

Διδακτορική Διατριβή

Μελέτη της δράσης φορέων τύπου *spuma* που εκφράζουν anti- α σφαιρίνης shRNA (short hairpin RNA) και β -σφαιρίνη σε πειραματικά μοντέλα θαλασσαιμίας



Μοριανός Ιωάννης

Εργαστήριο Κυτταρικής και
Γονιδιακής Θεραπείας
Τδρμα Ιατροβιολογικών Ερευνών
της Ακαδημίας Αθηνών

Αθήνα 2011

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Σόνια Τσιτήλου

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Διδώ Βασιλακοπούλου

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Γεώργιος Βασιλόπουλος

Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας, Ιατρική Σχολή, Παν. Θεσσαλίας

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Σόνια Τσιτήλου

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Διδώ Βασιλακοπούλου

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Γεώργιος Βασιλόπουλος

Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας - Αιματολογίας, Ιατρική Σχολή, Παν. Θεσσαλίας

Μιλτιάδης Τύπας

Καθηγητής Γενετικής - Μικροβιακής Γενετικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Παναγούλα Κόλλια

Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ.

Αγλαΐα Αθανασιάδου

Ομότιμη Καθηγήτρια Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών.

Εμμανουήλ Καναβάκης

Καθηγητής Γενετικής, Τμήμα Ιατρικής, ΕΚΠΑ.

Ευχαριστίες

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου, Γεώργιο Βασιλόπουλο, για τη δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματώσω την έναρξη της ενασχόλησής μου στην βιοϊατρική έρευνα, για την επιστημονική καθοδήγηση και βοήθεια που μου παρείχε κατά την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής καθώς και για τις συμβουλές του κατά τη συγγραφή της.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου Σόνια Τσιτλήλου καθώς και την καθηγήτρια μου Διδώ Βασιλακοπούλου που παρείχαν ουσιαστικές συμβουλές και συνετέλεσαν στην επίβλεψη και ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής ενώ συμμετείχαν ουσιαστικά και στη συγγραφή της.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια, Έλενα Κ. Σιαπάτη της οποίας η αξία έχει παραγνωριστεί. Όντας πάντα εκεί για τους διδακτορικούς φοιτητές του εργαστηρίου, παρείχε κάθε δυνατή βοήθεια στο σχεδιασμό και την πραγματοποίηση των πειραματικών διαδικασιών προκειμένου να ολοκληρωθεί και αυτή η επιστημονική μελέτη.

Πολλά ευχαριστώ στις Αγγελική Ανδριανάκη, Ηλένια Χατζηανδρέου, Μάγδα Παπαδάκη και στους Γιώργο Πόγκα και Νικόλαο Πούλο για τη βοήθειά τους στην πραγματοποίηση των πειραματικών διαδικασιών αλλά κυρίως για τη συμπαράσταση και την υποστήριξή τους στις όμορφες αλλά και δύσκολες στιγμές που έχουμε περάσει στο εργαστήριο.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου, Βαγγέλη και Ελένη, στον αδερφό μου Στράτο και στη Μαρία μου γιατί πιστεύουν σε εμένα και με στήριξαν σε αυτή τη δύσκολη διαδρομή με κάθε δυνατό τρόπο.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή φιλοξενήθηκε από το εργαστήριο Κυτταρικής και Γονιδιακής Θεραπείας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) και χρηματοδοτήθηκε από το Πρόγραμμα Ενίσχυσης Ερευνητικού Δυναμικού (ΠΕΝΕΔ) 2003.

Περιεχόμενα

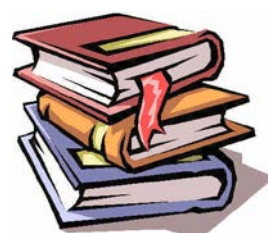
Εισαγωγή	7
1. Αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα και ερυθροποίηση.....	8
2. Αιμοσφαιρίνες.....	14
3. Μεταγραφική ρύθμιση του γονιδιακού τόπου της β-σφαιρίνης	16
4. β-Θαλασσαιμίες	20
i. Μοριακή Βάση.....	20
ii. Παθοφυσιολογία	22
5. Δευτερογενή χαρακτηριστικά της β-θαλασσαιμίας.....	25
i. Σπληνομεγαλία	25
ii. Σπληνεκτομή.....	25
iii. Υπερφόρτωση σιδήρου – Αιμοσιδήρωση	26
iv. Χηλική θεραπεία σιδήρου.....	27
6. Θεραπευτικές Προσεγγίσεις των β-Θαλασσαιμιών	27
i. Συμβατικές Θεραπείες	27
ii. Γονιδιακή Θεραπεία	29
7. Γονιδιακή Θεραπεία της β-Θαλασσαιμίας.....	30
i. Ιστορική αναδρομή της έρευνας στη γονιδιακή θεραπεία της β-θαλασσαιμίας	30
ii. Περιοχές της LCR στη γονιδιακή θεραπεία της β-θαλασσαιμίας	32
8. Αφροϊοί (Spumaretroviridae).....	35
i. Το γονιδίωμα των αφροϊών.....	36
ii. Ίκός κύκλος ζωής.....	38
iii. Τροπισμός των αφροϊών <i>in vitro</i>	40
iv. Αφροϊκοί φορείς (FV).....	40
9. Παρεμβολή του RNA (RNA interference - RNAi).....	41
i. Ο μηχανισμός της παρεμβολής του RNA.....	42
ii. Ανάπτυξη και χρήση μικρών παρεμβατικών RNA (small interfering RNA - siRNA) και μικρών φουρκετών RNA (small hairpin RNA - shRNA)	44
10. Παρεμβολή του RNA και η εφαρμογή της στη γονιδιακή θεραπεία της β-θαλασσαιμίας	47

Στόχος της Διδακτορικής Διατριβής.....	49
Υλικά και Μέθοδοι.....	52
1. Αφροϊκοί φορείς (FV).....	53
i. Κατασκευή αφροϊκών πλασμιδιακών φορέων	53
ii. Παραγωγή αφροϊκών φορέων με τη μέθοδο CaP.....	55
2. Κυτταρικές Σειρές.....	56
i. Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών.....	56
ii. Μεταγωγή κυτταρικών σειρών	56
3. Αρχέγονα Κύτταρα Ποντικού.....	57
i. Απομόνωση αρχέγονων κυττάρων ποντικού.....	57
ii. Μεταγωγή αρχέγονων κυττάρων ποντικού	59
iii. Ερυθροειδική καλλιέργεια αρχέγονων κυττάρων ποντικού.....	60
4. Μεταμόσχευση Αρχέγονων Κυττάρων σε Ποντίκια-Μοντέλα της β- Θαλασσαιμίας	60
5. Ανθρώπινα Αρχέγονα Κύτταρα	61
i. Απομόνωση ανθρώπινων αρχέγονων κυττάρων	61
ii. Μεταγωγή ανθρώπινων αρχέγονων κυττάρων	62
iii. Ερυθροειδική καλλιέργεια αρχέγονων κυττάρων ποντικού.....	63
6. Κυτταρομετρία Ροής.....	63
i. Εσωτερική σήμανση (intracytoplasmic staining) επιμολυσμένων κυττάρων με την χρήση αντισωμάτων	63
ii. Ανάλυση της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε περιφερικό αίμα ποντικού	64
iii. Ανάλυση της ερυθροειδικής ωρίμανσης σε καλλιέργεια αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (AAK) <i>ex vivo</i>	64
7. Ανάλυση κατά Western	65
8. Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real Time - PCR).....	66
i. Υπολογισμός του τίτλου των ιικών φορέων.....	66
ii. Υπολογισμός των επιπέδων χιμαιρισμού και των ενσωματωμένων ιικών αντιγράφων	67
iii. Υπολογισμός της έκφρασης του mRNA της ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε ερυθροειδικές αποικίες ποντικού και ανθρώπου	67

Αποτελέσματα	69
1. Κατασκευή αφοϊκών φορέων (FV) που εκφράζουν β-σφαιρίνη και ρυθμίζονται από την αλληλουχία α-HS40	70
2. Κατασκευή του αφοϊκού φορέα που εκφράζει β-σφαιρίνη και ρυθμίζεται από τις αλληλουχίες HS2 και HS3	72
3. Τιτλοποίηση των αφοϊκών φορέων.....	73
4. Βελτιστοποίηση της κυτταρομετρίας ροής και της ανοσο-ανίχνευσης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης.....	73
5. Ανάλυση της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε κυτταρικούς πληθυσμούς MEL που έχουν επιμολυνθεί με αφοϊκούς φορείς	76
6. Μεταγωγή κυττάρων της σειράς MEL με φορείς που εκφράζουν β-σφαιρίνη ...	78
7. Συσχέτιση του αριθμού των ενσωματωμένων αφοϊκών αντιγράφων και της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε ανεξάρτητους κλώνους MEL	79
8. Σύγκριση της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης μεταξύ των αφοϊκών φορέων σε κυτταρικούς κλώνους MEL	82
9. Μεταγωγή αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων ποντικίου.....	83
10. Απομόνωση κυττάρων εμβρυϊκού ήπατος.....	87
11. Υγρή καλλιέργεια ερυθροειδικής διαφοροποίησης αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων ποντικίου	88
12. Έλεγχος των θαλασσαιμικών ποντικών ($Hbb^{th-3/+}$).....	93
13. Βελτιστοποίηση της κυτταρομετρίας ροής του περιφερικού αίματος.....	95
14. Μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων σε μυϊκά μοντέλα β-θαλασσαιμίας	98
15. Διόρθωση του θαλασσαιμικού φαινοτύπου σε μεταμοσχευμένα ποντίκια με γενετικά διορθωμένα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα.....	99
16. <i>In vivo</i> παραγωγή ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε μεταμοσχευμένα ποντίκια με γενετικά διορθωμένα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα.....	102
17. Βελτίωση των αιματολογικών παραμέτρων μετά από μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων	105
18. Σχηματισμός υβριδικής αιμοσφαιρίνης στο περιφερικό αίμα των μεταμοσχευμένων ποντικών με γενετικά διορθωμένα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα	108
19. Μεταγωγή αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων ($CD34^{+}$) από ασθενείς με β-θαλασσαιμία.....	110
20. Επαγωγή της έκφρασης της β-σφαιρίνης σε γενετικά διορθωμένα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα από ασθενείς με β-θαλασσαιμία.....	111
21. Αποκατάσταση της μη αποδοτικής ερυθροποίησης σε γενετικά διορθωμένα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα από ασθενείς με β-θαλασσαιμία.....	113
22. Βελτίωση της βιωσιμότητας των γενετικά διορθωμένων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων από ασθενείς με β-θαλασσαιμία	116

23. Κατασκευή του συνδυαστικού αφοϊκού φορέα (FV) που εκφράζει β-σφαιρίνη και shRNA έναντι της α-σφαιρίνης	117
24. Διόρθωση της ισορροπίας της α- και β-σφαιρίνης σε ερυθρο-ειδικές καλλιέργειες αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (CD34 ⁺) από θαλασσαιμικούς ασθενείς.....	119
25. Αποκατάσταση της ερυθροποίησης <i>ex vivo</i> σε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (CD34 ⁺) από θαλασσαιμικούς ασθενείς	121
Συζήτηση.....	123
Βιβλιογραφία	136
Περίληψη	155
Δημοσίευση	160

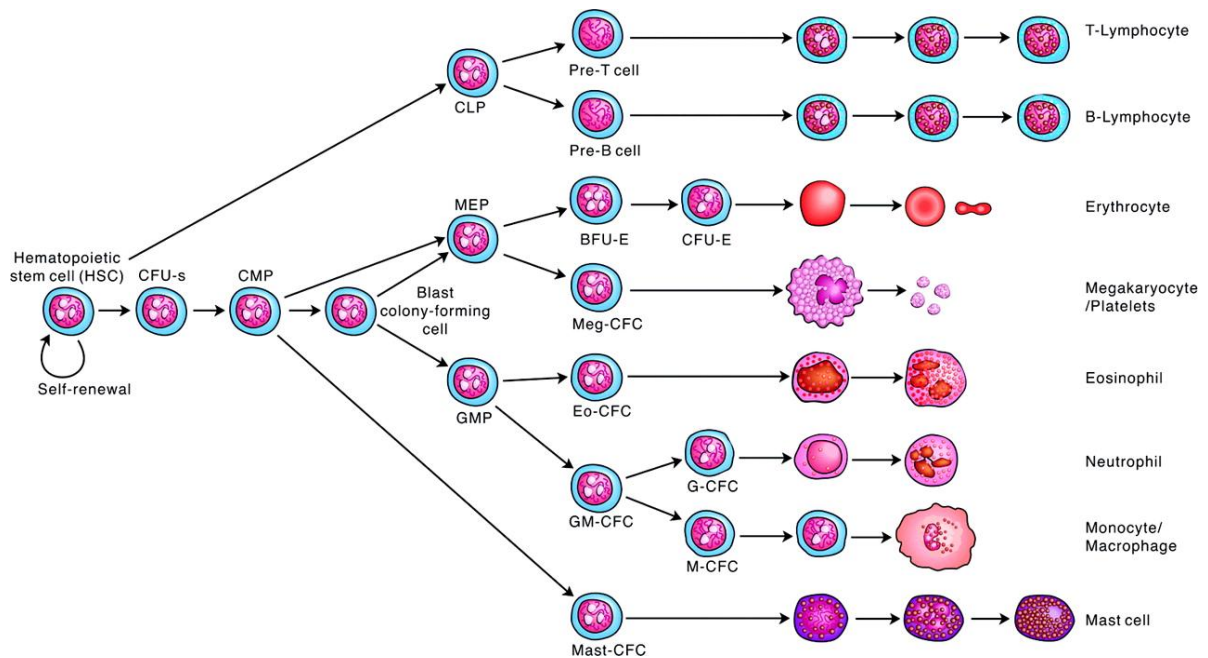
Εισαγωγή



1. Αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα και ερυθροποίηση

Η παραγωγή των ερυθροκυττάρων στον ανθρώπινο οργανισμό είναι μία συνεχής και δυναμικά ρυθμιζόμενη διαδικασία. Η φυσιολογική διάρκεια ζωής ενός ερυθροκυττάρου είναι κατά προσέγγιση 120 ημέρες, με ημερήσια αντικατάσταση του 0.8% με 1.0% των ερυθροκυττάρων που βγαίνουν στην κυκλοφορία. Η ισορροπημένη παραγωγή και καταστροφή διατηρεί τον αριθμό των ερυθροκυττάρων σε φυσιολογικά επίπεδα. Αύξηση της ερυθροποιητικής δραστηριότητας παρατηρείται όταν η οξυγόνωση των ιστών υπολείπεται εξαιτίας απώλειας αίματος ή μειωμένου χρόνου ζωής των ερυθροκυττάρων ή όταν υπάρχουν αυξημένες ανάγκες για μεταφορά οξυγόνου.

Ο μυελός των οστών αποτελεί την περιοχή του οργανισμού όπου λαμβάνει χώρα η ερυθροποίηση. Στα κύτταρα της ερυθράς σειράς διακρίνουμε οκτώ (8) βαθμίδες διαφοροποιημένων κυττάρων που αναπτύσσονται μέσα στο μυελό των οστών (MO) (**Εικόνα 1**). Τα κύτταρα που έχουν την ευθύνη να διατηρούν την ομοιόσταση στον αιμοποιητικό ιστό και να ρυθμίζουν τον αριθμό των λευκοκυττάρων, ερυθροκυττάρων και αιμοπεταλίων που υπάρχουν στην κυκλοφορία μέσω της διαφοροποίησής τους σε οποιοδήποτε από αυτούς τους κυτταρικούς τύπους είναι γνωστά ως αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (AAK ή Hematopoietic Stem Cells - HSCs). Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα είναι σπάνια στον πληθυσμό των κυττάρων του μυελού των οστών με την συχνότητά τους να υπολογίζεται σε 1 στα 10^5 με 10^6 κύτταρα.

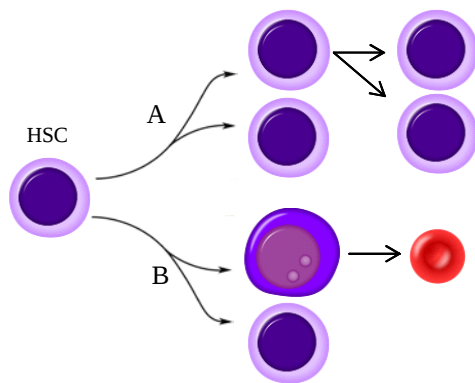


Εικόνα 1. Το ιεραρχικό μοντέλο διαφοροποίησης των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (AAK). Τα AAK διαφοροποιούνται προς οκτώ διαφορετικές “γενιές” ώριμων κυττάρων. (Από: Metcalf 2007)

Τις δύο τελευταίες δεκαετίες έχει γίνει έντονη προσπάθεια για να προσδιοριστούν φαινοτυπικά τα κύτταρα που εμφανίζουν τις αναγεννητικές ικανότητες των AAK. Έτσι σήμερα ξέρουμε ότι τα AAK του μυελού των οστών ενήλικων ποντικών έχουν τον εξής φαινότυπο: Είναι αρνητικά ως προς τους επιφανειακούς δείκτες διαφοροποίησης (CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, NK1.1, B220, TER-119 και Gr-1) και γι’ αυτό αποκαλούνται Lineage⁻ ή Lin⁻. Είναι θετικά για τα c-Kit⁺, Sca-1⁺ ενώ εκφράζουν ενδιάμεσα επίπεδα Thy-1^{low}, CD34^{-/low}, Rhodamine^{low} και Hoechst^{low}.^{1,2,3} Αντίθετα με ό,τι συμβαίνει στον άνθρωπο όπου τα AAK βρίσκονται σε μεγάλη συχνότητα σε ένα πληθυσμό κυττάρων CD34⁺, τα AAK στο ποντίκι εμφανίζουν CD34^{-/low} φαινότυπο. Ωστόσο, τα AAK που προέρχονται από το εμβρυϊκό ήπαρ των ποντικών εκφράζουν το επιφανειακό αντίγονο CD34 (CD34⁺) οπότε φαίνεται ότι η έκφραση του ρυθμίζεται αναπτυξιακά.^{4,5} Η μετάβαση από

CD34⁺ AAK σε CD34⁻ AAK στον μυελό των οστών παρατηρείται στις οκτώ πρώτες ημέρες ζωής του ποντικίου.^{6,7}

Τα AAK χαρακτηρίζονται σε λειτουργικό επίπεδο από την ικανότητα τους να αυτοανανεώνονται και υπό τις κατάλληλες συνθήκες να διαφοροποιούνται σε πολλούς τύπους διαφορετικών κυττάρων. Η ιδιότητά της αυτοανανέωσης αναφέρεται στην διαδικασία κατά την οποία τουλάχιστον το ένα από τα δύο θυγατρικά κύτταρα διατηρεί τις ιδιότητες των αρχέγονων κυττάρων. Η διαίρεση των AAK μπορεί να είναι συμμετρική ή ασύμμετρη, δίνοντας γένεση σε δύο νέα AAK ή σε ένα AAK και ένα διαφοροποιημένο κύτταρο, αντίστοιχα (**Εικόνα 2**).^{8,9,10}



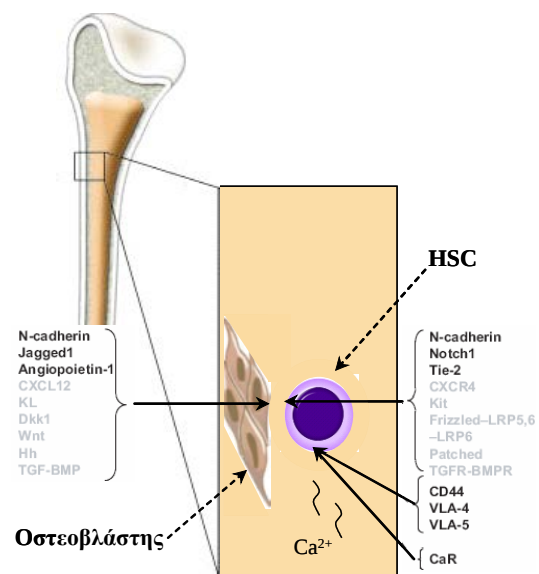
Εικόνα 2. Δύο τύποι διαίρεσης των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (AAK). (A) Συμμετρική διαίρεση προς δύο νέα AAK. (B) Ασύμμετρη διαίρεση προς ένα AAK και ένα διαφοροποιημένο κυτταρικό τύπο.

Με τον τρόπο αυτό τα AAK αυξάνουν ή διατηρούν τον αριθμό τους ανάλογα με τις απαιτήσεις του οργανισμού προκειμένου αυτός να ανταποκριθεί σε ενδεχόμενες μεταβολές του αριθμού των αιμοποιητικών κυττάρων.

Το μικροπεριβάλλον που συντηρεί τα AAK στον μυελό των οστών (stem cell niche) έχει μελετηθεί εκτενώς σε ασπόνδυλους οργανισμούς όπως η *D.melanogaster* και ο *C.elegans* και έχουν προσδιοριστεί τα χαρακτηριστικά εκείνα που επηρεάζουν την δημιουργία και διατήρηση των AAK στην περιοχή αυτή (**Εικόνα 3**).¹¹ Καταρχάς, έχει γίνει γνωστό ότι ο συνολικός αριθμός των AAK στο μυελό των οστών είναι αυστηρά ελεγχόμενος και υπάρχει ένα πολύπλοκο δίκτυο παραγόντων που καθορίζει το ρυθμό της αυτοανανέωσης και της διαφοροποίησής τους. Ακόμα, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών τύπων αποδεικνύονται

σημαντικές για την διατήρηση των ιδιοτήτων των ΑΑΚ ενώ τα προϊόντα του μικροπεριβάλλοντος παρέχουν την μοριακή βάση αυτών των αλληλεπιδράσεων και την ισορροπία μεταξύ των κατασταλτικών και των ενεργοποιητικών σημάτων που ελέγχουν τον αριθμό και την λειτουργία των ΑΑΚ. Τέλος, το μικροπεριβάλλον των ΑΑΚ στο μυελό των οστών έχει την ικανότητα να μεταδώσει χαρακτηριστικά που ομοιάζουν με εκείνα των αρχέγονων κυττάρων και σε κύτταρα που είναι ήδη διαφοροποιημένα.^{12,13,14,15}

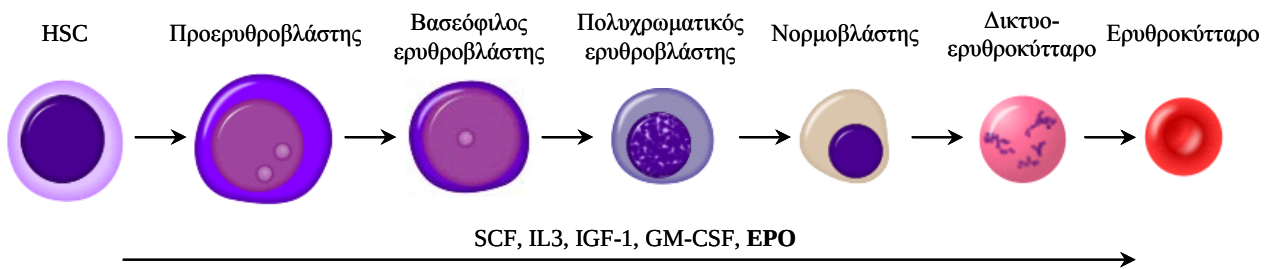
Εικόνα 3. Αλληλεπιδράσεις στο μικροπεριβάλλον του ενδόστεου. Τα ΑΑΚ δεσμεύουν συστατικά του μικροπεριβάλλοντος μέσω αλληλεπιδράσεων που ρυθμίζουν την λειτουργία τους. Όσον αφορά στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μοριακών συστατικών του μικροπεριβάλλοντος και των αρχέγονων κυττάρων τα μόρια που εμφανίζονται με έντονο μαύρο χρώμα δείχνουν αποδεδειγμένη ενώ τα γκρι πιθανή εμπλοκή στις αλληλεπιδράσεις. (Τροποποιημένο από: Yin 2006)



Ένα αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο διαφοροποιείται σε ερυθροκύτταρο ακολουθώντας ενδιάμεσα στάδια τα οποία επιφέρουν μείωση του μεγέθους του κυττάρου, συμπύκνωση και τελικώς απώλεια του πυρηνικού νουκλεϊκού υλικού και των οργανιδίων, σύνθεση αιμοσφαιρίνης και τέλος απώλεια της ικανότητας αναδιπλασιασμού των κυττάρων.

Το αναγνωρισμένο μορφολογικά, πρωϊμότερο, ερυθροποιητικό κύτταρο είναι ο προερυθροβλάστης. Στην εξέλιξη της διαφοροποίησης η δημιουργία του προερυθροβλάστη ακολουθεί τα στάδια των κυττάρων που σχηματίζουν τις

ερυθροποιητικές αποικίες (BFU-E και CFU-E). Ο προερυθροβλάστης έχει μεγάλο μέγεθος (20-30 μ m), μεγάλο σφαιρικό πυρήνα με πυρήνια και βασεόφιλο κυτταρόπλασμα (σκούρος μπλε χρωματισμός) το οποίο σηματοδοτεί την παρουσία ριβοσωμάτων. Τον προερυθροβλάστη διαδέχεται ο βασεόφιλος ερυθροβλάστης ο οποίος διατηρεί το μεγάλο μέγεθος (15-20 μ m) ενώ ο πυρήνας μικραίνει ελαφρώς με την χρωματίνη να είναι περισσότερο συμπυκνωμένη. Ο βασεόφιλος ερυθροβλάστης διαφοροποιείται σε πολυχρωματικό ερυθροβλάστη ο οποίος μικραίνει σε μέγεθος (12-15 μ m) και εμφανίζει πιο σφαιρικό και μικρό πυρήνα με περισσότερο συμπυκνωμένη χρωματίνη. Την ίδια στιγμή, το κυτταρόπλασμα αρχίζει να μετατρέπεται από βασεόφιλο σε οξεόφιλο (ερυθρόχρωος χρωματισμός) τονίζοντας την ταυτόχρονη παρουσία ριβοσωμάτων καθώς επίσης και την παραγωγή και παρουσία αιμοσφαιρίνης. Έως και αυτό το στάδιο, τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να διαιρούνται. Το στάδιο του νορμοβλάστη ή πυκνωτικού ερυθροβλάστη διαδέχεται αυτό του πολυχρωματικού ερυθροβλάστη με τα κύτταρα να μικραίνουν εμφανώς σε μέγεθος (8-10 μ m), τον πυρήνα να εμφανίζει τον υψηλότερο βαθμό συμπύκνωσης και το κυτταρόπλασμα να περιέχει υψηλότερα επίπεδα αιμοσφαιρίνης. Στο επόμενο στάδιο ερυθροποίησης, το δικτυοερυθροκύτταρο διατηρεί το ίδιο περίπου μέγεθος, ο πυρήνας, όμως έχει αποβληθεί και το κυτταρόπλασμα περιέχει περισσότερη αιμοσφαιρίνη και μία υπολειμματική ποσότητα ριβοσωμικού RNA που διατηρεί υπολειμματική ικανότητα σύνθεσης αιμοσφαιρίνης. Τα δικτυοερυθροκύτταρα παραμένουν μία με δύο ημέρες στο μυελό των οστών και άλλες μία με δύο ημέρες στο περιφερικό αίμα και τον σπλήνα, όπου το RNA αποδομείται εντελώς και προκύπτει το τελικό ερυθροκύτταρο (Red Blood Cell - RBC) (**Εικόνα 4**).

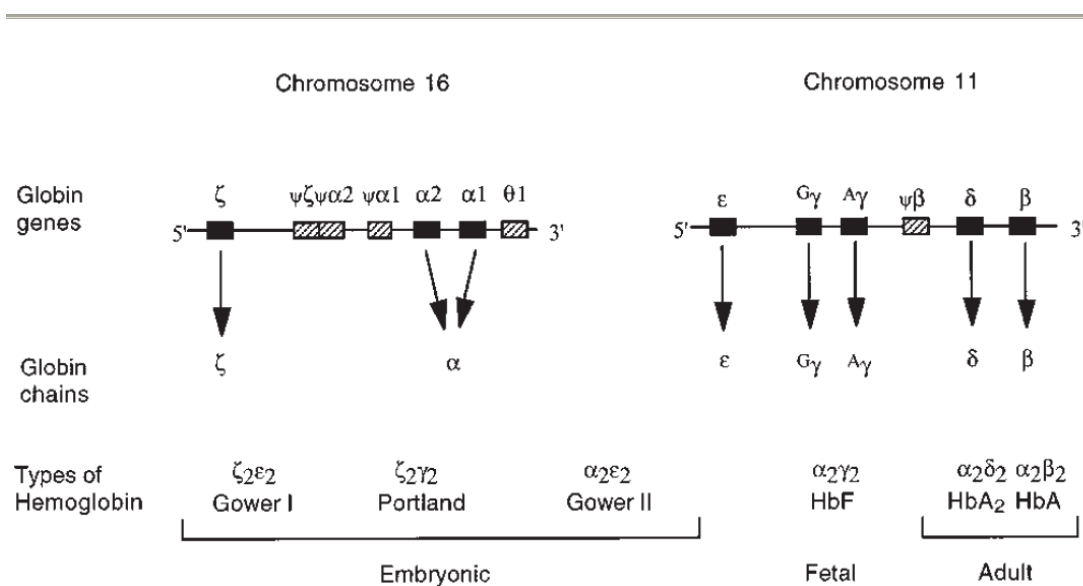


Εικόνα 4. Τα στάδια ερυθροποιητικής διαφοροποίησης. Το πρωϊμότερο ερυθροποιητικό κύτταρο, ο προερυθροβλάστης, διαφοροποιείται σε βασεόφιλο ερυθροβλάστη, πολυχρωματικό ερυθροβλάστη, νορμοβλάστη, δικτυοερυθροκύτταρο και τέλος σε ώριμο ερυθροκύτταρο. Στο κάτω τμήμα της εικόνας φαίνονται τα μόρια που σηματοδοτούν τη μετάβαση στα διαδοχικά στάδια διαφοροποίησης. Η ερυθροποιητίνη είναι η ορμόνη που κυριαρχεί στην ερυθροποίηση ενώ καθοριστική είναι η συνεισφορά των κυτταροκινών SCF, IL-3, IGF-1 και GM-CSF.

Η ερυθροποίηση μεταξύ άλλων, όπως αναφέρθηκε, ενεργοποιείται κάτω από συνθήκες υποξίας όταν υπάρχουν αυξημένες ανάγκες μεταφοράς οξυγόνου.¹⁶ Όταν παρουσιάζονται αυτές οι συνθήκες ενεργοποιείται η σύνθεση του σημαντικότερου παράγοντα ερυθροποίησης, της ερυθροποιητίνης (Erythropoietin - EPO).¹⁷ Τα ερυθροποιητικά προγονικά κύτταρα ανταποκρίνονται στην EPO στο στάδιο των CFU-E κυττάρων κατευθύνοντας την ισορροπία των κυττάρων στο μυελό των οστών προς την παραγωγή ώριμων ερυθροκυττάρων. Αρκετές κυτταροκίνες συνεργάζονται με την EPO προκειμένου να επάγουν ερυθροειδική διαφοροποίηση. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται οι ιντερλευκίνες 3 (IL-3) και 6 (IL-6), ο παράγοντας διέγερσης κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor - GM-CSF) και ο αυξητικός παράγοντας των αρχέγονων κυττάρων (Stem Cell Factor - SCF) (**Εικόνα 4**). Ακόμη, έχει δειχθεί ότι ο SCF μαζί με την EPO και άλλες κυτταροκίνες επάγουν τον *in vitro* σχηματισμό των ερυθροειδικών αποικιών από κύτταρα του μυελού των οστών διεγείροντας εν μέρει τον πολλαπλασιασμό των ερυθροειδικών απογόνων.^{18,19}

2. Αιμοσφαιρίνες

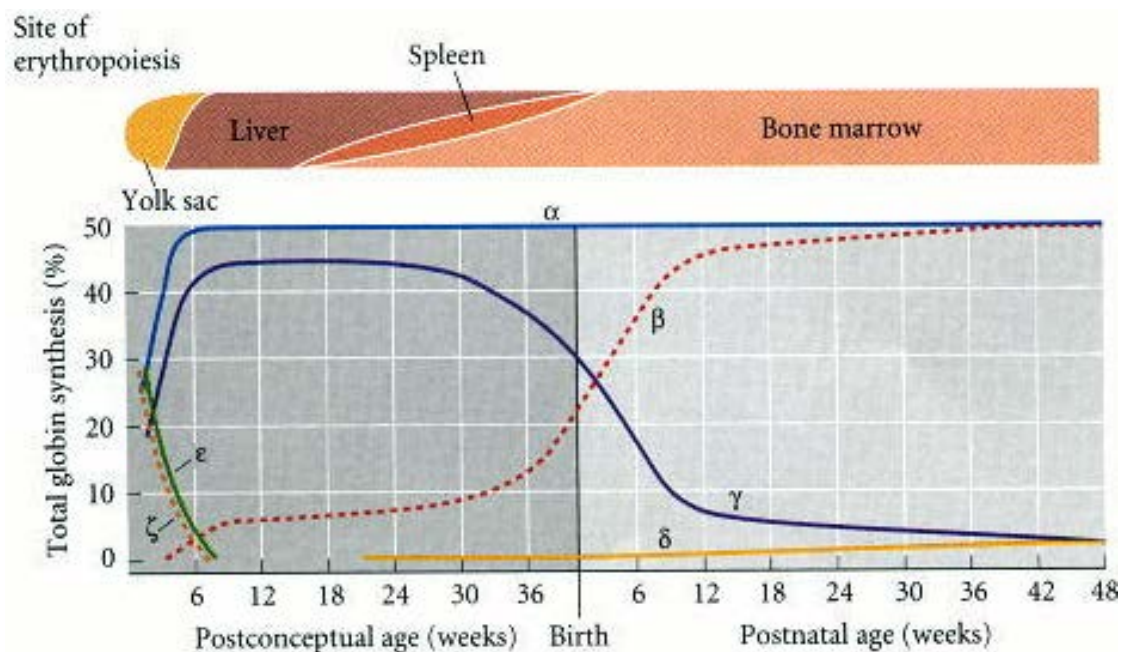
Η ανθρώπινη αιμοσφαιρίνη είναι ένα τετραμερές μόριο που είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς των σπονδυλωτών. Η τετραμερής αυτή πρωτεΐνη αποτελείται από δύο τύπους πολυπεπτιδικών αλυσίδων ή σφαιρινών, τις τύπου-α και τύπου-β. Τα γονίδια που κωδικοποιούν την παραγωγή των ανθρώπινων σφαιρινών εντοπίζονται στα χρωμοσώματα 16 και 11 για τα τύπου-α και τα τύπου-β γονίδια αντίστοιχα (**Εικόνα 5**). Τα γονίδια τύπου-α κωδικοποιούν τις αλυσίδες ζ και α ενώ τα γονίδια τύπου-β κωδικοποιούν τις αλυσίδες ε, γ, δ και β.²⁰



Εικόνα 5. Οργάνωση των ανθρώπινων α- και β-γονιδίων, με τις αλυσίδες των σφαιρινών και τις αιμοσφαιρίνες που παράγονται σε κάθε στάδιο της ανάπτυξης.

Η σειρά με την οποία διατάσσονται τα γονίδια στα χρωμοσώματα 16 και 11 αντιστοιχεί και στην σειρά με την οποία εκφράζονται τα γονίδια κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης (**Εικόνα 6**). Η αλυσίδα ζ εκφράζεται κατά τις πρώτες 6 εβδομάδες της κύησης ενώ σταδιακά τη διαδέχεται η σφαιρίνη α, που κυριαρχεί καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του ανθρώπου. Στην περίπτωση των γονιδίων τύπου-β, πρόωμη έκφραση εκδηλώνει το γονίδιο ε (όμοια με εκείνου της σφαιρίνης ζ) ενώ μέχρι και λίγες εβδομάδες μετά την γέννηση κυριαρχεί η έκφραση του γ-γονιδίου και η αιμοσφαιρίνη HbF (α2γ2, εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη). Περί την 6^η εβδομάδα της ζωής

του ανθρώπου, μειώνεται σταδιακά η παραγωγή της γ-σφαιρίνης και αρχίζει η έκφραση της β-σφαιρίνης η οποία σε σύμπλοκο με την α-σφαιρίνη δίνει τον κυρίαρχο τύπο της αιμοσφαιρίνης των ενηλίκων (HbA, $\alpha_2\beta_2$). Τέλος, η τύπου-δ είναι παρούσα σε ελάχιστες ποσότητες μετά από τη γέννηση και σε σύμπλοκο με την α-αλυσίδα δημιουργεί την αιμοσφαιρίνη HbA₂. Η σύνθεση των διαφορετικών τύπων αιμοσφαιρίνης αποτελεί μία αντανάκλαση των φυσιολογικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα προκειμένου να προσαρμοστεί ο οργανισμός στις διαφορετικές απαιτήσεις σε οξυγόνο κατά τα στάδια της ανάπτυξης.



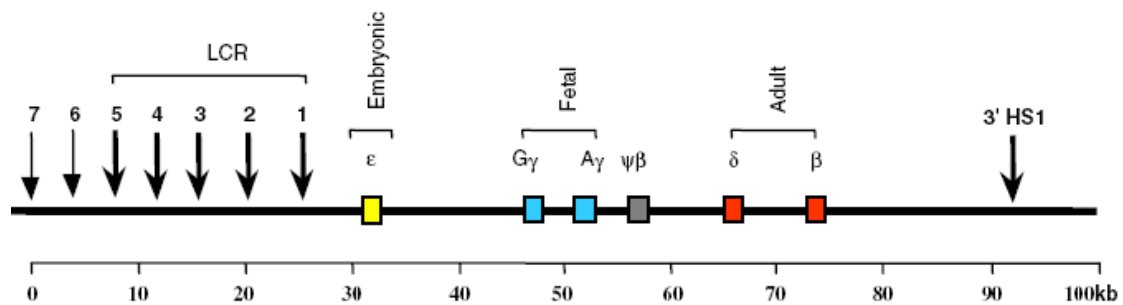
Εικόνα 6. Η πορεία παραγωγής των αιμοσφαιρινών κατά τα στάδια ανάπτυξης του ανθρώπινου οργανισμού. Σημειώνεται η εναλλαγή στην παραγωγή μεταξύ της εμβρυϊκής και ενήλικης αιμοσφαιρίνης λίγο πριν την γέννηση. (Από: Karlsson 1985)

Στην ενήλικη ζωή του ανθρώπου υπάρχει ένα ποσοστό ερυθροκυττάρων που περιέχει εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη (HbF) ταυτόχρονα με την αιμοσφαιρίνη HbA. Ο πληθυσμός αυτός των κυττάρων είναι γνωστός ως F-κύτταρα. Η εναλλαγή στην έκφραση των αιμοσφαιρινών και ιδιαίτερα μεταξύ της εμβρυϊκής (HbF) και της αιμοσφαιρίνης των ενηλίκων (HbA) εμφανίζει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον αλλά

ακόμη δεν έχει αποσαφηνιστεί ο ακριβής υποκείμενος μηχανισμός. Θεωρείται πάντως πως ελέγχεται από έναν ιδιότυπο ανταγωνισμό των γονιδίων των σφαιρινών ως προς τις *cis*-ενεργές ρυθμιστικές περιοχές του γονιδιακού τόπου των σφαιρινών τύπου-β (β -globin Locus Control Region-LCR) που καθορίζουν την μεταγραφή των γονιδίων. Η ρυθμιστική περιοχή του γονιδιακού τόπου της β -σφαιρίνης (LCR) είναι μία από τις εκτενέστερα μελετημένες ρυθμιστικές περιοχές. Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11 και συγκεκριμένα στο τμήμα από 25kb έως και 5kb ανοδικά του γονιδίου της σφαιρίνης ϵ και χαρακτηρίζεται από εξελικτικά διατηρημένες θέσεις υπερευαισθησίας στην DNase I (Hypersensitive Site, HS). Μετά από πειράματα σε διαγονιδιακά ζώα βρέθηκε ότι η ρυθμιστική περιοχή LCR, που αποτελείται από τις περιοχές HS1-5, έχει την ικανότητα να υποστηρίζει την έκφραση του συνδεδεμένου διαγονιδίου σε υψηλά επίπεδα που είναι ανεξάρτητα από το σημείο ενσωμάτωσης και ευθέως ανάλογα του αριθμού των διαγονιδίων ανά κύτταρο (copy number-dependent / position-independent expression).²¹

3. Μεταγραφική ρύθμιση του γονιδιακού τόπου της β -σφαιρίνης

Η έκφραση του γονιδιακού τόπου των αιμοσφαιρινών βρίσκεται υπό τον έλεγχο ενός πολύπλοκου προγράμματος μεταγραφικής ρύθμισης που εξαρτάται από το επίπεδο διαφοροποίησης καθώς και από το αναπτυξιακό στάδιο του κυττάρου. Ο συντονισμός αυτών των λειτουργιών πραγματοποιείται από ρυθμιστικούς παράγοντες που αλληλεπιδρούν με αλληλουχίες DNA οι οποίες εντοπίζονται τόσο κοντά όσο και σε απόσταση από τις κωδικές αλληλουχίες. Η σημαντικότερη ρυθμιστική περιοχή στον ανθρώπινο γονιδιακό τόπο της β -σφαιρίνης είναι η Κύρια Ρυθμιστική Περιοχή (Locus Control Region - LCR) η οποία και οριοθετείται 5 - 25kb ανοδικά του γονιδίου της ϵ -σφαιρίνης. Η περιοχή LCR αποτελείται από 5 περιοχές που χαρακτηρίζονται από υπερευαισθησία στην DNase I (Υπερευαίσθητες Θέσεις - Hypersensitive Sites - HS) (**Εικόνα 7**). Κάθε υπερευαίσθητη θέση (HS) έχει μία κεντρική αλληλουχία που περικλείει μοτίβα τα οποία αναγνωρίζονται από μεταγραφικούς παράγοντες. Η παρουσία της περιοχής LCR είναι απαραίτητη για την γονιδιακή έκφραση των σφαιρινών σε υψηλά επίπεδα σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια του ερυθροκυττάρου.²¹



Εικόνα 7. Ο γονιδιακός τόπος των ανθρώπινων σφαιρινών στο χρωμόσωμα 11. Στα αριστερά φαίνεται η περιοχή LCR της ανθρώπινης β-σφαιρίνης και οι υπερευαίσθητες θέσεις (HS) που την αποτελούν. (Από: Stamatoyannopoulos 2005)

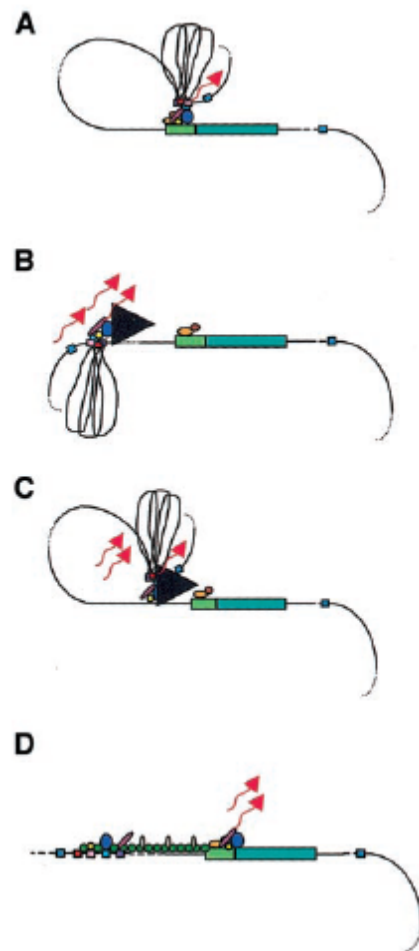
Σήμερα είναι αποδεδειγμένο ότι η περιοχή LCR διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση της έκφρασης των γονιδίων των σφαιρινών. Το ερώτημα που απομένει να απαντηθεί έγκειται στο πως ακριβώς επιτυγχάνεται. Με τα μέχρι σήμερα δεδομένα, φαίνεται ότι η περιοχή LCR μπορεί να ενισχύσει την έκφραση των γονιδίων των σφαιρινών, να δημιουργήσει μία ανοιχτή διαμόρφωση της χρωματίνης του ευρύτερου γονιδιακού τόπου καθώς επίσης και να δράσει από μεγάλη απόσταση.^{22,23} Για τον τρόπο με τον οποίο επιτυγχάνεται η δράση της περιοχής LCR έχουν προταθεί 4 μοντέλα (**Εικόνα 8**).

Στο πρώτο μοντέλο (A) οι μεταγραφικοί παράγοντες προσδένονται στις υπερευαίσθητες θέσεις HS της περιοχής LCR αλλά και στον υποκινητή. Η περιοχή LCR αλληλεπιδρά απευθείας με τον υποκινητή δημιουργώντας μία θηλιά (loop) και παρακάμπτοντας τις αλληλουχίες που μεσολαβούν. Με αυτό τον τρόπο σχηματίζεται ένα ενεργό μεταγραφικό σύμπλοκο στον υποκινητή.^{24,25,26,27} Στο δεύτερο μοντέλο (B) οι μεταγραφικοί παράγοντες προσδένονται αρχικά στις αλληλουχίες της περιοχής LCR και δημιουργούν ένα σύμπλοκο που ελέγχει/διαβάζει τις αλληλουχίες του DNA καθοδικά της LCR έως ότου αναγνωρίσει και προσδεθεί στην αλληλουχία του υποκινητή εκκινώντας ταυτόχρονα τη μεταγραφή.^{28,29} Το τρίτο μοντέλο (C) δανείζεται στοιχεία από τα μοντέλα (A) και (B) αποτελώντας περισσότερο ένα συνδυασμό αυτών. Οι μεταγραφικοί παράγοντες προσδένονται τόσο στις υπερευαίσθητες θέσεις HS της περιοχής LCR όσο και σε περιοχή της αλληλουχίας του DNA καθοδικά της LCR σχηματίζοντας μία διαμόρφωση θηλιάς (loop). Με αυτό

τον τρόπο έρχονται κοντά στον γονιδιακό τόπο των σφαιρινών και εκκινούν την ανίχνευση του γενωμικού DNA έως ότου αναγνωρίσουν την αλληλουχία του υποκινητή.²⁸ Τέλος, το τέταρτο μοντέλο (D) περιλαμβάνει την συνεχή πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων στη χρωματίνη μέσω πρωτεϊνών που δεν προσδένονται στο DNA καθώς και πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με αυτή (πράσινοι κύκλοι). Η συνεχής πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων λαμβάνει χώρα από το σύμπλοκο εκκίνησης που σχηματίζεται στις αλληλουχίες της LCR έως και την αλληλουχία του υποκινητή. Η συνεχόμενη πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων οδηγεί στην αλλαγή της διαμόρφωσης της χρωματίνης έως το σημείο έναρξης της μεταγραφής.³⁰

Εικόνα 8. Τα τέσσερα πιθανά μοντέλα δράσης της περιοχής LCR και της μεταγραφικής ρύθμισης των γονιδίων των σφαιρινών.

(Από: Stamatoyannopoulos 2002)

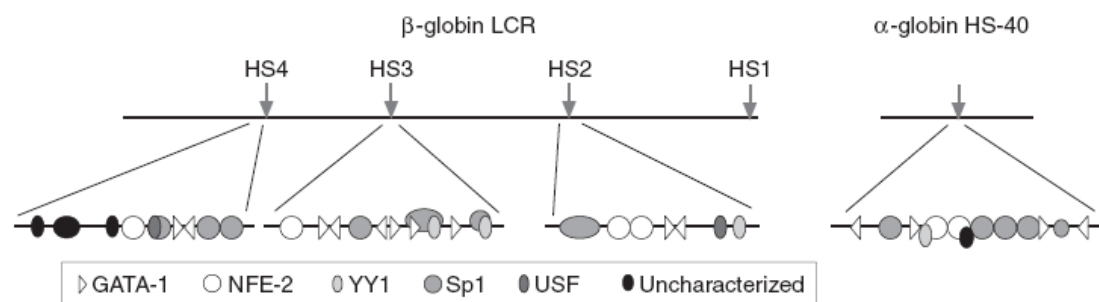


Από τις υπερευαίσθητες θέσεις HS της περιοχής LCR η πιο απομακρυσμένη (HS5) δεν εμφανίζει ιστοειδικότητα. Αντίθετα, οι αλληλουχίες HS1-4 παρουσιάζονται έντονα ερυθροειδικές παρ' ότι οι HS2 και HS4 έχουν βρεθεί και σε μη ερυθροποιητικές κυτταρικές σειρές.³¹ Η μέγιστη έκφραση του γονιδίου της β-σφαιρίνης προϋποθέτει ότι αυτό συνδέεται με μία αλληλουχία που περιλαμβάνει ολόκληρη την περιοχή LCR. Παραταύτα, όταν κάθε μία από τις θέσεις HS απομονωθεί ως αλληλουχία 1-3 kb και επανενωθούν σχηματίζοντας μία mini-LCR κατασκευή, τότε μπορούν να παραχθούν και πάλι υψηλά επίπεδα β-σφαιρίνης.^{32,33,34} Όταν όμως κάθε θέση HS ελέγχεται ανεξάρτητα για την ικανότητά της να ελέγξει την μεταγραφή του γονιδίου της β-σφαιρίνης, η πιο έντονη έκφραση προέρχεται από την χρήση της αλληλουχίας HS2 που θεωρείται και κλασικός ενισχυτής.^{35,36,37,38}

Η ενεργότητα των θέσεων HS εντοπίζεται ως επί το πλείστον σε μία κεντρική αλληλουχία (core region/sequence) 200-400bp. Η αλληλουχία αυτών των θέσεων έδειξε την ύπαρξη πολλαπλών σημείων πρόσδεσης ερυθροειδικών και μη ερυθροειδικών μεταγραφικών παραγόντων (**Εικόνα 9**). Η αλληλουχία HS2 περιέχει διπλές περιοχές πρόσδεσης των ερυθροειδικών παραγόντων NF-E2 και GATA-1 όπως και περιοχές αναγνώρισης των μη ιστοειδικών μεταγραφικών παραγόντων USF και YY1, μαζί με πλούσιες σε νουκλεοτίδια-G περιοχές, οι οποίες μπορούν να προσδένουν Sp1 ή κάποιον σχετικό μεταγραφικό παράγοντα.^{39,40,41}

Η αλληλουχία HS3 περιέχει διπλές αλληλουχίες αναγνώρισης του μεταγραφικού παράγοντα GATA-1 που περικλείονται από περιοχές πλούσιες σε νουκλεοτίδια-G.⁴² Επίσης, ο EKLF φαίνεται πως είναι ένας σημαντικός μεταγραφικός παράγοντας που προσδένεται στις πλούσιες σε νουκλεοτίδια-G περιοχές.⁴³ Αντίθετα με την HS2, η παρουσία ενός και μόνο αντιγράφου της αλληλουχίας HS3 μπορεί να ενεργοποιήσει την έκφραση του γονιδίου της β-σφαιρίνης αναδεικνύοντας την ικανότητα “ανοίγματος” της χρωματίνης από την αλληλουχία HS3.⁴⁴

Η περιοχή HS4 περιέχει αλληλουχίες πρόσδεσης των ερυθροειδικών μεταγραφικών παραγόντων GATA-1 και NF-E2 και επιπλέον έναν αριθμό μη ιστοειδικών μεταγραφικών παραγόντων όπως τους: Sp1, J-BP και TEF-2.^{45,46} Και σε αυτή την περίπτωση έχει γίνει εμφανές ότι η παρουσία των σημείων πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων GATA-1 και NF-E2 είναι σημαντική για τη δράση της αλληλουχίας HS4.⁴⁷



Εικόνα 9. Αναλυτική παράθεση των μεταγραφικών παραγόντων που προσδένονται στις υπερευαίσθητες θέσεις 2-4 (HS2-4) της LCR της ανθρώπινης β-σφαιρίνης και της αλληλουχίας HS40 της ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου της ανθρώπινης α-σφαιρίνης. (Από: Weatherall 1981)

Αντίστοιχα, στον γονιδιακό τόπο της α-σφαιρίνης η χαρτογράφηση της περιοχής ανέδειξε την ύπαρξη πέντε (5) θέσεων HS οι οποίες βρίσκονται 4, 8, 10, 33 και 40 kb ανοδικά του γονιδίου της ζ-σφαιρίνης (HS4,8,10,33,40). Ο έλεγχος αυτών των αλληλουχιών ως προς την ικανότητά τους να ενισχύσουν την μεταγραφή του γονιδίου της α-σφαιρίνης έδειξε πως μόνο η αλληλουχία HS40 είναι ενεργή αναδεικνύοντάς τη ως τη μείζονα ρυθμιστική αλληλουχία του γονιδιακού τόπου της α-σφαιρίνης.⁴⁸ Η δομή της αλληλουχίας HS40 μοιάζει σημαντικά με εκείνη της αλληλουχίας HS2 της περιοχής LCR της β-σφαιρίνης.⁴⁹ Μία κεντρική αλληλουχία 350bp διατηρεί την μεγαλύτερη ενεργότητα και περιέχει δύο σημεία πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων NF-E2 και GATA-1 καθώς και αρκετά μοτίβα CACCC και σημεία πρόσδεσης του YY1 (**Εικόνα 9**).⁵⁰

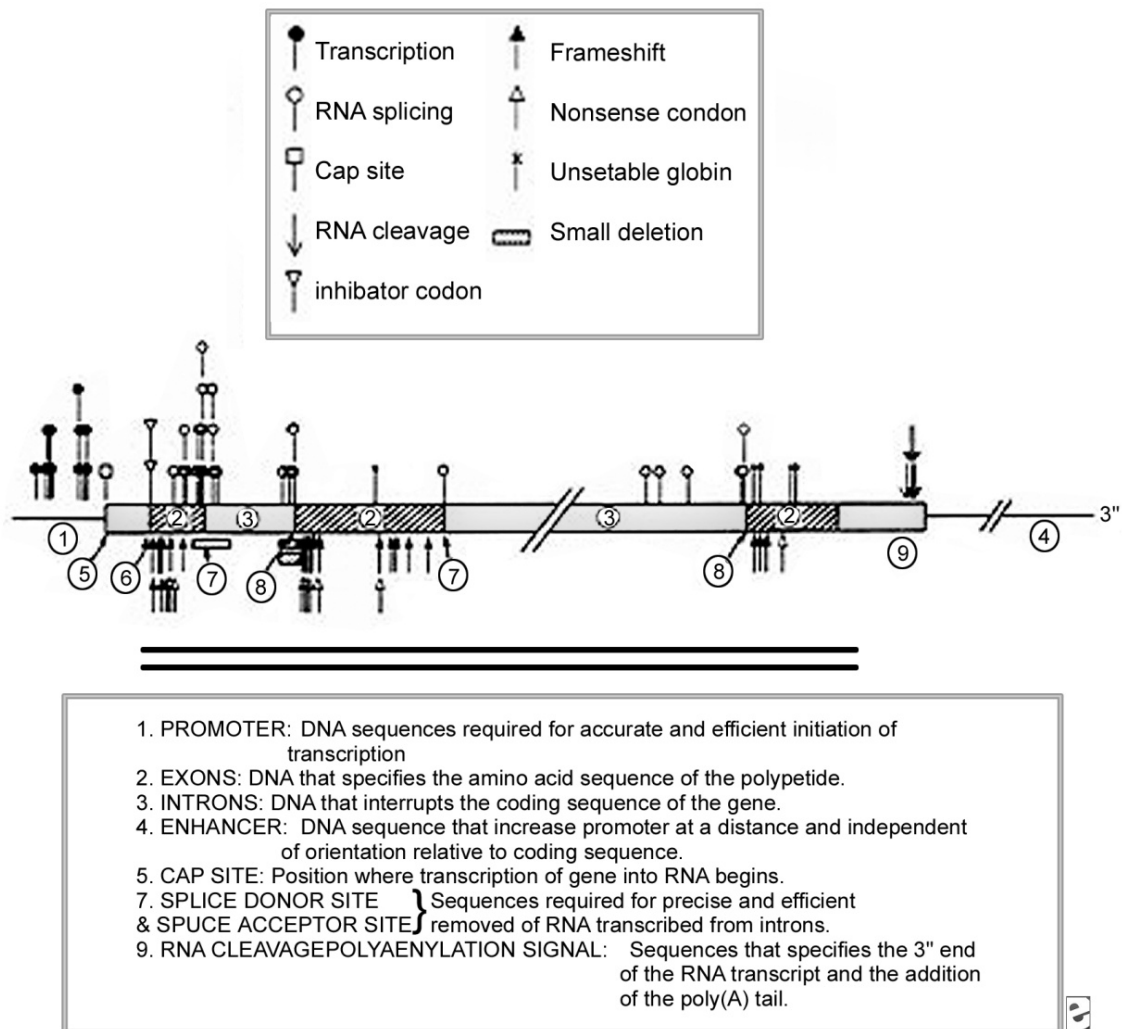
4. β-Θαλασσαιμίες

i. Μοριακή Βάση

Οι β-θαλασσαιμίες αποτελούν τις συχνότερες μονογονιδιακές διαταραχές παγκοσμίως.^{51,52,53} Υπάρχουν δύο κύριες μορφές της β-θαλασσαιμίας: η β⁰-θαλασσαιμία, στην οποία δεν παράγεται καθόλου β-σφαιρίνη και η β⁺-θαλασσαιμία, κατά την οποία παράγεται μία ποσότητα β-σφαιρίνης η οποία όμως είναι μικρότερη του φυσιολογικού. Λιγότερο σοβαρές μορφές της β-θαλασσαιμίας με ήπια μείωση της παραγωγής β-σφαιρίνης συνήθως αναφέρονται ως β⁺⁺. Το κυριότερο διαγνωστικό χαρακτηριστικό της β-θαλασσαιμίας, που συναντάται τόσο στη β⁰- όσο και στη β⁺-θαλασσαιμία, είναι τα αυξημένα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης HbA₂. Υπάρχουν όμως και λιγότερο συχνές μορφές β-θαλασσαιμίας στις οποίες τα επίπεδα της HbA₂ είναι φυσιολογικά και οφείλονται σε συνυπάρχουσες μεταλλάξεις του γονιδίου της δ-σφαιρίνης.

Έως σήμερα έχουν χαρακτηριστεί σχεδόν 200 μεταλλαγμένα αλληλόμορφα που οδηγούν σε β-θαλασσαιμία. Σε αντίθεση με τις α-θαλασσαιμίες, η πλειονότητα των β-θαλασσαιμιών προκαλούνται από σημειακές μεταλλάξεις εντός των γονιδίων της β-σφαιρίνης ή των παρακείμενων ρυθμιστικών αλληλουχιών (**Εικόνα 10**). Λίγες μεταλλαγές έχουν γίνει γνωστές που είναι υπεύθυνες για τις β-θαλασσαιμίες και

εντοπίζονται ανεξάρτητα από τον γονιδιακό τόπο της β-σφαιρίνης, οι οποίες όμως αφορούν σε trans-δρώντες ρυθμιστικούς παράγοντες ή σε ελλείψεις γενετικού υλικού.



Εικόνα 10. Σημειακές μεταλλαγές που εντοπίζονται στο γονίδιο της β-σφαιρίνης ή στις παρακείμενες αλληλουχίες και είναι υπεύθυνες για την ανάπτυξη β-Θαλασσαιμίας. (Από: eMedicine Specialties, Thalassemia, Hassan M Yaish, MD)

Συνολικά έχουν περιγραφεί δεκατέσσερις (14) ελλείψεις που αφορούν αποκλειστικά στο γονίδιο της β-σφαιρίνης και είναι υπεύθυνες για την ανάπτυξη β-θαλασσαιμίας. Το εύρος τους ποικίλει από 290 ζεύγη βάσεων έως και περισσότερα

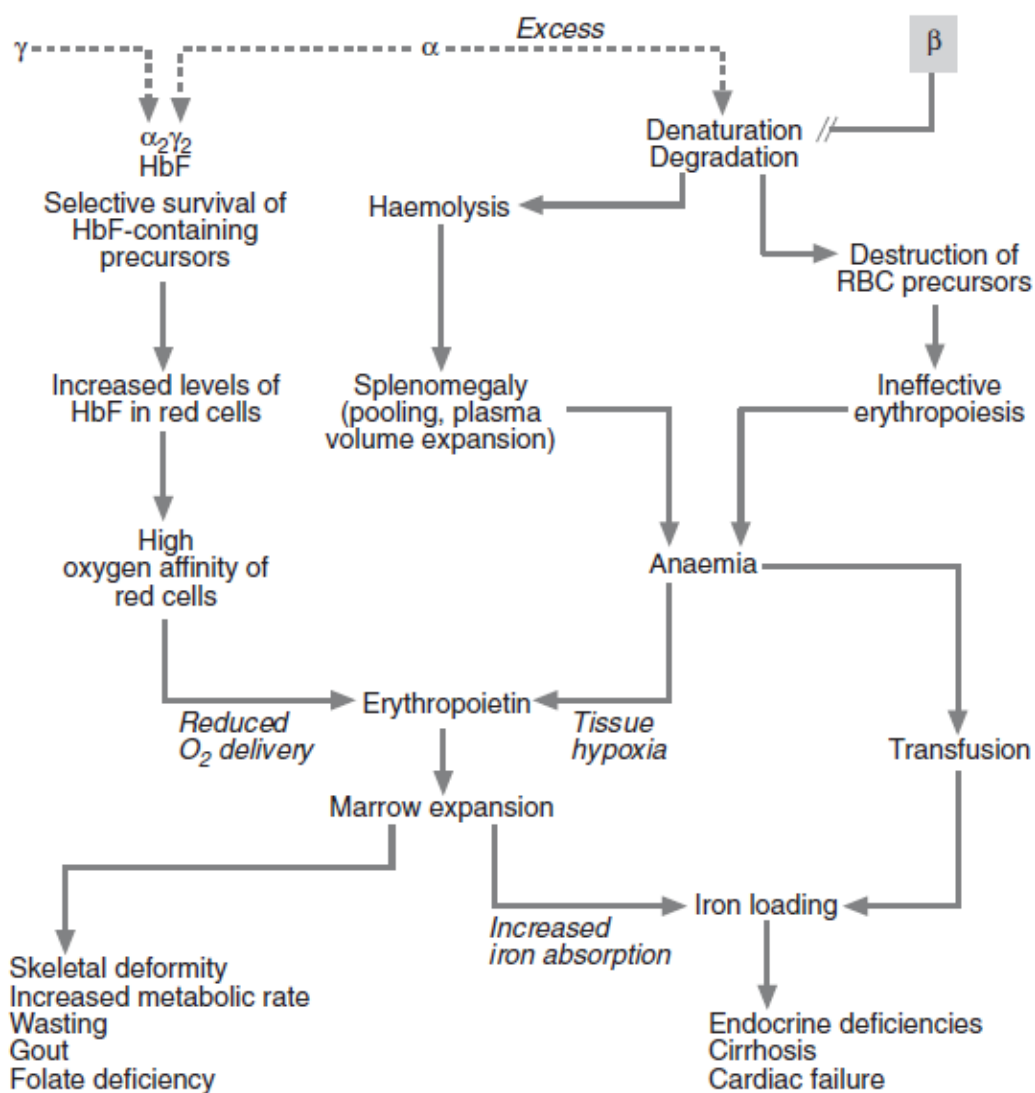
από 60 χιλιάδες ζεύγη βάσεων. Η πλειονότητα των μεταλλαγών όμως, που οδηγούν στην ανάπτυξη β-θαλασσαιμιών δεν αφορούν σε ελλείψεις. Συνήθως προκαλούνται από σημειακές μεταλλαγές, μικρές ενθέσεις και μεταθέσεις εντός του γονιδιακού τόπου της β-σφαιρίνης ή τις άμεσα παρακείμενες αλληλουχίες.

