



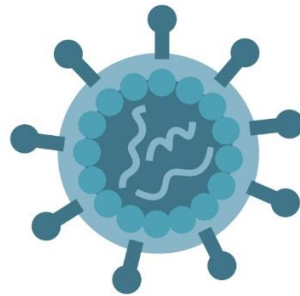
ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Λειτουργική αξιολόγηση νέων λεντιϊκών φορέων
γονιδιακής θεραπείας αιμοσφαιρινοπαθειών**

Τσεμπερά Ευγενία

Βιολόγος



Επιβλέπων Καθηγητής

Νικόλαος Ανάγνου, Ομότιμος Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Αθηνών, ΕΚΠΑ
Διευθυντής Εργαστηρίου Κυτταρικής και Γονιδιακής Θεραπείας, ΙΙΒΕΑΑ

ΑΘΗΝΑ

Μάρτιος 2020

Επιβλέπων Καθηγητής:

Νικόλαος Ανάγνου, Ομότιμος Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, ΕΚΠΑ

Διευθυντής Εργαστηρίου Κυτταρικής και Γονιδιακής Θεραπείας, ΙΙΒΕΑΑ

Επιστημονικοί Υπεύθυνοι:

Εκάτη Δρακοπούλου, Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ)

Νικόλαος Ανάγνου, Ομότιμος Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, ΕΚΠΑ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Νικόλαος Ανάγνου, Ομότιμος Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Αθηνών, ΕΚΠΑ

Χάρις Λιάπη, Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής Αθηνών, ΕΚΠΑ

Μαρία Ρουμπελάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής Αθηνών, ΕΚΠΑ

Η παρούσα Ερευνητική Εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρικής και Γονιδιακής Θεραπείας του Κέντρου Βασικής Έρευνας στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ).

Πρόλογος- Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία αποτελεί αναλυτική παρουσίαση της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής μου Εργασίας που έχει διεξαχθεί κατά το ακαδημαϊκό έτος 2018-2020, στο Εργαστήριο Κυτταρικής και Γονιδιακής Θεραπείας του Κέντρου Βασικής Έρευνας στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ), κατά το δεύτερο έτος των μεταπτυχιακών σπουδών μου στο Διατμηματικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα *Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική*, του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιστημονικό μου υπεύθυνο και επιβλέποντα Νικόλαο Ανάγνου, Ομότιμο Καθηγητή Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών του ΕΚΠΑ, για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ μαζί του, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθόλη την διάρκεια των πειραμάτων. Τον θεωρώ Καθηγητή και μέντορα, καθώς η αγάπη και το πάθος του για την Βιολογία, αποτελούν πηγή έμπνευσης για μένα, ώστε να γίνομαι καλύτερη επιστήμονας.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω στην Εκάτη Δρακοπούλου, Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ), υπεύθυνη και επιβλέπουσα των πειραμάτων μου καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, για την προθυμία και υπομονή που επέδειξε, να μου δείξει και εξηγήσει όλες τις πειραματικές διεργασίες, καθώς και για την αμέριστη συμπαράσταση και καθοδήγηση που μου προσέφερε όχι μόνο σε επαγγελματικό αλλά και προσωπικό επίπεδο.

Θερμές ευχαριστίες επίσης οφείλω στην Διευθύντρια του Κέντρου Θαλασσαιμίας και Δρεπανοκυτταρικής Νόσου του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών, Δρ. Ερση Βοσκαρίδου, για την αμέριστη βιοήθειά της στην διάθεση των απαραίτητων βιολογικών δειγμάτων των ασθενών.

Στις φίλες και συναδέλφισσες μου, Κωσταντίνα Γιαννούλη και Αναστασία Ψυχογιού, καθώς και στην ομάδα του Εργαστηρίου Μπούμπας-Βεργίνης, οφείλω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ για την ψυχολογική υποστήριξή τους, καθώς και για το υπέροχο φιλικό κλίμα που διαμορφώθηκε, τόσο εντός, όσο και εκτός του εργαστηρίου.

Τέλος, θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου τον οικογενειακό και φιλικό μου περίγυρο και ιδιαίτερα τους γονείς μου, για την αμέριστη συμπαράσταση, αγάπη και υπομονή που μου έδειξαν όλο αυτό το χρονικό διάστημα. Χωρίς αυτούς η πραγματοποίηση αυτής της εργασίας θα ήταν αδύνατη. Τους ευχαριστώ που με στηρίζουν και με βοηθούν να κάνω τα όνειρα μου πραγματικότητα

Περίληψη

Οι κλινικές δοκιμές για την γονιδιακή θεραπεία της β-θαλασσαιμίας αυξάνονται συνεχώς με την 1^η επιτυχημένη μελέτη να είναι πλέον γεγονός. Παρά την πρόοδο όμως, υπάρχουν ακόμη σημαντικοί περιορισμοί που αφορούν κυρίως στην ασφάλεια και στην αποτελεσματικότητα της γονιδιακής μεταφοράς και σχετίζονται κυρίως με τα υποβέλτιστα ποσοστά γονιδιακής μεταφοράς στα κύτταρα-στόχοι, την ανάγκη για μακροπρόθεσμη σταθερή και ιστοειδική έκφραση του διαγονιδίου και την επιλογή κατάλληλων φορέων που θα εγγυώνται υψηλά ποσοστά ασφάλειας και μεταγωγής με χαμηλή γενοτοξικότητα.

Στην προσπάθεια αντιμετώπισης των παραπάνω, κατασκευάσαμε έναν νέο λεντιϊκό φορέα γ-σφαιρίνης, τον GammaThal, ο οποίος φέρει τον πολυμορφισμό γ -σφαιρίνης Forest Park επιτρέποντας την διάκριση της γ -σφαιρίνης του φορέα από την ενδογενή και συνεπώς την άμεση και ακριβή ποσοτικοποίηση της αύξησης της HbF λόγω μεταγωγής. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιώντας τον φάκελο HF του στελέχους Edmonston του ιού της ιλαράς που παρουσιάζει αυξημένο τροπισμό για τα ανθρώπινα αιμοποιητικά κύτταρα CD34⁺ αναμένεται ιστοειδική στόχευση του φορέα με υψηλή μεταγωγή σε χαμηλή πολλαπλότητα μόλυνσης, ελαχιστοποιώντας έτσι τις πιθανότητες εισχωρητικής μεταλλαξιγένεσης σε μια μελλοντική κλινική μελέτη.

Ο GammaThal αξιολογήθηκε *in vitro*, σε CD34⁺ κύτταρα φυσιολογικών και θαλασσαιμικών δοτών (β^+ και β^0) με πολλαπλότητα μόλυνσης MOI=25. Μεταγωγή με τον εν λόγω φορέα, οδήγησε σε σημαντικά υψηλότερα ποσοστά F-κυττάρων στους θαλασσαιμικούς δότες, ενώ στην περίπτωση των υγιών δοτών παρατηρήθηκε απλά μια τάση. Συγκεκριμένα, στους θαλασσαιμικούς ασθενείς παρατηρήθηκε μια μέση αύξηση των F-κυττάρων της τάξης του 8.93% ($p=0.026$, $n=4$) ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στους υγιείς δότες ήταν 11% ($p=0.098$, $n=3$). Η αύξηση των F-κυττάρων στους θαλασσαιμικούς ασθενείς συνοδεύτηκε με μια μέση αποτελεσματικότητα μεταγωγής 54.58% και μέσο αριθμό αντιγράφων φορέα ανά κύτταο VCN=0.94. Επιπλέον, ο GammaThal επέφερε σημαντική βελτίωση της ερυθροποίησης *in vitro* σε θαλασσαιμικό υπόβαθρο, οδηγώντας σε μειωμένο ποσοστό απόπτωσης των ερυθροβλαστών (10.24%, $p=0.067$) σε συνδυασμό με αυξημένο αριθμό ορθοχρωματικών ερυθροβλαστών στα μεταγμένα με τον φορέα κύτταρα.

Συμπερασματικά, κατασκευάσαμε έναν νέο υποσχόμενο λεντιϊκό φορέα γ-σφαιρίνης για την γονιδιακή θεραπεία της β-θαλασσαιμίας. Με την διεξαγωγή επιπλέον πειραμάτων τόσο in

vitro όσο και in vivo, καθώς και έπειτα από ανάλυση του προτύπου ενσωμάτωσης στο γονιδίωμα των κυττάρων-στόχων, θα καθορισθεί εάν ο GammaThal αποτελεί έναν αποτελεσματικό κλινικό φορέα που συνδυάζει υψηλά επίπεδα βιοασφάλειας και θεραπευτική βελτίωση της β-θαλασσαιμίας.

Abstract

Gene therapy for β -thalassemia has gained grounds over the last years, with the 1st successful clinical trial already being a reality and a great number of others being under way. Despite the progress however, there are still some limitations concerning safety and efficacy. The above limitations are primarily connected with suboptimal gene transfer, the need for long-term and stable tissue-specific transgene expression and designing of novel lentiviral vectors demonstrating high safety and transduction efficiency with low genotoxicity.

To this end we constructed a novel γ -globin lentiviral vector, designated GammaThal. The aforementioned vector carries a $\Lambda\gamma$ polymorphism, which gives a distinct peak in HPLC, separating the therapeutic transgene from the endogenous and thus providing means of direct measurement of the vector-producing $\Lambda\gamma$ -globin. Additionally, pseudotyping of the novel vector with the alternative envelope glycoprotein HF from the Edmonston strain of measles virus, shown to demonstrate increased tropism towards human CD34⁺ cells, we aimed at high transduction efficiency at low multiplicity of infection, trying thus to minimize the potential risk of insertional mutagenesis in a future clinical application.

GammaThal was assessed *in vitro* in CD34⁺ cells from normal and thalassemic donors (β^+ and β^0) at an MOI=25. We show that while transduction with GammaThal only leads to a trend regarding F-cells increase in normal donors, in a thalassemic background it leads to significantly increased F-cells percentage and transduction efficiency. Specifically, in thalassemic patients an average F-cell increase of 8.93% was observed ($p = 0.026$, $n = 4$) while the corresponding rate in healthy donors was 11% ($p= 0.098$, $n=3$). F-cells in thalassemic patients was associated with a mean transduction efficiency of 54.58% and an average vector copy number (VCN) per cell = 0.94. Furthermore, transduction with GammaThal improves thalassemic erythropoiesis *in vitro*, by reducing apoptosis (10.24%, $p=0.067$) and thus leading to an increase in the number of orthochromatic erythroblasts.

Overall, we have generated a new promising γ -globin lentiviral vector for the gene therapy of β -thalassemia. By conducting additional experiments both *in vitro* and *in vivo*, as well as a comprehensive integration site analysis, it will be determined if GammaThal could be an effective clinical vector that combines high level of biosafety with therapeutical improvement of β -thalassemia.

Περιεχόμενα

Πρόλογος- Ευχαριστίες	4
Περίληψη.....	5
Abstract	6
Συντομογραφίες.....	10
Εισαγωγή.....	11
1.1 Αιμοσφαιρίνες: Δομή και λειτουργία	12
1.2 Γονιδιακός τύπος β-σφαιρινών	13
1.3 Μεταστροφή αιμοσφαιρινών	15
1.4 Κληρονομική παραμονή της ανθρώπινης εμβρυικής αιμοσφαιρίνης (HPFH)	17
1.5 Αιμοσφαιρινοπάθειες	20
1.6 α-θαλασσαιμία.....	22
1.7 β-θαλασσαιμία.....	22
1.8 Θεραπευτικές προσεγγίσεις για την β-θαλασσαιμία.....	24
1.9 Γονιδιακή θεραπεία	26
1.10 Συστήματα μεταφοράς διαγονιδίου	30
1.11 Λεντιϊκοί φορείς	33
1.12 Λεντιϊκοί φορείς β-σφαιρίνης.....	36
1.13 Λεντιϊκοί φορείς γ-σφαιρίνης	37
1.14 GammaThal	39
Σκοπός.....	42
Υλικά και Μέθοδοι.....	43
2.1 Σύσταση και παρασκευή διαλυμάτων	44
2.2 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς HEK-293T.....	46
2.3 Κρυοσυντήρηση κυττάρων για μελλοντική χρήση.....	46
2.4 Δημιουργία δεκτικών κυττάρων (competent cells).....	46
2.5 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων	47
2.6 Παραγωγή πλασμιδίων σε μικρή κλίμακα (miniprep).....	47
2.7 Παραγωγή πλασμιδίων σε μεγάλη κλίμακα (maxiprep).....	48
2.8 Πέψη και ηλεκτροφόρηση	48
2.9 Κατασκευή GammaThal.....	49
2.10 Μετασχηματισμός HEK-293T για την παραγωγή ιού (transfection)	51
2.11 Τίτλοποίηση ικού φορέα (titration)	52
2.12 Απομόνωση ανθρώπινων CD34 ⁺ κυττάρων, μεταγωγή και χειρισμός	52
2.13 Υγρή καλλιέργεια ερυθροειδικής διαφοροποίησης CD34 ⁺ κυττάρων	54
2.14 Αποικίες προγονικών κυττάρων (colony-forming assays)	55
2.15 Απομόνωση γενωμικού DNA.....	55
2.16 Απομόνωση RNA	56
2.17 Ανάλυση RNA με qPCR	56
2.18 Κυτταρομετρία ροής.....	57

2.19	Επίστρωση ερυθροβλαστών σε αντικειμενοφόρο πλάκα με φυγοκέντρηση (Cytospins).....	58
2.20	Προσδιορισμός ενσωματωμένων ιϊκών αντιγράφων ανά κύτταρο και αποτελεσματικότητας μεταγωγής.....	58
2.21	Στατιστική ανάλυση	59
	Αποτελέσματα	60
3.1	Κατασκευή λεντιϊκού φορέα GammaThal.....	61
3.2	Λειτουργικός τίτλος των νέων λεντιϊκών φορέων GGHI-mB-3D και GammaThal.....	64
3.3	Αξιολόγηση του φορέα GammaThal σε CD34 ⁺ κύτταρα υγιών δοτών	66
3.3.1	Αυξημένη παραγωγή F-κυττάρων μετά από μεταγωγή των CD34 ⁺ κυττάρων με τον φορέα GammaThal	66
3.3.2	Έκφραση εμβρυϊκής γ-σφαιρίνης σε επίπεδο μεταγράφου	68
3.3.3	Αριθμός αντιγράφων φορέα GammaThal ανά κύτταρο	68
3.4	Αξιολόγηση του νέου φορέα GammaThal σε CD34 ⁺ κύτταρα από θαλασσαιμικούς (β ⁰ και β ⁺) ασθενείς.....	72
3.4.1	Αυξημένη παραγωγή F-κυττάρων μετά από μεταγωγή των CD34 ⁺ κυττάρων με τον φορέα GammaThal	72
3.4.2	Έκφραση εμβρυϊκής γ-σφαιρίνης σε επίπεδο μεταγράφου	74
3.4.3	Η μεταγωγή με τον GammaThal δεν επηρεάζει την κλωνογενή ικανότητα των CD34 ⁺ κυττάρων	75
3.4.4	Προσδιορισμός αποτελεσματικότητας γονιδιακής μεταγωγής και μέσου αριθμού αντιγράφων φορέα ανά κύτταρο (VCN/cell).....	76
3.4.5	Βελτίωση της ερυθροποίησης έπειτα από μεταγωγή με τον GammaThal.....	80
3.5	Σύγκριση αποτελεσμάτων μεταξύ υγιών δοτών και θαλασσαιμικών ασθενών	85
3.5.1	Αυξημένη παραγωγή F-κυττάρων μετά από μεταγωγή των CD34 ⁺ κυττάρων με τον φορέα GammaThal	85
3.5.2	Έκφραση εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης σε επίπεδο μεταγράφου	87
	Συζήτηση - Συμπεράσματα	89
	Βιβλιογραφία.....	97

Συντομογραφίες

FACS: Κυτταρομετρία ροής (Fluorescence-Activated Cell Sorting)

FBS: Εμβρυικός βόειος ορός (Fetal Bovine Serum)

FP: Forest Park

HbF: Εμβρυική αιμοσφαιρίνη (Hemoglobin Fetal)

HEK-293T: Νεφρικά εμβρυονικά κύτταρα (Human Embryonic Kidney 293 cells)

HF envelope: Φάκελος ψευδοτυπημένος με αιμαγλουτινίνη και πρωτεΐνη σύντηξης (Hemagglutinin and Fusion protein)

HPFH: Κληρονομική παραμονή εμβρυικής αιμοσφαιρίνης (Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin)

HPLC: Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography)

IL: Ιντερλευκίνη (Interleukin)

LCR: Περιοχή ελέγχου γονιδιακού τόπου (Locus Control Region)

MOI: Πολλαπλότητα μόλυνσης (Multiplicity Of Infection)

Pen-strep: Πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (penicillin-streptomycin)

qPCR: Απόλυτη ποσοτικοποίηση με αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Quantitative Polymerase Chain Reaction)

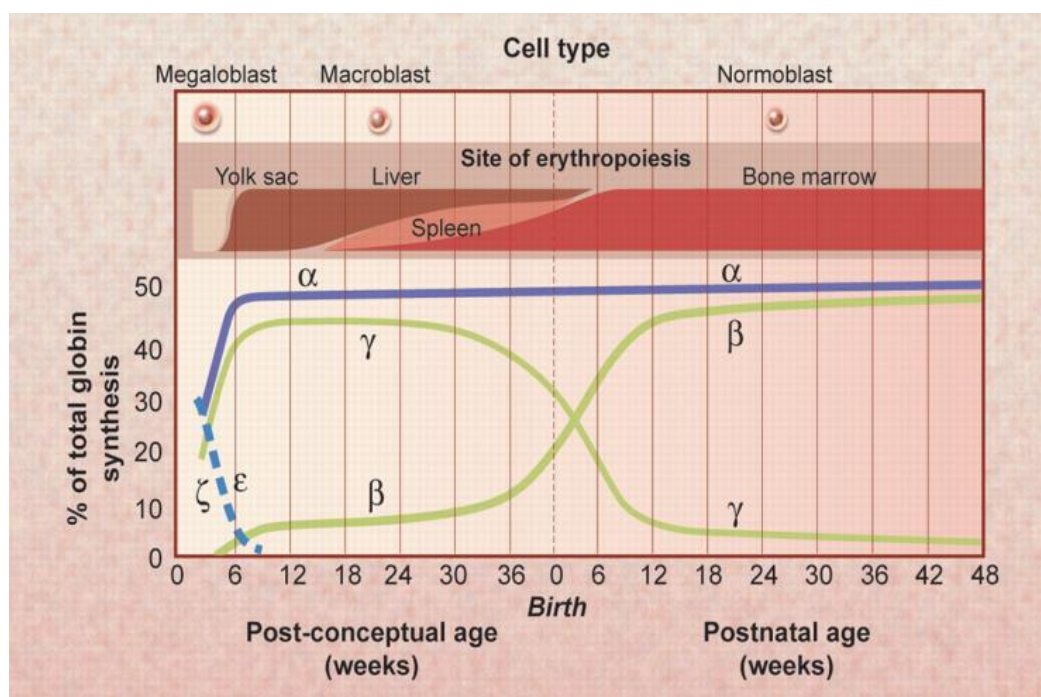
VCN: Αριθμός ιικών αντιγράφων ή αριθμός αντιγράφων φορέα (Vector Copy Number)

Εισαγωγή

1.1 Αιμοσφαιρίνες: Δομή και λειτουργία

Οι αιμοσφαιρίνες είναι τετραμερή πρωτεϊνικά μόρια [1] που βρίσκονται στα ερυθροκύτταρα και η κύρια λειτουργία τους είναι η μεταφορά του οξυγόνου στους διάφορους ιστούς και όργανα. Αποτελούνται από τέσσερα μόρια αίμης, όπου το καθένα είναι συνδεδεμένο με ένα μόριο σιδήρου.

Οι αλυσίδες που συνθέτουν τις αιμοσφαιρίνες είναι πέντε (α,β,γ,δ,ε και ζ) με την έκφραση και συγκέντρωσή τους να διαφοροποιείται κατά την ανάπτυξη όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.



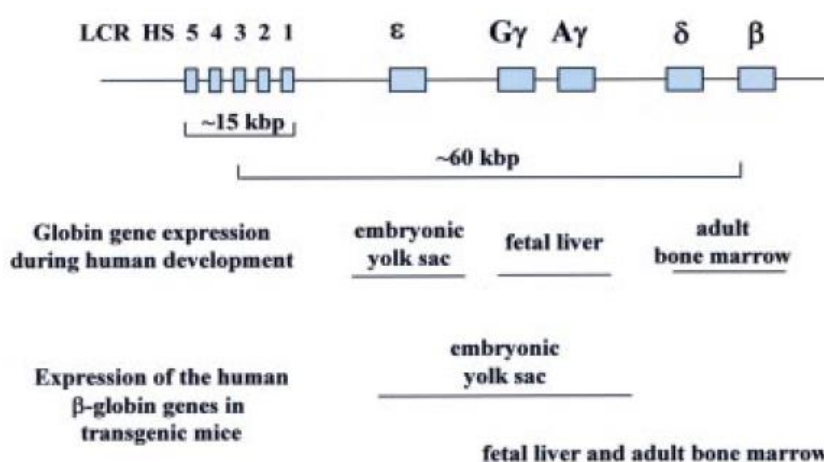
Εικόνα 1: Έκφραση των διαφορετικών αλυσίδων των αιμοσφαιρινών κατά την ανάπτυξη [1]

Η αιμοσφαιρίνη είναι μια πρωτεΐνη που έχει ως πρωτεύοντα ρόλο τη μεταφορά οξυγόνου στους διάφορους ιστούς και όργανα του σώματος [2]. Το οξυγόνο συνδέεται με υψηλή συγγένεια στο δισθενή σίδηρο της αίμης του μορίου της αιμοσφαιρίνης. Αν ο σίδηρος είναι τρισθενής, τότε το οξυγόνο δεν μπορεί να συνδεθεί, το μόριο της αιμοσφαιρίνης που πλέον ονομάζεται οξειδωμένη metHb είναι ασταθές και αποδομείται [2]. Σαν κομβικό μόριο στον κύκλο οξυγόνωσης και ανταλλαγής αερίων, συνδέεται και με το διοξείδιο του άνθρακα με μεγάλη συγγένεια στη φλεβική κυκλοφορία. Επιπρόσθετα, ο σίδηρος της αίμης, μπορεί να συνδεθεί με το μονοξείδιο του άνθρακα και μάλιστα με υψηλότερη συγγένεια από ότι με το οξυγόνο και σε αυτή την περίπτωση έχουμε δηλητηρίαση αέριου άνθρακα.

Πέρα από το ρόλο της αιμοσφαιρίνης ως αναπνευστική πρωτεΐνη έχει και άλλες λειτουργίες[3]. Για παράδειγμα, συμμετέχει στη ρύθμιση του ερυθροκυτταρικού μεταβολισμού και η οξειδωσή της επηρεάζει τη γήρανση των ερυθροκυττάρων. Ακόμα συνδέεται με τη γενετική αντοχή στην ελονοσία, αποτελεί πηγή ενεργών καταβολιτών και οι ενζυματικές της ιδιότητες ενέχουν φαρμακολογικού ενδιαφέροντος [3].

1.2 Γονιδιακός τόπος β-σφαιρινών

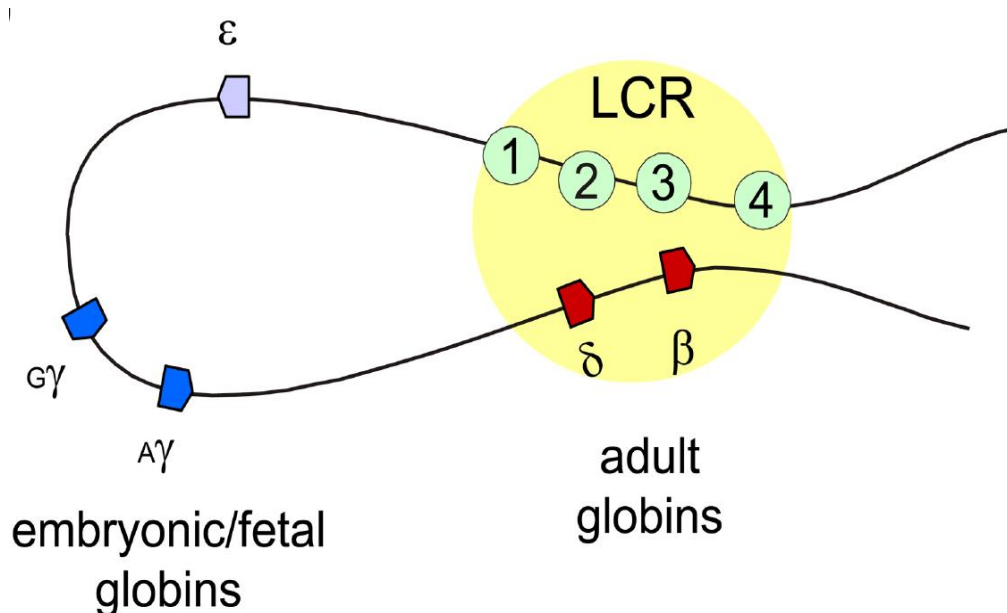
Ο γονιδιακός τόπος των β-σφαιρινών (Εικόνα 2) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11 και αποτελείται από 5 γονίδια τα οποία εκφράζονται ιστοειδικά σε καθορισμένα αναπτυξιακά στάδια στα ερυθροκύτταρα.



Εικόνα 2: Γονιδιακός τόπος β-σφαιρινών v [4]

Στο εμβρυονικό στάδιο ανάπτυξης [1] (τρεις πρώτοι μήνες κύησης) κυριαρχούν οι αιμοσφαιρίνες Gower 1, Gower 2 και Portland που προέρχονται από τους συνδυασμούς αλυσίδων, ζεε₂, α₂ε₂ και ζεγ₂ αντίστοιχα. Κατά το εμβρυικό στάδιο (τρεις έως έξι μήνες κύησης), κυριαρχή η εμβρυική αιμοσφαιρίνη HbF (α₂γ₂). Κατά το ενήλικο στάδιο [1], η HbF αποτελεί το 1% των πρωτεϊνικών μορίων στα ερυθροκύτταρα, ακολουθεί η HbA₂ (α₂δ₂) σε ποσοστό 2% και τέλος η κύρια ενήλικη αιμοσφαιρίνη του ανθρώπου είναι η HbA (α₂β₂) η οποία απαντάται σε ποσοστό 97%. Στους ενήλικες [1] υπάρχει περίπτωση λόγω μεταλλαγών στο γονιδιακό τόπο της α- ή της β-σφαιρίνης, καθώς και στον υποκινητή της γ-σφαιρίνης, να οδηγηθούμε σε κληρονομική παραμονή της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης (HPFH). Σ αυτή την περίπτωση τα επίπεδα έκφρασης της HbF είναι αυξημένα σε ποσοστό 10-40%.

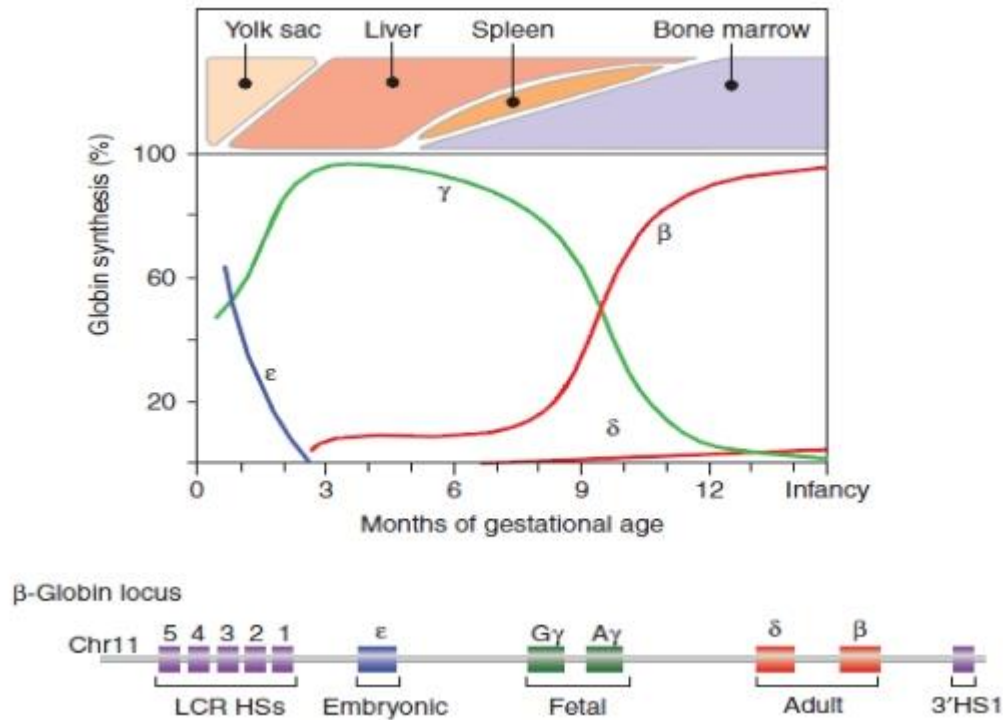
Το σημαντικότερο ρυθμιστικό στοιχείο που ελέγχει την έκφραση των γονιδίων είναι η περιοχή ελέγχου του γενετικού τόπου (Locus Control Region, LCR), η οποία εντοπίζεται 6-22 kb ανοδικά του ϵ γονιδίου. Ο LCR αποτελείται από 5 γονίδια με θέσεις υπερευαισθησίας στην DNase I. Η ιστοειδική και χρονικά καθορισμένη έκφραση των γονιδίων εξαρτάται από την ευαισθησία του LCR στην DNase I. Στα ερυθροκύτταρα, όπου εκφράζονται τα γονίδια των σφαιρινών, το χρωματινικό περιβάλλον γύρω από τον LCR είναι ευαίσθητο στην δράση της DNase I, σε αντίθεση με τα κύτταρα που δεν εκφράζουν σφαιρίνες, στα οποία ο LCR δεν είναι ευαίσθητος στην δράση της DNase I [4]. Η έκφραση των σφαιρινών εξαρτάται από την διαμόρφωση του χρωματινικού περιβάλλοντος και την προσέκλυση μεταγραφικών παραγόντων. Σύμφωνα με τους Levings και Bungert 2002 [4], και το μοντέλο γονιδιακής ρύθμισης στον β -γονιδιακό τόπο που προτείνουν, αρχικά δημιουργείται ένα ολοσύνθετο του LCR με τα στοιχεία HS core, το οποίο είναι προσβάσιμο στην χρωματίνη. Στην συνέχεια, επιστρατεύονται παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (π.χ. HATs) και μεταγραφικοί παράγοντες (οικογένεια NF-E2, GATA, EKLF) και αφού εδραιωθεί το ευχρωματινικό περιβάλλον, το μεταγραφικό σύμπλοκο μεταφέρεται στο εκάστοτε γονίδιο, είτε με άμεση επικοινωνία του LCR με τον υποκινητή του εκάστοτε γονιδίου, είτε με LCR-ανεξάρτητο τρόπο (μεταφορά του μεταγραφικού συμπλόκου, χωρίς επαφή LCR-υποκινητή) [4]. Η επικοινωνία του LCR με τα γονίδια των σφαιρινών γίνεται με την δημιουργία βρόχων [5] που τους φέρνει σε γειτνίαση όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.



