδεδεμένο με τον υποκινητή του εμβρυϊκού G $\gamma$ -γονιδίου (-384 έως +36 από το σημείο έναρξης της μεταγραφής). (Bodine *et al.*, 1987). Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια μεταφέρθηκαν με διαμόλυνση σε ερυθροποιητικά κύτταρα K562 και σε μη-ερυθροποιητικά κύτταρα HeLa όπου και μελετήθηκε η επίπτωση τους στην έκφραση του γονιδίου CAT. Όλες οι λειτουργικές CAT δοκιμασίες έγιναν σε συνεργασία με τον Καθ. Ν. Μοσχονά (IMBB και Πανεπιστήμιο Κρήτης), όπου το κάθε πλασμίδιο ελέγχθηκε από 3 έως 6 φορές και οι τελικές τιμές προσδιορίστηκαν με βάση την αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης (Σελ. 49-50 των αποτελεσμάτων).

**Πίνακας 1.** Τα δέκα τμήματα που ελέγχθηκαν λειτουργικά με τα αντίστοιχα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση τους, καθώς και το μέγεθος κάθε τμήματος.

Τμήμα	Ενζύμα	(bp)	τικότητα CAT
A	Bam HI-Bgl II	1,052	+
B	Bgl II-Bgl II	1,868	-
C	Bgl II-Kpn I	1,514	-
D	Kpn I-Xba I	1,344	-
F	Ava I-Bam HI	535	+++
F1	Hph I-Hph I	753	+++
G	Ava I-Bgl II	1,594	+++
H	Bam HI-Nco I	1,866	-
I	Bgl II-Xba I	2,860	-
J	Nco I-Kpn I	2,569	-

Τα αποτελέσματα της λειτουργικής ανάλυσης (Πίνακας 1) έδειξαν ότι τα τμήματα F, F1, G και σε μικρότερο βαθμό το τμήμα A, περιέχουν ιδιότητες ενισχυτή. Αυτά τα τμήματα βρέθηκαν να αυξάνουν την δραστηριότητα της CAT κατά δύο ως τρεις φορές στα ερυθροποιητικά κύτταρα K562 ενώ καμία αύξηση δεν παρατηρήθηκε στα μη-ερυθροποιητικά κύτταρα HeLa. Η προσεκτική αυτή ανάλυση εντόπισε τον ενισχυτή στο τμήμα F σε μία περιοχή μήκους 0.5 kb (AvaI-BamHI) και στο τμήμα F1 σε μία περιοχή μήκους 0.7 kb (HphI-HphI) τα οποία εδράζονται αμέσως μετά το 3' σημείο αποκοπής της HRFH-3. Η διαφορά μεταξύ των δύο τμημάτων, είναι ότι το τμήμα F1 περιέχει αλληλουχίες αποκλειστικά από το άκρο της αποκοπής από



την διαμετατιθέμενη περιοχή ενώ το τμήμα F περιέχει και 66 bp από την αλληλουχία Alu I που εντοπίζεται ανοδικά από το σημείο αποκοπής (Σχήμα 2).

### **Ενισχυτής HPFH-3: Λειτουργική ανάλυση σε ετερόλογους και μη-υποκινητές**

Ο ενισχυτής της HPFH-3 (τμήμα F) ελέγχθηκε περαιτέρω για την οντογενετική του εξειδίκευση σε υποκινητές ετερόλογων γονιδίων της σφαιρίνης με πρώιμο εβρυϊκή (ε-γονίδιο) ή ενηλίκου τύπου εξειδίκευση (δ- και β-γονίδια) καθώς και στον μη-ετερόλογο υποκινητή της διϋδροφυλικής αφυδρογονάσης (DHFR). Τα αποτελέσματα μετά από διαμόλυνση σε κύτταρα K562 έδειξαν ότι ο ενισχυτής της HPFH-3 αυξάνει κατά 2.3 φορές την δραστηριότητα του ε-CAT γονιδίου. Δεν είχε καμία επίπτωση στην έκφραση των ενηλίκων δ- και β- γονιδίων, ενώ μειωμένη κατά 3.8 φορές ήταν η έκφραση στον μη-ετερόλογο υποκινητή της DHFR-CAT. (Anagnou *et al.*, 1995). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η επίπτωση του ενισχυτή 3' της μετάλλαξης HPFH-3 περιορίζεται στους υποκινητές του όψιμου εμβρυϊκού γ- καθώς και στον υποκινητή του πρώιμου εμβρυϊκού ε-γονιδίου.

#### Δραστηριότητα CAT

**Σχήμα 3.** Η λειτουργική ανάλυση των τμημάτων F1, F, G, A και H στην έκφραση του γCAT γονιδίου εντόπισαν τον ενισχυτή (γραμμοσκιασμένο τμήμα) αμέσως μετά από το 3' σημείο αποκοπής (κάθετο βέλος) που επεκτείνεται για περίπου 700 bp.

### **Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του ενισχυτή HPFH-3 και της διαμετατιθέμενης περιοχής**

Η ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του DNA της περιοχής του ενισχυτή είχε ήδη αναλυθεί προηγουμένως (Henthorn *et al.*, 1986; GenEMBL: M13703) και περιέχει 445 bp από το 3' σημείο αποκοπής της μετάλλαξης. Στην συνέχεια επεκτείναμε αυτή την ανάλυση περαιτέρω κατά 5,816 bp ώστε να ολοκληρωθεί η ανάλυση της πλήρους αλληλουχίας που ελέγξαμε λειτουργικά. Το συνολικό μήκος από το 3' σημείο αποκοπής έως το τέλος της διαθέσιμης διαμετατιθέμενης περιοχής προσδιορίστηκε ότι είναι 6,261 bp (Anagnou *et al.*, 1995; GenEMBL: X81476). Η ανάλυση έδειξε ότι η περιοχή του ενισχυτή περιέχει ένα

σύμπλεγμα από επαναληπτικές αλληλουχίες με περιοχές που έδειξαν 61-70% ομολογία με μία συντηρημένη περιοχή που ευρίσκεται στον ενισχυτή 3' του β-γονιδίου του κοτόπουλου και 3' του Αγ-γονιδίου του ανθρώπου, καθώς και τουλάχιστον σε 10 περιοχές του ιού SV40 (GTGGRRRG). Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι οι DNA αλληλουχίες που ευρίσκονται 3' του σημείου αποκοπής του ελλείματος της HPFH-3 είναι συμβατές με τη δομή και λειτουργία ενός στοιχείου ενισχυτή που έχουν την ικανότητα να τροποποιούν την αναπτυξιακή ρύθμιση του Αγ-γονιδίου (Henthorn *et al.*, 1986; Anagnou *et al.*, 1995).

Στην συνέχεια ελέγξαμε εάν ο ενισχυτής παρουσιάζει ομολογία με άλλα γνωστά ρυθμιστικά στοιχεία. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε τα προγράμματα Blast της NCBI και το RepeatMasker (<http://www.ftp.genome.washington.edu/RM/RepeatMasker>).

Η ανάλυση μας έδειξε ότι ο ενισχυτής της HPFH-3 παριστά μέρος μιας μακράς τελικής επαναληπτικής αλληλουχίας (LTR) ενός ενδογενούς ρετροϊού. Το στοιχείο αυτό εμφανίζει ομολογία 87% με τις περιοχές U3, R και U5 μιας νέας LTR περιοχής, της ανθρώπινης οικογένειας των ενδογενών ρετροϊών (human endogenous retroviruses, HERVs) της οικογένειας ERV-9, η οποία εμφανίζει επίσης ιδιότητες ισχυρού ενισχυτού σε ερυθροποιητικά κύτταρα και εντοπίζεται 5' της περιοχής LCR (Long *et al.*, 1998). Επομένως, δύο παρόμοια στοιχεία ERV-9 LTR φαίνεται να περικλείουν το σύμπλεγμα της β-σφαιρίνης του ανθρώπου (Long *et al.*, 1998).

#### **Σχήμα 4.** Δύο παρόμοια στοιχεία ERV-9 LTR περιλαμβάνουν το σύμπλεγμα της β-σφαιρίνης.

Ακολούθως η νέα αναλυθείσα DNA αλληλουχία (GenEMBL: X81476) χρησιμοποιήθηκε σε συνεργασία με το εργαστήριο της Δρ. D. Tuan (Medical College of Georgia) για την κλωνοποίηση με PCR της αντίστοιχης περιοχής ERV-9 από άλλα είδη. Τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα έχουν δείξει ότι η αντίστοιχη περιοχή δεν υπάρχει στο DNA του χιμπατζή αλλά είναι παρούσα στο DNA του γίββωνα, του ουραγουτάγκου και του γορίλλα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η αντίστοιχη περιοχή στο DNA του χιμπατζή περιλαμβάνει μόνο ένα στοιχείο LINE 1, ενώ ο άνθρωπος έχει και τα δύο (ERV-9 και LINE1) στοιχεία (Tuan *et al.*, υπό προετοιμασία). Τα δεδομένα αυτά ενισχύουν την άποψη ότι ορισμένα μεταθετά στοιχεία παρουσιάζουν αλλαγές λόγω εξέλιξης (Löwer *et al.*, 1996) Το στοιχείο ERV-9-LTR από χιμπατζή έχει κλωνοποιηθεί στο φορέα έκφρασης Green Fluorescent Protein (GFP) όπου παρουσιάζει στοιχεία ενισχυτού τόσο σε ερυθροποιητικά όσο και μη-ερυθροποιητικά κύτταρα (Tuan *et al.*, 1999).

Η περαιτέρω ανάλυση της περιοχής εντόπισε i) πολλαπλές δυνητικές θέσεις δέσμωσης για διάφορους παράγοντες (GATA-1, YY1 και GTI) ii) 30 ανοικτά μεταγραφικά πλαίσια (open reading frames, ORFs) με μήκος από 102 έως 369 bp, όπου το μεγαλύτερο παρουσίασε ομολογία 37% στο αμινοξικό επίπεδο προς τη συνθάση του μυκοκηροσικού οξέος του *Mycobacterium leprae* και 34% ομολογία προς την πρωτεΐνη αντίστασης στην τετρακυκλίνη του *Bacillus subtilis*, και iii) ομολογία 87-88% με τις περιοχές των χρωμοσωμάτων 5q31 και 17 (Kosteas *et al.*, 1999). Η περιοχή αυτή βρίσκεται μετά από το στοιχείο LINE1 και εδράζεται 2,514 bp καθοδικά του 3' άκρου της HPFH-3 και αποτελεί μέρος αλληλουχίας μιας νέας υπεροικογένειας μεταθετών γενετικών στοιχείων που εμφανίζουν δομικές ομοιότητες προς τους ενδογενείς ρετροϊούς και χαρακτηρίζονται ως Mammalian apparent LTR-retrotransposons ή MaLRS (Smit 1993; Smit 1996). Το MALR περιέχει μια εσωτερική αλληλουχία 1, 555 bp που περιλαμβάνει μικρά ORFs των 228 bp και 216 bp τα οποία παρουσιάζουν 52% ομολογία με μία τελομερική αντίστροφη μεταγραφή και με μία γλυκοπρωτεΐνη του περιβλήματος.

**Σχήμα 5.** Δομική ανάλυση της περιοχής 2,304 bp 3' από το σημείο αποκοπής της HPFH-3.

Σημαντικό ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι άλλα δύο κολοβωμένα τμήματα MaLR τύπου MLTIJ2 έχουν εντοπιστεί 3' των εμβρυϊκών Gγ και Αγ γονιδίων (Smit 1993; Kosteas *et al.*, 1999) τα οποία παρουσιάζουν 87% ομολογία μεταξύ τους ενώ δεν παρουσιάζουν σημαντική ομολογία με το ανωτέρω MaLR στοιχείο τύπου MSTA διότι ανήκει σε άλλη οικογένεια (Kosteas *et al.*, 1999). Ειδικότερα, το στοιχείο Gγ MaLR (# 36, 986-37, 317) είναι 331 bp και το Αγ MaLR (#41,759-42,095) στοιχείο είναι 336 bp και εδράζονται 1004 bp και 861 bp, αντίστοιχα 3' των γ-γονιδίων. Το Αγ MaLR εντοπίζεται εντός του τμήματος Eη που έχουμε χαρακτηρίσει ως αποσιωπητή (Kosteas *et al.*, 1993; Kosteas *et al.*, 1994). Περαιτέρω ανάλυση ανέδειξε ότι τα στοιχεία MaLR περιέχουν διάφορες δυνητικές θέσεις δέσμωσης για διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες. Εντοπίστηκαν, δύο GATA-1, μία YY1, μία EKLF και μία GTI θέση εντός του Αγ MaLR καθώς και μία YY1 θέση εντός του Gγ MaLR. Τα στοιχεία αυτά κλωνοποιήθηκαν στο φορέα έκφρασης pGL3 Gγ-λουσιφεράση (Promega) που περιλαμβάνει το γονίδιο της λουσιφεράσης συνδεδεμένο με τον υποκινητή του εμβρυϊκού Gγ-γονιδίου (-384 έως +36) από το σημείο έναρξης της μεταγραφής

(Bodine *et al.*, 1987) και ελέγχθηκαν λειτουργικά τόσο σε κύτταρα K562 όσο και σε HeLa. Τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα έχουν δείξει ότι το Αγ MaLR μειώνει την έκφραση τόσο στα ερυθροποιητικά (ως 65%) όσο και στα μη ερυθροποιητικά κύτταρα (ως 95%). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν με το τμήμα Enh (# 41,364-42,117) και αναφέρονται αργότερα (Kosteas *et al.*, 1993; Kosteas *et al.*, 1994).

#### **HPFH-4: Κλωνοποίηση και δομική ανάλυση του γεφυρικού τμήματος**

Η δεύτερη μετάλλαξη που μελετήθηκε παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα HbF σε Ιταλούς ασθενείς και αναφέρεται ως Ιταλική HPFH ή HPFH-4. Οι ετεροζυγώτες παρουσιάζουν HbF 14-30% και αιματολογικούς δείκτες που σχετίζονται με το φαινότυπο (Saglio *et al.*, 1986). Οι μεταλλάξεις HPFH-3 και HPFH-4 έχουν τον ίδιο φαινότυπο και παρουσιάζουν ετερογένεια στα σημεία αποκοπής τους. Τα 5' άκρα τους εντοπίζονται σε απόσταση 5 kb και τα 3' άκρα τους απέχουν περίπου 2 kb. Δεδομένου ότι τα 3' άκρα τους είναι σχεδόν παρόμοια είναι πιθανόν ότι η αυξημένη έκφραση των εμβρυϊκών γονιδίων να δημιουργείται από ένα κοινό ρυθμιστικό μηχανισμό μέσω του ενισχυτή της HPFH-3 (Anagnou *et al.*, 1988; Anagnou *et al.*, 1995). Βάση της αρχικής ανάλυσης κατά Southern σχεδιάστηκε ένα ζεύγος εκκινητών, HPFH-4 ευθείας (forward) αλληλουχίας 5'-CTG-ACA-TGT-AGC-ATG-AAT-GCT-TGT-G-3' και HPFH-4 αντίστροφης (reverse) αλληλουχίας 5'-GAC-ACA-GAG-TGC-TGA-TTA-GTG-CAT-T-3' από περιοχές εκατέρωθεν των 5' και 3' άκρων της αποκοπής. Με τη μεθοδολογία της PCR κλωνοποιήθηκε από γενωμικό DNA του ετεροζυγώτη το γεφυρικό τμήμα 3,629 bp και υποκλωνοποιήθηκε στην θέση Eco RV του φορέα pBCSK (Stratagene). Το κλωνοποιημένο τμήμα υπεβλήθη σε ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του και η νέα αναλυθείσα DNA περιοχή 2,255 bp έχει κατατεθεί στην βάση δεδομένων (Kosteas *et al.*, 1997b; GenEMBL: AJ010985). Η ανάλυση έδειξε ότι το 5' άκρο του ελλείμματος της HPFH-4 επισυμβαίνει στη συντεταγμένη # 50,375 (του συμπλέγματος της β-σφαιρίνης) ενώ το 3' άκρο του εντοπίζεται 2,255 bp ανοδικά του 3' σημείου αποκοπής του ελλείμματος της HPFH-3. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, προσδιορίστηκε ότι το ολικό μήκος του ελλείμματος είναι 40.3 kb. Η σύγκριση των αλληλουχιών εκατέρωθεν των σημείων αποκοπής δεν έδειξε εκτεταμένη ομολογία εκτός από την παρουσία δύο ζευγών επαναληπτικών αλληλουχιών CCTTG και AGAAC (Σχήμα 6). Η αναλυθείσα DNA περιοχή μήκους 2,255 bp εμφανίζει πολλαπλές δυνητικές θέσεις δέσμευσης για διάφορους ερυθροποιητικούς παράγοντες όπως οι GATA-1 (7 θέσεις), GT-1 (3 θέσεις) YY1 (4 θέσεις) (Kosteas *et al.*, 1997b). Η ανάλυση με το πρόγραμμα RepeatMasker έδειξε ότι η περιοχή περιλαμβάνει και επαναληπτικές αλληλουχίες διαφόρων οικογενειών όπως την human medium reiterated frequency repeats ή MERs και LINE 1 (Σχήμα 7, Smit *et al.*, 1996; Smit *et al.*, 1999).

**Σχήμα 6.** Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του γεφυρικού τμήματος από την μετάλλαξη HPFH-4. Στο τμήμα A, η 5' φυσιολογική περιοχή διακόπτεται μετά την αλληλουχία GGG όπως φαίνεται από το βέλος, ενώ η αλληλουχία που αρχίζει με AGA προέρχεται από την διαμετατιθέμενη περιοχή. Στο τμήμα B, η ανάλυση της αλληλουχίας εκατέρωθεν του σημείου αποκοπής δεν έδειξε εκτεταμένη ομολογία

εκτός από δύο ζεύγη επαναληπτικών αλληλουχιών τα νουκλεοτίδια CCTTG και AGAAC.

#### **HPFH-4: Λειτουργική ανάλυση**

Στη συνέχεια θελήσαμε να διερευνήσουμε με λειτουργικές δοκιμασίες εάν η περιοχή 2,255 bp μεταξύ των ελλειμάτων HPFH-4 και HPFH-3 περιέχει νέο ενισχυτή υπεύθυνο για τον φαινότυπο HPFH. Για τον σκοπό αυτό, απομονώθηκαν τέσσερα συνεχόμενα τμήματα (A, B, C και D) και τέσσερα αλληλοκαλυπτόμενα τμήματα (E, F, G και H) που περιλαμβάνουν την περιοχή (Σχήμα 7, Πίνακας 2).

**Σχήμα 7.** Η νέα αναλυθείσα περιοχή DNA περιλαμβάνει δυνητικές θέσεις δέσμησης για διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες. Οκτώ τμήματα από την περιοχή μεταξύ της HPFH-4 και HPFH-3 ελέγχθηκαν λειτουργικά για την παρουσία ενισχυτή. (MER= medium reiteration frequency repeats).

**Πίνακας 2.** Τα επτά διαφορετικά τμήματα από την περιοχή μεταξύ της HPFH-4 και HPFH-3 που ελέγχθηκαν λειτουργικά.

Τμήμα	Ενζύμα	Ίχκος (bp)
A	Ssp I-Sau 3A	350
B	Sau 3A-Sau 3A	1090
C	Hph I-Hph I	428
D	Sau 3A-Sau 3A	619
E	Hph I-Alu I	246
F	Alu I-Hph I	182
G	Alu I-Alu I	499
H	Alu I-Alu I	573

Όλα τα τμήματα υποκλωνοποιήθηκαν και στίς δύο κατευθύνσεις (5'→3' και 3'→5') στον φορέα έκφρασης pGL3 Γγ-λουσιφεράσης. Σαν θετική αλληλουχία ελέγχου για την παρουσία ενισχυτή, χρησιμοποιήθηκε η θέση HS2 (1.45 kb) από την περιοχή LCR όπου η δράση της λουσιφεράσης ήταν πέντε έως έξι φορές μεγαλύτερη από το πλασμίδιο αναφοράς. Τα αποτελέσματα μας μετά από διαμόλυνση σε ερυθροποιητικά K562 (Σχήμα 8) και σε μή-ερυθροποιητικά κύτταρα HeLa (Σχήμα 9) έδειξαν ότι κανένα από τα τμήματα που ελέγξαμε δεν έδειξε ανιχνεύσιμη δραστηριότητα ενισχυτού. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα αποκλείσαμε την ύπαρξη αλληλουχιών με δραστηριότητα ενισχυτού στην αναλυθείσα περιοχή DNA (Kosteas *et al.*, 1999; Kosteas *et al.*, υπό προετοιμασία).

### Γερμανική (Αγδβ)<sup>ο</sup> Θαλασσαιμία: Χαρακτηρισμός και κλωνοποίηση

Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας είχε χαρακτηριστεί η Γερμανική (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία (Anagnou *et al.*, 1988). Οι ετεροζυγώτες εμφανίζουν φαινότυπο τύπου δβ-θαλασσαιμίας με αυξημένα επίπεδα HbF (9.9 έως 12.5%) με ετεροκυτταρική κατανομή στα ερυθροκύτταρα. Η αρχική ανάλυση κατά Southern έδειξε ότι το 5' άκρο του ελλείματος ευρίσκεται περίπου 1.0 kb 3' του Γγ-γονιδίου, και περιλαμβάνει τα Αγ, ψβ, δ και β-γονίδια. Το 3' άκρο ευρίσκεται πλησίον εκείνων των ελλειμάτων της HPFH-4 και HPFH-3. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, είχε προταθεί ότι η αυξημένη έκφραση των εμβρυϊκών γονιδίων πιθανώς να δημιουργείται από ένα κοινό ρυθμιστικό μηχανισμό παρόμοιο με εκείνων των ελλειμάτων της HPFH-4 και HPFH-3. Η πρόβλεψη αυτή επιβεβαιώθηκε μερικώς με την ανίχνευση του μεταγραφικού ενισχυτού 3' του άκρου της HPFH-3 (Anagnou *et al.*, 1995) καθώς και με τη μοριακή κλωνοποίηση των ελλειμάτων της HPFH-4 που προαναφέρθηκε και της Γερμανικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας που ακολουθεί (Kosteas *et al.*, 1997b).

**Σχήμα 8.**

Κανένα από τα οκτώ τμήματα που ελέγχθηκαν σε K562 κύτταρα δεν παρουσίασε αυξημένη δραστηριότητα της λουσιφεράσης σημαντικά μεγαλύτερη από το πλασμίδιο αναφοράς. Ως θετική αλληλουχία για την παρουσία ενισχυτή χρησιμοποιήθηκε η HS2 θέση από την περιοχή LCR όπου η μετατροπή της λουσιφεράσης ήταν 5 έως 6 φορές πάνω από την βασική έκφραση.



**Σχήμα: 9** Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και μετά την διαμόλυνση των ίδιων πλασμιδίων σε μη ερυθροποιητικά HeLa κύτταρα.

### **Γερμανική (Αγδβ)<sup>ο</sup> Θαλασσαιμία: μοριακή κλωνοποίηση των σημείων αποκοπής**

Βάσει της αρχικής ανάλυσης κατά Southern σχεδιάστηκε ένα ζευγάρι εκκινητών, German F1 5'-ATC-TCC-ACT-TGT-CCT-CTG-TG-3' και German R3 5'-GAC-TGC-TGG-TGT-ACA-GTG-AAC-ATC-TG-3', από τις περιοχές εκατέρωθεν των 5' και 3' άκρων της αποκοπής. Χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο DNA από κυτταρικά υβρίδια (βλ. Παρακάτω) απομονώθηκε με τη μεθοδολογία της PCR το γεφυρικό τμήμα 280 bp της

μετάλλαξης. Το τμήμα αυτό κλωνοποιήθηκε σε φορέα pGEM-T (Promega) και υπεβλήθη σε ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του. Η ανάλυση της πρωτοταγούς δομής έδειξε ότι το 5' άκρο της Γερμανικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> Θαλασσαιμίας ευρίσκεται στη συντεταγμένη # 37,548, ενώ το 3' άκρο 0.12 kb καθοδικά εκείνου της HPFH-4, ενώ το ολικό μήκος του ελλείμματος προσδιορίστηκε ότι είναι 53.3 kb (Kosteas *et al.*, 1997b). Τα σημεία αποκοπής εμφανίζουν εκατέρωθεν ένα ζεύγος από δύο συνεχόμενες επαναληπτικές αλληλουχίες (CAGT και GAAAT). Τα στοιχεία αυτά υποδηλώνουν ότι το έλλειμμα της Γερμανικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας όσο και η HPFH-4 προέρχονται από ένα μη-ομόλογο ανασυνδυασμό όπως και σε πολλές άλλες ελλειμματικές μεταλλάξεις ( Vanin *et al.*, 1983; Henthorn *et al.*, 1990). Το σημείο σύντηξης εμφανίζει και δύο ορφανά (TA) νουκλεοτίδια (Σχήμα 10).

Δεδομένου ότι η συνεχόμενη περιοχή των 6.2 kb καθοδικά της ανωτέρω αναλυθείσας περιοχής, περιέχει μόνο ένα μεταγραφικό ενισχυτή 3' του άκρου της HPFH-3, τα ανωτέρω δεδομένα τεκμηριώνουν ότι η ενεργοποίηση των εμβρυϊκών γ-γονιδίων στις τρεις συγκρίσιμες σε μήκος μεταλλάξεις, δημιουργείται από ένα κοινό ρυθμιστικό μηχανισμό μέσω του ανωτέρω ενισχυτού. Τα αποτελέσματα αυτά είναι συμβατά και με τους προκύπτοντες φαινότυπους όπου τα ελαφρώς χαμηλότερα επίπεδα HbF στην Γερμανική (Αγδβ)<sup>ο</sup> Θαλασσαιμία οφείλεται στο έλλειμμα του ενός από τα δύο εμβρυϊκά γονίδια (Σχήμα 11).

**Σχήμα 10.** Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του γεφυρικού τμήματος από την Γερμανική (Aγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία. Στο τμήμα A, η 5' φυσιολογική περιοχή διακόπτεται μετά την αλληλουχία GTC όπως φαίνεται από το βέλος. Ενώ η αλληλουχία που αρχίζει με τα νουκλεοτίδια TAA (υποδεικνυόμενη με μαύρο πλαίσιο) είναι από την διαμετατιθέμενη περιοχή. Στο τμήμα B, η ανάλυση της αλληλουχίας εκατέρωθεν του

σημείου αποκοπής δεν έδειξε εκτεταμένη ομολογία εκτός από τρία ζεύγη επαναληπτικών αλληλουχιών CAGT (διακεκομμένη γραμμή) και GAAAT και AGTGA (εντός πλαισίου).

**Σχήμα 11.** Κανένα από τα τμήματα της αναλυθείσας περιοχής DNA που ελέγχθηκαν δεν έδειξε ανιχνεύσιμη δραστηριότητα ενισχυτού. Δεδομένο ότι η συνεχόμενη περιοχή των 6.2

kb περιέχει μόνο ένα μεταγραφικό ενισχυτή (Anagnou *et al.*, 1995), η ενεργοποίηση των εμβρυϊκών γ-γονιδίων στις τρεις συγκρίσιμες μεταλλάξεις δημιουργείται από ένα κοινό ρυθμιστικό μηχανισμό. Η άποψη αυτή είναι συμβατή και με τους προκύπτοντες αντίστοιχους φαινότυπους.

### **Χρωμοσωμική μεταφορά των γονιδίων του β-συμπλέγματος σε κύτταρα MEL.**

Προκειμένου να διερευνήσουμε περαιτέρω τους μηχανισμούς που οδηγούν στην ενεργοποίηση των εμβρυϊκών γονιδίων *cis* των ελλειμμάτων αυτών *in vivo*, μελετήθηκαν τα γονίδια αυτά σε κυτταρικά υβρίδια MEL. Σε συνεργασία με την Καθ. Θ. Παπαγιαννοπούλου (University of Washington, Seattle) δημιουργήθηκαν 15 σωματικά υβρίδια από τη σύντηξη μεταξύ μετασχηματισμένων από τον ιό EBV (Epstein-Barr virus) λεμφοκυττάρων ετεροζυγώτου της Γερμανικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας και ερυθρολευχαιμικών MEL κυττάρων. Οκτώ υβρίδια που περιείχαν μόνο το φυσιολογικό χρωμόσωμα 11, βρέθηκαν μετά από χρώση με φθορίζοντα αντισώματα για την γ- και β-σφαιρίνη, εξέφρασαν β- αλλά όχι γ-σφαιρίνη. Από επτά υβρίδια που περιείχαν το ανώμαλο χρωμόσωμα 11, μόνο δύο εξέφρασαν γ-σφαιρίνη, κατανομημένη σε 2-3% των F-κυττάρων (Σχήμα 12). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε αντίθεση με τα υβρίδια HPFH-1 και HPFH-2 MEL που είχαν προηγουμένως χαρακτηριστεί (Anagnou *et al.*, 1988) όπου η κατανομή των F-κυττάρων ήταν πανκυτταρική. Η διαφορά που τότε είχε παρατηρηθεί στην έκφραση των γ-γονιδίων στα υβρίδια HPFH-1 και HPFH-2 MEL οφείλεται όπως πρόσφατα αποδείξαμε στην παρουσία δύο διαμετατιθέμενων ενισχυτών 3' της HPFH-2 (McArthur and Anagnou 1998) έναντι του ενός ενισχυτή 3' του ελλείματος της HPFH-1 (Feingold and Forget 1989). Περαιτέρω, είναι πολύ πιθανόν ότι το στοχαστικό πρότυπο της έκφρασης των γ-γονιδίων στη Γερμανική θαλασσαιμία να αντανακλά τη διάφορο ισχύ των δύο επιμέρους διαμετατιθέμενων ενισχυτών στα δύο ελλείματα (HPFH-1 έναντι HPFH-3), αντίστοιχα. Τα ανωτέρω δεδομένα υποδηλώνουν ότι τα κυτταρικά υβρίδια MEL έχουν την ικανότητα να αντανακλούν με πιστότητα τα *in vivo* φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των δύο διακριτών συνδρόμων.

**Σχήμα 12.** Ανάλυση των κυτταρικών υβριδίων. Τμήμα Α, οκτώ από τα υβρίδια περιείχαν μόνο το φυσιολογικό χρωμόσωμα 11, εξέφρασαν β- αλλά όχι γ-σφαιρίνη. Τμήμα Β, από τα έξι υβρίδια με το χρωμόσωμα 11 από την Γερμανική (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία μόνο ένα εξέφρασε γ-σφαιρίνη. Τμήμα Γ, ένα υβρίδιο που περιείχε και τους δύο τύπους των χρωμοσωμάτων 11, εξέφρασε και β και γ σφαιρίνη.

## **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ: 1Α**

Η λειτουργική ανάλυση της διαμετατιθέμενης περιοχής του ελλείματος της HPFH-3 εντόπισε ένα νέο ενισχυτή αμέσως μετά από το σημείο αποκοπής. Ο ενισχυτής της HPFH-3 βρέθηκε να αυξάνει κατά τρεις φορές τη δραστικότητα CAT σε κύτταρα K562, ενώ είχε και την ικανότητα να τροποποιή την αναπτυξιακή έκφραση του Αγ-γονιδίου σε διαγονιδιακά ποντίκια. Η ανάλυση της πρωτοταγούς δομής ολόκληρης της περιοχής που ελέγχθηκε λειτουργικά έδειξε ότι ο ενισχυτής παριστά μέρος μιας LTR αλληλουχίας της οικογένειας ERV. Τα ανωτέρω δεδομένα υποστηρίζουν την άποψη ότι τα στοιχεία ERV έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν γονίδια. Στη συνέχεια κανένα από τα τμήματα από την ανοδική αναλυθείσα περιοχή, HPFH-4 έως HPFH-3, δεν έδειξε ανιχνεύσιμη δραστικότητα ενισχυτού. Δεδομένου ότι η συνεχόμενη περιοχή περιέχει μόνο ένα μεταγραφικό ενισχυτή 3' του άκρου της HPFH-3, τα ανωτέρω δεδομένα τεκμηριώνουν ότι η ενεργοποίηση των γ-γονιδίων στις τρεις συγκρίσιμες μεταλλάξεις δημιουργείται από ένα κοινό ρυθμιστικό μηχανισμό μέσω του ανωτέρω ενισχυτού.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: I B

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η αξία της πρώτης θεωρίας χρησιμοποιώντας αυτή την φορά μία άλλη ομάδα από διαφορετικές μεταλλάξεις τύπου δβ-θαλασσαιμίας και HPFH. Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τα ελλείμματα της Ολλανδικής (β)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας (Gilman *et al.*, 1984; Gilman *et al.*, 1987) της Ισπανικής (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας (Ottolenghi *et al.*, 1982; Camaschella *et al.*, 1987) καθώς και τις συγκρίσιμες Κινεζική (Jones *et al.*, 1981; Mager *et al.*, 1985) και Ταϊλανδική (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία (Winichagoon *et al.*, 1990; Kosteas *et al.*, 1997a).

### Ολλανδική (β)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία: Λειτουργική ανάλυση της 3' διαμετατιθέμενης περιοχής

Η πρώτη μετάλλαξη που μελετήθηκε ήταν η Ολλανδική (β)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία όπου οι ετεροζυγώτες παρουσιάζουν ήπια αναιμία με αυξημένα επίπεδα HbF 4-11% με ετεροκυτταρική κατανομή καθώς και αυξημένα επίπεδα της HbA2 5.3-7.6 λόγω έλλειψης του β-γονιδίου. Η μορφή αυτή προκύπτει από έλλειμμα DNA 12.6 kb.

**Σχήμα 13.** Στρατηγική που ακολουθήθηκε για την ανίχνευση στοιχείων ενισχυτών στην 3' διαμετατιθέμενη περιοχή του ελλείματος της Ολλανδικής (β)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας. Το στοιχείο LINE 1 (γραμμοσκιασμένο τμήμα) βρίσκεται αμέσως μετά το σημείο αποκοπής (κάθετο βέλος). Τέσσερα συνεχόμενα ή αλληλοκαλυπτόμενα τμήματα από την περιοχή αυτή ελέγχθηκαν με την δοκιμασία CAT.



Το έλλειμα αρχίζει 3-4 kb από το 3' άκρο του δ-γονιδίου και τερματίζει 9 kb από το 3' άκρο του β-γονιδίου μέσα στο 3' άκρο του στοιχείου LINE 1 (Shafit-Zagardo *et al.*, 1982; Gilman 1987). Ως αποτέλεσμα του ελλείματος αφαιρείται το β-γονίδιο μαζί με τον ισχυρό ενισχυτή 3' του β-γονιδίου (Antonίου *et al.*, 1988; Behringer *et al.*, 1987) ενώ μετατίθεται η LINE 1 αλληλουχία δίπλα από το δ-γονίδιο (Σχήμα 13). Η διαμετατιθέμενη Hind III-Eco RI 3.5 kb περιοχή ελέγχθηκε λειτουργικά για την παρουσία αλληλουχιών με ιδιότητες ενισχυτού. Για τον σκοπό αυτό απομονώθηκαν τέσσερα τμήματα (A, B, C και D) από την περιοχή και υποκλωνοποιήθηκαν στο πλασμίδιο αναφοράς γ-CAT (Σχήμα 14). Ως θετική αλληλουχία για την παρουσία ενισχυτή χρησιμοποιήθηκε το τμήμα 2.3 kb Eco RI που βρίσκεται 3' του Αγ γονιδίου που έχει αποδειχθεί ότι λειτουργεί ως ενισχυτής στα κύτταρα K562 (Bodine and Ley 1987).

Πίνακας 3. Τα τέσσερα διαφορετικά τμήματα από την 3' διαμετατιθέμενη περιοχή που ελέγχθηκαν λειτουργικά.

Τμήμα	Ενζυμα	Ίγκος (bp)	Δραστηριότητα CAT
A	Hind III-Xba I	446	0.4
B	Xba I-Xba I	1,450	0.5
C	Xba I-Xba I	1,600	0.5
D	Hind III-Hpa I	1,096	0.5

Τα αποτελέσματα (πίνακας 3) μετά από διαμόλυνση σε κύτταρα K562 με ή χωρίς επαγωγή με αιμίνη έδειξαν ότι κανένα από τα τμήματα δεν παρουσίασε μετατροπή της CAT (0.3-0.5 δραστηριότητα) μεγαλύτερη από το πλασμίδιο αναφοράς γ-CAT (1.0 δραστηριότητα). Με βάση αυτά τα αποτελέσματα αποκλείσαμε την ύπαρξη αλληλουχιών με δραστηριότητα ενισχυτού στις 3' διαμετατιθέμενες αλληλουχίες στην Ολλανδική (β)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία (Kosteas *et al.*, 1991).

### Ισπανική (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία: Λειτουργική ανάλυση της 3' διαμετατιθέμενης περιοχής

Η δεύτερη μετάλλαξη που μελετήσαμε ήταν η Ισπανική (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία όπου οι ετεροζυγώτες παρουσιάζουν ήπια αναιμία με αυξημένα επίπεδα HbF 5-15% με ετεροκυτταρική κατανομή (Ottolenghi *et al.*, 1982). Η μορφή αυτή προκύπτει από έλλειμα DNA περίπου 115 kb που περιλαμβάνει τα ενήλικα δ- και β-γονίδια (Camaschella *et al.*, 1987) Η μετάλλαξη επισυμβαίνει εντός της επαναληπτικής αλληλουχίας Alu I όπως έχει συμβεί και στις HPFH-1 και HPFH-3. Η μετάλλαξη αυτή έχει προέλθει από ένα ομόλογο ανασυνδυασμό δεδομένης της ομολογίας που παρουσιάζει το γεφυρικό τμήμα με 16 από τα 22 bp μέσα στην αλληλουχία Alu I (Fiengold and Forget 1989; Henthorn *et al.*, 1990). Το κύριο ενδιαφέρον της Ισπανικής (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας είναι ότι είναι συγκρίσιμη τόσο στην θέση όσο και στο μέγεθος της εν σχέσει με την HPFH-1 ή/και την HPFH-2 (105 kb) αλλά και στο ότι επεκτείνεται περαιτέρω κατά 8.5 έως 9.0 kb καθοδικά των ελλειμάτων της HPFH-1 και HPFH-2 (Σχήμα 14). Τα μειωμένα επίπεδα της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης στην δβ-θαλασσαιμία εν σχέση με εκείνων των HPFH (HbF 20-30%) πιθανόν να είναι αποτέλεσμα της αφαίρεσης των ενισχυτών της HPFH-1 (Fiengold and Forget 1989) και HPFH-2 (McArthur and Anagnou 1998) που διαμετατίθενται αντίστοιχα στις μορφές αυτές. Χρησιμοποιώντας την ίδια στρατηγική, έξι αλληλοκαλυπτόμενα (SpA, SpB, SpA3, SpA4, SpB3 και SpB4) τμήματα 3' από το σημείο αποκοπής που περιλαμβάνουν την περιοχή Hind III 3.0 kb, ελέγχθηκαν με την δοκιμασία της CAT σε κύτταρα K562 και HeLa (Πίνακας 4).

**Σχήμα 14.** Η στρατηγική που ακολουθήθηκε για την ανίχνευση στοιχείων ενισχυτών στην 3' διαμετατιθέμενη περιοχή (γραμμοσκιασμένο τμήμα) του ελλείματος της Ισπανικής (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας. Έξι συνεχόμενα ή αλληλοκαλυπτόμενα τμήματα από την περιοχή αυτή ελέγχθηκαν με την δοκιμασία CAT.