Οι μεταλλαγές αυτές αφορούν σε όλα τα στάδια ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Ειδικότερα, (1) η μεταγραφή επηρεάζεται από ελλείψεις, ενθέσεις και σημειακές αλλαγές στον υποκινητή αλλά και στην 5' αμετάφραστη περιοχή (UTR). (2) Η ωρίμανση του mRNA επηρεάζεται από μεταλλαγές στα φυσιολογικά σημεία συρραφής (splice sites) και από τη δημιουργία νέων σημείων συρραφής τόσο στα εσώνια όσο και στα εξώνια. Επίσης, επηρεάζεται και από την ένθεση αλληλουχιών αδενίνης δημιουργώντας νέα σημεία πολυαδενυλίωσης (PolyA) καθώς και από μεταλλαγές στην 3' αμετάφραστη περιοχή (UTR). (3) Η μετάφραση επηρεάζεται από μεταλλαγές στην αλληλουχία έναρξης, από τη δημιουργία κωδικονίων λήξης της μετάφρασης (STOP codons) καθώς και από μεταλλαγές που αλλάζουν το πλαίσιο ανάγνωσης (frameshift). (4) Τέλος, υπάρχουν μεταλλαγές που επηρεάζουν σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο οδηγώντας στη δημιουργία ασταθών αλυσίδων β-σφαιρίνης.

ii. Παθοφυσιολογία

Η παθοφυσιολογία μίας τόσο σοβαρής νόσου όπως, η β-θαλασσαιμία έχει μελετηθεί εκτενώς και είναι πλέον καλά κατανοητή. Το βασικό χαρακτηριστικό είναι η μειωμένη παραγωγή των β-αλυσίδων της σφαιρίνης. Αυτό οδηγεί σε ανισόροπη σύνθεση αλυσίδων αιμοσφαιρίνης και τη δημιουργία περίσσειας των α-αλυσίδων της σφαιρίνης. Αν και η σύνθεση της εμβρυϊκής HbF αιμοσφαιρίνης διατηρείται μετά τη γέννηση σε ένα βαθμό που ποικίλει μεταξύ των διαφορετικής βαρύτητας μορφών της β-θαλασσαιμίας, το συνολικά της επίπεδα δεν επαρκούν για να αντισταθμίσουν την έλλειψη της αιμοσφαιρίνης HbA. Πρακτικά, τα επίπεδα των γ- και β-αλυσίδων δεν είναι ποτέ αντίστοιχα εκείνων των α-αλυσίδων, οπότε, η περίσσεια των α-αλυσίδων αποτελεί το χαρακτηριστικό γνώρισμα της β-θαλασσαιμίας. Οι α-αλυσίδες που παραμένουν ασύνδετες κατακρημνίζονται στους πρόδρομους ερυθροβλάστες στο μυελό των οστών καθώς επίσης και στους απογόνους τους στο περιφερικό αίμα,

οδηγώντας σε μη-αποδοτική ωρίμανση των ερυθροβλαστών και μη-αποδοτική ερυθροποίηση. Αντίστοιχα, όταν γίνει βλάβη στη μεμβράνη του ώριμου ερυθροκυττάρου αυτό εμφανίζει μειωμένο χρόνο ζωής και οδηγείται σε καταστροφή και κατά συνέπεια σε ελαττωματική κυκλοφορία του αίματος. Η αναιμία που προκαλείται οδηγεί στον έντονο πολλαπλασιασμό του μυελού των οστών ο οποίος όμως αδυνατεί να παράγει λειτουργικά ερυθροκύτταρα και ως επακόλουθο, στην διόγκωσή του. Το γεγονός αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία σκελετικών παραμορφώσεων καθώς επίσης και μίας πληθώρας αναπτυξιακών και μεταβολικών ανωμαλιών. Η αναιμία μπορεί να επιδεινωθεί περαιτέρω με την εμφάνιση αιμοαραιώσης που προκαλείται από τη λίμναση μεγάλων ποσοτήτων αίματος στο σπλήνα. Η υπερπλασία του μυελού των οστών οδηγεί στην αύξηση των αναγκών για σίδηρο που με τη σειρά της προκαλεί αύξηση της απορρόφησης αλλά και του φορτίου σιδήρου, που συχνά επιδεινώνεται από την ανάγκη για τακτικές μεταγγίσεις αίματος. Οι τακτικές μεταγγίσεις αίματος με τη σειρά τους, οδηγούν σε προοδευτική εναπόθεση σιδήρου στους ιστούς (αιμοσιδήρωση), βλάβες οργάνων (ήπαρ , καρδιά κ.α.), και αν δε μειωθούν εγκαίρως μπορούν να οδηγήσουν σε πολυοργανικές ανεπάρκειες και να αποτελέσουν αιτία θανάτου (**Εικόνα 11**).



Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση της παθοφυσιολογίας των β-Θαλασσαιμιών.
(Από: Weatherall 1981)

5. Δευτερογενή χαρακτηριστικά της β-θαλασσαιμίας

i. Σπληνομεγαλία

Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά του σπλήνα είναι ότι λειτουργεί ως φίλτρο του αίματος κρατώντας τα ελαττωματικά ερυθροκύτταρα αλλά και κάθε “ξένο” σωματίδιο σε ένα στρώμα φαγοκυττάρων.⁵⁴ Η δίοδος από το σπλήνα ενός μεγάλου αριθμού ελαττωματικών ερυθροκυττάρων όπως αυτά που παράγονται στην β-θαλασσαιμία οδηγεί, προοδευτικά, στην διόγκωσή του. Απόδειξη για το μηχανισμό αυτό αποτελεί και η παρατήρηση ασθενών με β-θαλασσαιμία που έχουν ξεκινήσει μεταγίσεις από τα πρώτα χρόνια της ζωής τους, έχουν μικρό αριθμό ελαττωματικών ερυθροκυττάρων στην κυκλοφορία, και δεν ανέπτυξαν σημαντική σπληνομεγαλία. Πέραν όμως της υπερλειτουργίας του σπλήνα στην προσπάθειά του να αποβάλει από την κυκλοφορία τα μη λειτουργικά ερυθροκύτταρα, η σπληνομεγαλία εμφανίζεται επίσης και λόγω αυξημένης αιμοποίησης. Καθώς ο μυελός των οστών ασθενών με β-θαλασσαιμία αδυνατεί να παράγει επαρκή επίπεδα λειτουργικών ερυθροκυττάρων δίνεται η εντολή να αυξηθεί η εξωμυελική αιμοποίηση και ο σπλήνας υπερλειτουργεί σαν ερυθροποιητικό όργανο και κατά συνέπεια διογκώνεται.

Το συνολικό ποσοστό των ερυθροκυττάρων που παγιδεύεται στο σπλήνα αφορούν στο 9-40% του συνολικού όγκου των ερυθροκυττάρων.⁵⁵ Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με ένα ακόμα χαρακτηριστικό των θαλασσαιμιών που είναι η επέκταση του όγκου του πλάσματος (συνδέεται τόσο με τη σπληνομεγαλία όσο και με την επέκταση του μυελού των οστών) έχει σαν αποτέλεσμα την αιμοαραίωση που επιδεινώνει την αναιμία ενώ φορτώνει με περισσότερο έργο την καρδιακή λειτουργία.

ii. Σπληνεκτομή

Η σπληνεκτομή εφαρμόζεται σε ασθενείς με μείζονα β-θαλασσαιμία και αποτελεί μία θεραπευτική παρέμβαση που εφαρμόζεται σχεδόν από τότε που περιγράφηκε η νόσος.⁵⁶ Τα αποτελέσματα της επέμβασης όμως μέχρι σήμερα δεν επιβεβαιώνουν πάντα την ευεργετική της δράση στην εξέλιξη της θαλασσαιμίας. Η σπληνεκτομή φαίνεται να είναι ευεργετική σε ένα ποσοστό ασθενών με β-θαλασσαιμία που εμφανίζουν αυξημένες απαιτήσεις για μετάγγιση.^{57,58,59} Οι μελέτες

που το υποστηρίζουν αυτό έχουν διενεργηθεί σε κέντρα που υπάρχει η δυνατότητα να διατηρούνται οι ασθενείς με επαρκή επίπεδα αιμοσφαιρίνης. Την ίδια στιγμή υπάρχει και η δυνατότητα να διαχειριστούν οι τυχόν επιπλοκές που μπορεί να εμφανιστούν. Σε περίπτωση που αυτό δεν είναι εφικτό και ειδικότερα όταν η σπληνεκτομή εφαρμοστεί σε ασθενείς που δεν υποβάλλονται συχνά σε μεταγγίσεις, το αποτέλεσμα της σπληνεκτομής είναι πολύ λιγότερο ικανοποιητικό.

iii. Υπερφόρτωση σιδήρου – Αιμοσιδήρωση

Η γενικευμένη υπερφόρτωση των οργάνων με σίδηρο έχει αναγνωρισθεί ως μία επιπλοκή των θαλασσαιμιών εδώ και πολλά χρόνια.^{60,61,62,63,64} Η περίσσεια του σιδήρου προέρχεται τόσο από αυξημένη απορρόφηση του στοιχείου από το έντερο (1^η περίπτωση) όσο και από τις μεταγγίσεις (2^η περίπτωση). Ανάλογα με το αν ένας ασθενής έχει υποβληθεί σε λίγες ή σε πολλές μεταγγίσεις, αντίστοιχα, κυριαρχεί η πρώτη ή η δεύτερη περίπτωση. Η ροή του σιδήρου στον ανθρώπινο οργανισμό βρίσκεται φυσιολογικά σε ισορροπία με περίπου 0.5% της ολικής ποσότητας σιδήρου να απορροφάται και να αποβάλλεται καθημερινά. Από τη στιγμή που ο ρυθμός έκκρισης του σιδήρου δεν μπορεί να μεταβληθεί από τον ανθρώπινο οργανισμό, η ισορροπία αυτή καθορίζεται από τον έλεγχο της απορρόφησης. Οι δύο κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό της απορρόφησης του σιδήρου από το έντερο είναι η ποσότητα του σιδήρου στις αποθήκες του οργανισμού (αντικατοπτρίζεται κατά κύριο λόγο στα επίπεδα της φερριτίνης στον ορό) αλλά και η ερυθροποιητική ενεργότητα.

Λαμβάνοντας τα παραπάνω υπόψιν γίνεται αντιληπτό ότι στην περίπτωση ασθενών με θαλασσαιμία οι οποίοι χρήζουν μεταγγίσεων, οι μεταγγίσεις οδηγούν σε συσσώρευση σιδήρου στον οργανισμό την περίσσεια του οποίου δεν υπάρχει κάποιος φυσιολογικός μηχανισμός που θα αποβάλλει. Αντίθετα, στην περίπτωση ασθενών με θαλασσαιμία οι οποίοι δεν έχουν την ανάγκη τακτικών μεταγγίσεων, τα αυξημένα επίπεδα σιδήρου που απορροφώνται από το έντερο οφείλονται στην αυξημένη αλλά μη-αποδοτική ερυθροποίηση που ενεργοποιείται προκειμένου να καλυφθεί η μεγάλη απαίτηση από τον οργανισμό για παραγωγή ώριμων ερυθροκυττάρων.

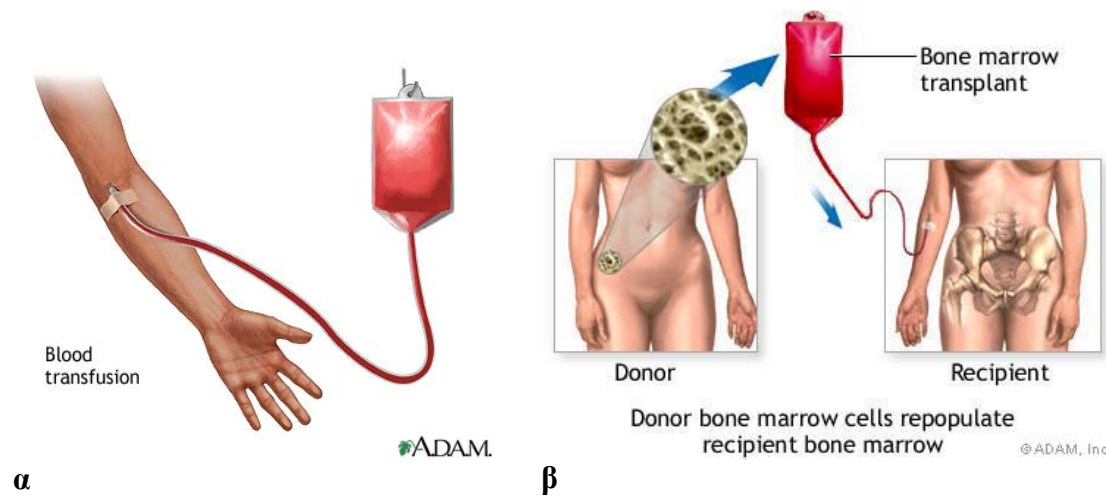
iv. Χηλική θεραπεία σιδήρου

Η ανεξέλεγκτη συσσώρευση σιδήρου σε ασθενείς με μείζονα μορφή β-θαλασσαιμίας εξαιτίας των τακτικών μεταγγίσεων θα οδηγούσε σε θάνατο μέσα στις δύο πρώτες δεκαετίες της ζωής χωρίς τη χρήση χηλικής θεραπείας σιδήρου. Η κυριότερη θεραπεία για την υπερφόρτωση του οργανισμού με σίδηρο αφορά στη χρησιμοποίηση δεφεροξαμίνης (desferrioxamine-DF). Το μόριο αυτό ήταν διαθέσιμο για τη χηλική θεραπεία από το τέλος της δεκαετίας του 1970 και χορηγείται παρεντερικά. Η δεφεροξαμίνη είναι μέλος της τάξης των υδροξαμικών οξέων και εμφανίζει μεγάλη συγγένεια για το σίδηρο. Τα σύμπλοκα της δεφεροξαμίνης με το σίδηρο καθίστανται ανενεργά και αποβάλλονται μέσω των νεφρών. Η χρήση της δεφεροξαμίνης έχειδειχθεί ότι μειώνει τις παρενέργειες της νόσου και επεκτείνει το προσδόκιμο ζωής των ασθενών. Στα χρόνια που ακολούθησαν την ανακάλυψη της δεφεροξαμίνης έχουν αναπτυχθεί και χηλικές ενώσεις που χορηγούνται δια της στοματικής οδού όπως: το deferiprone και το deferasirox τα οποία, όμως, χρησιμοποιούνται πολλές φορές σε συνδυασμό με τη δεφεροξαμίνη.

6. Θεραπευτικές Προσεγγίσεις των β-Θαλασσαιμιών

i. Συμβατικές Θεραπείες

Σήμερα η β-θαλασσαιμία αντιμετωπίζεται είτε με συχνές μεταγγίσεις αίματος ή θεραπεύεται με αλλογενή μεταμόσχευση μυελού των οστών (**Εικόνα 12**). Στην πρώτη περίπτωση, οι ασθενείς μεταγγίζονται σε τακτά χρονικά διαστήματα και για όλη τους τη ζωή, προκειμένου να επιτυγχάνουν ικανή μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς. Σε κλινικό επίπεδο, αυτό επιτυγχάνεται με συντήρηση της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης σε επίπεδα άνω των 8gr/dl. Οι τακτικές μεταγγίσεις δημιουργούν όμως υπερφόρτωση σιδήρου (αιμοσιδήρωση) στον ασθενή γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή οργάνων όπως το ήπαρ και η καρδιά που θέτουν σε κίνδυνο τη ζωή του ασθενούς.^{65,66} Γι' αυτό το λόγο, όπως ήδη αναφέρθηκε, έχουν αναπτυχθεί και εξελίσσονται διαρκώς μέθοδοι αποσιδήρωσης των ασθενών κάτι που έχει αυξήσει σημαντικά το προσδόκιμο επιβίωσής τους.



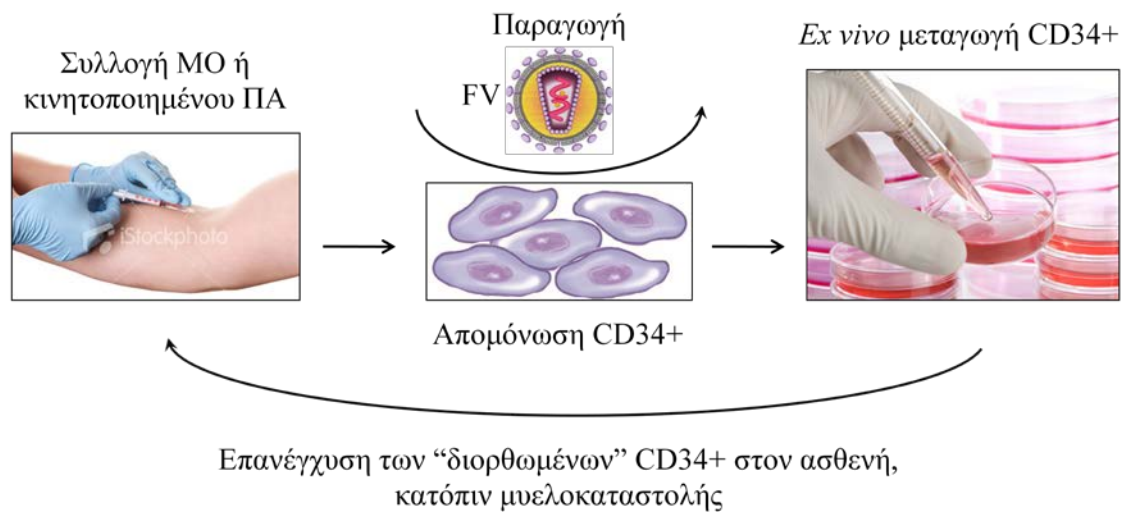
Εικόνα 12. Διαθέσιμες θεραπευτικές επιλογές για την αντιμετώπιση της β-Θαλασσαιμίας. (α) Μετάγγιση αίματος, (β) Αλλογενής μεταμόσχευση μυελού των οστών. (Από: A.D.A.M.)

Η αλλογενής μεταμόσχευση μυελού των οστών πραγματοποιείται μία φορά στην ζωή του ασθενούς και εφόσον είναι επιτυχημένη μπορεί να διορθώσει την ερυθροποίηση αποτελώντας ουσιαστικά την μοναδική διαθέσιμη θεραπεία της β-θαλασσαιμίας. Όμως ούτε η αλλογενής μεταμόσχευση μυελού των οστών είναι απαλλαγμένη από προβλήματα καθώς η πραγματοποίησή της και μόνο απαιτεί την εύρεση ενός πλήρως συμβατού δότη, η πιθανότητα εύρεσης του οποίου δεν ξεπερνά το 30% εντός του συγγενικού του περιβάλλοντος. Η εφαρμογή της αλλογενούς μεταμόσχευσης μυελού των οστών (MMO) έστω και από συμβατό δότη μπορεί επίσης να συνοδεύεται από ανοσολογικές επιπλοκές όπως, η ασθένεια μοσχεύματος εναντίον ξενιστή (Graft versus Host Disease - GvHD) ή τελικά να οδηγήσει σε απόρριψη του μοσχεύματος. Αν η ανεύρεση συμβατού συγγενή δότη, δεν είναι εφικτή, η μεταμόσχευση μυελού των οστών από μη συγγενικό δότη έχει κίνδυνο ανοσολογικών επιπλοκών και ενδεχομένως μη αναστρέψιμων παθολογικών επιπλοκών που μπορούν να οδηγήσουν στο θάνατο.^{67,68,69}

ii. Γονιδιακή Θεραπεία

Μία τρίτη στρατηγική, δυνητικά θεραπευτική είναι η γονιδιακή επιδιόρθωση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων του ασθενούς (AAK). Τα AAK αποτελούν τον πιο ελκυστικό και καλά μελετημένο κυτταρικό στόχο για γονιδιακή θεραπεία. Τα κύτταρα αυτά (1) χαρακτηρίζονται ως πολυδύναμα γιατί έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε όλους τους τύπους αιμοποιητικών και λεμφικών κυττάρων και (2) εμφανίζουν εξαιρετικά μεγάλη αναγεννητική ικανότητα.^{70,71} Τα χαρακτηριστικά τους αυτά εξασφαλίζουν ότι η μεταφορά του γονιδίου επιλογής που θα γίνει κατά τη γονιδιακή θεραπεία σε ένα αρχικά μικρό πληθυσμό αρχέγονων κυττάρων θα οδηγήσει σε έκφραση και γενετική διόρθωση ενός ολόκληρου ιστού. Ακόμα, τα χαρακτηριστικά τους αυτά και ο παρατεταμένος χρόνος ζωής τους μειώνουν την ανάγκη επαναλαμβανόμενων κύκλων γονιδιακής θεραπείας η οποία μπορεί να εφαρμοσθεί μία μόνο φορά και να έχει εφ' όρου ζωής επίδραση στον ασθενή. Η απομόνωσή των AAK είναι απλή και μπορεί να γίνει από το μυελό των οστών και το περιφερικό αίμα ενώ στη συνέχεια μπορούν εύκολα να επαναχορηγηθούν στον ασθενή μέσω των μεθόδων αυτόλογης μεταμόσχευσης που εφαρμόζονται.

Η λογική που διέπει την προσέγγιση της γονιδιακής θεραπείας είναι απλή στη σύλληψη και αφορά στην ενσωμάτωση ενός φυσιολογικού γονιδίου β- ή γ-σφαιρίνης στο γονιδίωμα των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (**Εικόνα 13**). Τα κύτταρα αυτά θα δώσουν γένεση στο αιμοποιητικό σύστημα του ασθενούς το οποίο πλέον θα εκφράζει ικανά επίπεδα β- ή γ-σφαιρίνης και κατά συνέπεια HbA ή HbF αντίστοιχα. Προκειμένου η γονιδιακή μεταφορά ενός φυσιολογικού γονιδίου β-σφαιρίνης στα AAK να έχει θεραπευτική ικανότητα πρέπει να πληρούνται αρκετές συνθήκες. Αυτές αφορούν (α) στη μεταμόσχευση ενός ικανού αριθμού γενετικά διορθωμένων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, (β) στη ρύθμιση της έκφρασης των διαγονιδίων με τρόπο αντίστοιχο των ενδογενών γονιδίων των σφαιρινών, (γ) στην σταθερή έκφραση θεραπευτικών επιπέδων β-σφαιρίνης αλλά και (δ) στην ασφαλή έκφραση του γονιδίου χωρίς επιδράσεις από τα σημεία ενσωμάτωσης των ιϊκών σωματιδίων.⁷²



Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση του πλάνου εφαρμογής της γονιδιακής θεραπείας στον άνθρωπο.

7. Γονιδιακή Θεραπεία της β-Θαλασσαιμίας

ι. Ιστορική αναδρομή της έρευνας στη γονιδιακή θεραπεία της β-θαλασσαιμίας

Η μεταφορά των γονιδίων της β- ή γ-σφαιρίνης στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα αρχικά δοκιμάστηκε με ρετροϊκούς φορείς. Οι ρετροϊοί ξεχωρίζουν ως φορείς γονιδιακής μεταφοράς γιατί σε αντίθεση με άλλα ιογενή συστήματα μεταφοράς, ενσωματώνονται στο γενετικό υλικό του κυττάρου-ξενιστή. Επιπλέον, το μικρό σχετικά γονιδιώμά τους έκανε εφικτή τη λειτουργική χαρτογράφηση της βιολογίας τους και την ανάπτυξη φορέων πολύ νωρίτερα από τα άλλα ιογενή συστήματα. Η πρώτη απόπειρα πειραματικής γονιδιακής θεραπείας της β-θαλασσαιμίας άρχισε πριν από 20 χρόνια με τη χρήση των ρετροϊών ως φορέων των γονιδίων των σφαιρινών. Οι πρώτοι ρετροϊκοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τύπου MLV (Murine Leukemia Virus).^{73,74} Από τις πρώτες εφαρμογές αυτής της τεχνολογίας εμφανίστηκαν τα προβλήματα που συνοδεύουν τη χρήση των MLV στη μεταφορά γονιδίων σε αρχέγονα κύτταρα. Οι ρετροϊοί τύπου MLV μολύνουν

αποκλειστικά κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε φάση αναδιπλασιασμού προκειμένου να διαπεράσουν την πυρηνική μεμβράνη και να μπορέσουν να ενσωματωθούν στο γονιδίωμά τους.⁷⁵ Στην γονιδιακή θεραπεία ο πρωτεύων κυτταρικός πληθυσμός στόχος, αυτός των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, βρίσκεται σε φάση ηρεμίας (quiescence). Οπότε, είναι προφανές ότι η χρήση των ιικών φορέων τύπου MLV αντιμετώπισε ένα πολύ σημαντικό εμπόδιο. Επίσης, ένα άλλο πρόβλημα που συναντάται στους φορείς τύπου MLV είναι η σίγηση της γονιδιακής έκφρασης του διαγονιδίου που ενσωματώνουν. Η αιτία της μεταγραφικής σίγησης έχει αποδοθεί στη *de novo* μεθυλίωση των κυτοσινών των αλληλουχιών CpG και κατ' επέκταση στην απακετυλίωση των ιστονών που οδηγεί στην συμπύκνωση της χρωματίνης.^{76,77} Ωστόσο, πλήθος από μελέτες έχουν δείξει ότι δεν απαιτείται μεθυλίωση για την επίτευξη της σίγησης στα κύτταρα των θηλαστικών⁷⁸ αλλά δρα ως δευτερογενές βήμα στο μονοπάτι της μεταγραφικής σίγησης των ρετροϊκών φορέων.^{79,80,81,76}

Για το λόγο αυτό, δοκιμάστηκαν νέοι φορείς βασισμένοι στους λεντοϊούς και τους αφροϊούς. Το πεδίο της γονιδιακής θεραπείας γνώρισε ραγδαία ανάπτυξη με την εισαγωγή των νέων ρετροϊκών φορέων. Οι πιο καλά μελετημένοι από αυτούς, οι λεντοϊοί, είναι οι πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενοι ιικοί φορείς σήμερα. Την ίδια στιγμή σε πιο πρώιμο στάδιο βρίσκεται η χρήση της ομάδας των αφροϊκών φορέων (FV ή spuma).^{82,83}

Η χρήση των λεντοϊών ως φορείς έχει βρει ευρεία εφαρμογή εξαιτίας (i) της ικανότητάς τους να επιμολύνουν μη διαιρούμενα κύτταρα, (ii) των υψηλών τίτλων τους και (iii) της σταθερής έκφρασης των διαγονιδίων.⁸⁴ Το σημαντικότερο ίσως μειονέκτημα των λεντοϊικών φορέων είναι η προέλευσή τους από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV). Παρότι οι σημερινοί φορείς είναι πολλαπλά απενεργοποιημένοι και θεωρούνται ασφαλείς, κανείς δεν μπορεί να αποκλείσει την πιθανότητα ανασυνδυασμών που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην παραγωγή μολυσματικού αναπαραγόμενου ιού HIV.

Οι ρετροϊκοί φορείς αρχικά εμφάνισαν περιορισμούς σε θέματα τίτλου, σταθερότητας και έκφρασης της β-σφαιρίνης. Παρόλα αυτά οι αρχικές μελέτες προσέφεραν πολύτιμες γνώσεις για την επίτευξη υψηλής και ρυθμιζόμενης έκφρασης των γονιδίων των σφαιρινών. Οι αρχικές μελέτες έδειξαν ότι για την αποδοτική έκφραση των γονιδίων των σφαιρινών απαιτείται η παρουσία εκτενών τμημάτων της ρυθμιστικής περιοχής LCR, καθώς η ενσωμάτωση των ελάχιστων αλληλουχιών των υπερευαίσθητων θέσεων HS της LCR είχαν ως αποτέλεσμα φορείς με χαμηλούς

τίτλους και χαμηλή έκφραση του διαγονιδίου η οποία επίσης ήταν εξαρτώμενη από τη θέση ένθεσης του φορέα στο γονιδίωμα του ξενιστή. Ακόμα, διαπιστώθηκε ότι θα πρέπει να ελεγχθούν οι αλληλουχίες της LCR που θα χρησιμοποιηθούν καθώς βρέθηκε ότι υπάρχει παρεμβολή μεταξύ εκείνων των αλληλουχιών και των ιικών τελικών επαναλήψεων (LTR) κατά τη μεταγραφική ρύθμιση. Το γεγονός αυτό οδηγούσε στην ασταθή μεταφορά των προϊόντων και την δημιουργία φορέων ευπαθών στον ανασυνδυασμό αλληλουχιών. Επιπροσθέτως, βρέθηκε ότι προκειμένου η έκφραση του διαγονιδίου να μην επηρεάζεται από την μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος θα πρέπει η εισαγωγή του διαγονιδίου στο φορέα να πραγματοποιείται σε αντίθετο προσανατολισμό σε σχέση με τη φορά μεταγραφής του ιού. Τέλος, διαπιστώθηκε πως προκειμένου να εκφραστεί το γονίδιο της β-σφαιρίνης είναι απαραίτητη η παρουσία των εσώνίων του, οπότε η χρήση μόνο της κωδικής αλληλουχίας του cDNA δεν οδηγεί σε έκφραση του γονιδίου.⁸⁵ Αρκετές τροποποιήσεις οδήγησαν στην αποτελεσματικότερη έκφραση του γονιδίου της β-σφαιρίνης μεταξύ των οποίων η έλλειψη αλληλουχιών από το εσώνιο 2 του γονιδίου της β-σφαιρίνης η οποία επιτρέπει την σταθερότερη μεταφορά και έκφραση του γονιδίου από τους ρετροϊικούς φορείς και η χρήση καταλληλότερων ρυθμιστικών περιοχών.

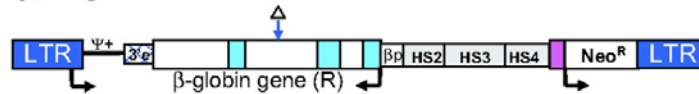
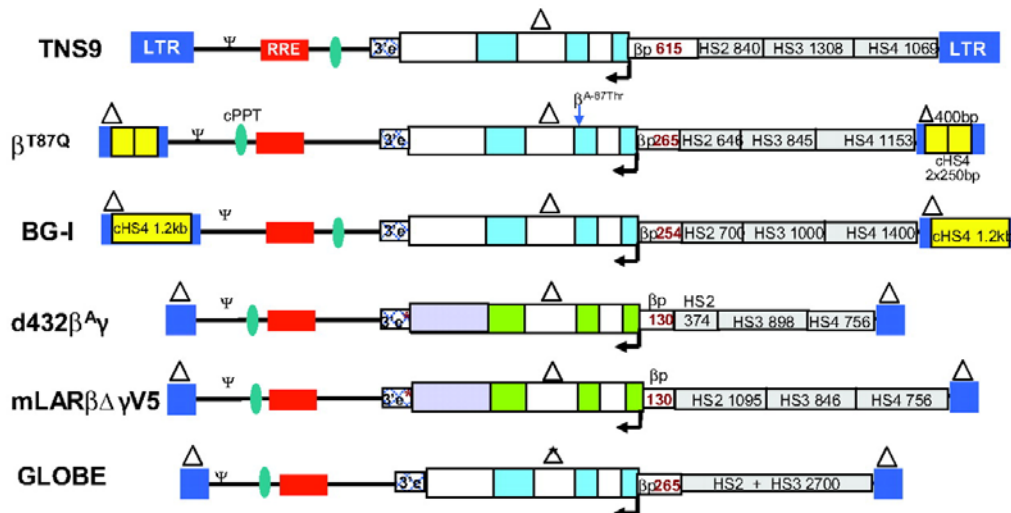
ii. Περιοχές της LCR στη γονιδιακή θεραπεία της β-θαλασσαιμίας

Οι πρώτες προσπάθειες που έγιναν προκειμένου να επιτευχθεί η παραγωγή της ανθρώπινης β-σφαιρίνης από έναν ιικό φορέα δεν γνώρισαν την προσδοκώμενη επιτυχία. Αυτό οφειλόταν στο γεγονός ότι αρχικά για την έκφραση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης χρησιμοποιήθηκαν μόνο το β-γονίδιο με τον υποκινητή του χωρίς ρυθμιστικές περιοχές.^{86,87,88} Οι Grosveld et al (1987) ήταν οι πρώτοι που διαπίστωσαν την σημασία της περιοχής που εντοπίζεται 20 kb ανοδικά του γονιδίου της ε-σφαιρίνης (που τότε ακόμη δεν είχε γίνει γνωστή ως LCR) στην έκφραση υψηλών επιπέδων ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε πειραματικό μοντέλο διαγονιδιακών ποντικών.²¹ Η περιοχή αυτή των 20 kb μπορεί να ελαττωθεί έως και σε 2.5 kb και να συνεχίζει να ρυθμίζει αποδοτικά την υψηλή έκφραση του γονιδίου της β-σφαιρίνης.^{33,34}

Η ανακάλυψη των διαφορετικών υπερευαίσθητων θέσεων HS της περιοχής LCR σήμανε και την ανάπτυξη της έρευνας στην έκφραση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε διαγονιδιακά ποντίκια ή ερυθροποιητικές κυτταρικές σειρές.^{36,38,89,90} Η αλληλουχία HS2 αποτέλεσε την πιο εκτενώς μελετημένη αλληλουχία καθώς φάνηκε γρήγορα ότι μπορεί να ενισχύσει σημαντικά την έκφραση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης.^{91,92} Για όλες τις θέσεις HS βρέθηκε γρήγορα ότι η δράση τους σε μεγάλο βαθμό οφείλεται σε μικρές κεντρικές αλληλουχίες DNA.^{33,35,36,38,41,46,93,94} Ο συνδυασμός των μικρών κεντρικών αλληλουχιών των θέσεων HS2-4 σε μία αλληλουχία συνολικού μήκους ~1kb (μLCR) οδήγησε στη δημιουργία των πρώτων ιικών φορέων που είχαν υψηλό τίτλο, γενομική σταθερότητα και ταυτόχρονα υψηλή έκφραση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης στη λευχαιμική κυτταρική σειρά ποντικού (Mouse Erythro Leukemia - MEL).⁹⁵

Μερικά χρόνια αργότερα, σε μία από τις σημαντικότερες μελέτες σε αυτό το πεδίο από τους May et al (2000) προσδιορίστηκαν οι ελάχιστες αλληλουχίες των περιοχών HS2, HS3 και HS4 που όταν συνδυαστούν έχουν την δυνατότητα να οδηγήσουν στην παραγωγή των υψηλότερων επιπέδων ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε θαλασσαιμικό μοντέλο ποντικών.⁹⁶ Οι αλληλουχίες αυτές αθροιστικά υπολογίζονται σε τμήματα μήκους ~3.2 kb έναντι ~1 kb που είχαν χρησιμοποιηθεί έως τότε.

Την ίδια στιγμή και μετά το χαρακτηρισμό του σημαντικότερου ρυθμιστικού στοιχείου της ανθρώπινης α-σφαιρίνης (HS40) άρχισε να διερευνάται η χρήση του στην έκφραση των γονιδίων των σφαιρινών. Αρχικά,δείχθηκε ότι η αλληλουχία HS40 είναι ικανή να εκφράσει το γονίδιο της ανθρώπινης γ-σφαιρίνης ελλείψει άλλης ρυθμιστικής περιοχής, ενώ αργότερα έγινε γνωστό ότι δρα σε συνεργασία με τον υποκινητή της ανθρώπινης β-σφαιρίνης προκειμένου να παράγει σταθερά και σε υψηλά επίπεδα ανθρώπινη γ-σφαιρίνη.^{97,98}

A. A prototypic globin retroviral vector**B. Globin lentivirus vectors**

Εικόνα 14. (Α) Πρωτότυπη κατασκευή ενός γάμμα-ρετροϊκού φορέα που φέρει το γονίδιο της β-σφαιρίνης και μικρές κεντρικές αλληλουχίες της περιοχής LCR. Το γονίδιο της β-σφαιρίνης τοποθετείται σε αντίθετο προσανατολισμό στο ρετροϊκό φορέα για να αποτραπεί η απομάκρυνση (splicing) των εσωνίων στο ιικό γενομικό RNA κατά την δημιουργία του ιού. Το βέλος δείχνει την κατεύθυνση της μεταγραφής. (Β) Ρετροϊκοί φορείς που εκφράζουν β- ή γ-σφαιρίνη και κατασκευάστηκαν από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες. Ο φορέας TNS9 βασίζεται στη δημοσίευση των May et al. (2000) και ενσωματώνει το γονίδιο της ανθρώπινης β-σφαιρίνης. Ο φορέας β^{A87Q} ενσωματώνει ένα γονίδιο β-σφαιρίνης που φέρει μία μετάλλαξη στο 87^ο κωδικόνιο η οποία του προσδίδει ιδιότητες ενάντια στη δρεπανοκυτταρική αναιμία.⁹⁹ Ο φορέας αυτός χρησιμοποιήθηκε στην πρώτη κλινική μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη Γαλλία. Οι υπόλοιποι φορείς εμφάνισαν καινοτομίες όπως: η χρήση των αλληλουχιών μονωτών cHS4 (BG-I), η ενσωμάτωση ρυθμιστικών περιοχών της 3' αμετάφραστης περιοχής (d432β^{Aγ}), η χρήση εκτενέστερων αλληλουχιών της ρυθμιστικής περιοχής LCR (mLARβΔγV5) και τέλος η δημιουργία μεγαλύτερων ελλείψεων στο εσώνιο 3 του γονιδίου της β-σφαιρίνης και η χρήση μόνο των αλληλουχιών HS2 και HS3 από την ρυθμιστική περιοχή LCR (GLOBE). (Από: Arumugam 2010)

Στην παρούσα μελέτη προτιμήθηκε η χρήση της αλληλουχίας HS40 της ανθρώπινης α-σφαιρίνης καθώς (1) είναι ιδιαίτερα μικρή σε μέγεθος, μόλις 350 bp, και υποθέσαμε ότι θα επηρέαζε κατά το δυνατόν λιγότερο τη σταθερότητα του ιϊκού φορέα, (2) μπορεί, αποδεδειγμένα, να συνεργαστεί με τον υποκινητή της ανθρώπινης β-σφαιρίνης προκειμένου να ρυθμίσει αποδοτικά την έκφραση του γονιδίου της γ-σφαιρίνης και (3) σε συνδυασμό με ρυθμιστικές περιοχές από τα γονίδια των α- και β-σφαιρινών, που φυσιολογικά εμφανίζουν ισχυρή έκφραση στους ενήλικες, μπορεί να οδηγήσει σε προσθετική δράση τους και κατά συνέπεια σε πιο αποδοτική έκφραση. Σε αυτό το φορέα δοκιμάστηκε και η χρήση της αλληλουχίας cHS4 που είναι γνωστό ότι μπορεί να δράσει ως αλληλουχία μονωτής, εξασφαλίζοντας έκφραση του διαγονιδίου ανεξάρτητη από το σημείο ενσωμάτωσης του ιϊκού φορέα, προκειμένου να ελεγχθεί η επίδρασή του στην έκφραση του γονιδίου της β-σφαιρίνης. Συγχρόνως, κατασκευάστηκε και ένας φορέας που θα αποτελέσει το μέτρο σύγκρισης της αποδοτικότητας της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης από τη ρυθμιστική αλληλουχία HS40. Ο φορέας αυτός φέρει τις αλληλουχίες HS2 και HS3 της περιοχής LCR της β-σφαιρίνης, στη θέση της HS40, που όπως έχει γίνει γνωστό είναι οι ελάχιστες αλληλουχίες που μπορούν να ενσωματωθούν σε ιϊκούς φορείς επηρεάζοντας κατά το δυνατόν λιγότερο τον τίτλο και τη σταθερότητά του. Επίσης έχει δειχθεί, ότι οι αλληλουχίες HS2 και HS3 έχουν τη δυνατότητα να εκφράζουν αποδοτικά το γονίδιο της ανθρώπινης β-σφαιρίνης τόσο στο περιβάλλον του ποντικίου όσο και του ανθρώπου.

8. Αφροϊοί (Spumaretroviridae)

Οι Αφροϊοί (Foamy Virus - FV) ή ιοί Spuma, αποτελούν ένα από τα επτά γένη των ρετροϊών (*Retroviridae*). Οι τρεις κύριοι τύποι ρετροϊών είναι οι ογκοϊοί, όπως ο ιός της λευχαιμίας του ποντικίου (murine leukemia virus - MLV), οι λεντοϊοί, όπως ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (human immunodeficiency virus - HIV) και οι αφροϊοί (FV). Οι αφροϊοί εμφανίζουν ξεχωριστή μορφολογία, σχηματίζουν τα σωματίδια κατά κύριο λόγο στο ενδοπλασματικό δίκτυο αλλά και δευτερευόντως στην κυτταροπλασματική μεμβράνη ενώ τα ιϊκά σωματίδια μπορούν να φέρουν είτε DNA ή RNA ως γενομικό υλικό. Τα ιϊκά σωματίδια χαρακτηρίζονται από έναν

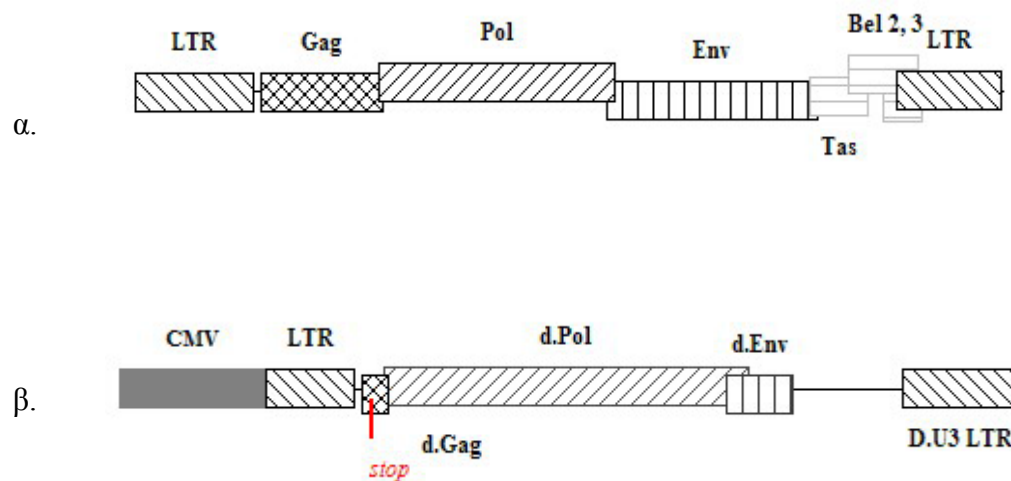
πυρήνα που φαίνεται ανώριμος και φωτεινός στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ενώ στην επιφάνειά τους φέρουν διακριτές ακίδες γλυκοπρωτεϊνικής φύσεως. Από την ανακάλυψή τους σε μία καλλιέργεια ανθρώπινων κυττάρων το 1971, οι αφροϊοί έχουν ενοχοποιηθεί για ποικίλες ανθρώπινες παθολογικές καταστάσεις, χωρίς όμως σαφή στοιχεία. Αξίζει να σημειωθεί ότι, σε προσωπικό ζωολογικού κήπου που είχε μολυνθεί με αφροϊούς, μετά από επαφή με ζώα φορείς του ιού, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση με ανάπτυξη κάποιας γνωστής ασθένειας ύστερα από ιατρική παρακολούθηση 20 και πλέον ετών. Το μοναδικό αυτό χαρακτηριστικό, της έλλειψης παθογένειας, ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας των ρετροϊών έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον για την ανάπτυξη φορέων που βασίζονται σε αφροϊούς για εφαρμογές γονιδιακής μεταφοράς και θεραπείας.

i. Το γονιδίωμα των αφροϊών

Οι αφροϊοί θεωρούνται πολύπλοκοι ρετροϊοί καθώς το γονιδίωμά τους κωδικοποιεί βοηθητικές ιικές πρωτεΐνες οι οποίες όμως δεν περιέχονται τελικώς στα ιικά σωματίδια. Το πρότυπο γονιδίωμα των αφροϊών το οποίο στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται συχνά ως ανθρώπινος αφροϊός, φαίνεται στην εικόνα **15(α)**. Το γονιδίωμα των αφροϊών κωδικοποιεί τα κοινά γονίδια των ρετροϊών, *gag*, *pol* και *env*, καθώς επίσης και τα γονίδια *bel1* ή *tas* και *bel2,3* ή *bet* τα οποία μεταγράφονται από διαφορετικές μεταγραφικές μονάδες και είναι μοναδικά για τους αφροϊούς. Παρόλο που έχουν προταθεί διάφορες πιθανές λειτουργίες του για το γονίδιο *bet*, ο ρόλος του *in vivo* παραμένει άγνωστος. Αυτό το οποίο έχει γίνει γνωστό είναι ότι η ύπαρξή του δεν είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό του ιού *in vitro*, σε κυτταροκαλλιέργειες. Σε αντίθεση, το γονίδιο *tas* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη η οποία λειτουργεί ως trans-ενεργοποιητής του υποκινητή που εδράζεται στην μακρά επαναλαμβανόμενη τελική αλληλουχία (long terminal repeat - LTR) του ιού. Απουσία της πρωτεΐνης *Tas* ο υποκινητής που εδράζεται στην περιοχή LTR παραμένει μεταγραφικά ανενεργός. Εκτός του υποκινητή στην περιοχή LTR, οι αφροϊοί περιέχουν ένα δεύτερο υποκινητή ο οποίος χαρακτηρίζεται εσωτερικός υποκινητής (internal promoter - IP) διότι εντοπίζεται εντός της αλληλουχίας του γονιδίου *env*. Ο υποκινητής IP ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων *tas* και *bet*, αλλά σε αντίθεση με τον επαγόμενο υποκινητή του LTR εμφανίζει μικρή αλλά σταθερή μεταγραφική

ενεργότητα. Ο υποκινητής IP trans-ενεργοποιείται και αυτός από την πρωτεΐνη Tas, με ένα τρόπο παρόμοιο με εκείνο που ισχύει στην περίπτωση του υποκινητή της περιοχής LTR αλλά σε σημαντικά μικρότερο βαθμό. Μελέτες που έγιναν σε επιμολυσμένους ινοβλάστες έχουν δείξει ότι νωρίς κατά την επιμόλυνση, ο υποκινητής IP ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων *tas* και *bet*. Μόλις τα mRNA τους μεταφραστούν και συντεθεί η πρωτεΐνη Tas, αρχίζει η μαζική μεταγραφή από την περιοχή LTR του ιού, δημιουργώντας συσσώρευση των mRNA των *gag*, *pol* και *env* και τελικώς την παραγωγή νέων ιϊκών σωματιδίων.

Τα δομικά γονίδια των αφοιτών *foamy* έχουν κάποια χαρακτηριστικά τα οποία είναι ξεχωριστά για αυτό το γένος. Η πολυπεπτιδική αλυσίδα που κωδικοποιεί το γονίδιο *Gag* δεν υπόκειται στις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις που θα παράγουν τις ώριμες πρωτεϊνικές μορφές που συναντώνται στους άλλους ρετροϊούς, παραμένοντας σε ανώριμη κατάσταση. Επίσης η πρόδρομη μορφή της πρωτεΐνης Pol τεμαχίζεται μερικώς από πρωτεάσες του ιού με αποτέλεσμα η περιοχή της ιντεγκράσης να διαχωρίζεται αλλά τα τμήματα της πρωτεάσης και αντίστροφης μεταγραφάσης να διατηρούνται στο ίδιο μόριο. Στην περίπτωση της πρωτεΐνης *Env*, ο διαχωρισμός των επιφανειακών και διαμεμβρανικών περιοχών γίνεται όπως και στους υπόλοιπους ρετροϊούς. Ωστόσο, η πρωτεΐνη *Env* περιέχει ένα σήμα εντοπισμού στο ενδοπλασματικό δίκτυο το οποίο συνεισφέρει στον προσδιορισμό του σημείου σχηματισμού και εκβλάστησης των ιϊκών σωματιδίων (*budding*).



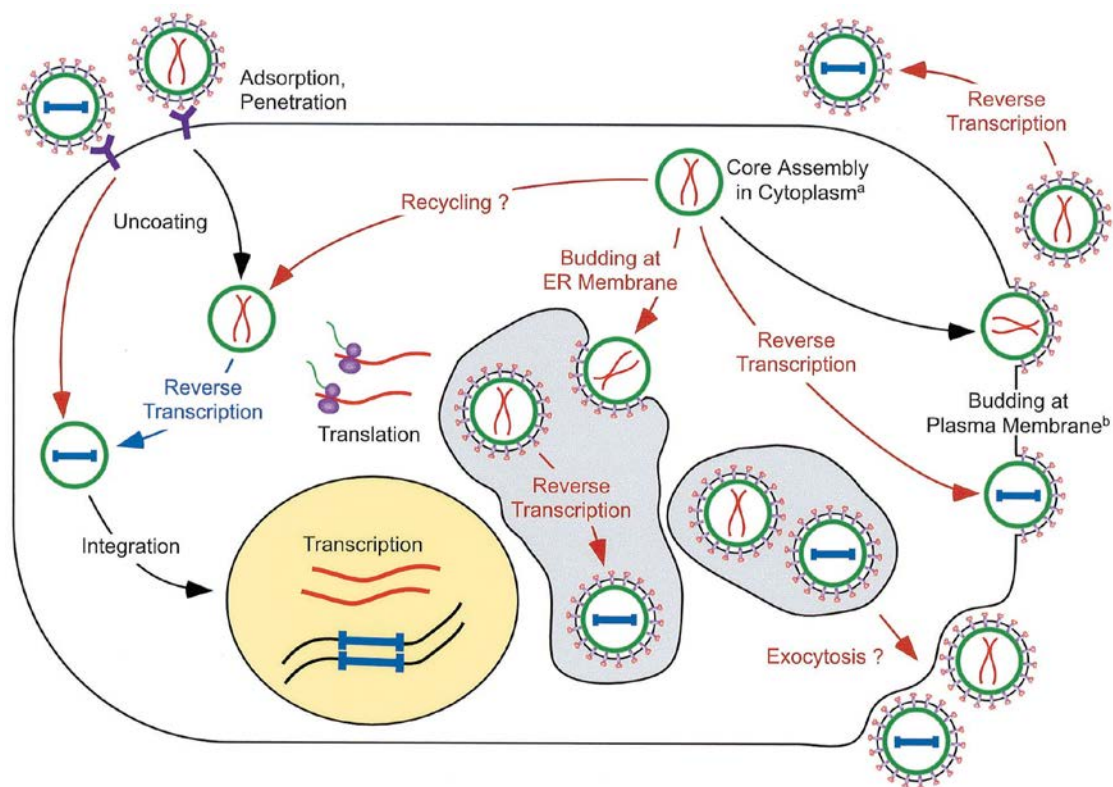
Εικόνα 15 (α) Το γονιδίωμα του αφροϊού με τις αλληλουχίες LTR και τα ιϊκά γονίδια Gag, Pol, Env, Tas και Bel2,3. **(β)**. Η βασική δομή των αφροϊκών φορέων. Έχουν διατηρηθεί οι ελάχιστες cis-ενεργές περιοχές, τμήματα των γονιδίων Gag, Pol και Env ενώ η U3 LTR φέρει μία μεγάλη έλλειψη και η U5 LTR είναι συντηγμένη με τον υποκινητή του CMV.

ii. Ιϊκός κύκλος ζωής

Ο πολλαπλασιασμός των αφροϊών διαφέρει από εκείνον που εμφανίζουν οι συμβατικοί ρετροϊοί όπως, οι ογκοϊοί αλλά και οι λεντοϊοί, σε σημαντικό βαθμό. Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι ο πολλαπλασιασμός των αφροϊών μοιάζει περισσότερο με εκείνο των ιών που ανήκουν σε μία άλλη οικογένεια στην οποία μεσολαβεί το στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής, τους *Hepadnaviridae*, παρά των ρετροϊών. Μία σύντομη περιγραφή του κύκλου ζωής των αφροϊών δίνεται στην εικόνα 16. Η αντίστροφη μεταγραφή λαμβάνει χώρα και στο μολυσμένο κύτταρο πριν εξελιχθεί το ιϊκό σωματίδιο, γεγονός που οδηγεί στο σχηματισμό ιϊκών σωματιδίων τα οποία περιέχουν συχνότερα DNA παρά RNA ως γενομικό υλικό. Οι προσπάθειες που έχουν γίνει για να κατηγοριοποιηθούν τους αφροϊούς είτε ως ιούς DNA ή RNA έχουν αποδειχθεί προβληματικές.

Κατά τη διάρκεια της ιϊκής ωρίμανσης, η τομή της πρωτεΐνης Gag από τις ιϊκές πρωτεάσες είναι ατελής. Κατά συνέπεια, τα ώριμα ιϊκά σωματίδια δεν περιέχουν πρωτεΐνες καψιδίου και νουκλεοκαψιδίου αλλά στη θέση τους υπάρχουν δύο μεγάλοι

μήκους πρωτεΐνες Gag οι οποίες διαφέρουν κατά 4 kDa στο καρβοξυτελικό άκρο. Τα ιικά σωματίδια απελευθερώνονται από το κύτταρο κυρίως μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου, κάτι το οποίο δεν γίνεται απουσία της πρωτεΐνης Env (Εικόνα 16). Ο κυτταρικός υποδοχέας που επιτρέπει τη σύνδεση των αφοοίων στην κυτταρική μεμβράνη δεν έχει γίνει γνωστός αλλά θα πρέπει να είναι πολύ διαδεδομένος, από τη στιγμή που οι αφοοιοί εμφανίζουν πολύ ευρύ τροπισμό.



Εικόνα 16. Σύντομη περιγραφή του κύκλου ζωή των αφοοίων. Κάποια από τα μοναδικά χαρακτηριστικά του πολλαπλασιασμού των αφοοίων εμφανίζονται με κόκκινα γράμματα και βέλη ενώ τα κοινά χαρακτηριστικά με τους υπόλοιπους συμβατικούς ρετροϊούς, όπως ο HIV, εμφανίζονται με μαύρα γράμματα και βέλη. (Από: Meiering 2001)

iii. Τροπισμός των αφοϊών *in vitro*

Οι αφοϊοί *in vitro*, μπορούν να επιμολύνουν τους περισσότερους κυτταρικούς τύπους από ένα εύρος διαφορετικών ειδών. Ωστόσο, το αποτέλεσμα της επιμόλυνσης μπορεί να διαφέρει σημαντικά ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Η χαρακτηριστική εικόνα των κυττάρων πολλών διαφορετικών τύπων μετά από επιμόλυνση είναι που τους έδωσε αυτό το όνομα (Αφοϊοί). Τα επιμολυσμένα κύτταρα υπόκεινται σε ταχύ σχηματισμό συγκυτίων, κυτταροπλασματικών κενотоπίων και τέλος, σε κυτταρικό θάνατο. Οι κυτταρικές σειρές ινοβλαστών είναι ιδιαίτερα ευπαθείς στις κυτταροπαθολογικές αυτές επιδράσεις. Σε αντίθεση, η χρόνια μόλυνση είναι πιθανή για έναν αριθμό κυτταρικών σειρών *in vitro*. Η χρόνια μόλυνση *in vitro* έχει ως αποτέλεσμα την συνεχή παραγωγή ιικών σωματιδίων χωρίς εμφανή κυτταρικό θάνατο αλλά σε σύγκριση με την κυτταροπαθολογική μόλυνση παράγει σημαντικά μικρότερο ιικό τίτλο. Οι παράγοντες εκείνοι που καθορίζουν εάν ο αφοϊός θα εμφανίσει λυτικό κύκλο ζωής παρά μία χρόνια επιμόλυνση *in vitro*, είτε αυτοί αφορούν στους ιούς ή στα κύτταρα ξενιστές, δεν έχουν γίνει γνωστοί.

iv. Αφοϊικοί φορείς (FV)

Η ανάπτυξη αφοϊικών φορέων αξιοποιεί τις ιδιαιτερότητες και τα πλεονεκτήματα των αφοϊών foamy. Αυτά περιλαμβάνουν την έλλειψη παθογένειας, το μεγαλύτερο γονιδίωμα μεταξύ των ρετροϊών ($\geq 13\text{kb}$), την επιμόλυνση κυττάρων από πολλά είδη σπονδυλωτών και ποικίλους τύπους ιστών καθώς επίσης και το γεγονός ότι τα ιικά σωματίδια είναι αρκετά σταθερά για να συγκεντρωθούν μέσω υπερφυγοκέντρωσης και δεν απενεργοποιούνται από τον ανθρώπινο ορό καθιστώντας εφικτή τη χρήση τους και σε εφαρμογές *in vivo*.^{100,101,102,103} Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι αφοϊικοί φορείς μπορούν να επιμολύνουν αρχέγονα κύτταρα με μεγαλύτερη επιτυχία από ότι οι φορείς που βασίζονται στον ιό MLV (Murine Leukemia Virus).^{83,104} Αυτή τους η ικανότητα βασίζεται στις ιδιαιτερότητες που εμφανίζουν οι αφοϊοί και αφορούν (1) στο ότι συχνά έχουν μεταγράψει το γενετικό υλικό τους πριν την είσοδό τους στο κύτταρο-στόχο αλλά και (2) στο γεγονός ότι οι αφοϊοί πολλές φορές ανιχνεύονται ως επισωματικά στοιχεία γραμμικού ή κυκλικού DNA το οποίο είναι μεταγραφικά ενεργό και μπορούν να πραγματοποιήσουν ολόκληρο τον κύκλο τους χωρίς να ενσωματωθούν στο γενετικό υλικό του ξενιστή

και χωρίς την ανάγκη αναδιπλασιασμού αυτών των κυττάρων.^{105,106,107} Αυτό το χαρακτηριστικό τους δίνει πλεονέκτημα έναντι των άλλων ρετροϊών, στους οποίους θα πρέπει να μεσολαβήσει μεταγραφή σε κυτταρικούς τύπους που ενδεχομένως να μην βρίσκονται σε φάση αναδιπλασιασμού όπως, τα ΑΑΚ.

Το γονιδίωμα του αφροϊκού φορέα φαίνεται στην εικόνα **15(β)**. Ο στόχος είναι η παραγωγή ενός απενεργοποιημένου ιού ο οποίος 1) ενσωματώνει τις ελάχιστες *cis*-ενεργές περιοχές που απαιτούνται για την δημιουργία ιϊκού σωματιδίου, 2) φέρει το διαγονίδιο της επιλογής μας και 3) μεταγράφεται ανεξάρτητα από τον ενδογενή παράγοντα *Tas*. Η δημιουργία ανίκανων προς πολλαπλασιασμό ιϊκών φορέων γίνεται με την αφαίρεση μεγάλων τμημάτων του γονιδιώματος του αφροϊού και κυρίως του γονιδίου *env* και του υποκινητή *bell* και αντικατάστασή τους με γονίδια επιλογής ή αναφοράς. Η διαδικασία ταυτόχρονης διαμόλυνσης των κυττάρων όπου θα σχηματισθούν τα ιϊκά σωματίδια με τον αφροϊκό πλασμιδιακό φορέα που φέρει το διαγονίδιο της επιλογής μας και των πλασμιδιακών φορέων που κωδικοποιούν τα γονίδια *gag*, *pol* και *env* τα οποία έχουμε αφαιρέσει από τον αφροϊκό φορέα θα περιγραφεί στην συνέχεια.

9. Παρεμβολή του RNA (RNA interference - RNAi)

Τα τελευταία χρόνια, η παρεμβολή του RNA (RNA interference - RNAi) έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως ένα πειραματικό εργαλείο για την ανάλυση της λειτουργίας των γονιδίων των θηλαστικών, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Η παρεμβολή του RNA πρόκειται για ένα εξελικτικά διατηρημένο βιολογικό μονοπάτι που ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά στα φυτά και σε κατώτερους οργανισμούς. Ο μηχανισμός της παρεμβολής του RNA αφορά στη κωδικοποίηση δίκλωνων μορίων RNA (dsRNA) τα οποία χρησιμοποιούνται για να προσδεθούν και να επάγουν την αποικοδόμηση των RNA-στόχων, έχοντας ως αποτέλεσμα την καταστολή της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων.

Η παρεμβολή του RNA μπορεί να επαχθεί σε κύτταρα θηλαστικών με την εισαγωγή συνθετικών, δίκλωνων, μικρών, παρεμβατικών RNA (small interfering RNA - siRNA) μήκους 21-23 ζευγών βάσεων (bp) ή μέσω συστημάτων πλασμιδιακών και ιϊκών φορέων που εκφράζουν μικρές, δίκλωνες φουρκέτες RNA

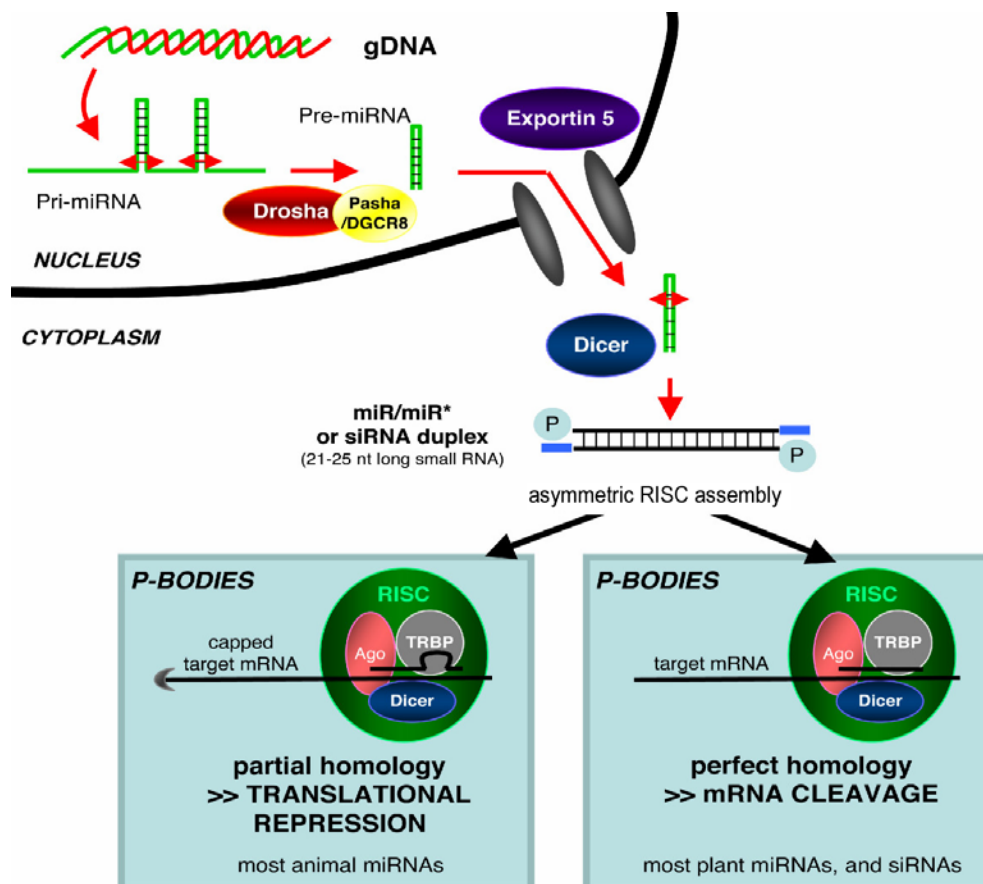
(small hairpin RNA - shRNA) που ακολούθως μετατρέπονται σε siRNA από τους μηχανισμούς του κυττάρου. Η κυτταροειδική στόχευση της έκφρασης των si/shRNA αποτελεί μία σημαντική εξέλιξη, ιδιαιτέρως για την παρεμβολή του RNA σε θεραπευτικές εφαρμογές ως εναλλακτική των συμβατικών θεραπευτικών προσεγγίσεων.¹⁰⁸

Στόχος αυτής της μελέτης είναι εκτός από τον έλεγχο της αποδοτικότητας των φορέων που εκφράζουν το γονίδιο της ανθρώπινης β-σφαιρίνης, η δημιουργία αφοϋικών φορέων οι οποίοι θα εκφράζουν τόσο το γονίδιο της β-σφαιρίνης όσο και μία μικρή φουρκέτα RNA η οποία έχει στόχο το γονίδιο της ανθρώπινης α-σφαιρίνης. Απώτερος σκοπός είναι η συνδυαστική αυτή προσέγγιση να επιφέρει αποδοτικότερη αποκατάσταση της ισορροπίας των αλυσίδων της α- και β-σφαιρίνης, τόσο αυξάνοντας τα επίπεδα της β-σφαιρίνης όσο και μειώνοντας τα επίπεδα της α-σφαιρίνης, επιτυγχάνοντας με αυτόν τον τρόπο την αποφυγή των παθογόνων επιδράσεων της νόσου.

i. Ο μηχανισμός της παρεμβολής του RNA

Η παρεμβολή του RNA παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από βοτανολόγους στα τέλη της δεκαετίας του 1980, αλλά οι μοριακοί μηχανισμοί παρέμειναν ασαφείς έως και τα τέλη της δεκαετίας του 1990, όταν οι μελέτες που έγιναν στον νηματώδη σκώληκα *Caenorhabditis elegans* έδειξαν ότι η παρεμβολή του RNA αποτελεί έναν εξελικτικά διατηρημένο μηχανισμό γονιδιακής σίγησης.^{109,110} Αυτή η, ειδική για την αλληλουχία, μεταμεταγραφική γονιδιακή σίγηση από δίκλωνα τμήματα RNA είναι διατηρημένη σε μία σειρά από οργανισμούς: φυτά, *Neurospora*, *Drosophila*, *C. elegans* και θηλαστικά. Η διαδικασία της παρεμβολής του RNA σχετίζεται με την φυσιολογική άμυνα ενάντια σε ιούς αλλά και στα μεταθετά γενετικά στοιχεία (transposons).¹¹¹ Τα δίκλωνα τμήματα RNA που παράγονται από μεταθετά στοιχεία, ιούς σε φάση πολλαπλασιασμού ή από τα πρόσφατα αναγνωρισμένα, μη κωδικά μικροRNA (microRNA - miRNA) μετατρέπονται μετά από ωρίμανση σε μικρού μήκους δίκλωνα RNA (dsRNA).¹¹² Αυτές οι μικρές αλληλουχίες RNA εκκινούν έναν καταρράκτη βιοχημικών διαδικασιών που περιλαμβάνουν μία πρωτεΐνη που έχει ενεργότητα κυτταροπλασματικής ριβονουκλεάσης III (RNase III-like) γνωστή ως Dicer και το μερικώς χαρακτηρισμένο πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που είναι γνωστό

ως σύμπλοκο σίγησης επαγόμενο από RNA (RNA Induced Silencing Complex - RISC). Η δημιουργία του συμπλόκου RISC οδηγεί, τελικώς, στην αποικοδόμηση ή στην καταστολή της μετάφρασης των mRNA (μεταμεταγραφική ρύθμιση) (**Εικόνα 17**).



