

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Doktorska disertacija

**VARIJANTE U GENIMA-MODIFIKATORIMA β -TALASEMIJSKIH
SINDROMA KAO REGULATORI GENSKE EKSPRESIJE I
POPULACIONO-GENETIČKI MARKERI**

Milena Radmilović

Универзитет у Београду
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ
ИНСТИТУТ ЗА ФИЗИОЛОГИЈУ И БИОХЕМИЈУ
БИБЛИОТЕКА

Инв. бр. 50033
БЕОГРАД

BEOGRAD

Novembar, 2011.

APSTRAKT

β -talasemijski sindromi pripadaju grupi naslednih oboljenja hemoglobina koju odlikuje poremećena sinteza β -globinskog lanca. Kliničke manifestacije β -talasemija variraju od simptomatske hiporhromije i mikrocitoze do teškog oblika anemije koju odlikuje zavisnost pacijenata od čestih transfuzija. Ova fenotipska varijabilnost najčešće se ne može objasniti samo genotipom β -globina, odnosno različitim alelskim varijantama unutar samog β -globinskog gena (primarni modifikatori β -talasemijskih sindroma). Naime, smatra se da bilo koji faktor koji umanjuje disbalans između α - i β -globinskih lanaca, predstavlja potencijalo važan modifikator ovih oboljenja. Tako, sinteza fetalnog hemoglobina (HbF) i u adultnom dobu, djelimično ublažava kliničku sliku jer se nedostatak funkcionalnog β -globinskog lanca kompenzuje viškom fetalnih, γ -globinskih lanaca, zbog čega se γ -globinski geni svrstavaju u sekundarne gene-modifikatore β -talasemijskih sindroma.

Kao potencijalni gen-modifikator β -talasemijskih sindroma, u novijim studijama, navodi se i *KLF1* gen koji kodira eritroidno-specifični transkripcioni faktor uključen u proces eritroidne diferencijacije. Broj do sada detektovanih genetičkih varijanti u *KLF1* genu, kao i naše znanje o različitim fenotipovima koji se dovode u vezu sa ovim varijantama veoma je ograničeno.

U ovom radu ispitivana je učestalost najčešćih alelskih varijanti β -globinskog gena, uzročnika β -talasemija u Srbiji. Takođe, rađena je i haplotipska analiza β -globinskog lokusa, kako bi se ispitao uticaj hromozomskog okruženja na fenotip. Korišćena je metodologija bazirana na PCR i sekvenciranju.

Ova teza obuhvata ispitivanje uticaja -158 (C>T) varijante u promotoru γ -globinskog gena kao i delecije (-AGCA) na poziciji -225 do -222 u promotoru γ -globinskog gena, na ekspresiju izbačena riječ fetalnih gena čovjeka, i to funkcionalnim esejima u ćelijskoj kulturi. Analizirane su i interakcije ovih potencijalnih regulatornih elemenata sa transkripcionim faktorima esejima usporene elektroforetske pokretljivosti (EMSA). Navedene *in vitro* analize vršene su kako u normalnim, tako i u uslovima eritroidnog stresa, koji je u ćelijskoj kulturi izazivan dodavanjem eritropoetina.

U cilju identifikacije potencijalnih sekundarnih modifikatora β -talasemijskih sindroma sekvenciranjem je analiziran gen *KLF1* čovjeka, a otkrivene genetičke varijante su testirane kao mogući uzročnici povišenog nivoa HbF u adultnom dobu. Izučavan je i uticaj detektovanih varijanti na ekspresiju *KLF1* i *BCL11A* gena metodom Real-time PCR.

Rezultati naše studije ukazali su na Hb Lepore-BW kao najčešćeg uzročnika talasemija u Srbiji, sa učestalošću od 26.2%, dok zajednička učestalost genetičkih varijanti IVS-II-745, β^{039} i IVS-I-110 u srpskoj populaciji premašuje 50%. Sprovedena haplotipska analiza ukazala je na haplotip I i haplotip II kao najčešće β -globinske haplotipove u srpskoj populaciji. Ove analize ukazale su na asocijaciju haplotipa I i Hb Lepore-BW, IVS-I-1 i IVS-I-110 varijanti, odnosno haplotipa II i β^{039} varijante.

Funkcionalna analiza -158 (C>T) varijante u promotorskom regionu γ -globinskog gena, pokazala je da ova varijanta nema uticaj na ekspresiju datog globinskog gena, kako u

standardnim, tako ni u uslovima eritroidnog stresa. S druge strane, funkcionalna analiza 4bp delecije promotorskog regiona γ -globinskog gena, ukazala je na prisustvo potencijalnog regulatornog elementa na ovoj poziciji u uslovima eritroidnog stresa.

U našoj studiji su kod osoba sa povišenim nivoom HbF otkrivene dvije nove, dosad neprijavljene varijante u *KLF1* genu, -148 (G>A) u promotorskom regionu i p.F182L u drugom egzonu *KLF1* gena, kao i poznata varijanta, p.S102P. Analiza uticaja navedenih genetičkih varijanti na ekspresiju *BCL11A* i *KLF1* gena ukazala je na promotorsku varijantu -148 (G>A) kao potencijalnog pozitivnog regulatora ekspresije oba gena.

Rezultati prezentovani u ovom radu predstavljaju korak ka razumijevanju fenotipskog diverziteta, kao i patofizioloških mehanizama koje leže u osnovi β -talasemijskih sindroma. Izučavanje varijanti u sekundarnim genima-modifikatorima β -talasemijskih sindroma i njihovog uticaja na fenotipsku varijabilnost, može biti osnova za uvođenje genske terapije ovih monogenских oboljenja.

Ključne riječi: talasemijski sindromi, genetičke varijante, geni-modifikatori

ABSTRACT

β -thalassemia syndromes belong to a group of inherited hemoglobin disorders characterized by a defect in β -globin chain synthesis. Clinical manifestations of β -thalassemia are extremely diverse, spanning from symptomatic hypochromia and microcytosis to transfusion-dependent form of anemia. This phenotypic variability in most cases cannot only be attributed to allele variations within β -globin gene itself. Any factor that reduces the imbalance between α - and β -globin polypeptide chains is considered to be an important modifier of this disorder. Specifically, production of fetal hemoglobin (HbF) through adulthood could ameliorate the severity of β -thalassemia phenotype since γ -globin polypeptide chains compensate the lack of the functional β -globin polypeptide chains. This is the reason why γ -globin genes are considered to be secondary modifiers of β -thalassemias.

In recent studies, *KLF1* gene emerged as a potential modifier gene of β -thalassemias. This gene encodes KLF1, erythroid-specific transcriptional factor involved in the process of erythroid differentiation. Number of known *KLF1* genetic variants, as well as our knowledge of different phenotypes associated with these variants is very limited.

In this paper, the frequency of the most common β -thalassemia mutations, as well as chromosomal background against which these mutations arose, was studied. PCR and sequencing-based methods were used.

This study includes the analysis of the -158 (C>T) γ -globin gene variant and a 4 bp deletion at -225 to -222 of the γ -globin gene promoter, and their effect on the expression of fetal globin genes. Interactions between these potential regulatory elements and transcription factors were also analyzed. These *in vitro* analysis were conducted under normal conditions and under erythroid stress caused by addition of erythropoietin.

In order to identify potential secondary modifiers of β -thalassemia, *KLF1* gene was sequenced and detected genetic variants were analyzed as variants likely to be associated with high levels of HbF. The effect of detected variants on *KLF1* and *BCL11A* gene expression was also studied using the RQ-PCR ("Real Time") method.

The results of our study showed that Hb Lepore-BW was the most common cause of thalassemia in Serbia, with frequency of 26.2%, while IVS-II-745, β^{039} i IVS-I-110 genetic variants account for more than 50% of all affected β -globin alleles. Haplotype analysis depicts haplotype I and II as the most frequent haplotypes in Serbia. This study also revealed the association between haplotype I and Hb Lepore-BW, IVS-I-1 and IVS-I-110 variants, as well as between haplotype II and β^{039} variant.

Results of our functional analysis indicate that the -158 (C>T) γ -globin gene variant has no effect on γ -globin gene expression, neither in normal conditions, nor under erythroid stress. On the other hand, functional analysis of the 4 bp deletion affecting γ -globin gene promoter, indicated the presence of the potential regulatory element acting only under erythroid stress. In our study of individuals with elevated HbF levels, two novel *KLF1* variants were identified: promoter variant -148 (G>A) and variant affecting second exon of *KLF1* gene, p.F182L. Also,

p.S102P variant was detected. The study of the effect of these genetic variants on *BCL11A* and *KLF1* gene expression pointed out the promoter region containing -148 (G>A) variant, as a potential regulatory element of *KLF1* gene expression.

The results presented in this study can lead to a better understanding of phenotypic diversity and mechanisms playing a central role in the pathophysiology of β -thalassemia syndromes. The study of variants within modifier genes of β -thalassemia and their influence on phenotypic variability will provide important information for devising gene therapy treatments for these monogenic disorders.

Key words: thalassemia syndromes, genetic variants, modifier genes

SADRŽAJ

UVOD	1
STRUKTURA I FUNKCIJA HEMOGLOBINA ČOVJEKA	2
KLASTERI GLOBINSKIH GENA	3
GLOBINSKI POLIPEPTIDI I HEMOGLOBINI ČOVJEKA	6
FETALNI HEMOGLOBIN	7
HEMOGLOBINOPATIJE	8
TALASEMIJSKI SINDROMI – OPŠTI PRINCIPI	9
TALASEMIJSKI SINDROMI – PATOFIZIOLOGIJA	10
β -TALASEMIJSKI SINDROMI	11
β -GLOBINSKI GENI – STRUKTURA, FUNKCIJA I EKSPRESIJA	13
POLIMORFIZMI U β -GLOBINSKOM GENSKOM LOKUSU	14
β -TALASEMIJSKI SINDROMI-KLINIČKA I HEMATOLOŠKA KLASIFIKACIJA	16
MODIFIKATORI β -TALASEMIJSKIH SINDROMA	17
PRIMARNI MODIFIKATORI β -TALASEMIJSKIH SINDROMA	18
SEKUNDARNI MODIFIKATORI β -TALASEMIJSKIH SINDROMA	20
α -GLOBINSKI GENOTIP	20
VARIJACIJE U SINTEZI HbF – HPFH	21
VARIJACIJE U SINTEZI HbF – GENI MODIFIKATORI IZVAN GLOBINSKIH GENSKIH LOKUSA	24
ERITROPOETIN	24
VARIJACIJE U SINTEZI HbF – NOVI POTENCIJALNI GENI-MODIFIKATORI	24
HBS1L – MYB	25
BCL11A	25
KLF1	26
TERCIJARNI MODIFIKATORI β -TALASEMIJSKIH SINDROMA	28
CILJ RADA	29
MATERIJAL I METODE	32
MATERIJAL	33
BIOLOŠKI MATERIJAL	33
DNK I RNK	33
ĆELIJSKE LINIJE	33
BAKTERIJSKI SOJ	33
PLAZMIDNI VEKTORI	34
PRAJMERI	34
OLIGONUKLEOTIDNE PROBE	39
ANTITIJELE	39
METODE	40
IZOLACIJA DNK IZ PERIFERNE KRVI NA KOLINI	40

IZOLACIJA MONONUKLEARNIH ĆELIJA IZ ASPIRATA KOŠTANE SRŽI ILI PERIFERNE KRV	40
IZOLACIJA RNK IZ MONONUKLEARNIH ĆELIJA	41
REVERZNA TRANSKRIPCija (RT)	42
REAKCIJA LANČANOG UMNOŽAVANJA DNK (PCR)	42
ALEL SPECIFIČNI PCR (ARMS)	43
GAP PCR	45
DETEKCIJA DELECIJE- $\alpha^{3.7}$	46
PCR-RFLP – HAPLOTIPSKA ANALIZA	47
UMNOŽAVANJE PROMOTORSKOG REGIONA γ -GLOBINSKOG GENA	49
UMNOŽAVANJE PROMOTORSKOG REGIONA ϵ - γ -GLOBINSKOG GENA	51
DETEKCIJA MUTACIJA U OKVIRU <i>KLF1</i> GENA	52
DGGE ZA γ -GLOBINSKE GENE	52
ANALIZA DNK NA AGAROSNOM GELU	54
BOJENJE POLIAKRILAMIDNIH GELOVA SREBRONITRATOM	54
SEKVENCIJIRANJE PCR PRODUKATA/CAT KONSTRUKATA	55
PRAVLJENJE CAT KONSTRUKATA ZA EKSPERIMENTE TRANZIJENTNE TRANSFEKCIJE	56
KULTIVISANJE BAKTERIJA	58
PRIPREMANJE <i>E. Coli DH5α</i> KOMPETENTNIH ĆELIJA	59
TRANSFORMACIJA <i>E. Coli DH5α</i> KOMPETENTNIH ĆELIJA	60
DETEKCIJA ŽELJENOG KONSTRUKTA	61
BRZA LIZA (LYSIS GEL ELECTROPHORESIS)	61
IZOLOVANJE PLAZMIDNE DNK NA MALOJ SKALI (MINI PREP)	62
IZOLOVANJE PLAZMIDNE DNK NA MALOJ SKALI	63
IZOLOVANJE PLAZMIDNE DNK NA VELIKOJ SKALI	64
ČUVANJE TRANSFORMANATA	65
USLOVI GAJENJA ĆELIJA U KULTURI	66
ZAMRZAVANJE ĆELIJA	66
ODMRZAVANJE ĆELIJA	67
SUBKULTIVACIJA ĆELIJA	68
BROJANJE ĆELIJA	68
VIJABILNOST K562 ĆELIJA POD UTICAJEM ERITROPOETINA (EPO)	69
MTT TEST	69
IZOLOVANJE JEDARNIH PROTEINA	70
BRADFORD METODA	70
ANALIZA INTERAKCIJE DNK I JEDARNIH PROTEINA	71
IN SILICO ANALIZA PROMOTORSKOG REGIONA γ -GLOBINSKIH I <i>KLF1</i> GENA	71
ANALIZA DIREKTNE INTERAKCIJE DNK I JEDARNIH PROTEINA	71
OBILJEŽAVANJE OLIGONUKLEOTIDNE PROBE	71
METODA USPORENE ELEKTROFORETSKE POKRETLJIVOSTI (EMSA)	72
TRANZIJENTNA TRANSFEKCIJA K562 ĆELIJA LIPOFEKTAMINOM	74
PRIPREMA ĆELIJSKIH EKSTRAKATA	75

β -GALAKTOZIDAZNI ESEJ	75
CAT ELISA ESEJ	76
PRAĆENJE EKSPRESIJE GENA POMOĆU RQ-PCR METODE	77
ODREĐIVANJE EKSPRESIJE <i>KLF1</i> I <i>BCL11A</i> GENA KOMPARATIVNOM ddC _T METODOM	79
REZULTATI	81
REZULTATI DESETOGODIŠNJE STUDIJE TALASEMIJSKIH MUTACIJA U SRBIJI	82
POLIMORFIZMI U β -GLOBINSKOM GENSKOM LOKUSU KAO MARKERI ZA PORIJEKLO I DISTRIBUCIJU β -TALASEMIJSKIH MUTACIJA	84
VARIJANTE U PROMOTORU γ -GLOBINSKIH GENA KAO MODIFIKATORI β -TALASEMIJSKIH SINDROMA	87
VARIJANTE U PROMOTORSKOM REGIONU $\epsilon\gamma$ -GLOBINSKOG GENA KAO MODIFIKATORI β -TALASEMIJSKOG FENOTIPA	88
ANALIZA PROMOTORSKOG REGIONA $\epsilon\gamma$ -GLOBINSKOG GENA DGGE METODOM	88
DETEKCIJA <i>XmnI</i> POLIMORFIZMA U PROMOTORSKOM REGIONU $\epsilon\gamma$ -GLOBINSKOG GENA PCR-RFLP METODOM	89
ANALIZA UČESTALOSTI <i>XmnI</i> POLIMORFIZMA U PROMOTORSKOM REGIONU $\epsilon\gamma$ -GLOBINSKOG GENA U SRPSKOJ POPULACIJI	90
FUNKCIONALNA ANALIZA <i>XmnI</i> POLIMORFIZMA U PROMOTORSKOM REGIONU $\epsilon\gamma$ -GLOBINSKOG GENA	90
PRIPREMA CAT KONSTRUKTA	91
TRANSKRIPCija γ -GLOBINSKIH GENA U USLOVIMA ERITROIDNOG STRESA – OPTIMIZACIJA EKSPERIMENTALNE DOZE EPO	92
FUNKCIONALNA ANALIZA PROMOTORSKOG REGIONA $\epsilon\gamma$ -GLOBINSKOG GENA	93
ANALIZA VEZIVANJA TRANSKRIPCIONIH FAKTORA ZA PROMOTORSKI REGION $\epsilon\gamma$ -GLOBINSKOG GENA	94
<i>IN SILICO</i> ANALIZA PROMOTORSKOG REGIONA $\epsilon\gamma$ -GLOBINSKOG GENA	94
ANALIZA INTERAKCIJA PROMOTORSKOG REGIONA $\epsilon\gamma$ -GLOBINSKOG GENA I TRANSKRIPCIONIH FAKTORA	94
KORELACIJA <i>XmnI</i> POLIMORFIZMA U $\epsilon\gamma$ -GLOBINSKOM GENU I NIVO FETALNOG HEMOGLOBINA KOD β -TALASEMIČNIH PACIJENATA SRPSKOG PORIJEKLA	96
VARIJANTE U PROMOTORSKOM REGIONU $\Lambda\gamma$ -GLOBINSKOG GENA KAO MODIFIKATORI β -TALASEMIJSKOG FENOTIPA	96
ANALIZA PROMOTORSKOG REGIONA $\Lambda\gamma$ -GLOBINSKOG GENA DGGE METODOM	96
SEKVENCIJIRANJE PROMOTORSKOG REGIONA $\Lambda\gamma$ -GLOBINSKOG GENA	97
FUNKCIONALNA ANALIZA DELECIJE OD 4 bp U PROMOTORSKOM REGIONU $\Lambda\gamma$ -GLOBINSKOG GENA	98
PRIPREMA CAT KONSTRUKTA	98
FUNKCIONALNA ANALIZA PROMOTORSKOG REGIONA $\Lambda\gamma$ -GLOBINSKOG GENA	99
ANALIZA VEZIVANJA TRANSKRIPCIONIH FAKTORA ZA PROMOTORSKI REGION $\Lambda\gamma$ -GLOBINSKOG GENA	101

<i>IN SILICO</i> ANALIZA PROMOTORSKOG REGIONA γ -GLOBINSKOG GENA	101
ANALIZA INTERAKCIJA PROMOTORSKOG REGIONA γ -GLOBINSKOG GENA I	
TRANSKRIPCIONIH FAKTORA	101
VARIJANTE U GENIMA IZVAN GLOBINSKIH LOKUSA KAO	
MODIFIKATORI β -TALASEMIJSKIH SINDROMA	104
EKSPRESIJA <i>BCL11A</i> I <i>KLF1</i> GENA KOD PACIJENATA SA POVEĆANIM NIVOOM HbF	104
SEKVENCIJANJE <i>KLF1</i> GENA.....	106
EKSPRESIJA <i>BCL11A</i> I <i>KLF1</i> GENA KOD NOSILACA RAZLIČITIH <i>KLF1</i> GENOTIPOVA.....	106
ANALIZA VEZIVANJA TRANSKRIPCIONIH FAKTORA ZA PROMOTORSKI REGION <i>KLF1</i> GENA	109
<i>IN SILICO</i> ANALIZA PROMOTORSKOG REGIONA <i>KLF1</i> GENA	109
ANALIZA INTERAKCIJA PROMOTORSKOG REGIONA <i>KLF1</i> GENA I	
TRANSKRIPCIONIH FAKTORA	109
DISKUSIJA	112
TALASEMIJSKI SINDROMI U SRBIJI –	
MUTACIJE I POLIMORFIZMI U β -GLOBINSKOM GENSKOM LOKUSU	113
SEKUNDARNI GENI-MODIFIKATORI β -TALASEMIJSKIH SINDROMA.....	116
VARIJANTE U PROMOTORSKOM REGIONU γ -GLOBINSKOG GENA	
KAO MODIFIKATORI β -TALASEMIJSKIH SINDROMA.....	116
VARIJANTE U PROMOTORSKOM REGIONU γ -GLOBINSKOG GENA	
KAO MODIFIKATORI β -TALASEMIJSKIH SINDROMA.....	118
<i>XmnI</i> POLIMORFIZAM.....	118
4 bp DELECIJA (-AGCA)	118
VARIJANTE U GENIMA IZVAN GLOBINSKIH GENSKIH LOKUSA KAO	
MODIFIKATORI β -TALASEMIJSKIH SINDROMA – <i>BCL11A</i> , <i>KLF1</i>	121
ZAKLJUČCI.....	126
LITERATURA.....	129

Genetičko nasljeđe gena koji leže u osnovi nasljednih bolesti ukazuje je na to da pacijenti sa istom ili sličnom bolešću mogu imati različit ili isti klinički manifestaciju bolesti. Izuzetak je u ovom pogledu A. Huntington, gdje fenotipske varijacije uključuju i dob početka u kojoj se bolest manifestuje, različit intenzitet pogođenih organa kao i potrebe za transplantacijom, početak kloničkog spavanja u teškim kolapsima može nastati čak i kod monogenstičkog nasljeđa. Određivanje gena za određene bolesti komplikuje se zbog kompleksnih interakcija mutacije koja leži u osnovi bolesti sa drugim genotipnim faktorima sa primarnom, sekundarnom i tercijarnom ulogom. Takođe se postojeće gene modifikatore prošire iz proučavanja različitih fenotipa u okviru jedne iste bolesti u istom genotipu.

STRUKTURA I FUNKCIJA HEMOGLOBINA ČOVJEKA

UVOD

Hemoglobin je tetramerni molekularni kompleks koji se sastoji od dva para različitih polipeptidnih lanaca (α i β globinski lanci) i četiri prostetike hem grupe. Svaka od ovih četiri prostetike sadrži željezo u unutrašnjosti globinskog subjedra (Slika 1).

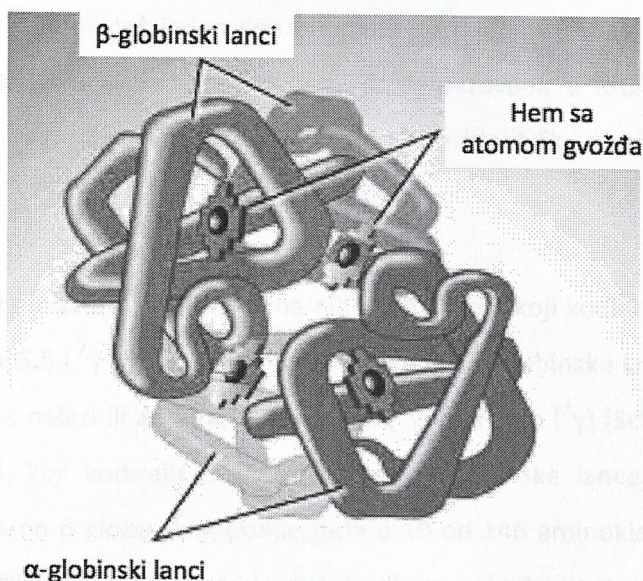
Glavni α -polipeptidni lanac je 141 aminokiselina, dok su β -polipeptidni lanci dugi 146 aminokiselina. Oko 75% globalnog prisustva formira oksidat (Karlson 1978), koja se sastoji od četiri ili osam aminokiselinskih segmenata (A-D). Kratki polipeptidni segmenti intermolekularni segmenti koji nisu organizovani u α -helise, raspoređeni su između helikalnih segmenata. Razlika aminokiselina u lancu se odražava u do porudji koju razumije unutar određene helikalne segmenta (Hunt 1958). Hem, feroproteoglikin IX, sadrži gvožđe koje je kovalentno vezano za globinski lanac i to sa aminokiselinom histidinom na poziciji F8. Aminokiseline koje imaju aromatske, baze ili kisele boje grupe, na primer leu, arginin i glutaminska kiselina, lokalizirane su na površini molekula i u kontaktu su sa okolnim vodenim rastvorom. Neutratne aminokiseline se u uglavnom orijentirane ka hidrofobnoj unutrašnjoj molekula i formiraju džep za vezanje za gvožđe hem.

Identifikovanje gena koji leže u osnovi naslednih bolesti ukazalo je na to da pacijenti koji imaju isti genotip mogu imati veoma različite kliničke manifestacije bolesti. Izuzetna fenotipska varijabilnost β -talasemija, gdje fenotipske razlike uključuju i dob pacijenata u kojoj se bolest pojavljuje, različitu zahvaćenost pojedinih organa kao i potrebe za transfuzijom, pokazuje kako širok spektar u težini bolesti može nastati čak i kod monogenetskih oboljenja. Određivanje fenotipa na osnovu genotipa komplikuje se zbog kompleksnih interakcija mutacije koja leži u osnovi bolesti sa drugim genetičkim faktorima na primarnom, sekundarnom i tercijarnom nivou. Dokaz za postojanje gena modifikatora proističe iz proučavanja različitih fenotipa u okviru porodica koje dijele isti genotip.

STRUKTURA I FUNKCIJA HEMOGLOBINA ČOVJEKA

Hemoglobin (Hb) je tetramerni metaloprotein koji se sastoji od dva para različitih polipeptidnih lanaca (α - i β -globinski lanci) i četiri prostetične hem-grupe. Svaka od ovih četiri hem-grupe smještena je unutar globinskih subjedinica (Slika 1).

Dužina α -polipeptidnih lanaca je 141 aminokiselina, dok su β -polipeptidni lanci dugi 146 aminokiselina. Oko 75% globinskog polipeptida formira α -spiralu [Karlson 1978], koja se sastoji od sedam ili osam spiralnih segmenata (A-H). Kratki polipeptidni segmenti (interhelikalni segmenti) koji nisu organizovani u α -heliks, raspoređeni su između helikalnih segmenata. Pojedine aminokiseline u lancu se označavaju po poziciji koju zauzimaju unutar određenih helikalnih segmenata [Bunn 1998]. Hem, feroprotoporfirin IX, sadrži gvožđe koje je kovalentno vezano za globinski lanac i to sa aminokiselinom histidinom na poziciji F8. Aminokiseline koje imaju polarne, bazne ili kisele, bočne grupe, na primer lizin, arginin i glutaminska kiselina, pozicionirane su na površini molekula i u kontaktu su sa okolnim vodenim rastvorom. Neutralne aminokiseline su uglavnom orijentisane ka hidrofobnoj unutrašnjosti molekula i formiraju džep u kome se nalazi hem.



Slika 1. Kvaternerna struktura molekula hemoglobina. α - i β -globinski lanci, kao i hem grupa označeni su strelicama.

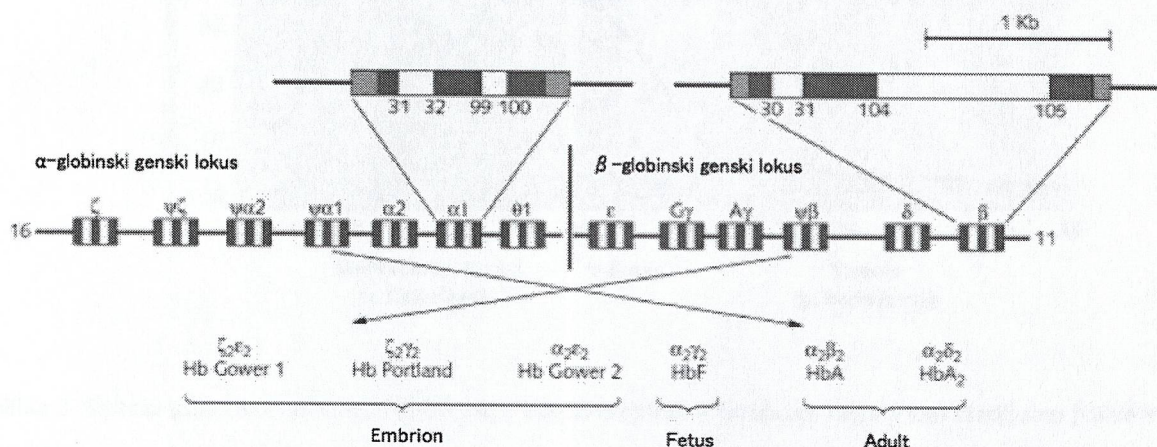
KLASTERI GLOBINSKIH GENA

Količina i tip hemoglobina koji se kod čovjeka proizvodi na određenom stupnju razvika, određeni su prvenstveno selektivnom ekspresijom pojedinačnih gena koji kodiraju određene tipove globinskih polipeptidnih lanaca. Globinski geni čovjeka, raspoređeni su u okviru dva klastera [Higgs *et al.* 1989; Fritsch *et al.* 1980]. Klaster α -globinskih gena smješten je na kraćem kraku hromozoma 16 i zauzima region od oko 30 kb (između trake 16p13.2 i telomere) dok je klaster β -globinskih gena smješten na terminalnom dijelu kraćeg kraka hromozoma 11 (11p15.5) i proteže se preko 70 kb [Deisseroth *et al.* 1977; Deisseroth *et al.* 1978].

Klaster α -globinskih gena sadrži tri funkcionalna gena: gen ζ , koji kodira ζ -globinske lance i koji se eksprimira u embrionalnom stadijumu razvitka čovjeka, i gene α_2 i α_1 koji kodiraju α -globinski polipeptid od početnih faza gestacije i kasnije kroz čitav život (Slika 2). U lokusu α -globinskih gena postoje i pseudogeni, evolutivni ostaci koji ne kodiraju proteine (pseudo ζ ,

pseudo α_2 i pseudo α_1 geni). Još jedan gen α -tipa, θ -gen, identifikovan je na samom 3' kraju lokusa [Hsu *et al.*1988]. Transkripcija ovog gena je detektovana u fetalnom tkivu i adultnoj kostnoj srži, mada na veoma niskom nivou (<1%) i nije identifikovan Hb koji sadrži θ -lanac [Albitar *et al.*1989].

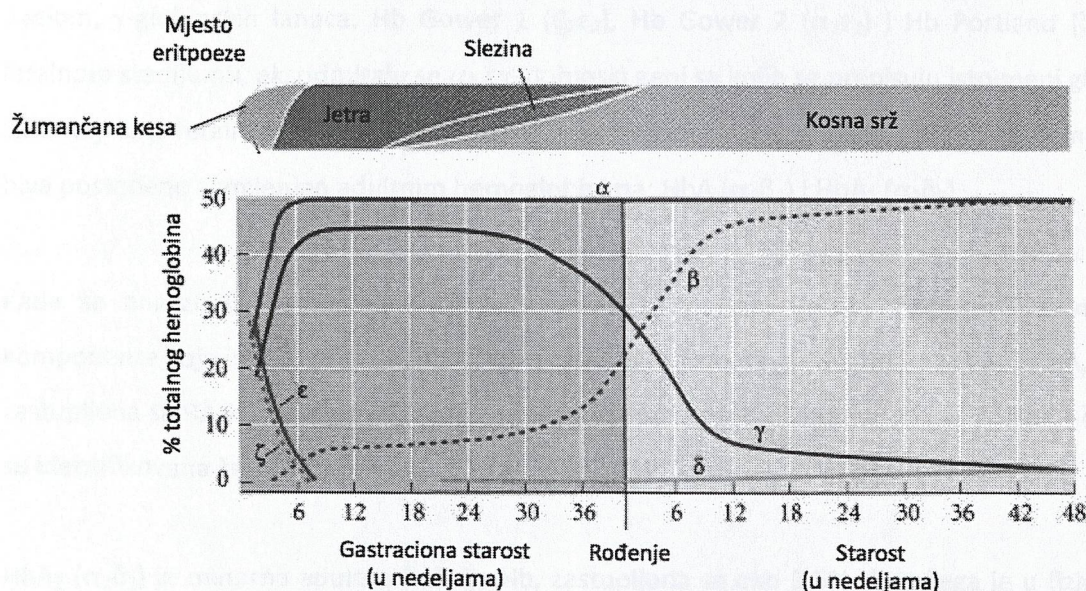
Klaster β -globinskih gena sadrži pet funkcionalnih gena: ϵ gen, koji kodira embrionalni globinski lanac, dva gena $\zeta\gamma$ (*HBG2*) i $\zeta\gamma$ (*HBG1*), koji kodiraju fetalne γ -globinske lance i koji se razlikuju na poziciji 136, gdje se nalazi ili aminokiselina glicin ($\zeta\gamma$) ili alanin ($\zeta\gamma$) [Schroeder *et al.* 1968], i konačno, gene δ i β , koji kodiraju istoimene adultne globinske lance (Slika 2). δ -globinski polipeptid se razlikuje od β -globinskog polipeptida u 10 od 146 aminokiselina. γ - i β - globinski lanci sadrže 39 različitih aminokiselina. U ovom lokusu takođe postoji pseudo gen, lociran između γ - i δ -gena (Slika 2).



Slika 2. Globinski geni i hemoglobini čovjeka. Zelenom bojom obilježeni su egzoni, a bijelom bojom obilježeni su introni globinskih gena.

Redosled gena u globinskim lokusima čovjeka odgovara radosledu njihove ekspresije tokom ontogenetskog razvika [Collins and Weissman 1984]. Ekspresija globinskih gena u okviru ovih klastera prostorno je i vremenski regulisana. Naime, u embrionalnom stadijumu ekspresija je ograničena na žumančanu kesu, u fetalnom periodu odvija se u jetri, dok se posle rođenja izmiješta u slezinu i koštanu srž.

Molekulski "switch" je proces u kome ćelija prestaje da eksprimira jedan gen ili grupu gena i počinje ekspresiju drugog gena ili grupe gena. Tokom razvitka čovjeka, javljaju se dva molekulska "switch"-a globinskih gena: embrionalni na fetalni "switch", tokom kog sinteza α - i γ -globinskih lanaca zamjenjuje sintezu ζ - i ϵ -globinskih lanaca, i fetalni na adultni "switch" tokom kog dolazi do prestanka sinteze γ -globinskih lanaca i početka produkcije β -globinskih lanaca [Forget and Pearson 1995] (Slika 3).



Slika 3. Sintaza globinskih polipeptida čovjeka u embrionalnom, fetalnom i adultnom stadijumu [Gilbert 2000].

Svi globinski geni dijele istu osnovnu organizaciju: sadrže tri egzona i dva introna. Oba introna α -globinskih gena su kratki (100-300 bp), dok ostali globinski geni sadrže jedan kraći i jedan duži (1000-1200 bp) intron. Drugi egzon svih globinskih gena je odgovoran za glavne komponente džepa u kojem je smješten hem, dok treći egzon kodira aminokiseline duž linije dodira α - i β -subjedinica i značajan je za formiranje stabilnog tetramera [Steinberg *et al.* 2009].

GLOBINSKI POLIPEPTIDI I HEMOGLOBINI ČOVJEKA

Hemoglobin čovjeka je globularni molekul i sačinjavaju ga par α - i par β -subjedinica. α -subjedinicu sačinjavaju lanci koji se prepisuju sa jednog od α -globinskih gena, dok je β -subjedinicu sačinjavaju lanci kodirani genima β -globinskog lokusa.

Embrionalni hemoglobini nastaju kombinacijom ζ - odnosno α -globinskih lanaca i ϵ - i, jednim dijelom, γ -globinskih lanaca: Hb Gower 1 ($\zeta_2\epsilon_2$), Hb Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$) i Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$). U fetalnom stadijumu, ekspimiraju se α - i γ -globinski geni sa kojih se prepisuju istoimeni globinski lanci koji čine fetalni hemoglobin HbF ($\alpha_2\gamma_2$). Nakon rođenja, predominantni fetalni hemoglobin biva postepeno zamijenjen adultnim hemoglobinima: HbA ($\alpha_2\beta_2$) i HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$).

Kada se analiziraju hemoglobini zdravog odraslog čovjeka, uočavaju se različite minorne komponente koje imaju nižu izoelektričnu tačku u odnosu na glavnu komponentu HbA, koja je zastupljena sa 92.5%. Minorne frakcije su produkti posttranslacione modifikacije HbA i do sada su identifikovana četiri različita tipa: HbA_{1a1}, HbA_{1a2}, HbA_{1b}, HbA_{1c} [McDonald *et al.* 1978].

HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) je minorna adultna frakcija Hb, zastupljena sa oko 2.5% zbog čega je u fiziološkim uslovima i relevantna, dok su funkcionalne karakteristike veoma slične onima kod HbA. Iako minorna, ova frakcija predstavlja najbolji marker za diferencijalno dijagnostikovanje nekih bolesti, među kojima prednjače talasemijski sindromi. Naime, povećan procenat HbA₂ često se sreće kod β -talasemija kao i kod megaloblastne anemije. S druge strane, ova hemoglobinska frakcija je smanjena kod α -talasemija [Bunn 1998]. Pokazano je da je uzrok niske zastupljenosti HbA₂ izrazito smanjena sinteza δ -globinskog lanca u odnosu na β [Roberts *et al.* 1972]. Pored toga, formiranje α/β dimera je favorizovano u odnosu na α/δ dimere. Naime, α -globin ima ukupno pozitivno površinsko naelektrisanje, dok su β -globini negativno naelektrisani. Međutim, δ -globinski lanac ima manje negativno naelektrisanje od β -globinskog lanca, tako da dimerizuje sa α -globinskim lancima u manjem stepenu [Bunn 1987].

Fetalni hemoglobin (HbF)

Fetalni hemoglobin (HbF) je glavni transportni protein, prenosnik kiseonika, u fetalnom stadijumu razvika čovjeka. Posle osme gestacione nedelje, HbF postaje predominantni hemoglobin, zamjenjujući embrionalne hemoglobine. Neposredno po rođenju on je zastupljen sa 75% u krvi. Šest mjeseci posle rođenja HbF je prisutan u hemolizatu sa manje od 5%, a kasnije spada na ispod 1%. Patofiziološka posledica toga je da su α -talasemije simptomatične *in utero* i odmah po rođenju obzirom da α -globinski lanci učestvuju u formiranju HbF, dok su abnormalnosti β -globinskog lanca asimptomatične u prvih 4-6 mjeseci života.

Funkcionalno, fetalni hemoglobin se u najvećoj mjeri razlikuje od adultnog po načinu vezivanja kiseonika. Naime, HbF vezuje kiseonik sa većim afinitetom u odnosu na adultni hemoglobin, na taj način olakšavajući transport kiseonika kroz placentu.

Normalno, oko 0.1% do 7% eritrocita sadrži detektabilne količine fetalnog hemoglobina. Ove, takozvane F ćelije, sadrže oko 5pg HbF što čini oko 20% ukupnog hemoglobina u ćeliji. Produkcija F ćelija je genetički kontrolisana [Dover *et al.* 1992].

Kao što je već rečeno, fetalni hemoglobin građen je od dva α - i dva γ -globinska lanca. Za razliku od ostalih humanih globinskih subjedinica, γ -globinski lanci su strukturno heterogeni. Kod novorođenčadi, oko dvije trećine γ -globinskih lanaca ima glicin na poziciji 136 dok ostali γ -globinski lanci na ovoj poziciji imaju alanin. Zastupljenost γ -globinskih lanaca sa glicinom na poziciji 136 se smanjuje u periodu preuključivanja sa produkcije γ - na produkciju β -globinskih lanaca (u periodu molekuskog "switch"-a) [Schroeder *et al.* 1968].

HbF je u različitoj mjeri povećan kod nekoliko naslednih poremećaja, uključujući β -talasemije, naslednu perzistenciju fetalnog hemoglobina i anemiju srpastih ćelija. Blago povišeni nivoi fetalnog hemoglobina mogu se vidjeti i kod mnoštva stečenih hematoloških poremećaja, uključujući megaloblastnu anemiju, aplastičnu anemiju i leukemije, posebno hronične

mijelocitne leukemije kod djece. Kod homozigotnih β -talasemija i anemije srpastih ćelija, preživljavanje F ćelija je selektivno pojačano i zato se povećava koncentracija HbF u cirkulaciji. Produkcija HbF ćelija može biti pojačana administracijom nekoliko hemoterapeutskih lijekova i metabolita a pokazano je da hidroksiurea, derivati butirata i visoke doze eritropoetina dovode do indukcije sinteze γ -globinskog lanca [Witt *et al.* 2003].

HEMOGLOBINOPATIJE

Hemoglobinopatije predstavljaju heterogenu grupu naslednih anemija, a posledica su mutacija u genima koji kodiraju globinske polipeptidne subjedinice molekula hemoglobina. Ova oboljenja obuhvataju kvantitativne i kvalitativne poremećaje.