Κανένα από τα τμήματα (πίνακας 4) δεν έδειξε μετατροπή της CAT (δραστηκότητα 0.6-1.6) μεγαλύτερη από το πλασμίδιο αναφοράς (δραστηκότητα 1.0). Με βάση τα ανωτέρα αποτελέσματα αποκλείσαμε και σε αυτή την περίπτωση την παρουσία ενός ενισχυτή στην 3' διαμετατιθέμενη περιοχή της Ισπανικής (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας (Kosteas *et al.*, 1991; Kosteas *et al.*, υπό προετοιμασία).

Πίνακας 4. Τα έξι διαφορετικά τμήματα από την 3' διαμετατιθέμενη περιοχή που ελέγχθηκαν λειτουργικά

Τμήμα	Ενζύμα	Μήκος (bp)	δραστηκότητα CAT
SpA/SpB	Hind III-Hind III	3,077	0.6
SpaA3	Hind III-Bgl II	599	1.6
SpaA4	Hind III-Xba I	1,430	1.0
SpB3	Xba I-Hind III	1,642	1.0
SpB4	Bgl II-Hind III	2,473	1.6

**Δομική ανάλυση της 3' διαμετατιθέμενης περιοχής**

Τα τελευταία χρόνια έχουν εντοπιστεί στο σύμπλεγμα της β-σφαιρίνης αρκετές νέες επαναληπτικές αλληλουχίες ενδογενών ρετροϊών (ERV, MaLR) όπως προαναφέρθηκε καθώς και γονίδια που κωδικοποιούν τους υποδοχείς του οσφρητικού βολβού ή olfactory receptor genes (OR) (Buck and Axel 1991). Τα γονίδια αυτά εδράζονται μέσα στους ενισχυτές 3' των ελλειμάτων της HPFH-1 (Feingold *et al.*, 1999), της HPFH-6 (Kosteas *et al.*, 1996) καθώς και στην νέα αναλυθείσα DNA περιοχή 3' της LCR (Bulger *et al.*, 1999). Ο ρόλος που ενδεχομένως να παίζουν αυτά τα γονίδια θα αναφερθεί αργότερα.

Η διαμετατιθέμενη περιοχή της Ισπανικής (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας επεκτείνεται πέρα από το 3' άκρο από όλων των HPFH και δβ-θαλασσαιμιών, με μόνη εξαίρεση την Ιαπωνική (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία (Shiokawa *et al.*, 1988). Θελήσαμε να αναλύσουμε την διαμετατιθέμενη περιοχή με σκοπό την ανίχνευση νέων *cis* στοιχείων του συμπλέγματος. Η αναλυθείσα DNA περιοχή μήκους 3,077 bp έχει κατατεθεί στην βάση δεδομένων (GenEMBL AJ309925) και εμφανίζει πολλαπλές δυνητικές θέσεις δέσμευσης όπως εννέα θέσεις GATA-1 καθώς και εννέα θέσεις YY1. Περαιτέρω, η περιοχή βρέθηκε ότι περιέχει και πολλαπλές επαναληπτικές αλληλουχίες (Kosteas *et al.*, υπό προετοιμασία) των οικογενειών LINE 1 και Alu (Smit *et al.*, 1996; Smit *et al.*, 1999).

### **Κινεζική και Ταϊλανδική (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία: Λειτουργική ανάλυση της 3' διαμετατιθέμενης περιοχής**

Στην συνέχεια ελέγξαμε λειτουργικά την 3' διαμετατιθέμενη περιοχή στις συγκρίσιμες μορφές της Κινεζικής και Ταϊλανδικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας.

**Σχήμα 15.** Η στρατηγική που ακολουθήθηκε για τη ανίχνευση στοιχείων ενισχυτών στην 3' διαμετατιθέμενη περιοχή (γραμμοσκιασμένο τμήμα) των ελλειμάτων της Κινεζικής και της Ταϊλανδικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας. Τέσσερα συνεχόμενα και ένα γεφυρικό τμήμα (C) από την περιοχή αυτή ελέγχθηκαν με την δοκιμασία CAT.

Οι ετεροζυγώτες της Κινεζικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας παρουσιάζουν ήπια αναιμία με αυξημένα επίπεδα HbF 9-20% με ετεροκυτταρική κατανομή (Jones *et al.*, 1981; Mager *et al.*, 1985). Αντίθετα, τρεις ετεροζυγώτες της αρχικής οικογένειας (I-1, II-5 και II-7) με Ταϊλανδική (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα HbF 17-23% με πανκυτταρική κατανομή (Σχήμα 17, Winichagoon *et al.*, 1990; Kosteas *et*

*al.*, 1997a). Τα 5' σημεία αποκοπής τους διαφέρουν κατά 4.0 kb ενώ τα 3' σημεία αποκοπής τους διαφέρουν κατά 2.8 kb. Η συνολική τους έλλειψη είναι περίπου 100 kb και αφαιρούν το Αγ, ψβ, δ και β-γονίδια. Τέσσερα συνεχόμενα τμήματα (A, B, D και E) καθώς και το γεφυρικό τμήμα C από την Κινεζική (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία υποκλωνοποιήθηκαν και αναλύθηκαν με τη δοκιμασία CAT (Σχήμα 15). Όλα τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια μεταφέρθηκαν σε ερυθροποιητικά K562 και μη-ερυθροποιητικά κύτταρα HeLa.

**Σχήμα 16.** Ανίχνευση του μεταγραφικού ενισχυτού 3' του σημείου αποκοπής του ελλείματος της Ταϊλανδικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας.

Κανένα από τα τμήματα (B, C, D και E) που ελέγχθηκαν δεν έδειξε δραστικότητα ενισχυτού στο σύστημα CAT. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα αποκλείσαμε τον ρόλο ενός ενισχυτού στη δημιουργία του φαινοτύπου της Κινεζικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας (Kosteas *et al.*, 1991). Αντιθέτως, ένα τμήμα 1.4 kb ευρισκόμενο περίπου 1.0 kb 3' από το σημείο αποκοπής της Ταϊλανδικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας βρέθηκε να ενισχύει την δραστικότητα της CAT κατά 5-6 φορές εν σχέσει με το πλασμίδιο αναφοράς και να εμφανίζει σχεδόν τα ίδια επίπεδα με τον ενισχυτή 2.3 kb Eco RI 3' του Αγ γονιδίου (Σχήμα 16). Επομένως, η αφαίρεση

του τμήματος A που περιέχει τον νέο ενισχυτή στη Κινεζική θαλασσαιμία οδηγεί σε φαινότυπο (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας, ενώ η διατήρηση του στην Ταϊλανδική θαλασσαιμία οδηγεί σε φαινότυπο ΗΡFH.

**Σχήμα 17.** Αιματολογικοί δείκτες από τρεις ετεροζυγώτες (I-1, II-5 και II-7) με φαινότυπο ΗΡFH.

Δεδομένου ότι οι ετεροζυγώτες (I-1, II-5 και II-7) της Ταϊλανδικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας (Σχήμα 17) εμφανίζουν φαινότυπο HPFH (HbF 17-23% και πανκυτταρική κατανομή) τα ανωτέρω δεδομένα υποδηλώνουν ότι ο ενισχυτής αυτός ευρισκόμενος 74 kb 3' του β-γονιδίου είναι υπεύθυνος για την τροποποίηση της αναπτυξιακής ρύθμισης του παραμένοντος Γγ-γονιδίου. Με βάση τα ανωτέρω, προτείναμε η Ταϊλανδική (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία να μετονομασθεί σε HPFH-6 (Kosteas *et al.*, 1991; Kosteas *et al.*, 1997a).

Πίνακας 5. Τα πέντε διαφορετικά τμήματα από την 3' διαμετατιθέμενη περιοχή που ελέγχθηκαν λειτουργικά

Τμήμα	Ενζυμα	Ίηκος (bp)
A	Eco RI-Bgl II	1,476
B	Bgl II-Eco RI	~1,500
C	XbaI-Eco RI	~1,100
D	Eco RI-Eco RI	~1,750
E	Sac I-Stu I	~1,500

### HPFH-6: Κλωνοποίηση και δομική ανάλυση του γεφυρικού τμήματος

Προκειμένου να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς ενεργοποίησης του Γγ-γονιδίου από τον ενισχυτή της HPFH-6, χαρακτηρίσαμε τα σημεία αποκοπής του ελλείματος και προχωρήσαμε στην δομική ανάλυση της 3' διαμετατιθέμενης περιοχής.

Ο ασθενής (NW) είναι μέλος της Ταϊλανδικής οικογένειας και είναι διπλός ετεροζυγώτης, ο οποίος παρουσιάζει β<sup>ο</sup>-θαλασσαιμία στο ένα χρωμόσωμα (μετάλλαξη στην θέση 654 του δεύτερου ιντρονίου) και (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία στο άλλο χρωμόσωμα (Winichagoon *et al.*, 1990). Βάσει της αρχικής ανάλυσης κατά Southern γνωρίζαμε ότι το 5' άκρο ευρίσκεται καθοδικά μίας θέσης Hind III 3' του Γγ-γονιδίου, ενώ το 3' άκρο εντοπίζεται κοντά στο 3' άκρο της Κινεζικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας (Mager *et al.*, 1985) και ανοδικά του ενισχυτή HPFH-6 (τμήμα A). Δεδομένου ότι η αλληλουχία της περιοχής δεν ήταν γνωστή, χρειάστηκε πρώτα να αναλύσουμε την πρωτοταγή δομή στο 5' άκρο του τμήματος A (1.4 kb Eco RI-Bgl II). Τα αποτελέσματα αυτά, καθώς και τα δεδομένα από την ανάλυση κατά Southern χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να σχεδιαστεί ένα ζεύγος εκκινητών με την αλληλουχία F 5'-CTC-TAT-AGG-ACA-GGA-CTC-CTC-AGA-3' που εντοπίζεται 368 bp 3' του Γγ-γονιδίου και με την αλληλουχία R 5'-CTG-CAG-TAG-AGC-CTT-AGG-TAT-TAA-CG-3' που εντοπίζεται στο 42 bp μετά την θέση EcoRI του ενισχυτή. Χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο γενωμικό DNA από τον ετεροζυγώτη, απομονώθηκε με τη μεθοδολογία της PCR το γεφυρικό τμήμα 1.5kb της μετάλλαξης. Το τμήμα αυτό κλωνοποιήθηκε στην θέση EcoRV του φορέα pBSKS (Stratagene) και υπεβλήθη σε ανάλυση της πρωτοταγής δομής του. Η μοριακή ανάλυση έδειξε ότι το 5' άκρο του ελλείματος επισυμβαίνει 1,260 bp από το 3' άκρο του εμβρυϊκού Γγ-γονιδίου στην συντεταγμένη # 37,243 ενώ το 3' άκρο προσδιορίστηκε σε απόσταση 521 bp 3' από την θέση EcoRI (Σχήμα 18, Kosteas *et al.*, 1997; GenEMBL X81445). Η ανάλυση της πρωτοταγής δομής από το σημείο αποκοπής έως την θέση EcoRI του ενισχυτή απεκάλυψε την παρουσία πολλαπλών δυνητικών θέσεων αναγνώρισης από διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες όπως οι GCRE (GAGTCA), c/EBP (CTTGCACCA), HNF-I (TGGTTAAT), CTII (CTAATG) και AP-1 (TGAATCA).

**Σχήμα 18.** Η μοριακή ανάλυση έδειξε ότι το 5' άκρο του ελλείματος επισυμβαίνει 1,260 bp από το 3' άκρο του εμβρυϊκού Gγ-γονιδίου στην συντεταγμένη # 37,243 ενώ το 3' άκρο προσδιορίστηκε σε απόσταση 521 bp 3' από την θέση EcoRI. Η ανάλυση επεκτάθηκε και μετά το σημείο αποκοπής της Κινεζικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας.

**Σχήμα 19.** Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του γεφυρικού τμήματος από την HPFH-6. Στο τμήμα A, η 5' φυσιολογική περιοχή τερματίζεται μετά την αλληλουχία AAC όπως φαίνεται από το βέλος, ενώ η αλληλουχία που αρχίζει με TAT είναι από την διαμετατιθέμενη περιοχή και υποδεικνύεται με μαύρο πλαίσιο. Στο τμήμα B, η ανάλυση της αλληλουχίας εκατέρωθεν του σημείου αποκοπής έδειξε μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία CCCT (διακεκομμένη γραμμή) και μία ανεστραμμένη αλληλουχία AAGAGAG και TTCTCTC (αγκύλη).



Τα σημεία αποκοπής εμφανίζουν μία επαναλαμβανόμενη αλληλουχία (CCCT) και μία ανεστραμμένη αλληλουχία (AAGAGAG και TTCTCTC). Δεδομένου ότι το σημείο αποκοπής δεν περιέχει ομόλογες αλληλουχίες, υποδηλώνει ότι το έλλειμμα της HPFH-6 προέρχεται από ένα μη-ομόλογο ανασυνδυασμό όπως συμβαίνει και σε πολλές άλλες ελλειμματικές μεταλλάξεις (Σχήμα 20). Με βάση τα δεδομένα από τις μεταλλάξεις HPFH-2 (Collins *et al.*, 1987) και την Κινεζική (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία (Mager *et al.*, 1985) το ολικό μήκος του ελλείματος υπολογίσθηκα σε 101 kb και είναι εντυπωσιακά παρόμοιο με την Κινεζική (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία που είναι 100 kb. Δύο άλλα ζεύγη μεταλλάξεων παρουσιάζουν έλλειμα με παρόμοιο μήκος, δηλ. οι HPFH-1 και HPFH-2 με περίπου 105 kb και δύο (γδβ)<sup>ο</sup>-θαλασσαιμίες με 96 kb (Σχήμα 20). Τα ανωτέρω ευρήματα ενισχύουν περαιτέρω την αξία της υπόθεσης ότι τα τρία ζεύγη των ανωτέρω μεταλλάξεων-ελλειμάτων με σχεδόν ταυτόσημο μήκος, δημιουργούνται μέσω της απώλειας μιας πλήρους χρωματινικής αγκύλης (Vanin *et al.*, 1983; Collins *et al.*, 1987; Henthorn *et al.*, 1990).

**Σχήμα 20.** Ομοιότητες του συνολικού μήκους του ελλείματος σε τρεις ομάδες μεταλλάξεων-ελλειμάτων του συμπλέγματος.

**Σχήμα 21.**

Νουκλεοτιδική αλληλουχία του ενισχυτού HPFH-6. Με κόκκινο οι θέσεις GATA-1, με μπλε οι θέσεις YY1, με πράσινο οι θέσεις GTI/II, με ρόζ οι θέσεις NFE-2/AP-1, με μόνι οι θέσεις c-myb και με κίτρινο η θέση του αποσιωπητή της β-ιντερφερόνης. Με βελάκια απεικονίζονται τα σημεία έναρξης των ελλειμάτων από το 5' όσο και από το 3' άκρο.

## Δομική ανάλυση του ενισχυτή της HPFH-6

Στη συνέχεια με την βοήθεια της Δρ. Ρ. Παύλου εστίασαμε στην περαιτέρω δομική ανάλυση της περιοχής από την θέση EcoRI έως το τέλος του ενισχυτού, συνολικού μήκος 1,476 bp. Η ανάλυση αποκάλυψε την ύπαρξη πολλαπλών θέσεων αναγνώρισης από διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως πέντε θέσεις του παράγοντα GATA-1, δύο θέσεις του μεταγραφικού συμπλέγματος NF-E2/AP-1, τέσσερις θέσεις τύπου GTI/II και τρεις θέσεις του παράγοντος YY1 (Kosteas *et al.*, 1996).

**Σχήμα 22.** Μεταλλαξογένεση με τη δημιουργία ελλειμάτων στον ενισχυτή με την χρήση εξωνουκλεάσης.

Για να εκτιμήσουμε τον επιμέρους *in vivo* ρόλο των θέσεων στην ολική δραστηριότητα του ενισχυτή, δημιουργήσαμε με τη χρήση της εξωνουκλεάσης III μία σειρά προοδευτικών μεταλλάξεων-ελλειμάτων στο αρχικό τμήμα του ενισχυτού, τόσο από το 5' άκρο όσο και από το 3' άκρο (Σχήμα 22). Τα κολοβωμένα τμήματα υποκλωνοποιήθηκαν σε πλασμίδια αναφοράς γ-CAT και ακολούθως μεταφέρθηκαν με διαμόλυνση στα ερυθρολευχαιμικά κύτταρα K562, όπου μελετήθηκε η παροδική έκφραση του γονιδίου CAT (Σχήμα 23). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλες οι μεταλλάξεις, ακόμα και μίας θέσης GATA-1 (Δ1) μειώνουν σημαντικά (από 2-4 φορές) τη δραστηριότητα του ενισχυτού, γεγονός που υποδηλώνει τη συνεργιστική δράση και αλληλεπίδραση των επί μέρους παραγόντων για την πλήρη δραστηριότητα του ενισχυτού (Σχήμα 23).

**Σχήμα 23.** Λειτουργική ανάλυση των μεταλλάξεων στον ενισχυτή της HPFH-6. Όλα τα ελλείμματα παρουσίασαν σημαντική (2 έως 4) μείωση στην δραστηριότητα του ενισχυτή.

Στην συνέχεια ο ενισχυτής ελέγχθηκε για την οντογενετική του εξειδίκευση σε υποκινητές ετερόλογων γονιδίων της σφαιρίνης με πρώιμο εμβρυϊκή (ε-γονίδιο) ή ενηλίκου τύπου εξειδίκευση (δ και β-γονίδια) καθώς και στον μη-ετερόλογο υποκινητή της διϋδροφυλικής αφυδρογονάσης (DHFR). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο ενισχυτής δεν είχε σημαντική επίπτωση στους υποκινητές των ε, δ, και β-γονιδίων, σε αντίθεση με την υψηλή ενεργοποίηση του υποκινητού του όψιμου εμβρυϊκού γ-γονιδίου, ενώ μειωμένη ήταν η έκφραση στον μη-ετερόλογο υποκινητή της DHFR-CAT (Σχήμα 24).

**Σχήμα 24.** Λειτουργική ανάλυση του ενισχυτού HPFH-6 σε ετερόλογους υποκινητές, όπου παρουσίασε εξειδίκευση προς τον υποκινητή του γ-γονιδίου.

## Ανίχνευση ενός ανοικτού αναγνωστικού πλαισίου (ORF) εντός του ενισχυτή της HPFH-6

Η περαιτέρω ανάλυση της πρωτοταγούς δομής ολοκληρώθηκε και επεκτάθηκε μετά το σημείο αποκοπής της Κινεζικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας (GenEMBL: X02992) καλύπτοντας μία συνολική έκταση 3,157 bp (GenEMBL: X81445). Η ανάλυση έδειξε ότι το 3' άκρο αποκοπής της HPFH-6 εντοπίζεται ακριβώς 2,809 bp ανοδικά από το 3' άκρο της Κινεζικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας και 74 kb 3' από το ενήλικο β-γονίδιο. Περαιτέρω, τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι το 3' άκρο της αποκοπής εντοπίζεται 6 kb ανοδικά από το ενδογενές στοιχείο ρετροϊού HERV-H που προαναφέρθηκε (Σχήμα 3 από την συζήτηση) (Mager *et al.*, 1985; Mager and Henthorn 1984).

Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ORF finder της NCBI εντοπίσαμε εντός του HPFH-6 ενισχυτή ένα ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο ή open reading frame (ORF) 230 αμινοξέων (Σχήμα 25). Η περαιτέρω ανάλυση με το πρόγραμμα Blast της NCBI έδειξε ότι το ORF αποτελεί μέρος ενός γονιδίου χωρίς ιντρόνια, για υποδοχέα του οσφρητικού βολβού (Buck and Axel 1991). Το στοιχείο OR εντός του ενισχυτή της HPFH-6 (OR-6H) εμφανίζει ομολογία 37% σε επίπεδο αμινοξέων (Σχήμα 26) με το γονίδιο OR που εντοπίζεται εντός του ενισχυτή 3' της HPFH-1 (HPFH1OR) (Feingold *et al.*, 1999) καθώς και έως 36% ομολογία με τα OR γονίδια αρουραίων (Πίνακας 6). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι αλλά τρία γονίδια OR εντοπίζονται στην 5' περιοχή της LCR (Bulger *et al.*, 1999) ο ρόλος των οποίων ακόμα δεν έχει διευκρινιστεί.

**Πίνακας 6. Ομολογία του OR-6H με άλλα γνωστά γονίδια οσφρητικών υποδοχέων**

<b>Ομολογία σε επίπεδο αμινοξέων μεταξύ του γονιδίου OR-6H και άλλων ORF's</b>	
<b>HPFH1 OR</b>	<b>37%</b>
OR τύπου πρωτεΐνη αρουραίου, F5	36%
OR τύπου πρωτεΐνη αρουραίου, I15	35%
OR τύπου πρωτεΐνη αρουραίου, I14	35%
OR αρουραίου	34%
OR τύπου πρωτεΐνη αρουραίου, I3	32%
OR αρουραίου	16%
Υποδοχέας G-πρωτεΐνης Ανθρώπου	22%
Υποδοχέας G-πρωτεΐνης Βοδιού	19%

**Σχήμα 25.** Εντόπιση στο 3' άκρο του ενισχυτή HPFH-6 ενός ORF 230 αμινοξέων οσφρητικού υποδοχέα. Το κουτί TATA και το poly-A είναι υπογραμμισμένα.

**Σχήμα 26.** Ομολογία αμινοξέων μεταξύ των ανοικτών πλαισίων για τους αντίστοιχους σφρητικούς υποδοχείς που εδράζονται εντός των ενισχυτών HPFH-1 και HPFH-6.

Η λειτουργική μελέτη της έκφρασης του γονιδίου OR-6H αρχικά έγινε σε επίπεδο mRNA με ανάλυση κατά Northern από διάφορους ιστούς (Clonetech). Τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά λόγω των χαμηλών επιπέδων της έκφρασης. Στην συνέχεια προχωρήσαμε στην ανάλυση με την αντίστροφη μεταγραφή του mRNA με την μεθοδολογία της RT-PCR. Με την τεχνική της RT-PCR απομονώσαμε και αναλύσαμε αρκετά PCR προϊόντα από διάφορες αιμοποιητικές σειρές (K562, HHW 105, MEL και HL60) (Σχήμα 27). Όλα τα προϊόντα περιείχαν την ίδια αλληλουχία με την γενωμική αλληλουχία της αντίστοιχής περιοχής του συμπλέγματος της β-σφαιρίνης, υποδηλώντας ότι το γονίδιο OR-6H εκφράζεται σε αυτές τις κυτταρικές σειρές. Στην συνέχεια από την ανοδική περιοχή του ORF υποκλωνοποιήθηκαν 300 bp στην θέση του υποκινητή σε φορέα CAT ώστε να ελεγχθεί η ικανότητα του να ενεργοποιεί την μεταγραφή σε K562 κύτταρα. Δεν παρατηρήθηκε καμία δραστηριότητα. Σε συνεργασία με τον Δρ I. Connerton (Institute of Food Research, UK) χρησιμοποιήθηκαν δύο εκκινητές, ORF/F 5'-CAT-CCG-AAT-TGA-CTC-TTC-CTT-GCA-CC-3' και ORF/R 5'-GGT-ATT-GTG-GCC-ACA-GAA-AGG-CAG-A-3', από την περιοχή του OR-6H γονιδίου και ελέγχθηκε με PCR μία cDNA βιβλιοθήκη από ιστό ανθρώπινου σφρητικού βολβού (Crowe *et al.*, 1996). Δεν προέκυψε κανένα προϊόν PCR, υποδηλώντας ότι το OR-6H γονίδιο είτε δεν εκφράζεται σε αυτή την βιβλιοθήκη, είτε ότι αντιπροσωπεύει μία υποκατηγορία OR γονιδίων που εκφράζονται ειδικά στις ανωτέρω κυτταρικές σειρές. Τέλος, αρνητική ήταν και η παρουσία

προϊόντος PCR από cDNA βιβλιοθήκη μυελού των οστών (Clonetech) (Kosteas *et al.*, υπό προετοιμασία).

**ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ  
ΟΣΦΡΗΤΙΚΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ (OR-6H)**



**Σχήμα 27.** Πειράματα RT-PCR έδειξαν ότι το OR-6H εκφράζεται σε διάφορες αιμοποιητικές σειρές.

- A. Αποκλείσαμε την παρουσία γενωμικού DNA χρησιμοποιώντας εκκινητές για το Gγ-γονίδιο.
- B. Η έκφραση των κυτταρικών σειρών για την ε και γ-σφαιρίνη.
- C. Η έκφραση του OR-6H γονιδίου.
- D. Ποσοτικός έλεγχος του RNA με εκκινητές για την ακτίνη.

## **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ: 1B**

**Η λειτουργική ανάλυση της διαμετατιθέμενης περιοχής του ελλείματος της HPFH-6 εντόπισε ένα νέο ενισχυτή μετά από το σημείο αποκοπής. Ο ενισχυτής της HPFH-6 βρέθηκε να αυξάνει κατά**

πέντε έως έξι φορές τη δραστικότητα CAT σε κύτταρα K562, ενώ πρόσφατα αποδείκτε ότι είχε και την ικανότητα να τροποποιή την αναπτυξιακή έκφραση του Αγ-γονιδίου σε διαγονιδιακά ποντίκια. Ο ενισχυτής της HPFH-6 είναι υπεύθυνος για την τροποποίηση της αναπτυξιακής ρύθμισης του διατηρημένου γ-γονιδίου και υπεύθυνος για τον προκύπτοντα φαινότυπο δηλ. HPFH έναντι δβ-θαλασσαιμίας. Τα ανωτέρω δεδομένα όπως και με τον ενισχυτή της HPFH-3, υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η αύξηση στην έκφραση των γ-γονιδίων οφείλεται στη διαμετάθεση ενισχυτών από το 3' άκρο του συμπλέγματος. Η ανάλυση της πρωτοταγούς δομής έδειξε ότι ο ενισχυτής περιέχει ένα ORF 230 αμινοξέων που αποτελεί μέρος ενός γονιδίου για υποδοχέα του οσφρητικού βολβού το οποίο εκφράζεται σε διάφορες ερυθροποιητικές σειρές. Ο ρόλος αυτού του οσφρητικού γονιδίου καθώς και άλλων που έχουν εντοπιστή στο σύμπλεγμα ακόμα δεν έχει διευκρινιστή.

## Πειράματα σε εξέλιξη

Σε συνεργασία με τον Δρ. F. Grosveld (Erasmus University, Rotterdam) πραγματοποιείται ο *in vivo* ρόλος των ενισχυτών της HPFH-2 (McArthur and Anagnou 1998), HPFH-3 (Anagnou *et al.*, 1995) και HPFH-6 (Kosteas *et al.*, 1991; Kosteas *et al.*, 1996; Kosteas *et al.*, 1997a). Είναι γνωστό ότι σε διαγονιδιακά ποντίκια παρουσία της περιοχής LCR, το Αγ γονίδιο εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα έως και το ενήλικο στάδιο της ανάπτυξης (Grosveld *et al.*, 1987; Behringer *et al.*, 1990). Εάν όντως οι ενισχυτές έχουν σημαντική δράση επί του Αγ γονιδίου, τότε αναμένεται ότι στα διαγονιδιακά ποντίκια το Αγ γονίδιο θα παρουσιάσει υψηλότερη έκφραση στο ενήλικο στάδιο. Όλοι οι ενισχυτές έχουν κλωνοποιηθεί σε κατασκευή που περιέχει την περιοχή της LCR συνδεδεμένη με το Αγ γονίδιο έως και την θέση Cla I (Ε. Κατσαντώνη) που περιλαμβάνει τους αποσιωπητές Enh και F (Kosteas *et al.*, 1993, Kosteas *et al.*, 1994) (Σχήμα 28). Τα αποτελέσματα μέχρι στιγμής έχουν δείξει ότι οι ενισχυτές HPFH-2, HPFH-3 και HPFH-6 έχουν την ικανότητα να τροποποιούν *in vivo* την αναπτυξιακή ρύθμιση των εμβρυϊκών Αγ-γονιδίων (Katsantoni *et al.*, 2000).

**Σχήμα 28.** Σε κατασκευή που περιλαμβάνει την περιοχή LCR συνδεδεμένη με το Αγ-γονίδιο, επιτελείται η ακριβής εκτίμηση του *in vivo* ρόλου των ενισχυτών.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: II

Στο δεύτερο μέρος των αποτελεσμάτων, διερευνήθηκε η αξία της δεύτερης υπόθεσης που έχει διατυπωθεί για να εξηγήσει τους φαινοτύπους των συνδρόμων δβ-θαλασσαιμίας και HPFH. Η υπόθεση αυτή αφορά την αφαίρεση λόγω του ελλείμματος, αρνητικών *cis*-ρυθμιστικών αλληλουχιών ή αποσιωπητών που εδράζονται μεταξύ των Αγ και δ-γονιδίων, και η οποία οδηγεί στην μη ολοκλήρωση της μεταστροφής της αιμοσφαιρίνης. Οι περαιτέρω ποσοτικές φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ των δύο συνδρόμων φαίνεται ότι προέρχονται από την διαμετάθεση είτε ασθενών ενισχυτών ή άλλων αλληλουχιών με θετική ή αρνητική επίπτωση στην έκφραση των γ-γονιδίων. Στη συνέχεια διερευνήθηκε ο ρόλος αποσιωπητών στην δημιουργία του φαινοτύπου HPFH έναντι εκείνου της δβ-θαλασσαιμίας, με την εκτεταμένη λειτουργική ανάλυση των περιοχών εκατέρωθεν των σημείων αποκοπής δύο συγκρίσιμων μεταλλάξεων.

### Λειτουργική ανάλυση της περιοχής μεταξύ των Αγ και δ-γονιδίων

Ελέγξαμε πειραματικά την αξία της ανωτέρω υπόθεσης σε μια περιοχή 13.4 kb που ευρίσκεται μεταξύ των Αγ και δ-γονιδίων για την παρουσία αποσιωπητών (Σχήμα 29). Για τον σκοπό αυτό 23 συνεχόμενα και αλληλοκαλυπτόμενα τμήματα υποκλωνοποιήθηκαν και ελέγχθηκαν για δυναμική αρνητική επίδραση στην μεταγραφική ικανότητα των αλληλουχιών του ισχυρού υποκινητή του ιού του σαρκώματος Rous (RSV-CAT) ή του ιού SV40 (pGL2 Gγ-λουσιφεράση-SV40).

**Σχήμα 29.** Λειτουργική ανάλυση της περιοχής 13.4 kb μεταξύ των Αγ και δ-γονιδίων.

Τα πλασμίδια μεταφέρθηκαν στα ερυθρολευχαιμικά κύτταρα K562 και μελετήθηκε η παροδική έκφραση του γονιδίου της CAT. Σαν θετική αλληλουχία για την παρουσία αποσιωπητή χρησιμοποιήθηκε το τμήμα DNA από -392 έως -177 του υποκινητή του ε-γονιδίου που έχει αποδειχθεί ότι λειτουργεί ως

αποσιωπητής τόσο σε λειτουργικές *in vitro* δοκιμασίες όσο και σε διαγονιδιακά ποντίκια (Cao *et al.*, 1989; Raich *et al.*, 1995).

Πίνακας 7. Τα είκοσι τρία διαφορετικά τμήματα μεταξύ των Αγ και δ-γονιδίων που ελέγχθηκαν λειτουργικά.

Τμήμα	Ενζύμα	Μήκος (bp)	αστικότητα CAT
Enh	Hind III-Hind III	753	63
A	Hind III-Bgl I	480	150
B	Bgl I-Cla I	1,360	70
C	Cla I-Ava I	1,001	125
D	Hind III-Sac I	842	109
E	Bgl II-Xba I	1,767	89
F	Bgl I-Sac I	362	57
G	Sac I-Eco RI	764	114
H	Ava I-Bgl II	740	98
I	Xba I-Xba I	1,994	148
K	Nco I-Eco RI	922	91
L	Xba I-Xba I	748	134
M	Xba I-Xba I	1,151	151
M1	Xba I-Eco RI	509	Σε εξέλιξη
M2	Eco RI-Xba I	642	Σε εξέλιξη
N	Eco RI-Bgl II	1,622	150
O	Xba I-Bgl II	980	62
P	Bgl II-Eco RI	1,533	57
Q	Hph I-Ssp I	572	149
R	Eco RI-Sal I	855	168
S	Pst I-Sac I	530	103
T (NRE)	58 του δ-γονιδίου (με PCR)	160	Σε εξέλιξη
U (PRE)	30 του δ-γονιδίου (με PCR)	246	Σε εξέλιξη

Τα αποτελέσματα (πίνακας 7) έδειξαν την παρουσία τεσσάρων τμημάτων με ιδιότητες αποσιωπητού. Η δραστηριότητα των πλασμιδίων που περιείχαν τις περιοχές αυτές ήταν κατά 30-40% χαμηλότερη του πλασμιδίου ελέγχου pRSV-CAT. Δύο τμήματα (Enh και F) προσδιορίστηκαν μεταξύ των Αγ και ψβ-γονιδίων, ευρισκόμενα 0.4 kb και 1.6 kb από το 3' άκρο του Αγ γονιδίου αντίστοιχα ενώ δύο άλλα τμήματα (O και P) εντοπίστηκαν 2.3 kb και 0.7 kb 5' του δ-γονιδίου, αντίστοιχα (Kosteas *et al.*, 1993; Kosteas *et al.*, 1994). Οι αλληλουχίες αυτές φαίνεται ότι συμμετέχουν και στην αναπτυξιακή ρύθμιση των εμβρυϊκών γ-γονιδίων.



του μεταλλαγμένου τμήματος Enh<sup>m</sup>, υποδηλώντας ότι αυτή η φυσιολογική μετάλλαξη δεν ευθύνεται αποκλειστικά για τον φαινότυπο που παρατηρείται.

Σε συνεργασία με τον Δρ. Π. Σουλτανά μελετήθηκε ο αποσιωπητής F (AvaI-Sac 364 bp) για την δυνατότητα σύνδεσης του με μεταγραφικούς παράγοντες.

**Σχήμα 31.** Η περιοχή μεταξύ των Αγ και δ-γονιδίων με τους επιμέρους αποσιωπητές που εντοπίστηκαν (Enh, F, O και P). Ο αποσιωπητής F υποδιαιρέθηκε σε μικρότερα τμήματα (F<sub>E</sub>, F<sub>H</sub> και F<sub>G</sub>) όπου βρέθηκε ότι συνδέεται με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες.

Τα αποτελέσματα έδειξαν συγκεκριμένες θέσεις δέσμευσης για τους παράγοντες YY1, GATA-1 και CP1 (Σχήμα 31). Οι θέσεις για τον παράγοντα YY1 βρέθηκαν να εμφανίζουν ποικίλου βαθμού ομολογία με συμβατικές αλληλουχίες δέσμευσης (VDCCATN<sub>W</sub>Y). Τρεις από τις θέσεις (26, 108 και 311) εμφανίζουν

ισχυρή σύνδεση με τον YY1, δύο θέσεις (88 και 338) συνδέονται ολιγότερο ισχυρά, ενώ μία θέση (219) εμφανίζει ασθενή σύνδεση. Επιπρόσθετα προσδιορίστηκαν τρεις θέσεις ισχυρής σύνδεσης για τον ερυθροποιητικό παράγοντα GATA-1 (61, 292 και 321) και μία θέση για τον μη-ιστοειδικό παράγοντα CP1 (Soultanas *et al.*, 1996; Soultanas *et al.*, υπό προετοιμασία).

Στη συνέχεια ελέγχθηκαν λειτουργικά οι θέσεις σύνδεσης του παράγοντα YY1. Για τον σκοπό αυτό δημιουργήθηκαν μέσω PCR επιλεκτικές μεταλλάξεις σε κάθε μία από τις ισχυρές θέσεις σύνδεσης (26, 108 και 311) του παράγοντα YY1. Τα μεταλλαγμένα F τμήματα υποκλωνοποιήθηκαν στα πλασμίδια αναφοράς RSV-CAT και pGL2 Gγ-λουσιφεράση-SV40 και ελέγχθηκαν λειτουργικά σε K562 και HeLa κύτταρα. Τα αρχικά αποτελέσματα έχουν δείξει ότι η μετάλλαξη στην YY1 θέση 108 (ACA σε TTG) αναστέλλει τη δράση του αποσιωπητή, και ως αποτέλεσμα παρουσιάζει αυξημένη έκφραση κατά 2.0-2.2 σε K562 και HeLa κύτταρα. Σε εξέλιξη βρίσκονται και μία σειρά πειραμάτων όπου το τμήμα F έχει χωριστεί σε τρία μικρότερα τμήματα (F<sub>E</sub>, F<sub>H</sub> και F<sub>G</sub>) όπου κάθε τμήμα περιέχει και ένα διαφορετικό αριθμό από τις ισχυρές θέσεις σύνδεσης του παράγοντα YY1 (Σχήμα 31). Όλα τα τμήματα F<sub>E</sub> (μία YY1), F<sub>H</sub>(καμία YY1) και F<sub>G</sub> (δύο YY1) υποκλωνοποιήθηκαν στο φορέα pGL2 Gγ-luciferase-SV40 και ελέγχονται λειτουργικά σε K562 και HeLa κύτταρα. Με βάση τα ανωτέρω αποτελέσματα η αρχική κατασκευή με τρεις YY1 θέσεις αναμένεται να παρουσιάσει την χαμηλότερη έκφραση ενώ αναμένεται αυξημένη έκφραση του γονιδίου αναφοράς στις υπόλοιπες κατασκευές (Soultanas *et al.*, υπό προετοιμασία).

Στη συνέχεια διερευνήσαμε περαιτέρω το ρόλο των αποσιωπητών O και P στη δημιουργία του φαινότυπου δύο συγκρίσιμων μεταλλάξεων, την Αμερικανική (δβ)<sup>0</sup> θαλασσαιμία (Anagnou *et al.*, 1985) και την Ιταλική HPFH-5 (Camaschella *et al.*, 1990) όπου ενισχύεται ο αρνητικός ρόλος των αποσιωπητών στην έκφραση των γ-γονιδίων.

### **Αμερικανική (δβ)<sup>0</sup> θαλασσαιμία: Κλωνοποίηση και δομική ανάλυση του γεφυρικού τμήματος**

Η Αμερικανική (δβ)<sup>0</sup> θαλασσαιμία παρουσιάζει επίπεδα HbF 25% τα οποία είναι σημαντικό πιο αυξημένα από ότι συνήθως παρατηρούμε σε τέτοιου είδους μεταλλάξεις (HbF 4-18%). Η μορφή αυτή προκύπτει από έλλειμα DNA περίπου 12.0 kb. Το έλλειμα αρχίζει περίπου 2.4 kb ανοδικά από το 5' άκρο του δ-γονιδίου και τερματίζει περίπου 200 bp από το 3' άκρο του β-γονιδίου (Anagnou *et al.*, 1985). Αρχικά ο ακριβής φαινότυπος της Αμερικανικής (δβ)<sup>0</sup> θαλασσαιμίας ήταν δύσκολο να χαρακτηριστεί δεδομένου ότι η ασθενής ήταν διπλός ετεροζυγώτης και για το γονίδιο της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας (β<sup>s</sup>) το οποίο προκαλεί και αυξημένη εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη. Η χρώση με μονοκλωνικό αντίσωμα για την γ-σφαιρίνη περαιτέρω έδειξε ότι η ασθενής παρουσίαζε πανκυτταρική κατανομή της HbF στα ερυθροκύτταρα (Anagnou *et al.*, 1985). Έτσι δεν ήταν σαφές εάν ο φαινότυπος αυτής της μετάλλαξης ήταν τύπου δβ-θαλασσαιμίας ή HPFH. Αργότερα εντοπίστηκε μια άλλη πολύ συγκρίσιμη μετάλλαξη απουσία όμως του γονιδίου β<sup>s</sup> με φαινότυπο δβ-θαλασσαιμίας και HbF 14.7% (Waye *et al.*, 1994).