Εικόνα 17. Ο μηχανισμός δράσης της παρεμβολής του RNA που περιλαμβάνει την ωρίμανση του δίκλωνου μορίου RNA στον πυρήνα (Drosha), την έξοδο από τον πυρήνα (Exportin 5), την περαιτέρω ωρίμανση του RNA στο κυτταρόπλασμα (Dicer) και την παρεμπόδιση της μετάφρασης του mRNA-στόχου μέσω του συμπλόκου RISC. (Από: Saumet 2006)

Τα miRNA, που συναντώνται φυσιολογικά στον οργανισμό, κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα και μεταγράφονται σε πρόδρομα μόρια RNA. Ένα ένζυμο γνωστό ως Drosha συμμετέχει στην ωρίμανση των μεταγράφων των πρόδρομων miRNA σε

προ-miRNA (pre-miRNA, 70μερές), τα οποία μετέπειτα μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα.¹¹³ Στο κυτταρόπλασμα, το ένζυμο Dicer είναι υπεύθυνο για την τομή των δίκλωνων μορίων (dsRNA), που προέρχονται είτε από ενδογενή μετάγραφα miRNA αλληλουχίες ή μέσω ενσωμάτωσης με ιϊκούς φορείς. Οι δίκλωνες αλληλουχίες RNA που κωδικοποιούνται από ιϊκούς φορείς αφορούν σε τμήματα 19-25 ζευγών βάσεων που εμφανίζουν τη χαρακτηριστική μορφή των τριπλών φουρκετών.¹¹⁴ Τα δίκλωνα μόρια του μικρού παρεμβατικού RNA (siRNA duplex) ενσωματώνονται στο σύμπλοκο RISC, όπου μία ελικάση εξαρτώμενη από το ATP τα ξεμπλέκει, έτσι ώστε είτε η μία ή και οι δύο αλυσίδες να αναγνωρίσουν τα mRNA-στόχους τους.¹¹⁵ Ο βαθμός της συμπληρωματικότητας μεταξύ της αλυσίδας-οδηγού του siRNA και του mRNA-στόχου καθορίζει το μηχανισμό καταστολής της έκφρασης του mRNA. Ο μηχανισμός μπορεί να αφορά είτε σε κατάτμηση του μηνύματος στην περιοχή σύνδεσης των siRNA και mRNA ή στην καταστολή της μετάφρασης.^{116,117} Κατά την siRNA-επαγόμενη σίγηση, τα κατατετμημένα προϊόντα απελευθερώνονται και αποδομούνται, αφήνοντας το μη δεσμευμένο σύμπλοκο RISC να “επιτηρεί” τη δεξαμενή των mRNA.

ii. Ανάπτυξη και χρήση μικρών παρεμβατικών RNA (small interfering RNA - siRNA) και μικρών φουρκετών RNA (small hairpin RNA - shRNA)

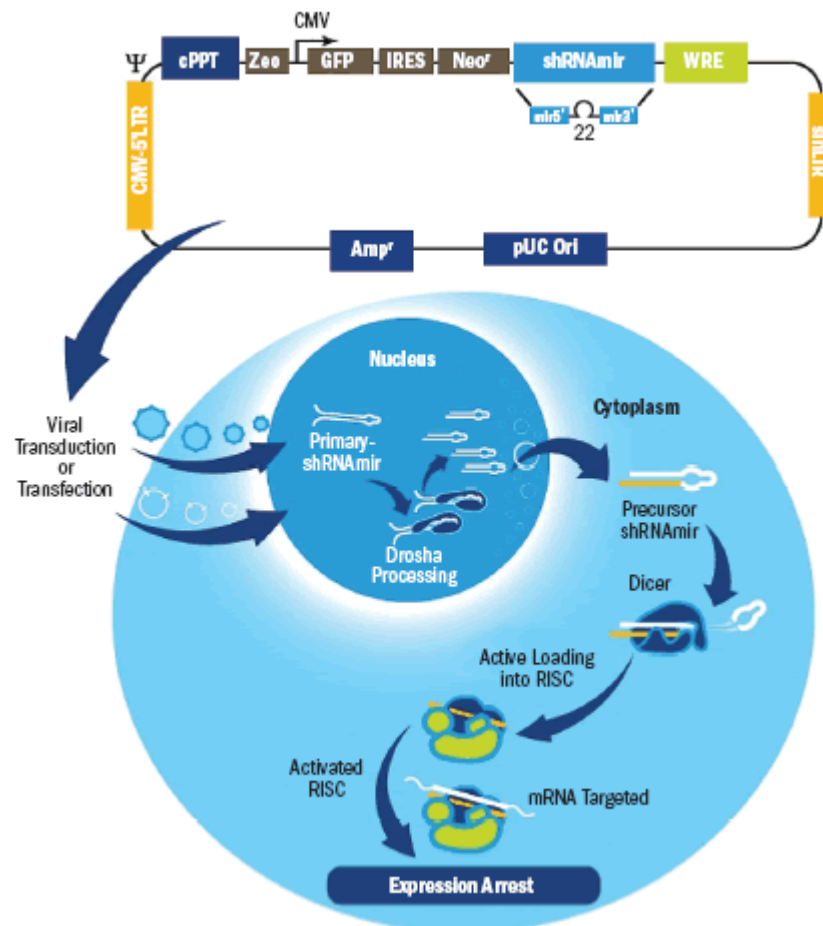
Η ειδική και αποτελεσματική γονιδιακή καταστολή μέσω της παρεμβολής του RNA σε ζωικά μοντέλα *C. elegans* και *D. melanogaster* μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας μεγάλου μήκους (>500bp) δίκλωνα μόρια RNA.¹¹⁸ Στα θηλαστικά αυτό δεν είναι εφικτό. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι δίκλωνα τμήματα RNA μήκους μεγαλύτερου των 30 ζευγών βάσεων ενεργοποιούν το μονοπάτι της ιντερφερόνης (IFN) το οποίο είναι μέρος του συστήματος έμφυτης ανοσίας που ενεργοποιείται μερικώς από δίκλωνα RNA, τα οποία αποτελούν ένα κοινό ενδιάμεσο στάδιο του διπλασιασμού σε ιϊκές μολύνσεις. Γι’ αυτό πρέπει να χρησιμοποιηθούν μικρά παρεμβατικά RNA μεγέθους 21-23 ζευγών βάσεων που δημιουργούνται μέσω χημικής σύνθεσης.^{119,120,121} Αυτά τα μόρια αποφεύγουν την ενεργοποίηση του μηχανισμού απόκρισης στο στρες με το να μιμούνται τα ενδογενή προϊόντα του ενζύμου Dicer. Με αυτό τον τρόπο εισέρχονται στο μονοπάτι της παρεμβολής του RNA απευθείας στο στάδιο του συμπλόκου RISC. Καθώς τα siRNA χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο, η βασική δομή αποδοτικών siRNA έχει

προσδιορίζεται, και αφορά σε ένα διμερές RNA 19 ζευγών βάσεων με μονόκλιωνα τμήματα 2 νουκλεοτιδίων στα 3' άκρα. Έχει επίσης γίνει ξεκάθαρο, ότι η αποδοτικότητα της καταστολής μέσω μικρών παρεμβατικών RNA εξαρτάται από την αλληλουχία, γι' αυτό και έχουν αναπτυχθεί κανόνες για την σχεδίαση των siRNA.¹²² Η τεχνολογία των siRNA έχει επιτυχημένα εφαρμοσθεί σε κυτταρικές σειρές, αρχέγονα κύτταρα καθώς και εμβρυϊκά βλαστικά κυττάρα.^{119,123,124,125,126,127}

Σε αντίθεση με τον *C.elegans* όπου τα αποτελέσματα της παρεμβολής του RNA είναι σταθερά, διαρκούν πολύ και κληρονομούνται στους απογόνους, η γονιδιακή καταστολή που προέρχεται από διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με δίκλιωνα siRNA είναι παροδική.¹²⁸ Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα κύτταρα των θηλαστικών δεν έχουν RNA-εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες που πολλαπλασιάζουν τα siRNA στον *C.elegans*. Επομένως, η γονιδιακή καταστολή εξαρτάται από τον αριθμό των μορίων siRNA που έχουν ενσωματωθεί στα κύτταρα. Η ενεργότητα των siRNA σε κύτταρα θηλαστικών διαρκεί για 3-7 ημέρες όταν τα κύτταρα διαιρούνται αλλά μπορεί να διατηρηθεί για 3 εβδομάδες ή και περισσότερο σε τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα, όπως, οι νευρώνες.¹²⁹ Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, έχουν αναπτυχθεί συστήματα βασισμένα σε φορείς για την εισαγωγή και τη σταθερή έκφραση των siRNA στα κύτταρα-στόχους.¹³⁰ Αυτοί οι φορείς περιλαμβάνουν υποκινητές της RNA πολυμεράσης III που είτε εκφράζουν συμπληρωματικές αλληλουχίες από δύο ξεχωριστούς υποκινητές (διαδοχικό σύστημα) ή εκφράζουν μικρές φουρκέτες RNA (shRNA) που διασπώνται από το Dicer προκειμένου να παράγουν siRNA. Τέτοια συστήματα φορέων έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχημένα για να προσδώσουν αποδοτική και σταθερή καταστολή των γονιδίων στόχων σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών.¹²² Παρότι είναι δύσκολο να προδικάσεις ποιο από αυτά τα δύο συστήματα φορέων θα είναι το πιο αποδοτικό στη καταστολή της γονιδιακής έκφρασης, τα δεδομένα δείχνουν πως το σύστημα των shRNA είναι πιο αποδοτικό από το διαδοχικό σύστημα.¹³¹ Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει επίσης, ότι τα shRNA είναι πιο αποτελεσματικοί ενεργοποιητές της παρεμβολής του RNA απ' ότι τα siRNA.¹³²

Οι περιορισμοί της χρήσης πλασμιδιακών φορέων, από την άποψη της αποδοτικότητας και της δυσκολίας στην διαμόλυνση πρωτογενών κυττάρων έχει οδηγήσει στην δημιουργία ρετροϊκών και αδενοϊκών φορέων για την εισαγωγή των shRNA.^{133,134,135,136} Οι ιϊκοί φορείς επιτρέπουν την αποτελεσματική μεταφορά και σταθερή έκφραση των αλληλουχιών που φέρουν τα shRNA σε ένα μεγάλο εύρος

κυττάρων των θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένων και των αρχέγονων κυττάρων (Εικόνα 18).



Εικόνα 18. Ενσωμάτωση και ρυθμιζόμενη έκφραση μικρών φουρκετών RNA (shRNA) με τη χρήση ρετροϊκών φορέων. Ο μηχανισμός δράσης των shRNA παραμένει ο ίδιος με εκείνο των siRNA και των ενδογενών miRNA. (Από: Thermo Scientific Open Biosystems Lentiviral shRNA^{mir} for Stable and Regulatable RNAi)

10. Παρεμβολή του RNA και η εφαρμογή της στη γονιδιακή θεραπεία της β-θαλασσαιμίας

Η λογική που διέπει τη χρήση μίας συνδυαστικής τεχνικής που θα περιλαμβάνει τόσο την στόχευση της α-σφαιρίνης μέσω του μηχανισμού της παρεμβολής του RNA όσο και την έκφραση ενός λειτουργικού γονιδίου της β-σφαιρίνης αφορά στην προσπάθεια αποκατάστασης της ανισόρροπης παραγωγής που παρατηρείται ανάμεσα σε αυτές τις δύο πρωτεΐνες στην β-θαλασσαιμία. Όπως περιγράφηκε νωρίτερα, η μειωμένη παραγωγή των β-αλυσίδων της σφαιρίνης έχει ως αποτέλεσμα την περίσσεια των α-αλυσίδων της σφαιρίνης οι οποίες και είναι υπεύθυνες για την πρόωμη καταστροφή των πρόδρομων ερυθροκυττάρων. Μία συνδυαστική προσέγγιση σαν και αυτή που περιγράφουμε θα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της β-σφαιρίνης (μέσω της έκφρασης ενός λειτουργικού γονιδίου) αλλά και την ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων της α-σφαιρίνης (μέσω της έκφρασης συμπληρωματικών αλληλουχιών siRNA). Κάτι τέτοιο θα απέφερε ταχύτερη και αποτελεσματικότερη αποκατάσταση της ανισορροπίας των δύο αλυσίδων των σφαιρινών και κατά συνέπεια βελτίωση της μη αποδοτικής ερυθροποίησης και γενικότερα του θαλασσαιμικού φαινοτύπου.

Η πρώτη προσέγγιση που απεδείκνυε την αποδοτικότητα μίας συνεργιστικής προσέγγισης γονιδιακής έκφρασης και γονιδιακής καταστολής στην αντιμετώπιση των θαλασσαιμιών έγινε από τους Samakoglu et al (2006).¹³⁷ και αφορούσε στην έκφραση ενός γονιδίου γ-σφαιρίνης και μίας μικρής φουρκέτας RNA έναντι του δρεπανοκυτταρικού αλληλομόρφου β-σφαιρίνης. Η εφαρμογή αυτής της προσέγγισης έγινε σε ανθρώπινα AAK με σκοπό τη γονιδιακή θεραπεία της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας. Λίγο αργότερα, εφαρμόστηκε και η μοναδική μέχρι σήμερα μελέτη για την θεραπεία της β-θαλασσαιμίας με μία συνδυαστική προσέγγιση.¹³⁸ Η προσέγγιση αυτή πραγματοποιήθηκε *in vivo* σε ένα μοντέλο β-θαλασσαιμίας που προκαλείται από ελαττωματική συρραφή του μεταγράφου της β-σφαιρίνης. Η προσέγγιση δεν περιελάμβανε έκφραση λειτουργικού γονιδίου παρά μόνο παρεμβολή του RNA για την μείωση των επιπέδων της α-σφαιρίνης και έκφραση μικρών συμπληρωματικών αλληλουχιών RNA με στόχο την επιτυχή συρραφή των μεταγράφων της β-σφαιρίνης.

Η ενσωμάτωση της τεχνολογίας της παρεμβολής του RNA σε αφοροϊκούς φορείς μέχρι σήμερα αφορούσε στην ανάπτυξη αντιϊκής θεραπείας και συγκεκριμένα οι μελέτες που έχουν γίνει στόχευαν στην καταπολέμηση του ιού της ηπατίτιδας B

(HBV) και στον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV). Συγκεκριμένα, αναπτύχθηκαν αφοϋικοί φορείς που αξιοποιούσαν την τεχνολογία της παρεμβολής του RNA και κωδικοποιούσαν μικρές φουρκέτες RNA έναντι του αντιγόνου επιφανείας του ιού της ηπατίτιδας Β (HBV surface antigen - HBsAg). Αυτοί οι φορείς έδειξαν σημαντική μείωση στην ανίχνευση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *in vitro* που είναι απαραίτητες για τη σύνθεση του ιού και κατά συνέπεια του ίδιου του πολλαπλασιασμού του ιού.^{139,140} Στην περίπτωση του ιού HIV (η μία μελέτη αφορά στον simian immunodeficiency virus - SIV), οι αφοϋικοί φορείς που κατασκευάστηκαν κωδικοποιούσαν μικρές φουρκέτες RNA έναντι των γονιδίων των ιών της ανοσοανεπάρκειας (rev/env - rev και tat) και κατάφεραν να μειώσουν σημαντικά τα επίπεδα των γονιδίων αυτών και τον πολλαπλασιασμό του ιού μετά από επιμόλυνση (κατά 4 φορές).^{141,142,143}

Η ερευνητική μας ομάδα πρόσφατα έδειξε ότι οι αφοϋικοί φορείς μπορούν να ενσωματώσουν επιτυχώς μία κασέτα έκφρασης μικρών αλληλουχιών RNA τόσο έναντι σε ένα γονίδιο αναφοράς όπως, το GFP όσο και σε γονίδια που σχετίζονται με παθογόνες καταστάσεις όπως, το BCR-ABL.¹⁴⁴ Η προσέγγιση αυτή ανέδειξε την ικανότητα των αφοϋικών φορέων να εκφράσουν σταθερά και αποδοτικά μικρές αλληλουχίες RNA *in vivo* προσφέροντας επιτυχή γονιδιακή καταστολή. Αυτό έγινε μετά από επιμόλυνση AAK ενισχύοντας με ακόμη έναν τρόπο την αξιοποίηση της τεχνολογίας της παρεμβολής του RNA στη γονιδιακή θεραπεία με χρήση αφοϋικών φορέων.

Στόχος της Διδακτορικής Διατριβής



Η διδακτορική διατριβή είχε ως στόχο την ανάπτυξη νέων ρετροϊκών φορέων για την εξέλιξη της γονιδιακής μεταφοράς και την αντιμετώπιση της β-θαλασσαιμίας. Οι φορείς που θελήσαμε να εξελίξουμε ανήκουν στην οικογένεια των αφροϊών οι οποίοι εμφανίζουν συγκριτικά πλεονεκτήματα σε θέματα ασφάλειας σε σχέση με τους ογκοϊούς. Στόχος μας ήταν να κατασκευάσουμε αφροϊκούς φορείς που να εκφράζουν το γονίδιο της β-σφαιρίνης και να ελέγξουμε την αποτελεσματικότητά τους συγκριτικά με τις κατασκευές που βασίζονται σε άλλους ρετροϊκούς φορείς και χρησιμοποιούν παρόμοιες κασέτες έκφρασης. Επιπροσθέτως, θελήσαμε να κατασκευάσουμε και ένα νέο αφροϊκό φορέα που θα εξέφραζε το γονίδιο της β-σφαιρίνης από ρυθμιστικές αλληλουχίες που δε θα προέρχονταν από το γονιδιακό τόπο της β-σφαιρίνης (HS2/HS3) αλλά από εκείνο της α-σφαιρίνης (α-HS40). Με αυτό τον τρόπο θελήσαμε να ελέγξουμε τα πλεονεκτήματα αυτής της περισσότερο ευέλικτης κατασκευής σε θέματα ιικού τίτλου και αποδοτικότητας της έκφρασης της β-σφαιρίνης.

Ο έλεγχος της αποδοτικότητας της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα που στερούνται έκφρασης της β-σφαιρίνης. Γι' αυτό το σκοπό αξιοποιήσαμε το μοντέλο β-θαλασσαιμίας στο ποντίκι ($Hbb^{th-3/+}$) και οι φορείς μας ελέχθησαν τόσο *in vitro*, σε καλλιέργειες αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, όσο και *in vivo*, μετά από μεταμόσχευση των επιμολυσμένων θαλασσαιμικών κυττάρων σε ποντίκια. Επίσης, θελήσαμε να ελέγξουμε τους αφροϊκούς φορείς που κατασκευάσαμε σε συνθήκες προ-κλινικής μελέτης της έκφρασης της β-σφαιρίνης σε αρχέγονα κύτταρα που απομονώθηκαν από ασθενείς με β-θαλασσαιμία.

Επιπλέον της δημιουργίας των κλασικών κατασκευών έκφρασης του γονιδίου της β-σφαιρίνης, στόχο μας αποτέλεσε και η αξιοποίηση της νεότερης προσέγγισης της παρεμβολής του RNA με σκοπό να μειωθούν δραστικά τα επίπεδα της έκφρασης του γονιδίου της α-σφαιρίνης, η περίσσεια της οποίας είναι υπεύθυνη για την παθολογία της β-θαλασσαιμίας. Η χρήση της τεχνολογίας της παρεμβολής του RNA θελήσαμε να συνδυαστεί με την ταυτόχρονη έκφραση του γονιδίου της β-σφαιρίνης προκειμένου να επιτευχθεί η αποδοτικότερη αποκατάσταση της ανισορροπίας μεταξύ των αλυσίδων της α- και β-σφαιρίνης και με αυτό τον τρόπο να οδηγηθούμε ταχύτερα

στην αντιμετώπιση της β-θαλασσαιμίας. Για το λόγο αυτό ο συνδυαστικός φορέας που κατασκευάσαμε θελήσαμε να δοκιμαστεί σε αρχέγονα κύτταρα από ασθενείς με β-θαλασσαιμία και η αποδοτικότητά του να συγκριθεί με εκείνη των φορέων που αξιοποιούν είτε αποκλειστικά την τεχνολογία της παρεμβολής του RNA έναντι του γονιδίου της ανθρώπινης α-σφαιρίνης ή την τεχνολογία έκφρασης του λειτουργικού γονιδίου της ανθρώπινης β-σφαιρίνης.

Υλικά και Μέθοδοι



1. Αφροϊκοί φορείς (FV)

i. Κατασκευή αφροϊκών πλασμιδιακών φορέων

Η παραγωγή του απενεργοποιημένου αφροϊκού φορέα έγινε, όπως περιγράφεται, από τους Trobridge et al (2002).¹⁴⁵ Ο αφροϊκός φορέας περιέχει μεγάλες ελλείψεις στο 3' LTR και στα γονίδια *gag*, *pol* και *env* που τα καθιστούν αδρανή, ενώ τα γονίδια *bel1-3* απουσιάζουν τελείως. Σ' αυτήν τη μορφή ο αφροϊός είναι ανίκανος να διπλασιαστεί με τον ενδογενή του μηχανισμό, γι' αυτό και στο 5' LTR στη θέση του υποκινητή του αφροϊού βρίσκεται ο υποκινητής που προέρχεται από τον κυτταρομεγαλοϊό (CytoMegalovirus - CMV). Ακριβώς επειδή ο αφροϊκός φορέας είναι απενεργοποιημένος, έχουν κατασκευαστεί 3 βοηθητικοί πλασμιδιακοί φορείς που κωδικοποιούν τα 3 απαραίτητα γονίδια για τον σχηματισμό των ιϊκών σωματιδίων. Τα πλασμίδια pCiGS, pCiPS και pCiES περιέχουν τα γονίδια *gag*, *pol* και *env* αντίστοιχα, τα οποία εκφράζονται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή και του ενισχυτή του ιού CMV που στη συνέχεια ακολουθεί ένα υβριδικό εσώνιο του ιού SV40 και καταλήγουν σε ένα σήμα πολύ-αδενυλίωσης προερχόμενο από τον ιό SV40.²⁵

Στο φορέα pΔΦ.HS40.β κλωνοποιήθηκε η κασέτα έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης η οποία φέρει (1) τον ενισχυτή της ανθρώπινης α-σφαιρίνης HS40, (2) έναν υποκινητή της ανθρώπινης β-σφαιρίνης μήκους 174 bp (συναντάται με την ονομασία -127 bp λόγω του ότι αφορά στο τμήμα που ξεκινά 127 bp ανοδικά του σημείου κάλυψης (cap) του mRNA) και (3) το γονίδιο της ανθρώπινης β-σφαιρίνης με τα 3 εξώνια και τα 2 εσώνια όπου το 2^ο εσώνιο φέρει μία έλλειψη. Ολόκληρη η κασέτα του διαγονιδίου εισήχθη σε αντίθετο προσανατολισμό συγκριτικά με την φορά μεταγραφής των ιϊκών γονιδίων προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι η μεταγραφή του γονιδίου θα είναι ανεξάρτητη από εκείνη του αφροϊκού φορέα.

Η αλληλουχία που κωδικοποιεί τη ρυθμιστική περιοχή HS40 (425 bp) μαζί με τον υποκινητή του γονιδίου της ανθρώπινης β-σφαιρίνης (-127bp) απομονώθηκε ως ένα ενιαίο τμήμα με άκρα NotI-NcoI από ένα φορέα που αποτέλεσε ευγενική χορηγία του καθηγητή D.W. Emery (University of Washington, Seattle, WA).

Ένας 2^{ος} φορέας που κατασκευάστηκε είναι αυτός που ενσωματώνει τον μονωτή HS4 που έχει απομονωθεί από τα ορνιθοειδή (chicken HS4 - cHS4). Η

αλληλουχία cHS4 από την ρυθμιστική περιοχή του α-γονιδίου των ορνιθοειδών θεωρείται ότι δρα ως μονωτής της χρωματίνης και μπορεί να ελαχιστοποιήσει τις επιδράσεις τις εξαρτώμενες από το σημείο ενσωμάτωσης του διαγονιδίου, των παρακείμενων ρυθμιστικών στοιχείων (pΔΦ.HS40.β.cHS4). Η αλληλουχία cHS4 εισήχθη μέσα στην 3'αμετάφραστη αλληλουχία (Untranslated 3 – U3) της 3' LTR έτσι ώστε να ενσωματωθεί στις κυτταρικές σειρές-στόχους σε δύο αντίγραφα. Αυτό συμβαίνει καθότι μετά από αναδίπλωση του ιϊκού DNA κατά τη φάση της αντίστροφης μεταγραφής, η 3' LTR χρησιμοποιείται από τους μηχανισμούς των αφροϊών ως εκκινητής για την έναρξη της αντίστροφης μεταγραφής από την 5' LTR, οπότε η θυγατρική 5' LTR φέρει αντίγραφο της U3 αλληλουχίας της 3' LTR.

Για την κατασκευή του φορέα pΔΦ.HS2.HS3.β χρησιμοποιήθηκε η ίδια βασική δομή απενεργοποιημένου αφροϊκού φορέα η οποία περιγράφεται για την δημιουργία του φορέα HS40.β. Στην θέση του ενισχυτή HS40 της ανθρώπινης α-σφαιρίνης κλωνοποιήθηκαν οι αλληλουχίες HS2 (756 bp) και HS3 (1334 bp) που προέρχονται από την LCR της ανθρώπινης β-σφαιρίνης. Η απομόνωσή τους έγινε μέσω PCR με την χρήση εκκινητών που αναγνωρίζουν το 5' άκρο της αλληλουχίας HS2 και το 3' άκρο της αλληλουχίας HS3. Η εισαγωγή τους έγινε ως ενιαία αλληλουχία HS2-HS3, σε αντίθετο προσανατολισμό ως προς την μεταγραφή του ιϊκού γονιδιώματος, με τη χρήση ενσωματωμένων αλληλουχιών των περιοριστικών ενζύμων XbaI και NotI στα αντίστοιχα άκρα των δύο εκκινητών. Οι αλληλουχίες των δύο εκκινητών είναι οι ακόλουθες:

F: 5'-GCCGGGTCTAGACATTTGATTCACAAT-3'

R: 5'-CTAAGCGGCCGCCTAGTGCTTAGATTTC-3'

Ο συνδυαστικός φορέας pΔΦ.H4.HS40.β έχει την κασέτα HS40.β σε αντίθετο προσανατολισμό σε σχέση με τη μεταγραφή του ιϊκού γενετικού υλικού αυτούσια, δηλαδή, από το φορέα pΔΦ.HS40.β. Ανοδικά της κασέτας HS40.β έχουμε εισάγει την κασέτα H4 η οποία προέρχεται από το φορέα pΔΦ.H4 (που έχει κατασκευαστεί από την υποψήφια διδάκτωρ Μάγδα Παπαδάκη) και η οποία κωδικοποιεί μία μικρή φουρκέτα RNA με αλληλουχία συμπληρωματική σε ένα τμήμα του mRNA της ανθρώπινης α-σφαιρίνης η οποία ρυθμίζεται από έναν ανθρώπινο υποκινητή τύπου Pol III, τον H1. Αλληλουχία shRNA ενάντια στην α-σφαιρίνη:

F: 5'-GATCCCCGGTCAACTTCAAGCTCCTATTCAAGAGATAGGAGCT
TGAAGTTGACCTTTTT-3'

R:5'-CGCGAAAAAGGTCAACTTCAAGCTCCTATCTCTTGAATAGGA
GCTTGAAGTTGACCGGG-3'

Η κασέτα HS40.β είναι υπεύθυνη για την έκφραση του γονιδίου της ανθρώπινης β-σφαιρίνης ενώ η κασέτα H4 εκφράζει τις μικρές φουρκέτες RNA οι οποίες μέσω του ενδογενούς μηχανισμού της παρεμβολής του RNA στοχεύουν στο γονίδιο της ανθρώπινης α-σφαιρίνης και οδηγεί σε μερική μείωση των επιπέδων έκφρασής του.

ii. Παραγωγή αφοϊκών φορέων με τη μέθοδο CaP

Η παραγωγή των αφοϊκών φορέων πραγματοποιήθηκε με το πρωτόκολλο παροδικής διαμόλυνσης με ασβέστιο-φωσφόρο (Calcium-Phosphate - CaP). Κύτταρα της σειράς 293T στρώθηκαν σε καλλιέργειες και σε συγκέντρωση 3×10^6 κυττάρων / τρυβλίο 10cm μία ημέρα πριν από την διαμόλυνση. Την ημέρα της διαμόλυνσης εισήχθη χλωροκίνη (σε τελική συγκέντρωση 25μM) 20min πριν από την διαμόλυνση με τους πλασμιδιακούς φορείς. Οι πλασμιδιακοί φορείς τις επιλογής μας (HS40.β, HS40.β.cHS4 ή HS2.HS3.β σε τελική συγκέντρωση 12μg) εισήχθησαν ταυτόχρονα με τους βοηθητικούς πλασμιδιακούς φορείς που κωδικοποιούν τις ιικές πρωτεΐνες Gag (12μg), Pol (1.5μg) και Env (0.8μg) σε διάλυμα CaCl_2 (250mM) (διάλυμα B) και στη συνέχεια αναμείχθηκαν αργά και με ανακίνηση με διάλυμα NaHPO_4 (1.5mM) – 2X Hepes Saline (διάλυμα A). Μετά από την ανάμειξη το διάλυμα παρέμεινε σε ηρεμία για 15min και μετά από την κατακρήμνιση του συμπλόκου CaP εισήχθη στις καλλιέργειες των κυττάρων 293T. Μετά από 2-4 ώρες στις καλλιέργειες των κυττάρων προστέθηκε διάλυμα βουτυρικού νατρίου (Sodium Butyrate, Sigma-Aldrich, Germany, B5887) (800μL 0.45M / τρυβλίο 10cm) σε τελική συγκέντρωση 36mM. Το διάλυμα βουτυρικού νατρίου προστίθεται γιατί έχει δειχθεί ότι αυξάνει τη μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή της LTR καθώς και του υποκινητή του ιού CMV και κατά συνέπεια αυξάνει τον τίτλο του αφοϊκού φορέα.^{146,147} Ο ιός συλλέχθηκε από το υπερκείμενο της καλλιέργειας μετά από 72 ώρες.

2. Κυτταρικές Σειρές

i. Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών

Η κυτταρική σειρά MEL 585 (Mouse Erythro-Leukemia) καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υλικό RPMI 1640 (RPMI 1640 + GlutaMAX, Gibco, Invitrogen, California, USA, 61870) μετά από προσθήκη 1% αντιβιοτικού που αποτελείται από πενικιλίνη (100U/ml) και στρεπτομυκίνη (100μg/ml) (Penicillin-Streptomycin, Gibco, Invitrogen, California, USA, 15070063) και 10% ορού εμβρύου βοός (FBS, Gibco, Invitrogen, California, USA, 2012-07) ενώ οι κυτταρικές σειρές HT1080 (Human Teratocarcinoma), HeLa (Human Cervical Cancer) και 293T (Human Embryonic Kidney) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, Invitrogen, California, USA, 41966) μετά από προσθήκη 1% P/S & 10% FBS. Οι κυτταρικές σειρές HT1080, HeLa και 293T χαρακτηρίζονται προσκολλώμενες καθώς τα κύτταρα προσκολλώνται στην επιφάνεια του τρυβλίου καλλιέργειας και παρουσιάζουν οριζόντια ανάπτυξη. Όταν τα κύτταρα αυξηθούν και καλύψουν την επιφάνεια του τρυβλίου, τα κύτταρα αποκολλώνται με τη χρήση του ενζύμου θρυψίνη (Trypsin, Invitrogen, California, USA, 15090-046), φυγοκεντρούνται στις 1200rpm (250g) για 5min και τελικώς επαναιωρούνται σε DMEM. Αντιθέτως, τα κύτταρα τις σειρές MEL αναπτύσσονται σε εναιώρημα. Οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂.

Για την επαγωγή της διαφοροποίησης των κυττάρων MEL σε τελικά ερυθροειδή κύτταρα, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συγκέντρωση 3×10^5 / ml παρουσία 2% DMSO (Dimethyl Sulfoxide, AppliChem, Denmark, A3608) ή 5mM HMBA (N,N' Hexamethylene-bisacetamide 98%, Sigma-Aldrich, Germany, 224235) για 5 ημέρες και την 5^η ημέρα της διαφοροποίησης τα κύτταρα συλλέγονται για ανάλυση των πρωτεϊνών.

ii. Μεταγωγή κυτταρικών σειρών

Μία μέρα πριν από την συλλογή του ιικού φορέα τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο 6 θέσεων κύτταρα της σειράς HT1080 ή HeLa σε συγκέντρωση $1-1.5 \times 10^5$ / well σε καλλιέργεια 2ml θρεπτικού υλικού προκειμένου να προσκολληθούν στην επιφάνεια

του τρυβλίου πριν από την εισαγωγή του ιού. Τα κύτταρα αυτά θα χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό του τίτλου του ιού. Την επόμενη ημέρα εισήχθησαν σε τρυβλία 12 θέσεων $3-5 \times 10^4$ κύτταρα της σειράς MEL ανά ml θρεπτικού υλικού στα οποία και υπολογίστηκε η έκφραση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης. Ο αφοοίος που προηγουμένως είχε παραχθεί στην κυτταρική σειρά 293T, συλλέχτηκε από το υπερκείμενο της καλλιέργειας. Το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε στα 1200rpm για 10 λεπτά και στη συνέχεια το νέο υπερκείμενο πέρασε μέσα από φίλτρο 45μm (Filtropur S, Sarstedt AG & Co, Germany, 831826) προκειμένου να αφαιρεθούν τα κυτταρικά κατάλοιπα. Στην συνέχεια, τα ιικά αποθέματα είτε συγκεντρώθηκαν μέσω υπερφυγοκέντρησης (20.000rpm / 4ώρες / θερμοκρασία δωματίου) είτε χρησιμοποιήθηκαν απευθείας και εισήχθησαν στην καλλιέργεια των προσκολλώμενων κυττάρων (HT1080 ή HeLa) και των κυττάρων σε εναιώρημα (MEL). Το πρωτόκολλο της μεταγωγής αφορούσε σε επώαση με τον ιό για περίπου 18-22 ώρες ενώ την επόμενη ημέρα το πρωί τα κύτταρα συλλέχθηκαν, ξεπλέθηκαν με PBS, φυγοκεντρήθηκαν (1200rpm/5min) και επαναιωρήθηκαν σε νέο θρεπτικό υλικό όπου και παρέμειναν σε καλλιέργεια για άλλες 2 με 3 ημέρες.

3. Αρχέγονα Κύτταρα Ποντικίου

i. Απομόνωση αρχέγονων κυττάρων ποντικίου

Ποντίκια του στελέχους C57BL/6J θυσιάστηκαν και αφαιρέθηκαν ο μηρός, η κνήμη και το ανώνυμο οστόν. Από τα οστά αυτά απομονώθηκαν τα κύτταρα του μυελού των οστών τα οποία πλύθηκαν με PBS και υποβλήθηκαν σε επώαση με αιμολυτικό διάλυμα προκειμένου να απαλλαγούμε από την πληθώρα των ώριμων ερυθροκυττάρων και να συλλεχθούν τα μονοπύρρηνα κύτταρα (αναλογία ερυθροκυττάρων:λευκοκυττάρων περίπου 1000:1). Τα κύτταρα επώαστηκαν με το διάλυμα αιμόλυσης (8.26gr NH_4Cl , 1gr KHCO_3 , 0.037gr EDTA / 1lt ddH₂O) για 6 λεπτά στους 4°C και ακολούθως προστέθηκε ισοοσμωτικό διάλυμα για να σταματήσει την αντίδραση. Στην συνέχεια και προκειμένου να απομακρυνθούν τα διαφοροποιημένα κύτταρα από τον πληθυσμό των κυττάρων του μυελού των οστών, τα κύτταρα που απομονώθηκαν, μετρήθηκαν και επώαστηκαν με αντισώματα έναντι

των επιφανειακών αντιγόνων Gr-1 (a-mouse Ly-6G & Ly-6C, Pharmingen BD, New Jersey, USA, 553123), B220 (a-mouse CD45R/B220, Pharmingen BD, New Jersey, USA, 553083), CD3 (a-mouse CD3 e chain, Pharmingen BD, New Jersey, USA, 553057), CD11b (a-mouse Integrin α_M chain, Mac-1 α chain, Pharmingen BD, New Jersey, USA, 553308) και TER-119 (a-mouse TER-119, Pharmingen BD, New Jersey, USA, 553670). Τα αντιγόνα αυτά αφορούν σε επιφανειακούς μάρτυρες που χαρακτηρίζουν τα διαφοροποιημένα κύτταρα και συγκεκριμένα ανήκουν στους κυτταρικούς τύπους των κοκκιοκυττάρων (Gr-1), B-λεμφοκυττάρων (B220), T-κυττάρων (CD3), μακροφάγων (γενικότερα εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα της μυελικής σειράς αλλά και στα κύτταρα Φυσικούς Φονείς - NK) (CD11b) καθώς και στα ερυθρά κύτταρα (TER-119). Μία εναλλακτική μέθοδος απομόνωσης των αρχέγονων κυττάρων περιλαμβάνει την επώαση των κυττάρων του μυελού των οστών με ένα μείγμα αντισωμάτων ενάντια στα επιφανειακά αντιγόνα που συναντώνται σε διαφοροποιημένα κύτταρα και είναι εμπορικά διαθέσιμο (StemSep Mouse Hematopoietic Progenitor Cell Enrichment Kit - Stemcell Technologies, Vancouver, Canada, 13056). Στη συνέχεια, τα κύτταρα επώαστηκαν με μικροσφαιρίδια τα οποία αναγνωρίζουν το σταθερό τμήμα των αντισωμάτων και ακολούθως εισήχθησαν σε στήλες MACS τύπου LD (Miltenyi Biotec GmbH, Germany, 130-042-901) όπου παρουσία ισχυρού μαγνητικού πεδίου παραμένουν τα θετικά κύτταρα ως προς τους δείκτες και διέρχονται ελεύθερα τα αρνητικά κύτταρα. Αυτά τα κύτταρα τα οποία δεν επιλέγονται χαρακτηρίζονται μη διαφοροποιημένα - προγονικά κύτταρα (Lineage negative ή κύτταρα Lin⁻) και διατηρούν όλες τις ιδιότητες των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (AAK). Τα κύτταρα Lin⁻ τέλος, μετρήθηκαν και όταν ποσοτικοποιηθούν στο 0.1%-0.5% του συνολικού αριθμού των κυττάρων του μυελού των οστών, τότε η απομόνωση θεωρείται επιτυχής.

Μια εναλλακτική πηγή αρχέγονων κυττάρων ποντικού είναι αυτή του εμβρυϊκού ήπατος. Το εμβρυϊκό ήπαρ αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα όργανα αιμοποίησης, ειδικότερα μεταξύ των ημερών E11-E14 όταν περιέχει και τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αρχέγονων κυττάρων. Όπως έχει δειχθεί, μεταξύ του συνολικού πληθυσμού των κυττάρων του εμβρυϊκού ήπατος, ο πληθυσμός εκείνος που είναι θετικός ως προς την έκφραση του αντιγόνου επιφανείας CD11b είναι ιδιαίτερα εμπλουτισμένος σε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα. Προκειμένου να συλλέξουμε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα εμβρυϊκού ήπατος, απομονώσαμε από έμβρυα E13.5 τα κύτταρα του ήπατος τα οποία στη συνέχεια επώαστηκαν με

αντίσωμα κατά του αντιγόνου CD11b-Βιοτίνη και επελέγησαν με τη χρήση μικροσφαιριδίων στρεπταβιδίνης σε στήλες MACS τύπου MS (Miltenyi Biotec GmbH, Germany, 130-042-201).

ii. Μεταγωγή αρχέγονων κυττάρων ποντικού

Η δημιουργία των ιικών φορέων έγινε μετά από παροδική διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς 293T με τον πλασμιδιακό θεραπευτικό φορέα και με τους βοηθητικούς πλασμιδιακούς φορείς που κωδικοποιούν τις ιϊκές πρωτεΐνες Gag, Pol και Env. Την 3^η ημέρα μετά την διαμόλυνση, συλλέχθηκε το υπερκείμενο των κυττάρων όπου έχουν απελευθερωθεί τα ιϊκά σωματίδια. Το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε (1200rpm, 4°C, 5 λεπτά) και ακολούθως φιλτραρίστηκε σε φίλτρο διατομής 0.45μm προκειμένου να απαλλαγεί από τα κυτταρικά υπολείμματα. Στη συνέχεια ο ιός φυγοκεντρήθηκε για 4 ώρες στις 20.000 rpm και σε θερμοκρασία δωματίου (20°C). Ο ιός τελικά επαναιωρήθηκε σε θρεπτικό υλικό όγκου ίσο με το 1/100 του αρχικού όγκου και εισάγεται στην καλλιέργεια. Η μεταγωγή έγινε με επώαση των κυττάρων με τον ιό κατά την διάρκεια της νύχτας (over night – ο/ν) ενώ την επόμενη ημέρα το πρωί (16-20 ώρες μετά την μεταγωγή) τα κύτταρα συλλέχθηκαν και μπήκαν σε νέο θρεπτικό υλικό. Στην περίπτωση των αρχέγονων κυττάρων η καλλιέργεια έγινε σε θρεπτικό υλικό StemSpan SFEM (StemCell Technologies, Vancouver, Canada, 09600).

Τα αρχέγονα κύτταρα εισήχθησαν σε τρυβλία που έχουν επιστρωθεί για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με Retronectin σε συγκέντρωση 50ng/ml (CH296, Takara Bio Inc, Japan, T100A). Το πρωτόκολλο της μεταγωγής περιελάμβανε την εισαγωγή του ιού, που προηγουμένως έχει επαναιωρηθεί σε StemSpan παρουσία 5% FCS και 1% Pen/Strep, και την προσθήκη των κυτταροκινών IL-6 (PeproTech, New Jersey, USA, 200-06), Flt-3 ligand (PeproTech, New Jersey, USA, 300-19) και SCF (PeproTech, New Jersey, USA, 250-03) σε τελική συγκέντρωση 10ng/ml , 50ng/ml και 50ng/ml αντίστοιχα. Μετά από 18-20 ώρες τα κύτταρα ξεπλήθηκαν με PBS, μετρήθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε θρεπτικό υλικό StemSpan.

iii. Ερυθροειδική καλλιέργεια αρχέγονων κυττάρων ποντικίου

Μετά την μεταγωγή των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, έγινε η εισαγωγή τους σε συνθήκες ερυθροειδικής καλλιέργειας. Η ερυθροειδική καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε τόσο σε ημιστερεά όσο και σε υγρή φάση. Στην περίπτωση της ημιστερεάς φάσης τα κύτταρα εισήχθησαν στην ημιστερεά καλλιέργεια μεθυλκυτταρίνης (mouse MethoCult, StemCell Technologies, Vancouver, Canada, GF M3434) σε τελική συγκέντρωση 5×10^3 κυττάρων/ml και διατηρήθηκαν σε καλλιέργεια και σε συνθήκες 37°C και 5% CO_2 για 10 ημέρες. Την 10^η ημέρα οι αποικίες των κυττάρων που είχαν αναπτυχθεί στην επιφάνεια του ημιστέρεου θρεπτικού υλικού ελέγχθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο και επιλέχθηκαν οι αποικίες ερυθροποιητικής προέλευσης (BFU-Es) οι οποίες και εμφανίζουν ερυθρό χρωματισμό. Στην περίπτωση της ερυθροειδικής καλλιέργειας υγρής φάσης τα CD11b θετικά κύτταρα εμβρυϊκού ήπατος καλλιεργήθηκαν στο θρεπτικό μέσο StemSpan παρουσία 5% FCS και 1% Pen/Strep και των ακόλουθων κυτταροκινών: στη φάση πολλαπλασιασμού χρησιμοποιούνται οι κυτταροκίνες EPO 0.5U/ml (NeoRecormon, Roche, Basel, Schweiz), muSCF 100ng/ml και Dexamethasone 10^{-6}M (Sigma-Aldrich, Germany, D1756) ενώ κατά τη φάση διαφοροποίησης προστίθεται μόνο EPO σε συγκέντρωση 10U/ml. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν στη φάση πολλαπλασιασμού για 6-8 ημέρες και στη φάση διαφοροποίησης για άλλες 3, σε συγκέντρωση $3-5 \times 10^5$ κυττάρων / ml.

4. Μεταμόσχευση Αρχέγονων Κυττάρων σε Ποντίκια-Μοντέλα της β-Θαλασσαιμίας

Θηλυκά ποντίκια στελέχους $\text{Hbb}^{\text{th3/+}}$ C57BL/6J, με έλλειψη του ενός εκ των δύο γονιδίων της β-σφαιρίνης, που εμφανίζουν φαινότυπο ενδιάμεσης β-θαλασσαιμίας χρησιμοποιήθηκαν ως δότες κυττάρων μυελού των οστών ή γονιμοποιήθηκαν από αρσενικά ποντίκια στελέχους $\text{Hbb}^{\text{th3/+}}$ C57BL/6J και συλλέχθηκαν τα έμβρυα ηλικίας E13.5 από όπου και απομονώθηκαν κύτταρα ήπατος. Τα κύτταρα του μυελού των οστών ή τα ομόζυγα ($\text{Hbb}^{\text{th3/th3}}$) κύτταρα εμβρυϊκού ήπατος απομονώθηκαν και υπέστησαν μεταγωγή με τους αφροϊκούς φορείς pΔΦ.HS40.β και pΔΦ.HS2.HS3.β, όπως έχει περιγραφεί.

Αρσενικά φυσιολογικά ποντίκια του ιδίου στελέχους (C57BL/6J) χρησιμοποιήθηκαν ως δέκτες μεταμόσχευσης αρχέγονων κυττάρων. Προηγουμένως, τα ποντίκια υποβλήθηκαν σε αγωγή μυελοκαταστολής με χορήγηση μη-μυελοαφαναστικής δόσης της ουσίας Busilvex® (Pierre Fabre Médicament, France, 264610102). Το Busilvex® χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά σε τέσσερις ημερήσιες δόσεις από d -4 έως d -1, με τελική συγκέντρωση 20mg/kg, έως και την προηγούμενη της ημέρας της μεταμόσχευσης. Την ημέρα της μεταμόσχευσης τα μετηγμένα κύτταρα που απομονώθηκαν από τα θαλασσαιμικά ποντίκια-δότες, συλλέχτηκαν, φυγοκεντρήθηκαν (1300rpm, 4°C, 7 λεπτά), επαναιωρήθηκαν σε PBS και χορηγήθηκαν ενδοφλέβια στα μυελοκατεσταλμένα ποντίκια-δέκτες σε συγκέντρωση $0.5-2 \times 10^5$ ανά ποντίκι. Τα ποντίκια θυσιάστηκαν μετά από 18-25 εβδομάδες ενώ πραγματοποιήθηκαν και έλεγχοι των αιματολογικών τους παραμέτρων κάθε 7-8 εβδομάδες.

5. Ανθρώπινα Αρχέγονα Κύτταρα

ι. Απομόνωση ανθρώπινων αρχέγονων κυττάρων

Ανθρώπινα δείγματα περιφερικού αίματος συλλέχθηκαν κατά τις τακτικές επισκέψεις μετάγγισης στο νοσοκομείο παιδών Αγία Σοφία (σε συνεργασία με τον Δρ. Καττάμη, Α΄ Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο Παιδών “Η Αγία Σοφία”) ή σπανιότερα, δείγματα μυελού των οστών απομονώθηκαν κατά την επέμβαση μεταμόσχευσης μυελού των οστών σε θαλασσαιμικούς ασθενείς μείζονος β-θαλασσαιμίας (β^0) (σε συνεργασία με τους Δρ. Γουσέτη και Γραφάκο, Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, Νοσοκομείο Παιδών “Η Αγία Σοφία”). Κατά προσέγγιση, 35ml περιφερικού αίματος αραιώθηκαν με ίση ποσότητα PBS και στην συνέχεια ισομοιράστηκαν σε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες φυγοκέντρωσης των 50ml που ο καθένας περιείχε 15ml φικόλης (Histopaque®-1077, Sigma-Aldrich, Germany, 10771). Στη συνέχεια, οι δοκιμαστικοί σωλήνες φυγοκεντρήθηκαν στα 400g χωρίς φρένο (!) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη φυγοκέντρωση, στο δοκιμαστικό σωλήνα δημιουργήθηκαν από επάνω προς τα κάτω οι εξής φάσεις. Η φάση του πλάσματος, ο δακτύλιος των μονοπύρηνων κυττάρων, η φάση της φικόλης

και τέλος, η φάση των ερυθροκυττάρων. Απομονώθηκε ο δακτύλιος των μονοπύρηνων κυττάρων ο οποίος και περιλαμβάνει όλα τα κύτταρα πλην των ερυθροκυττάρων. Στη συνέχεια, τα μονοπύρηννα κύτταρα ξεπλήθηκε με PBS στο οποίο είχε προστεθεί 1% FCS και EDTA τελικής συγκέντρωσης 2mM. Το μείγμα των μονοπύρηνων κυττάρων επώαστηκε σε διάλυμα λύσης των ερυθροκυττάρων για 7 λεπτά στους 4⁰C προκειμένου να απαλλαγεί από τα εναπομείναντα ερυθροκύτταρα. Τα μονοπύρηννα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 300μl PBS - 1% FCS - 2mM EDTA ανά 10⁸ κύτταρα. Αρχικά, ανά 10⁸ μονοπύρηννα κύτταρα προστέθηκαν 100μl από το αντιδραστήριο μπλοκαρίσματος μη ειδικών επιτόπων (FcR Blocking Reagent) και στη συνέχεια επώαστηκαν με 100μl αντισώματος έναντι του αντιγόνου επιφανείας CD34 το οποίο είναι συζευγμένο με μικροσφαιρίδια (CD34 Microbead kit, Miltenyi Biotech GmbH, Germany, 130-046-702) για 30 λεπτά στους 4⁰C. Μετά το πέρας της επώασης με το αντίσωμα τα κύτταρα ξεπλήθηκαν, επαναιωρήθηκαν σε 500μl PBS - 1% FCS - 2mM EDTA ανά 10⁸ κύτταρα και φορτώθηκαν μέσα σε στήλη MACS τύπου MS προκειμένου να γίνει η επιλογή των κυττάρων εκείνων που είναι θετικά για την έκφραση του επιφανειακού αντιγόνου CD34 (CD34⁺).

ii. Μεταγωγή ανθρώπινων αρχέγονων κυττάρων

Με μία διαδικασία που αναφέρθηκε προηγουμένως ο ιός συγκεντρώθηκε (20.000 rpm / 4 ώρες / 20°C) 100X και εισήχθη στην καλλιέργεια των αρχέγονων κυττάρων. Τα αρχέγονα κύτταρα εισήχθησαν σε τρυβλία που έχουν επιστρωθεί για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με Retronectin σε συγκέντρωση 50ng/ml (CH296, Takara Bio Inc, Japan, T100A). Το πρωτόκολλο της μεταγωγής περιελάμβανε την εισαγωγή του ιού, που προηγουμένως έχει επαναιωρηθεί σε StemSpan παρουσία 5% FCS και 1% Pen/Strep, και την προσθήκη των κυτταροκινών huFlt3L (100ng/ml), huSCF (100ng/ml), huTPO (100ng/ml), huIL-6 (20ng/ml) και huIL-3 (20ng/ml) (PeproTech, New Jersey, USA, Ltd). Μετά από 18-20 ώρες τα κύτταρα ξεπλήθηκαν με PBS, μετρήθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε θρεπτικό υλικό StemSpan. Η μεταγωγή έγινε με επώαση των κυττάρων με τον ιό για 18-20 ώρες. Στη συνέχεια, συλλέχθηκαν, ξεπλύθηκαν με PBS, μετρήθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε νέο θρεπτικό υλικό StemSpan.

iii. Ερυθροειδική καλλιέργεια αρχέγονων κυττάρων ποντικίου

Μετά την μεταγωγή των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, γίνεται η εισαγωγή τους σε συνθήκες ερυθροειδικής καλλιέργειας. Τα κύτταρα CD34⁺ που έχουν υποστεί μεταγωγή με τους αφοϊκούς φορείς για 18-20 ώρες, επαναιωρούνται σε StemSpan παρουσία 1% Pen/Strep, 5% FCS και των ακόλουθων κυτταροκινών με τις τελικές τους συγκεντρώσεις να διαμορφώνονται σε EPO 1U/ml, huSCF 10ng/ml, huIL-3 10ng/ml και είτε Dexamethasone 10⁻⁶M και β-estradiol 1μM (Sigma-Aldrich, Germany, E8875) ή huTPO 10ng/ml και huFlt3L 10ng/ml. Τα κύτταρα CD34⁺ διατηρούνται σε συνθήκες ερυθροειδικής καλλιέργειας για 16-18 ημέρες και σε συγκέντρωση 1-3x10⁵/ml.

6. Κυτταρομετρία Ροής

i. Εσωτερική σήμανση (intracytoplasmic staining) επιμολυσμένων κυττάρων με την χρήση αντισωμάτων

Τα κύτταρα της σειράς MEL 585 που έχουν υποστεί μεταγωγή με αφοϊκούς φορείς, καλλιεργήθηκαν παρουσία 2% DMSO ή 5mM HMBA προκειμένου να οδηγηθούν σε ερυθροποιητική διαφοροποίηση. Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα υποβλήθηκαν σε ερυθροειδική διαφοροποίηση κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Κατόπιν τα κύτταρα συλλέχτηκαν, μετρήθηκαν και τοποθετήθηκαν στην καλλιέργεια σε συγκεντρώσεις των 1x10⁶ κυττάρων / 100μl. Στα κύτταρα αυτά προστέθηκε 4% παραφορμαλδεΰδη (Paraformaldehyd, AppliChem, Denmark, A3813.1000) και επωάστηκαν για 1 ώρα στους 37°C (MEL 585) ή για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (AAK) προκειμένου να επιτευχθεί η μονιμοποίηση τους. Στην συνέχεια τα κύτταρα επωάστηκαν 1 ώρα (κατ' ελάχιστον) έως ο/η στους 4°C με διάλυμα 1:1 μεθανόλης-ακετόνης (AppliChem, , Denmark, A3493 - CarloERBA, Italy, 400974) ή για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα 0.1% Triton X-100 (AppliChem, Denmark, A1388) προκειμένου να επιτευχθεί η διάνοιξη πόρων και η έκθεση των ενδοκυττάρων πρωτεϊνών στα αντισώματα. Τέλος, τα κύτταρα επωάστηκαν για 30 λεπτά στους 4°C με αντίσωμα κατά της ανθρώπινης β-σφαιρίνης (hemoglobin β (37-8) PE, Santa Cruz Biotechnology, California, USA, sc-21757) σε τελική αραίωση

1:50. Η ανίχνευση των σημασμένων κυττάρων έγινε με την βοήθεια κυτταρομετρητή ροής FC500 (Beckman Coulter, Switcherland).

ii. Ανάλυση της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε περιφερικό αίμα ποντικού

Τα επίπεδα έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης στα μεταμοσχευμένα ποντίκια υπολογίστηκαν τουλάχιστον 4 εβδομάδες μετά την μεταμόσχευση όταν και συλλέχτηκε περιφερικό αίμα από την ουρά. Το αίμα ξεπλύθηκε από τις αντιπηκτικές ουσίες με δύο πλύσεις και φυγοκεντρήσεις με PBS στις 1200 rpm για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, 20-30 μl από τα ερυθροκύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε PBS - 4% PFA μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 λεπτά. Ακολούθησε μία πλύση με PBS και φυγοκέντρωση στα 1500g για 3 λεπτά. Στα μονιμοποιημένα κύτταρα διανοίχτηκαν πόροι μετά από επώαση με διάλυμα 1:4 μεθανόλης:ακετόνης σε θερμοκρασία δωματίου για 90'. Ακολούθησαν δύο πλύσεις με PBS και φυγοκέντρωση στα 1500g για 3 λεπτά. Τα ερυθροκύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 500μl PBS-2% FCS και 10-15μl από το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν για να σημανθούν με αντίσωμα κατά της ανθρώπινης β-σφαιρίνης. Το αντίσωμα (Santa Cruz Biotechnology, California, USA, sc-21757) χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1:50 σε τελικό όγκο 100μl και επώαστηκε με τα κύτταρα για 30 λεπτά στους 4°C. Στην συνέχεια, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS-2% FCS, φυγοκεντρήθηκαν στα 1500g για 3 λεπτά και τελικά επαναιωρήθηκαν σε 500μl PBS-2% FCS και αναλύθηκαν σε κυτταρομετρητή ροής FC500. Σε κάθε ανάλυση με χρήση κυτταρομετρίας ροής συμπεριλήφθηκε και ένα ζευγάρι δειγμάτων ελέγχου, ένα θετικό και ένα αρνητικό. Στην περίπτωση της ανάλυσης του περιφερικού αίματος των μεταμοσχευμένων ποντικών τα δείγματα ελέγχου ήταν περιφερικό αίμα από φυσιολογικό ποντίκι (αρνητικό) και περιφερικό αίμα από άνθρωπο (θετικό).

iii. Ανάλυση της ερυθροειδικής ωρίμανσης σε καλλιέργεια αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (AAK) *ex vivo*

Η εκτίμηση της ερυθροειδικής διαφοροποίησης των AAK ποντικού ή ανθρώπου μετά από τη διαφοροποίησή τους *ex vivo* παρουσία κυτταροκινών έγινε μέσω κυτταρομετρίας ροής και συγκεκριμένα ενός πρωτοκόλλου που παρουσιάστηκε

το 2001 από τους Socolovsky et al.¹⁴⁸. Τα διαφοροποιημένα AAK επώστηκαν σε PBS-2% FCS παρουσία των αντισωμάτων CD71-Biotin (Pharmingen BD, New Jersey, USA, 555535-Human / 557416-Mouse) και TER119-PE (Pharmingen BD, New Jersey, USA, 09085B) ή Glycophorin A-PE (Pharmingen BD, New Jersey, USA, 555570) στην περίπτωση των κυττάρων ποντικού ή ανθρώπου, αντίστοιχα. Η επώαση έγινε στους 4°C για 30 λεπτά και σε αραίωση 1:50. Στη συνέχεια, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS και αφού επαναιωρήθηκαν σε μικρό όγκο (50-100μl) επώστηκαν με το δευτερογενές αντίσωμα streptavidin-PE-Cy5 το οποίο δεσμεύεται στην ομάδα της βιοτίνης του αντισώματος CD71-Biotin. Και εδώ η επώαση έγινε στους 4°C για 30 λεπτά και σε αραίωση 1:100. Στα κύτταρα προστέθηκε επίσης η χημική ένωση propidium iodide (PI – Pharmingen BD, New Jersey, USA, 556463) η οποία βάφει θετικά τα νεκρά κύτταρα προκειμένου αυτά να αποκλειστούν από την ανάλυση. Τα σημασμένα κύτταρα αναλύθηκαν σε κυτταρομετρητή ροής FC500.

7. Ανάλυση κατά Western

Περιφερικό αίμα όγκου 10 μl υπέστη λύση με την προσθήκη 40 μl αντιδραστηρίου αιμόλυσης (Hemolysate Reagent - Helena Laboratories, Texas, USA, H5125) και το αιμόλυμα διαιρέθηκε στα δύο και φορτώθηκε εξίσου σε δύο μη-αποδιατακτικά πηκτώματα 12% πολυακρυλαμίδης. Τα πηκτώματα αυτά στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες PVDF (Roche, Switzerland, 03010040001) για 30 λεπτά στους 4°C. Οι μεμβράνες επώστηκαν σε διάλυμα TBS-T παρουσία 5% πρωτεΐνης γάλακτος για 2 ώρες στους 4°C, προκειμένου να μπλοκαριστεί η μη-ειδική πρόσδεση του αντισώματος. Η μία μεμβράνη επώστηκε, στη συνέχεια, με αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης β-σφαιρίνης (1:1000) ενώ η άλλη με αντίσωμα έναντι της α-σφαιρίνης του ποντικού (1:500) (και τα δύο από Santa Cruz Biotechnology, California, USA, sc21757 και sc31111). Η επώαση διήρκησε 16-20 ώρες (ο/ν) και πραγματοποιήθηκε στους 4°C, σε διάλυμα TBS-T με 5% πρωτεΐνη γάλακτος. Την επόμενη ημέρα οι μεμβράνες εισήχθησαν σε διάλυμα TBS-T με 5% πρωτεΐνη γάλακτος που περιείχε το δευτερογενές αντίσωμα το οποίο είναι συζευγμένο με το ένζυμο της περοξειδάσης HRP και επώστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Η εμφάνιση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του

συστήματος ανίχνευσης Amersham ECLTM (GE Healthcare, Wisconsin, USA, RPN2132).

8. Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real Time - PCR).

i. Υπολογισμός του τίτλου των ιϊκών φορέων

Ο υπολογισμός του τίτλου των ιϊκών φορέων έγινε σε DNA που απομονώθηκε από συγκεκριμένο αριθμό κυττάρων που έχουν επιμολυνθεί και τα οποία έχουν παραμείνει σε καλλιέργεια για περισσότερες από 7 ημέρες. Η παραμονή σε καλλιέργεια για 7 ημέρες έγινε προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα παρουσίας πλασμιδιακού φορέα (που προέρχεται από το υλικό της διαμόλυνσης) στο περιβάλλον της καλλιέργειας. Για την τιτλοποίηση του ιού χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις του ιού στις κυτταρικές σειρές HT1080 ή/και HeLa. Στην αντίδραση PCR, χρησιμοποιήθηκαν 250ng DNA ως υπόστρωμα σε δυο επαναληπτικές αντιδράσεις των 25μl χρησιμοποιώντας το ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, California, USA).

Η ανίχνευση των ενσωματωμένων ιϊκών σωματιδίων πραγματοποιήθηκε με τη χρησιμοποίηση εκκινητών οι οποίοι είναι ειδικοί για τους αφροϊούς:

F: 5'-CTGGAATGTTACTCAAAGAGCTGTTT-3',

R: 5'-TGGAACAGGATGCTGCATTCT-3'.

Η μέθοδος ελέγχου του πολλαπλασιασμού του προϊόντος της PCR έγινε με την φθορίζουσα ένωση Sybr-Green (Brilliant Sybr Green QPCR Master Mix, Stratagene, California, USA, 600548). Ο αριθμός των αντιγράφων που αντιστοιχούν σε κάθε κύτταρο (vector copy number) προέκυψε μετά από υπολογισμό του συνολικού αριθμού των κυττάρων που αναλύθηκαν με τη χρήση αντιδραστήριου QPCR (TaqMan[®] Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems, California, USA, 4369016) ειδικών εκκινητών και ανιχνευτών (probes) για το ενδογενές γονίδιο της RNase P (Applied Biosystems, California, USA, 4316844).

Δείγματα ελέγχου με διαφορετικές τιμές πλασμιδιακού φορέα και γενομικού DNA του ποντικίου χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να κατασκευαστούν καμπύλες

τιτλοδότησης. Αυτές χρησιμοποιούνται κάθε φορά για να υπολογίζεται η απόλυτη τιμή των ιικών αντιγράφων που ενσωματώνονται.

ii. Υπολογισμός των επιπέδων χιμαιρισμού και των ενσωματωμένων ιικών αντιγράφων

Κύτταρα μυελού των οστών συλλέχθηκαν κατά τη φάση της θυσίας των πειραματόζωων και απομονώθηκε γενομικό DNA. Όπως αναφέρθηκε ήδη, χρησιμοποιήθηκαν 250ng DNA σε δυο επαναληπτικές αντιδράσεις των 25μl, και από την ανάλυση των επιπέδων πολλαπλασιασμού των ειδικών αλληλουχιών για τους αφοϊικούς φορείς και το γονίδιο RNase P προέκυψε ο αριθμός των ιικών αντιγράφων ανά κύτταρο μυελού των οστών του ποντικίου. Επιπλέον, στην περίπτωση των μεταμοσχευμένων ποντικών, έγινε ο έλεγχος της έκφρασης του ειδικού γονιδίου Testis-Specific Protein Y-encoded (TSPY) για τα κύτταρα που προέρχονται από ποντίκια γένους αρσενικού με χρήση του αντιδραστηρίου Sybr-Green:

F: 5'-TCCTTGGGCTCTTCATTATTCTTAAC-3';

R: 5'-GAGAACCACGTTGGTTTGAGATG-3'.