Εικόνα 3: Επικοινωνία LCR και γονιδίων των σφαιρινών μέσω δημιουργίας βρόχων [5]

1.3 Μεταστροφή αιμοσφαιρινών

Κατά την διάρκεια της ζωής του ανθρώπου πραγματοποιούνται δύο μεταστροφές αιμοσφαιρινών[6]. Η πρώτη συμβαίνει στο έμβρυο, όπου μειώνεται η παραγωγή των ζ και ε αλυσίδων και αυξάνεται η παραγωγή των α και γ, με αποτέλεσμα να συντίθεται η εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη HbF ($\alpha_2\gamma_2$). Αυτή η μεταστροφή συμπίπτει με την αλλαγή του σημείου αιμοποίησης από το λεκιθικό σάκο στο ήπαρ. Σε αυτήν την εμβρυϊκή φάση, η HbF αποτελεί το 90-95% των συνολικών αιμοσφαιρινών και παραμένει έτσι για 34-36 εβδομάδες. Η δεύτερη μεταστροφή πραγματοποιείται κατά τη γέννηση όπου αποσιωπείται η έκφραση του γονιδίου της γ-σφαιρίνης και αυξάνεται αυτή του β γονιδίου, με αποτέλεσμα να μειώνεται η σύνθεση της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης και να αυξάνεται αυτή της ενήλικης HbA ($\alpha_2\beta_2$). Συγκεκριμένα, η έκφραση της HbF παραμένει σε σταθερά επίπεδα τις πρώτες δύο εβδομάδες μετά της γέννηση και αρχίζει να μειώνεται 3% ανά εβδομάδα. Στο πρώτο τρίμηνο μετά τη γέννηση κυρίαρχη αιμοσφαιρίνη είναι η ενήλικη αιμοσφαιρίνη HbA. Στους πρώτους έξι μήνες, η εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη βρίσκεται σε ποσοστό περίπου 2% και σταδιακά μειώνεται ώστε να φτάσει περίπου στο 1%. Βέβαια η αποσιώπηση της έκφρασης του γονιδίου της γ-σφαιρίνης μπορεί να ανασταλεί ή να επέλθει επανενεργοποίησης της, όπως συμβαίνει στην περίπτωση HPFH.



Εικόνα 4: Παρουσίαση των εναλλαγών στην παραγωγή αιμοσφαιρινών κατά την κύηση και απεικόνιση των γονιδίων του γονιδιακού τόπου της β-σφαιρίνης που εκφράζονται σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο [6]

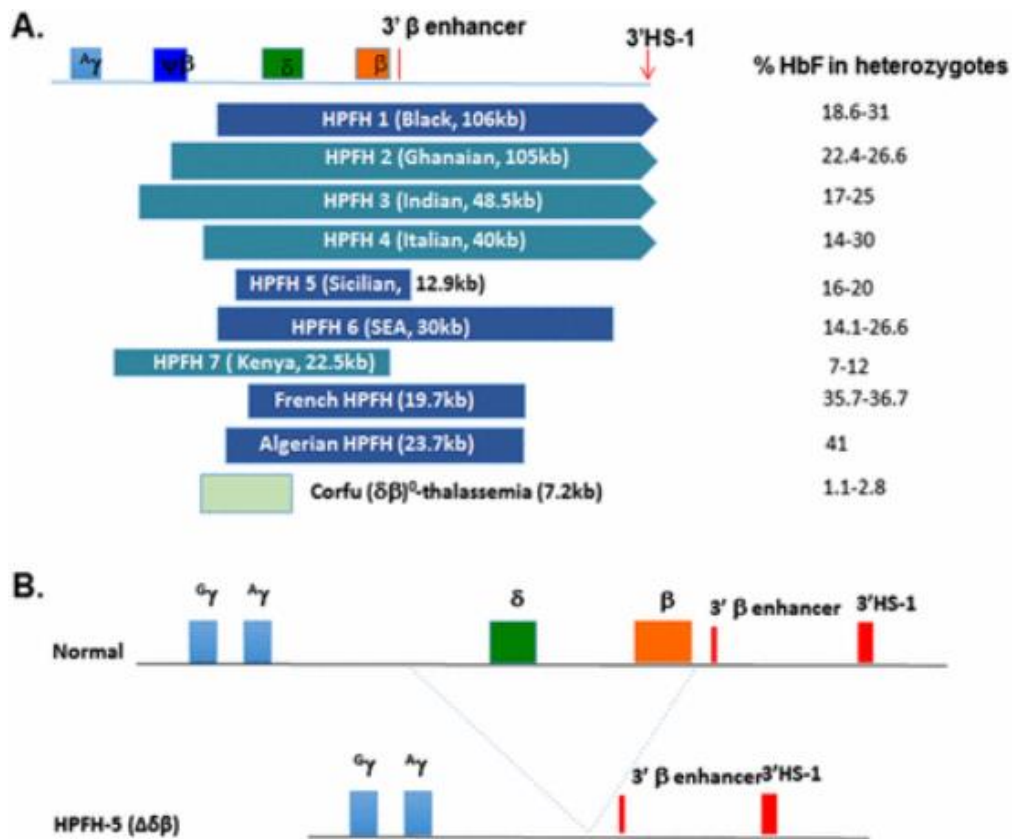
Έχουν γίνει αρκετά πειράματα, κυρίως knock out σε διαγονιδιακά ποντίκια και τεχνικές διαμόρφωσης χρωματίνης, ώστε να προσδιοριστούν τα μοριακά γεγονότα που συνδέονται με τη μεταστροφή από την εμβρυική στην ενήλικη αιμοσφαιρίνη. Παρόλα αυτά, ακόμα χρειάζονται πολλές μελέτες ώστε να διαλευκανθεί η μοριακή βάση και να δημιουργηθούν οι σωστές συσχετίσεις. Έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί μεταστροφής αιμοσφαιρινών, ο ανταγωνισμός γονιδίων (gene competition) και το αυτόνομο γονίδιο (autonomous gene) [7]. Σύμφωνα με τον πρώτο μηχανισμό, η περιοχή LCR του γονιδιακού τόπου της β-σφαιρίνης, δημιουργεί χρωματινικούς βρόγχους και προσεγγίζει τα προς έκφραση γονίδια στο εκάστοτε αναπτυξιακό στάδιο. Κατά το αυτόνομο γονίδιο, η ρύθμιση των επιπέδων των αιμοσφαιρινών ελέγχεται από την πρόσδεση καταστολέων ή ενεργοποιητών κόντα στον υποκινητή του εκάστοτε γονιδίου. Έχουν βρεθεί 3 κύριοι γενετικοί τόποι ως υπεύθυνοι για τις γενετικές παραλλαγές στην έκφραση της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης [7]. Η πρώτη είναι μια θέση πολυμορφισμού στον υποκινητή του γονιδίου της γ-σφαιρίνης στην θέση -158. Η δεύτερη και πιο καλά χαρακτηρισμένη πολυμορφική θέση βρίσκεται στο εσώνιο 2 του γονιδίου BCL11A και η τελευταία βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6, σε μια μη κωδική για πρωτεΐνες περιοχή, ανάμεσα στα γονίδια HBSIL και MYB. Ακόμα αρκετοί παράγοντες, όπως ο BCL11A, SOX6, KLF1, p22NF-E4, COUP-TF, DRED/TR2/TR4 κ.α, έχουν χαρακτηριστεί ως

ρυθμιστές των επιπέδων της HbF[8]. Ο BCL11A είναι ένας C2H2 zinc-finger μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος έχει κατασταλτική δράση στα γ-γονίδια [8]. Προσδένεται στη θέση -115bp και στο HS3 του β γονιδίου, ανάμεσα στο γ και το δ γονίδιο και αλληλεπιδρά με το SOX6, GATA-1, FOG και με το NURD σύμπλοκο χρωταίνης. Στο εμβρυικό στάδιο, όπου η εμβρυική αιμοσφαιρίνη είναι υψηλή, τα επίπεδα mRNA του BCL11A είναι χαμηλά, ενώ μετέπειτα που μειώνεται η HbF, υπάρχουν πλήρους μήκους ισομορφές του BCL11A. Ο SOX6[7] προσδένεται ισχυρά στον υποκινητή του γ γονιδίου, στη μικρή αυλάκωση του DNA και προκαλεί κάμψη του DNA με αποτέλεσμα να υπάρχουν διαμορφωτικές αλλαγές. Ο GATA-1 ένας από τους σημαντικότερους μεταγραφικούς παράγοντες κατά την αιμοποίηση συμβάλλει στη δημιουργία χρωματινικών βρόχων μέσω της προσέλευσης του κατασταλτικού χρωματινικού συμπλέγματος NURD [6]. Η περιοχή ανάμεσα στα γονίδια HBSIL και MYB περιέχει 3 θέσεις υπερευαισθησίας με ενεργή χρωματίνη και εκεί προσδένεται η RNA pol II στα ερυθροκύτταρα. Μειωμένη έκφραση και των 2 γονιδίων οδηγεί σε αυξημένη έκφραση της HbF, με καθοριστικότερο από το 2 γονίδια να είναι το MYB. Οι περισσότεροι παράγοντες που έχουν χαρακτηριστεί ως ρυθμιστές της μεταστροφής αιμοσφαιρινών έχουν κατασταλτική επίδραση στα γονίδια των γ σφαιρινών, όμως έχει βρεθεί ο μεταγραφικός παράγοντας NF-E4 ο οποίος θεωρείται ενεργοποιητής[8]. Αυτός, μαζί με τον μεταγραφικό παράγοντα CP2, αποτελούν τμήμα του εμβρυικού μεταγραφικού συμπλέγματος SSP. Σε *in vitro* πειράματα, έχει δειχθεί ότι αυξάνει την HbF, όμως σε διαγονιδιακά ποντίκια, καθυστερεί την μεταστροφή της εμβρυικής σε ενήλικη αιμοσφαιρίνη, χωρίς να αυξάνει τα επίπεδα της πρώτης.

1.4 Κληρονομική παραμονή της ανθρώπινης εμβρυικής αιμοσφαιρίνης (HPFH)

Η κατάσταση κατά την οποία παρατηρείται παραμονή της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης στα ερυθρά αιμοσφαίρια στην ενήλικη ζωή ονομάζεται κληρονομική παραμονή της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης [9]. Συνήθως η αύξηση της HbF εντοπίζεται σε όλα τα ερυθροκύτταρα (πανκυτταρική), όμως υπάρχουν και περιπτώσεις που είναι ετεροκυτταρική [9]. Οφείλεται είτε σε ελλείψεις διαφόρων μεγεθών, τμημάτων DNA κατά μήκος του συμπλέγματος γονιδίων β σφαιρίνης, είτε σε σημειακές μεταλλαγές στους υποκινητές του γ γονιδίου [10]. Το σύνδρομο HPFH βελτιώνει την κλινική εικόνα ατόμων με β-θαλασσαιμία ή δρεπανοκυτταρική αναιμία καθώς η περίσσεια των α-αλυσίδων δεσμεύεται από τις γ-αλυσίδες που παράγονται με αποτέλεσμα να μην καθιζάνουν και να οδηγούν στον

θαλασσαιμικό φαινότυπο. Τα ομόζυγα άτομα για ΗΡFΗ είναι υγιή. Μέχρι στιγμής έχουν εντοπιστεί 8 τύποι ΗΡFΗ που οφείλονται σε διαγραφές τμημάτων DNA [10]. Σε όλους τους τύπους υπάρχουν ελλείψεις στην περιοχή ανάμεσα στο γ και στο δ γονίδιο στο γονιδιακό τόπο της β-σφαιρίνης στο χρωμόσωμα 11. Σε τμήμα αυτής της διαγονιδιακής περιοχής συνδέεται ο μεταγραφικός παράγοντας BCL11A ο οποίος δρά κατασταλτικά στην έκφραση της γ σφαιρίνης [11]. Έτσι, ελλείψεις σε αυτή την περιοχή δεν του επιτρέπουν να συνδεθεί με αποτέλεσμα να μην αναστέλλεται η έκφραση της γ σφαιρίνης. Η μικρότερη έλλειψη παρατηρείται στην περίπτωση της δβ θαλασσαιμίας (Corfu), η οποία είναι 7.2 kb και εντοπίζεται ανοδικά του δ γονιδίου [12]. Ο τύπος ΗΡFΗ-5 χαρακτηρίζεται από μια έλλειψη 12.9 kb, η οποία ξεκινάει 3.2 kb ανοδικά του δ γονιδίου και φτάνει μέχρι το 3' άκρο του β γονιδίου. Το αποτέλεσμα αυτής της έλλειψης είναι ο ενισχυτής του β γονιδίου να πλησιάζει το γ γονίδιο [10]. Ο τύπος ΗΡFΗ-7 χαρακτηρίζεται από μια έλλειψη 22.5 kb ανάμεσα στο ΗΒG1 γονίδιο και στο β γονίδιο, και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μιας δομικά ανώμαλης αιμοσφαιρίνης, της Hb Kenya, η οποία προκύπτει από τη μη ομόλογη διασταύρωση των αντίστοιχων γονιδίων [10]. Η έλλειψη που δημιουργείται στον τύπο ΗΡFΗ-6 οδηγεί στην υπερέκφραση μόνο του ΗΒG2 γονιδίου, σε αντίθεση με τους άλλους τύπους κληρονομικής παραμονής της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης που οφείλονται σε έλλειψη, οι οποίοι οδηγούν στην υπερέκφραση και των δύο γ γονιδίων [10]. Οι τύποι ΗΡFΗ-3 και ΗΡFΗ-4 έχουν παραπλήσιο μέγεθος και το 3' άκρο τους εντοπίζεται σε περιοχή επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών οι οποίες έχουν ιδιότητες ενισχυτή. Τέλος, οι μεγαλύτερες ελλείψεις συναντώνται στον τύπο ΗΡFΗ-1 και ΗΡFΗ-2 και είναι παρόμοιου μεγέθους, 106 και 105 kb αντιστοίχως. Η χρήση τμήματος DNA παρόμοιου με το ΗΡFΗ-2, το οποίο περιείχε και το DNA στο 3' άκρο του ΗΡFΗ-1 σε διαγονιδιακά ποντίκια, έδειξε σημαντική αύξηση της HbF, μιας και αυτές οι περιοχές είναι υπομεθυλιωμένες, κωδικοποιούν την οικογένεια των οσφρητικών υποδοχέων, έχουν ιδιότητες ενισχυτή και περιέχουν θέση υπερευαισθησίας στην Dnase I.



Εικόνα 5: Τύποι HPFH [12]

Σε αντίθεση με τους τύπους των ελλείψεων όπου υπερεκφράζονται και τα δύο γ γονίδια (εκτός του HPFH-6), στην περίπτωση που το σύνδρομο οφείλεται σε σημειακές μεταλλαγές στους υποκινητές του γ γονιδίου, συνήθως υπερεκφράζεται μόνο το ένα από τα δύο γ γονίδια [10].

TABLE 1. Nondeletion Forms of Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin (HPFH)

Type and Racial Group	Mutation in Globin Gene	Percentage of Hb F in Heterozygotes
Pancellular $\epsilon\gamma$ HPFH		
Black	$\epsilon\gamma$: -202 (C→G)	15–25
Black	$\epsilon\gamma$: -175 (T→C)	20–30
Sardinian	$\epsilon\gamma$: -175 (T→C)	17–21
Japanese	$\epsilon\gamma$: -114 (C→T)	11–14
Pancellular $\Lambda\gamma$ HPFH		
Southern Italian	$\Lambda\gamma$: -196 (C→T)	12–16
Chinese	$\Lambda\gamma$: -196 (C→T)	14–21
Black	$\Lambda\gamma$: -175 (T→C)	36–41*
Greek	$\Lambda\gamma$: -117 (G→A)	10–20
Sardinian	$\Lambda\gamma$: -117 (G→A)	12–16
Black	$\Lambda\gamma$: -117 (G→A)	11–16
Black	$\Lambda\gamma$: -114 to -102 deleted	30–32
Pancellular $\epsilon\gamma\Lambda\gamma$ HPFH		
Chinese	Unknown	20–25
Heterocellular $\epsilon\gamma$ HPFH		
Black (Atlanta)	$\epsilon\gamma\epsilon\gamma$: -158 (C→T)	2.3–3.8
Japanese	$\epsilon\gamma$: -114 (C→T)	11–14
Heterocellular $\Lambda\gamma$ HPFH		
Black	$\Lambda\gamma$: -202 (C→T)	1.6–3.9
British	$\Lambda\gamma$: -198 (T→C)	3.5–10
Brazilian	$\Lambda\gamma$: -195 (C→G)	4.5–7
Black (Georgia)	$\Lambda\gamma$: -114 (C→T)	2.6–6
Heterocellular $\epsilon\gamma\Lambda\gamma$ HPFH		
Swiss	Unknown	1–4
Black (Seattle)	Normal γ -gene promoters	3–8

Εικόνα 6: Τύποι HPFH χωρίς ελλείψεις [10]

Οι σημειακές μεταλλάξεις είναι πολλές, όμως έχουν ομαδοποιηθεί σε 3 διακριτές περιοχές και οδηγούν σε HPFH μέσω αλλαγών στο πρότυπο δέσμευσης διαφόρων ρυθμιστικών παραγόντων και κατά συνέπεια επαενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου της γ σφαιρίνης [10]. Κάποιες εντοπίζονται 200bp καθοδικά από την περιοχή έναρξης της μεταγραφής των γ γονιδίων, μια περιοχή πλούσια σε αλληλουχίες GC. Η δεύτερη περιοχή με σημειακές μεταλλάξεις είναι η θέση -175, όπου εκεί εντοπίζεται μια οκτανουκλεοτιδική αλληλουχία η οποία επηρεάζει την πρόσδεση του GATA-1 και του OCT-1, με αποτέλεσμα τα επίπεδα της HbF να αυξάνουν σε ποσοστό 15-25%. Τέλος, η επόμενη περιοχή που είναι πλούσια σε σημειακές μεταλλάξεις που οδηγούν σε HPFH είναι το κουτί CCAAT, μια ρυθμιστική αλληλουχία που βρίσκεται κόντα στον υποκινητή του HBG1 γονιδίου. Στην συγκεκριμένη περιοχή δρουν πολλοί trans-δρόσοι παράγοντες όπως ο NF-E3, ο CDP και η πρωτεΐνη CP1 [13].

1.5 Αιμοσφαιρίνοπάθειες

Ως αιμοσφαιρίνοπάθειες ορίζονται οι ασθένειες που προκύπτουν από διαταραχές των αιμοσφαιρινών. Πρόκειται για κληρονομικές μονογονιδιακές διαταραχές με παγκόσμια συχνότητα εμφάνισης πάνω από 5% [14]. Στις αιμοσφαιρίνοπάθειες συγκαταλέγεται η δρεπανοκυτταρική αναιμία, καθώς και οι διαφορετικοί τύποι τόσο της α όσο και της β -

θαλασσαιμίας. Στην περίπτωση της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας, η διαταραχή στις αιμοσφαιρίνες είναι ποιοτική, ενώ στην περίπτωση των θαλασσαιμιών είναι ποσοτική. Στις θαλασσαιμίες, καθοριστικός παράγοντας της κλινικής βαρύτητας είναι η ισορροπημένη αναλογία των α/β αλυσίδων των αιμοσφαιρινών. Υπό φυσιολογικές συνθήκες ο λόγος είναι περίπου 1. Στην α -θαλασσαιμία ο λόγος είναι μειωμένος σε σχέση με τους υγιείς, ενώ στην β -θαλασσαιμία είναι αυξημένος [15]. Κάθε χρόνο υπάρχουν πάνω από 25.000 γεννήσεις μεταγγισιοεξαρτώμενων θαλασσαιμικών ασθενών, ενώ οι ασθενείς που επηρεάζονται από δρεπανοκυτταρική αναιμία, σε παγκόσμιο επίπεδο είναι περίπου 300 εκατομμύρια [14]. Η δρεπανοκυτταρική αναιμία κατανέμεται σε ορισμένες περιοχές της Μεσογείου, την Μέση Ανατολή, στην νότια Αφρική και την Ινδία, ενώ η κατανομή των θαλασσαιμιών φαίνεται στην Εικόνα 7 [16].

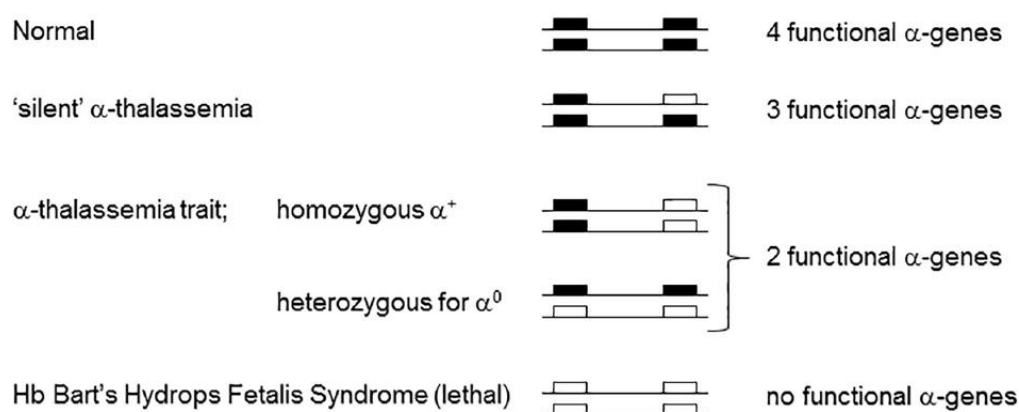


Εικόνα 7: Γεωγραφική κατανομή των θαλασσαιμιών[16, 17]

Ο υψηλός επιπολασμός των συγκεκριμένων νόσων οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι οι φορείς έχουν επιλεκτικό πλεονέκτημα έναντι του *Plasmodium falciparum*. Έτσι κατανέμεται σε χώρες που εμφανίζουν υψηλή ενδημικότητα έναντι της ελονοσίας [18]. Τέλος, μια άλλη αιτία είναι ότι στις αρκετές από τις χώρες που εντοπίζονται οι αιμοσφαιρινοπάθειες, τα ποσοστά των αιμομικτικών γάμων είναι αυξημένα [16].

1.6 α-θαλασσαιμία

Η α-θαλασσαιμία αποτελεί μία από τις κύριες αιμοσφαιρινοπάθειες. Η α-θαλασσαιμία χαρακτηρίζεται από μειωμένη ή καθόλου παραγωγή α αλυσίδων με αποτέλεσμα να κατακρημνίζεται η περίσσεια των β αλυσίδων στους ερυθροβλάστες και να εμφανίζεται ατελής ερυθροποίηση και αιμόλυση [19]. Συναντάται σε χώρες της Μεσογείου, στην Αφρική, στη Μέση Ανατολή και την κεντρική Ασία [18]. Ο φαινότυπος και η κλινική εικόνα των ασθενών με α-θαλασσαιμία ποικίλει ανάλογα με την ποσότητα παραγωγής των α-αλυσίδων. Οι τύποι της α-θαλασσαιμίας παρουσιάζονται στην Εικόνα 8.



Εικόνα 8: Τύποι α-θαλασσαιμίας [19]

Στην περίπτωση φυσιολογικού λειτουργικού γονιδίου, τότε ο τύπος της α-θαλασσαιμίας είναι HbH και οι ασθενείς εμφανίζουν από ενδιάμεση έως σοβαρή θαλασσαιμία με εκδήλωση δυσερυθροποίησης, αιμολυτικής αναιμίας και σπληνομεγαλίας [20]. Οι ποσοτικές αλλαγές που παρατηρούνται οφείλονται σε απαλοιφές μεγάλων τμημάτων είτε στο γονίδιο της α-σφαιρίνης είτε στα ρυθμιστικά του στοιχεία [18]. Η θεραπεία της α-θαλασσαιμίας περιλαμβάνει μεταγγίσεις αίματος, αλλογενή μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων και γονιδιακή θεραπεία [19].

1.7 β-θαλασσαιμία

Ως β-θαλασσαιμία ή αλλοιώς αναιμία Cooley [21] ορίζεται το κληρονομικό σύνδρομο κατά το οποίο η ποσοτική μείωση των β-αλυσίδων οδηγεί σε εμφάνιση αναιμίας. Το κληρονομικό πρότυπο στις περισσότερες περιπτώσεις είναι αυτοσωμικό υπολειπόμενο, αν και σε κάποιες περιπτώσεις κληρονομείται με επικρατή τρόπο [22]. Η παθογένεια της νόσου οφείλεται σε περίπου 300 μεταλλάξεις στον γονιδιακό τόπο των β-σφαιρινών [23]. Το αποτέλεσμα είναι

είτε η μειωμένη/καθόλου παραγωγή β-αλυσίδων είτε η παραγωγή μη σταθερών αιμοσφαιρινών, οι οποίες οδηγούν σε κατακρήμνιση των α-αλυσίδων που βρίσκονται σε περίσσεια στους ερυθροβλάστες, οδηγώντας τελικά σε ατελή ερυθροποίηση και αιμόλυση. Η γεωγραφική κατανομή της νόσου εστιάζεται στις Μεσογειακές χώρες, την Μέση Ανατολή, κάποιες περιοχές της Αφρικής, την Ινδία και την Βορειοδυτική Ασία [24].

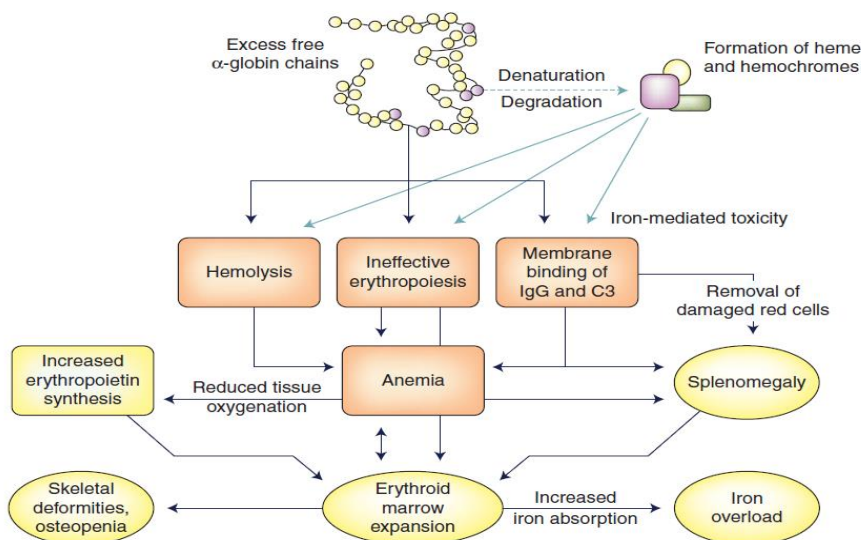
Η κλινική εκδήλωση της θαλασσαιμίας ποικίλει ανάλογα με το βαθμό παραγωγής των αλυσσων και αναλόγως διαμορφώνεται και η βαρύτητα της ασθένειας. Ανάλογα με την ποσότητα παραγωγής των β αλυσίδων (β^{++} , β^+ , β^0), η β-θαλασσαιμία κατηγοριοποιείται στην ελάσσονα, την ενδιάμεση και τη μείζονα [25]. Στην ελάσσονα θαλασσαιμία, οι φορείς είναι συνήθως ασυμπτωματικοί, αν και κάποιες φορές μπορεί να εκδηλώσουν ελαφρά αναιμία. Η ενδιάμεση θαλασσαιμία εμφανίζεται σε ηλικίες από 2-6 χρονών και οι ασθενείς συνήθως δεν χρειάζονται μεταγγίσεις αίματος. Οι ασθενείς εμφανίζουν εξωμυελική ερυθροποίηση η οποία συνδέεται με πλήθος κλινικών προβλημάτων [25]. Οι ασθενείς με μείζονα θαλασσαιμία εκδηλώνουν συμπτώματα από 6-24 μηνών και είναι μεταγγισιοεξαρτώμενοι. Οι ασθενείς αυτοί είναι χλωμοί και εμφανίζουν σοβαρή αναιμία λόγω δυσερυθροποίησης, και αιμόλυσης, διόγκωση οργάνων, και εμφανίζουν σκελετικά προβλήματα [25].