**Σχήμα 32.** Διερεύνηση του ρόλου των αποσιωπητών O και P στη δημιουργία του φαινοτύπου δύο συγκρίσιμων μεταλλάξεων, την Αμερικανική ( $\delta\beta$ )<sup>0</sup> θαλασσαιμία και την Ιταλική HPFH-5.

Μια άλλη πολύ συγκρίσιμη μετάλλαξη με τις δύο αυτές ( $\delta\beta$ )<sup>0</sup> θαλασσαιμίες, είναι η Ιταλική HPFH-5 με επίπεδα HbF 16-20% και έλλειμα 12.9 kb. Το έλλειμα της HPFH-5 αρχίζει 3.2 kb ανοδικά του δ-γονιδίου και τερματίζει μέσα στον ενισχυτή του 3' του β-γονιδίου (Camaschella *et al.*, 1990). Με βάση τα ανωτέρω αποτελέσματα και δεδομένου ότι τα πιθανά άκρα της Αμερικανικής ( $\delta\beta$ )<sup>0</sup> θαλασσαιμίας δεν διέφεραν πολύ από εκείνα της HPFH-5, αποφασίσαμε την κλωνοποίηση του γεφυρικού τμήματος. Αρχικά σχεδιάστηκαν ένα ζευγάρι εκκινητών, ευθείας αλληλουχίας (ανοδικά της θέσης Xba I) 5'-GTA-TAC-CTC-CCA-TAC-CAT-GTG-GCT-3' και αντίστροφης αλληλουχίας 5'-GAG-GAC-AAG-GAC-CAC-TTG-AGA-CTC-A-3' (καθοδικά της θέσης Ava II, Σχήμα 33). Χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο γενωμικό DNA από τον ετεροζυγότη απομονώθηκε με τη μεθοδολογία της PCR το γεφυρικό τμήμα 1.5 kb της μετάλλαξης. Το τμήμα αυτό υποκλωνοποιήθηκε στη συνέχεια στο φορέα pGEM-T (Promega) όπου υπεβλήθη σε ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του. Τα αποτελέσματα μετά την ανάλυση της πρωτοταγούς δομής έδειξαν κατ' αρχάς ότι και οι δύο δβ-θαλασσαιμίες ήταν σχεδόν ταυτόσημες στα σημεία αποκοπής τους με έλλειμα 11.76 kb.

### **Ο ρόλος των αποσιωπητών O και P στην δημιουργία του φαινοτύπου HPFH έναντι εκείνου της δβ-θαλασσαιμίας**

Η ανάλυση των σημείων αποκοπής μεταξύ της Αμερικανικής ( $\delta\beta$ )<sup>0</sup> θαλασσαιμίας και της Ιταλικής HPFH-5, έδειξε ότι τα 5' άκρα τους διαφέρουν κατά 779 bp, ενώ τα 3' άκρα τους κατά 362 bp. Παρόλο τις ελάχιστες διαφορές τους οι δύο μεταλλάξεις εμφανίζουν διάκριτους φαινοτύπους. Η Ιταλική HPFH-5 έχει ένα μέσο όγκο ερυθροκυττάρων (MCV) 80-81fl με ένα εύρος HbF 16-20% με πανκυτταρική κατανομή. Ενώ η Αμερικανική ( $\delta\beta$ )<sup>0</sup> θαλασσαιμία έχει ένα MCV 70.9 fl και HbF 14.7% με ετεροκυτταρική κατανομή. Αμφότερα τα ελλείματα αφαιρούν τον αποσιωπητή P, ενώ ο αποσιωπητής O σχεδόν αφαιρείται στην HPFH-5 και διατηρείται κατά το πλείστον στη δβ-θαλασσαιμία (Σχήμα 32).

**Σχήμα 33.** Τα γεφυρικά τμήματα της HPFH-5 και της Αμερικανικής (δβ)<sup>0</sup> θαλασσαιμίας ελέγχθηκαν λειτουργικά για την πιθανή δημιουργία των φαινοτύπων από την παρουσία ή απουσία του αποσιωπητή.

Για να διερευνήσουμε κατά πόσο τα δύο στοιχεία (O και P) ενέχονται στη δημιουργία των δύο φαινοτύπων, τα δύο γεφυρικά τμήματα υποκλωνοποιήθηκαν μέσω PCR στο πλασμίδιο γ-CAT. Συγχρόνως υποκλωνοποιήθηκαν και μία σειρά αλληλοκαλυπτομένων τμημάτων από τις περιοχές των σημείων αποκοπής συμπεριλαμβανόμενο και διάφορες περιοχές του ενισχυτή 3' του β-γονιδίου. Όλα τα πλασμίδια μεταφέρθηκαν με διαμόλυνση σε ερυθροποιητικά K562 και μη-ερυθροποιητικά κύτταρα πίθηκου COS-7, όπου και μελετήθηκε η μεταγραφική τους επίπτωση στο γονίδιο αναφοράς.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το γεφυρικό τμήμα της HPFH-5, που περιλαμβάνει ένα μικρό τμήμα του κολοβωμένου αποσιωπητού O σε σύντηξη με ένα σχεδόν άθικτο τμήμα του ενισχυτού 3' του β-γονιδίου αύξησε τη δραστικότητα CAT κατά 4-5 φορές. Αντίθετα, το συγκρίσιμο γεφυρικό τμήμα της δβ-θαλασσαιμίας, που περιέχει ένα άθικτο τμήμα του αποσιωπητού O σε σύντηξη με ένα άθικτο τμήμα του ενισχυτού 3' του β-γονιδίου παρουσίασε δραστικότητα χαμηλότερη του πλασμιδίου αναφοράς γ-CAT. Ο ενισχυτής του β-γονιδίου όπως ανεμένετο παρουσίασε αυξημένη έκφραση, κατά ένδεκα φορές του πλασμιδίου γ-CAT. Ο ενισχυτής αυτός περιλαμβάνει τέσσερις GATA-1 θέσεις (Wall *et al.*, 1988) οι οποίες απεικονίζονται με ανοικτούς κύκλους. Η παρουσία τμήματος του ενισχυτή με μία ή δύο GATA θέσεις είχαν ως αποτέλεσμα ίση δραστικότητα CAT με το πλασμίδιο αναφοράς, υποδηλώντας ότι απαιτούνται και οι τέσσερις GATA θέσεις για την ισχυρή λειτουργία του ενισχυτή (Σχήμα 34) (Kosteas *et al.*, 1996).

**Σχήμα 34.** Η ανάλυση α) της ισχυρής δράσης του ενισχυτού 3' του β-γονιδίου (11x). β) της αυξημένης δραστηριότητας του γεφυρικού τμήματος της HPFH-5 (4x) λόγω απουσίας μίας GATA-1 θέσης καθώς και γ) της αδυναμίας του ενισχυτού 3' του β-γονιδίου να ενεργοποιήσει το γ-γονίδιο παρουσία του αποσιωπητού O.

Προκειμένου να τεκμηριώσουμε κατά πόσο η παρουσία του αποσιωπητού O είναι η αιτία της χαμηλής δραστηριότητας στην δβ-θαλασσαιμία, δημιουργήσαμε προοδευτικά ελλείματα επί του γεφυρικού τμήματος που αφαιρούν το 5' άκρο του αποσιωπητού καθώς και δύο εσωτερικά ελλείματα. Ο αποσιωπητής O περιλαμβάνει δύο θέσεις YY1 και τρεις θέσεις GATA-1 που απεικονίζονται ως κλειστοί και ανοικτοί κύκλοι αντίστοιχα. Η προοδευτική αφαίρεση κυρίως της εσωτερικής αλληλουχίας, οδήγησε στην επανενεργοποίηση του γ-CAT γονιδίου κατά τέσσερις φορές (Σχήμα 35). Τα ανωτέρω αποτελέσματα μιμούνται επαρκώς την *in vivo* κατάσταση όσον αφορά τα επίπεδα της έκφρασης των γ-γονιδίων στα δύο σύνδρομα και τεκμηριώνουν για πρώτη φορά την άποψη ότι η διατήρηση και παρουσία του αποσιωπητού O είναι υπεύθυνη για τις φαινοτυπικές διαφορές. Περαιτέρω, τα πειραματικά δεδομένα, σε συνδυασμό με εκείνα των μικρών ελλειμάτων-μεταλλάξεων του β-γονιδίου, επιβεβαιώνουν την αξία αμφοτέρων των υποθέσεων, ήτοι τον αυτόνομο μηχανισμό της μεταστροφής, μέσω της παρουσίας των αποσιωπητών και του συναγωνιστικού μηχανισμού μέσω της παρουσίας ενός άθικτου λειτουργικού β-γονιδίου.

**Σχήμα 35.** Επιλεκτικές μεταλλάξεις στον αποσιωπητή O έδειξαν ότι η αφαίρεση της κεντρικής περιοχής του (τρεις θέσεις GATA-1 και μία θέση YY1) οδήγησε σε συγκρίσιμα επίπεδα (4x) δραστηριότητας με το αρχικό γεφυρικό τμήμα της HPFH-5.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ: II

Η λειτουργική ανάλυση τμημάτων από την περιοχή μεταξύ των Αγ και δ-γονιδίων σε κύτταρα K562, ανέδειξαν την παρουσία τεσσάρων τμημάτων με ιδιότητες αποσιωπητού. Δύο τμήματα (Enh και F) προσδιορίστηκαν μεταξύ των Αγ και ψβ-γονιδίων, ευρισκόμενα 0.4 kb και 1.6 kb από το 3' άκρο του Αγ γονιδίου, αντίστοιχα ενώ άλλα δύο τμήματα (O και P) εντοπίστηκαν 0.7 kb και 2.3 kb 5' του δ-γονιδίου, αντίστοιχα. Τα δεδομένα αυτά είναι συμβατά με μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια όπου επετεύχθη αυτόνομη φυσιολογική μεταστροφή του LCR Αγ-γονιδίου στο ενήλικο στάδιο, η κατασκευή του οποίου συμπεριλάμβανε τους αποσιωπητές Enh και F. Στη συνέχεια διερευνήθηκε ο ρόλος των αποσιωπητών O και P στη δημιουργία του φαινοτύπου HPFH έναντι εκείνου της δβ-θαλασσαιμίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η διατήρηση και παρουσία του O αποσιωπητού είναι υπεύθυνη για τις φαινοτυπικές διαφορές. Τα ανωτέρω δεδομένα επιβεβαιώνουν την υπόθεση για τον αυτόνομο μηχανισμό της μεταστροφής, μέσω της παρουσίας των αποσιωπητών.

## Πειράματα σε εξέλιξη

Σε συνεργασία με την Δρ. Κ. Μαμαλάκη (IMBB) και τον Δρ. F. Grosveld (Erasmus University, Rotterdam) επιτελείται η ακριβής εκτίμηση του *in vivo* ρόλου των δύο αποσιωπητών (Enh και F) με τη σύνδεση των επιμέρους περιοχών με τα εμβρυϊκά γ-γονίδια σε διαγονιδιακά ποντίκια. Συγχρόνως επιτελείται και η *in vivo* διάσπαση (disruption) της φυσικής συνέχειας της αλληλουχίας τους με την τεχνολογία του loxP ομόλογου ανασυνδυασμού σε γενωμικούς κλώνους τεχνητών χρωμοσωμάτων βακτηριοφάγου P1 (PAC) που περιέχουν το σύμπλεγμα των γονιδίων της β-σφαιρίνης με σκοπό την αδρανοποίηση τους (Katsantoni *et al.*, υπό προετοιμασία). Η αδρανοποίηση αυτή αναμένεται να οδηγήσει στην άρση της αρνητικής επίδρασης τους στον υποκινητή των γ-γονιδίων.

Παράλληλα σε συνεργασία με τον Δρ. K. Peterson (University of Kansas, Kansas City) έχει γίνει μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού η επιλεκτική εκτομή των τμημάτων O και P 2.5 kb από τον γενωμικό κλώνο του τεχνικού χρωμοσώματος σακχαρομύκητα (YAC) που περιέχει το σύμπλεγμα των β-γονιδίων συνολικό μήκος 248 kb (Σχήμα 36).

**Σχήμα 36:** Η αφαίρεση μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού των αποσιωπητών O και P από τροποποιημένο YAC αναμένεται να επηρεάσει την αναπτυξιακή έκφραση του Αγ-γονιδίου.

Ο φυσιολογικός και ο μεταλλαγμένος κλώνος β-YAC έχουν εισαχθεί σε ποντίκια όπου αναλύεται η έκφραση των Gγ και Αγ γονιδίων σε όλα τα στάδια της οντογένεσης. Η πιθανή επανενεργοποίηση των γ-γονιδίων στο μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο θα τεκμηριώσει την κατασταλτική δράση των στοιχείων αυτών και συγχρόνως θα επιβεβαιώσει την υπόθεση που ελέγχουμε (Kosteas *et al.*, υπό προετοιμασία) (Σχήμα 36).

# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV**

## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

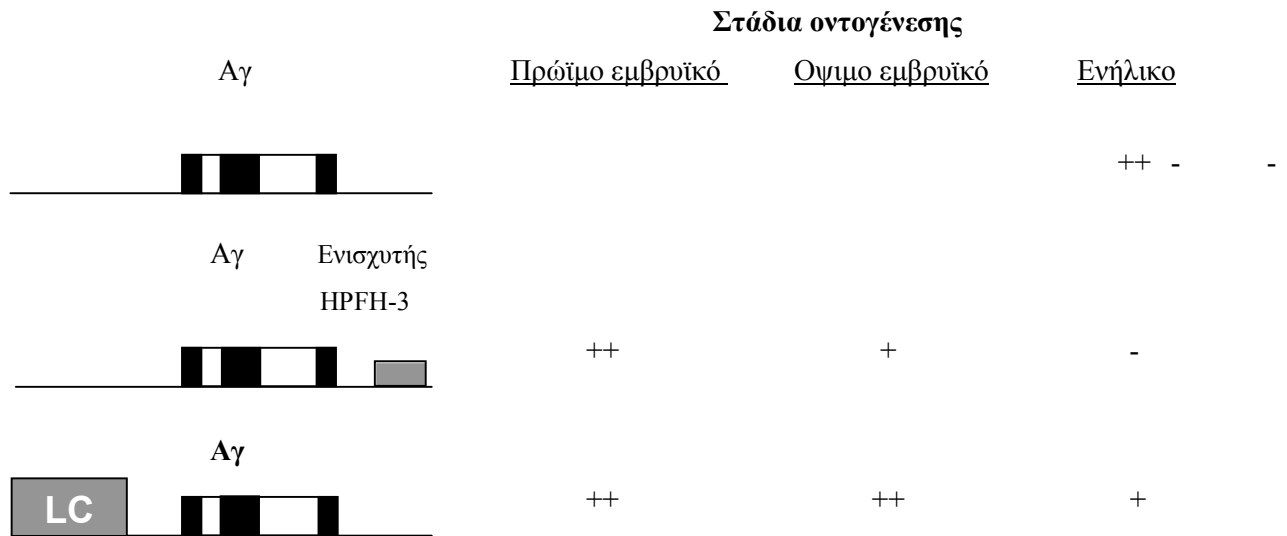
## Αποτελέσματα Πρώτου Μέρους

Στο πρώτο μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής, ελέγξαμε πειραματικά την αξία της υπόθεσης κατά πόσον η διαμετάθεση νέων αλληλουχιών με ιδιότητες ενισχυτών από το 3' άκρο του συμπλέγματος, λόγω μεταλλάξεων, σε γειτνίαση με τα γ-γονίδια είναι υπεύθυνη για την αυξημένη έκφραση των γ-γονιδίων στην ενήλικη ζωή. Για τον σκοπό αυτό μελετήσαμε λειτουργικά επτά φυσικές μεταλλάξεις HRFH και δβ-θαλασσαιμίας. Τα αποτελέσματα μας ανέδειξαν δύο νέους ενισχυτές 3' των ελλειμάτων της HRFH-3 (Anagnou *et al.*, 1995) και HRFH-6 (Kosteas *et al.*, 1997a) που είναι υπεύθυνοι για την δημιουργία του φαινοτύπου.

Η μετάλλαξη HRFH-3 αφαιρεί 48.5 kb DNA που περιλαμβάνει τα ενήλικα δ και β-γονίδια και παρουσιάζει αυξημένη έκφραση των γ-γονιδίων. Βάσει της ανωτέρω υπόθεσης, ελέγξαμε την διαμετατιθέμενη περιοχή για την πιθανή παρουσία ενός ενισχυτή που είναι υπεύθυνος για τον προκύπτοντα φαινότυπο. Για τον σκοπό αυτό, έγινε επανασύσταση του ανασυνδυασμένου γεφυρικού τμήματος 13.6 kb όπως προκύπτει στο DNA του ετεροζυγώτου με HRFH-3 (Kutlar *et al.*, 1984; Henthorn *et al.*, 1986). Το ανασυνδυασμένο τμήμα περιέχει το εμβρυϊκό Αγ-γονίδιο με τις πλευρικές του αλληλουχίες καθώς και 6.2 kb αλληλουχιών που προέρχονται από μία περιοχή 30 kb από το β-γονίδιο, ευρισκόμενη στο το 3' άκρο του συμπλέγματος. Ακολούθως έγινε εισαγωγή του επανασυσταθέντος τμήματος με μικροένεση σε γονιμοποιημένα ωάρια ποντικού όπου και μελετήθηκε η αναπτυξιακή έκφραση των γ-γονιδίων σε διαγονιδιακά ποντίκια. Προηγούμενες μελέτες (Chada *et al.*, 1986; Kollias *et al.*, 1986) έχουν δείξει ότι η εισαγωγή των γ-γονιδίων χωρίς επιρόσθετες αλληλουχίες οδηγεί στην έκφραση μόνο στα 11.5 ημερών κύτταρα του λεκιθικού ασκού και όχι σε αργότερο στάδιο της ανάπτυξης όπως στο εμβρυϊκό ήπαρ ή στα ερυθροκύτταρα του περιφεριακού αίματος. Επομένως, το σύστημα αυτό παρέχει την δυνατότητα να ελέγχεται η επίδραση επιρόσθετων αλληλουχιών στο αναπτυξιακό πρόγραμμα των γ-γονιδίων. Η διαμετάθεση λοιπόν της 3' περιοχής από το έλλειμα της HRFH-3 σε γειτνίαση με το Αγ-γονίδιο είχε ως αποτέλεσμα την παρατεταμένη έκφραση του Αγ-γονιδίων σε δύο ποντίκια μέχρι και το στάδιο των 16 ημερών του εμβρυϊκού ήπατος (Anagnou *et al.*, 1995). Επομένως, τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι οι 3' διαμετατιθέμενες αλληλουχίες έχουν την ικανότητα να τροποποιούν εν μέρει την αναπτυξιακή έκφραση του Αγ-γονιδίου. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και με την 3' διαμετατιθέμενη περιοχή από το έλλειμα της HRFH-2 (Arcasoy *et al.*, 1997). Η διαμετατιθέμενη περιοχή της HRFH-2 περιλαμβάνει τον ενισχυτή της HRFH-1 καθώς και τον νέο μεταγραφικό ενισχυτή που πρόσφατα εντοπίσαμε 3' του σημείου αποκοπής του ελλείματος (McArthur and Anagnou 1998). Όταν το γ-γονίδιο συνδέθηκε με την περιοχή LCR παρατηρήθηκε ότι η περιοχή LCR, προσδίδει υψηλού επιπέδου ερυθροποιητική έκφραση. Το επίπεδο της έκφρασης εξαρτάται από τον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου, αλλά όχι από την θέση ενσωματώσής του (Grosveld *et al.*, 1987; Enver *et al.*, 1989; Enver *et al.*, 1990; Boehringer *et al.*, 1990). Ομως, η αναπτυξιακή εξειδίκευση της έκφρασης του Αγ-γονιδίου χάνεται παρουσία της LCR και το Αγ-γονίδιο εκφράζεται σε όλα τα στάδια της οντογένεσης (Enver *et al.*, 1989). Η κατασκευή μας δεν περιελάμβανε την περιοχή LCR και μας επέτρεψε να ελέγξουμε απευθείας την επιρροή της 3' διαμετατιθέμενης περιοχής στην αναπτυξιακή έκφραση του γ-γονιδίου (Σχήμα 1).

### **Μελέτες του Αγ-γονιδίου σε διαγονιδιακά ποντίκια**





Σχήμα 1. Η διαμετάθεση της 3' περιοχής από το έλλειμα της HPFH-3 σε γειτνίαση με το Αγ-γονίδιο έχει ως αποτέλεσμα την παρατεταμένη έκφραση του Αγ-γονιδίου έως και το στάδιο του εμβρυϊκού ήπατος.

Ο ρόλος της 3' διαμετατιθέμενης περιοχής διερευνήθηκε περαιτέρω με *in vitro* λειτουργικές δοκιμασίες CAT. Αρκετά τμήματα που καλύπτουν την ανωτέρω περιοχή υποκλωνοποιήθηκαν σε φορέα έκφρασης και μελετήθηκαν για την παρουσία ενισχυτού με βάση την ικανότητα τους να ενεργοποιήσουν το υβριδικό γονίδιο αναφοράς γ-CAT, τόσο σε ερυθροποιητικά κύτταρα K562, όσο και σε μη-ερυθροποιητικά κύτταρα HeLa. Τμήματα που εντοπίζονται στις πρώτες 700 hr μετά από το σημείο αποκοπής της HPFH-3 παρουσίασαν αυξημένη δραστηριότητα CAT κατά τρεις φορές, ανεξάρτητα από την κατεύθυνση τους, κυρίως σε κύτταρα K562 παρουσία αιμίνης αλλά όχι στα κύτταρα HeLa. Τα ανωτέρω δεδομένα τεκμηριώνουν την παρουσία ενός νέου ενισχυτού με ερυθροποιητική εξειδίκευση, 3' του σημείου αποκοπής της HPFH-3.

Σχήμα 2. Η διαφορά ισχύος μεταξύ διάφορων ενισχυτών του συμπλέγματος των β-γονιδίων, όπως μελετήθηκε σε *in vitro* λειτουργικές δοκιμασίες σε κύτταρα K562 (McArthur and Anagnou, 1998).

Η δραστηριότητα του ενισχυτή της HPFH-3 ήταν συγκρίσιμη, αλλά χαμηλότερη, από εκείνη του ενισχυτή της HPFH-1 που είχε εντοπιστεί προηγουμένως (Fiengold and Forget 1989). Παρόμοια αποτελέσματα είχαν παρατηρηθεί σε πρόσφατη μελέτη χρησιμοποιώντας το λίκνιο ευαίσθητο σύστημα της λουσιφεράσης, όπου η

ισχύς του ενισχυτού της HPFH-3 ήταν περίπου κατά 50% χαμηλότερη από εκείνη του ενισχυτού της HPFH-1 (McArthur and Anagnou 1998) (Σχήμα 2).

Στην συνέχεια, ο ενισχυτής HPFH-3 ελέγχθηκε για την οντογενική του εξειδίκευση σε υποκινητές ετερόλογων γονιδίων με πρώιμου εμβρυϊκού (ε-γονίδιο) ή ενηλικίου τύπου εξειδίκευση (β και δ-γονίδια), καθώς και στον μη-ετερόλογο υποκινητή της DHFR-CAT. Ο ενισχυτής είχε την ικανότητα να αυξάνει την έκφραση του ε-γονιδίου (κατά 2.3 φορές), στα κύτταρα K562, δεν παρουσίασε όμως καμία επίπτωση στους υποκινητές των β- και δ-γονιδίων. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η δράση του ενισχυτού της HPFH-3 περιορίζεται στους υποκινητές των πρώιμων και όψιμων εμβρυϊκών γονιδίων. Είναι γνωστό ότι τα κύτταρα K562 εκφράζουν γ αλλά όχι β-σφαιρίνη. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το γονίδιο αναφοράς βCAT δεν λειτουργεί στα K562 κύτταρα, σε αντίθεση με το γονίδιο εCAT (Fordis *et al.*, 1984, Fordis *et al.*, 1985). Είναι ενδεχόμενο, η μη ενεργοποίηση του β-γονιδίου από τον ενισχυτή της HPFH-3, να οφείλεται στην ισχύ του ενισχυτή, δεδομένου ότι η HS2 θέση της περιοχής LCR, με ισχυρή δράση ενισχυτή, είχε την ικανότητα να ενεργοποιεί σημαντικά τον υποκινητή του β-γονιδίου (Jane *et al.*, 1992).

Η ανάλυση, αρχικά τις δομές του ενισχυτή της HPFH-3 (Henthorn *et al.*, 1986) καθώς και ολόκληρης της διαμετατιθέμενης περιοχής (Anagnou *et al.*, 1995) ανέδειξε αρκετές νέες πληροφορίες. Η ανάλυση έδειξε ότι το συνολικό μήκος της διαμετατιθέμενης περιοχής είναι 6,261 bp. Η περιοχή του ενισχυτή βρέθηκε ότι αποτελείται από μία σειρά από επαναληπτικές αλληλουχίες που είναι ομόλογες με άλλα στοιχεία ενισχυτών όπως του ενισχυτή 3' του β-γονιδίου στο κοτόπουλο (Choi *et al.*, 1986) καθώς και με το κεντρικό στοιχείο (GTGGWWG, όπου W = A ή T) του ενισχυτή του ιού SV40 (Gorman *et al.*, 1982). Ομολογία υπάρχει και με το τμήμα Enh 753 bp 3' του Αγ-γονιδίου (Bodine and Ley 1987) το οποίο αρχικά είχε χαρακτηριστεί ως ενισχυτής, ενώ στο σύστημα μας απεδείχθη ότι λειτουργεί και ως αποσιωπητής, όπως αναφέρεται αργότερα (Kosteas *et al.*, 1993; Kosteas *et al.*, 1994). Παρόμοιες ομολογίες υπάρχουν και με τον ενισχυτή 3' του ελλείματος της HPFH-1 (Feingold and Forget 1989). Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι οι DNA αλληλουχίες που βρίσκονται 3' του σημείου αποκοπής του ελλείματος της HPFH-3 είναι συμβατές με τη δομή και λειτουργία ενός στοιχείου ενισχυτή που έχουν την ικανότητα να τροποποιούν την αναπτυξιακή ρύθμιση του Αγ-γονιδίου (Anagnou *et al.*, 1995).

Περαιτέρω ανάλυση ανέδειξε ότι ο ενισχυτής της HPFH-3 παριστά μέρος μιας μακράς επαναληπτικής αλληλουχίας της οικογένειας των ενδογενών ρετροϊών ERV-9 LTR (Smit 1996). Στον άνθρωπο υπάρχουν περίπου 50 είδη από τα στοιχεία ERV-9 με τουλάχιστον 4,000 κολοβωμένα αντίγραφα ή solitary LTR (La Mantia *et al.*, 1992). Τα στοιχεία ERV-9 LTR αποτελούν μέρος της ανθρώπινης οικογένειας των ενδογενών ρετροϊών *human endogenous retroviruses* ή HERVs που αποτελούνται από δύο κατηγορίες (Class I και Class II) (Lower *et al.*, 1996). Η συχνή παρουσία των στοιχείων ERV-9 LTR στο γονιδίωμα μπορεί να αποτελεί μία πηγή λειτουργικών αλληλουχιών (ενισχυτών ή/και υποκινητών) που εντοπίζονται στην περιοχή U3 της LTR τους, και ενδεχομένως να επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων. Η άποψη αυτή ενισχύεται από διάφορες λειτουργικές μελέτες με στοιχεία ERV9 (La Mantia *et al.*, 1992; Anagnou *et al.*, 1995; Long *et al.*, 1998). Σημαντικό ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ένα δεύτερο στοιχείο ERV-9 LTR έχει πρόσφατα εντοπισθεί 5' της περιοχής LCR (Long *et al.*, 1998). Η παρουσία της ERV-9 εντός της περιοχής LCR ενισχύει την άποψη ότι κατά προτίμηση οι ρετροϊοί ενσωματώνονται σε μεταγραφικά ενεργές ή "ανοικτές" από άποψη δομής της χρωματίνης περιοχές του γονιδιώματος, όπως τις HS θέσεις ή σε νησίδες CpG (Feuchter *et al.*, 1992). Τα δύο στοιχεία ERV-9 που εντοπίζονται στα άκρα του συμπλέγματος της β-σφαιρίνης, παρουσιάζουν 87% ομολογία εντός της LTR στις περιοχές U3, R και U5. Μια επαναληπτική αλληλουχία 41 bp (E element) εντοπίζεται στην περιοχή U3, ενώ μία επαναληπτική αλληλουχία 72 bp ευρίσκεται εντός της περιοχής U5. Ο υποκινητής της ERV-9 δεν περιέχει κουτί TATA και πιστεύεται ότι η μεταγραφή γίνεται μέσω του στοιχείου έναρξης Inr- (initiator element), και των παραγόντων Sp1 και TBP ή TATA binding protein (La Mantia *et al.*, 1991; La Mantia *et al.* 1992). Τα στοιχεία HERV ενσωματώθηκαν στο ανθρώπινο γονιδίωμα πριν από περίπου δέκα εκατομμύρια χρόνια (Di Cristofano *et al.*, 1995) και λόγω της δομής τους έχουν πολλαπλασιαστεί και εξαπλωθεί μέσω ενός ενδιάμεσου RNA, ως πλήρεις ή κολοβωμένες αλληλουχίες τύπου ρετροϊών (retrovirus-like elements) γνωστές ως ρετροτρανσποζόνια (retrotransposons). Τα ρετροτρανσποζόνια με LTR έχουν προέλθει από ένα προρετροϊο και η δομή τους είναι παρόμοια με τους ρετροϊούς, με κωδικές περιοχές για την αντίστροφη μεταγραφή, αλλά χωρίς λειτουργικό γονίδιο για το περίβλημα (envelope ή env) (Smit 1996; Smit 1998). Η διεργασία της μετάθεσης

ενός ρετροτρανσποζόνιου αρχίζει με τη μεταγραφή του σε RNA από τις RNA πολυμεράσες του κυττάρου, και ακολούθως τη σύνθεση ενός DNA αντιγράφου αυτού του RNA, από την αντίστροφη μεταγραφάση που κωδικοποιείται από το ίδιο το ρετροτρανσποζόνιο. Στη συνέχεια, το αντίγραφο του DNA μπορεί να ενσωματωθεί σε κάποια άλλη θέση του γονιδιώματος (Alberts *et al.*, 2000). Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιλαμβάνει εννέα διαφορετικές οικογένειες HERV (Lower *et al.*, 1996) με συνολικά 50,000 αντίγραφα που αποτελούν περίπου το 1.3% του ανθρώπινου γονιδιώματος. Τα στοιχεία αυτά έχουν μελετηθεί εκτεταμένα, γιατί με την εισαγωγή τους στο γονιδίωμα έχουν προκαλέσει μεταλλάξεις στον ποντικό και σε λιγότερο βαθμό στον άνθρωπο (Smit 1996; Smit 1999; Kazazian 1998; Strazzullo *et al.*, 1998). Στο παρελθόν άλλο ένα στοιχείο HERV, το HERV-H ή RTVL-H, είχε εντοπιστεί στο σύμπλεγμα της β-σφαιρίνης ανοδικά από το 3' άκρο του ελλείματος της HPFH-2 (Mager *et al.*, 1984) το οποίο όμως δεν παρουσιάζει ομολογία με τα ERV-9 που βρίσκονται στα άκρα του συμπλέγματος (Σχήμα 3).

**Σχήμα 3.** Εντόπιση του στοιχείου RTVL-H ή HERV-H στο 3' άκρο του συμπλέγματος των β-γονιδίων της σφαιρίνης, ανοδικά του 3' άκρου του ελλείματος της HPFH-2.

Συνολικά υπάρχουν περίπου 1,000 αντίγραφα HERV-H και περίπου 1,000 κολοβωμένα LTRs τα οποία έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν την μεταγραφή (Feuchter *et al.*, 1992). Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι η και η 5' HS5 ERV-9 LTR έχει την ικανότητα έναρξης της μεταγραφής πυρηνικών RNAs και ίσως λειτουργεί για το άνοιγμα της περιοχής HS5 της LCR κατά τα αρχικά στάδια της οντογένεσης και της αιμοποίησης (Tuan *et al.*, 1999; Ling *et al.*, 2000; Proudfoot *et al.*, 2000). Αντιθέτως, τα στοιχεία ERV-9 δεν έχουν εντοπιστεί στα τροκτικά τα οποία εκφράζουν φυσιολογικά τα γονίδια της σφαιρίνης (Di Cristofano *et al.*, 1995).

Με βάση τα ανωτέρω, η πληροφορία της νέας αναλυθείσας DNA περιοχής 3' του ελλείματος της HPFH-3 χρησιμοποιήσαμε ως πηγή ώστε να σχεδιαστούν εκκινητές για την κλωνοποίηση μέσω PCR της αντίστοιχης ERV-9 LTR περιοχής από διάφορα άλλα είδη (Ling *et al.*, 2000). Τα στοιχεία ERV-9 LTR από τον άνθρωπο και τον χιμπατζή υποκλωνοποιήθηκαν σε φορέα έκφρασης GFP. Λειτουργικές δοκιμασίες έδειξαν ότι τα στοιχεία αυτά κατέχουν ισχυρή δράση ενισχυτού σε διάφορες ερυθροποιητικές σειρές, καμία δράση όμως δεν ανιχνεύτηκε σε μη-ερυθροποιητικά κύτταρα (Tuan *et al.*, 1999). Σημαντικό ενδιαφέρον παρουσιάζει από πλευράς εξέλιξης, το γεγονός ότι η αντίστοιχη ERV-9 LTR περιοχή δεν υπάρχει στο DNA χιμπατζή αλλά είναι παρούσα στο DNA του γίββωνα, του ουραγκουτάγκου και του γορίλλα. Περαιτέρω, η αντίστοιχη περιοχή στο DNA του χιμπατζή περιλαμβάνει μόνο ένα στοιχείο LINE 1, ενώ ο άνθρωπος έχει και τα δύο (ERV-9 και LINE 1) στοιχεία. Η σημασία αυτών των δεδομένων ευβρίσκεται υπό διερεύνηση (Tuan *et al.*, υπό προετοιμασία). Στο παρελθόν, άλλο ένα στοιχείο ERV-9 LTR από cDNA βιβλιοθήκη ανθρώπινου εμβρυϊκού καρκινώματος (human embryonal carcinoma cDNA library) παρουσίασε αυξημένη δραστηριότητα CAT, αλλά μόνο σε μη διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα NT2/D1. Τα ανωτέρω υποδηλώνουν ότι ίσως να υπάρχει ειδική έκφραση των στοιχείων ERV-9 LTR μέσα στα κύτταρα στα οποία έχει γίνει η σύνθεση του mRNA τους (La Mantia *et al.*, 1991) ή ενδεχομένως η ειδική αυτή μεταγραφή να οφείλεται στην παρουσία δυνητικών θέσεων σύνδεσης για διαφόρους ιστοειδικούς παράγοντες εντός της περιοχής U3 (Long *et al.*, 1998).

Στην συνέχεια, για να διερευνήσουμε περαιτέρω την ύπαρξη νέων ρυθμιστικών *cis*- στοιχείων στη γειτονική περιοχή, επεκτείναμε την ανάλυση της πρωτοταγούς αλληλουχίας του DNA έως και το τέλος της

διαμετατιθέμενης περιοχής. Η ανάλυση ανέδειξε i) πολλαπλές δυνητικές θέσεις δέσμησης για διάφορους παράγοντες (GATA-1, YY1 και GTI), ii) 30 ORFs με μήκος από 102 έως 369 bp, καθώς και iii) ομολογία 87-88% με τις περιοχές των χρωμοσωμάτων 5q31 και 17 (Kosteas *et al.*, 1999). Η περιοχή ομολογίας βρίσκεται μετά από το στοιχείο LINE1 και εδράζεται 2,514 bp καθοδικά του 3' άκρου της HPFH-3 και ανήκει στην οικογένεια μεταθετών γενετικών στοιχείων MaLR (Mammalian apparent LTR retrotransposon) (Smit 1996). Η δομή του MaLR αποτελείται από στοιχεία που είναι χαρακτηριστικά για τα ρετροτρανσποζόνια (κουτί TATA ιού, κουτί CCAAT ιού και poly-A ρετροϊού). Το νέο MaLR στοιχείο ανήκει στην τάξη "MST-internal" και είναι ένα πλήρες στοιχείο, γεγονός που συμβαίνει μόνο στις 10% των περιπτώσεων. Τα στοιχεία MaLR αποτελούν την μεγαλύτερη οικογένεια ενδογενών ρετροϊών, με περίπου 167,000 αντίγραφα που αποτελούν περίπου το 2.6% του ανθρώπινου γονιδιώματος (Smit 1996; Smit 1999; Kazazian 1998).

Ένα λειτουργικό ρετροτρανσποζόνιο περιέχει μία εσωτερική αλληλουχία με 4,000 έως 9,000 bp που κωδικοποιούν για τα γονίδια gag, pol-int και μερικές φορές για το γονίδιο env. Χαρακτηριστικό για ένα ρετροτρανσποζόνιο είναι η παρουσία της αλληλουχίας που κωδικοποιεί το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης (Σχήμα 4).

Η εσωτερική αλληλουχία των MaLRs περιλαμβάνει ένα ORF περίπου 1,600 bp το οποίο όμως δεν κωδικοποιεί για τα γονίδια gag, pol, env και την αντίστροφη μεταγραφάση. Το νέο στοιχείο MaLR που εντοπίσαμε, περιέχει μία εσωτερική αλληλουχία 1,555 bp και περιλαμβάνει μικρότερα ORFs μεταξύ 369-105 bp. Τα ORFs των 228 bp και 216 bp οποία παρουσιάζουν 52% ομολογία με μία τελομερική αντίστροφη μεταγραφάση και μία γλυκοπρωτεΐνη του περιβλήματος. Δύο κολοβωμένα στοιχεία MaLR ευβρίσκονται 3' των Gγ και Αγ γονιδίων (Smit 1993; Kosteas *et al.*, 1999). Είναι ενδιαφέρον, ότι το στοιχείο MaLR 3' του Αγ-γονιδίου μήκους 336 bp, ευρίσκεται εντός της περιοχής του αποσιωπητού Enh. Προκειμένου να απαντηθεί το ερώτημα κατά πόσον το ίδιο στοιχείο MaLR διαθέτει την ιδιότητα του αποσιωπητού, μελετήθηκε λειτουργικά η επίπτωση του στην έκφραση του γ-γονιδίου σε παροδικές διαμολύνσεις. Όι μέχρι στιγμής λειτουργικές δοκιμασίες με το στοιχείο Αγ MaLR, έχουν δείξει ότι μειώνει την έκφραση του γονιδίου αναφοράς (pGL2 Gγ-λουσιφεράση-SV40) τόσο σε ερυθροποιητικά όσο και σε μη ερυθροποιητικά κύτταρα στον ίδιο βαθμό με τον αποσιωπητή Enh. Τρέχουσες μελέτες αποσκοπούν στην λειτουργική διερεύνηση του στοιχείου Gγ MaLR.