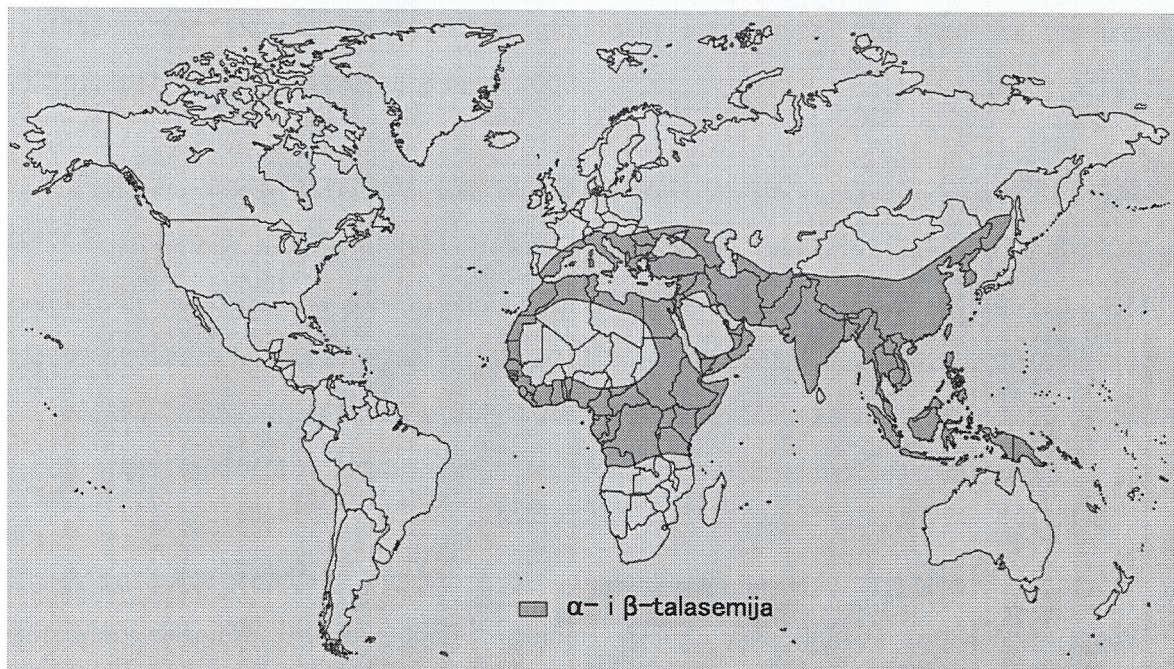
Kvantitativni poremećaji posledica su odsustva ili smanjene sinteze jednog ili više polipeptidnih lanaca i označavaju se terminom "talasemije". Talasemije se obično klasifikuju prema tipu globinskog lanca koji odsustvuje (α^0 - i β^0 -talasemije) ili je prisutan u smanjenim količinama (α^+ - i β^+ -talasemije). Iako α - i β -talasemija predstavljaju najčešće oblike ovog oboljenja, treba napomenuti da su definisane i druge vrste talasemija kao što su δ -, $\delta\beta$ - i $\gamma\delta\beta$ -talasemije.

Za razliku od kvantitativnih, kvalitativni poremećaji, koji se najčešće nazivaju hemoglobinskim varijantama ili strukturnim hemoglobinopatijama, posledica su varijacija u aminokiselinskoj sekvenci molekula hemoglobina. Karakterišu se prisustvom normalne količine mutiranih globinskih polipeptida, koji doprinose formiranju molekula hemoglobina izmijenjenih fizičkih i hemijskih svojstava. U praksi, međutim, granica između kvantitativnih i kvalitativnih poremećaja nije tako stroga. Naime, naporima molekularne genetike, pokazano je da postoje hemoglobinske varijante (Hb E, Hb Lepore, Hb Constant Spring) čiji se izmijenjeni polipeptidi sintetišu i u smanjenoj mjeri, te stoga predstavljaju talasemijski poremećaj. Usled ovakvih otkrića uveden je pojam "talasemijski sindromi" koji obuhvata sve nasledne anemije koje se karakterišu defektom u sintezi jednog ili više globinskih lanaca hemoglobinskog tetramera [Pavlović 2006].

Talasemijski sindromi – opšti principi

Kao što je već rečeno, talasemijski sindromi su veoma heterogena grupa naslednih oboljenja koja se karakterišu poremećajem u produkciji jednog ili više polipeptidnih lanaca hemoglobina i jedni su od najčešćih genetskih poremećaja u svijetu. Naime, 4.83% svjetske populacije nosioci su neke od globinskih varijanti, uključujući 1.67% populacije koju su heterozigotni nosioci α - i β -talasemije [Rund and Rachmilewitz 2005].

Riječ “talasemija” porijeklom je od grčke riječi koja označava “more”. Naziv je prvi put upotrebljen za anemije karakteristične za područje Mediterana [Whipple and Bradford 1932]. Naime, iako se talasemijski sindromi susreću u skoro svim populacijama i geografskim lokacijama, najčešće se javljaju u Mediteranskoj oblasti, kao i u ekvatorskom regionu Azije i Afrike. “Talasemijski pojas” prostire se duž obala Sredozemnog mora, preko Arapskog poluostrva, Turske, Irana, Indije i jugoistočne Azije. Frekvencija talasemijskih sindroma u ovim oblastima kreće se od 2.5% do 15% [Forget 2000] (Slika 4).



Slika 4. Distribucija talasemijskih sindroma u svijetu [Weatherall 1997].

Danas je već široko prihvaćena teorija po kojoj se visoka učestalost talasemije i srpaste anemije u nekim tropskim i subtropskim oblastima objašnjava rezistencijom na malariju (*Plasmodium falciparum*). Naime, prema "malaričnoj hipotezi", klinički zdravi talasemični heterozigoti rezistentni su na malariju i imaju selektivnu prednost u odnosu na homozigote koji imaju manje šanse za preživljavanje zbog malarije, odnosno anemije [Bernini and Hartevelde 1998]. Jedno od mogućih objašnjenja ove teorije uzima u obzir činjenicu da je membrana ćelija crvene loze kod talasemija izrazito podložna oštećenjima izazvanim oksidativnim stresom, a kako infekcija malaričnim parazitom doprinosi da oksidativni stres dostigne kritičan nivo, dolazi do lize inficiranih ćelija, što rezultira smrću parazita i protektivnim efektom [Friedman and Traeger 1981]. "Malarična hipoteza" podržana je činjenicom da se oblasti u kojima su rasprostranjene talasemije, odnosno malarija, preklapaju.

Talasemijski sindromi – patofiziologija

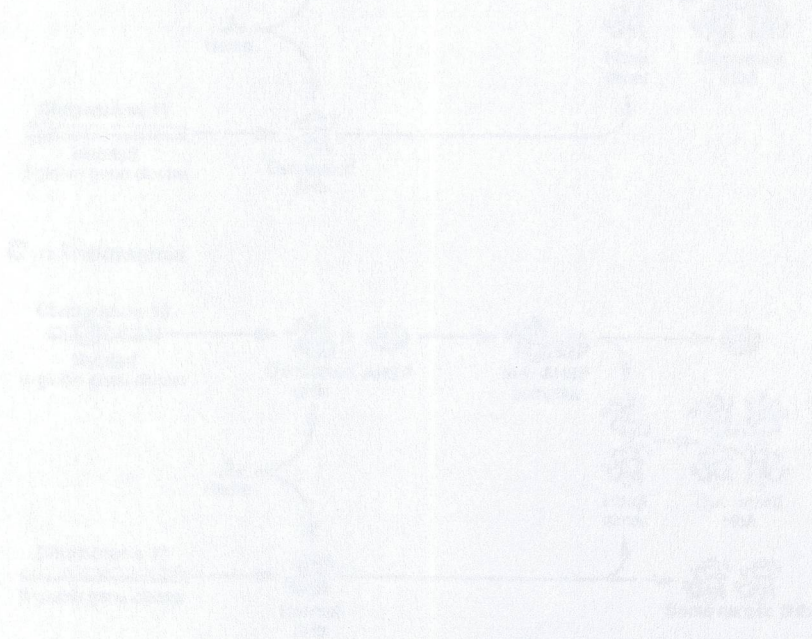
Klinički simptomi koji se dovode u vezu sa talasemijskim sindromima javljaju se usled nedovoljne akumulacije hemoglobina, što rezultira hipohromijom i mikrocitozom, i neizbalansirane akumulacije pojedinih globinskih subjedinica, što vodi ka neefikasnoj eritropoezi i hemolitičkoj anemiji [Forget 2000].

Jedna od osnovnih karakteristika svih oblika talasemijskih sindroma je odsustvo ili smanjena produkcija jednog ili više globinskih lanaca. Klinički su relevantni samo α - i β -globinski polipeptidi, neophodni za sintezu HbA, obzirom da je drastično smanjena sinteza γ -, ϵ - i ζ -globinskih lanaca letalna *in utero*. Najznačajnija i odmah uočljiva posledica nedostatka jednog od ova dva polipeptidna lanca je deficit HbA u talasemičnim eritrocitima, odnosno njihova hipohromija i mikrocitoza. U blažim kliničkim formama, ovaj fenomen se jedva uočava.

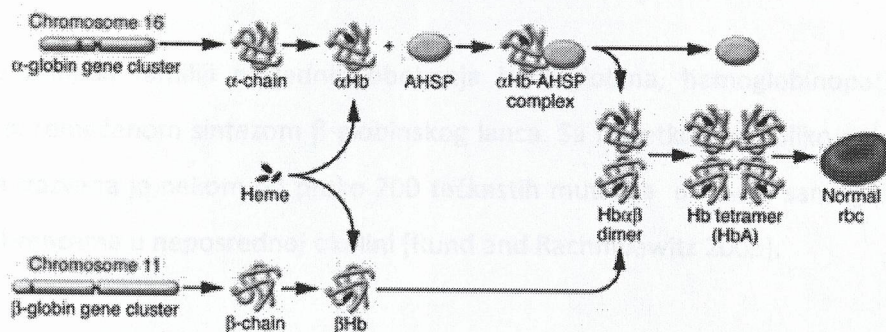
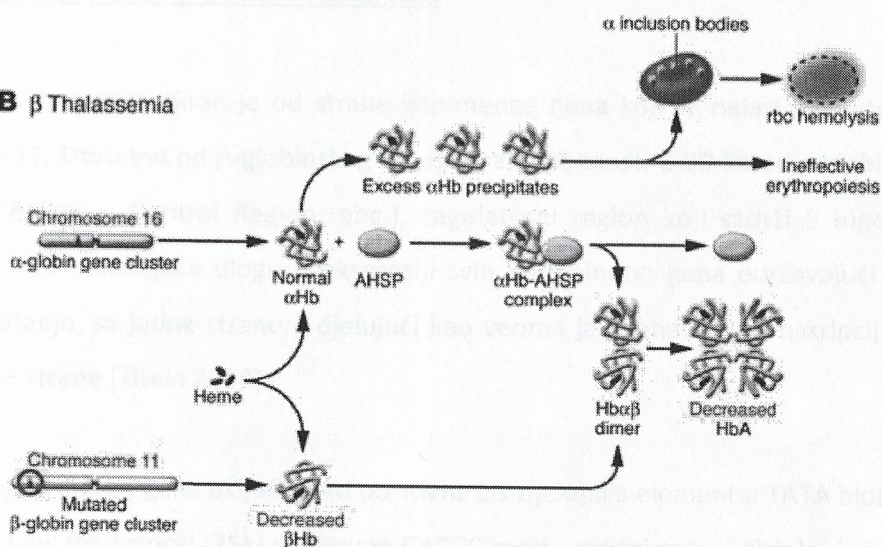
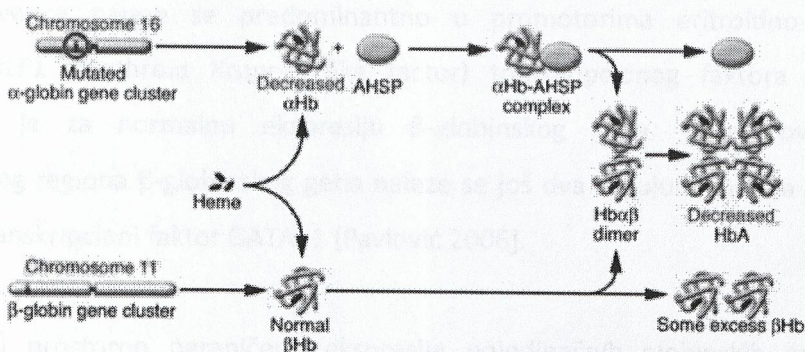
Druga posledica smanjene biosinteze α - i β -globinskih lanca je akumulacija lanca koji se normalno sintetiše. Hemoglobinski tetrameri su vrlo solubilni, za razliku od slobodnih, nesparenih globinskih lanaca koji formiraju nestabilne agregate koji nisu u mogućnosti da

normalno otpuštaju kiseonik i precipitiraju u ćeliji. Kod β -talasemija, agregati α -lanaca se nazivaju inkluzionim tijelima, ili, češće ali nepravilno, Heinz-ovim telima (prava Heintz-ova tijela sačinjavaju precipitirani molekuli HbA). Kod α -talasemija se formiraju homotetrameri (Hb H i Hb Bart), koji su nešto stabilniji od α -globinskih agregata i precipitiraju mnogo sporije. Ovi precipitati dovode do fizičkog i oksidativnog oštećenja ćelijske membrane, što izaziva prevremenu destrukciju eritroidnih ćelija (hemoliza) (Slika 5).

Osnovna klinička posledica patofizioloških procesa kod talasemijskih sindroma je hemolitička anemija. Kliničke manifestacije anemije izazvane talasemijskim sindromima variraju od asimptomatske hipohromije i mikrocitoze do teške anemije koja je fatalna *in utero* ili u ranom djetinjstvu, ako se ne liječi. Transfuzija je terapijska mjera predupređenja pogoršanja kliničke slike. Međutim, hemoliza, primjena čestih transfuzija, kao i intenzivirana apsorpcija gvožđa u gastrointestinalnom traktu, dovodi do ogromnog viška gvožđa u plazmi, što opet doprinosi oštećenju mnogih vitalnih organa i na kraju do smrti [Rund and Rachmilewitz 2005].



Slika 5. Formiranje tetramera hemoglobina. (A) normalni成人 hemoglobin, (B) fetalni hemoglobin, (C) HbH, (D) HbBart. HbH i HbBart su hemoglobini sa stabilnijim α -proteinima [Bank 2007].

A Normal**B β Thalassemia****C α Thalassemia**

Slika 5. Formiranje tetramera hemoglobina. (A) Normalni uslovi; (B) β -talasemija; (C) α -talasemija. RBC-eritrociti, AHSP- α -hemoglobin stabilizirajući protein [Bank 2007].

β -TALASEMIJSKI SINDROMI

β -talasemija pripada porodici naslednih oboljenja hemoglobina, hemoglobinopatija, koja se karakteriše poremećenom sintezom β -globinskog lanca. Sa izuzetkom nekoliko delecija, većina β -talasemija izazvana je nekom od preko 200 tačkastih mutacija u okviru samog β -globinskog gena ili u sekvencama u neposrednoj okolini [Rund and Rachmilewitz 2005].

β -globinski geni – struktura, funkcija i ekspresija

β -globinski polipeptid kodiran je od strane istoimenog gena koji se nalazi u klasteru gena na hromozomu 11. Uzvodno od β -globinskog lokusa, na udaljenosti 6-20 kb od ϵ -globinskog gena, nalazi se LCR (Locus Control Region, eng.), regulatorni region koji sadrži 5 hipersenzitivnih mjesta. LCR igra odlučujuću ulogu u ekspresiji svih β -globinskih gena održavajući hromatin u otvorenom stanju, sa jedne strane, i djelujući kao veoma jak enhanser transkripcije globinskih gena, s druge strane [Thein 2004].

Promotor β -globinskog gena uključuje tri pozitivna *cis*-djelujuća elementa: TATA blok (na poziciji -30), CCAAT blok (na poziciji -75) i dupliciran CACCC motiv, proksimalni i distalni (na poziciji -90 i -105). Dok su CCAAT i TATA elementi karakteristični za brojne promotore eukariotskih gena, CACCC sekvence nalaze se predominantno u promotorima eritroidno-specifičnih gena. Vezivanje KLF1 (erythroid Kruppel like factor) transkripcionog faktora za CACCC motiv neophodno je za normalnu ekspresiju β -globinskog gena. Pored ovih, uzvodno od promotorskog regiona β -globinskog gena nalaze se još dva vezujuća motiva i to za eritroidno-specifični transkripcioni faktor GATA-1 [Pavlović 2006].

Vremenski i prostorno ograničena ekspresija pojedinačnih globinskih gena ostvaruje se direktnom interakcijom promotora ovih gena i LCR-a, pri čemu se ova ekspresija oslanja na dva mehanizma, utišavanju gena i genskoj kompeticiji [Thein 1998]. Dok ϵ - i γ -globinski geni bivaju autonomno utišani na određenom stupnju razvika, ekspresija β -globinskog gena zavisi od

kompeticije sa γ -globinskim genom za interakciju sa sekvencama unutar LCR-a. Ovo stanovište podržano je činjenicom da se β -globinski gen manje ekspremira u slučaju povećane ekspresije γ -globinskih gena, izazvane promotorskim mutacijama [Thein 2005].

Polimorfizmi u β -globinskom genskom lokusu

Normalne varijacije u DNK sekvenci su veoma česte i uglavnom se javljaju u intragenskim sekvencama i intronima, a samo mali broj njih dovode do nastanka mutacija, uzročnika bolesti. Ovi DNK polimorfizmi imaju veliku primjenu kako u kliničkoj praksi tako i u fundamentalnim istraživanjima među kojima je i mapiranje oboljelog gena [Kazazian 1990].

U β -globinskom lokusu otkriven je veliki broj polimorfizama od kojih je većina karakteristična za rasne grupe. Pokazano je da ovi polimorfizmi formiraju preferencijalne asocijacije i takve kombinacije polimorfnih mjesta nazivaju se haplotipovi.

Analizom haplotipova u β -globinskom lokusu utvrđeno je postojanje devet haplotipova karakterističnih za Mediteran, koji su zastupljeni sa više od 1%. [Orkin *et al.* 1982] (Tabela 1).

Populaciono-genetičke analize polimorfnih restrikcionih mjesta u humanom β -globinskom genu ukazuju na postojanje neuniformnih rekombinacija. Ustanovljeno je da postoje dvije familije polimorfizama sa visoko konzerviranim asocijacijama (izrazito niska stopa rekombinacija): jedna na 5' kraju gena duga 34.6 kb i druga na 3' kraju duga 19.4 kb. One su razdvojene segmentom od 9.1 kb u kome je rekombinaciona stopa 3-30 puta veća od očekivane i u kome se dešava 75% svih rekombinacija u β -globinskom genu. Ovaj segment je zato označen kao "hot spot" za mejoitičku rekombinaciju [Chakravarti *et al.* 1984].

Tabela 1. Haplotipovi β -talasemijskih hromozoma mediteranskog porijekla i njihova procentualna zastupljenost u Mediteranu.

Haplotip	ϵ	G_γ	A_γ	$\psi\beta$	$3'\psi\beta$	β	$3'\beta$	Učestalost
I	+	-	-	-	-	+	+	47%
II	-	+	+	-	+	+	+	17%
III	-	+	-	+	+	+	-	8%
IV	-	+	-	+	+	-	+	1%
V	+	-	-	-	-	+	-	12%
VI	-	+	+	-	-	-	+	6%
VII	+	-	-	-	-	-	+	6%
VIII	-	+	-	+	-	+	-	1%
IX	-	+	-	+	+	+	+	3%

Restrikciona mjesta za enzim *HincII* nalaze se uzvodno od gena ϵ , u genu $\psi\beta$ i nizvodno od ovog gena i definiše ϵ , $\psi\beta$ i $3'\psi\beta$ polimorfizme, za *HindIII* u G_γ i A_γ genu i definiše G_γ i A_γ polimorfizme, za *Avall* u β genu i definiše β polimorfizam i za enzim *BamHI* nizvodno od β gena i definiše $3'\beta$ polimorfizam. Znak "+" simboliše prisustvo restrikcionog mjesta za određeni enzim, a znak "-" odsustvo restrikcionog mjesta za isti enzim .

Smatra se da haplotipovi oslikavaju hromozomski kontekst (background, eng.) u kome su nastale određene mutacije u β -globinskom genu koje dovode do talasemije. Postoje i izuzeci: neki haplotipovi mogu biti vezani za više mutacija, a ponekad ista mutacija može biti asocirana sa više haplotipova [Orkin *et al.* 1982]. Na osnovu toga je postavljena hipoteza o multicentričnom porijeklu tih mutacija.

Ipak, asocijacija specifičnog haplotipa i odedene mutacije nije invarijantna. Asocijacije prikazane u tabeli 2, u Meditedanu zastupljene su sa oko 86%. Ovako visoka asocijacija ukazuje na pozitivnu selekciju za β -talasemijske heterozigote u regionima Mediterana pogodjenim malarijom. Drugo objašnjenje za tako visok stepen asocijacije je činjenica da je potrebno da prođe dosta vremena izmedju prve talasemijske i neke sledeće mutacije u odredjenom

haplotipskom kontekstu. U monogenским oboljenjima postoji mogućnost da se ovako visoka asocijacija haplotipa i β -talasemijske mutacije ne održi dugo, zbog nedostatka pozitivne selekcije za heterozigote [Kazazian *et al.* 1984]. U slučaju polimorfizama u β -globinskom genskom lokusu koji su povezani sa specifičnim β -talasemijskim alelima, moguće ih je koristiti u cilju otkrivanja porijekla i migracionog širenja mutacija [Orkin *et al.* 1983].

Tabela 2. Asocijacija haplotipova i mutacija u β -globinskom genu u Mediteranu.

Haplotip	Identifikovani talasemijski defekt
I	β^+ IVS-I-110
II	β^0 kodon 39
III	β^0 IVS-II-1
IV	β^0 kodon 8
V	β^0 IVS-I-1
	β^0 IVS-II-1
VI	β^+ IVS-I-6
VII	β^+ IVS-II-745
VIII	β^+ -87
IX	β^0 kodon 39

β -talasemijski sindromi-klinička i hematološka klasifikacija

Prema težini kliničke slike β -talasemijski sindromi se mogu svrstati u tri grupe:

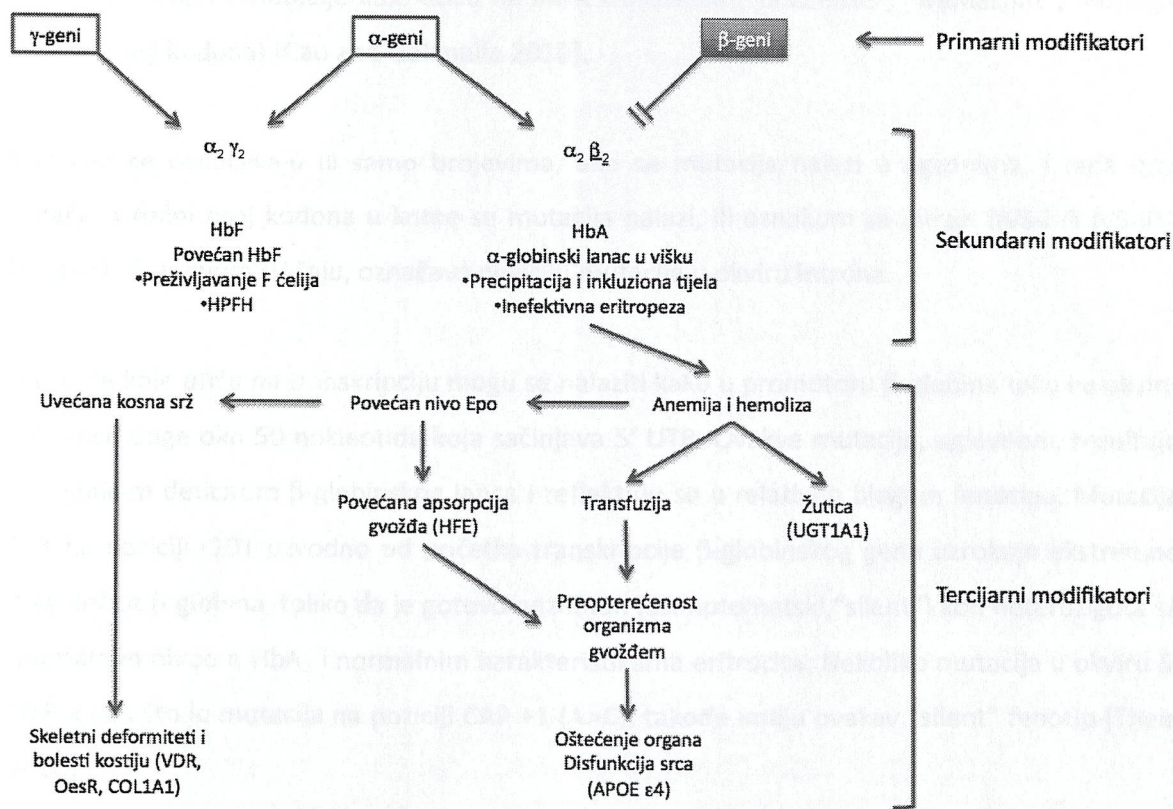
1. talasemija minor ili "trait" – blaga, neprogresivna, hipohromna i mikrocitna anemija, heterozigotni nosioci;
2. talasemija intermedija – srednje težak poremećaj, dvostruki heterozigoti za blaže mutacije, koje ne uzrokuju značajno smanjenje sinteze odgovarajućeg globinskog lanca;
3. talasemija major, Cooley-eva anemija – težak poremećaj, izrazita, kontinuirana zavisnost od transfuzije krvi, najčešće homozigoti ili dvostruki heterozigoti.

Pri razmatranju hematoloških aspekata talasemijskih sindroma, uzimaju se u obzir sledeći hematološki parametri: pored sniženog nivoa hemoglobina, koji ne mora biti naročito indikativan, to su još i MCV (srednji volumen eritrocita), čija je normalna vrijednost 85 – 95 fl i predstavlja mjeru za mikrocitozu, MCH (prosječni sadržaj hemoglobina u eritrocitu), čija se normalna vrijednost kreće od 27 pg do 32 pg i koji je mjera za hipohromiju, i RDW (distribucija eritrocita po volumenu), čije su normalne vrijednosti 8,5% – 11,5% i koji je mjera za anizocitozu (nejednakost u veličini eritrocita). Vrijednosti RDW veće od normalnih ukazuju na talasemijski sindrom. Za diferencijalnu dijagnostiku talasemija od neprocjenljivog su značaja i nivoi HbA, HbA₂ i HbF u krvi.

MODIFIKATORI β -TALASEMIJSKIH SINDROMA

β -talasemija uglavnom je uzrokovana jednom od preko 200 tačkastih mutacija, opisanih do sada. Međutim, genotipska varijabilnost u odgovarajućem lokusu često nije dovoljna da bi objasnila veliku fenotipsku varijabilnost koja se javlja kod pacijenata sa istim genotipom. Ovo neslaganje između genotipa i fenotipa najizraženije je u slučajevima talasemije intermedije i može se objasniti postojanjem drugih genetičkih modifikatora [Rund and Rachmilewitz 2005].

Faktori koji utiču na β -talasemijski fenotip djeluju na tri nivoa. Primarni modifikatori obično se odnose na vrstu mutacije koja pogađa sam β -globinski gen. Sekundarni modifikatori predstavljaju promjene u lokusima koji utiču na balans α/β -globinskih lanaca i uključuju kako α - i γ -globinske gene, tako i gene koji utiču na ekspresiju γ -globinskih gena i na stabilnost i količinu α -globinskog lanca. U tercijarne modifikatore ubrajaju se lokusi koji utiču na komplikacije izazvane β -talasemijama, kao što su bolesti kostiju i kamen u žuči (Slika 6) [Thein 2004].



Slika 6. Patofiziologija β -talasemija. Primarni, sekundarni i tercijarni modifikatori β -talasemijskih sindroma.

Primarni modifikatori β -talasemijskih sindroma

β -talasemije su veoma heterogene i na molekularnom nivou. Većina mutacija koje dovode do pojave bolesti su tačkaste mutacije, male delecije ili insercije.

Lokacija mutacija u različitim funkcionalnim regionima gena određuje težinu kliničke slike, pa su tako mutacije i podijeljene na mutacije koje utiču na transkripciju β -globinskog gena (promotorske i 5' UTR mutacije), mutacije koje utiču na procesovanje β -globinske iRNK (mutacije koje mijenjaju mjesta iskrajanja, mutacije koje kreiraju alternativna mjesta iskrajanja,

3' UTR mutacije) i mutacije koje utiču na iRNK translaciju ("nonsense", "frameshift", mutacije inicijacionog kodona) [Cao and Galanello 2010].

Mutacije se označavaju ili samo brojevima, ako se mutacija nalazi u egzonima, i tada broj označava redni broj kodona u kome se mutacija nalazi, ili oznakom za intron (IVS-I ili IVS-II) i brojem koji, u ovom slučaju, označava poziciju mutacije u okviru introna.

Mutacije koje utiču na transkripciju mogu se nalaziti kako u promotoru β -globina tako i u okviru sekvence duge oko 50 nukleotida koja sačinjava 5' UTR. Ovakve mutacije, uglavnom, rezultuju minimalnim deficitom β -globinskog lanca i reflektuju se u relativno blagom fenotipu. Mutacija C>T na poziciji -101 uzvodno od početka transkripcije β -globinskog gena uzrokuje ekstremno blag deficit β -globina, toliko da je gotovo neznan (asimptomatski, "silent") kod heterozigota sa normalnim nivoom HbA₂ i normalnim karakteristikama eritrocita. Nekoliko mutacija u okviru 5' UTR-a kao što je mutacija na poziciji CAP +1 (A>C), takođe imaju ovakav "silent" fenotip [Thein 2004].

Mutacije koje utiču na obradu β -globinske iRNK pogađaju kako donorsko i akceptorsko mjesto u intronima, tako i konsenzusne sekvence koje okružuju ova mjesta. Mutacije koje dovode do promjene donorskog i akceptorskog mjesta iskrajanja blokiraju produkciju funkcionalne iRNK tako da se β -globinski lanci uopšte ne sintetišu i dolazi do β^0 talasemije. U ove mutacije se ubrajaju one koje se javljaju na pozicijama IVS-I-1, IVS-I-2, IVS-II-1 i IVS-I-130. Mutacije koje pogađaju konsenzus sekvence koje se nalaze oko donorskog i akceptorskog mjesta iskrajanja smanjuju efikasnost normalnog iskrajanja od 70% do 95% i dovode do β^+ talasemije [Pavlović 2006]. Primjer ovakvih mutacija su mutacije na poziciji IVS-I-6, IVS-I-5. Drugi tip mutacija u okviru ovih konsenzus sekvenci favorizuje obradu na "pogrešnim" tj. kriptičnim mjestima iskrajanja. Iskrajanje iRNK na ovim mjestima dovodi do produkcije nefunkcionalne iRNK što rezultira fenotipom β^+ talasemije [Kazazian 1990].

Mutacije koje narušavaju translaciju iRNK bilo u fazi inicijacije ili elongacije su povezane sa β^0 fenotipom. Oko polovine svih β -talasemijskih alela se karakteriše preranom terminacijom elongacije β -globinskog lanca. Oni su rezultat uvođenja novog terminacionog kodona usled promjene okvira čitanja ili kao posledica "nonsense" mutacija i gotovo kod svih dolazi do terminacije u okviru prvog ili drugog egzona. Ove mutacije povezane su sa postojanjem minimalnih količina stabilnih, mutiranih β -globinskih iRNK u eritroidnim ćelijama. Kod heterozigota u ovim slučajevima, uopšte se ne proizvodi β -globinski lanac sa mutantnog alela i prisutna je samo polovina normalne količine β -globina, što ipak rezultuje asimptomatskim fenotipom [Thein 2005a].

Sekundarni modifikatori β -talasemijskih sindroma

Težina hemolize kod β -talasemije odražava stepen narušene ravnoteže u količini globinskih lanaca. Neravnotežu u količini globinskih lanaca genetski mogu modifikovati dva faktora – varijacije u količini proizvedenog α -globina i varijacije u količini proizvedenog fetalnog hemoglobina.

α -globinski genotip

U mnogim populacijama gdje je β -talasemija preovlađujuća, javlja se i α -talasemija sa visokom učestalošću i zato nije neuobičajeno da se oba stanja naslijede zajedno. Homozigoti ili kombinovani heterozigoti za β -talasemiju koji naslijede i α -talasemiju imaju manje α -globina u višku i zbog toga, blažu kliničku sliku. Naime, iako do anemije dolazi, prije svega, usled neefektivne eritropoeze, jedan od uzročnika klinički relevantnog simptoma ove bolesti, hemolize, je i apoptoza zrelih eritrocita koji sadrže inkluziona tijela α -globina. Faktori koji smanjuju količinu α -globinskih lanaca u eritroidnim prekursorima, imaju, stoga, modulišući efekat na fenotip. Interakcija α - i β -talasemije predstavlja osnovu za značajnu heterogenost bolesti u kliničkom smislu; stepen ublažavanja bolesti zavisi od samih alela β -talasemije kao i od broja funkcionalnih α -globinskih gena [Ho *et al.* 1998]. Konasleđivanje delecije samo jednog α -

globinskog gena ima vrlo mali efekat na fenotip β^0 -talasemija, dok osobe koje imaju deletirana dva α -globinska gena i homozigotnu β^+ -talasemiju, mogu imati blažu formu talasemije intermedije. Takođe, blaži oblik talasemije javlja se kod pacijenata koji su naslijedili samo jedan funkcionalan α -gen i homozigotnu β -talasemiju [Thein 2005a].

Kao što udruženo nasljeđivanje α -talasemije može da ublaži kliničku sliku homozigotne β -talasemije, prisutvo povećane količine α -globinskog lanca kod heterozigotnih nosilaca β -talasemije, u većoj mjeri narušava ravnotežu u količini globinskih lanaca što dovodi do toga da klinički asimptomatsko stanje prelazi u talasemiju intermediju [Galanello *et al.* 1983]. Fenotip heterozigotne β -talasemije kome doprinosi samo jedan α -globinski gen u višku ($\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$) je varijabilan i zavisi od težine alela β -talasemije [Camaschella *et al.* 1997]. Iz ovakvih studija izvodi se zaključak da postoji određena granica kada je u pitanju narušena ravnoteža globinskih lanaca, iznad koje se javljaju klinički simptomi. Ovo može biti povezano sa efikasnošću proteolitičkog mehanizma eritroidnih prekursora i/ili sa nivoom α -hemoglobin stabilizirajućeg proteina (AHSP), šaperona α -globina. Naime, AHSP formira stabilne komplekse sa slobodnim α -globinskim lancima i time onemogućava formiranje precipitata. U nedostatku ovog proteina, dolazi do povećane apoptoze eritroidnih prekursora i do teže kliničke slike β -talasemije [Cao and Galanello 2010].

Varijacije u sintezi HbF – HPFH

Nasledno prisustvo fetalnog hemoglobina (HPFH – hereditary persistence of fetal hemoglobin, eng.) je poremećaj koji se manifestuje nastavkom sinteze fetalnih, γ -globinskih polipeptida, a samim tim i fetalnog hemoglobina i kod adulta. Ova sinteza HbF djelimično ublažava kliničku sliku β -talasemijskih sindroma jer se nedostatak funkcionalnog β -globinskog lanca kompenzuje viškom γ -globinskih lanaca.

Opisana su dva glavna tipa HPFH sindroma :

- pancelularni tip HPFH, koji se karakteriše veoma visokim nivoom sinteze fetalnog hemoglobina i njegovom uniformnom distribucijom u svim ćelijama crvene loze i
- heterocelularni tip HPFH, koji je rezultat genetski determinisanog povećanja broja F ćelija.

Pancelularni tip HPFH se može podijeliti u dvije klase i to prvu, koja nastaje kao posledica delecija i drugu, u čijoj osnovi leže tačkaste mutacije.

Delecione forme pancelularnog tipa HPFH posledica su velikih delecija unutar β -globinskog lokusa koje se na 5' kraju javljaju između γ - i δ -globinskog gena i obuhvataju δ - i β -globinske gene, dio intergenskog regiona između γ - i δ -globinskih gena ili izrazito veliki region DNK, tako da se protežu nizvodno od 3' kraja β -globinskog lokusa [Tuan *et al.* 1980]. Objašnjenje koje se može ponuditi za povećanu ekspresiju i pancelularnu distribuciju HbF kod ovih sindroma je činjenica da ovakvi genski rearanžmani dovode udaljene enhansere u blizinu γ -globinskih gena, te da dolazi do interakcije pozitivnih regulatora ovih gena sa dodatnim enhanserom [Feingold and Forget 1989].

Nedelecione forme HPFH su najčešće rezultat zamjene jedne baze u promotorima γ ili γ -globinskih gena [Chen *et al.* 2008; Gilman and Huisman 1985]. Postoje tri promotorska regiona γ i γ -gena u okviru kojih se grupiše većina mutacija koje za posledicu imaju povećanje transkripcije γ -globinskih gena: oko pozicija -114 do -117, na poziciji -175, i na pozicijama od -195 do -202 [Thein 2004].

Sva tri istaknuta regiona sadrže regulatorne elemente koji vezuju mnoštvo transkripcionih faktora. Prvi region, na poziciji -202, sadrži vezivno mjesto za transkripcioni faktor Sp1. Za neke od ovih mutacija je jasno pokazano da povećavaju afinitet za vezivanje ovog transkripcionog faktora [Sykes and Kaufman 1990] dok za druge važi obrnuto [Fischer and Nowock 1990]. Region u kome je registrovana mutacija -175, sadrži vezivna mjesta za opšti transkripcioni faktor, OCT1, i eritroidno-specifični GATA-1. Region na poziciji -117 je distalni CCAAT blok, koji vezuje opšte CP1 i CDP transkripcione faktore i eritroidno-specifične GATA-1 i NF-E3. Mutacije u

ovom regionu dovode do slabije interakcije CCAAT bloka i eritroidno-specifičnih transkripcionih faktora, dok se opšti faktori ponašaju suprotno ovome [Superti-Furga *et al.* 1988].

Novija istraživanja promotorskog regiona γ -globinskih gena ukazala su na postojanje nekoliko mutacija koje se dovode u vezu sa nedelecionom formom HPFH a locirane su van, do sada poznatog, -202 do -110 regiona. Naime, mutacije -567 (C>G) i -109 (G>T) u promotoru γ -globinskog gena dovode do povećane ekspresije ovog gena ukidajući vezujuća mjesta GATA-1, odnosno NF-E3 transkripcionih faktora, za koje se pretpostavlja da učestvuju u supresiji transkripcije ovog gena [Chen *et al.* 2008; Chassanidis *et al.* 2009].

Konasleđivanje heterocelularne forme HPFH rezultuje blažom kliničkom slikom homozigotne β -talasemije, što je i pokazano u više familija u Aziji i na Sardiniji [Cao *et al.* 1994].

Heterocelularni tip HPFH često je posledica mutacija van β -globinskog genskog lokusa [Forget 2000]. Pacijenti koji se karakterišu ovim sindromom sadrže ekstremno veliki broj F ćelija u adultnom periodu života. Nivo HbF je obično znatno niži nego kod pancelularnog tipa HPFH. Ovdje pripadaju i mutacije za koje se misli da su odgovorne za povišeni nivo sinteze HbF, ali se pojava ispoljava samo u prisustvu faktora koji izazivaju eritroidni stres. Takva je i mutacija -158 (C>T) u γ -globinskom genu [Gilman and Huisman 1985].

Zamjena C>T na poziciji -158 u promotoru γ -globinskog gena ili *XmnI*- γ polimorfizam, veoma je čest polimorfizam u svijetu i javlja se sa učestalošću od oko 35% [Thein 2004]. Iako ima mali efekat kod normalnih osoba, klinička ispitivanja su pokazala da, u uslovima hematopoetskog stresa, kao što je homozigotna β -talasemija i anemija srpastih ćelija, prisustvo *XmnI* polimorfizma dovodi do povećanja ekspresije HbF [Kolia *et al.* 2008; Labie *et al.* 1985a]. Ovo bi moglo da objasni zašto su iste mutacije u različitim β -hromozomalnim okruženjima (prisustvo ili odsustvo *XmnI* polimorfizma) povezane sa različitom težinom kliničke slike. Međutim, brojna istraživanja ne idu u prilog ovoj tvrdnji [Poznanic *et al.* 2003; Labie *et al.* 1985b], te hipoteza o *XmnI* polimorfizmu u promotoru γ -globinskog gena kao faktoru koji je dovoljan za idukciju HbF u *in vivo* uslovima ostaje nepotvđena. Naime, i nakon 25 godina izučavanja, još uvijek nije jasno

da li ovaj *XmnI* polimorfizam nezavisno ili udruženo sa drugim faktorima utiče na nivo HbF u organizmu [Sankaran *et al.* 2010a].

Varijacije u sintezi HbF – geni modifikatori izvan globinskih genskih lokusa

Eritropoetin

Eritropetin (Epo) je 30 kDa glikoprotein koji se primarno sintetiše u bubrežnim ćelijama i u manjoj mjeri, u ćelijama jetre kao odgovor na smanjenu količinu kiseonika u organizmu i nepohodan je u procesu eritropoeze. Epo dovodi do uvećanja broja ćelija crvene loze stimulišući proliferaciju i diferencijaciju relativno zrelih eritroidnih progenitora u procesu koji se označava kao eritroidni stres [Weiss *et al.* 1997; Suzuki *et al.* 2006]. Pored toga, Epo smanjuje apoptozu i produžava preživljavanje eritroidnih ćelija kroz indukciju Bcl-2 familije proteina, Bcl-X i Mcl-1 [Perrine 2005]. Takođe, pokazano je da je Epo jedan od farmakoloških agenasa koji indukuju sintezu γ -globinskih polipeptida [Witt *et al.* 2003]. Naime, pretpostavlja se da eritroidna ekspanzija, posredovana Epo, dovodi do idukcije HbF jer dolazi do proliferacije ranih eritroidnih prekursora koji zadržavaju mogućnost ekspresije fetalnih gena [Blau *et al.* 1993].

Ova funkcija eritropoetina, ustanovljena kod talasemičnih miševa i eritroidnih ćelijskih kultura β -talasemijskih pacijenata, predstavlja i racionalizaciju koja stoji u pozadini *in vivo* primjene Epo kao terapijstva kod pacijenata oboljelih od talasemije [Gambari and Fibach 2007].