Η μοριακή βάση της β-θαλασσαιμίας σχετίζεται με μεταλλαγές στον β-γονιδιακό τόπο. Μέχρι σήμερα, έχουν χαρακτηριστεί περίπου 300 μεταλλάξεις σχετιζόμενες με την παθολογία της νόσου, οι οποίες μπορούν να ομαδοποιηθούν σε αυτές που οδηγούν σε απαλοιφή μεγάλων γονιδιακών τμημάτων (deletion forms) και σε αυτές που σχετίζονται με σημειακές μεταλλαγές και προσθήκη/απαλοιφή λίγων βάσεων (nondeletion forms) [23]. Απαλοιφές μεγάλων γονιδιακών τμημάτων στην β-θαλασσαιμία είναι σπάνιες και περιορίζονται στο β-γονίδιο και σε αυτές που επηρεάζουν το βLCR. Οι ελλείψεις στο β-γονίδιο κυμαίνονται από 105 bp έως 67 kb και σχετίζονται με β^0 θαλασσαιμία. Όταν απουσιάζουν και το β-γονίδιο και ο βLCR, οι ομοζυγώτες δεν γεννιούνται. Όταν υπάρχουν ελλείψεις μόνο στο βLCR η κλινική εκδήλωση της νόσου ποικίλλει [23].

Η δεύτερη κατηγορία μεταλλαγών σχετίζεται με τη μεταγραφή, την επεξεργασία του RNA και την μετάφραση [26]. Οι μεταγραφικές μεταλλάξεις εμφανίζονται 100 bp ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής και στην 5' αμετάφραστη περιοχή του β-γονιδίου. Αυτές οι μεταλλαγές είναι είτε σιωπηλές είτε οδηγούν σε β^+ ή β^{++} αλληλόμορφα. Όσον αφορά στις μεταλλάξεις που σχετίζονται με το RNA, όσες επηρεάζουν την εναλλακτική συρραφή, οδηγούν σε β^0 αλληλόμορφα, ενώ όσες δεν επηρεάζουν την διαδικασία της συρραφής οδηγούν σε φαινοτύπους ενδιάμεσης ή μείζονος β-θαλασσαιμίας. Τέλος, οι μεταλλάξεις που

αφορούν στην μετάφραση είναι υπεύθυνες για το 50% των αλληλομόρφων της β-θαλασσαιμίας καθώς είτε λόγω μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης είτε λόγω πρόωρης λήξης της μετάφρασης ή λόγω αλλαγών στα αμινοξέα, οδηγούν στην παραγωγή μη λειτουργικών β-αλυσίδων [26].

Όσον αφορά στα κλινικά συμπτώματα της νόσου, αυτά απεικονίζονται παρακάτω στην Εικόνα 9.



Εικόνα 9: Κλινικές εκδηλώσεις της β-θαλασσαιμίας [27]

1.8 Θεραπευτικές προσεγγίσεις για την β-θαλασσαιμία

Η θεραπεία της θαλασσαιμίας εντοπίζεται σε δύο κύριους άξονες, τις συστηματικές μεταγγίσεις αίματος με παράλληλη αποσιδήρωση και στην αλλογενή μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων από τον μυελό των οστών [28]. Επιπλέον για την θεραπεία της β-θαλασσαιμίας γίνεται χρήση υδροξουρίας. Σε ορισμένες περιπτώσεις πραγματοποιείται σπληνεκτομή και φυσικά, μια άλλη θεραπευτική προσέγγιση είναι αυτή της γονιδιακής θεραπείας.

Με τις συχνές μεταγγίσεις (περίπου ανά δύο βδομάδες) αντιμετωπίζεται το πρόβλημα των χαμηλών ερυθρών και της χαμηλής αιμοσφαιρίνης. Το μειονεκτήματα που προκύπτουν από αυτό το είδος υποστηρικτικής θεραπείας σχετίζονται με τον τρόπο ζωής και την ψυχολογία των μεταγγιζοεξαρτώμενων ασθενών, καθώς και με τα προβλήματα που προκύπτουν από τις πιθανές λοιμώξεις και ανοσοαποκρίσεις. Βέβαια, το σημαντικότερο πρόβλημα που

προκύπτει έπειτα από μεταγγίσεις ερυθροκυττάρων είναι η συσσώρευση σιδήρου [27]. Τα μονοπάτια που συνδέονται με τον μεταβολισμό του σιδήρου και η δράση των υποδοχέων του όπως η τρανσφερρίνη λειτουργούν φυσιολογικά στον θαλασσαιμικό ασθενή, όμως λόγω της μεγάλης ποσότητας ερυθρών που λαμβάνουν, τα συστήματα αυτά υφίστανται κορεσμό με αποτέλεσμα να μένει στον οργανισμό ελεύθερη ποσότητα σιδήρου. Η ποσότητα του σιδήρου που δρά σε μονοπάτια ανεξάρτητα της τρανσφερρίνης, οδηγεί στην παραγωγή ROS τα οποία είναι κυτταροτοξικά και τελικά προκαλείται βλάβη σε όργανα όπως η καρδιά, ο θυροειδής και το ήπαρ [27]. Για αυτό το λόγο η αποσιδήρωση κρίνεται απολύτως απαραίτητη κατά τις μεταγγίσεις και επιτυγχάνεται με τη λήψη φαρμάκων που τον δεσμεύουν, όπως είναι η δεφεροξαμίνη και η δεφεριπρόνη [27]. Η σπληνομεγαλία που είναι αποτέλεσμα της κυκλοφορίας παθολογικών ερυθρών αιμοσφαιρίων μπορεί να αποτελέσει σοβαρό κίνδυνο για τον ασθενή μιας και ο διογκωμένος σπλήνας συμπιέζει τα γύρω όργανα, προκαλώντας θετική ανατροφοδότηση στην αναιμία και οδηγεί σε διάφορους τύπους κυτταροπενίας όπως λευκοπενία και θρομβοπενία. Συνήθως κρίνεται απαραίτητη η σπληνεκτομή.

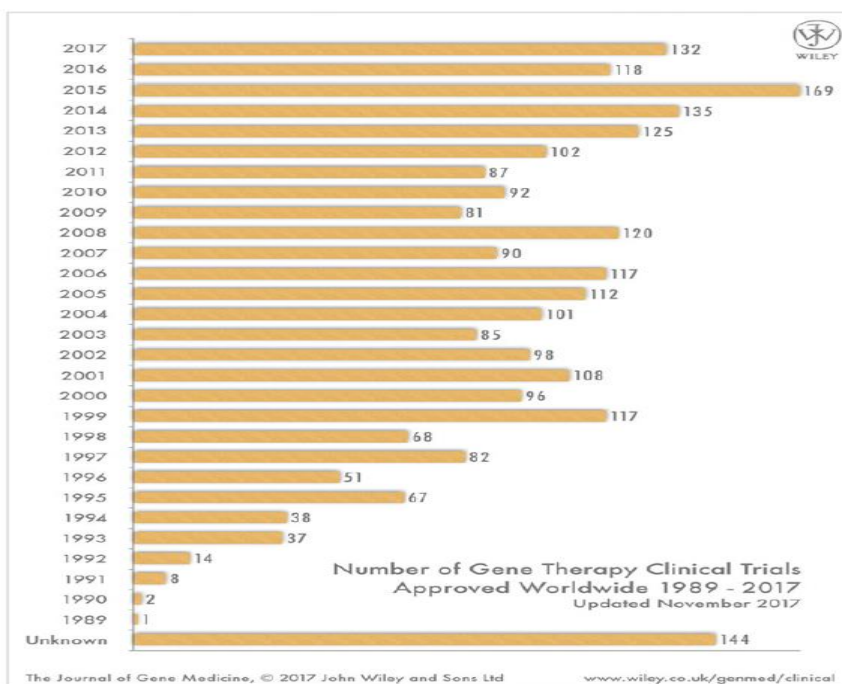
Η μεταμόσχευση αρχέγονων βλαστικών αιμοποιητικών κυττάρων από τον μυελό των οστών αποτελεί την καλύτερη θεραπευτική προσέγγιση [28]. Η μεταμόσχευση μυελού των οστών μπορεί να είναι αυτόλογη (τα κύτταρα προέρχονται από τον ίδιο τον ασθενή) ή αλλογενής (τα κύτταρα προέρχονται από ιστοσυμβατό δότη). Στην περίπτωση των θαλασσαιμιών εφαρμόζεται η αλλογενής μεταμόσχευση κατά την οποία συλλέγονται τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα από τον δότη, ελέγχονται και αφού προετοιμαστεί ο δέκτης (με χημειοθεραπεία ή ακτινοβολία), έγχυονται τα κύτταρα στον ασθενή. Παρά το γεγονός ότι μέχρι στιγμής η μεταμόσχευση αρχέγονων βλαστικών αιμοποιητικών κυττάρων αποτελεί την καλύτερη επιλογή θεραπείας, υπάρχουν αρκετά σοβαρά προβλήματα, ειδικά κατά την αλλογενή μεταμόσχευση όπως η εύρεση συμβατών δοτών και η εμφάνιση της νόσου κατά του ξενιστή (GvHD) [29]. Λόγω των περιορισμών των παραπάνω θεραπευτικών προσεγγίσεων, ως βέλτιστη και ριζικότερη θεραπεία θεωρείται αυτή της γονιδιακής θεραπείας.

Η γονιδιακή θεραπεία για την β-θαλασσαιμία πραγματοποιείται με τη χρήση φορέων οι οποίοι εισάγουν στο γονιδίωμα του ασθενή το θεραπευτικό φυσιολογικό γονίδιο είτε της β-σφαιρίνης, είτε της γ-σφαιρίνης με σκοπό να αυξηθούν τα επίπεδα της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης. Το βασικό πλεονέκτημα αυτής της προσέγγισης σε σχέση με τις άλλες θεραπείες είναι ότι με την χρήση κατάλληλου συστήματος μεταφοράς του διαγονιδίου η έκφραση του θεραπευτικού διαγονιδίου μπορεί να είναι εφ' όρου ζωής. Επιπλέον, δεδομένου ότι η αυξημένη εμφάνιση των γ-σφαιρινών σε άτομα που πάσχουν από β-

θαλασσαιμία ή δρεπανοκυτταρική αναιμία, βελτιώνει την κλινική του κατάσταση, έχει κριθεί απαραίτητη η επαγωγή της HbF [30]. Αυτό επιτυγχάνεται είτε μέσω θεραπευτικής παρεμπόδισης της μεταστροφής της με φαρμακολογική στόχευση των καταστολέων των γ-γονιδίων είτε με επαγωγή της HbF μέσω γονιδιωματικής επεξεργασίας των τροποποιητών της έκφρασης της όπως του BCL11A και του KLF1 [31]. Ακόμα, επαγωγή μπορεί να επιτευχθεί μέσω της χρήσης χημειοθεραπευτικών παραγόντων (υδροξουρία, 5-αζακυτιδίνη, decitabine) και παραγώγων λιπαρών οξέων βραχέων αλύσων (φαινυλοβουτυρικό νάτριο, ισοβουτυρικό, βουτυρική αργινίνη). Από αυτούς τους παράγοντες, ο πλέον χρησιμοποιούμενος είναι η υδροξουρία. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης της υδροξουρίας δεν είναι ακόμα κατανοητός, όμως φαίνεται πως εμπλέκεται στο σηματοδοτικό μονοπάτι του cGMP. Δυστυχώς το 30-70% των ασθενών με μείζονα θαλασσαιμία και το 50% των ασθενών με β-θαλασσαιμία/Hbβ^F δεν ανταποκρίνεται στην θεραπεία με υδροξουρία [31].

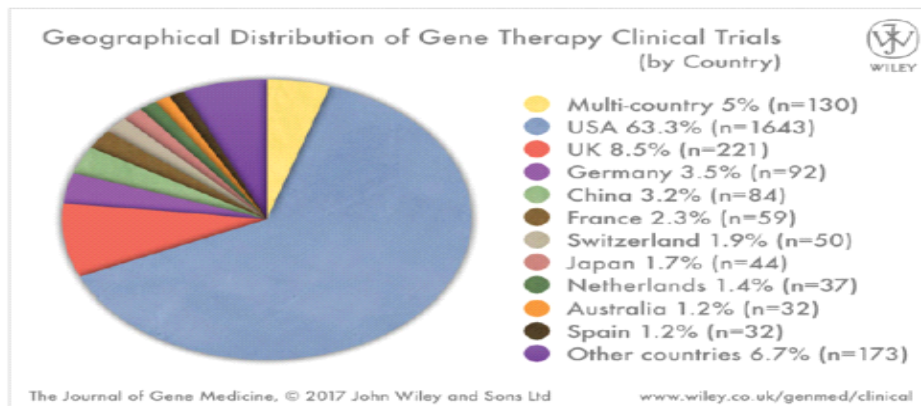
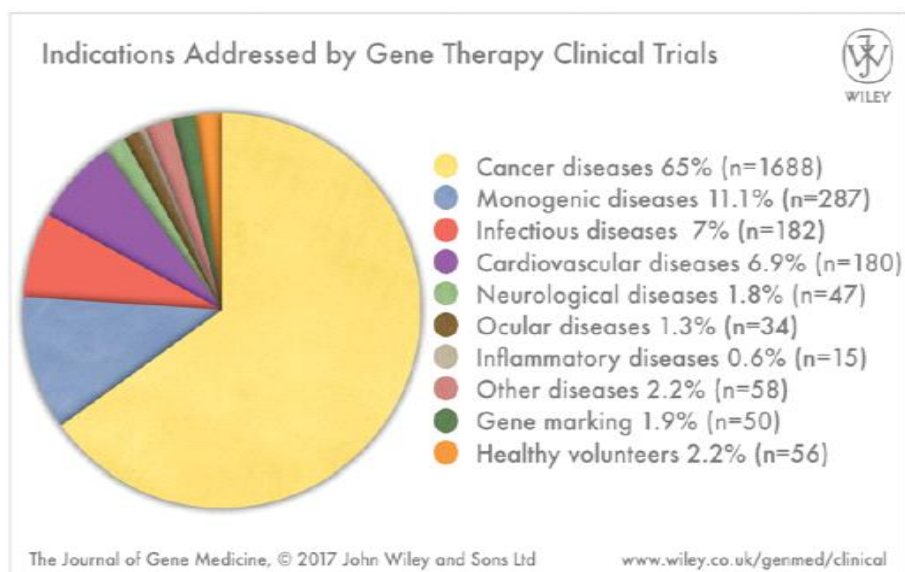
1.9 Γονιδιακή θεραπεία

Ως γονιδιακή θεραπεία ορίζεται η εισαγωγή γενετικού υλικού σε δυσλειτουργικά κύτταρα, με σκοπό την τροποποίηση της έκφρασης ενός γονιδίου, για να διακοπεί ή να αντιστραφεί μια παθολογική κατάσταση [32]. Αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη προοπτική για την θεραπεία πληθώρας μονογονιδιακών ασθενειών, οι οποίες μπορεί να είναι είτε συγγενείς (π.χ. β-θαλασσαιμία) είτε επίκτητες (π.χ. καρκίνος). Ειδικά τα τελευταία χρόνια, λόγω της ραγδαίας προόδου στη γονιδιωματική επεξεργασία και της χρήσης συστημάτων CRISPR και CAR T cells, έχει σημειωθεί σημαντική βελτίωση ως προς την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα της γονιδιακής θεραπείας. Αυτό αποδεικνύεται από την αύξηση των κλινικών δοκιμών σε παγκόσμιο επίπεδο [33]. Στην Εικόνα 10 φαίνεται ο αριθμός των κλινικών δοκιμών έως το 2017.



Εικόνα 10: Αριθμός κλινικών μελετών γονιδιακής θεραπείας έως το 2017[33]

Η γεωγραφική τους κατανομή των κλινικών μελετών παρουσιάζεται στην Εικόνα 11Α. Παρατηρείται ότι ο κύριος αριθμός κλινικών μελετών γονιδιακής θεραπείας πραγματοποιείται στην Αμερική. Όσον αφορά τις ασθένειες στις οποίες απευθύνονται αυτές οι κλινικές μελέτες, παρουσιάζονται στην Εικόνα 11Β και φαίνεται ότι ως επί το πλείστον σχετίζονται με διάφορα είδη καρκίνου.

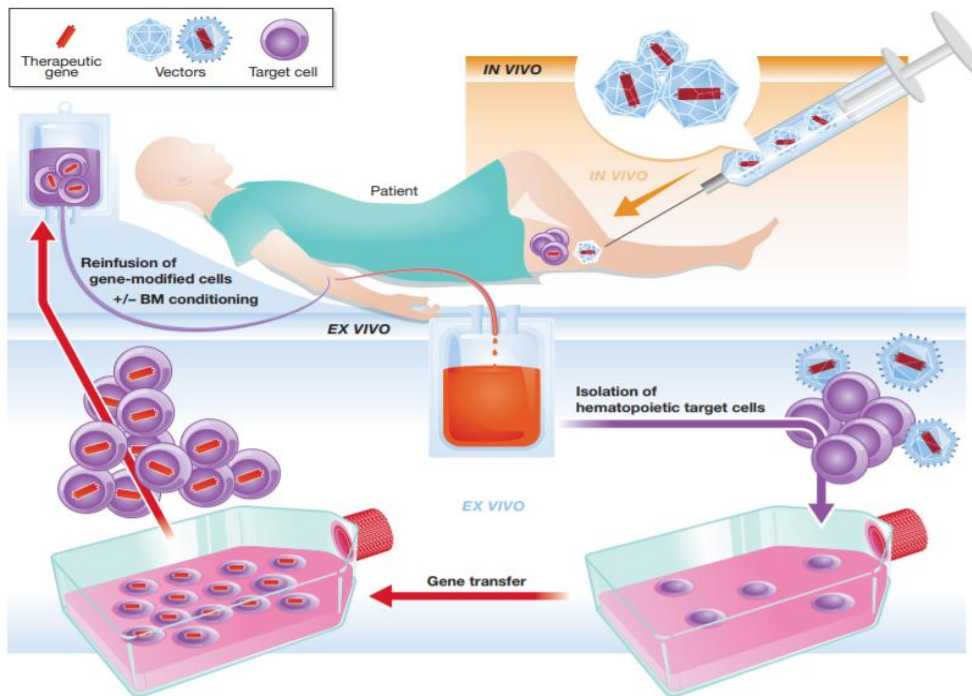
A**B**

Εικόνα 11: Κλινικές μελέτες γονιδιακής θεραπείας. (A) Γεωγραφική κατανομή των κλινικών μελετών ανά χώρα. (B) Ασθένειες στις οποίες απευθύνονται οι κλινικές μελέτες γονιδιακής θεραπείας [33]

Η γονιδιακή θεραπεία μπορεί να επιτευχθεί μέσω της προσθήκης ενός γονιδίου, μέσω της τροποποίησης-διόρθωσης ή αποσιώπησης ενός γονιδίου, καθώς και μέσω συνδυασμού αυτών των οδών [34]. Όσον αφορά τα οχήματα μεταφοράς του επιδιορθωτικού γενετικού υλικού, του διαγονιδίου όπως θα αναφέρετε από εδώ και στο εξής, αυτά ποικίλουν και μπορεί να είναι τόσο ικής, όσο και μη ικής προελεύσεως. Ανάλογα με τον φορέα, το διαγονίδιο μπορεί είτε να ενσωματωθεί στο γενετικό υλικό του κυττάρου-στόχου και να εκφράζεται μόνιμα, είτε να παραμείνει παροδικά σε αυτό με την μορφή επισώματος [35]. Στην παρούσα εργασία, θα αναλυθούν ιικά οχήματα μεταφοράς.

Η γονιδιακή θεραπεία, διακρίνεται στη σωματική και τη γαμετική. Η σωματική γονιδιακή θεραπεία αφορά την τροποποίηση σωματικών κυττάρων και άρα δεν κληρονομείται στις επόμενες γενιές [36]. Αντιθέτως, η γαμετική παρεμβαίνει στους γαμέτες και συνεπώς η γενετική τροποποίηση μπορεί να περάσει στις επόμενες γενιές. Ωστόσο, μια τέτοια πρακτική εγείρει βιοηθικά ζητήματα και συνεπώς εφαρμογή της προς το παρόν δεν είναι δυνατή [37].

Η γονιδιακή θεραπεία διακρίνεται επιπρόσθετα σε *in vivo* και *ex vivo* (Εικόνα 12) [38]. Η διάκριση αυτή βασίζεται στον τρόπο μεταφοράς του επιθυμητού διαγονιδίου στον ασθενή. Η *in vivo* γονιδιακή θεραπεία αποτελεί μια προσέγγιση κατά την οποία τα δυσλειτουργικά κύτταρα διορθώνονται στην φυσική τους θέση, μέσα στο σώμα του ασθενούς, είτε με έγχυση του φορέα στην κυκλοφορία ή άμεσα στον πάσχοντα ιστό. Η παραπάνω εφαρμογή συνήθως αφορά δυσπρόσιτους ιστούς όπως ήπαρ και πνεύμονες [39]. Κατά την *ex vivo* γονιδιακή θεραπεία, αρχικά συλλέγονται εύκολα προσβάσιμα κύτταρα του ασθενή πχ. κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος ή κύτταρα του δέρματος και στην συνέχεια υφίστανται γενετική τροποποίηση για να επιστρέψουν τελικά στον ίδιο τον ασθενή. Το γεγονός ότι τα γενετικώς τροποποιημένα κύτταρα μεταμοσχεύονται πίσω στον ασθενή χωρίς να απαιτείται ιστοσυμβατός δότης, καθιστά τη γονιδιακή θεραπεία μία πρακτική διαθέσιμη σε όλους, που προσφέρει δυνητικά ισόβιο θεραπευτικό όφελος, χωρίς τις ανεπιθύμητες ενέργειες της αλλογενούς μεταμόσχευσης (νόσος μοσχεύματος κατά ξενιστή, απόρριψη, χρόνια ανοσοκατασταλτική αγωγή).



Εικόνα 12: Γονιδιακή θεραπεία *in vivo* και *ex vivo* [38]

Παρά τις επιτυχημένες εφαρμογές της γονιδιακής θεραπείας, υπάρχουν ακόμα κάποιοι περιορισμοί [40] οι οποίοι σχετίζονται με:

- Τα υποβέλτιστα ποσοστά γονιδιακής μεταφοράς στα κύτταρα-στόχο
- Η ανάγκη για μακροπρόθεσμη και σταθερή, ιστοειδική έκφραση του διαγονιδίου
- Η ανάγκη εφαρμογής πλήρους μυελοκαταστολής για να επιτραπεί η επιτυχής εγκατάσταση και εμφύτευση των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων
- Η ανάγκη χρήσης φορέων για τη γονιδιακή μεταφορά που θα εγγυώνται υψηλά ποσοστά ασφάλειας με χαμηλή γενοτοξικότητα

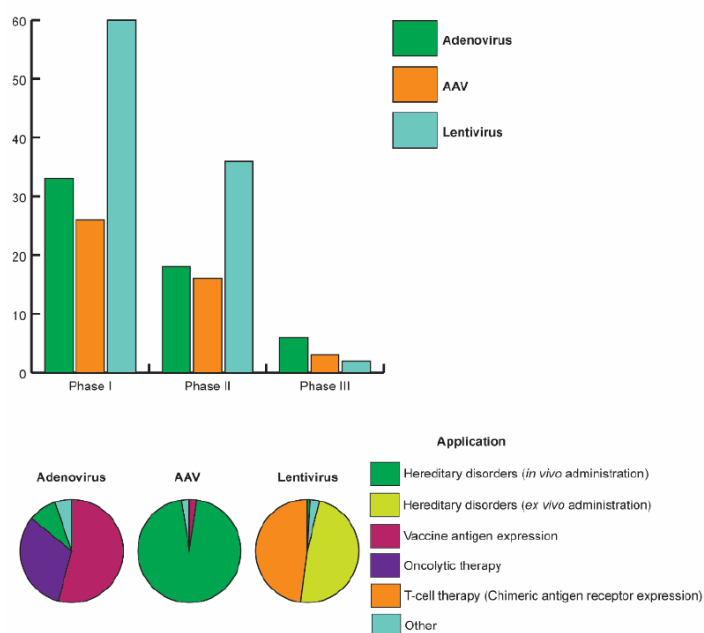
Οι άξονες αντιμετώπισης των παραπάνω περιορισμών είναι αρκετοί. Εμείς στην παρούσα μελέτη, στοχεύουμε στην κατασκευή ενός νέου λεντιικού φορέα, τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του οποίου πιθανόν να μπορούν να βελτιώσουν την γονιδιακή θεραπεία της β-θαλασσαιμίας.

1.10 Συστήματα μεταφοράς διαγονιδίου

Στη γονιδιακή θεραπεία η μεταφορά του διαγονιδίου στα κύτταρα στόχους επιτυγχάνεται με την χρήση οχημάτων μεταφοράς. Τα οχήματα μεταφοράς, όπως αναφέρθηκε παραπάνω

διαχωρίζονται στα ιϊκής και στα μη ιϊκής προέλευσης. Τα ιϊκής προέλευσης περιλαμβάνουν τους ρετροϊούς, τους αδενιοϊούς, τους απλούς ερπητοϊούς, τους αδενοσυσχετιζόμενους ιούς και τους λεντιοϊούς, ενώ στα μη ιϊκά συστήματα συγκαταλέγονται τα λιποσώματα, το σύστημα βιολιστικής χορήγησης σωματιδίων (biolistic particle delivery system/gene gun) και DNA συζεύγματα με πολυκατιόντα (DNA conjugates) [41].

Στη γονιδιακή θεραπεία χρησιμοποιούνται κυρίως ιϊκά συστήματα μεταφοράς τόσο σε προκλινικό όσο και σε κλινικό στάδιο για τις διαφορετικές παθήσεις όπως φαίνεται και στην Εικόνα 13.



Εικόνα 13: Κλινική χρήση των ιικών συστημάτων μεταφοράς και οι εφαρμογές τους [42]

Οι αδενιοϊοί ανήκουν στην οικογένεια *Adenoviridae*, δεν έχουν φάκελο και το γενετικό τους υλικό είναι dsDNA. Οι αδενιοϊοί συνδυάζουν την υψηλή αποτελεσματικότητα μεταγωγής με τη χαμηλή παθογονικότητα, όμως το γεγονός ότι είναι υψηλά ανοσογόνοι οδηγεί σε εμφάνιση τοξικότητας [42]. Επιπλέον το ιϊκό γονιδίωμα δεν ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή με αποτέλεσμα η έκφραση του διαγονιδίου να είναι παροδική και σε χαμηλά επίπεδα[43]. Οι αδενοσυσχετιζόμενοι ιοί ανήκουν στην οικογένεια των *Parvoviridae*. Δεν έχουν φάκελο και το γενετικό τους υλικό είναι ssDNA το οποίο ως επί το πλείστον δρα επισωματικά και δεν ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή. Για την αντιγραφή τους είναι απαραίτητη η παρουσία κάποιου αδενιοϊού. Οι αδενοσυσχετιζόμενοι ιοί σύνηθως χρησιμοποιούνται για μεταγωγή κυττάρων με αργό δυναμικό διαίρεσης όπως καρδιομυοκύτταρα [43]. Οι ρετροϊοί έχουν γενετικό υλικό RNA το οποίο έπειτα από

αντίστροφη μεταγραφή ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή ως ευθύγραμμο dsDNA. Οι ρετροϊοί εκφράζουν τα γονίδια *gag-pol* και *env* τα οποία είναι υπεύθυνα για τον σχηματισμό του νουκλεοκαψιδίου και του φακέλου αντίστοιχα. Ο πιο καλά χαρακτηρισμένος και ευρέως χρησιμοποιούμενος ρετροϊός είναι ο ιός λευχαιμίας των ποντικών (murine leukemia virus MLV) [44]. Το βασικό μειονέκτημα αυτού του συστήματος μεταφοράς είναι το φαινόμενο της εισχωρητικής μεταλλαξιγένεσης λόγω της τυχαίας ενσωμάτωσης του ιικού γενετικού υλικού στο γονιδίωμα του κυττάρου στόχου, καθώς και το ότι μπορεί να μεταίγει μόνο διαιρούμενα κύτταρα και όχι ηρεμούντα κύτταρα. Βέβαια παρέχει την δυνατότητα συνεχούς έκφρασης του διαγονιδίου και για αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται συχνά και σε κλινικό επίπεδο [45].