ΣΧΗΜΑ 4  
ΠΛΑΓΙΑ

Ακολούθως μελετήθηκε η μετάλλαξη HPFH-4 (Saglio *et al.*, 1986) η οποία παρουσιάζει τον ίδιο φαινότυπο με την HPFH-3 (επίπεδα HbF 14-30%, πανκυτταρική κατανομή της HbF). Δεδομένου ότι τα 3' άκρα τους είναι σχεδόν παρόμοια, είχε προταθεί ότι η αυξημένη έκφραση των γ-γονιδίων που παρατηρείται να δημιουργείται από ένα κοινό ρυθμιστικό μηχανισμό μέσω του ενισχυτού της HPFH-3 (Anagnou *et al.*, 1988, Anagnou *et al.*, 1995). Μετά από κλωνοποίηση του γεφυρικού τμήματος με PCR, προσδιορίστηκε ότι το 5' άκρο του ελλείματος της HPFH-4 επισυμβαίνει στη συντεταγμένη #50,375, ενώ το 3' άκρο του ευρίσκεται 2,255 bp ανοδικά του 3' σημείου αποκοπής του ελλείματος της HPFH-3. Το ολικό μήκος του ελλείματος προσδιορίστηκε ότι είναι 40.3 kb. Η απουσία εκτεταμένης ομολογίας στα σημεία σύντηξης, υποδηλώνει ότι το έλλειμα της HPFH-4 έχει προέλθει από ένα μη-ομόλογο ανασυνδυασμό. Η ανάλυση της αλληλουχίας του DNA της 3' διαμετατιθέμενης περιοχής έδειξε, ότι περιλαμβάνει πολλαπλές δυναμικές θέσεις δέσμευσης για διάφορους παράγοντες (GATA-1, GT-1 και YY1) καθώς και τις επαναλληπτικές αλληλουχίες των οικογενειών MERs και LINE1 (Smit *et al.*, 1996; Smit 1999). Τα στοιχεία MER είναι η νεότερη οικογένεια που έχει ανακαλυφθεί και αποτελείται από σαράντα αντίγραφα τα περισσότερα από τα οποία αποτελούν μέρος των αλληλουχιών SINES, LINEs ή LTR στοιχείων (Kaplan *et al.*, 1991; Smit and Riggs 1996). Τα στοιχεία LINE είναι ρετροτρανσποζόνια χωρίς την LTR περιοχή. Αποτελούν περίπου το 15-20% του ανθρώπινου γονιδιώματος με περίπου 100,000 αντίγραφα τα περισσότερα από τα οποία είναι κολοβωμένα. Τα στοιχεία LINE με την εισαγωγή τους στο ανθρώπινο γονιδίωμα προκαλούν μεταλλάξεις (Smit 1996; Kazazian 1998; Esnault *et al.*, 2000).

Η λειτουργική ανάλυση οκτώ τμημάτων από την περιοχή 2,255 bp μεταξύ των ελλειμάτων της HPFH-4 και HPFH-3, τόσο σε κύτταρα K562 όσο και σε HeLa, δεν έδειξαν να εμφανίζουν ανιχνεύσιμη δραστηριότητα ενισχυτού. Με βάση τα ανωτέρω αποτελέσματα, αποκλείσαμε την παρουσία ενισχυτού στην αναλυθείσα DNA περιοχή.

Η τελευταία συγκρίσιμη μετάλλαξη που μελετήθηκε ήταν η Γερμανική (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία (Anagnou *et al.*, 1988) η οποία όμως παρουσιάζει διαφορετικό φαινότυπο από τις HPFH, με HbF 9.9 έως 12.5% και ετεροκυτταρική κατανομή. Η μοριακή ανάλυση της Γερμανικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας έδειξε ότι το 5' άκρο του ελλείματος ευρίσκεται στη συντεταγμένη #37,548, το 3' άκρο 120 bp καθοδικά εκείνου της HPFH-4, ενώ το ολικό μήκος του ελλείματος είναι 53 kb (Kosteas *et al.*, 1997b). Η σύγκριση των σημείων αποκοπής δεν παρουσίασε σημαντική ομολογία υποδηλώνοντας ότι το έλλειμα της Γερμανικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας, όπως και στην περίπτωση της HPFH-4, προέρχεται από ένα μη-ομόλογο ανασυνδυασμό. Περαιτέρω το σημείο σύντηξης εμφανίζει και δύο επιπλέον ή “ορφανά” (TA) νουκλεοτίδια. Τα “ορφανά” νουκλεοτίδια έχουν παρατηρηθεί και σε άλλες φυσιολογικές μεταλλάξεις της β-σφαιρίνης, με 2 έως 36 bp, τα οποία δεν υπάρχουν στην φυσιολογική 5' και 3' DNA περιοχή. Η παρουσία τους ενδεχομένως να είναι αποτέλεσμα της περίπλοκης αναδιοργάνωσης του DNA στο σημείο σύντηξης (Henthorn *et al.*, 1990). Ορισμένες όμως περιοχές ή συνθήκες φαίνεται ότι αποτελούν συχνά σημεία αποκοπής διότι ευνοούν συνθήκες μη-ομόλογου ανασυνδυασμού όπως οι επαναλληπτικές αλληλουχίες (Alu I, LINE I), η ομολογία στο σημείο σύντηξης, οι περιοχές πλούσιες σε AT, η θέση αναγνώρισης της τοποισομεράσης II καθώς και οι θέσεις στάσης (pause) της DNA πολυμεράσης α (Zhang *et al.*, 1988; Dimorski *et al.*, 1993). Οι μεταλλάξεις που προέρχονται από ένα μη-ομόλογο ανασυνδυασμό μπορούν περαιτέρω να εμφανίσουν τρία διαφορετικά χαρακτηριστικά στο σημείο σύντηξης τους, δηλ. i) αυτά που δεν παρουσιάζουν καμία ομολογία και έχουν προέλθει από μία απλή αφαίρεση και την επανασύνδεση των τυφλών ή “flush” άκρων, ii) αυτά που παρουσιάζουν ελάχιστη ομολογία όπως στην HPFH-4 και τέλος iii) αυτά που προσθέτουν νουκλεοτίδια όπως στην Γερμανική (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία (Vanin *et al.*, 1983; Henthorn *et al.*, 1990; Metzenberg *et al.*, 1991).

Προκειμένου να διερευνήσουμε περαιτέρω τους μηχανισμούς που οδηγούν στην ενεργοποίηση των εμβρυϊκών γονιδίων *cis* των ελλειμμάτων αυτών *in vivo*, μελετήθηκαν τα γονίδια αυτά μετά την μεταφορά των παθολογικών χρωμοσωμάτων I1, όπου εδράζεται το σύμπλεγμα των β-γονιδίων, σε σωματικά κυτταρικά υβρίδια ερυθρολευχαιμικών κυττάρων του ποντικού (MEL) (Anagnou *et al.*, 1985b). Τα κυτταρικά υβρίδια έχουν αποδειχθεί στο παρελθόν ότι προσφέρουν ένα υποδειγματικό σύστημα για την μελέτη των μηχανισμών της μεταστροφής της αιμοσφαιρίνης (Papayannopoulou *et al.*, 1986; Papayannopoulou *et al.*, 1988).

## **Πίνακας 1. Η έκφραση των γονιδίων της σφαιρίνης σε MEL x ανθρώπινα κυτταρικά υβρίδια.**

<u>Πηγή Ανθρώπινων κυττάρων</u>	<u>Γονίδια της σφαιρίνης που εκφράζονται στα υβρίδια μέσω γρωμοσωμικής μεταφοράς</u>
Ενήλικο ερυθροκύτταρο	Ενήλικο β-γονίδιο
Λεμφοκύτταρο	Ενήλικο β-γονίδιο
Ελλειμματική HPFH, λεμφοκύτταρο	Εμβρυϊκό γ-γονίδιο
Αγ HPFH, λεμφοκύτταρο	Εμβρυϊκό Αγ- και ενήλικο β-γονίδιο
Εμβρυϊκό ερυθροκύτταρο	Αρχική έκφραση των γ-γονιδίων και σταδιακή έκφραση των ενήλικων γονιδίων

Όπως προαναφέρθηκε στην εισαγωγή, η έκφραση του υβριδίου αντανακλά με πιστότητα την αναπτυξιακή προέλευση του κυττάρου από το οποίο έχει κατασκευαστεί το υβρίδιο (Πίνακας 1). Συγκεκριμένα, όταν το ανθρώπινο χρωμόσωμα 11 προέρχεται από ενήλικο ερυθροκύτταρο, τα υβρίδια παράγουν αποκλειστικά β-σφαιρίνη. Το ίδιο ισχύει και όταν το χρωμόσωμα 11 προέρχεται από λεμφοκύτταρο. Όταν όμως το λεμφοκύτταρο προέρχεται από άτομο με ελλειμματική HPFH, τότε εκφράζεται μόνο το γονίδιο της γ-σφαιρίνης (Parayannopoulou *et al.*, 1988). Στο παθολογικό χρωμόσωμα 11 με την -117 Αγ HPFH μετάλλαξη, όπου παρατηρείται παράλληλη έκφραση των γ- και β-γονιδίων *in cis*, στα υβρίδια αναπαράγεται παρόμοιο πρότυπο έκφρασης. Όταν το κύτταρο είναι εμβρυϊκό αιμοποιητικό, τα υβρίδια αρχικά εκφράζουν γ-σφαιρίνη. Με την πάροδο του χρόνου, συνήθως μεταξύ 20 έως 40 εβδομάδων, παρατηρείται μία σταδιακή μεταστροφή στην έκφραση, και τελικός παράγεται αποκλειστικά β-σφαιρίνη. Επομένως τα κυτταρικά υβρίδια αντανακλούν την αναπτυξιακή μεταστροφή από γ- σε β-σφαιρίνη *in vitro*, και προσφέρουν ένα υποδειγματικό σύστημα για τη μελέτη των μηχανισμών της μεταστροφής της αιμοσφαιρίνης.

Με βάση τα ανωτέρω δεδομένα και να διερευνηθεί ο ρόλος των διαμετατιθέμενων περιοχών σε γειτνίαση με τα εμβρυϊκά γ-γονίδια, δημιουργήθηκε μία σειρά από κυτταρικά υβρίδια μεταξύ των λεμφοκυττάρων του ετεροζυγώτου της Γερμανικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας και ερυθρολευχαιμικών MEL κυττάρων. Μόνο δύο από τα οκτώ υβρίδια βρέθηκαν να εκφράζουν γ-σφαιρίνη σε ποσοστό 2-3% των κυττάρων. Τα αποτελέσματα αυτά διαφέρουν με εκείνα με τα υβρίδια HPFH-1 x MEL και HPFH-2 x MEL τα οποία είχαν προηγουμένως χαρακτηριστεί (Parayannopoulou *et al.*, 1988) και όπου η κατανομή των F-κυττάρων ήταν σχεδόν πανκυτταρική. Η επιμέρους διαφορά που έχει παρατηρηθεί στην έκφραση των γ-γονιδίων μεταξύ των υβριδίων HPFH-1 x MEL και HPFH-2 x MEL, οφείλεται όπως πρόσφατα αποδείξαμε, στην παρουσία δύο διαμετατιθέμενων ενισχυτών 3' της HPFH-2 (McArthur and Anagnou 1998) έναντι του ενός ενισχυτή 3' του ελλείμματος της HPFH-1 (Feingold and Forget 1989). Περαιτέρω, τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τα προηγούμενα δεδομένα των ελλειμματικών χρωμοσωμάτων, όπου η ενεργοποίηση των γ-γονιδίων επισυμβαίνει μόνον *cis* του ελλείμματος, ενώ είναι πολύ πιθανόν ότι το στοχαστικό πρότυπο της έκφρασης των γ-γονιδίων στη Γερμανική (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία, να αντανακλά τη διάφορο ισχύ των δύο επιμέρους διαμετατιθέμενων ενισχυτών (δηλ. εκείνων της HPFH-1 και της HPFH-3, αντίστοιχα) στα δύο ελλείμματα. Επομένως, τα κυτταρικά υβρίδια MEL έχουν την ικανότητα να αντανακλούν με πιστότητα τα *in vivo* φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των δύο διακριτών συνδρόμων.

Δεδομένου ότι η συνεχόμενη περιοχή των 6.2 kb καθοδικά της ανωτέρω μελετηθείσας περιοχής, περιέχει μόνο ένα μεταγραφικό ενισχυτή 3' του άκρου της HPFH-3, τα ανωτέρω δεδομένα τεκμηριώνουν ότι η ενεργοποίηση των εμβρυϊκών γ-γονιδίων στις τρεις συγκρίσιμες σε μήκος μεταλλάξεις, δημιουργείται από ένα κοινό ρυθμιστικό μηχανισμό μέσω του ανωτέρω ενισχυτού της HPFH-3. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στην ίδια περιοχή του 3' άκρου του ελλείμματος της HPFH-3, υπάρχουν σε μικρή απόσταση τα 3' σημεία αποκοπής δύο συγκρίσιμων ελλειμμάτων, αυτά της Ιταλικής (De Angioletti *et al.*, 1997) και της Βελγικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας (Losekoot *et al.*, 1990). Η μορφή της Ιταλικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας προκύπτει από έλλειμμα 52 kb. Το 5' άκρο του ελλείμματος επισυμβαίνει μέσα στο δεύτερο εξόνιο του Αγ-γονιδίου, ενώ το 3' άκρο ευρίσκεται μόλις 5-14 bp ανοδικά από το 3' άκρο της HPFH-3. Η μορφή της Βελγικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας προκύπτει από έλλειμμα 50 kb. Το 5' άκρο του ελλείμματος επισυμβαίνει

μέσα σε επαναληπτική αλληλουχία Alu I 3' του Αγ-γονιδίου, ενώ το 3' άκρο ευρίσκεται μόλις 4-10 bp ανοδικά από το 3' άκρο της HPFH-3. Δεδομένου ότι η περιοχή αυτή περιέχει πολλαπλές επαναληπτικές αλληλουχίες (ERV-9 LTR), θεωρείται ένα θερμό σημείο ανασυνδυασμού (hotspot) γεγονός που ενισχύει την άποψη, ότι η εισαγωγή της οικογένειας των ενδογενών ρετροϊών στο γονιδίωμα προκαλεί μεταλλάξεις (Smit 1996; Smit 1999; Kazazian 1998). Οι φαινότυποι της Βελγικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας (HbF 12-17%) και της Ιταλικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας (HbF 14-15%) με ετεροκυτταρική κατανομή είναι παρόμοιοι με της Γερμανικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας, γεγονός που υποδηλώνει ότι και σε αυτά τα ελλείμματα η αυξημένη HbF δημιουργείται μέσω του ενισχυτή της HPFH-3 (Σχήμα 5) (Kosteas *et al.*, υπό προετοιμασία).

**Σχήμα 5.** Οι φαινότυποι της Βελγικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας (HbF 12-17%) και της Ιταλικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας (HbF 14-15%) με ετεροκυτταρική κατανομή είναι παρόμοιοι με εκείνου της Γερμανικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας, γεγονός που υποδηλώνει ότι και σε αυτά τα ελλείμματα η αυξημένη HbF δημιουργείται μέσω του ενισχυτή της HPFH-3.

Τέλος, ο ενισχυτής της HPFH-3 ενδεχομένως να είναι υπεύθυνος και για τον φαινότυπο της Βιετναμικής HPFH-7, η οποία παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα HbF 18-27% με πανκυτταρική κατανομή (Motum *et al.*, 1993). Η μορφή αυτή προκύπτει από έλλειμμα 30 kb. Το 5' άκρο του ελλείματος επισυμβαίνει 3.9 kb καθοδικά του δ-γονιδίου, ενώ το 3' άκρο ευρίσκεται 8 kb ανοδικά από το 3' άκρο της HPFH-3. Τρέχουσες επιπρόσθετες δομικές και λειτουργικές μελέτες ευρίσκονται σε εξέλιξη στο εργαστήριο μας προκειμένου να ελεγχθεί η περιοχή των 8 kb που αποτελεί την ενδιάμεση περιοχή, ώστε να αποκλειστεί η παρουσία ενός άλλου ενισχυτού.

Στην συνέχεια ελέγξαμε την πρώτη υπόθεση, για την διαμετάθεση ενισχυτών, χρησιμοποιώντας ως μοντέλα άλλες επιπρόσθετες μεταλλάξεις-ελλείμματα.



Διάφορες β-θαλασσαιμίες με ασυνήθιστα υψηλά ποσοστά της HbA<sub>2</sub> έχουν παρατηρηθεί σε αρκετές περιπτώσεις, όπου παράλληλα παρουσιάζουν και αυξημένα επίπεδα της HbF (Cao *et al.*, 1994). Στην Ολλανδική (β)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία, οι ετεροζυγώτες παρουσιάζουν ήπια αναιμία με αυξημένα επίπεδα HbF 4-11% με ετεροκυτταρική κατανομή, και αυξημένη HbA<sub>2</sub> (5.3-7.6%) λόγω της απουσίας του β-γονιδίου. Το έλλειμα αρχίζει 3-4 kb από το 3' άκρο του δ-γονιδίου και τερματίζει 9 kb από το 3' άκρο του β-γονιδίου μέσα στο 3' άκρο του στοιχείου LINE 1 (Shafit-Zagardo *et al.*, 1982; Gilman 1987).

Τα στοιχεία LINE 1 μήκους 6-8 kb, είναι ρετροτρανσποζόνια χωρίς την περιοχή LTR. Στον άνθρωπο υπάρχουν περισσότερα από 100,000 αντίγραφα LINE από τα οποία, περισσότερο από το 95% είναι κολοβωμένα στο 5' άκρο τους. Τα στοιχεία LINE αποτελούν στο ανθρώπινο γονιδίωμα το 15-20% από τα οποία περίπου 14.6% είναι τύπου LINE 1, και περίπου το 2.1% είναι τύπου LINE 2. Τα πλήρη στοιχεία LINE 1 κυμαίνονται από 3,000-4,000 αντίγραφα τα οποία όμως δεν είναι λειτουργικά, λόγω μεταλλάξεων που περιέχουν. Τα στοιχεία LINE είναι πλούσια σε A-T και η δομή τους αποτελείται κυρίως από μία 5' UTR περιοχή υποκινητού για την πολυμεράση II, και δύο ORFs, το ORF1 και το ORF2 τα οποία χωρίζονται από μια ενδιάμεση αλληλουχία 66 bp. Το ORF2 παρουσιάζει ομολογία με την αντίστροφη μεταγραφάση, ενώ στο 3' άκρο ευρίσκεται η 3' UTR 205 bp, και η αλληλουχία poly-A (Smit 1996; Kazazian 1998). Στον άνθρωπο έχουν αναφερθεί οκτώ περιπτώσεις όπου η εισαγωγή του στοιχείου LINE έχει προκαλέσει μετάλλαξη (Kazazian 1998). Μία από αυτές έχει προέλθει από την εισαγωγή ενός στοιχείου LINE 1, μήκους 6 kb εντός του β-γονιδίου της σφαιρίνης (Dívosky *et al.*, 1996).

Στην Ολλανδική (β)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία, ως αποτέλεσμα του ελλείματος μετατίθεται η LINE 1 αλληλουχία δίπλα στο δ-γονίδιο και αφαιρείται το β-γονίδιο μαζί με τον ισχυρό ενισχυτή του (Antonίου *et al.*, 1988; Behringer *et al.*, 1987). Η αφαίρεση του ενισχυτού 3' του β-γονιδίου είναι ενδιαφέρουσα, δεδομένου ότι υποδηλώνει ότι υφίσταται ένας ισχυρός ενισχυτής στο 3' άκρο της Ολλανδικής (β)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας. Εάν η υπόθεση είναι αληθινή τότε ο ενισχυτής αυτός θα πρέπει να λειτουργεί στα γ και τα δ-γονίδια από απόσταση τουλάχιστον 19 kb. Απομονώθηκαν τέσσερα τμήματα από την διαμετατιθέμενη περιοχή και ελέγχθηκαν λειτουργικά για την παρουσία ενισχυτή. Τα αποτελέσματα μετά από διαμόλυνση σε κύτταρα K562, έδειξαν ότι κανένα από τα τμήματα που ελέγχθηκαν δεν παρουσίασε ιδιότητες ενισχυτού. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα αποκλείσαμε την παρουσία ενισχυτού στις 3' διαμετατιθέμενες αλληλουχίες, ενώ παραμένει ανοικτό το ενδεχόμενο ενισχυτών καθοδικά της αναλυθείσας περιοχής (Kosteas *et al.*, 1991).

Τα αποτελέσματα αυτά είναι συμβατά και με τον φαινότυπο από μία σειρά μικρών μεταλλάξεων β-θαλασσαιμίας (290 bp έως 12.6 kb), που αφαιρούν ολόκληρο ή μόνο ένα μέρος από το β-γονίδιο (Dimovski *et al.*, 1993) συμπεριλαμβανόμενων και των κουτιών TATA και CACCC. (Σχήμα 6). Η αφαίρεση ολόκληρου ή ενός τμήματος του β-γονιδίου, οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα της HbF 1.8-15%, που όμως είναι σαφώς χαμηλότερα από τα επίπεδα που παρατηρούνται στην δβ-θαλασσαιμία και την HPFH. Οι φαινότυποι που παρατηρούνται στην β-θαλασσαιμία (αυξημένη HbF και HbA<sub>2</sub>) ενισχύουν την υπόθεση του ανταγωνιστικού μοντέλου μεταξύ των β και γ-γονιδίων για την αλληλεπίδραση τους με την περιοχή LCR, όπου απουσία του β-γονιδίου, ενισχύεται η έκφραση των γ και δ-γονιδίων (Hanscombe *et al.*, 1991).

**Σχήμα 6.** Μεταλλάξεις στην περιοχή του β-γονιδίου έχουν ως αποτέλεσμα μια μικρή αλλά σημαντική αύξηση στα επίπεδα της HbF.

Στην Ισπανική (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία οι ετεροζυγώτες παρουσιάζουν ήπια αναιμία με αυξημένα επίπεδα (HbF 5-15%) και ετεροκυτταρική κατανομή. Το έλλειμμα των περίπου 115 kb αφαιρεί τα δ και β-γονίδια και επεκτείνεται πέραν από κάθε 3' άκρο όλων των HPFH και δβ-θαλασσαιμίες, με μόνη εξαίρεση την Ιαπωνική (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία (Shiokawa *et al.*, 1988). Η Ισπανική (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία είναι πολύ πληροφοριακή, δεδομένου ότι το 3' άκρο της επεκτείνεται περίπου 6-7 kb καθοδικά από το 3' άκρο της HPFH-1. Η περιοχή του DNA που αφαιρείται στην Ισπανική (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία αλλά διατηρείται στις HPFH-1 και HPFH-2 μορφές, περιέχει διάφορα ενδιαφέροντα στοιχεία. Η περιοχή που διατηρείται περιέχει την 3' HS1 θέση (Elder *et al.*, 1990), δύο ενισχυτές που εντοπίζονται 3' των ελλειμάτων της HPFH-1 (Feingold and Forget 1989) και της HPFH-2 (McArthur and Anagnou 1998) καθώς και ένα λειτουργικό γονίδιο οσφρητικού υποδοχέα το οποίο εντοπίζεται εντός του ενισχυτή της HPFH-1 (Feingold *et al.*, 1999). Λειτουργικές δοκιμασίες σε πέντε τμήματα από την 3' διαμετατιθέμενη περιοχή που ελέγχθηκαν σε ερυθροποιητικά κύτταρα K562 και σε μη ερυθροποιητικά κύτταρα HeLa, δεν παρουσίασαν αυξημένη δραστηριότητα εν σχέσει με το πλασμίδιο αναφοράς. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, αποκλείσαμε και σε αυτή την περίπτωση την παρουσία ενισχυτού ή άλλες λειτουργικές αλληλουχίες στις 3' διαμετατιθέμενες αλληλουχίες της Ισπανικής (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας (Kosteas *et al.*, 1991). Τα χαμηλότερα επίπεδα HbF που παρατηρούνται στην Ισπανική (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία είναι συγκρίσιμα με αυτά της Ολλανδικής (β)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας και είναι συμβατά με την απουσία ενός νέου ενισχυτού, με αποτέλεσμα να μην παρατηρείται αυξημένη HbF αντίστοιχη των μορφών HPFH. Τα επίπεδα όμως της HbF είναι αρκετά αυξημένα λόγω έλλειψης ανταγωνισμού από τα ενήλικα δ και β-γονίδια, που επιτρέπει την πιο συχνή αλληλεπίδραση των γ-γονιδίων με την περιοχή της LCR (Hanscombe *et al.*, 1991).

Η ανάλυση της πρωτοταγούς δομής της διαμετατιθέμενης περιοχής Hind III 3,077 bp βρέθηκε να εμφανίζει πολλαπλές δυνητικές θέσεις δέσμευσης για τους παράγοντες GATA-1 και YY1. Επίσης έδειξε ότι η περιοχή περιέχει πολλαπλές επαναληπτικές αλληλουχίες των οικογενειών LINE 1 και Alu (Smit *et al.*, 1996; Smit *et al.*, 1999). Δεν βρέθηκε όμως να περιέχει κάποιο νέο στοιχείο όπως τα LTR ERV-9, παρόμοια με αυτά που εντοπίζονται στην περιοχή 5' LCR και μέσα στον ενισχυτή της HPFH-3, κάτι που όμως ήταν αναμενόμενο με βάση τα αποτελέσματα από τις λειτουργικές δοκιμασίες.

Η τελευταία μελέτη αφορούσε δύο συγκρίσιμες μεταλλάξεις τύπου (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας. Οι ετεροζυγώτες της Κινεζικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας παρουσιάζουν ήπια

αναιμία με αυξημένα επίπεδα HbF (9-20%) με ετεροκυτταρική κατανομή (Jones *et al.*, 1981; Mager *et al.*, 1985). Αντίθετα, τρεις ετεροζυγώτες της Ταϊλανδικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας παρουσιάζουν πιο αυξημένα επίπεδα HbF (17-23%) με πανκυτταρική κατανομή (Winichagoon *et al.*, 1990). Τα 5' σημεία αποκοπής τους διαφέρουν κατά 4.0 kb ενώ τα 3' σημεία αποκοπής τους διαφέρουν κατά 2.8 kb, ενώ η συνολική τους έλλειψη είναι περίπου 100 kb (Kosteas *et al.*, 1997a). Δεδομένου ότι οι μεταλλάξεις αυτές είναι πολύ συγκρίσιμες όσον αφορά το 3' σημείο αποκοπής τους, ελέγξαμε την διαμετατιθέμενη περιοχή για την παρουσία ενισχυτή. Τα αποτελέσματα μας μετά από διαμόλυνση σε ερυθροποιητικά K562 και μη-ερυθροποιητικά κύτταρα HeLa, έδειξαν ότι το τμήμα A (Eco RI- Bgl II 1,476 bp) ευρισκόμενο 532 bp 3' από το σημείο αποκοπής της Ταϊλανδικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας βρέθηκε να ενισχύει την δραστηριότητα της CAT κατά 5-6 φορές. Η αφαίρεση του τμήματος A στη περίπτωση της Κινεζικής θαλασσαιμίας, οδηγεί σε φαινότυπο (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας, ενώ η διατήρηση του στην Ταϊλανδική θαλασσαιμία οδηγεί σε φαινότυπο HPFH. Δεδομένου ότι τρεις ετεροζυγώτες της Ταϊλανδικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας εμφανίζουν φαινότυπο HPFH, τα ανωτέρω δεδομένα υποδηλώνουν ότι ο νέος αυτός ενισχυτής είναι υπεύθυνος για την τροποποίηση της αναπτυξιακής ρύθμισης του διατηρημένου Gγ-γονιδίου. Με βάση τα ανωτέρω, προτείναμε η Ταϊλανδική (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία να μετονομασθεί σε HPFH-6 (Kosteas *et al.*, 1991; Kosteas *et al.*, 1997a).

Στην συνέχεια, προκειμένου να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς ενεργοποίησης του Gγ-γονιδίου από τον ενισχυτή της HPFH-6, χαρακτηρίσαμε τα σημεία αποκοπής του ελλείμματος και προχωρήσαμε στην δομική ανάλυση της 3' διαμετατιθέμενης περιοχής. Το γεφυρικό τμήμα της HPFH-6 απομονώθηκε με PCR από DNA διπλού ετεροζυγώτη, ο οποίος συνχρόνως παρουσιάζει και β<sup>ο</sup>-θαλασσαιμία (Winichagoon *et al.*, 1990). Η μοριακή ανάλυση του κλωνοποιημένου τμήματος έδειξε ότι το 5' άκρο του ελλείμματος επισυμβαίνει 1,260 bp από το 3' άκρο του εμβρυϊκού Gγ-γονιδίου στην συντεταγμένη # 37,243, ενώ το 3' άκρο προσδιορίστηκε σε απόσταση 521 bp 3' από την EcoRI θέση του ενισχυτού (Σχήμα 18 των αποτελεσμάτων, Kosteas *et al.*, 1997a; GenEMBL X81445). Η ανάλυση της πρωτοταγούς δομής από το σημείο αποκοπής της HPFH-6 έως την EcoRI θέση του ενισχυτή, απεκάλυψε την παρουσία πολλαπλών δυνητικών θέσεων αναγνώρισης από διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες όπως οι GCRC, c/EBP, HNF-I, CTII και AP-1. Η σύγκριση των σημείων αποκοπής δεν περιέχει ομόλογες αλληλουχίες, υποδηλώνοντας ότι το έλλειμμα της HPFH-6 προέρχεται από ένα μη-ομόλογο ανασυνδυασμό. Με βάση τα δεδομένα από τις μεταλλάξεις HPFH-2 (Collins *et al.*, 1987) και της Κινεζικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας (Mager *et al.*, 1985), το ολικό μήκος του ελλείμματος υπολογίστηκε σε 101 kb και είναι εντυπωσιακά παρόμοιο με την Κινεζική (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία που είναι 100 kb (Kosteas *et al.*, 1997a).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι δύο άλλα ζεύγη μεταλλάξεων παρουσιάζουν έλλειμμα με παρόμοιο μήκος, δηλ. οι HPFH-1 και HPFH-2 με περίπου 105 kb και δύο (γδβ)<sup>ο</sup>-θαλασσαιμίες με 96 kb. Η διαφορά που παρατηρούνται στα σημεία αποκοπής των ελλειμμάτων αυτών, υποδηλώνουν ότι η αποκοπή συμβαίνει κατά την διάρκεια της αντιγραφής. Τα ανωτέρω ευρήματα ενισχύουν περαιτέρω την αξία της υπόθεσης ότι τα τρία ζεύγη των ανωτέρω μεταλλάξεων-ελλειμμάτων με σχεδόν ταυτόσημο μήκος, δημιουργούνται μέσω της απώλειας μιας πλήρους χρωματινικής αγκύλης (Vanin *et al.*, 1983; Collins *et al.*, 1987; Henthorn *et al.*, 1990). Η υπόθεση αυτή προτείνει ότι η περιοχή σύνδεσης του DNA, προσδένεται με την περιοχή σύνδεσης του χρωμοσωμικού σκελετού (matrix attachment regions ή MARs) και δημιουργεί μια αγκύλη. Η αγκύλη αυτή είναι σημαντική για την αντιγραφή των γονιδίων αλλά και για την έκφραση τους. Η περιοχή MAR είναι πλούσια σε αλληλουχία A-T (70%), συνήθως περιλαμβάνει θέση σύνδεσης για την τοποισομεράση II και για τον παράγοντα SATB1 (special A-T rich binding protein 1), και συνήθως βρίσκεται κοντά σε *cis*-ρυθμιστικές περιοχές του DNA (Nakagomi *et al.*, 1992; Walter *et al.*, 1998). Οι περιοχές MARs δεν παρουσιάζουν κάποια συμβατική αλληλουχία μεταξύ τους, ενώ παρατηρείται μικρή ομολογία μεταξύ ορισμένων από τις εννέα θέσεις MARs που έχουν εντοπιστεί μέσω του προγράμματος MAR-Finder (Walter *et al.*, 1998) στο σύμπλεγμα της β-σφαιρίνης. Οι θέσεις αυτές εντοπίζονται ως εξής: τρεις θέσεις 5' του ε-γονιδίου, μία στη περιοχή του ψβ-γονιδίου, δύο κοντά στο δ-γονίδιο, δύο στο 5' άκρο του IVSII του β-γονιδίου, καθώς και μία τελευταία 2 kb 3' του β-γονιδίου (Jarman and Higgs 1988; Walter *et*

*al.*, 1998). Σε αρκετές περιπτώσεις οι θέσεις MARs αποτελούν στόχο ανασυνδυασμού με την προσθήκη, την αφαίρεση ή την μετάθεση χρωμοσωμάτων (Palena *et al.*, 1994).

Στην περίπτωση της Κινεζικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας (Σχήμα 7) κατά την διάρκεια της αντιγραφής, το DNA διολισθαίνει συγχρόνως και από τις δύο περιοχές σύνδεσης MAR (M1 και M2) που βρίσκονται σε κοντινή απόσταση και δημιουργούν δύο θυγατρικές έλικες. Σε περίπτωση ενός μη-ομόλογου ανασυνδυασμού, ο μηχανισμός αυτός θα οδηγήσει στην αποκοπή μιάς αγκύλης χρωματίνης με αποτέλεσμα τη δημιουργία ελλείματος 100 kb όπως φαίνεται στο Σχήμα 7. Παρομοίως, μια αποκοπή ανοδικά του ε-γονιδίου και του β-γονιδίου, οδηγεί στην αφαίρεση της περιοχής που περιλαμβάνει τα ε, Gγ, Αγ και δ γονίδια και δημιουργεί την (γδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία. Μία άλλη αποκοπή (σε άλλο σημείο MAR) καθοδικά του Αγ-γονιδίου και ανοδικά της περιοχής 3D, αφαιρεί από την περιοχή τα δ- και β-γονίδια και δημιουργεί την μετάλλαξη HPFH-1 (Σχήμα 7).

**Σχήμα 7.** Προτεινόμενος μηχανισμός δημιουργίας μεγάλων ελλειμμάτων στο σύμπλεγμα των β-γονιδίων (Collins *et al.*, 1987).

Έχει αναφερθεί ότι τα MARs ενδεχομένως να διευκολύνουν την έκφραση των γονιδίων της σφαιρίνης και την αλληλεπίδραση τους με την περιοχή LCR κατά τα διάφορα στάδια της ανάπτυξης μέσω της αναδιοργάνωσης της χρωματίνης. (Walter *et al.*, 1998).

Πρόσφατα πειράματα με RNA FISH και δοκιμασίες υπερεισθησίας στην DNase I, έχουν δείξει ότι το σύμπλεγμα των γονιδίων της β-σφαιρίνης είναι χωρισμένο σε τουλάχιστον τρεις μικρότερες λειτουργικές περιοχές που ενδεχομένως παριστούν όρια της χρωματίνης (chromatin boundaries) (Gribnau *et al.*, 2000; Udvardy 1999) και ενδεχομένως οι περιοχές MARs να συμμετέχουν στην δημιουργία τους. Η παρουσία των ορίων χρωματίνης θα εξηγούσε και το κύριο πρόβλημα της ενέργειας που απαιτείται από τον μηχανισμό της δημιουργίας αγκύλης (looping) δεδομένου ότι το DNA στον πυρήνα είναι πολύ πυκνό (~7-8 mg/ml) και οι μεταγραφικοί παράγοντες δεν παρέχουν ενέργεια (Udvardy 1999). Οι περιοχές αυτές φαίνεται ότι αντανakλούν τα διάφορα στάδια της ανάπτυξης, όπου έχουν εντοπιστεί μετάγραφα από τις περιοχές μεταξύ των γονιδίων, υποδηλώνοντας ότι η μεταγραφή αυτή είναι απαραίτητη για την αναδιοργάνωση της χρωματίνης μέσω και της οποίας ελέγχεται η μεταγραφή των γονιδίων για το κάθε αναπτυξιακό στάδιο (Gribnau *et al.*, 2000; Engel and Tanimoto 2000).

Ακολούθως εστιαστήκαμε στην περαιτέρω δομική ανάλυση της περιοχής από την Eco RI θέση έως το τέλος του ενισχυτού, συνολικού μήκος 1,476 bp. Η ανάλυση απεκάλυψε την ύπαρξη πολλαπλών θέσεων αναγνώρισης από διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες όπως GATA-1, NF-E2/AP-1, GTI/II και YY1 (Kosteas *et al.*, 1996). Για να εκτιμήσουμε τον επιμέρους *in vivo* ρόλο των θέσεων στην ολική δραστηριότητα του ενισχυτή, δημιουργήσαμε μία σειρά προοδευτικών μεταλλάξεων-ελλειμμάτων στο αρχικό τμήμα του ενισχυτού, τόσο από το 5' άκρο όσο και από το 3' άκρο. Τα αποτελέσματα μετά από διαμόλυνση σε ερυθρολευχαιμικά κύτταρα K562 έδειξαν ότι όλες οι μεταλλάξεις, ακόμα και μίας θέσης GATA-1 (5' Δ1) μειώνουν σημαντικά (από 2-4 φορές) τη δραστηριότητα του ενισχυτού, γεγονός που υποδηλώνει ότι είναι απαραίτητη η συνεργιστική δράση και αλληλεπίδραση των επί μέρους παραγόντων για την πλήρη δραστηριότητα του ενισχυτού.

Στην συνέχεια ο ενισχυτής ελέγχθηκε για την οντογενετική του εξειδίκευση σε υποκινητές ετερόλογων γονιδίων της σφαιρίνης με πρώιμο εμβρυϊκή (ε-γονίδιο) ή ενηλίκου τύπου εξειδίκευση (δ και β-γονίδια) καθώς και στον μη-ετερόλογο υποκινητή της διϋδροφυλικής αφυδρογονάσης (DHFR). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο ενισχυτής δεν είχε σημαντική επίπτωση, σε αντίθεση με την υψηλή ενεργοποίηση του υποκινητού του όψιμου εμβρυϊκού γ-γονιδίου ενώ μειωμένη ήταν η έκφραση στον μη-ετερόλογο υποκινητή της DHFR-CAT.

Η περαιτέρω ανάλυση της πρωτοταγούς δομής ολοκληρώθηκε και επεκτάθηκε 539 bp μετά το σημείο αποκοπής της Κινεζικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας (GenEMBL: X02992) καλύπτοντας μία συνολική έκταση 3,157 bp (GenEMBL: X81445). Η ανάλυση έδειξε ότι το 3' άκρο αποκοπής της HPFH-6 εντοπίζεται ακριβώς 2,809 bp ανοδικά από το 3' άκρο της Κινεζικής (Αγδβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας και 74 kb 3' από το ενήλικο β-γονίδιο. Περαιτέρω, τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι το 3' άκρο της αποκοπής εντοπίζεται 6 kb ανοδικά από το ενδογενές στοιχείο ρετροϊού HERV-H που προαναφέρθηκε (Mager *et al.*, 1985; Mager and Henthorn 1984). Τα στοιχεία HERV-H όπως και τα ERV-9 ανήκουν στην κατηγορία των HERVs Τάξης 1(Class I) τα οποία παρουσιάζουν ομολογίες με τους τύπου C ρετροϊούς των θηλαστικών. Τα στοιχεία HERV-H παρουσιάζουν περαιτέρω διαφορές στην περιοχή του υποκινητή U3 και χωρίζονται σε τρεις υποκατηγορίες (Löwer *et al.*, 1996). Διάφορες λειτουργικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι και τα στοιχεία HERV-H έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν γονίδια αναφοράς (Feuchter *et al.*, 1992) (Σχήμα 3).

Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ORF finder εντοπίσαμε εντός του ενισχυτή HPFH-6 ένα ORF 230 αμινοξέων. Σημαντικό είναι ότι το ORF αρχίζει με το αμινοξύ μεθειονίνη, το οποίο είναι χαρακτηριστικό του πρώτου εξονίου ενός γονιδίου, ενώ χαρακτηρίζεται και από την παρουσία ενός κουτιού TATA το οποίο είναι απαραίτητο για την λειτουργία ενός υποκινητή. Όλα αυτά τα ανωτέρω στοιχεία υποδηλώνουν την πιθανή παρουσία ενός νέου γονιδίου εντός της 3' περιοχής του ενισχυτού (Kosteas *et al.*, 1996). Η περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι το ORF αποτελεί μέρος ενός γονιδίου για τον υποδοχέα του οσφρητικού βολβού (Buck and Axel 1991). Πιστεύεται ότι η οικογένεια των γονιδίων οσφρητικών υποδοχέων (olfactory receptor ή OR)

αποτελούν την μεγαλύτερη οικογένεια γονιδίων στα σπονδυλωτά με περίπου 500-1,000 γονίδια στο σκύλο, το ποντίκι και τον αρουραίο. Στον άνθρωπο τα περισσότερα είναι ψευδογονίδια με περίπου 200-300 λειτουργικά γονίδια τα οποία συνήθως είναι οργανωμένα σε συμπλέγματα (Ben-Arie *et al.*, 1994; Crowe *et al.*, 1996; Buettner *et al.*, 1998; Mombaerts 1999). Υπάρχει επίσης διαθέσιμη βάση δεδομένων που περιλαμβάνει όλα τα δημοσιευμένα γονίδια OR, τα μοντέλα έκφρασης τους καθώς και τη χρωμοσωμική τους εντόπιση σε διάφορους οργανισμούς (<http://cgepe.met.yale.edu/ORDB/HTML>) (Skoufos *et al.*, 1999). Το στοιχείο OR εντός του ενισχυτή της HPFH-6 (OR-6H) εμφανίζει ομολογία 37% σε επίπεδο αμινοξέων με το γονίδιο OR που εντοπίζεται εντός του ενισχυτή 3' της HPFH-1 (OR-1B) (Feingold *et al.*, 1999). Φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι το OR-6H γονίδιο ανήκει στην Τάξη I της οικογένειας, ενώ το OR-1B γονίδιο ανήκει στην Τάξη II της οικογένειας των OR γονιδίων (Buettner *et al.*, 1998; Feingold *et al.*, 1999). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι αλλά τρία γονίδια OR εντοπίζονται στην 5' περιοχή της LCR ενώ τα αντίστοιχα γονίδια OR έχουν πρόσφατα εντοπιστεί και στον ποντικό (Bulger *et al.*, 1999; Bulger *et al.*, 2000). Τα ομόλογα για το HPFH-1OR γονίδια, ονομάζονται MOR3'β2 και MOR3'β3, εδράζονται στο χρωμόσωμα 7 του ποντικού κοντά στο σύμπλεγμα της β-σφαιρίνης και παρουσιάζουν 73 έως 71% ομολογία αντίστοιχα με το HPFH-1OR γονίδιο (Bulger *et al.*, 1999; Feingold *et al.*, 1999). Η παρουσία μιας οικογένειας OR γονιδίων, που έχει διατηρηθεί κατά την διάρκεια της εξέλιξης πλησίον της περιοχής LCR, υποδηλώνει ότι ενδεχομένως η περιοχή LCR να έχει διπλό ρόλο με την ικανότητα να ενεργοποιεί παράλληλα δύο συμπλέγματα γονιδίων (Bulger *et al.*, 1999). Μια άλλη μελέτη, αναφέρει ότι σε μία έκταση περίπου 500 kb που περιλαμβάνει την περιοχή 11p15.5 όπου εδράζει το σύμπλεγμα της β-σφαιρίνης, υπάρχουν συνολικά έξι OR γονίδια ή ψευδογονίδια (Buettner *et al.*, 1998). Με βάση αυτή την μελέτη, φαίνεται ότι εκκρεμεί η εντόπιση ενός OR γονιδίου που ακόμα δεν έχει καθορισθεί. Μέχρις στιγμής, σε ολόκληρο το χρωμόσωμα 11, έχουν εντοπισθεί 26 OR γονίδια και υπολογίζεται ότι συνολικά υπάρχουν τουλάχιστον 40-50 (Buettner *et al.*, 1998). Δύο γονίδια OR έχουν πρόσφατα εντοπιστεί και στο σύμπλεγμα της β-σφαιρίνης στο κοτόπουλο, το πρώτο βρίσκεται 11.5 kb 3' του β-γονιδίου και περιλαμβάνει ένα ORF 315 αμινοξέων (Staines and Thomas 1999), ενώ το δεύτερο εντοπίζεται 7.1 kb 3' του ε-γονιδίου (Bulger *et al.*, 1999). Το OR 3' του β-γονιδίου παρουσιάζει ομολογία με τα γονίδια OR που εντοπίζονται 3' των ελλειμμάτων της HPFH-1 (Feingold *et al.*, 1998) και HPFH-6 (Kosteas *et al.*, 1996).

Η λειτουργική μελέτη της έκφρασης του γονιδίου OR-6H αρχικά έγινε στο επίπεδο του mRNA με ανάλυση κατά Northern από διάφορους ιστούς. Τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά λόγω των χαμηλών επιπέδων της έκφρασης. Στην συνέχεια προχωρήσαμε στην ανάλυση με την αντίστροφη μεταγραφή του mRNA με την μεθοδολογία της RT-PCR. Με την τεχνική της RT-PCR απομονώσαμε και αναλύσαμε αρκετά PCR προϊόντα από διάφορες αιμοποιητικές σειρές (K562, HHW 105, MEL και HL60). Όλα τα προϊόντα περιείχαν την ίδια αλληλουχία με την γενωμική αλληλουχία της β-σφαιρίνης υποδηλώνοντας ότι το γονίδιο OR-6H εκφράζεται σε αυτές τις κυτταρικές σειρές (Σχήμα 27 των Αποτελεσμάτων). Στην συνέχεια, 300 bp από την ανοδική περιοχή του ORF υποκλωνοποιήθηκαν στην θέση του υποκινητή του γονιδίου της CAT, ώστε να ελεγχθεί η ικανότητα του να ενεργοποιεί την μεταγραφή σε κύτταρα K562. Καμία όμως δραστηριότητα δεν παρατηρήθηκε. Τέλος, σε συνεργασία με τον I. Connerton ελέγχθηκε με PCR μία cDNA βιβλιοθήκη από ανθρώπινο ιστό οσφρητικού βολβού (Crowe *et al.*, 1996). Δεν προέκυψε κανένα προϊόν PCR, υποδηλώνοντας ότι το OR-6H γονίδιο δεν εκφράζεται στον οσφρητικό βολβό ή ότι αντιπροσωπεύει μία υποκατηγορία γονιδίων OR, ειδικά για τις ανωτέρω αιμοποιητικές κυτταρικές σειρές. Τέλος, αρνητική ήταν και η παρουσία PCR προϊόντος από cDNA βιβλιοθήκη μυελού των οστών.

Η παρουσία των γονιδίων OR στο άκρο του συμπλέγματος της β-σφαιρίνης και ο ρόλος της LCR ως προς την έκφρασή τους ακόμα δεν έχει διευκρινιστεί. Ενδεχομένως η περιοχή LCR να ενεργοποιεί και τα δύο συμπλέγματα. Η υπόθεση αυτή υποδηλώνει ότι ίσως υπάρχει κάποιο στοιχείο μονοτού (insulator) μεταξύ των δύο περιοχών αντίστοιχο της θέσης HS4 στο κοτόπουλο (Chung *et al.*, 1993; Chung *et al.*, 1997). Όμως η ιδέα αυτή αμφισβητείται λόγω του ότι η HS4 λειτουργεί ως σύνορο μεταξύ του συμπλέγματος της β-σφαιρίνης στο κοτόπουλο και της περιοχής για τον υποδοχέα του γονιδίου φυλλικού οξέος (folate) (Prioleau *et al.*, 1999). Αντιθέτως, η ευαισθησία για την DNase I επεκτείνεται αρκετές kb ανοδικά από την περιοχή της LCR (HS6 και HS7) έως και το σύμπλεγμα των γονιδίων OR (Bulger *et al.*, 1999a; Gribnau *et al.*, 2000). Επομένως το ερώτημα είναι, τι αποτρέπει την περιοχή LCR να αλληλεπιδράσει με τα ανοδικά γονίδια OR, τα οποία είναι πιο κοντά στην LCR απ' ό,τι είναι το β-γονίδιο που βρίσκεται σε απόσταση άνω των 50 kb

(Gribnau *et al.*, 2000). Αποτελέσματα από την ίδια ομάδα, υποδηλώνουν ότι η αναδιοργάνωση της χρωματίνης σε μικρότερες περιοχές καθορίζει πια γονίδια θα αλληλεπιδράσουν με την περιοχή LCR (Gribnau *et al.*, 2000).

Η πρόσφατη αφαίρεση μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού της περιοχής LCR έδειξε να μην επηρεάζει την έκφραση των OR γονιδίων σε διαγονιδιακά ποντίκια (Bulger *et al.*, 1999; Bulger *et al.*, 2000). Τα αποτελέσματα αυτά μαζί με τα τρέχοντα δεδομένα της ανάλυσης του ανθρωπίνου γονιδιώματος, θα βοηθήσουν περαιτέρω στην διερεύνηση της κατανομής και οργάνωσης των γονιδίων των σφρητικών υποδοχέων, καθώς και στην κατανόηση των μηχανισμών που ελέγχουν την όσφρηση (Buettner *et al.*, 1998).

## Αποτελέσματα Δεύτερου Μέρους

Στο δεύτερο μέρος των αποτελεσμάτων, ελέγξαμε την υπόθεση ότι η αφαίρεση αποσιωπητών που εδράζονται μεταξύ των Αγ και δ-γονιδίων οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα HbF στην ενήλικη ζωή. Για τον σκοπό αυτό ελέγξαμε λειτουργικά μια περιοχή 13.4 kb μεταξύ των Αγ και δ-γονιδίων για την παρουσία αποσιωπητών. Τα αποτελέσματά μας ανέδειξαν την παρουσία τεσσάρων αποσιωπητών, οι οποίοι φαίνεται ότι συμμετέχουν στη μεταστροφή της αιμοσφαιρίνης και είναι υπεύθυνοι για τους προκύπτοντες φαινότυπους.

Είκοσι τρία συνεχόμενα ή αλληλοκαλυπτόμενα τμήματα από την περιοχή των 13.4 kb, υποκλωνοποιήθηκαν και ελέγχθηκαν για πιθανή αρνητική δράση στη μεταγραφική ικανότητα του πλασμιδίου pRSV-CAT. Σαν θετική αλληλουχία για την παρουσία κατασταλτικής αλληλουχίας, χρησιμοποιήθηκε ο αποσιωπητής του ε-γονιδίου (Cao *et al.*, 1989; Raich *et al.*, 1995). Σε λειτουργικές δοκιμασίες, ο αποσιωπητής του ε-γονιδίου καταστέλλει τη δράση του υποκινητή κατά δέκα φορές σε κύτταρα HeLa και κατά τρεις φορές σε κύτταρα K562 (Cao *et al.*, 1989). Σε διαγονιδιακά ποντίκια η αφαίρεση του ε-αποσιωπητή από την κατασκευή LCR ε-γονιδίου, έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση του ε-γονιδίου έως και το ενήλικο στάδιο της ανάπτυξης (Raich *et al.*, 1995). Η σύγκριση της αλληλουχίας του αποσιωπητή του ε-γονιδίου με άλλους γνωστούς αποσιωπητές, έδειξε ότι σε τρεις περιοχές παρουσιάζει ομολογία με τους αποσιωπητές της λυσοζύμης του κοτόπουλου, καθώς και με τον αποσιωπητή *autonomous replicating sequence binding factor 1* ή ABF-1 του σακχαρομούκητα που προσδένεται στην συμβατική αλληλουχία RTCRYBNNNACG (όπου R = A ή G, Y = C ή T, B = C ή T ή G) (Cao *et al.*, 1989; Peters *et al.*, 1993) η οποία παρουσιάζει ομολογία με την συμβατική αλληλουχία VDCCATNWY (όπου V = A ή C ή G, D = A ή G ή T, W = T ή A) του κατασταλτικού παράγοντα YY1 (Gumucio *et al.*, 1992). Πρόσφατη μελέτη με λειτουργικές δοκιμασίες έως και 6 kb 5' του ε-γονιδίου, έδειξε την παρουσία επιπλέον αρνητικών στοιχείων στις περιοχές -3 kb (εNRA-I, εNRA-II) και -1.7 kb (εNRB) του υποκινητή. Αυτά τα αρνητικά στοιχεία ακολουθούνται από δύο θετικά στοιχεία το εPRA και εPRB (Li *et al.*, 1998). Τα στοιχεία αυτά περιλαμβάνουν και πολλαπλές δυνητικές θέσεις δέσμευσης για τους παράγοντες GATA-1 και YY1 που έχουν αποδειχθεί ότι λειτουργούν είτε θετικά είτε αρνητικά στην έκφραση ενός γονιδίου (Raich *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1997). Έχει προταθεί, ότι η καταστολή του ε-γονιδίου πραγματοποιείται μέσω της συνεργιστικής δράσης πολλαπλών αρνητικών στοιχείων που ευρίσκονται στην ευρύτερη περιοχή του υποκινητή και στην παρουσία μεταγραφικών παραγόντων. Η αφαίρεση από τον γενωμικό κλώνο βYAC που περιέχει το σύμπλεγμα των β-γονιδίων του ε-αποσιωπητή (από την θέση -304 έως -179), που περιλαμβάνει μια YY1 και δύο GATA-1 θέσεις, έδειξε ότι εκτός την έκφραση του ε-γονιδίου επηρεάζεται και η έκφραση του γ-γονιδίου. Ενδεχομένως η περιοχή του ε-υποκινητή να μεσολαβεί και στην αλληλεπίδραση της LCR με το γ-γονίδιο μειώνοντας την απόσταση μεταξύ τους (Liu *et al.*, 1997).

Τα αποτελέσματα μετά από διαμόλυνση των ανασυνδιασμένων πλασμιδίων σε κύτταρα K562, έδειξαν την παρουσία τεσσάρων τμημάτων με ιδιότητες αποσιωπητού. Η δραστηριότητα των πλασμιδίων που περιείχαν τις περιοχές αυτές ήταν κατά 30-40% χαμηλότερη του πλασμιδίου ελέγχου pRSV-CAT. Δύο τμήματα (Enh και F) προσδιορίστηκαν μεταξύ των Αγ και ψβ-γονιδίων, ευρισκόμενα 0.4 kb και 1.6 kb από το 3' άκρο του Αγ γονιδίου, αντίστοιχα ενώ δύο άλλα τμήματα (O και P) εντοπίστηκαν 0.7 kb και 2.3 kb 5' του δ-γονιδίου, αντίστοιχα (Kosteas *et al.*, 1993; Kosteas *et al.*, 1994).

Το τμήμα Enh (Hind III 753 bp), αρχικά είχε χαρακτηριστεί ως ενισχυτής (Bodine and Ley 1987). Στο *in vitro* σύστημα που αναπτύξαμε για την ανάδειξη *cis* λειτουργικών αλληλουχιών, αποδείξαμε ότι λειτουργεί και ως αποσιωπητής τόσο σε δοκιμασίες CAT όσο και σε δοκιμασίες λουσιφεράσης. Αρκετές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με το στοιχείο Enh, έχουν περαιτέρω αποδείξει ότι το τμήμα Enh ενδεχομένως να συμμετέχει στην σύνδεση του β-συμπλέγματος με την περιοχή σύνδεσης του χρωμοσωμικού σκελετού (matrix attachment regions ή MARs) (Cunningham *et al.*, 1994). Πιο πρόσφατα έχει αποδειχθεί ότι το τμήμα Enh έχει την ικανότητα, παρουσία και της περιοχής LCR να προστατεύει το Αγ-γονίδιο από τα φαινόμενα θέσεως (Stamatoyannopoulos *et al.*, 1997). Τα πιο πρόσφατα δεδομένα, υποδηλώνουν ότι η λειτουργία της περιοχής αυτής είναι αμφιλεγόμενη και παραμένει αδιευκρίνιστη (Liu *et al.*, 1998). Ενδιαφέρον παρουσιάζει μία φυσιολογική μετάλλαξη (C σε T στην θέση #41,806) μέσα στο τμήμα Enh που



περιγράφηκε σε μέλη Κινεζικής οικογένειας, όπου τα  $\gamma$ -γονίδια ενεφάνισαν έκφραση και στο ενήλικο στάδιο (Balta *et al.*, 1994). *In vivo* πειράματα σε υβρίδια που περιελάμβαναν αυτή την μετάλλαξη (Enh<sup>m</sup>), εντόπισαν μια πρωτεΐνη που στο ενήλικο στάδιο προσδέεται μερικά νουκλεοτίδια μετά από την σημειακή μετάλλαξη, υποδηλώνοντας ότι αποτρέπει την αλληλεπίδραση της LCR με το Α $\gamma$ -γονίδιο. Λειτουργικές συγκριτικές δοκιμασίες σε K562 και σε κύτταρα HeLa μεταξύ του φυσιολογικού Enh και μεταλλαγμένου Enh<sup>m</sup> τμήματος που επιτελέσαμε, δεν παρουσίασαν καμία διαφορά στην έκφραση του γονιδίου αναφοράς, υποδηλώνοντας ότι η μετάλλαξη Enh<sup>m</sup> δεν ευθύνεται αποκλειστικά για τον φαινότυπο που παρατηρείται.

Τα δεδομένα μας για την παρουσία δύο αποσιωπητών 3' του Α $\gamma$  γονιδίου είναι συμβατά με μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια όπου επετεύχθη αυτόνομη φυσιολογική μεταστροφή του LCR Α $\gamma$ -γονιδίου στο ενήλικο στάδιο, η κατασκευή του οποίου συμπεριλάμβανε τους αποσιωπητές Enh και F (Dillon *et al.*, 1991; Lloyd *et al.*, 1992; Arcasoy *et al.*, 1997). Όταν η κατασκευή δεν περιελάμβανε τις περιοχές Enh και F, παρατηρείτο έκφραση του  $\gamma$ -γονιδίου έως και το ενήλικο στάδιο (Σχήμα 30 των Αποτελεσμάτων). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε κατασκευές  $\beta$ -YAC όπου απουσία των  $\delta$  και  $\beta$ -γονιδίων, τα  $\gamma$ -γονίδια παρουσίασαν αυτόνομη καταστολή (Peterson *et al.*, 1995). Τα δεδομένα αυτά είναι συμβατά με την υπόθεση ότι η αναπτυξιακή ρύθμιση των  $\gamma$ -γονιδίων επιτελείται και μέσω αυτών των αποσιωπητών (Dillon and Grosveld 1991; Stamatoyannopoulos 1991). Πρόσφατα το τμήμα Enh αφαιρέθηκε επιλεκτικά με ομόλογο ανασυνδυασμό από  $\beta$ YAC. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αφαίρεση του αποσιωπητού Enh δεν παρουσίασε καμία αλλαγή, τόσο στο χρόνο όσο και στα επίπεδα έκφρασης στα γονίδια της σφαιρίνης κατά τα διάφορα στάδια της ανάπτυξης (Liu *et al.*, 1998). Το ανωτέρω εύρημα δεν είναι απαραίτητα ασύμβατο με τις προηγούμενες μελέτες (Dillon *et al.*, 1991; Lloyd *et al.*, 1992; Arcasoy *et al.*, 1997). Μία πιθανή εξήγηση για το γεγονός ότι η αφαίρεση του τμήματος Enh δεν επηρέασε την έκφραση των  $\gamma$ -γονιδίων αποτελεί το ενδεχόμενο να υπάρχουν και άλλα στοιχεία του συμπλέγματος που αναπληρώνουν ή συμβάλλουν συνεργιστικά στην μεταστροφή της αναπτυξιακής έκφρασης των  $\gamma$ -γονιδίων. Η δράση του αποσιωπητού Enh ενδεχομένως είναι πάνω στο  $\gamma$ -γονίδιο μόνο κατά την διάρκεια της ανάπτυξης.

Δεδομένου ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες συμμετέχουν στην αναπτυξιακή ρύθμιση των γονιδίων της σφαιρίνης, μελετήθηκαν συστηματικά οι διάφοροι παράγοντες που προσδέονται με τους αποσιωπητές Enh και F. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι ο αποσιωπητής Enh συνδέεται με διάφορους παράγοντες και περιλαμβάνει τρεις θέσεις σύνδεσης για τον παράγοντα GATA-1, καθώς και από μια θέση για τους παράγοντες AP-2, CBP-1 και Sp1 (Purucker *et al.*, 1990). Αργότερα αποδείχθηκε ότι περιλαμβάνει και δύο θέσεις σύνδεσης της πρωτεΐνης SATB1 που προσδέεται ειδικά με τις θέσεις MARS ή SARs του DNA (Cunningham *et al.*, 1994). Οι θέσεις MARS έχουν την ικανότητα να δημιουργούν αγκύλη του DNA η οποία είναι σημαντική για την αντιγραφή και την έκφραση των γονιδίων (Walter *et al.*, 1998).

Ο αποσιωπητής F ελέγχθηκε για πρώτη φορά και βρέθηκε ότι περιέχει θέσεις δέσμευσης για τους παράγοντες YY1, GATA-1 και CP1. Οι έξι θέσεις σύνδεσης για τον παράγοντα YY1 βρέθηκαν να εμφανίζουν ποικίλου βαθμού σύνδεση και ομολογία με τις συμβατικές αλληλουχίες δέσμευσης. Επιπρόσθετα, προσδιορίστηκαν τρεις θέσεις ισχυρής σύνδεσης για τον ερυθροποιητικό παράγοντα GATA-1 καθώς και μία θέση για το μη-ιστοειδικό παράγοντα CP1 (Soulтанas *et al.*, 1996). Στη συνέχεια ελέγχθηκαν λειτουργικά οι ισχυρές θέσεις σύνδεσης του παράγοντα YY1. Για τον σκοπό αυτό, δημιουργήθηκαν επιλεκτικές μεταλλάξεις σε κάθε μία από τις θέσεις σύνδεσης (26, 108 και 311). Τα μεταλλαγμένα F τμήματα υποκλωνοποιήθηκαν σε πλασμίδια αναφοράς και ελέγχθηκαν λειτουργικά σε κύτταρα K562 και HeLa. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μετάλλαξη στην YY1 θέση 108 (ACA σε TTG) αναστέλλει τη δράση του αποσιωπητή, και ως αποτέλεσμα παρουσιάζει αυξημένη έκφραση κατά 2.0-2.2 σε κύτταρα K562 και HeLa. Στη συνέχεια, για να προσδιοριστεί εάν οι YY1 θέσεις λειτουργούν συνεργιστικά ή όχι, το τμήμα F χωρίστηκε σε τρία μικρότερα τμήματα (F<sub>E</sub>, F<sub>H</sub> και F<sub>G</sub>) παρόμοια με εκείνα που αρχικά χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα μετατόπισης της κινητικότητας και αποτύπωσης με DNase I. Κάθε τμήμα περιέχει και ένα διαφορετικό αριθμό από τις ισχυρές θέσεις σύνδεσης του παράγοντα YY1. Όλα τα τμήματα υποκλωνοποιήθηκαν στο φορέα pGL2 G $\gamma$ -λουσιφεράση-SV40 και ελέγχονται λειτουργικά σε τρέχοντα πειράματα. Εάν οι YY1 θέσεις λειτουργούν συνεργιστικά, τότε αναμένεται ότι η αρχική κατασκευή, δηλ. το τμήμα F με τρεις ισχυρές YY1 θέσεις, θα παρουσιάσει την χαμηλότερη έκφραση. Με ενδιαφέρον αναμένεται και η ανάλυση του τμήματος F<sub>E</sub> που περιλαμβάνει δύο ισχυρές θέσεις δέσμευσης (26 και 108). Εάν παρουσιάσει παρόμοια χαμηλά επίπεδα, τότε με βάση και την λειτουργική μελέτη που προαναφέρθηκε θα

υποδηλώνει ότι η δράση του αποσιωπητή περιορίζεται στο 5' άκρο κοντά στην θέση 108 (Soulтанas *et al.*, υπό προετοιμασία). Παράλληλη μελέτη του εργαστηρίου μας έχει δείξει ότι οι αποσιωπητές Enh και F (σε αντίθεση με τους αποσιωπητές O και P) παρουσιάζουν συνεργιστική δράση (52±9) εν σχέσει με τα απομονωμένα Enh (79±11) και F (73±14%) τμήματα (E. Κατσαντώνη; αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Η συσσώρευση πολλαπλών θέσεων σύνδεσης για τους παράγοντες YY1 και GATA-1 εντός του αποσιωπητού F, σε συνδυασμό με τα δεδομένα που τεκμηριώνουν τον κατασταλτικό ρόλο των ανωτέρω δύο παραγόντων στους υποκινητές των ε- και γ-γονιδίων στην οντογένεση (Baron *et al.*, 1997; Arcasoy *et al.*, 1997), υποδηλώνει τον δυνητικό ρόλο των πρωτεϊνών αυτών στην ρύθμιση της λειτουργίας του αποσιωπητού μέσα στο σύνθετο πλαίσιο της διεργασίας της μεταστροφής της αιμοσφαιρίνης.

Η έρευνα για αρνητικά στοιχεία έχει πραγματοποιηθεί και στο σύμπλεγμα της α-σφαιρίνης, όπου η αναπτυξιακή ρύθμιση του εμβρυϊκού ζ-γονιδίου είναι αυτόνομη όπως εκείνη των ε και γ-γονιδίων. Πρόσφατες *in vivo* και *in vitro* μελέτες εντόπισαν μία αλληλουχία αποσιωπητού 108 bp, ευρισκόμενη 1.2 kb 3' του ζ-γονιδίου, στην οποία συνδέεται ο παράγοντας NF-kB (GGGRHTYYHC, όπου R = A ή G, H = A, T ή C, Y = C ή T) υποδηλώνοντας ότι εν μέρει συμμετέχει στην καταστολή του ζ-γονιδίου (Liebhaber 2000, Wang and Liebhaber 1999). Η αλληλουχία αυτή δεν εμφανίζεται στους αποσιωπητές Enh και F. Σημαντικό ενδιαφέρον για την λειτουργία των εμβρυϊκών γονιδίων προέρχεται από μία πρόσφατη μελέτη, όπου απεδείχθη ότι η επανενεργοποίηση των εμβρυϊκών ζ και ε-γονιδίων αναστρέφει την θνησιμότητα σε ομόζυγα ποντίκια με α και β-θαλασσαιμία (Russell and Liebhaber 1998). Επομένως, η πλήρης κατανόηση των μηχανισμών που αποσιωπούν τα εμβρυϊκά ζ και ε-γονίδια στην ενήλική ζωή μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη νέων στρατηγικών που θα αποτρέπουν την καταστολή τους *in utero* και ενδεχομένως να μειώσουν την θνησιμότητα που παρατηρείται από την θαλασσαιμία (Wang and Liebhaber 1999).

Στην συνέχεια διερευνήσαμε περαιτέρω το ρόλο των αποσιωπητών (O και P) που εδράζονται 5' του δ-γονιδίου, στη δημιουργία του φαινοτύπου HPHH έναντι εκείνου της δβ-θαλασσαιμίας με την εκτεταμένη λειτουργική ανάλυση των περιοχών εκατέρωθεν των σημείων αποκοπής δύο συγκρίσιμων μεταλλάξεων, ήτοι της Ιταλικής HPHH-5 (Camaschella *et al.*, 1990) και της Αμερικανικής δβ-θαλασσαιμίας (Anagnou *et al.*, 1985).

Η περιοχή 5' του δ-γονιδίου, έχει μελετηθεί εκτεταμένα κυρίως γιατί πιστεύεται ότι περιέχει *cis* ρυθμιστικά στοιχεία που συμμετέχουν στην μεταστροφή της αιμοσφαιρίνης, και τα οποία είναι υπεύθυνα για τους φαινοτύπους της HPHH και δβ-θαλασσαιμίας. Μία προηγούμενη μελέτη εντόπισε ένα παράγοντα από κύτταρα K562 και MEL, που προσδένεται σε μία επαναληπτική περιοχή πλούσια σε πυριμιδίνη (pyr factor) 1 kb ανοδικά του δ-γονιδίου (O' Neill *et al.*, 1991; Acuto *et al.*, 1996). Ο παράγοντας pyr προσδένεται σε μία συντηρημένη περιοχή 250 bp που αποτελείται κατά 95% από πυριμιδίνη. Πιστεύεται ότι ο παράγοντας pyr έχει την ικανότητα να αναδιοργανώνει την χρωματίνη και ίσως να παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταστροφή της αιμοσφαιρίνης (O' Neill *et al.*, 1991). Σε λειτουργικές δοκιμασίες σε κύτταρα MEL, ένα τμήμα 383 bp που περιλαμβάνει το στοιχείο pyr 250 bp, καθώς και μία θέση GATA-1, βρέθηκε να αυξάνει την έκφραση ενός β-CAT γονιδίου κατά τρεις φορές (Acuto *et al.*, 1996). Η αφαίρεση του παράγοντα pyr σε διαγονιδιακά ποντίκια παρουσίασε καθυστέρηση του φαινομένου της μεταστροφής της αιμοσφαιρίνης και παρατεταμένη έκφραση του γ-γονιδίου έως και το ενήλικο στάδιο (O' Neill *et al.*, 1991) ενδεχομένως λόγω της αναδιοργάνωσης της χρωματίνης δεδομένου ότι λειτουργικά δεν παρουσίασε κατασταλτική δράση. Έχει αποδειχθεί ότι το σύμπλεγμα pyr αλληλεπιδρά με τέσσερις υπομονάδες του παράγοντα SWI/SNF (O' Neill *et al.*, 1991) που έχει την ικανότητα να αναδιοργανώνει την χρωματίνη. Πρόσφατα απεδείχθη ότι αλληλεπιδρά και με τον παράγοντα Ikaros, που είναι απαραίτητος για την φυσιολογική ανάπτυξη των B και T-λεμφοκυττάρων, καθώς και με τους καταστολείς NURD (nucleosome-remodeling deacetylase) (O' Neill *et al.*, 2000). Το αντίστοιχο κλωνοποιημένο τμήμα Q στην παρούσα μελέτη, δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές εν σχέσει με το γονίδιο αναφοράς pRSV-CAT. Μία άλλη μελέτη εντόπισε μία αρνητική περιοχή 4.0 έως 1.7 kb (τμήμα R) 5' του δ-γονιδίου. Το αντίστοιχο τμήμα στην παρούσα μελέτη είναι το τμήμα N (Σχήμα 8). Η περιοχή αυτή παρουσιάζει αρκετά ενδιαφέροντα στοιχεία. Η αλληλουχία βρέθηκε ότι περιέχει i) δύο αλληλουχίες Alu I, ii) συμβατικές αλληλουχίες σύνδεσης για τους παράγοντες Sp1 και GATA-1, iii) αρκετές μικρές επαναληπτικές αλληλουχίες καθώς και iv) ομολογίες με τους αποσιωπητές από το γονίδιο της λυσοζύμης του κοτόπουλου, τον παράγοντα ABF1 της ζύμης, καθώς και με τον αποσιωπητή του ε-γονιδίου (Vitale *et al.*, 1994).

**Σχήμα 8.** Τμήμα Α. Λειτουργική ανάλυση της περιοχής μεταξύ των Αγ και δ-γονιδίων τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Τμήμα Β. Η περιοχή 5' του δ-γονιδίου με βάση τις μελέτες των Vitale *et al.*, 1994; O' Neil *et al.*, 1999 και την παρούσα μελέτη υποδηλώνει την παρουσία σημαντικών *cis* στοιχείων που συμμετέχουν στην μεταστροφή της αιμοσφαιρίνης.

Το τμήμα R ελέγχθηκε μαζί με πέντε συνεχόμενα και αλληλοκαλυπτόμενα τμήματα (F1-F5) από την 1.7 kb R περιοχή (Σχήμα 8). Τα αποτελέσματα μετά από διαμόλυνση σε κύτταρα MEL, έδειξαν ότι το τμήμα R και το τμήμα F5 651 bp, μειώνουν κατά πέντε φορές την δραστικότητα του πλασμιδίου αναφοράς β-CAT. Το τμήμα R βρέθηκε να μειώνει κατά έξι φορές την έκφραση του πλασμιδίου αναφοράς γCAT, ενώ κανένα από τα αλληλοκαλυπτόμενα τμήματα (F1-F5) δεν παρουσίασε αντίστοιχη κατασταλτική δράση (Vitale *et al.*, 1994). Το αντίστοιχο N τμήμα στην παρούσα μελέτη, παρουσίασε επίσης μειωμένη δραστικότητα RSV-CAT κατά 20% (Σχήμα 8). Τα ανωτέρω δεδομένα των δύο μελετών, καίτοι προέρχονται από τη χρήση φορέων έκφρασης που δεν είναι απόλυτα συγκρίσιμοι (δηλ. β-CAT έναντι RSV-CAT), εντούτοις είναι συμβατά με την ύπαρξη 5' του δ-γονιδίου σημαντικού *cis* ρυθμιστικών στοιχείων που συμμετέχουν στο φαινόμενο της μεταστροφής της αιμοσφαιρίνης. Οι αποσιωπητές O και P εκτός από την κατασταλτική τους δράση στο γονίδιο αναφοράς RSV-CAT, φαίνεται ότι συμμετέχουν και στη δημιουργία των φαινοτύπων της Αμερικανικής (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας και της Ιταλικής HPFH.

Η Αμερικανική (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμία παρουσιάζει επίπεδα HbF 25% με πανκυτταρική κατανομή στα ερυθροκύτταρα. Ο ακριβής φαινότυπος της Αμερικανικής (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας ήταν δύσκολο να χαρακτηριστεί δεδομένο ότι η ασθενής ήταν διπλός ετεροζυγώτης και για το γονίδιο της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας (β<sup>s</sup>) (Anagnou *et al.*, 1985) Έτσι δεν ήταν σαφές εάν ο φαινότυπος αυτής της μετάλλαξης ήταν τύπου δβ-θαλασσαιμίας ή HPFH. Αργότερα εντοπίστηκε μια άλλη πολύ συγκρίσιμη μετάλλαξη απουσία όμως του γονιδίου β<sup>s</sup>, με φαινότυπο δβ-θαλασσαιμίας και HbF 14.7% (Waye *et al.*, 1994). Η Ιταλική HPFH-5 είναι πολύ συγκρίσιμη μετάλλαξη με τις δύο αυτές (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίες με επίπεδα HbF 16-20% και έλλειμα 12.9 kb. Το έλλειμα της HPFH-5 αρχίζει 3.2 kb ανοδικά του δ-γονιδίου και τερματίζει μέσα στον ενισχυτή του 3' του β-γονιδίου (Camaschella *et al.*, 1990). Ο ενισχυτής του β-γονιδίου έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει την δράση ενός συνδεδεμένου υποκινητή σε πειράματα διαμόλυνσης (Antonίου *et al.*, 1988) καθώς και ότι λειτουργεί στο ενήλικο στάδιο του ποντικού σε κατασκευές που δεν περιλαμβάνουν την περιοχή LCR (Behringer *et al.*, 1987).

**Σχήμα 9.** Η μορφή της HPFH Kenya προκύπτει από έλλειμα 24 kb και η διαμετάθεση του ενισχυτή 3' του β-γονιδίου στην περιοχή των γ-γονιδίων, πιθανόν να οδηγεί στην αυξημένη τους έκφραση στην ενήλικη ζωή.

Ο ενισχυτής του β-γονιδίου ενδεχομένως να είναι υπεύθυνος και για την αποτελεσματική έκφραση των γ-γονιδίων στην HPFH Kenya (Nute *et al.*, 1976; Ojwang *et al.*, 1983). Η HPFH Kenya έχει προέλθει από ένα επιχιασμό μεταξύ των Αγ και β-γονιδίων (Σχήμα 9). Ο επιχιασμός έχει επισυμβεί στα εξόνια 2 των Αγ και β-γονιδίων μεταξύ των αμινοξέων 80 έως 87, και ως αποτέλεσμα αφαιρεί μία περιοχή περίπου 24 kb μεταξύ των Αγ και β-γονιδίων. Στην περίπτωση της HPFH Kenya, υπάρχει παράλληλη παραγωγή τόσο της Γγ όσο και των υβριδικών Αγ-β αλύσεων *cis* του ελλείματος στην ενήλικη ζωή. Οι ετεροζυγώτες παράγουν 7-15% Hb Kenya και 5-15% HbF με πανκυτταρική κατανομή. Ο ίδιος ενισχυτής του β-γονιδίου φαίνεται να είναι υπεύθυνος και για τον φαινότυπο της HPFH-5.

Με βάση τα ανωτέρω αποτελέσματα και δεδομένου ότι τα πιθανά άκρα της Αμερικανικής (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας δεν διαφέρουν πολύ από εκείνα της HPFH-5, απομονώθηκε με PCR το γεφυρικό τμήμα μήκος 1.5-kb της μετάλλαξης. Η ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του έδειξε ότι όντως οι δύο δβ-θαλασσαιμίες ήταν σχεδόν ταυτόσημες. Η ανάλυση των σημείων αποκοπής μεταξύ της Αμερικανικής (δβ)<sup>ο</sup> θαλασσαιμίας και της Ιταλικής HPFH-5, έδειξε ότι τα 5' άκρα τους διαφέρουν κατά 779 bp, ενώ τα 3' άκρα τους κατά 362 bp. Παρά τις ελάχιστες διαφορές τους, οι δύο μεταλλάξεις εμφανίζουν διάκριτους φαινοτύπους. Αμφότερα τα ελλείματα αφαιρούν τον αποσιωπητή P, ενώ ο αποσιωπητής O σχεδόν αφαιρείται στην HPFH-5 και διατηρείται κατά το πλείστον στη δβ-θαλασσαιμία. Μία άλλη συγκρίσιμη μετάλλαξη, είναι μια δβ-θαλασσαιμία με προέλευση από την Ανατολική Ευρώπη, η οποία έχει χαρακτηριστεί από το εργαστήριο μας (Palena *et al.*, 1994). Η μετάλλαξη αυτή παρουσιάζει αυξημένη HbF 13-18% με ετεροκυτταρική κατανομή και έλλειμα 9.5 kb. Το 5' άκρο της δβ-θαλασσαιμίας από την Ανατολική Ευρώπη είναι μικρότερο κατά 1.5 kb εν σχέσει με την HPFH-5. Είχε προταθεί ότι οι φαινοτυπικές διαφορές που παρατηρούνται ανάμεσα σε αυτές τις δύο μεταλλάξεις οφείλονται στην παρουσία αρνητικών στοιχείων (αποσιωπητής O) στο 5' άκρο της δβ-θαλασσαιμίας κάτι που επιβεβαιώθηκε από την ανωτέρω μελέτη.