Varijacije u sintezi HbF – novi potencijalni geni-modifikatori

Iako su brojna istraživanja fokusirana na biohemijsku karakterizaciju regulacije ekspresije globinskih gena, veliki pomaci na ovom polju načinjeni su u okviru humane genetike. Naime, rezultati analize kompletnog genoma (GWAS - Genome-Wide Association Studies) ukazali su na postojanje čestih polimorfizama u okviru svega tri lokusa koji se dovode u vezu sa varijacijom u nivou fetalnog hemoglobina. Ova tri lokusa uključuju klaster β -globinskih gena, kao što je već

spomenuto, intergenski region između *HBS1L* i *MYB* gena i *BCL11A* gen [Nguyen *et al.* 2010]. Kao jedan od faktora koji može uticati na nivo HbF, u protekloj godini javio se i KLF1 transkripcioni faktor kao glavni eritroidni regulator.

HBS1L – MYB

Varijante u *HBS1L-MYB* intergenskom regionu doprinose sa više od 20% varijacijama u nivou HbF, detektovanim u zdravim populacijama u Evropi. Većina ovih polimorfizama javljaju se u okviru segmenta dugog 79 kb i raspoređene su u tri bloka koja su obilježena kao HMIP 1, 2 i 3 (HMIP – *HBS1L-MYB* intergenic polymorphism. eng.). Genetičke varijante koje pokazuju najveći efekat na nivo HbF locirane su u okviru 24 kb dugog regiona HMPI 2 bloka [Thein *et al.* 2007]. Polimorfizmi za koje je pokazana asocijacija sa nivoom HbF uključuju, između ostalih, polimorfizme rs9399137, rs28384513 i rs4895441 [Lettre *et al.* 2008].

Mehanizam koji omogućava ovim genetičkim varijantama da utiču na nivo HbF još uvijek nije poznat, ali rezultati brojnih studija ukazuju da se ovaj biološki efekat ostvaruje preko regulacije okolnih gena, tj. *HBS1L* i *MYB* gena. Naime, pokazano je da ovaj intergenski region ima ulogu regulatornog elementa na šta ukazuje postojanje mjesta za vezivanje transkripcionih faktora kao što je GATA-1 [Wahlberg *et al.* 2009]. Smatra se da ovaj regulatorni region kontroliše ekspresiju *MYB* gena koji kodira eritroidni transkripcioni faktor, što dalje utiče na eritroidnu diferencijaciju i, indirektno, na nivo HbF [Thein *et al.* 2009].

BCL11A

BCL11A (B-cell CLL/lymphoma 11A) je transkripcioni represor aktivan u B-limfocitima koji se eksprimira i u eritroidnim ćelijama. Ovaj protein sa DNK vezujućim domenom u vidu "cinkanog prstića" (zinc-finger, eng.) kodiran je od strane istoimenog gena koji se prostire sa preko 102 kb na hromozomu 2p16 [Chen *et al.* 2009]. U GWAS studijama ustanovljeno je postojanje veze između genetičkih varijanti u okviru *BCL11A* gena i nivoa HbF u različitim populacijama

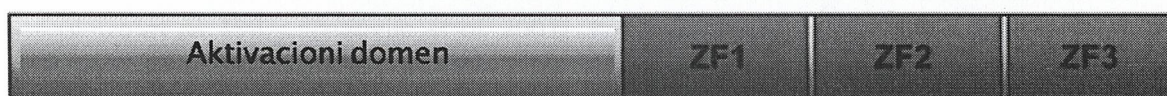
[Sankaran *et al.* 2010b]. Tačnije, oko 15% ukupne varijabilnosti u nivou HbF moglo se pripisati polimorfizmima nađenim u drugom intronu *BCL11A* gena, kao što su rs11886868 i rs4671393 [Sankaran *et al.* 2010a; Lettre *et al.* 2008]. Daljim istraživanjima ustanovljeno je da je *BCL11A* represor γ -globinskih gena [Sankaran *et al.* 2008] koji se ne vezuje direktno za promotorski region ovih gena, već za LCR, kao i za intergenski region između γ - i δ -globinskog gena, za koji je već pokazana asocijacija sa γ -globinskom genskom represijom [Bank 2006]. Svoju represorsku ulogu *BCL11A* vjerovatno ostvaruje u interakciji sa brojnim transkripcionim faktorima kao što su jedarni deacetilazni kompleks (NuRD), eritroidni transkripcioni faktori, GATA-1 i FOG-1, kao i SOX6 za koga je pokazano da djeluje kao represor embrionalnih globinskih gena kod miša [Bauer and Orkin 2011].

Tvrdnja da *BCL11A* djeluje kao represor γ -globinskih gena leži i u činjenici da je nivo ekspresije *BCL11A* gena u adultnom stupnju viši u odnosu na nivo ekspresije ovog gena u fetalnom stupnju razvika [Bauer and Orkin 2011; Sankaran *et al.* 2010b]. Kao direktni represor fetalnih globinskih gena, *BCL11A* je prvi genetički i biohemijski potvrđen faktor koji učestvuje u molekulskom "switch"-u globinskih gena [Sankaran *et al.* 2010a]. Kao takav, ovaj transkripcioni faktor predstavlja potencijalni terapijski target protein za indukciju HbF. Međutim, kako *BCL11A* funkcioniše kao transkripcioni faktor i u neeritroidnim ćelijama, postavlja se pitanje u kom stepenu će inhibicija produkcije *BCL11A* uticati na ovu njegovu ulogu.

KLF1

Eritroidni Kruppel-Like Faktor, KLF1 (EKLF), ključni je eritroidno-specifični transkripcioni faktor koji se vezuje za CACCC motiv, važan regulatorni element mnogih eritroidnih gena, uključujući *BCL11A* i β -globinski gen [Ouyang *et al.* 1998; Borg *et al.* 2010]. Vezivanje KLF1 transkripcionog faktora za ove motive ostvaruje se preko tri DNK vezujuća domena u vidu "cinkanih prstića" koji su ključni za aktivaciju KLF1 taget gena. KLF1 takođe sadrži i prolinom bogat transaktivacioni domen koji je neophodan za specifičnu aktivaciju ovih globinskih gena (Slika 7). Ovaj transaktivacioni domen građen je iz inhibitornog (AK 195-291) i aktivacionog (AK 20-124)

domena. Aktivacioni region u okviru transaktivacionog domena KLF1 transkripcionog faktora interaguje sa brojnim ćelijskim proteinima uspostavljajući, na taj način, optimalan potencijal aktivacije. S druge strane, inhibitorni region funkcionise tako što onemogućava efikasno vezivanje DNK vezujućeg domena za specifičnu DNK sekvencu [Chen and Bieker 1996]. Pretpostavlja se da aktivacija KLF1 dovodi do konformacione promjene u samom proteinu, što dalje dovodi do otvaranja ovog transkripcionog faktora i efikasnog vezivanja KLF1 za određenu DNK sekvencu. Kako je poznato da KLF1 podliježe brojnim posttranslacionim modifikacijama, kao što su fosforilacija i acetilacija, smatra se da ovi procesi mogu dovesti do aktivacije KLF1 transkripcionog faktora [Bieker 2005].



Slika 7. Shematski prikaz KLF1 transkripcionog faktora kod čovjeka. DNK vezujući domeni u vidu “cinkanih prstića” obilježeni su kao ZF1, ZF2 i ZF3.

Direktna asocijacija mutacija u okviru *KLF1* gena sa regulacijom hemoglobina ustanovljena je od strane Borg J, et al [Borg *et al.* 2010]. Naime, nađeno je da je HPFH, detektovana kod 10 od 27 članova porodice sa Malte, posledica tačkaste mutacije u *KLF1* genu (p.K288X) koja u potpunosti ukida funkciju DNK vezujućeg domena, na taj način onemogućavajući ulogu KLF1 kao transkripcionog faktora. Kao posledica, dolazi do smanjene ekspresije *BCL11A* gena, odnosno do smanjene sinteze BCL11A, represora fetalnih globinskih gena, što u krajnjem vodi ka povišenom nivou HbF [Borg *et al.* 2010; Zhou *et al.* 2010].

Broj do sada detektovanih mutacija u *KLF1* genu, kao i naše znanje o različitim fenotipovima koji se dovode u vezu sa ovim mutacijama je veoma malo [Borg *et al.* 2010], međutim, studije o KLF1 mutacijama [Satta *et al.* 2011; Borg *et al.* 2010; Arnaud *et al.* 2010; Singleton *et al.* 2008], otvorile su vrata novim istraživanjima na polju humane eritropoeze. Novootkrivene i

funkcionalno okarakterisane genetičke varijante u ovom i drugim genima modifikatorima β -talasemijskih sindroma (*BCL11A*, *HBS1L-MYB*), mogu poslužiti kao meta za gensku terapiju talasemija u budućnosti.

Tercijarni modifikatori β -talasemijskih sindroma

Hiperbilirubinemija i sklonost ka nastajanju kamena u žuči je uobičajena komplikacija kod pacijenata sa β -talasemijom i uslovljena je brzom hemolizom eritrocita s obzirom na to da je bilirubin produkt hemoglobina. Različiti stupnjevi ikterusa (žutice) su često primijećeni kod talasemijskih sindroma – od talasemije minor (trait) do talasemije major [Galanello *et al.* 1997; Sampietro *et al.* 1997; Galanello *et al.* 2001]. Proučavanja su pokazala da su nivoi bilirubina i pojavljivanje kamena u žuči kod β -talasemija povezani sa polimorfnom varijantom (sedam TA ponovaka) u promotorskom regionu gena za uridin-difosfat – glukoniltransferazu 1A (*UGT1A*) [Bosma *et al.* 1995], što se još naziva i Žilbertov sindrom. Pokazano je da je (TA)⁷ varijanta povezana sa povišenim nivoom bilirubina i kod anemije srpastih ćelija i drugih hemolitičkih anemija [Passon *et al.* 2001].

Uobičajena komplikacija β -talasemije uključuje oštećenje organa zbog nagomilavanja gvožđa, ne samo zbog transfuzija već i zbog povećane apsorpcije u digestivnom traktu. Mutacija p.C282Y u *HFE1* genu, koja uslovljava naslednu hemohromatozu, predstavlja predispoziciju za nagomilavanje gvožđa kod talasemije intermedije [Rees *et al.* 1997].

Progresivna osteoporoza i osteopenija je još jedna uobičajena komplikacija koja se sreće kod mladih adulta sa β -talasemijom [Wonke 1998]. Genetički lokusi za koje se pretpostavlja da su uključeni u genetičku kontrolu koštane mase uključuju gen za receptor za estrogen, gen za receptor za vitamin D (VDR; vitamin D receptor, eng.), gen za kolagen tipa α 1 i α 2 (*COLA1*, *COLA2*) kao i gen za transformišući faktor rasta β 1 (*TGF β 1*).

Talasemija je praćena i hiperkoagulacionim stanjem [Eldor and Rachmilewitz 2002]. Zbog toga, genetički faktori rizika za tromboze, kao što su mutacije u genu za Faktor V, Faktor II i metilentetrahidrofolat reduktazu (*MTHFR*), mogu značajno da doprinesu pojavi, i oštećenjima nastalim usled pojave, trombotičkih insulta.

Hemoglobinopatije u koje spadaju i talasemijski sindromi, predstavljaju najčešća monogenska oboljenja u svijetu. Uprkos činjenici da u osnovi ovih bolesti leže genetičke varijante vezane za jedan genetički lokus, ova oboljenja karakteriše velika fenotipska varijabilnost. U fokusu savremenih istraživanja je uticaj gena-modifikatora na fenotipsku varijabilnost β -talasemijskih sindroma. U prvu kategoriju gena-modifikatora β -talasemijskih sindroma ubraja se tip alelskih varijanti unutar β -globinskog gena i njihova kombinacija (β -globinski genotip). Među sekundarnom genima-modifikatorima ističu se oni kojima se može pripisati efekat na ekspresiju fetalnog hemoglobina (HbF) u krvi. Proučavanje alelskih varijanti, uzročnika β -talasemijskih sindroma kao primarnih gena-modifikatora talasemijskog fenotipa, kao i hromozomskog miljea (haplotipovi u β -globinskom lokusu) u kome su ove mutacije nastale u srpskoj populaciji, može objasniti različite kliničke manifestacije kod pacijenata, što je od suštinske važnosti za liječenje i genetički savjet u slučajevima prenatalne dijagnostike. Izučavanje sekundarnih gena-modifikatora β -talasemijskih sindroma može doprinijeti osmišljavanju genske terapije ovog monogenetskog oboljenja u budućnosti. Stoga su ciljevi ovog istraživanja sledeći:

- Sprovođenje ekstenzivne populaciono-genetičke studije koja za osnovu ima analizu učestalosti najčešćih alelskih varijanti i genotipova, uzročnika β -talasemija u Srbiji.
- Sprovođenje haplotipske analize β -globinskog lokusa, kako bi se ispitao uticaj hromozomskog okruženja (miljea) na fenotip. Haplotopska analiza će dati i rezultate značajne za populacionu genetiku, kao što su: protok gena među populacijama koje su kroz istoriju dolazile u kontakt sa srpskom populacijom i porijeklo β -talasemijskih mutacija u Srbiji.
- *In vitro* funkcionalna analiza *XmnI* polimorfizma u okviru promotorskog regiona γ -globinskog gena kao potencijalnog modifikatora fenotipa β -talasemijskih sindroma, u standardnim uslovima i uslovima eritroidnog stresa. Analiza interakcije ovog transkripcionog regulatornog elementa i transkripcionih faktora.

- Populaciona analiza *XmnI* polimorfizma i njegov uticaj na povišenu ekspresiju HbF u adultnom dobu u srpskoj populaciji.
- *In vitro* funkcionalna karakterizacija delecije (-AGCA) na poziciji -225 do -222 promotorskog regiona γ -globinskog gena kao potencijalnog modifikatora fenotipa β -talasemijskih sindroma, u standardnim uslovima i uslovima eritroidnog stresa. Analiza interakcije ovog transkripcionog regulatornog elementa i transkripcionih faktora.
- Detekcija genetičkih varijanti u *KLF1* genu čovjeka kao mogućih uzročnika povišenog nivoa fetalnog hemoglobina (HbF) u adultnom dobu: potencijalni sekundarni modifikatori fenotipa β -talasemijskih sindroma.
- Proučavanje uticaja detektovanih genetičkih varijanti u *KLF1* genu na ekspresiju *KLF1* i *BCL11A* gena.
- Sprovođenje populaciono-genetičke studije u cilju utvrđivanja najčešćih genetičkih varijanti u okviru *KLF1* gena u srpskoj populaciji.

MATERIJAL I METODE

MATERIJAL

BIOLOŠKI MATERIJAL

DNK i RNK

DNK koja je korišćena u ovom radu izolovana je iz pune krvi 63 zdravih individua i 130 pacijenata prezentovanih sa anemijom, mikrocitozom, hipohromijom i hematološkim parametrima koji su ukazivali na prisustvo talasemije. Dijagnoza dijela pacijenata postavljena je na Hematoonkološkom odeljenju Univerzitetske dečje klinike u Beogradu, dok je drugi dio pacijenata dijagnostifikovan na Institutu za majku i dete “Dr Vukan Čupić” u Beogradu. Krv je uzimana sa 3,8% Na-citratom kao antikoagulansom, u odnosu 9:1 i transportovana do Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo gdje je vršena izolacija DNK i RNK.

Za ovo istraživanje postoji odobrenje etičkog komiteta Instituta za majku i dete “Dr Vukan Čupić”, Beograd.

Ćelijske linije

Za dobijanje jedarnih ekstrakata za EMSA eksperimente kao i u eksperimentima tranzijentne transfekcije korišćena je humana K562 eritroleukemična ćelijska linija [Lozzio *et al.* 1973; Lozzio *et al.* 1975].

Bakterijski soj

U ovom radu je korišćen bakterijski soj DH5α *E. coli* [Gough *et al.* 1983].

PLAZMIDNI VEKTORI

Za pravljenje konstrukata u cilju ispitivanja uticaja tačkastih mutacija tj. malih delecija u promotorskom regionu γ globinskih gena na aktivnost datog promotora korišćen je pCATbasic vektor (Promega). Kao pozitivna kontrola u eksperimentima tranzijentne transfekcije korišćen je pBLCAT5 vektor [Boshart *et al.* 1992]. Kao kontrola efikasnosti transfekcije korišćen je pCH110 plazmid (Amersham Pharmacia Biotech) koji eksprimira gen za β -galaktozidazu. Kao kontrola digestije PCR produkata korišćen je pUC18 vektor [Vieira *et al.* 1982; Messing 1983].

PRAJMERI

U različitim PCR reakcijama korišćeni su odgovarajući specifični prajmeri, čiji su nazivi i sekvence navedeni u tabelama 3 – 12. U reakcijama sekvenciranja korišćeni su prajmeri upotrebljeni u PCR reakciji.

Tabela 3. Kontrolni i zajednički prajmeri korišćeni za detekciju najučestalijih mutacija u kodirajućem regionu β globinskog gena

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
A	5'– CAATGTATCATGCCTCTTTGCACC –3'
B	5'– GAGTCAAGGCTGAGAGATGCAGGA –3'
C	5'– ACCTCACCTGTGGAGCCAC –3'
R37	5'– CCAATCTACTCCCAGGAGCA –3'
R47	5'– CACTCAGTGTGGCAAAGGTG–3'
R96	5'– TCGGCCCATCACTTTGGCAA –3'
D	5'– CAACTTCATCCACGTTCAACC –3'
R61	5'– CACTGACCTCCCACATTCCC –3'

Tabela 4. Prajmeri korišćeni za detekciju najučestalijih β -talasemijskih mutacija u mediteranskoj populaciji

Mutacija	Sekvenca prajmera	Sa prajmerom	Bp
β^+ IVSI-110 (G→A)*	M: 5'– ACCAGCAGCCTAAGGGTGGGAAAATACACT –3' N: 5'– ACCAGCAGCCTAAGGGTGGGAAAATACACC –3'	C C	390 390
β^0 IVSI-1 (G→A)*	M: 5'– TTAAACCTGTCTTGTAACCTTGATACGAAT –3' N: 5'– TTAAACCTGTCTTGTAACCTTGATACGAAC –3'	C C	281 281
β^+ IVSI-6 (T→C)*	M: 5'– TCTCCTTAAACCTGTCTTGTAACCTTCATG –3' N: 5'– TCTCCTTAAACCTGTCTTGTAACCTTCATA –3'	C C	286 286
β^0 39 (C→T)*	M: 5'– CAGATCCCCAAAGGACTCAAAGAACCTGTA –3' N: 5'– CAGATCCCCAAAGGACTCAAAGAACTGTG –3'	C C	436 436
β^0 6 (-A)*	M: 5'– CCCACAGGGCAGTAACGGCAGACTTCTGCC –3' N: 5'– CCCACAGGGCAGTAACGGCAGACTTCTGCT –3'	C C	207 208
β^0 IVSII-1 (G→A)*	M: 5'– AAGAAAACATCAAGGGTCCCATAGACTGAT –3' N: 5'– AAGAAAACATCAAGGGTCCCATAGACTGAC –3'	C C	634 634
β^+ IVSII-745 (C→G)**	M: 5'– TCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCGAGG –3' N: 5'– TCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCGAGC –3'	B B	738 738
β^+ -87 (C→G)***	M: 5'– CACTTAGACCTCACCTGTGGAGCCACCCG –3' N: 5'– CACTTAGACCTCACCTGTGGAGCCACCCC –3'	D D	239 239
β^0 44 (-C)*	M: 5'– CAGCATCAGGAGTGGACAGATCCCGAAAGA –3' N: 5'– CAGCATCAGGAGTGGACAGATTCCGAAAGG –3'	C C	451 451
β^0 76 (-C)*	M: 5'– GGTACGGCTGTCATCACTTAGACCTCAGCT –3' N: 5'– GGTACGGCTGTCATCACTTAGACCTCAGCC –3'	C C	548 548
β^+ -101 (C→T)***	M: 5'– GGTACGGCTGTCATCACTTAGACCTCAGCT –3' N: 5'– GGTACGGCTGTCATCACTTAGACCTCAGCC –3'	D D	253 253
HbS (A→T)*	M: 5'– CCCACAGGGCAGTAACGGCAGACTTCTGCT –3' N: 5'– CCCACAGGGCAGTAACGGCAGACTTCTGCA –3'	C C	208 208
β^0 5 (-CT)*	M: 5'– CACAGGGCAGTAACGGCAGACTTCTCCTCG –3'	C	204
β^0 8 (-AA)*	M: 5'– CCTTGCCCCACAGGGCAGTAACGGCACACC –3'	C	214

Napomena: Fragment AxB=861 bp se koristi kao kontrolni za analize (*) mutacija
 Fragment R37xR47=527 bp se koristi kao kontrolni za analize (**) mutacija
 Fragment R96xB=675 bp se koristi kao kontrolni za analize (***) mutacija

Tabela 5. Prajmeri korišćeni za detekciju hemoglobinske varijante Hb Lepore-BW

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
Lep A	5'-GTTTTCCTACCCTCAGATT-3'
Lep B	5'-AATCATTCGTCTGTTTCCCA-3'
R37	5'- CCAATCTACTCCCAGGAGCA -3'

Tabela 6. Prajmeri korišćeni za detekciju delecije $-\alpha^{3,7}$

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
C10	5'- GATGCACCCACTGGACTCCT -3'
C3	5'- CCATTGTTGGCACATTCCGG -3'
C2	5'- CCATGCTGGCACGTTTCTGA -3'

Tabela 7. Prajmeri za detekciju polimorfizama u okviru β -globinskog genskog lokusa

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
EF	5'- GGCACATGGATCGAATTGAA -3'
ER	5'-ACCATGATGCCAGGCCTGAG-3'
GGF	5'-GTGACTAGTGCTGCAAGAA-3'
GGR	5'-TGTGCTGCAATCCAGGGAAGGGGGT-3'
AGF	5'-GGCCAAACATACATTGCTA-3'
AGR	5'-TCTGTAGTTCACTCAAAACCC-3'
PBF	5'-GAACAGAAGTTGAGATAGAGA-3'
PBR	5'-ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT-3'
3PBF	5'-TCTGCATTTGACTCTGTTAGC-3'
3PBR	5'-GGACCCTAACTGATATAACTA-3'
BF	5'-GCCAAGGACAGGTACGGCTGTCATC-3'
BR	5'-CCCTTCCTATGACATGAACTTAACCAT-3'
3BF	5'-TCACCAAGGCAATCCTAAGC-3'
3BR	5'-CCTTTGCCCACTTTTTGATG-3'

Tabela 8. Prajmeri korišćeni za kloniranje promotorskog regiona γ -globinskog gena u pCATbasic plazmidni vektor

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
A(γ)	5'-ACTGTGGCCTTTATGAAAATTGT-3'
D	5'-GGACTAGGAGCTTATTGAT-3'
AgC	5'- <u>CCCAAGCTT</u> GGACTGAATCGGAACAAGGCAA-3'
AgB	5'- <u>GCTCTAGAGCT</u> CAGACGTTCCAGAAGCGA-3'

Napomena: podvučeni regioni predstavljaju mjesta sječenja *HindIII* i *XbaI* restrikcionih enzima

Tabela 9. Prajmeri korišćeni za kloniranje promotorskog regiona γ -globinskog gena u pCATbasic plazmidni vektor

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
GgF	5'- <u>CCCAAGCTT</u> GAACTGTTGCTTTATAGGATTTT-3'
GgR	5'- <u>GCTCTAGAGC</u> AGGAGCTTATTGATAACTCAGAC-3'

Napomena: podvučeni regioni predstavljaju mjesta sječenja *HindIII* i *XbaI* restrikcionih enzima

Tabela 10. Prajmeri korišćeni za umnožavanje regiona *KLF1* gena

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
KLF1-E1 F	5'-GCTTTGGACACAGGGTTAGT-3'
KLF1-E1 R	5'-TCAGGTCAAGATGCAGGTCT-3'
KLF1-E2a F	5'-TTCCAAAGCCTCTGCGTCAG-3'
KLF1-E2a R	5'-ACGCCGCAGGCACTGAAAG-3'
KLF1-E2b F	5'-GGGAGGAAGAGGACGATGA-3'
KLF1-E2b R	5'-GGACAAGGAAGCCATAAGC-3'
KLF1-E3 F	5'-AGGCTGAGTAAAGGGGTGTG-3'
KLF1-E3 R	5'-ACCTTCAGGAGCCGCTTTCT-3'

Tabela 11. DGGE prajmeri za detekciju mutacija u γ -globinskom genu

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
A za A γ	5'– ACTGTGGCCTTTATGAAAATTGT –3'
A za G γ	5'– ACTGTTGCTTTATAGGAT –3'
B	5'– TCAGACGTTCCAGAAGCGA –3' + 20 GC clamp
C	5'– GACTGAATCGGAACAAGGCAA –3'
D	5'– GGACTAGGAGCTTATTGAT –3'

Tabela 12. Sekvence prajmera za RQ-PCR *GAPDH* i *BCL11A* gena

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
GAPDH-F	5'–GTGAAGGTCGGAGTCAACG–3'
GAPDH-R	5'–TGAGGTCAATGAAGGGGTC–3'
BCL11A-F	5'–CGAGCACAAACGGAAACAATG–3'
BCL11A-R	5'–GATTAGAGCTCCATGTGCAGAACG–3'

OLIGONUKLEOTIDNE PROBE

Oligonukleotidi korišćeni u EMSA esejima, navedeni su u tabeli 13.

Tabela 13. Oligonukleotidi korišćeni u EMSA esejima

Naziv oligonukleotida	Sekvenca oligonukleotida
Xmnl WT coding	5'-TCTGTCTGAAACGGTCCCTGGCTAAACTCC-3'
Xmnl WT noncoding	5'-GGAGTTTAGCCAGGGACCGTTTCAGACAGA-3'
Xmnl coding	5'-TCTGTCTGAAACGGTTCCTGGCTAAACTCC-3'
Xmnl noncoding	5'-GGAGTTTAGCCAGGAACCGTTTCAGACAGA-3'
A γ WT coding	5'-GGCTATAAAAAAATTAAGCAGCAGTATCC-3'
A γ WT noncoding	5'-GGATACTGCTGCTTAATTTTTTTTATAGCC-3'
A γ Δ coding	5'-GGCTATAAAAAAATTAGCAGTATCCTCTT-3'
A γ Δ noncoding	5'-AAGAGGATACTGCTAATTTTTTTTATAGCC-3'
KLF1 WT coding	5'-AAACAGTGCCCCCGCCGCTTGCCTTGC-3'
KLF1 WT noncoding	5'-GCAAGGCAAGGCGGCGGGGGGCACTGTTT-3'
KLF1 MUT coding	5'-AAACAGTGCCCCCGACCGCTTGCCTTGC-3'
KLF1 MUT noncoding	5'-GCAAGGCAAGGCGGTGGGGGGGCACTGTTT-3'

ANTITIJELA

Spisak antitijela i njihove karakteristike date su u tabeli 14.

Tabela 14. Spisak antitijela korišćenih u ovom radu.

Naziv antitijela	Proizvođač	Kat. broj	Porijeklo	Konc.
Sp1 (PEP2)	Santa Cruz Biotechnology	sc-59x	zec, poliklonsko IgG	200 μ g/ml

METODE

IZOLACIJA DNK IZ PERIFERNE KRVI NA KOLONI

[Prema uputstvu proizvođača QIAGEN]

U 1.5 ml epruvetu sipa se 20 µl QIAGEN proteaze, 200 µl nekoagulisanog uzorka krvi i 200 µl pufera AL. Smješa se miješa vorteksovanjem u toku 15 sek i zatim inkubira na 56°C u toku 10 min da bi se obezbijedilo liziranje ćelija i oslobađanje DNK od proteina. Nakon toga se dodaje 200 µl 100% etanola i smješa ponovo miješa vorteksovanjem u toku 15 sek. Smješa se pažljivo nanosi na QIAamp kolonu i vrši se centrifugiranje na 8000 rpm u toku 1 min da bi sadržaj prošao kroz kolonu. Eluat se odbacuje jer se DNK afinitetno vezala za kolonu, a kolona se prebacuje u novu tubu za sakupljanje eluata. Zatim se dodaje 500 µl pufera AW1 i vrši centrifugiranje na 8000 rpm u toku 1 min. U ovom koraku se DNK, koja je vezana za kolonu, ispira od nečistoća. Eluat se ponovo odbacuje, a kolona se prebacuje u novu tubu za sakupljanje eluata. U sledećem koraku, dodaje se pufer AW2 koji dodatno oslobađa DNK od nečistoća i vrši centrifugiranje na 14000 rpm u toku 3 min. Eluat se odbacuje, kolona prebacuje u novu tubu i ponavlja centrifugiranje na istoj brzini u toku 1 min kako bi se uklonili i poslednji tragovi pufera. Konačno se kolona prebacuje u čistu 1.5 ml epruvetu i dodaje se 200 µl pufera AE koji će osloboditi DNK sa kolone. Korisno je inkubirati kolonu na sobnoj temperaturi u toku 1 min kako bi se povećao prinos DNK. Centrifugiranjem na 6000 rpm u toku 1 min dobija se 190-200 µl eluata u kome je rastvorena DNK.

IZOLACIJA MONONUKLEARNIH ĆELIJA IZ ASPIRATA KOŠTANE SRŽI ILI PERIFERNE KRVI

[prema uputstvu proizvođača GE Healthcare]

Na dno sterilne epruvete zapremine 10 ml sipa se 3 ml Ficoll-Plaque PLUS (GE Healthcare), a zatim se na ovaj gradijent nanese 4 ml razblaženog uzorka (1:1, uzorak:fiziološki rastvor). Smješa se centrifugira na 1500 rpm u toku 25 min na sobnoj temperaturi, u kliničkoj centrifugi,

bez koćenja. Nakon centrifugiranja, pipetom se prebaci "buffy coat" interfaza koja je sastavljena od mononuklearnih ćelija u novu sterilnu epruvetu. Ova interfaza se zatim ispira dva puta u PBS-u. Nakon svakog ispiranja slijedi centrifugiranje na 1500 rpm u toku 15 min. Talog se resuspenduje u TRIzol®-u (Invitrogen).

IZOLACIJA RNK IZ MONONUKLEARNIH ĆELIJA

[prema uputstvu proizvođača invitrogen]

Za izolaciju RNK iz mononuklearnih ćelija korišćen je TRIzol® (Invitrogen). TRIzol® predstavlja monofazni rastvor fenola i guanidin-izotiocijanata, a sam proces izolacije predstavlja unapređen klasični metod izolacije RNK definisan od strane Chomczynski *et al.* [Chomczynski and Sacchi 1987].

U 1 ml TRIzol®-a resuspenduje se maksimalno 1×10^7 ćelija i lizira provlačenjem kroz iglu promera 0.7 mm. Liziran uzorak se ostavi da stoji na sobnoj temperaturi 5-10 min. Zatim se doda 200 μ l hloroforma, snažno promućka i uzorak ostavi da stoji 5-15 min na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja na 12000 rcf u toku 15 min na +4°C pojavljuju se jasno odvojene faze: gornja vodena faza u kojoj se nalazi RNK, interfaza i donja, crevena, organska faza u kojoj se nalazi DNK i proteini. Gornja, vodena faza se prebacije u novu tubu i dodaje se 0.5 ml izopropanola. Smješa se promiješa okretanjem tube i ostavi se da stoji 10-15 min na sobnoj temperaturi (precipitacija RNK). Nakon toga smješa se centrifugira na 12000 rcf u toku 15 min na +4°C, a zatim se ukloni supernatant odlivanjem i talog se opere sa 1 ml hladnog 70% etanola. Nakon centrifugiranja na 12000 rcf u toku 10 min na +4°C, pažljivo se ukloni etanol i talog osuši na sobnoj temperaturi. Tako osušeni talog RNK rastvori se u "RNase-free" vodi, a koncentracija i čistoća RNK odredi se mjerenjem A_{260}/A_{280} na spektrofotometru.

REVERZNA TRANSKRIPCija (RT)

[prema uputstvu Fermentas] 1999]

Sinteza cDNK je izvršena reakcijom reverzne transkripcije.

Smješa finalnog volumena 11.5 µl koja sadrži 2 µg RNK i 100 pmol "random-hexamer" prajmera inkubira se 5 min na 70°C, a zatim ohladi na ledu. Zatim se doda smješa finalnog volumena 8.5 µl koja sadrži 4 µl 5x RT-pufera, 20 U RNase-inhibitora, 2 µl dNTP (10 mM) i 40 U M-MuLV reverzne transkriptaze (Fermentas). Smješa se inkubira 10 min na 25°C, a zatim 1h na 42°C. Reakcija se zaustavlja inkubacijom od 10 min na 70°C.

REAKCIJA LANČANOG UMNOŽAVANJA DNK (PCR)

PCR (Polymerase Chain Reaction, eng.) je *in vitro* amplifikacija definisane DNK sekvence i predstavlja imitaciju procesa DNK replikacije. Reakcija koristi dva oligonukleotida komplementarna krajevima sekvence koja se umnožava (prajmeri), koji su međusobno suprotno orijentisani i dugački 15-20 nukleotida. Sinteza DNK katalizovana je termostabilnom DNK polimerazom. Ponavljanje ciklusa, od kojih se svaki sastoji od denaturacije DNK, hibridizacije prajmera i ekstenzije hibridizovanih prajmera od strane termostabilne DNK polimeraze, za rezultat ima eksponencijalnu amplifikaciju specifičnog DNK fragmenta. Krajevi amplifikovanog fragmenta su definisani 5' krajevima prajmera, a njihova veličina određena je rastojanjem između sekvenci koje prajmeri prepoznaju. PCR reakciona smješa mora sadržati u sebi komponente potrebne za *in vitro* sintezu DNK: matrica (DNK koja se kopira), prajmeri (oligonukleotidi komplementarni krajevima sekvence koja se kopira), nukleotidi (gradivni elementi DNK), *Taq* polimeraza (termostabilna DNK polimeraza koja katalizuje ugradnju nukleotida po principu komplementarnosti sa matricom), joni magnezijuma i pufer (neophodni za optimalni rad *Taq* polimeraze).

Alel specifični PCR (ARMS)

[Old *et al.* 1990; Newton *et al.* 1989]

Zahvaljujući velikoj specifičnosti PCR-a, moguće je dizajnirati prajmer tako da on u sebi sadrži tačkastu mutaciju. Takav mutirani prajmer će se vezati samo za mutiranu sekvencu, odnosno produkt reakcije će se dobiti samo u slučaju prisustva mutacije.

Za detekciju najučestalijih β -talasemijskih mutacija ARMS PCR-om, PCR reakcije se rade u dvije odvojene epruvete. U jednoj epruveti je prisutan mutirani prajmer (prajmer sa tačkastom mutacijom) a u drugoj normalan prajmer (prajmer komplementaran sekvenci normalnog alela). Ova dva prajmera se razlikuju samo u jednom nukleotidu. Oba prajmera se kombinuju sa istim, zajedničkim prajmerom. Izvođenje PCR reakcije u dvije epruvete je važno jer omogućava detekciju heterozigotnih nosilaca mutacija. Pored ovih prajmera u reakciji su prisutna još dva prajmera. Njihov produkt je kontrolni fragment, a njegovo prisustvo govori o uspješnosti PCR reakcije. Dužina fragmenata je različita (zavisí od prajmera koji se koriste), ali je kontrolni fragment uvijek duži.

Finalna PCR smješa od 25 μ l sadrži sledeće komponente: 100-300 ng DNK, 1x PCR pufer (Qiagen, Njemačka), 1.5 mM $MgCl_2$, 1x Q pufer (Qiagen, Njemačka), 200 μ M dNTP, prajmeri kontrolne reakcije, zajednički prajmer i prajmer M ili N (Tabela 3, 4) i 1U HotStarTaq®DNA Polimerase (Qiagen, Njemačka). Koncentracija prajmera karakteristična je za svaki ARMS-PCR (Tabela 15).

Temperaturni profil PCR reakcije:

- 1. 15 min/ 95°C – aktivacija HotStart Taq polimeraze
- 2. 35 ciklusa:
 - 1 min/95°C – denaturacija
 - 1 min/63°C – aniling
 - 1 min/72°C – elongacija
- 3. 10 min/72°C – finalna elongacija

Analiza PCR produkata se vrši na 2% agaroznom gelu vizualizacijom pod UV-svjetlom.

Tabela 15. Koncentracije prajmera korišćenih za detekciju najučestalijih β -talasemijskih mutacija u mediteranskoj populaciji.

A.

Mutacija	Prajmer A	Prajmer B	Prajmer C	Prajmer N ili M
β^039	20 pmol	20 pmol	9 pmol	9 pmol
$\beta^0IVSII-1$	20 pmol	20 pmol	20 pmol	20 pmol
$\beta^0IVSI-1$	20 pmol	20 pmol	25 pmol	25 pmol
$\beta^+IVSI-110$	20 pmol	20 pmol	15 pmol	15 pmol
β^06	20 pmol	20 pmol	10 pmol	10 pmol
$\beta^+IVSI-6$	20 pmol	20 pmol	50 pmol	50 pmol
β^076	20 pmol	20 pmol	25 pmol	25 pmol
HbS	20 pmol	20 pmol	10 pmol	10 pmol
β^08	20 pmol	20 pmol	25 pmol	25 pmol
β^044	20 pmol	20 pmol	25 pmol	25 pmol
β^05	20 pmol	20 pmol	12.5 pmol	12.5 pmol

B.

Mutacija	Prajmer R96	Prajmer B	Prajmer D	Prajmer N ili M
β^+ -101	25 pmol	25 pmol	25 pmol	25 pmol
β^+ -87	25 pmol	25 pmol	25 pmol	25 pmol

C.

Mutacija	Prajmer R37	Prajmer R47	Prajmer B	Prajmer N ili M
β^+ IVSII-745	30 pmol	30 pmol	25 pmol	25 pmol

Gap PCR

[Craig *et al.* 1994]

Gap PCR je PCR koji omogućava detekciju većih delecija, kao što je ona koja se javlja kod Hb Lepore BW. PCR analiza se radi sa tri prajmera: LepA, LepB i R37 (Tabela 5). Prajmer LepB lociran je iza β -globinskog gena. Prajmer LepA potiče iz δ -globinskog gena. PCR produkt LepA i LepB prajmera je dužine 356 bp i on detektuje samo fuzionisani $\delta\beta$ -globinski (Lepore) gen. Prajmer R37 se nalazi u promotoru β -globinskog gena, i to u dijelu koji je u normalnom hromozomu prisutan, a u slučaju rekombinacije koja je rezultovala fuzionisanim (Lepore) genom ne postoji (deletiran). PCR produkt LepB i R37 prajmera je dužine 751 bp i on detektuje samo normalni β -globinski gen.

Finalna PCR smješa od 25 μ l sadrži sledeće komponente: 100-300 ng DNK, 1x PCR pufer (Qiagen, Njemačka), 1.5 mM $MgCl_2$, 1x Q pufer (Qiagen, Njemačka), 200 μ M dNTP, prajmeri R37 (0.24 μ g), LepA (0.32 μ g), LepB (0.4 μ g) i 1U HotStarTaq®DNA Polimerase (Qiagen, Njemačka).

Temperaturni profil PCR reakcije:

1. 15 min/ 95°C – aktivacija HotStart Taq polimeraze
2. 35 ciklusa:
 - 1 min/95°C – denaturacija
 - 1 min/55°C – aniling
 - 1 min/72°C – elongacija
3. 10 min/72°C – finalna elongacija

Analiza PCR produkata se vrši na 2% agaroznom gelu vizualizacijom pod UV-svjetlom.

Detekcija delecije- $\alpha^{3,7}$

[Dodé *et al.* 1993; Bowden *et al.* 1992]

Za detekciju ove delecije u PCR reakciji se koriste prajmeri u dvije odvojene reakcije (Tabela 6.)

Prajmerima C10 i C3 umnožava se α_2 -globinski gen što u odsustvu delecije daje fragment dužine 1.9 kb, dok se prajmerima C10 i C2, takođe u odsustvu delecije umnožava α_1 -globinski gen što daje fragment dužine 2.1 kb. U prisustvu gore navedene delecije prajmeri C10 i C2 daju fragment dužine 1.9 kb.

Prajmeri C10 i C3 prepoznaju gene generisane u recipročnom, triplikacionom događaju ($\alpha\alpha^{\text{anti}3,7}$), tako što daju i fragment dužine 2.1 kb.

Finalna PCR smješa od 50 μ l sadrži sledeće komponente: 0.5-1 μ g DNK, 1x PCR pufer (Qiagen, Njemačka), 1.5 mM MgCl_2 , 1x Q pufer (Qiagen, Njemačka), 200 μ M dNTP, prajmeri C2 (50 pmol) i C10 (50 pmol), odnosno C3 i C10 i 1 U HotStarTaq®DNA Polimerase (Qiagen, Njemačka).

Temperaturni profil PCR reakcije:

1. 15 min/ 95°C – aktivacija HotStart Taq polimeraze
2. 35 ciklusa:
 - 1 min/95°C – denaturacija
 - 1.5 min/52°C – aniling
 - 2 min/72°C – elongacija
3. 10 min/72°C – finalna elongacija

Analiza PCR produkata se vrši na 1% agaroznom gelu vizualizacijom pod UV-svjetlom.

PCR-RFLP – haplotipska analiza

PCR-RFLP (PCR - Restriction Fragment Length Polymorphism, eng.) je metoda koja se koristi za direktnu detekciju mutacije koja mijenja, kreira novo ili ukida postojeće mjesto prepoznavanja nekog restrikcionog enzima.