Ένα άλλο ιϊκό σύστημα μεταφοράς του διαγονιδίου είναι αυτό του απλού ερπητοϊού (Herpes simplex virus, HSV). Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματά του είναι η μεγάλη χωρητικότητα για ένθεση του διαγονιδίου (40-150kb) και ο υψηλός τροπισμός του προς τους νευρώνες [45]. Το γονιδίωμά του δεν ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή και είναι υψηλά ανοσογόνος και μπορεί να προκαλέσει έντονη αντικαρκινική ανοσολογική αντίδραση [46]. Οι λέντιοι περιγράφονται αναλυτικά στην παράγραφο 1.10, όμως συνοπτικά πρόκειται για ιούς με γενετικό υλικό ssRNA της οικογένειας των Retroviridae οι οποίοι χρησιμοποιούνται συχνά στη γονιδιακή θεραπεία γιατί προσφέρουν μακροπρόθεσμη έκφραση του διαγονιδίου ακόμα και σε μη διαιρούμενα κύτταρα [47].

Όσον αφορά στα μη ιϊκά συστήματα μεταφοράς διαγονιδίου, το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η παροδική έκφραση του διαγονιδίου. Το πλέον διαδεδομένο μη ιϊκό σύστημα είναι τα λιποσώματα. Αποτελούν ένα μη παθογονικό εργαλείο το οποίο είναι εύκολο στην παραγωγή και φτηνό αλλά η αποτελεσματικότητα της μεταγωγής είναι μειωμένη συγκριτικά με τα ιϊκά οχήματα μεταφοράς. Κατά το σύστημα βιολιστικής χορήγησης σωματιδίων, η είσοδος του DNA στα κύτταρα στόχο γίνεται με την βοήθεια χρυσών σφαιριδίων. Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι μπορεί να γίνει μεταγωγή κυττάρων που βρίσκονται στη φάση G₀ του κυτταρικού κύκλου και ότι είναι μια εύχρηστη και φτηνή τεχνική. Το γεγονός ότι η αποτελεσματικότητα της μεθόδου ποικίλλει, καθώς και το ότι *in vivo* τα σφαιρίδια παραμένουν στο σώμα, αποτελούν τα μειονεκτήματα αυτού του συστήματος [41]. Τέλος ένας άλλος τρόπος μεταφοράς του διαγονιδίου είναι μέσω της δημιουργίας συμπλεγμάτων του DNA με πολυλυσίνη και αντισώματα/πρωτεΐνες που συνδέονται με συγκεκριμένους υποδοχείς στα κύτταρα-στόχους [41].

Οι Lukashev et al 2016 [43] κατηγοριοποίησαν τα συστήματα μεταφοράς με τα χαρακτηριστικά τους, όπως φαίνεται στον παρακάτω Πίνακα 1.

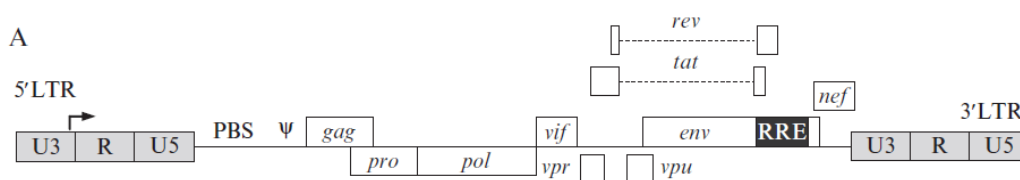
Πίνακας 1: Οχήματα μεταφοράς διαγονιδίου στην γονιδιακή θεραπεία και εμφάνιση των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους[43]

Transgene delivery method	Size of inserted transgene, kb	Time of transgene expression	Preferential way of administration	Immunogenicity	Safety	Main field of application	Remarks
Adenoviral vectors	up to 30	short (days)	subcutaneous, intratumoral, local	high	low; systematic administration can lead to a systemic inflammatory response, lethal case described	vaccines, oncolytic viruses	most people have antibodies against vectors based on human adenoviruses
Lentiviruses	up to 10	life-long	<i>ex vivo</i> transduction of stem cells	low	acceptable in case of lethal diseases; risk of insertional oncogenesis	correction of inherited genetic defects, mainly of hematopoietic system	
Retroviruses	up to 10	life-long	<i>ex vivo</i> transduction of stem cells	low	unacceptably low; high risk of insertional oncogenesis		frequency of leucosis 25% in clinical trials
Adeno-associated viruses	up to 4	long (months, years, may be life-long)	intramuscular	low	high	correction of inherited genetic defects, first therapy of polyetiological diseases	the only licensed GT product is based on AAV
Poxviruses	up to 20	short (days)	subcutaneous, local	high	relatively high, tested on hundreds of thousands of people during the vaccination program; when using non-modified vaccinia virus severe side effects are possible	vaccines, oncolytic viruses	more than 100 vaccines based on poxviruses for human and animals are being developed
RNA viruses	up to 2	short (days)	subcutaneous, intratumoral, local	medium	not enough data for the estimation; depends on each vector	oncolytic viruses, niche applications	non-stable genome, difficult to obtain approval
Plasmids	up to 10	short (days, weeks)	gene gun, liposomes [45]	low	high	vaccines	
RNA	up to 10	short (days)	gene gun, liposomes [45]	low	high	therapy of polyetiological diseases	difficult to assure the stability of the drug

1.11 Λεντιϊκοί φορείς

Οι λέντιϊοι μοιάζουν αρκετά με τους ρετροϊούς. Ανήκουν στην οικογένεια *Retroviridae* και έχουν γενετικό υλικό ssRNA το οποίο ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι λεντιϊκοί φορείς είναι αυτοί που προέρχονται από τον HIV (human immunodeficiency virus) και τον SIV (simian immunodeficiency virus). Οι λέντιϊοι αποτελούνται από τα γονίδια *gag*, *pol* και *env* τα οποία είναι υπεύθυνα για την δημιουργία

του νουκλεοκαψιδίου και του φακέλου. Εκτός από αυτά τα γονίδια, οι λέντιϊοι έχουν 2 ρυθμιστικά γονίδια (*tat*, *rev*) και 4 βοηθητικά γονίδια (*nef*, *vif*, *vpr*, *vpu*) τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες υπεύθυνες για όλα τα στάδια του κύκλου ζωής του ιού [48]. Τα άλλα σημαντικά στοιχεία του λεντιϊού είναι οι περιοχές LTR (long terminal repeats) οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ενσωμάτωση στο γονιδίωμα του ξενιστή και δρουν σαν υποκινητές/ενισχυτές, το σήμα συσκευασίας (ψ) και το πολυουρινικό σήμα (PPT) το οποίο είναι το εναρκτήριο σημείο για την αντίστροφη μεταγραφή. Το γενετικό υλικό των λεντιϊκών φορέων ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή, όμως έπειτα από τροποποίηση των υπεύθυνων για την ενσωμάτωση αλληλουχιών (ιντεγκράση και LTR), μπορεί να εντοπιστεί και σαν επίσωμα [49]. Η δομή του λεντιϊού HIV φαίνεται στην Εικόνα 14.

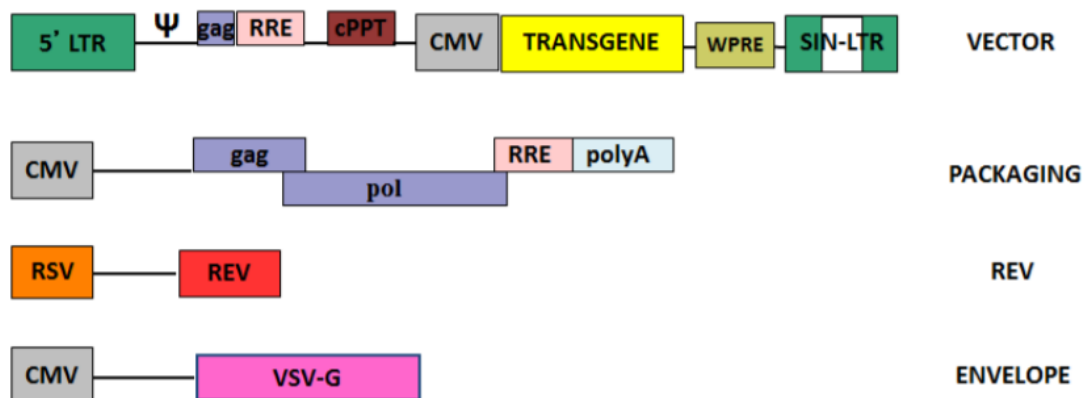


Εικόνα 14: Αγρίου τύπου HIV προϊός [48]

Στην προσπάθεια αύξησης της ασφάλειας της γονιδιακής θεραπείας, έχουν κατασκευαστεί διαφορετικοί λεντιϊκοί φορείς μέσω γενωμικής επεξεργασίας και πλέον χρησιμοποιούνται οι τρίτης γενιάς λεντιϊκοί φορείς (Εικόνα 15). Στους τρίτης γενιάς λεντιϊκούς φορείς, έχουν αφαιρεθεί τα βοηθητικά γονίδια που σχετίζονται με την παθογένεια όπως *nef*, *vif*, *vpr* και *vpu*. Επιπλέον, φέρουν αυτοαδρανοποιούμενα άκρα sinLTR (self-inactivating long terminal repeats), όπου τμήμα της 3' LTR περιοχής απαλείφεται και άρα αδρανοποιείται η δράση του ιικού υποκινητή/ενισχυτή στο ένα άκρο. Κατά την ανάστροφη μεταγραφή, η οποία λαμβάνει χώρα μόλις ο ιικός φορέας εισαχθεί στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-στόχου, η 3' LTR αντιγράφεται και αντικαθιστά την 5' LTR περιοχή, η οποία είναι πλέον και αυτή αδρανοποιημένη. Κατά συνέπεια, λόγω της αδρανοποίησης των LTR, είναι απαραίτητη η ύπαρξη ενός εσωτερικού ιστοειδικού συνήθως υποκινητή μέσα στον ιικό φορέα, ο οποίος τοποθετείται ακριβώς πριν το διαγονίδιο και ρυθμίζει την έκφραση του διαγονιδίου μετά την ενσωμάτωση στο κύτταρο-στόχος [50].

Τα ιϊκά σωμάτια παράγονται έπειτα από χρήση συστήματος παροδικής διαμόλυνσης 4 πλασμιδίων. Το πλασμίδιο που περιέχει το γονιδίωμα του ιού και το επιθυμητό διαγονίδιο, το πλασμίδιο που περιέχει τα γονίδια *gag* και *pol* και είναι υπεύθυνα για τις δομικές πρωτεΐνες και την ενσωμάτωση, το πλασμίδιο με το γονίδιο *rev* το οποίο είναι υπεύθυνο για την μεταφορά στον πυρήνα και το πλασμίδιο που περιέχει τα γονίδια φακέλου (envelope)

[49]. Ο ευρέως χρησιμοποιούμενος φάκελος είναι ο VSV-G ο οποίος προέρχεται από τον ιό της φυσαλιδωδους στοματίτιδας και έχει ευρύ τροπισμό [51]. Ανάλογα με τα κύτταρα στόχους μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικοί φάκελοι, πιο ιστοειδικοί που δείχνουν τροπισμό μιας και αναγνωρίζουν συγκεκριμένους υποδοχείς. Τέτοιοι φάκελοι οδηγούν συνήθως και σε αποτελεσματικότητα μεταγωγής [52].



Εικόνα 15: Σύστημα παροδικής διαμόλυνσης 4 πλασμιδίων [49]

Οι λεντιϊκοί φορείς έχουν ευρεία εφαρμογή στη γονιδιακή θεραπεία γιατί συνδυάζουν αρκετά πλεονεκτήματα. Έχουν την δυνατότητα να διαμολύνουν τόσο κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε κυτταρικό κύκλο, όσο και κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε φάση G₀, όπως αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα [47]. Επιπλέον, οι λεντιϊκοί φορείς μπορούν να εσωκλείουν μεγαλύτερου μεγέθους διαγονίδια (10 kb) σε σχέση με τους ρετροϊούς. Το γεγονός ότι ενσωματώνονται στο γονιδίωμα του ξενιστή έχει ως αποτέλεσμα την σταθερή και μακροπρόθεσμη έκφραση του διαγονιδίου. Τέλος οι τρίτης γενιάς λεντιϊκοί φορείς φαίνεται πως τείνουν να ενσωματώνονται λιγότερο κοντά σε πρωτο-ογκογονίδια και άρα μειώνεται η πιθανότητα εμφάνισης εισχωρητικής μεταλλαξιγένεσης, εξ αιτίας των αυτοαδρανοποιούμενων άκρων sin-LTR [53]. Σε αντιδιαστολή με τα παραπάνω, η χρήση λεντιϊκών φορέων σχετίζεται με διάφορα προβλήματα που χρίζουν αντιμετώπισης ώστε να αυξηθεί η βιοασφάλεια της γονιδιακής θεραπείας. Αρχικά, λόγω του τυχαίου προτύπου ενσωμάτωσης στο γονιδίωμα, ο κίνδυνος ενεργοποίησης πρωτοογκογονιδίων ή η αναστολή ενεργοποίησης ογκοκατασταλτικών γονιδίων δεν έχει εξαλειφθεί πλήρως. Ο κίνδυνος αυτός αυξάνεται χορηγώντας υψηλές δόσεις του ιικού φορέα [54]. Επιπλέον, με την χρήση λεντιϊκών φορέων υπάρχει η πιθανότητα, καίτοι μειωμένη, της παραγωγής ενεργών παθογόνων ιικών σωματίων (replication competent virus) έπειτα από ανασυνδυασμό. Αυτό το φαινόμενο ήταν πιο συχνό στους πρώτης γενιάς λεντιϊκούς φορείς, στους οποίους τα

γονίδια παθογένειας *nef*, *vif*, *vpr* και *vru* δεν είχαν ακόμα αφαιρεθεί. Στους τρίτης γενιάς λεντιϊκούς φορείς το παραπάνω φαινόμενο είναι πολύ σπάνιο [55].

1.12 Λεντιϊκοί φορείς β-σφαιρίνης

Οι λεντιϊκοί φορείς χρησιμοποιούνται σε μεγάλο βαθμό στην γονιδιακή θεραπεία αρκετών παθήσεων. Ακολούθως, θα αναφερθούν εφαρμογές τους στην γονιδιακή θεραπεία της β-θαλασσαιμίας, κατά την οποία οι θεραπευτικές στρατηγικές προσανατολίζονται κυρίως στην χρήση λεντιϊκών φορέων με διαγονίδιο είτε β είτε γ-σφαιρίνης.

Σε προκλινικό επίπεδο έχουν πραγματοποιηθεί αρκετά πειράματα με φορείς β-σφαιρίνης. Τα περισσότερα *in vivo* πειράματα έχουν πραγματοποιηθεί σε $Hbb^{th3/+}$ ποντίκια. Ανάλογα με τα ιδιαίτερα ρυθμιστικά στοιχεία του κάθε λεντιϊκού φορέα β-σφαιρίνης, η παραγωγή των αιμοσφαιρινών και η διόρθωση φαινοτύπου ποικίλλει. Σε κάποιες μελέτες [56] έχει παρατηρηθεί αύξηση των ολικών αιμοσφαιρινών κατά 3-4 g/dL, ενώ σε άλλες [57-60] μετά από κανονικοποίηση με τον VCN η μέση αύξηση ήταν 1.1-2.3 g/dL. Επιπλέον, έχει επιτευχθεί ολική διόρθωση φαινοτύπου σε μοντέλο θαλασσαιμικού ποντικού με VCN=2 [61]. Σε άλλη μελέτη με λεντιϊκό φορέα β-σφαιρίνης η αποτελεσματικότητα μεταγωγής ανήλθε στο 30-50% και το VCN=1 και κατάφερε να διορθώσει πλήρως τον θαλασσαιμικό φαινότυπο ποντικού $Hbb^{th3/+}$ [62].

Η πρώτη πετυχημένη κλινική μελέτη με ιϊκούς φορείς β-σφαιρίνης πραγματοποιήθηκε το 2007 από τους Cavazzana-Calvo et al 2010 [63]. Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο φορέας β^{AT87Q} [57] για να μετάγει αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα 1 ασθενή με β^E/β^0 μείζονα θαλασσαιμία. Το αποτέλεσμα ήταν ο ασθενής να είναι μεταγγιζοανεξάρτητος μετά από 1-2 χρόνια με τα επίπεδα των αιμοσφαιρινών να φτάνουν τα 9-10 g/dl. Τα θετικά αποτελέσματα της μελέτης οφείλονται στην ένθεση του φορέα στο γονίδιο HMGA2. Βασισμένοι σε αυτά τα αποτελέσματα, η ίδια ομάδα εξέλιξε την μελέτη της με 18 θαλασσαιμικούς ($\beta^E\beta^0$ n=10, $\beta^0\beta^0$ n=5, $\beta^+\beta^0$ n= 3) και 4 δρεπανοκυτταρικούς ασθενείς [64]. Σε αυτή την κλινική μελέτη στους $\beta^0\beta^0$ ασθενείς μειώθηκε η συχνότητα των μεταγγίσεων, ενώ οι υπόλοιποι σταμάτησαν τις μεταγγίσεις μέσα σε ένα χρόνο και εμφάνισαν μια μέση αύξηση αιμοσφαιρινών 4.9 g/dL. Από τότε έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές ακόμα κλινικές μελέτες, οι οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Κλινικές μελέτες γονιδιακής θεραπείας για την β-θαλασσαιμία [65]

Identifier And Phase	Sponsor	Country	Start Date	Vector	No Of Treated Patients And Age	Genotype	Graft Source	Conditioning	Administration Route	Results
LG001 study Phase I/II	Bluebird Bio	France	September 2006	HPV569	3 18–22 yrs	Non-b0/b0	BM, mPB (Plrxfr+G-CSF)	Busulfan 12.8 mg/kg	Intravenous	1 transfusion independent patient with HMG2 clonal dominance that regressed over years
NCT01639690 Phase I	MSKCC	USA	July 2012	TNS9.3.55	4 18–23 yrs	Non-b0/b0, b0/b0	mPB (G-CSF)	Busulfan 8 mg/kg	Intravenous	Decrease in transfusion requirements; this trial is currently suspended and has been amended for higher intensity conditioning
NCT01745120 HGB-204 Phase III	Bluebird Bio	Global	August 2013	BB305	18 12–35 yrs	Non-b0/b0 (n=10), b0/b0 (n=8)	mPB (Plrxfr+G-CSF)	Busulfan 12.8 mg/kg	Intravenous	8 non-b0/b0 and 3 b0/b0 patients transfusion independent
NCT02151526 HGB-205 Phase III	Bluebird Bio	France	August 2013	BB305	4 16–18 yrs	Non-b0/b0 (n=3), b0/b0 [IVS1-110 homozygous] (n=1)	mPB (Plrxfr+G-CSF)	Busulfan 12.8 mg/kg	Intravenous	4 transfusion independent patients
NCT02453477 TIGET-BTHAL Phase I/II	Telethon Foundation	Italy	May 2015	GLOBE	9 6–35 yrs	Non-b0/b0 (n=7), b0/b0 (n=2)	mPB (Plrxfr+G-CSF)	42 g/m ² Treosulfan and 8 mg/kg thiotepa	Intra-BM	Reduced transfusion requirements in adults; 3 pediatric participants (1 b0/b0) transfusion independent
NCT02906202 HGB-207 Phase III	Bluebird Bio	Global	July 2016	BB305	20 8–34 yrs	Non-b0/b0	mPB (Plrxfr+G-CSF)	Busulfan 12.8 mg/kg	Intravenous	17 transfusion independent patients
NCT03207009 HGB-212 Phase III	Bluebird Bio	Global	June 2017	BB305	11 ≤50 yrs	b0/b0 or IVS1-110 homozygous	mPB (Plrxfr+G-CSF)	Busulfan 12.8 mg/kg	Intravenous	6 transfusion independent patients

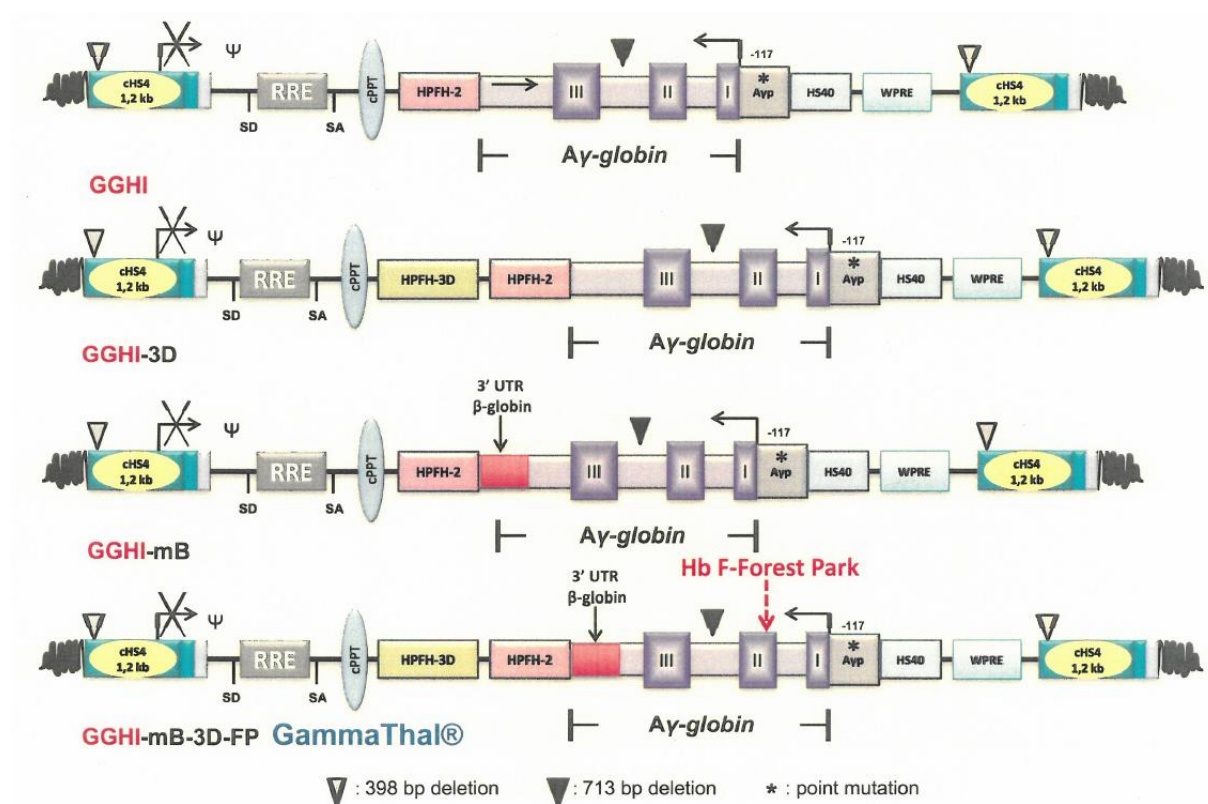
Σε συνέχεια της πρώτης επιτυχημένης κλινικής μελέτης ακολούθησε η δεύτερη φάση σε θαλασσαιμικούς ασθενείς με τον φορέα β-σφαιρίνης β^{A-T87Q}. Πραγματοποιήθηκε μεταγωγή αυτόλογων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων 22 μεταγγισιοεξαρτώμενων θαλασσαιμικών ασθενών. Από αυτούς όλοι οι μη β⁰β⁰ σταμάτησαν τις μεταγγίσεις, ενώ στους β⁰β⁰ μειώθηκε η ετήσια συχνότητα μεταγγίσεων κατά 73% [66, 67].

1.13 Λεντιϊκοί φορείς γ-σφαιρίνης

Στην γονιδιακή θεραπεία της β-θαλασσαιμίας, εκτός από φορείς με διαγονίδιο β-σφαιρίνης χρησιμοποιούνται και φορείς γ-σφαιρίνης. Οι φορείς γ-σφαιρίνης φέρουν κάποια πλεονεκτήματα σε σχέση με τους φορείς β-σφαιρίνης. Αρχικά, το βασικότερο είναι ότι μπορούν να θεραπεύσουν και την δρεπανοκυτταρική αναιμία [68]. Έχει φανεί ότι η εμβρυική αιμοσφαιρίνη έχει πιο έντονες αντιδρεπανοκυτταρικές ιδιότητες από την ενήλικη αιμοσφαιρίνη [69]. Επιπλέον δεν εισάγεται στον οργανισμό κάποιο νέο γονίδιο μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες παρενέργειες. Η γ-σφαιρίνη και κατ'επέκταση η εμβρυική αιμοσφαιρίνη εκφράζεται φυσιολογικά σε προγενέστερα αναπτυξιακά στάδια και η

επανεργοποίησή της δεν έχει φανεί μέχρι σήμερα να συνδέεται με παθολογικές καταστάσεις.

Με λεντιϊκούς φορείς γ-σφαιρίνης έχουν πραγματοποιηθεί *in vitro* πειράματα σε ανθρώπινα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα με ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε σχέση με την αύξηση της ανθρώπινης εμβρυικής αιμοσφαιρίνης και την βελτίωση της ερυθροποίησης. Συγκεκριμένα, στο Εργαστήριο Κυτταρικής και Γονιδιακής Θεραπείας του Κέντρου Βασικής Έρευνας στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ), στο οποίο εκπονήθηκε και η συγκεκριμένη εργασία, έχουν κατασκευαστεί οι λεντιϊκοί φορείς της Εικόνα 17.



Εικόνα 16: Λεντιϊκοί φορείς γ-σφαιρίνης

Ο φορέας GGHI [70] με φάκελο VSV-G, έπειτα από μεταγωγή CD34⁺ κυττάρων με MOI=100, οδήγησε σε αύξηση της γ-σφαιρίνης κατά 32.9% έπειτα από μέτρηση με HPLC, με μέσο VCN=1.1 και μέση αποτελεσματικότητα μεταγωγής 40.3%. Ο GGHI-mB-3D [71] με εναλλακτικό φάκελο BaEVRless [72, 73] έπειτα από μεταγωγή CD34⁺ κυττάρων με MOI=50, οδήγησε σε μια μέση αύξηση των επιπέδων της HbF 91% έπειτα από μέτρηση με HPLC, με μέσο VCN=0.86 και μέση αποτελεσματικότητα μεταγωγής 56.4%. Άλλη μελέτη [74] στόχευσε

στην αύξηση της HbF μέσω ένθεσης της γ -σφαιρίνης στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, με παράλληλη προσπάθεια επανενεργοποίησης της υπάρχουσας εμβρυικής αιμοσφαιρίνης. Αυτό επιτεύχθηκε με την χρήση λεντιϊκού φορέα γ -σφαιρίνης ο οποίος περιείχε έναν συνθετικό zinc-finger μεταγραφικό παράγοντα που αλληλεπιδρά με τον υποκινητή των γ -γονιδίων. Τα αποτελέσματα σε φυσιολογικά CD34⁺ κύτταρα έδειξαν έκφραση της HbF/VCN 21%, ενώ στα θαλασσαιμικά κύτταρα η έκφραση της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης ανήλθε στο 45-60%, με αποτέλεσμα να παρατηρηθεί αύξηση των ολικών αιμοσφαιρινών κατά 3 φορές.

Σε *in vivo* μελέτες με λεντιϊκό φορέα γ -σφαιρίνης, υποκινητή της β -σφαιρίνης και στοιχεία του β -LCR βρέθηκε μια μέση αύξηση στην συγκέντρωση των αιμοσφαιρινών 2.6 g/dL με παράλληλη βελτίωση των αιματολογικών παραμέτρων [75]. Αύξηση των επιπέδων της HbF σε *in vivo* θαλασσαιμικό έχει επιτευχθεί και με την χρήση λεντιϊκού φορέα με διαγονίδιο γ -σφαιρίνης και NA10XD [76]. Σε αυτή την μελέτη η έκφραση της HbF παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα και έπειτα από δευτερογενή μεταμόσχευση (~12 g/dL) κατάφερε να οδηγήσει σε αναστροφή του θαλασσαιμικού φαινοτύπου. Επιπλέον, *in vivo* πειράματα [77] σε θαλασσαιμικό μοντέλο ποντικού με την χρήση λεντιϊκού φορέα γ -σφαιρίνης με το διαγονίδιο επιλογής MGMT έδειξαν αυξημένα επίπεδα των F-κυττάρων σε σημείο διόρθωσης του παθολογικού φαινοτύπου, έπειτα από χρήση του αλκυλιωτικού παράγοντα καρμουστίνης.

Προς το παρόν η μόνη κλινική μελέτη σε εξέλιξη που περιλαμβάνει φορείς γ -σφαιρίνης είναι από τους Malik et al 2018 [78] και περιλαμβάνει δύο μικρο-δρεπανοκυτταρικούς μεταγγιζοεξαρτώμενους ασθενείς (HbS- β^0). Σύμφωνα με πρωταρχικά αποτελέσματα, ο ένας από τους δύο ασθενείς εμφάνισε αύξηση της HbF 20% μετά από μεταγωγή με τον τροποποιημένο φορέα με παράλληλη μείωση του πόνου.