Για να διερευνηθεί κατά πόσο τα δύο στοιχεία ενέχονται στη δημιουργία των δύο φαινοτύπων, τα δύο γεφυρικά τμήματα των δύο ελλειμάτων υποκλωνοποιήθηκαν μέσω PCR και υποκλωνοποιήθηκαν στο πλασμίδιο γ-CAT. Συγχρόνως υποκλωνοποιήθηκαν και μία σειρά αλληλοκαλυπτομένων τμημάτων από τις περιοχές των σημείων αποκοπής συμπεριλαμβανόμενων και διαφόρων περιοχών από τον ενισχυτή 3' του β-γονιδίου. Λειτουργική ανάλυση σε κύτταρα K562 και COS-7, έδειξε ότι το γεφυρικό τμήμα της HPFH-5, που περιλαμβάνει ένα μικρό τμήμα του κολοβωμένου αποσιωπητού O σε σύντηξη με ένα σχεδόν άθικτο τμήμα του ενισχυτού 3' του β-γονιδίου, αύξησε τη δραστικότητα CAT κατά 4-5 φορές. Αντίθετα, το συγκρίσιμο γεφυρικό τμήμα της δβ-θαλασσαιμίας, που περιέχει ένα άθικτο τμήμα του αποσιωπητού O σε σύντηξη με ένα άθικτο τμήμα του ενισχυτού 3' του β-γονιδίου, παρουσίασε δραστικότητα χαμηλότερη του πλασμιδίου αναφοράς γ-CAT. Ο ενισχυτής του β-γονιδίου παρουσίασε αυξημένη έκφραση κατά ένδεκα

φορές από το πλασμίδιο  $\gamma$ -CAT ενώ ελλείματα στον ενισχυτή και συνεπώς η αφαίρεση GATA-1 θέσεων οδηγεί σε μειωμένη έκφραση του (Kosteas *et al.*, 1996).

Προκειμένου να τεκμηριωθεί κατά πόσον η παρουσία του αποσιωπητού O ήταν η αιτία της χαμηλής δραστηριότητας στην δβ-θαλασσαιμία, δημιουργήθηκαν ελλείματα του αποσιωπητού O στο γεφυρικό τμήμα. Η προοδευτική αφαίρεση κυρίως της εσωτερικής αλληλουχίας, οδήγησε στην επανενεργοποίηση του  $\gamma$ -CAT γονιδίου κατά τέσσερις φορές. Τα ανωτέρω αποτελέσματα μιμούνται επαρκώς την *in vivo* κατάσταση όσον αφορά τα επίπεδα της έκφρασης των  $\gamma$ -γονιδίων στα δύο σύνδρομα και τεκμηριώνουν για πρώτη φορά την άποψη ότι η διατήρηση και παρουσία του O αποσιωπητού είναι υπεύθυνη για τις φαινοτυπικές διαφορές.

Οι δύο αποσιωπητές 5' του  $\delta$ -γονιδίου, πέραν του τεκμηριωμένου ρόλου τους στην δημιουργία των φαινοτύπων της HPFH και δβ-θαλασσαιμίας καθώς και της συμμετοχής τους στον γενικότερο φυσιολογικό μηχανισμό της καταστολής των  $\gamma$ -γονιδίων στην περιγεννητική περίοδο (Kosteas *et al.*, 1993; Kosteas *et al.*, 1994), φαίνεται ότι εμφανίζουν στοιχεία ρυθμιστικών αλληλουχιών με οντογενετική εξειδίκευση για τα  $\beta$  και  $\gamma$ -γονίδια.

**Σχήμα 10.** Τμήμα A. Η αφαίρεση του  $\beta$ -γονιδίου οδηγεί σε σημαντικά αυξημένα επίπεδα της HbF (1.8-14.4%) υποδηλώνοντας ότι υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ των  $\gamma$  και  $\beta$ -γονιδίων. Τμήμα B. Οι αποσιωπητές O και P φαίνεται ότι έχουν ένα διπλό ρόλο τόσο όσον αφορά την καταστολή των  $\gamma$ -γονιδίων όσο και ως προς την έκφραση των  $\beta$ -γονιδίων στο ενήλικο στάδιο.

Πράγματι, προσεκτική μελέτη και συσχέτιση των μοριακών και αιματολογικών δεδομένων δύο λίαν πληροφοριακών μεταλλάξεων ήτοι της Τουρκικής β-θαλασσαιμίας (Öner *et al.*, 1995) και της δβ-θαλασσαιμίας τύπου Corfu (Kulozik *et al.*, 1988) (Σχήμα 10) υποδηλώνουν ότι η ύπαρξη των αποσιωπητών O και P, είναι απαραίτητη τόσο για την καταστολή των γ-γονιδίων στην περιγεννητική περίοδο (στατιστικά σημαντική αύξηση της HbF στους ετεροζυγώτες σε σύγκριση με τους τυπικούς ετεροζυγώτες της κλασσικής β-θαλασσαιμίας), όσο και για τη διατήρηση των υψηλών επιπέδων της έκφρασης των β-γονιδίων στο ενήλικο στάδιο. Το τελευταίο προκύπτει από τα χαμηλά επίπεδα της έκφρασης του άθικτου β-γονιδίου στους ετεροζυγώτες της δβ-θαλασσαιμίας τύπου Corfu.

Τέλος, εκτεταμένες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε διαγονιδιακά ποντίκια όπου έχουν αφαιρεθεί διάφορα τμήματα μεταξύ των Αγ και δ-γονιδίων και κυρίως 5' του δ-γονιδίου με σκοπό να μιμηθούν τον φαινότυπο που προκαλείται από το έλλειμα της δβ-Corfu 7.2 kb, όπου παρατηρείται έκφραση του γ-γονιδίου στο ενήλικο στάδιο (Σχήμα 8).

Όπως προαναφέρθηκε, σε εξέλιξη βρίσκεται η ανάλυση μας σε διαγονιδιακά ποντίκια όπου έχουν αφαιρεθεί από το βYAC οι αποσιωπητές O και P με συνολικό έλλειμα 2.5 kb. Με βάση τα πρόσφατα δεδομένα από συγκρίσιμα ελλείματα και την παρουσία ενός αρνητικού (NRE) και ενός θετικού (PRE) στοιχείου στην περιοχή του υποκινητή του δ-γονιδίου (Ebb *et al.*, 1998) εξετάζουμε το ενδεχόμενο να αφαιρέσουμε και μία επιπλέον περιοχή από το βYAC. Για τον σκοπό αυτό κλωνοποιήθηκαν και στις δύο κατευθύνσεις (5→ 3 και 3→ 5) στο πιο ευαίσθητο φορέα (εν σχέση με τον RSV-CAT) pGL2-Gγ-λουσιφεράση-SV40 οι αποσιωπητές Ehh, F, O και P μαζί με τα τμήματα S, M, M1 και M2 (τμήματα του M) καθώς και τα τμήματα T (NRE) και U (PRE). Σε εξέλιξη βρίσκεται επίσης και η λειτουργική ανάλυση των τμημάτων αυτών τόσο σε κύτταρα K562 όσο και σε HeLa. Αναμένεται ότι η ανάλυση αυτή μαζί με τα δεδομένα από τις φυσικές μεταλλάξεις από τον άνθρωπο, θα βοηθήσει στο σχεδιασμό ενός νέου τμήματος που ενδεχομένως χρειαστεί να αφαιρέσουμε από το βYAC προκειμένου να αναπαραχθεί *in vivo* ο φαινότυπος της κληρονομικής παραμονής της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης.

## Τελικό συμπέρασμα

Συνοψίζοντας, η μελέτη πολλαπλών φυσικών μεταλλάξεων, του συμπλέγματος της β-σφαιρίνης, με διάκριτους φαινότυπους (HPFH και δβ θαλασσαιμία) είχε ως αποτέλεσμα την ανακάλυψη νέων *cis*-ρυθμιστικών αλληλουχιών. Τα στοιχεία αυτά φαίνεται ότι συμμετέχουν στην μεταστροφή της αιμοσφαιρίνης και είναι υπεύθυνα για την δημιουργία του φαινοτύπου. Ανιχνεύτηκαν δύο νέοι ενισχυτές 3' των ελλειμάτων της HPFH-3 (Anagnou *et al.*, 1995; Kosteas *et al.*, 1999) και HPFH-6 (Kosteas *et al.*, 1991; Kosteas *et al.*, 1997a), καθώς και τέσσερις αποσιωπητές, δύο 3' του Αγ-γονιδίου και δύο 5' του δ-γονιδίου (Kosteas *et al.*, 1993; Kosteas *et al.*, 1994; Kosteas *et al.*, 1996).

Τα νέα αυτά *cis*-στοιχεία φαίνεται ότι είναι συμβατά με το μοντέλο της δημιουργίας αγκύλης (looping) μέσα από την οποία η περιοχή LCR αλληλεπιδρά με τα επιμέρους γονίδια της σφαιρίνης κατά τα διάφορα στάδια της ανάπτυξης. Η αφαίρεση των δ και β-γονιδίων στις μεταλλάξεις HPFH-3 και HPFH-6 έχουν ως αποτέλεσμα την διαμετάθεση ενισχυτών δίπλα από τα γ-γονίδια (Σχήμα 11). Η παρουσία των ενισχυτών ενισχύει ή αυξάνει την πιθανότητα αλληλεπίδρασης της περιοχής LCR με τα γ-γονίδια στο ενήλικο στάδιο συμμετέχοντας με αυτό το τρόπο στη μεταστροφή της αιμοσφαιρίνης.

**Σχήμα 11:** Η διαμετάθεση ενισχυτών από το 3' άκρο του συμπλέγματος ενισχύει ή αυξάνει την αλληλεπίδραση της LCR με τα εμβρυϊκά γ-γονίδια.

Η αφαίρεση τόσο των αποσιωπητών που ανιχνεύτηκαν όσο και των ενήλικων γονιδίων αυξάνει την πιθανότητα αλληλεπίδρασης της LCR με τα γ-γονίδια λόγω απουσίας ανταγωνισμού από το β-γονίδιο. Ομως, σημαντικό ρόλο στην έκφραση των γονιδίων παίζει η δομή της χρωματίνης. Όπως προαναφέρθηκε ο παράγοντας EKLF συνδέεται ειδικά με το κουτί CACCC του β-γονιδίου ενώ ακολουθεί σύνδεση από τις πρωτεΐνες της οικογένειας SWI/SNF που τροποποιούν την δομή της χρωματίνης. Το τρέχον ενδιαφέρον σχετικά με την αναπτυξιακή ρύθμιση των γονιδίων της β-σφαιρίνης εστιάζετε στην δομή της χρωματίνης και προς την ανίχνευση νέων *cis*- ρυθμιστικών στοιχείων όπως μονωτές για την χρήση τους σε νέες κατασκευές ρετροϊών.

Τρέχουσες μελέτες της δικής μας ερευνητικής ομάδας βασίζονται στα ανωτέρω δεδομένα και αφορούν i) την περαιτέρω *in vivo* ανάλυση των ενισχυτών HPFH-3, HPFH-6 και HPFH-2 (McArthur and Anagnou 1998) σε διαγονιδιακά ποντίκια, όπου ελέγχεται η ικανότητα τους να τροποποιούν την αναπτυξιακή έκφραση του εμβρυϊκού Αγ-γονιδίου παρουσία και των δύο αποσιωπητών 3' του γονιδίου (Κατσαντώνη *et al.*, αδημοσίευτα αποτελέσματα) ii) Την ανεξάρτητη κλωνοποίηση των ενισχυτών αυτών σε κατασκευή ρετροϊού με τον οποίο έχει παρατηρηθεί επιτυχή μεταφορά του Αγ-γονιδίου σε κύτταρα MEL 585 (Emery *et al.*, 1999) καθώς και iii) η αδρανοποίηση μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού των δύο αποσιωπητών που βρίσκονται 5' του δ-γονιδίου, από β-YAC όπου θα πιστοποιηθεί ο *in vivo* ρόλος τους στην αρνητική ρύθμιση των γ-γονιδίων.

Οι ανωτέρω πειραματικές προσπελάσεις αναμένεται να οδηγήσουν στην απόκτηση νέων γνώσεων για την κατανόηση της ρύθμισης των γονιδίων της σφαιρίνης, αλλά και στην δυνατότητα ανάπτυξης νέων μεθόδων γονιδιακής θεραπείας που θα συμβάλουν στην θεραπεία σοβαρών κληρονομικών νόσων όπως είναι η β-θαλασσαιμία και η δρεπανοκυτταρική αναιμία.



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ V

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alami, R., Bender, M.A., Feng, Y.Q., Fiering S.N., Hug, B.A., Ley, T.J., Groudine, M. and Bouhassira, E.E. Deletions within the Mouse  $\beta$ -Globin Locus Control Region Preferentially Reduce  $\beta^{\text{min}}$  Globin Gene Expression. *Genomics* 63:417 2000.
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας. Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία του Κυττάρου. Σε μετάφραση από της Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης 2000.
- Alberts, B and Sternglanz, R. Chromatin contract to silence. *Nature*: 344,291, 1990.
- Albitar, M., Katsumata, M., and Liebhaber, S.A.: Human alpha-globin genes demonstrate autonomous developmental regulation in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* 11:3786, 1991.
- Allshire, R.C., Javerzat, J.P., Redhead, N.J. and Cranston, G.: Position effect variegation at fission yeast chromosomes. *Cell* 76:157, 1994.
- Anagnou, N.P., Papayannopoulou, T. Stamatoyannopoulos, G. and Nienhuis, A.W. Structurally diverse molecular deletions in the  $\beta$ -globin gene cluster exhibit an identical phenotype on interaction with the  $\beta^{\text{s}}$ -gene. *Blood* 65:1245, 1985a.
- Anagnou, N.P., Lim, E., Helder, J., Wieder, S., Marks, B., Wang, A., Colbert, D. and Deisseroth, A.B.: Regulatory factors specific for adult and embryonic globin genes may govern their expression in erythroleukemic cells. *Blood* 65:705. 1985b.
- Anagnou, N.P., Karlsson, S., Moulton A., Keller, G., Nienhuis, A.W. Promoter sequences required for function of the human fetal  $\gamma$ -globin gene in erythroid cells. *EMBO J* 5:121, 1986.
- Anagnou, N.P., Papayannopoulou, T., Nienhuis, A. and Stamatoyannopoulos, G. 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, 1988.
- Anagnou, N.P., Perez-Stable, C., Gelinas, R., Costantini, F., Liapaki, K., Constantopoulou, M., Kosteas, T., Moschonas, N.K., and Stamatoyannopoulos, G.: Sequences located 3' to the breakpoint of the hereditary persistence of fetal hemoglobin-3 deletion exhibit enhancer activity and can modify the developmental expression of the human  $\text{A}\gamma$  globin gene in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 270:10256, 1995.
- Andrews, N. C., Erdjument-Bromage, H., Davidson, M. B., Tempst, P., and Orkin, S. H.: Globin locus control region enhancer binding factor (NF-E2): An hematopoietic-specific basic-leucine zipper protein. *Nature* 362:722, 1993.
- Antoniou, M., deBoer, E., Habets, G., and Grosveld, F.: The human  $\beta$ -globin gene contains multiple regulatory regions: Identification of one promoter and two downstream enhancers. *EMBO J.* 7:377, 1988
- Antoniou, M., and Grosveld, F.:  $\beta$ -Globin dominant control region interacts differently with distal and proximal promoter elements. *Genes Dev.* 4:1007, 1990.
- Antoniou, M., De Boer, E., Spanopoulou, E., and Grosveld, F.: TBP binding and the rate of transcription initiation from the human  $\beta$ -globin gene. *Nucleic Acids Res.* 23:3473, 1995.
- Antoniou, M., Geraghty, F., Hurst, J., and Grosveld, F.: Efficient 3'-end formation of human beta-globin mRNA in vivo requires sequences within the last intron but occurs independently of the splicing reaction. *Nucleic Acids Res.* 26:721, 1998.
- Arcasoy, M.O., Romana, M., Fabry, M.E., Skarpidi, E., Nagel, R.L., and Forget, B.G.: High levels of human  $\gamma$ -globin gene expression in adult mice carrying a transgene of deletion-type hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Mol. Cell. Biol.* 17:2076, 1997.
- Armstrong, J.A., Bieker, J.J. and Emerson, B.M. A SWI/SNF-related chromatin remodeling complex, E-RC1, is required for tissue specific transcriptional regulation by EKLF in vitro. *Cell* 95:93, 1998.
- Asano, H. and Stamatoyannopoulos, G.: Activation of  $\beta$ -globin promoter by erythroid Krüppel-like factor. *Mol. Cell. Biol.* 18:102, 1998.
- Asano, H., Li, X.S., and Stamatoyannopoulos, G.: FKLf, a novel Krüppel-like factor that activates human embryonic and fetal  $\gamma$ -like globin genes. *Mol. Cell. Biol.* 19:3571, 1999.

- Asano, H., Li, X.S., Stamatoyannopoulos, G.: FKLFF-2: A novel Krüppel-like factor that activates globin and other erythroid lineage genes. Abstract Book of the Twelfth Conference on Hemoglobin Switching, Orcas Island, WA. June 2000.
- Bacolla, A., Ulrich, M.J., Larson, J.E., Ley, T.J., Wells, R.D. An intramolecular triplex in the human gamma-globin 5'-flanking region is altered by point mutations associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 270:24556, 1995.
- Bagga, R., Michalowski, S., Sabnis, R., Griffith, J.D. and Emerson, B.M. HMG I/Y regulates long-range enhancer-dependent transcription on DNA and chromatin by changes in DNA topology. *Nucleic Acids Res.* 28:2541, 2000.
- Ballas, S.K., Talacki, C.A., Adachi, K., Schwartz, E., Surrey, S., and Rappaport, E.: The Xmn I site (-158, C----T) 5' to the G $\gamma$  gene: correlation with the Senegalese haplotype and G $\gamma$  globin expression. *Hemoglobin* 15:393, 1991.
- Balta, G., Brickner, H.F., Takegawa, S., Kazazian, H.H., Papayannopoulou, T., Forget, B.G. and Atweh, G. Increased expression of G-gamma and A-gamma globin genes associated with a mutation in the A-gamma enhancer. *Blood* 83:3727, 1994.
- Barbour, V.M., Tufarelli, C., Sharpe, J.A., Smith, Z.E., Ayyub, H., Heinlein, C.A., Stanley, J.S., Indrak, K., Wood, W.G. and Higgs, D.R.  $\alpha$ -Thalassemia resulting from a negative chromosomal position effect. *Blood* 96:800, 2000.
- Baron, M.H. Transcriptional control of globin gene switching during vertebrate development. *Biochimica et Biophysica Acta* 1351:51, 1997.
- Bauchwitz, R. and Constantini, F. YAC transgenics: a study of conditions to protect YAC DNA from breakage and a protocol for transfection. *Biochimica et Biophysica Acta* 1401:21, 1988.
- Behringer, R., Hammer, R., Brinster, R.L. Palmiter, R. and Townes, T. Two 3' sequences direct adult erythroid specific expression of human  $\beta$ -globin genes in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7056, 1987.
- Behringer, R. R., Ryan, T. M., Palmiter, R. D., Brinster, R. L., and Townes, T. M.: Human  $\gamma$ - to  $\beta$ -globin gene switching in transgenic mice. *Genes Dev.* 4:380, 1990.
- Ben-Arie, N., Lancet, D., Taylor, C., Khen, M., Walker, N., Ledbetter, D.H., Carrozzo, R., Patal, K., Sheer, D., Lebrach, H. and North, M.A. Olfactory receptor gene cluster on human chromosome 17: Possible duplication of an ancestral receptor repertoire. *Hum Mol Genet* 3:229, 1994.
- Bender, M.A. Reik, A., Close, J., Telling, A., Epner, E., Fiering, S., Hardison, R. and Groudine, M. Description and Targeted Deletion of 5' Hypersensitive Site 5 and 6 of the Mouse  $\beta$ -Globin Locus Control Region. *Blood* 92:1, 1998.
- Bender, M.A., Bulger, M., Close, J. and Groudine, M.  $\beta$ -globin Gene Switching and Dnase I Sensitivity of the Endogenous  $\beta$ -globin Locus in Mice Do Not Require the Locus Control Region. *Mol Cell* 5:387, 2000.
- Berg, P.E., Williams, D.M. and Qian, R.L. A common protein binds to two silencers 5' to the human beta-globin gene. *Nucleic Acids Res.* 17:8833, 1989.
- Bernet, A., Sabatier, S., Picketts, D.J., Ouazana, R., Morlé, F., Higgs, D.R., and Godet, J.: Targeted inactivation of the major positive regulatory element (HS-40) of the human alpha-globin gene locus. *Blood* 86:1202, 1995.
- Berry, M., Grosveld, F. and Dillon, N.A.: A single point mutation is the cause of the Greek form of hereditary persistence of foetal haemoglobin. *Nature* 358:499, 1992.
- Bieker, J.J. EKLF regulation. Abstract Book of the Twelfth Conference on Hemoglobin Switching, Orcas Island, WA. June 2000.
- Blom van Assendelft, G., Hanscombe, O., Grosveld, F., and Greaves, D. R.: The  $\beta$ -globin dominant control region activates homologous and heterologous promoters in a tissue-specific manner. *Cell* 56:969, 1989.
- Bodine, D. M., and Ley, T. J.: An enhancer element lies 3' to the human  $\gamma$  globin gene. *EMBO J.* 6:2997, 1987.
- Bollekens, J.A. and Forget, B.G.,  $\delta\beta$  thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Hematol Onc Clin North Am* 5: 399, 1991.
- Bonifer, C., Yannoutsos, N., Kruger, G., Grosveld, F. and Sippel, A.E. Dissection of the locus control function located on the chicken lysozyme gene domain in transgenic mice. *Nucleic Acids Res* 22:4202, 1994.

- Boyer, S. H., Belding, T. K., Margolet, L., and Noyes, A. N.: Fetal hemoglobin restriction to a few erythrocytes (F cells) in normal human adults. *Science* 188:361, 1975.
- Brickner, H. E., Zhu, X. X., and Atweh, G. F.: A novel regulatory element of the human  $\alpha$ -globin gene responsible for its constitutive expression. *J. Biol. Chem.* 266:15363, 1991.
- Broyles, R.H. Use of somatic cell fusion to reprogram globin genes. *Sem in Cell Dev Biol* 10:259; 1999.
- Buck, L. and Axel, R. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis of odor recognition. *Cell* 65:175, 1991.
- Buettner, J.A., Glusman, G., Ben-Arie, N., Ramos, P., Lancet, D. and Evans, G.A. Organization and Evolution of Olfactory Receptor Genes of Human Chromosome 11. *Genomics* 53:56, 1998.
- Bulger, M., von Doorninck, J.H., Saitoh, N., Telling, A., Farrell, C., Bender, M.A., Felsenfeld, G., Axel, R., and Groudine, M.: Conservation of sequence and structure flanking the mouse and human  $\beta$ -globin loci: The  $\beta$ -globin genes are embedded within an array of odorant receptor genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5129, 1999a.
- Bulger, M. and Groudine, M. Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes & Dev* 13:2465, 1999b.
- Bulger, M., Bender, M.A., van Doorninck, H., Wertmann, B., Farrell, C.M. Felsenfeld, G., Groudine, M. and Hardison, R. Comparative structural and functional analysis of the olfactory receptor genes flanking the human and mouse  $\beta$ -globin gene clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:14560, 2000.
- Bungert, J., Davé, U., Lim, K.-C., Lieuw, K.H., Shavit, J.A., Liu, Q., and Engel, J.D.: Synergistic regulation of human beta-globin gene switching by locus control region elements HS3 and HS4. *Genes Dev.* 9:3083, 1995.
- Bungert, J., Tanimoto, K., Patel, S., Liu, Q., Fear, M. and Engel, J. Hypersensitive Site 2 Specifies a Unique Function within the Human  $\beta$ -Globin Locus Control Region To Stimulate Globin Gene Transcription. *Mol Cell Biol* 19:3062, 1999.
- Bushmeyer, S., Park, K. and Atchison, M. Characterization of Functional Domains within the Multifunctional Transcription factor, YY1. *J. Biol. Chem.* 270: 30213, 1995.
- Buettner, J.A., Glusman, G., Ben-Arie, N., Ramos, P., Lancet, D. and Evans, G.A. Organization and evolution of olfactory receptor genes on human chromosome 11. *Genomics* 53:56, 1998.
- Camaschella, C., Serra, A., Saglio, G., Baiget, M., Malgaretti, N., Montonani, R. and Ottolenghi, S. The 3' ends of the deletions of Spanish ( $\delta\beta$ )<sup>o</sup>-thalassemia and Black HPFH 1 and 2 lie within 17 kilobases. *Blood* 70:593. 1987.
- Cao, S. X., Gutman, P. D., Davie, H. P., and Schechter, A. N.: Identification of a transcriptional silencer in the 5'-flanking region of the human  $\epsilon$ -globin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5306, 1989.
- Cao, A., Galanello, R. and Rosatelli, M.C. Genotype-phenotype correlations in  $\beta$ -thalassemias. *Blood Reviews* 8:1-12, 1994.
- Caterina, J. J., Ryan, T. M., Pawlik, K. M., Palmiter, R. D., Brinster, R. L., Behringer, R. R., and Townes, T. M.: Human  $\beta$ -globin locus control region: Analysis of the 5' DNase I hypersensitive site HS 2 in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1626, 1991.
- Chada, K., Magran, J. and Constantini, F. An embryonic pattern of expression of a human fetal globin gene in transgenic mice. *Nature* 319:685, 1986.
- Chang, V., Wu, R. and Ho, Y. Recycling of Anion-Exchange Resins for Plasmid DNA Purification. *BioTechniques* 26:1056 June 1999.
- Chiang, Y. L., Ley, T. J., Sanders-Haigh, L., and Anderson, W. F.: Human globin gene expression in hybrid 2S MEL x human fibroblast cells. *Somatic Cell. Mol. Genet.* 10:399, 1984.
- Choi, O. R., and Engel, J. D.: Developmental regulation of  $\beta$ -globin gene switching. *Cell* 55:17, 1988.
- Chung, J.H., Whiteley, M. and Felsenfeld, G.: A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effects in *Drosophila*. *Cell* 74:505, 1993.

- Chung, J.H., Bell, A.C. and Felsenfeld, G.: Characterization of the chicken beta-globin insulator. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:575, 1997.
- Collins, F.C., Cole, J.L., Lockwood, W.K. and Ianuzzi, M.C. The deletion in both common types of hereditary persistence of fetal hemoglobin is approximately 105 kilobases. *Blood* 70:1797, 1987.
- Costantini, F., Radice, G., Magram, J., Stamatoyannopoulos, G., Papayannopoulou, Th., and Chada, K.: Developmental regulation of human globin genes in transgenic mice. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 50:361, 1985.
- Craddock, C.F., Vyas, P., Sharpe, J.A., Ayyub, H., Wood, W.G., and Higgs, D.R.: Contrasting effects of alpha and beta globin regulatory elements on chromatin structure may be related to their different chromosomal environments. *EMBO J.* 154:1718, 1995.
- Craig, J.E., Rochette, J., Fisher, C.A., Weatherall, D.J., Marc S., Lathrop, G.M., Demenais, F., and Thein, S.: Dissecting the loci controlling fetal haemoglobin production on chromosomes 11p and 6q by the regressive approach. *Nat. Genet.* 12:58, 1996.
- Crispino, J.D., Lodish, M.B., MacKay, J.P. and Orkin, S.H. Use of altered specificity mutants to probe a specific protein-protein interaction in differentiation: the GATA-1: FOG complex. *Mol Cell* 2:219, 1999.
- Crossley, M., Whitelaw, E., Perkins, A., Williams, G., Fujiwara, Y., and Orkin, S.H.: Isolation and characterization of the cDNA encoding BKLf/TEF-2, a major CACCC-box-binding protein in erythroid cells and selected other cells. *Mol. Cell. Biol.* 16:1695, 1996.
- Crowe, M.L., Perry, B.N. and Connerton, I.F. Olfactory receptor-encoding genes and pseudogenes are expressed in humans. *Gene* 169:247, 1996.
- Curtin, P., Pirastu, M., Kan, Y. W., Gobert-Jones, J.A., Stephens, A.D. and Lehmann, H.: A distant gene deletion affects  $\beta$ -globin gene function in an atypical  $\gamma\delta\beta$ -thalassemia. *J. Clin. Invest.* 76:1554, 1985.
- De Angioletti, M., Lacerra, G. and Carestia, C.: Breakpoint characterization of the Italian ( $A\gamma\delta\beta$ )<sup>o</sup> thalassemia showing 3' breakpoint clustering with those of Indian HPFH and Belgian ( $A\gamma\delta\beta$ )<sup>o</sup> thalassemia. Abstracts of the 6<sup>th</sup> International Conference on Thalassemia. Malta, p. 146, 1997.
- deBoer, E., Antoniou, M., Mignotte, V., Wall, L., and Grosveld, F.: The human  $\beta$ -globin promoter; nuclear protein factors and erythroid specific induction of transcription. *EMBO J.* 7:4203, 1988.
- Deconinck, A.E., Mead, P.E., Tevonsian, S.G., Crispino, S.D., Katz, S.G. and Zon, L. FOG acts as a repressor of red blood cell development in Xenopus. *Dev* 10:2031, 2000.**
- de Villiers, J., Olson, L., Banerji, J., and Schaffner, W.: Analysis of the transcriptional enhancer effect. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 47 Pt 2:911, 1983.
- Dickinson, L. A., Joh, T., Kohwi, Y., and Kohwi-Shigematsu, T.: A tissue-specific MAR/SAR DNA-binding protein with unusual binding site recognition. *Cell* 70:631, 1992.
- Di Cristofano, A., Strazzullo, M., Parisi, T. and La Mantia, G. Mobilization of an ERV9 human endogenous retroviral element during primate evolution. *Virology* 213:271, 1995.
- Dillon, N., and Grosveld, F.: Human  $\gamma$ -globin genes silenced independently of other genes in the  $\beta$ -globin locus. *Nature* 350:252, 1991.
- Dillon, N., Trimborn, T., Strouboulis, J., Fraser, P., and Grosveld, F.: The effect of distance on long-range chromatin interactions. *Mol. Cell* 1:131, 1997.
- Dimovski, A.J., Efremov, D.G., Jankovic, L., Plaseska, D., Juricic, D. and Efremov, G.D. A  $\beta^o$  -thalassaemia due to a 1605 bp deletion of the 5'  $\beta$ -globin gene region. *Brit J of Hematol* 85:143, 1993.
- Divoky, V., Indrak, K., Mrug, M., Brabec, V., Huisman, T.H.J. and Prchal, J.T.: A novel mechanism of  $\beta$  thalassemia: The insertion of L1 retrotransposable element into  $\beta$  globin IVS II. *Blood* 88:148a, 1996.
- Donze, D., Townes, T.M., and Bieker, J.J.: Role of erythroid Kruppel-like factor in human  $\gamma$ - to  $\beta$ -globin gene switching. *J. Biol. Chem.* 270:1955, 1995.
- Donze, D., Jeancake, P.H., and Townes, T.M.: Activation of  $\delta$ -globin gene expression by erythroid Kruppel-like factor: a potential approach for gene therapy of sickle cell disease. *Blood* 88:4051, 1996.

- Dover, G.J., Smith, K.D., Chang, Y.C., Purvis, S., Mays, A., Meyers, D.A., Sheils, C., Serjeant, G.: Fetal hemoglobin levels in sickle cell disease and normal individuals are partially controlled by an X-linked gene located at Xp22.2. *Blood* 80:816, 1992.
- Driscoll, M.C., Dobkin, C.S. and Alter, B.P.:  $\gamma\delta\beta$ -thalassemia due to a de novo mutation deleting the 5'  $\beta$ -globin gene activation-region hypersensitive sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7470, 1989.
- Dyer, M.A., Naidoo, R., Hayes, R.J., Larson, C.J., Verdine, G.L. and Baron, M.H. A DNA-binding protein interacts with an essential upstream regulatory element of the human embryonic beta-like globin gene. *Mol. Cell. Biol.* 16:829, 1996.
- Dyer, M.A., Hayes, R.J. and Baron, M.H. The HMG domain protein SSRP1/PREIIBF is involved in activation of the human embryonic  $\beta$ -like globin gene. *Mol. Cell. Biol.* 18:2617, 1998.
- Duan, Z.-J., Rohde, A., Han, H., Chien, S., Hu, Z., Stamatoyannopoulos, G. and Qiliang, L. Recruitment of NF-Y to the CCAAT box plays a critical role in *in vivo* regulation of  $\gamma$ -globin gene.
- Ebb, D., Tang, D.C., Drew, L., Chin, K., Berg, P.E. and Rogers, G. Identification of upstream regulatory elements that repress expression of adult beta-like globin genes in a primitive erythroid environment. *Blood Cells, Molecules, and Disease* 24:356, 1998.
- Edington, G.M. and Lehman, H. Expression of the sickle-cell gene in Africa. *Br Med J* 2:1328, 1955.
- Efstratiadis, A., Posakony, J.W., Maniatis, T., Lawn, R.M., O'Connell, C., Spritz, R.A., DeRiel, J.K., Forget, B.G., Weissman, S.M., Slightom, J.L., Blechi, A.E., Smithies, O., Baralle, F.E., Shoulders, C.C. and Proudfoot, N.J. The structure and evolution of the Human  $\beta$ -Globin Gene Family. *Cell* 21:653-668, 1980.
- Ellis, J., Tan-Un, K.C., Harper, A., Michalovich, D., Yannoutsos, N., Philipsen, S., Grosveld, F. A dominant chromatin-opening activity in 5' hypersensitive site 3 of the human beta-globin locus control region. *EMBO J.* 15:562, 1996.
- Ellis, J., Talbot, D., Dillon, N., and Grosveld, F.: Synthetic human beta-globin 5' HS2 constructs function as locus control regions only in multicopy transgene concatamers. *EMBO J.* 12:127, 1993.
- Emery, D.W., Morrish, F., Li, Q. and Stamatoyannopoulos, G. Analysis of  $\gamma$ -globin expression cassettes in retroviral vectors. *Hum Gene Ther* 10:877, 1999.
- Emery, D.W., Yannaki, E., Tubb, J. and Stamatoyannopoulos, G. A chromatin insulator protects retrovirus vectors from chromosomal position effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:9150, 2000.
- Engel, J.D. and Tanimoto, K. Looping, linking and chromatin activity: new insights into  $\beta$ -globin locus regulation. *Cell* 100:499, 2000.
- Enver, T., Zhang, J., Anagnou, N.P., Stamatoyannopoulos, G. and Papayannopoulou, T. Developmental programs of human erythroleukemia cells: Globin gene expression and methylation. *Mol. Cell. Biol.* 8:4917, 1988a.
- Enver, T., Zhang, J.-W., Papayannopoulou, Th., and Stamatoyannopoulos, G.: DNA methylation: A secondary event in globin gene switching? *Genes Dev.* 2:698, 1988b
- Enver, T., Ebens, A.J., Forrester, W.C., Stamatoyannopoulos, G.: The human  $\beta$ -globin locus activating region alters the developmental fate of a human fetal globin gene in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7033-7037, 1989.
- Enver, T., Raich, N., Ebens, A. J., Papayannopoulou, Th., Costantini, F., and Stamatoyannopoulos, G.: Developmental regulation of human fetal-to-adult globin gene switching in transgenic mice. *Nature* 344:309, 1990.
- Epner, E., Reik, A., Cimbara, D., Telling, A., Bender, M.A., Fiering, S, Enver, T., Martin, D.I., Kennedy, M., Keller, G., Groudine, M.: The  $\beta$ -globin LCR is not necessary for an open chromatin structure or developmentally regulated transcription of the native mouse beta-globin locus. *Mol. Cell* 2:447, 1998.
- Esnault, C., Maestre, J. and Heidmann, T. Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nature Genet* 24:363, 2000.
- Evans, T., Reitman, M., Felsenfeld G.: An erythrocyte-specific DNA-binding factor recognizes a regulatory sequence common to all chicken globin genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5976, 1988.
- Evans, T., and Felsenfeld, G.: Trans-activation of a globin promoter in nonerythroid cells. *Mol. Cell. Biol.* 11:843, 1991.

- Farrell, C.M., Grinberg, A., Huang, S.P., Chen, D., Pichel, J.G., Westphal, H. and Felsenfeld, G.: A large upstream region is not necessary for gene expression or hypersensitive site formation at the mouse  $\beta$ -globin locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:14554, 2000.
- Filipe, A., Li, Q., Deveaux, S., Godin, I., Romeo, P-H., Stamatoyannopoulos, G., and Mignotte, V.: Regulation of embryonic/fetal globin genes by nuclear hormone receptors: a novel perspective on hemoglobin switching. *EMBO J.* 18:687, 1999.
- Felsenfeld, G., Bell, A., Litt, M., Pikaart, M., Prioleau, M., Targa, F., Saitoh, N. and West, A. Establishment and maintenance of chromatin boundaries. Abstract Book of the Twelfth Conference on Hemoglobin Switching, Orcas Island, WA. June 2000.
- Feng, W.C., Southwood, C.M. and Bieker, J.J. Analysis of  $\beta$ -thalassemia mutant DNA interaction with erythroid Krüppel-like factor (EKLF), an erythroid cell-specific transcription factor. *J. Biol. Chem.* 269, 1493, 1993.
- Fessas, P. and Stamatoyannopoulos, G. Hereditary persistence of fetal hemoglobin in Greece. A study and a comparison. *Blood* 24:223, 1964.
- Festenstein, R., Tolalni, M., Corbella, P., Mamalaki, C., Parrington, J., Fox, M., Miliou, A., Jones, M. and Kioussis, D. : Locus control region function and heterochromatin-induced position effect variegation. *Science* 271:1123, 1996.
- Festenstein, R. and Kioussis, D. Locus control regions and epigenetic chromatin modifiers. *Curr Opin Genet Dev* 10:199, 2000.
- Feuchter, A.E., Freeman, J.D. and Mager, D. Strategy for detecting cellular transcripts promoted by human endogenous long terminal repeats: Identification of a novel gene (CDC4L) with homology to yeast CDC4. *Genomics* 13:1237, 1992.
- Fiering, S., Epner, E., Robinson, K., Zhuang, Y., Telling, A., Hu, M., Martin, D.I., Enver, T., Ley, T.J., and Groudine, M.: Targeted deletion of 5'HS2 of the murine beta-globin LCR reveals that it is not essential for proper regulation of the beta-globin locus. *Genes Dev.* 9:2203, 1995.
- Filipe, A., Li, Q., Deveaux, S., Godin, I., Romeo, P-H., Stamatoyannopoulos, G., and Mignotte, V.: Regulation of embryonic/fetal globin genes by nuclear hormone receptors: a novel perspective on hemoglobin switching. *EMBO J.* 18:687, 1999.
- Flint, J., Thomas, K., Micklem, G., Raynham, H., Clark, K., Doggett, N.A., King, A., and Higgs, D.R.: The relationship between chromosome structure and function at a human telomeric region. *Nat. Genet.* 15:252, 1997.
- Fodde, R., Losekoot, M., Casula, L. and Bernini, L.F. Nucleotide sequence of the Belgian  $\gamma^+$ ( $\text{A}\gamma\delta\beta$ ) $^0$ -thalassemia deletion breakpoint suggests a common mechanism for a number of such recombination events. *Genomics* 8:732, 1990.
- Fordis, M.C., Anagnou, N.P., Dean, A., Nienhuis, A.W. and Schechter, A.: A  $\beta$ -globin gene, inactive in the K562 leukemic cell, functions normally in a heterologous expression system. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:4485, 1984.
- Fordis, M.C., Nelson, N., Dean, A., Schechter, A., Anagnou, N.P., Nienhuis, A.W., McCormick, M., Padmanabhan, R. and Howard, B. Trans-acting factors are responsible for the lack of  $\beta$ -globin gene expression in K562 cells. *Prog Clin Biol Res* 191:281, 1985.
- Forrester, W. C., Thompson, C., Elder, J. T., and Groudine, M.: A developmentally stable chromatin structure in the human  $\beta$ -globin gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:1359, 1986.
- Forrester, W.C., Takegawa, S., Papayannopoulou, Th., Stamatoyannopoulos, G., Groudine, M.: Evidence for a locus activation region: The formation of developmentally stable hypersensitive sites in globin-expressing hybrids. *Nucleic Acids Res.* 24:10159, 1987.
- Forrester, W. C., Epner, E., Driscoll, M. C., Enver, T., Brice, M., Papayannopoulou, Th., and Groudine, M.: A deletion of the human  $\beta$ -globin locus activation region causes a major alteration in chromatin structure and replication across the entire  $\beta$ -globin locus. *Genes Dev.* 4:1637, 1990.
- Fraser, P., Pruzina, S., Antoniou, M. Grosveld, F.: Each hypersensitive site of the human  $\beta$ -globin locus control region confers a different developmental pattern of expression on the globin genes. *Genes Dev.* 7:106, 1993.
- Fraser, P., Grosveld, F.: Locus control regions, chromatin activation and transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10:361, 1998a.