U haplotipsku analizu uključeno je sedam polimorfnih mjesta (ϵ /HincII, G γ /HindIII, A γ /HindIII, ψ β /HincII, 3' ψ β /HincII, β /Avall, 3' β /BamHI) koji se nalaze unutar β -globinskog genskog lokusa.

Prajmeri koji se koriste za umnožavanje odgovarajućih regiona u okviru β -globinskog genskog lokusa i različite temperature anilinga prajmera navedeni su u tabeli 7 i tabeli 15. Ostale komponente PCR smješe, kao i temperaturni profili PCR reakcija isti su za sve navedene polimorfizme.

Finalna PCR smješa od 50 μ l sadrži sledeće komponente: 0.5-1 μ g DNK, 1x PCR pufer (Qiagen, Njemačka), 1.5 mM MgCl₂, 1x Q pufer (Qiagen, Njemačka), 200 μ M dNTP, prajmeri (40 pmol) i 1,5 U HotStarTaq®DNA Polimerase (Qiagen, Njemačka).

Tabela 16. Odgovarajuća temperatura anilinga prajmera

Polimorfizam	ϵ /HincII	G γ /HindIII	A γ /HindIII	$\psi\beta$ /HincII	3' $\psi\beta$ /HincII	β /AvalI	3' β /BamHI
T _A	55°C	60°C	55°C	61°C	61°C	57°C	57°C

Temperaturni profil PCR reakcije:

- 15 min/ 95°C – aktivacija HotStart Taq polimeraze
- 35 ciklusa:
 - 1 min/95°C – denaturacija
 - 1.5 min/ T_A – aniling
 - 2 min/72°C – elongacija
- 10 min/72°C – finalna elongacija

Nakon provjere PCR produkta na 1% agaroznom gelu, pristupa se detekciji polimorfizma pomoću sječenja dobijenog DNK fragmenata odgovarajućim restrikcionim enzimima. Sastavi smješa za digestiju restrikcionim enzimom dati su u tabeli 17.

Tabela 17. Sastavi smješa za digestiju za detekciju ϵ /HincII, G γ /HindIII, A γ /HindIII, $\psi\beta$ /HincII, 3' $\psi\beta$ /HincII, β /AvalI polimorfizama .

Polimorfizam	ϵ /HincII	G γ /HindIII	A γ /HindIII	$\psi\beta$ /HincII	3' $\psi\beta$ /HincII	β /AvalI
PCR produkt	25 μ l	25 μ l	25 μ l	25 μ l	25 μ l	25 μ l
pufer	1x OPA (Pha)	1x M (Pha)	1x M (Pha)	1x OPA (Pha)	1x OPA (Pha)	1x R (F)
BSA	/	0.01%	0.01%	/	/	/
pUC18/19	150 ng	150 ng	150 ng	150 ng	150 ng	150 ng
restrikcioni enzim	HincII 3U (Pha)	HindIII 1U (Pha)	HindIII 1U (Pha)	HincII 2U (Pha)	HincII 2U (Pha)	AvalI 4U (F)
finalna zapremina	40 μ l	40 μ l	40 μ l	40 μ l	40 μ l	40 μ l

Napomena: Pha – Amersham Pharmcia
F - Fermentas

Sve smješe za digestiju inkubirane su preko noći na 37⁰C. Produkti digestija za detekciju $\epsilon/HincII$, $G\gamma/HindIII$ i $A\gamma/HindIII$ polimorfizama analizirani su elektroforezom na 1% agaroznom gelu, dok su produkti digestije za detekciju $\psi\beta/HincII$, $3'\psi\beta/HincII$ i $\beta/Avall$ polimorfizama analizirani na 2% agaroznom gelu. Dužina fragmenta nakon digestije u prisustvu, odnosno odsustvu polimorfizma prikazani su u tabeli 18. Da bi sa sigurnošću utvrdili prisustvo $3'\beta/BamHI$ polimorfizma, umnoženi fragmenti su sekvencirani.

Tabela 18. Pregled dužina PCR produkata i fragmenata koji nastaju usled sječenja odgovarajućim restrikcionim enzimom.

Polimorfizam	Dužina PCR produkta (bp)	Restrikcioni enzim	Dužine fragmenata (bp)	
			u odsustvu polimorfizma	u prisustvu polimorfizma
$\epsilon/HincII$	1068	<i>HincII</i>	1068	586+482
$G\gamma/HindIII$	760	<i>HindIII</i>	760	660+100
$A\gamma/HindIII$	1842	<i>HindIII</i>	1060+755+27	678+382+755+27
$\psi\beta/HincII$	701	<i>HincII</i>	701	360+341
$3'\psi\beta/HincII$	590	<i>HincII</i>	590	470+120
$\beta/Avall$	707	<i>Avall</i>	434+273	434+215+58

Umnožavanje promotorskog regiona $A\gamma$ -globinskog gena

U cilju analize mutacija u promotorskom regionu $A\gamma$ -globinskog gena bilo je potrebno PCR metodom isti i umnožiti.

Da bi se izbjeglo umnožavanje $G\gamma$ -globinskog gena, zbog velike homologije između $A\gamma$ - i $G\gamma$ -globinskih gena, PCR reakcija se odvija u dva koraka. U prvom koraku prajmerima A($A\gamma$) i D (Tabela 8) umnožava se region dužine 664 bp. U drugom koraku, fragment dobijen u prvom koraku služi kao matrica kako bi se prajmerima za kloniranje, AgC i AgB (Tabela 8) umnožio fragment dužine 307 bp.

Finalna PCR smješa od 50 μ l sadrži sledeće komponente: 0.5-1 μ g DNK, 1x PCR pufer (Qiagen, Njemačka), 1.5 mM $MgCl_2$, 1x Q pufer (Qiagen, Njemačka), 200 μ M dNTP, prajmeri A(γ) i D (50 pmol svaki), odnosno AgC i AgB (30 pmol svaki) i 1.5 U HotStarTaq®DNA Polimerase (Qiagen, Njemačka).

Temperaturni profil PCR reakcije (1st round):

1. 15 min/ 95⁰C – aktivacija HotStart Taq polimeraze
2. 35 ciklusa:
 - 1 min/95⁰C – denaturacija
 - 1.5 min/52⁰C – aniling
 - 2 min/72⁰C – elongacija
3. 10 min/72⁰C – finalna elongacija

Temperaturni profil PCR reakcije (2nd round):

1. 15 min/ 95⁰C – aktivacija HotStart Taq polimeraze
2. 35 ciklusa:
 - 1 min/95⁰C – denaturacija
 - 1.5 min/64⁰C – aniling
 - 2 min/72⁰C – elongacija
3. 10 min/72⁰C – finalna elongacija

Očekivani produkt reakcije je dug 307 bp. Analiza PCR produkta se vrši na 2% agaroznom gelu. Dobijeni PCR produkti se prečišćavaju na koloni (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen), prema uputstvu proizvođača. Kada je DNK matrica pripremljena, pristupa se reakciji sekvenciranja u kojoj su korišćeni isti prajmeri kao i za PCR reakciju.

Umnožavanje promotorskog regiona γ -globinskog gena

U cilju analize mutacija u promotorskom regionu γ -globinskog gena bilo je potrebno PCR metodom isti i umnožiti.

Finalna PCR smješa od 50 μ l sadrži sledeće komponente: 0.5-1 μ g DNK, 1x PCR pufer (Qiagen, Njemačka), 1.5 mM $MgCl_2$, 1x Q pufer (Qiagen, Njemačka), 200 μ M dNTP, GgF i GgR, 30 pmol svaki (Tabela 9) i 1.5 U HotStarTaq®DNA Polimerase (Qiagen, Njemačka).

Temperaturni profil PCR reakcije:

1. 15 min/ 95°C – aktivacija HotStart Taq polimeraze
2. 35 ciklusa:
 - 1 min/95°C – denaturacija
 - 1.5 min/55°C – aniling
 - 2 min/72°C – elongacija
3. 10 min/72°C – finalna elongacija

Očekivani produkt reakcije je dug 675 bp. Analiza PCR produkta se vrši na 2% agaroznom gelu. Dobijeni PCR produkti se prečišćavaju na koloni (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen), prema uputstvu proizvođača. Kada je DNK matrica pripremljena, pristupa se reakciji sekvenciranja u kojoj su korišćeni isti prajmeri kao i za PCR reakciju.

Detekcija mutacija u okviru *KLF1* gena

Prajmeri korišćeni za umnožavanje određenih regiona u okviru *KLF1* gena dati su u tabeli 10.

Finalna PCR smješa od 50 μ l sadrži sledeće komponente: 0.5-1 μ g DNK, 1x PCR pufer (Qiagen, Njemačka), 1.5 mM $MgCl_2$, 1x Q pufer (Qiagen, Njemačka), 200 μ M dNTP, prajmeri, 30 pmol svaki (Tabela 10) i 1.5 U HotStarTaq®DNA Polimerase (Qiagen, Njemačka).

Temperatura anilinga prajmera *KLF1*-E2b F i *KLF1*-E2b R je 57°C, dok je temperatura anilinga za ostale parove prajmera 60°C.

Temperaturni profil PCR reakcije:

1. 15 min/ 95°C – aktivacija HotStart Taq polimeraze
2. 35 ciklusa:
 - 1 min/95°C – denaturacija
 - 1 min/60°C ili 57°C – aniling
 - 1 min/72°C – elongacija
3. 10 min/72°C – finalna elongacija

Analiza PCR produkata se vrši na 2% agaroznom gelu vizualizacijom pod UV-svjetlom.

DGGE ZA γ -GLOBINSKE GENE

[Gottardi *et al.* 1992]

DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, eng.) je metoda za skrining mutacija i omogućava pretraživanje DNK sekvenci i otkrivanje sekvence kod koje je prisutna neka promjena u odnosu na normalnu sekvencu.

PCR teče u dva koraka. U prvom se umnožavaju nezavisno γ - (prajmeri A i D) i δ -globinski gen (prajmeri B i D). U sekundarnom PCR-u se umnožavaju uži regioni oba fragmenta (prajmeri B + 20 GC repić (clamp, eng.) i C) (Tabela 11).

Finalna PCR smješa od 50 μ l sadrži sledeće komponente: 0.5-1 μ g DNK, prajmeri 20 pmol svaki (Tabela 11), dNTP 1.5 mM svaki, $MgCl_2$ 6.7 mM, BSA 16 μ g, amonijum sulfat 16.6 mM, Na_2EDTA 67 μ M, DMSO 10%, Tris HCl pH 8.8 67 mM, β merkaptotetanol 10 mM, Amply Taq (Perkin Elmer) 1.5 U.

Temperaturni profil PCR reakcije (1st round):

1. 10 min/98°C – hot start
2. 2 min/72°C – međukorak za dodavanje polimeraze
3. 30 ciklusa:
 - 1 min/95°C – denaturacija
 - 2 min/45°C – aniling
 - 2 min/60°C – elongacija
4. 10 min/72°C – finalna elongacija

Temperaturni profil PCR reakcije (2nd round):

1. 10 min/98°C – hot start
2. 2 min/72°C – međukorak za dodavanje polimeraze
3. 26 ciklusa:
 - 1 min/94°C – denaturacija
 - 30 sek/60°C – aniling
 - 2 min/60°C – elongacija
4. 10 min/72°C – finalna elongacija

PCR produkti se analiziraju na 6% denaturišućem gradijentnom poliakrilamidnom gelu (akrilamid : N,N'-metilenbisakrilamid, u odnosu 37.5 : 1) pravljen sa 1X TAE puferom pH 8.0 (40 mM Tris, 20 mM Na-acetat, 1 mM Na_2EDTA). Kao inicijatori polimerizacije koriste se 0,1%

amonijumpersulfat i 0,01% TEMED. DGGE gel sadrži linearno povećanje koncentracije denaturišućeg agensa (urea, formamid) (100% denaturišući agens = 7M urea/40% formamid (v/v)). Za analizu produkta sekundarnog PCR-a koristi se gradijent 35% - 65%. Elektroforeza se odvija u 1x TAE puferu pri konstantnoj temperaturi (60°C) i konstantnom naponu 10V/cm 5h. Gel se zatim boji srebronitratom.

ANALIZA DNK NA AGAROZNOM GELU

[Sambrook *et al.* 1989]

Analiza DNK vrši se na horizontalnom agaroznom gelu odgovarajuće koncentracije (1 - 2%), u zavisnosti od veličine molekula DNK koje treba razdvojiti. Kao pufer za pripremanje gelova koristi se 1xTAE pufer (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA pH 8.0). Isti pufer koristi se i za elektroforezu. U gel se dodaje fluorescentna boja etidijum bromid (u finalnoj koncentraciji 0.5 µg/µl) koja se interkalira u DNK i omogućava njenu vizuelizaciju pod UV svjetlom. Elektroforeza se izvodi pri jačini struje od 80 mA i naponu od 80 V. Veličina fragmenata DNK određuje se pomoću adekvatnih komercijalnih markera (Fermentas).

BOJENJE POLIAKRILAMIDNIH GELOVA SREBRONITRATOM

[Radojkovic and Kusic 2000]

Vizuelizacija DNK na poliakrilamidnim gelovima vrši se bojenjem pomoću srebronitrata. Gel se posle elektroforeze fiksira rastvorom 10% etanola i 0.5% glacijalne sirćetne kiseline, uz mućkanje na klackalici 20-30 min. Posle toga se ovaj rastvor odlije, a gel se prelije 0.1% rastvorom srebronitrata i mućka na klackalici 10 min. Slijedi nekoliko sekundi ispiranja vodom. Trake u gelu postaju vidljive nakon dodavanja rastvora 1.5% NaOH, 0.01% NaBH₄ i 0.048% formaldehid (15-20 min, u zavisnosti od količine uzorka u gelu). Bojenje se stopira dodavanjem 0.75% rastvora Na₂CO₃.

SEKVENCIJANJE PCR PRODUKATA/CAT KONSTRUKATA

Sekvenciranje DNK je rađeno BigDye™ Terminators Version 3.1 Ready Reaction Kit-om (Applied Biosystems) kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Ovaj kit omogućava sekvenciranje u PCR reakciji u kojoj se pored deoksinukleotida koriste i 2',3'-dideoksinukleotidi [Sanger *et al.* 1977]. DNK polimeraza kopira jedan lanac DNK matrice ugrađujući nukleotide na 3' kraj prajmera sve dok u rastući lanac ne ugradi neki od dideoksinukleotida. Dideoksinukleotidi nemaju OH-grupu na 3' poziciji, zbog čega nemaju sposobnost vezivanja sledećeg nukleotida, pa njihovom ugradnjom dolazi do terminacije polimerizacije. Reakcije se rade sa samo jednim prajmerom (asimetrični PCR) tako da se dobija serija fragmenata različitih dužina koji se završavaju dideoksinukleotidom. Svaki od 4 dideoksinukleotida obilježen je različitom fluorescentnom bojom čime je omogućena detekcija fragmenata u sekvenceru. Za razliku od kitova u kojima su dideoksinukleotidi obilježeni jednom istom fluorescentnom bojom, ovaj kit omogućava da se sekvenciranje jednog uzorka radi u jednoj umjesto u četiri odvojene PCR reakcije.

Prvo se PCR reakcijom umnoži region DNK koji želimo da sekvenciramo. Nakon provjere PCR produkta na 1% ili 2% agaroznom gelu, vrši se njegovo prečišćavanje na koloni (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen) prema uputstvu proizvođača. Kada je DNK matrica pripremljena, pristupa se reakciji sekvenciranja za koju su u izradi ovog rada korišćeni isti prajmeri kao i za PCR reakciju.

Na isti način se sekvenciraju i CAT-konstrukti dobijeni kloniranjem da bi se potvrdilo da su ispravni. Plazmidi su izolovani pomoću QIAGEN kita na način opisan u dijelu Izolovanje plazmidne DNK na maloj skali.

Smješa za sekvenciranje finalne zapremine 8 µl sadrži sledeće komponente:

- 3-10 ng prečišćenog PCR produkta (za dužine 200-500bp)/ 150-300 ng CAT-konstrukta
- prajmer za sekvenciranje 3.2 pmol
- 3 µl Ready Reaction Mix (Applied Biosystems)

Temperaturni profili PCR reakcije za sekvenciranje:

1. 1 min/96°C
2. 25 ciklusa:
 - 10 sek/96°C
 - 5 sek/50°C
 - 4 min/60°C
3. ∞/4°C

Posle završene reakcije sekvenciranja u uzorke se doda 40 µl Na-acetata, promućka se i centrifugira 20 min na 13000 rpm posle čega se supernatant uklanja. Talogu se doda 200 µl 70% etanola i centrifugira 10 min na 13000 rpm, posle čega se supernatant uklanja. Ovaj korak se ponavlja još jednom. Nakon drugog ispiranja etanolom talog je neophodno u potpunosti osušiti. Osušeni talog se rastvara u 25 µl HiDi i cjelokupna količina se nanosi na plejt za sekvenciranje. Manji broj CAT konstrukata (0.5%) je sekvenciran u kompaniji "Makrogen". u Južnoj Koreji, <http://dna.macrogen.com/eng>.

PRAVLJENJE CAT KONSTRUKATA ZA EKSPERIMENTE TRANZIJENTNE TRANSFEKCIJE

Za pravljenje konstrukata za ispitivanje mutacija i malih delecija u promotorskom regionu γ -globinskih gena korišćen je pCATbasic vektor (Promega). Ovaj vektor naziva se i reporterski, i služi za ispitivanje aktivnosti promotora. Naime, ispred CAT gena se nalazi polilinkerski region u koji se uklonira željeni promotor i posle tranzijentne transfekcije u odabranu ćelijsku liniju CAT esejom se mjeri količina CAT proteina (reporter) koja je direktno proporcionalna aktivnosti promotora.

Prvo se PCR reakcijom umnože promotorski regioni γ -globinskih gena na prethodno opisan način. Dobijeni PCR produkti se prečišćavaju na koloni (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen) prema uputstvu proizvođača. Nakon toga se digestijom restrikcionim enzimima *HindIII* i *XbaI*

omogućava stvaranje "ljepljivih krajeva". Plazmid pCATbasic, ispred CAT gena, ima polilinkerski region koji, pored drugih, ima i mjesta za sječenje restrikcionim enzimima *HindIII* i *XbaI*.

Smješa za digestiju finalne zapremine 20 µl sadrži sledeće komponente:

- 400 ng pCATbasic plazmida ili 300-800 ng prečišćene PCR smješe
- 1 x M pufer
- 0.01% BSA
- 3 U *HindIII*, Pharmacia
- 3 U *XbaI*, Pharmacia

Smješe za digestiju inkubirane su preko noći na 37°C. Produkti digestije analizirani su elektroforezom na 1% agaroznom gelu u slučaju digestije plazmida, odnosno 2% agaroznom gelu u slučaju digestije PCR produkta.

Istovremeno su pripremane i kontrolne digestije u kojima je plazmid sječen samo sa jednim enzimom. Linearizacija plazmida u obje jednostruke digestije je potvrda aktivnosti oba restrikciona enzima.

Radi sprečavanja recirkularizacije plazmida vrši se reakcija defosforilacije kojom se sa 5' kraja plazmida uklanja fosfatna grupa. Defosforilacija se vrši alkalnom fosfatazom izolovanom iz crijeva teleta (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, CIAP, Fermentas) prema uputstvu proizvođača.

Smješa za defosforilaciju finalne zapremine 35 µl sadrži sledeće komponente:

- 1.5-2 µg pCATbasic plazmida
- 1 x pufer
- 2 U CIAP, Fermentas

Smješa za defosforilaciju se inkubira 30 minuta na 37°C. Dejstvo alkalne fosfataze se zaustavlja izlaganjem smješe temperaturi od 85°C u trajanju od 15 minuta.

Formiranje rekombinantnog DNK molekula spajanjem plazmida i PCR fragmenta sa komplementarnim ljepljivim krajevima vrši se u ligacionoj reakciji.

Ukupna količina DNK u ligacionoj smješi ne bi trebalo da pređe 200 ng. Molarni odnos vektora i fragmenta je varijabilan. Za fragmente veličine slične vektoru, preporučuje se odnos 1 : 1, dok u slučaju fragmenata manjih od vektora odnos raste 1:2, 1:3, 1:5 i tako dalje.

Ligaciona smješa finalne zapremine 10 µl sadrži sledeće komponente:

- 100 ng digeriranog, defosforilovanog, prečišćenog pCATbasic vektora
- 85 ng digeriranog prečišćenog PCR fragmenta (molarni odnos plazmida i fragmenta je 1:5)
- 1 x pufer, sadrži Mg i ATP
- 4 U T4 DNK Ligaza, Biolabs

Ligaciona smješa se inkubira preko noći na 16°C. Produkte ligacije moguće je analizirati elektroforezom na 1% agaroznom gelu.

Napravljeni konstrukti koji sadrže promotorski region γ -globinskih gena nazvani su Ag i Gg prema tome o kom γ -globinskom genu se radi ($^A\gamma$ - ili $^G\gamma$ -globinski gen).

KULTIVISANJE BAKTERIJA

[Sambrook *et al.* 1989]

U toku rada sa bakterijama neophodno je održati sterilne uslove. Iz tog razloga, sve manipulacije odvijaju se u neposrednoj blizini plamenika. Takođe, svi rastvori, posude (petri šolje, menzure itd.) i alatke (eža, nastavak, čačkalica itd.) moraju biti sterilni.

E. coli bakterije soja *DH5α* kultivisane su u tečnom, LB (Luria-Bertani) medijumu (1% tripton, 1% NaCl, 0.5% ekstrakt kvasca) ili na čvrstoj, LA podlozi (1% tripton, 1% NaCl, 0.5% ekstrakt kvasca i 1.5% bacto-agar). Svi medijumi za kultivisanje se sterilisu autoklaviranjem.

Bakterije se kultivisu na temperaturi od 37°C. U tečni i u čvrsti medijum dodaje se odgovarajući antibiotik. S obzirom da pCATbasic nosi rezistenciju na ampicilin, ovaj antibiotik je dodavan u finalnoj koncentraciji 100 µg/ml.

PRIPREMANJE *E. Coli DH5α* KOMPETENTNIH ĆELIJA

[Sambrook *et al.* 1989]

Ovom metodom se bakterije pripremaju za transformaciju stranom DNK. Ćelijska membrana bakterija se učini propustljivijom, a pritom se ne smije umanjiti vijabilnost samih ćelija i njihova sposobnost umnožavanja.

Sa čvrste, LA podloge se pojedinačna bakterijska kolonija prenese u 5 ml tečnog, LB medijuma bez antibiotika (*DH5α* soj nije rezistentan na antibiotike). Kultivacija se vrši preko noći, uz aeraciju i mućkanje na 37°C. Narednog dana, u svjež LB medijum (20 ml) inokulira se 1 ml prekonoćne kulture. Bakterije se gaje na 37°C do postizanja gustine od 0.3 – 0.5 OD/ml, koja se određuje mjerenjem spektrofotometrom na talasnoj dužini od 620 nm. Bakterije iz ove kulture razblažuju se inokuliranjem (2 ml) u svjež tečni, LB medijum (20 ml). Rast bakterijske kulture se nastavlja na 37°C do gustine 0.5 OD₆₂₀/ml. Na ovaj način dobijamo veliki broj bakterijskih ćelija koje se nalaze u eksponencijalnoj fazi rasta.

Taloženje bakterija se vrši centrifugiranjem na 7000 rpm na +4°C u trajanju od 10 minuta (Sorvall centrifuga, SS-34). Dobijeni talog bakterija se resuspenduje u 10 ml hladnog 0.1 M CaCl₂, inkubira na ledu 10 minuta i ponovo centrifugira pri istim uslovima. Bakterijski talog se resuspenduje u 2 ml ohlađenog rastvora sačinjenog od 0.1 M CaCl₂ i 15% glicerola. Kompetentne bakterijske ćelije čuvaju se u alikvotima od 200 µl na -80°C.

Poželjno je izvršiti provjeru kompetentnih ćelija njihovim zasijavanjem na čvrstu, LA podlogu (očekuje se rast) i na LA podlogu sa antibiotikom (ne očekuje se rast). Takođe, poželjno je isprobati efikasnost transformacije ovih ćelija plazmidom koji nosi rezistenciju i njihovim zasijavanjem na podlogu koja sadrži odgovarajući antibiotik (očekuje se rast).

TRANSFORMACIJA *E. Coli DH5α* KOMPETENTNIH ĆELIJA

[Cohen *et al.* 1972]

Transformacija kompetentnih bakterijskih ćelija plazmidom u koji je ukloniran željeni fragment DNK je ključna metoda genetičkog inženjerstva i obezbjeđuje velike količine DNK potrebne za naredne eksperimente. Bakterije se u ovom postupku koriste, zbog svoje značajne reproduktivne sposobnosti, kao recipijent za stranu DNK koju replikuju jednako efikasno kao i svoju sopstvenu.

Kompetentne ćelije (200 µl) se otapaju na ledu i dodaje im se produkt ligacije plazmida i DNK fragmenta uz veoma pažljivo, blago miješanje. Smješa se inkubira 30 min na ledu.

Izlaganjem smješe temperaturnom šoku: led – 42°C (2 min) – led (10 min), propustljivost bakterijskih membrana dostiže maksimum što omogućava efikasnu transformaciju kompetentnog soja *E. coli* bakterija plazmidnom DNK.

Transformisanim ćelijama dodaje se 800 µl tečnog, LB medijuma bez antibiotika i njihov oporavak se favorizuje rastom u aerisanim uslovima na 37°C u toku 30-60 min. Oporavak se nastavlja dodavanjem svježeg LB medijuma sa antibiotikom (1 ml) i rastom u aerisanim uslovima na 37°C u toku 1-2 sata.

Nakon toga se alikvot bakterijske kulture (20-100 µl) razmazuje po čvrstoj, LA podlozi koja sadrži antibiotik. Rast bakterija odvija se preko noći na 37°C, posle čega se uočavaju pojedinačne kolonije na petri šoljama. S obzirom na selektivnost podloge, samo bakterije koje su primile plazmidnu DNK tj. transformanti, mogu da izrastu.

DETEKCIJA ŽELJENOG KONSTRUKTA

Sekvenciranje konstrukta je konačna potvrda da plazmid sadrži željeni DNK fragment i da u čitavoj sekvenci ne postoji promjena nastala usled eventualne greške u DNK replikaciji. Sekvenciranje je vršeno pomoću prajmera korišćenih za umnožavanje željenog fragmenta za kloniranje.

U slučaju transformacije bakterija ovako pripremljenim konstruktima dobije se veliki broj transformanata. Otežavajuća okolnost je što pCATbasic plazmid nosi samo jedan gen koji mu daje rezistenciju na ampicilin, pa znamo da izrasli transformant ima u sebi ovaj plazmid. Ono što ne znamo je da li taj plazmid sadrži u sebi fragment koji smo željeli da uklonimo ili je "prazan". Da bi se smanjio broj onih transformanta koji će se provjeravati digestijom restrikcionim enzimima i sekvenciranjem, radjena je preliminarna analiza velikog broja transformanata metodom brze lize.

Brza liza (lysis gel electrophoresis) [Barnes 1977]

Ovom metodom se u nekoliko koraka, brzo i efikasno, može uočiti postojanje plazmidnih molekula u velikom broju bakterija koje se analiziraju.

Za postupak brze lize su nam uvijek potrebni "svježi" transformanti. Zato već dobijene transformante zasadimo na nove petri šolje sa ampicilinom, ostavimo ih da izrastu preko noći na 37°C i sjutradan ih analiziramo. Prvo je potrebno lizirati bakterije.

U epruvetu sa 25 µl 10 mM EDTA sterilnom čačalicom prenese se bakterijska kolonija i vorteksuje zajedno sa čačalicom. Čačalica se ukloni i doda se 25 µl sveže napravljenog 2x cracking pufera sledećeg sastava: 0.2 M NaOH, 0.5% SDS, 0.5 M saharoza. Smješa se inkubira 10 minuta na 70°C, a zatim postepeno hladi na sobnoj temperaturi. Zatim se doda 1.5 µl 4 M KCl i inkubira 5 minuta na ledu. Nakon inkubacije se centrifugira (13000 rpm, 5min, +4°C). U talogu

ostaje hromozomska DNK, a u supernatantu plazmidna DNK koja se analizira na 1% agaroznom gelu (100 V, 100 mA, 90 min).

Pored transformanata koje obrađujemo ovim postupkom, potrebno je, takođe, uraditi brzu lizu nekoliko bakterija za koje znamo da nose plazmide određenih veličina i koji nam služe kao standardi za određivanje veličine plazmida koje treba da identifikujemo. Plazmide koji na gelu imaju trake odgovarajuće veličine, treba dalje ispitivati da bi se potvrdilo da nose željenu sekvencu. Međutim plazmidi izolovani brzom lizom nisu dovoljno čisti i samim tim nepogodni su za dalju analizu. Za dobijanje relativno male količine plazmida koji je dovoljno prečišćen da se na njemu mogu raditi analize restrikcionim enzimima, koristimo metodu mini prep.

IZOLOVANJE PLAZMIDNE DNK NA MALOJ SKALI (MINI PREP)

[Zhou *et al.* 1990]

Za dobijanje relativno male količine plazmida zadovoljavajuće čistoće i kvaliteta da se na njemu mogu raditi analize restrikcionim enzimima, koristimo metodu "mini prep".

Sa čvrste selektivne podloge pojedinačna bakterijska kolonija se prenese u 2 ml tečnog, LB medijuma sa antibiotikom i inkubira preko noći na 37°C uz aeraciju. Prekonoćna kultura se prebaci u epruvetu i centrifugira 5 min na 13000 rpm. Bakterijski talog se resuspenduje vorteksovanjem i suspenziji se dodaje 300 µl svežeg TENS pufera (1x TE, 0.1 N NaOH, 0.5% SDS) koji lizira bakterije. Nakon kratkog vorteksovanja dodaje se 150 µl 3M Na-acetat pH 5.2. Nakon snažnog vorteksovanja, centrifugira se 2 minuta na 13000 rpm. Supernatant u kome se nalazi DNK prebacuje se u čistu epruvetu, dok proteini ostaju u talogu. Dodaje se 1 ml hladnog 95% etanola, promiješa i centrifugira pri istim uslovima. DNK talog se ispira hladnim 70% etanolom i nakon centrifugiranja pri istim uslovima suši u vakuum centrifugi. DNK se resuspenduje u 30 µl pufera 1x TE koji sadrži RNK-azu (finalna koncentracija 10 µg/ml).

Plazmidna DNK se može provjeriti elektroforezom na 1% agaroznom gelu. Ova metoda daje plazmidnu DNK koja je dovoljno čista da bi se konstrukt provjerio digestijom restrikcionim enzimima kojima je PCR fragment i kloniran. Na ovaj način se PCR fragment "izbacuje" iz plazmida i to se provjerava elektroforezom na 1% agaroznom gelu.

Ovako izolovana plazmidna DNK nije dovoljno čista da bi se željeni konstrukt provjerio sekvenciranjem. Iz transformanata kod kojih smo detektovali izbacivanje fragmenta, izolovana je plazmidna DNK na maloj skali pomoću kita QIAGEN-a, prema uputstvu proizvođača.

IZOLOVANJE PLAZMIDNE DNK NA MALOJ SKALI

[Prema uputstvu proizvođača QIAGEN]

Za dobijanje male količine plazmidne DNK koja može uspješno da se sekvencira, koristi se QIAprep Spin Miniprep Kit.

Sa čvrste selektivne podloge pojedinačna bakterijska kolonija se prenese u 5 ml tečnog, LB medijuma sa antibiotikom i inkubira preko noći na 37°C uz aeraciju. Prekonoćna kultura se prebaci u epruvetu i centrifugira 5 min na 13000rpm. Bakterijski talog se resuspenduje vorteksovanjem u 250 µl pufera P1. Zatim se dodaje 250 µl pufera P2 i sadržaj se miješa okretanjem tube 4 do 6 puta. Nakon dodavanja 350 µl pufera N3 neophodno je momentalno i temeljno promiješati sadržaj na isti način. Ovi koraci omogućili su lizu bakterija. Zatim se smješa centrifugira na 13000 rpm u toku 10 min. Supernatant se direktnim presipanjem iz epruvete nanosi na QIAprep kolonu. Nakon toga se vrši centrifugiranje na 13000 rpm u toku 1 min i eluat se odbacuje. U ovom koraku DNK je ostala vezana za kolonu i potrebno ju je isprati od nečistoća. To se postiže dodavanjem 0.5 ml pufera PB i centrifugiranjem u toku 1 min. Ovaj korak nije neophodan u slučaju DH5α bakterijskog soja, ali s obzirom da ne ometa izolaciju i ne smanjuje prinos reakcije ne mora se preskočiti. Dodavanje 0.75 ml pufera PE i centrifugiranje na 13000 rpm u toku 1 min takođe oslobađa DNK od nečistoća. Posle svakog od do sada navedenih centrifugiranja, eluat se odbacuje. Da bi se odstranili i poslednji tragovi pufera, kolona se

prebacuje u čistu epruvetu i ponovo centrifugira na 13000 rpm u toku 1 min. Kolona se ponovo prebacuje u čistu epruvetu i dodaje se 100 µl pufera EB koji će osloboditi DNK sa kolone. Korisno je inkubirati kolonu na sobnoj temperaturi u toku 1 min kako bi se povećao prinos DNK. Centrifugiranjem na 13000 rpm u toku 1 min dobija se 95-100 µl eluata u kome je rastvorena plazmidna DNK.

IZOLOVANJE PLAZMIDNE DNK NA VELIKOJ SKALI

[Prema uputstvu proizvođača QIAGEN]

Za dobijanje velike količine plazmidne DNK dobrog kvaliteta, potrebne za eksperimente transfekcije, koristi se QIAGEN EndoFree Plasmid Purification Maxi Kit.

Sa čvrste selektivne podloge pojedinačna bakterijska kolonija se prenese u 500 ml tečnog, LB medijuma sa antibiotikom i inkubira preko noći na 37°C uz aeraciju. Ukoliko bakterijski soj nije dostupan na petri šolji, može se koristiti i glicerolski stok. Glicerolski stok nije potrebno otapati, dovoljno je zagrebat i sterilnim nastavkom po površini i nastavak ubaciti u tečni medijum. Prekonoćnu kulturu je potrebno podijeliti na dva dijela i prebaciti u sterilnu plastičnu tubu od 250 ml. Centrifugiranje se vrši na 6000 rpm u toku 20 min na +4°C (Sorvall centrifuga, rotor GS-3), nakon čega se supernatant prosipa, a bakterijski talog resuspenduje u 10 ml pufera P1 da bi se obezbijedila liza bakterijskih ćelija. Od ovog koraka pa na dalje, sve se radi na ledu. Zatim se dodaje 10 ml pufera P2 a sadržaj se miješa okretanjem 4 do 6 puta. Miješanje vorteksovanjem se ne preporučuje da ne bi došlo do miješanja plazmidne i genomske DNK i kidanja plazmidne DNK. Nakon toga, smješa se inkubira na sobnoj temperaturi u toku 5 min. Za to vrijeme, priprema se QIAfilter Cartridge tako što se zatvori poklopac na izlazu iz kertridža i kertridž smjesti u odgovarajuću epruvetu (50 ml) na odgovarajući stalak. Zatim se dodaje 10 ml pufera P3, prethodno ohlađenog na +4°C, nakon čega je potrebno momentalno i temeljno promiješati smješ u okretanjem 4 do 6 puta. Lizat se sipa u otvor na kertridžu i inkubira se bez pomijeranja, na sobnoj temperaturi 10 minuta. Tokom ovog vremena, nastali precipitati koji sadrže proteine, genomsku DNK i deterdžent će isplivati na površinu rastvora i formirati sloj. Skine se poklopac

sa donjeg dijela kertridža i gurne dio za potiskivanje tečnosti. Nakon filtracije se dobije oko 25 ml lizata. Doda se 2.5 ml ER pufera, izmeša okretanjem 10 puta i inkubira na ledu 30 minuta. Ovaj pufer služi za uklanjanje endotoksina. Za to vrijeme, pripremi se QIAGEN-tip 500 kolona nanošenjem 10 ml pufera QBT i pusti se da se kolona isprazni pod dejstvom sile gravitacije. Nanese se lizat koji se inkubirao na ledu i takođe pusti da se kolona isprazni pod dejstvom sile gravitacije. Plazmidna DNK se vezala za kolonu. DNK se ispira od nečistoća dva puta dodavanjem 30 ml pufera QC. Svi eluati se do ovog trenutka bacaju. Od sledećeg koraka se koristi samo "endotoxin-free" i "pyrogen-free" posuđe. U ovom radu korišćeno je stakleno posuđe pečeno na 180°C tokom 12 sati, a moguće je koristiti i nove sterilne polipropilenske tube. Prije dodavanja sledećeg pufera, potrebno je kolonu učvrstiti za novu epruvetu. DNK se pomoću gravitacije eluira sa kolone sa 15 ml pufera QN i skuplja u prethodno pečene COREX staklene epruvete od 30 ml. DNK se taloži dodavanjem 10.5 ml (0.7 volumena) izopropanola na sobnoj temperaturi. Nakon dodavanja, smješu je potrebno promiješati okretanjem i centrifugirati na 9000 rpm u toku 45 min na +4°C (Sorvall centrifuga, rotor SS-34). Supernatant se pažljivo odliva, a DNK talog se ispira sa 5 ml 70% etanola. Nakon centrifugiranja na 9000 rpm u toku 20 min, supernatant je potrebno ukloniti do poslednje kapi, kako bi se talog što prije osušio. DNK talog se rastvara u 500 µl 1xTE ili vode. Nije poželjno da se DNK talog presuši, jer se takva DNK teško rastvara. Kako bi se DNK bolje rastvorila poželjno je da se ostavi na +4°C u toku noći.

ČUVANJE TRANSFORMANATA

[Sambrook *et al.* 1989]

Transformanti su nekoliko nedelja vijabilni na čvrstim, LA podlogama suplementiranim sa antibiotikom, ukoliko su petri šolje zatvorene parafilmom i čuvaju se na +4°C okrenute naopako. Za duže čuvanje transformanata, pripremaju se glicerolski stokovi: 150 µl sterilnog 100% glicerola i 850 µl tečne prekonoćne kulture. Najbolje je koristiti istu prekonoćnu kulturu koja se koristi za izolaciju plazmidne DNK na maloj skali pomoću QIAGEN kita. Na taj način pouzdano

znamo da se u glicerolskom stoku nalazi upravo ona bakterijska kultura kod koje je konstrukt potvrđen sekvenciranjem.

Glicerolski stokovi su vijabilni nekoliko godina na -20°C i duži niz godina na -80°C .

USLOVI GAJENJA ČELIJA U KULTURI

[Shannon *et al.* 1973]

K562 (ATCC br. CCL-243, DSMZ br. ACC 10) je ustaljena (permanentna) ćelijska linija. K562 ćelije su okruglog oblika i rastu u suspenziji (razmnožavaju se u tečnom medijumu bez lijepljenja za podlogu) i po diobi ostaju zajedno formirajući "grozdove".

Ova ćelijska linija se gaji u petri šoljama ili falkon plastičnim sudovima u termostatu sa automatskim protokom 5% CO_2 u vazduhu i na temperaturi od 37°C . Koristi se medijum koji sadrži sve komponente neophodne za neprekidno razmnožavanje ćelija (Eagle MEM sa dodatkom 10% fetalnog telećeg seruma, FCS). Jedan litar ovog medijuma sadrži 100 ml 10x Eagle MEM-a, 100 ml fetalnog telećeg seruma, 28 ml 7.5% NaHCO_3 , 10 ml 1 M HEPES-a pH 7-7.2, 10 ml 3% glutamina (0.03% finalno), 10 ml 100x neesencijalnih aminokiselina, 10 ml antibiotika (penicilin - streptomycin).

Zamrzavanje ćelija

Ćelije se zamrzavaju kad su u fazi logaritamskog rasta, ni prije (*lag* faza – neposredno posle pasažiranja dok se ćelije oporavljaju i neznatno umnožavaju), ni posle (*stacionarna* faza koja se karakteriše sve većim umiranjem ćelija zbog prevelikog broja ćelija po mililitru medijuma za rast).

Ćelije koje se lijepe ispiraju se od medijuma u kome su rasle, tripsinizuju i resuspenduju u svježem medijumu. U slučaju ćelija koje rastu u suspenziji, ovaj korak ne postoji. Nezavisno od

karakteristika, ćelijska suspenzija se prebacuje u tubu i vrši se centrifugiranje na 1800 obr/min, 7 minuta na sobnoj temperaturi. Medijum se pažljivo usisa da ne bi došlo do odljepljivanja taloga, ćelije se resuspenduju u PBS-u (ispiranje) i ponovo talože pod istim uslovima. Talog od $1-2 \times 10^6$ ćelija se rastvori u 0.5-1 ml medijuma za zamrzavanje i sipa u već ohlađene i obilježene epruvete za zamrzavanje. Medijum za zamrzavanje sadrži krioprotektivni agens, DMSO-a (dimetilsulfoksid) i fetalni teleći serum (ili MEM) u odnosu 1:9. Prisustvo krioprotektivnog agensa je neophodno zbog njegove funkcije da veže vodu i smanji vjerovatnoću stvaranja kristala leda pogubnih za ćelije.