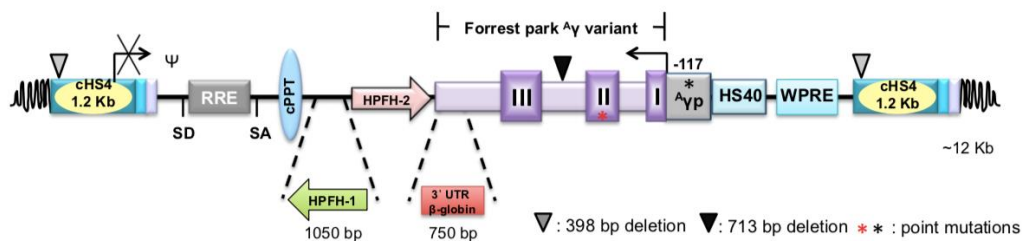
1.14 GammaThal

Στην παρούσα μελέτη κατασκευάσαμε έναν νέο λεντιϊκό φορέα γ -σφαιρίνης, τον GammaThal, ο οποίος φέρει 2 επιπλέον χαρακτηριστικά από τον ήδη χαρακτηρισμένο φορέα GGHI-mB-3D [71]. Ο εν λόγω φορέας αποτελεί έναν 3ης γενιάς λεντιϊκο φορέα με αυτοαδρανοποιούμενα άκρα, η κατασκευή του οποίου περιγράφεται στους Drakoroulou et al 2019 [71]. Συνοπτικά, για την κατασκευή του GGHI-mB-3D, ένα τμήμα 1050 bp BamHI-EcoRI από το πλασμίδιο Pbr322, το οποίο περιείχε τον 3D ενισχυτή της HPFH-1 αφαιρεμένης περιοχής, εισήχθη στην XhoI περιοχή του GGHI [70], με αντίδραση λιγάσης με μη κολλώδη άκρα (blunt-end ligation), με τον ίδιο προσανατολισμό με αυτό της μεταγραφής του γονιδίου HBG1. Το αποτέλεσμα ήταν η κατασκευή του φορέα GGHI-3D. Στη συνέχεια, το τμήμα BstBI-

BSu36I του GGHI το οποίο περιείχε την 3' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου της γ-σφαιρίνης (gamma-globin 3'UTR), αντικαταστήθηκε με την 3' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου της β-σφαιρίνης. Έτσι δημιουργήθηκε ο φορέας GGHI-mB. Τέλος, ο GGHI-mB-3D κατασκευάστηκε με ένθεση 1234 bp του BSU36I-NsiI του GGHI-mB στον GGHI-3D.

Το πρώτο ξεχωριστό χαρακτηριστικό του GammaThal εντοπίζεται στο $\Delta\gamma$ διαγονίδιο. Στην προσπάθεια βελτίωσης του GGHI-mB-3D πραγματοποιήσαμε σημειακή μεταλλαγή στο εξώνιο 2 του $\Delta\gamma$ γονιδίου. Η σημειακή μεταλλαγή 220G→A είναι τύπου *αλλοίωσης νοήματος* (missense) και σε επίπεδο πρωτεΐνης οδηγεί σε αλλαγή αμινοξέος από ασπαρτικό οξύ σε ασπαραγίνη (Asp74→Asn). Σύμφωνα με τους Song-sen Chen et. al 1985 [79], η συγκεκριμένη μεταλλαγή οδηγεί στον πολυμορφισμό Forest Park εντοπίζεται στο αμινοξύ 74, με βάση το επίσημο σύστημα αρίθμησης κατά HGVS. Ο εν λόγω πολυμορφισμός επιτρέπει δυνητικά την διάκριση της ενδογενούς γ-αλυσίδας/HbF από αυτήν που παράγεται λόγω του διαγονιδίου κατόπιν μεταγωγής, εξ αιτίας αλλαγών στην κινητικότητα της αιμοσφαιρίνης όπως προσδιορίζεται με χρωματογραφία DEAE-cellulose τετραμερούς ή με HPLC αλυσίδας. Συνεπώς ο GammaThal παρέχει την δυνατότητα ακριβέστερης ποσοτικοποίησης της HbF που οφείλεται στο θεραπευτικό διαγονίδιο.

Το δεύτερο σημαντικό πλεονέκτημα του GammaThal είναι ο εναλλακτικός φάκελος HF [80, 81] του στελέχους Edmonston του ιού της ιλαράς, ο οποίος παρουσιάζει αυξημένο τροπισμό προς τα ανθρώπινα CD34⁺ [82]. Με την χρήση του συγκεκριμένου φακέλου, αναμένεται να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα μεταγωγής, καθώς οι γλυκοπρωτεΐνες με τις οποίες είναι ψευδοτυπημένοι αναγνωρίζουν τους υποδοχείς CD46 και SLAM [82]. Ο υποδοχέας CD46 εκφράζεται [83] σε υψηλό βαθμό στα λεμφοκύτταρα και στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα CD34⁺, ενώ ο SLAM εκφράζεται κυρίως σε λεμφοκύτταρα και δενδριτικά και σχεδόν καθόλου στα αρχέγονα αιμοποιητικά CD34⁺ κύτταρα [84, 85]. Ο προϊός του νέου λεντιϊκού φορέα GammaThal παρουσιάζεται παρακάτω στην Εικόνα 18.



Εικόνα 17: GammaThal λεντιϊκός φορέας

Ο GammaThal αποτελείται από το Λ γ διαγονίδιο με τον πολυμορφισμό Forest Park, που βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή Λ γ γονιδίου, ο οποίος περιέχει την Ελληνική μετάλλαξη -117 η οποία οδηγεί σε εμφάνιση ΗΡFH [86]. Το στοιχείο HS40 από τον γονιδιακό τόπο των α -σφαιρινών δρά ως ενισχυτής της έκφρασης του γ -γονιδίου [87]. Σαν ενισχυτές δρούν ακόμα, τα στοιχεία ΗΡFH-2 [70, 88] και το στοιχείο 3D του ΗΡFH-1 ενισχυτή [71, 89] του γονιδιακού τόπου της β -σφαιρίνης. Επιπλέον, η 3'αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου της γ -σφαιρίνης αντικαταστήθηκε με αυτήν της β -σφαιρίνης (3'UTR), η οποία προσδίδει σταθερότητα σε επίπεδο μεταγράφου [90-93]. Η σταθερότητα σε επίπεδο μεταγράφου, επιτυγχάνεται και με το στοιχείο Woodchuck Post-transcriptional Regulatory Element (WPRE) [94]. Για να αποτραπεί το φαινόμενο θέσεως και η ετερογενής έκφραση του διαγονιδίου, ο GammaThal φέρει τον μονωτή χρωματίνης cHS4 ο οποίος έχει δράση και τύπου φραγμού και τύπου διακόπτη ενισχυτή [95]. Επίσης, προστέθηκε και το ρυθμιστικό στοιχείο Rev Response Element (RRE), το οποίο είναι απαραίτητο για την αντιγραφή του ιικού φορέα [96]. Τέλος, στον GammaThal κλωνοποιήθηκε το στοιχείο cPPT/CTS το οποίο προέρχεται από το γονίδιο *pol* του HIV-1 και συμβάλλει στην αύξηση της αποτελεσματικότητας μεταγωγής [97].

Σκοπός

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, κατασκευάσαμε τον νέο λεντιϊκό φορέα γ-σφαιρίνης GammaThal. Ο συγκεκριμένος φορέας φέρει τον πολυμορφισμό Forest Park στο HBG1 γονίδιο, ο οποίος επιτρέπει την διάκριση της ενδογενούς HbF από αυτήν που οφείλεται στο θεραπευτικό διαγονίδιο. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας φάκελο που αυξάνει τον τροπισμό του φορέα αναμένεται ιστοειδική στόχευση και υψηλότερα επίπεδα μεταγωγής ακόμα και σε χαμηλή πολλαπλότητα μόλυνσης (MOI).

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η *in vitro* αξιολόγησή του λεντιϊκού φορέα γ-σφαιρίνης GammaThal, σε ανθρώπινα αρχέγονα αιμοποιητικά CD34⁺ κύτταρα φυσιολογικών και θαλασσαιμικών δοτών, με MOI=25. Προς αυτόν τον σκοπό πραγματοποιήθηκε:

- Έλεγχος της έκφρασης της HbF στα διαφοροποιημένα κύτταρα (F- κύτταρα) με κυτταρομετρία ροής
- Προσδιορισμός της έκφρασης της γ-σφαιρίνης σε επίπεδο μεταγράφου με qPCR
- Προσδιορισμός της αποτελεσματικότητας μεταγωγής και του αριθμού αντιγράφων φορέα ανά κύτταρο (VCN/cell) έπειτα από έλεγχο αποικιών μεθυλκυτταρίνης και qPCR
- Βελτίωση ερυθροποίησης μέσω προσδιορισμού των αποπτωτικών κυττάρων με κυτταρομετρία ροής και χρώση Annexin-V/7AAD καθώς και προσδιορισμού του αριθμού των ορθοχρωματικών ερυθροβλαστών στα μεταγμένα και μη μεταγμένα κύτταρα.

Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Σύσταση και παρασκευή διαλυμάτων

Θρεπτικός ζωμός (LB broth): Για την καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένος θρεπτικός ζωμός LB broth (Sigma Aldrich) με σύσταση: , 10 g/L τρυπτόνη, 5 g/L εκχύλισμα ζύμης, 5 g/L NaCl, 2.2 g/L inert binding agents, με ή χωρίς αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 100 µg/ml

Θρεπτικό άγαρ (LB broth with agar): Για την καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν 20-25 ml ανά τρυβλίο petri αποστειρωμένου θρεπτικού άγαρ LB (Sigma-Aldrich) με σύσταση 13.72g/L άγαρ, 9.14g/L τρυπτόνη, 4.57 g/L εκχύλισμα ζύμης, 4.57 g/L NaCl, 1.6g/L inert binding agents, με ή χωρίς αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 100 µg/ml.

CCMB80: Για την Παρασκευή των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων (competent cells), χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα CCMB80 (PH=6.4). Για την παρασκευή του εν λόγω διαλύματος χρησιμοποιήθηκαν 80 mM CaCl₂·2H₂O, 20 mM MnCl₂·4H₂O, 10 mM MgCl₂·6H₂O, 10 mM οξικό κάλιο (pH=7) και 10% γλυκερόλη. Το διάλυμα αποστειρώθηκε με διήθηση από φίλτρο 0.2 µm και αποθηκεύτηκε στους 4°C.

DMEM: Για την καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς HEK-293T χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο DMEM Gibco™, High Glucose, Pyruvate κατόπιν προσθήκης 10% εμβρυικού βόειου ορού (FBS) (Gibco™) και 1% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (Gibco™)

2xHBS: Για τον μετασηματισμό της κυτταρικής σειράς HEK-293T κατά την διαδικασία παραγωγής του ιού χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα 2X HBS (pH = 7.12). Για την παρασκευή του εν λόγω διαλύματος χρησιμοποιήθηκαν 1M NaCl (Sigma-Aldrich), 1M HEPES (LONZA), 0.5 M Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich) και dH₂O. Το διάλυμα αποστειρώθηκε με διήθηση από φίλτρο 0.2 µm.

Pre-transduction medium: Για την καλλιέργεια των ανθρώπινων CD34⁺ κυττάρων τις πρώτες δύο μέρες της διαφοροποίησης χρησιμοποιήθηκε StemSpan serum-free expansion medium (SFEM, STEMCELL Technologies). εμπλουτισμένο με τις παρακάτω ανθρώπινες ανασυνδυασμένες κυτοκίνες: 100 ng/ml ιντερλευκίνη 6, 100 ng/ml Flt-3 ligand, 50 ng/ml θρομβοποιητίνη, 100 ng/ml human stem cell factor και 1% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (Gibco™). Όλες οι ανασυνδυασμένες κυτοκίνες παρέχονται από την ImmunoTools (Friesoyte, Germany)

Erythroid-medium: : Για την καλλιέργεια των ανθρώπινων CD34⁺ κυττάρων από την ημέρα 3 έως και το τέλος της ερυθροειδικής διαφοροποίησης χρησιμοποιήθηκε το StemSpan serum-

free expansion medium (SFEM STEMCELL Technologies) εμπλουτισμένο με τις παρακάτω ανασυνδυασμένες ανθρώπινες κυτοκίνες: 20% εμβρυικό βόειο ορό (FBS) (Gibco™), 50 ng/ml human stem cell factor, 10⁻⁶M β-οιστραδιόλη, 1 ng/ml ιντερλευκίνη-3, 1 unit/ml ερυθροποιητίνη, 10⁻⁶M δεξαμεθαζόνη και 1% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (Gibco™). Όλες οι ανασυνδυασμένες κυτοκίνες παρέχονται από την ImmunoTools (Friesoyte, Germany).

Θρεπτικό μέσο κατάψυξης: Το θρεπτικό μέσο (freeze medium), αποτελείται από 90%(v/v) εμβρυικό βόειο ορό (FBS) (Gibco™) και 10%(v/v) διμέθυλοσουλφοξειδίο (DMSO) (Appllichem). Το διάλυμα αποστειρώθηκε με διήθηση από φίλτρο 0.2 μm.

Πίνακας 3: Αλληλουχίες του εκάστοτε εκκινητή

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή
Mutagenesis F	CCAGGTGCTTTATGGCATTTCCCAAGGAAGTCAGC
Mutagenesis R	GCTGACTTCCTTGGGAGATGCCATAAAGCACCTGG
3'UTR F	TCTCCTTTCATCTCAACAGCTCC
3'UTR R	AACACTTCAGGGGAAAGGTGG
3D-HPFH1 F	ATCTGGATGTAGGACAATGTGAT
3D-HPFH1 R	TTTTTAGTAGAGACGGGGTTTCAC
Gamma-FP F	ACTACACACCCAGCTTCTAC
Gamma-FP R	AGAAGGTGCTGACTTCCTTG
Gamma-globin F	GCCATAAAGCACCTGGATGA
Gamma-globin R	GATTGCCAAAACGGTCACC
Alpha-globin F	CACGCTGGCGAGTATGGTG
Alpha-globin R	TTAACCTGGGCAGAGCCGT
WPRE F	TTCTCCTCCTTGATAAATCCTGGTT
WPRE R	CGCCACGTTGCCCA
hRNase P F	ATGGAATTCGAACGCTGACG
hRNase P R	GCGACATGCAAATATTGCAGG

2.2 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς HEK-293T

Για την παραγωγή, καθώς και για την τιτλοποίηση των ιικών φορέων, χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη κυτταρική σειρά νεφρικών εμβρυονικών κυττάρων HEK-293T (Human Embryonic Kidney 293 cells). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε φλάσκα 75 cm² (Corning Cell Culture Flasks Sigma=Aldrich) σε τελικό όγκο 12ml DMEM, εμπλουτισμένο 10% FBS και 1% penstrep και επώαστηκαν στους 37°C παρουσία 5% CO₂. Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων, και αφού η επιφανειακή κάλυψη φτάσει το 80%, τα κύτταρα αποκολλώνται μηχανικά με 10ml DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS και 1% penstrep και στην συνέχεια, αραιώνονται 1:10.

2.3 Κρυοσυντήρηση κυττάρων για μελλοντική χρήση

Για την κατάψυξη και μακροπρόθεσμη συντήρησή τους, τα κύτταρα αρχικά επαναδιαλύονται στο θρεπτικό μέσο κατάψυξης (freeze medium), σε συγκέντρωση 10⁵-10⁶ κύτταρα/ml και στην συνέχεια μεταφέρονται σε κρυοφιαλίδια του 1ml (VWR International) και καταψύχονται στους -80°C. Η μείωση της θερμοκρασίας των κυττάρων πραγματοποιείται σταδιακά (περίπου 1°C ανά ώρα) ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός πάγου στο εσωτερικό τους.

Η απόψυξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε 10ml θρεπτικού μέσου (DMEM για τα HEK-293T και StemSpan για τα CD34+) και σύντομη επώαση σε υδατόλουτρο στους 37°C, με ταυτόχρονη ήπια ανάδευση. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 1500 στροφές/λεπτό και επαναιώρηση στο αντίστοιχο θρεπτικό μέσο και επώαση 37°C παρουσία 5% CO₂.

2.4 Δημιουργία δεκτικών κυττάρων (competent cells)

Η δημιουργία των βακτηριακών δεκτικών κυττάρων *E. coli* (NEB stable Competent cells, New England Biolabs) πραγματοποιήθηκε χημικά, με βάση το διάλυμα CCMB80 (βλ 2.1 στα Υλικά και Μέθοδοι). Αρχικά επιστρώθηκαν τα βακτηριακά κύτταρα σε τρυβλίο Petri με θρεπτικό άγαρ, απουσία αμπικιλίνης. Στην συνέχεια, 5 μονήρεις αποικίες ενοφθαλμίστηκαν σε 250 ml θρεπτικού ζωμού χωρίς αμπικιλίνη και ακολούθησε επώαση στους 19°C υπό ανάδευση στα 300 rpm για 16-18 h. Όταν η οπτική πυκνότητα έφτασε στο OD₆₀₀ ≤ 0.3, η βακτηριακή καλλιέργεια επώαστηκε για 30 min στον πάγο. Στην συνέχεια, η υγρή καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε στους 4°C και στα 3500 rpm για 10min και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 80 ml CCMB80. Ακολούθησε επώαση για 1 h στον πάγο, και φυγοκέντρηση στα 3500 rpm για 10 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 5ml CCMB80. Ακολούθησε επώαση για 1

ηστον πάγο, και όταν η οπτική πυκνότητα OD_{600} ήταν μεταξύ 1 και 1.5, 100 μl δεκτικών πλέον βακτηρίων μοιράστηκαν σε παγωμένα σωληνάκια, τύπου errendorf. Ακολούθησε στιγμιαία ψύξη τους με υγρό άζωτο και αποθήκευσή τους στους -80°C .

Για τον υπολογισμό της απόδοσης των δεκτικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός με 100pg του πλασμιδίου PUC18 ανά 100μl δεκτικών βακτηριακών κυττάρων. Ο μετασχηματισμός έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο Bacterial Transformation (Addgene) με τη μέθοδο του θερμικού πλήγματος όπως περιγράφεται στο τμήμα 2.5. 1-10 pg εμβολιάστηκαν σε θρεπτικό άγαρ και ακολούθησε επώαση για 16-18 h στους 37°C . Η απόδοση υπολογίστηκε με βάση τον τύπο: αριθμός αποικιών/μg του DNA που επιστρώθηκε.

2.5 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Ο μετασχηματισμός των βακτηριακών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο Bacterial Transformation (Addgene) με τη μέθοδο του θερμικού πλήγματος ώστε το κυτταρικό τους τοίχωμα να καταστεί παροδικά διαπερατό. 10 pg-100 ng του εκάστοτε πλασμιδίου προστέθηκαν σε 100 μl δεκτικών βακτηριακών κυττάρων NEB stable Competent cells (New England Biolabs) και επώαστηκαν στον πάγο για 30 min. Ακολούθησε θερμικό πλήγμα στους 42°C για 30 sec και εν συνεχεία για 2 min στον πάγο. Στην συνέχεια, τα μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα προστέθηκαν σε 900 μl αποστειρωμένου θρεπτικού ζωμού και επώαστηκαν για 1 ώρα στους 37°C . Τέλος, 100-200 μl επιστρώθηκαν σε τριβλία Petri με θρεπτικό άγαρ και ακολούθησε επώαση για 16-18 h στους 37°C .

2.6 Παραγωγή πλασμιδίων σε μικρή κλίμακα (miniprep)

Από την στερεή καλλιέργεια έγινε επιλογή μονήρων αποικιών, οι οποίες καλλιεργήθηκαν ξεχωριστά σε μικρής κλίμακας υγρή καλλιέργεια LB των 5ml για 16-18 h στους 37°C . Από αυτές, ακολούθησε εξαγωγή του πλασμδιακού DNA με τη βοήθεια του kit NucleoSpin® Plasmid miniprep (MACHEREY-NAGEL) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνοπτικά, τα βακτηριακά κύτταρα επαναδιαλύθηκαν στο διάλυμα RES (RNase A 60 μg/ml) της κατασκευάστριας εταιρείας και ακολούθησε η λύση τους. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 5min στα 11000g και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε στήλη δέσμμευσης του DNA. Ακολούθησε πλύση και έκλουση του DNA σε τελικό όγκο 50 μl.

2.7 Παραγωγή πλασμιδίων σε μεγάλη κλίμακα (maxiprep)

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα πραγματοποιήθηκε με το σύστημα NucleoBond® Xtra Midi/Maxi (MACHEREY-NAGEL), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, μία μονήρης αποικία με το επιθυμητό πλασμίδιο από τρυβλίο LB agar με αμπικιλίνη (100 µg/ml), μεταφέρθηκε σε 5 ml υγρή καλλιέργεια θρεπτικού ζωμού με αμπικιλίνη και επώαστηκε για 9 ώρες στους 37°C υπο ανάδευση στα 300 rpm. Έπειτα, 500 ml υγρής καλλιέργειας μεταφέρθηκαν σε 500 ml θρεπτικού ζωμού με αμπικιλίνη (100 µg/ml) και επώαστηκαν για 16-18 h στους 37°C υπο ανάδευση στα 300 rpm. Όταν η οπτική πυκνότητα έφτασε στα προτεινόμενα από την κατασκευάστρια εταιρεία όρια, η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε στα 4000g για 20 min στους 4°C. Στη συνέχεια, το ίζημα επαναδιαλύθηκε στο διάλυμα επαναιώρησης (RES) του κιτ το οποίο περιείχε RNάση A σε συγκέντρωση 60 µg/ml. Ακολούθησε λύση των κυττάρων και επώασή τους σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε εξισορρόπηση της στήλης με την προσθήκη 25 ml buffer EQU. Με το πέρας της πεντάλεπτης επώασης, το διάλυμα εξουδετέρωσης (NEU) προστέθηκε στα κύτταρα και ακολούθησε ανάδευση έως αποχρωματισμού. Έπειτα, το διάλυμα, μεταφέρθηκε στην στήλη και πραγματοποιήθηκε πλύση με EQU, και αφού αφαιρέθηκε το εσωτερικό φίλτρο της στήλης, πραγματοποιήθηκε μια δεύτερη πλύση με το διάλυμα πλύσης Wash Buffer. Η έκλυση του πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 15 ml διαλύματος έκλυσης (ELU) και η κατακρήμνισή του με 10.5 ml ισοπροπανόλης υπό ισχυρή ανάδευση. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε για 30 min στα 15000g στους 4°C και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 4 ml 70% αιθανόλη. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 15 min στα 13000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε πλήρως και το πλασμιδιακό DNA επαναιωρήθηκε σε 500 µl αποστειρωμένου ύδατος. Η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA προσδιορίστηκε με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος A260 nm.

2.8 Πέψη και ηλεκτροφόρηση

Για τον έλεγχο της ποιότητας του εκάστοτε πλασμιδιακού DNA, πραγματοποιήθηκε πέψη 1 µg DNA με 1 unit του περιοριστικού ενζύμου ECORI (New England Biolabs, NEB) (Πίνακας 4) σε τελικό όγκο 50 µl, στους 37°C για 1 h. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

Πίνακας 4: Πρότυπο ζωνώσεων των πλασμιδίων έπειτα απο πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI

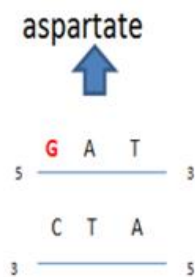
Πλασμίδια	Ένζυμο	Αναμενόμενες ζώνες (bp)
Hd24 (6426 bp)	EcoRI	1291, 5135
Fdelta30 (6236 bp)	EcoRI	1291, 4945
Gag-pol/RRE (8895 bp)	EcoRI	401, 4153, 4341
ENV (4174 bp)	EcoRI	309, 3865
GGHI-mB-3D (11564 bp)	EcoRI	1528, 1815, 8221
GFPI (8939 bp)	EcoRI	1782, 7157

Για τον έλεγχο της επιτυχία της σημειακής μεταλλαγμένης και την παραγωγή του GammaThal πραγματοποιήθηκε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο SfaNI (New England Biolabs, NEB) και το προϊόν της πέψης ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. Η αντίδραση της πέψης έγινε σε τελικό όγκο 50 μl παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος NEB Buffer3.1. Μία μονάδα (1 unit) ενζύμου χρησιμοποιήθηκε για την πέψη 1 μg DNA για 1 h στους 37°C.

2.9 Κατασκευή GammaThal

Για την κατασκευή του GammaThal, χρησιμοποιήθηκε ο πρόσφατα χαρακτηρισμένος φορέας GGHI-mB-3D από Drakoroulou et. al 2019 [71]. Για τη δημιουργία του πραγματοποιήθηκε σημειακή μεταλλαγμένη στο εξώνιο 2 του Λ γονιδίου. Η σημειακή μεταλλαγή 220G→A είναι τύπου αλλοίωσης νοήματος (missense) και σε επίπεδο πρωτεΐνης οδηγεί σε αλλαγή αμινοξέος απο ασπαρτικό οξύ σε ασπαραγίνη (Asp74→Asn).

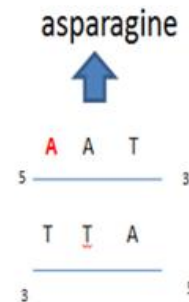
GGHI-mB-3D



FP mutation



GammaThal



Η μεταλλαξιγένεση έγινε χρησιμοποιώντας το QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (AgilentTechnologies) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR σε τελικό όγκο 50 μl, χρησιμοποιώντας 125 ng των εκκινητών mutagenesis F και mutagenesis R (βλ. Πίνακας 3) και 50 ng του πλασμιδίου GGHI-mB-3D στις παρακάτω συνθήκες: 1 min στους 95°C, 50 sec στους 95°C, 50 sec στους 60°C και 12 min στους 68°C για 18 κύκλους, 7 min στους 68°C. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα ελέγχου το πλασμίδιο pWhitescript 4.5-kb, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

Για την πέψη του αρχικού GGHI-mB-3D, χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό ένζυμο Dpn I (10U/μl) στο προϊόν της αντίδρασης και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 2 h. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, τόσο για το υπό μετάλλαξη δείγμα όσο και για δείγμα ελέγχου. Ακολούθησε μετασηματισμός σε δεκτικά κύτταρα XL10-GOLD ULTRACOMPETENT CELLS, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Τα βακτηριακά κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία LB άγαρ με αμπικιλίνη 100 μg/ml και 80 μg/ml X-gal και 20 mM IPTG για τον προσδιορισμό της απόδοσης της μεταλλαξιγένεσης. Ακολούθησε επώαση για 24 h στους 37°C και καταμέτρηση των αποικιών. Αφού συλλέχθηκαν οι αποικίες, ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.6 στα Υλικά και Μέθοδοι. Απομονώθηκε DNA τόσο από το αρχικό πλασμίδιο GGHI-mB-3D όσο και από τον GammaThal. Έπειτα το πλασμιδιακό DNA υπέστη πέψη και ηλεκτροφόρηση όπως περιγράφεται στο 2.8 στα Υλικά και Μέθοδοι.

Για να επαληθευθεί η επιτυχία της σημειακής μεταλλαξιγένεσης 220G→A (Asp74→Asn) στον GammaThal, 100 ng/μl (σε τελικό όγκο 20 μl) από το εν λόγω πλασμίδιο, καθώς και από το αρχικό GGHI-mB-3D, εστάλησαν για αλληλούχιση κατά Sanger στην Eurofins Genomics, Lab

Supplies, μαζί με 100 pmol/μl σε τελικό όγκο 20 μl από κατάλληλους εκκινητές (βλ Πίνακας 3).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης και η επαλήθευση της μεταλλαγής πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος SnapGene Viewer 4.3.8

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση επόμενης γενιάς NGS (Next Generation Sequencing), στο Ελληνικό Κέντρο Γονιδιωματικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ). Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS) έγινε με ενζυμική θραυσματοποίηση του πλασμιδιακού GammaThal DNA και κατασκευή βιβλιοθήκης συμβατή με τις πλατφόρμες αλληλούχισης της Illumina. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε από το Εργαστήριο Αιματολογίας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) με το πρόγραμμα DNASTAR.

Από το σημείο αυτό, τόσο το πλασμίδιο το οποίο περιέχει την γ-κασέτα με την σημειακή μεταλλαγή, όσο και ο λεντιϊκός φορέας γ-σφαιρίνης με φάκελο HF, θα αποκαλούνται ως GammaThal.

2.10 Μετασηματισμός HEK-293T για την παραγωγή ιού (transfection)

Η παραγωγή του ιικού φορέα πραγματοποιήθηκε με το λεντιϊκό σύστημα διαμόλυνσης τρίτης γενιάς στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά HEK-293T με την μέθοδο κατακρήμνισης με φωσφορικό ασβέστιο. Αναλυτικότερα, χρησιμοποιήθηκαν 35 μg pMDLg/pRRE, 18.2 μg pRSV-Rev (και τα δύο ευγενική χορηγία του Dr Luigi Naldini, San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy, Milano, Italy), 10.5 μg pCG-Hd24 και 10.5 μg pCG-Fdel30 (ευγενική χορηγία της Dr. Els Verhoeven, CIRI-International Center for Infectiology Research, Team EVIR, Université de Lyon), καθώς και 70 μg GGHI-mB-3D ή GammaThal. Για την παραγωγή του λεντιϊκού φορέα μάρτυρα με το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP εκτός των pMDLg/pRRE, pRSV-Rev pCG-Hd24 και pCG-Fdel30 χρησιμοποιήθηκε και το pCCLsin.PPT.hPGK.eGFP. WPRE που περιείχε την κασέτα GFP.