Η τιμή πολλαπλασιασμού του γονιδίου TSPY σε συνάρτηση με μία καμπύλη αναφοράς που δημιουργήθηκε από δείγματα με διαβάθμιση της αναλογίας κυττάρων από αρσενικό και θηλυκό ποντίκι μας οδήγησε στον υπολογισμό του ποσοστού των κυττάρων δότη που έχουν εποικήσει το ποντίκι δέκτη.

iii. Υπολογισμός της έκφρασης του mRNA της ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε ερυθροειδικές αποικίες ποντικίου και ανθρώπου

Στην περίπτωση των AAK ποντικίου, μετά από 10 ημέρες καλλιέργειας των μετεγγμένων κυττάρων Lin⁻ σε μεθυλκυτταρίνη έγινε συλλογή των ερυθροποιητικών αποικιών BFU-E. Κάθε μία από αυτές τις αποικίες κυττάρων συλλέχθηκε ξεχωριστά και υποβλήθηκε σε απομόνωση ολικού RNA με τη χρήση του αντιδραστηρίου Trizol (Invitrogen, California, USA, 15596-018) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Στην περίπτωση των ανθρώπινων AAK, μετά από καλλιέργεια 16-18 ημερών παρουσία κυτταροκινών που επάγουν ερυθροειδική διαφοροποίηση,

συλλέχθηκε ένας πληθυσμός της τάξης των 5×10^4 - 1×10^5 κυττάρων απ' όπου και απομονώνεται RNA.

Το RNA που απομονώθηκε στην συνέχεια υποβλήθηκε σε αντίστροφη μεταγραφή για την δημιουργία του ολικού cDNA με τη χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού MMLV Reverse (Promega, Wisconsin, USA, M170B). Οι αλληλουχίες του cDNA χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 250ng ανά 25μl αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου. Για την ανίχνευση των μεταγράφων της ανθρώπινης α- και β-σφαιρίνης και της α-σφαιρίνης του ποντικού (ενδογενές δείγμα ελέγχου) χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές ειδικοί για τα δύο μετάγραφα. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι για:

Την α-σφαιρίνη του ποντικού

F: 5'-ACCTACTTTCCTCACTTTGATGTAAGC-3'

R: 5'-GCATCGGCGACCTTCTTG-3'

Την β-σφαιρίνη του ανθρώπου

F: 5'-GGTGAATTCTTTGCCAAAGTGAT-3'

R: 5'-CACCTTTGCCACACTGAGTGA-3'

Την α-σφαιρίνη του ανθρώπου

F: 5'-TTCGACCTGAGCCACGGC-3'

R: 5'-GTGGCTTAGGAGCTTGAAGTT-3'

Ο έλεγχος του πολλαπλασιασμού του προϊόντος της αντίδρασης PCR έγινε με την φθορίζουσα ένωση Sybr-Green (Brilliant Sybr Green QPCR master mix, Stratagene, California, USA, 600548). Τέλος, τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου της ανθρώπινης β-σφαιρίνης ως προς τα αντίστοιχα της ενδογενούς α-σφαιρίνης υπολογίσθηκαν με την μέθοδο $2^{-\Delta\Delta C_t}$ όπως αυτή προσδιορίστηκε από τους Livak et al (2001).¹⁴⁹

Αποτελέσματα

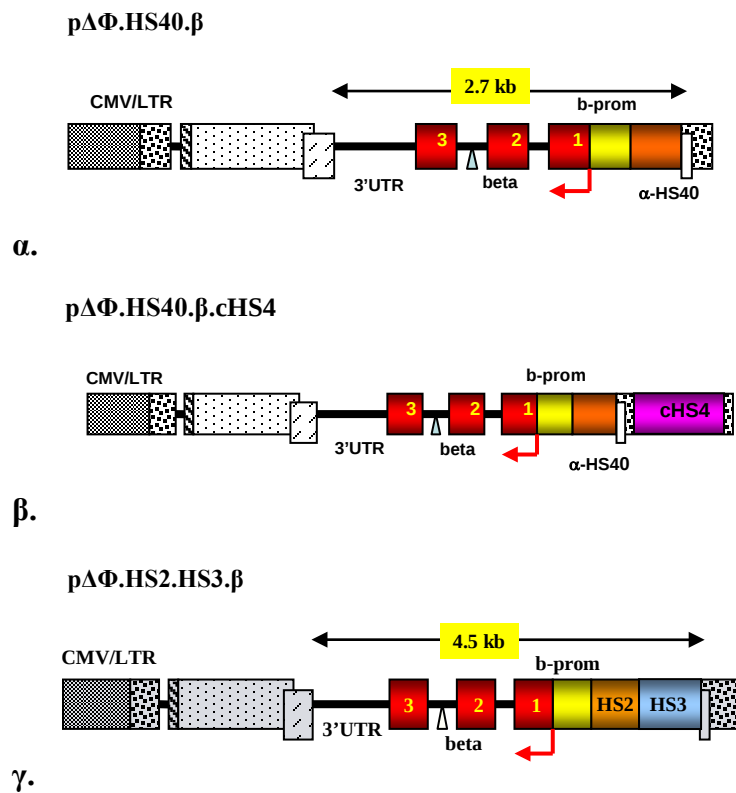


1. Κατασκευή αφοϊκών φορέων (FV) που εκφράζουν β-σφαιρίνη και ρυθμίζονται από την αλληλουχία α-HS40

Η δημιουργία των αφοϊκών φορέων που εκφράζουν β-σφαιρίνη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μίας βασικής δομής αφοϊού (FV viral backbone) η οποία φέρει τις ελάχιστες *cis*-ενεργές ρυθμιστικές αλληλουχίες μήκους 2.5 kb που είναι απαραίτητες για το πακετάρισμα του ιϊκού σωματιδίου. Στο φορέα αυτό έχει δημιουργηθεί μία έλλειψη στην αμετάφραστη 3' περιοχή LTR του ιϊκού υποκινητή (ΔU3), μεγάλες ελλείψεις στα γονίδια *gag*, *pol* και *env* και πλήρης έλλειψη των γονιδίων *bel* 1, 2 και 3.

Στόχο μας αποτέλεσε η δημιουργία αφοϊκών φορέων που θα συνδυάζουν αλληλουχίες από τους γονιδιακούς τύπους των ανθρώπινων σφαιρινών ώστε να εκφράζουν αποδοτικά το γονίδιο της β-σφαιρίνης. Οπότε για αυτό το σκοπό χρησιμοποιήσαμε την ρυθμιστική αλληλουχία HS40 που προέρχεται από το γονιδιακό τόπο της ανθρώπινης α-σφαιρίνης. Ο πρώτος αφοϊκός φορέας που κατασκευάστηκε ήταν ο pΔΦ.HS40.β. Στο φορέα pΔΦ.HS40.β κλωνοποιήθηκε η κασέτα έκφρασης του γονιδίου της ανθρώπινης β-σφαιρίνης το οποίο φέρει μία έλλειψη στο δεύτερο εσώνιο και το οποίο ρυθμίζεται από έναν υποκινητή του γονιδίου της ανθρώπινης β-σφαιρίνης μήκους 174 bp καθώς και τον ενισχυτή της ανθρώπινης α-σφαιρίνης HS40. Ολόκληρη η κασέτα του διαγονιδίου έχει εισαχθεί σε αντίθετο προσανατολισμό συγκριτικά με την φορά μεταγραφής των ιϊκών γονιδίων προκειμένου να εξασφαλιστεί η ανεξάρτητη μεταγραφή του γονιδίου από εκείνη του αφοϊκού φορέα (**Εικόνα 19α**).

Ο δεύτερος αφοϊκός φορέας που κατασκευάστηκε προκειμένου να εκφράσει το γονίδιο της ανθρώπινης β-σφαιρίνης, ο pΔΦ. HS40.β.cHS4, είναι αυτός που ενσωματώνει το μονωτή HS4 που έχει απομονωθεί από τα ορνιθοειδή (chicken HS4 - cHS4). Η αλληλουχία cHS4 προέρχεται από τη ρυθμιστική περιοχή του α-γονιδίου των ορνιθοειδών και θεωρείται ότι δρα ως μονωτής της χρωματίνης. Αυτό σημαίνει ότι μπορεί να ελαχιστοποιήσει τις επιδράσεις των παρακείμενων ρυθμιστικών αλληλουχιών από το σημείο ενσωμάτωσης του διαγονιδίου. Η αλληλουχία cHS4 εισήχθη μέσα στη 3' περιοχή LTR έτσι ώστε να ενσωματωθεί στις κυτταρικές σειρές στόχους σε δύο αντίγραφα στις 5' και 3' LTR, καθώς μετά από αναδίπλωση του ιϊκού DNA η 3' LTR χρησιμοποιείται από τους μηχανισμούς των αφοϊών ως εκκινητής για την έναρξη της αντίστροφης μεταγραφής (**Εικόνα 19β**).



Εικόνα 19. Αφροϊκοί φορείς που εκφράζουν ανθρώπινη β-σφαιρίνη. Χρησιμοποιήθηκε ένας αφροϊκός φορέας με σημαντικές ελλείψεις στο γονιδίωμά του (ΔΦ) και ελάχιστες cis-δρώσες ρυθμιστικές αλληλουχίες. **(α)** Στο φορέα pΔΦ.HS40.β η ρύθμιση της έκφρασης του διαγονιδίου ελέγχεται από τον υποκινητή της ανθρώπινης β-σφαιρίνης (174bp) και τον ενισχυτή της ανθρώπινης α-σφαιρίνης (α-HS40). **(β)** Ο φορέας pΔΦ.HS40.β.cHS4 κατασκευάστηκε μετά από εισαγωγή στο φορέα pΔΦ.HS40.β της ρυθμιστικής αλληλουχίας cHS4 που προέρχεται από τα ορνιθοειδή και θεωρείται ότι δρα ως μονωτής. **(γ)** Στον φορέα pΔΦ.HS2.HS3.β η ρύθμιση της έκφρασης του διαγονιδίου ελέγχεται από τον υποκινητή της ανθρώπινης β-σφαιρίνης (174bp) και τις αλληλουχίες HS2 και HS3 της περιοχής LCR του γονιδιακού τόπου της ανθρώπινης β-σφαιρίνης.

2. Κατασκευή του αφροϊκού φορέα που εκφράζει β-σφαιρίνη και ρυθμίζεται από τις αλληλουχίες HS2 και HS3

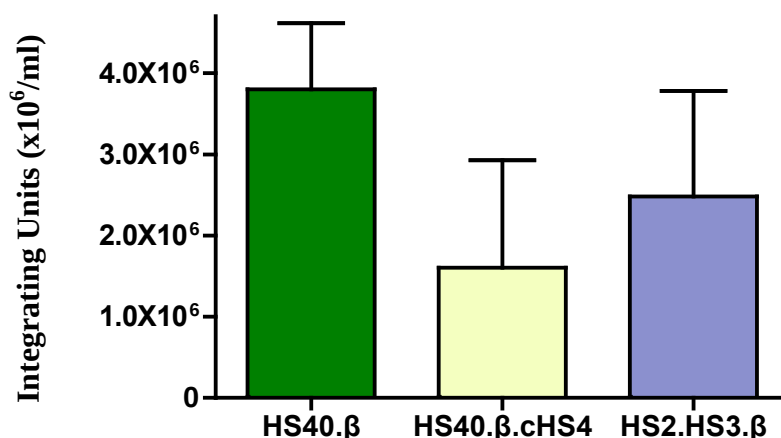
Η κατασκευή του νέου ιϊκού φορέα pΔΦ.HS2.HS3.β πραγματοποιήθηκε προκειμένου να ελεγχθεί μία περισσότερο συμβατική κατασκευή η οποία θα εκφράζει το γονίδιο της ανθρώπινης β-σφαιρίνης κάτω από τη ρύθμιση αλληλουχιών της περιοχής LCR, που είναι υπεύθυνη για τη μεταγραφική ρύθμιση του β-γονιδίου. Για τη χρήση των αλληλουχιών HS2 και HS3 υπάρχουν πολλά βιβλιογραφικά δεδομένα και θεωρήσαμε ότι θα αποτελούσαν ιδανικές αλληλουχίες ελέγχου και συγκριτικής αξιολόγησης για την κατασκευή με την αλληλουχία HS40.

Για τον έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος υποκινητής της ανθρώπινης β-σφαιρίνης μεγέθους 174 bp μαζί με τις αλληλουχίες HS2 και HS3 της περιοχής LCR του γονιδιακού τόπου της ανθρώπινης β-σφαιρίνης. Ολόκληρη η κασέτα του διαγονιδίου εισήχθη σε αντίθετα προσανατολισμό συγκριτικά με την φορά μεταγραφής των ιϊκών γονιδίων προκειμένου η μεταγραφή του να μην επηρεάζεται από τις ενδογενείς ρυθμιστικές αλληλουχίες του ιϊκού φορέα. Η χρήση των αλληλουχιών HS2 και HS3 της περιοχής LCR του γονιδιακού τόπου της ανθρώπινης β-σφαιρίνης επιλέχθηκε διότι δρουν ενισχυτικά στην έκφραση του γονιδίου και έχουν και λειτουργία “ανοίγματος” της χρωματίνης του γονιδιακού τόπου της β-σφαιρίνης.³⁴ Επίσης, έχειδειχθεί πως η παρουσία των δύο αυτών στοιχείων της περιοχής LCR του γονιδιακού τόπου της ανθρώπινης β-σφαιρίνης είναι η ελάχιστη απαιτούμενη αλληλουχία της περιοχής LCR προκειμένου να επιτευχθεί ικανοποιητική και ιστοειδική έκφραση του διαγονιδίου της β-σφαιρίνης (**Εικόνα 19γ**).¹⁵⁰

Οι αφροϊκοί φορείς που κατασκευάστηκαν, ερευνήθηκαν συγκριτικά στα διαφορετικά μοντέλα έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητα των διαφορετικών ρυθμιστικών αλληλουχιών να παράγουν αποδοτικά β-σφαιρίνη.

3. Τίτλοποίηση των αφοϊκών φορέων

Οι ιϊκοί φορείς pΔΦ.HS40.β, pΔΦ.HS40.β.cHS4 και pΔΦ.HS2.HS3.β αρχικά χρησιμοποιήθηκαν για να μεταγάγουν κύτταρα της κυτταρικής σειράς τίτλοποίησης HT1080 και στη συνέχεια από αυτά τα κύτταρα απομονώθηκε γενομικό DNA. Ο τίτλος των ιϊκών φορέων υπολογίστηκε με την μέθοδο της PCR πραγματικού χρόνου και άγγιξε το 1×10^5 (n=6), 1×10^5 (n=3) και 2.8×10^5 (n=4) IU/ml στη μη-συγκεντρωμένη τους μορφή, για τους τρεις φορείς αντίστοιχα. Μετά από συγκέντρωση οι τίτλοι των τριών ιϊκών φορέων υπολογίστηκαν σε 3.8×10^6 (n=9), 1.6×10^6 (n=3) και 2.5×10^6 (n=6) IU/ml, αντίστοιχα (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. Οι τίτλοι των ιϊκών φορέων pΔΦ.HS40.β, pΔΦ.HS40.β.cHS4 και pΔΦ.HS2.HS3.β υπολογίστηκαν με τη μέθοδο της PCR πραγματικού χρόνου σε 3.8×10^6 IU/ml, 1.6×10^6 IU/ml και 2.5×10^6 IU/ml, αντίστοιχα.

4. Βελτιστοποίηση της κυτταρομετρίας ροής και της ανοσο-ανίχνευσης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης

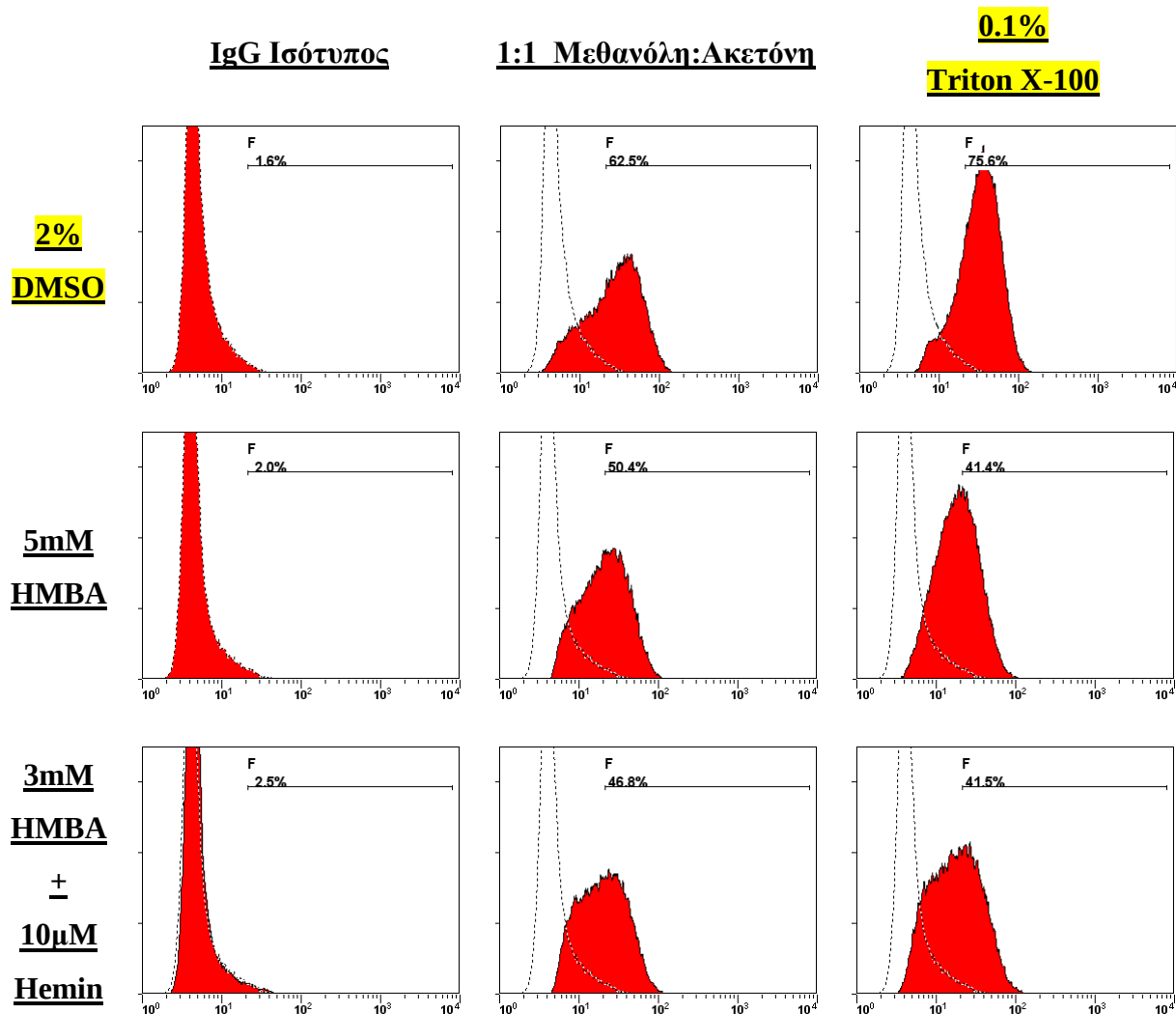
Η αξιολόγηση της αποδοτικότητας των αφοϊκών φορέων που εκφράζουν β-αιμοσφαιρίνη στην κυτταρική σειρά MEL πραγματοποιήθηκε με την αξιοποίηση ενός κλώνου MEL ο οποίος περιέχει ένα τεχνητό χρωμόσωμα ζύμης (Yeast Artificial

Chromosome - YAC). Το τεχνητό χρωμόσωμα ζύμης φέρει 150 kb DNA από το χρωμόσωμα 11 που περιλαμβάνει το γονιδιακό τόπο της ανθρώπινης β-σφαιρίνης μαζί με τη ρυθμιστική περιοχή LCR.¹⁵¹ Ο κλώνος αυτός, που για συντομία θα αναφέρεται ως MEL-YAC-C20, χρησιμοποιείται ως θετικό δείγμα ελέγχου της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης.

Αρχικά, πραγματοποιήσαμε δοκιμαστική χρώση κυττάρων του κλώνου MEL-YAC-C20 προτού προχωρήσουμε στη χρώση και κυτταρομετρία ροής των κυττάρων που έχουν υποστεί μεταγωγή με αφροϊκούς φορείς. Τα κύτταρα διαφοροποιήθηκαν παρουσία 2% DMSO ή 5mM HMBA ή 3mM HMBA μαζί με 10μM Hemin για 5 ημέρες. Την 5^η ημέρα τα κύτταρα συλλέχτηκαν, φυγοκεντρήθηκαν και έγινε αδρός μακροσκοπικός έλεγχος του χρώματός τους. Ένα σύνολο (ίζημα) κυττάρων ερυθρού χρώματος δείχνει ικανοποιητική επαγωγή της β-σφαιρίνης. Παρατηρήσαμε, ότι όλα τα κύτταρα απέκτησαν εξίσου ερυθρό χρωματισμό και με τα τρία πρωτόκολλα διαφοροποίησης και προχωρήσαμε στην συλλογή 1×10^6 κυττάρων ανά δείγμα προς χρώση με αντίσωμα. Στην συνέχεια, τα δείγματα μονιμοποιήθηκαν με 4% παραφορμαλδεϋδη (PFA) στους 37°C για 1 ώρα και ακολούθησε διάνοιξη των πόρων στα κύτταρα με τρεις διαφορετικές μεθόδους. 1) Με επώαση στους 4°C για 1 ώρα έως ο/η με 1:1 διάλυμα μεθανόλης : ακετόνης, 2) επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15' με 0,1% Triton X-100 και 3) επώαση για 10' σε θερμοκρασία δωματίου με 0.15% Saponin (Fluka, BioChemica, 89510). Τέλος, τα δείγματα των κυττάρων επώαστηκαν με διάλυμα αντισώματος αντί-ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε αραιώση 1:50 και ελέγχθηκαν με κυτταρομετρία ροής.

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως από τα τρία πρωτόκολλα επαγωγής των κυττάρων MEL-YAC-C20 τα υψηλότερα επίπεδα ανθρώπινης β-σφαιρίνης ανιχνεύθηκαν μετά από καλλιέργεια παρουσία 2% DMSO. Τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν με 2% DMSO εμφάνισαν μεγαλύτερα ποσοστά ανίχνευσης θετικών κυττάρων για ανθρώπινη β-σφαιρίνη έναντι εκείνων που καλλιεργήθηκαν παρουσία 5mM HMBA ή 3mM HMBA + 10μM Hemin. Από τα πρωτόκολλα διάνοιξης πόρων φάνηκε να υπερέχει εκείνο της επώασης για 15' σε θερμοκρασία δωματίου με 0.1% Triton X-100 δείχνοντας ποσοστά θετικών κυττάρων για ανθρώπινη β-σφαιρίνη της τάξης του 75.6% έναντι 62.5% μετά από χειρισμό των κυττάρων με διάλυμα 1:1 μεθανόλης : ακετόνης (**Εικόνα 21**).

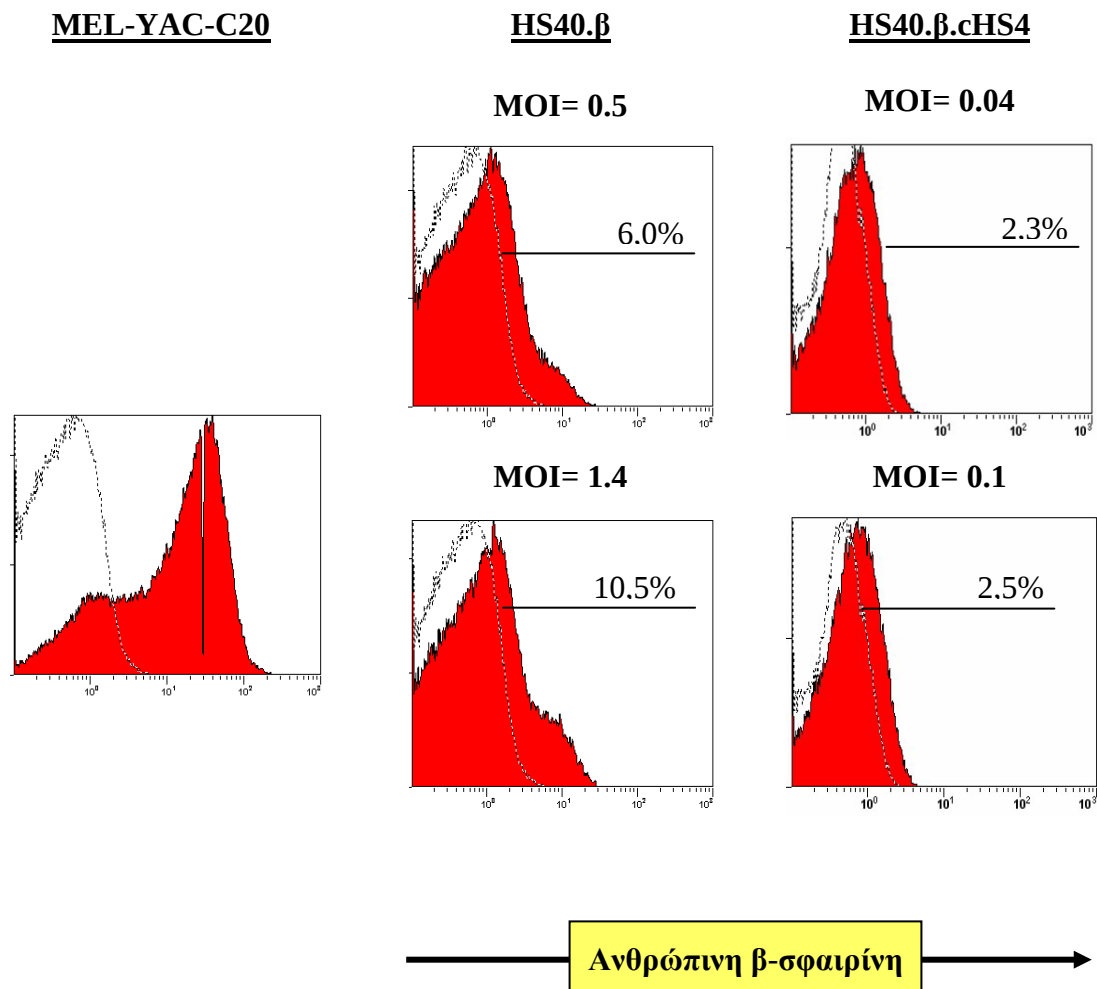
Η χρήση διαλύματος 0.15% Saponin για την διάνοιξη των πόρων απέτυχε να δώσει επίπεδα χρώσης που να προσεγγίζουν εκείνα των άλλων δύο μεθόδων (δεδομένα που δεν παρουσιάζονται).



Εικόνα 21. Κυτταρομετρία ροής για την ανοσοανίχνευση της β-αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης σε κλώνο MEL-YAC-C20. Η σύγκριση πραγματοποιείται με δείγμα ελέγχου (διακεκομμένες γραμμές) το οποίο έχει υποστεί επαγωγή αλλά έχει βαφτεί με αντίσωμα ίδιου ισότυπου με εκείνο κατά της ανθρώπινης β-σφαιρίνης (IgG1) αλλά χωρίς αντιγονική ειδικότητα. Από την σύγκριση των όμοιων κατά τα άλλα δειγμάτων αναγνωρίζονται τα πιο αποδοτικά πρωτόκολλα διαφοροποίησης και διάνοιξης των πόρων τα οποία επισημαίνονται με κίτρινο χρώμα.

5. Ανάλυση της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε κυτταρικούς πληθυσμούς MEL που έχουν επιμολυνθεί με αφροϊκούς φορείς

Κύτταρα της ερυθροποιητικής σειράς MEL μετήχθησαν με ένα σχετικά χαμηλό αριθμό ιικών σωματιδίων ανά κύτταρο (Multiplicity Of Infection - MOI) ο οποίος δεν ξεπερνά το 1.4 στην περίπτωση του φορέα HS40.β και το 0.12 για το φορέα HS40.β.cHS4. Μετά από ανάλυση με κυτταρομετρία ροής προέκυψε πως ο πληθυσμός των μετηγμένων κυττάρων που εκφράζουν ανθρώπινη β-σφαιρίνη αγγίζει το 10.5% και 2.5% του συνολικού πληθυσμού των κυττάρων MEL για τους δύο φορείς αντίστοιχα. Η εικόνα που παρατηρούμε από την κυτταρομετρία ροής δεν είναι η ύπαρξη μίας ξεκάθαρης ομάδας κυττάρων που εκφράζουν ανθρώπινη β-σφαιρίνη αλλά η μετατόπιση του συνολικού πληθυσμού των κυττάρων προς το μέρος του άξονα των x που αφορά στα θετικά κύτταρα για την έκφραση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης. Αυτό ενδεχομένως οφείλεται στο γεγονός ότι υπάρχει ένα μεγάλο ποσοστό κυττάρων που εκφράζουν σε χαμηλά επίπεδα ανθρώπινη β-σφαιρίνη η οποία δεν επαρκεί για να τα διαχωρίσει από το συνολικό πληθυσμό των κυττάρων MEL. Κυτταρικοί πληθυσμοί που έχουν μετηχθεί με μικρότερο MOI της τάξης του 0.5 και 0.04 με τους δύο φορείς αντίστοιχα, εμφάνισαν μετατόπιση προς το μέρος του άξονα των x που αφορά στα θετικά κύτταρα για την έκφραση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε ποσοστό 6.0% και 2.3% αντίστοιχα (**Εικόνα 22**).



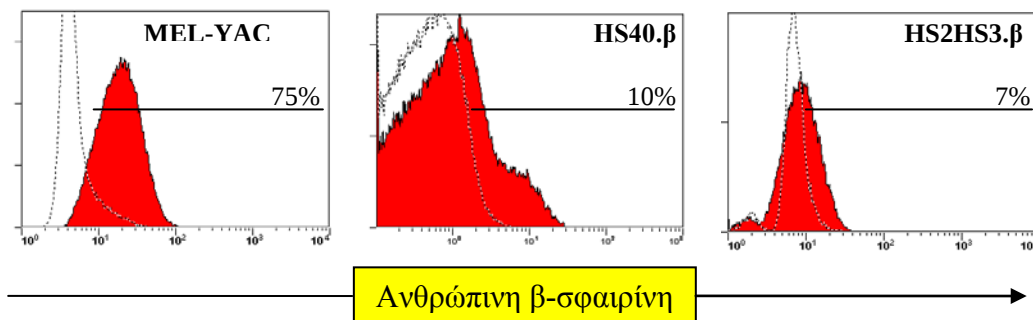
Εικόνα 22. Κύτταρα MEL-YAC-C20 που έχουν υποστεί μεταγωγή με τους αφοοϊκούς φορείς και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης μετά από διαφοροποίηση με DMSO. Τα ιστογράμματα αποτυπώνονται πάνω από εκείνο των μη επιμολυσμένων κυττάρων MEL (δείγμα ελέγχου) και οι οριζόντιες γραμμές δείχνουν το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν ανθρώπινη β-σφαιρίνη.

Η χρήση του φορέα HS40.β.cHS4 τόσο σε πληθυσμούς κυττάρων MEL όσο και σε ανεξάρτητους κυτταρικούς κλώνους MEL (τα δεδομένα δεν παρατίθενται) αποδείχθηκε μη αποδοτική στην παραγωγή της ανθρώπινης β-σφαιρίνης. Ο φορέας αυτός, ο οποίος φέρει την ίδια ρυθμιστική αλληλουχία με το φορέα HS40.β,

κατασκευάστηκε προκειμένου να ελεγχθεί κατά πόσο μπορεί να βελτιώσει τη σταθερότητα της έκφρασης του διαγονιδίου. Η αδυναμία του να επιδείξει αύξηση ή τουλάχιστον εφάμιλλα επίπεδα έκφρασης της β-σφαιρίνης που παράγεται από το φορέα HS40.β αυτόματα αποδεικνύει ότι στερείται του θεωρητικού πλεονεκτήματος (δράση της αλληλουχίας cHS4 ως μονωτής) έναντι του φορέα αυτού ενώ ταυτόχρονα εμφανής ήταν η πτώση στον τίτλο του φορέα HS40.β.cHS4. Ως εκ τούτου, η χρήση του δε διερευνήθηκε περαιτέρω και η παρούσα μελέτη εστιάστηκε στη σύγκριση μεταξύ των δύο διαφορετικών ρυθμιστικών αλληλουχιών (HS40 και HS2/HS3) σχετικά με την ικανότητά τους να εκφράσουν αποδοτικά και σταθερά το γονίδιο της β-σφαιρίνης στο πλαίσιο των αφοϋικών φορέων.

6. Μεταγωγή κυττάρων της σειράς MEL με φορείς που εκφράζουν β-σφαιρίνη

Η ερυθροποιητική σειρά MEL χρησιμοποιήθηκε για να υπολογισθεί η έκφραση της β-σφαιρίνης από τους αφοϋικούς φορείς, HS40.β και HS2.HS3.β. Τα κύτταρα επιμολύνθηκαν με διαφορετικά MOI και μετά από 7 ημέρες τοποθετήθηκαν σε καλλιέργεια παρουσία 2% DMSO προκειμένου να υποβληθούν σε ερυθροποιητική διαφοροποίηση. Την 5^η ημέρα καλλιέργειας με 2% DMSO τα κύτταρα συλέχθησαν και μελετήθηκε η έκφραση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης με κυταρομετρία ροής. Μελετήσαμε την ικανότητα έκφρασης των δύο φορέων συγκριτικά και παρατηρήσαμε ότι επιτεύχθηκαν αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε MEL κύτταρα με τον HS40.β (2.5-12.9%, MOI 0.6-8) και HS2.HS3.β (2.2-7.3%, MOI 1-5). Ο γεωμετρικός μέσος του άξονα των x όπου ανιχνεύεται η έκφραση της β-σφαιρίνης αντιστοιχεί στη μονάδα μέτρησης που αποκαλείται μέση ένταση φθορισμού (Mean Fluorescent Intensity - MFI). Το MFI αποτελεί το μέτρο της έντασης της έκφρασης της πρωτεΐνης που ανιχνεύθηκε, εν προκειμένω της β-σφαιρίνης. Η ένταση της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης, όπως προέκυψε από την τιμή του MFI, εκφράστηκε ως προς την αντίστοιχη έκφραση της κυτταρικής σειράς MEL-YAC-C20, που αποτέλεσε το δείγμα θετικού ελέγχου και ποίκιλε μεταξύ 5-57% και 3-46% για τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β, αντίστοιχα (Εικόνα 23).¹⁵²



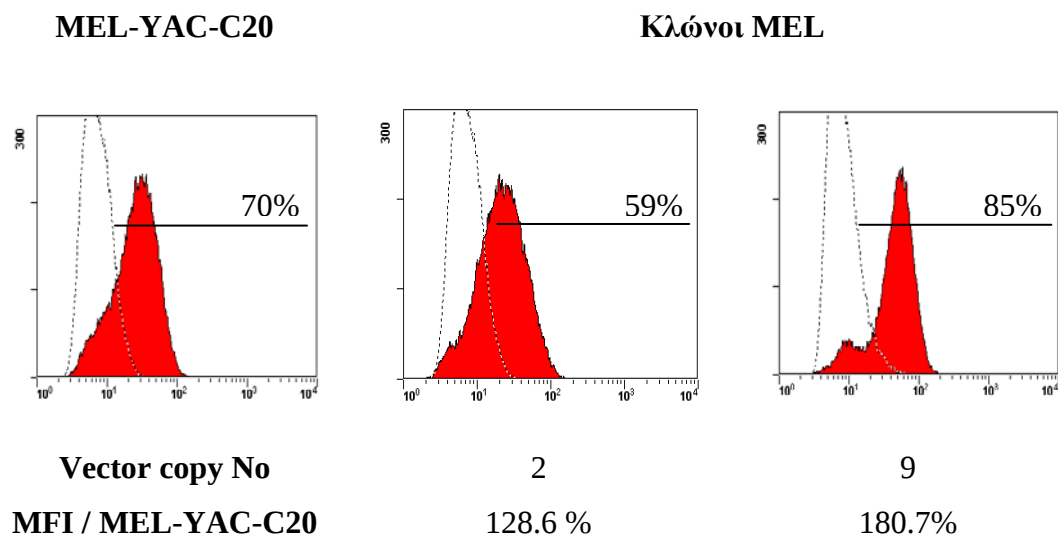
	MOI	β-σφαιρίνη %	MFI ως προς το δείγμα ελέγχου	MFI % της YAC
YAC	-	71 ± 15 %	29 ± 13.5	-
HS40.b (n=9)	0.6-8	7 ± 4.4 %	2.2 ± 0.8	5-57 %
HS2.HS3.b (n=3)	1-5	4.8 ± 3.6 %	1.3 ± 0.1	3-46 %

Εικόνα 23. Κυτταρικοί πληθυσμοί MEL που έχουν υποστεί μεταγωγή με τους αφοριτικούς φορείς και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης (οριζόντιος άξονας). Τα ιστογράμματα αποτυπώνονται πάνω από εκείνα των μη μετηγμένων κυττάρων MEL (δείγμα ελέγχου - διακεκομμένη γραμμή). Η κυτταρική σειρά MEL-YAC-C20 αποτελεί το δείγμα θετικού ελέγχου της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης.

7. Συσχέτιση του αριθμού των ενσωματωμένων αφοριτικών αντιγράφων και της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε ανεξάρτητους κλώνους MEL

Πληθυσμός μετηγμένων κυττάρων MEL υποβλήθηκε σε διαδοχικές αραιώσεις και καλλιεργήθηκε σε τρυβλία μικροτιτλοδότησης 96 θέσεων προκειμένου να απομονωθούν κυτταρικοί κλώνοι. Οι 116 κλώνοι κυττάρων MEL που απομονώθηκαν, ελέγχθηκαν με PCR γενομικού DNA για την ανίχνευση του διαγονιδίου της ανθρώπινης β-σφαιρίνης ή αλληλουχίας του αφοριτικού φορέα. Οι κλώνοι που βρέθηκαν θετικοί για την ύπαρξη των διαγονιδίων (n=37) υποβλήθηκαν σε PCR πραγματικού χρόνου για τον υπολογισμό του αριθμού των αντιγράφων των

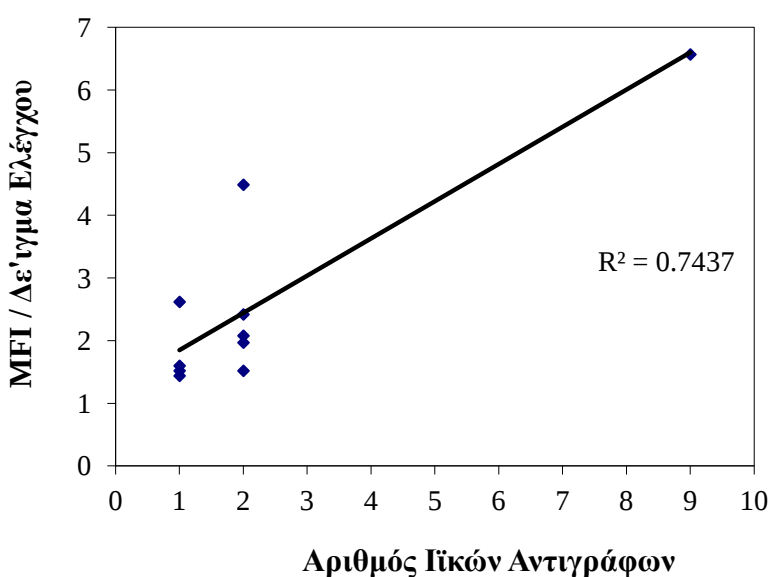
ενσωματωμένων ιϊκών φορέων που αντιστοιχούν σε κάθε κύτταρο. Το αποτέλεσμα ήταν το 94% των κλώνων να έχει 1-3 ιϊκά αντίγραφα και ένας κλώνος είχε 9. Η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής έδειξε πως οι κυτταρικοί κλώνοι εμφανίζουν πληθυσμούς κυττάρων που είναι θετικοί για την έκφραση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε ποσοστά που κυμαίνονται από 19.5% έως και 57%. Ο πληθυσμός των κυττάρων αυτών εμφανίζει ξεκάθαρη μετατόπιση της έκφρασης στο ιστόγραμμα της κυτταρομετρίας η οποία όμως στους διαφορετικούς κλώνους εμφανίζει διαφορετική ένταση (**Εικόνα 24**). Γι' αυτό το λόγο υπάρχει η ποικιλία τιμών που εμφανίζονται ως ποσοστά κυττάρων που εκφράζουν ανθρώπινη β-σφαιρίνη. Ως πιο αξιόπιστο μέτρο σύγκρισης θεωρείται η ένταση της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης (Mean Fluorescence Intensity - MFI) που κυμάνθηκε από 140% έως 540% σε σύγκριση με την αντίστοιχη τιμή των κυττάρων που δεν έχουν επιμολυνθεί και δεν εκφράζουν ανθρώπινη β-σφαιρίνη (αρνητικό δείγμα ελέγχου). Στην περίπτωση του κλώνου που φέρει 9 ενσωματωμένα ιϊκά αντίγραφα, το ποσοστό των κυττάρων που βρέθηκαν θετικά για την έκφραση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης ήταν 85% ενώ το MFI της έκφρασης αυτής υπολογίσθηκε σε 650% συγκριτικά με την αντίστοιχη τιμή του αρνητικού δείγματος ελέγχου.



Εικόνα 24. Παρουσίαση δύο αντιπροσωπευτικών κυτταρικών κλώνων MEL στους οποίους η έκφραση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης, όπως προκύπτει από ανάλυση κυτταρομετρίας ροής, προσεγγίζει και ξεπερνά αντίστοιχα εκείνης του θετικού

δείγματος ελέγχου (MEL-YAC-C20) και σε επίπεδο πληθυσμού θετικών κυττάρων για την ανθρώπινη β-σφαιρίνη αλλά και σε επίπεδο έντασης της έκφρασης του διαγονιδίου (MFI).

Η ανάλυση του MFI της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης από κάθε κυτταρικό κλώνο με τον αριθμό των ιικών αντιγράφων που ενσωματώνει έδειξε ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση ανάμεσα σε αυτά τα δύο στοιχεία (**Εικόνα 25**). Από το συνολικό αριθμό των κυτταρικών κλώνων που βρέθηκαν θετικοί για την ενσωμάτωση του διαγονιδίου της ανθρώπινης β-σφαιρίνης (25), παρατηρήθηκε έκφραση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης στο 60% (15).

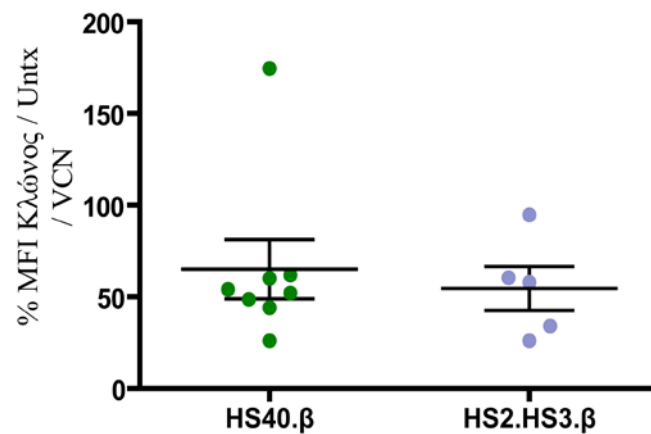


Εικόνα 25. Συσχέτιση της έντασης της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης, και του αριθμού των ιικών αντιγράφων. Με τον τρόπο αυτό αναδεικνύεται η θετική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα παραγωγής του πρωτεϊνικού προϊόντος και του αριθμού των ενσωματωμένων διαγονιδίων που είναι υπεύθυνα για αυτή την παραγωγή.

8. Σύγκριση της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης μεταξύ των αφοϊκών φορέων σε κυτταρικούς κλώνους MEL

Κύτταρα MEL που έχουν μετηχθεί με το φορέα HS2.HS3.β μετά από διαδοχικές αραιώσεις καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία 96 θέσεων με στόχο να απομονωθούν κυτταρικοί κλώνοι, με αντίστοιχο τρόπο με αυτόν που έχει περιγραφεί. Οι κλώνοι ελέγχθηκαν με αντίδραση PCR και όσοι βρέθηκαν να έχουν ενσωματώσει αντίγραφα από τον αφοϊκό φορέα, τοποθετήθηκαν σε καλλιέργεια παρουσία 2% DMSO προκειμένου να προαχθεί η ερυθροειδική διαφοροποίησή τους και ελέγχθηκαν για την παραγωγή της ανθρώπινης β-σφαιρίνης μέσω κυτταρομετρίας ροής. Επίσης, μελετήσαμε τον αριθμό των ιικών αντιγράφων του κάθε κλώνου και τα συσχετίσαμε με τα επίπεδα έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης που παράγουν, όπως αυτά προέκυψαν με αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου. Η παραγωγή της ανθρώπινης β-σφαιρίνης εκφράστηκε σαν ποσοστιαία αύξηση στην ένταση της έκφρασης (mean fluorescence intensity, MFI) των κυτταρικών κλώνων MEL ως προς την ένταση του αρνητικού δείγματος ελέγχου (μη μετηγμένα MEL) διορθωμένη ως προς τον αριθμό των ιικών αντιγράφων (vector copy number - VCN) [% (MFI κλώνου / δείγμα ελέγχου) / VCN].

Οι κυτταρικοί κλώνοι MEL που προέκυψαν από τη μεταγωγή με το φορέα HS40.β παράγουν ανθρώπινη β-σφαιρίνη σε επίπεδα της τάξεως του 65% της αντίστοιχης παραγωγής του θετικού κλώνου MEL-YAC-C20 ανά ενσωματωμένο ιικό αντίγραφο. Η αντίστοιχη έκφραση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης στους κυτταρικούς κλώνους που είχαν υποστεί μεταγωγή με το φορέα HS2.HS3.β αγγίζει το 55% του θετικού κλώνου MEL-YAC-βGLO ανά ενσωματωμένο ιικό αντίγραφο. Όπως προκύπτει από την ανάλυση, οι δύο αφοϊκοί φορείς παράγουν ικανή ποσότητα ανθρώπινης β-σφαιρίνης, τα επίπεδα έκφρασης είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους και ως εκ τούτου οι φορείς HS40.β και HS2.HS3.β κρίνονται εξίσου αποτελεσματικοί στη παραγωγή της ανθρώπινης β-σφαιρίνης στην ερυθροκυτταρική σειρά MEL (Εικόνα 26).



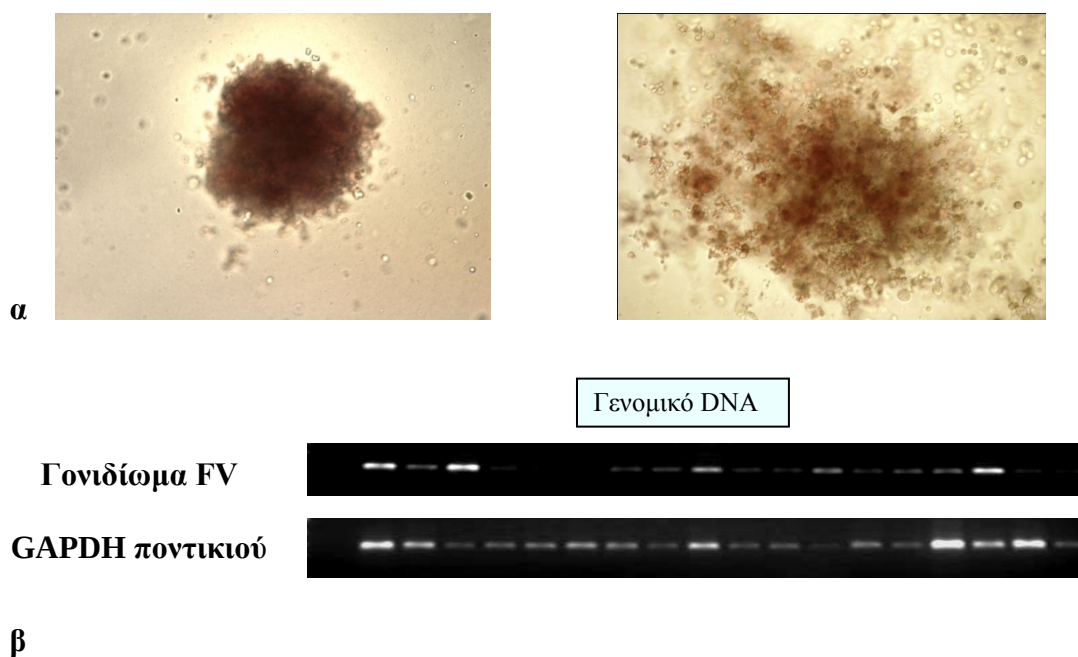
Εικόνα 26. Η παραγωγή της ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε κυτταρικούς κλώνους MEL, εκφράζεται ως ποσοστό αύξησης της έκφρασης ως προς το αρνητικό δείγμα ελέγχου ανά ιικό αντίγραφο (μη μετηγμένα κύτταρα MEL). Η μέση τιμή έκφρασης της β-σφαιρίνης είναι 65% και 55% για τους κλώνους που έχουν μετηχθεί με τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β, αντίστοιχα.

9. Μεταγωγή αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων ποντικίου

Η μελέτη της δράσης των αφοϊκών φορέων σε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα έγινε με τη χρήση ποντικών του στελέχους C57BL/6J Hbb^{th3/+} οι οποίοι αποτελούν το μοντέλο β-θαλασσαιμίας στον ποντικό. Προκειμένου να απομονωθούν τα AAK, στον πληθυσμό των κυττάρων του μυελού των οστών πραγματοποιήθηκε αρνητική επιλογή των κυττάρων Lin⁻, των κυττάρων δηλαδή εκείνων που δεν έχουν διαφοροποιηθεί προς κάποιο κυτταρικό τύπο αλλά διατηρούν την ικανότητα διαφοροποίησής τους προς όλους τους κυτταρικούς τύπους. Τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε μεταγωγή με τους ιικούς φορείς HS40.β και HS2.HS3.β και την επόμενη ημέρα συλλέγησαν και εισήχθησαν σε ημιστερεές καλλιέργειες μεθυλκυτταρίνης σε συγκέντρωση $5 \times 10^3/\text{ml}$. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε καλλιέργεια μεθυλκυτταρίνης για 10 ημέρες και τη 10^η ημέρα έγινε η συλλογή των διαφορετικών, πρόδρομων ερυθροειδικών αποικιών BFU-E (**Εικόνα 27α**).

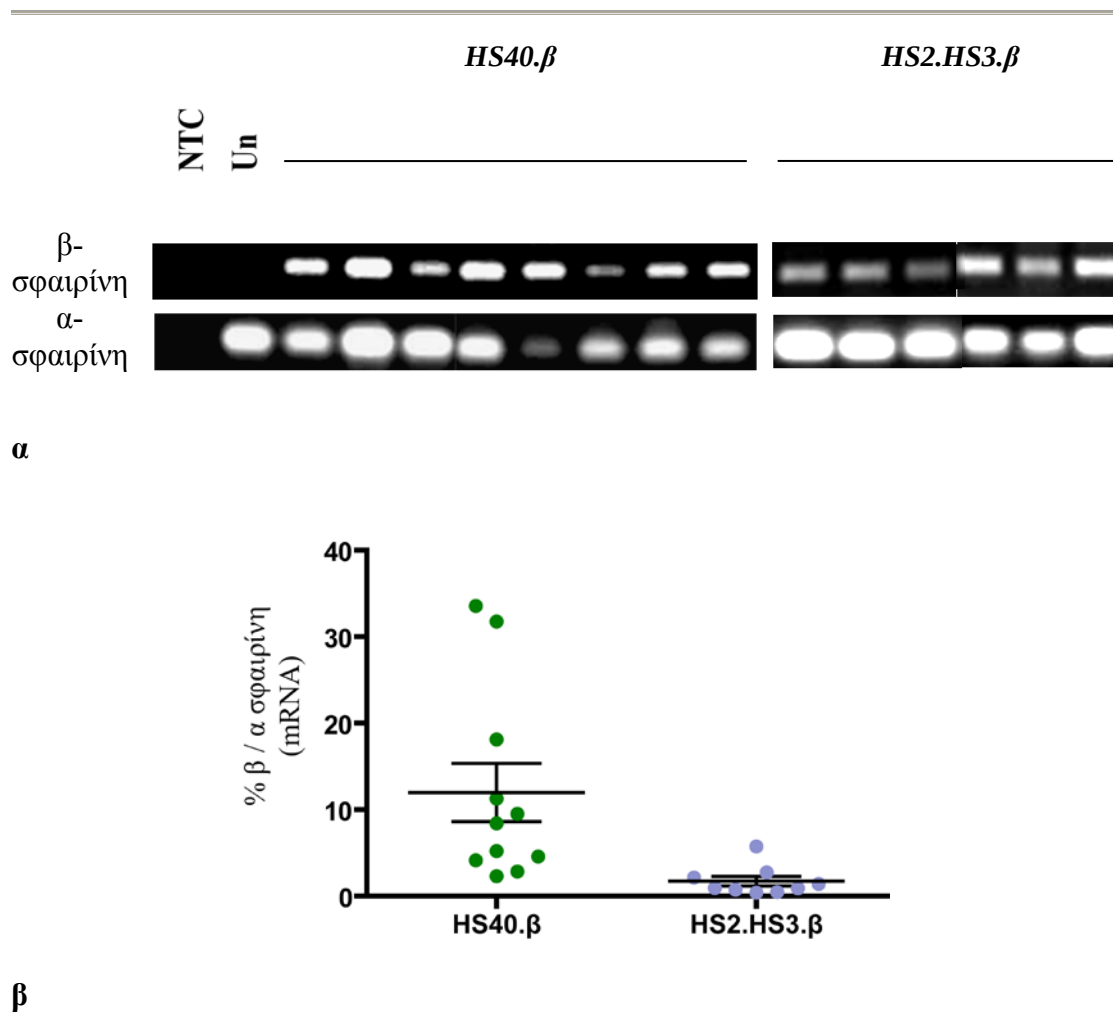
Από κάθε μία αποικία BFU-E απομονώθηκε DNA και ελέγχθηκε με την μέθοδο της PCR για την ανίχνευση του ενσωματωμένου αφροϊκού φορέα. Με αυτό τον τρόπο έγινε η επιλογή των αποικιών που έχουν μετηχθεί επιτυχώς και κατά συνέπεια φέρουν το διαγονίδιο της ανθρώπινης β-σφαιρίνης. Το επίπεδο της επιτυχημένης μεταγωγής των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, όπως προέκυψε από το ποσοστό των αποικιών BFU-E που έφεραν στο γονιδιώμά τους ενσωματωμένους αφροϊκούς φορείς, ήταν το 45% (MOI ~20) (**Εικόνα 27β**).

Οι αποικίες που είχαν ενσωματωμένους αφροϊκούς φορείς, ελέγχθηκαν με τη μέθοδο της PCR με αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcription-PCR) για την ανίχνευση του mRNA της β-σφαιρίνης καθώς και της ενδογενούς α-σφαιρίνης του ποντικού (γονίδιο αναφοράς). Από τις αποικίες BFU-E που ελέγχθηκαν, το 75% βρέθηκε να εκφράζει mRNA της β-σφαιρίνης (**Εικόνα 27α**).



Εικόνα 27. α. Εικόνες ανάστροφου μικροσκοπίου που δείχνουν την μορφή των αποικιών BFU-E τη 10^η ημέρα καλλιέργειας σε επιφάνεια μεθυλκυτταρίνης. **β.** Ανάλυση PCR γενομικού DNA των διαφορετικών αποικιών BFU-E για την ανίχνευση του ενσωματωμένου γονιδιώματος του αφροϊκού φορέα.

Όσες από τις αποικίες παρουσιάζουν έκφραση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης υποβλήθηκαν σε PCR πραγματικού χρόνου για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων των μεταγράφων της ενδογενούς α-σφαιρίνης του ποντικίου και της ανθρώπινης β-σφαιρίνης που παράγεται από τους αφοιτικούς φορείς. Η σχετική ποσοτικοποίηση μεταξύ των δύο αλυσίδων των σφαιρινών έγινε με την μέθοδο $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Από την ανάλυση αυτή προέκυψε ότι ο φορέας HS2.HS3.β επιτυγχάνει μέση έκφραση 2% (0.5% - 5.8%) της ανθρώπινης β-σφαιρίνης ως προς την ενδογενή α-σφαιρίνη του ποντικίου. Τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης με το φορέα HS40.β ήταν κοντά στο 12% (2.3% - 33.6%). Όπως προκύπτει από τη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης, ο φορέας HS40.β αποδεικνύεται αισθητά πιο αποδοτικός στην παραγωγή της ανθρώπινης β-σφαιρίνης συγκριτικά με το φορέα HS2.HS3.β στο περιβάλλον των ΑΑΚ του ποντικίου (**Εικόνα 28β**).



Εικόνα 28. α. Ανάλυση με RT-PCR για την ανίχνευση της έκφρασης των μεταγράφων (mRNA) της ανθρώπινης β-σφαιρίνης και της α-σφαιρίνης του ποντικού σε διαφορετικές αποικίες BFU-E. **β.** Έκφραση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε ερυθροειδικές αποικίες ποντικού BFU-E. Η παραγωγή της β-σφαιρίνης, σε επίπεδο μεταγράφων, εκφράζεται ως ποσοστό της έκφρασης της ενδογενούς α-σφαιρίνης του ποντικού. Η σχετική αυτή έκφραση για αποικίες BFU-E που ενσωματώνουν τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β ανήλθε σε 12% και 2% κατά μέσο όρο, αντίστοιχα.

10. Απομόνωση κυττάρων εμβρυϊκού ήπατος

Η δυσκολία στην αναπαραγωγή της αποικίας των ποντικών $Hbb^{th-3/+}$ και η καθυστέρηση που αυτή θα προκαλούσε στην πραγματοποίηση των πειραμάτων από την έλλειψη ΑΑΚ από ενήλικα ζώα ήταν ο λόγος που στραφήκαμε σε εναλλακτικές πηγές απομόνωσης ΑΑΚ. Μία από τις σημαντικότερες πηγές ΑΑΚ είναι το εμβρυϊκό ήπαρ.

Κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης στον ποντικό υπάρχουν διαφορετικά όργανα που εξυπηρετούν τις αυξημένες ανάγκες διαφοροποίησης των αρχέγονων κυττάρων που στην συνέχεια θα σχηματίσουν το έμβρυο. Η αυξημένη ερυθροποίηση που παρατηρείται στο έμβρυο του ποντικού συντελείται από τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα που αρχικά εντοπίζονται στο λεκιθικό σάκο και στην περιοχή της αορτής-γονάδων-μεσόνεφρων (Yolk Sack - YS και Aorta Gonad Mesonephr - AGM) μεταξύ της 7^{ης} και 10^{ης} ημέρας της κύησης ενώ από την 11^η ημέρα, τα ΑΑΚ μεταναστεύουν και αποικίζουν το εμβρυϊκό ήπαρ και το θύμο αδένα. Από την ημέρα της γέννησης του εμβρύου τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα εντοπίζονται στο μυελό των οστών του ποντικού.^{153,154,155} Τα κύτταρα του εμβρυϊκού ήπατος (KEH) αποτελούν σημαντική πηγή αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων και χρησιμοποιούνται εναλλακτικά του μυελού των οστών ως πηγή απομόνωσής τους. Από προηγούμενη μελέτη των Morrison et al. (1995) είναι γνωστό ότι από το σύνολο των ηπατικών κυττάρων, ο πληθυσμός των ΑΑΚ παρουσιάζεται θετικός για την έκφραση του αντιγόνου επιφανείας Mac-1 (σύμπλοκο CD18/CD11b).¹⁵⁶ Το γεγονός αυτό αξιοποιήσαμε εμείς απομονώνοντας τα κύτταρα CD11b+ από τον ολικό πληθυσμό των κυττάρων του εμβρυϊκού ήπατος. Τα κύτταρα αυτά στην συνέχεια υπόκεινται σε μεταγωγή με αντίστοιχο πρωτόκολλο όπως και με τα κύτταρα από το μυελό των οστών.

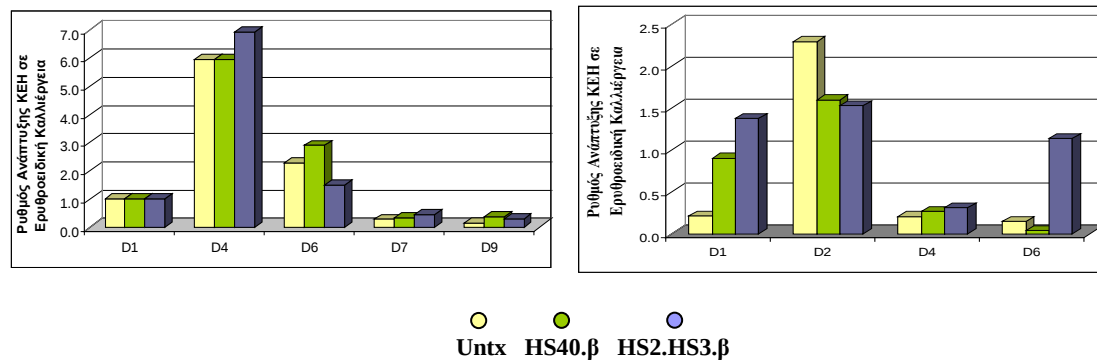
Θηλυκά διαγονιδιακά ποντίκια $Hbb^{th-3/+}$ (σειρά C57BL/6J) τα οποία είχαν διασταυρωθεί με αρσενικά ποντίκια του ίδιου στελέχους και διένυαν την 13.5 ημέρα της κύησης, θυσιάστηκαν και τα έμβρυα που κυοφορούσαν απομονώθηκαν χειρουργικά. Από τα έμβρυα αυτά έγινε η εξαγωγή του εμβρυϊκού ήπατος και απομονώθηκαν όλα τα ηπατικά κύτταρα μετά από οσμωτική λύση των ερυθροκυττάρων. Μέρος αυτών των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του γονοτύπου των ζώων. Γι' αυτό το σκοπό, απομονώθηκε DNA και πραγματοποιήθηκε PCR με στόχο την ανίχνευση των γονιδίων της β-σφαιρίνης του

ποντικίου, της Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyl Transferase (HPRT) και της Testis-Specific Protein Y-encoded (TSPY). Ανιχνεύοντας ταυτόχρονα HPRT και το γονίδιο της ενδογενούς β-σφαιρίνης του ποντικίου μπορέσαμε να διακρίνουμε τα φυσιολογικά έμβρυα (Hbb⁺, HPRT⁻) από τα θαλασσαιμικά ενώ αυτά περαιτέρω διαχωρίζονται σε ετερόζυγα (Hbb⁺, HPRT⁺) και ομόζυγα (Hbb⁻, HPRT⁺). Τέλος, η ανίχνευση του γονιδίου TSPY ορίζει το φύλο του εμβρύου για την εκτίμηση του χιμαιρισμού στη μεταμόσχευση των κυττάρων του εμβρυϊκού ήπατος.

11. Υγρή καλλιέργεια ερυθροειδικής διαφοροποίησης αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων ποντικίου

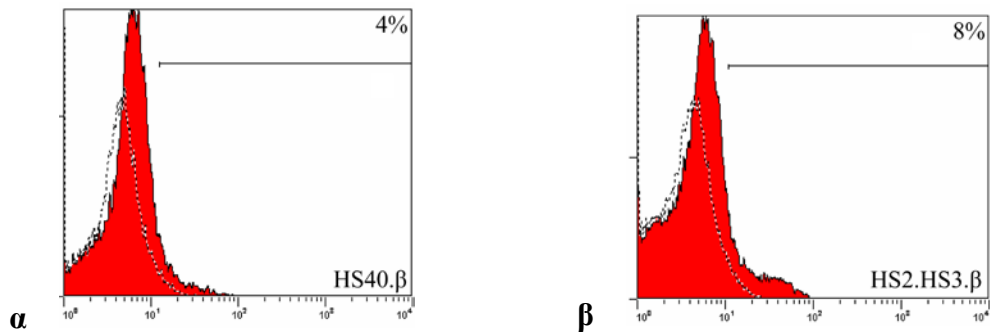
Τα θαλασσαιμικά κύτταρα εμβρυϊκού ήπατος συλλέγονται και επαναιωρούνται σε φρέσκο θρεπτικό υλικό μετά τη μεταγωγή τους (18-20 ώρες παρουσία συγκεντρωμένου ιϊκού αποθέματος). Τα κύτταρα στη συνέχεια τοποθετούνται σε υγρή καλλιέργεια παρουσία των κυτταροκινών Ερυθροποιητίνη (EPO), Παράγοντας Αρχέγονων Κυττάρων (Stem Cell Factor - SCF), και Δεξαμεθαζόνη (Dexamethason) οι οποίες προάγουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και ταυτόχρονα τα οδηγούν σε μερική ερυθροειδική διαφοροποίηση. Στα κύτταρα αυτά μετά από 8-10 ημέρες καλλιέργειας, γίνεται αλλαγή του υλικού καλλιέργειας και προστίθεται μόνο η EPO σε συγκέντρωση 5-10 U/ml. Τα κύτταρα παραμένουν στην καλλιέργεια για 3 ακόμα ημέρες προκειμένου να προαχθεί η τελική διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων σε ώριμα ερυθροκύτταρα.