Ćelijska suspenzija se mora zamrznuti polako (temperatura treba da opada $1-3^{\circ}\text{C}/\text{min}$) jer se tada preferencijalno stvaraju ekstra-, a ne intracelularni kristali leda, pa ćelije ostaju neoštećene. To se postiže držanjem ćelija prvo na $+4^{\circ}\text{C}$ (1 sat), zatim na -20°C (1 do 16 sati) i konačno na -80°C (16 do 72 sata). Tek tada se ćelije smještaju u tečni azot (-196°C), gdje su hemijske i fizičke aktivnosti u ćeliji na zanemarljivom nivou, i one ostaju vijabilne godinama. Takođe, ćelije se, prije smještanja u tečni azot, mogu smjestiti u specijalne kutije direktno na -80°C . Naime, ležišta ovih kutija u koje se smještaju epruvete sa ćelijama, uronjena su u izopropil alkohol koji omogućava postepeno spuštanje temperature unutar kutije.

Odmrzavanje ćelija

Ćelije treba brzo odmrznuti, prenoseći ih sa -196°C (tečni azot) u topli medijum (37°C). Brzim otapanjem, kristalne strukture brzo nestaju i smanjuje se opasnost da probiju ćelijske membrane.

DMSO koji je prisutan u medijumu za zaleđivanje uklanja se centrifugiranjem na 1800 obr/min, 7 min. Međutim, neposredno nakon otapanja ćelije su veoma osjetljive. S obzirom da je koncentracija DMSO-a veoma niska nakon dodavanja svježeg medijuma, ovaj korak je poželjno odložiti. DMSO je inertan u medijumu za gajenje ćelija ali postoji izvjesna vjerovatnoća da može svojim prisustvom da navede ćelije da promijene svoje prvobitne karakteristike. Iako K562

ćelijska linija koja je korišćena u ovom radu, nije mnogo osjetljiva, prilikom odmrzavanja ćelija uklanjali smo DMSO.

Potrebno je da prođe izvesno vrijeme da bi se ćelije oporavile posle odmrzavanja i ušle u normalni tempo rasta.

Subkultivacija ćelija

K562 ćelije rastu u suspenziji. Prilikom diobe dvije ćelije ostaju u blizini formirajući grozove. Prvo se staklenom pipetom ili automatskom pipetom grozdovi "razbiju" blagim uvlačenjem i izvlačenjem medijuma. Zatim se skupe u tubu od 10 ml i centrifugiraju u kliničkoj centrifugi 7 minuta na 1800 rpm. Supernatant se usisa vakumskom pumpom a talog ćelija rastvori u 1 ml 1xPBS-a (Phosphate Buffer Saline) koji na 1 litar sadrži: 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 0.2 g KH_2PO_4 i 1.15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$. Ćelije se resuspenduju i broje. Zasađuju se 2×10^5 ćelija/ml i presađuju jednom u 2-3 dana u 1:3 ili 1:5 odnosu.

Brojanje ćelija

[Meryman 1963; Ristić 1979]

Ćelije se broje uz pomoć mikroskopa i pločice za brojanje. U izradi ovog rada korišćena je Bürker-Türk-ova pločica i sledeća formula za izračunavanje broja ćelija:

$$\text{br ćelija na pločici}/64 (\text{br polja u kojima su ćelije brojane}) \times 0.5 = \text{br ćelija u suspenziji } (10^6)/\text{ml}.$$

Da bi brojanje bilo vjerodostojno, neophodno je dobro resuspendovati ćelije. Miješanjem 100 μl ćelija iz suspenzije sa istim volumenom 0,1% tripan-plavo boje omogućava se razlikovanje živih od mrtvih ćelija. Tripan-plavo ulazi u mrtve ćelije i boji ih, dok žive ćelije ostaju svijetle, sa zlatnim oreolom.

VIJABILNOST K562 ĆELIJA POD UTICAJEM ERITROPOETINA (EPO)

Eritropoetin je korišćen za tretiranje K562 ćelija prije tranzijentne transfekcije i za izolovanje jedarnih proteina za EMSA eksperimente. Raspon koncentracija Epo je bio sledeći: 60 mU/ml, 100 mU/ml, 500 mU/ml, 1 U/ml i 3 U/ml. Ćelije su gajene 48 sati u MEM medijumu sa ovim koncentracijama Epo. Nakon ovog vremena ćelije su skupljene, oprane 1x PBS-om i ponovo tretirane određenom koncentracijom Epo. Nakon 24 sata rađena je procjena vijabilnosti MTT testom.

MTT test

Vijabilnost K562 ćelija pod uticajem različitih koncentracija Epo je mjerena MTT testom. To je kolorimetrijski esej koji detektuje konverziju žute tetrazolijumske soli MTT (dimetiltiazol difenil tetrazolijum bromid) u ljubičasti formazan koju vrše enzimi mitohondrijalne reduktaze živih ćelija. Ova konverzija je u direktnoj srazmjeri sa brojem živih ćelija. Kristali formazana nisu rastvorljivi u vodenom rastvoru. Količina formazana se određuje njegovim rastvaranjem u DMSO i mjerenjem spektrofotometrijski na čitaču za mikroploče.

K562 ćelije su 48 sati rasle pod tretmanom Epo i to u sledećim koncentracijama: 60 mU/ml, 100 mU/ml, 500 mU/ml, 1 U/ml i 3 U/ml. Ćelije su oprane 1x PBS-om, izbrojane i zasijane 0.5×10^5 u 100 μ l MEM medijuma u 96-well plejtu. Reakcije su postavljane u triplikatu, uključujući netretirane ćelije kao i sam medijum (blank). Sjutradan je u svaki bunarić dodato MTT rastvora u finalnoj koncentraciji 0.5 mg/ml. Nakon 4 sata inkubacije u svaki bunarić je dodato 100 μ l DMSO koji rastvara nastale kristale formazana. Absorbanca je mjerena na talasnoj dužini 620 nm na čitaču za mikroploče Microplate reader Multiskan RC (Labsystems).

IZOLOVANJE JEDARNIH PROTEINA

[Schreiber *et al.* 1989]

Za izolaciju jedarnih proteina iz K562 ćelijske linije obično se polazi od $0.5-1 \times 10^6$ ćelija. Ćelije se resuspenduju u 1 ml 1x TBS (0.05M Tris Base, 0.9% NaCl, pH 8.4) i prebacuju u epruvetu. Nakon kratkog centrifugiranja na 10000 rpm, talog se resuspenduje u 400 μ l u hladnog pufera A (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF) laganim provlačenjem kroz nastavak. Ćelije se inkubiraju 15 minuta na ledu, nakon čega im se dodaje 25 μ l 10% rastvora Nonidet NP-40. Nakon intenzivnog vorteksovanja, homogenat se centrifugira 30 sekundi na 10000 rpm. Talog se resuspenduje u 50 μ l hladnog pufera C (20mM HEPES pH7.9, 0.4M NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM DTT, 1mM PMSF) i epruveta se snažno protresa 15 minuta na $+4^{\circ}\text{C}$ (MultiBio RS-24, LKB). Jedarni ekstrakt se centrifugira 5 min na 10000 rpm na $+4^{\circ}\text{C}$ i supernatant se u alikvotima (oko 55 μ l) čuva na -70°C .

BRADFORD METODA

[Bradford 1976]

Bradford metoda se koristi za utvrđivanje koncentracije proteina u uzorku. U smješu finalne zapremine 1 ml stavlja se 10 μ l proteinskog uzorka i 200 μ l Bradford reagensa (Protein Assay Due Reagent, Bio Rad). Nakon miješanja smješe, apsorpcija se određuje spektrofotometarski na talasnoj dužini od 595nm (Ultrospec 3300 Pro, Amersham Biosciences).

Radi određivanja koncentracije proteina u uzorku, neophodno je napraviti standardnu krivu tako što se poznata razblaženja BSA proteina (1 mg/ml), uključujući blank, pripremaju i mjere na identičan način.

Универзитет у Београду
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ
ИНСТИТУТ ЗА ФИЗИОЛОГИЈУ И БИОХЕМИЈУ
БИБЛИОТЕКА
Инв. бр. 60033
БЕОГРАД

ANALIZA INTERAKCIJE DNK I JEDARNIH PROTEINA

In silico analiza promotorskog regiona γ -globinskih i KLF1 gena

Za *in silico* analizu promotorskog regiona γ -globinskih i KLF1 gena korišćen je kompjuterski algoritam TFSEARCH, verzija 1.3 (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>), dostupan na internetu. Program omogućava identifikaciju sekvenci koje pokazuju visoku korelaciju u odnosu na TFMATRIX bazu podataka (verzija 3.3) u kojoj su sakupljena okarakterisana mjesta vezivanja transkripcionih faktora. Pretraga je bila ograničena na mjesta vezivanja transkripcionih faktora prisutnih kod vertebrata i na nivo značajnosti preko 80%.

Analiza direktne interakcije DNK i jedarnih proteina

Radi proučavanja promotorskog regiona γ -globinskih i KLF1 gena čovjeka, sintetisane su po dvije komplementarne jednolančane oligonukleotidne probe (Tabela 13). S obzirom da u *in vivo* uslovima regulatorne sekvence postoje u obliku dvolančane DNK, od dva komplementarna jednolančana oligonukleotida, renaturacijom je pravijena dvolančana proba. U ovom radu korišćene su dvolančane probe koje su se međusobno razlikovale po prisustvu, odnosno odsustvu, određenih mutacija i malih delecija.

U "supershift" esejima korišćeno je Sp1 antitijelo čije su karakteristike prikazane u tabeli 14.

Za proučavanje interakcija promotorskih DNK sekvenci i transkripcionih faktora koristili smo metodu usporene elektroforetske pokretljivosti (electrophoretic mobility shift assay, EMSA).

Obilježavanje oligonukleotidne probe

Reakcija obilježavanja 5' kraja oligonukleotida vršena je pomoću Ready-To-Go T4 Polinukleotidne kinaze (Amersham Bioscience) prema preporuci proizvođača.

Reakcija obilježavanja finalne zapremine 50 μ l sadrži sledeće komponente:

- 5 pmol jednolančanog coding oligonukleotida, navedenog u tabeli 13
- 1-2 μ l γ -³²P ATP-a
- Ready-To-Go T4 Polinukleotidne kinaze (Amersham Bioscience) rastvorena u vodi

Reakcija se inkubira na 37°C u toku 30 min, nakon čega se oligonukleotid prečišćava od neugrađenog aktiviteta propuštanjem kroz G-50 kolonu (GE Healthcare).

Specifični aktivitet oligonukleotidne probe određuje se mjerenjem na scintilacionom brojaču.

Obilježeni jednolančani "coding" oligonukleotid se uparava u vakuum centrifugi i rastvara u 25 μ l 10x razblaženom puferu za renaturaciju (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA i 1 mM DTT). Zatim se dodaje komplementarni "noncoding" oligonukleotid u 10x višku (50 pmol), radi sigurnosti da će sve jednolančane obilježene probe biti uključene u reakciji renaturacije. Reakcija hibridizacije obilježenog i neobilježenog oligonukleotida postiže se kratkom denaturacijom na temperaturi od 90°C u toku 3 minuta i renaturacijom – sporim hlađenjem do sobne temperature.

Specifični aktivitet oligonukleotidne probe određuje se mjerenjem na scintilacionom brojaču.

Reakcija prevođenja neobilježenih proba i neobilježenih specifičnih kompetitora u dvolančanu formu se vrši na isti način.

Metoda usporene elektroforetske pokretljivosti (EMSA)

[Fried and Crothers 1981; Wall *et al.* 1988]

Interakcija jedarnih proteina sa odabranim promotorskim regionom analizirana je modifikovanom standardnom metodom usporene elektroforetske pokretljivosti.

Pri određenim uslovima, jedarni proteini se, ukoliko imaju afinitet za određene sekvence DNK, vezuju za iste, formirajući komplekse koji se u električnom polju kreću sporije nego slobodan DNK fragment. Nakon razdvajanja na 4% poliakrilamidnom gelu, formirani kompleksi se detektuju u vidu traka čija je elektroforetska pokretljivost manja u poređenju sa onom koju ima slobodan fragment.

Reakciona smješa finalne zapremine 25 μ l sadrži sledeće komponente:

- 1-5 ng 32 P obilježene dvolančane probe (specifična aktivnost oko 10000 cpm)
- 2-5 μ g jedarnih proteina
- 1 x pufer (50 mM Tris, pH 8.0; 250 mM NaCl; 5 mM DTT, 5 mM EDTA; 50 % glicerol)

Po potrebi, smješi se dodaju i sledeće komponente:

- Nespecifični dvolančani kompetitor (20 ng/ μ l Poly(dI-dC):Poly(dI-dC) Pharmacia)
- Specifični kompetitor (ista, ali neobilježena dvolančana proba, dodaje se u velikom višku -50 ili 100x većem molarnom odnosu u odnosu na obilježenu probu)
- Kompetitor koji sadrži konsenzus sekvencu za određeni transkripcioni faktor
- Antitijelo

Smješa se priprema na ledu, dok se reakcija vezivanja transkripcionih faktora za DNK probu odvija na 37°C tokom 30 min. Nakon isteka tog vremena, reakciona smješa se miješa sa 6 μ l boje (0.25%, brom fenol plavo, 0.25% ksilen cijanol, 30% glicerol) i nanosi na 4% poliakrilamidni gel. Elektroforeza se odvija u 0.5x TBE puferu, pri konstantnom naponu od 250 V i struji od 55 mA u toku sat i deset minuta. Poliakrilamidni gel se suši i analizira na fosfoimidžeru (Cyclone, Perkin Elmer) ili autoradiografski.

TRANZIJENTNA TRANSFEKCIJA K562 ĆELIJA LIPOFEKTAMINOM

U eksperimentima tranzijentne transfekcije K562 ćelije su dan prije transfekcije zasijavane u petri šolje prečnika 10 cm pod normalnim uslovima u MEM medijumu sa 10% FCS. Sjutradan su ćelije skupljene, centrifugirane, oprane 1x PBS-om, brojane i zasijane 2×10^6 ćelija u petri šolje prečnika 3.56 cm (površine 10 cm^2) u 2 ml MEM medijuma bez antibiotika.

Prilikom tretmana K562 ćelija sa Epo, ćelije su 48h prije transfekcije gajene uz dodatak Epo koncentracije 1 U/ml. Dan prije transfekcije, ćelije su skupljene, centrifugirane, oprane 1x PBS-om, brojane i zasijane sa dodatkom ove koncentracije Epo. Sjutradan su ćelije skupljene, centrifugirane, oprane 1x PBS-om, brojane i zasijane 2×10^6 ćelija u petri šolje prečnika 3.56 cm (površine 10 cm^2) u 2 ml MEM medijuma bez antibiotika.

Za svaku šolju se rastvori 8 μg plazmidne DNK (6 μg CAT konstrukta i 2 μg pCH110 plazmida) u 250 μl Opti-MEM-a (GibcoBRL) i blago promiješa. Zatim se, za svaku šolju, 20 μl Lipofektamina 2000 (Invitrogen) rastvori u 250 μl Opti-MEM-a, blago promiješa i inkubira 5 min na sobnoj temperaturi. Konačno se ove dvije smješe sjedine, blago promiješaju i inkubiraju 20 min na sobnoj temperaturi, čime se omogućava formiranje kompleksa između lipofektamina i DNK.

Nakon isteka ovog vremena, u svaku petri šolju se, kap po kap, dodaje 500 μl smješe za transfekciju. Petri šolja se zatim blago zaljulja da bi se medijum bolje sjedinio sa smješom za transfekciju.

Ćelije se u prisustvu smješe za transfekciju inkubiraju 24 sata. Nakon ovog vremena ćelije se pakupe i pripreme za β -galaktozidazni i CAT esej.

PRIPREMA ČELIJSKIH EKSTRAKATA

Nakon 24 sata od transfekcije, ćelije se ispiraju dva puta 1x PBS-om od medijuma. Talog ćelija se resuspenduje u 1 ml TEN pufera (40 mM Tris HCl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 8, 150 mM NaCl). Nakon centrifugiranja 2 min na 13000 rpm, ćelijski talog se vorteksovanjem resuspenduje u 100 μ l 0.25 M Tris HCl pH 8. Liziranje ćelija se postiže tokom tri ciklusa naizmjeničnim stavljanjem ćelija u tečni azot (-196°C) i vodeno kupatilo ($+37^{\circ}\text{C}$) uz vorteksovanje nakon svakog koraka. Nakon centrifugiranja 5 minuta na 13000 rpm ($+4^{\circ}\text{C}$), supernatant se alikvotira i prebacuje u nove mikro tube.

Pripremljene ekstrakte bi trebalo odmah koristiti za CAT i β -galktozidazni esej ili odmah zalediti i čuvati na -80°C . Da bi se izbjegla degradacija CAT enzima i β -galaktozidaze, uzorak bi trebalo brzo zalediti kratkotrajnom inkubacijom u tečnom azotu, a tek tada skladištiti na -80°C .

β -GALAKTOZIDAZNI ESEJ

[prema uputstvu proizvođača Promega]

Svrha β -galaktozidaznog esejja je da normalizuje rezultate CAT esejja u odnosu na efikasnost transfekcije u pojedinačnom uzorku. Iz tog razloga se, uz plazmid koji nosi CAT reporter gen, ćelije istovremeno transfekuju i sa β -galaktozidaza reporterskim vektorom - pCH110. Aktivnost ovog enzima mjerena je pomoću esejja β -galaktozidazne aktivnosti (" β -galactosidase Enzyme Assay System"), Promega.

Priprema za esej odvija se na ledu. Standardni esej se izvodi tako što se uzorku razblaženom u Tris-HCl pH 7.8 doda jednaka količina 2x Assay pufera koji sadrži 200 mM natrijum fosfatni pufer pH 7.3, 2 mM MgCl_2 , 100 mM β -merkaptetoetanol i 1.33 mg/ml supstrata ONPG (*o*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid). Uzorci se inkubiraju na 37°C najmanje 30 minuta. Tokom ovog vremena β -galaktozidaza hidrolizuje bezbojan supstrat u *o*-nitrofenil koji ima žutu boju. Absorbanca je mjerena na Microplate reader Multiskan RC (Labsystems) aparatu na talasnoj dužini 420 nm.

Kao referentne vrijednosti za konstrukciju standardne kalibracione krive i određivanje vrijednosti β -galaktozidaze u ispitivanim ćelijskim lizatima korišćena su standardna razblaženja ovog enzima: 1,5625 mU, 3,125 mU, 6,25 mU, 12,5 mU, 25 mU, 50 mU, i 100 mU.

CAT ELISA ESEJ

[prema uputstvu proizvođača Roche]

Aktivnosti CAT enzima (hloramfenikol-acetil-transferaza) su određivane "CAT ELIZA esejem" (CAT Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Roche). Esej se izvodi prema uputstvu proizvođača.

CAT ELIZA esej je enzimski imunoesej za kvantifikaciju hloramfenikol-acetil-transferaze (CAT) iz *E. coli* u transfekovanim eukariotskim ćelijama. CAT ELIZA se koristi za kvantifikovanje ekspresije CAT-a u eukariotskim ćelijama koje su transfekovane plazmidima koji sadrže CAT reporterski gen.

CAT ELISA se bazira na "sendvič" ELISA principu. Anti-CAT antitijelo vezano je za površinu bunarića mikrotitar ploče (Roche kit). Za njega se specifično vezuje ukupna hloramfenikol acetiltransferaza prisutna u uzorku (ili standardu). Primarno antitijelo je obilježeno digoksigeninom (anti-CAT-DIG) i specifično se vezuje za hloramfenikol acetiltransferazu. Za njega se vezuje sekundarno antitijelo koje je konjugovano sa peroksidazom (anti-DIG-POD). Kvantifikacija hloramfenikol acetiltransferaze obezbjeđuje se dodavanjem supstrata peroksidaze (ABTS). Naime, peroksidaza razlaže supstrat dajući obojeni produkt. Absorbanca uzorka određuje se pomoću čitača za mikrotitar ploče i direktno je proporcionalna nivou hloramfenikol acetiltransferaze prisutne u uzorku.

Pripremljeni ćelijski ekstrakti se pomiješaju sa puferom za uzorak do finalne zapremine od 200 μ l, zatim se nanese u bunariće na mikroploči i pokriveni inkubiraju 1h na 37°C. Nakon vezivanja hloramfenikol acetiltransferaze iz uzorka, bunarići se pet puta ispiraju sa po 250 μ l pufera za ispiranje. Zatim se u bunariće dodaje po 200 μ l anti-CAT-DIG antitijela i inkubira pokriveno 1h

na 37°C. Nakon vezivanja primarnog antitijela, bunarići se pet puta ispiraju sa po 250 µl pufera za ispiranje. Zatim se u bunariće dodaje po 200 µl anti-DIG-POD antitijela i inkubira pokriveno 1h na 37°C. Nakon vezivanja sekundarnog antitijela, bunarići se pet puta ispiraju sa po 250 µl pufera za ispiranje. Na kraju se u bunariće dodaje po 200 µl supstrata i inkubira pokriveno do razvijanja boje (10-40 min) na sobnoj temperaturi. Absorbanca je mjerena na Microplate reader Multiskan RC (Labsystems) aparatu na talasnoj dužini 405/492 nm.

Kao standardi za određivanje aktivnosti CAT-a u ispitivanim ćelijskim lizatima (za konstrukciju standardne kalibracione krive) korišćena su sledeća razblaženja CAT enzima *E coli*: 1,5625 pg, 3,125 pg, 6,25 pg, 12,5 pg, 25 pg, 50 pg, i 100 pg.

Vrijednosti dobijenih aktivnosti CAT enzima normalizovane su u odnosu na aktivnost β-galaktozidaze porijeklom sa pCH110 plazmida. Relativne aktivnosti promotorskih konstrukata su preračunate procentualno u odnosu na pBLCAT5 plazmid (100%) i predstavljene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrijednosti relativnih aktivnosti CAT enzima poređene su Student *t*-testom, a statistička analiza je urađena programom MSExcel. Korišćeni su uslovi uparenog *t*-testa, dvostrani interval poverenja (eng. two-tailed) sa nivoom povjerenja 95% i poređene su grupe uzoraka čija varijansa nije bila unaprijed poznata. Samo u slučajevima kada je *p* vrednost bila manja od 0.05 rezultat je smatran statistički značajnim.

PRAĆENJE EKSPRESIJE GENA POMOĆU RQ-PCR METODE

“Real-time”-PCR ili kvantitativni PCR (RQ-PCR) jeste metoda koji omogućava tačnu kvantifikaciju količine PCR produkta u toku svakog PCR ciklusa, tj. u realnom vremenu (“real-time”). U RQ-PCR mjeri se fluorescentni signal koji se emituje u toku PCR reakcije koji je direktno proporcionalan količini PCR produkta u datom ciklusu. Za razliku od “klasičnog” PCR-a gdje se količina produkta može mjeriti samo na kraju PCR reakcije, ovdje se kvantifikacija odvija u toku eksponencijalne faze reakcije, u toku koje dolazi do udvostručavanja PCR produkta prilikom svakog PCR ciklusa.

U početnim ciklusima intenzitet fluorescencije ne prelazi bazalni nivo ("baseline"). Ciklus u kome je fluorescentni signal uzorka značajno viši od bazalnog signala, naziva se "threshold cycle" – Ct. Vrijednost Ct je direktno proporcionalna količini target sekvence u uzorku. Što je veći početni broj kopija target sekvence, Ct je niži, i obratno, Ct je viši u uzorcima sa manjom početnom količinom target sekvence.

Trenutno se koriste dvije osnovne RQ-PCR tehnike: SYBR Green i TaqMan. U ovom radu korišćena je SYBR Green RQ-PCR tehnika.

SYBR Green je najjednostavnija tehnika, zasnovana na primjeni DNK-interkalirajuće SYBR Green boje. Ova boja se vezuje za manji žljeb dvolančane DNK i sa povećanjem broja PCR reakcije dolazi do povećanja količine dvolančane DNK, pa samim tim dolazi i do povećanja fluorescentnog signala koga emituje SYBR Green boja (na 520nm).

SYBR Green tehnika nije specifična i za posledicu može imati detekciju nespecifično amplifikovanih PCR produkata, kao i detekciju dimera prajmera. Za procjenu specifičnosti primjenjuje se analiza krive topljenja ("melting curve analysis"). U ovoj analizi, temperatura polako raste od 40°C do 95°C, pri čemu se konstantno prati nivo fluorescencije. Fluorescentni signal će biti visok pri niskim temperaturama u slučaju postojanja dvolančane DNK, ali će fluorescencija drastično pasti pri temperaturama oko tačke topljenja PCR produkata. PCR produkti različite dužine i sastava će imati različite tačke topljenja pa će davati različite pik-ove fluorescencije. Specifični PCR produkt ima samo jedan pik.

Efikasnost reakcije je veoma važna za odabir metode kvantifikacije RQ-PCR podataka i ona se izračunava iz nagiba (S) standardne krive.

Standardna kriva se pravi analiziranjem desetostrukih razblaženja početne količine cDNK (RNK ili DNK).

Kvantifikacija RQ-PCR podataka može biti:

- Apsolutna kvantifikacija, gdje je rezultat izražen kao apsolutni broj kopija target sekvence. Tačna kvantifikacija target sekvence se dobija poređenjem sa standardnom krivom izrađenom od uzoraka poznate koncentracije.
- Relativna kvantifikacija, gdje je rezultat predstavljen kao relativni odnos reference (kalibrator) i mjerenog uzorka.

U oba pristupa kvantifikaciji, veoma je važno izvršiti normalizaciju dobijenih podataka. Kako je količina dobijenih PCR produkata direktno zavisna od početne količine matrice, da bi se izbjegle greške nastale prilikom postavke eksperimenta, uporedo sa umnožavanjem target sekvence vrši se i umnožavanje takozvane endogene kontrole. Endogena kontrola je obično "housekeeping" gen čija je ekspresija stabilana u svim uzorcima koji se kvantifikuju, odnosno čija se ekspresija ne mijenja prilikom eksperimentalnih tretmana.

U ovom radu korišćena je relativna kvantifikacija RQ-PCR podataka.

Određivanje ekspresije KLF1 i BCL11A gena komparativnom ddCt metodom (relativna kvantifikacija)

Komparativni ddCt metod je najčešće korišćena metoda. Količina target gena, normalizovanog u odnosu na endogenu kontrolu i relativno u odnosu na kalibrator je:

$Q = 2^{-ddCt}$, gdje je

$$ddCt = dCt_{uzorak} - dCt_{KALIBRATOR} =$$

$$(Ct_{target} - Ct_{endogena\ kont.}) - (Ct_{target, KALIBRATOR} - Ct_{endogena\ kont., KALIBRATOR})$$

Da bi kalkulacija primjenom ove metode bila tačna, efikasnost amplifikacije target gena i endogene kontrole mora biti približno ista i mora biti iznad 96%.

Ekspresija *KLF1* i *BCL11A* gena je praćena primjenom RQ-PCR metode na 7500 Real-time PCR aparatu (Applied Biosystems), upotrebom SYBR Green hemije. Kao endogena kontrola korišćen

je *GAPDH* gen. Za praćenje ekspresije *KLF1* gena korišćen je RT²qPCR Primer Assay - SYBR® Green Human *KLF1* kit (SABiosciences). Prajmeri za sve ostale gene, kao i njihove sekvence su navedeni u tabeli 12.

Finalni volumen PCR reakcije za *BCL11A* gen je 10 µl i sadrži sledeće komponente: 25 ng cDNK, 1x Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), prajmeri finalne koncentracije 400 nM.

Temperaturni profil PCR reakcije:

1. 2 min/50°C
2. 10 min/95°C
3. 40 ciklusa:
 - 15 sek/95°C
 - 1 min/60°C

Finalni volumen PCR reakcije za *KLF1* gen je 25 µl i sadrži sledeće komponente: 50 ng cDNK, 1x Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), miks prajmera (SABiosciences) finalne koncentracije 400 nM.

Temperaturni profil PCR reakcije:

1. 2 min/50°C
2. 3 min/95°C
3. 40 ciklusa:
 - 15 sek/95°C
 - 1 min/60°C

Obrada rezultata je izvršena primjenom komparativne ddCt metode, a kao kalibrator je korišćena medijana dCt vrijednosti nađena kod analiziranih zdravih kontrola.

REZULTATI DEKODIRANJE STUDIJ TALASEMIJSKIH MUTACIJA U SRBIJI

Rezultati dekodiranja su veoma heterogena grupa kliničkih oboljelih i jednako su heterogeni i rezultati genotipiranja u Srbiji i kod nas. Molekularna dijagnostika talasemijskih mutacija je vrlo važna jer se putem dijagnoze najranije utvrđuje da li utvrđena klinička slika, tok i prognoza odgovaraju kliničkim varijantama. Rezultati dekodiranja su veoma heterogena grupa kliničkih oboljelih i jednako su heterogeni i rezultati genotipiranja u Srbiji i kod nas.

Rezultati dekodiranja su veoma heterogena grupa kliničkih oboljelih i jednako su heterogeni i rezultati genotipiranja u Srbiji i kod nas. Molekularna dijagnostika talasemijskih mutacija je vrlo važna jer se putem dijagnoze najranije utvrđuje da li utvrđena klinička slika, tok i prognoza odgovaraju kliničkim varijantama. Rezultati dekodiranja su veoma heterogena grupa kliničkih oboljelih i jednako su heterogeni i rezultati genotipiranja u Srbiji i kod nas.

REZULTATI

Rezultati dekodiranja su veoma heterogena grupa kliničkih oboljelih i jednako su heterogeni i rezultati genotipiranja u Srbiji i kod nas. Molekularna dijagnostika talasemijskih mutacija je vrlo važna jer se putem dijagnoze najranije utvrđuje da li utvrđena klinička slika, tok i prognoza odgovaraju kliničkim varijantama. Rezultati dekodiranja su veoma heterogena grupa kliničkih oboljelih i jednako su heterogeni i rezultati genotipiranja u Srbiji i kod nas.

Rezultati dekodiranja su veoma heterogena grupa kliničkih oboljelih i jednako su heterogeni i rezultati genotipiranja u Srbiji i kod nas. Molekularna dijagnostika talasemijskih mutacija je vrlo važna jer se putem dijagnoze najranije utvrđuje da li utvrđena klinička slika, tok i prognoza odgovaraju kliničkim varijantama. Rezultati dekodiranja su veoma heterogena grupa kliničkih oboljelih i jednako su heterogeni i rezultati genotipiranja u Srbiji i kod nas.

Rezultati dekodiranja su veoma heterogena grupa kliničkih oboljelih i jednako su heterogeni i rezultati genotipiranja u Srbiji i kod nas. Molekularna dijagnostika talasemijskih mutacija je vrlo važna jer se putem dijagnoze najranije utvrđuje da li utvrđena klinička slika, tok i prognoza odgovaraju kliničkim varijantama. Rezultati dekodiranja su veoma heterogena grupa kliničkih oboljelih i jednako su heterogeni i rezultati genotipiranja u Srbiji i kod nas.

REZULTATI DESETOGODIŠNJE STUDIJE TALASEMIJSKIH MUTACIJA U SRBIJI

Talasemijski sindromi su veoma heterogena grupa naslednih oboljenja i jedni su od najčešćih genetičkih poremećaja u svijetu i kod nas. Molekularna dijagnostika talasemijskih sindroma je najpouzdaniji način da se postavi dijagnoza u najranijem uzrastu i da se, blagovremenom primjenom liječenja popravi klinička slika, tok i prognoza bolesti. Molekularna osnova talasemijskih sindroma se izučava u Srbiji od 2000. godine.

U ovom radu predstavljeni su rezultati desetogodišnje studije bazirane na proučavanju talasemijskih sindroma u Srbiji. U ovu studiju uključeno je 127 pacijenata iz 68 nesrodnih familija srpskog porijekla.

Deset različitih mutacija u okviru β -globinskog gena detektovano je kod svih 127 pacijenata kod kojih su uočene anemija, mikrocitoza, hipohromija i hematološki parametri koji su ukazivali na prisustvo talasemije (Tabela 19).

Od ovih 127 pacijenata, 124 su bili heterozigotni nosioci β -talasemije, dok su tri talasemija major pacijenta bili nosioci jedne β -talasemijske mutacije i hemoglobinske varijante Hb Lepore-BW ($\delta 87\text{Gln-}\beta\text{-IVS-II-8}$).

Rezultati naše studije ukazuju na Hb Lepore-BW kao najčešćeg uzročnika talasemija u Srbiji, sa učestalošću koja prevazilazi 25%. Više od 20% pacijenata bili su nosioci IVS-II-745 (C>G) mutacije, dok je kod 16.2% pacijenata detektovana kodon 39 (C>T) mutacija. Mutacija IVS-I-110 (G>A) detektovana je kod 14.6% pacijenata. Zajedno, hemoglobinska varijanta Hb Lepore-BW i ove tri mutacije predstavljaju skoro 80% svih mutantnih β -globinskih alela.

Takođe, kod jedne familije pokazano je prisustvo α -talasemije tipa 1 ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$), dok je nestabilna varijanta Hb Sabine ($\beta 91$ (F7) Leu→Pro, CTG>CCG) detektovana kod jednog pacijenta.

Tabela 19. Učestalost najčešćih mutacija koje uzrokuju β -talasemiju u srpskoj populaciji.

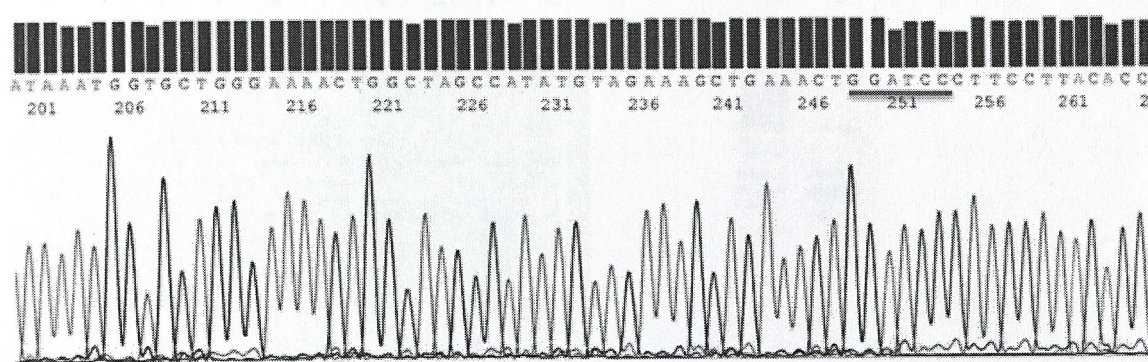
Mutacija	HGVS nomenklatura	Vrsta mutacije	Familije		Hromozomi	
			n	%	n	%
Hb Lepore ($\delta\beta$ fusion)	NG_000007.3: g.63632_71046del	Talasemijska Hb varijanta	16	23.5	34	26.2
IVS-II-745 (C>G)	HBB:c.316-106C>G	β^+	14	20.6	27	20.8
Codon 39 (C>T)	HBB:c.118C>T	β^0	10	14.7	21	16.2
IVS-I-110 (G>A)	HBB:c.93-21G>A	β^+	10	14.7	19	14.6
IVS-I-1 (G>A)	HBB:c.92+1G>A	β^0	8	11.7	10	7.7
IVS-I-6 (T>C)	HBB:c.92+6T>C	β^+	3	4.4	6	4.6
IVS-II-1 (G>A)	HBB:c.315+1G>A	β^0	2	2.9	3	2.3
Codon 5 (-CT)	HBB:c.17_18delCT	β^0	1	1.5	3	2.3
Codon 44 (-C)	HBB:c.135delC	β^0	1	1.5	2	1.5
-87 (C>G)	HBB:c.-137C>G	β^+	1	1.5	2	1.5
IVS-I-5 (G>C)	HBB:c.92+5G>C	β^+	1	1.5	1	0.8
Hb Sabine (codon 91 T>C)	HBB :c.275T>C	Nestabilna Hb varijanta	1	1.5	2	1.5
UKUPNO			68	100	130	100

POLIMORFIZMI U β -GLOBINSKOM GENSKOM LOKUSU KAO MARKERI ZA PORIJEKLO I DISTRIBUCIJU β -TALASEMIJSKIH MUTACIJA

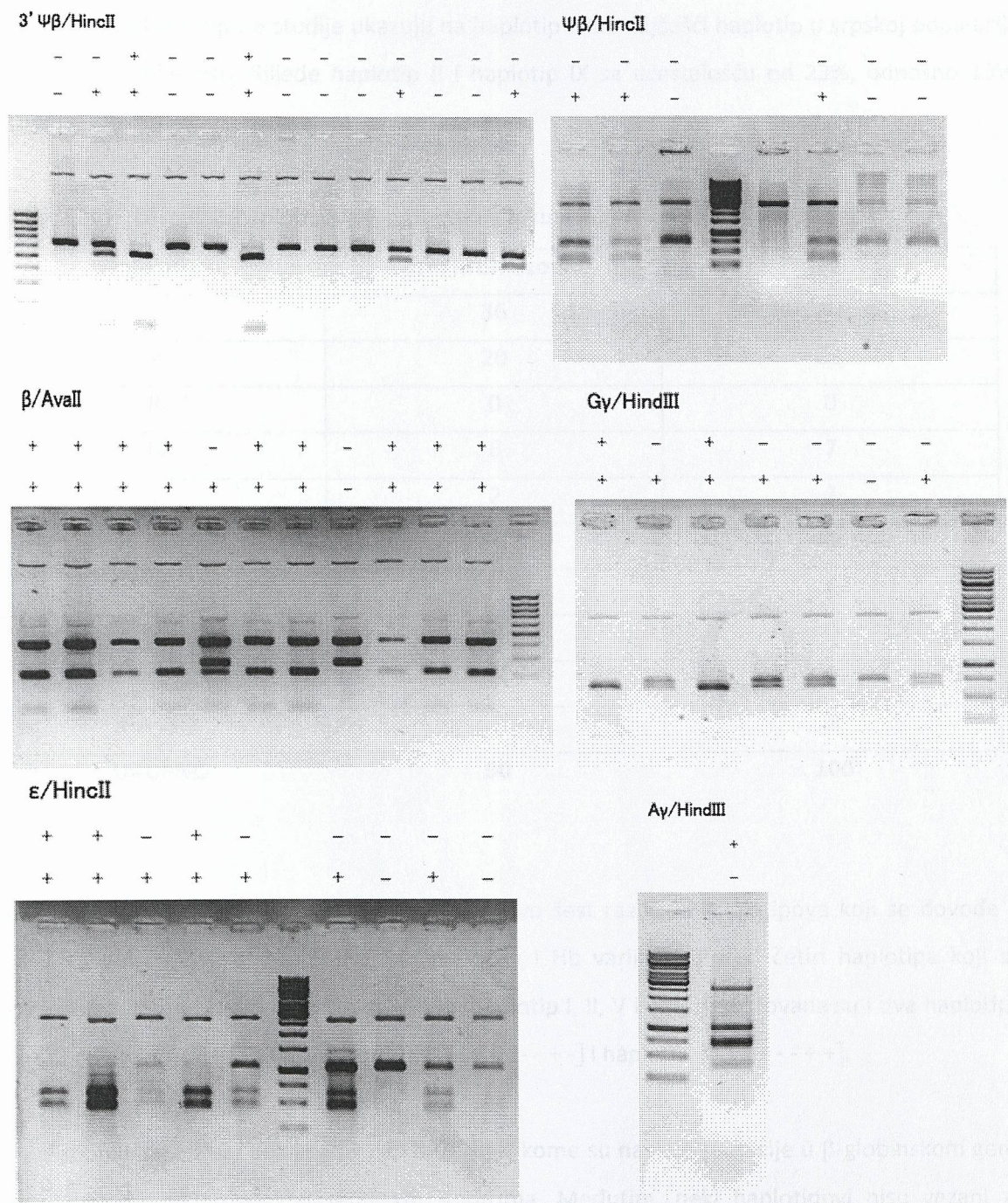
U cilju utvđivanja hromozomskog konteksta u kome su nastale β -talasemijske mutacije u Srbiji, izučavani su polimorfizmi u okviru β -globinskog lokusa. Da bi se utvrdila molekulska pozadina β -globinskog lokusa u srpskoj populaciji, takođe je sprovedena analiza polimorfizama u β -globinskom lokusu hromozoma zdravih osoba.

Haplotipska analiza rađena je na 28 pacijenata sa detektovanom β -talasemijom i 45 zdravih osoba.

U ovu studiju uključeno je sedam polimorfnih mjesta koja, u različitim kombinacijama, čine devet do sada okarakterisanih haplotipova β -talasemijskih hromozoma mediteranskog porijekla: ϵ /*HincII*, $G\gamma$ /*HindIII*, $A\gamma$ /*HindIII*, $\psi\beta$ /*HincII*, $3'\psi\beta$ /*HincII*, β /*Avall* i $3'\beta$ /*BamHI*. $3'\beta$ /*BamHI* polimorfno mjesto određeno je sekvenciranjem (Slika 8), dok su ostali polimorfizmi detektovani PCR-RFLP metodom (Slika 9).



Slika 8. Dio sekvence 3' regiona β -globinskog gena. $3'\beta$ /*BamHI* polimorfno mjesto (GGATCC) je podvučeno.



Slika 9. PCR-RFLP analiza polimorfnih mjesta na 1% (ϵ /HincII, G γ /HindIII, A γ /HindIII, $\psi\beta$ /HincII) i 2% (3' $\psi\beta$ /HincII, β /AvaII) agaroznom gelu. U analizama na 1% agaroznom gelu korišćen je 1 kb DNK marker, dok je za analize na 2% agaroznom gelu korišćen 100 bp DNK marker. Odsustvo mjesta koje prepoznaje i siječe odgovarajući restrikcioni enzim označeno je sa "-", a prisustvo sa "+".