Το υπερκείμενο της υγρής καλλιέργειας συλλέχθηκε 48 και 72 h μετά τον μετασηματισμό, όπως περιγράφεται από τους Paranikolaou et al. 2012 [70], και συμπυκνώθηκε 100 φορές με υπερδιήθηση στα 4000g για 40 min με την χρήση 100 kDa centrifugal units (Millipore, Darmstadt, Germany). Συγκεκριμένα, το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε για 10 min στα 1500 rpm στους 4°C και κατόπιν διήθησης χρησιμοποιώντας φίλτρο 0.45 mm, συμπυκνώθηκε με

φυγοκέντρηση στα 4000g για 40 min. Το υπερκείμενο, μοιράστηκε σε κρυοφιαλίδια και αποθηκεύτηκε στους -80°C για μελλοντική χρήση.

2.11 Τιτλοποίηση ιϊκού φορέα (titration)

Ο προσδιορισμός του λειτουργικού τίτλου των λεντιϊκών φορέων γ-σφαιρίνης GGHI-mB-3D/HF και GGHI-mB-3D-FP/HF (GammaThal) πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα HEK-293T σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Salmon και Trono (*Production and Titration of Lentiviral Vectors*) [98], χρησιμοποιώντας τον GFP/HF, όπως περιγράφεται από τους Drakoroulou et al., 2019 [71].

Αναλυτικότερα, διαδοχικές αραιώσεις 1:5, 1:50, 1:500, 1:10, 1:10 και 1:100 του συμπυκνωμένου GFP/HF ιού χρησιμοποιήθηκαν για να μετάγουν 50000 HEK-293T κύτταρα για 24 h. Πέντε ημέρες αργότερα, τα μισά κύτταρα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για τον προσδιορισμό της έκφρασης GFP, ενώ στα υπόλοιπα έγινε απομόνωση γενωμικού DNA (NucleoSpin Tissue kit Macherey Nagel) και εν συνεχεία qPCR. Η qPCR έγινε με την μέθοδο της απόλυτης ποσοτικοποίησης (absolute quantitation), βασισμένη στην χρήση SYBRGreen mix (Kapa Biosystems) με εκκινητές για το στοιχείο WPRE και το γονίδιο hRNaseP. Η αλληλουχία των εκκινητών παρουσιάζεται στον Πίνακα 3. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο, η αραιώση του ιού που δίνει ποσοστό έκφρασης GFP πιο κοντά στο 10% αντιστοιχεί σε 0.1 αντίγραφα ανά κύτταρο. Συσχετίζοντας VCN και Cts κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη $y = -3.8479x - 1.4667$ $R^2 = 0.999$ που χρησιμοποιήθηκε εν συνεχεία για τον υπολογισμό των τίτλων των GGHI-mB-3D και GammaThal λεντιϊκών φορέων. Η τιτλοποίηση των εν λόγω φορέων γ-σφαιρίνης πραγματοποιήθηκε κατόπιν απομόνωσης του γενωμικού DNA και qPCR (χωρίς να πραγματοποιηθεί κυτταρομετρία ροής) χρησιμοποιώντας τους ίδιους εκκινητές.

2.12 Απομόνωση ανθρώπινων CD34⁺ κυττάρων, μεταγωγή και χειρισμός

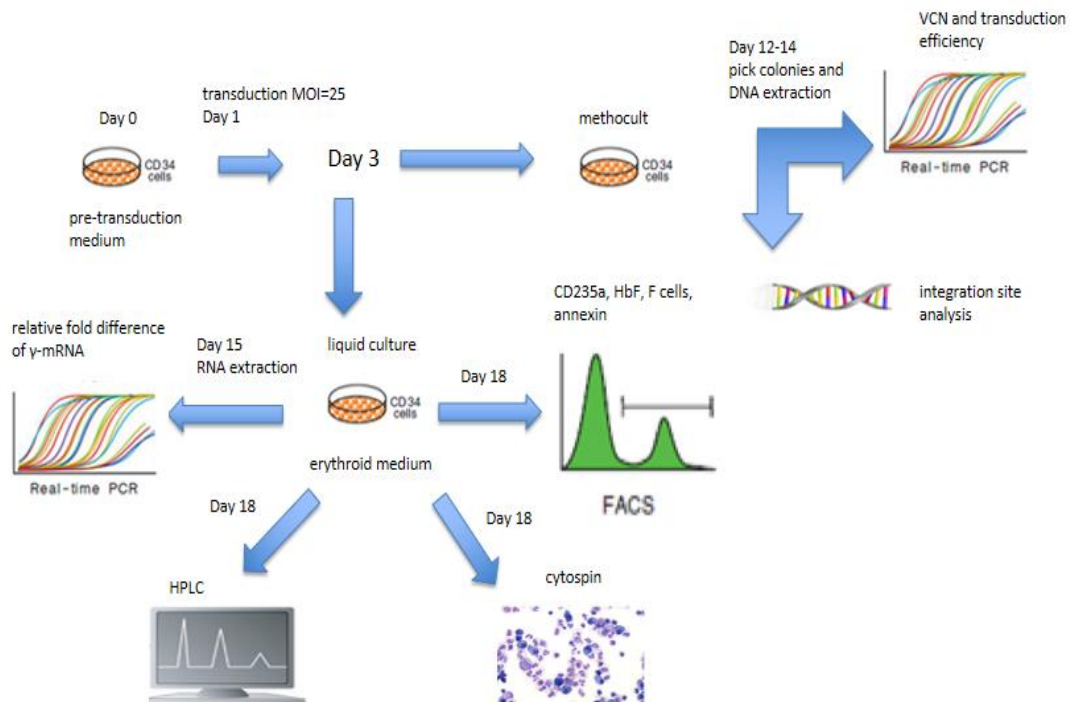
Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα προήλθαν από μη κινητοποιημένο περιφερικό αίμα 3 υγιών και 4 θαλασσαιμικών dotών από το Κέντρο Θαλασσαιμίας και Δρεπανοκυτταρικής Νόσου του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών. Η λήψη των θαλασσαιμικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε την ημέρα της προγραμματισμένης αιμοληψίας, μετά από Ενημερωμένη Συναίνεση. Μετά τη λήψη 10 ml από κάθε δότη μη κινητοποιημένου περιφερικού αίματος, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός με φυγοκέντρηση παρουσία φυκόλης, και συλλέχθηκε η στοιβάδα των μονοπύρηνων από τα οποία και ακολούθησε η απομόνωση των CD34⁺ κυττάρων, χρησιμοποιώντας το EasySep Human CD34⁺ Selection kit και τον μαγνήτη Purple

EasySep Magnet (STEMCELL Technologies, Cambridge, United Kingdom), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Αφού απομονώθηκαν και προσδιορίστηκε ο αριθμός τους, ακολούθησε επαναδιάλυση σε θρεπτικό pre-transduction serum-free medium (StemSpan serum-free expansion medium {SFEM}, STEMCELL Technologies) (βλ. 2.1 στα Υλικά και Μέθοδοι) και επώαση στους 37°C για 24 h παρουσία 5% CO₂. Η επαναϊώρηση έγινε σε συγκέντρωση 10⁵ κύτταρα/ml σε θρεπτικό εμπλουτισμένο με τις ακόλουθες ανασυνδυασμένες ανθρώπινες κυτοκίνες: 100 ng/ml ιντερλευκίνη 6, 100 ng/ml Flt-3 ligand, 50 ng/ml θρομβοποιητίνη και 100 ng/ml human stem cell factor. Την επόμενη μέρα ακολούθησε μεταγωγή των κυττάρων (10⁴-10⁵ κύτταρα) με τον ιικό φορέα σε 48-well Retronectin (Takara)-coated plates σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας. Η πολλαπλότητα μόλυνσης (MOI, multiplicity of infection) που χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων ήταν 25. Η απαιτούμενη ποσότητα ιού υπολογίστηκε με βάση τον τύπο:

$$\text{Όγκος ιϊκού φορέα (ml)} = (\text{MOI} * \text{Αριθμός των κυττάρων}) / \text{Τίτλος του ιού (titer)}$$

Τα κύτταρα έμειναν στην καλλιέργεια για 18 ημέρες. Οι πειραματικές ομάδες ήταν 2, κύτταρα μή μεταγμένα και κύτταρα μεταγμένα με τον ιικό φορέα GammaThal. Την επόμενη μέρα απο την μεταγωγή με τον ιικό φορέα, τα κύτταρα χωρίστηκαν σε 2 διαφορετικές καλλιέργειες, την υγρή καλλιέργεια ερυθροειδικής διαφοροποίησης και την ημιστερεή κλωνογενή καλλιέργεια. Η πειραματική πορεία που ακολούθηθηκε απεικονίζεται παρακάτω στην Εικόνα 2.1.



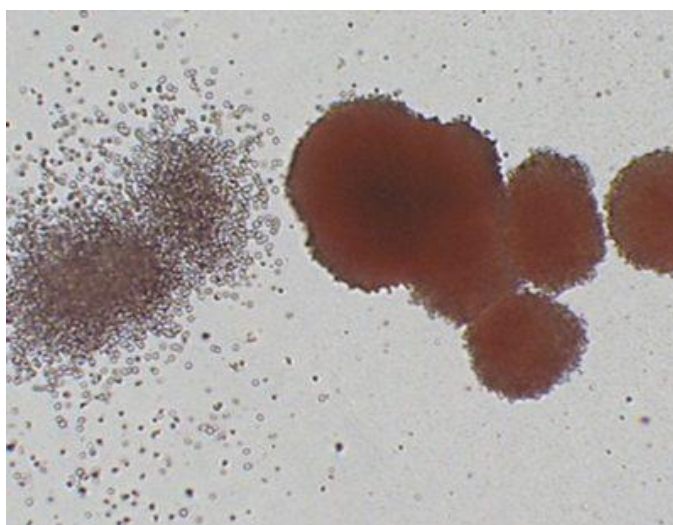
Εικόνα 2.1: Απεικόνιση του πειραματικού σχεδιασμού

2.13 Υγρή καλλιέργεια ερυθροειδικής διαφοροποίησης CD34⁺ κυττάρων

Μετά 24 h από την μεταγωγή, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με DPBS και φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στις 1800 rpm, επαναδιαλύθηκαν σε θρεπτικό μέσο ερυθροειδικής διαφοροποίησης (erythroid medium) και καταμετρήθηκαν. Το θρεπτικό υλικό StemSpan SFEM, περιείχε 20% εμβρυικό ορό βοδιού (FBS), 50 ng/ml human stem cell factor, 10^{-6} M β-οιστραδιόλη, 1 ng/ml ιντερλευκίνη-3, 1 unit/ml ερυθροποιητίνη και 10^{-6} M δεξαμεθαζόνη. Η καλλιέργεια διήρκεσε 18 ημέρες και περίπου ανά τρεις ημέρες τα κύτταρα καταμετρούνταν και ανανεωνόταν το θρεπτικό υλικό τους. Την ημέρα 15, πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA από 10^5 κύτταρα έτσι ώστε να ελεγχθεί αν υπάρχει διαφορά σε επίπεδο mRNA για το γονίδιο της γ-σφαιρίνης μεταξύ των μεταγμένων και των μή μεταγμένων κυττάρων. Επιπλέον, έγινε φύλαξη ποσότητας RNA στους -80°C για μελλοντική χρήση. Με το πέρας της καλλιέργειας, τα κύτταρα ελέγχθηκαν με κυτταρομετρία ροής ως προς τα επίπεδα ερυθροειδικής διαφοροποίησης, την έκφραση της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης και το ποσοστό της απόπτωσης. Τέλος, 10^5 κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση της αποτελεσματικότητας της ερυθροποίησης μέσω cytospin και 10^6 κύτταρα κρατήθηκαν ως ίζημα και εστάλησαν για ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

2.14 Αποικίες προγονικών κυττάρων (colony-forming assays)

Για την δημιουργία αποικιών, 2×10^3 κύτταρα προστέθηκαν σε 3ml μεθυλοκυτταρίνης (Methocult H4434 STEMCELL Technologies) και εν συνεχεία επιστρώθηκαν σε τρυβλία Petri 35mm^2 (Corning) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Με το πέρας 11 ημερών καταμετρήθηκαν όλες οι αποικίες (BFU-e, CFU-GM, CFU-GEMM) και συλλέχθηκαν οι BFU-e αποικίες ώστε να υπολογιστεί το ποσοστό μεταγωγής (transduction efficiency), ο αριθμός των ιικών αντιγράφων/κύτταρο (vector copy number-VCN), καθώς και για να πραγματοποιηθεί ανάλυση του προτύπου ενσωμάτωσης του διαγονιδίου στο DNA του κυττάρου.



Εικόνα 2.2: Κλωνογενείς αποικίες μεθυλοκυτταρίνης. Αριστερα: λευκή μυελική αποικία CFU-e. Δεξιά: ερυθρή αποικία BFU-e

2.15 Απομόνωση γενωμικού DNA

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση γενωμικού DNA, τόσο στην κυτταρική σειρά HEK293T κατά την τιτλοποίηση των ιικών φορέων όσο και στα αρχέγονα αιμοποιητικά $\text{CD}34^+$ κύτταρα για τον προσδιορισμό του VCN. Η απομόνωση έγινε σύμφωνα με το Nucleospin Tissue Genomic DNA from tissue (Macherey-Nagel). Συγκεκριμένα, 10^5 - 5×10^5 κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στα 1800 rpm σε θερμοκρασία δωματίου και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 180 μl T1, 25 μl πρωτεϊνάση K και 200 μl B3 και ακολούθησε επώαση στους 70°C για 10 min, ώστε να πραγματοποιηθεί λύση των κυττάρων. Στην συνέχεια, ακολούθησε προσθήκη 70% αιθανόλης και μεταφορά στην στήλη Nucleospin Tissue Column. Ακολούθησαν 2 πλύσεις με τα διαλύματα BW και B5 και έκλυση του γενωμικού DNA με το διάλυμα BE σε τελικό όγκο από 30-100 μl .

2.16 Απομόνωση RNA

Απομόνωση RNA πραγματοποιήθηκε στα αρχέγονα αιμοποιητικά CD34⁺ κύτταρα, την ημέρα 15 της υγρής καλλιέργειας ερυθροειδικής διαφοροποίησης έτσι ώστε να προσδιοριστεί η έκφραση της γ-σφαιρίνης σε επίπεδο μεταγράφου. Η απομόνωση έγινε σύμφωνα με το Nucleospin RNA Plus RNA isolation (Macherey-Nagel). Συγκεκριμένα, 10⁵-10⁶ κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στα 1800 rpm σε θερμοκρασία δωματίου και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 350 μl LBP ώστε να γίνει η κυτταρική λύση. Στην συνέχεια, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν στη στήλη συγκράτησης του DNA, Nucleospin gDNA Removal Column και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 30 sec στα 11000g. Προστέθηκαν 100 μl Binding Solution BS στο έκλουμα και ακολούθησε μεταφορά των κυττάρων στη στήλη Nucleospin RNA Plus Column και έπειτα από μια πλύση με το WB1 και 2 πλύσεις με το WB2, πραγματοποιήθηκε έκλυση του RNA σε RNase-free νερό σε τελικό όγκο 30 μl. Η συγκέντρωσή του RNA προσδιορίστηκε με φωτομέτρηση στο φωτόμετρο Quawell UV-Vis spectrophotometer Q5000.

2.17 Ανάλυση RNA με qPCR

Ο προσδιορισμός των επιπέδων της γ-σφαιρίνης σε επίπεδο μεταγράφου μεταξύ μεταγμένων και μή μεταγμένων κυττάρων, προσδιορίστηκε με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) και την μέθοδο ΔΔCT [99]. Την ημέρα 15, συλλέχθηκαν 10⁵ κύτταρα από την υγρή καλλιέργεια ερυθροειδικής διαφοροποίησης, μεταγμένων με τον φορέα και μή μεταγμένων, και ακολούθησε απομόνωση του RNA, χρησιμοποιώντας το Nucleospin RNA Plus Kit (Macherey-Nagel). Το απομονωμένο RNA φωτομετρήθηκε και ακολούθησε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής σύμφωνα με το πρωτόκολο της TAKARA PrimeScript RT reagent kit (Perfect Real Time). Η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής πραγματοποιήθηκε με OligodT εκκινητές και RNA το οποίο δεν ξεπερνούσε τα 500 ng σε τελικό όγκο αντίδρασης 10 μl. Για να επιτευχθεί η αντίστροφη μεταγραφή, το διάλυμα της αντίδρασης, επώαστηκε για 15 min στους 37°C και έπειτα για 5sec στους 85°C ώστε να απενεργοποιηθεί το ένζυμο. Ακολούθως, το cDNA χρησιμοποιήθηκε σε αντίδραση qPCR με SYBRGreen mix (Kapa Biosystems). Η συγκέντρωση του cDNA ανά αντίδραση δεν ξεπερνούσε τα 20 ng. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν για το γονίδιο της γ-σφαιρίνης, ενώ για το γονίδιο αναφοράς (reference gene) χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για το ανθρώπινο γονίδιο της α-σφαιρίνης (Πίνακας 3).

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στις ακόλουθες συνθήκες: 95°C για 3sec και 95°C για 3 sec, 60°C για 20 sec για 40 κύκλους.

2.18 Κυτταρομετρία ροής

Κύτταρα CD34⁺, μεταγμένα και μη μεταγμένα με τον GammaThal, αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής τις ημέρες απο 15 έως 18, έτσι ώστε να προσδιοριστούν τα επίπεδα ερυθροειδικής διαφοροποίησης των κυττάρων, τα ποσοστά έκφρασης της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης, το ποσοστό των F κυττάρων, καθώς και το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων. Ως F-κύτταρα ορίζονται τα διαφοροποιημένα CD34⁺ κύτταρα τα οποία εκφράζουν 3-7% την ανθρώπινη εμβρυική αιμοσφαιρίνη υπο φυσιολογικές συνθήκες [100]. Τα F-κύτταρα είναι διπλά θετικά για το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης γλυκοφορίνης A, συζευγμένο με PE φθοριόχρωμα (CD235a PE) και για το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης εμβρυικής αιμοσφαιρίνης, συζευγμένο με FITC φθοριόχρωμα (anti-HbF FITC).

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η εξωκυττάρια χρώση με το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης γλυκοφορίνης A, συζευγμένο με PE φθοριόχρωμα (CD235a PE monoclonal antibody BD Pharmingen). Στην συνέχεια, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με το Cytotfix/Cytoperm kit (BD Pharmingen και ακολούθησε ενδοκυττάρια χρώση με το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης εμβρυικής αιμοσφαιρίνης, συζευγμένο με FITC φθοριόχρωμα (anti-HbF FITC monoclonal antibody BD Pharmingen).

Όσον αφορά τον προσδιορισμό της απόπτωσης, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Drakoroulou et al 2019 [71] και το FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD (Biolegend) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνοπτικά, 10⁵ κύτταρα απο την υγρή καλλιέργεια διαφοροποίησης, ξεπλύθηκαν 2 φορές με PBS που περιείχε 1% FBS και στην συνέχεια επαναιωρήθηκαν σε Annexin-V binding buffer σε συγκέντρωση 0.25-1*10⁷ κύτταρα/ml. 5 μl Annexin-FITC και 5μl 7-AAD χρησιμοποιήθηκαν ανά δείγμα. Ακολούθησε επώαση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι, προστέθηκαν επιπλέον 400 μl Annexin-V binding buffer και ακολούθησε ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.

Για όλα τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε το κυτταρόμετρο Cytomics FC500 CXP Series Flow Cytometry System (Beckman Coulter, Nyon, Switzerland), ενώ η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό FlowJo X.

2.19 Επίστρωση ερυθροβλαστών σε αντικειμενοφόρο πλάκα με φυγοκέντρηση (Cytospins)

Για την αξιολόγηση του σταδίου της ερυθροειδικής διαφοροποίησης την ημέρα 18, 10^5 κύτταρα και απο τις 2 πειραματικές ομάδες (μεταγμένα με τον φορέα GammaThal και μη μεταγμένα κύτταρα), επιστρώθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα με φυγοκεντρήθηκαν σε επιτραπέζια φυγόκεντρο (Shandon cytospin 4 Thermo Scientific) για 5min στις 1000 rpm. Ακολούθησε μονιμοποίηση και χρώση με Giemsa, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. 30 διαφορετικά οπτικά πεδία ανά πλάκα ελέχθησαν και καταμετρήθηκε ο αριθμός των ορθοχρωματικών ερυθροβλαστών, τόσο στα μεταγμένα όσο και στα μη μεταγμένα κύτταρα, με την βοήθεια του προγράμματος Image J.

2.20 Προσδιορισμός ενσωματωμένων ιϊκών αντιγράφων ανά κύτταρο και αποτελεσματικότητας μεταγωγής

Ο προσδιορισμός της αποτελεσματικότητας μεταγωγής και των ιϊκών αντιγράφων ανά κύτταρο πραγματοποιήθηκε έπειτα απο ανάλυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR). Συγκεκριμένα απομονώθηκε DNA από 20-30 μονήρεις αποικίες BFU-e ανά ασθενή που είχαν μεταχθεί με τον ιικό φορέα. Στην συνέχεια ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με εκκινητές για την γ-σφαιρίνη (Πίνακας 3) και πολυμεράση GoTaqG2 Green MasterMix 2x (Promega). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25 μl στις παρακάτω συνθήκες: 95°C για 10 min, στους 95°C για 15 sec, στους 60°C για 30 sec και στους 72°C για 1 min, για 40 κύκλους και τέλος στους 72°C για 15 min. Το προϊόν της αντίδρασης, ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Οι εκκινητές για την γ-σφαιρίνη, προσδέονται τόσο στο ενδογενές γ-γονίδιο των CD34⁺ κυττάρων, όσο και στο διαγονίδιο. Το ενδογενές γονίδιο δίνει ενα προϊόν στις 1009 bp, ενώ το προϊόν του διαγονιδίου είναι στις 282 bp. Παρουσία και των 2 άνω ζωνών σημαίνει ότι πρόκειται για μεταγμένα με τον ιό κύτταρα, ενώ παρουσία μόνο της 1009 bp παραπέμπει σε μη μεταγμένα κύτταρα. Σε κάθε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, χρησιμοποιήθηκαν και αρνητικοί μάρτυρες (αποικία μη μεταγμένων κυττάρων) και θετικοί μάρτυρες (αποικία μεταγμένων κυττάρων).

Η αποτελεσματικότητα μεταγωγής αξιολογήθηκε στις BFUe αποικίες που περιείχαν την αλληλουχία του διαγονιδίου. Στην συνέχεια, οι θετικές για το διαγονίδιο αποικίες, αναλύθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR), ώστε να

προσδιοριστεί ο αριθμός των ενσωματωμένων ιϊκών αντιγράφων ανά κύτταρο. Πραγματοποιήθηκε απόλυτη ποσοτικοποίηση (absolute quantitation) με εκκινητές για τη γ-σφαιρίνη και hRNaseP για το γονίδιο αναφοράς. Η αλληλουχία των εκκινητών παρουσιάζεται στον Πίνακα 3. Χρησιμοποιήθηκε SYBRGreen mix (Kapa Biosystems) και οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν 95°C για 3 sec και 95°C για 3 sec και 60°C για 20 sec για 40 κύκλους. Για τον υπολογισμό του αριθμού ιϊκών αντιγράφων ανά κύτταρο χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες καμπύλες για το πλασμίδιο και για το γενωμικό DNA. Οι πρότυπες καμπύλες δημιουργήθηκαν με διαδοχικές αραιώσεις του GammaThal και διαδοχικές αραιώσεις γενωμικού DNA των CD34⁺ κυττάρων, σύμφωνα με το πρωτόκολλο Creating Standard Curves with Genomic DNA or Plasmid DNA Templates for Use in Quantative PCR (Applied Biosystems). Θετικές θεωρήθηκαν οι αποικίες που είχαν VCN \geq 0.1.

2.21 Στατιστική ανάλυση

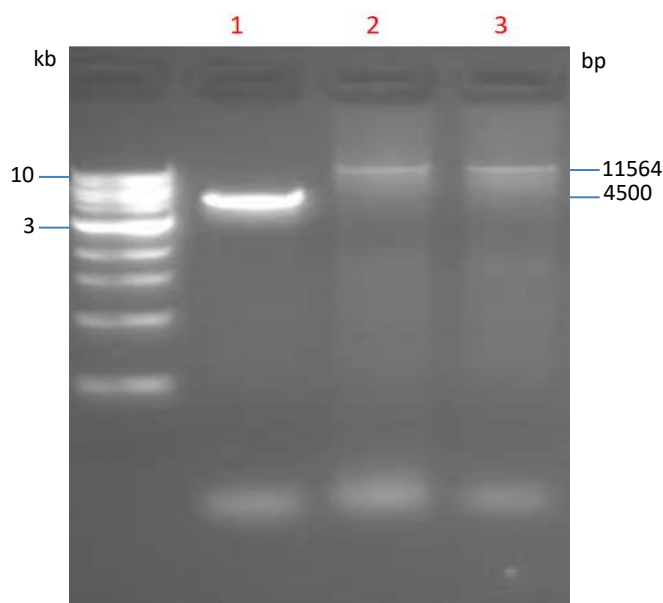
Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο πρόγραμμα GraphPad Prism 5. Η σύγκριση διαφορετικών παραμέτρων μεταξύ διαφορετικών ομάδων πραγματοποιήθηκε με Paired two-tailed Student's t-test, 2-way Anova, 1-way ANOVA Kruskal-Wallis test, ενώ για την σύγκριση ανεξάρτητων μέσων όρων το Unpaired two-tailed Student's t-test. . Οι κάθετες γραμμές στα διαγράμματα απεικονίζουν την σταθερά απόκλισης (standard deviation, SD). Για τον προσδιορισμό των έκτοπων τιμών (outliers) χρησιμοποιήθηκε το Microsoft Excel.

Αποτελέσματα

3.1 Κατασκευή λεντιϊκού φορέα GammaThal

Ο GammaThal είναι ένας λεντιϊκός φορέας με διαγονίδιο γ-σφαιρίνης και φάκελο που προέρχεται από τον ιό της ιλαράς ψευδοτυπημένο με τις γλυκοπρωτεΐνες HF. Η κατασκευή του βασίστηκε στον προηγουμένως χαρακτηρισμένο λεντιϊκό φορέα γ-σφαιρίνης GGHI-mB-3D [71]. Για να κατασκευαστεί ο GammaThal, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, πραγματοποιήθηκε μια σημειακή μεταλλαξιγένεση στο εξώνιο 2 του γ γονιδίου. Η σημειακή μεταλλαγή 220G→A είναι τύπου αλλοίωσης νοήματος (missense) και σε επίπεδο πρωτεΐνης οδηγεί σε αλλαγή αμινοξέος από ασπαρτικό οξύ σε ασπαραγίνη (Asp74→Asn). Ο προκύπτων πολυμορφισμός της HbF (Forest Park, FP) επιτρέπει την διάκριση με HPLC, της ενδογενούς HbF από αυτήν που παράγεται λόγω του διαγονιδίου.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μεταλλαξιγένεσης QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies), έπειτα από την PCR, ακολούθησε πέψη του αρχικού πλασμιδίου GGHI-mB-3D, με το περιοριστικό ένζυμο Dpn I (10 U/μl) ώστε να πραγματοποιηθεί επιλογή του νεοσυντιθέμενου DNA που περιέχει την μετάλλαξη. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, τόσο για το υπό μετάλλαξη δείγμα όσο και για το πλασμίδιο ελέγχου pWhitescript 4.5-kb το οποίο παρέχεται από την κατασκευάστρια εταιρεία. Στην Εικόνα 3.1 φαίνονται οι αναμενόμενες ζώνες για τα 2 πλασμίδια, οι οποίες είναι στα 11564 bp για το υπό μετάλλαξη δείγμα και στα 4500 bp για το πλασμίδιο ελέγχου.