Στην πράξη, τα θαλασσαιμικά κύτταρα του εμβρυϊκού ήπατος δεν ανταποκρίνονται θετικά στις συνθήκες της υγρής καλλιέργειας με τον αριθμό τους να φθίνει πολύ νωρίς, μην επιτρέποντας να πραγματοποιήσουμε μία ολοκληρωμένη ανάλυση της ερυθροποίησης αυτών των κυττάρων αλλά και της παραγωγής της ανθρώπινης β-σφαιρίνης καθώς επίσης και της βιωσιμότητάς τους. Σε δύο επαναλήψεις του πειράματος αυτού που έχουν πραγματοποιηθεί η πορεία των κυττάρων στην καλλιέργεια (ρυθμός ανάπτυξης) ήταν η ακόλουθη (**Εικόνα 29**).



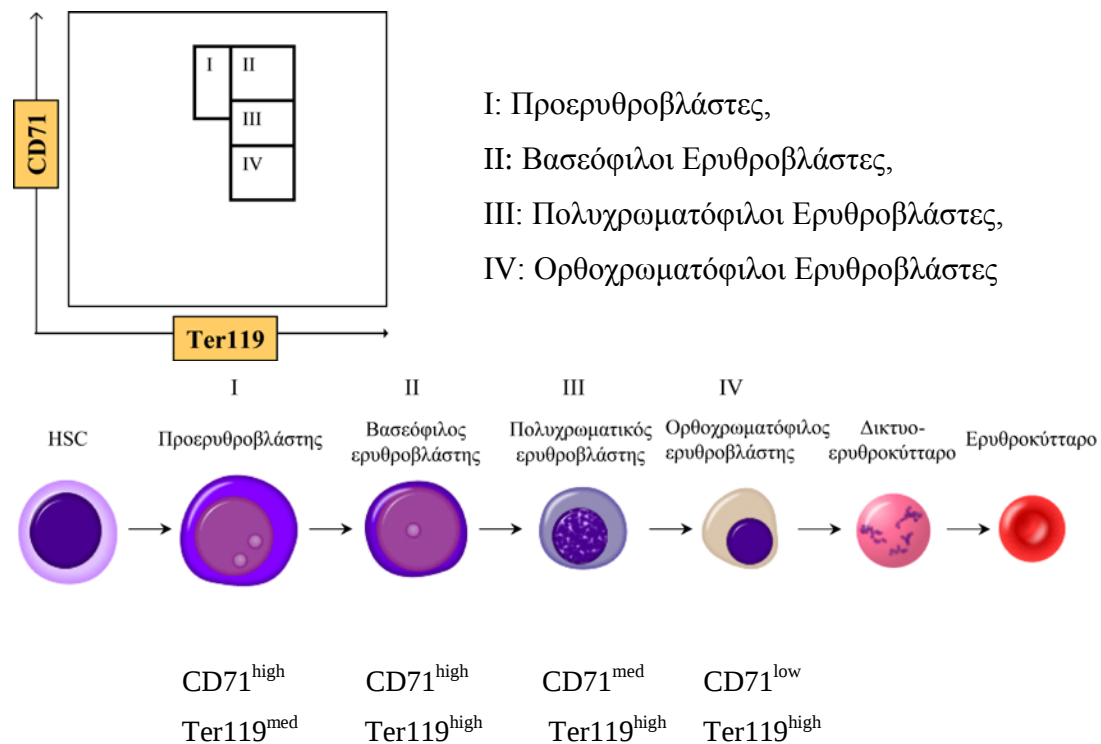
Εικόνα 29. Ρυθμός ανάπτυξης σε ερυθροειδική καλλιέργεια κυττάρων του εμβρυϊκού ήπατος σε δύο ανεξάρτητα πειράματα. Τα κύτταρα αυτά δεν ανταποκρίνονται θετικά στις συνθήκες καλλιέργειας *ex vivo* με αποτέλεσμα ο ρυθμός ανάπτυξης να είναι θετικός μέχρι την 4^η ημέρα. Ο αριθμός των κυττάρων μειώνεται αισθητά και μόνο όσο αυξάνεται η ερυθροειδική διαφοροποίηση διακρίνεται κάποια διαφορά στον ρυθμό αύξησης ανάμεσα στο θαλασσαιμικό δείγμα ελέγχου (Untx) και στα διορθωμένα δείγματα HS40.β και HS2.HS3.β.

Σε κάθε μία από τις δύο επαναλήψεις μπορέσαμε να μετρήσουμε τα επίπεδα της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης για τον ένα μόνο αφοιτικό φορέα καθότι δεν επαρκούσαν τα κύτταρα για αυτή την ανάλυση και για τους δύο φορείς. Στην πρώτη επανάληψη αυτό κατέστη εφικτό για το φορέα HS40.β ενώ στην δεύτερη έγινε μόνο για τον φορέα HS2.HS3.β (**Εικόνα 30**).



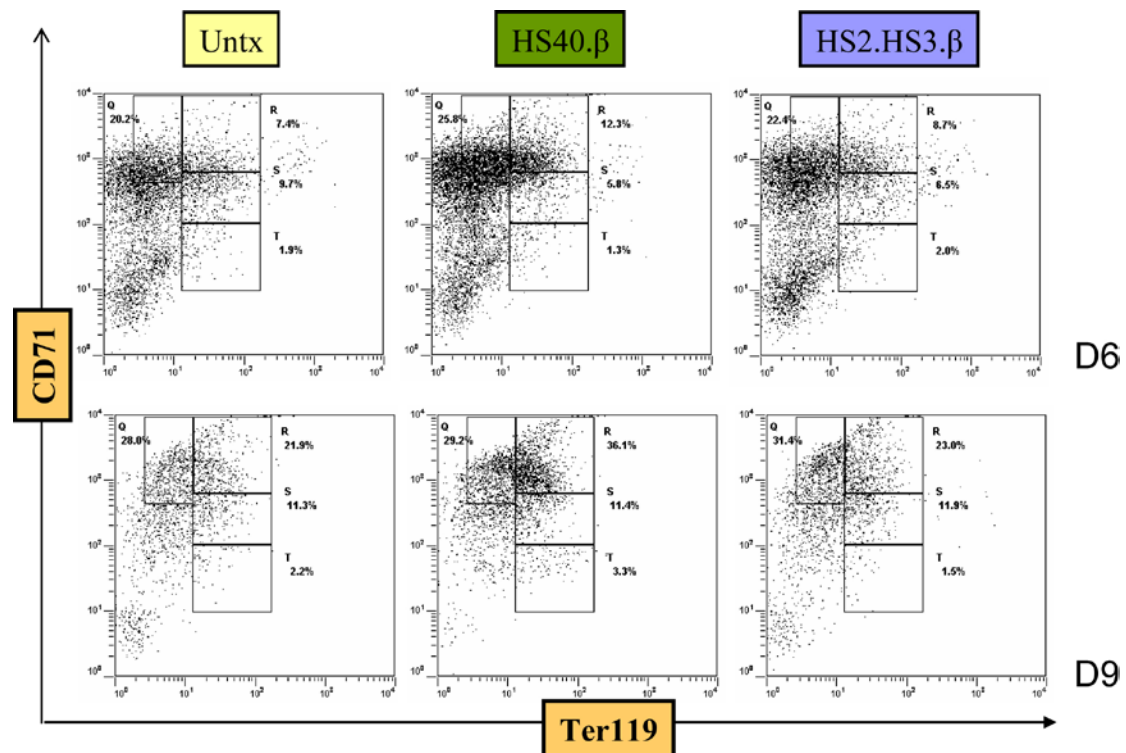
Εικόνα 30. Έκφραση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε ερυθροειδικές καλλιέργειες αρχέγονων κυττάρων ποντικού. Σε καλλιέργειες κυττάρων του εμβρυϊκού ήπατος που έχουν υποστεί μεταγωγή με τους αφοϊκούς φορείς HS40.β (**α**) και HS2.HS3.β (**β**) μετρήσαμε την έκφραση της β-σφαιρίνης η οποία σχετίζεται άμεσα με την διόρθωση του θαλασσαιμικού φαινοτύπου και την αύξηση της βιωσιμότητας των μετηγμένων κυττάρων.

Στην πρώτη επανάληψη ήταν δυνατή και η ανάλυση της ερυθροειδικής διαφοροποίησης των AAK του εμβρυϊκού ήπατος κάτι το οποίο είναι εφικτό μέσω ενός πρωτοκόλλου ανάλυσης που διαμόρφωσαν οι Socolovsky et al το 2001.¹⁴⁸ Οι δύο πιο κοινοί επιφανειακοί δείκτες ερυθροειδικής διαφοροποίησης στον ποντικό είναι το CD71 και το Ter119. Τα επίπεδα έκφρασης των δύο αντιγόνων μεταβάλλονται αντιστρόφως ανάλογα μεταξύ τους καθώς εξελίσσεται η ερυθροειδική διαφοροποίηση, δηλαδή τα πρόδρομα ερυθροειδικά κύτταρα, οι προερυθροβλάστες, χαρακτηρίζονται από υψηλή έκφραση του επιφανειακού μάρτυρα CD71 και χαμηλή έκφραση του Ter119. Καθώς προχωρά η ερυθροποίηση και οι προερυθροβλάστες διαφοροποιούνται σε βάσει-, πολύ-, όρθο-χρωματόφιλους και τελικώς σε ώριμα ερυθροκύτταρα η έκφραση του CD71 μειώνεται και τελικώς ελαχιστοποιείται ενώ αντίθετα η έκφραση του Ter119 επάγεται συνεχώς σε υψηλότερα επίπεδα. Τα τέσσερα αυτά στάδια της ερυθροειδικής διαφοροποίησης χαρακτηρίζονται με βάση αυτό το πρωτόκολλο ανάλυσης από τους εξής φαινοτύπους, όπως αυτοί διαμορφώνονται μέσω κυτταρομετρίας ροής, σε CD71^{high} Ter119^{med}, CD71^{high} Ter119^{high}, CD71^{med} Ter119^{high}, CD71^{low} Ter119^{high} (**Εικόνα 31**).



Εικόνα 31. Ανάλυση της ερυθροποίησης με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας τα αντιγόνα επιφανείας CD71 και Ter119. Ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασής τους ταξινομούνται σε 4 πεδία (I-IV) τα οποία αντιστοιχούν στα 4 επίπεδα ερυθροειδικής διαφοροποίησης.

Για την ανάλυση της ερυθροποίησης των ηπατικών AAK που καλλιεργούμε κάτω από συνθήκες ερυθροειδικής διαφοροποίησης πραγματοποιήσαμε χρώση με αντισώματα ενάντια στο CD71 και Ter119 και στην συνέχεια εφαρμόσαμε κυτταρομετρία ροής. Ο έλεγχος της ερυθροποίησης έγινε σε δύο χρονικά σημεία, κατά την έκτη (D6) και κατά την ένατη ημέρα (D9) της καλλιέργειας. Με βάση τη μέθοδο χρώσης που ακολουθήσαμε, φαίνεται (**Εικόνα 32**) ότι κατά την έκτη ημέρα της καλλιέργειας υπερισχύουν οι πρόδρομοι ερυθροβλάστες (στάδιο I) ενώ μέχρι την ένατη ημέρα έχουμε διαφοροποίηση κατά κύριο λόγο σε βασεόφιλους ερυθροβλάστες (στάδιο II).



Εικόνα 32. Ανάλυση της ερυθροειδικής διαφοροποίησης αρχέγονων κυττάρων ποντικού σε υγρή καλλιέργεια με χρώση για τα αντιγόνα επιφανείας CD71 και Ter119 και κυτταρομετρία ροής. Ο ορισμός των τεσσάρων πεδίων της γραφικής παράστασης που αντιστοιχούν στα τέσσερα στάδια ερυθροειδικής διαφοροποίησης ανέδειξε (α) τη σταδιακή διαφοροποίηση των κυττάρων από την 6^η στην 9^η ημέρα από $CD71^{high} Ter119^{med}$ προς $CD71^{high} Ter119^{high}$ και (β) τη βελτιωμένη ερυθροποίηση (υψηλότερο % $CD71^{high} Ter119^{high}$) των μετηγμένων κυττάρων συγκριτικά με τα θαλασσαιμικά κύτταρα ελέγχου (Untx).

Το συμπέρασμα που προκύπτει από αυτή την ανάλυση είναι ότι τα μετηγμένα κύτταρα με αφοριτικούς φορείς επιτυγχάνουν αυξημένη ερυθροποίηση συγκριτικά με τα μη μετηγμένα (untransduced - Untx) θαλασσαιμικά κύτταρα ελέγχου. Κατά την έκτη μέρα ο αριθμός των προερυθροβλαστών ($CD71^{high} Ter119^{med}$) είναι κατά 1.6 και 1.2 φορές αυξημένος ενώ και κατά την ένατη ημέρα ο αριθμός των βασεόφιλων ερυθροβλαστών είναι κατά 1.6 και 1.05 φορές αυξημένος για τα κύτταρα που έχουν μετηχθεί με τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β, αντίστοιχα. Αυτό το αποτέλεσμα

υποδηλώνει ότι η παραγωγή της ανθρώπινης β-σφαιρίνης μέσω των αφροϊκών φορέων επιφέρει ερυθροειδική διαφοροποίηση και μερική διόρθωση του θαλασσαιμικού φαινοτύπου τη στιγμή που τα θαλασσαιμικά κύτταρα ελέγχου, λόγω αδυναμίας παραγωγής αιμοσφαιρίνης, οδηγούνται ταχύτερα στην απόπτωση. Το δεύτερο συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι ο φορέας HS40.β επιτυγχάνει μεγαλύτερη διόρθωση του θαλασσαιμικού φαινοτύπου των κυττάρων του εμβρυϊκού ήπατος στον ποντικό σε σχέση με τον φορέα HS2.HS3.β κάτι που αναδεικνύεται από τα σαφώς αυξημένα ποσοστά των ερυθροειδικών κυτταρικών πληθυσμών (36% έναντι 23% CD71^{high} Ter119^{high}) (Εικόνα 32).

12. Έλεγχος των θαλασσαιμικών ποντικών ($Hbb^{th-3/+}$)

Το μοντέλο των θαλασσαιμικών ποντικών $Hbb^{th-3/+}$ δημιουργήθηκε από τους Smithies et al (1995) μετά την πλήρη αφαίρεση των β1 και β2 γονιδίων της β-σφαιρίνης.¹⁵⁷ Οι ελλείψεις των γονιδίων β1 και β2 της β-σφαιρίνης του ποντικού $Hbb^{th-3/+}$ δημιουργήθηκαν μετά από ομόλογο ανασυνδυασμό και στο σημείο αυτό από τη μέθοδο του ανασυνδυασμού έχουν εισαχθεί και διατηρούνται αλληλουχίες του ανθρώπινου γονιδίου HPRT. Τα ομόζυγα ποντίκια ως προς αυτές τις ελλείψεις ($Hbb^{th-3/th-3}$) εμφανίζουν φαινότυπο μείζονος β-θαλασσαιμίας ο οποίος είναι θνησιγενής στο έμβρυο με αποτέλεσμα τα έμβρυα να πεθαίνουν προτού γεννηθούν. Τα ετερόζυγα ποντίκια παρουσιάζουν τον φαινότυπο ενδιάμεσης β-θαλασσαιμίας με μειωμένα επίπεδα αιμοσφαιρίνης και αιματοκρίτη, σημαντικά μειωμένες τιμές μέσου όγκου ερυθροκυττάρων (MCV) και μέσης περιεκτικότητας αιμοσφαιρίνης (MCH), ενώ στο περιφερικό αίμα τα ερυθρά κύτταρα εμφανίζονται μικροκυτταρικά, υπόχρωμα και έχουν όλες τις μορφολογικές αλλοιώσεις της β-θαλασσαιμίας.

Η διασταύρωση των ποντικών $Hbb^{th-3/+}$ μεταξύ τους δίνει πολύ μικρό αριθμό απογόνων και για αυτό το λόγο υιοθετήθηκε η επιλογή της διασταύρωσης μεταξύ $Hbb^{th-3/+}$ και φυσιολογικών ποντικών του ίδιου στελέχους (C57BL/6J) και η χρήση των ετερόζυγων ζώων. Οι απόγονοι αυτής της διασταύρωσης ελέγχονται μετά από πραγματοποίηση τομής της άκρης της ουράς τους σε ηλικία 3-4 εβδομάδων και επιλέγονται τα ετερόζυγα θαλασσαιμικά ποντίκια, που αναμένονται σε ποσοστό 50%. Από το τμήμα της ουράς πραγματοποιείται απομόνωση γενομικού DNA ενώ με την

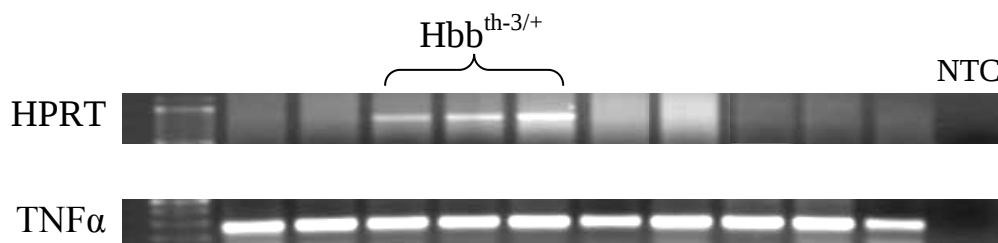
τομή συλλέγεται και μία μικρή ποσότητα περιφερικού αίματος η οποία και διατηρείται σε μικροσωληνάκι με αντιπηκτική ουσία. Το περιφερικό αίμα ξεπλένεται από την αντιπηκτική ουσία με φυσιολογικό ορό ή PBS και στην συνέχεια στρώνεται σε πλακίδιο όπου μονιμοποιείται με μεθανόλη και βάφεται διαδοχικά με τις χρωστικές ουσίες May Grunwald και Giemsa.

Το γενομικό υλικό του κάθε ποντικίου αναλύεται με αντίδραση PCR για την ανίχνευση των αλληλουχιών του ανθρώπινου γονιδίου HPRT που εισήχθησαν μετά τον ανασυνδυασμό.

(Ζεύγος Εκκινητών: F: 5'-GGCAAAGGATGTGATACGTGGAAG-3'

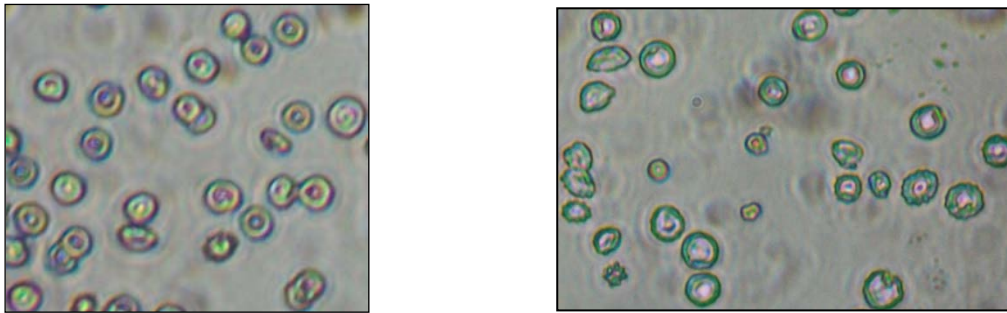
R: 5'-CCAGTTTCACTAATGACACAAACATG-3')

Κατά την ανάλυση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αгарόζης ελέγχεται η παρουσία ζώνης ειδικής για την αλληλουχία του ανθρώπινου γονιδίου HPRT (**Εικόνα 33**). Ο εντοπισμός μίας τέτοιας ζώνης αναδεικνύει τα ετερόζυγα δείγματα DNA και κατά συνέπεια τα ποντίκια $Hbb^{th-3/+}$.



Εικόνα 33. Αντίδραση PCR για την ανίχνευση των αλληλουχιών του ανθρώπινου γονιδίου HPRT οι οποίες εντοπίζονται στο γονιδίωμα των διαγονιδιακών ποντικίων $Hbb^{th-3/+}$. Η ύπαρξη δειγμάτων αρνητικού (Non Template Control-NTC) και θετικού ελέγχου (ενδογενές γονίδιο TNFα) επιτρέπουν την αξιολόγηση ψευδώς θετικών και ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων, αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα της PCR επαληθεύονται επίσης από την μελέτη των πλακιδίων περιφερικού αίματος στο μικροσκόπιο όπου τα ερυθροκύτταρα των θαλασσαιμικών ζώων εμφανίζουν την εικόνα των μικροκυτταρικών, υποχρωματικών ερυθροκυττάρων (**Εικόνα 34**).

**α****β**

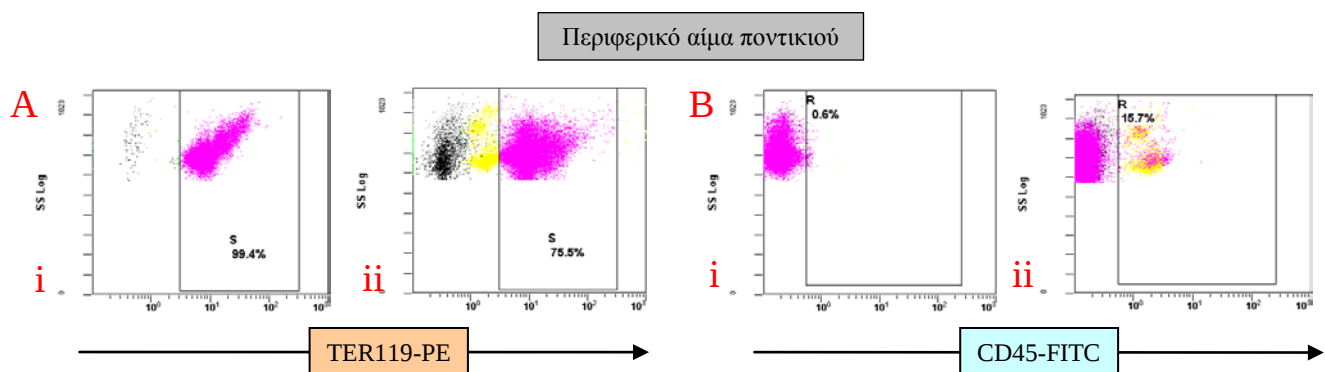
Εικόνα 34. Εικόνα από οπτικό μικροσκόπιο (1000X) του περιφερικού αίματος (**α**) φυσιολογικού και (**β**) θαλασσαιμικού ποντικίου $Hbb^{th-3/+}$.

13. Βελτιστοποίηση της κυτταρομετρίας ροής του περιφερικού αίματος

Θελήσαμε να ελέγξουμε τις παραμέτρους της κυτταρομετρίας ροής που θα εφαρμόσουμε προτού προχωρήσουμε στην ανίχνευση της ύπαρξης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης στο περιφερικό αίμα ποντικίου. Γνωρίζουμε ότι στο περιφερικό αίμα η πλειοψηφία των κυττάρων είναι ώριμα ερυθροκύτταρα αλλά θελήσαμε να ελέγξουμε σε τι βαθμό οι υπόλοιποι κυτταρικοί τύποι επηρεάζουν την εικόνα της κυτταρομετρίας ροής και αυτό γιατί ο κυτταρικός πληθυσμός στον οποίο περιορίζεται η έκφραση της β-σφαιρίνης είναι τα ερυθροκύτταρα.

Δείγματα περιφερικού αίματος ποντικίου βάφτηκαν με αντισώματα κατά των αντιγόνων TER-119 και CD45 που εμφανίζουν ειδικότητα ως προς τα ερυθρά και λευκά κύτταρα, αντίστοιχα. Το αποτέλεσμα που προέκυψε ήταν ότι το 99.4% των κυττάρων ήταν ερυθρά και μόλις το 0.6% λευκά (**Εικόνα 17Ai** και **17Bi**). Δείγματα του ίδιου περιφερικού αίματος υποβλήθηκαν σε μερική λύση των ερυθροκυττάρων μετά από επώαση με το αντίστοιχο διάλυμα. Τα δείγματα αυτά στην συνέχεια επωάστηκαν με τα αντισώματα κατά των αντιγόνων TER-119 και CD45 και

αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Ως αποτέλεσμα της μερικής λύσης των ερυθροκυττάρων, τα τελευταία αποτέλεσαν το 75.5% των συνολικών κυττάρων του δείγματος και τα λευκά κύτταρα το 15.7% αυξάνοντας κατά 25 φορές την συγκέντρωσή τους (**Εικόνα 35Aii** και **35Bii**).



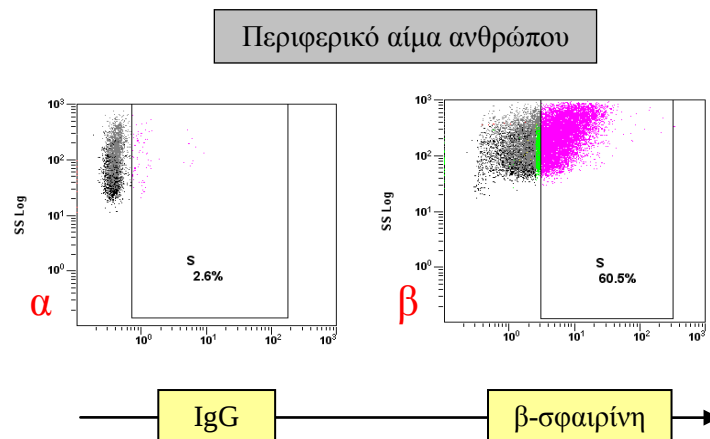
Εικόνα 35. Σήμανση περιφερικού αίματος ποντικού με αντισώματα κατά των αντιγόνων TER-119 (**Ai**) και CD45 (**Bi**) που ανιχνεύουν τα ερυθροκύτταρα και όλους τους αιμοποιητικούς κυτταρικούς τύπους πλην των ερυθροκυττάρων και των κυττάρων του πλάσματος, αντίστοιχα. Δίπλα τους βρίσκεται η ανάλυση των ίδιων δειγμάτων μετά από μερική λύση ερυθροκυττάρων (**Aii** και **Bii**).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα δείγματα περιφερικού αίματος δεν απαιτούν περαιτέρω επεξεργασία απαλλαγής από τους λοιπούς κυτταρικούς τύπους καθώς η συγκέντρωσή τους είναι αμελητέα, με τη συντριπτική πλειοψηφία των κυττάρων να είναι ερυθρά αιμοσφαίρια τα οποία και αποτελούν τον κυτταρικό στόχο προς ανάλυση.

Το επόμενο βήμα είναι ο έλεγχος της ανίχνευσης της κυτταροπλασματικής β-σφαιρίνης σε δείγματα ανθρώπινου περιφερικού αίματος μέσω ενδοκυττάριας σήμανσης. Δείγματα αίματος μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα 4% παραφορμαλδεΰδης και στη συνέχεια διανοίχθηκαν οι πόροι στην κυτταρική μεμβράνη. Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για την διάνοιξη των πόρων στα τοιχώματα των κυττάρων ήταν 1:4 μεθανόλης:ακετόνης αντί για 0.1% Triton X-100 το οποίο επέφερε αυξημένο ποσοστό κυτταρικού θανάτου (δεν παρουσιάζονται τα δεδομένα). Τέλος, τα κύτταρα επώαστηκαν με αντίσωμα κατά της ανθρώπινης β-σφαιρίνης στους 4°C γιατί η

επώαση είτε σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 37°C είχε σαν αποτέλεσμα μειωμένη ειδικότητα (δεν παρουσιάζονται τα δεδομένα).

Η χρώση θεωρείται επιτυχής όταν τα κύτταρα εμφανίζουν πλήρη μετατόπιση επί του ιστογράμματος που ανιχνεύεται η β-σφαιρίνη (άξονας x). Η μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος, όπως μετρήθηκε μετά από χρώση με τον ισότυπο IgG, ήταν της τάξεως του 2.5%. Η χρώση του δείγματος του ανθρώπινου περιφερικού αίματος με αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης β-σφαιρίνης έδειξε μία σχεδόν ολοκληρωτική μετατόπιση των κυττάρων στον άξονα των x, με το ποσοστό των κυττάρων που ξεπερνούν το κατώφλι της έκφρασης που έχουμε θέσει να είναι μεγαλύτερο του 60%. Ο λόγος που αυτό το ποσοστό δεν αγγίζει το 100% έχει να κάνει (1) με το πώς ορίζουμε το κατώφλι της έκφρασης με βάση την εικόνα του ισότυπου IgG και πόσο στενά τοποθετούμε το περίγραμμα (gate) στη χρώση ελέγχου και (2) με τη διαδικασία της ενδοκυττάριας χρώσης, η οποία έχει αρκετά στάδια στα οποία ο ανθρώπινος παράγοντας μπορεί να επηρεάσει οποιοδήποτε από τα στάδια μονιμοποίησης, της διάνοιξης των πόρων και της χρώσης και κατά συνέπεια και το τελικό αποτέλεσμα της χρώσης της β-σφαιρίνης (**Εικόνα 36**).



Εικόνα 36. Εσωτερική χρώση ανθρώπινου περιφερικού αίματος με αντίσωμα ισότυπικού ελέγχου (**α**) και κατά της ανθρώπινης β-σφαιρίνης (**β**).

14. Μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων σε μυϊκά μοντέλα β-θαλασσαιμίας

Η μελέτη της ικανότητας των αφοϋικών φορέων που εκφράζουν ανθρώπινη β-σφαιρίνη να διορθώσουν το θαλασσαιμικό φαινότυπο στο ζωικό μοντέλο της β-θαλασσαιμίας ελέγχθηκε μέσω μεταμόσχευσης γενετικώς διορθωμένων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων στο μοντέλο β-θαλασσαιμίας του ποντικίου $Hbb^{th-3/+}$, που χορηγήθηκε από τον καθηγητή Ν.Ανάγνου (ΕΚΠΑ, Ιατρική Σχολή). Τεχνικές δυσκολίες στη διασταύρωση του πειραματικού μοντέλου των ποντικών $Hbb^{th-3/th-3}$ (μικρός αριθμός ετερόζυγων απογόνων) μας οδήγησαν στη χρήση θηλυκών ποντικών C57BL/6J $Hbb^{th-3/+}$ για λήψη μυελού των οστών και αρσενικών C57BL/6J για δέκτες της μεταμόσχευσης κυττάρων μυελού των οστών.

Απομονώσαμε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα από τα διαγονιδιακά ποντίκια $Hbb^{th-3/+}$, τα καλλιεργήσαμε παρουσία συγκεντρωμένων ιικών αποθεμάτων για 16-20 ώρες και την επομένη χορηγήσαμε αυτά τα κύτταρα ενδοφλεβίως σε μερικώς μυελοκατεσταλμένα (με χρήση Busilvex) φυσιολογικά ποντίκια δέκτες του ίδιου στελέχους αλλά διαφορετικού φύλου. Η προέλευση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων του ποντικίου ήταν είτε από μυελό των οστών ώριμων θαλασσαιμικών ποντικών (Lin^-) ή από το εμβρυϊκό ήπαρ, μία νέα προσέγγιση που βασίστηκε στη μελέτη των Rivella et al. (2003).¹⁵⁸ Για τη χρήση AAK εμβρυϊκού ήπατος, επιλέχτηκαν ομόζυγα θαλασσαιμικά έμβρυα ($Hbb^{th-3/th-3}$), ενώ σε κάθε περίπτωση τα ποντίκια δέκτες ήταν φυσιολογικά ποντίκια του στελέχους C57BL/6J. Κατά την πειραματική προσέγγιση της χρησιμοποίησης των AAK του εμβρυϊκού ήπατος, η αντικατάσταση του ενδογενούς πληθυσμού των κυττάρων του μυελού των οστών από ομόζυγα θαλασσαιμικά AAK αναμένεται να έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία παραγωγής ώριμων ερυθροκυττάρων, την ανάπτυξη θαλασσαιμίας και τελικώς, το θάνατο. Αντιθέτως, αναμένεται οι μεταμοσχευμένοι δέκτες των AAK του εμβρυϊκού ήπατος τα οποία προηγούμενως έχουν μετηχθεί με τους αφοϋικούς φορείς που εκφράζουν ανθρώπινη β-σφαιρίνη να εμφανίζουν διορθωμένο φαινότυπο και κατά συνέπεια να ζουν χωρίς εμφανή προβλήματα και με βελτιωμένες αιματολογικές παραμέτρους.

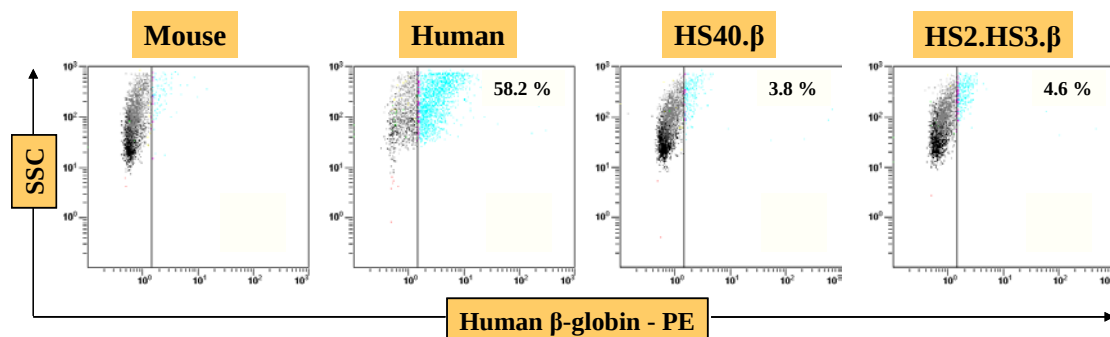
Αυτό που παρατηρήσαμε είναι ότι στις 16-25 εβδομάδες μετά την μεταμόσχευση, το ποσοστό χιμαιρισμού ήταν χαμηλό με μέσο επίπεδο κυττάρων δότη στο μυελό των οστών να κυμαίνεται κάτω του 50% (Μ.Ο: 47%, εύρος: 15-80%

n=9) ενώ σε μεγάλο αριθμό πειραματόζων ο χμαιορισμός κρίθηκε πολύ μικρός ώστε να αξιολογηθεί η βελτίωση των αιματολογικών παραμέτρων τους (0-15% n=9). Το αποτέλεσμα αποδόθηκε στην μερική (και όχι πλήρη) μυελοκαταστολή που επιτυγχάνουμε με την χορήγηση 4 δόσεων Busilvex σε ισάριθμες ημέρες πριν από την μεταμόσχευση. Η εναλλακτική μέθοδος (χορήγηση μυελοαφανιστικής δόσης ακτινοβολίας 10-12Gy), δεν είναι προς το παρόν διαθέσιμη στο ερευνητικό κέντρο. Η παρατήρηση του χαμηλού χμαιορισμού ήταν περισσότερο έκδηλη στην περίπτωση των ποντικών που μεταμοσχεύθηκαν με AAK του εμβρυϊκού ήπατος κάτι που ενδεχομένως να σχετίζεται με την αδυναμία επιβίωσης των ομόζυγων θαλασσαιμικών κυττάρων εν αντιθέσει με τα Lin⁻ που προέρχονται από ενήλικα ετερόζυγα θαλασσαιμικά ζώα. Σε δύο περιπτώσεις επιτυχημένης μεταμόσχευσης μη διορθωμένων ομόζυγων θαλασσαιμικών κυττάρων εμβρυϊκού ήπατος τα ποντίκια εμφάνισαν φαινότυπο βαριάς αναιμίας (RDW 25-35, υπερμεγέθους σπλήνας, μειωμένη κινητικότητα και καχεξία) και τελικά απεβίωσαν μετά από 8-9 εβδομάδες. Το γεγονός αυτό έδειξε μεν την ορθότητα της πειραματικής μας προσέγγισης και την εν δυνάμει ικανότητα της προσέγγισης αυτής να προσομοιάσει τις συνθήκες βαριάς β-θαλασσαιμίας, στην πράξη όμως τα AAK του εμβρυϊκού ήπατος δεν εμφανίζουν επιτυχημένη ικανότητα αιμοποιητικής αναγέννησης μετά από μεταμόσχευση ενώ είναι σχετικά μειωμένα και τα επίπεδα γονιδιακής μεταφοράς.

15. Διόρθωση του θαλασσαιμικού φαινοτύπου σε μεταμοσχευμένα ποντίκια με γενετικά διορθωμένα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα

Τα κύτταρα του μυελού των οστών που απομονώθηκαν από ποντίκια C57BL/6J Hbb^{th-3/+} υποβλήθηκαν αρχικά σε επιλογή των αρχέγονων κυττάρων Lin⁻ και στην συνέχεια σε μεταγωγή με τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β με MOI≤10. Τα ποντίκια στελέχους C57BL/6J υποβλήθηκαν σε μυελοκαταστολή με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση Busilvex επί τέσσερις ημέρες σε δόσεις τελικής συγκέντρωσης 20mg/kg/ημέρα (d -4 έως d -1). Την επόμενη ημέρα της μεταγωγής τα ιικά αποθέματα αφαιρέθηκαν μετά από δύο πλύσεις με PBS και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε PBS. Κατά προσέγγιση, 1×10^5 μετηγμένα κύτταρα χορηγήθηκαν ενδοφλέβια στα μυελοκατεσταλμένα ποντίκια C57BL/6J.

Στα μεταμοσχευμένα ποντίκια έγιναν αιμοληψίες από την ουρά τους προκειμένου να ελεγχθούν τα επίπεδα των αιμοσφαιρινών στο περιφερικό αίμα και τελικά μετά από 4 μήνες παρακολούθησης, θυσιάστηκαν. Τα ποσοστά των κυττάρων του δότη αναλύθηκαν με PCR πραγματικού χρόνου για την ανίχνευση του χρωμοσώματος Υ και κυμάνθηκαν από 0% έως 57%. Μεταξύ της πρώτης ομάδας πειραματόζωων που παρακολουθήθηκαν και θυσιάστηκαν υπήρξε ένα ζώο από κάθε αφορικό φορέα που εμφάνισε αποδεκτά ποσοστά μεταμόσχευσης της τάξεως του 16.8% και 57.4%, για τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β, αντίστοιχα (**Εικόνα 37**).



Εικόνα 37. Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης στο περιφερικό αίμα ποντικών που έχουν μεταμοσχευθεί με μετεγγμένα κύτταρα Lin⁻ του μυελού των οστών. Η έκφραση που προέρχεται από τα μεταμοσχευμένα Lin⁻ που έχουν υποστεί μεταγωγή με τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β συγκρίνεται με θετικό δείγμα ελέγχου ανθρώπινου περιφερικού αίματος. Ως αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιείται περιφερικό αίμα μη μεταμοσχευμένου ποντικού.

Το περιφερικό αίμα των ποντικών ελέγχθηκε με κυτταρομετρία ροής για την ανθρώπινη β-σφαιρίνη. Τα ποσοστά των ερυθρών κυττάρων που εξέφραζαν ανθρώπινη β-σφαιρίνη στο περιφερικό αίμα των δύο ζώων ήταν 3.8% και 4.6% για τα ποντίκια που μεταμοσχεύτηκαν με τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β, αντίστοιχα. Το αντίστοιχο ποσοστό στο ανθρώπινο περιφερικό αίμα που μπορούσε να ανιχνευτεί με τη μέθοδό μας ήταν 58%. Η ένταση της έκφρασης (MFI) της ανθρώπινης β-σφαιρίνης στα δείγματα των δύο ποντικών (εκφραζόμενη ως ποσοστό της

αντίστοιχης έκφρασης του δείγματος ελέγχου) ήταν της τάξης του 33% και 32% για τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β, αντίστοιχα (**Εικόνα 38**).

	Control	HS40.β	HS2.HS3.β
% Χιμαιρισμός (Y)	-	16.8	57.4
Αριθμός ιϊκών αντιγράφων (VCN)	-	1.0	0.3
MFI / θετικό δείγμα	-	33%	32%
RBC	10.5x10 ⁶ /μl	11x10 ⁶ /μl (↑4.7%)	12.5x10 ⁶ /μl (↑19.0%)
HGB	15.9g/dl	16.5g/dl (↑3.8%)	18.9g/dl (↑18.8%)
HCT	43.8%	45.9% (↑2.1%)	52.5% (↑8.7%)
Μέγεθος σπλήνα	0.0762gr	0.0734gr (↓3.7%)	0.0720gr (↓5.5%)

Εικόνα 38. Χαρακτηριστικά των μεταμοσχευμένων ποντικών. Αναφέρονται τα ποσοστά επιτυχημένου χιμαιρισμού, τα ιϊκά αντίγραφα που ενσωματώνονται ανά κύτταρο που προέρχεται από τα μετηγμένα κύτταρα Lin⁻, η ένταση της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης στα ποντίκια συγκριτικά με την αντίστοιχη έκφραση στο δείγμα θετικού ελέγχου και τέλος οι αιματολογικές παράμετροι (αριθμός ερυθροκυττάρων, συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης, αιματοκρίτης αλλά και το μέγεθος του σπλήνα).

Συγχρόνως το περιφερικό αίμα των ποντικών αναλύθηκε ως προς τις αιματολογικές του παραμέτρους και διαπιστώθηκε αύξηση του αριθμού των ερυθροκυττάρων (Red Blood Cell - RBC), του αιματοκρίτη (Hematocrit - HCT) και της αιμοσφαιρίνης (Hemoglobin - HGB) ως προς το δείγμα ελέγχου που δεν είχε υποστεί μεταγωγή με τους φορείς μας. Η αύξηση στην συγκέντρωση των ερυθροκυττάρων ήταν της τάξεως του 4.7% και 19% για τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β ενώ στα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης και του αιματοκρίτη η αύξηση ήταν 3.8% και 18.8% (HCT) καθώς και 2.1% και 8.7% (HGB) για τους δύο φορείς, αντίστοιχα. Μετά την θυσία των ζώων απομονώθηκαν οι σπλήνες τους και μετρήθηκε

το βάρος τους. Η μείωση στο βάρος των σπληνών των ζώων που είχαν μεταμοσχευτεί με κύτταρα μετηγμένα με τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β υπολογίσθηκε σε 3.7% και 5.5%, αντίστοιχα (**Εικόνα 38**).

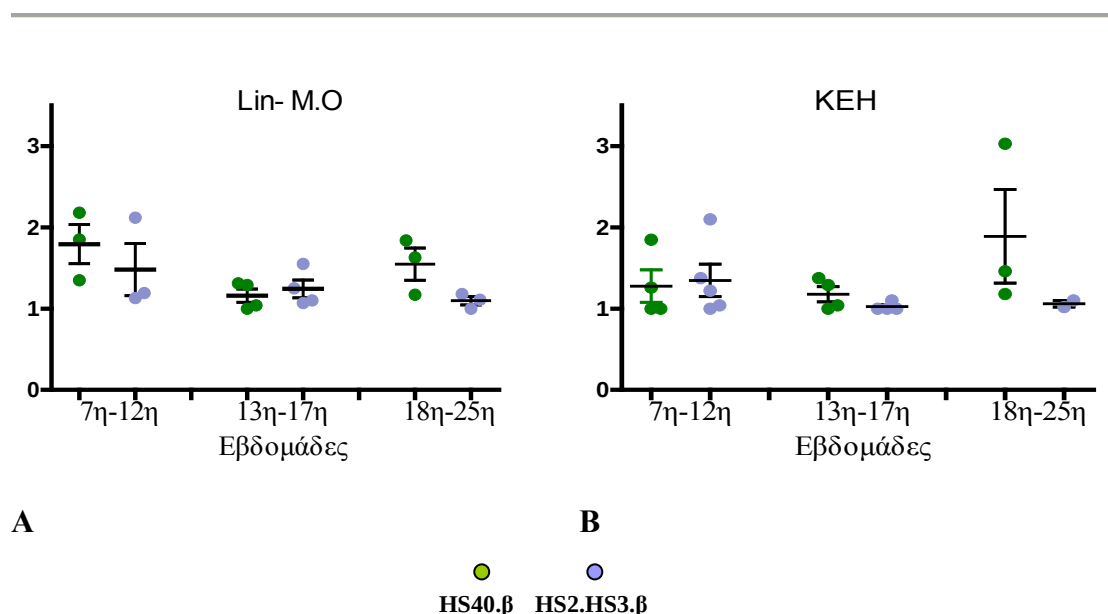
Τα μεταμοσχευμένα ποντίκια θανατώθηκαν μετά από 4 μήνες και τα κύτταρα του μυελού των οστών συλλέχθηκαν μετά την θανάτωση των ζώων. Από τα κύτταρα αυτά απομονώθηκε DNA το οποίο και υποβλήθηκε σε PCR πραγματικού χρόνου για το χρωμόσωμα Υ. Από την αντίδραση PCR υπολογίσθηκε το ποσοστό των μεταμοσχευμένων κυττάρων στα ποντίκια. Με μία δεύτερη αντίδραση PCR για την ανίχνευση των αφοϋικών φορέων υπολογίσθηκε και ο αριθμός των ιικών αντιγράφων που ενσωματώθηκαν στα μετηγμένα κύτταρα του μυελού των οστών. Η τιμή αυτή (Vector Copy Number-VCN) υπολογίσθηκε σε 1 ιικό αντίγραφο ανά μεταμοσχευμένο κύτταρο για τα κύτταρα που υπέστησαν μεταγωγή με τον φορέα HS40.β και 0.3 για τα αντίστοιχα κύτταρα που υπέστησαν μεταγωγή με τον φορέα HS2.HS3.β (**Εικόνα 38**).

Τα πειραματικά μοντέλα των ποντικών $Hbb^{th-3/+}$ έδειξαν βελτίωση σε όλες τις αιματολογικές παραμέτρους καθώς και μερική διόρθωση του θαλασαιμικού φαινοτύπου μέσω της παραγωγής της ανθρώπινης β-σφαιρίνης από τα μετηγμένα κύτταρα που τους μεταμοσχεύτηκαν. Η πρώτη εικόνα που δόθηκε για τη διόρθωση του θαλασαιμικού φαινοτύπου *in vivo* είναι ενθαρρυντική αλλά χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση καθώς η διαφορά στα επίπεδα του εποικισμού από τα κύτταρα δότη είναι μεγάλη και το δείγμα μικρό.

16. *In vivo* παραγωγή ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε μεταμοσχευμένα ποντίκια με γενετικά διορθωμένα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα

Η μέτρηση της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης στο περιφερικό αίμα των μεταμοσχευμένων ποντικών έγινε σε τρεις περιόδους της ζωής τους, στην αρχική φάση μετά τη μεταμόσχευση (7^η-12^η εβδομάδα), σε μία ενδιάμεση φάση (13^η-17^η εβδομάδα) και με τη λήξη του πειράματος (18^η-25^η εβδομάδα). Στην περίπτωση των δεκτών που πήραν διορθωμένα AAK του εμβρυϊκού ήπατος, παρατηρήσαμε ότι μόνο ένας μικρός αριθμός ζώων είχε χιμαιρική αιμοποίηση και παρουσίαζε έκφραση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε αρκετά χαμηλά επίπεδα αλλά σε σταθερή βάση κατά τη διάρκεια της ζωής των ποντικών. Οι δύο φορείς (HS40.β και HS2.HS3.β) έδειξαν

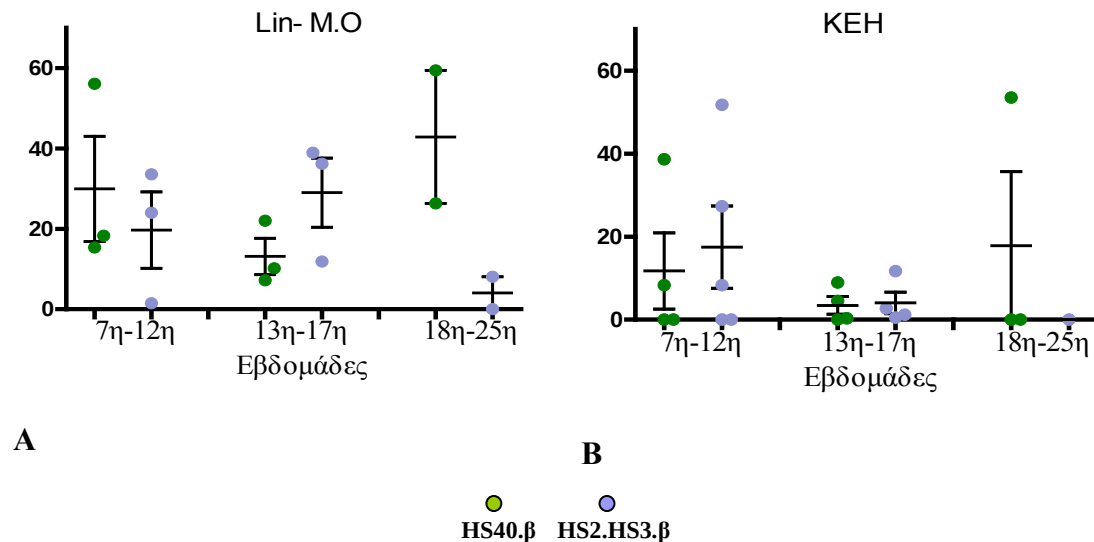
παρεμφερή επίπεδα έντασης της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης στο περιφερικό αίμα των ποντικών σε σύγκριση τόσο με ποντίκια ελέγχου (φορές αύξησης του MFI ως προς το αρνητικό δείγμα ελέγχου: 1.64x έναντι 1.12x) όσο και ποσοστά έκφρασης αναφορικά με τα αντίστοιχα επίπεδα ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε ανθρώπινο περιφερικό αίμα που χρησιμοποιήθηκε ως θετικό δείγμα ελέγχου (ποσοστό έκφρασης ως προς το ανθρώπινο δείγμα ελέγχου: 11.36% έναντι 7.17%) (**Εικόνα 39B & Εικόνα 40B**).



Εικόνα 39. Έκφραση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης στο μοντέλο του θαλασσαιμικού ποντικού. Η παραγωγή της β-σφαιρίνης εκφράζεται ως τιμή αύξησης της έντασης που προκύπτει από κυτταρομετρία ροής (MFI) στο περιφερικό αίμα μεταμοσχευμένων ποντικών με κύτταρα Lin⁻ (**A**) και κύτταρα του εμβρυϊκού ήπατος (KEH) (**B**) σε σχέση με φυσιολογικά ποντίκια.

Στην περίπτωση της χρησιμοποίησης των κυττάρων Lin⁻ του μυελού των οστών, τα ποσοστά χμαιορισμού και μεταγωγής είναι μεγαλύτερα. Τα επίπεδα έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης στο περιφερικό αίμα των μεταμοσχευμένων ποντικών με τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β φτάνουν το 26.6% και το 17.6% (με εύρος 7.2 % - 59.4 % και 1.5 % - 38.9 %) της αντίστοιχης έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε ανθρώπινο περιφερικό αίμα που χρησιμοποιείται ως θετικό δείγμα ελέγχου (**Εικόνα 40A**). Τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης συσχετιζόμενα με ποντίκια

ελέγχου αγγίζουν το 1.53x και 1.28x (εύρος 1.04x - 2.18x και 1.07x - 2.12x) εκφραζόμενα ως τιμές αύξησης της έντασης της έκφρασης (MFI) της ανθρώπινης β-σφαιρίνης και αφορούν τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β, αντίστοιχα (**Εικόνα 39Α**).

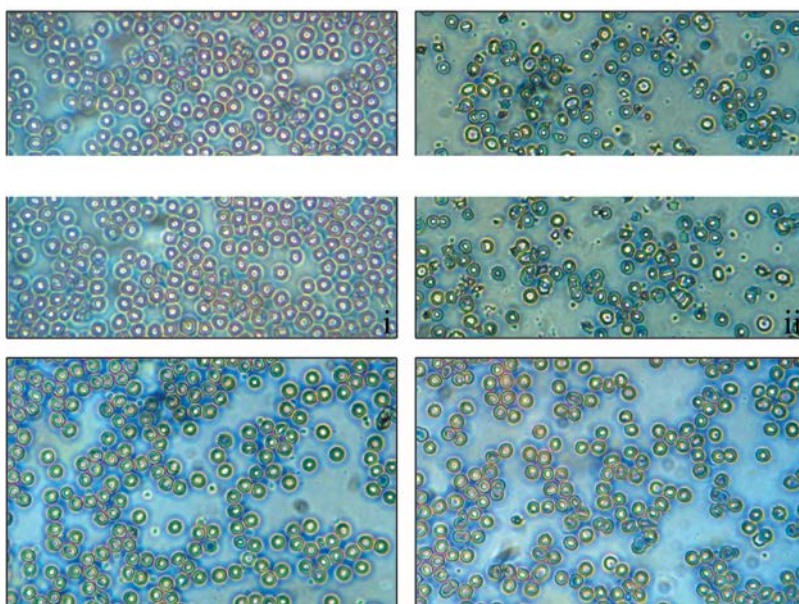


Εικόνα 40. Έκφραση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης στο μοντέλο του θαλασσαιμικού ποντικίου. Η παραγωγή της β-σφαιρίνης στο περιφερικό αίμα μεταμοσχευμένων ποντικών με κύτταρα Lin⁻ (**A**) και κύτταρα εμβρυϊκού ήπατος (KEH) (**B**) εκφράζεται εδώ ως ποσοστό της αντίστοιχης παραγωγής β-σφαιρίνης σε περιφερικό αίμα ανθρώπου το οποίο αποτελεί το θετικό δείγμα ελέγχου, όπως προκύπτει από κυτταρομετρία ροής

Σε γενικές γραμμές, παρατηρήσαμε ότι κατά τη διάρκεια της πειραματικής μελέτης υπήρξαν μεταβολές στο ποσοστό της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης, γεγονός που πιθανώς να οφείλεται στην ολιγοκλωνική αιμοποίηση που έχει τεκμηριωθεί στον ποντικό. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, στα διαφορετικά χρονικά σημεία της ζωής του κάθε ποντικίου υπάρχουν διαφορετικοί κυρίαρχοι κυτταρικοί κλώνοι που δίνουν γένεση σε ερυθροκύτταρα που θα εκφράζουν ή δεν θα εκφράζουν ανθρώπινη β-σφαιρίνη ανάλογα με το αν προήλθαν από μετηγμένα ΑΑΚ.

17. Βελτίωση των αιματολογικών παραμέτρων μετά από μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων

Με τη λήξη του πειράματος των μεταμοσχευμένων ποντικών έγινε συλλογή περιφερικού αίματος καθώς και του σπλήνα προκειμένου να ελεγχθεί η αποκατάσταση του θαλασσαιμικού φαινοτύπου και η βελτίωση των αιματολογικών παραμέτρων. Αρχικά ελέγχθηκε η μορφολογία των ερυθροκυττάρων μετά από χρώση May-Grunwald/Giemsa και παρατηρήσαμε ότι τα ποντίκια που είχαν μεταμοσχευθεί με αρχέγονα κύτταρα γονοτύπου $Hbb^{th-3/+}$ εμφάνιζαν μία παθολογική εικόνα β-θαλασσαιμίας με αιμοαραίωση, αποπτωτικά κύτταρα και ανισοκυττάρωση (**Εικόνα 41ii**). Την ίδια στιγμή ποντίκια που είχαν μεταμοσχευθεί με γενετικά διορθωμένα ΑΑΚ γονοτύπου $Hbb^{th-3/+}$, με τους αφοϋικούς φορείς, παρουσίασαν εικόνες μεγάλης βελτίωσης του θαλασσαιμικού φαινοτύπου (**Εικόνες 41iii και 41iv**) σε σύγκριση με ποντίκια που μεταμοσχεύθηκαν με φυσιολογικά κύτταρα (**Εικόνα 41i**).

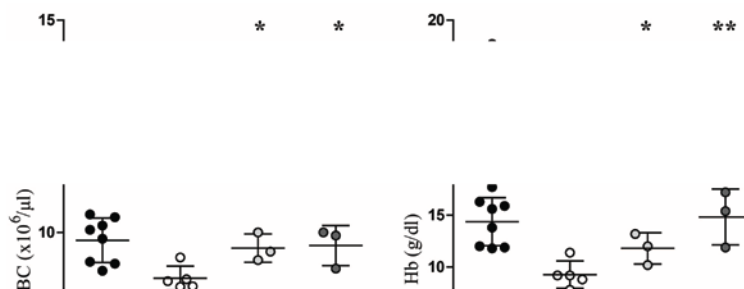


Εικόνα 41. Χρώση με May-Grunwald / Giemsa περιφερικού αίματος ποντικών που έχουν μεταμοσχευθεί με κύτταρα (i) φυσιολογικά, (ii) θαλασσαιμικά- $Hbb^{th-3/+}$, (iii) θαλασσαιμικά που έχουν μετηχθεί με το φορέα HS40.β και (iv) θαλασσαιμικά που έχουν μετηχθεί με το φορέα HS2.HS3.β (Μεγέθυνση x400). Τα ποντίκια που μεταμοσχεύθηκαν με γενετικά διορθωμένα ΑΑΚ (iii και iv) παρουσιάζουν μία βελτιωμένη εικόνα ερυθροκυττάρων, εγγύτερη της φυσιολογικής εικόνας υγιών ποντικών (i) παρά της παθολογικής εικόνας ποντικών με β-θαλασσαιμία (ii).

Το περιφερικό αίμα των ποντικών που υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση με γενετικά διορθωμένα AAK υποβλήθηκε σε αιματολογικές εξετάσεις και οι μετρήσεις συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες μετρήσεις ποντικών που είχαν υποβληθεί σε μεταμόσχευση με φυσιολογικά κύτταρα (WT) και με θαλασσαιμικά κύτταρα γονοτύπου Hbb^{th-3/+} (Thal). Σε όλες τις κατηγορίες που ελέγχθηκαν τα ποντίκια στα οποία έγινε έγχυση διορθωμένων αρχέγονων κυττάρων, με τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β, παρουσίασαν βελτίωση των παραμέτρων τους με την εικόνα τους να προσομοιάζει εκείνη των φυσιολογικών ποντικών (**Εικόνα 42**). Συγκεκριμένα, ο αριθμός των ερυθροκυττάρων (RBC) στα ποντίκια που εισήχθησαν τα HS40.β-AAK και τα HS2.HS3.β-AAK άγγιξε το 8.87×10^6 ($p=0.0179$ συγκριτικά με τα θαλασσαιμικά) και 9.06×10^6 ($p=0.0256$ συγκριτικά με τα θαλασσαιμικά) την στιγμή που οι αντίστοιχες τιμές στα φυσιολογικά και θαλασσαιμικά ποντίκια υπολογίστηκαν σε 9.44×10^6 και 6.69×10^6 . Την ίδια στιγμή η αιμοσφαιρίνη (Hb) που μετρήθηκε στο αίμα και για την παραγωγή της οποίας ευθύνονται οι φορείς HS40.β και HS2.HS3.β υπολογίστηκε σε 11.8 g/dl, $p=0.0469$ συγκριτικά με τα θαλασσαιμικά, και 14.8g/dl, $p=0.0069$ συγκριτικά με τα θαλασσαιμικά, αντίστοιχα, ενώ οι τιμές της αιμοσφαιρίνης σε φυσιολογικά ποντίκια ήταν 14.4g/dl και σε ποντίκια με β-θαλασσαιμία 9.3g/dl. Οι τιμές για τον αιματοκρίτη (HCT) και το μέσο όγκο ερυθροκυττάρων (MCV) ήταν και αυτές βελτιωμένες στα ποντίκια που μεταμοσχεύθηκαν με HS40.β-AAK και HS2.HS3.β-AAK σε σχέση με τα θαλασσαιμικά ποντίκια ελέγχου. Συγκεκριμένα οι τιμές του αιματοκρίτη για τα φυσιολογικά, θαλασσαιμικά και διορθωμένα ποντίκια-HS40.β και -HS2.HS3.β υπολογίστηκαν σε 40.8%, 26.7%, 38.5%, $p=0.0089$ συγκριτικά με τα θαλασσαιμικά και 40.5%, $p=0.0115$ συγκριτικά με τα θαλασσαιμικά, ενώ αντίστοιχα ο μέσος όγκος ερυθροκυττάρων άγγιξε το 43.08fL, 38.96fL, 43.47fL, $p=0.0144$ συγκριτικά με τα θαλασσαιμικά και 44.67fL, $p=0.0048$ συγκριτικά με τα θαλασσαιμικά. Σημαντική ήταν η αποκατάσταση του εύρους κατανομής μεγέθους ερυθρών αιμοσφαιρίων (RDW) που ενώ στα φυσιολογικά και θαλασσαιμικά ποντίκια υπολογίστηκε σε 15.8% και 29.8%, αντίστοιχα, η μεταμόσχευση των HS40.β-AAK και HS2.HS3.β-AAK επέφερε μείωση της παραμέτρου αυτής σε επίπεδα 15%, $p=0.0002$ συγκριτικά με τα θαλασσαιμικά και 14.9%, $p=0.0001$ συγκριτικά με τα θαλασσαιμικά.

Τέλος, η μεταμόσχευση γενετικά διορθωμένων αρχέγονων κυττάρων επέφερε και την αποκατάσταση της σπληνομεγαλίας, που είναι μεταξύ των σοβαρότερων δευτερογενών χαρακτηριστικών της παθολογίας της β-θαλασσαιμίας. Έτσι, όταν τα

ποντίκια αυτά θυσιάστηκαν, το βάρος του σπλήνα μετρήθηκε και στην περίπτωση των ποντικών με β-θαλασσαιμία υπολογίσθηκε σε 191.25mg. Η χρήση των αρχέγονων κυττάρων-HS40.β και -HS2.HS3.β οδήγησε σε μείωση του μεγέθους του σπλήνα με το βάρος τους να αγγίζει τα 89.5mg ($p=0.0197$ συγκριτικά με τα θαλασσαιμικά) και 89.7mg ($p=0.0209$ συγκριτικά με τα θαλασσαιμικά) την στιγμή που το μέσο βάρος σπλήνα φυσιολογικών ποντικών υπολογίσθηκε σε 90.3mg.



Εικόνα 42. Αιματολογικές παράμετροι των ποντικών που μεταμοσχεύθηκαν με φυσιολογικά κύτταρα (WT), με θαλασσαιμικά κύτταρα Hbb^{th-3/+} (Thal) και με κύτταρα που έχουν υποστεί μεταγωγή με τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β. Τα ποντίκια που μεταμοσχεύθηκαν με γενετικά διορθωμένα κύτταρα παρουσιάζουν σημαντικά βελτιωμένες αιματολογικές παραμέτρους καθώς και απουσία σπληνομεγαλίας σε σύγκριση με ποντίκια με β-θαλασσαιμία.

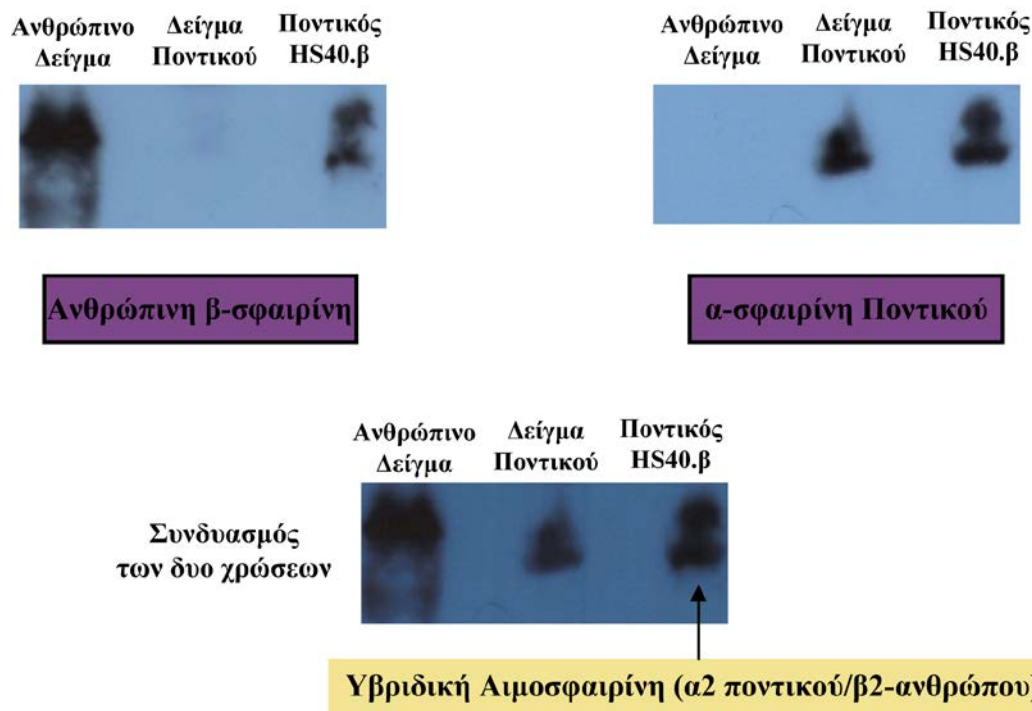
Η παραγωγή της ανθρώπινης β-σφαιρίνης που έχουν επιτύχει οι φορείς HS40.β και HS2.HS3.β στο μοντέλο β-θαλασσαιμίας του ποντικίου και την οποία είδαμε στο προηγούμενο κεφάλαιο, βλέπουμε εδώ ότι συνοδεύεται από την βελτίωση των αιματολογικών παραμέτρων, της εικόνας των ερυθροκυττάρων στην κυκλοφορία καθώς και από την αποτροπή της σπληνομεγαλίας. Το σύνολο των ενδείξεων αυτών αποδεικνύει ότι η παραγωγή της ανθρώπινης β-σφαιρίνης από τους αφοϊκούς φορείς είναι επαρκής για να οδηγήσει στην φυσιολογική αιμοποίηση, την αποτροπή των παθολογικών συνεπειών της έλλειψης της β-σφαιρίνης και συνολικά να διορθώσουν το θαλασσαιμικό φαινότυπο στο μοντέλο *in vivo*.