- Fraser, P., Gribnau, J., Trimborn, T.: Mechanisms of developmental regulation of globin loci. *Curr. Opin. Hematol.* 5:139, 1998b.
- Fucharoen, S., Shimizu, K., and Fukumaki, Y.: 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, 1990.
- Gaensler, K.M., Kitamura, M., and Kan, Y.W.: Germ-line transmission and developmental regulation of a 150-kb yeast artificial chromosome containing the human  $\beta$ -globin locus in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 23:11381, 1993.
- Gigliani, B., Casini, C., Mantovani, R., Merli, S., Comi, P., Ottolenghi, S., Saglio, G., Camaschella, C., and Mazza, U.: A molecular study of a family with Greek hereditary persistence of fetal hemoglobin and  $\beta$ -thalassemia. *EMBO J* 3:2641, 1984.
- Gillemans, N., Tewari, R., Lindeboom, F., Rottier, R., de Wit, T., Wijgerde, M., Grosveld, F. and Philipsen, S. Altered DNA-binding specificity mutants of EKLF and Sp1 show that EKLF is an activator of the beta-globin locus control region in vivo. *Genes Dev.* 12:2863, 1998.
- Gilman, J.G., Huisman, T.H.J. and Abels, J. Dutch  $\beta^0$ -thalassemia: a 10 kilobase DNA deletion associated with significant  $\gamma$ -chain production. *Br J of Hematol* 56:339, 1984.
- Gilman, J.G. and Huisman, T.H.: DNA sequence variation associated with elevated fetal  $G\gamma$  globin production. *Blood* 66:783, 1985.
- Gilman, J.G. The 12.6 kilobase DNA deletion in Dutch  $\beta^0$ -thalassemia. *Br J of Hematol* 67:369, 1987.
- Gong, Q.-H., Stern, J., and Dean, A.: Transcriptional role of a conserved GATA-1 site in the human  $\epsilon$ -globin gene promoter. *Mol. Cell. Biol.* 11:2558, 1991.
- Gong, Q., and Dean, A.: Enhancer-dependent transcription of the  $\epsilon$ -globin promoter requires promoter-bound GATA-1 and enhancer-bound AP-1/NF-E2. *Mol. Cell. Biol.* 13:911, 1993.
- Gourdon, G., Sharpe, J.A., Wells, D., Wood, W.G., and Higgs, D.R.: Analysis of a 70 kb segment of DNA containing the human zeta and alpha-globin genes linked to their regulatory element (HS-40) in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.* 22:4139, 1994.
- Gorman, C.M., Moffat, L.F. and Howard, B.H. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 2:1044, 1982a.
- Gorman, C.M, Merlino, G.T., Willingham, M.C., Pastan, I. and Howard, B.H. The Rous Sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukaryotic cell by DNA-mediated transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:6777, 1982b.
- Graham, F.L. and van der Eb, A.J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52:456, 1973.
- Gribnau, J., de Boer, E., Trimborn, T., Wijgerde, M., Milot, E., Grosveld, F., and Fraser, P.: Chromatin interaction mechanism of transcriptional control in vivo. *EMBO J.* 17:6020, 1998.
- Gribnau, J., Diderich, K., Pruzina, S., Calzolari, R. and Fraser, P. Intergenic transcription and developmental remodeling of chromatin subdomains in the human  $\beta$ -globin locus. *Mol Cell* 5:377, 2000.
- Grosveld, F., van Assendelft, G.B., Greaves, D.R. and Kollias, G.: Position-independent, high-level expression of the human  $\beta$ -globin gene in transgenic mice. *Cell* 51:975, 1987.
- Grosveld, F., Dillon, N., and Higgs, D.: The regulation of human globin gene expression. *Baillieres Clin. Haematol.* 6:31, 1993.
- Grosveld, F. Activation by locus control regions? *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 9:152, 1999.
- Groudine, M. and Weintraub, H.: Propagation of globin DNase I-hypersensitive sites in absence of factors required for induction: a possible mechanism for determination. *Cell* 30:131, 1982.
- Gumucio, D. L., Rood, K. L., Gray, T. A., Riordan, M. F., Sartor, C. I., and Collins, F. S.: Nuclear proteins that bind the human  $\gamma$ -globin gene promoter: Alterations in binding produced by point mutations associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Mol. Cell. Biol.* 8:5310, 1988.



- Gumucio, D. L., Rook, K. L., Blanchard-McQuate, K. L., Gray, T. A., Saulino, A., and Collins, F. S.: Interaction of Sp1 with the human  $\gamma$  globin promoter: Binding and transactivation of normal and mutant promoters. *Blood* 78:1853, 1991.
- Gumucio, D.L., Heilstedt-Williamson, H., Gray, T.A., Tarlé, S.A., Shelton, D.A., Table, D.A., Slightom, J.L., Goodman, M., and Collins, F.S.: Phylogenetic footprinting reveals a nuclear protein which binds to silencer sequences in the human  $\gamma$  and  $\epsilon$  globin genes. *Mol. Cell. Biol.* 12:4919, 1992.
- Gumucio, D., Shelton, D.A., Bailey, W.J., Slightom, J.L. and Goodman, M. Phylogenetic footprinting reveals unexpected complexity in trans factor binding upstream from the  $\epsilon$ -globin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6018, 1993.
- Gutman, P.D., Cao, S.X., Dave, H.P.G., Mittelman, M. and Schechter, A. Binding of erythroid and non-erythroid nuclear proteins to the silencer of the human  $\epsilon$ -globin-encoding gene. *Gene* 110:197, 1992.
- Hanahan, D. and Meselson, M., Plasmid screening at high colony density. *Gene* 10: 63, 1980.
- Hanahan, Douglas, Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580, 1983.
- Hanscombe, O., Vidal, M., Kaeda, J., Luzzatto, L., Greaves, D.R., and Grosveld, F.: High-level, erythroid-specific expression of the human hemoglobin in murine erythrocytes. *Genes Dev.* 3:1572, 1989.
- Hanscombe, O., Whyatt, D., Fraser, P., Yannoutsos, N., Greaves, D., Dillon, N., and Grosveld, F.: Importance of globin gene order for correct developmental expression. *Genes Dev.* 5:1387, 1991.
- Hardison, R., Slightom, J.L., Gumucio, D.L., Goodman, M. Stojanovic, N. and Miller, W. Locus control regions of mammalian beta-globin gene clusters: Combining phylogenetic analyses and experimental results to gain functional insights. *Gene* 205:73, 1997.
- Harvey, M.P., Motum, P., Lindeman, R., and Trent, R.J.: An  $A\gamma$  globin promoter (four base-pair deletion) mutant shows linked polymorphic changes throughout the  $A\gamma$  gene. *Exp. Hematol.* 20:320, 1992.
- Hartzog, G. A., and Myers, R. M.: Discrimination among potential activators of the  $\beta$ -globin CACCC element by correlation of binding and transcriptional properties. *Mol. Cell. Biol.* 13:44, 1993.
- Hatton, C.S., Wilkie, A.O., Drysdale, H.C., Wood, W.G., Vickers, M.A., Sharpe, J., Ayyub, H., Pretorius, I.M., Buckle, V.J., and Higgs, D.R.:  $\alpha$ -thalassemia caused by a large (62 kb) deletion upstream of the human  $\alpha$  globin gene cluster. *Blood* 76:221, 1990.
- Henthorn, P., Mager, D., Huisman, T. and Smithies, O. A gene deletion ending within a complex array of repeated sequences 3' to the human  $\beta$ -globin gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5194, 1986.
- Henthorn, P., Smithies, O. and Mager, D.L. Molecular analysis of deletions in the human  $\beta$ -globin gene cluster: deletion junctions and locations of breakpoints. *Genomics* 6:226, 1990.
- Herendeen, D.R., Kassavetis, G.A., and Geiduschek, E.P.: A transcriptional enhancer whose function imposes a requirement that proteins track along DNA. *Science* 256:1298, 1992.
- Higgs, D.R., Vickers, M.A., Wilkie, A.O., Pretorius, I.M., Jarman, A.P., and Weatherall, D.J.: A review of the molecular genetics of the human  $\alpha$ -globin gene cluster. *Blood* 73:1081, 1989.
- Higgs, D.R., Wood, W.G., Jarman, A.P., Sharpe, J., Lida, J., Pretorius, I.-M., and Ayyub, H.: A major positive regulatory region located far upstream of the human  $\alpha$ -globin gene locus. *Genes Dev.* 4:1588, 1990.
- Higgs, D.R.  $\alpha$ -Thalassemia. In *Clinical Haematology: The Haemoglobinopathies*. Baillier's Clinical Haematology:6,117, 1993.
- Higgs, D.R., Sharpe, J.A., Gourdon, G., Craddock, C.F., Vyas, P., Picketts, D.J., Barbour, V., Ayyub, H., and Wood, W.G.: Expression of the human  $\alpha$ -globin cluster in transgenic mice. In Stamatoyannopoulos, G. (ed). *Hemoglobin Switching*, Intercept Ltd., pp. 165-178, 1995.
- Higgs, D.R., Sharpe, J.A., and Wood, W.G.: Understanding  $\alpha$  globin gene expression: a step towards effective gene therapy. *Sem. Hematol.* 35:93, 1998
- Higuchi, R. Recombinant PCR. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds) Academic Press, Inc. pp. 177-183, 1990.
- Huisman, T.H.J., The  $\delta\beta$ -thalassemia repository. *Hemoglobin* 16: 237-258. 1992.

- Huisman, T.H.J., Schroeder, W.A., Dozy, A.M., Shelton, J.R., Shelton, J. B., Boyd, E.M. and Apell, G. Evidence for multiple structural genes for the gamma-chain of human fetal hemoglobin in hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Ann N.Y. Acad Sci* 165:320, 1969.
- Huisman, T.H.J., Stamatoyannopoulos, G., Bouver, N., Shelton, J.R., Shelton, J.B. and Apell, G. Nature of fetal hemoglobin in the Greek type of hereditary persistence of fetal hemoglobin with and without concurrent  $\beta$ -thalassemia. *J Clin Invest* 49:1035, 1970.
- Humphries, R. K., Ley, T., Turner, P., Moulton, A. D., and Nienhuis, A. W.: Differences in human  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\delta$ -globin gene expression in monkey kidney cells. *Cell* 30:173, 1982.
- Hyde-DeRuyscher, R.P., Jennings, E. and Shenk, T. DNA binding sites for the transcriptional activator/repressor YY1. *Nucleic Acids Res.*, 23:4457, 1995.
- Ikuta, T., and Kan, Y. W.: In vivo protein-DNA interactions at the  $\beta$ -globin gene locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10188, 1991.
- Imam, A.M.A., Patrinos, G.P., de Krom, M., Bottardi, S., Janssens, R.J., Katsantoni, E., Wai, A.W.K. Sherratt, D.C. and Grosveld, F. Modification of human  $\beta$ -locus PAC clones by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nucl. Acids Res.* 28:e65 2000.
- Ioannou, P.A., Amemiya, C.T. Garnes, K.J., Kroisel, P.M., Shizuya, H., Chen, C., Batzer, B.A. and de Jong, P.J. A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nature Genet.*, 6, 84-89.
- Ito, E., Toki, T., Ishihara, H., Ohtani, H., Gu, L., Yokoyama, M., Engel, J.D. and Yamamoto, M. Erythroid transcription factor GATA-1 is abundantly transcribed in mouse testis. *Nature* 362:466, 1993.
- Jane, S. M., Ney, P. A., Vanin, E. F., Gumucio, D. L., and Nienhuis, A. W.: Identification of a stage selector element in the human  $\gamma$ -globin gene promoter that fosters preferential interaction with the 5' HS2 enhancer when in competition with the  $\beta$ -promoter. *EMBO J.* 11:2961, 1992.
- Jane, S. M., Gumucio, D. L., Ney, P. A., Cunningham, J. M., and Nienhuis, A. W.: Methylation enhanced binding of Sp1 to the stage selector element of the human  $\gamma$ -globin gene promoter may regulate developmental specificity of expression. *Mol. Cell. Biol.* 13:3272, 1993.
- Jarman, A.P. and Higgs, D.R. Nuclear scaffold attachment sites in the human globin gene complexes. *EMBO* 7:3337, 1988.
- Jarman, A. P., Wood, W. G., Sharpe, J. A., Gourdon, G., Ayyub, H., and Higgs, D. R.: Characterization of the major regulatory element upstream of the human  $\alpha$ -globin gene cluster. *Mol. Cell. Biol.* 11:4679, 1991.
- Johnson, K., Forsberg, C., Norton, J., Downs, K., Christensen, H. and Bresnick, E. Coactivator usage by the  $\beta$ -globin locus control region. Abstract Book of the Twelfth Conference on Hemoglobin Switching, Orcas Island, WA. June 2000.
- Jones, R. W., Old, J.M., Trent, R.J., Clegg, J.B. and Weatherall, D. J.: Restriction mapping of a new deletion responsible for  $G\gamma(\delta\beta)^0$  thalassemia. *Nucleic Acids Res* 9:6813, 1981.
- Kadam, S. and Emerson, B.M. Selective gene regulation by chromatin remodeling complexes in vitro. Abstract Book of the Twelfth Conference on Hemoglobin Switching, Orcas Island, WA. June 2000.
- Kamei, Y., Xu, L., Heinzel, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S.C., Heyman, R.A., Rose, D.W., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85:403, 1996.
- Kaplan, D.J., Jurka, J., Solus, J.F. and Duncan, C.H. Medium reiteration frequency repetitive sequences in the human genome. *Nucleic Acids Res* 19:4731, 1991.
- Karlson, S. and Nienhuis, A.W. Developmental regulation of human globin genes. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 1071-1108, 1985.
- Karpen, G.H. Position-effect variegation and the new biology of heterochromatin. *Curr Opin Genet Dev* 4:281, 1994.
- Katsantoni, E.Z., Strouboulis, J., a San, J.K., Wai, A.W.K., Drabek, D., de Wit, T., Grosveld, F. and Anagnou, N.P. Identification of the in vivo role of the HPFH-2, HPFH-3 and HPFH-6 enhancers in transgenic mice. Abstract at the 11<sup>th</sup> Balkan Hematology Meeting, Thessaloniki, Greece November 2000.

- Kaufman, R., Pham, C.T.N. and Ley, T.J. Transgenic Analysis of a 100-kb Human  $\beta$ -Globin Gene Cluster-Containing DNA Fragment Propagated as a Bacterial Artificial Chromosome. *Blood* 94:3178-3184 1999
- Kazazian, H.H. Jr. Mobile elements and disease. *Curr Opin Genet Dev* 8:343, 1998.
- Kelllum, R. and Schedl, P. A position-effect assay for boundaries of higher order chromosomal domains. *Cell* 64:941, 1991.
- Kelllum, R. and Schedl, P. A group of scs elements function as domain boundaries in an enhancer blocking assay. *Mol Cell Biol* 12:2424, 1992.
- Khadam, S., McAlpine, G.S., Phelan, M.L., Kingston, R.E., Jones, K.A. and Emerson, B.M. Functional selectivity of recombinant mammalian SWI/SNF subunits. *Genes and Dev* 14:2441, 2000.
- Kim, C. G., Swendeman, S. L., Barnhart, K. M., and Sheffery, M.: Promoter elements and erythroid cell nuclear factors that regulate  $\alpha$ -globin gene transcription in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 10:5958, 1990.
- Kioussis, D., Vanin, E., deLange, T., Flavell, R. A., and Grosveld, F. G.:  $\beta$ -Globin gene inactivation by DNA translocation in  $\gamma\delta\beta$ -thalassemia. *Nature* 306:662, 1983.
- Kioussis, D. and Festenstein, R.: Locus control regions: overcoming heterochromatin-induced gene inactivation in mammals. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7:614, 1997.
- Kollias, G., Wrighton, N., Hurst, J., and Grosveld, F.: Regulated expression of human A  $\gamma$ -,  $\beta$ -, and hybrid  $\gamma\beta$ -globin genes in transgenic mice: Manipulation of the developmental expression patterns. *Cell* 46:89, 1986.
- Kollias, G., Hurst, J., deBoer, E., Grosveld, F. The human beta-globin gene contains a downstream developmental specific enhancer. *Nucleic Acids Res.* 15:5739, 1987.
- Kosche, K.A., Dobkin, C., and Bank, A. DNA sequences regulating human beta globin gene expression. *Nucl. Acids Res* 13:7781, 1985.
- Kosteas, T., Constantopoulou, M., Moschonas, N. and Anagnou, N.P.: Identification of a new enhancer element 53 kb 3' of the  $\beta$ -globin gene. *Clin Res* 39:259, 1991.
- Kosteas, T., Manifava, M., Moschonas, N. and Anagnou, N.P. Functional analysis of the  $A\gamma$  to  $\psi\beta$  globin gene region of the human  $\beta$ -locus: evidence for negative regulatory elements. *Clin. Res.* 41:308, 1993.
- Kosteas, T., Manifava, M., Moschonas, N. and Anagnou, N.P. Functional analysis of the  $A\gamma$  to  $\delta$  globin gene region of the  $\beta$ -cluster: Evidence for multiple negative regulatory elements. *Blood* 84:506a 1994.
- Kosteas, T., Moschonas, N. and Anagnou, N.P. The molecular basis for the phenotypic differences between  $\delta\beta$ -thalassemia and HPFH: The role of two silencers upstream of the  $\delta$ -globin gene. *Blood* 88:150a, 1996.
- Kosteas, T., Pavlou, O., Palena, A., Moschonas, N. and Anagnou, N.P. 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* 88:150a, 1996.
- Kosteas, T., Palena, A. and Anagnou, N.P. Molecular cloning of the breakpoints of HPFH-6 deletion and sequence analysis of the novel juxtaposed region from the 3' end of the  $\beta$ -globin gene cluster. *Hum Genet* 100:441, 1997a.
- Kosteas, T., Palena, A., Papayannopoulou, T. and Anagnou, N.P. Structural and functional analysis of two developmental mutants with discrete phenotypes using chromosome mediated gene transfer. *Blood* 90:129a, 1997b.
- Kosteas, T., McArthur, M. and Anagnou, N.P.: The HPFH-4, HPFH-3 and the German ( $A\gamma\delta\beta$ ) $^{\circ}$  thalassemia share a common regulatory mechanism of globin gene expression. *Blood* 94:205a, 1999.
- Koutsourakis, M., Langeveld, A., Patient, R., Beddington, R. and Grosveled, F. The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. *Development* 126:723, 1999.
- Kulozik, A.E., Yarwood, N. and Jones, R.W. The Corfu ( $\delta\beta$ ) $^{\circ}$  Thalassemia: A Small Deletion Acts at a Distance to Selectively Abolish  $\beta$  Globin Gene Expression. *71:457*, 1988.
- Kulozik, A.E., Bail, S., Bellan-Koch, A., Bartram, C.R., Kohne, E., and Kleihauer, E.: The proximal element of the  $\beta$ -globin locus control region is not functionally required in vivo. *J. Clin. Invest.* 87:2142-2146, 1991.

- Kutlar, A., Gardiner, M.B., Headlee, M.G., Reese, A.L., Cleek, M.P., Nagle, S., Sukumaran, P.K. and Huisman, T.H.J. *Biochem Genet* 22:21, 1984.
- La Mantia, Maglione, D., Pengue, G., Di Cristofano, A., Simeone, A., Lanfranccone, L., and Lania, L. Identification and characterization of novel human endogenous retroviral sequences preferentially expressed in undifferentiated embryonal carcinoma cells. *Nucleic Acids Res* 19:1513, 1991.
- La Mantia, G., Majello, B., Di Cristofano, A., Strazzullo, M., Minchiotti, G. and Lania, L. Identification of regulatory elements within the minimal promoter region of the human endogenous ERV9 proviruses: accurate transcription initiation is controlled by an Inr-like element. *Nucleic Acid Res* 20:4129, 1992.
- Lanclos, K.D., Oner, C., Dimovski, A.J., Gu, Y.C., and Huisman, T.H.: Sequence variations in the 5' flanking and IVS-II regions of the  $G\gamma$ - and  $A\gamma$ -globin genes of  $\beta^S$  chromosomes with five different haplotypes. *Blood* 77:2488, 1991.
- Laverriere, A.C., MacNeil, C., Mueller, C., Poelmann, R.E., Burch, J.B. and Evans, T. GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J Biol Chem* 269:23177, 1994.
- Lee, J.S., Ngo, H., Kim, D. and Chung, J.H. Erythroid Kruppel-like factor is recruited to the CACCC box in the  $\beta$ -globin promoter but not to the CACCC box in the  $\gamma$ -promoter: The role of the neighboring promoter elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:2468, 2000.
- Leonard, M., Brice, M., Engel, J.D. and Papayannopoulou, T. Dynamics of GATA transcription factor expression during erythroid differentiation. *Blood* 82:1071, 1993.
- Lewin, B. *Genes IV*. Cell Press, Cambridge, Mass. 1990.
- Lewis, B.A. and Orkin, S.H.: A functional initiator element in the human  $\beta$ -globin promoter. *J. Biol. Chem.* 270:28139, 1995.
- Ley, T. J., Chiang, Y. L., Haidaris, D., Anagnou, N. P., Wilson, V. L., and Anderson, W. F.: DNA methylation and regulation of the human  $\beta$ -globin-like genes in mouse erythroleukemia cells containing human chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6618, 1984.
- Li, J., Noguchi, C.T., Miller, W., Hardison, R., and Schechter, A.N.: Multiple regulatory elements in the 5' flanking sequence of the human epsilon-globin gene. *J. Biol. Chem.* 273:10202, 1998
- Li, Q. and Stamatoyannopoulos, J.A.: Position independence and proper developmental control of  $\gamma$ -globin gene expression require both a 5' locus control region and a downstream sequence element. *Mol. Cell. Biol.* 14:6087, 1994a.
- Li, Q. and Stamatoyannopoulos, G. Hypersensitive site 5 of the human  $\beta$  locus control region functions as a chromatin insulator. *Blood* 84:1399, 1994b.
- Li, Q., Clegg, C., Peterson, K., Shaw, S., Raich, N. and Stamatoyannopoulos, G. Binary transgenic mouse model for studying the trans control of globin gene switching: evidence that GATA-1 is an in vivo repressor of human epsilon gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:2444, 1997.
- Li, Q., Blau, C.A., Clegg, C.H., Rohde, A., and Stamatoyannopoulos, G.: Multiple  $\epsilon$ -promoter elements participate in the developmental control of  $\epsilon$ -globin genes in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 273:17361, 1998.
- Li, Q., Zhang, M., Duan, Z. and Stamatoyannopoulos, G. Structural Analysis and Mapping of Dnase I Hypersensitivity of HS5 of the  $\beta$ -Globin Locus Control Region. *Genomics* 61:183, 1999.
- Li, Q., Rohde, A., Han, H., Chien, S., Zhang, M. and Stamatoyannopoulos, G. The human HS5 can protect a position-sensitive gene from position effects in transgenic mice. Abstract Book of the Twelfth Conference on Hemoglobin Switching, Orcas Island, WA. June 2000.
- Li, Q., Duan, Z.J., and Stamatoyannopoulos, G. Analysis of the mechanism of action of non-deletion hereditary persistence of fetal hemoglobin mutants in transgenic mice. *EMBO J* 20:157, 2001.
- Liberati, C., di Silvio, A., Ottolenghi, S. and Montavani, R. NF-Y binding to twin CCAAT boxes: Role of Q rich domains and histone fold helices. *J Mol Biol* 285:1441, 1999.
- Liebhaber, S. The role of mRNA stabilization in the expression and developmental control of the human  $\alpha$ -globin gene cluster. Abstract Book of the Twelfth Conference on Hemoglobin Switching, Orcas Island, WA. June 2000.

- Lim, L.C., Swendeman, S.L., and Sheffery, M.: Molecular cloning of the  $\alpha$ -globin transcription factor CP2. *Mol. Cell. Biol.* 12:828, 1992.
- Lim, L.C., Fang, L., Swendeman, S.L., Sheffery, M. Characterization of the molecularly cloned murine  $\alpha$ -globin transcription factor CP2. *J. Biol. Chem.* 268:18008, 1993.
- Lindenbaum, M.H. and Grosveld, F.: An in vitro globin gene switching model based on differentiated embryonic stem cells. *Genes Dev.* 4:2075, 1990.
- Ling, J., Wenhui, P., Zeng, S., Li, C., Keskinetepe, M., Whitney, B., Krantz, S. and Tuan, D. The solitary LTR of human endogenous retrovirus ERV-9 in the  $\beta$ -globin locus control region possesses enhancer and promoter activities and initiates synthesis of novel nuclear RNAs in embryonic and erythroid cells. Abstract Book of the Twelfth Conference on Hemoglobin Switching, Orcas Island, WA. June 2000.
- Liu, D., Chang, J. C., Moi, P., Liu, W., Kan, Y. W., and Curtin, P. T.: Dissection of the enhancer activity of  $\beta$ -globin 5' DNase I-hypersensitive site 2 in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3899, 1992.
- Liu, Q., Bungert, J. and Engel, J.D. Mutation of gene-proximal regulatory elements disrupts human epsilon-, gamma- and beta-globin expression in yeast artificial chromosome transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:169, 1997.
- Liu, Q., Tanimoto, K., Bunger, J., and Engel, J.D.: The  $A\gamma$ -globin 3' element provides no unique function(s) for human  $\beta$ -globin locus gene regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:9944, 1998.
- Lloyd, J., Krakowsky, J., Crable, S. and Lingrel, J.: Human  $\gamma$  to  $\beta$ -globin gene switching using a mini construct in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 12:1561, 1992.
- Long, Q., Bengra, C., Chunhua, L., Kutlar, F. and Tuan, D. A long terminal repeat of the human endogenous retrovirus ERV-9 is located in the 5' boundary area of the human  $\beta$ -globin locus control region. *Genomics* 54:542, 1998.
- Lower, R., Lower, J. and Kurth, R. The viruses in all of us: Characteristic and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5177, 1996.
- Lowrey, C. H., Bodine, D. M., and Nienhuis, A. W.: Mechanism of DNase I hypersensitive site formation within the human globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1143, 1992.
- Lozzio, C. and Lozzio, B. Human chronic myelogenous leukemia cell line with a positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45:321, 1975.
- Lu, J.R., McKinsey, T.A., Xu, H., Wang, D.Z., Richardson, J.A. and Olson, E.N. FOG-2, a heart- and brain- enriched cofactor for GATA transcription factors. *Mol Cell Biol* 19:4495, 1999.
- Mamalaki, A., Anagnou, N.P. and Moschonas, N. Developmental and inducible patterns of human theta 1-globin gene expression in embryonic/fetal and adult erythroid cells. *Am J Hematol* 35:251, 1990.
- Mager, D., Henthorn, P.S. and Smithies, O. A Chinese  $G\gamma^+(A\gamma\delta\beta)^0$  thalassemia deletion: comparison to other deletions in the human  $\beta$ -globin gene cluster and sequence analysis of the breakpoints. *Nucleic Acids Res* 13:6559, 1985.
- Magis, W. and Martin, D.I.: HMG-I binds to GATA motifs: implications for an HPFH syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214:927, 1995.
- Magram, J., Niederreither, K., and Constantini, F.:  $\beta$ -Globin enhancers target expression of a heterologous gene to erythroid tissues of transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* 9:4581, 1989.
- Mantovani, R., Malgaretti, N., Nicolis, S., Ronchi, A., Giglioni, B., and Ottolenghi, S.: The effects of HPFH mutations in the human  $\gamma$ -globin promoter on binding of ubiquitous and erythroid specific nuclear factors. *Nucleic Acids Res.* 16:7783, 1988.
- Mantovani, R., Superti-Furga, G., Gilman, J., and Ottolenghi, S.: 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. *Nucl. Acids Res.* 17:6681, 1989.
- Marin, M., Karis, A., Visser, P., Grosveld, F. and Philipsen, S. Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell* 89:619, 1997
- Martin, D.I.K., Tsai, S-F. and Orkin, S.: Increased  $\gamma$ -globin expression in a nondeletion HPFH mediated by an erythroid-specific DNA-binding factor. *Nature* 338:435, 1989.

- Martin, D. I. K., Zon, L. I., Mutter, G., and Orkin, S. H.: Expression of an erythroid transcription factor in megakaryocytic and mast cell lineages. *Nature* 344:444, 1990.
- Martin, D.I., Fiering, S., and Groudine, M.: Regulation of beta-globin gene expression: straightening out the locus. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6:488, 1996.
- McArthur, M. and Anagnou, N.P.: Molecular and functional characterisation of a novel transcriptional enhancer 3' to the breakpoint of the HPFH-2 deletion. *Blood* 92:333, 1998.
- McDonagh, K. T., Lin, H. J., Lowrey, C. H., Bodine, D. M., and Nienhuis, A. W.: The upstream region of the human  $\alpha$ -globin gene promoter. Identification and functional analysis of nuclear protein binding sites. *J. Biol. Chem.* 266:11965, 1991a.
- McDonagh, K. T., and Nienhuis, A. W.: Induction of the human  $\gamma$ -globin gene promoter in K562 cells by sodium butyrate: Reversal of repression by CCAAT displacement protein. *Blood* 78:255a, 1991b.
- McMorrow, T., van den Wijngaard, A., Wollenschlaeger, A., van de Corput, M., Monkhorst, K., Trimborn, T., Fraser, P., van Lohuizen, M., Jenuwein, T., Djabali, M., Philipsen, S., Grosveld, F. and Millot, E. Activation of the  $\beta$  globin locus by transcription factors and chromatin modifiers. *EMBO J* 19:4986, 2000.
- Melis, M., Demopoulos, G., Najfeld, V., Zhang, J., Brice, M., Papayannopoulou, Th., and Stamatoyannopoulos, G.: A chromosome 11-linked determinant controls fetal globin expression and the fetal to adult globin switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:8105, 1987.
- Merika, M. and Orkin, S.H.: Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and EKLF. *Mol. Cell. Biol.* 15:2437, 1995.
- Metzenberg, A.B., Wurzer, G., Huisman, T.H.J. and Smithies, O. Homology requirements for unequal crossing over in humans. *Genetics* 128:143, 1991.
- Mignotte, V., Eleouet, J. F., Raich, N., and Romeo, P. H.: Cis- and trans-acting elements involved in the regulation of the erythroid promoter of the human porphobilinogen deaminase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6548, 1989a.
- Mignotte, V., Wall, L., de Boer, E., Grosveld, F., and Romeo, P. H.: Two tissue-specific factors bind the erythroid promoter of the human porphobilinogen deaminase gene. *Nucleic Acids Res.* 17:37, 1989b.
- Miller, I.J. and Bieker, J.J.: A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Kruppel family of nuclear proteins. *Mol. Cell. Biol.* 13:2776, 1993.
- Milot, E., Fraser, P. and Grosveld, F. Position effects and genetic disease. *Trends Genet* 12:123, 1996a.
- Milot, E., Strouboulis, J., Trimborn, T., Wijgerde, M., de Boer, E., Langeveld, A., Tan-Un, K., Vergeer, W., Yannoutsos, N., Grosveld, F. and Fraser, P. Heterochromatin effects on the frequency and duration of LCR-mediated gene transcription. *Cell* 87:105, 1996b.
- Moi, P., and Kan, Y. W.: Synergistic enhancement of globin gene expression by activator protein-1-like proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:9000, 1990.
- Mombaerts, P. Odorant receptor genes in humans. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 9:315, 1999.
- Motum, P.I., Hamilton, T.J., Lindeman, R, Le, Huong, and Trent, R.J. Molecular characterisation of Vietnamese HPFH. *Human Mutation* 2:179, 1993.
- Motamed, K., Bastiani, C., Zhang, Q., Bailey, A., and Chen, C.K.: CACC box and enhancer response of the human embryonic epsilon globin promoter. *Gene* 123:235, 1993.
- Motohashi, H., Shavit, J.A., Igarashi, K., Yamamoto, M. and Engel, J.D. The world according to Maf. *Nucleic Acids Res.* 25:2953, 1997.
- Mouthon, M.-A., Bernard, O., Mitjavila, M.-T., Romeo, P.-H., Vainchenker, W., and Mathieu-Mahul, D.: Expression of tal-1 and GATA-binding proteins during human hematopoiesis. *Blood* 81:647, 1993.
- Motum, P.I., Lindeman, R., Harvey, M.P. and Trent, R.J. Comparative studies of nondeletional HPFH  $\gamma$ -globin gene promoters. *Exp Hematol* 21:852, 1993.
- Mullis, K. Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263, 1986.

- Myers, R. M., Cowie, A., Stuve, L., Hartzog, G., and Gaensler, K.: Genetic and biochemical analysis of the mouse  $\beta$ -major globin promoter. *Prog. Clin. Biol. Res.* 316A:117, 1989.
- Nakagomi, K., Kohwi, Y., Dickinson, L.A. and Kohwi-Shigematsu, T. A novel DNA-binding motif in the nuclear matrix attachment DNA-binding protein SATB1. *Mol Cell Biol* 14:1852, 1994.
- Navas, P.A., Peterson, K.R., Li, Q., Skarpidi, E., Rohde, A., Shaw, S.E., Clegg, C.H., Asano, H., Stamatoyannopoulos, G.: Developmental specificity of the interaction between the locus control region and embryonic or fetal globin genes in transgenic mice with an HS3 core deletion. *Mol. Cell Biol.* 18:4188, 1998.
- Navas, P.A., McArthur, M., Li, Q., Peterson, K.P., Rohde, J. and Stamatoyannopoulos, G. The HS4 core is not necessary for  $\epsilon$  and  $\gamma$  gene expression in embryonic cells, but is required for  $\beta$ -gene expression in definitive cells. Abstract Book of the Twelfth Conference on Hemoglobin Switching, Orcas Island, WA. June 2000.
- Neff, T., Shotkoski, F. and Stamatoyannopoulos, G. *Stem Cell Therapy, Position Effects and Chromatin Insulators.* *Stem Cells* 15:265, 1997.
- Ney, P. A., Sorrentino, B. P., McDonagh, K. T., and Nienhuis, A. W.: Tandem AP-1-binding sites within the human  $\beta$ -globin dominant control region function as an inducible enhancer in erythroid cells. *Genes Dev.* 4:993, 1990a.
- Ney, P. A., Sorrentino, B. P., Lowrey, C. H., and Nienhuis, A. W.: Inducibility of the HS II enhancer depends on binding of an erythroid specific nuclear protein. *Nucleic Acids Res.* 18:6011, 1990b.
- Ney, P.A., Andrews, N.C., Jane, S.M., Safer, B., Purucker, M.E., Weremowicz, S., Morton, C.C., Goff, S.C., Orkin, S.H., Nienhuis, A.W.: Purification of the human NF-E2 complex: cDNA cloning of the hematopoietic cell-specific subunit and evidence for an associated partner. *Mol. Cell Biol.* 13:5604, 1993.
- Nuez, B., Michalovich, D., Bygrave, A., Ploemacher, R. and Grosveld, F. Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLf gene. *Nature* 375:316, 1995.
- Nute, P.E., Wood, W.G., Stamatoyannopoulos, G., Olwey, C. and Fialkow, P.J.: The Kenya form of hereditary persistence of fetal hemoglobin: Structural studies and evidence for homogeneous distribution of haemoglobin F using fluorescent anti-haemoglobin F antibodies. *Br J Haematol* 32: 55, 1976.
- Ojwang, P.J., Nakatsuji, T., Gardiner, M.B., Reese, A.L., Gilman, J.G. and Huisman, T.H.J.: Gene deletion as the molecular basis for the Kenya- $\gamma$ -HPFH condition. *Hemoglobin* 7:115, 1983.
- Omichinski, J.G., Clore, G.M., Schaad, O., Felsenfeld, G., Trainor, C., Appella, E., Stahl, S.J., and Gronenborn, A.M.: NMR structure of a specific DNA complex of Zn-containing DNA binding domain of GATA-1. *Science* 261:438, 1993.
- O'Neill, D., Bornschlegel, K., Flamm, M., Castle, M., and Bank, A. A DNA-binding factor in adult hematopoietic cells interacts with a pyrimidine-rich domain upstream from the human  $\delta$ -globin gene. *Proc Natl Acad Sci* 88:8953, 1991.
- O'Neill, D., Yang, J., Erdjument-Bromage, H., Bornschlegel, K., Tempst, P. and Bank, A. Tissue-specific and developmental stage-specific DNA binding by a mammalian SWI/SNF complex associated with human fetal-to-adult globin gene switching. *Proc Natl Acad Sci* 96:349, 1999.
- O'Neill, D., Schoetz, S.S., Lopez, R.A., Castle, M., Rabinowitz, L., Shor, E., Krawchuk, D. Goll, M.G., Renz, M., Seelig, H-P., Han, S., Seong, R.H., Park, S.D., Agalioti, T., Munshi, N., Thanos, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Bank, A. An Ikaros containing chromatin-remodeling complex in adult-type erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci* 20:7572, 2000.
- Öner, C., Öner R., Gügrey, A. and Altay, C. A new Turkish type of  $\beta$ -thalassaemia major with homozygosity for two non consecutive 7.6 kb deletions of the  $\psi\beta$  and  $\beta$  genes and an intact  $\delta$  gene. *Brit J of Hematol* 89:306, 1995.
- Orford, M., Nefedov, M., Vadolas, J., Zaibak, F., Williamson, R. and Ioannou, P.A. Engineering EGFP reporter constructs into a 200 kb human  $\beta$ -globin BAC clone using GET Recombination. *Nucleic Acids Res.* 28: 2000.
- Orkin, S. H., Goff, S. C., and Nathan, D. G.: Heterogeneity of the DNA deletion in  $\gamma\delta\beta$ -thalassemia. *J. Clin. Invest.* 67:878, 1981.
- Orkin, S.H., Antonarakis, S.E. and Kazazian, H. H. Jr. Base substitution at positions -88 in a beta-thalassaemic globin gene. Further evidence for the role of distal promoter element ACACCC. *J Biol Chem* 259:8679, 1984.
- Orkin, S. H.: GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* 80:575, 1992.