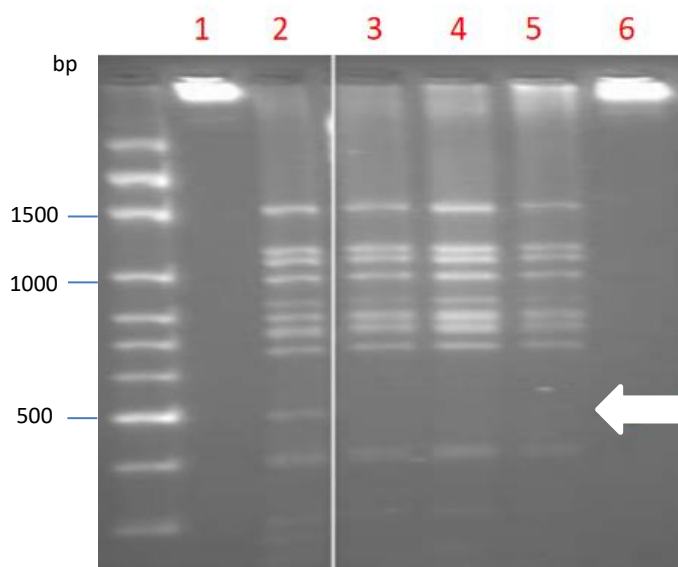
Εικόνα 3.1: Πρότυπο ηλεκτροφόρησης έπειτα από πέψη του GGHI-mB-3D, με το ένζυμο Dpn I και χρήση του 1 kb ladder (NEB), Θέση 1: δείγμα ελέγχου pWhitescript 4.5-kb control template, Θέση 2,3: πλασμίδιο GGHI-mB-3D-FP

Ο πρώτος έλεγχος της επιτυχημένης σημειακής μεταλλαγμένης Forest Park 220G→A (Asp74→Asn) στο αρχικό πλασμίδιο GGHI-mB-3D, πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση έπειτα απο πέψη του GGHI-mB-3D και του GammaThal με το περιοριστικό ένζυμο SfaNI. Το αναμενόμενο πρότυπο ζωνώσεων παρουσιάζεται στην παρακάτω Εικόνα 3.2

GGHI-mB-3D				GammaThal			
#	Ends	Coordinates	Length (bp)	#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	SfaNI-SfaNI	4717-6199	1483	1	SfaNI-SfaNI	5362-6844	1483
2	SfaNI-SfaNI	2210-3332	1123	2	SfaNI-SfaNI	8229-9351	1123
3	SfaNI-SfaNI	718-1769	1052	3	SfaNI-SfaNI	9792-10843	1052
4	SfaNI-SfaNI	11327-717	955	4	SfaNI-SfaNI	10844-234	955
5	SfaNI-SfaNI	10492-11326	835	5	SfaNI-SfaNI	235-1069	835
6	SfaNI-SfaNI	9301-10077	777	6	SfaNI-SfaNI	1484-2260	777
7	SfaNI-SfaNI	3333-4063	731	7	SfaNI-SfaNI	4600-5361	762
8	SfaNI-SfaNI	7327-8039	713	8	SfaNI-SfaNI	7498-8228	731
9	SfaNI-SfaNI	8641-9300	660	9	SfaNI-SfaNI	3522-4234	713
10	SfaNI-SfaNI	6475-6961	487	10	SfaNI-SfaNI	2261-2920	660
11	SfaNI-SfaNI	8040-8442	403	11	SfaNI-SfaNI	3119-3521	403
12	SfaNI-SfaNI	10104-10491	388	12	SfaNI-SfaNI	1070-1457	388
13	SfaNI-SfaNI	6200-6474	275	13	SfaNI-SfaNI	6845-7096	252
14	SfaNI-SfaNI	4465-4716	252	14	SfaNI-SfaNI	9352-9600	249
15	SfaNI-SfaNI	1961-2209	249	15	SfaNI-SfaNI	7279-7497	219
16	SfaNI-SfaNI	4064-4282	219	16	SfaNI-SfaNI	4399-4599	201
17	SfaNI-SfaNI	6962-7162	201	17	SfaNI-SfaNI	9601-9791	191
18	SfaNI-SfaNI	1770-1960	191	18	SfaNI-SfaNI	7097-7278	182
19	SfaNI-SfaNI	4283-4464	182	19	SfaNI-SfaNI	4235-4398	164
20	SfaNI-SfaNI	7163-7326	164	20	SfaNI-SfaNI	2921-3037	117
21	SfaNI-SfaNI	8524-8640	117	21	SfaNI-SfaNI	3038-3118	81
22	SfaNI-SfaNI	8443-8523	81	22	SfaNI-SfaNI	1458-1483	26
23	SfaNI-SfaNI	10078-10103	26	23	SfaNI-SfaNI		

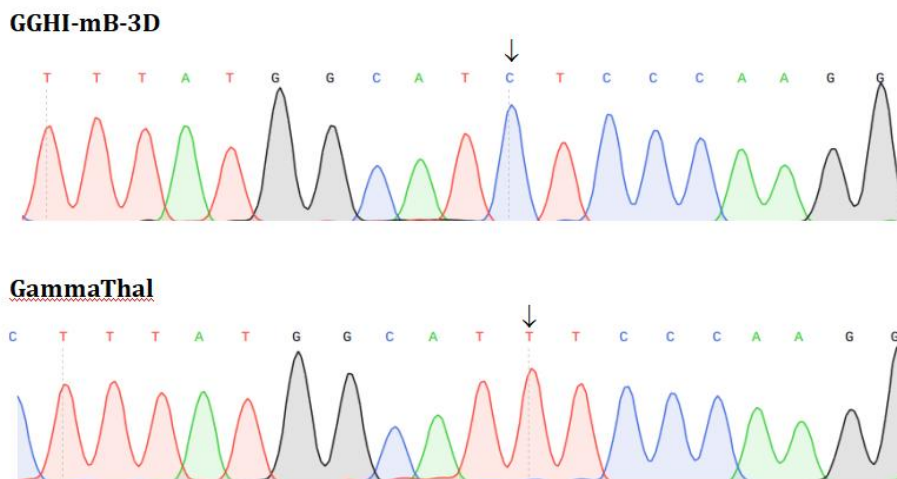
Εικόνα 3.2: Πρότυπο ζωνώσεων έπειτα απο πέψη με το περιοριστικό ένζυμο SfaNI στο αρχικό πλασμίδιο GGHI-mB-3D και στον GammaThal

Το προϊόν της πέψης ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 3% όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.3.



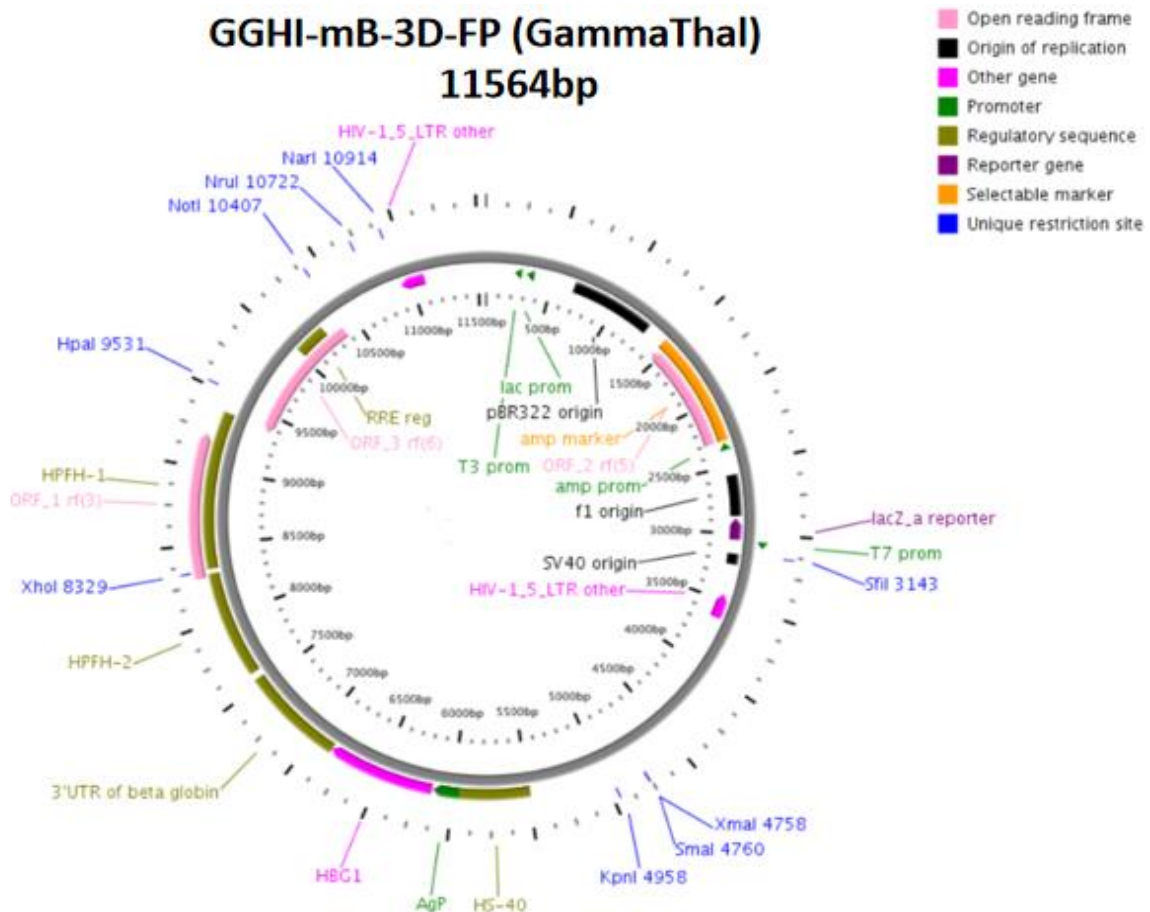
Εικόνα 3.3: Ηλεκτροφόρηση του αρχικού GGHI-mB-3D και GammaThal έπειτα από πέψη με SfaNI και χρήση του 100 bp ladder, Θέση 1: GGHI-mB-3D uncut, Θέση 2: GGHI-mB-3D cut, Θέση 3,4,5: GammaThal cut, Θέση 6: GammaThal uncut. Με λευκό βέλος φαίνεται η ζώνη που απουσιάζει απο τον GammaThal στα 487 bp, ενώ στο GGHI-mB-3D εμφανίζεται

Η επιβεβαίωση της επιτυχημένης μεταλλαξιγένεσης προήλθε από αλληλούχηση κατά Sanger στην Eurofins Genomics, Lab Supplies (βλ.2.9 στα Υλικά και Μέθοδοι), όπως φαίνεται στην παρακάτω Εικόνα 3.4.



Εικόνα 3.4: Χρωματογράφημα που δείχνει την σημειακή μεταλλαγή C→T(στην 3'-5' αλυσίδα)

Τέλος, έπειτα από αλληλούχηση επόμενης γενιάς (NGS) ολόκληρου του πλασμιδίου GGHI-mB-3D-FP (GammaThal), κατασκευάστηκε ο πλασμιδιακός χάρτης με το πρόγραμμα PlasMapper όπως φαίνεται στην παρακάτω Εικόνα 3.5.



Εικόνα 3.5: Πλασμιδιακός χάρτης του GGHI-mB-3D-FP (GammaThal)

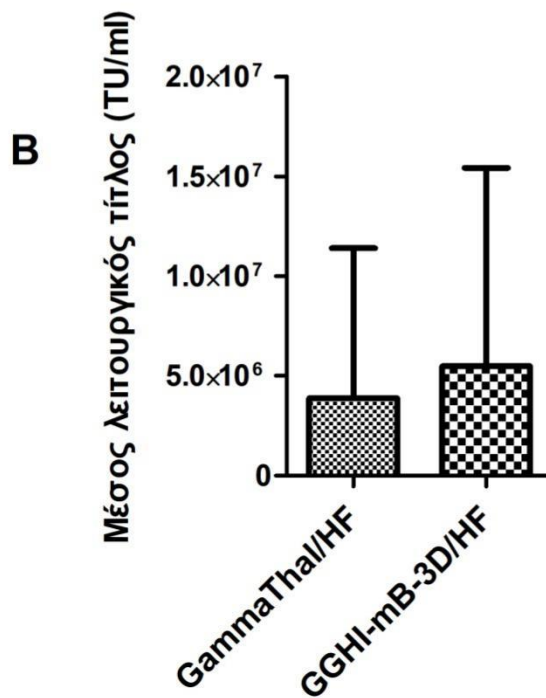
3.2 Λειτουργικός τίτλος των νέων λεντιϊκών φορέων GGHI-mB-3D και GammaThal

Για τον προσδιορισμό των λειτουργικών τίτλων των φορέων γ σφαιρίνης GGHI-mB-3D/HF και GammaThal/HF, χρησιμοποιήθηκε ο φορέας μάρτυρας GFP/HF όπως περιγράφεται από τους Salmon and Trono [98] και κατασκευάστηκε η πρότυπη εξίσωση συσχέτισης $\Delta Ct(y)$ και $\log VCN(x)$: $y = -3.8479x - 1.4667$ $R^2 = 0.999$.

Ακολούθως στην Εικόνα 3.6Α φαίνεται ο τίτλος του κάθε ιϊκού φορέα που παρήχθη σε ιικά σωματίδια/ml, καθώς και γράφημα (Εικόνα 3.6B) όπου εμφανίζονται οι μέσοι τίτλοι των ιϊκών φορέων GGHI-mB-3D και GammaThal. Ο μέσος λειτουργικός τίτλος για τον GGHI-mB-3D υπολογίστηκε σε $5.48 \times 10^6 \pm 9.95 \times 10^6$ (n=11), ενώ για τον GammaThal $3.881 \times 10^6 \pm 7.51 \times 10^6$ (n=15), με την διαφορά μεταξύ τους να μην είναι στατιστικά σημαντική (two-tailed Student's t-test unpaired p=0.6443).

A

Παραγωγές ιικών φορέων	GGHI-mB-3D/HF Titer (TU/ml)	GammaThal/HF Titer (TU/ml)
LOT1	6.45×10^6	2.9×10^7
LOT2	6.68×10^5	8.6×10^6
LOT3	2.8×10^6	5.9×10^6
LOT4	2.4×10^5	1.23×10^6
LOT5	1.41×10^5	3.3×10^6
LOT6	3.4×10^7	1.4×10^5
LOT7	1.8×10^6	1.5×10^5
LOT8	1×10^7	2.7×10^5
LOT9	4.1×10^5	1.4×10^6
LOT10	4.7×10^5	7.26×10^6
LOT11	3.3×10^6	2.3×10^5
LOT12		2.5×10^5
LOT13		3.59×10^5
LOT14		8.5×10^4
LOT15		3.5×10^4



Εικόνα 3.6: Τίτλοποίηση ιικών φορέων. (A) Παρουσίαση των ιικών τίτλων σε ιικά σωματίδια/ml για τον GGHI-mB-3D/HF και τον GammaThal/HF. (B) Μέσος ιικός τίτλος των GGHI-mB-3D/HF και GammaThal/HF (unpaired, two-tailed Student's t-test, $p=0.6443$, $n=26$). Οι κάθετες γραμμές απεικονίζουν την σταθερά απόκλισης \pm SD

3.3 Αξιολόγηση του φορέα GammaThal σε CD34⁺ κύτταρα υγιών δοτών

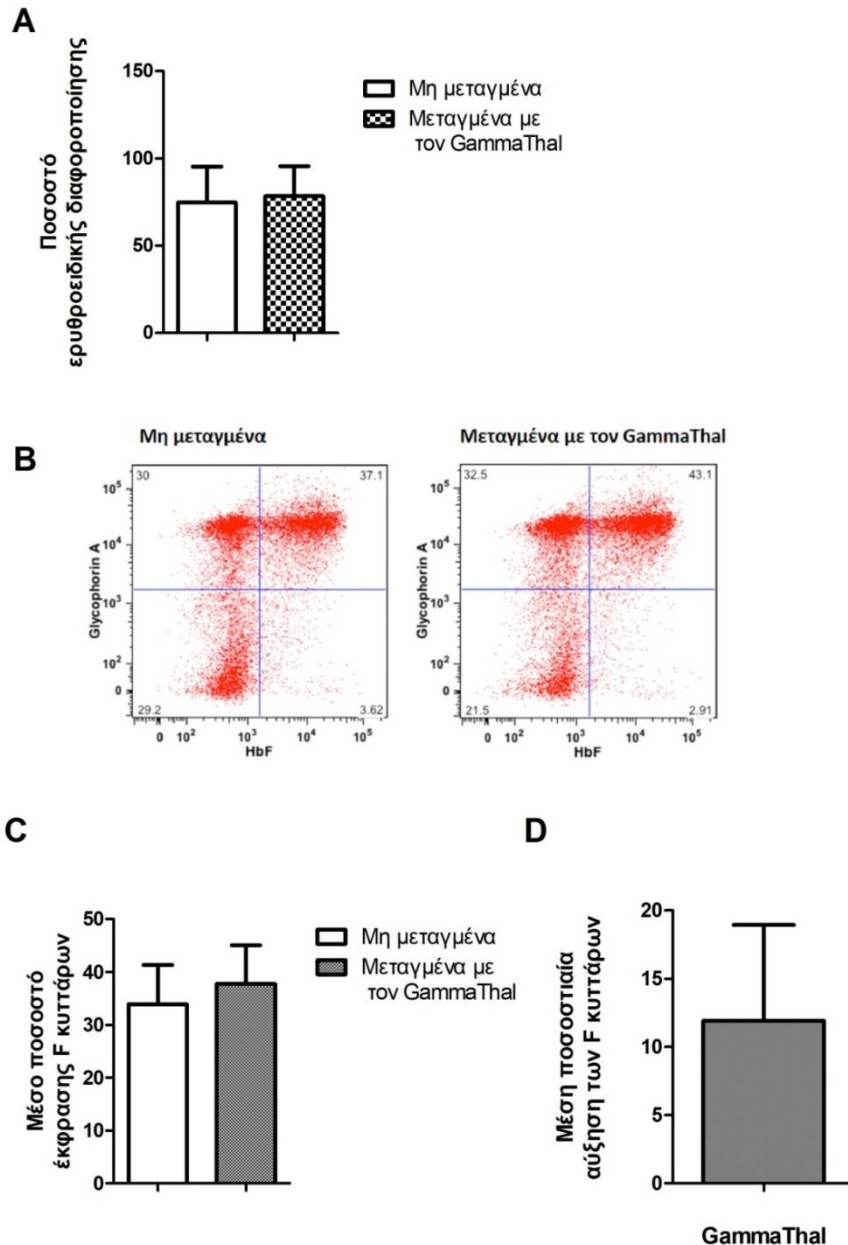
Προκείμενου να αξιολογήσουμε την αποτελεσματικότητα του νέου φορέα GammaThal, αρχικά απομονώθηκαν αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα από 10ml περιφερικού αίματος 3 υγιών δοτών. Τα κύτταρα μετάχθηκαν με τον ιικό φορέα GammaThal ο οποίος περιείχε το θεραπευτικό διαγονίδιο της γ-σφαιρίνης σε MOI 25. Μη μεταγμένα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

3.3.1 Αυξημένη παραγωγή F-κυττάρων μετά από μεταγωγή των CD34⁺ κυττάρων με τον φορέα GammaThal

Η αξιολόγηση του νέου φορέα GammaThal, αρχικά πραγματοποιήθηκε με μέτρηση των επιπέδων των F-κυττάρων και της ερυθροειδικής διαφοροποίησης μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα επίπεδα ερυθροειδικής διαφοροποίησης των CD34⁺ κυττάρων μετρήθηκαν με το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης γλυκοφορίνης A, συζευγμένο με PE φθοριόχρωμα (CD235a PE). Η εξωκυττάρια χρώση με τον δείκτη CD235 πραγματοποιήθηκε τις ημέρες 15-18 στις οποίες το κυτταρικό ίζημα είχε κόκκινο χρώμα, γεγονός που υποδηλώνει επιτυχημένη διαφοροποίηση προς ερυθροειδική σειρά. Στην Εικόνα 3.7A και στον Πίνακα 5 φαίνεται το μέσο ποσοστό ερυθροειδικής διαφοροποίησης στα μη μεταγμένα κύτταρα και στα μεταγμένα με τον φορέα GammaThal. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε πως το μέσο ποσοστό διαφοροποίησης προς προερυθροβλάστες στα μη μεταγμένα κύτταρα ανήλθε στο 74.83%±20.47% ενώ στα μεταγμένα CD34⁺ 78.4%±17.16%, με την μικρή αυτή διαφορά να μην είναι στατιστικά σημαντική ($p=0.269$, $n=3$).

Όσον αφορά, στο ποσοστό των διαφοροποιημένων κυττάρων που εκφράζουν την εμβρυική αιμοσφαιρίνη (F-κύτταρα) (βλ. 2.18 στα Υλικά και Μέθοδοι), υπολογίστηκε με κυτταρομετρία ροής τις ημέρες 15-18 της καλλιέργειας χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης γλυκοφορίνης A, συζευγμένο με PE φθοριόχρωμα (CD235a PE) και μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης εμβρυικής αιμοσφαιρίνης, συζευγμένο με FITC φθοριόχρωμα (anti-HbF FITC). Στο αντιπροσωπευτικό στικτόγραμμα της Εικόνας 3.7B στην περίπτωση των μη μεταγμένων κυττάρων, τα F-κύτταρα (διπλά θετικά έναντι του CD235a PE και του αντι-HbF FITC) ανήλθαν σε ποσοστό 37.1% έναντι 43.1% στην περίπτωση των μεταγμένα με GammaThal CD34⁺ κυττάρων.

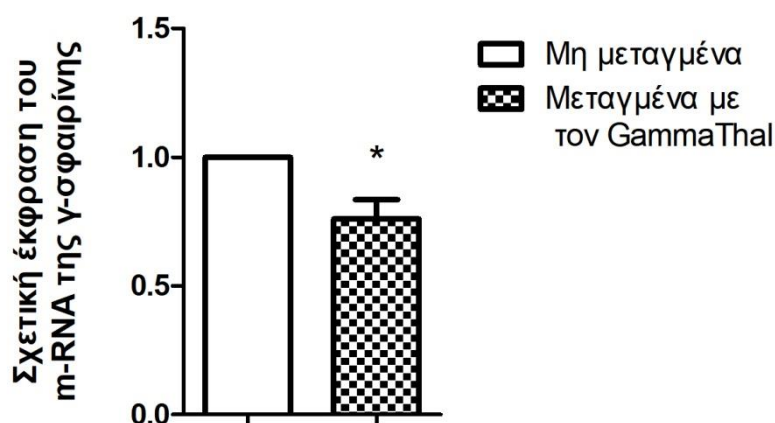
Υστερα από 3 ανεξάρτητα πειράματα και όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.7C, το ποσοστό των F-κυττάρων στα μεταγμένα με τον φορέα CD34+ κύτταρα έφτασε το $37.73 \pm 7.32\%$ ενώ στα μη μεταγμένα κύτταρα το $33.9 \pm 7.44\%$, με την διαφορά αυτή του $11 \pm 7.009\%$ (Εικόνα 3.7D) να μην είναι στατιστικά σημαντική ($p=0.098$, $n=3$). Οι αντίστοιχες τιμές ανά δότη, εμφανίζονται στον συγκεντρωτικό Πίνακα 5.



Εικόνα 3.7: Αξιολόγηση του νέου ιϊκού φορέα GammaThal σε CD34+ κύτταρα υγιών δοτών. (A) Μέσο ποσοστό διαφοροποίησης στα μη μεταγμένα και στα μεταγμένα με τον φορέα GammaThal, CD34+ κύτταρα (paired, two-tailed Student's t-test, $p=0.269$, $n=3$). (B) Αντιπροσωπευτικό σικτιόγραμμα κυτταρομετρίας ροής με τα F-κύτταρα στα μη μεταγμένα και μεταγμένα με τον GammaThal κύτταρα. (C) Μέσο ποσοστό παραγωγής F-κυττάρων στα μη μεταγμένα και στα μεταγμένα με τον GammaThal CD34+ κύτταρα (paired, two-tailed Student's t-test, $p=0.098$, $n=3$). (D) Μέση ποσοστιαία αύξηση των επιπέδων των F-κυττάρων στα μεταγμένα κύτταρα. Οι κάθετες γραμμές απεικονίζουν την σταθερά απόκλιση $\pm SD$

3.3.2 Έκφραση εμβρυϊκής γ-σφαιρίνης σε επίπεδο μεταγράφου

Η αξιολόγηση της έκφρασης της εμβρυϊκής γ-σφαιρίνης σε επίπεδο μεταγράφου κατόπιν μεταγωγής με τον GammaThal υπολογίστηκε με την χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR) την ημέρα 15 της υγρής καλλιέργειας ερυθροειδικής διαφοροποίησης με εκκινητές για το διαγονίδιο της γ -σφαιρίνης. Για την εν λόγω ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ΔΔCT[99] και ο μέσος όρος της έκφρασης του mRNA της γ-σφαιρίνης στα μεταγμένα κύτταρα σε σχέση με τα μη μεταγμένα φαίνεται στην Εικόνα 3.8. Αναλυτικότερα, μετά από 3 ανεξάρτητα πειράματα (αναλυτικά οι τιμές στον συγκεντρωτικό Πίνακα 5), υπολογίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του mRNA της γ-σφαιρίνης στα μεταγμένα κύτταρα, παρέμειναν σε χαμηλά επίπεδα και συγκεκριμένα στο 0.76 ± 0.08 , χωρίς να ξεπερνούν αυτά των μη μεταγμένων κυτταρων. Η εν λόγω μείωση που ανήλθε στο 24% ήταν στατιστικά σημαντική ($p = 0.031$, $n=3$). Αυτή η μείωση δεν συμβαδίζει με τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα. Περαιτέρω ανάλυση πραγματοποιείται στην συζήτηση.



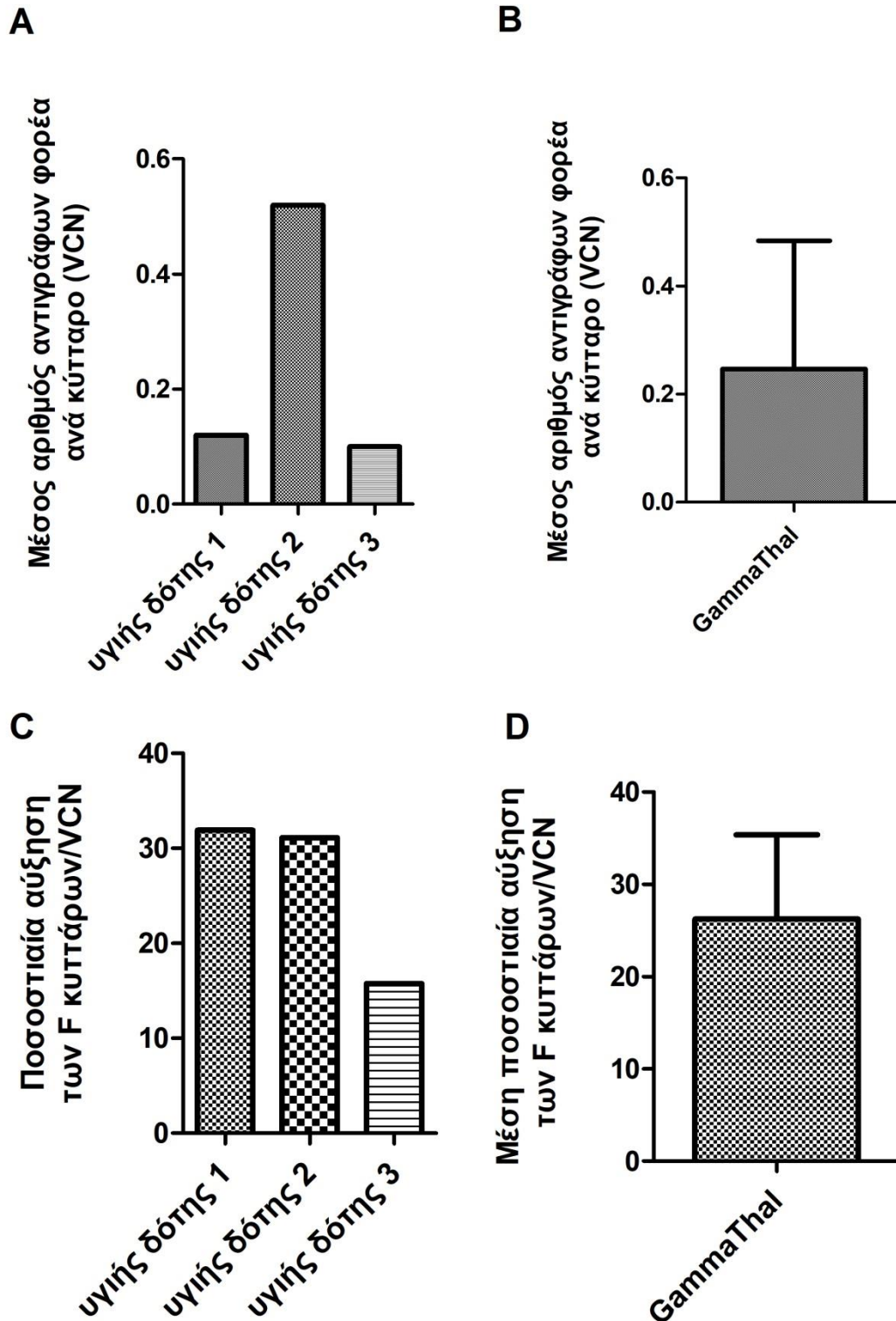
Εικόνα 3.8: Σχετική έκφραση της γ-σφαιρίνης σε επίπεδο μεταγράφου στα μεταγμένα με τον GammaThal κύτταρα (paired, two-tailed Student's t-test, $p=0.031$, $n=3$). Η κανονικοποίηση έγινε έναντι του γονιδίου της α-σφαιρίνης. Οι κάθετες γραμμές απεικονίζουν την σταθερά απόκλιση $\pm SD$

3.3.3 Αριθμός αντιγράφων φορέα GammaThal ανά κύτταρο

Στην περίπτωση των υγιών δοτών, ο υπολογισμός του αριθμού των ιϊκών αντιγράφων ανά κύτταρο υπολογίστηκε έπειτα απο απομόνωση DNA των $CD34^+$ κυττάρων της υγρής ερυθροειδικής καλλιέργειας κατά το τέλος της διαφοροποίησης όπως περιγράφεται στο 2.20 στα Υλικά και Μέθοδοι. Ο προσδιορισμός του VCN πραγματοποιήθηκε έπειτα απο ανάλυση

με qPCR χρησιμοποιώντας εκκινητές για το διαγονίδιο της γ -σφαιρίνης και για το γονίδιο αναφοράς (housekeeping gene) hRNase P (Πίνακας 3), χρησιμοποιώντας τις εξισώσεις όπως περιγράφεται στο 2.20. Συγκεκριμένα, η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε για τους γ -εκκινητές ήταν η $\gamma=33.235x-3.15$, ενώ για το γονίδιο αναφοράς η $\gamma=32.223x-3.09$.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.9A και στον Πίνακα 5, το VCN στον υγιή δότη 1 ήταν 0.12, στον δότη 2 0.52 και στον δότη 3 0.1, με το μέσο αριθμό αντιγράφων να φτάνει το 0.25 ± 0.24 (Εικόνα 3.9B). Οι διαφορές στο VCN μεταξύ των δοτών δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Έπειτα από κανονικοποίηση με το VCN και όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.9C, η μέση αύξηση στα επίπεδα των F-κυττάρων ανά ασθενή, διαμορφώθηκε στο 31.88% για τον υγιή δότη 1, 15.74% για τον υγιή δότη 2 και 31.1%, για τον υγιή δότη 3. Οι διαφορές ανάμεσα στους δότες, δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Τέλος, η μέση αύξηση των F κυττάρων προς το μέσο VCN και για τους 3 δότες υπολογίσθηκε στο $26.24 \pm 9.1\%$ (Εικόνα 3.9D)



Εικόνα 3.9: Λειτουργική αξιολόγηση του νέου φορέα GammaThal μέσω του VCN σε κύτταρα υγιών δοτών. (A) Αριθμός αντιγράφων φορέα ανά κύτταρο ανά ασθενή. (B) Μέσος αριθμός αντιγράφων φορέα στο σύνολο των υγιών δοτών (n=3). (C) Μέση ποσοστιαία αύξηση των F-κυττάρων ανά δότη έπειτα από κανονικοποίηση με το VCN. (D) Μέση ποσοστιαία αύξηση των F-κυττάρων στο σύνολο των 3 υγιών δοτών έπειτα από κανονικοποίηση με το VCN. Οι κάθετες γραμμές απεικονίζουν την σταθερά απόκλισης \pm SD

Στον παρακάτω Πίνακα 5, παρουσιάζονται οι τιμές της ερυθροειδικής διαφοροποίησης, των F-κυττάρων, των επιπέδων έκφρασης της γ-σφαιρίνης σε επίπεδο μεταγράφου καθώς και το VCN, ανά υγιή δότη, τόσο για την ομάδα των μη μεταγμένων κυττάρων, όσο και για την ομάδα των μεταγμένων με τον GammaThal κυττάρων.