18. Σχηματισμός υβριδικής αιμοσφαιρίνης στο περιφερικό αίμα των μεταμοσχευμένων ποντικών με γενετικά διορθωμένα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα

Η ανθρώπινη β-σφαιρίνη που παράγεται από τους αφοϊκούς φορείς στον οργανισμό των μεταμοσχευμένων ποντικών, θελήσαμε να ελέγξουμε κατά πόσο δημιουργεί λειτουργικά σύμπλοκα με την ενδογενή α-σφαιρίνη του ποντικίου και οδηγεί στην έξοδο στην κυκλοφορία υβριδικής αιμοσφαιρίνης εφαρμόσαμε μεταφορά κατά Western ανιχνεύοντας την ύπαρξη και των δύο αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης.

Δείγματα περιφερικού αίματος από φυσιολογικό ποντικό, από μεταμοσχευμένο ποντικό και από περιφερικό αίμα ανθρώπινης προέλευσης, υποβλήθηκαν σε αιμόλυση προκειμένου να απελευθερωθεί η αιμοσφαιρίνη στο διάλυμα. Τα δείγματα του αιμολύματος φορτώθηκαν σε μη-αποδιατακτικά πηκτώματα ακρυλαμίδης και η μεταφορά των πρωτεϊνών έγινε σε μεμβράνη PVDF. Στην συνέχεια έγινε χρώση των πανομοιότυπων μεμβρανών με αντισώματα έναντι της ανθρώπινης β-σφαιρίνης και έναντι της α-σφαιρίνης του ποντικίου. Η εικόνα μετά τη μεταφορά και εμφάνιση των μεμβρανών έδειξε την ανίχνευση των α-αλυσίδων των σφαιρινών του ποντικίου στα δείγματα του φυσιολογικού και του μεταμοσχευμένου ποντικίου ενώ η ανίχνευση των β-αλυσίδων των σφαιρινών του ανθρώπου έγινε εμφανής στο δείγμα του ανθρώπινου περιφερικού αίματος καθώς επίσης και στο δείγμα του μεταμοσχευμένου ποντικίου με κύτταρα μετεγγμένα με το φορέα HS40.β. Η συνανίχνευση των αλυσίδων της α-σφαιρίνης του ποντικίου και της β-σφαιρίνης του ανθρώπου στο δείγμα του περιφερικού αίματος του

μεταμοσχευμένου ποντικού αποδεικνύει τη σύνθεση υβριδικής πρωτεΐνης στα ώριμα ερυθροκύτταρα του ποντικού που βγαίνουν στην κυκλοφορία όπου το ετεροτετραμερές της αιμοσφαιρίνης αποτελείται από 2 α -αλυσίδες ποντικού και 2 β -αλυσίδες ανθρώπινης προέλευσης (Εικόνα 43).



Εικόνα 43. Ανάλυση σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα μετά από μεταφορά κατά Western της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης στο περιφερικό αίμα ποντικού που έχει μεταμοσχευθεί με κύτταρα που ενσωματώνουν το φορέα HS40.β. Η συνανίχνευση της σφαιρίνης α του ποντικού και της σφαιρίνης β του ανθρώπου, που εκφράζεται από το διαγονίδιο, στην ίδια πρωτεϊνική θέση του πηκτώματος αποδεικνύει τη σύνθεση υβριδικής αιμοσφαιρίνης ($\alpha 2$ ποντικού/ $\beta 2$ ανθρώπου) στο μεταμοσχευμένο ποντικό.

19. Μεταγωγή αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (CD34⁺) από ασθενείς με β-θαλασσαιμία

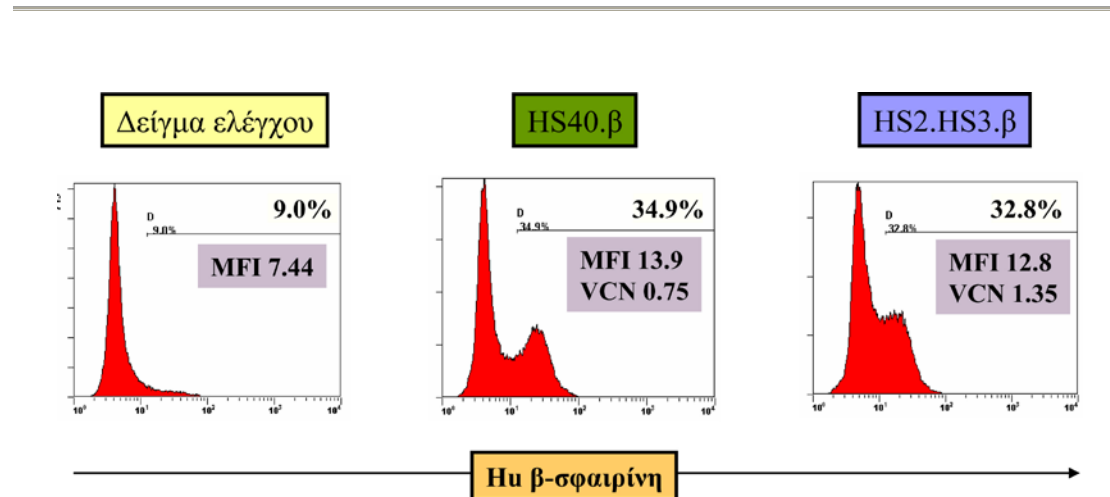
Η εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας στον άνθρωπο αφορά στην απομόνωση ΑΑΚ του ίδιου του ασθενή, μεταγωγή των κυττάρων *ex vivo* με φορείς που εκφράζουν ένα φυσιολογικό αντίγραφο του ελαττωματικού γονιδίου και στη συνέχεια την επανέγχυση των γενετικά διορθωμένων αρχέγονων κυττάρων στον ασθενή προκειμένου να αποκαταστήσουν τον ελαττωματικό φαινότυπο. Προκειμένου να μελετήσουμε την αποδοτικότητα των αφοιικών φορέων στο ανθρώπινο σύστημα καθώς επίσης και να ελέγξουμε την εφαρμογή τους σε ένα πρωτόκολλο προκαταρκτικής γονιδιακής θεραπείας στον άνθρωπο απομονώσαμε ΑΑΚ (CD34⁺) είτε από το μυελό των οστών είτε από το περιφερικό αίμα ασθενών με μείζονα β-θαλασσαιμία (β⁰).

Στα κύτταρα αυτά, όπως και στη περίπτωση των ΑΑΚ του ποντικιού, θελήσαμε να μελετήσουμε την ερυθροποίηση *ex vivo* και γι' αυτό εφαρμόσαμε υγρή καλλιέργεια σε συνθήκες που οδηγούν τα κύτταρα αυτά στην ερυθροειδική διαφοροποίηση. Τα κύτταρα CD34⁺ καλλιεργήθηκαν παρουσία των κυτταροκινών Flt3L, IL3, IL6, SCF και TPO και έγινε μεταγωγή για 16-20 ώρες με τους αφοιικούς φορείς που κωδικοποιούν την ανθρώπινη β-σφαιρίνη. Την επομένη της μεταγωγής τους, τα κύτταρα CD34⁺ τοποθετήθηκαν σε φρέσκο μέσο καλλιέργειας στο οποίο προστέθηκαν οι κυτταροκίνες EPO, IL3, SCF σε συνδυασμό είτε με τις Flt3L και TPO ή με τις β-οιστραδιόλη και δεξαμεθαζόνη. Τα κύτταρα CD34⁺ παρουσία της ερυθροποιητίνης και των άλλων κυτταροκινών διατηρούνται σε συνθήκες που ευνοούν τον πολλαπλασιασμό τους ενώ σταδιακά οδηγούνται σε ερυθροειδική διαφοροποίηση.

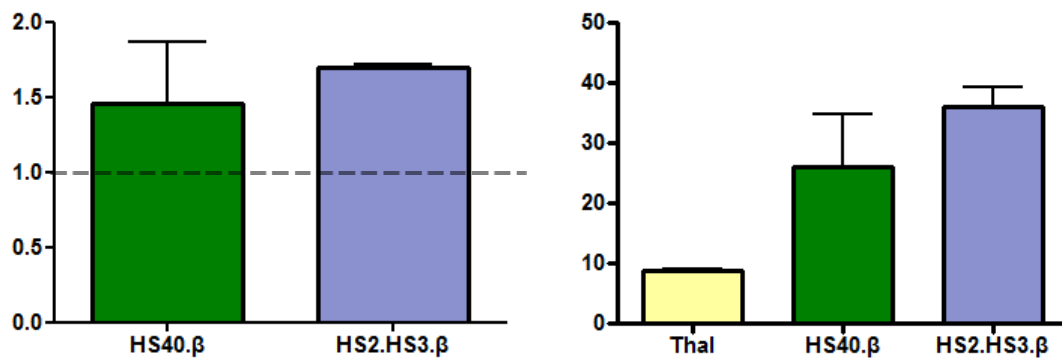
Τα ανθρώπινα, θαλασσαιμικά κύτταρα CD34⁺ παραμένουν σε υγρή καλλιέργεια για 18 περίπου ημέρες διατηρώντας τα, ιδανικά, σε συγκέντρωση μεταξύ $3-5 \times 10^5$ / ml ενώ οι κυτταροκίνες προστίθενται εκ νέου κάθε 2^η με 3^η ημέρα. Μετά το πέρας των 18 ημερών τα κύτταρα έχουν φτάσει σε τελική ερυθροειδική διαφοροποίηση, η οποία όμως αρχίζει να γίνεται εμφανής από την 11^η με 13^η ημέρα. Σε εκείνο το χρονικό σημείο οι καλλιέργειες ελέγχονται για την έκφραση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης, για το επίπεδο της ερυθροποίησης και για τη βιωσιμότητά τους, υπολογίζοντας τα επίπεδα απόπτωσης.

20. Επαγωγή της έκφρασης της β-σφαιρίνης σε γενετικά διορθωμένα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα από ασθενείς με β-θαλασσαιμία

Η χρώση των διαφοροποιημένων πλέον κυττάρων CD34⁺ για την ανθρώπινη β-σφαιρίνη και η σύγκρισή της με τα επίπεδα της βασικής έκφρασης που παρατηρείται στο μη μετηγμένο δείγμα θαλασσαιμικών ασθενών έδειξε ότι τα δείγματα που φέρουν ενσωματωμένους τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β αύξησαν την έκφραση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης κατά 1.5x και 1.7x φορές, αντίστοιχα (**Εικόνα 44B**). Συγκεκριμένα τα ποσοστά των κυττάρων που παράγουν ανθρώπινη β-σφαιρίνη κυμαίνονται σε ένα ποσοστό της τάξεως του 9% για το θαλασσαιμικό δείγμα ελέγχου και 27 % και 36 % για τα μετηγμένα με τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β θαλασσαιμικά κύτταρα CD34⁺, αντίστοιχα (**Εικόνα 44Γ**).



A



B

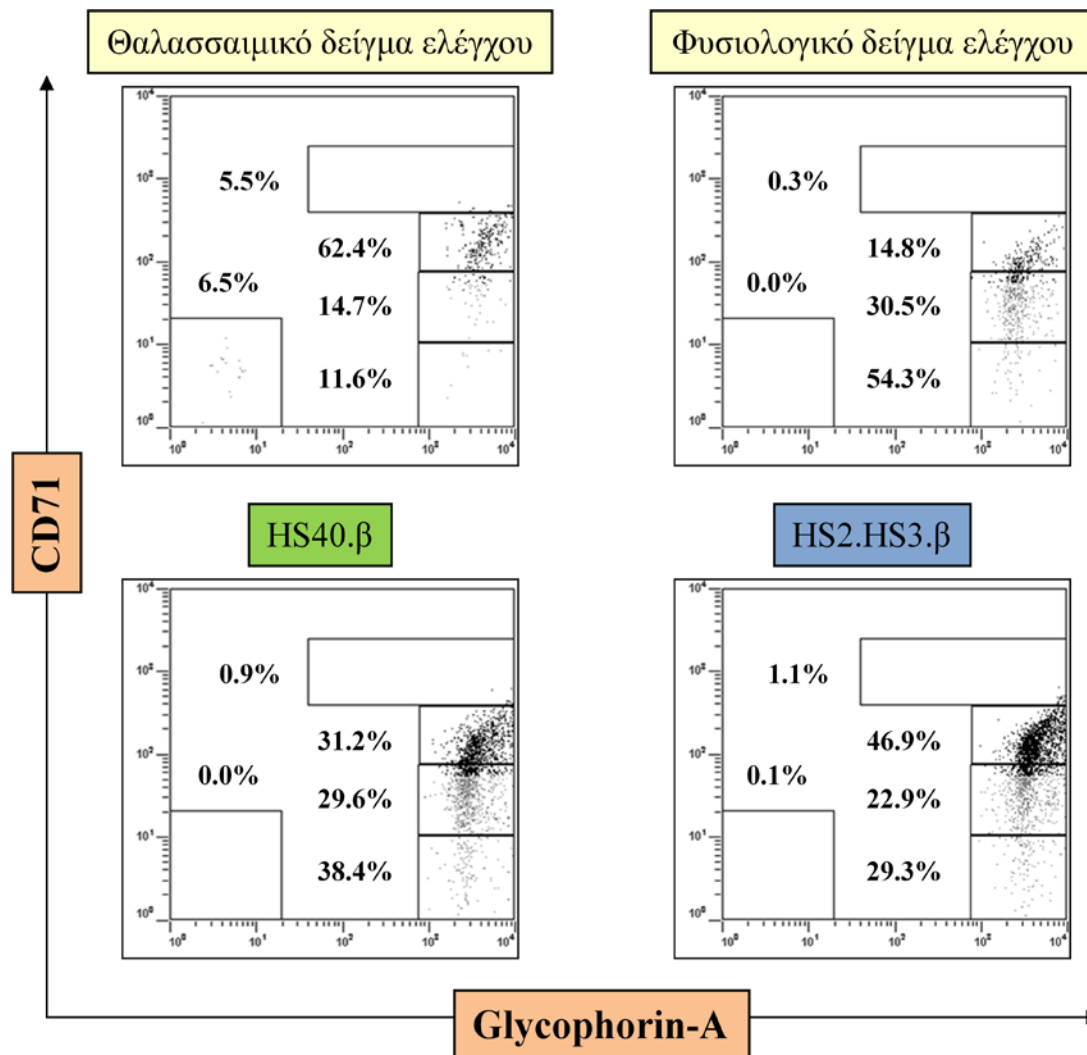
Γ

Εικόνα 44. Έκφραση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε ερυθροειδική υγρή καλλιέργεια ανθρώπινων θαλασσαιμικών κυττάρων CD34⁺. **(Α)** Αντιπροσωπευτικό γράφημα κυτταρομετρίας ροής για την ανίχνευση της β-σφαιρίνης. Τα δείγματα που έχουν επιμολυνθεί με τους αφοϊικούς φορείς επιδεικνύουν αυξημένη παραγωγή β-σφαιρίνης κατά >3 φορές σε αριθμό κυττάρων και 2 φορές σε ένταση της έκφρασης (MFI). **(Β)** Η ένταση της έκφρασης (MFI) της β-σφαιρίνης αυξήθηκε κατά 1.5 φορές και 1.7 φορές για τα κύτταρα που ενσωματώνουν τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β σε σύγκριση με το θαλασσαιμικό δείγμα ελέγχου (Untx). **(Γ)** Τα απόλυτα επίπεδα των κυττάρων που εκφράζουν β-σφαιρίνη κυμάνθηκαν στο 8.9%, 27% και 36% για το θαλασσαιμικό δείγμα ελέγχου, το HS40.β και το HS2.HS3.β δείγμα, αντίστοιχα.

21. Αποκατάσταση της μη αποδοτικής ερυθροποίησης σε γενετικά διορθωμένα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα από ασθενείς με β-θαλασσαιμία

Τα ΑΑΚ από ασθενείς με β-θαλασσαιμία δεν παράγουν ικανές ποσότητες β-σφαιρίνης και σαν αποτέλεσμα αδυνατούν να οδηγηθούν σε πλήρη ερυθροειδική διαφοροποίηση καθώς δεν μπορούν να σχηματίσουν ώριμη αιμοσφαιρίνη ενώ οι κατακρημνισμένες α-αλυσίδες της σφαιρίνης οδηγούν σε καταστροφή τους διαφοροποιημένους ώριμους ερυθροβλάστες. Ένα σύστημα *ex vivo* υπολογισμού του βαθμού αποδοτικής ερυθροποίησης είναι η μέτρηση των ερυθροειδικών επιφανειακών αντιγόνων CD71 και glycophorin A (GlyA) με κυτταρομετρία ροής.

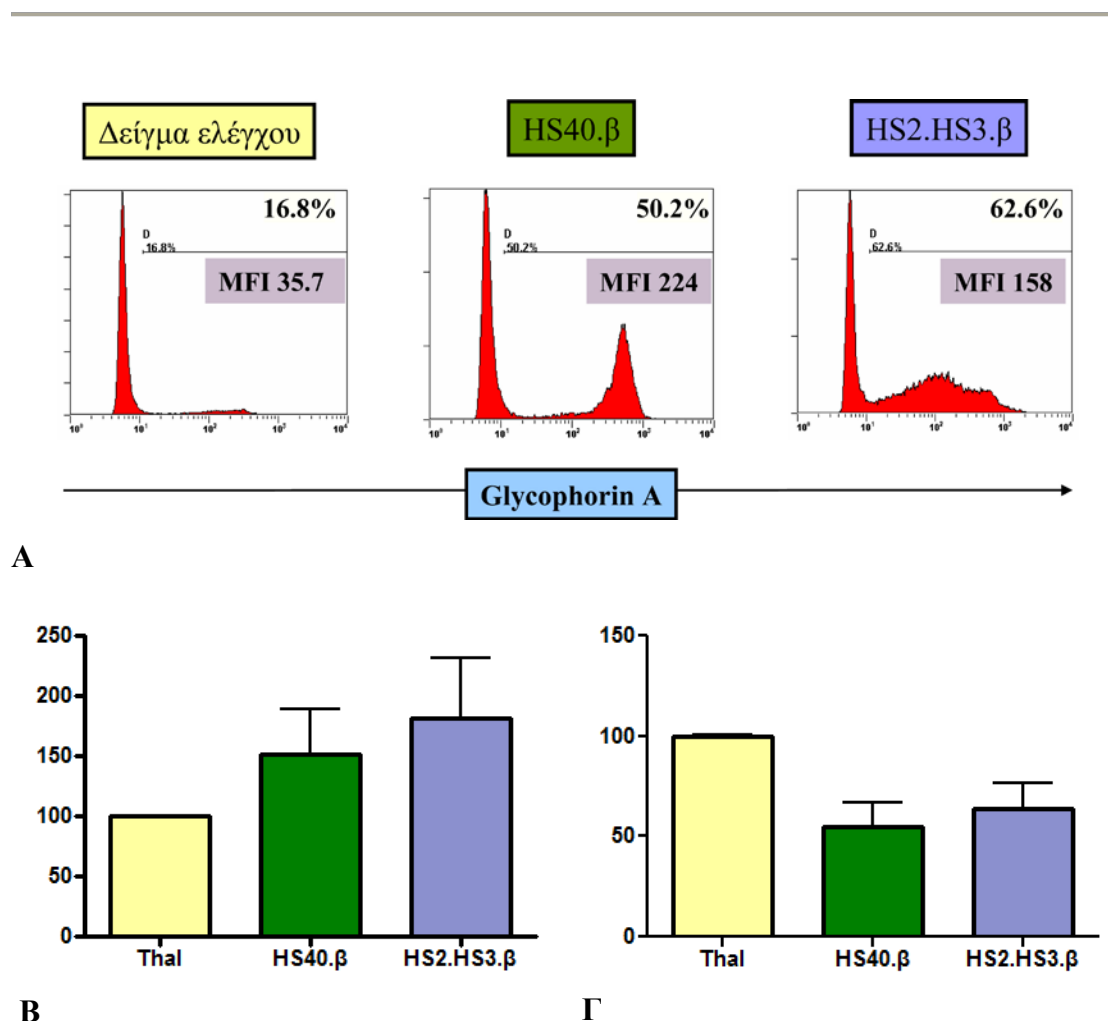
Τα θαλασσαιμικά κύτταρα CD34⁺ που είχαν υποστεί μεταγωγή με τους αφροϊκούς φορείς επέδειξαν μερική αποκατάσταση της μη αποδοτικής ερυθροποίησης που παρουσιάζεται στα θαλασσαιμικά κύτταρα ελέγχου (**Εικόνα 45**). Συγκεκριμένα, μετά από κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση των επιφανειακών αντιγόνων CD71 και glycophorin A στα κύτταρα CD34⁺ φάνηκε ότι μετά από 18 ημέρες καλλιέργειας τα κύτταρα εμφανίζουν προχωρημένη ερυθροποίηση. Τα επίπεδα έκφρασης του glycophorin A παρουσιάζονται υψηλά (GlyA^{high}) ενώ ποικίλλει ο βαθμός έκφρασης του CD71. Αυτό το οποίο καθίσταται σαφές είναι ότι στην περίπτωση των κυττάρων που έχουν υποστεί μεταγωγή με τους αφροϊκούς φορείς υπάρχει πρόοδος της ερυθροποίησης με τον πληθυσμό των κυττάρων να μετατοπίζεται στον άξονα των y προς την πλευρά των αρνητικών κυττάρων ως προς το CD71, δηλαδή των περισσότερο ώριμων ερυθροβλαστικών κυττάρων. Τα ποσοστά των βασεόφιλων ερυθροβλαστών (GlyA^{high} /CD71^{high}), πολυχρωματόφιλων ερυθροβλαστών (GlyA^{high} /CD71^{med}) και ορθοχρωματικών ερυθροβλαστών (GlyA^{high} /CD71^{low}) μετρήθηκαν σε 62.4%, 14.7% και 11.6% στην περίπτωση του θαλασσαιμικού δείγματος ελέγχου, 14.8%, 30.5% και 54.3% στην περίπτωση του φυσιολογικού δείγματος ελέγχου, 31.2%, 29.6% και 38.4% στην περίπτωση του δείγματος που είχε επιμολυνθεί με το φορέα HS40.β και 46.9%, 22.9% και 29.3% στην περίπτωση του δείγματος που είχε επιμολυνθεί με το φορέα HS2.HS3.β. Η εικόνα που προκύπτει από τα επιμολυσμένα θαλασσαιμικά κύτταρα CD34⁺ προσομοιάζει περισσότερο με εκείνη του φυσιολογικού δείγματος ελέγχου παρά με την εικόνα του θαλασσαιμικού δείγματος ελέγχου.



Εικόνα 45. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα erythroειδικής καλλιέργειας αρχέγονων θαλασσαιμικών κυττάρων CD34⁺. Τα επίπεδα erythropoίησης αναλύονται μέσω της μέτρησης της έκφρασης των επιφανειακών αντιγόνων Glycophorin A και CD71.

Συγκεντρωτικά, τα δεδομένα που προέκυψαν από την αξιολόγηση της erythropoίησης *ex vivo* μέσω ανάλυσης της έκφρασης των επιφανειακών αντιγόνων CD71 και GlyA δείχνουν ότι τα δείγματα HS40.β-CD34⁺ έχουν αυξημένη έκφραση του GlyA κατά 1.5 φορές σε σχέση με το θαλασσαιμικό δείγμα ελέγχου ενώ τα δείγματα HS2.HS3.β-CD34⁺ έχουν αυξημένη έκφραση GlyA κατά 1.8 φορές (**Εικόνα 46B**). Επίσης, τα δείγματα αυτά μετά από μεταγωγή με τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β έδειξαν μειωμένη έκφραση του επιφανειακού αντιγόνου CD71 σε

ποσοστό 55% και 63.5% του θαλασσαιμικού δείγματος ελέγχου, αντίστοιχα, γεγονός που δείχνει βελτίωση της μη-αποδοτικής ερυθροποίησης (**Εικόνα 46Γ**).

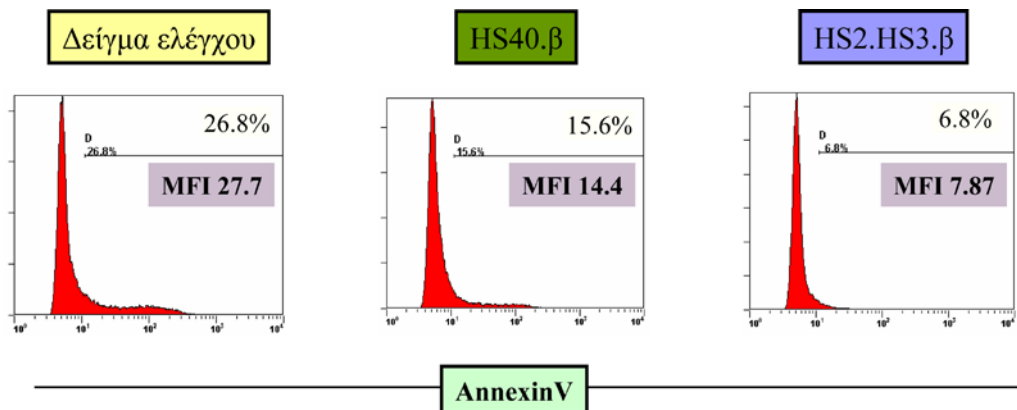


Εικόνα 46. Υπολογισμός της ερυθροποίησης μέσω μέτρησης της έκφρασης των ερυθροειδικών αντιγόνων CD71 και GlyA σε ερυθροειδική υγρή καλλιέργεια ανθρώπινων θαλασσαιμικών κυττάρων CD34⁺. **(Α)** Αντιπροσωπευτικό γράφημα κυτταρομετρίας ροής για την μέτρηση του GlyA. Τα δείγματα που έχουν επιμολυνθεί με τους αφοϊικούς φορείς επιδεικνύουν αυξημένη ερυθροποίηση κατά >3. **(Β)** Η ένταση της έκφρασης (MFI) του glycophorin A αυξήθηκε κατά 1.5 φορές και 1.8 φορές για τα κύτταρα που ενσωματώνουν τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β σε σύγκριση με το θαλασσαιμικό δείγμα ελέγχου (Thal). **(Γ)** Η ένταση της έκφρασης (MFI) του CD71 μειώθηκε στο 55% και 63.5% για τα κύτταρα που ενσωματώνουν τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β ως προς το θαλασσαιμικό δείγμα ελέγχου (Thal).

22. Βελτίωση της βιωσιμότητας των γενετικά διορθωμένων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων από ασθενείς με β-θαλασσαιμία

Τα θαλασσαιμικά αρχέγονα κύτταρα τα οποία στερούνται β-σφαιρίνης και κατά συνέπεια αδυνατούν να σχηματίσουν ενήλικη αιμοσφαιρίνη HbA, οδηγούνται σε μη-αποδοτική ερυθροποίηση και πρόωμη απόπτωση των ερυθροβλαστών. Αντίθετα, τα φυσιολογικά αρχέγονα κύτταρα στα οποία παρατηρείται λειτουργική ερυθροποίηση εμφανίζουν αυξημένη βιωσιμότητα σε σχέση με τα θαλασσαιμικά κύτταρα. Η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε για να ποσοτικοποιήσουμε την απόπτωση και κατά αντιστοιχία τα επίπεδα βιωσιμότητας των κυττάρων μετά από ερυθροειδική διαφοροποίηση *ex vivo* ήταν η κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση του παράγοντα AnnexinV. Η AnnexinV αποτελεί ένα μάρτυρα απόπτωσης καθώς ανήκει στην πρωτεϊνική οικογένεια των ανεξινών οι οποίες προσδένονται σε αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια όπως είναι η φωσφατιδυλσερίνη που εκτίθεται στην εξωτερική μεμβράνη των κυττάρων κατά τα αρχικά στάδια της απόπτωσης.

Τα κύτταρα που επιμολύνονται με τους αφοϋικούς φορείς και επιτυγχάνουν αποτελεσματική σύνθεση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης, καταφέρνουν και αποκαθιστούν την μη αποδοτική ερυθροποίηση που χαρακτηρίζει τα θαλασσαιμικά κύτταρα, αποτρέποντας την πρόωμη απόπτωσή τους. Έτσι, σε πλήρη αντιστοιχία με τις προηγούμενες παρατηρήσεις, μετά από 18 ημέρες σε καλλιέργεια τα κύτταρα CD34⁺ που έχουν μετηχθεί με τους αφοϋικούς φορείς εμφάνισαν βελτιωμένη βιωσιμότητα, όπως αυτό προκύπτει μετά από μέτρηση του αποπτωτικού επιφανειακού μάρτυρα Annexin V. Τα επίπεδα της Annexin V στα δείγματα HS40.β-CD34⁺ και HS2.HS3.β-CD34⁺ είναι μειωμένα κατά 1.9x και 3.5x φορές (**Εικόνα 47**).



Εικόνα 47. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα μέτρησης της βιωσιμότητας σε ερυθροειδική καλλιέργεια αρχέγονων θαλασσαιμικών κυττάρων CD34⁺. Τα επίπεδα βιωσιμότητας αναλύονται μέσω της μέτρησης της έκφρασης του αποπτωτικού επιφανειακού μάρτυρα Annexin V.

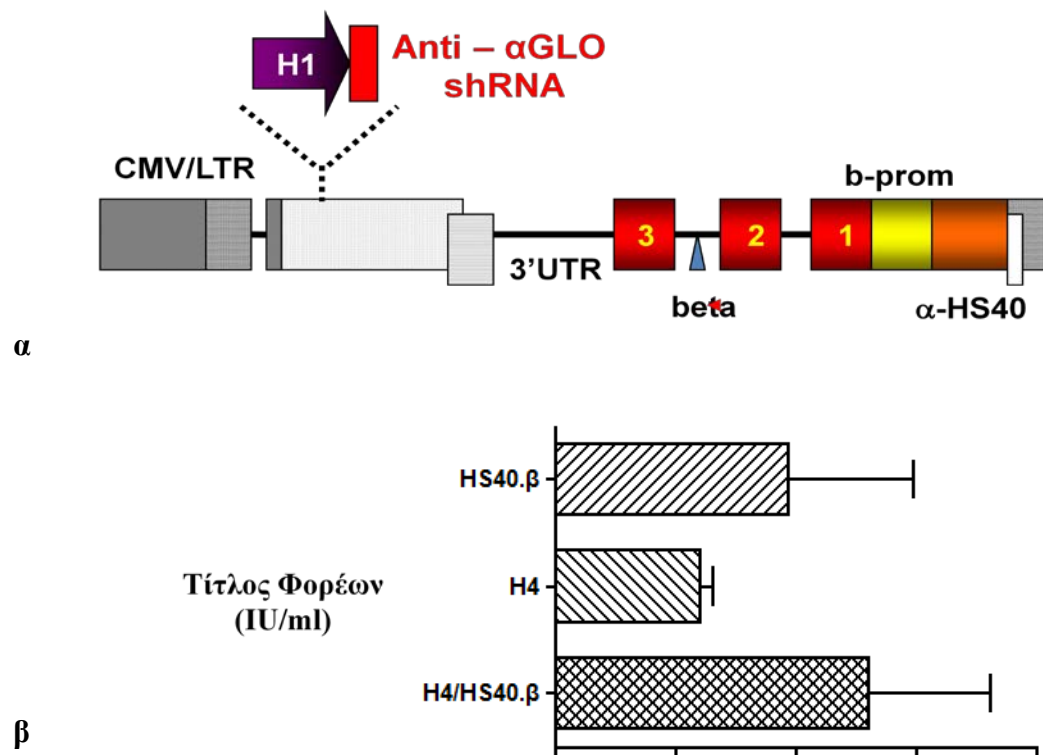
23. Κατασκευή του συνδυαστικού αφοϊκού φορέα (FV) που εκφράζει β-σφαιρίνη και shRNA έναντι της α-σφαιρίνης

Στην προσπάθειά μας να επεκτείνουμε την ερευνητική μας μελέτη στη γονιδιακή θεραπεία της β-θαλασσαιμίας θελήσαμε να συνδυάσουμε δύο διαφορετικές προσεγγίσεις. Την ενσωμάτωση και έκφραση ενός φυσιολογικού γονιδίου της β-σφαιρίνης και την χρησιμοποίηση μικρών φουρκετών RNA (short hairpin RNA - shRNA) που έχουν στόχο το γονίδιο της α-σφαιρίνης. Η συνδυαστική αυτή προσέγγιση έχει στόχο την ταχύτερη αποκατάσταση της παθολόγου ανισορροπίας που παρατηρείται στη β-θαλασσαιμία μεταξύ των αλυσίδων της α- και β-σφαιρίνης η οποία και είναι υπεύθυνη για τη μη αποδοτική ερυθροποίηση και καταστροφή των πρόδρομων ερυθροκυττάρων. Η λογική πίσω από αυτή την προσέγγιση είναι ότι ο ίδιος αφοϊκός φορέας θα εκφράζει το γονίδιο της β-σφαιρίνης ενώ ταυτοχρόνως θα επιτυγχάνει και μερική μείωση των επιπέδων του γονιδίου της α-σφαιρίνης μέσω του μηχανισμού της παρεμπόδισης του RNA (RNA interference - RNAi). Με αυτό τον τρόπο θα αποκατασταθεί ταχύτερα και αποδοτικότερα η ανισορροπία μεταξύ των δύο

αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης και κατά συνέπεια θα αποκατασταθεί και η ερυθροποίηση των θαλασσαιμικών κυττάρων.

Για τη δημιουργία των ιικών φορέων χρησιμοποιήθηκε μία βασική δομή αφροϊκού φορέα η οποία φέρει τις ελάχιστες *cis*-ενεργές ρυθμιστικές αλληλουχίες που είναι απαραίτητες για το πακετάρισμα του ιικού σωματιδίου. Για τον έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου της ανθρώπινης β-σφαιρίνης χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος ο υποκινητής του γονιδίου της β-σφαιρίνης, μεγέθους 174 bp, μαζί με την αλληλουχία HS40 της ρυθμιστικής περιοχής του γονιδιακού τόπου της ανθρώπινης α-σφαιρίνης. Ολόκληρη η κασέτα του διαγονιδίου εισήχθη σε αντίθετο προσανατολισμό συγκριτικά με την φορά μεταγραφής των ιικών γονιδίων προκειμένου η μεταγραφή του να μην επηρεάζεται από τα ενδογενή ρυθμιστικά στοιχεία του ιικού φορέα. Η μικρή φουρκέτα RNA έναντι του γονιδίου της α-σφαιρίνης μεταγράφεται κάτω από τον έλεγχο ενός ανθρώπινου υποκινητή H1 τύπου Pol III. Η αλληλουχία του shRNA έχει εισαχθεί σε ίδιο προσανατολισμό με το μεταγραφικό προσανατολισμό του ιικού γονιδιώματος και αντίθετα από την κασέτα έκφρασης της β-σφαιρίνης. Η έκφραση των δύο αυτών αλληλουχιών είναι ανεξάρτητη καθώς η μεταγραφή τους δεν είναι αλληλένδετη και ρυθμίζεται από διαφορετικές αλληλουχίες (**Εικόνα 48α**).

Ο συνδυαστικός φορέας pΔΦ.H4/HS40.β κατασκευάστηκε συγχρόνως με τους αφροϊκούς φορείς που κωδικοποιούν είτε μόνο το γονίδιο της β-σφαιρίνης (pΔΦ.HS40.β) ή μόνο το shRNA έναντι του γονιδίου της α-σφαιρίνης (pΔΦ.H4). Οι τίτλοι των τριών φορέων υπολογίστηκαν, μετά από επιμόλυνση κυττάρων της σειράς HT1080, και ανάλυση με PCR πραγματικού χρόνου και διαπιστώθηκε ότι η ύπαρξη και των δύο κωδικών αλληλουχιών δεν επηρεάζει τον τίτλο του αφροϊκού φορέα (**Εικόνα 48β**).



Εικόνα 48. (α) Συνδυαστικός αφοϊκός φορέας που εκφράζει ανθρώπινη β-σφαιρίνη και shRNA έναντι της α-σφαιρίνης. Η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της β-σφαιρίνης ελέγχεται από τον υποκινητή της ανθρώπινης β-σφαιρίνης και τον ενισχυτή της ανθρώπινης α-σφαιρίνης HS40 ενώ το shRNA ρυθμίζεται από έναν ανθρώπινο υποκινητή Pol III, τον H1. **(β)** Υπολογισμός του τίτλου των αφοϊκών φορέων με PCR πραγματικού χρόνου. Ο συνδυαστικός φορέας H4/HS40.β και οι απλοί φορείς H4 και HS40.β δίνουν παρεμφερείς τίτλους.

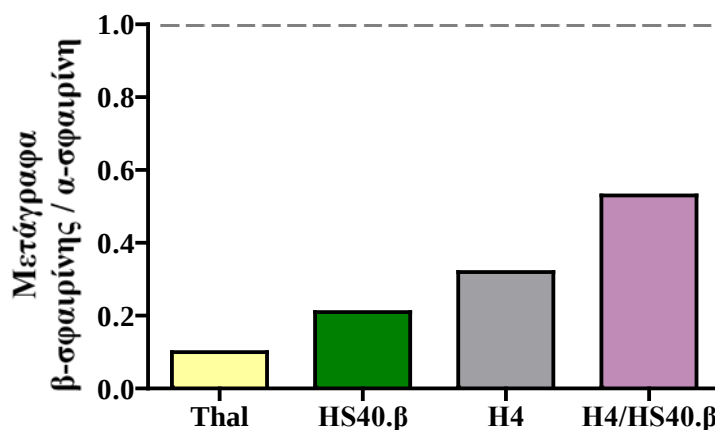
24. Διόρθωση της ισορροπίας της α- και β-σφαιρίνης σε ερυθροειδικές καλλιέργειες αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (CD34⁺) από θαλασσαιμικούς ασθενείς

Τα αρχέγονα κύτταρα που προέρχονται από ασθενείς με β-θαλασσαιμία αποτελούν το ιδανικότερο σύστημα προσομοίωσης *ex vivo* του θαλασσαιμικού φαινοτύπου στον άνθρωπο. Γι' αυτό το λόγο και επιλέχθηκαν ως κύτταρα-στόχοι της

γονιδιακής θεραπείας με το συνδυαστικό φορέα H4/HS40.β δίνοντάς μας την δυνατότητα σύγκρισης της αποτελεσματικότητας αυτού του φορέα σε σχέση με τους φορείς που φέρουν μόνο τη μία κωδική αλληλουχία, H4 και HS40.β. Το πρώτο που θελήσαμε να μελετήσουμε ήταν η αποκατάσταση της ανισορροπίας μεταξύ των αλυσίδων της α- και β-σφαιρίνης, που είναι και το παθοφυσιολογικό χαρακτηριστικό της νόσου αλλά και το αίτιο που οδηγεί στο θαλασσαιμικό φαινότυπο.

Επιμολύνουμε τα κύτταρα CD34⁺ και στη συνέχεια τα εισάγαμε σε καλλιέργεια παρουσία κυτταροκινών που επάγουν την ερυθροειδική διαφοροποίηση (EPO, Dexamethasone, SCF, Flt3L, TPO, IL-3). Μετά από 16-18 ημέρες σε καλλιέργεια τα κύτταρα συλλέχθηκαν και από αυτά απομονώθηκε ολικό RNA. Το RNA μετά από αντίστροφη μεταγραφή αναλύθηκε με PCR πραγματικού χρόνου. Με την PCR πραγματικού χρόνου θελήσαμε να ανιχνεύσουμε τα επίπεδα σύνθεσης των μεταγράφων της α- και της β-σφαιρίνης. Το αποτέλεσμα που προέκυψε ήταν ότι το θαλασσαιμικό δείγμα ελέγχου εκφράζει β-σφαιρίνη σε πολύ χαμηλά επίπεδα, που δεν ξεπερνούν το 0.1 της αντίστοιχης έκφρασης της β-σφαιρίνης. Την ίδια στιγμή επετεύχθη με τους φορείς HS40.β και H4, που είχαν χρησιμοποιηθεί για να επιμολύνουν τα θαλασσαιμικά CD34⁺, μερική αποκατάσταση της ισορροπίας μεταξύ των δύο αλυσίδων και ο λόγος β-/α-σφαιρίνη ανέβηκε στο 0.21 και 0.32. Η αποκατάσταση της ισορροπίας μεταξύ α- και β-σφαιρίνης που επετεύχθη με την επιμόλυνση των κυττάρων CD34⁺ με το φορέα H4/HS40.β ήταν αισθητά σημαντικότερη και ο λόγος β-/α-σφαιρίνη άγγιξε το 0.53 (**Εικόνα 49**).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο συνδυαστικός φορέας H4/HS40.β, συνεισφέροντας τόσο στην αύξηση της παραγωγής της β-σφαιρίνης όσο και στη μείωση των επιπέδων της α-σφαιρίνης, συνέβαλε σε αποδοτικότερη αποκατάσταση της ανισορροπίας μεταξύ των αλυσίδων της α- και β-σφαιρίνης, σε σχέση με τους απλούς φορείς που κωδικοποιούν αποκλειστικά είτε το γονίδιο της β-σφαιρίνης ή το shRNA έναντι της α-σφαιρίνης.



Εικόνα 49. Ανάλυση της σχετικής έκφρασης των αλυσίδων της α- και β-σφαιρίνης μετά από ερυθροειδική καλλιέργεια κυττάρων CD34⁺ από ασθενείς με β-θαλασσαιμία. Ο λόγος της β-/α-σφαιρίνη στο θαλασσαιμικό δείγμα ελέγχου υπολογίστηκε με PCR πραγματικού χρόνου σε 0.1 και μετά από επιμόλυνση με τους φορείς HS40.β, H4 και H4/HS40.β ανέβηκε στο 0.21, 0.32 και 0.53, αντίστοιχα.

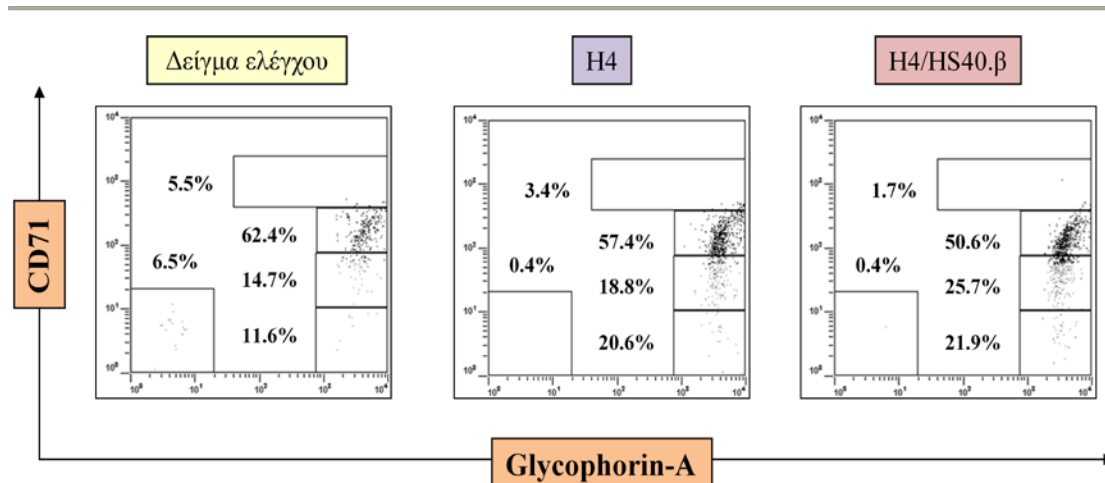
25. Αποκατάσταση της ερυθροποίησης *ex vivo* σε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (CD34⁺) από θαλασσαιμικούς ασθενείς

Είδαμε ότι τα AAK από ασθενείς με β-θαλασσαιμία αδυνατούν να ακολουθήσουν την πλήρη ερυθροειδική διαφοροποίηση καθώς δεν μπορούν να σχηματίσουν ώριμη αιμοσφαιρίνη και αντί αυτής οδηγούνται σε πρόωπη απόπτωση. Το σύστημα υπολογισμού *ex vivo* του βαθμού αποδοτικής ερυθροποίησης που αξιοποιήσαμε αφορά στη μέτρηση των ερυθροειδικών επιφανειακών αντιγόνων CD71 και glycophorin A (GlyA) με κυτταρομετρία ροής. Και εδώ τα CD34⁺, μετά από μεταγωγή με τους αφοϊκούς φορείς FV, καλλιεργήθηκαν κάτω από συνθήκες ερυθροειδικής διαφοροποίησης και αναλύονται 16-18 ημέρες μετά.

Αυτή τη φορά χρησιμοποιήσαμε τον συνδυαστικό φορέα H4/HS40.β και το φορέα H4 που κωδικοποιεί μόνο το shRNA έναντι του γονιδίου της α-σφαιρίνης. Το αποτέλεσμα ήταν ότι και οι δύο φορείς έδειξαν μερική αποκατάσταση της μη-αποδοτικής ερυθροποίησης η οποία παρατηρήθηκε στο θαλασσαιμικό δείγμα ελέγχου. Ο συνδυαστικός φορέας H4/HS40.β αποδείχθηκε όμως περισσότερο

αποτελεσματικός. Συγκεκριμένα τα ποσοστά των βασεόφιλων ερυθροβλαστών ($\text{GlyA}^{\text{high}} / \text{CD71}^{\text{high}}$), πολυχρωματόφιλων ερυθροβλαστών ($\text{GlyA}^{\text{high}} / \text{CD71}^{\text{med}}$) και ορθοχρωματικών ερυθροβλαστών ($\text{GlyA}^{\text{high}} / \text{CD71}^{\text{low}}$) ήταν 62.4%, 14.7% και 11.6% στην περίπτωση του θαλασσαιμικού δείγματος ελέγχου, 57.4%, 18.8% και 20.6% στην περίπτωση του δείγματος που είχε επιμολυνθεί με το φορέα H4 και 50.6%, 25.7% και 21.9% στην περίπτωση του δείγματος που είχε επιμολυνθεί με το φορέα H4/HS40.β (Εικόνα 50).

Εμφανής ήταν η μετατόπιση του πληθυσμού των επιμολυσμένων κυττάρων προς τον άξονα των y και συγκεκριμένα στην περιοχή των αρνητικών κυττάρων ως προς το CD71 με το φορέα H4/HS40.β να δίνει υψηλότερα ποσοστά από τους κυτταρικούς πληθυσμούς τόσο των πολυχρωματόφιλων όσο και των ορθοχρωματικών ερυθροβλαστών, τις δύο πιο ώριμες καταστάσεις των πρόδρομων ερυθροκυττάρων.



Εικόνα 50. Ανάλυση της ερυθροποίησης *ex vivo* μετά από ερυθροειδική καλλιέργεια κυττάρων CD34^+ από ασθενείς με β-θαλασσαιμία. Τα επίπεδα ερυθροποίησης αναλύονται μέσω της μέτρησης της έκφρασης των επιφανειακών αντιγόνων Glycophorin A και CD71. Τα επιμολυσμένα κύτταρα με το φορέα H4/HS40.β έδειξαν αποδοτικότερη ερυθροειδική διαφοροποίηση σε σχέση με το φορέα H4, ενώ και οι δύο φορείς αποκατέστησαν, μερικώς, την μη αποδοτική διαφοροποίηση των θαλασσαιμικών αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων.

Συζήτηση



Η γονιδιακή θεραπεία της β-θαλασσαιμίας είχε αρχικά χαρακτηριστεί ως εφικτός στόχος από την επιστημονική κοινότητα, όμως οι προσπάθειες που γίνονται τα τελευταία 25 χρόνια αναδεικνύουν συνεχώς τα προβλήματα που τη συνοδεύουν και που κυρίως εστιάζονται στην κατασκευή φορέων που θα μπορούν να εκφράζουν αποτελεσματικά και σταθερά τα γονίδια των σφαιρινών σε ερυθροειδικό περιβάλλον.

Αρχικά, για την έκφραση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης χρησιμοποιήθηκαν μόνο το β-γονίδιο με τον υποκινητή του χωρίς ρυθμιστικές περιοχές.^{86,87,88} Οι Grosveld et al (1987) ήταν οι πρώτοι που απέδειξαν τη σημασία της περιοχής που αργότερα έγινε γνωστή ως LCR, στην έκφραση υψηλών επιπέδων ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε πειραματικό μοντέλο διαγονιδιακών ποντικών.²¹ Η ανακάλυψη των διαφορετικών υπερευαίσθητων θέσεων (HS) της περιοχής LCR οδήγησε στην ανάπτυξη της έρευνας σχετικά με τη ρύθμιση της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε διαγονιδιακά ποντίκια ή ερυθροποιητικές κυτταρικές σειρές.^{36,38,89,90} Ο συνδυασμός των μικρών κεντρικών αλληλουχιών των θέσεων HS2-4 σε μία αλληλουχία συνολικού μήκους ~1kb οδήγησε στη δημιουργία των πρώτων ρετροϊκών φορέων που είχαν υψηλό τίτλο, σταθερότητα και ταυτόχρονα υψηλή έκφραση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε λευχαιμική κυτταρική σειρά ποντικού MEL.⁹⁵ Μερικά χρόνια αργότερα, σε μία από τις σημαντικότερες μελέτες στο χώρο από τους May et al. (2000), προσδιορίστηκαν οι ελάχιστες αλληλουχίες των περιοχών HS2, HS3 και HS4 που όταν συνδυαστούν έχουν τη δυνατότητα να οδηγήσουν στην παραγωγή υψηλών επιπέδων ανθρώπινης β-σφαιρίνης από ένα λεντοϊκό φορέα.⁹⁶ Σε αυτή τη μελέτη επετεύχθη η διόρθωση του θαλασσαιμικού φαινοτύπου στο μοντέλο της β-θαλασσαιμίας του ποντικού, με μέση αύξηση της σύνθεσης της αιμοσφαιρίνης κατά 3-4g/dl και με αυτό τον τρόπο κατέστη σαφές ότι η παραγωγή του γονιδίου της β-σφαιρίνης σε θεραπευτικά επίπεδα είναι εφικτή από ρετροϊκούς φορείς. Στη συνέχεια υπήρξαν και άλλες ερευνητικές ομάδες που έδειξαν διόρθωση του θαλασσαιμικού φαινοτύπου στον ποντικό με χρήση λεντοϊκών φορέων.^{158,159,160} Αυτό το οποίο φάνηκε από αυτές τις μελέτες ήταν ότι η ενσωμάτωση κατά μέσο όρο ενός (1) ιϊκού αντιγράφου ανά κύτταρο δεν είναι αρκετό για να επιφέρει διόρθωση του θαλασσαιμικού φαινοτύπου. Τα επίπεδα έκφρασης της β-σφαιρίνης στα μεταμοσχευμένα ποντίκια συχνά ποίκιλλαν και δεν αρκούσαν για να χαρακτηριστούν θεραπευτικά, ενώ ένας σημαντικός αριθμός ενσωματωμένων αντιγράφων του ιϊκού φορέα ήταν απαραίτητος για να παράγει θεραπευτικές ποσότητες β-σφαιρίνης. Στην

ίδια περίπου χρονική περίοδο δοκιμάστηκε σε ρετροϊκούς φορείς η δραστηριότητα της ρυθμιστικής αλληλουχίας HS40 της ανθρώπινης α-σφαιρίνης στην έκφραση των γονιδίων των σφαιρινών. Αρχικά, δείχθηκε ότι είναι ικανή να εκφράσει το γονίδιο της ανθρώπινης γ-σφαιρίνης ελλείψει άλλης ρυθμιστικής περιοχής ενώ αργότερα έγινε γνωστό ότι δρα συνεργιστικά με τον υποκινητή της ανθρώπινης β-σφαιρίνης προκειμένου να παράγει σταθερά και σε υψηλά επίπεδα ανθρώπινη γ-σφαιρίνη.^{97,98} Στη συνέχεια και μέχρι σήμερα ακολούθησαν διαφορετικές προσεγγίσεις προκειμένου να βελτιστοποιηθούν οι φορείς έκφρασης των γονιδίων της σφαιρίνης οι οποίες περιελάμβαναν τη χρήση εκτενέστερων αλληλουχιών HS2-3-4, την ενσωμάτωση και της αλληλουχίας HS1 αλλά και τη χρήση αλληλουχιών-μονωτών της έκφρασης του διαγονιδίου, όπως η αλληλουχία cHS4, με την τελευταία να εμφανίζει σημαντική επίδραση στον τίτλο του φορέα.^{161,162,163,164,165,166,167,168}

Τα σχετικά ενθαρρυντικά πειραματικά αποτελέσματα με ρετροϊκούς και λεντοϊκούς φορείς σε πειραματικά μοντέλα δε μεταφράστηκαν σε κλινική εφαρμογή παρά μόλις πρόσφατα, όταν και έγινε γνωστή η πρώτη επιτυχημένη απόπειρα εφαρμογής της γονιδιακής θεραπείας για τη β-θαλασσαιμία στον άνθρωπο. Οι Cavazzana-Calvo et al. (2010) κατάφεραν, χρησιμοποιώντας ένα λέντι-ϊικό φορέα να αποκαταστήσουν μερικώς τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης σε ένα δεκαοκτάχρονο με μείζονα HbE/β-θαλασσαιμία και τρία χρόνια μετά να παραμένει, αν και ελαφρά αναιμικός, απαλλαγμένος από την ανάγκη τακτικών μεταγγίσεων.¹⁶⁹ Βέβαια, διατηρείται μία επιφύλαξη όσον αφορά στην ασφάλεια χρησιμοποίησης των φορέων αυτών στη γονιδιακή θεραπεία καθώς όπως δείχθηκε και σε αυτή την περίπτωση υπάρχει επιλεκτική αύξηση της συχνότητας ενός κλώνου στον οποίο ο φορέας έχει ενσωματωθεί και έχει ενεργοποιήσει το γονίδιο HMGA2. Το γονίδιο αυτό αν και δεν έχει συσχετισθεί άμεσα με την εμφάνιση καρκίνου, έχει βρεθεί όμως, ότι μπορεί να προάγει την εμφάνιση καλοηθών νεοπλασιών και η πιο συνήθης μορφή είναι αυτή των λιπωμάτων. Αποδεικνύεται με αυτό τον τρόπο ότι ακόμη και σήμερα η εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας, αν και πιο κοντά από ποτέ, επιδέχεται βελτιώσεων προτού φτάσει στο κρεβάτι των ασθενών.¹⁷⁰

Στο πεδίο της εφαρμοσμένης γονιδιακής θεραπείας, πρόσφατες κλινικές δοκιμές έδειξαν ότι τα γενετικά διορθωμένα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα μετά από μεταγωγή με γάμμα-ρετροϊκούς φορείς μπορούν να βελτιώνουν την κλινική εικόνα των ασθενών.^{171,172,173} Ειδικότερα, σε μία κλινική μελέτη για τη νόσο της βαριάς μικτής ανοσοανεπάρκειας (SCID-X1), η γονιδιακή θεραπεία ήταν

αποτελεσματική σε περισσότερους από 10 ασθενείς αλλά προκάλεσε και ανεπιθύμητες παρενέργειες που συνδέονται με μεταλλαξογένεση από την ενσωμάτωση των ιικών φορέων κοντά σε ογκογονίδια.¹⁷⁴ Επίσης μελέτες στο μοντέλο του ποντικίου έχουν δείξει ότι εξαιτίας της μεταλλαξογένεσης που προκαλείται από την ενσωμάτωση ιικών φορέων στα AAK αυτά μπορούν να οδηγηθούν στην ανάπτυξη λευχαιμίας.^{175,176} Για το λόγο αυτό υπάρχει η ανάγκη ανάπτυξης φορέων που να εξασφαλίζουν ασφαλέστερο πρότυπο ενσωμάτωσης στο γενετικό υλικό των κυττάρων-στόχων. Οι λεντοϊοί και οι αφροϊοί εμφανίζουν διαφορετικό πρότυπο ενσωμάτωσης συγκριτικά με τους ευρέως χρησιμοποιούμενους γάμμα-ρετροϊκούς φορείς.^{177,178,179} Οι αφροϊοί ενσωματώνονται σε μικρότερο βαθμό κοντά σε αλληλουχίες υποκινητών σε σχέση με τους όγκο-ρετροϊούς και λιγότερο συχνά εντός γονιδιακών αλληλουχιών συγκριτικά με τους λεντοϊούς γεγονός που τους καθιστά σχετικά ασφαλέστερους. Επιπλέον και σε αντίθεση με τους άλλους ρετροϊούς που χρησιμοποιούνται στην γονιδιακή θεραπεία, οι αφροϊοί είναι μη-παθογόνοι ενώ δεν έχει αναφερθεί κανένα νόσημα στους φυσικούς φορείς (αιλουροειδή, άλογα, χιμπαντζήδες, ουρακοτάγκους και βοοειδή) ή στους ανθρώπους που μολύνθηκαν μετά από επαφή με ζώα φορείς των αφροϊών.¹⁸⁰

Οι αφροϊκοί φορείς εκτός από το σαφές πλεονέκτημα που έχουν στο θέμα της ασφάλειας έναντι των άλλων φορέων, έχει δείχθει ότι είναι ικανοί για αποτελεσματική και σταθερή γονιδιακή μεταφορά σε AAK ποντικίου, μεγάλου ζωικού μοντέλου (π.χ. σκύλου) και ανθρώπου (CD34⁺).^{181,182,183,184} Η αποτελεσματική γονιδιακή μεταφορά επιτυγχάνεται με χαμηλά MOI, γεγονός που αυξάνει το πρότυπο ασφαλείας. Ειδικότερα, στο ζωικό μοντέλο του σκύλου με τη νόσο Canine Leukocyte Adhesion Deficiency-(CLAD), η χρήση αφροϊκών φορέων έδειξε για πρώτη φορά θεραπευτικό αποτέλεσμα.¹⁸⁵

Στη δική μας μελέτη, χρησιμοποιήσαμε ένα φορέα ο οποίος συνδυάζει στοιχεία από τους γονιδιακούς τύπους τόσο της α- όσο και της β-σφαιρίνης. Η υπόθεση ήταν ότι μία τέτοια κατασκευή θα είχε αρτιότερη αναπτυξιακή ρύθμιση με τη συνύπαρξη της λειτουργικής περιοχής του α-γονιδίου (HS40), που είναι ενεργό στον ενήλικα, αλλά και του γονιδίου της β-σφαιρίνης που εκφράζεται επίσης στην ενήλικη φάση της ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, η κατασκευή έχει το γονίδιο της ανθρώπινης β-σφαιρίνης να ρυθμίζεται μεταγραφικά από τον ομόλογο υποκινητή και από την αλληλουχία HS40 που προέρχεται από το γονιδιακό τόπο της α-σφαιρίνης και εμφανίζει δράση ενισχυτή. Ως αλληλουχία αναφοράς στη μελέτη, κατασκευάσαμε

ένα δεύτερο “συμβατικό” φορέα ο οποίος έχει τις ρυθμιστικές αλληλουχίες HS2 και HS3 από το γονιδιακό τόπο της ανθρώπινης β-σφαιρίνης (LCR) και την ίδια κασέτα έκφρασης με την πρώτη κατασκευή προκειμένου να μπορέσουμε να εξετάσουμε συγκριτικά την αποδοτικότητα των δύο διαφορετικών φορέων. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι για πρώτη φορά στη γονιδιακή θεραπεία της β-θαλασσαιμίας χρησιμοποιούνται αφοϊκοί φορείς και γι’ αυτό το λόγο τα αποτελέσματα της μελέτης είναι πρωτότυπα και το μοναδικό σημείο σύγκρισης είναι οι μελέτες με άλλους ρετροϊούς.

Οι τίτλοι των δύο φορέων HS40.β και HS2.HS3.β υπολογίστηκαν σε 3.8×10^6 και 2.5×10^6 IU/ml, αντίστοιχα (n=9 και n=6). Συγκριτικά, ο τίτλος των πρότυπων αφοϊκών φορέων που εκφράζουν ένα γονίδιο αναφοράς όπως, η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green Fluorescent Protein - GFP) και έχουν αισθητά μικρότερο μέγεθος (< 7 kb έναντι 9 kb και 10.8 kb για τους HS40.β και HS2.HS3.β αντίστοιχα) δεν ξεπερνούν το 7×10^6 IU/ml. Φαίνεται δηλαδή ότι οι ρυθμιστικές αλληλουχίες και το γονίδιο της β-σφαιρίνης εμφανίζουν μικρή παρεμβολή στον σχηματισμό και την σταθερότητα των αφοϊκών φορέων.

Η αποδοτικότητα των αφοϊκών φορέων FV ελέγχθηκε αρχικά *in vitro* στην ερυθροκυτταρική σειρά MEL. Κύτταρα της σειράς MEL υπέστησαν μεταγωγή με χαμηλό MOI (1-2) και στην συνέχεια απομονώθηκαν κυτταρικοί κλώνοι με διαδοχική αραίωση. Η έκφραση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης στους κυτταρικούς κλώνους υπολογίστηκε με κυτταρομετρία ροής (επίπεδο MFI) και άγγιξε για τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β το 65% ($\pm 16\%$) και 55% ($\pm 12\%$) της αντίστοιχης έκφρασης του θετικού κυτταρικού κλώνου MEL-YAC-C20. Τα επίπεδα της παραγωγής αυτής εκφράστηκαν ανά ενσωματωμένο ιϊκό αντίγραφο (Vector Copy Number - VCN). Σε αντίστοιχη μελέτη, οι Li et al (1999) πραγματοποίησαν έναν έλεγχο των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων της γ- και β-σφαιρίνης που ρυθμίζονται είτε από την αλληλουχία HS40 ή από τις αλληλουχίες HS2 και HS3 στην κυτταρική σειρά MEL.⁹⁸ Αυτό το οποίο έδειξαν ήταν ότι στην περίπτωση του γονιδίου της ανθρώπινης β-σφαιρίνης, τα δύο συστήματα έκφρασης οδήγησαν σε ανίχνευση παραπλήσιων μεταξύ τους επιπέδων mRNA συγκριτικά με τα επίπεδα της ενδογενούς α-σφαιρίνης του ποντικίου 46% έναντι 57.3% ανά ιϊκό αντίγραφο για τους φορείς που ρυθμίζονται από τις αλληλουχίες HS40 και HS2/HS3, αντίστοιχα. Τόσο η μελέτη μας όσο και εκείνη των Li et al. (1999) συνηγορούν στο ότι και οι δύο φορείς που χρησιμοποιούν τις διαφορετικές ρυθμιστικές αλληλουχίες επάγουν την παραγωγή εξίσου ικανών

ποσοτήτων ανθρώπινης β-σφαιρίνης. Αντίθετα, αντικρουόμενα είναι τα αποτελέσματα όσον αφορά στα επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου της γ-σφαιρίνης στην κυτταρική σειρά MEL από τα ρυθμιστικές αλληλουχίες HS40 και HS2/HS3/HS4 οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν με τον υποκινητή της ανθρώπινης β-σφαιρίνης.^{98,160} Παρότι φαίνεται ότι η ρυθμιστική αλληλουχία HS40 μπορεί και δρα συνεργιστικά με τον υποκινητή της β-σφαιρίνης, δεν γίνεται σαφές κατά πόσο στην περίπτωση του γονιδίου της γ-σφαιρίνης η ρύθμιση είναι αποτελεσματικότερη από την αλληλουχία HS40 ή τις HS2/HS3/HS4, ίσως και εξαιτίας της πολυπλοκότητας της ρύθμισης ενός εμβρυϊκά ενεργού γονιδίου σε ενήλικο ερυθροειδικό περιβάλλον. Στη μελέτη των Zhu et al (2007) η έκφραση του γονιδίου της ανθρώπινης β-σφαιρίνης στην κυτταρική σειρά K562 αποδείχθηκε αποδοτικότερη όταν ρυθμιζόταν από την αλληλουχία HS40 συγκριτικά με την HS3, κάτι το οποίο υποδεικνύει ότι η αλληλουχία HS40 είναι ικανή να προσφέρει περισσότερο αποτελεσματική ρύθμιση από κάποιες άλλες αλληλουχίες τις περιοχής LCR ξεχωριστά.¹⁸⁶

Οι αφροϊκοί φορείς χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια *ex vivo* για να μετάγουν AAK από το μοντέλο του θαλασσαιμικού ποντικίου $Hbb^{th-3/+}$ τα οποία καλλιεργήθηκαν σε ημιστερεά υλικά και απομονώθηκαν οι ερυθροειδικές αποικίες BFU-E. Τα επίπεδα της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης στις αποικίες BFU-E υπολογίστηκαν με σχετική ποσοτικοποίηση του mRNA της β-σφαιρίνης συγκριτικά με το mRNA της ενδογενούς α-σφαιρίνης του ποντικίου. Οι τιμές αυτές για τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β άγγιξαν το 12% και 2% αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές δείχνουν ότι οι αφροϊκοί φορείς μπορούν να μετάγουν αποτελεσματικά τα AAK του ποντικίου και να οδηγήσουν σε έκφραση του διαγονιδίου, ενώ η διαφορά στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των δύο φορέων ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα υπέρ του φορέα HS40.β.