Rezultati ove haplotipske studije ukazuju na haplotip I kao najčešći haplotip u srpskoj populaciji sa 40% zastupljenosti. Slijede haplotip II i haplotip IX sa učestalošću od 23%, odnosno 15% (Tabela 20).

Tabela 20. Učestalost haplotipova β-globinskog lokusa u zdravoj srpskoj populaciji.

Haplotip	Broj hromozoma	%
I	36	40
II	20	23
III	0	0
IV	6	7
V	2	2
VI	1	1
VII	4	4
VIII	0	0
IX	14	15
HA i HB	7	8
UKUPNO	90	100

Haplotipskom analizom ustanovljeno je prisustvo šest različitih haplotipova koji se dovode u vezu sa pet najčešćih β-talasemijskih mutacija i Hb varijanti. Pored četiri haplotipa koji su karakteristični za Mediteransko podneblje (haplotip I, II, V i VII), detektovana su i dva haplotipa specifična za srpsku populaciju: haplotip A [+ - + - - + -] i haplotip B [+ - + - - + +].

Haplotipovi oslikavaju hromozomski kontekst u kome su nastale mutacije u β-globinskom genu koje dovode do pojave talasemijskih sindroma. Međutim, neki haplotipovi nisu vezani za mutirane gene, dok se neke mutacije često dovode u vezu sa više haplotipova. Naši rezultati tako pokazuju asocijaciju hemoglobinske varijante Hb Lepore-BW i čak tri haplotipa: I, V i haplotipa A. Haplotip I je takođe asociran sa IVS-I-1 (G>A) i IVS-I-110 (G>A) β-talasemijskim mutacijama. Za najčešću β-talasemijsku mutaciju u Srbiji, IVS-II-745(C>G), u najvećem broju

slučaja, pokazana je povezanost sa haplotipom VII, dok je kodon 39 (C>T) mutacija u asocijaciji sa haplotipom II.

Neki od polimorfizama koji su povezani sa haplotipovima se nalaze u regionima koji su potencijalni *cis*-regulatorni transkripcioni elementi gena-modifikatora β -talasemijskih sindroma.

VARIJANTE U PROMOTORU γ -GLOBINSKIH GENA KAO MODIFIKATORI β -TALASEMIJSKIH SINDROMA

Sa izuzetkom nekoliko delecija, većina β -talasemija izazvana je tačkastim mutacijama u okviru samog β -globinskog gena ili u sekvencama u neposrednoj blizini. Međutim, velika fenotipska varijabilnost, koja se uglavnom vezuje za β -talasemiju tipa intermedija, najčešće se ne može objasniti samo genotipom β -globina.

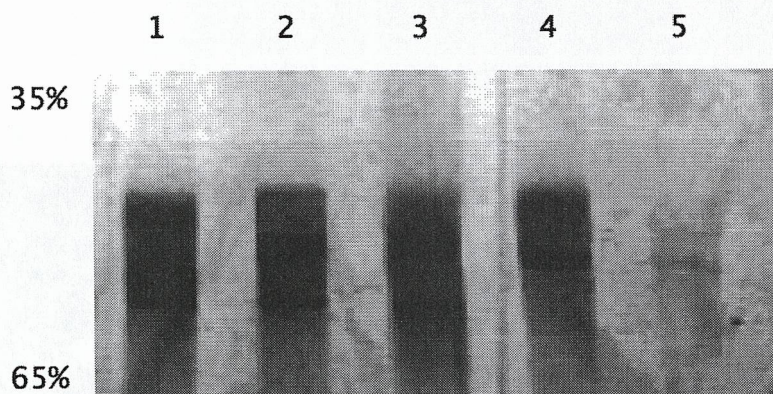
U cilju izučavanja korelacije fenotip-genotip β -talasemijskih sindroma, kod pacijenata sa β -talasemijom rađena je analiza γ -globinskih gena kao gena-modifikatora ovih oboljenja. Naime, sinteza HbF djelimično ublažava kliničku sliku, jer se nedostatak funkcionalnog β -globinskog lanca kompenzuje viškom fetalnih, γ -globinskih lanaca ($^A\gamma$ - i $^G\gamma$ -globinski lanci). Dosadašnje studije pokazale su postojanje različitih mutacija i polimorfizama u okviru, uglavnom, promotorskog regiona ovih gena, koji mogu uticati na njihovu povećanu ekspresiju u uslovima eritroidnog stresa. Zbog toga smo naše istraživanje usmjerili na ispitivanje molekularne osnove povišene ekspresije HbF u porodicama sa naslednim poremećajima hemoglobina.

Među analiziranim pacijentima izdvojila se porodica u kojoj su dva njena člana, otac i sin, imali izrazito povišen nivo HbF (12.8% i 16.5%). Ovi pacijenti su nosioci mutacije u β -globinskom genu koji rezultuje sintezom patološkog hemoglobina Hb Sabine.

Varijante u promotorskom regionu γ -globinskog gena kao modifikatori β -talasemijskog fenotipa

Analiza promotorskog regiona γ -globinskog gena DGGE metodom

Promotorski region γ -globinskog gena umnožen je PCR-om u dva koraka, pod uslovima koji su opisani u poglavlju Materijal i metode. U primarnom PCR-u, prajmerima A za γ i D umnožen je fragment dužine 661 bp koji je zatim poslužio kao matrica za sekundarni PCR. U sekundarnoj PCR reakciji, prajmerima C i B amplifikovan je fragment dužine 327 bp. Dobijeni PCR produkti analizirani su na 6% DGGE poliakrilamidnom gelu, nakon čega su bojeni srebronitratom (Slika 10).

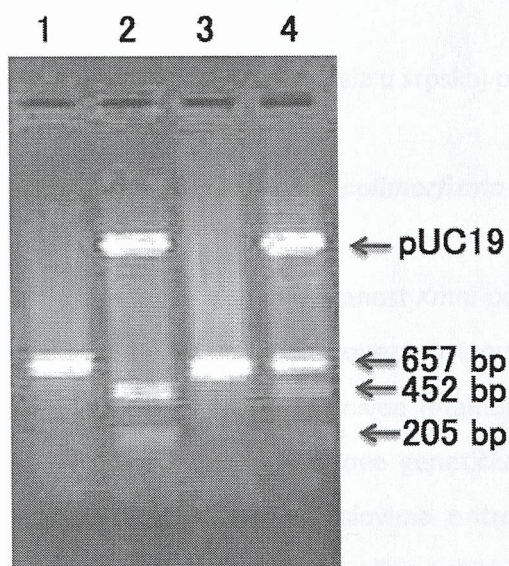


Slika 10: DGGE dijela promotorskog regiona γ -globinskog gena. Procenat denaturišućeg agensa označen je sa lijeve strane slike. 1 – kontrola, -158 C>T (-/-); 2 – kontrola, -158 C>T (+/-); 3 – pacijent sa Hb Sabine, HbF 16.5%; 4 – kontrola, -158 C>T (+/+); 5 – pacijent sa Hb Sabine, HbF 12.8%.

DGGE analiza promotorskog regiona γ -globinskog gena kod Hb Sabine pacijenata sa povećanim HbF ukazala je na postojanje genetskih varijanti kod oba pacijenta. Sekvenciranjem je pokazano da se radi o -158 C>T (*XmnI*) polimorfizmu kod oba pacijenta. Naime, utvrđeno je da je pacijent sa 16.5% HbF, heterozigotni nosilac -158 C>T (*XmnI*) polimorfizma, dok je kod pacijenta sa HbF od 12.8% pokazano prisustvo -158 C>T (*XmnI*) polimorfizma u homozigotnom stanju.

Detekcija *XmnI* polimorfizma u promotorskom regionu γ -globinskog gena PCR-RFLP metodom

Da bi potvrdili rezultate dobijene DGGE metodom, detekcija *XmnI* polimorfizma u promotorskom regionu γ -globinskog gena vršena je i PCR-RFLP metodom. Reakcija umnožavanja vršena je prajmerima GgF i GgR bez repića a produkt dužine 657 bp podvrgnut je digestiji *XmnI* restrikcionim enzimom. Kako ovaj polimorfizam kreira *XmnI* restrikciono mjesto, fragment koji posjeduje -158 (C>T) polimorfizam imaće dva produkta digestije veličine 452 bp i 205 bp. Kao kontrola aktivnosti restrikcionog enzima korišćen je pUC19, plazmid koji posjeduje samo jedno *XmnI* restrikciono mjesto i koji, nakon digestije ovim enzimom, daje fragment dužine 2.69 kb (Slika 11).



Slika 11. Detekcija *XmnI* polimorfizma PCR-RFLP metodom. 1,3 – nedigerirani PCR fragment; 2 – Hb Sabine pacijent, HbF 12.8%; 4 – Hb Sabine pacijent, HbF 16.5%.

Analiza učestalosti XmnI polimorfizma u promotorskom regionu $\epsilon\gamma$ -globinskog gena u srpskoj populaciji

XmnI polimorfizam je jedan od najčešćih polimorfizama u okviru β -globinskog klastera gena. Ovaj polimorfizam se javlja na poziciji -158 uglavnom $\epsilon\gamma$ -globinskog gena i odlikuje se zamjenom citozina timinom (-158 C>T).

Prisustvo *XmnI* polimorfizma proučavano je među 44 nosilaca β -talasemijskih mutacija (88 hromozoma) iz 28 nesrodnih porodica u srpskoj populaciji. Pacijenti su uglavnom bili nosioci hemoglobinske varijante Hb Lepore BW, kodon 39 (C>T) i IVS-I-110 (G>A) mutacije.

Među proučavanih 44 pacijenta, 52% bili su heterozigotni nosioci *XmnI* polimorfizma, dok je kod 6.8% detektovano prisustvo ovog polimorfizma u homozigotnom stanju.

Utvrđena frekvencija *XmnI* alela u srpskoj populaciji vrlo je visoka i iznosi 0.33.

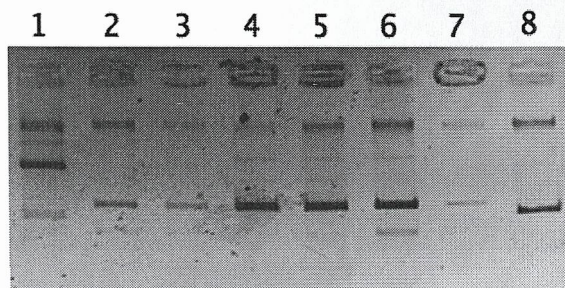
Funkcionalna analiza XmnI polimorfizma u promotorskom regionu $\epsilon\gamma$ -globinskog gena

S obzirom na veliku zastupljenost *XmnI* polimorfizma u srpskoj populaciji, a zbog brojnih studija koje ukazuju na moguću povezanost ovog polimorfizma i povišene ekspresije $\epsilon\gamma$ -globinskog gena, odnosno, povišenog nivoa fetalnog hemoglobina, naša istraživanja usmjerili smo na *in vitro* funkcionalnu analizu ove genetičke varijante. Funkcionalna analiza *XmnI* polimorfizma posebno je ispitivana u uslovima eritroidnog stresa, koji je u *in vitro* uslovima simuliran dodavanjem određenih doza Epo u K562 ćelije koje su korišćene kao eksperimentalni model sistem.

Promotorski region $\epsilon\gamma$ -globinskog gena ukloniran je u pCATbasic reporterski vektor. Nakon tranzijentne transfekcije CAT-konstrukata u K562 ćelije, CAT ELIZA esejom upoređivana je aktivnost promotora $\epsilon\gamma$ -globinskog gena sa i bez *XmnI* polimorfizma.

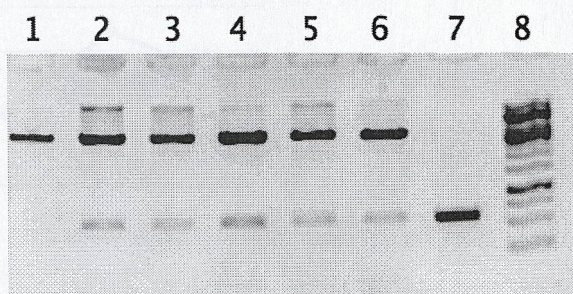
Priprema CAT konstrukata

Promotorski region γ -globinskog gena sa i bez *XmnI* polimorfizma umnožen je i ukloniran u reporterski vektor pCATbasic (Slike 12, 13), što je opisano u poglavlju Materijal i Metode. Uspješno kloniranje određene alelske varijante potvrđeno je sekvenciranjem.



Slika 12. Detekcija transformanata sa insertovanim fragmentom u pCATbasic plazmid metodom brze lize. 1 – pCATbasic plazmid (kontrolni plazmid bez inserta); 2-7 – potencijalni klonovi; 8 – pCATbasic plazmid (kontrolni plazmid bez inserta).

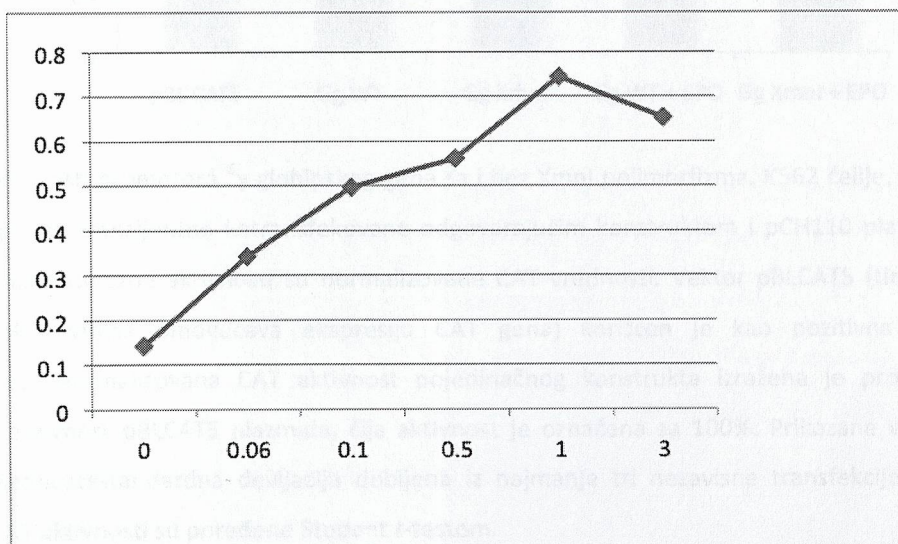
Slika 13. Detekcija insertovanog fragmenta iz potencijalnog klona digestijom plazmidne DNK izolovane mini prepom. 1 – linearizovan pCATbasic plazmid; 2-6 – plazmidna DNK potencijalnog klona digerirana restrikcionim enzimima *HindIII* i *XbaI*; 7 – insertovani fragment umnožen PCR reakcijom (675 bp); 8 – 1 kb DNK marker.



Transkripcija γ -globinskih gena u uslovima eritroidnog stresa – optimizacija eksperimentalne doze Epo

Da bi se ispitao uticaj mutacija u okviru promotora γ -globinskih gena u uslovima eritroidnog stresa, K562 ćelijska linija koja je korišćena u eksperimentima tranzijentne transfekcije tretirana je eitropoetinom (Epo).

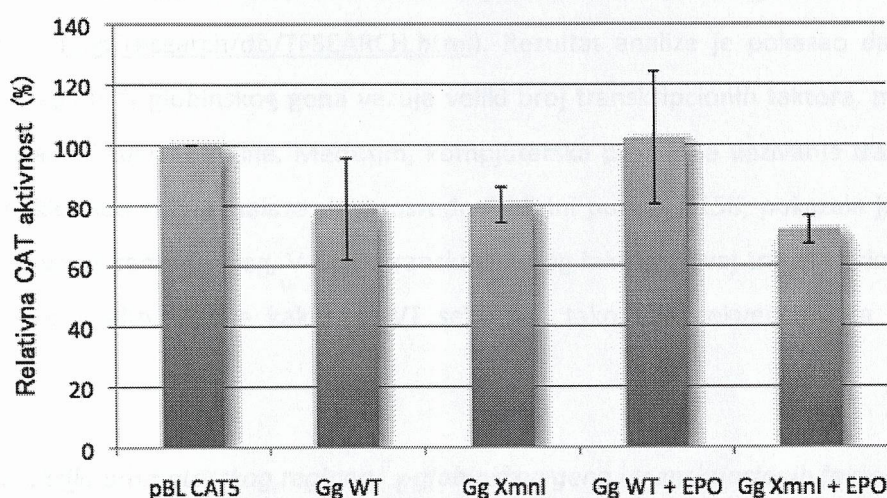
Za optimizaciju eksperimentalne doze Epo korišćen je opseg doza od 60 mU/ml do 3 U/ml u trajanju od 72 sata. K562 ćelije podvrgnute su testovima preživljavanja i tako je procijenjena doza Epo pri kojoj su ćelije najvijabilnije i metabolički najaktivnije. Vijabilnost je provjeravana MTT testom (Slika 14). Tretman K562 ćelija Epo od 1 U/ml najbolje je djelovao na K562 ćelije koje su, pod ovom količinom Epo, najviše proliferisale. Svi dalji eksperimenti na ćelijama u uslovima eritroidnog stresa rađeni su na ćelijama koje su tretirane Epo koncentracije 1U/ml.



Slika 14. Vijabilnost K562 ćelija pod tretmanom različitim dozama Epo u trajanju od 72 sata određena MTT testom. Na apscisi su označene doze Epo kojima su ćelije tretirane u U/ml, dok je na ordinati izražena absorbanca (A_{620}) pri čemu je broj preživjelih ćelija direktno proporcionalan izmjerenoj absorbanci.

Funkcionalna analiza promotorskog regiona γ -globinskog gena

CAT-konstrukti dobijeni na prethodno opisan način (Gg WT, Gg XmnI), kotransfekovani su sa pCH110 plazmidom u ćelijsku liniju K562 sa i bez tretmana Epo (poglavlje Materijal i metode). Aktivnost pojedinačnih promotora mjerena je CAT ELIZA esejom (Slika 15).



Slika 15. Aktivnosti promotora γ -globinskog gena sa i bez XmnI polimorfizma. K562 ćelije, netretirane i tretirane Epo, su tranzijentno kotransfekovane odgovarajućim konstruktom i pCH110 plazmidom i na osnovu β -galaktozidazne aktivnosti su normalizovane CAT vrednosti. Vektor pBLCAT5 (timidin kinazni promotor HSV virusa omogućava ekspresiju CAT gena) korišćen je kao pozitivna kontrola u eksperimentu. Normalizovana CAT aktivnost pojedinačnog konstrukta izražena je procentualno u odnosu na aktivnost pBLCAT5 plazmida, čija aktivnost je označena sa 100%. Prikazane vrijednosti su srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija dobijena iz najmanje tri nezavisne transfekcije. Vrijednosti relativnih CAT aktivnosti su poređene Student *t*-testom.

Iz rezultata transfekcije može se vidjeti da ne postoji statistički značajna razlika između aktivnost promotora γ -globinskog gena sa i bez XmnI polimorfizma kako u standardnim uslovima, tako i u uslovima eritroidnog sresa.

Analiza vezivanja transkripcionih faktora za promotorski region $\epsilon\gamma$ -globinskog gena

In silico analiza promotorskog regiona $\epsilon\gamma$ -globinskog gena

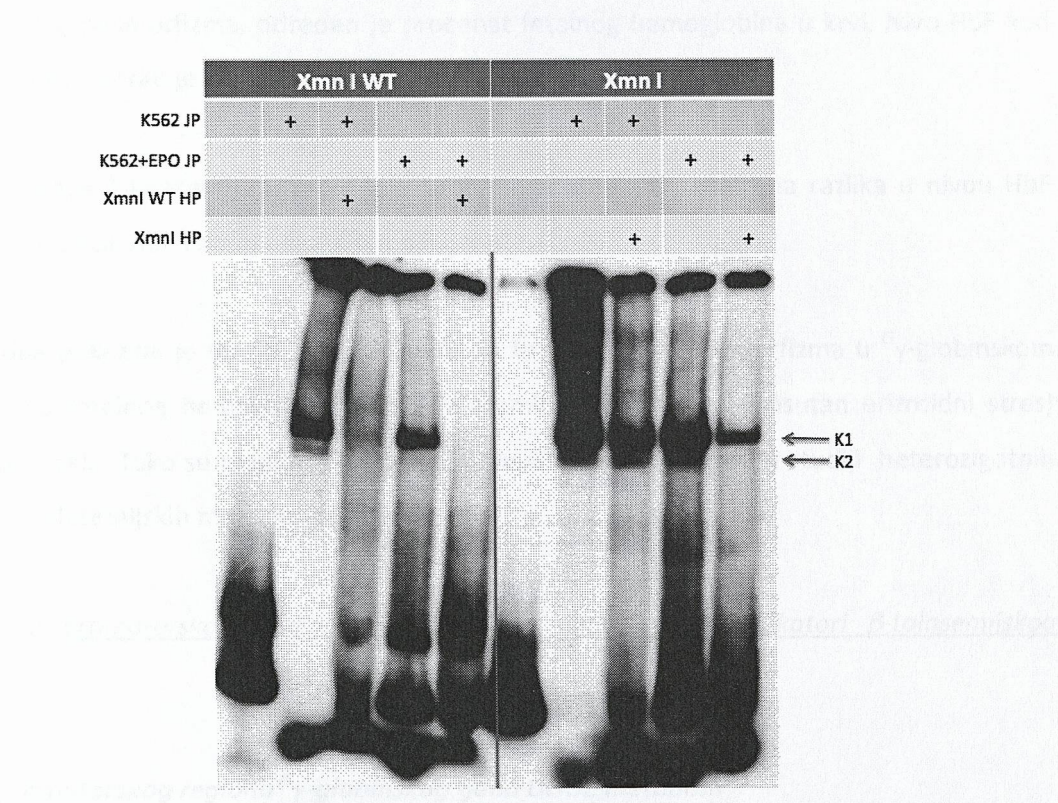
U cilju identifikacije proteina koji se vezuju za sekvence DNK u promotoru $\epsilon\gamma$ -globinskog gena, region od -616 do +41 bp je analiziran na prisustvo potencijalnih mjesta za vezivanje transkripcionih faktora. Ova analiza je urađena programom TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>). Rezultat analize je pokazao da se za ovaj promotorski region $\epsilon\gamma$ -globinskog gena vezuje veliki broj transkripcionih faktora, među kojima su najčešći članovi GATA familije. Međutim, kompjuterska predikcija vezivanja transkripcionih faktora za nukleotide koji se nalaze u neposrednoj blizini pozicije -158, pokazala je postojanje mjesta za vezivanje samo jednog, V-Myb, transkripcionog faktora. Ovaj transkripcioni faktor se, prema *in silico* analizi, vezuje kako za WT sekvencu tako i za sekvencu koja sadrži *XmnI* polimorfizam.

Analiza interakcija promotorskog regiona $\epsilon\gamma$ -globinskog gena i transkripcionih faktora

Eksperimentima usporene elektroforetske pokretljivosti (EMSA) analizirane su interakcije jedarnih proteina sa promotorom $\epsilon\gamma$ -globinskog gena. Korišćene su dvolančane oligonukleotidne probe dobijene hibridizacijom (annealing, eng.) "coding" i "noncoding" odgovarajućih oligonukleotida čije se sekvence prikazane u tabeli 13 poglavlja Materijal i metode. Jedarni proteini za ove analize izolovani su iz K562 ćelija i K562 ćelija koje su prethodno bile tretirane Epo.

EMSA eksperimenti rađeni su sa dvije oligonukleotidne probe dužine 30 nukleotida od kojih je jedna sadržala *XmnI* polimorfizam dok druga nije. Rezultati eksperimenata usporene elektroforetske pokretljivosti pokazali su da se proteini vezuju sa većim afinitetom za probu koja sadrži *XmnI* polimorfizam u poređenju sa probom bez *XmnI* polimorfizma. Međutim, obje oligonukleotidne probe (*XmnI* WT i *XmnI* proba) u interakciji sa jedarnim proteinima izolovanim

iz K562 ćelija sa i bez tretmana Epo imale su isti patern traka na gelu (Slika 16). Oba kompleksa koji se tom prilikom javljaju, u reakcijama unakrsne kompeticije sa neobilježenim XmnI WT i XmnI probama, potpuno su bila “ohlađena” (radiografije nisu prikazane). Ovi rezultati ukazuju na vezivanje istih transkripcionih faktora kako za probu koja ne sadrži *XmnI* polimorfizam, tako i za probu koja ovaj polimorfizam sadrži.



Slika 16. Analiza interakcije radioaktivno obilježene dvolančane probe (XmnI WT/ XmnI) sa jedarnim proteinima (JP) iz K562 ćelija bez i pod tretmanom Epo, metodom usporene elektroforetske pokretljivosti (EMSA). Radi provjere specifičnosti formiranih kompleksa, ista neobilježena, hladna proba (HP) dodavana je u višku. Formirani kompleksi označeni su sa K1 i K2.

Rezultati *in vitro* analiza -158 (C>T) polimorfizma u promotoru γ -globinskog gena ukazuju da ova promjena sama za sebe, ne predstavlja sekundarni modifikator β -talasemijskih sindroma tj. ne utiče na povećanje sinteze HbF kod pacijenata sa β -talasemijom.

Korelacija *XmnI* polimorfizma u γ -globinskom genu i nivoa fetalnog hemoglobina kod β -talasemičnih pacijenata srpskog porijekla

U cilju ispitivanja veze između *XmnI* polimorfizma i povećanog nivoa fetalnog hemoglobina u *in vivo* uslovima, kod β -talasemičnih pacijenata kod kojih je prethodno utvrđeno prisustvo tj. odsustvo ovog polimorfizma, određen je procenat fetalnog hemoglobina u krvi. Nivo HbF kod ovih pacijenata varirao je od 0.35% do 16.5%.

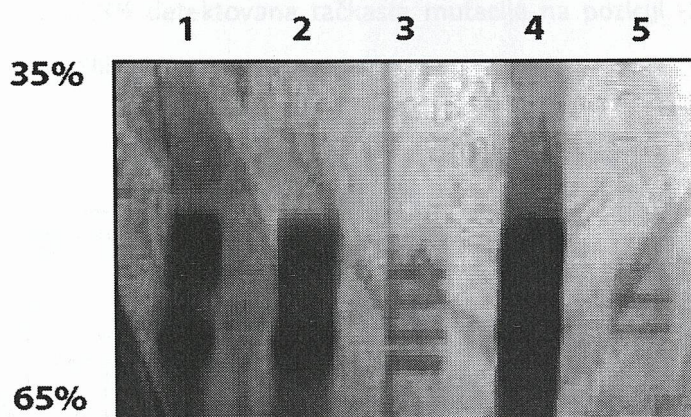
Kod 44 nosilaca β -talasemije u Srbiji nije pronađena statistički značajna razlika u nivou HbF između *XmnI* pozitivnih i *XmnI* negativnih pacijenata.

Naša studija pokazala je da ne postoji korelacija između *XmnI* polimorfizma u γ -globinskom genu i nivoa fetalnog hemoglobina kod β -talasemičnih pacijenata (prisutan eritroidni stres) srpskog porijekla. Tako su rezultati naših analiza *in vitro*, našli potvrdu u studiji heterozigotnih nosilaca β -talasemijskih mutacija u Srbiji.

Varijante u promotorskom regionu γ -globinskog gena kao modifikatori β -talasemijskog fenotipa

Analiza promotorskog regiona γ -globinskog gena DGGE metodom

Promotorski region γ -globinskog gena umnožen je reakcijom lančanog umnožavanja (PCR) u dva koraka, pod uslovima koji su opisani u poglavlju Materijal i metode. U primarnom PCR-u, prajmerima A za γ i D umnožen je fragment dužine 664 bp koji je zatim poslužio kao matrica za sekundarni PCR. U sekundarnoj PCR reakciji, prajmerima C i B amplifikovan je fragment dužine 327 bp. Dobijeni PCR produkti analizirani su na 6% DGGE poliakrilamidnom gelu, nakon čega su bojeni srebronitratom (Slika 17).



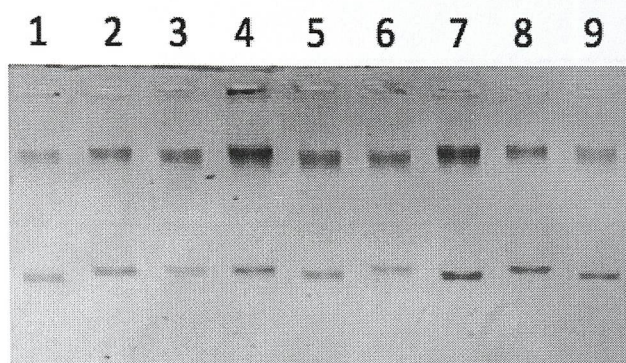
Slika 17. DGGE dijela promotorskog regiona γ -globinskog gena. Procenat denaturišućeg agensa označen je sa lijeve strane slike. 1, 2, 4 – negativne kontrole (pacijenti kod kojih nisu detektovane promjene u promotoru γ -globinskog gena); 3 – pacijent sa Hb Sabine, HbF 16.5%; 5 – pacijent sa Hb Sabine, HbF 12.8%.

DGGE analiza promotorskog regiona γ -globinskog gena kod Hb Sabine pacijenata sa povećanim HbF ukazala je na postojanje heterozigotnih promijena u ovom regionu kod oba pacijenta s obzirom na to da je došlo do razdvajanja fragmenta na dvije, odnosno četiri trake.

Sekvenciranje promotorskog regiona γ -globinskog gena

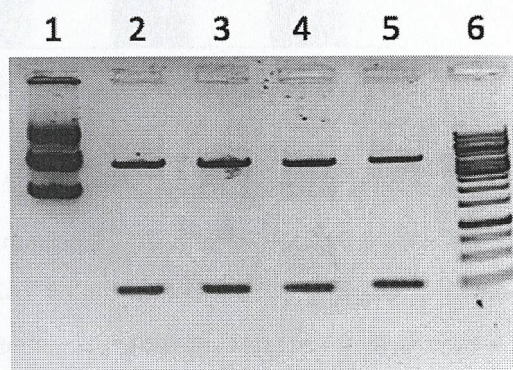
Kako su rezultati DGGE metode ukazali da postojanje međusobno različitih promjena u okviru promotorskog regiona γ -globinskog gena, ove fragmente je bilo neophodno sekvencirati da bi se utvrdilo sa sigurnošću o kakvim promjenama je riječ. Sekvencirani su fragmenti dobijeni nakon sekundarne PCR reakcije, dužine 327bp, sa prajmerom C (forward prajmer).

Rezultati sekvenciranja pokazali sledeće: kod pacijenta sa nivoom HbF od 16.5% detektovano je prisustvo delicije od 4 bp na poziciji -225 do -222 u heterozigotnom obliku, dok je kod pacijenta



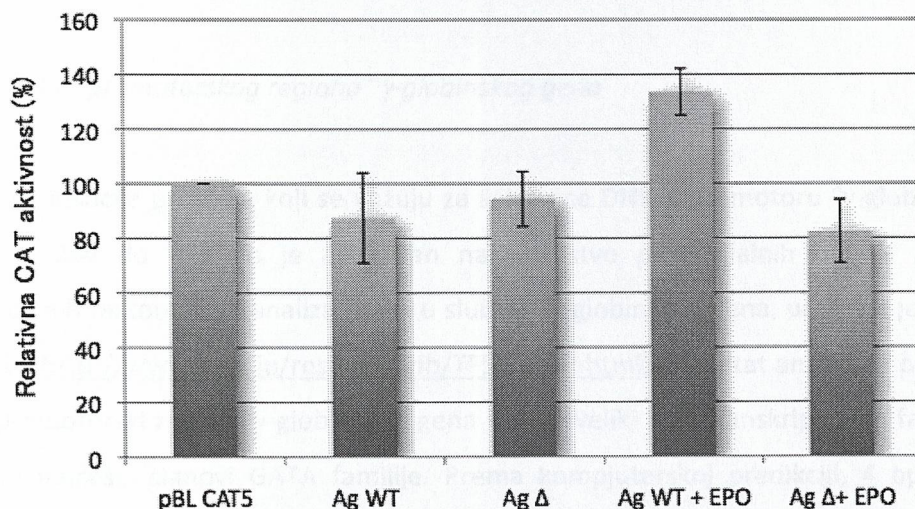
Slika 19. Detekcija transformanata sa insertovanim fragmentom u pCATbasic plazmid metodom brze lize. 1 – pCATbasic plazmid (kontrolni plazmid bez inserta); 2-8 – potencijalni klonovi; 9 – pCATbasic plazmid (kontrolni plazmid bez inserta).

Slika 20. Detekcija insertovanog fragmenta iz potencijalnog klona digestijom plazmidne DNK izolovane mini prepom. 1 – linearizovan pCATbasic plazmid; 2-5 – plazmidna DNK potencijalnog klona digerirana restrikcijom enzimima *HindIII* i *XbaI*; 6 – 100 bp DNK marker.



Funkcionalna analiza promotorskog regiona γ -globinskog gena

CAT-konstrukti dobijeni na prethodno opisan način (Ag WT, Ag Δ), kotransfekovani su sa pCH110 plazmidom u ćelijsku liniju K562 sa i bez tretmana Epo, na način opisan u poglavlju Materijal i metode. Aktivnost pojedinačnih promotora je mjerena CAT ELIZA esejem (Slika 21).



Slika 21. Uticaj 4bp delecije na aktivnost promotora γ -globinskog gena. K562 ćelije, netretiranih i tretiranih Epo, su tranzijentno kotransfekovane odgovarajućim konstruktom i pCH110 plazmidom i na osnovu β -galaktozidazne aktivnosti su normalizovane CAT vrednosti. Vektor pBLCAT5 (timidin kinazni promotor HSV virusa omogućava ekspresiju CAT gena) korišćen je kao pozitivna kontrola u eksperimentu. Normalizovana CAT aktivnost pojedinačnog konstrukta izražena je procentualno u odnosu na aktivnost pBLCAT5 plazmida, čija aktivnost je označena sa 100%. Prikazane vrijednosti su srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija dobijena iz najmanje tri nezavisne transfekcije. Vrijednosti relativnih CAT aktivnosti su poređene Student *t*-testom.

Iz rezultata transfekcije može se vidjeti da ne postoji statistički značajna razlika između aktivnosti promotora γ -globinskog gena sa i bez 4bp delecije u uslovima neeritroidnog stresa. Međutim, u uslovima eritroidnog stresa tj. u ćelijama tretiranim Epo (1U/ml), primjećuje se statistički značajna razlika u aktivnosti WT i deletiranog promotora γ -globinskog gena ($p < 0.05$). Naime, aktivnost WT promotora u uslovima eritroidnog stresa raste dok se aktivnost promotora koji sadrži 4bp deleciju ne mijenja u odnosu na aktivnost tog promotora u uslovima neeritroidnog stresa (Slika 21).

Analiza vezivanja transkripcionih faktora za promotorski region $\text{A}\gamma$ -globinskog gena

In silico analiza promotorskog regiona $\text{A}\gamma$ -globinskog gena

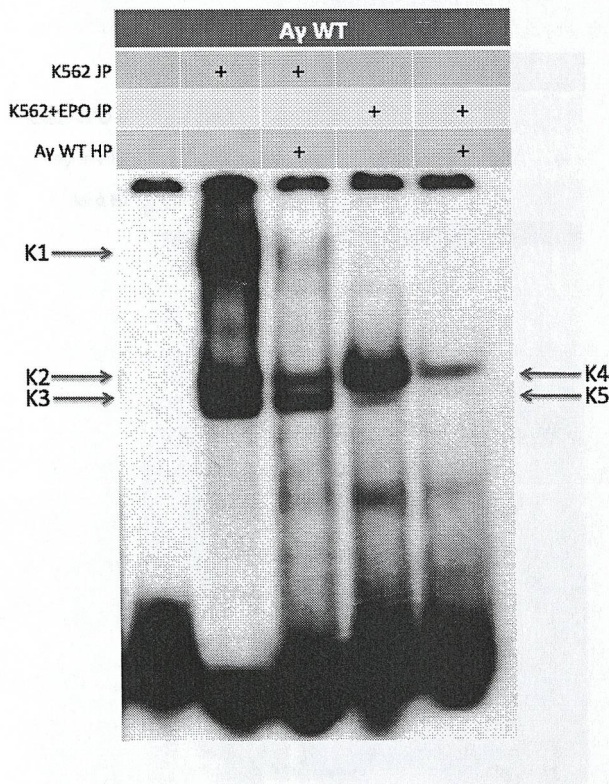
U cilju identifikacije proteina koji se vezuju za sekvence DNK u promotoru $\text{A}\gamma$ -globinskog gena, region od -264 do +23 bp je analiziran na prisustvo potencijalnih mjesta za vezivanje transkripcionih faktora. Ova analiza, kao i u slučaju $\text{G}\gamma$ -globinskog gena, urađena je programom TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>). Rezultat analize je pokazao da se za ovaj promotorski region $\text{A}\gamma$ -globinskog gena vezuje veliki broj transkripcionih faktora, među kojima su najčešći članovi GATA familije. Prema kompjuterskoj predikciji, 4 bp delecija na poziciji -225 do -222 ukida mjesto vezivanja Nkx-2 transkripcionog faktora, dok, s druge strane, kreira mjesta vezivanja GATA-1 i GATA-2 transkripcionih faktora.

Analiza interakcija promotorskog regiona $\text{A}\gamma$ -globinskog gena i transkripcionih faktora

Eksperimentima usporene elektroforetske pokretljivosti (EMSA) analizirane su interakcije jedarnih proteina sa promotorom $\text{A}\gamma$ -globinskog gena. U ovim eksperimentima korišćene su dvolančane oligonukleotidne probe dobijene hibridizacijom (annealing, eng.) "coding" i "noncoding" oligonukleotida čije su sekvence prikazane u tabeli 13 poglavlja Materijal i metode. Jedarni proteini za ove analize izolovani su iz K562 ćelija i K562 ćelija koje su prethodno bile tretirane Epo koncentracije 1U/ml. EMSA eksperimenti rađeni su sa dvije oligonukleotidne probe, $\text{A}\gamma \Delta$ i $\text{A}\gamma$ WT, dužine 30 nukleotida od kojih je jedna sadržala deleciju na poziciji -225 do -222, dok druga nije.

Rezultati eksperimenata usporene elektroforetske pokretljivosti pokazali su različit patern vezivanja proteina iz K562 ćelija tretiranih i netretiranih Epo, kako u slučaju $\text{A}\gamma$ WT (Slika 22), tako i u slučaju $\text{A}\gamma \Delta$ probe (radiografija nije prikazana). Naime, u eritroidnom stresu dolazi do formiranja nova dva kompleksa u odnosu na komplekse koji se formiraju u normalnim,

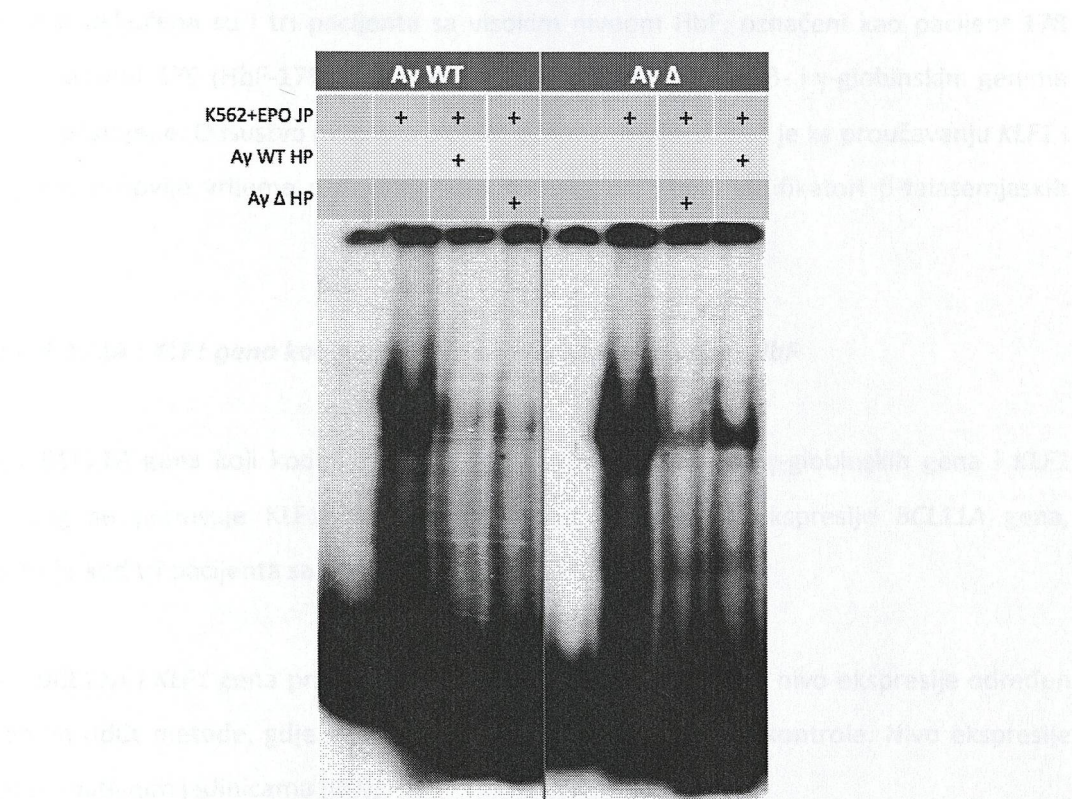
neeritroidnim uslovima. Interakcije proteina i oligonukleotidnih proba su specifične što potvrđuju i rezultati nakon reakcija kompeticije "sam sa sobom" (Slike 22, 23).