- Ottolenghi, S., and Giglioni, B.: The deletion in a type of  $\delta\beta$  thalassemia begins in an inverted Alu I repeat. *Nature* 300:770, 1982.
- Ottolenghi, S., Sardinian  $A\gamma$ -HPFH: A T to C substitution in a conserved "octamer" sequence in the  $A\gamma$ -globin promoters. *Blood* 7:815, 1988.
- Oyake, T., Itoh, K., Motohashi, H. et al., Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site. *Mol Cell Biol* 16:6083, 1996.
- Pace, B.S., Li, Q., and Stamatoyannopoulos, G.: In vivo search for butyrate responsiveness sequences using transgenic mice carrying  $A\gamma$  gene promoter mutants. *Blood* 88:1079, 1996.
- Palena, A., Blau, A., Stamatoyannopoulos, G. and Anagnou, N.P. Eastern European ( $\delta\beta$ )<sup>o</sup>-thalassemia: Molecular characterization of a novel 9.1-kb deletion resulting in high levels of fetal hemoglobin in the adult. *Blood* 83:3738-3745, 1994.
- Pandolfi, P.P., Roth, M.E., Karis, A., Leonard, M.W., Dzierzak, E., Grosveld, F., Engel, J.D. and Lindenbaum, M.H. Targeted disruption of the GATA-3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nat. Genet.* 11:40, 1995.
- Papayannopoulou, Th., Lindsley, D., Kurachi, S., Lewison, K., Hemenway, T., Melis, M., Anagnou, N. P., and Najfeld, V.: Adult and fetal human globin genes are expressed following chromosomal transfer into MEL cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:780, 1985.
- Papayannopoulou, Th., Brice, M., and Stamatoyannopoulos, G.: Analysis of human globin switching in MEL x human fetal erythroid cell hybrids. *Cell* 46:469, 1986.
- Papayannopoulou, Th., Enver, T., Takegawa, S., Anagnou, N. P., and Stamatoyannopoulos, G.: Activation of developmentally mutated human globin genes by cell fusion. *Science* 242:1056, 1988.
- Park, K., and Atchison, M. L.: Isolation of a candidate repressor/activator, NF-E1 (YY-1, $\delta$ ), that binds to the immunoglobulin k3' enhancer and the immunoglobulin heavy-chain  $\mu$ E1 site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9804, 1991.
- Peri, K.G., Ganon, J., Gagnon, C., and Bard, H.: Association of -158 (C $\rightarrow$ T) (XmnI) DNA polymorphism in G gamma-globin promoter with delayed switchover from fetal to adult hemoglobin synthesis. *Pediatr. Res.* 41:214, 1997.
- Perkins, A.C., Sharpe, A.H. and Orkin, S.H. Lethal beta-thalassemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF. *Nature* 375:318, 1995.
- Perkins, A.C., Yang, H., Crossley, P.M., Fujiwara, Y and Orkin, S.H. Deficiency of the CACC-element binding protein, BKLf leads to a progressive myeloproliferative disease and impaired expression of SHP-1. *Blood* 90:575a, 1997.
- Persons, D. and Nienhuis, A.W. Gene therapy for the hemoglobin disorders: Past, present, and future. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:5022, 2000.
- Peters, B., Merezhinskaya, N., Diffley, J. F. X., and Noguchi, C. T.: Protein-DNA interactions in the  $\epsilon$ -globin gene silencer. *J. Biol. Chem.* 268:3430, 1993.
- Peterson, K.R., Zitnik, G., Huxley, C., Gnirke, A., Leppig, K.A., Papayannopoulou, Th., and Stamatoyannopoulos, G.: Use of yeast artificial chromosomes (YACs) for studying control of gene expression: Correct regulation of the genes of a human  $\beta$ -globin locus YAC following transfer to mouse erythroleukemia lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11207, 1993a.
- Peterson, K.R., Clegg, C.H., Huxley, C., Josephson, B.M., Haugen, H.S., Furukawa, T., Stamatoyannopoulos, G.: Transgenic mice containing a 248 kb human  $\beta$  locus yeast artificial chromosome display proper developmental control of human globin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:7593, 1993b.
- Peterson, K.R., Li, Q., Clegg, C.H., Furukawa, T., Navas, P.A., Norton, E.J., Kimbrough, T.G., and Stamatoyannopoulos, G.: Use of YACs in studies of development: Production of  $\beta$ -globin locus YAC mice carrying human globin developmental mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:5655, 1995.
- Peterson, K.R., Clegg, C.H., Navas, P.A., Norton, E.J., Kimbrough, T.G., and Stamatoyannopoulos, G.: Effect of deletion of 5'HS3 or 5'HS2 of the human  $\beta$ -globin locus yeast artificial chromosome transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:6605, 1996.



- Peterson, K.R., Clegg, C.H., Li, Q., and Stamatoyannopoulos, G.: Production of transgenic mice with yeast artificial chromosomes. *Trends in Genetics* 13:61, 1997.
- Peterson, K.R., Navas, P.A., Li, Q., and Stamatoyannopoulos, G.: LCR-dependent gene expression in  $\beta$ -globin YAC transgenics: detailed structural studies validate functional analysis even in the presence of fragmented YACs. *Hum. Mol. Genet.* 7:2079, 1998.
- Peterson, K. Role of gene-specific sequences and gene order in *cis* regulation of globin gene switching. Abstract Book of the Twelfth Conference on Hemoglobin Switching, Orcas Island, WA. June 2000.
- Pevny, L., Simon, M.C., Robertson, E., Klein, W.H., Tsai, S.F., d'Agati, V., Orkin, S.H. and Costantini, F. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 349:257, 1991.
- Pevny, L., Lin, C.S., d'Agati, V., Simon, M.C., Orkin, S.H. and Costantini, F. Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development* 121:163, 1995.
- Philipsen, S., Talbot, D., Fraser, P. and Grosveld, F. The beta-globin dominant control region: hypersensitive site 2. *EMBO J.* 9:2159, 1990.
- Philipsen, S., Pruzina, S., and Grosveld, F.: The minimal requirements for activity in transgenic mice of hypersensitive site 3 of the  $\beta$  globin locus control region. *EMBO J.* 12:1077, 1993.
- Pissard, S., M'rad, A., Beuzard, Y., and Romeo, P.H.: A new type of hereditary persistence of fetal haemoglobin (HPFH): HPFH Tunisia  $\beta^+$  (+C-200)<sup>G</sup> $\gamma$ . *Br. J. Haematol.* 95:67, 1996.
- Pomerantz, O., Goodwin, A.J., Joyce, T. and Lowrey, C.H. Conserved elements containing NF-E2 and tandem GATA binding sites are required for erythroid-specific chromatin structure reorganization within the human  $\beta$ -locus control region. *Nucleic Acids Res.*, 26:5684, 1998.
- Ponce, E., Lloyd, J. A., Pierani, A., Roeder, R. G., and Lingrel, J. B.: Transcription factor OTF-1 interacts with two distinct DNA elements in the  $A\gamma$ -globin gene promoter. *Biochemistry* 30:2961, 1991.
- Poncz, M., Schwartz, E., Ballantine, M., Surrey, S. Nucleotide Sequence Analysis of the  $\delta\beta$ -Globin Gene Region in Humans. *J. Biol. Chem.* 258:11599, 1983.
- Poncz, M.P., Henthorn, P., Stoeckert, C.J. Jr and Surrey, S. Globin gene expression in hereditary persistence of fetal hemoglobin and  $\delta\beta$  thalassemia. In M. Lean (ed), *Oxford Surveys on Eucaryotic Genes*. Oxford University Press, Oxford, UK. pp. 163-203, 1989.
- Pondel, M.D., Proudfoot, N.J., Whitelaw, C., and Whitelaw, E.: The developmental regulation of the human zeta-globin gene in transgenic mice employing beta-galactosidase as a reporter gene. *Nucleic Acids Res.* 20:5955, 1992a.
- Pondel, M.D., George, M., and Proudfoot, N.J.: The LCR-like alpha-globin positive regulatory element functions as an enhancer in transiently transfected cells during erythroid differentiation. *Nucleic Acids Res.* 20:237, 1992b.
- Porcu, S., Kitamura, M., Witkowska, E., Zhang, Z., Utero, A., Lin, C., Chang, J., and Gaensler, K.M: The human beta globin locus introduced by YAC transfer exhibits a specific and reproducible pattern of developmental regulation in transgenic mice. *Blood* 90:4602, 1997.
- Proudfoot, N., Plant, K. and Routledge, S. LCR and intergenic transcripts in the human  $\beta$ -globin gene cluster. . Abstract Book of the Twelfth Conference on Hemoglobin Switching, Orcas Island, WA. June 2000.
- Protocols and Application Guide, 3<sup>rd</sup> Edition Promega Corporation cat. #P1610, 1996.
- Pruzina, S., Hanscombe, O., Whyatt, D., Grosveld, F., and Philipsen, S.: Hypersensitive site 4 of the human  $\beta$  globin locus control region. *Nucleic Acids Res.* 19:1413, 1991.
- Prucker, M., Bodine, D., Lin, H., McDonagh, K., and Nienhuis, A. W.: Structure and function of the enhancer 3' to the human  $A\gamma$  globin gene. *Nucleic Acids Res.* 18:7407, 1990.
- Pyati, J., Kucherlapati, R. S., and Skoultschi, A. I.: Activation of human  $\beta$ -globin genes from nonerythroid cells by fusion with murine erythroleukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3435, 1980.
- Raich, N., Enver, T., Nakamoto, B., Josephson, B., Papayannopoulou, Th., and Stamatoyannopoulos, G.: Autonomous developmental control of human embryonic globin gene switching in transgenic mice. *Science* 250:1147, 1990.

- Raich, N., Papayannopoulou, T., Stamatoyannopoulos, G., and Enver, T.: Demonstration of a human  $\epsilon$ -globin gene silencer with studies in transgenic mice. *Blood* 79:861, 1992.
- Raich, N., Clegg, C.H., Grofti, J., Romeo, P.H. and Stamatoyannopoulos, G. GATA1 and YY1 are developmental repressors of the human epsilon-globin gene. *EMBO J.* 14:801, 1995.
- Rapley, R. and Walker, M. PCR screening of DNA cloned into polylinker-containing vectors with M13 sequencing primers. *BioTechniques* 12:516, 1992.
- Ramchandran, R., Bengra, C., Whitney, B., Lancelos, K. and Tuan, D. A (GATA) (7) motif located in the 5' boundary area of the human beta-globin locus control region exhibits silencer activity in erythroid cells. *Am J Hematol* 65:14, 2000.
- Reddy, P. M., and Shen, C. K.: Protein-DNA interactions in vivo of an erythroid-specific, human  $\beta$ -globin locus enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8676, 1991.
- Reddy, P.M.S., Stamatoyannopoulos, G., Papayannopoulou, Th., and Shen, C.-K.J.: Genomic footprinting and sequencing of human  $\beta$ -globin locus: Tissue specificity and cell line artifact. *J. Biol. Chem.* 269:8287, 1994.
- Reik, A., Telling, A., Zitnik, G., Cimborra, D., Epner, E., Groudine, M. The locus control region is necessary for gene expression in the human beta-globin locus but not the maintenance of an open chromatin structure in erythroid cells. *Mol. Cell Biol.* 18:5992, 1998.
- Ren, S., Lou, X.-N., and Atweh, G.F.: The major regulatory element upstream of the alpha-globin gene has classical and inducible enhancer activity. *Blood* 81:1058, 1993.
- Riemer, C., ElSherbini, A., Stojanovic, N., Schwartz, S., Kwitkin, P.B., Miller, W. and Hardison, R. A Database of Experimental Results on Globin Gene Expression. *Genomics* 55:325, 1998.
- Rochette, J., Craig, J.E. and Thein, S.L. Fetal Hemoglobin Levels in Adults. *Blood Reviews* 8: 213, 1994.
- Rombel, I., Yu, K.-H., Zhang, Q., Papayannopoulou, Th., Stamatoyannopoulos, G., Shen, C-K.J.: Transcriptional activation of human adult  $\alpha$ -globin genes by hypersensitive site-40 enhancer: Function of nuclear factor-binding motifs occupied in erythroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:6454, 1995.
- Romeo, P.-H., Prandini, M.-H., Joulin, V., Mignotte, V., Prenant, M., Vainchenker, W., Marguerie, G., and Uzan, G.: Megakaryocytic and erythrocytic lineages share specific transcription factors. *Nature* 344:447, 1990.
- Romeo, L., Osorio-Almeida, L., Higgs, D.R., Lavinha, J., and Liebhaber, S.A.:  $\alpha$ -thalassemia resulting from deletion of regulatory sequences far upstream of the  $\alpha$ -globin structural genes. *Blood* 78:1589, 1991.
- Ronchi, A., Nicholis, S., Santoro, C., and Ottolenghi, S.: Increased Sp1 binding mediates erythroid-specific overexpression of a mutated (HPFH)  $\gamma$ -globin promoter. *Nucleic Acids Res.* 17:10231, 1989.
- Ronchi, A.E., Bottardi, S., Mazzucchelli, C., Ottolenghi, S. and Santoro, C. Differential binding of the NFE3 and CP1/NFY transcription factors to the human gamma- and epsilon-globin CCAAT boxes. *J. Biol. Chem.* 270:21934, 1995.
- Ronchi, A., Berry, M., Raguz, S., Imam, A., Yannoutsos, N., Ottolenghi, S., Grosveld, F., and Dillon, N.: Role of the duplicated CCAAT box region in  $\gamma$ -globin gene regulation and hereditary persistence of fetal haemoglobin. *EMBO J.* 15:143, 1996.
- Ronchi, A.E., Liberati, C., Cera, M.R., Mantovani, R. and Ottolenghi, S. The role of the transcription factor NF-Y in globin gene regulation and in the adult expression of fetal hemoglobin in hereditary persistence of fetal hemoglobin. Abstract Book of the Twelfth Conference on Hemoglobin Switching, Orcas Island, WA. June 2000.
- Roseman, R.R., Pirrotta, V. and Geyer, P.K. The su(Hw) protein insulates expression of the *Drosophila melanogaster* white gene from position effects. *EMBO J* 12:435, 1993.
- Ross, J. and Pizarro, A. Human beta and delta globin messenger RNAs turn over at different rates. *J Mol Biol* 167:607, 1983.
- Rottier, R., Gillemans, N., Grosveld, F. and Philipsen, S. The role of GATA-2 during hematopoietic development. Abstract Book of the Twelfth Conference on Hemoglobin Switching, Orcas Island, WA. June 2000.
- Rubin, J.E., Pasceri, P., Wu, X., Leboulch, P. and Ellis, J. Locus control region activity by 5'HS3 requires a functional interaction with  $\beta$ -globin gene regulatory elements: expression of novel  $\beta/\gamma$ -globin hybrid. *Blood* 95:3242, 2000.

- Rutherford, T., Clegg, J.B., Higgs, D.R., Jones, R.W., Thompson, J. and Weatherall, D.J. Embryonic erythroid differentiation in the human cell line K562. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:348, 1981
- Ryan, T.M., Behringer, R.R., Townes, T.M., Palmiter, R.D., and Brinster, R.L.: High-level erythroid expression of human alpha-globin genes in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:37, 1989.
- Ryan, T.M., Sun, C.-W., Ren, J. and Townes, T.M. Human  $\gamma$ -globin gene promoter element regulates human  $\beta$ -globin gene development specificity. *Nucleic Acids Res* 28:2736, 2000.
- Sabath, D.E., Spangler, E.A., Rubin, E.M. and Stamatoyannopoulos, G. Analysis of the human zeta-globin gene promoter in transgenic mice. *Blood* 82:2899, 1993.
- Sabath, D.E., Koehler, K.M., Yang, W.Q., Patton, K., and Stamatoyannopoulos, G.: Identification of a major positive regulatory element located 5' to the human  $\zeta$ -globin gene. *Blood* 85:2587, 1995.
- Sabath, D.E., Koehler, K.M., and Yang, W.Q.: Structure and function of the  $\zeta$ -globin upstream regulatory element. *Nucleic Acids Res.* 24:4978, 1996.
- Saglio, G., Camaschella, C., Serra, A., Mazza, U., Izzo, P., Terragni, F., Giglioni, B., Comi, P. and Ottolenghi, S. Italian Type of Deletional Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin. *Blood* 68:646, 1986.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2<sup>nd</sup> edition 1989.
- Sampietro, M., Thein, S.L., Contreras, M., and Pazmany, L.: Variation of HbF and F-cell number with the  $\text{G}\gamma$  Xmn I (C-T) polymorphism in normal individuals. *Blood* 79:832, 1992.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:5463, 1977.
- Saitoh, N., Bell, A.C., Targa, F.R., West, A.G., Simpson, M., Pikaart, M. and Felsenfeld, G. Structural and functional conservation at the boundaries of the chicken  $\beta$ -globin domain. *EMBO J* 19:2315, 2000.
- Schizuya, H., Birren, B., Kim, U.J., Mancino, V. and Slepak, T. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89, 8794, 1992.
- Schroeder, W. A., Huisman, T. H. J., Shelton, J. R., Shelton, J. B., Kleihauer, E. F., Dozy, A. M., and Robberson, B.: Evidence for multiple structural genes for the  $\gamma$  chain of human fetal hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 60:537, 1968.
- Schübeler, D., Francastel, C., Cimborá, D.M., Reik, A., Martin D.I.K. and Groudine, M. Nuclear localization and histone acetylation: a pathway for chromatin opening and transcriptional activation of the human  $\beta$ -globin locus. *Genes Dev.* 14:940, 2000.
- Serghini, M. A., Ritzenthaler, C., and Pinck, L. A rapid and efficient 'miniprep' for isolation of plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 17:3604, 1989.
- Shafit-Zagardo, B., Brown, F.L., Maio, J.J. and Adams, J.M. Kpn I families of long, interspersed repetitive DNAs associated with the human  $\beta$ -globin gene cluster. *Gene* 20:397, 1982.
- Sharpe, J. A., Chan-Thomas, P. S., Lida, J., Ayyub, H., Wood, W. G., and Higgs, D. R.: Analysis of the human  $\alpha$  globin upstream regulatory element (HS-40) in transgenic mice. *EMBO J.* 11:4565, 1992.
- Sharpe, J.A., Wells, D.J., Whitelaw, E., Vyas, P., Higgs, D.R., and Wood, W.G.: Analysis of the human  $\alpha$ -globin gene cluster in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11262, 1993.
- Shewchuk, B.M. and Hardison, R.C. CpG islands from the alpha-globin gene cluster increase gene expression in an integration-dependent manner. *Mol Cell Biol* 17:5856, 1997.
- Shi, Y., Seto, E., Chang, L.-S., and Shenk, T.: Transcriptional repression by YY1, a human GLI-kruppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. *Cell* 67:377, 1991.
- Shih, D.M., Wall, R. J., and Shapiro, S. G.: Developmentally regulated and erythroid-specific expression of the human embryonic  $\beta$ -globin gene in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.* 18:5465, 1990.
- Shih, D.M., Wall, R.J., and Shapiro, S.G.: A 5' control region of the human  $\epsilon$ -globin gene is sufficient for embryonic specificity in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 268:3066, 1993.

- Shimizu, R., Takahashi, S., Engel, J.D. and Yamamoto, M. GATA transgenes under GATA-1 locus control rescue germ line GATA-1 mutant deficiencies. Abstract Book of the Twelfth Conference on Hemoglobin Switching, Orcas Island, WA. June 2000.
- Shiokawa, S., Yamada, H., Takihara, Y., Matsunaga, E., Ohba, Y., Yamamoto, K., and Fukumaki, Y.: Molecular analysis of Japanese  $\delta\beta$ -thalassemia. *Blood* 72:1771, 1988.
- Shrivastava, A. and Calame, K., An analysis of genes regulated by the multi-functional transcriptional regulator Yin Yang-1. *Nucl. Acids Res.* 22:5151, 1994.
- Sieweke, M.H. and Graf, T. A transcription factor party during blood cell differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 8:545, 1998.
- Skalnik, D. G., Strauss, E. C., and Orkin, S. H.: CCAAT displacement protein as a repressor of the myelomonocytic-specific gp91-phox gene promoter. *J. Biol. Chem.* 266:16736, 1991.
- Skoufos, E., Healy, M.D., Singer, M.S., Nadkarni, P.M., Miller, P.L. and Shepherd, G.M. Olfactory Receptor Database: a database of the largest eukaryotic gene family. *Nucleic Acids Res* 27:343, 1999.
- Smit, A.F.A. Identification of a new, abundant superfamily of mammalian LTR-transposons. *Nucleic Acids Res* 21:1863, 1993.
- Smit, A.F.A. The origin of interspersed repeats in the human genome. *Curr Opin Genet Dev* 6: 743, 1996a.
- Smit, A.F.A. and Riggs, A. Tiggers and other DNA transposon fossils in the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1443, 1996b.
- Smit, A.F.A. Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. *Curr Opin Genet Dev* 9: 657, 1999.
- Soultanas, P., Kosteas, T. and Anagnou, N.P. YY1 binds to multiple sites of a silencer element located 1.6 kb 3' to the fetal  $A\gamma$ -globin gene. *Blood* 88:147a, 1996.
- Staines, D.M. and Thomas, J.O. A sequence with homology to human HPFH-linked enhancer elements and to a family of G-protein linked membrane receptor genes is located downstream of the chicken  $\beta$ -globin locus. *Gene* 234:345, 1999.
- Stamatoyannopoulos, G.: Human hemoglobin switching. *Science* 252:383, 1991.
- Stamatoyannopoulos, G., Josephson, B., Zhang, J-W., Li, Qiliang: Developmental regulation of human  $\gamma$ -globin genes in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* 13:7636-7644, 1993.
- Stamatoyannopoulos, G. and Nienhuis A.W. Hemoglobin switching, In: *Molecular Basis of Blood Diseases*, Stamatoyannopoulos, G. et al. (eds), W.B. Saunders, Philadelphia, Pa. pp. 107-155, 1994.
- Stamatoyannopoulos, J.A., Goodwin, A.J., Joyce, T.M., and Lowrey, C.H.: Characterization of a DNase I hypersensitive-site forming element from the human  $\beta$ -globin locus control region. In Stamatoyannopoulos, G. (ed). *Molecular Biology of Hemoglobin Switching*. Andover, Intercept Ltd. Pp 71-86, 1995a.
- Stamatoyannopoulos, J.A., Goodwin, A., Joyce, T., and Lowrey, C.H.: NF-E2 and GATA binding motifs are required for the formation of Dnase I hypersensitive site 4 of the human beta-globin locus control region. *EMBO J.* 14:106, 1995b.
- Stamatoyannopoulos, G. and Grosveld, F. Hemoglobin switching. In Stamatoyannopoulos, G., Majerus, P., Perlmutter, R. and Varmus, H. (eds), *The Molecular Basis of Blood Disease*. W.B. Saunders, Philadelphia, PA, pp. 135-182, 2001.
- Stamatoyannopoulos, J., Clegg, C.H., and Li, Q.: Sheltering of  $\gamma$ -globin expression from position effects requires both an upstream locus control region and a regulatory element 3' to the  $A\gamma$ -globin gene. *Mol. Cell. Biol.* 17:240, 1997.
- Starck, J., Sarkar, R., Romana, M., Bhargava, A., Scarpa, A.L., Tanak, M., Chamberlain, J.W., Weissman, S.M. and Forget, B. Developmental Regulation of Human  $\gamma$ - and  $\beta$ - Globin Genes in the Absence of the Locus Control Region. *Blood* 84:1656, 1994.

- Stoming, T. A., Stoming, G. S., Lanclos, K. D., Fei, Y. I., Altay, C., Kutlar, F., and Huisman, T. H. J.: An  $\Lambda\gamma$  type of nondeletional hereditary persistence of fetal hemoglobin with a T→C mutation at position -175 to the cap site of the  $\Lambda\gamma$  globin gene. *Blood* 73:329, 1989.
- Strauss, E. C., and Orkin, S. H.: In vivo protein-DNA interactions at hypersensitive site 3 of the human  $\beta$ -globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5809, 1992a.
- Strauss, E. C., Andrews, N. C., Higgs, D. R., and Orkin, S. H.: In vivo footprinting of the human  $\alpha$ -globin locus upstream regulatory element by guanine and adenine ligation-mediated polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Biol.* 12:2135, 1992b.
- Strazzullo, M., Parisi, T., Di Critofano, A., Rocchi, M. and La Mantia, G. Characterization and genomic mapping of chimeric ERV9 endogenous retroviruses-host gene transcripts. *Gene* 206:77, 1998.
- Stuve, L. L., and Myers, R. M.: A directly repeated sequence in the  $\beta$ -globin promoter regulates transcription in murine erythroleukemia cells. *Mol. Cell. Biol.* 10:972, 1990.
- Southern, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 95:503, 1975.
- Surrey, S., Delgrosso, K., Malladi, P., and Schwartz, E.: A single base change at position -175 in the 5'-flanking region of the  $G\gamma$ -globin gene from a black with  $G\gamma\beta^+$ -HPFH. *Blood* 71:807, 1988.
- Swendeman, S.L., Spielholz, C., Jenkison, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., and Sheffery, M.: Characterization of the genomic structure, chromosomal location, promoter, and development expression of the alpha-globin transcription factor CP2. *J. Biol. Chem.* 269:11663, 1994.
- Takegawa, S., Brice, M., Stamatoyannopoulos, G., and Papayannopoulou, Th.: Only adult hemoglobin is produced in fetal non-erythroid x MEL cell hybrids. *Blood* 68:1384, 1986.
- Talbot, D., Collis, P., Antoniou, M., Vidal, M., Grosveld, F., and Greaves, D.R.: A dominant control region from the human beta-globin locus conferring integration site-independent gene expression. *Nature* 338:6213, 1989.
- Talbot, D., Philipsen, S., Fraser, P., and Grosveld, F.: Detailed analysis of the site 3 region of the human  $\beta$ -globin dominant control region. *EMBO J.* 9:2169, 1990.
- Talbot, D., Grosveld, F.: The 5'HS2 of the globin locus control region enhances transcription through the interaction of a multimeric complex binding at two functionally distinct NF-E2 binding sites. *EMBO J.* 10:1391, 1991.
- Tang, D.C., Ebb, D., Hardison, R.C., and Rodgers, G.P.: Restoration of the CCAAT box or insertion of the CACCC motif activates [corrected]  $\delta$ -globin gene expression. *Blood* 90:421, 1997.
- Tang, W., Smith, K. and Dover, G. The F-cell production locus is mapped between DXS 452 and APXL, an interval of 2-3 CM on Xp22.2. Abstract Book of the Twelfth Conference on Hemoglobin Switching, Orcas Island, WA. June 2000.
- Tanimoto, K., Liu, Q., Bungert, J. and Engel, J.D. Effects of altered gene order or orientation of the locus control region on human  $\beta$ -globin gene expression in mice. *Nature* 398:344, 1999.
- Tewari, R., Gillemans, N., Wijgerde, M., Nuez, B., von Lindern, M., Grosveld, F. and Philipsen, S. Erythroid Krüppel-like Factor (EKLF) is active in primitive and definitive erythroid cells and is required for the function of 5'HS3 of the  $\beta$ -globin locus control region. *EMBO J.* 17:2334, 1998.
- Townes, T. M., Lingrel, J. B., Chen, H. Y., Brinster, R. L., and Palmiter, R. D.: Erythroid-specific expression of human  $\beta$ -globin genes in transgenic mice. *EMBO J.* 4:1715, 1985.
- Transfection. Promega Corporation, 1998.
- Trepicchio, W.L., Dyer, M.A., and Baron, M.H.: Developmental regulation of the human embryonic beta-like globin gene is mediated by synergistic interactions among multiple tissue- and stage-specific elements. *Mol. Cell. Biol.* 13:7457, 1993.
- Trudel, M., and Costantini, F.: A 3' enhancer contributes to the stage-specific expression of the human  $\beta$ -globin gene. *Genes Dev.* 1:954, 1987.
- Tsai, F.Y., Keller, G., Kuo, F.C., Weiss, M., Chen, J., Rosenblatt, M., Alt, F.W. and Orkin, S.H. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 371:221, 1994.

- Tsang, A.P., Visvader, J.E., Turner, C.A., Fujiwara, Y., Yu, C., Weiss, M.J., Crossley, M. and Orkin, S.H. FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell* 90:109, 1997.
- Tsang, A.P., Fujiwara, Y., Hom, D.B. and Orkin, S.H. Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev.* 12:1176 1998.
- Tuan, D., Solomon, W., Li, Q., and London, I. M.: The " $\beta$ -like-globin" gene domain in human erythroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6384, 1985.
- Tuan, D., Solomon, W. B., London, I. M., and Lee, D. P.: An erythroid-specific, developmental-stage-independent enhancer far upstream of the human " $\beta$ -like globin" genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2554, 1989
- Tuan, D., Kong, S., and Hu, K.: Transcription of the hypersensitive site HS2 enhancer in erythroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11219, 1992.
- Tuan, D., Zeng, S., Ling, J., Li, C., Bollag, R., Keskinetepe, M., Pi, W., Soliman, H., Kutlar, F. and Krantz, S. The LTR of human endogenous retrovirus ERV-9 in the 5' boundary area of the  $\beta$ -globin locus control region possesses enhancer activity in embryonic and hematopoietic cells. *Blood* 94:204a, 1999a.
- Tuan, D., Zeng, S., Ling, J., Chunhua, L., Roni, B., Keskinetepe, M., Wenhui, P., Hatem, S., Kutlar, F. and Krantz, S. The LTR of human endogenous retrovirus ERV-9 in the 5' boundary area of the  $\beta$ -globin locus control region possesses enhancer activity in embryonic and hematopoietic cells. *Blood* 94:204a 1999b.
- Udvardy, A. Dividing the empire: boundary chromatin elements delimit the territory of enhancers. *EMBO* 18:1,1999.
- Ulrich, M. J., Gray, W. J., and Ley, T. J.: An intramolecular DNA triplex is disrupted by point mutations associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 267:18649, 1992.
- Van der Ploeg, L.H., Konings, A., Oort, M., Roos, D., Bernini, L., and Flavell, R.A.:  $\gamma$ - $\beta$ -thalassemia studies showing that deletion of the  $\gamma$ - and  $\delta$ -genes influence  $\beta$ -globin gene expression in man. *Nature* 283:637, 1980.
- Vanin, E. F., Henthorn, P. S., Kioussis, D., Grosveld, F., and Smithies, O.: Unexpected relationships between four large deletions in the human  $\beta$ -globin gene cluster. *Cell* 35:701, 1983.
- Viprakasit, V., Gibbons, R.J., Tolmie, J., Lunt, P., Winter, R., Broughton, B.C., Lehmann, A.R. and Higgs, D.R. Identification of mutations in a trans-acting factor with different effects on  $\alpha$  and  $\beta$  globin expression. Abstract Book of the Twelfth Conference on Hemoglobin Switching, Orcas Island, WA. June 2000.
- Vitale, M., Di Marzo, R., Calzolari, R., Acuto, S., O'Neil, D., Bank, A., and Maggio, A. Evidence for a globin promoter specific silencer element located upstream of the human  $\delta$ -globin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 204:413, 1994.
- Vyas, P., Vickers, M.A., Simmons, D.L., Ayyub, H., Craddock, C.F., and Higgs, D.R.: Cis-acting sequences regulating expression of the human  $\alpha$ -globin cluster lie within constitutively open chromatin. *Cell* 69:781, 1992.
- Wada-Kiyama, Y., Peters, B., and Noguchi, C. T.: The  $\epsilon$ -globin gene silencer. *J. Biol. Chem.* 267:11532, 1992.
- Wall, L., Destroismaisons, N., Delvoeye, N., and Guy, L.G.: CAAT/enhancer-binding proteins are involved in beta-globin gene expression and are differently expressed in murine erythroleukemia and K562 cells. *J. Biol. Chem.* 271:16477, 1996.
- Wall, L., deBoer, E. and Grosveld, F. The human beta-globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid-specific protein. *Genes Dev* 2:1089, 1988.
- Walter, W.R., Singh, G.B. and Krawetz, S.A. MARs Mission Update. *Biochem Biophys Res Commun* 242:419, 1998.
- Walters, M., Kim, C., and Gelinas, R.: Characterization of a DNA binding activity in DNase I hypersensitive site 4 of the human globin locus control region. *Nucleic Acids Res.* 19:5385, 1991.
- Walters, M., and Martin, D. I. K.: Functional erythroid promoters created by interaction of the transcription factor GATA-1 with CACCC and AP-1/NFE-2 elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10444, 1992.
- Walters, M.C., Fiering, S., Eidemiller, J., Magis, W., Groudine, M. and Martin, D.I.K. Enhancers increase the probability but not the level of gene expression. *Proc Natl Acad of Sci USA* 92:7125, 1995.
- Walters, M.C., Magis, W., Fiering, S., Eidemiller, J., Scalzo, D., Groudine, M. and Martin, D.I. Transcription enhancer can act in *cis* to suppress position-effect variegation. *Genes Dev* 10:185, 1996.

- Wang, Z. and Liebhaber, S.A. A 3' flanking NF- $\kappa$ B site mediates developmental silencing of the human  $\zeta$ -globin gene. *EMBO* 18:2218, 1999.
- Wasylyk, B., Wasylyk, C., Augereau, P., and Chambon, P.: The SV40 72 bp repeat preferentially potentiates transcription starting from proximal natural or substitute promoter elements. *Cell* 32:503, 1983.
- Watt, P., Lamb, P., Squire, L., and Proudfoot, N.: A factor binding GATAAG confers tissue specificity on the promoter of the human  $\zeta$ -globin gene. *Nucleic Acids Res.* 18:1339, 1990.
- Waye, J.S., Eng, B., Coleman, M.B., Steinberg, M.H. and Alter, B.P.:  $\delta\beta$ -thalassemia in an African-American: identification of the deletion endpoints and PCR-based diagnosis. *Hemoglobin* 18:389, 1994.
- Westphal, E.M., Sierakowska, H., Livanos, E., Kole, R. and Vos J-M. A System for Shuttling 200-kb BAC/PAC Clones into Human Cells: Stable Extrachromosomal Persistence and Long-Term Ectopic Gene Activation. *Hum Gen Ther* 9:1863, 1998.
- Wen, S-C., Roder, K., Hu, K-Y., Rombel, I., Gavva, N.R., Daftari, P., Kuo, Y-Y., Wang, C. and Shen, J. Loading of DNA-Binding Factors to an Erythroid Enhancer. *Mol Cell Biol* 20:1993, 2000.
- Whyatt, D. J., deBoer, E. and Grosveld, F. The two zinc finger-like domains of GATA-1 have different DNA binding specificities. *EMBO J.* 12:4993, 1993.
- Wijgerde, M., Grosvedl, F., and Fraser, P.: Transcription complex stability and chromatin dynamics in vivo. *Nature* 377:209, 1995.
- Wijgerde, M., Gribnau, J., Trimborn, T., Nuez, B., Philipsen, S., Grosveld, F. and Fraser, P. The role of EKLF in human  $\beta$ -globin gene competition. *Genes Dev* 10:2894, 1996.
- of human chromosome 16. Cell 65:595, 1991. Wilkie, A.O., Higgs, D.R., Rack, K.A., Buckle, V.J., Spun, N.K., Fischel-Ghodsian, N., Ceccherini, I., Brown, W.R., and Harris, P.C.: Stable length polymorphism of up to 260 kb at the tip of the short arm**
- Willing, M. C., Nienhuis, A. W., and Anderson, W. F.: Selective activation of human  $\beta$ - but not  $\gamma$ -globin gene in human fibroblast x mouse erythroleukaemia cell hybrids. *Nature* 277:534, 1979.
- Winichagoon, P., Fucharoen, S., Thonglairoam, V. and Wasi, P. Thai  $G\gamma(A\gamma\delta\beta)^0$  thalassemia and its interaction with a single  $\gamma$ -gene on a chromosome carrying  $\beta^0$  thalassemia. *Hemoglobin* 14:185, 1990.
- Wood, W. G., Stamatoyannopoulos, G., Lim, G., and Nute, P. E.: F-cells in the adult: Normal values and levels in individuals with hereditary and acquired elevations of Hb F. *Blood* 46:671, 1975.
- Wood, W.G., Old, J.M., Roberts, A.V., Clegg, J.B., Weatherall, D.J. Human globin gene expression: control of beta, delta and delta beta chain production. *Cell* 15:437, 1978.
- Wright, S., deBoer, E., Rosenthal, A., Flavell, R. A. and Grosveld, F. G. DNA sequences required for regulated expression of the  $\beta$ -globin genes in murine erythroleukaemia cells. *Phil. Trans. Royal Soc. London*, B307, 271, 1984.
- Xiao, J.-H., Davidson, I., Macchi, M., Rosales, R., Vigneron, R., Staub, A. and Chambon, P. In vitro binding of several cell-specific and ubiquitous nuclear proteins to the GT-1 motif of the SV40 enhancer. *Genes Dev.* 1:794, 1987.
- Yang, H. Y., and Evans, T.: Distinct roles for the two cGATA-1 finger domains. *Mol. Cell. Biol.* 12:4562, 1992.
- Yant, S.R., Zhu, W., Millinoff, D., Slightom, J.L., Goodman, M., and Gumucio, D.L.: High affinity YY1 binding motifs: identification of two core types (ACAT and CCAT) and distribution of potential binding sites within the human beta globin cluster. *Nucl. Acids Res.* 11:4353, 1995.
- Yu, C. Y., Chen, J., Lin, L. I., Tam, M., and Shen, C. K.: Cell type-specific protein-DNA interactions in the human  $\zeta$ -globin upstream promoter region: Displacement of Sp1 by the erythroid cell-specific factor NF-E1. *Mol. Cell. Biol.* 10:282, 1990.
- Yu, C.-Y., Motamed, K., Chen, J., Bailey, A. D., and Shen, C.-K.J.: The CACC box upstream of human embryonic  $\epsilon$  globin gene binds Sp1 and is a functional promoter element in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 266:8907, 1991.

- Zafarana, G., Raguz, S., Pruzina, S., Grosveld, F., and Meijer, D.: The regulation of human  $\beta$ -globin gene expression: the analysis of hypersensitive site 5 (HS5) in the LCR. In: *Developmental Control of Globin Genes*, Intercept Lt., Andover, England, p. 39, 1995.
- Zafarana, G., Raguz, S., Pruzina, S., Grosveld, F. and Meijer, D. The regulation of human  $\beta$ -globin gene expression: The analysis of hypersensitive site 5 (HS5) in the LCR. In "Hemoglobin Switching" (G. Stamatoyannopoulos, Ed.), pp. 39-44, Intercept Ltd, Hampshire, UK.
- Zafarana, G., Rottier, R., Grosveld, F. and Philipsen, S. Erythroid overexpression of c/EBP gamma in transgenic mice affects gamma-globin expression and fetal liver erythropoiesis. *EMBO J* 21:5856, 2000.
- Zhang, J-W., Stamatoyannopoulos, G. and Anagnou, N.P. Laotian ( $\delta\beta$ )<sup>o</sup>-Thalassemia: Molecular Characterization of a Novel Deletion Associated With Increased Production of Fetal Hemoglobin. *Blood* 72:983, 1988.
- Zhang, Q., Reddy, P.M., Yu, C.Y., Bastiani, C., Higgs, D., Stamatoyannopoulos, G., Papayannopoulou, T. and Shen, C.K. Transcriptional activation of human zeta 2 globin promoter by the alpha globin regulatory elements (HS-40): functional role of specific nuclear factor-DNA complexes. *Mol. Cell. Biol.* 13:2298, 1993.
- Zhang, Q., Rombel, I., Reddy, G.N., Gang, J.B., and Shen, C.K.: Functional roles of in vivo footprinted DNA motifs within an alpha-globin enhancer. Erythroid lineage and developmental stage specificities. *J. Biol. Chem.* 270:8501, 1995
- Zhou, W., Clouston, D.R., Wang, X., Cerruti, L., Cunningham, J. M. and Jane, S.M. Induction of human fetal globin gene expression by a novel erythroid factor, NF-E4. *Mol Cell Biol* 20:7662, 2000.