Χρησιμοποιήσαμε κύτταρα του εμβρυϊκού ήπατος τα οποία και αποτελούν σημαντική πηγή αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων και χρησιμοποιούνται εναλλακτικά, εξαιτίας της σχετικής έλλειψης ενήλικων $Hbb^{th-3/+}$ ποντικών από τα οποία και απομονώνονται τα AAK του μυελού των οστών. Στην περίπτωση των ερυθροειδικών καλλιιεργειών AAK του εμβρυϊκού ήπατος του θαλασσαιμικού ποντικίου $Hbb^{th-3/+}$ τα δείγματα που είχαν υποστεί μεταγωγή έδειξαν αύξηση του αριθμού των προερυθροβλαστών (6^η ημέρα) και των βασεόφιλων ερυθροβλαστών (9^η ημέρα) σε σχέση με το θαλασσαιμικό δείγμα ελέγχου. Συγκεκριμένα στο δείγμα AAK-HS40.β αυξήθηκε ο αριθμός των κυττάρων που οδηγούνται σε ερυθροειδική

διαφοροποίηση κατά 1.6 φορές τόσο κατά την 6^η όσο και την 9^η ημέρα ενώ στο δείγμα AAK-HS2.HS3.β υπήρξε αύξηση μόλις 1.2 και 1.05 φορές, αντίστοιχα. Συμπεραίνουμε ότι οι φορείς μας έδειξαν αποκατάσταση της μη-αποδοτικής ερυθροποίησης που χαρακτηρίζει τη β-θαλασσαιμία. Επιπλέον, υπάρχει μία ελαφριά υπεροχή του φορέα HS40.β στην αποτελεσματική παραγωγή ανθρώπινης β-σφαιρίνης και κατά συνέπεια ερυθροειδικής διαφοροποίησης των AAK.

Μελετήσαμε επίσης, την αποτελεσματικότητα των φορέων μας *in vivo* εφαρμόζοντας πειράματα μεταμόσχευσης μυελού των οστών στο μοντέλο του θαλασσαιμικού ποντικίου Hbb^{th-3/+}. Γι' αυτό το σκοπό χρησιμοποιήσαμε AAK που είχαν υποστεί μεταγωγή από τους αφοιτικούς φορείς και τα οποία προέρχονταν τόσο από μυελό των οστών ενήλικων ποντικών (Lin⁻) όσο και από εμβρυϊκό ήπαρ ομόζυγων εμβρύων. Αυτό που παρατηρήσαμε είναι ότι στην περίπτωση της χρησιμοποίησης των κυττάρων Lin⁻ επετεύχθησαν μεγαλύτερα ποσοστά χιμαιρισμού καθώς και μεταγωγής των κυττάρων. Τα ποντίκια στα οποία μεταμοσχεύθηκαν AAK εμβρυϊκού ήπατος εξέφρασαν, κατά μέσο όρο, ανθρώπινη β-σφαιρίνη στο περιφερικό αίμα σε επίπεδο 11.36% και 7.17% (HS40.β και HS2.HS3.β) του ποσοστού της έκφρασης του θετικού μάρτυρα (ανθρώπινο περιφερικό αίμα) που μετρήθηκε παράλληλα. Στην περίπτωση των ποντικών που δέχθηκαν μετηγμένα κύτταρα Lin⁻ τα επίπεδα της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης από τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β κυμάνθηκαν στο 26.6% και 17.6% της αντίστοιχης έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε ανθρώπινο περιφερικό αίμα, αντίστοιχα. Με τον αριθμό των ιικών αντιγράφων ανά κύτταρο να κυμαίνεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα προκύπτει ότι τα αποτελέσματα αυτά δεν αντανakλούν διαφορές στην επιτυχία της μεταγωγής των δύο φορέων αλλά μάλλον διαφορές σε επίπεδο γονιδιακής ρύθμισης και έκφρασης στο ενήλικο περιβάλλον των κυττάρων Lin⁻ συγκριτικά με το πιο πρώιμο αναπτυξιακά περιβάλλον των εμβρυϊκών κυττάρων του ήπατος.

Τα αποτελέσματά μας ως τώρα δείχνουν ότι οι αφοιτικοί φορείς επιτυγχάνουν ικανοποιητικά επίπεδα μεταγωγής και έκφρασης του γονιδίου της ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε ερυθροειδικό περιβάλλον τόσο της ερυθροκυτταρικής σειράς MEL όσο και σε AAK ποντικίου σε πειραματικές δοκιμασίες *ex vivo* και *in vivo*. Όμως ο φορέας HS40.β φαίνεται να υπερέχει ελαφρώς του HS2.HS3.β στο περιβάλλον του ποντικίου στις περισσότερες δοκιμασίες *ex vivo* και *in vivo*.

Στην υπάρχουσα βιβλιογραφία, οι πρώτες σημαντικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο χώρο της γονιδιακής θεραπείας της β-θαλασσαιμίας έγιναν

με πρωτόκολλα μεταμόσχευσης σε φυσιολογικά ποντίκια.^{96,187} Οι φορείς που χρησιμοποιήθηκαν εξέφραζαν το γονίδιο της β-σφαιρίνης από τον ομόλογο υποκινητή και τις ρυθμιστικές αλληλουχίες HS2/HS3/HS4. Το επίπεδο έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης στο περιφερικό αίμα ποσοτικοποιήθηκε μετρώντας το mRNA της και εκφράστηκε ως προς την τιμή του mRNA της ενδογενούς β-σφαιρίνης του ποντικίου, που σε φυσιολογικά ποντίκια είναι αντίστοιχη της τιμής της α-σφαιρίνης του ποντικίου. Αρχικά, τα επίπεδα της αναλογίας ανθρώπινης β-σφαιρίνης ως προς την β-σφαιρίνη του ποντικίου (huβ/muβ) κυμαίνονταν λίγο πάνω από το 3% ενώ καθώς βελτιώνονταν οι κατασκευές των ρετροϊκών φορέων αυξήθηκαν σε 12 έως 25%. Η μεταμόσχευση στο μοντέλο του θαλασσαιμικού ποντικίου Hbb^{th-3/+} ήταν το επόμενο βήμα και εδώ τα επίπεδα παραγωγής της ανθρώπινης β-σφαιρίνης στο περιφερικό αίμα των μεταμοσχευμένων ποντικών υπολογίστηκαν σε 21% της συνολικής αιμοσφαιρίνης του ποντικίου από ένα λεντοϊκό φορέα που χρησιμοποιούσε τις ρυθμιστικές αλληλουχίες HS2/HS3/HS4.¹⁵⁶ Ο ίδιος λεντοϊκός φορέας, ο αποδοτικότερος μέχρι σήμερα φορέας στο χώρο της γονιδιακής θεραπείας της β-θαλασσαιμίας, χρησιμοποιήθηκε για να μετάγει AAK εμβρυϊκού ήπατος τα οποία μεταμοσχεύθηκαν σε ποντίκια που είχαν υποστεί μυελοαφανιστική δόση ακτινοβολίας.¹⁵⁸ Η έκφραση αυτή τη φορά άγγιξε το 30-65% την 8^η εβδομάδα και >95% την 16^η εβδομάδα, επίπεδα που είναι εμφανώς θεραπευτικά. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό που συμφωνεί με τις παρατηρήσεις μας είναι ότι την 8^η εβδομάδα μόνο τα 10 από τα 13 ποντίκια είχαν επιτυχώς μεταμοσχευθεί και την 16^η αυτά είχαν μειωθεί σε μόλις 6 από τα 13, γεγονός που δείχνει την αδυναμία των μετηγμένων AAK του εμβρυϊκού ήπατος να επιτύχουν τα επίπεδα μεταμόσχευσης που παρατηρούνται με AAK του μυελού των οστών. Αυτή η παρατήρηση έρχεται σε αντίθεση με μία από τις αρχικές μελέτες χρησιμοποίησης των κυττάρων του εμβρυϊκού ήπατος στη μεταμόσχευση ποντικίου όπου και είχε δειχθεί η αυξημένη ικανότητα μεταμόσχευσης αυτού του εμπλουτισμένου κυτταρικού πληθυσμού σε AAK.¹⁵³

Σε μία πρόσφατη μελέτη κατασκευάστηκε ένας λεντοϊκός φορέας όπου χρησιμοποιήθηκαν μόνο οι αλληλουχίες HS2 και HS3 προκειμένου να ρυθμίσουν την έκφραση του διαγονιδίου της ανθρώπινης β-σφαιρίνης και αυτός ο φορέας είναι αντίστοιχος του δικού μας φορέα HS2.HS3.β.¹⁵⁰ Στα πειράματα μεταμόσχευσης, το ποσοστό των επιτυχώς μεταμοσχευμένων ποντικών δε δίνεται από τους συγγραφείς, όμως συνολικά εμφανίζεται παραγωγή της ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε επίπεδο άνω

του 90% της συνολικής αιμοσφαιρίνης που ανιχνεύεται στο περιφερικό αίμα των ποντικών. Μετά από εφαρμογή της μεθόδου HPLC ο λόγος των αλυσίδων β-ανθρώπου/α-ποντικίου έφτασε το 23.8%. Η απευθείας σύγκριση των αποτελεσμάτων αυτών με την μελέτη μας θα ήταν εσφαλμένη και τα συμπεράσματα επισφαλή και ο λόγος έγκειται στο διαφορετικό πρωτόκολλο μυελοκαταστολής που χρησιμοποιήθηκε. Ενώ σε όλες τις μελέτες διεθνώς στη γονιδιακή θεραπεία της β-θαλασσαιμίας χρησιμοποιούνται πρωτόκολλα μυελοαφανισμού με θανάσιμες δόσεις ακτινοβολίας, στη μελέτη μας εφαρμόσαμε ένα πρωτόκολλο ήπιας μυελοκαταστολής που είναι παρεμφερές με ότι χρησιμοποιείται σε κλινικές εφαρμογές. Το αποτέλεσμα είναι ότι σε όλες τις αντίστοιχες μελέτες οι ποντικοί που χρησιμοποιούνται ως δέκτες είναι χιμαιρικοί σε ποσοστό κοντά στο 100%. Αντίθετα, στη δική μας περίπτωση υπάρχει αδυναμία εγκατάστασης του θαλασσαιμικού φαινοτύπου καθώς τα ποντίκια δέκτες που χρησιμοποιούμε είναι φυσιολογικού στελέχους και τα θαλασσαιμικά κύτταρα δότες κατά κανόνα αδυνατούν να αποτελέσουν περισσότερο από ένα ποσοστό των αιμοποιητικών κυττάρων του ποντικίου μετά τη μεταμόσχευση. Οι Persons et al. (2001) έδειξαν ότι εάν τα θαλασσαιμικά κύτταρα σε ένα χιμαιρικό ποντικό αποτελούν λιγότερο από το 50% του συνολικού πληθυσμού τότε όλες οι αιματολογικές παράμετροι πλησιάζουν εκείνες των φυσιολογικών ποντικών ($Hb > 12g/dl$ με τιμές φυσιολογικού ποντικίου $\geq 13g/dl$ και θαλασσαιμικού ποντικίου $\geq 9g/dl$).¹⁸⁸ Στην περίπτωσή μας τα κύτταρα του ποντικίου-δέκτη τα οποία επιβιώνουν μετά από μυελοκαταστολή αποτελούν συχνά περισσότερο από το 75% του συνολικού πληθυσμού των κυττάρων του μυελού των οστών του μεταμοσχευμένου ποντικίου. Ως αποτέλεσμα οι αιματολογικές παράμετροι των ποντικών ήταν ταυτόσημες με εκείνες των φυσιολογικών ποντικών και δεν μπορούσε να εκτιμηθεί η συνεισφορά των επιτυχώς μετηγμένων κυττάρων στη διόρθωση του θαλασσαιμικού φαινοτύπου. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν μόνο ένα μέρος των κυττάρων που μεταμοσχεύονται τα οποία με τη σειρά τους αποτελούν ένα υποσύνολο των κυττάρων του μυελού των οστών του χιμαιρικού ποντικίου. Επομένως, η πιο αντιπροσωπευτική μέτρηση που μπορούμε να παραθέσουμε είναι ο αριθμός των κυττάρων του περιφερικού αίματος που εκφράζουν την ανθρώπινη β-σφαιρίνη, η οποία προέρχεται αποκλειστικά από τους αφοοϊκούς φορείς μας, και το ποσοστό του συνολικού πληθυσμού που αυτά αποτελούν. Παρόλα αυτά, στις περιπτώσεις ποντικών όπου το επίπεδο της μεταμόσχευσης κρίθηκε ικανοποιητικό, αξιολογήσαμε και την επίδραση που έχει η

έκφραση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης από τους αφροϊκούς φορείς στη διόρθωση των αιματολογικών παραμέτρων και των αιμοποιητικών οργάνων.

Οι δύο τελευταίες μελέτες που αναφέρθηκαν, από τους Miccio et al (2008) και Persons et al (2001) αναλύουν και μία εξαιρετικά σημαντική παράμετρο της γονιδιακής θεραπείας της β-θαλασσαιμίας, τον προσδιορισμό του ελάχιστου αριθμού διορθωμένων κυττάρων που απαιτούνται για τη διόρθωση του θαλασσαιμικού φαινοτύπου. Προκύπτει ότι 10-20% διορθωμένα κύτταρα είναι αρκετά για να βελτιώσουν αισθητά την εικόνα της ενδιάμεσης θαλασσαιμίας όπως αυτή μελετάται στο μοντέλο του θαλασσαιμικού ποντικού Hbb^{th-3/+}. Επίσης, σε ασθενείς με βαριά β-θαλασσαιμία (ομόζυγος-β⁰) έχει αναφερθεί ότι η επικράτηση ενός ποσοστού επιτυχώς μεταμοσχευμένων φυσιολογικών κυττάρων της τάξης του 25% βελτίωσε αισθητά την παραγωγή της β-σφαιρίνης (Hb 8.3-9.3 g/dl).¹⁸⁹ Σε συνδυασμό με το γεγονός ότι στις κλινικές μελέτες δεν επιτρέπεται η χρησιμοποίηση πρωτοκόλλων μυελοαφανισμού αλλά τα πρωτόκολλα πλησιάζουν περισσότερο στη μέθοδο μυελοκαταστολής που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη μας, η γνώση των τιμών αυτών είναι πολύ σημαντική, καθότι θέτουν το στόχο του αριθμού των διορθωμένων ΑΑΚ που πρέπει να επιτευχθεί στις μελέτες γονιδιακής θεραπείας της β-θαλασσαιμίας πριν αυτές οδηγηθούν σε κλινικές δοκιμές.

Στη μελέτη μας αυτή τα χαμηλά επίπεδα χιμαιρισμού δεν μας επέτρεψαν να διερευνήσουμε σφαιρικά την αποτελεσματικότητα των φορέων μας στο μοντέλο του θαλασσαιμικού ποντικού, παρόλα αυτά τα αποτελέσματά μας επιτρέπουν να είμαστε αισιόδοξοι. Επιτυγχάνοντας ποσοστά έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης της τάξεως του 26.6% και 17.6% για τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β, αντίστοιχα, από ένα μικρό κάθε φορά πληθυσμό μεταμοσχευμένων κυττάρων είμαστε κοντά στο κατώφλι της έκφρασης που απαιτείται για επιτυχή εφαρμογή των κλινικών δοκιμών. Συγχρόνως, με αυτό το τρόπο προσομοιώνεται και το τι θα μπορούσε να συμβεί στην περίπτωση χρησιμοποίησης των αφροϊκών φορέων για κλινικές δοκιμές υπό αντίστοιχες συνθήκες μερικής μυελοκαταστολής.

Στα πειραματόζωα που εμφάνισαν υψηλές τιμές χιμαιρισμού έγινε και αξιολόγηση των αιματολογικών παραμέτρων. Διαπιστώσαμε με αυτό τον τρόπο πως η έκφραση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης από τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β οδήγησε όχι μόνο σε αύξηση της συνολικής αιμοσφαιρίνης (Hb) αλλά και σε αύξηση του αριθμού των ερυθροκυττάρων (RBC), στην αύξηση του αιματοκρίτη (HCT) καθώς και στην αύξηση του μέσου όγκου των ερυθροκυττάρων (MCV). Όλες οι τιμές

αυτές προσέγγισαν τις τιμές των φυσιολογικών ποντικών. Ακόμα ιδιαίτερα σημαντική ήταν και η αποκατάσταση του εύρους της κατανομής του μεγέθους των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RDW) ενώ η μεταμόσχευση γενετικά διορθωμένων αρχέγονων κυττάρων απέτρεψε την εκδήλωση σπληνομεγαλίας διατηρώντας το μέγεθος του σπλήνα σε επίπεδα κοντά σε εκείνα των φυσιολογικών ποντικών. Ταυτόχρονα και η ίδια η εικόνα του περιφερικού αίματος των μεταμοσχευμένων ποντικών έδειχνε βελτίωση, με μειωμένη ανισοκυττάρωση, αιμοαραίωση και απόπτωση των ερυθροκυττάρων. Παρόμοια με τη δική μας ήταν η εικόνα διόρθωσης του θαλασσαιμικού φαινοτύπου σε μεταμοσχευμένα πειραματόζωα των Miccio et al. (2008) οι οποίοι χρησιμοποίησαν ένα λεντοϊκό φορέα με τις ρυθμιστικές αλληλουχίες HS2/HS3. Τα αποτελέσματα αυτά συνηγορούν υπέρ της ισάξιας δραστηριότητας των δύο αφοϊκών φορέων στη βελτίωση της β-θαλασσαιμίας στον ποντικό.

Τέλος, η μελέτη της αποδοτικότητας των αφοϊκών φορέων ελέγχθηκε και σε ΑΑΚ (CD34⁺) από θαλασσαιμικούς ασθενείς με βαριά β-θαλασσαιμία (β⁰). Τα κύτταρα καλλιιεργήθηκαν *ex vivo* κάτω από συνθήκες ερυθροειδικής διαφοροποίησης και μετά από 15-18 ημέρες μετρήθηκαν τα επίπεδα της β-σφαιρίνης και ο βαθμός της ερυθροποίησης. Συγκεκριμένα, με τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β επετεύχθη αύξηση της παραγωγής της β-σφαιρίνης σε σχέση με το θαλασσαιμικό δείγμα ελέγχου κατά 1.5 και 1.7 φορές, θετικά για β-σφαιρίνη κύτταρα: 26% και 36% αντίστοιχα. Ως αποτέλεσμα της παραγωγής β-σφαιρίνης από τους αφοϊκούς φορείς, αυξήθηκε ο βαθμός της αποδοτικής ερυθροποίησης κατά 1.8 και 2.2 φορές διορθώνοντας την ελαττωματική αιμοποίηση των θαλασσαιμικών κυττάρων CD34⁺. Μία άλλη παράμετρος που αναλύσαμε στο σύστημα αυτό ήταν και η απόπτωση που λόγω της αδυναμίας ερυθροειδικής διαφοροποίησης του θαλασσαιμικού δείγματος είναι αυξημένη στα παθολογικά κύτταρα. Εφαρμόζοντας χρώση για annexin V είδαμε ότι τα δείγματα HS40.β-CD34⁺ και HS2.HS3-CD34⁺ εμφάνισαν μειωμένη απόπτωση κατά 1.9 και 3.5 φορές. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα αυτά έρχονται τα δεδομένα των Puthenveetil et al. (2004) οι οποίοι χρησιμοποίησαν ένα λεντοϊκό φορέα που εξέφραζε το γονίδιο της β-σφαιρίνης από τον ομόλογο υποκινητή και τις ρυθμιστικές αλληλουχίες HS2/HS3/HS4 και πέτυχαν σημαντική μείωση της απόπτωσης στην ερυθροειδική υγρή καλλιέργεια των θαλασσαιμικών κυττάρων CD34⁺ (από 49±12% σε 2±1%), όπως μετρήθηκε με χρώση για annexin V, και σημείωσαν αύξηση της

παραγωγής των αλυσίδων της β-σφαιρίνης από $7.3 \pm 7\%$ σε $75 \pm 14\%$, όπως υπολογίσθηκαν με HPLC.¹⁶³

Συμπερασματικά, ο φορέας HS40.β με το μικρό και ισχυρό ενισχυτή HS40 από το γενετικό τόπο της ανθρώπινης α-σφαιρίνης επιτυγχάνει υψηλότερο τίτλο και αποτελεσματικότερα επίπεδα γονιδιακής μεταφοράς από τον πιο σύνθετο και μεγάλο σε μέγεθος φορέα HS2.HS3.β. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να είναι αποδοτικότερος *in vitro*, *ex vivo* και *in vivo* στο ζωικό μοντέλο της β-θαλασσαιμίας και σε συνθήκες χαμηλού MOI. Επίσης, λαμβάνοντας υπόψη ότι εκφράζουμε ένα ανθρώπινο διαγονίδιο με ανθρώπινες ρυθμιστικές αλληλουχίες στο σύστημα του ποντικίου συμπεραίνουμε ότι η περισσότερη πολύπλοκη σύνθεση του φορέα HS2.HS3.β έναντι του HS40.β ίσως δεν έχει πλεονέκτημα στη μεταγραφική ρύθμιση. Από τις μέχρι σήμερα μελέτες έχει γίνει γνωστό ότι οι ρυθμιστικές αλληλουχίες των σφαιρινών είναι διατηρημένες σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των δύο ειδών, ποντικίου και ανθρώπου.^{50,190,191,192,193} Αυτό το οποίο βρέθηκε από τους Erner et al (1998) είναι ότι στο σύστημα του ποντικίου η παρουσία της ρυθμιστικής περιοχής LCR είναι ευεργετική για την έκφραση των γονιδίων των σφαιρινών αλλά όχι απαραίτητη.²² Ο γονιδιακός τύπος της β-σφαιρίνης του ποντικίου βρίσκεται σε ανοιχτή διαμόρφωση της χρωματίνης οπότε και οι ρυθμιστικές αλληλουχίες με αντίστοιχη ικανότητα, όπως, η αλληλουχία HS3, δεν προσδίδουν πλεονέκτημα στην έκφραση της β-σφαιρίνης. Αντίθετα, στο ανθρώπινο σύστημα η μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων των σφαιρινών είναι πιο αυστηρά ελεγχόμενη. Επομένως, στο ανθρώπινο περιβάλλον ($CD34^+$ AAK) ο φορέας HS2.HS3.β εμφανίζεται εξίσου αποδοτικός με το HS40.β στην έκφραση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης. Το γεγονός αυτό αναδεικνύει την πιο στενή μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της β-σφαιρίνης στα ανθρώπινα κύτταρα, όπου γίνεται εμφανές το πλεονέκτημα της ύπαρξης περισσότερου εκτενών αλληλουχιών της ανθρώπινης ρυθμιστικής περιοχής LCR στον φορέα έκφρασης όπως είναι η περίπτωση του HS2.HS3.β.

Η έρευνα στη γονιδιακή θεραπεία της β-θαλασσαιμίας ως τις μέρες μας έχει περιορίσει το πεδίο δράσης της στην αποκατάσταση ενός λειτουργικού γονιδίου της β-σφαιρίνης. Με δεδομένο το γεγονός πως ο θαλασσαιμικός φαινότυπος οφείλεται κατά μείζονα λόγο στις ελεύθερες αλυσίδες της α-σφαιρίνης, οι οποίες οδηγούν στην πρόωμη απόπτωση των ερυθροκυττάρων, είναι λογικό κάποιος να υποθέσει ότι ο έλεγχος των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου της α-σφαιρίνης θα μπορούσε να αποτελέσει μία εναλλακτική θεραπευτική προσέγγιση για την αντιμετώπιση της β-

θαλασσαιμίας. Τα στοιχεία που προκύπτουν από την παρατήρηση ασθενών που έχουν συγκληρονομήσει τόσο την α -θαλασσαιμία όσο και τη β -θαλασσαιμία δείχνουν ότι εμφανίζουν έναν περισσότερο ήπιο φαινότυπο θαλασσαιμίας εξαιτίας μίας πιο ισορροπημένης σύνθεσης των αλυσίδων α - και β -σφαιρίνης.

Οι προσεγγίσεις της παρεμβολής του RNA στην έρευνα της β -θαλασσαιμίας έως τώρα υπήρξαν ελάχιστες. Οι Xie et al. (2007) πραγματοποίησαν μία μελέτη *in vivo* σε ένα θαλασσαιμικό μοντέλο ποντικού ($Hbb^{th-4/+}$) και έδειξαν μείωση των επιπέδων της α -σφαιρίνης κατά 20-35% σε επίπεδο mRNA με τη χρησιμοποίηση μίας μικρής αλληλουχίας RNA έναντι του γονιδίου της α -σφαιρίνης.¹³⁸ Μία άλλη μελέτη που αξιοποιούσε τον μηχανισμό της παρεμβολής του RNA αφορούσε στην στόχευση του μεταλλαγμένου γονιδίου της β -σφαιρίνης που οδηγεί στην δρεπανοκυτταρική αναιμία.¹³⁷

Στη μελέτη μας επιχειρήσαμε να αξιολογήσουμε μία συνδυαστική κατασκευή αφοϊκού φορέα ο οποίος κωδικοποιεί τόσο το γονίδιο της β -σφαιρίνης όσο και μία μικρή αλληλουχία RNA (shRNA) που στοχεύει το γονίδιο της α -σφαιρίνης. Σκοπός ήταν να διερευνήσουμε κατά πόσο μπορούμε αυξάνοντας τα επίπεδα της β -σφαιρίνης και ταυτόχρονα μειώνοντας εκείνα της α -σφαιρίνης να επιτύχουμε καλύτερη ισορροπία μεταξύ των δύο αλυσίδων και μερική αποκατάσταση της μη αποδοτικής ερυθροποίησης που χαρακτηρίζει τη β -θαλασσαιμία. Από μελέτες που έχουν γίνει σε δείγματα περιφερικού αίματος ετεροζυγωτών με β -θαλασσαιμία προκύπτει ότι ο λόγος μεταξύ των αλυσίδων της α - και β -σφαιρίνης τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης όσο και σε επίπεδο mRNA κυμαίνεται κοντά στο 2 (β -/ α -σφαιρίνη ~ 0.5).^{52,194} Η δική μας ερευνητική προσπάθεια έδειξε ότι ο συνδυαστικός φορέας μπορεί να διαφοροποιήσει σημαντικά το λόγο των αλυσίδων β -/ α - ο οποίος στην περίπτωση των ομόζυγων θαλασσαιμικών ασθενών υπολογίσαμε ότι κυμαίνεται κοντά στο 0.1. Η χρησιμοποίηση του φορέα H4/HS40. β βελτίωσε σημαντικά το λόγο των β -/ α -αλυσίδων σε επίπεδο περίπου διπλάσιο από τη διόρθωση που επετεύχθη με τους απλούς φορείς HS40. β και H4. Αυτός ο φορέας οδήγησε σε μερική αποκατάσταση του θαλασσαιμικού φαινοτύπου και της μη-αποδοτικής ερυθροποίησης, όπως αυτή μελετήθηκε με κυτταρομετρία ροής.

Βιβλιογραφία



- 1 Osawa M, Hanada K, Hamada H & Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* (1996); **273**: 242-245.
- 2 Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA & Lemischka IR. A stem cell molecular signature. *Science* (2002); **298**: 601-604.
- 3 Ishida A, Zeng H & Ogawa M. Expression of lineage markers by CD34+ hematopoietic stem cells of adult mice. *Exp Hematol* (2002); **30**: 361-365.
- 4 Sanchez MJ, Holmes A, Miles C & Dzierzak E. Characterization of the first definitive hematopoietic stem cells in the AGM and liver of the mouse embryo. *Immunity* (1996); **5**: 513-525.
- 5 Yoder MC, Hiatt K, Dutt P, Mukherjee P, Bodine DM & Orlic D. Characterization of definitive lymphohematopoietic stem cells in the day 9 murine yolk sac. *Immunity* (1997); **7**: 335-344.
- 6 Ito T, Tajima F & Ogawa M. Developmental changes of CD34 expression by murine hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* (2000); **28**: 1269-1273.
- 7 Matsuoka S, Ebihara Y, Xu M, Ishii T, Sugiyama D, Yoshino H, *et al.* CD34 expression on long-term repopulating hematopoietic stem cells changes during developmental stages. *Blood* (2001); **97**: 419-425.
- 8 Betschinger J & Knoblich JA. Dare to be different: asymmetric cell division in *Drosophila*, *C. elegans* and vertebrates. *Curr Biol* (2004); **14**: R674-685.
- 9 Blank U, Karlsson G & Karlsson S. Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood* (2008); **111**: 492-503.
- 10 Morrison SJ & Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* (2006); **441**: 1068-1074.
- 11 Xie T & Spradling AC. A niche maintaining germ line stem cells in the *Drosophila* ovary. *Science* (2000); **290**: 328-330.
- 12 Kiger AA, Jones DL, Schulz C, Rogers MB & Fuller MT. Stem cell self-renewal specified by JAK-STAT activation in response to a support cell cue. *Science* (2001); **294**: 2542-2545.
- 13 Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* (1978); **4**: 7-25.

- 14 Abkowitz JL, Catlin SN, McCallie MT & Gutter P. Evidence that the number of hematopoietic stem cells per animal is conserved in mammals. *Blood* (2002); **100**: 2665-2667.
- 15 Adams GB & Scadden DT. The hematopoietic stem cell in its place. *Nat Immunol* (2006); **7**: 333-337.
- 16 Tinsley JC, Jr., Moore CV & et al. The role of oxygen in the regulation of erythropoiesis; depression of the rate of delivery of new red cells to the blood by high concentrations of inspired oxygen. *J Clin Invest* (1949); **28**: 1544-1564.
- 17 Jacobson LO, Goldwasser E, Fried W & Plzak L. Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature* (1957); **179**: 633-634.
- 18 McNiece IK, Langley KE & Zsebo KM. Recombinant human stem cell factor synergises with GM-CSF, G-CSF, IL-3 and epo to stimulate human progenitor cells of the myeloid and erythroid lineages. *Exp Hematol* (1991); **19**: 226-231.
- 19 Muta K, Krantz SB, Bondurant MC & Dai CH. Stem cell factor retards differentiation of normal human erythroid progenitor cells while stimulating proliferation. *Blood* (1995); **86**: 572-580.
- 20 Collins FS & Weissman SM. The molecular genetics of human hemoglobin. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* (1984); **31**: 315-462.
- 21 Grosveld F, van Assendelft GB, Greaves DR & Kollias G. Position-independent, high-level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice. *Cell* (1987); **51**: 975-985.
- 22 Epner E, Reik A, Cimborá D, Telling A, Bender MA, Fiering S, *et al.* The beta-globin LCR is not necessary for an open chromatin structure or developmentally regulated transcription of the native mouse beta-globin locus. *Mol Cell* (1998); **2**: 447-455.
- 23 Reik A, Telling A, Zitnik G, Cimborá D, Epner E & Groudine M. The locus control region is necessary for gene expression in the human beta-globin locus but not the maintenance of an open chromatin structure in erythroid cells. *Mol Cell Biol* (1998); **18**: 5992-6000.
- 24 Milot E, Strouboulis J, Trimbom T, Wijgerde M, de Boer E, Langeveld A, *et al.* Heterochromatin effects on the frequency and duration of LCR-mediated gene transcription. *Cell* (1996); **87**: 105-114.

- 25 Wijgerde M, Grosveld F & Fraser P. Transcription complex stability and chromatin dynamics in vivo. *Nature* (1995); **377**: 209-213.
- 26 Gribnau J, de Boer E, Trimborn T, Wijgerde M, Milot E, Grosveld F, *et al.* Chromatin interaction mechanism of transcriptional control in vivo. *EMBO J* (1998); **17**: 6020-6027.
- 27 Bungert J, Tanimoto K, Patel S, Liu Q, Fear M & Engel JD. Hypersensitive site 2 specifies a unique function within the human beta-globin locus control region to stimulate globin gene transcription. *Mol Cell Biol* (1999); **19**: 3062-3072.
- 28 Tuan D, Kong S & Hu K. Transcription of the hypersensitive site HS2 enhancer in erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1992); **89**: 11219-11223.
- 29 Blackwood EM & Kadonaga JT. Going the distance: a current view of enhancer action. *Science* (1998); **281**: 60-63.
- 30 Bulger M & Groudine M. Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev* (1999); **13**: 2465-2477.
- 31 Dhar V, Nandi A, Schildkraut CL & Skoultschi AI. Erythroid-specific nuclease-hypersensitive sites flanking the human beta-globin domain. *Mol Cell Biol* (1990); **10**: 4324-4333.
- 32 Forrester WC, Novak U, Gelinas R & Groudine M. Molecular analysis of the human beta-globin locus activation region. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1989); **86**: 5439-5443.
- 33 Talbot D, Collis P, Antoniou M, Vidal M, Grosveld F & Greaves DR. A dominant control region from the human beta-globin locus conferring integration site-independent gene expression. *Nature* (1989); **338**: 352-355.
- 34 Collis P, Antoniou M & Grosveld F. Definition of the minimal requirements within the human beta-globin gene and the dominant control region for high level expression. *EMBO J* (1990); **9**: 233-240.
- 35 Curtin PT, Liu DP, Liu W, Chang JC & Kan YW. Human beta-globin gene expression in transgenic mice is enhanced by a distant DNase I hypersensitive site. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1989); **86**: 7082-7086.
- 36 Fraser P, Hurst J, Collis P & Grosveld F. DNaseI hypersensitive sites 1, 2 and 3 of the human beta-globin dominant control region direct position-independent expression. *Nucleic Acids Res* (1990); **18**: 3503-3508.

- 37 Ryan TM, Behringer RR, Martin NC, Townes TM, Palmiter RD & Brinster RL. A single erythroid-specific DNase I super-hypersensitive site activates high levels of human beta-globin gene expression in transgenic mice. *Genes Dev* (1989); **3**: 314-323.
- 38 Caterina JJ, Ryan TM, Pawlik KM, Palmiter RD, Brinster RL, Behringer RR, *et al.* Human beta-globin locus control region: analysis of the 5' DNase I hypersensitive site HS 2 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1991); **88**: 1626-1630.
- 39 Talbot D & Grosveld F. The 5'HS2 of the globin locus control region enhances transcription through the interaction of a multimeric complex binding at two functionally distinct NF-E2 binding sites. *EMBO J* (1991); **10**: 1391-1398.
- 40 Ney PA, Sorrentino BP, Lowrey CH & Nienhuis AW. Inducibility of the HS II enhancer depends on binding of an erythroid specific nuclear protein. *Nucleic Acids Res* (1990); **18**: 6011-6017.
- 41 Caterina JJ, Ciavatta DJ, Donze D, Behringer RR & Townes TM. Multiple elements in human beta-globin locus control region 5' HS 2 are involved in enhancer activity and position-independent, transgene expression. *Nucleic Acids Res* (1994); **22**: 1006-1011.
- 42 Philipsen S, Pruzina S & Grosveld F. The minimal requirements for activity in transgenic mice of hypersensitive site 3 of the beta globin locus control region. *EMBO J* (1993); **12**: 1077-1085.
- 43 Gillemans N, Tewari R, Lindeboom F, Rottier R, de Wit T, Wijgerde M, *et al.* Altered DNA-binding specificity mutants of EKLF and Sp1 show that EKLF is an activator of the beta-globin locus control region in vivo. *Genes Dev* (1998); **12**: 2863-2873.
- 44 Ellis J, Tan-Un KC, Harper A, Michalovich D, Yannoutsos N, Philipsen S, *et al.* A dominant chromatin-opening activity in 5' hypersensitive site 3 of the human beta-globin locus control region. *EMBO J* (1996); **15**: 562-568.
- 45 Pruzina S, Hanscombe O, Whyatt D, Grosveld F & Philipsen S. Hypersensitive site 4 of the human beta globin locus control region. *Nucleic Acids Res* (1991); **19**: 1413-1419.
- 46 Lowrey CH, Bodine DM & Nienhuis AW. Mechanism of DNase I hypersensitive site formation within the human globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1992); **89**: 1143-1147.

- 47 Stamatoyannopoulos JA, Goodwin A, Joyce T & Lowrey CH. NF-E2 and GATA binding motifs are required for the formation of DNase I hypersensitive site 4 of the human beta-globin locus control region. *EMBO J* (1995); **14**: 106-116.
- 48 Higgs DR, Wood WG, Jarman AP, Sharpe J, Lida J, Pretorius IM, *et al.* A major positive regulatory region located far upstream of the human alpha-globin gene locus. *Genes Dev* (1990); **4**: 1588-1601.
- 49 Jarman AP, Wood WG, Sharpe JA, Gourdon G, Ayyub H & Higgs DR. Characterization of the major regulatory element upstream of the human alpha-globin gene cluster. *Mol Cell Biol* (1991); **11**: 4679-4689.
- 50 Gourdon G, Sharpe JA, Higgs DR & Wood WG. The mouse alpha-globin locus regulatory element. *Blood* (1995); **86**: 766-775.
- 51 Weatherall DJ & Clegg JB. *The thalassaemia syndromes*. 3rd edn, (Blackwell Scientific, 1981).
- 52 Stamatoyannopoulos G. *The molecular basis of blood diseases*. 3rd edn, (W.B. Saunders, 2001).
- 53 Nathan DG, Orkin SH & Oski FA. *Nathan and Oski's hematology of infancy and childhood*. 5th edn, (W.B. Saunders, 1998).
- 54 Bowdler AJ. *The complete spleen : structure, function, and clinical disorders*. 2nd edn, (Humana Press, 2002).
- 55 Blendis LM, Modell CB, Bowdler AJ & Williams R. Some effects of splenectomy in thalassaemia major. *Br J Haematol* (1974); **28**: 77-87.
- 56 Penberthy GC & Cooley TB. Results of Splenectomy in Childhood. *Ann Surg* (1935); **102**: 645-655.
- 57 Modell B, Petrou M, Ward RH, Fairweather DV, Rodeck C, Varnavides LA, *et al.* Effect of fetal diagnostic testing on birth-rate of thalassaemia major in Britain. *Lancet* (1984); **2**: 1383-1386.
- 58 Piomelli S, Hart D, Graziano J, Grant G, Karparkin M & McCarthy K. Current strategies in the management of Cooley's anemia. *Ann N Y Acad Sci* (1985); **445**: 256-267.
- 59 Cohen A, Gayer R & Mizanin J. Long-term effect of splenectomy on transfusion requirements in thalassemia major. *Am J Hematol* (1989); **30**: 254-256.
- 60 Whipple GH. Problems in Anemia. *Bull N Y Acad Med* (1936); **12**: 322-324.

- 61 Howell J & Wyatt JP. Development of pigmentary cirrhosis in Cooley's anemia. *AMA Arch Pathol* (1953); **55**: 423-431.
- 62 Ellis GH, Brandt CS & Thacker EJ. Factors influencing the uptake of iron by blood and by bone marrow cells in vitro. *Science* (1954); **119**: 94-95.
- 63 Erlandson ME, Golubow J, Wehman J & Smith CH. Metabolism of Iron, Calcium and Magnesium in Homozygous Thalassemia. *Ann N Y Acad Sci* (1964); **119**: 769-775.
- 64 Fink H. Transfusion Hemochromatosis in Cooley's Anemia. *Ann N Y Acad Sci* (1964); **119**: 680-685.
- 65 Modell B, Khan M & Darlison M. Survival in beta-thalassaemia major in the UK: data from the UK Thalassaemia Register. *Lancet* (2000); **355**: 2051-2052.
- 66 Borgna-Pignatti C, Rugolotto S, De Stefano P, Zhao H, Cappellini MD, Del Vecchio GC, *et al.* Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine. *Haematologica* (2004); **89**: 1187-1193.
- 67 Barrett AJ, Lucarelli G, Gale RP, Sobocinski A, Horowitz M & Bortin MM. Bone marrow transplantation for thalassaemia--a preliminary report from the International Bone Marrow Transplant Registry. *Prog Clin Biol Res* (1989); **309**: 173-185.
- 68 Lucarelli G, Galimberti M, Polchi P, Angelucci E, Baronciani D, Giardini C, *et al.* Bone marrow transplantation in patients with thalassemia. *N Engl J Med* (1990); **322**: 417-421.
- 69 Lucarelli G, Andreani M & Angelucci E. The cure of thalassemia by bone marrow transplantation. *Blood Rev* (2002); **16**: 81-85.
- 70 Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* (1993); **81**: 2844-2853.
- 71 Orlic D & Bodine DM. What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): will the real PHSC please stand up! *Blood* (1994); **84**: 3991-3994.
- 72 Stamatoyannopoulos G. Prospects for developing a molecular cure for thalassemia. *Hematology* (2005); **10 Suppl 1**: 255-257.
- 73 Williams DA, Lemischka IR, Nathan DG & Mulligan RC. Introduction of new genetic material into pluripotent haematopoietic stem cells of the mouse. *Nature* (1984); **310**: 476-480.

- 74 Gelinas RE, Bender MA, Miller AD & Novak U. Long-term expression of the human beta-globin gene after retroviral transfer into pluripotent hematopoietic stem cells of the mouse. *Adv Exp Med Biol* (1989); **271**: 135-148.
- 75 Miller DG, Adam MA & Miller AD. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol* (1990); **10**: 4239-4242.
- 76 Challita PM & Kohn DB. Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1994); **91**: 2567-2571.
- 77 Yoder JA, Walsh CP & Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* (1997); **13**: 335-340.
- 78 Pannell D, Osborne CS, Yao S, Sukonnik T, Pasceri P, Karauskakis A, *et al.* Retrovirus vector silencing is de novo methylase independent and marked by a repressive histone code. *EMBO J* (2000); **19**: 5884-5894.
- 79 Gautsch JW & Wilson MC. Delayed de novo methylation in teratocarcinoma suggests additional tissue-specific mechanisms for controlling gene expression. *Nature* (1983); **301**: 32-37.
- 80 Niwa O, Yokota Y, Ishida H & Sugahara T. Independent mechanisms involved in suppression of the Moloney leukemia virus genome during differentiation of murine teratocarcinoma cells. *Cell* (1983); **32**: 1105-1113.
- 81 Kempler G, Freitag B, Berwin B, Nanassy O & Barklis E. Characterization of the Moloney murine leukemia virus stem cell-specific repressor binding site. *Virology* (1993); **193**: 690-699.
- 82 Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, *et al.* In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* (1996); **272**: 263-267.
- 83 Russell DW & Miller AD. Foamy virus vectors. *J Virol* (1996); **70**: 217-222.
- 84 Sadelain M, Rivella S, Lisowski L, Samakoglu S & Riviere I. Globin gene transfer for treatment of the beta-thalassemias and sickle cell disease. *Best Pract Res Clin Haematol* (2004); **17**: 517-534.
- 85 Buchman AR & Berg P. Comparison of intron-dependent and intron-independent gene expression. *Mol Cell Biol* (1988); **8**: 4395-4405.

- 86 Cone RD, Weber-Benarous A, Baorto D & Mulligan RC. Regulated expression of a complete human beta-globin gene encoded by a transmissible retrovirus vector. *Mol Cell Biol* (1987); **7**: 887-897.
- 87 Dzierzak EA, Papayannopoulou T & Mulligan RC. Lineage-specific expression of a human beta-globin gene in murine bone marrow transplant recipients reconstituted with retrovirus-transduced stem cells. *Nature* (1988); **331**: 35-41.
- 88 Bender MA, Gelinas RE & Miller AD. A majority of mice show long-term expression of a human beta-globin gene after retrovirus transfer into hematopoietic stem cells. *Mol Cell Biol* (1989); **9**: 1426-1434.
- 89 Tuan DY, Solomon WB, London IM & Lee DP. An erythroid-specific, developmental-stage-independent enhancer far upstream of the human "beta-like globin" genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1989); **86**: 2554-2558.
- 90 Moi P & Kan YW. Synergistic enhancement of globin gene expression by activator protein-1-like proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1990); **87**: 9000-9004.
- 91 Novak U, Harris EA, Forrester W, Groudine M & Gelinas R. High-level beta-globin expression after retroviral transfer of locus activation region-containing human beta-globin gene derivatives into murine erythroleukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1990); **87**: 3386-3390.
- 92 Takekoshi KJ, Oh YH, Westerman KW, London IM & Leboulch P. Retroviral transfer of a human beta-globin/delta-globin hybrid gene linked to beta locus control region hypersensitive site 2 aimed at the gene therapy of sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1995); **92**: 3014-3018.
- 93 Philipsen S, Talbot D, Fraser P & Grosveld F. The beta-globin dominant control region: hypersensitive site 2. *EMBO J* (1990); **9**: 2159-2167.
- 94 Walters M, Kim C & Gelinas R. Characterization of a DNA binding activity in DNase I hypersensitive site 4 of the human globin locus control region. *Nucleic Acids Res* (1991); **19**: 5385-5393.
- 95 Sadelain M, Wang CH, Antoniou M, Grosveld F & Mulligan RC. Generation of a high-titer retroviral vector capable of expressing high levels of the human beta-globin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1995); **92**: 6728-6732.

- 96 May C, Rivella S, Callegari J, Heller G, Gaensler KM, Luzzatto L, *et al.* Therapeutic haemoglobin synthesis in beta-thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human beta-globin. *Nature* (2000); **406**: 82-86.
- 97 Ren S, Wong BY, Li J, Luo XN, Wong PM & Atweh GF. Production of genetically stable high-titer retroviral vectors that carry a human gamma-globin gene under the control of the alpha-globin locus control region. *Blood* (1996); **87**: 2518-2524.
- 98 Li Q, Emery DW, Fernandez M, Han H & Stamatoyannopoulos G. Development of viral vectors for gene therapy of beta-chain hemoglobinopathies: optimization of a gamma-globin gene expression cassette. *Blood* (1999); **93**: 2208-2216.
- 99 Pawliuk R, Westerman KA, Fabry ME, Payen E, Tighe R, Bouhassira EE, *et al.* Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy. *Science* (2001); **294**: 2368-2371.
- 100 Schweizer M, Falcone V, Gange J, Turek R & Neumann-Haefelin D. Simian foamy virus isolated from an accidentally infected human individual. *J Virol* (1997); **71**: 4821-4824.
- 101 Hill CL, Bieniasz PD & McClure MO. Properties of human foamy virus relevant to its development as a vector for gene therapy. *J Gen Virol* (1999); **80 (Pt 8)**: 2003-2009.
- 102 Trobridge G, Vassilopoulos G, Josephson N & Russell DW. Gene transfer with foamy virus vectors. *Methods Enzymol* (2002); **346**: 628-648.
- 103 Vassilopoulos G, Trobridge G, Josephson NC & Russell DW. Gene transfer into murine hematopoietic stem cells with helper-free foamy virus vectors. *Blood* (2001); **98**: 604-609.
- 104 Josephson NC, Vassilopoulos G, Trobridge GD, Priestley GV, Wood BL, Papayannopoulou T, *et al.* Transduction of human NOD/SCID-repopulating cells with both lymphoid and myeloid potential by foamy virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002); **99**: 8295-8300.
- 105 Kao FT & Puck TT. Genetics of somatic mammalian cells, VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1968); **60**: 1275-1281.
- 106 Mergia A & Luciw PA. Replication and regulation of primate foamy viruses. *Virology* (1991); **184**: 475-482.

- 107 Renshaw RW, Gonda MA & Casey JW. Structure and transcriptional status of bovine syncytial virus in cytopathic infections. *Gene* (1991); **105**: 179-184.
- 108 van Haaften G, Plasterk RH & Tijsterman M. Genomic instability and cancer: scanning the *Caenorhabditis elegans* genome for tumor suppressors. *Oncogene* (2004); **23**: 8366-8375.
- 109 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE & Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* (1998); **391**: 806-811.
- 110 Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, *et al.* The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* (2000); **403**: 901-906.
- 111 Tijsterman M, Ketting RF & Plasterk RH. The genetics of RNA silencing. *Annu Rev Genet* (2002); **36**: 489-519.
- 112 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* (2004); **116**: 281-297.
- 113 Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* (2003); **425**: 415-419.
- 114 Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM & Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* (2001); **409**: 363-366.
- 115 Kisielow M, Kleiner S, Nagasawa M, Faisal A & Nagamine Y. Isoform-specific knockdown and expression of adaptor protein ShcA using small interfering RNA. *Biochem J* (2002); **363**: 1-5.
- 116 Caudy AA, Ketting RF, Hammond SM, Denli AM, Bathoorn AM, Tops BB, *et al.* A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature* (2003); **425**: 411-414.
- 117 Doench JG, Petersen CP & Sharp PA. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev* (2003); **17**: 438-442.
- 118 Mello CC & Conte D, Jr. Revealing the world of RNA interference. *Nature* (2004); **431**: 338-342.
- 119 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K & Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* (2001); **411**: 494-498.

- 120 Kittler R, Putz G, Pelletier L, Poser I, Heninger AK, Drechsel D, *et al.* An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division. *Nature* (2004); **432**: 1036-1040.
- 121 Zheng L, Liu J, Batalov S, Zhou D, Orth A, Ding S, *et al.* An approach to genomewide screens of expressed small interfering RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004); **101**: 135-140.
- 122 Mittal V. Improving the efficiency of RNA interference in mammals. *Nat Rev Genet* (2004); **5**: 355-365.
- 123 Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A & Morgan RA. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001); **98**: 9742-9747.
- 124 Kao SC, Krichevsky AM, Kosik KS & Tsai LH. BACE1 suppression by RNA interference in primary cortical neurons. *J Biol Chem* (2004); **279**: 1942-1949.
- 125 Krick S, Eul BG, Hanze J, Savai R, Grimminger F, Seeger W, *et al.* Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in hypoxia-induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2005); **32**: 395-403.
- 126 Ikeda R, Yoshida K, Tsukahara S, Sakamoto Y, Tanaka H, Furukawa K, *et al.* The promyelotic leukemia zinc finger promotes osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells as an upstream regulator of CBFA1. *J Biol Chem* (2005); **280**: 8523-8530.
- 127 Hoelters J, Ciccarella M, Drechsel M, Geissler C, Gulkan H, Bocker W, *et al.* Nonviral genetic modification mediates effective transgene expression and functional RNA interference in human mesenchymal stem cells. *J Gene Med* (2005); **7**: 718-728.
- 128 Grishok A & Mello CC. RNAi (Nematodes: *Caenorhabditis elegans*). *Adv Genet* (2002); **46**: 339-360.
- 129 Omi K, Tokunaga K & Hohjoh H. Long-lasting RNAi activity in mammalian neurons. *FEBS Lett* (2004); **558**: 89-95.
- 130 Tuschl T. Expanding small RNA interference. *Nat Biotechnol* (2002); **20**: 446-448.
- 131 Miyagishi M & Taira K. Strategies for generation of an siRNA expression library directed against the human genome. *Oligonucleotides* (2003); **13**: 325-333.

- 132 Siolas D, Lerner C, Burchard J, Ge W, Linsley PS, Paddison PJ, *et al.* Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat Biotechnol* (2005); **23**: 227-231.
- 133 Dykxhoorn DM, Novina CD & Sharp PA. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2003); **4**: 457-467.
- 134 Brummelkamp TR, Bernards R & Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* (2002); **2**: 243-247.
- 135 Robinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, *et al.* A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* (2003); **33**: 401-406.
- 136 Arts GJ, Langemeijer E, Tissingh R, Ma L, Pavliska H, Dokic K, *et al.* Adenoviral vectors expressing siRNAs for discovery and validation of gene function. *Genome Res* (2003); **13**: 2325-2332.
- 137 Samakoglu S, Lisowski L, Budak-Alpdogan T, Usachenko Y, Acuto S, Di Marzo R, *et al.* A genetic strategy to treat sickle cell anemia by coregulating globin transgene expression and RNA interference. *Nat Biotechnol* (2006); **24**: 89-94.
- 138 Xie SY, Ren ZR, Zhang JZ, Guo XB, Wang QX, Wang S, *et al.* Restoration of the balanced alpha/beta-globin gene expression in beta654-thalassemia mice using combined RNAi and antisense RNA approach. *Hum Mol Genet* (2007); **16**: 2616-2625.
- 139 Sun Y, Li Z, Li L, Li J, Liu X & Li W. Effective inhibition of hepatitis B virus replication by small interfering RNAs expressed from human foamy virus vectors. *Int J Mol Med* (2007); **19**: 705-711.
- 140 Moore MD, McGarvey MJ, Russell RA, Cullen BR & McClure MO. Stable inhibition of hepatitis B virus proteins by small interfering RNA expressed from viral vectors. *J Gene Med* (2005); **7**: 918-925.
- 141 Park J, Nadeau P, Zucali JR, Johnson CM & Mergia A. Inhibition of simian immunodeficiency virus by foamy virus vectors expressing siRNAs. *Virology* (2005); **343**: 275-282.

- 142 Taylor JA, Vojtech L, Bahner I, Kohn DB, Laer DV, Russell DW, *et al.* Foamy virus vectors expressing anti-HIV transgenes efficiently block HIV-1 replication. *Mol Ther* (2008); **16**: 46-51.
- 143 Kiem HP, Wu RA, Sun G, von Laer D, Rossi JJ & Trobridge GD. Foamy combinatorial anti-HIV vectors with MGMTP140K potently inhibit HIV-1 and SHIV replication and mediate selection in vivo. *Gene Ther* (2010); **17**: 37-49.
- 144 Papadaki M, Siapati EK & Vassilopoulos G. A Foamy Virus Vector System for Stable and Efficient RNAi-expression in Mammalian Cells. *Hum Gene Ther* (2011).
- 145 Trobridge G, Josephson N, Vassilopoulos G, Mac J & Russell DW. Improved foamy virus vectors with minimal viral sequences. *Mol Ther* (2002); **6**: 321-328.
- 146 Bohan C, York D & Srinivasan A. Sodium butyrate activates human immunodeficiency virus long terminal repeat--directed expression. *Biochem Biophys Res Commun* (1987); **148**: 899-905.
- 147 White MR, Masuko M, Amet L, Elliott G, Braddock M, Kingsman AJ, *et al.* Real-time analysis of the transcriptional regulation of HIV and hCMV promoters in single mammalian cells. *J Cell Sci* (1995); **108 (Pt 2)**: 441-455.
- 148 Socolovsky M, Nam H, Fleming MD, Haase VH, Brugnara C & Lodish HF. Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood* (2001); **98**: 3261-3273.
- 149 Livak KJ & Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* (2001); **25**: 402-408.
- 150 Miccio A, Cesari R, Lotti F, Rossi C, Sanvito F, Ponzoni M, *et al.* In vivo selection of genetically modified erythroblastic progenitors leads to long-term correction of beta-thalassemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008); **105**: 10547-10552.
- 151 Vassilopoulos G, Navas PA, Skarpidi E, Peterson KR, Lowrey CH, Papayannopoulou T, *et al.* Correct function of the locus control region may require passage through a nonerythroid cellular environment. *Blood* (1999); **93**: 703-712.

- 152 Skarpidi E, Vassilopoulos G, Stamatoyannopoulos G & Li Q. Comparison of expression of human globin genes transferred into mouse erythroleukemia cells and in transgenic mice. *Blood* (1998); **92**: 3416-3421.
- 153 Rebel VI, Miller CL, Eaves CJ & Lansdorp PM. The repopulation potential of fetal liver hematopoietic stem cells in mice exceeds that of their liver adult bone marrow counterparts. *Blood* (1996); **87**: 3500-3507.
- 154 Muller AM, Medvinsky A, Strouboulis J, Grosveld F & Dzierzak E. Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* (1994); **1**: 291-301.
- 155 Godin I, Dieterlen-Lievre F & Cumano A. Emergence of multipotent hemopoietic cells in the yolk sac and paraaortic splanchnopleura in mouse embryos, beginning at 8.5 days postcoitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1995); **92**: 773-777.
- 156 Morrison SJ, Hemmati HD, Wandycz AM & Weissman IL. The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1995); **92**: 10302-10306.
- 157 Yang B, Kirby S, Lewis J, Detloff PJ, Maeda N & Smithies O. A mouse model for beta 0-thalassemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1995); **92**: 11608-11612.
- 158 Rivella S, May C, Chadburn A, Riviere I & Sadelain M. A novel murine model of Cooley anemia and its rescue by lentiviral-mediated human beta-globin gene transfer. *Blood* (2003); **101**: 2932-2939.
- 159 Imren S, Payen E, Westerman KA, Pawliuk R, Fabry ME, Eaves CJ, *et al*. Permanent and panerythroid correction of murine beta thalassemia by multiple lentiviral integration in hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002); **99**: 14380-14385.
- 160 Persons DA, Hargrove PW, Allay ER, Hanawa H & Nienhuis AW. The degree of phenotypic correction of murine beta -thalassemia intermedia following lentiviral-mediated transfer of a human gamma-globin gene is influenced by chromosomal position effects and vector copy number. *Blood* (2003); **101**: 2175-2183.
- 161 Hanawa H, Hargrove PW, Kepes S, Srivastava DK, Nienhuis AW & Persons DA. Extended beta-globin locus control region elements promote consistent

- therapeutic expression of a gamma-globin lentiviral vector in murine beta-thalassemia. *Blood* (2004); **104**: 2281-2290.
- 162 Lisowski L & Sadelain M. Locus control region elements HS1 and HS4 enhance the therapeutic efficacy of globin gene transfer in beta-thalassemic mice. *Blood* (2007); **110**: 4175-4178.
- 163 Puthenveetil G, Scholes J, Carbonell D, Qureshi N, Xia P, Zeng L, *et al.* Successful correction of the human beta-thalassemia major phenotype using a lentiviral vector. *Blood* (2004); **104**: 3445-3453.
- 164 Arumugam PI, Urbinati F, Velu CS, Higashimoto T, Grimes HL & Malik P. The 3' region of the chicken hypersensitive site-4 insulator has properties similar to its core and is required for full insulator activity. *PLoS One* (2009); **4**: e6995.
- 165 Emery DW, Yannaki E, Tubb J, Nishino T, Li Q & Stamatoyannopoulos G. Development of virus vectors for gene therapy of beta chain hemoglobinopathies: flanking with a chromatin insulator reduces gamma-globin gene silencing in vivo. *Blood* (2002); **100**: 2012-2019.
- 166 Aker M, Tubb J, Groth AC, Bukovsky AA, Bell AC, Felsenfeld G, *et al.* Extended core sequences from the cHS4 insulator are necessary for protecting retroviral vectors from silencing position effects. *Hum Gene Ther* (2007); **18**: 333-343.
- 167 Recillas-Targa F, Pikaart MJ, Burgess-Beusse B, Bell AC, Litt MD, West AG, *et al.* Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken beta-globin insulator are separable activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002); **99**: 6883-6888.
- 168 Urbinati F, Arumugam P, Higashimoto T, Perumbeti A, Mitts K, Xia P, *et al.* Mechanism of reduction in titers from lentivirus vectors carrying large inserts in the 3'LTR. *Mol Ther* (2009); **17**: 1527-1536.
- 169 Persons DA. Gene therapy: Targeting beta-thalassaemia. *Nature* (2010); **467**: 277-278.
- 170 Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, Wang G, Hehir K, Fusil F, *et al.* Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. *Nature* (2010); **467**: 318-322.

- 171 Chinen J, Davis J, De Ravin SS, Hay BN, Hsu AP, Linton GF, *et al.* Gene therapy improves immune function in preadolescents with X-linked severe combined immunodeficiency. *Blood* (2007); **110**: 67-73.
- 172 Gaspar HB, Bjorkegren E, Parsley K, Gilmour KC, King D, Sinclair J, *et al.* Successful reconstitution of immunity in ADA-SCID by stem cell gene therapy following cessation of PEG-ADA and use of mild preconditioning. *Mol Ther* (2006); **14**: 505-513.
- 173 Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, Stein S, Siler U, Koehl U, *et al.* Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med* (2006); **12**: 401-409.
- 174 Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, *et al.* LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* (2003); **302**: 415-419.
- 175 Baum C, von Kalle C, Staal FJ, Li Z, Fehse B, Schmidt M, *et al.* Chance or necessity? Insertional mutagenesis in gene therapy and its consequences. *Mol Ther* (2004); **9**: 5-13.
- 176 Li Z, Dullmann J, Schiedlmeier B, Schmidt M, von Kalle C, Meyer J, *et al.* Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* (2002); **296**: 497.
- 177 Beard BC, Keyser KA, Trobridge GD, Peterson LJ, Miller DG, Jacobs M, *et al.* Unique integration profiles in a canine model of long-term repopulating cells transduced with gammaretrovirus, lentivirus, or foamy virus. *Hum Gene Ther* (2007); **18**: 423-434.
- 178 Nowrouzi A, Dittrich M, Klanke C, Heinkelein M, Rammling M, Dandekar T, *et al.* Genome-wide mapping of foamy virus vector integrations into a human cell line. *J Gen Virol* (2006); **87**: 1339-1347.
- 179 Trobridge GD, Miller DG, Jacobs MA, Allen JM, Kiem HP, Kaul R, *et al.* Foamy virus vector integration sites in normal human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006); **103**: 1498-1503.
- 180 Rethwilm A. Foamy virus vectors: an awaited alternative to gammaretro- and lentiviral vectors. *Curr Gene Ther* (2007); **7**: 261-271.

- 181 Trobridge GD, Allen J, Peterson L, Ironside C, Russell DW & Kiem HP. Foamy and lentiviral vectors transduce canine long-term repopulating cells at similar efficiency. *Hum Gene Ther* (2009); **20**: 519-523.
- 182 Kiem HP, Allen J, Trobridge G, Olson E, Keyser K, Peterson L, *et al.* Foamy-virus-mediated gene transfer to canine repopulating cells. *Blood* (2007); **109**: 65-70.
- 183 Gharwan H, Hirata RK, Wang P, Richard RE, Wang L, Olson E, *et al.* Transduction of human embryonic stem cells by foamy virus vectors. *Mol Ther* (2007); **15**: 1827-1833.
- 184 Andrianaki A, Siapati EK, Hirata RK, Russell DW & Vassilopoulos G. Dual transgene expression by foamy virus vectors carrying an endogenous bidirectional promoter. *Gene Ther* (2010); **17**: 380-388.
- 185 Bauer TR, Jr., Allen JM, Hai M, Tuschong LM, Khan IF, Olson EM, *et al.* Successful treatment of canine leukocyte adhesion deficiency by foamy virus vectors. *Nat Med* (2008); **14**: 93-97.
- 186 Zhu J, Kren BT, Park CW, Bilgim R, Wong PY & Steer CJ. Erythroid-specific expression of beta-globin by the sleeping beauty transposon for Sickle cell disease. *Biochemistry* (2007); **46**: 6844-6858.
- 187 Raftopoulos H, Ward M, Leboulch P & Bank A. Long-term transfer and expression of the human beta-globin gene in a mouse transplant model. *Blood* (1997); **90**: 3414-3422.
- 188 Persons DA, Allay ER, Sabatino DE, Kelly P, Bodine DM & Nienhuis AW. Functional requirements for phenotypic correction of murine beta-thalassemia: implications for human gene therapy. *Blood* (2001); **97**: 3275-3282.
- 189 Andreani M, Nesci S, Lucarelli G, Tonucci P, Rapa S, Angelucci E, *et al.* Long-term survival of ex-thalassemic patients with persistent mixed chimerism after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* (2000); **25**: 401-404.
- 190 Moon AM & Ley TJ. Conservation of the primary structure, organization, and function of the human and mouse beta-globin locus-activating regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1990); **87**: 7693-7697.
- 191 Li QL, Zhou B, Powers P, Enver T & Stamatoyannopoulos G. Beta-globin locus activation regions: conservation of organization, structure, and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1990); **87**: 8207-8211.

- 192 Kielman MF, Smits R, Devi TS, Fodde R & Bernini LF. Homology of a 130-kb region enclosing the alpha-globin gene cluster, the alpha-locus controlling region, and two non-globin genes in human and mouse. *Mamm Genome* (1993); **4**: 314-323.
- 193 Bulger M, van Doorninck JH, Saitoh N, Telling A, Farrell C, Bender MA, *et al.* Conservation of sequence and structure flanking the mouse and human beta-globin loci: the beta-globin genes are embedded within an array of odorant receptor genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999); **96**: 5129-5134.
- 194 Chaisue C, Kitcharoen S, Wilairat P, Jetsrisuparb A, Fucharoen G & Fucharoen S. alpha/beta-Globin mRNA ratio determination by multiplex quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction as an indicator of globin gene function. *Clin Biochem* (2007); **40**: 1373-1377.

Περίληψη



Εισαγωγή.

Οι β-θαλασσαιμίες αποτελούν μία ετερογενή ομάδα κληρονομικών νοσημάτων που χαρακτηρίζονται από μειωμένη σύνθεση των β-αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης. Στην ομόζυγη κατάσταση προκαλούν μείζονα αιμολυτική αναιμία η οποία αντιμετωπίζεται με συχνές μεταγγίσεις αίματος αλλά, θεραπεύεται μόνο με μεταμόσχευση μυελού των οστών (MMO) σε ασθενείς που έχουν συμβατό δότη. Οι γενετικού τύπου θεραπευτικές προσεγγίσεις αποτελούν μία εναλλακτική θεραπευτική στρατηγική που σαν σκοπό έχουν την μεταφορά του γονιδίου της β-σφαιρίνης στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα και την έκφραση της αιμοσφαιρίνης στα ώριμα ερυθροκύτταρα. Στη παρούσα μελέτη έχει χρησιμοποιηθεί ένα σύστημα φορέων που βασίζεται στους ιούς τύπου Foamy οι οποίοι έχουν καταστεί ανίκανοι προς αναπαραγωγή ενώ μπορούν να μεταγάγουν αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (AAK).