Slika 22. Analiza interakcije radioaktivno obilježene dvolančane probe (Ay WT) sa jedarnim proteinima (JP) iz K562 ćelija bez i pod tretmanom Epo, metodom usporene elektroforetske pokretljivosti (EMSA). Radi provjere specifičnosti formiranih kompleksa, ista, neobilježena, hladna proba (HP) dodavana je u višku. Formirani kompleksi označeni su sa K1, K2, K3, K4 i K5.

U reakcijama unakrsne kompeticije, pokazano je da prilikom dodavanja hladne, Ay Δ probe dolazi do hlađenja kompleksa nastalih interakcijom proteina i Ay WT probe. Međutim, obrnuto, u eksperimentu kompeticije sa Ay WT kao hladnom probom, kompleksi proteina koji se vezuju za Ay Δ probu ne bivaju u potpunosti iskompetirani (Slika 23). Ovi rezultati ukazuju na

postojanje dodatnih transkripcionih faktora koji se vezuju za $A\gamma \Delta$ ali ne i za probu $A\gamma$ WT. Ovo je u skladu sa predhodno urađenom *in silico* analizom.



Slika 23. Analiza interakcije radioaktivno obilježene dvolančane probe ($A\gamma$ WT/ $A\gamma \Delta$) sa jedarnim proteinima (JP) iz K562 ćelija tretiranih Epo, metodom usporene elektroforetske pokretljivosti (EMSA). Radi provjere specifičnosti formiranih kompleksa, neobilježene, hladne probe (HP) dodavane su u višku.

Rezultati prethodno opisanih *in vitro* analiza ukazuju na moguće postojanje regulatornog elementa, u promotorskom regionu $A\gamma$ -globinskog gena na poziciji -225 do -222, koji je inducibilan u uslovima eritroidnog stresa.

VARIJANTE U GENIMA IZVAN GLOBINSKIH LOKUSA KAO MODIFIKATORI β -TALASEMIJSKIH SINDROMA

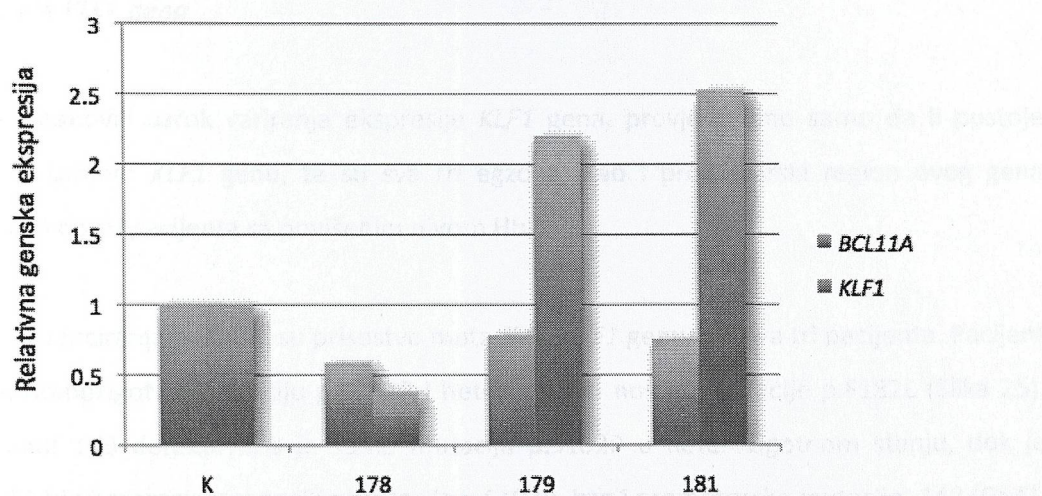
U ovu studiju uključena su i tri pacijenta sa visokim nivoom HbF, označeni kao pacijent 178 (HbF-12%), pacijent 179 (HbF-17%) i pacijent 181 (HbF-11%), u čijim β - i γ -globinskim genima nisu nađene promjene. Odsustvo mutacija u ovim genima usmjerila nas je ka proučavanju *KLF1* i *BCL11A* gena, u novije vrijeme označenih kao potencijalni geni-modifikatori β -talasemijaskih sindroma.

Ekspresija BCL11A i KLF1 gena kod pacijenata sa povećanim nivoom HbF

Ekspresija *BCL11A* gena koji kodira BCL11A, transkripcioni represor γ -globinskih gena i *KLF1* gena sa kog se prepisuje KLF1 transkripcioni faktor, regulator ekspresije *BCL11A* gena, proučavana je kod tri pacijenta sa povećanim nivoom HbF u krvi.

Ekspresija *BCL11A* i *KLF1* gena praćena je RQ-PCR metodom. Relativni nivo ekspresije određen je primjenom ddCt metode, gdje su kao kalibrator korišćene zdrave kontrole. Nivo ekspresije izražen je u relativnim jedinicama (RU).

Rezultati RQ-PCR metode pokazali su da kod sva tri pacijenta dolazi do izmijenjene ekspresije *BCL11A* i *KLF1* gena u odnosu na kontrolu. Naime, kod sva tri pacijenta detektovan je smanjen nivo ekspresije *BCL11A* gena, dok je nivo ekspresije *KLF1* gena bio smanjen kod pacijenta 178, a povećan kod pacijenata 179 i 181 (Slika 24).



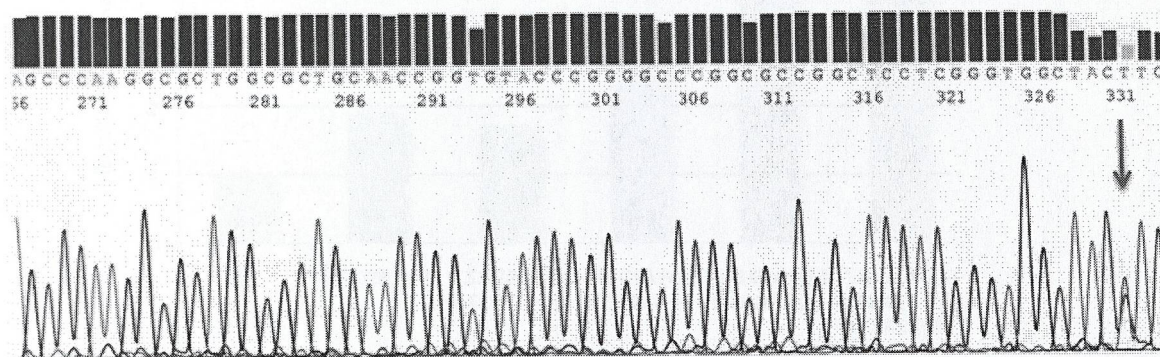
Slika 24. Ekspresija *BCL11A* i *KLF1* gena kod pacijenata sa povišenim nivoom HbF u odnosu na zdrave kontrole (K).

Nivo ekspresije *HBG* gena kod sva tri pacijenta kod kojih je detektovan visok procenat fetalnog hemoglobina u krvi (pacijenti 178, 179 i 181), bio je u značajnoj mjeri povišen u odnosu na kontrolnu grupu, što je i očekivano. Kako je kod sva tri pacijenta nivo ekspresije *BCL11A* bio snižen u odnosu na kontrolnu grupu, možemo pretpostaviti da smanjena ekspresija ovog gena dovodi do povećane ekspresije *HBG* gena, što je u skladu sa pretpostavljenom ulogom *BCL11A* kao represora γ -globinskih gena. Takođe, ovaj rezultat ukazuje i na moguću povezanost ekspresije *BCL11A* gena sa nivoom HbF u krvi. S druge strane, nivo ekspresije *KLF1* gena kod ova tri pacijenta varirao je u odnosu na kontrolnu grupu te se stoga direktna korelacija između nivoa ekspresije *KLF1* i *HBG* gena kao i nivoa HbF ne može ustanoviti.

Sekvenciranje *KLF1* gena

Da bismo ustanovili uzrok variranja ekspresije *KLF1* gena, provjerili smo samo da li postoje promjene u samom *KLF1* genu, te su sva tri egzona, kao i promotorski region ovog gena sekvencirani kod tri pacijenta sa povišenim nivom HbF.

Rezultati sekvenciranja pokazali su prisustvo mutacija u *KLF1* genu kod sva tri pacijenta. Pacijent 178 bio je homozigot za mutaciju p.S102P i heterozigotni nosilac mutacije p.F182L (Slika 25). Kod pacijenta 179 detektovana je samo mutacija p.S102P u heterozigotnom stanju, dok je pacijent 181 bio heterozigotni nosilac mutacije p.S102P, kao i promotorske mutacije -148 (G>A).

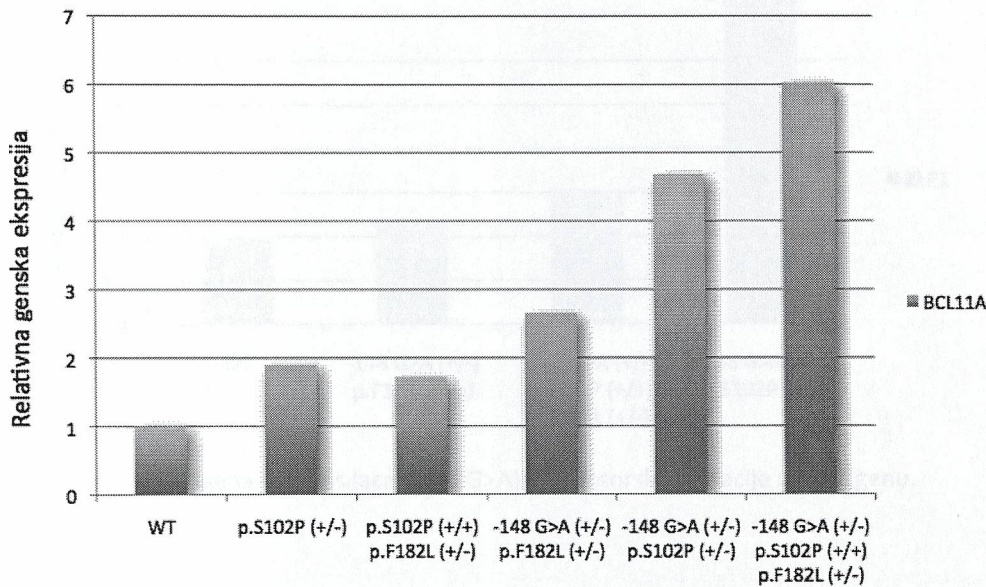


Slika 25. Dio sekvence *KLF1* gena. Mutacija p.F182L označena je strelicom.

Da bismo utvrdili zastupljenost detektovanih varijanti *KLF1* gena (-148 (G>A); p.S102P; p.F182L) u opštoj srpskoj populaciji, sprovedi smo populacionu studiju koja je uključivala 18 nezavisnih porodica. Rezultati ovih analiza pokazali su da je od 36 hromozoma sekvenciranih na prisustvo datih varijanti u *KLF1* genu, promotorska mutacija -148 (G>A) zastupljena sa 11.1%, dok je mutacija p.F182L zastupljena sa 13.9%. Mutacija u drugom egzonu *KLF1* gena koja dovodi do aminokiselinske zamjene serina u prolin, p.S102P, u srpskoj populaciji zastupljena je sa čak 41.7%.

Ekspresija BCL11A i KLF1 gena kod nosilaca različitih KLF1 genotipova

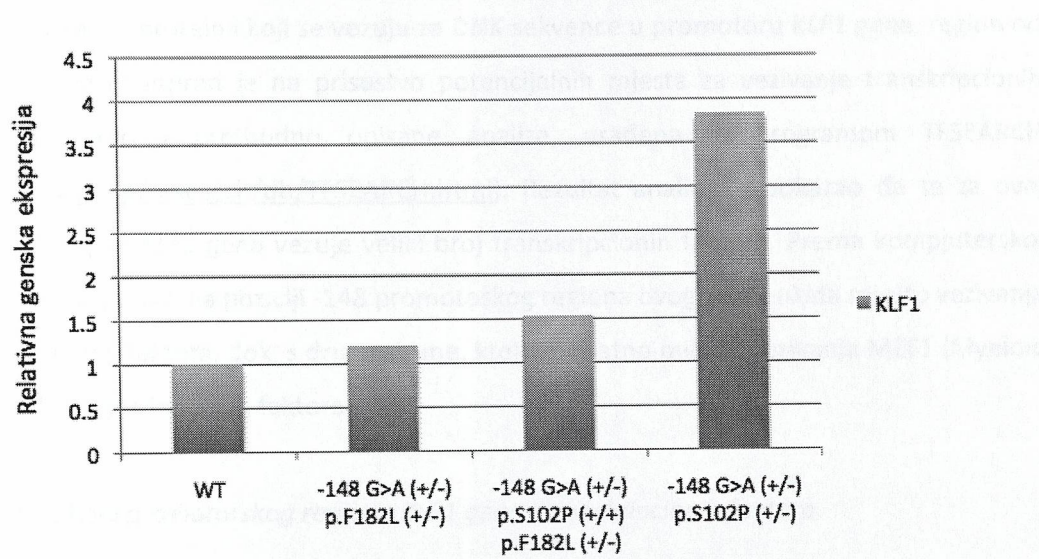
U cilju utvrđivanja uticaja određenog KLF1 genotipa na ekspresiju *BCL11A* gena koji je regulisan od strane KLF1 transkripcionog faktora, ekspresija ovog gena kod osoba sa različitim *KLF1* genotipom određena je RQ-PCR-om (Slika 26).



Slika 26. Ekspresija *BCL11A* gena kod osoba sa istim *KLF1* genotipom u odnosu na WT kontrolu.

Rezultati ove analize ukazali su na blago povećanje ekspresije *BCL11A* gena kod nosilaca varijanti p.S102P i p.F182L. S druge strane, veoma značajno povećanje ekspresije *BCL11A* gena (do 6 puta) zabilježeno je kod nosilaca promotorske mutacije -148 (G>A) u kombinaciji sa p.S102P i p.F182L varijantama. Ovi rezultati upućuju na zaključak da p.S102P i p.F182L varijante utiču na funkciju KLF1 kao transkripcionog faktora, dok mutacija -148 (G>A) utiče na povećanje ekspresije samog *KLF1* gena dovodeći, posredno, i do povećanja ekspresije *BCL11A* gena.

Da bismo utvrdili uticaj promotorske mutacije -148 (G>A) na ekspresiju *KLF1*, ekspresija ovog gena kod osoba kod kojih je data mutacija detektovana, u kombinaciji sa p.S102P i p.F182L, određena je RQ-PCR-om (Slika 27).



Slika 27. Ekspresija *KLF1* gena kod nosilaca -148 (G>A) promotorske mutacije u *KLF1* genu.

RQ-PCR metodom detektovan je povišen nivo ekspresije *KLF1* gena kod svih prethodno opisanih nosilaca -148 (G>A) mutacije u promotorskom regionu *KLF1* genu. Ovakav rezultat ukazuje na moguće postojanje inducibilnog regulatornog elementa u promotorskom regionu *KLF1* gena koji sadrži -148 (G>A) mutaciju. Potvrdu i objašnjenje ovakvih rezultata potražili smo u vrsti transkripcionih faktora koji se eventualno vezuju za promotorski region koji sadrži -148 (G>A) mutaciju.

Analiza vezivanja transkripcionih faktora za promotorski region KLF1 gena

In silico analiza promotorskog regiona KLF1 gena

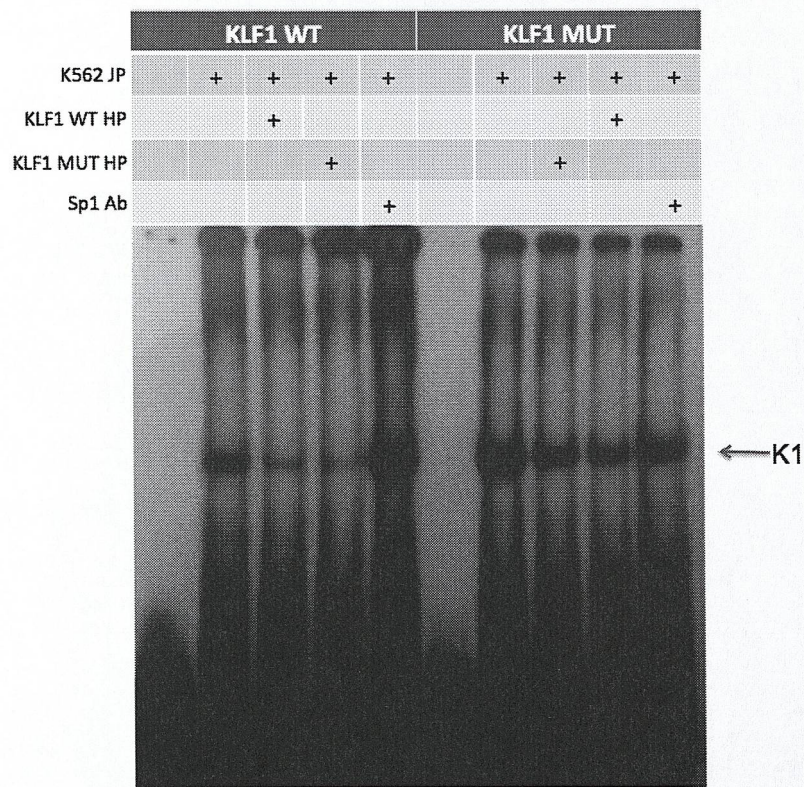
U cilju identifikacije proteina koji se vezuju za DNK sekvence u promotoru *KLF1* gena, region od -231 do +44 bp analiziran je na prisustvo potencijalnih mjesta za vezivanje transkripcionih faktora. Ova, kao i prethodno opisane analize, urađena je programom TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>). Rezultat analize je pokazao da se za ovaj promotorski region *KLF1* gena vezuje veliki broj transkripcionih faktora. Prema kompjuterskoj predikciji, mutacija G>A na poziciji -148 promotorskog regiona ovog gena, ukida mjesto vezivanja Sp1 transkripcionog faktora, dok, s druge strane, kreira dodatno mjesto vezivanja MZF1 (Myeloid Zinc Finger 1) transkripcionog faktora.

Analiza interakcija promotorskog regiona KLF1 gena i transkripcionih faktora

Eksperimentima usporene elektroforetske pokretljivosti (EMSA) analizirane su interakcije jedarnih proteina K562 ćelijske linije sa promotorom *KLF1* gena. U ovim eksperimentima korišćene su dvolančane oligonukleotidne probe dobijene hibridizacijom (annealing, eng.) "coding" i "noncoding" oligonukleotida čije su sekvence prikazane u tabeli 13, poglavlja Materijal i metode. EMSA eksperimenti rađeni su sa dvije oligonukleotidne probe, *KLF1* MUT i *KLF1* WT, dužine 30 nukleotida od kojih je jedna sadržala G>A promjenu na poziciji -148, dok druga nije.

Rezultati eksperimenata usporene elektroforetske pokretljivosti pokazali su da se proteini vezuju sa većim afinitetom za probu koja sadrži mutaciju -148 (G>A) u poređenju sa probom bez ove mutacije. Interakcije proteina i oligonukleotidnih proba su specifične što su potvrdili i rezultati reakcije kompeticije "sam sa sobom", gdje je došlo do potpunog "hlađenja" formiranog kompleksa (radiografije nisu prikazane). Međutim, obje oligonukleotidne probe (*KLF1* WT i *KLF1* MUT proba) u interakciji sa jedarnim proteinima izolovanim iz K562 ćelija imale

su isti patern traka na gelu. Kompleks koji se tom prilikom javlja, u reakcijama unakrsne kompeticije sa neobilježenim KLF1 WT i KLF1 MUT probama, nije bio u potpunosti “ohlađen” (Slika 28). Ovi rezultati ukazuju na to da se različiti transkripcioni faktori vezuju za KLF1 WT, donosno KLF1 MUT probu. U reakcijama “supershifta” sa probama KLF1 WT/KLF1 MUT i jedarnim proteinima iz K562 ćelija korišćeno je antitijelo za Sp1 transkripcioni faktor (Slika 28). Dodavanje Sp1 antitijela dovodi do formiranja jačeg kompleksa samo prilikom interakcije jedarnih proteina iz K562 ćelija i KLF1 WT probe, dok nema uticaja na komplekse formirane interakcijom jedarnih proteina i KLF1 MUT probe.



Slika 28. Analiza interakcije radioaktivno obilježene dvolančane probe (KLF1 WT/ KLF1 MUT) sa jedarnim proteinima (JP) iz K562 ćelija, metodom usporene elektroforetske pokretljivosti (EMSA). Radi provjere specifičnosti formiranih kompleksa, ista neobilježena, hladna proba (HP) dodavana je u višku. Formirani kompleks označen je sa K1. “Supershift” esej rađen je dodavanjem antitijela za Sp1 transkripcioni faktor.

Rezultati ove EMSA analize ukazuju na vezivanje različitih transkripcionih faktora za probu koja ne sadrži -148 (G>A) mutaciju u odnosu na probu koja ovu mutaciju sadrži. Kompleks koji se formira prilikom interakcije jedarnih proteina i KLF1 WT probe najvjerojatnije sadrži Sp1 transkripcioni faktor, što je *in silico* analizom i predviđeno.

TALASEMIJSKI SINDROMI U SRBIJI – MUTACIJE I POLIMORFIZMI U β -GLOBINSKOM GENSKOM LOKUSU

Naša studija objedinjuje podatke sakupljane više od 10 godina i uključuje ukupno 130 β -talasemijskih hromozoma pacijenata srpskog porijekla. Rezultati našeg istraživanja potvrđuju ranije prijavljene podatke o Hb Lepore-BW kao najčešćem uzročniku β -talasemije u Srbiji [Pavlovic *et al.* 2005]. Ova hemoglobinska varijanta koja se sastoji od α -globinskog i fuzionog $\delta\beta$ -globinskog lanca, prisutna je u srpskoj populaciji sa učestalošću od 26.2%. U ovaj procenat ulaze i tri slučaja udružene heterozigotnosti Hb Lepore-BW i β -talasemije. Druge vrste ove hemoglobinske varijante (Hb Lepore-Hollandia i Hb Lepore-Baltimore), koje se razlikuju po mjestu fuzije proksimalnog dijela δ - i distalnog dijela β -globinskog lanca, nisu detektovane. Ovakav rezultat je očekivan, obzirom da je Hb Lepore-BW najčešći tip Hb Lepore hemoglobinske varijante [Hardison *et al.* 2002; Patrinos *et al.* 2004].

Među detektovanim mutacijama, tri je distribuirano na više od 50% okarakterisanih hromozoma (IVS-II-745, kodon 39 i IVS-I-110). Mada je učestalost mutacije IVS-II-745 u okolnim zemljama mala (Bugarska 4.17%, Hrvatska 4.55%, Makedonija 2.99%) [Hardison *et al.* 2002; Patrinos *et al.* 2004], sa učestalošću od 20.8%, ova mutacija je najčešća u srpskoj populaciji, što je vjerovatno posledica genetičkog drifta.

Hemoglobinska varijanta za koju je takođe pokazano da je prisutna u srpskoj populaciji i to sa učestalošću od 1.5%, je Hb Sabine. Ovo je nestabilna Hb varijanta i prijavljena je u veoma malom broju familija u svijetu [Bogoevski *et al.* 1983; Schneider *et al.* 1969; Gasperini *et al.* 1992; Hull *et al.* 1998].

Iako ne postoji sistematična studija α -talasemija u Srbiji, naša istraživanja pokazuju da ova vrsta talasemijskih sindroma ne doprinosi značajno izrazitom talasemijskom fenotipu.

Orkin i saradnici [Orkin *et al.* 1983] definisali su devet (I-IX) preferencijalnih asocijacija pojedinih polimorfizama (haplotipovi) i tri različita subhaplotipa zastupljenih sa više od 1% u Mediteranu. Naše haplotipske analize β -globinskog lokusa u zdravoj srpskoj populaciji u saglasnosti su sa prethodnim studijama u ostalim Mediteranskim populacijama [Piras *et al.* 2005], koje definišu haplotip I i haplotip II kao dva najčešća haplotipa u Mediteranu. Haplotip IX javio se kao treći najčešći haplotip u srpskoj populaciji sa učestalošću od 15%.

Takođe, naši rezultati ukazali su na šest različitih haplotipova koji se dovode u vezu sa pet najčešćih β -talasemijskih mutacija i Hb varijanti u srpskoj populaciji. Naime, IVS-II-745 mutacija, kao najčešća mutacija u Srbiji, uglavnom je u asocijaciji sa haplotipom VII. Ovi rezultati su u skladu sa podacima prethodnih studija, uključujući Kiparsku studiju, gdje je ova mutacija sa učestalošću od 6% u svim slučajevima bila vezana za haplotip VII [Sozuoz *et al.* 1988].

Prethodne studije su već identifikovale haplotip II kao haplotip koji je često asociran sa β^0 kodon 39 mutacijom [Piras *et al.* 2005], što je slučaj i kod nas, te je stoga hromozomski kontekst u kome je nastala ova mutacija u srpskoj populaciji veoma sličan onom u ostalim Mediteranskim populacijama.

Mutacija IVS-I-110 ranije je prijavljena kao mutacija istočno-mediteranskog (turskog) porijekla koja je asocirana sa haplotipom I [Zahed *et al.* 2002]. Rezultati našeg istraživanja pokazali su da ova mutacija može biti vezana za dva različita haplotipa, haplotip I i haplotip B koji se razlikuju u njihovom 5' subhaplotipu. Ovakva haplotipska varijabilnost može biti rezultat rekombinacije između hromozoma sa haplotipom I i hromozoma sa haplotipom A ili B, koji su nađeni kao novi haplotipovi u Srbiji [Radmilovic *et al.* 2010].

Pored mutacije IVS-I-110, haplotip I, u ovoj studiji, je takođe asociran i sa mutacijom IVS-I-1. Za ovu talasemijsku mutaciju pokazano je da je u asocijaciji i sa haplotipom V [Orkin *et al.* 1982], mada su podaci o njenoj povezanosti sa haplotipom I takođe poznati [Lemsaddek *et al.* 2003].

Naši rezultati pokazuju povezanost Hb Lepore-BW kao najčešćeg uzročnika β -talasemija u Srbiji, sa haplotipovima I, V i haplotipom A. Iako je ova hemoglobinska varijanta uglavnom povezana sa haplotipom V [Efremov 1992; Hardison *et al.* 2002; Patrinos *et al.* 2004], naši rezultati nisu iznenađujući obzirom da je veza haplotipa I i Hb Lepore-BW takođe prijavljena i u Italiji [Fioretti *et al.* 1992]. Sa druge strane, činjenica da se haplotip A vezuje za Hb Lepore-BW, kao i jedinstvenost ovog haplotipa, ukazuju na nezavisno porijeklo ove hemoglobinske varijante [Pavlovic *et al.* 2005]. Međutim, nastanak Hb Lepore-BW u novom hromozomskom okruženju (haplotip A) može se objasniti nejednakom rekombinacijom ili genskom konverzijom između hromozoma sa 5' subhaplotipom karakterističnim za haplotip A i hromozoma sa Hb Lepore-BW varijantom u asocijaciji sa 3' subhaplotipom, karakterističnim za haplotip V. Činjenica da se moguće mjesto ove rekombinacije nalazi neposredno pored segmenta dugog 9.1 kb, koji je prethodno definisan kao "hot-spot" region nejednake rekombinacije u β -globinskom genskom klasteru [Chakravarti *et al.* 1984], ide u prilog ovoj hipotezi.

Talasemijski sindromi i različiti haplotipovi koji se dovode u vezu sa ovim oboljenjima, odraz su brojnih istorijskih i socioloških dešavanja na području Srbije i Balkana. Pored poznatih migracija Srba, podaci iz ove studije mogu dopuniti naša znanja o uticaju invazija i migracija na Balkansko poluostrvo. Ovi rezultati će takođe biti uključeni u nacionalnu i etničku mutacionu bazu podataka (NEMBDs) i na taj način doprinijeti uvidu u genografsku istoriju ljudske populacije [Patrinos 2006; Patrinos *et al.* 2005].

SEKUNDARNI GENI-MODIFIKATORI β -TALASEMIJSKIH SINDROMA

Hemoglobinopatije u koje spadaju i talasemijski sindromi, predstavljaju najčešća monogenska oboljenja u svijetu. Pretpostavlja se da je čak 7% svjetske populacije nosilac nekog oblika ovog oboljenja [Sankaran *et al.* 2010a]. Uprkos njihovom jednostavnom Mendelovskom nasljeđivanju, ova oboljenja karakteriše velika fenotipska varijabilnost. Iako osnova ove varijabilnosti nije u potpunosti objašnjena, u slučaju β -talasemijskih sindroma, može se pripisati efektu povećanog nivoa fetalnog hemoglobina (HbF) u krvi [Sankaran *et al.* 2010b].

Varijante u promotorskom regionu γ -globinskog gena kao modifikatori β -talasemijskih sindroma

Kao jedna od najčešćih varijanti u γ -globinskom genu, prijavljena je promjena na poziciji -158 (C>T), koja uvodi *XmnI* restrikciono mjesto, te se ova varijanta često naziva i *XmnI* polimorfizam [Poznanic *et al.* 2003]. Naša populaciona studija pokazala je da frekvencija ovog polimorfizma u srpskoj populaciji iznosi 0.33, te da su naši rezultati u skladu sa rezultatima prethodnih studija koje prijavljuju frekvenciju *XmnI* polimorfizma od 0.32 do 0.35 [Thein 2005b].

Gilman i Huisman su još 1985. godine ukazali na moguću vezu između *XmnI* polimorfizma γ -globinskog gena i njegove povišene ekspresije [Gilman and Huisman 1985]. Brojne studije rađene od tada imale su za cilj da potvrde ili u potpunosti opovrgnu ovu teoriju, ali bez uspjeha. Naime, iako rezultati nekih istraživanja ukazuju na uticaj ovog polimorfizma na povećanu ekspresiju γ -globinskog gena [Lanclos *et al.* 1989], odnosno povećanu sintezu fetalnog hemoglobina [Rosatelli *et al.* 1992], mnogobrojne studije koje ne govore u prilog datoj hipotezi [Labie *et al.* 1985b, Mastropietro *et al.* 2002], ne dozvoljavaju da se *XmnI* polimorfizam okarakterise kao pouzdani marker povećanog nivoa HbF.

U novijim kliničkim studijama pokazano je da promjena u promotoru γ -globinskog gena na poziciji -158 (C>T) ne dovodi uvijek do povećanja HbF kod neanemičnih individua, ali da

prisustvo ovog polimorfizma, u uslovima eritroidnog stresa, favorizuje produkciju HbF [Thein 2005b].

Da bismo ispitali uticaj *XmnI* polimorfizma na ekspresiju $\epsilon\gamma$ -globinskog gena, kako u normalnim, tako i u uslovima eritroidnog stresa kojim se karakteriše β -talasemija, sproveli smo funkcionalnu analizu ovog promotorskog regiona. Za razliku od prethodne studije [Lanclos *et al.* 1989], rezultati naših istraživanja pokazali su da ne postoji statistički značajna razlika između aktivnosti promotora $\epsilon\gamma$ -globinskog gena sa i bez *XmnI* polimorfizma kako u standardnim uslovima, tako i u uslovima eritroidnog stresa. Potvrdu ovakvog rezultata dobili smo i u rezultatima korelacije između *XmnI* polimorfizma i nivoa fetalnog hemoglobina kod β -talasemičnih pacijenata srpskog porijekla. Naime, nije pronađena statistički značajna razlika u nivou HbF između *XmnI* pozitivnih i *XmnI* negativnih pacijenata, što ide u prilog hipotezi da *XmnI* polimorfizam, djelujući sam, ne predstavlja modifikator β -talasemijskih sindroma.

Takođe, analiza interakcije promotorskog regiona $\epsilon\gamma$ -globinskog gena i transkripcionih faktora pokazala je da se za sekvencu koja sadrži *XmnI* polimorfizam, mada sa većim afinitetom, vezuju isti transkripcioni faktori kao i za sekvencu koja ne sadrži ovu genetičku varijantu, što je *in silico* analiza i predvidjela.

Prikazani rezultati dovode do zaključka izvedenog i iz ranijih studija, a to je da je, ako i postoji, povećan nivo HbF koji se dovodi u vezu sa *XmnI* polimorfizmom veoma mali, te da ovaj polimorfizam nije dovoljan da objasni veliku fenotipsku varijabilnost β -talasemijskih sindroma [Thein 2005b].

Varijante u promotorskom regionu $\Lambda\gamma$ -globinskog gena kao modifikatori β -talasemijskih sindroma

Xmnl polimorfizam

Sekvenciranje promotorskog regiona $\Lambda\gamma$ -globinskog gena pacijenta sa povišenim nivoom HbF (12.8%) ukazala je na postojanje genetičke varijante na poziciji -158 (C>T) u heterozigotnom obliku. Ova mutacija je od strane Patrinos et al. prijavljena kao uzročnik novog tipa HPFH (Cretan HPFH). Naime, pokazano je da C>T zamjena na poziciji -158 $\Lambda\gamma$ -globinskog gena dovodi do značajnog povećanja genske ekspresije, te da je ova varijanta uzročnik povećanog nivoa fetalnog hemoglobina [Patrinos et al. 1998]. Karakteristika ovog tipa HPFH je, između ostalog, i smanjena količina HbA₂ u odnosu na heterozigotne nosioce Hb Sabine koji ne posjeduju ovu varijantu u $\Lambda\gamma$ -globinskom genu [Kollia et al. 2008], što je u skladu sa našim rezultatima. Iako se Cretan HPFH odlikuje blagim porastom nivoa HbF (2.9%-5.1%) [Patrinos et al. 1998], procenat HbF od 12.8% detektovan kod našeg pacijenta ne iznenađuje i može se pripisati multifaktorijskim mehanizmima koji se nalaze u osnovi ćelijske i molekulske regulacije nivoa HbF.

Uticaj $\Lambda\gamma$ -158 (C>T) varijante na HbF produkciju, u poređenju sa $\zeta\gamma$ -158 (C>T), mogao bi se objasniti većom kompeticijom između LCR-a i $\Lambda\gamma$ -globinskog gena u odnosu na $\zeta\gamma$ -globinski gen u adultnom stupnju razvoja ili udruženim dejstvom ove dvije varijante *in cis* detektovanih kod našeg pacijenta [Patrinos et al. 1998; Kollia et al. 2008].

4 bp delecija (-AGCA)

Delecija na poziciji od -225 do -222 u promotorskom regionu $\Lambda\gamma$ -globinskog gena detektovana kod Hb Sabine pacijenta sa povišenim nivoom HbF (16.5%), ranije je prijavljena genetička varijanta [Gilman et al. 1988]. Bazirajući se uglavnom na $\zeta\gamma/\Lambda\gamma$ odnosu, prethodne studije

ukazale su na ovu 4 bp deleciju kao na uzročnika smanjene ekspresije $\text{A}\gamma$ -globinskog gena [Manca *et al.* 1991; Gilman *et al.* 1988; Gilman *et al.* 1993].

Naše funkcionalne analize pokazale su da ne postoji statistički značajna razlika između aktivnosti promotora $\text{A}\gamma$ -globinskog gena sa i bez ove 4 bp delecije u uslovima neeritroidnog stresa. Naime, u normalnim uslovima, ovaj region ne predstavlja regulatorni element. Međutim, u uslovima eritroidnog stresa primjećuje se statistički značajna razlika u aktivnosti WT i deletiranog promotora $\text{A}\gamma$ -globinskog gena ($p < 0.05$). Tačnije, aktivnost WT promotora u uslovima eritroidnog stresa raste dok se aktivnost promotora koji sadrži 4bp deleciju ne mijenja u odnosu na aktivnost tog promotora u uslovima neeritroidnog stresa.

Posmatrajući ovaj region samo u uslovima eritroidnog stresa, može se zaključiti da delecija na poziciji -222 do -225 $\text{A}\gamma$ -globinskog gena dovodi do smanjene aktivnosti ovog promotora a, samim tim i do smanjene ekspresije $\text{A}\gamma$ -globinskog gena, što bi bilo u skladu sa dosadašnjim studijama [Manca *et al.* 1991; Gilman *et al.* 1988]. Međutim, upoređujući ove rezultate sa rezultatima dobijenim u neeritroidnim uslovima, primjećuje se da je aktivnost deletiranog promotora na nivou aktivnosti promotora u normalnim uslovima, dok je aktivnost WT promotora veća. Objašnjenje za ovu razliku u aktivnosti promotora u uslovima eritroidnog stresa, može se naći u mogućem postojanju represora koji se vezuje za sekvencu deletiranog promotora i onemogućava njegovu povećanu aktivnost. U prilog ovoj hipotezi idu i rezultati *in silico* analize koji pokazuju da pomenuta 4 bp delecija uvodi mjesto vezivanja dva transkripciona faktora, GATA-1 i GATA-2, od kojih je GATA-1 poznat i kao aktivator, ali i kao represor [Rodriguez *et al.* 2005].

Eksperimentima usporene elektroforetske pokretljivosti pokazano je postojanje različitog paternog vezivanja proteina iz K562 ćelija tretiranih i netretiranih Epo, kako u slučaju $\text{A}\gamma$ WT, tako i u slučaju $\text{A}\gamma \Delta$ probe. Naime, u eritroidnom stresu dolazi do formiranja nova dva kompleksa u odnosu na komplekse koji se formiraju u normalnim, neeritroidnim uslovima. Interakcije

proteina i oligonukleotidnih proba su specifične što potvrđuju i rezultati nakon reakcija kompeticije "sam sa sobom".

Interesantan rezultat dobijen je u reakcijama unakrsne kompeticije u uslovima eritroidnog stresa. Naime, pokazano je da prilikom dodavanja hladne, $\text{A}\gamma$ Δ probe dolazi do hlađenja kompleksa nastalih interakcijom jedarnih proteina K562 ćelija tretiranih Epo i $\text{A}\gamma$ WT probe. Međutim, obrnuto, u eksperimentu kompeticije sa $\text{A}\gamma$ WT kao hladnom probom, kompleksi jedarnih proteina koji se vezuju za $\text{A}\gamma$ Δ probu ne bivaju u potpunosti iskompetirani, što ukazuje na postojanje dodatnih transkripcionih faktora koji se vezuju za $\text{A}\gamma$ Δ probu ali ne i za $\text{A}\gamma$ WT. Ovakav rezultat ide u prilog prethodno iznijetoj hipotezi o GATA-1 transkripcionom faktoru koji se vezuje samo za sekvencu deletiranog $\text{A}\gamma$ promotora i kao represor onemogućava ekspresiju ovog gena.

Naša studija o -225 do -222 regionu $\text{A}\gamma$ -globinskog gena predstavlja prvu studiju ovog tipa do sada. Rezultati prethodno opisanih *in vitro* analiza, iako ukazuju na moguće postojanje inducibilnog regulatornog elementa $\text{A}\gamma$ -globinskog gena, u promotorskom regionu ovog gena na poziciji -225 do -222, potvrdu će naći tek nakon "superšift" eksperimenata.

Varijante u genima izvan globinskih genskih lokusa kao modifikatori β -talasemijskih sindroma – *BCL11A*, *KLF1*

Kada govorimo o povećanoj sintezi fetalnog hemoglobina kao o načinu ublažavanja kliničke slike β -talasemija, u novijim studijama, kao geni čiji produkti utiču na ekspresiju γ -globinskih gena (*HBG* gena), a samim tim i na nivo HbF, navode se *BCL11A* i *KLF1* geni [Bauer and Orkin 2011; Sankaran *et al.* 2010a; Borg *et al.* 2010; Satta *et al.* 2011].

Rezultati naših istraživanja pokazali su da se kod pacijenata sa povećanim nivoom HbF u krvi detektuje snižen nivo ekspresije *BCL11A* gena. Ovaj podatak ukazuje na činjenicu da *BCL11A* direktno utiče na sintezu γ -globinskih lanaca, djelujući kao represor ekspresije *HBG* gena. Naime, smanjena produkcija *BCL11A* rezultuje smanjenom represijom fetalnih globinskih gena, što dovodi do povećane proizvodnje γ -globinskih lanaca, a samim tim i do povećanje sinteze HbF kod adulta. Ovi rezultati u skladu su sa podacima iz dosadašnjih studija u kojima je pokazano da *BCL11A*, zajedno sa represorskim kompleksom NuRD i eritroidnim transkripcionim faktorima, GATA-1 i FOG-1, utištava γ -globinske gene u eritroidnim progenitorima [Sankaran *et al.* 2008; Sankaran *et al.* 2010b].

RQ-PCR analize takođe su pokazale da ekspresija *KLF1* gena kod ova tri pacijenta sa povišenim HbF varira u odnosu na kontrolnu grupu (nivo ekspresije *KLF1* gena bio je snižen kod jednog, a povišen kod druga dva pacijenta), te se stoga direktna korelacija između nivoa ekspresije *KLF1* i nivoa HbF ne može ustanoviti.

KLF1 važan je eritroidno-specifični transkripcioni faktor koji djeluje kao dvostruki regulator molekuskog "switch"-a fetalnih u adultne globinske gene. Naime, pored poznate uloge *KLF1* u aktivaciji adultnih, β -globinskih gena [Chen and Bieker 1996; Bauer and Orkin 2011], ustanovljena je njegova uloga u aktivaciji ekspresije *BCL11A*, koji vrši represiju *HBG* gena. Ovo dvostruko dejstvo *KLF1* osigurava, kod većine adulta, nizak nivo HbF (<2% ukupnog Hb) [Borg *et al.* 2010].

Pokušavajući da utvrdimo uzrok variranja nivoa ekspresije *KLF1* gena kod pacijenata sa povišenim HbF, odlučili smo da provjerimo da li postoje promjene u samom *KLF1* genu.

Rezultati sekvenciranja pokazali su prisustvo genetičkih varijanti u *KLF1* genu i to -148 (G>A), u promotorskom regionu i dvije promjene u drugom egzonu ovog gena koje dovode do aminokiselinske zamjene u samom transkripcionom faktoru, p.S102P i p.F182L. Za razliku od mutacije p.S102P, koja je prijavljena u ranijim studijama [Arnaud *et al.* 2010], promotorska mutacija -148 (G>A) i mutacija p.F182L, prvi put su detektovane kod pacijenata uključenih u ovu studiju.

Populaciona studija zastupljenosti ovih mutacija u srpskoj populaciji pokazala je da učestalost mutacije p.S102P prevazilazi 40%, što nam je ukazalo na moguće podudaranje sa podacima iz literature koji navode ovu mutaciju kao neutralnu substituciju [Arnaud *et al.* 2010]. S druge strane, podaci o učestalosti mutacija -148 (G>A) (11.1%) i p.F182L (13.9%), prvi su ove vrste kod nas i u svijetu.

Da bi smo provjerili uticaj detektovanih varijanti na ekspresiju *BCL11A* gena, regulisanog od strane *KLF1* transkripcionog faktora, nivo ekspresije ovog gena utvrđena je RQ-PCR-om. Naše RQ-PCR analize dale su prve podatke o uticaju -148 (G>A), p.S102P i p.F182L genetičkih varijanti u *KLF1* genu na ekspresiju *BCL11A* gena.

Blago povećanje ekspresije *BCL11A* gena detektovano kod nosioca p.S102P i p.F182L mutacija, može se objasniti pozicijom ovih mutacija u samom *KLF1* genu. Naime, obje mutacije pogađaju transaktivacioni domen *KLF1* transkripcionog faktora za koga je pokazano da podliježe brojnim posttranslacionim modifikacijama [Bieker 2005]. Konkretno, mutacija p.S102P nalazi se u regionu *KLF1* koji podleže Ser/Thr fosforilaciji od strane kinaze CK1, što bi moglo da utiče na protein-protein interakcije ovog transkripcionog faktora [Borg *et al.* 2011]. Na sličan način, utičući na posttranslacione modifikacije, i mutacija p.F182L može uticati na funkciju *KLF1* kao transkripcionog faktora, posredno dovodeći do povećanja ekspresije *BCL11A* gena.

Ovakve mutacije koje utiču na funkciju KLF1 transkripcionog faktora, prijavljene su i u dosadašnjim istraživanjima. Naime, novije studije pokazale su da prisustvo pojedinih mutacija unutar regiona koji kodira DNK-vezujuće domene KLF1, kao što je p.K288X mutacija, utiču na ekspresiju gena regulisanih od strane ovog transkripcionog faktora [Borg *et al.* 2010]. Takođe, pokazano je postojanje mutacija u *KLF1* genu koje samo udružene dovode do promjene ekspresije *BCL11A* gena, odnosno do povišene sinteze HbF, dok pojedinačno daju normalan fenotip [Satta *et al.* 2011].

Značajno povećanje ekspresije *BCL11A* gena zabilježeno kod nosilaca -148 (G>A) promotorske mutacije u kombinaciji sa p.S102P i p.F182L varijantama, navelo nas je da ispitamo uticaj ove mutacije na ekspresiju samog *KLF1* gena. Analiza nivoa ekspresije *KLF1* gena pokazala je povišen nivo ekspresije ovog gena kod nosilaca -148 (G>A) i p.S102P, odnosno p.F182L mutacija. Ovakav rezultat ukazuje na moguće postojanje inducibilnog regulatornog elementa u promotorskom regionu *KLF1* gena koji sadrži -148 (G>A) mutaciju. Iako, prema *in silico* analizi, ova promotorska mutacija ukida vezujuće mjesto Sp1 transkripcionog faktora kao poznatog aktivatora velikog broja gena, uticaj -148 (G>A) mutacije može se objasniti vezivanjem dodatnog MZF1 transkripcionog faktora za ovaj promotorski region. Naime, MZF1 (Myeloid zinc finger 1) je transkripcioni faktor koji se uglavnom eksprimira u hematopetskim ćelijama i za koga je u ranijim studijama pokazano da djeluje kao represor [Perrotti *et al.* 1995], ali i kao veoma moćan aktivator genske ekspresije [Dong *et al.* 2008].

Rezultati analize usporene elektroforetske pokretljivosti ukazuju na vezivanje različitih transkripcionih faktora iste molekulske težine za region koji ne sadrži -148 (G>A) mutaciju u odnosu na promotorski region koji ovu mutaciju sadrži. Ukoliko uzmemo u obzir rezultate *in silico* analize, objašnjenje ovog EMSA rezultata može se naći u činjenici da je molekulska težina Sp1 i jedne od izoformi MZF1 transkripcionog faktora gotovo identična i iznosi 81 kDa, odnosno 82 kDa [Moeenrezakhanlou *et al.* 2008].

Ovakav rezultat, zajedno sa rezultatima *in silico* analize i analize uticaja date promotorske mutacije na ekspresiju *KLF1* i *BCL11A* gena, ukazuje na moguće postojanje inducibilnog regulatornog elementa u promotorskom regionu *KLF1* gena koji sadrži -148 (G>A) mutaciju.

Kod Hb Sabine pacijenata sa povišenim nivoom fetalnog hemoglobina, čijom smo analizom i započeli studiju o sekundarnim modifikatorima β -talasemijskih sindroma, ustanovili smo postojanje velikog broja genetičkih varijanti kao potencijalnih kandidata odgovornih za visok procenat HbF u krvi. Naime, kod Hb Sabine pacijenta sa HbF-12.8% detektovano je prisustvo -158 (C>T) polimorfizma u promotorskom regionu oba γ -globinska gena i to u homozigotnom obliku u γ -globinskom genu, odnosno u heterozigotnom obliku u promotoru γ -globinskog gena. Ovaj polimorfizam je takođe detektovan u heterozigotnom obliku i kod Hb Sabine pacijenta sa Hb-16.5% i to u promotoru γ -globinskog gena, dok je u promotorskom regionu γ -globinskog gena nađena do sada funkcionalno neokarakterisana delecija od 4bp locirana na poziciji -225 do -222. Takođe, kod ovog pacijenta ustanovljeno je i prisustvo p.S102P mutacije u okviru *KLF1* gena. Međutim, i pored brojnih podataka koje detektovane genetičke varijante dovode u vezu sa povećanim nivoom HbF, fenotip ovih pacijenata nije mogao biti u potpunosti objašnjen.

Na osnovu rezultata o uticaju različitih genetičkih varijanti u okviru promotora γ -globinskih gena u *in vitro* uslovima, kao i rezultata o uticaju varijanti u okviru gena izvan globinskih genskih lokusa na ekspresiju gena-modifikatora β -talasemijskih sindroma, može se zaključiti da je sinteza HbF kao modulatora β -talasemijskog fenotipa, veoma kompleksna i genetski determinisana. Napori novijih istraživanja na polju humane eritropeze usmjereni su ka sprovođenju analiza kompletnog genoma (GWAS - Genome-Wide Association Studies). Jedino na taj način ćemo u potpunosti moći da sagledamo genetičke komponente i mehanizme koje leže u osnovi varijabilnosti nivoa fetalnog hemoglobina, a samim ti i fenotipske varijabilnosti β -talasemijskih sindroma.

Po završetku projekta koji je imao za cilj sakvenciranje kompletnog genoma čovjeka (Human Genom Project), glavni cilj na polju genetike bio je da se ustanove različite genetičke varijacije unutar genoma i da se pokuša objasniti njihova uloga u fenotipskoj varijabilnosti. U proteklih pet godina nauka koja sa bavi proučavanjem ovih varijacija, variomika, uz prateći projekat (Human Variom Project) pokušava da ustanovi povezanost genotipa sa određenim fenotipom. Kako je već poznato da određeni fenotip zavisi od velikog broja genetičkih determinanti, ovaj proces nazvan genotip-fenotip mapiranje, predstavljaće izazov molekularne biologije u narednih 20 godina.

U ovom istraživanju najčešćih genetičkih varijanti u promotoru β -talasemije u srpskoj populaciji pri čemu je hemoglobinotička varijanta Hb-Lepore-Boston-Washington najčešćom, učestalošću od 12,1%.

Rezultati sekvenciranja IVS-II-745, IVS-I-110 su slični na više od 50% u srpskoj i evropskoj populaciji.

U ovom istraživanju haplotipske analize koja je ukazala na haplotip I i haplotip II kao najčešće u srpskoj populaciji u srpskoj populaciji.

Rezultati sekvenciranja najčešćih genetičkih varijanti u promotornom regionu β -talasemije i β -globinotičke varijante Hb-Lepore-Boston-Washington sa haplotipom A, odnosno haplotipom B, IVS-I-110 sa haplotipom I, IVS-II-745 sa haplotipom II i p.5102P sa haplotipom I.

ZAKLJUČCI

Rezultati istraživanja su pokazali prisustvo β -talasemije u srpskoj populaciji u srpskoj populaciji.

Rezultati istraživanja su pokazali prisustvo β -talasemije u srpskoj populaciji u srpskoj populaciji. Rezultati istraživanja su pokazali prisustvo β -talasemije u srpskoj populaciji u srpskoj populaciji. Rezultati istraživanja su pokazali prisustvo β -talasemije u srpskoj populaciji u srpskoj populaciji.

Rezultati istraživanja su pokazali prisustvo β -talasemije u srpskoj populaciji u srpskoj populaciji. Rezultati istraživanja su pokazali prisustvo β -talasemije u srpskoj populaciji u srpskoj populaciji.

Rezultati istraživanja su pokazali prisustvo β -talasemije u srpskoj populaciji u srpskoj populaciji. Rezultati istraživanja su pokazali prisustvo β -talasemije u srpskoj populaciji u srpskoj populaciji.

Rezultati istraživanja su pokazali prisustvo β -talasemije u srpskoj populaciji u srpskoj populaciji. Rezultati istraživanja su pokazali prisustvo β -talasemije u srpskoj populaciji u srpskoj populaciji.

- Utvrđena je učestalost najčešćih genetičkih varijanti, uzročnika β -talasamija, u srpskoj populaciji, pri čemu je hemoglobinska varijanta Hb Lepore Boston Washington najzastupljenija, učestalošću od 26.2%.
- Genetičke varijante IVS-II-745, β^039 i IVS-I-110 su prisutne na više od 50% β -talasemijskih hromozoma.
- Sprovedena je haplotipska analiza koja je ukazala na haplotip I i haplotip II kao najčešće β -globinske haplotipove u srpskoj populaciji.
- Utvrđena je povezanost najčešćih genetičkih varijanti, uzročnika β -talasamija i β -globinskih haplotipova i to: Hb Lepore Boston Washington sa haplotipom A, odnosno haplotipovima I i V, IVS-I-1 i IVS-I-110 sa haplotipom I, IVS-II-745 sa haplotipom VII i β^039 sa haplotipom II.
- Populaciono-genetička studija utvrdila je prisustvo *XmnI* polimorfizma u srpskoj populaciji sa frekvencom od 0.33.
- Funkcionalna analiza *XmnI* polimorfizma u promotorskom regionu $\epsilon\gamma$ -globinskog gena pokazala je da ova varijanta nema uticaj na ekspresiju datog globinskog gena, kako u standardnim, tako ni u uslovima eritroidnog stresa. Potvrda je dobijena i u populacionoj studiji koja je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u nivou HbF između *XmnI* pozitivnih i *XmnI* negativnih β -talasemijskih pacijenata.
- Funkcionalna analiza delecije (-AGCA) na poziciji -225 do -222 promotorskog regiona $A\gamma$ -globinskog gena, ukazala je na prisustvo potencijalnog regulatornog elementa na ovoj poziciji u uslovima eritroidnog stresa.
- Utvrđeno je prisustvo varijanti u genu za KLF1 transkripcioni faktor koje su potencijalni uzročnici povišenog nivoa HbF, i to -148 (G>A) u promotorskom regionu i p.S102P i p.F182L u drugom egzonu *KLF1* gena. Među njima su -148 (G>A) u promotorskom regionu i p.F182L u drugom egzonu, novootkrivene genetičke varijante u *KLF1* genu.
- Populaciono-genetička studija ustanovila je zastupljenost detektovanih genetičkih varijanti u srpskoj populaciji, pri čemu se varijanta p.S102P izdvojila sa učestalošću od preko 40%, dok su učestalosti p.F182L i -148 (G>A) varijanti bile 13.9 %, odnosno 11.1%.

- Analiza uticaja detektovanih genetičkih varijanti na ekspresiju *BCL11A* gena pokazala je povišenu ekspresiju ovog gena kod nosilaca p.S102P i p.F182L varijanti u odnosu na WT kontrolu. Izrazito povišena ekspresija *BCL11A* gena zabilježena je kod nosilaca -148 (G>A) varijante detektovane u kombinaciji sa p.S102P i p.F182L varijantama.
- Analiza uticaja promotorske, -148 (G>A) varijante udružene sa p.S102P i p.F182L varijantama, na ekspresiju *KLF1* gena, kao i analiza interakcije transkripcionih faktora sa ovim promotorskim regionom, ukazala je na moguće prisustvo regulatornog elementa u okviru promotorskog regiona *KLF1* gena koji sadrži -148 (G>A) varijantu.

Albitar M, Peschle C, Lieberhaber SA. Theta, zeta and epsilon globin messenger RNAs are expressed in adults. *Blood*. 1989;74(2):629-37.

Arnaud L, Saison C, Helias V, Lucien N, Steschenko D, Giarratana MC, Prehu C, Foliguet B, Montout L, de Brevern AG, Francina A, Ripoche P, Fenneteau O, Da Costa L, Peyrard T, Coghlan G, Illum N, Birgens H, Tamary H, Iolascon A, Delaunay J, Tchernia G, Cartron JP. A dominant mutation in the gene encoding the erythroid transcription factor KLF1 causes a congenital dyserythropoietic anemia. *Am J Hum Genet*. 2010;87(5):721-7.

Bank A. Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities. *Blood*. 2006;107(2):435-43.

Bank A. AHSP: a novel hemoglobin helper. *J Clin Invest*. 2007;117(7):1746-9.

Barnes WM. Plasmid detection and sizing in single colony lysates. *Science*. 1977;195(4276):393-4.

Bauer DE, Orkin SH. Update on fetal hemoglobin gene regulation in hemoglobinopathies. *Curr Opin Pediatr*. 2011;23(1):1-8.

Bernini LF, Hartevelde CL. α -thalassaemia. *Baillieres Clin Haematol*. 1998;11(1):53-90.

Bieker JJ. Probing the onset and regulation of erythroid cell-specific gene expression. *Mt Sinai J Med*. 2005;72(5):333-8.

Blau CA, Constantoulakis P, al-Khatti A, Spadaccino E, Goldwasser E, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G. Fetal hemoglobin in acute and chronic states of erythroid expansion. *Blood*. 1993;81(1):227-33.

Bogoevski P, Efremov GD, Kezic J, Lam H, Wilson JB, Huisman TH. Hb Sabine or $\alpha 2\beta 2$ 91 (F7) Leu $\rightarrow$ Pro in a Yugoslavian boy. *Hemoglobin*. 1983;7(2):195-200.

Borg J, Papadopoulos P, Georgitsi M, Gutiérrez L, Grech G, Fanis P, Phylactides M, Verkerk AJ, van der Spek PJ, Scerri CA, Cassar W, Galdies R, van Ijcken W, Özgür Z, Gillemans N, Hou J, Bugeja M, Grosveld FG, von Lindern M, Felice AE, Patrinos GP, Philipson S. Haploinsufficiency for the erythroid transcription factor KLF1 causes hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Nat Genet*. 2010;42(9):801-5.

Borg J, Patrinos GP, Felice AE, Philipson S. Erythroid phenotypes associated with KLF1 mutations. *Haematologica*. 2011;96(5):635-8.

Boshart M, Klüppel M, Schmidt A, Schütz G, Luckow B. Reporter constructs with low background activity utilizing the cat gene. *Gene*. 1992;110: 129-130.

Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantla S, de Boer A, Oostra BA, Lindhout D, Tytgat GN, Jansen PL, Oude Elferink RP, Chowdhury NR. The genetic basis of the reduced expression of

bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N Engl J Med*. 1995;333(18):1171-5.

Bowden DK, Vickers MA, Higgs DR. A PCR-based strategy to detect the common severe determinants of alpha thalassaemia. *Br J Haematol*. 1992;81(1):104-8.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.

Bunn HF. Subunit assembly of hemoglobin: an important determinant of hematologic phenotype. *Blood*. 1987;69(1):1-6.

Bunn FH. Human hemoglobins: normal and abnormal. In Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood, 5th edition. 1998. Ed. DG Nathan and SH orkin, WB Saunders Company, Philadelphia; str. 730.

Camaschella C, Kattamis AC, Petroni D, Roetto A, Sivera P, Sbaiz L, Cohen A, Ohene-Frempong K, Trifillis P, Surrey S, Fortina P. Different hematological phenotypes caused by the interaction of triplicated alpha-globin genes and heterozygous beta-thalassemia. *Am J Hematol*. 1997;55(2):83-8.

Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. *Genet Med*. 2010;12(2):61-76.

Cao A, Galanello R, Rosatelli MC. Genotype-phenotype correlations in beta-thalassemias. *Blood Rev*. 1994;8(1):1-12.

Chakravarti A, Buetow KH, Antonarakis SE, Waber PG, Boehm CD, Kazazian HH. Nonuniform recombination within the human β -globin gene cluster. *Am J Hum Genet*. 1984;36(6):1239-58.

Chassanidis C, Kalamaras A, Phylactides M, Pourfarzad F, Likousi S, Maroulis V, Papadakis MN, Vamvakopoulos NK, Aleporou-Marinou V, Patrinos GP, Kolliia P. The Hellenic type of nondeletional hereditary persistence of fetal hemoglobin results from a novel mutation (g.-109G>T) in the HBG2 gene promoter. *Ann Hematol*. 2009;88(6):549-55.

Chen X, Bieker JJ. Erythroid Krüppel-like factor (EKLF) contains a multifunctional transcriptional activation domain important for inter- and intramolecular interactions. *EMBO J*. 1996;15(21):5888-96.

Chen Z, Luo HY, Steinberg MH, Chui DH. BCL11A represses HBG transcription in K562 cells. *Blood Cells Mol Dis*. 2009;42(2):144-9.

Chen Z, Luo HY, Basran RK, Hsu TH, Mang DW, Nuntakarn L, Rosenfield CG, Patrinos GP, Hardison RC, Steinberg MH, Chui DH. A T-to-G transversion at nucleotide -567 upstream of HBG2 in a GATA-1 binding motif is associated with elevated hemoglobin F. *Mol Cell Biol*. 2008;28(13):4386-93.

- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156-9.
- Cohen SN, Chang AC, Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1972;69(8):2110-4.
- Collins FS, Weissman SM. The molecular genetics of human hemoglobin. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1984;31:315-462.
- Craig JE, Barnetson RA, Prior J, Raven JL, Thein SL. Rapid detection of deletions causing delta beta thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin by enzymatic amplification. *Blood*. 1994;83(6):1673-82.
- Deisseroth A, Nienhuis A, Lawrence J, Giles R, Turner P, Ruddle FH. Chromosomal localization of the human β -globin gene on chromosome 11 in somatic cell hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978;75(3):1456-60.
- Deisseroth A, Nienhuis A, Turner P, Velez R, Anderson WF, Ruddle F, Lawrence J, Creagan R, Kucherlapati R. Localization of the human α -globin structural gene two chromosome 16 in somatic cell hybrids by molecular hybridization assay. *Cell*. 1977;12(1):205-18.
- Dodé C, Krishnamoorthy R, Lamb J, Rochette J. Rapid analysis of α -3.7 thalassaemia and $\alpha\alpha\alpha$ anti 3.7 triplication by enzymatic amplification analysis. *Br J Haematol*. 1993;83(1):105-11.
- Dong S, Ying S, Kojima T, Shiraiwa M, Kawada A, Méchin MC, Adoue V, Chavanas S, Serre G, Simon M, Takahara H. Crucial roles of MZF1 and Sp1 in the transcriptional regulation of the peptidylarginine deiminase type I gene (PADI1) in human keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2008;128(3):549-57.
- Dover GJ, Smith KD, Chang YC, Purvis S, Mays A, Meyers DA, 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*. 1992;80(3):816-24.
- Efremov GD. Hemoglobinopathies in Yugoslavia: an update. *Hemoglobin*. 1992;16(6):531-44.
- Eldor A, Rachmilewitz EA. The hypercoagulable state in thalassemia. *Blood*. 2002;99(1):36-43.
- Feingold EA, Forget BG. The breakpoint of a large deletion causing hereditary persistence of fetal hemoglobin occurs within an erythroid DNA domain remote from the beta-globin gene cluster. *Blood*. 1989;74(6):2178-86.
- Fioretti G, De Angioletti M, Masciangelo F, Lacerra G, Scarallo A, de Bonis C, Pagano L, Guarino E, De Rosa L, Salvati F, Carestia C. Origin heterogeneity of Hb Lepore-Boston gene in Italy. *Am J Hum Genet*. 1992;50(4):781-6.

Fischer KD, Nowock J. The T>C substitution at -198 of the A gamma-globin gene associated with the British form of HPFH generates overlapping recognition sites for two DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(19):5685-93.

Forget BG. The Thalassemia Syndromes. in *Hematology basic principles and practise*. 2000. Ed. Ronald Hoffman et al. Churchill Livingstone, Philadelphia.

Forget BG, Peason HA. Hemoglobin Synthesis and the Thalassemias. In *Blood: Principles and Practice of Hematology*. 1995. Ed. Handin RI, Lux SE, Stossel TP, J. B. Lippincott Company, Philadelphia.

Fried MG, Crothers DM. Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrilamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 1981; 9: 6505 - 6521.

Friedman MJ, Traeger W. The biochemistry of resistance to malaria. *SciAm.* 1981;244(3):154-5, 158-64.

Fritsch EF, Lawn RM, Maniatis T. Molecular cloning and characterization of the human γ -like globin gene cluster. *Cell.* 1980;19(4):959-72.

Galanello R, Perseu L, Melis MA, Cipollina L, Barella S, Giagu N, Turco MP, Maccioni O, Cao A. Hyperbilirubinaemia in heterozygous beta-thalassaemia is related to co-inherited Gilbert's syndrome. *Br J Haematol.* 1997;99(2):433-6.

Galanello R, Piras S, Barella S, Leoni GB, Cipollina MD, Perseu L, Cao A. Cholelithiasis and Gilbert's syndrome in homozygous beta-thalassaemia. *Br J Haematol.* 2001;115(4):926-8

Galanello R, Ruggeri R, Paglietti E, Addis M, Melis MA, Cao A. A family with segregating triplicated alpha globin loci and beta thalassemia. *Blood.* 1983;62(5):1035-40.

Gambari R, Fibach E. Medicinal chemistry of fetal hemoglobin inducers for treatment of beta-thalassemia. *Curr Med Chem.* 2007;14(2):199-212.

Gasparini D, Galanello R, Melis MA, Iannelli S, Giordano P, Bernini LF, Cao A. Hemoglobin Sabine [β 91 (F7) Leu→Pro]: occurrence in a Sardinian individual with hemolytic anemia and inclusion bodies. *Haematologica* 1992; 77(5): 381-383.

Gilbert SF. Differential Gene Transcription. In: *Developmental Biology*. 6th edition. 2000. Ed. Gilbert SF. Sunderland (MA): Sinauer Associates.

Gilman JG, Huisman TH. DNA sequence variation associated with elevated fetal G gamma globin production. *Blood.* 1985 Oct;66(4):783-7.

Gilman JG, Johnson ME, Mishima N. Four base-pair DNA deletion in human A gamma globin-gene promoter associated with low A gamma expression in adults. *Br J Haematol.* 1988;68(4):455-8.

- Gilman JG, Josifovska O, Erlingsson S, Milner PF, Nagel RL. Direct demonstration that the A gamma T globin gene is linked to the 4 bp promoter deletion in the beta A chromosome of sickle cell traits. *Am J Hematol.* 1993;43(4):312-5.
- Gottardi E, Losekoot M, Fodde R, Saglio G, Camaschella C, Bernini LF. Rapid identification by denaturing gradient gel electrophoresis of mutations in the gamma-globin gene promoters in non-deletion type HPFH. *Br J Haematol.* 1992;80(4):533-8.
- Gough JA, Murray NE. Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *J Mol Biol.* 1983;166(1):1-19.
- Hardison RC, Chui DH, Giardine B, Riemer C, Patrinos GP, Anagnou N, Miller W, Wajcman H. HbVar: A relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the globin gene server. *Hum Mutat.* 2002;19(3):225-33.
- Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AO, Pretorius IM, Jarman AP, Weatherall DJ. A review of the molecular genetics of the human α -globin gene cluster. *Blood.* 1989;73(5):1081-104.
- Ho PJ, Hall GW, Luo LY, Weatherall DJ, Thein SL. Beta-thalassaemia intermedia: is it possible consistently to predict phenotype from genotype? *Br J Haematol.* 1998;100(1):70-8.
- Hsu SL, Marks J, Shaw JP, Tam M, Higgs DR, Shen CC, Shen CK. Structure and expression of the human theta 1 globin gene. *Nature.* 1988;331(6151):94-6.
- Hull D, Winter PC, McHale CM, Lappin TR, Mayne EE. Familial hemolytic anemia due to Hb Sabine [β 91(F7)Leu $\rightarrow$ Pro] identified by polymerase chain reaction. *Hemoglobin* 1998; 22(3): 263-266.
- Karlson P. Biokemija za studente medicine i kemije. 1978. Školska knjiga, Zagreb.
- Kazazian HH Jr. The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Semin Hematol.* 1990;27(3):209-28.
- Kazazian HH Jr, Orkin SH, Markham AF, Chapman CR, Youssoufian H, Waber PG. Quantification of the close association between DNA haplotypes and specific beta-thalassaemia mutations in Mediterraneans. *Nature.* 1984;310(5973):152-4.
- Kollia P, Kalamaras A, Chassanidis C, Samara M, Vamvakopoulos NK, Radmilovic M, Pavlovic S, Papadakis MN, Patrinos GP. Compound heterozygosity for the Cretan type of non-deletional hereditary persistence of fetal hemoglobin and beta-thalassemia or Hb Sabine confirms the functional role of the Agamma -158 C>T mutation in gamma-globin gene transcription. *Blood Cells Mol Dis.* 2008;41(3):263-4.
- Labie D, Dunda-Belkhodja O, Rouabhi F, Pagnier J, Ragusa A, Nagel RL. The -158 site 5' to the G gamma gene and G gamma expression. *Blood.* 1985b;66(6):1463-5.
- Labie D, Pagnier J, Lapoumeroulie C, Rouabhi F, Dunda-Belkhodja O, Chardin P, Beldjord C, Wajcman H, Fabry ME, Nagel RL. Common haplotype dependency of high G gamma-globin

gene expression and high Hb F levels in beta-thalassemia and sickle cell anemia patients. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985a;82(7):2111-4.

Lanclos KD, Michael SK, Gu YC, Howard EF, Stoming TA, Huisman TH. Transient chloramphenicol acetyltransferase expression of the G gamma globin gene 5'-flanking regions containing substitutions of C>T at position -158, G>A at position -161, and T>A at position -175 in K562 cells. *Biochim Biophys Acta*. 1989;1008(1):109-12.

Lemsaddek W, Picanço I, Seuanes F, Mahmal L, Benchekroun S, Khattab M, Nogueira P, Osório-Almeida L. Spectrum of beta thalassemia mutations and HbF levels in the heterozygous Moroccan population. *Am J Hematol*. 2003;73(3):161-8.

Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MA, Araújo AS, Uda M, Sanna S, Cao A, Schlessinger D, Costa FF, Hirschhorn JN, Orkin SH. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(33):11869-74.

Livak KL & Swchmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ddCt method. *Methods* 2001;25:402-408.

Lozzio CB, Lozzio BB. Cytotoxicity of a factor isolated from human spleen. *J Natl Cancer Inst*. 1973;50(2):535-8.

Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*. 1975;45(3):321-34.

Manca L, Cocco E, Gallisai D, Masala B, Gilman JG. Diminished A gamma T fetal globin levels in Sardinian haplotype II beta 0-thalassaemia patients are associated with a four base pair deletion in the A gamma T promoter. *Br J Haematol*. 1991;78(1):105-7.

Mastropietro F, Modiano G, Cappabianca M, Foglietta E, D'Asero C, Mezzabotta M, Ponzini D, Maffei L, Amato A, Lerone M, Grisanti P, Di Biagio P, Rinaldi S, Bianco I. Factors regulating Hb F synthesis in thalassemic diseases. *BMC Blood Disord*. 2002;2(1):2.

McDonald MJ, Shapiro R, Bleichman M, Solway J, Bunn HF. Glycosylated minor components of human adult hemoglobin. Purification, identification, and partial structural analysis. *J Biol Chem*. 1978;253(7):2327-32.

Meryman HT. Preservation of living cells. *Fed Proc*. 1963;22:81-9.

Messing J. New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol*. 1983;101:20-78.

Moeenrezakhanlou A, Shephard L, Lam L, Reiner NE. Myeloid cell differentiation in response to calcitriol for expression CD11b and CD14 is regulated by myeloid zinc finger-1 protein downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Leukoc Biol*. 2008;84(2):519-28.

Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 1989;17(7):2503-16.

Nguyen TK, Joly P, Bardel C, Moulisma M, Bonello-Palot N, Francina A. The XmnI (G)gamma polymorphism influences hemoglobin F synthesis contrary to BCL11A and HBS1L-MYB SNPs in a cohort of 57 beta-thalassemia intermedia patients. *Blood Cells Mol Dis.* 2010;45(2):124-7.

Old JM, Varawalla NY, Weatherall DJ. Rapid detection and prenatal diagnosis of beta-thalassaemia: studies in Indian and Cypriot populations in the UK. *Lancet.* 1990;336(8719):834-7.

Orkin SH, Antonarakis SE, Kazazian HH Jr. Polymorphism and molecular pathology of the human beta-globin gene. *Prog Hematol.* 1983;13:49-73.

Orkin SH, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE, Goff SC, Boehm CD, Sexton JP, Waber PG, Giardina PJ. Linkage of beta-thalassaemia mutations and beta-globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human beta-globin gene cluster. *Nature.* 1982;296(5858):627-31.

Ouyang L, Chen X, Bieker JJ. Regulation of erythroid Krüppel-like factor (EKLF) transcriptional activity by phosphorylation of a protein kinase casein kinase II site within its interaction domain. *J Biol Chem.* 1998;273(36):23019-25.

Passon RG, Howard TA, Zimmerman SA, Schultz WH, Ware RE. Influence of bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A promoter polymorphisms on serum bilirubin levels and cholelithiasis in children with sickle cell anemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2001;23(7):448-51.

Pavlović S. Talasemijski sindromi-molekularna genetika u savremenoj dijagnostici. 2006. Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd.

Pavlovic S, Urosevic J, Poznanic J, Perisic Lj, Petrucev B, Tosic N, Krivokapic-Dokmanovic L, Janic D, Cvorkov-Drazic M, Bunjevacki G. Molecular basis of thalassemia syndromes in Serbia and Montenegro. *Acta Haematol.* 2005;113(3):175-80.

Patrinos GP. National and ethnic mutation databases: recording populations' genography. *Hum Mutat.* 2006;27(9):879-87.

Patrinos GP, Giardine B, Riemer C, Miller W, Chui DH, Anagnou NP, Wajcman H, Hardison RC. Improvements in the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations for population and sequence variation studies. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(Database issue):D537-41.

Patrinos GP, Kollia P, Loutradi-Anagnostou A, Loukopoulos D, Papadakis MN. The Cretan type of non-deletional hereditary persistence of fetal hemoglobin [A gamma-158C>T] results from two independent gene conversion events. *Hum Genet.* 1998;102(6):629-34.

Patrinos GP, van Baal S, Petersen MB, Papadakis MN. Hellenic National Mutation database: a prototype database for mutations leading to inherited disorders in the Hellenic population. *Hum Mutat.* 2005;25(4):327-33.

Perrine SP. Fetal globin induction-can it cure beta thalassemia? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2005:38-44.

Perrotti D, Melotti P, Skorski T, Casella I, Peschle C, Calabretta B. Overexpression of the zinc finger protein MZF1 inhibits hematopoietic development from embryonic stem cells: correlation with negative regulation of CD34 and c-myb promoter activity. *Mol Cell Biol.* 1995;15(11):6075-87.

Piras I, Vona G, Falchi A, Latini V, Ristaldi S, Vacca L, Varesi L, Calò CM. Beta-globin cluster haplotypes in normal individuals and beta(0)39-thalassemia carriers from Sardinia, Italy. *Am J Hum Biol.* 2005;17(6):765-72.

Poznanic J, Perisic LJ, Urosevic J, Petrucev B, Tosic N, Belej J, Krivokapic-Dokmanovic L, Janic D, Cvorkov-Drazic M, Bunjevacki G, Pavlovic S. Correlation between XmnI beta globin gene polymorphism and fetal hemoglobin level in beta thalassemia patients in Serbia *Bulletin of hematology* 2003;31(2/3):60-62.

Radmilovic M, Zukic B, Stankovic B, Karan-Djurasevic T, Stojiljkovic M, Spasovski V, Tosic N, Dokmanovic L, Janic D, Pavlovic S. Thalassemia syndromes in Serbia: an update. *Hemoglobin.* 2010;34(5):477-85.

Radojkovic D, Kusic J. Silver staining of denaturing gradient gel electrophoresis gels. *Clin Chem.* 2000;46(6 Pt 1):883-4.

Rees DC, Luo LY, Thein SL, Singh BM, Wickramasinghe S. Nontransfusional iron overload in thalassemia: association with hereditary hemochromatosis. *Blood.* 1997;90(8):3234-6.

Ristić M. Hematologija za III i IV razred medicinske škole. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva. 1979;p242-243.

Roberts AV, Weatherall DJ, Clegg JB. The synthesis of human hemoglobin A₂ during erythroid maturation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1972;47(1):81-7.

Rodriguez P, Bonte E, Krijgsveld J, Kolodziej KE, Guyot B, Heck AJ, Vyas P, de Boer E, Grosveld F, Strouboulis J. GATA-1 forms distinct activating and repressive complexes in erythroid cells. *EMBO J.* 2005;24(13):2354-66.

Rosatelli MC, Altay C, Oner R, Leoni GB, Moi B, Atzori G, Cao A. Beta-globin haplotype and XmnI polymorphism at position G (gamma)-158 and HbF production in Fanconi's anemia. *Haematologica.* 1992;77(2):106-9.

Rund D, Rachmilewitz E. Beta-thalassemia. *N Engl J Med.* 2005;353(11):1135-46.

- Sambrook J, Fritsch E.F, T. Maniatis. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Second edition. 1989; Cold Spring Harbor Laboratory Press.pp6.3-6.13.
- Sampietro M, Lupica L, Perrero L, Comino A, Martinez di Montemuros F, Cappellini MD, Fiorelli G. The expression of uridine diphosphate glucuronosyltransferase gene is a major determinant of bilirubin level in heterozygous beta-thalassaemia and in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Br J Haematol.* 1997;99(2):437-9.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463-7.
- Sankaran VG, Lettre G, Orkin SH, Hirschhorn JN. Modifier genes in Mendelian disorders: the example of hemoglobin disorders. *Ann NY Acad Sci.* 2010a;1214:47-56.
- Sankaran VG, Menne TF, Xu J, Akie TE, Lettre G, Van Handel B, Mikkola HK, Hirschhorn JN, Cantor AB, Orkin SH. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science.* 2008;322(5909):1839-42.
- Sankaran VG, Xu J, Orkin SH. Transcriptional silencing of fetal hemoglobin by BCL11A. *Ann N Y Acad Sci.* 2010b;1202:64-8.
- Satta S, Perseu L, Moi P, Asunis I, Cabriolu A, Maccioni L, Demartis FR, Manunza L, Cao A, Galanello R. Compound heterozygosity for KLF1 mutations associated with remarkable increase of fetal hemoglobin and red cell protoporphyrin. *Haematologica.* 2011;96(5):767-70.
- Schneider RG, Ueda S, Alperin JB, Brimhall B, Jones RT. Hemoglobin sabine β 91 (F7) Leu→Pro. An unstable variant causing severe anemia with inclusion bodies. *N Engl J Med.* 1969; 280(14): 739-45.
- Schreiber E, Matthias P, Müller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 1989;17(15):6419.
- Schroeder WA, Huisman TH, Shelton JR, Shelton JB, Kleihauer EF, Dozy AM, Robberson B. Evidence of multiple structural genes for γ -chain of human fetal hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1968;60(2):537-44.
- Shannon JR et al (1973) Freezing, storage and recovery of cell stocks. *Tissue Culture Methods and Application.* New York: Academic Press Inc. p112 - 718.
- Singleton BK, Burton NM, Green C, Brady RL, Anstee DJ. Mutations in EKLF/KLF1 form the molecular basis of the rare blood group In(Lu) phenotype. *Blood.* 2008;112(5):2081-8.
- Sozuoz A, Berkalp A, Figus A, Loi A, Pirastu M, Cao A. Beta thalassaemia mutations in Turkish Cypriots. *J Med Genet.* 1988;25(11):766-8.

- Steinberg MH, Benz EJ Jr, Adewoy AH, Ebert BL. Pathobiology of the human erythrocyte and its hemoglobins. In Hematology: Basic Principles and Practice. 5th edition. Ed. Hoffman R, Furie B, Benz EJ, Jr., McGlave P, Silberstein LE, Shattil SJ. 2009. Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia.
- Superti-Furga G, Barberis A, Schaffner G, Busslinger M. The -117 mutation in Greek HPFH affects the binding of three nuclear factors to the CCAAT region of the gamma-globin gene. EMBO J. 1988;7(10):3099-107.
- Suzuki M, Ohneda K, Hosoya-Ohmura S, Tsukamoto S, Ohneda O, Philipsen S, Yamamoto M. Real-time monitoring of stress erythropoiesis in vivo using Gata1 and beta-globin LCR luciferase transgenic mice. Blood. 2006;108(2):726-33.
- Sykes K, Kaufman R. A naturally occurring gamma globin gene mutation enhances SP1 binding activity. Mol Cell Biol. 1990;10(1):95-102.
- Thein SL. Beta-thalassaemia. Baillieres Clin Haematol. 1998;11(1):91-126.
- Thein SL. Genetic insights into the clinical diversity of beta thalassaemia. Br J Haematol. 2004;124(3):264-74.
- Thein SL. Genetic modifiers of beta-thalassemia. Haematologica. 2005a;90(5):649-60.
- Thein SL. Pathophysiology of beta thalassemia – a guide to molecular therapies. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2005b:31-7.
- Thein SL, Menzel S, Lathrop M, Garner C. Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications. Hum Mol Genet. 2009;18(R2):R216-23.
- Thein SL, Menzel S, Peng X, Best S, Jiang J, Close J, Silver N, Gerovasilli A, Ping C, Yamaguchi M, Wahlberg K, Ulug P, Spector TD, Garner C, Matsuda F, Farrall M, Lathrop M. Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(27):11346-51.
- Tuan D, Murnane MJ, deRiel JL, Forget BG. Heterogeneity in the molecular basis of hereditary persistence of fetal haemoglobin. Nature. 1980;285(5763):335-7.
- Vieira J, Messing J. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene. 1982; 19: 259-268.
- Wall L, deBoer E, Grosveld F. The human beta-globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid-specific protein. Genes Dev. 1988;2(9):1089-100.
- Weatherall DJ. The thalassemias. BMJ. 1997;314(7095):1675-8.

- Wahlberg K, Jiang J, Rooks H, Jawaid K, Matsuda F, Yamaguchi M, Lathrop M, Thein SL, Best S. The HBS1L-MYB intergenic interval associated with elevated HbF levels shows characteristics of a distal regulatory region in erythroid cells. *Blood*. 2009;114(6):1254-62.
- Weiss G, Houston T, Kastner S, Jöhrer K, Grünewald K, Brock JH. Regulation of cellular iron metabolism by erythropoietin: activation of iron-regulatory protein and upregulation of transferrin receptor expression in erythroid cells. *Blood*. 1997;89(2):680-7.
- Whipple GH, Bradford WL. Mediterranean disease thalassemia (erythroblastic anemia of Cooley): associated pigment abnormalities simulating hemochromatosis. *J. Pediatr*. 1932;9: 279
- Witt O, Monkemeyer S, Rönndahl G, Erdlenbruch B, Reinhardt D, Kanbach K, Pekrun A. Induction of fetal hemoglobin expression by the histone deacetylase inhibitor apicidin. *Blood*. 2003;101(5):2001-7.
- Wonke B. Bone disease in beta-thalassaemia major. *Br J Haematol*. 1998;103(4):897-901.
- Zahed L, Demont J, Bouhass R, Trabuchet G, Hanni C, Zalloua P, Perrin P. Origin and history of the IVS-I-110 and codon 39 beta-thalassemia mutations in the Lebanese population. *Hum Biol*. 2002; 74: 837-847.
- Zhou C, Yang Y, Jong AY. Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques*. 1990;8(2):172-3.
- Zhou D, Liu K, Sun CW, Pawlik KM, Townes TM. KLF1 regulates BCL11A expression and gamma- to beta-globin gene switching. *Nat Genet*. 2010;42(9):742-4.

Универзитет у Београду
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ
ИНСТИТУТ ЗА ФИЗИОЛОГИЈУ И БИОХЕМИЈУ
БИБЛИОТЕКА
Инв. бр. 50033
БЕОГРАД