Στόχος της μελέτης.

Στόχο μας αποτέλεσε η δημιουργία φορέων τύπου Foamy που θα συνδυάζουν στοιχεία από τους γονιδιακούς τύπους των ανθρώπινων σφαιρινών ώστε να εκφράζουν αποδοτικά το γονίδιο της β-σφαιρίνης. Στη μελέτη μας χρησιμοποιήσαμε την ρυθμιστική αλληλουχία HS40 που προέρχεται από το γονιδιακό τόπο της ανθρώπινης α-σφαιρίνης καθώς επίσης και τις ρυθμιστικές αλληλουχίες HS2 και HS3 που προέρχονται από την περιοχή LCR του γονιδιακού τόπου της β-σφαιρίνης. Για την χρήση των αλληλουχιών HS2 και HS3 υπάρχουν πολλά βιβλιογραφικά δεδομένα και θεωρήσαμε ότι θα αποτελούσαν ιδανικές αλληλουχίες ελέγχου και συγκριτικής αξιολόγησης για την κατασκευή με την αλληλουχία HS40.

Δραστηκότητα των φορέων *in vitro* σε ερυθροειδική κυτταρική σειρά.

Η πρώτη λειτουργική δοκιμασία των φορέων έγινε στην κυτταρική σειρά MEL. Οι κυτταρικοί κλώνοι MEL που προέκυψαν από τη μεταγωγή με τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β παρήγαγαν ανθρώπινη β-σφαιρίνη αυξημένη κατά 65% και 55%, αντίστοιχα, συγκριτικά με το αρνητικό δείγμα ελέγχου και ανά ενσωματωμένο ιϊκό αντίγραφο. Όπως προέκυψε από την ανάλυση, οι δύο φορείς FV κρίνονται εξίσου αποτελεσματικοί στη παραγωγή της ανθρώπινης β-σφαιρίνης στην ερυθρό-κυτταρική σειρά MEL.

Δραστητικότητα των φορέων *ex vivo* σε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα ποντικού.

Για το σκοπό αυτό έγινε μεταγωγή αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (AAK) του μυελού των οστών (ΜΟ). Μετά τη μεταγωγή τους με τους φορείς FV, τα AAK καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες διαφοροποίησης προς ερυθροποιητικά κύτταρα σε μεθυλκυτταρίνη. Στις ερυθροειδικές αποικίες BFU-E που απομονώθηκαν, υπολογίσθηκαν τα επίπεδα της ανθρώπινης β-σφαιρίνης τα οποία και συσχετίσθηκαν με εκείνα της ενδογενούς α-σφαιρίνης του ποντικού. Από την ανάλυση αυτή προέκυψε ότι ο φορέας HS2.HS3.β επιτυγχάνει μέση έκφραση 2% της ανθρώπινης β-σφαιρίνης ως προς την ενδογενή α-σφαιρίνη του ποντικού ενώ τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης με το φορέα HS40.β άγγιζαν το 12%. Όπως προκύπτει από τη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης, ο φορέας HS40.β αποδεικνύεται πιο αποδοτικός στην παραγωγή της ανθρώπινης β-σφαιρίνης συγκριτικά με το φορέα HS2.HS3.β στο περιβάλλον των AAK του ποντικού.

Δραστητικότητα των φορέων *in vivo* στο μοντέλο θαλασσαιμίας του ποντικού.

Η μελέτη της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης από γενετικά διορθωμένα AAK επεκτάθηκε και στο μοντέλο θαλασσαιμικών ποντικών $Hbb^{th-3/+}$. Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα των $Hbb^{th-3/+}$ ποντικών υπέστησαν μεταγωγή με τους φορείς FV και στη συνέχεια εισήχθησαν σε μυελοκατεσταλμένα, φυσιολογικά.

Παρατηρήσαμε ότι κατά τη διάρκεια της πειραματικής μελέτης υπήρξαν μεταβολές στο ποσοστό της έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης με τα επίπεδα έκφρασής της στο περιφερικό αίμα των μεταμοσχευμένων ποντικών με τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β να φτάνουν το 26.6% και το 17.6% της αντίστοιχης έκφρασης της ανθρώπινης β-σφαιρίνης σε ανθρώπινο περιφερικό αίμα που χρησιμοποιείται ως θετικό δείγμα ελέγχου. Η παραγωγή της ανθρώπινης β-σφαιρίνης που πέτυχαν οι φορείς HS40.β και HS2.HS3.β παρατηρήσαμε ότι συνοδεύεται από την βελτίωση των αιματολογικών παραμέτρων, της εικόνας των ερυθροκυττάρων στην κυκλοφορία καθώς και από την αποτροπή της εμφάνισης σπληνομεγαλίας. Το σύνολο των ενδείξεων αυτών αποδεικνύει ότι η παραγωγή της ανθρώπινης β-σφαιρίνης από τους φορείς FV είναι επαρκής για να οδηγήσει στην φυσιολογική αιμοποίηση, την αποτροπή των παθολογικών συνεπειών της έλλειψης της β-σφαιρίνης και συνολικά να διορθώσουν το θαλασσαιμικό φαινότυπο στο *in vivo* μοντέλο

Δραστητικότητα των φορέων *ex vivo* σε AAK ασθενών με β-Θαλασσαιμία.

Προκειμένου να μελετήσουμε την αποδοτικότητα των φορέων FV στο ανθρώπινο σύστημα καθώς επίσης και θέλοντας να ελέγξουμε την εφαρμογή τους σε ένα πρωτόκολλο προκαταρκτικής γονιδιακής θεραπείας στον άνθρωπο απομονώσαμε AAK (CD34⁺) είτε από το μυελό των οστών είτε από το περιφερικό αίμα ασθενών με μείζονα β-Θαλασσαιμία. Τα κύτταρα αυτά υποβλήθηκαν σε μεταγωγή από τους φορείς FV ενώ στην συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες ερυθροειδικής διαφοροποίησης. Τα δείγματα που φέρουν ενσωματωμένους τους φορείς HS40.β και HS2.HS3.β αύξησαν την έκφραση της ανθρώπινης β-σφαιρίνης από το 9% που παρήγαγε το θαλασσαιμικό δείγμα ελέγχου σε 27 % και 36 %, αντίστοιχα. Επίσης, μετά από ανάλυση της έκφρασης των ερυθροειδικών επιφανειακών αντιγόνων CD71 και GlyA είδαμε ότι οι φορείς HS40.β και HS2.HS3.β οδήγησαν σε αυξημένη έκφραση του GlyA κατά 1.5 φορές και 1.8 φορές, αντίστοιχα, ενώ συγχρόνως επέδειξαν μειωμένη έκφραση του πρώιμου επιφανειακού αντιγόνου CD71 σε ποσοστό 55% και 63.5% του θαλασσαιμικού δείγματος ελέγχου, αντίστοιχα, γεγονός που δείχνει βελτίωση της μη-αποδοτικής ερυθροποίησης.

Γονιδιακή θεραπεία της β-Θαλασσαιμίας και RNA παρεμβολή.

Στόχος αυτής της μελέτης είναι εκτός από τον έλεγχο της αποδοτικότητας των φορέων που εκφράζουν το γονίδιο της ανθρώπινης β-σφαιρίνης, η δημιουργία φορέων τύπου Foamy οι οποίοι θα εκφράζουν τόσο το γονίδιο της β-σφαιρίνης όσο και μία μικρή φουρκέτα RNA η οποία έχει στόχο το γονίδιο της ανθρώπινης α-σφαιρίνης. Απώτερος σκοπός είναι η συνδυαστική αυτή προσέγγιση να επιφέρει αποδοτικότερη αποκατάσταση της ισορροπίας των αλυσίδων της α- και β-σφαιρίνης τόσο αυξάνοντας τα επίπεδα της β-σφαιρίνης όσο και μειώνοντας τα επίπεδα της α-σφαιρίνης. Γι' αυτό το λόγο δημιουργήθηκε ο συνδυαστικός φορέας H4/HS40.β στον οποίο η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της β-σφαιρίνης ελέγχεται από τον υποκινητή της ανθρώπινης β-σφαιρίνης και τον ενισχυτή της ανθρώπινης α-σφαιρίνης HS40 ενώ το shRNA ρυθμίζεται από έναν ανθρώπινο Pol III υποκινητή, τον H1.

Δραστητικότητα των φορέων *ex vivo* σε AAK ασθενών με β-Θαλασσαιμία.

Τα CD34⁺ κύτταρα των ασθενών με μείζονα β-θαλασσαιμία υποβλήθηκαν σε μεταγωγή από τους απλούς φορείς FV (HS40.β και H4) καθώς και με το συνδυαστικό φορέα H4/HS40.β ενώ στην συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες ερυθροειδικής

διαφοροποίησης. Το αποτέλεσμα που προέκυψε ήταν ότι στο θαλασσαιμικό δείγμα ελέγχου τα μετάγραφα της β-σφαιρίνης εκφράζονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα, που δεν ξεπερνούν το 0.1 της αντίστοιχης έκφρασης της α-σφαιρίνης. Την ίδια στιγμή τα θαλασσαιμικά $CD34^+$ που είχαν υποστεί μεταγωγή με τους απλούς φορείς HS40.β και H4 (έκφραση μόνο shRNA) πέτυχαν μερική αποκατάσταση της ισορροπίας μεταξύ των δύο αλυσίδων και ο λόγος β-/α-σφαιρίνη ανέβηκε στο 0.21 και 0.32. Η αποκατάσταση της ισορροπίας μεταξύ α- και β-σφαιρίνης που επετεύχθη με την επιμόλυνση των $CD34^+$ κυττάρων με το φορέα H4/HS40.β ήταν αισθητά σημαντικότερη και ο λόγος β-/α-σφαιρίνη άγγιξε το 0.53. Συγχρόνως με αυτά τα δεδομένα παρατηρήθηκε και εξίσου σημαντική αποκατάσταση της μη-αποδοτικής ερυθροποίησης των θαλασσαιμικών κυττάρων $CD34^+$ μετά από χρήση του συνδυαστικού φορέα H4/HS40.β.

Δημοσίευση



ORIGINAL ARTICLE

Comparative analysis of FV vectors with human α - or β -globin gene regulatory elements for the correction of β -thalassemia

I Morianos¹, EK Siapati¹, G Pongas¹ and G Vassilopoulos^{1,2}

β -Globin locus control region (LCR) sequences have been widely used for the regulated expression of the human β -globin gene in therapeutic viral vectors. In this study, we compare the expression of the human β -globin gene from either the HS2/HS3 β -globin LCR or the HS40 regulatory element from the α -globin locus in the context of foamy virus (FV) vectors for the genetic correction of β -thalassemia. Both regulatory elements expressed comparable levels of human β -globin in a murine erythroleukemic line, whereas in murine hematopoietic stem cells the HS40 β vector proved more efficient in β -globin expression and correction of the β -thalassemia phenotype. Following transplantation in the Hbb^{th3/+} mouse model, the expression efficiency by the two vectors was similar, whereas the HS40 β vector achieved relatively more stable transgene expression. In addition, in an *ex vivo* assay using CD34⁺ cells from thalassemic patients, both vectors achieved significant human β -globin expression and restoration of the thalassemic phenotype as evidenced by enhanced erythropoiesis and decreased apoptosis. Our data suggest that FV vectors with the α -globin HS40 element can be used as alternative but equally efficient vehicles for human β -globin gene expression for the genetic correction of β -thalassemia.

Gene Therapy advance online publication, 7 July 2011; doi:10.1038/gt.2011.98

Keywords: β -globin; foamy virus; thalassemia; HS40

INTRODUCTION

β -Thalassemia syndromes are a group of hereditary blood disorders characterized by deficient synthesis of the hemoglobin β -chain and chronic hemolysis. β -Thalassemias are considered the most common monogenic disorders worldwide and are inherited in an autosomal recessive manner. The defective synthesis of hemoglobin β -chains in the erythroid progenitors results in the accumulation and precipitation of excess α -chains, causing damage to the developing red blood cell membrane and a syndrome of chronic hemolysis with reduced or complete absence of adult hemoglobin. Patients with thalassemia major, the most severe form, require regular blood transfusions that not only affect the quality of life but also are often accompanied by life-threatening side effects such as iron overload in vital organs. Allogeneic bone marrow transplantation, when available, is the only therapeutic approach, which, however, is accompanied with severe morbidity and may be complicated with graft versus host disease.¹

As a result, alternative treatment options for β -thalassemia have been developed, and therapeutic β -globin vectors have been constructed and tested for over two decades. Accomplishments in *globin* gene regulation have paved the way toward β -thalassemia gene therapy, as obstacles such as low vector titers, vector stability and efficient transgene expression have been tackled. Retroviral vectors designed for the expression of β - or γ -globin genes had been plagued with low expression until the requirement for the inclusion of regulatory elements from the β -globin locus control region (LCR) was realized.^{2,3} The HS2 and HS3 are the minimum regulatory sequences required for efficient expression of the β -globin gene in the Hbb^{th3/+} mouse model of β -thalassemia and in patient samples.^{4,5}

The discovery of the α -globin locus HS40 enhancer provided an alternative regulatory element for the expression of *globin* genes with variable success.^{6–8}

In this study, we have used foamy virus (FV) vectors,⁹ a non-pathogenic genus of retroviruses, to provide a detailed comparison of the α -globin HS40 sequence and the β -globin LCR HS2 and HS3 sequences for the efficient expression of human β -globin gene. FV vectors transduce hematopoietic stem cells (HSCs) of murine, canine or human origin,^{10–12} and show reduced tendency to integrate in gene-coding sequences, constituting safer alternative gene transfer vehicles to γ -retroviral vectors.¹³ We demonstrate that in the context of FV vectors, the HS40 element is marginally more efficient than the combination of HS2/HS3, both *ex vivo* in murine HSCs and human CD34⁺ cells, as well as in the Hbb^{th3/+} mouse model of β -thalassemia. Given the compact size of the HS40 element, we propose that it can be used alternatively to the LCR sequences for regulated β -globin expression in gene therapy approaches with FV vectors.

RESULTS

Evaluation of human β -globin-expressing FV vectors in MEL cell line

We constructed and tested two FV vectors combining elements from both α - and β -globin loci; in the pDF.HS40 β vector, expression of the β -globin gene was driven by the native β -globin promoter and regulated by the HS40 sequence of the human α -globin locus (Figure 1a), whereas in the pDF.HS2.HS3 β vector the core HS2 and HS3 regulatory elements from the β -globin LCR were used. The titers of the FV vectors were estimated by real-time PCR to be

¹Division of Genetics and Gene Therapy, Basic Research II, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, Athens, Greece and ²Division of Hematology, University of Thessaly Medical School, Larissa, Greece

Correspondence: Professor G Vassilopoulos, Division of Genetics and Gene Therapy, Basic Research II, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, Soranou tou Efessiou 4, Athens 11527, Greece.

E-mail: gvassilop@bioacademy.gr

Received 4 February 2011; revised 13 April 2011; accepted 23 May 2011

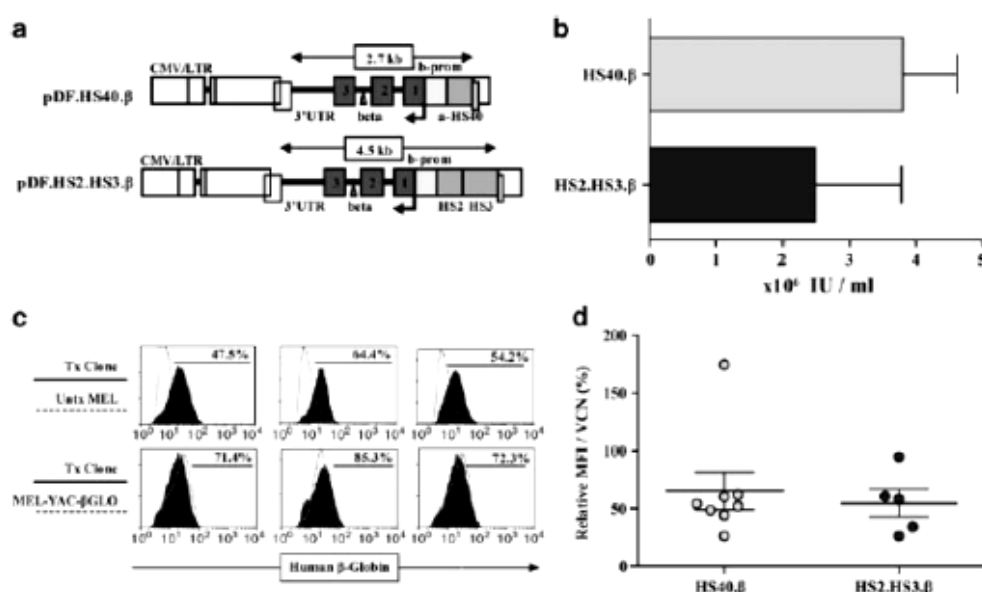


Figure 1 FV vector performance in MEL clones. (a) Schematic representation of foamy viral vectors pDF.HS40.β and pDF.HS2.HS3.β FV with either the α -globin HS40 or the β -globin HS2/HS3 regulatory elements and the human β -globin gene. (b) Vector titers (IU ml⁻¹) for the HS40.β and HS2.HS3.β FV vectors were calculated by Taqman real-time PCR analysis on transduced HT1080 cells. Average values are presented from $n=8$ experiments. Error bars indicate s.e.m. (c) Flow cytometry analysis for the expression of human β -globin in representative single, FV-transduced MEL clones. In the upper panel, filled histograms show transduced MEL cell clones displayed over untransduced control MEL cells (dotted line), whereas in the lower panel filled histograms show individual clones displayed over the MEL-YAC-βGLO cell line that is used as a positive control (dotted line). (d) Human β -globin levels in single HS40.β- or HS2.HS3.β-transduced MEL clones presented as antibody mean fluorescence intensity increase over the negative control per integrated VCN. Error bars indicate s.e.m. (HS40.β, $n=8$; HS2.HS3.β, $n=5$).

3.8×10^6 IU ml⁻¹ and 2.5×10^6 IU ml⁻¹ for HS40.β and HS2.HS3.β, respectively (Figure 1b). Initially, β -globin expression analysis by flow cytometry was tested in single-cell clones of the mouse erythroleukemia cell line (MEL) following transduction at low multiplicity of infection (MOI; ≤ 5) and compared with non-transduced clones as well as to a positive control.¹⁴ Efficient production of human β -globin was observed with both the vectors compared with the MEL-YAC-βGLO-positive control; expression levels varied from 36 to 100% of our positive control as estimated by the mean fluorescence intensity following antibody staining (Figure 1c). In the vast majority of the clones, this expression was achieved with a vector copy number (VCN) of 1–3, as evaluated by Taqman real-time PCR. When we calculated the β -globin mean fluorescence intensity levels per integrated VCN, we observed a $65 \pm 16\%$ increase in β -globin expression with the HS40.β vector over the untransduced cells and $55 \pm 12\%$ with the HS2.HS3.β vector (Figure 1d). These findings indicated that both vectors can support the expression of human β -globin gene in the MEL cellular environment.

Transduction and *ex vivo* culture of primary mouse HSCs

To test the efficiency of β -globin expression from our FV vectors in primary hematopoietic progenitors, we transduced bone marrow lineage-depleted (Lin⁻) cells from Hbb^{th3/+} mice with both vectors at similar MOIs (≤ 10). Following culture in methylcellulose medium, we harvested the erythroid burst-forming units colonies, calculated human β -globin mRNA expression via Taqman real-time PCR and expressed it relative to the endogenous mouse α -globin mRNA. The HS40.β vector achieved higher β -globin expression ($12 \pm 3.4\%$) compared with the HS2.HS3.β vector ($2 \pm 0.5\%$, $P=0.014$, Figure 2a).

We next isolated the CD11b+ cell fraction from homozygous Hbb^{th3/th3} E13.5 mouse embryonic fetal liver cells (FLCs) that are enriched in long-term HSCs.¹⁵ To elucidate whether our β -globin-

expressing FV vectors have the ability to restore the ineffective erythropoiesis in this mouse model, we analyzed erythroid differentiation by antibody staining for the erythropoietic markers CD71 and Ter119 by flow cytometry.¹⁶ To this end, we transduced FLCs at low MOI (< 3) and cultured them in medium containing cytokines that drive erythroid differentiation. In this system, on day 6 of FLC culture, HS40.β-transduced cells demonstrated slightly higher number of total CD71+ erythroid-committed progenitors (gates I and II of Figure 2b, 62.3%) compared with non-transduced FLCs (Figure 2b, 56.9%). On day 9, HS40.β-transduced FLCs showed a 21% increase in the CD71+ cells, while at the same time HS2.HS3.β-transduced cells exhibited a 4% increase in comparison with the non-transduced population. Collectively, these data indicate that both FV vectors can produce human β -globin at levels that can ameliorate the ineffective erythropoiesis seen in thalassemic cells. However, in the murine HSCs *ex vivo*, the HS40.β vector expressed higher levels of β -globin and restored more effectively the impaired erythropoiesis of the thalassemic FLCs.

In vivo assessment of β -globin-expressing FV vectors in the Hbb^{th3/+} mouse model

To assess the ability of the FV vectors to efficiently express human β -globin *in vivo* in the Hbb^{th3/+} mouse model of β -thalassaemia, we transduced bone marrow (BM) Lin⁻ cells or CD11b+ FLCs from E13.5 Hbb^{th3/th3} embryos with the HS40.β and HS2.HS3.β FV vectors. Transduced cells were transplanted to C57Bl/6 recipients conditioned with busulfan, using an adapted clinically relevant protocol,^{17,18} and were monitored for expression of human β -globin by flow cytometry in the peripheral blood (PB); values are expressed as percentage of a human PB sample (Figure 3a).

Animals that had received BM Lin⁻ cells transduced with the HS40.β vector expressed human β -globin at an average of 30% at 7–12 weeks following transplantation and 43% when they were killed

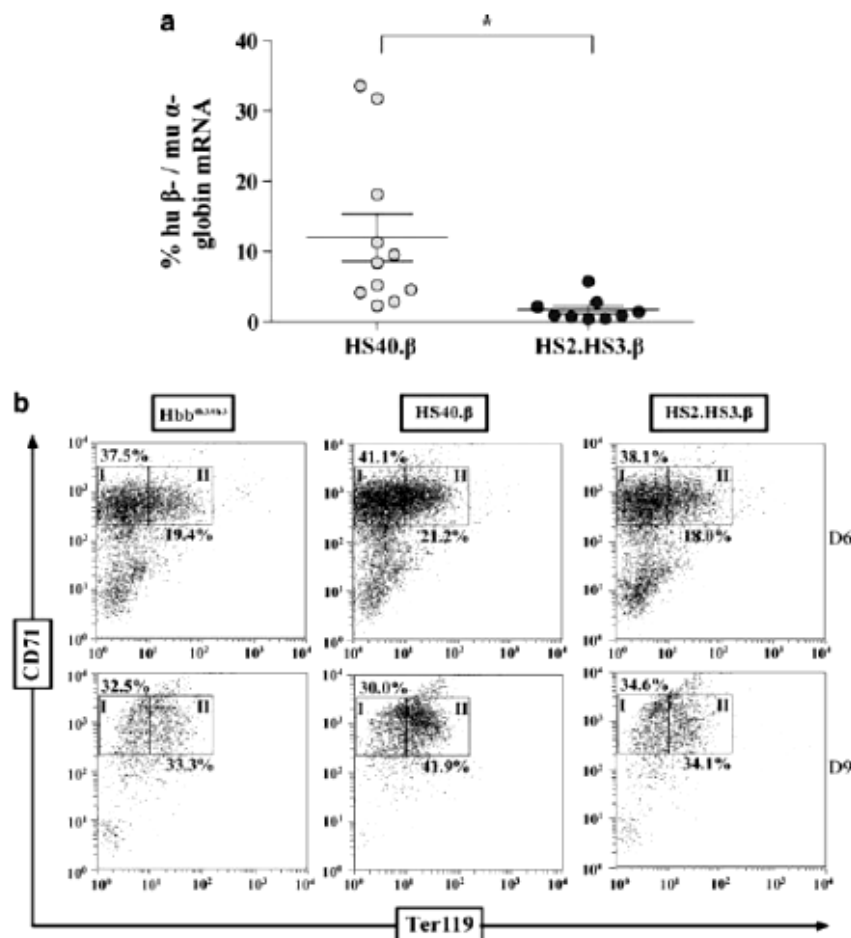


Figure 2 *Ex vivo* assessment of vector efficiency in murine primary HSCs. (a) Relative quantitation of human β -globin expression in individual mouse burst-forming units colonies. Total mRNA levels were analyzed by Taqman real-time PCR for the expression of human β -globin and endogenous murine α -globin. The levels of human β -globin gene were calculated as percentage of the endogenous mouse α -globin gene. Each symbol represents a single colony, and error bars indicate s.e.m. (HS40. β , $n=11$; HS2.HS3. β , $n=9$). (b) Analysis of erythropoiesis in liquid cultures of CD11b⁺ FLCs by flow cytometry for the CD71 and Ter119 following erythroid differentiation for 6 and 9 days, respectively. Representative flow cytometry charts show the percentages of proerythroblast (CD71⁺/Ter119⁻; gate I) and basophilic erythroblast cell populations (CD71⁺/Ter119⁺; gate II), respectively. *Denotes statistical significance.

(18–25 weeks after transplantation, Figure 3b). Mice that received the HS2.HS3. β -transduced cells had lower levels of β -globin that reached an average of 20% at 7–12 weeks after transplantation, rising to 29% by the 17th week and then dropping to 4% at the end of the experiment. When FLCs were used for transplantation, mice that received HS40. β -transduced cells exhibited β -globin expression at 12% by the 12th week after transplantation and 18% by the end of the experiment (25th week), showing an overall 1.4-fold increase in expression compared with control transplantation recipients (Figure 3c). Animals that were transplanted with HS2.HS3. β -transduced cells expressed human β -globin at an average of 17.5% by 12 weeks after transplantation, which, however, dropped to 4% by week 18 and was further reduced to nearly undetectable levels by week 25. Nevertheless, both vectors showed efficient transduction of long-term hematopoietic progenitors from FL and BM, and efficient β -globin expression at least for 18 weeks following transplantation. The VCN per human β -globin-expressing cell was similar for both vectors (HS40. β : 2.3 ± 1.1 ; HS2.HS3. β : 3.7 ± 0.2 , Figure 3d).

To further verify the functional aspect of the human β -globin protein produced *in vivo* by the FV vectors, we performed western blot analysis for the detection of both human β - and mouse α -globin. A non-denaturing acrylamide gel was used to maintain the entire

hemoglobin protein intact, and the same transplanted animal samples were immune stained for human β - and mouse α -globin. We found that the PB samples from our transplanted animals gave a single hemoglobin band that was positive for both human β - and mouse α -globin. This indicated that in animals transplanted with gene-corrected HSCs, human β -globin chains formed a hybrid tetramer with mouse α -globin chains (Figure 3e).

Evaluation of β -globin FV vectors in human thalassemic HSCs

To assess the effectiveness of the FV vectors to express human β -globin in a preclinical setting of human β -thalassaemia, we transduced HSCs from human β -thalassaemia major patients. CD34⁺ cells were isolated from BM or PB patient samples and transduced with the HS40. β and HS2.HS3. β vectors at low MOI (5–10). Cells were cultured under erythropoietic conditions, and at different time points (days 9–18), the levels of human β -globin were assayed by flow cytometry, alongside the evaluation of erythropoiesis with glycophorin A (GlyA) and CD71 analysis. Control thalassemic CD34⁺ cells showed basal levels of β -globin expression that accounted for $9 \pm 0.1\%$ of the total population. Transduction with the FV vectors resulted in a threefold increase in β -globin expression levels per VCN with the HS40. β vector ($26 \pm 8.9\%$) and in a fourfold increase with the

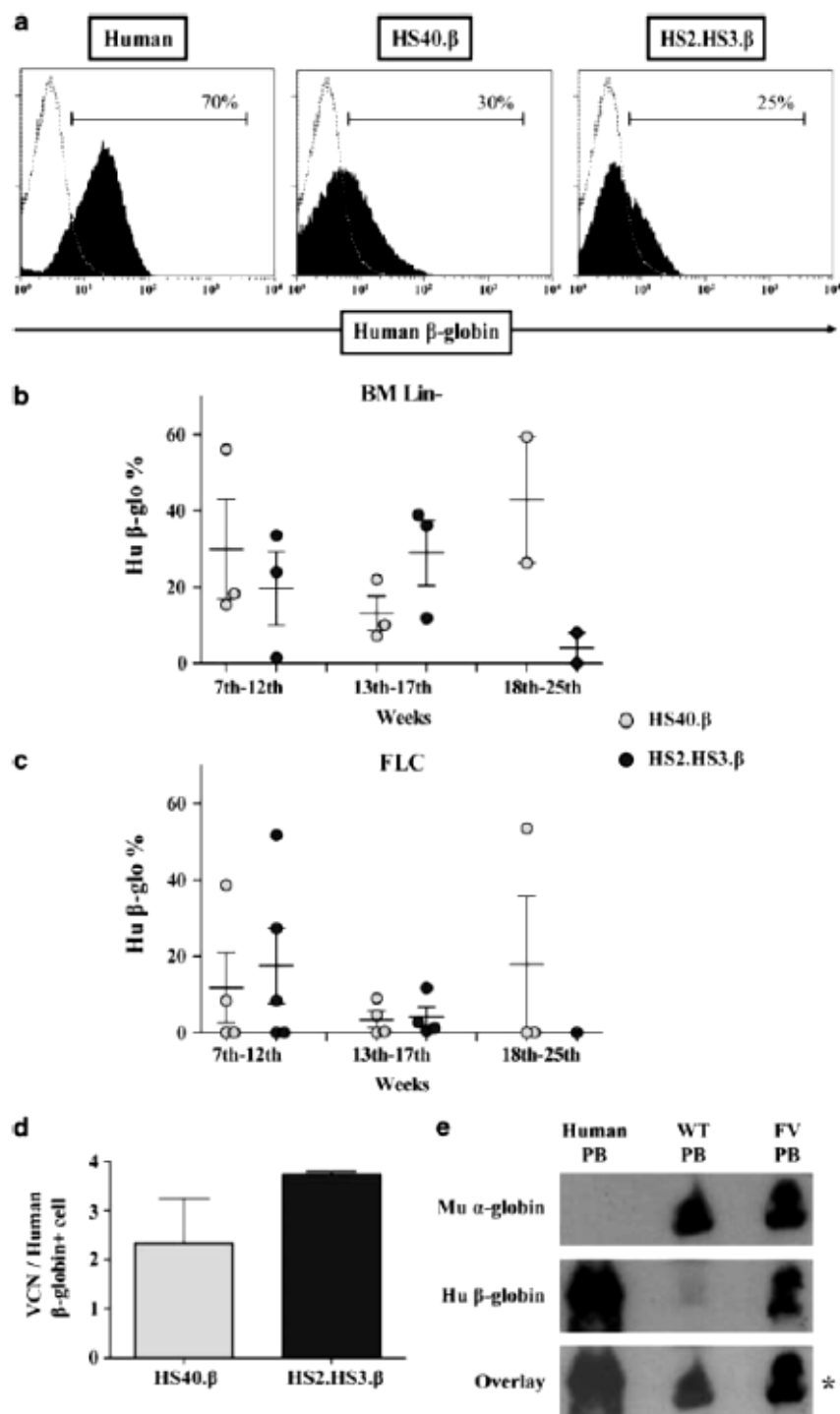


Figure 3 β -Globin expression in the $Hbb^{th3/+}$ transplantation model. (a) Representative flow cytometry histograms of the human β -globin expression in the peripheral blood (PB) of transplanted animals. Horizontal bars indicate the percentage of human β -globin expression (filled histogram) over the isotype control (dotted line). (b) Human β -globin expression (%) in the PB of animals transplanted with BM Lin $^{-}$ cells transduced with the HS40. β or the HS2HS3. β vectors. Human β -globin expression is presented in terms of antibody mean fluorescence intensity (MFI) fold increase over untransduced control mice and in three time periods after transplantation. Symbols represent individual animals, and error bars depict s.e.m. ($n=2-3$). (c) Human β -globin expression in animals transplanted with transduced CD11b $^{+}$ FLCs. Human β -globin expression (%) is presented in terms of antibody MFI fold increase over untransduced control mice and in three time periods after transplantation. Symbols represent individual animals, and error bars depict s.e.m. ($n=2-4$). (d) VCN analysis per human β -globin-expressing cell in the BM of engrafted animals at the time of killing. Error bars indicate s.e.m. ($n=3$). (e) Western blot analysis for the detection of human β - and mouse α -globin. PB samples from FV-transplanted animals gave a single hemoglobin band that was positive for both human β - and mouse α -globin, indicating the formation of a hybrid tetramer upon overlay (*).

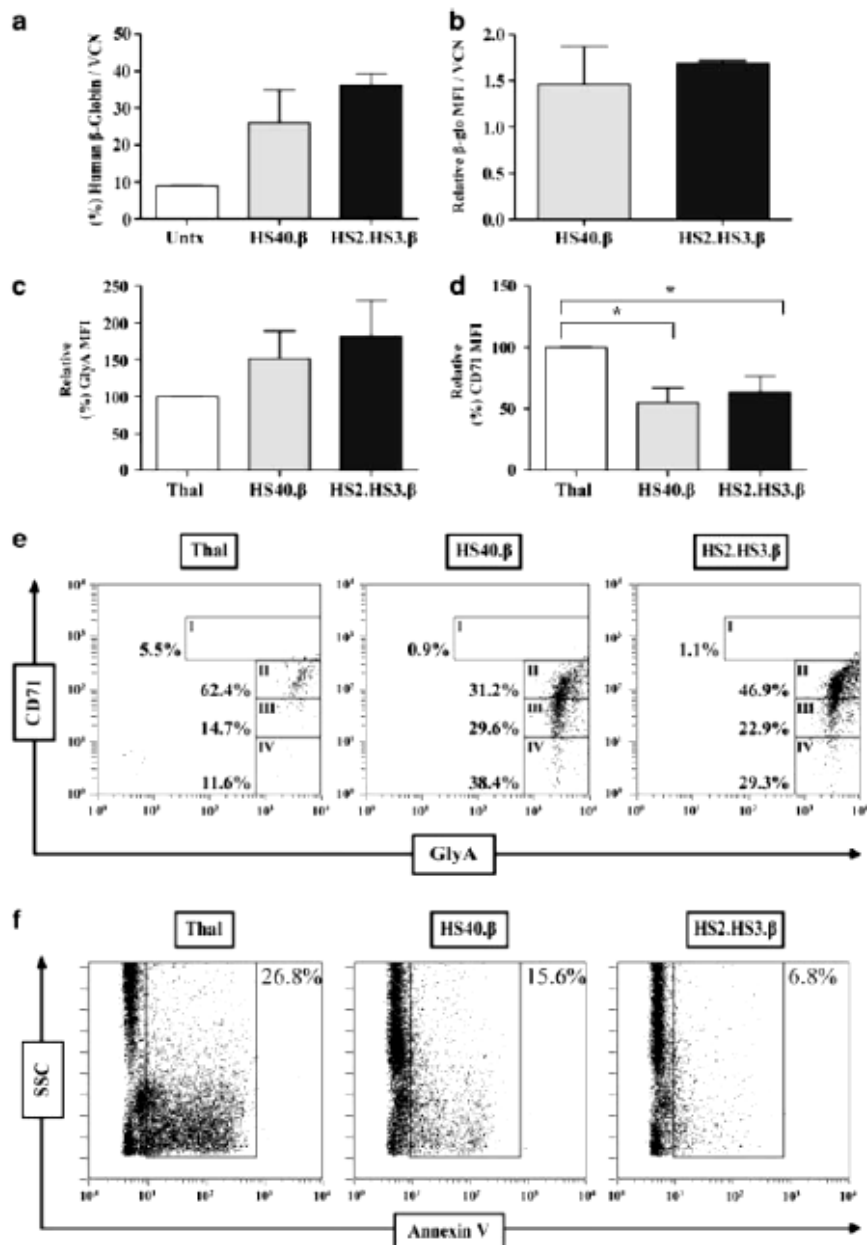


Figure 4 Restoration of ineffective erythropoiesis in human thalassemic CD34⁺ cells. (a) Human β -globin expression in thalassemia major (β^0) patient CD34⁺ erythroid cultures after transduction with the HS40. β or the HS2.HS3. β vectors. Percentages of β -globin-positive cells per VCN following antibody staining and fluorescence-activated cell sorting analysis are shown. Error bars represent s.e.m. of $n=3$ samples. (b) Human β -globin expression levels per VCN as indicated by antibody mean fluorescence intensity (MFI) in thalassemic patient HSCs following transduction with the HS40. β or the HS2.HS3. β vectors and erythroid differentiation. Error bars represent s.e.m. of $n=3$ samples. (c) Analysis of GlyA expression by flow cytometry in human thalassemic CD34⁺ erythroid cultures transduced with the HS40. β or HS2.HS3. β vectors. Values presented correspond to antibody MFI values relative to untransduced control cells. Error bars represent s.e.m. of $n=5$ samples. (d) Analysis of CD71 expression in human thalassemic CD34⁺ erythroid cultures. Antibody MFI values for HS40. β - and HS2.HS3. β -transduced thalassemic cells are shown over the negative control. Error bars represent s.e.m. of $n=4$ samples. (e) Representative flow cytometry analysis for human erythroid differentiation of transduced or control patient CD34⁺ cells using antibodies for CD71 and GlyA. Indicated gates represent erythroid maturation stages: basophilic (II), polychromatophilic (III) and orthochromatic erythroblasts (IV). (f) Representative flow cytometry analysis for the expression of the apoptotic marker Annexin-V in control or transduced patient CD34⁺ cells on day 18 of erythroid culture. *Denotes statistical significance.

HS2.HS3. β vector ($36 \pm 3.3\%$, Figure 4a). In addition, we assayed human β -globin expression levels by antibody staining and mean fluorescence intensity quantitation per VCN; the HS40. β -transduced cells exhibited a 150% increase over the control cells, while a similar 170% increase was seen in cells transduced with the HS2.HS3. β vector (Figure 4b). GlyA levels measured in HS40. β - and HS2.HS3. β -trans-

duced CD34⁺ cells reached 150% and 180%, respectively, of the respective values observed in control samples (Figure 4c). Thalassemic CD34⁺ cells because of an inability to reach full erythropoietic maturation retain high CD71 expression; when such cells were transduced with the HS40. β and HS2.HS3. β vectors, the cells showed a significant reduction of CD71 levels to 55% ($P=0.010$) and 63.5%

($P=0.032$), respectively (Figure 4d). These findings show that in human thalassemic samples both vectors expressed β -globin at comparable levels that were adequate for the restoration of ineffective erythropoiesis.

We then correlated the GlyA and CD71 expression pattern with the hierarchy of erythropoietic maturation: basophilic erythroblasts (GlyA^{high}/CD71^{high}), polychromatophilic erythroblasts (GlyA^{high}/CD71^{med}) and orthochromatic erythroblasts (GlyA^{high}/CD71^{low}).¹⁹ In the control thalassemic sample, the basophilic erythroblast subpopulation constituted 62.4% of the entire population, whereas the polychromatophilic and orthochromatic erythroblasts 14.7% and 11.6%, respectively (Figure 4e). In HS40. β -transduced cells, the basophilic erythroblast population was reduced to 31.2% of the entire cohort, whereas the polychromatophilic and orthochromatic cell populations were increased to 29.6% and 38.4%, respectively. Similarly, transduction with the HS2.HS3. β vector gave 46.9% of basophilic erythroblasts, 22.9% polychromatophilic and 29.3% orthochromatic erythroblasts, again indicating that β -globin expression by any of the two FV vectors in thalassemic CD34+ cells was capable of restoring erythropoietic maturation. A further characteristic of thalassemic CD34+ cells is their tendency to undergo apoptosis due to their inability to reach full erythroid maturation.²⁰ Apoptosis was measured by flow cytometry analysis for Annexin-V at 16 days following erythropoietic culture. HS40. β - and HS2.HS3. β -transduced thalassemic CD34+ cells were found to contain reduced amount of apoptotic cells, 15.6% and 6.8%, respectively, compared with 26.8% of apoptotic cells seen in the control sample (Figure 4f).

DISCUSSION

β -Thalassemia gene therapy has been envisioned for over 20 years,²¹ but vector stability, low titers and transgene expression issues have delayed its application.¹⁸ Human β -globin was initially expressed using only the homologous promoter without any additional regulatory elements.^{22–24} Over the years, the importance of the LCR sequence in the regulated expression of the human β -globin gene was demonstrated, alongside the discovery and utilization of the core elements of the different hypersensitive sites of the LCR sequence.^{2,25–28} The combination of core sequences from the HS2, HS3 and HS4 elements led to the construction of the first retroviral vectors with high titer, vector stability and efficient expression of the human β -globin transgene.^{29,30} On another approach that was implemented during the same time, the HS40 regulatory element from the α -globin locus that drives tissue-specific globin gene expression,^{31,32} was used to support expression of different globin genes.^{8,33}

In this study, we have used FV vectors to compare the efficiency of β -globin expression from a short (–127) β -globin gene promoter³³ regulated by either the HS40 α -globin enhancer or the HS2/HS3 regulatory sequences from the β -globin LCR. It was our original hypothesis that vectors harboring regulatory elements from both coordinately expressed globin genes would have optimal performance. To test our hypothesis, we constructed the HS40. β vector and compared it with a standard HS2.HS3. β vector. The titers of the HS40. β and HS2.HS3. β FV vectors were similar, indicating that these two regulatory elements have little impact on FV vector packaging. The efficiency of our FV vectors was initially tested *in vitro* in the erythroid cell line MEL, where we found that both vectors expressed comparable levels of β -globin. Our results are in accordance with previous studies comparing the efficiency of the HS40 sequence and the HS2 and HS3 sequences to regulate expression of β - and γ -globin in MEL cells.³³

We next transduced *ex vivo* BM HSCs isolated from the Hbb^{th3/+} mouse model of β -thalassemia intermedia. Progenitor erythroid colonies (day 10 burst-forming units) transduced with the HS40. β and HS2.HS3. β vectors expressed human β -globin mRNA at 12% and 2%, respectively, of the endogenous mouse α -globin. For pure technical reasons, expression in this assay could not be correlated to VCN due to residual FV plasmid contamination of the erythroid colonies. Nevertheless, this data indicated that both our FV vectors could express human β -globin with the HS40. β vector regulating such expression more efficiently in the mouse hematopoietic cell context. We also transduced a HSC-enriched population of FLCs isolated from Hbb^{th3/th3} E13.5 embryos, which was subsequently cultured under erythropoietic conditions. Transduced FLCs showed increased number of proerythroblasts (day 6) and basophilic erythroblasts (day 9) in comparison with the thalassemic control population. Collectively, these findings showed that both FV vectors managed to restore the ineffective erythropoiesis of thalassemic HSCs, but the HS40. β -transduced FLCs exhibited an improved erythropoiesis profile due to the more efficient β -globin production.

Using a similar construct to our HS2.HS3. β FV vector on a lentivirus vector backbone, Ferrari and colleagues⁴ achieved human β -globin expression in over 90% of PB cells following transplantation in lethally irradiated recipients. We utilized the same model of β -thalassemia to show that transplantation of FV-transduced BM Lin– HSCs resulted in 26.6% and 17.6% of human β -globin-expressing cells in the PB when HS40. β and HS2.HS3. β vectors were used, respectively. It is worth noting that these expression levels were obtained using a partially myeloablative regime with an average bone marrow chimerism of 47% (range 17–80%) in wild-type hosts. Studies in the Hbb^{th3/+} mouse model indicate that 10–20% of gene-corrected HSCs are sufficient to improve the intermediate thalassemia phenotype.^{4,34} Also in patients with severe thalassemia (β^0), the presence of nearly 25% of normal transplanted cells significantly improves the production of adult hemoglobin.³⁵ Although both our FV vectors achieved β -globin expression close to that threshold, due to the low engraftment rate, the hematological parameters of the transplanted animals resembled those of wild-type hosts. A thalassemic phenotype in the chimeric setting requires the presence of more than 50% of affected cells.³⁴ Nevertheless, non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis analysis of PB from our transplanted animals indicated the formation of hybrid hemoglobin tetramers.

In transplantation experiments with E13.5 Hbb^{th3/th3} FLCs, human β -globin in the PB reached an average of 11.4% for the HS40. β vector and 7.2% for the HS2.HS3. β vector. The differences in β -globin expression observed between transplantation of BM and FL HSCs purely reflect variations in engraftment rates achieved with the two HSC populations rather than gene transfer or developmental regulatory differences. Such reduction in engraftment and hence globin expression following transplantation with FLCs has been reported before.³⁶

Transduction of human CD34+ cells isolated from β -thalassemia patients (β^0) showed efficient β -globin expression following erythroid liquid culture by either of the FV vector-encoded regulatory elements. This restored the ineffective erythropoiesis seen in thalassemic cells by promoting the development of a CD71^{low}GlyA^{high} cell population and reducing apoptosis. It is noteworthy that such phenotypic improvement was achieved with a VCN of 1. The use of β -globin LCR elements for β -globin expression in thalassemic patient samples has been documented before,^{5,20} but our study constitutes the first report on the successful use of the α -globin HS40 regulatory element for the functional correction of β -thalassemia in human primary samples.

Contrary to what has been speculated before about the inability of the HS40 element to drive transcription of the fetal γ -globin *in vivo* following BMT or in transgenic animals, we found that this element, in the context of FV vectors, provided adult β -globin expression comparable to the HS2.HS3 element. This suggested that the HS40 transcriptional regulation may occur in a gene-context manner. In addition, the HS40 element does not have a chromatin opening activity, although this is a debatable condition for murine β -globin expression.³⁷ However, in our case, one cannot exclude the contribution of the proviral FV long terminal repeat in 'insulating' the transgene³⁸ and maintaining such an open chromatin conformation. This allows for a direct comparison of the transcriptional activity between the HS40 and HS2.HS3 elements. In conclusion, our data show that the HS40 constitutes a compact and strong enhancer compared with the larger and more complex HS2.HS3. In the context of the FV vector, HS40 provides stable expression following transplantation and is a potent regulatory element for β -globin expression.

Globin gene therapy has been in the forefront of therapeutic vector development. Retroviral vectors were initially explored as therapeutic vehicles but were met with unsurpassed obstacles in titers, stability and expression.^{3,29,39,40} Lentiviral globin vectors were then successfully explored in the predinical mouse and more recently in the clinical arena;^{18,30} however, globin expression was also accompanied by the unwanted overexpression of a gene (*HMGA2*) that may culminate to a malignant disorder. FV vectors are the less well explored genus of retroviruses and their therapeutic potential has not yet been explored in the clinic; however, we show that FV vectors can provide therapeutic levels of hemoglobin in the *thal3* mouse model and, similarly to the lentiviral vectors,⁴ with low VCNs (<2). Along with the lack of pathogenicity, efficient expression with low vector copies is a much desired feature in any therapeutic vector that holds promise for clinical application. In effect, FV vectors are an alternative to lentiviral vectors and could be further explored in the 'additive' gene transfer field.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and differentiation conditions

The mouse erythroleukemia (MEL) cell line was grown in RPMI complemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine and 1% PenStrep (100 U ml⁻¹ penicillin and 100 μ g ml⁻¹ streptomycin; all by GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). For erythroid differentiation, logarithmically growing cells were exposed to 2% dimethylsulfoxide (Carlo Erba, Val de Reuil, France) for 4 days. 293T and HT1080 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (GIBCO) with identical supplements as stated above.

Foamy viral vectors and vector production

Self-inactivating FV vectors were generated as previously described.⁴¹ The pDF.Lb vector that codes for the human β -globin gene under the regulation of an extended LCR cassette was used as a backbone. A sequence containing the HS40 element (425 bp) along with the -127 bp β -globin promoter was isolated as a *NorI*-*NaeI* fragment from a vector kindly gifted by Dr DW Emery³³ and inserted into the pDF.Lb backbone, replacing the LCR cassette and generating the pDF.HS40. β vector. The HS2 (756 bp) and HS3 (1334 bp) sequences were isolated as a single PCR fragment from the pDF.Lb LCR cassette using primers with *XbaI* and *NorI* restriction enzyme identification sequences (forward (F): 5'-GCCGGGTCTAGACATTTGATTCACAAT-3' and reverse (R): 5'-CTAAGCG GCGCCTAGTGCTTAGATTC-3'). The HS2/HS3 sequence replaced the HS40 element in the pDF.HS40. β vector, generating the pDF.HS2.HS3. β vector. The entire human β -globin gene expression cassette was integrated in reverse orientation in respect to the foamy transcription. FV vector stocks were generated by calcium phosphate-mediated transient transfection in 293T cells as described.⁴¹

Flow cytometry

Human β -globin expression was determined by intracellular staining with mouse monoclonal PE conjugated antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA). MEL cells, human CD34+ cells from patients or PB from transplanted animals were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 or 10 min at room temperature, respectively. Fixed PB was permeabilized with 1:4 methanol:acetone solution for 2 min at room temperature. MEL cells and human CD34+ cells with 0.1% Triton X for 15 min and followed by a 30-min incubation with the anti-human β -globin antibody at 4 °C. The stained PB samples were analyzed by flow cytometry, and in every set, there was a negative and a positive control, that is, wild-type mouse samples and human PB samples. Acquisition and analysis of human β -globin expression was performed on a FC500 flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

Isolation, transduction and *ex vivo* erythroid differentiation of mouse primary hematopoietic progenitor cells

Murine bone marrow cells were harvested from the femurs and tibias of *Hbb*^{th3/+} mice (kindly provided by Professor NA Anagnou) at approximately 7–10 weeks of age. BM Lin⁻ progenitors were isolated using a StemSep mouse progenitor enrichment cocktail (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) following the manufacturer's instructions. FLCs were isolated from E13.5 *Hbb*^{th3/th3} embryos and were subsequently selected for CD11b (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA) using streptavidin-coated beads and MS Macs columns (both from Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). BM Lin⁻ or FLC CD11b+ cells were transduced in StemSpan (STEMCELL Technologies) serum-free medium supplemented with 1% PenStrep, 5% fetal calf serum and murine SCF at 10 ng ml⁻¹, human IL6 at 10 ng ml⁻¹, human Flt3L at 50 ng ml⁻¹ (all by PeproTech EC Ltd, London, UK) at an MOI of 3–10 on retrovirus-coated plates (CH296, Takara Bio Inc, Otsu, Japan). The following day transduced or control BM Lin⁻ cells were plated at 10³ ml⁻¹ in methylcellulose medium (MethoCult, STEMCELL Technologies) and transduced FLC CD11b+ cells were cultured in StemSpan medium supplemented with 1% PenStrep, 5% fetal calf serum and the following cytokines at final concentrations as indicated. Growth phase: EPO 0.5 U ml⁻¹ (NeoRecormon, Roche, Basel, Switzerland), muSCF 100 ng ml⁻¹ and dexamethasone 10⁻⁶ M (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany); differentiation phase: EPO 10 U ml⁻¹. FLC CD11b+ cells were maintained in growth culture for up to 6 days and in erythroid differentiation culture for another 3 days at a concentration of 3–10 $\times$ 10⁵ ml⁻¹.

Transplantation of transduced BM Lin⁻ cells in *Hbb*^{th3/+} mice

Animals were kept at the BREA Animal Facility in microisolator cages provided with irradiated food and autoclaved water. Experiments were approved by the Institutional and the National Review Board committee. Myeloablation was performed using Busilvex (Pierre Fabre Médicament, Boulogne, France) following careful titration of the tolerated dose in normal C57Bl6J animals. Busilvex doses >80 mg per kg total were found to induce toxic death within 48 h. Daily intraperitoneal injections of 20 mg⁻¹ per kg Busilvex for 4 days before the transplantation in female C57Bl6J mice (7–10 weeks) resulted in partial myeloablation (data not shown). Following transduction, cells were washed in phosphate-buffered saline and 0.5–2 $\times$ 10⁵ cells were injected intravenously in partially myeloablated recipients. Mice were killed at weeks 18–25 after transplantation.

Western blot

A volume of 10 μ l of PB was lysed by the addition of 40 μ l Hemolysate Reagent (Helena Laboratories, Beaumont, TX, USA) and the hemolysate was equally divided on two non-denaturing, 12% polyacrylamide gels and transferred to PVDF membranes (Roche) for 30 min at 4 °C. Membranes were blocked with tris-buffered saline with Tween 20 containing 5% non-fat dry milk for 2 h at 4 °C. One membrane was stained for human β -globin (1:1000) and the other for mouse α -globin (1:500; both antibodies by Santa Cruz Biotechnology) by overnight incubation at 4 °C in tris-buffered saline with Tween 20/5% non-fat dry milk. A horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:5000) was added for 2 h at room temperature and the bands were visualized using Amersham ECL western blotting detection system (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA).

Isolation, transduction and *ex vivo* erythroid differentiation of human primary hematopoietic progenitor cells

PB samples from human β -thalassaemia major (β^0) patients were collected during regular hospital visits and were used to isolate CD34-positive cells (CD34 Microbead kit, Miltenyi Biotec). CD34+ thalassaemic cells were incubated with concentrated FV stocks for 18–20 h with the addition of huFlt3L at 100 ng ml⁻¹, huSCF at 100 ng ml⁻¹, huTPO at 100 ng ml⁻¹, huIL-6 at 20 ng ml⁻¹ and huIL-3 at 20 ng ml⁻¹ (PeproTech EC Ltd). The next day, transduced cells were washed with phosphate-buffered saline and cultured in StemSpan medium supplemented with 1% PenStrep, 5% fetal calf serum and the following cytokines at final concentrations as indicated, EPO 1 U ml⁻¹, huSCF 10 ng ml⁻¹, huIL-3 10 ng ml⁻¹ and either dexamethasone 10⁻⁶ M and β -estradiol 1 μ M (Sigma-Aldrich) or huTPO 10 ng ml⁻¹ and huFlt3L 10 ng/ml. CD34+ cells were maintained in culture for 16–18 days and at a concentration of 1–3 $\times$ 10⁵ ml⁻¹.

Taqman real-time PCR

For VCN and BM engraftment determination, genomic DNA from transduced cells or BM of transplanted mice was extracted and 250 ng was amplified in duplicate 25 μ l reactions using an ABI Prism 7000 instrument (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Detection of endogenous mouse GAPDH gene (Rodent GAPDH kit, ABI), the FV genome (F: 5'-CTGGAATGTTACT CAAAGAGCTGTTT-3' and R: 5'-TGGAACAGGATGCTGCATTCT-3') and in the case of BMT animals the TSPY gene (F: 5'-TCCTTGGGCTCTTCAT TATTCTTAAC-3' and R: 5'-GAGAACACGCTTGGTTTGAGATG-3') were performed using QPCR and SYBR Green master mixes, respectively (ABI or Stratagene, Santa Clara, CA, USA). Standards on the basis of different amounts of a FV vector plasmid (FV genome) or genomic DNA of mouse origin were also analyzed and their threshold cycle (Ct) values were plotted in standard curves. These were then used to extrapolate the absolute VCN and number of cells per reaction, respectively. In addition, a plot of increasing concentration of TSPY gene was performed for the engraftment levels in the transplanted mice, to be calculated as previously shown.

For the detection of human β -globin and murine α -globin mRNA, RNA was extracted from transduced or control day 10 burst-forming units using TriReagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) and reverse transcribed using MMLV-RT (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's recommendations. The levels of human β -globin and murine α -globin mRNA were analyzed using SYBR Green Master mix and primers: Hu- β : (F: 5'-GGTGAATCTTTTGCCAAAGTGAT-3' and R: 5'-CACCTTTGC CACTGAGTGA-3') and Mu- α : (F: 5'-ACCTACTTCTCTCACTTTGATG TAAGC-3' and R: 5'-GCATCGGCGACCTTCTTG-3'). The relative expression of human β -globin over murine α -globin expression was calculated using the 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} method developed by Livak et al.⁴²

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr G Stamatoyannopoulos, Q Li and D Emery from the University of Washington (Seattle, WA) for the HS40 plasmid; Dr N Anagnou for providing the Hb β^0 mice; and Drs E Gouseti, S Grafako and A Kattamis (Children's Hospital, Agia Sofia, Athens, Greece) for providing β -thalassaemia patient samples. The work was supported from an EU grant (CONCERT LSHB-CT-2004-005242) and a grant from the Greek GSRT (PENED 603).

- beta-globin gene derivatives into murine erythroleukemia cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 3386–3390.
- Micio A, Cesari R, Lotti F, Rossi C, Sanvito F, Ponzoni M et al. In vivo selection of genetically modified erythroblastic progenitors leads to long-term correction of beta-thalassaemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 10547–10552.
- Roselli EA, Mezzadra R, Frittoli MC, Maruggi G, Biral E, Mavilio F et al. Correction of beta-thalassaemia major by gene transfer in hematopoietic progenitors of pediatric patients. *EMBO Mol Med* 2010; **2**: 315–328.
- Li Q, Emery DW, Han H, Sun J, Yu M, Stamatoyannopoulos G. Differences of globin transgene expression in stably transfected cell lines and transgenic mice. *Blood* 2005; **105**: 3346–3352.
- Persons DA, Hargrove PW, Allay ER, Hanawa H, Nienhuis AW. The degree of phenotypic correction of murine beta-thalassaemia intermedia following lentiviral-mediated transfer of a human gamma-globin gene is influenced by chromosomal position effects and vector copy number. *Blood* 2003; **101**: 2175–2183.
- Ren S, Wong BY, Li J, Luo XN, Wong PM, Atweh GF. Production of genetically stable high-titer retroviral vectors that carry a human gamma-globin gene under the control of the alpha-globin locus control region. *Blood* 1996; **87**: 2518–2524.
- Vassilopoulos G, Rethwilm A. The usefulness of a perfect parasite. *Gene Therapy* 2008; **15**: 1299–1301.
- Vassilopoulos G, Trobridge G, Josephson NC, Russell DW. Gene transfer into murine hematopoietic stem cells with helper-free foamy virus vectors. *Blood* 2001; **98**: 604–609.
- Kiem HP, Allen J, Trobridge G, Olson E, Keyser K, Peterson L et al. Foamy-virus-mediated gene transfer to canine repopulating cells. *Blood* 2007; **109**: 65–70.
- Andrianaki A, Siapaki EK, Hirata RK, Russell DW, Vassilopoulos G. Dual transgene expression by foamy virus vectors carrying an endogenous bidirectional promoter. *Gene Therapy* 2010; **17**: 380–388.
- Trobridge GD, Miller DG, Jacobs MA, Allen JM, Kiem HP, Kaul R et al. Foamy virus vector integration sites in normal human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 1498–1503.
- Vassilopoulos G, Navas PA, Skarpidi E, Peterson KR, Lowrey CH, Papayannopoulou T et al. Correct function of the locus control region may require passage through a nonerythroid cellular environment. *Blood* 1999; **93**: 703–712.
- Morrison SJ, Hemmati HD, Wandycz AM, Weissman IL. The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 10302–10306.
- Socolovsky M, Nam H, Fleming MD, Haase VH, Brugnara C, Lodish HF. Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)Stat5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood* 2001; **98**: 3261–3273.
- Rohaly J. The use of busulfan therapy in bone marrow transplantation. A nursing overview. *Cancer Nurs* 1989; **12**: 144–152.
- Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, Wang G, Hehir K, Fusil F et al. Transfusion independence and HMG2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. *Nature* 2010; **467**: 318–322.
- Wojda U, Noel P, Miller JL. Fetal and adult hemoglobin production during adult erythropoiesis: coordinate expression correlates with cell proliferation. *Blood* 2002; **99**: 3005–3013.
- Puthenveetil G, Scholes J, Carbone J, Qureshi N, Xia P, Zeng L et al. Successful correction of the human beta-thalassaemia major phenotype using a lentiviral vector. *Blood* 2004; **104**: 3445–3453.
- Anderson WF, Goldberg S, Kantoff P, Berg P, Egliis M, Humphries RK. Attempts at gene therapy in beta-thalassaemic mice. *Ann NY Acad Sci* 1985; **445**: 445–451.
- Cone RD, Weber-Benarous A, Baorto D, Mulligan RC. Regulated expression of a complete human beta-globin gene encoded by a transmissible retrovirus vector. *Mol Cell Biol* 1987; **7**: 887–897.
- Dzierzak EA, Papayannopoulou T, Mulligan RC. Lineage-specific expression of a human beta-globin gene in murine bone marrow transplant recipients reconstituted with retrovirus-transduced stem cells. *Nature* 1988; **331**: 35–41.
- Bender MA, Gelinas RE, Miller AD. A majority of mice show long-term expression of a human beta-globin gene after retrovirus transfer into hematopoietic stem cells. *Mol Cell Biol* 1989; **9**: 1426–1434.
- Fraser P, Hurst J, Collis P, Grosfeld F. DNase I hypersensitive sites 1, 2 and 3 of the human beta-globin dominant control region direct position-independent expression. *Nucleic Acids Res* 1990; **18**: 3503–3508.
- Caterina JJ, Ryan TM, Pawlik KM, Palmer RD, Brinster RL, Behringer RR et al. Human beta-globin locus control region: analysis of the 5' DNase I hypersensitive site HS 2 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 1626–1630.
- Tuan DY, Solomon WB, London IM, Lee DP. An erythroid-specific, developmental-stage-independent enhancer far upstream of the human 'beta-like globin' genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 2554–2558.
- Moi P, Kan YW. Synergistic enhancement of globin gene expression by activator protein-1-like proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 9000–9004.
- Sadelain M, Wang CH, Antoniou M, Grosfeld F, Mulligan RC. Generation of a high-titer retroviral vector capable of expressing high levels of the human beta-globin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 6728–6732.
- May C, Rivella S, Callegari J, Heller G, Gaensler KM, Luzzatto L et al. Therapeutic haemoglobin synthesis in beta-thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human beta-globin. *Nature* 2000; **406**: 82–86.
- Sharpe JA, Chan-Thomas PS, Lida J, Ayyub H, Wood WG, Higgs DR. Analysis of the human alpha globin upstream regulatory element (HS-40) in transgenic mice. *EMBO J* 1992; **11**: 4565–4572.

- Isgro A, Gaziev J, Sodani P, Lucarelli G. Progress in hematopoietic stem cell transplantation as allogeneic cellular gene therapy in thalassaemia. *Ann NY Acad Sci* 2010; **1202**: 149–154.
- Grosfeld F, van Assendelft GB, Greaves DR, Kollias G. Position-independent, high-level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice. *Cell* 1987; **51**: 975–985.
- Novak U, Harris EA, Forrester W, Groudine M, Gelinas R. High-level beta-globin expression after retroviral transfer of locus activation region-containing human

- 32 Chen H, Lowrey CH, Stamatoyannopoulos G. Analysis of enhancer function of the HS-40 core sequence of the human alpha-globin cluster. *Nucleic Acids Res* 1997; **25**: 2917–2922.
- 33 Li Q, Emery DW, Fernandez M, Han H, Stamatoyannopoulos G. Development of viral vectors for gene therapy of beta-chain hemoglobinopathies: optimization of a gamma-globin gene expression cassette. *Blood* 1999; **93**: 2208–2216.
- 34 Persons DA, Allay ER, Sabatino DE, Kelly P, Bodine DM, Nienhuis AW. Functional requirements for phenotypic correction of murine beta-thalassemia: implications for human gene therapy. *Blood* 2001; **97**: 3275–3282.
- 35 Andreani M, Nesci S, Lucarelli G, Tonucci P, Rapa S, Angelucci E *et al*. Long-term survival of ex-thalassemic patients with persistent mixed chimerism after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000; **25**: 401–404.
- 36 Rivella S, May C, Chadburn A, Riviere I, Sadelain M. A novel murine model of Cooley anemia and its rescue by lentiviral-mediated human beta-globin gene transfer. *Blood* 2003; **101**: 2932–2939.
- 37 Epner E, Reik A, Cimbara D, Telling A, Bender MA, Fiering S *et al*. The beta-globin LCR is not necessary for an open chromatin structure or developmentally regulated transcription of the native mouse beta-globin locus. *Mol Cell* 1998; **2**: 447–455.
- 38 Hendrie PC, Huo Y, Stolitenko RB, Russell DW. A rapid and quantitative assay for measuring neighboring gene activation by vector proviruses. *Mol Ther* 2008; **16**: 534–540.
- 39 Plavec I, Papayannopoulou T, Maury C, Meyer F. A human beta-globin gene fused to the human beta-globin locus control region is expressed at high levels in erythroid cells of mice engrafted with retrovirus-transduced hematopoietic stem cells. *Blood* 1993; **81**: 1384–1392.
- 40 Walsh CE, Liu JM, Miller JL, Nienhuis AW, Samulski RJ. Gene therapy for human hemoglobinopathies. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993; **204**: 289–300.
- 41 Vassilopoulos G, Josephson NC, Trobridge G. Development of foamy virus vectors. *Methods Mol Med* 2003; **76**: 545–564.
- 42 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-(Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 2001; **25**: 402–408.