Πίνακας 5: Συγκενρωτικά στοιχεία όλων των παραμέτρων ανά φυσιολογικό δότη.

Δεδομένα κυτταρομετρίας ροής (FACS DATA)						
Δείγμα	CD235a		F-κύτταρα		m-RNA	VCN
	Μη μεταγμένα	GammaThal	Μη μεταγμένα	GammaThal		
Υγιής δότης 1	89.8	88.9	39.2	40.7	0.68	0.12
Υγιής δότης 2	83.2	87.7	37.1	43.1	0.77	0.52
Υγιής δότης 3	51.5	58.6	25.4	29.4	0.83	0.1
Μέσος όρος	74.83	78.4	33.9	37.73	0.76	0.25
P value	p = 0.269		p = 0.098		p = 0.031	

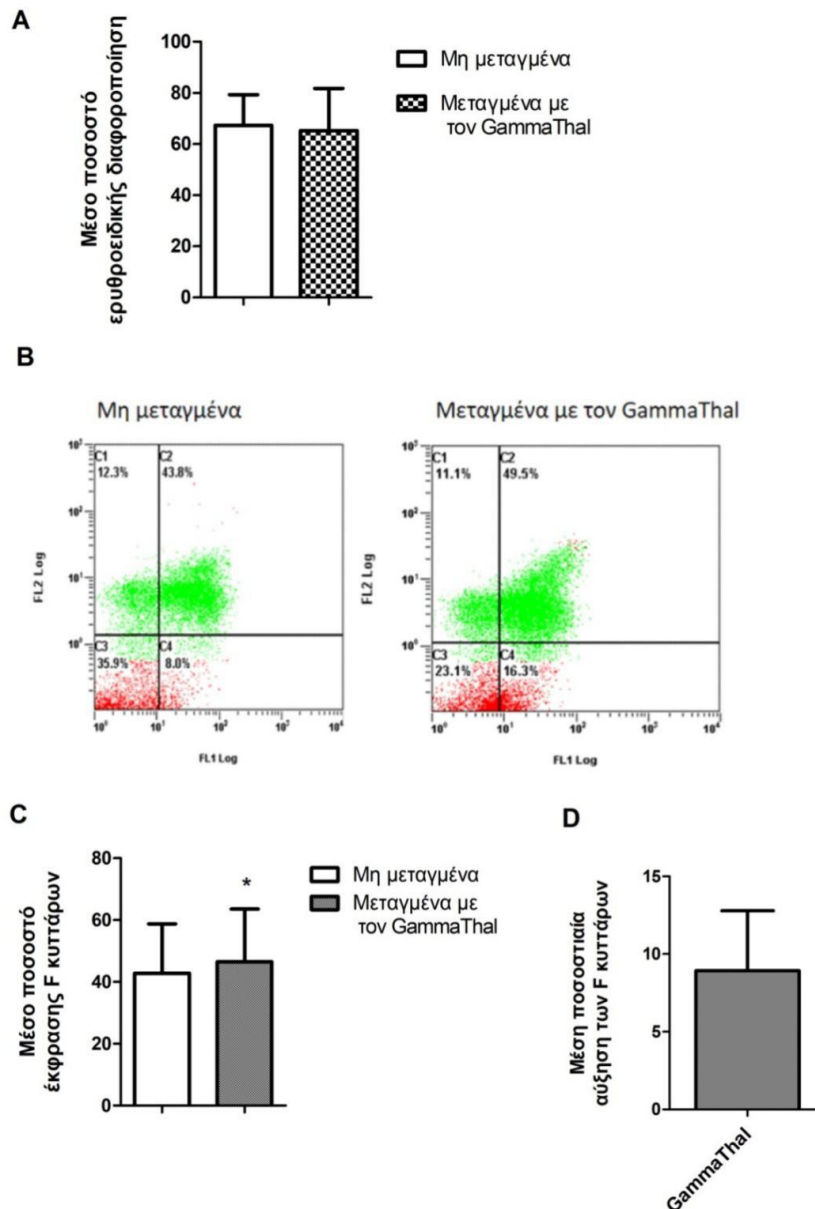
3.4 Αξιολόγηση του νέου φορέα GammaThal σε CD34⁺ κύτταρα από θαλασσαιμικούς (β⁰ και β⁺) ασθενείς

Βασισμένοι στα ενθαρρυντικά αποτελέσματα ως προς την αύξηση των F-κυττάρων και την έκφραση της γ-σφαιρίνης σε επίπεδο μεταγράφου που παρατηρήθηκαν στους υγιείς δότες κατόπιν μεταγωγής με τον νεό λεντιϊκό φορέα GammaThal σε σχετικά χαμηλό MOI=25, προχωρήσαμε σε αξιολόγηση του νέου φορέα σε κύτταρα θαλασσαιμικών ασθενών, με σκοπό να διερευνηθεί η ικανότητα του εν λόγω φορέα να επιτύχει θεραπευτικά επίπεδα *in vitro*. Τα αρχέγονα αιμοποιητικά CD34⁺ κύτταρα απομονώθηκαν από 10 ml περιφερικού μη κινητοποιημένου αίματος 4 θαλασσαιμικών ασθενών, εκ των οποίων οι 3 ήταν β⁺/β⁺ (ο γονότυπος δεν είναι γνωστός) και ο τέταρτος β⁰/β⁰ με γονότυπο IVSI-1/IVSI-1. Σε όλα τα πειράματα, όπως και στην περίπτωση των φυσιολογικών δοτών, ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα μη μεταγμένα κύτταρα .

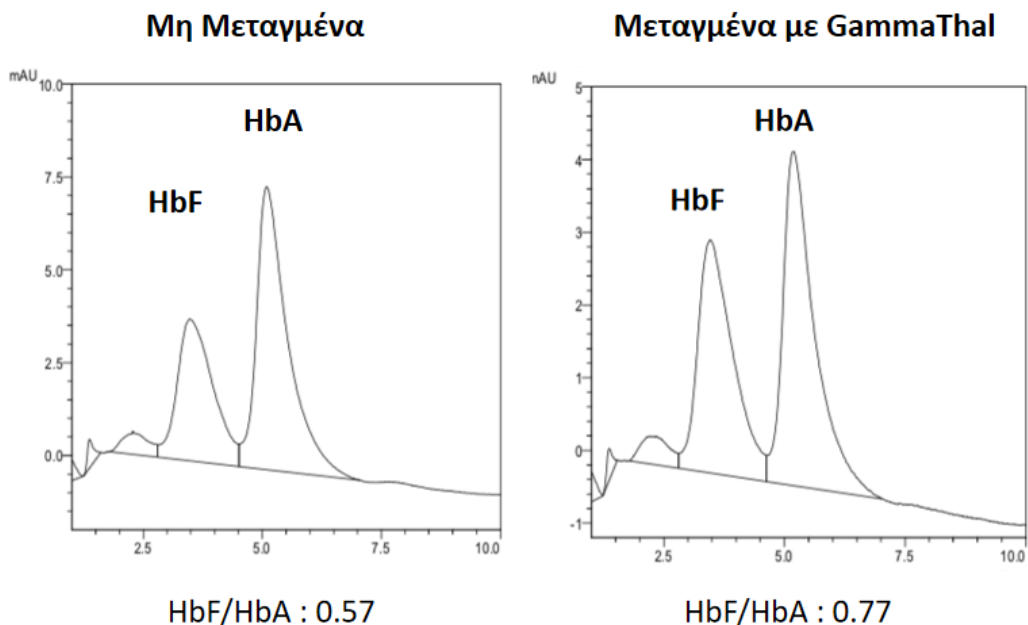
3.4.1 Αυξημένη παραγωγή F-κυττάρων μετά από μεταγωγή των CD34⁺ κυττάρων με τον φορέα GammaThal

Η αξιολόγηση του νέου φορέα GammaThal, αρχικά πραγματοποιήθηκε με μέτρηση των επιπέδων των F κυττάρων και της ερυθροειδικής διαφοροποίησης μέσω κυτταρομετρίας ροής. Στην Εικόνα 3.10A φαίνεται το μέσο ποσοστό διαφοροποίησης στα μη μεταγμένα κύτταρα και στα μεταγμένα με τον φορέα GammaThal. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε πως το μέσο ποσοστό διαφοροποίησης προς προερυθροβλάστες στα μη μεταγμένα κύτταρα ήταν 67.35±11.94%, ενώ στα μεταγμένα CD34⁺ 65.25±16.47%, χωρίς όμως αυτή η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική (p=0.431, n=4). Αναλυτικά, οι τιμές ανά ασθενή παρουσιάζονται στον συγκεντρωτικό Πίνακα 8. Όσον αφορά, το ποσοστό των διαφοροποιημένων κυττάρων που εκφράζουν την εμβρυική αιμοσφαιρίνη (F-κύτταρα) (βλ.2.18 στα Υλικά και Μέθοδοι), στο αντιπροσωπευτικό παράδειγμα της Εικόνας 3.10B τα F-κύτταρα ήταν 43.8% στην περίπτωση των μη μεταγμένων κυττάρων και 49.5% στην περίπτωση των μεταγμένων με τον GammaThal κυττάρων. Έπειτα από 4 ανεξάρτητα πειράματα και σύμφωνα με την Εικόνα 3.10C, το μέσο ποσοστό F-κυτταρων στα μεταγμένα με τον φορέα κύτταρα είναι σημαντικά υψηλότερο από το αντίστοιχο στα μη μεταγμένα και συγκεκριμένα 46.5 ±17.03% έναντι 42.78 ±15.93%. Η παραπάνω διαφορά που ανέρχεται σε ποσοστό 8.93 ±3.86% (Εικόνα 3.10D) είναι στατιστικά σημαντική (p=0.0267, n=4). Οι αναλυτικές τιμές ανά ασθενή φαίνονται στον συγκεντρωτικό Πίνακα 8. Τέλος, τα πρωταρχικά αποτελέσματα απο HPLC τετραμερούς για

τον μοναδικό β⁰ ασθενή (Thal 4) παρουσιάζονται στο χρωματογράφημα της Εικόνας 3.11. Σύμφωνα με αυτήν, παρατηρούμε ότι στα μη μεταγμένα κύτταρα ο λόγος HbF/HbA ήταν 0.57, ενώ στα μεταγμένα με τον GammaThal κύτταρα, ο λόγος αυτός διαμορφώθηκε στο 0.77, σημειώνοντας αύξηση 35.08%. Η εν λόγω αύξηση επείτα απο κανονικοποίηση με το μέσο VCN του συγκεκριμένου ασθενή (VCN=0.159), ανήλθε στο 220.62%



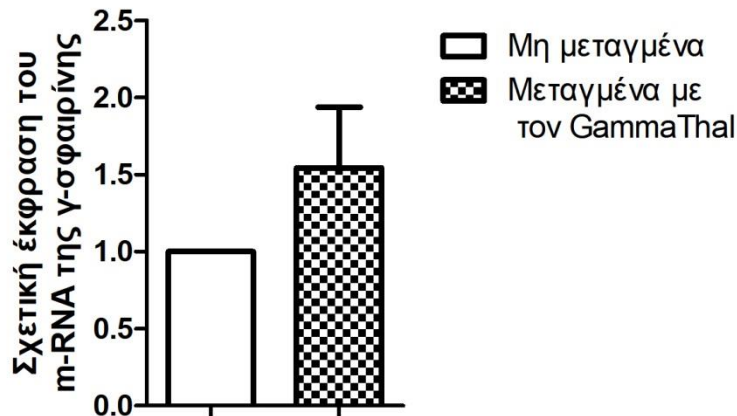
Εικόνα 3.10: Αξιολόγηση του νέου φορέα GammaThal σε CD34⁺ κύτταρα θαλασσαιμικών ασθενών. (A) Μέσο ποσοστό διαφοροποίησης στα μη μεταγμένα και στα μεταγμένα με τον φορέα GammaThal CD34⁺ κύτταρα (paired, two-tailed Student's t-test, p=0.431, n=4). (B) Αντιπροσωπευτικό στικτόγραμμα κυτταρομετρίας ροής με F-κύτταρα στα μη μεταγμένα και στα μεταγμένα με τον GammaThal κύτταρα την ημέρα 15-18 της διαφοροποίησης. (C) Μέσο ποσοστό παραγωγής F-κυττάρων στα μη μεταγμένα και στα μεταγμένα με τον GammaThal CD34⁺ κύτταρα (paired, two-tailed Student's t-test, p=0.0267, n=4). (D) Μέση ποσοστιαία αύξηση των επιπέδων των F-κυττάρων στα μεταγμένα με τον GammaThal CD34⁺ κύτταρα. Οι κάθετες γραμμές απεικονίζουν την σταθερά απόκλισης ±SD



Εικόνα 3.11:Χρωματογράφημα HPLC τετραμερούς του β⁰β⁰ θαλασσαιμικού ασθενή Thal 4. Φαίνεται ο λόγος HbF/HbA στα μη μεταγμένα και στα μεταγμένα κύτταρα.

3.4.2 Έκφραση της εμβρυϊκής γ-σφαιρίνης σε επίπεδο μεταγράφου

Η αξιολόγηση της έκφρασης της εμβρυϊκής γ-σφαιρίνης σε επίπεδο μεταγράφου κατόπιν μεταγωγής με τον GammaThal υπολογίστηκε με την χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR) την ημέρα 15 της υγρής καλλιέργειας ερυθροειδικής διαφοροποίησης με εκκινητές για το διαγονίδιο της ^Aγ-σφαιρίνης. Για την εν λόγω ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ΔΔCT[99] και ο μέσος όρος της έκφρασης του mRNA της γ-σφαιρίνης στα μεταγμένα κύτταρα σε σχέση με τα μη μεταγμένα φαίνεται στην Εικόνα 3.12. Αναλυτικότερα, μετά από 4 ανεξάρτητα πειράματα, υπολογίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του mRNA της γ-σφαιρίνης στα μεταγμένα κύτταρα, στο 1.54 ± 0.4 , δηλαδή υπάρχει 54.3% περισσότερη παραγωγή του γ-mRNA στα κύτταρα που έχουν μεταχθεί με τον GammaThal σε σχέση με τα μη μεταγμένα. Αυτή η διαφορά μετά από two-tailed Student's t-test paired βρέθηκε ότι δεν είναι στατιστικά σημαντική ($p=0.07$).



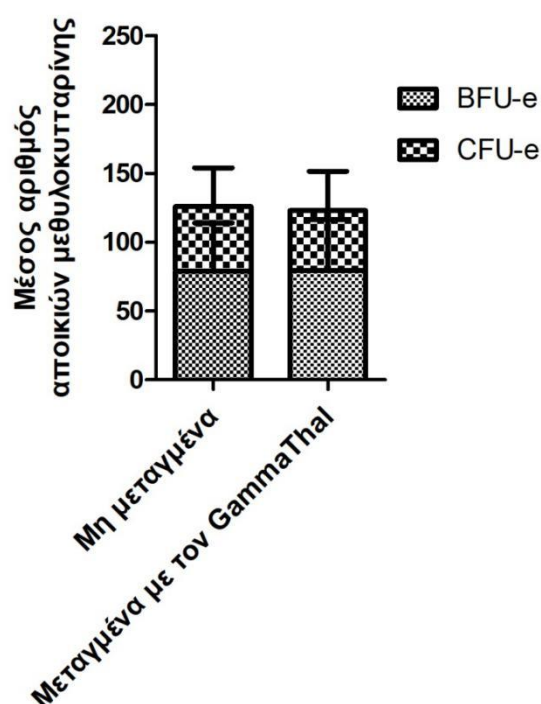
Εικόνα 3.12: Σχετική έκφραση της γ-σφαιρίνης σε επίπεδο μεταγράφου στα μεταγμένα με τον φορέα GammaThal κύτταρα και τα μη μεταγμένα (paired, two-tailed Student's t-test $p=0.07$, $n=4$). Η κανονικοποίηση έγινε έναντι του γονιδίου της α-σφαιρίνης. Οι κάθετες γραμμές απεικονίζουν την σταθερά απόκλιση $\pm SD$

3.4.3 Η μεταγωγή με τον GammaThal δεν επηρεάζει την κλωνογενή ικανότητα των CD34⁺ κυττάρων

Για να διερευνήσουμε την πιθανότητα διαφορετικού πρότυπου διαφοροποίησης κατόπιν μεταγωγής με τον νέο φορέα GammaThal, 2×10^3 CD34⁺ κύτταρα (μεταγμένα και μη), καλλιεργήθηκαν σε μεθυλοκυταρίνη για 12-14 ημέρες, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.14 στα Υλικά και Μέθοδοι. Οι αποικίες ερυθροειδικής (BFU-e) και μυελικής προελεύσεως (CFU-e) που αναπτύχθηκαν, καταμερήθηκαν και ο μέσος αριθμός τους τόσο στα μη μεταγμένα όσο και στα μεταγμένα με τον φορέα CD34⁺ κύτταρα απεικονίζεται στην Εικόνα 3.13.

Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση των μη μεταγμένων κυττάρων, ο μέσος αριθμός BFU-e υπολογίστηκε σε 79 ± 34.8 και των CFU-e σε 46.75 ± 28.2 , ενώ οι αντίστοιχες τιμές για τα μεταγμένα κύτταρα, ήταν 79.2 ± 37.10 και 43.7 ± 28.33 αντίστοιχα. Μετά από ανάλυση με το 2-way ANOVA test, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά σε κανέναν συνδυασμό των παραμέτρων του γραφήματος. Αναλυτικότερα, συγκρίνοντας τις ομάδες BFU-e/CFU-e με τα μη μεταγμένα/μεταγμένα με τον GammaThal δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.921$), ούτε επίσης μεταξύ των ομάδων μη μεταγμένα και μεταγμένα με τον GammaThal ($p=0.933$). Τέλος, συγκρίνοντας τις τιμές μεταξύ BFU-e και CFU-e, ανεξαρτήτως του αν έχει υπάρξει μεταγωγή ή όχι, φαίνεται πως υπάρχει μια τάση να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά

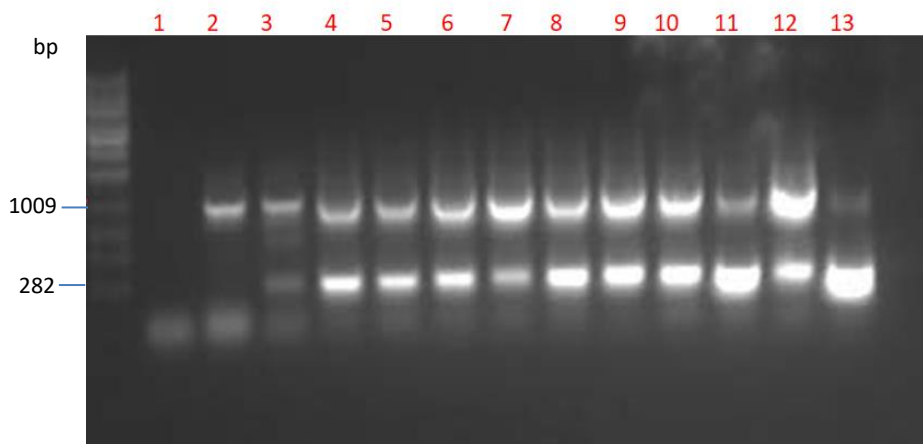
($p=0.058$), όπως αναμένεται με το συγκεκριμένο πρότυπο μεθυλοκυτταρίνης, καθώς το υλικό της μεθυλοκυτταρίνης που χρησιμοποιήθηκε ευνοεί τον σχηματισμό BFU-e.



Εικόνα 3.13: Μέσος αριθμός αποικιών μεθυλοκυτταρίνης BFU-e και CFU-e στην ομάδα των μη μεταγμένων και μεταγμένων με τον GammaThal κυττάρων (2-way ANOVA test). Σύγκριση του ολικού αριθμού αποικιών BFU-e/CFU-e με τις δύο πειραματικές συνθήκες μη μεταγμένα/μεταγμένα με τον GammaThal ($p=0.921$). Σύγκριση μεταξύ των ομάδων μη μεταγμένα και μεταγμένα με τον GammaThal ($p=0.933$). Σύγκριση του αριθμού αποικιών BFU-e με τον αριθμό αποικιών CFU-e, ανεξαρτήτως της ύπαρξης μεταγωγής ($p=0.058$). Οι κάθετες γραμμές απεικονίζουν την σταθερά απόκλισης $\pm SD$

3.4.4 Προσδιορισμός αποτελεσματικότητας γονιδιακής μεταγωγής και μέσου αριθμού αντιγράφων φορέα ανά κύτταρο (VCN/cell)

Η αποτελεσματικότητα της γονιδιακής μεταγωγής (transduction efficiency) και ο αριθμός των ιικών αντιγράφων ανά κύτταρο (VCN) υπολογίστηκαν έπειτα από απομόνωση DNA από 20-30 μονήρεις αποικίες BFU-e ανά ασθενή όπως περιγράφεται στους Drakoroulou et al., 2019 [71]. Πραγματοποιήθηκε PCR με εκκινητές για το διαγονίδιο της Λ γ σφαιρίνης (Πίνακας 3) και οι θετικές, σε αλληλουχίες του φορέα, αποικίες (Εικόνα 3.14) χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του VCN/cell με PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) όπως περιγράφεται στους Drakoroulou et al., 2019 [71] και στην παράγραφο 2.20 στα Υλικά και Μέθοδοι.



Εικόνα 3.14: Έλεγχος αποτελεσματικότητας μεταγωγής σε 10 μονήρεις αποικίες BFU-e. Θέση 1: μίγμα H₂O, Θέση 2: αρνητικός μάρτυρας (μη μεταγμένα κύτταρα), Θέση 3: θετικός μάρτυρας (μεταγμένα κύτταρα), Θέσεις 4-13: άγνωστα δείγματα, 1 kb ladder

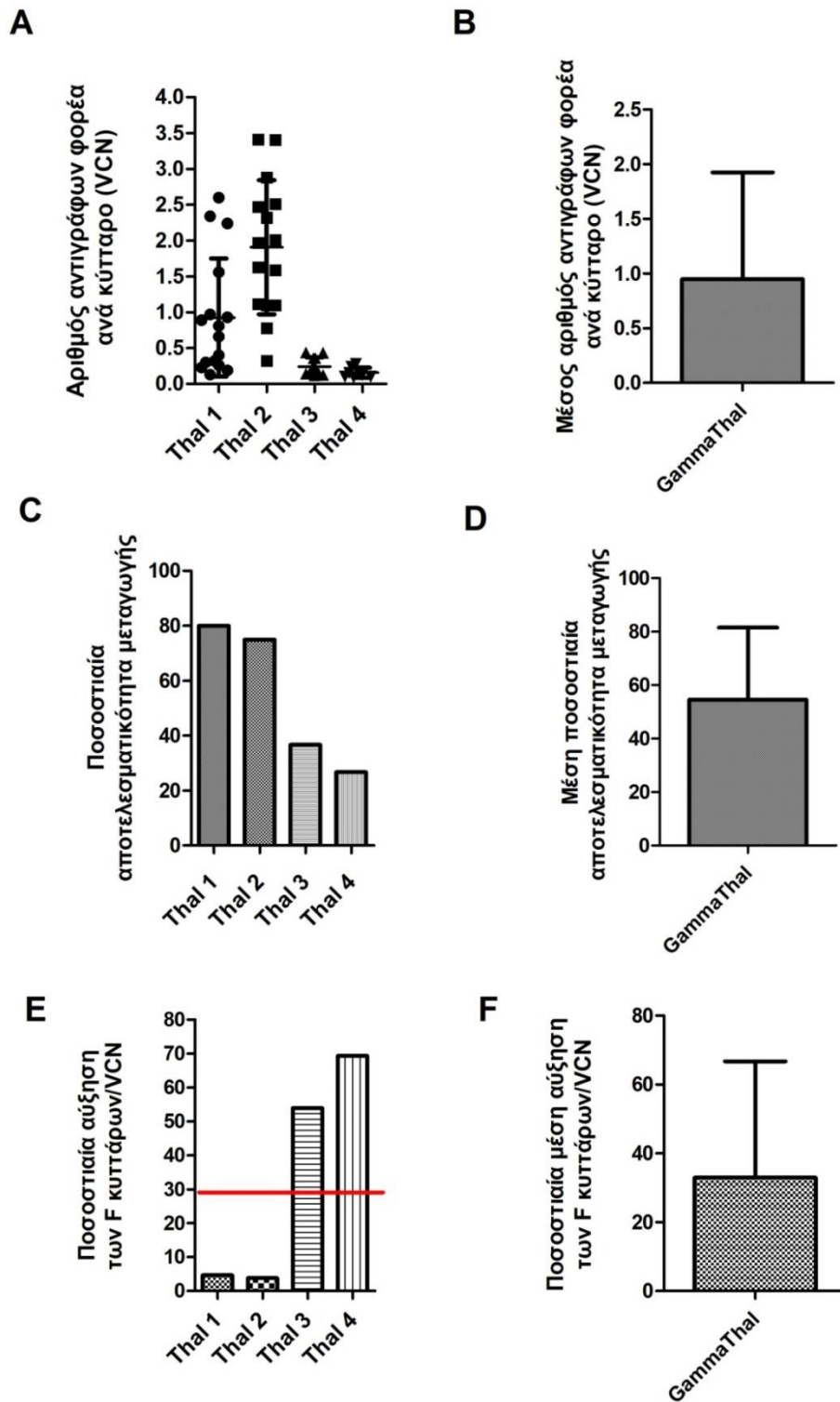
Στην περίπτωση μη μεταγμένων κυττάρων (Εικόνα 3.14, θέση 2) εμφανίζεται μια ζώνη στα 1009 bp η οποία αντιστοιχεί στο ενδογενές HBG1 των CD34⁺ κυττάρων, ενώ στα μεταγμένα με τον φορέα κύτταρα (Εικόνα 3.14, θέση 3), εκτός από την ενδογενή εμφανίζεται μια επιπλέον ζώνη στα 282 bp η οποία αντιστοιχεί στο ενσωματωμένο διαγονίδιο με την έλλειψη. Βάσει των παραπάνω, όλες οι αποικίες που ελέχθησαν είναι θετικές για αλληλουχίες του GammaThal και συνεπώς αναλύθηκαν περαιτέρω για τον προσδιορισμό του VCN/cell.

Χρησιμοποιώντας εκκινητές για το διαγονίδιο της ^Αγ-σφαιρίνης και του γονιδίου αναφοράς hRNase P, υπολογίσθηκε ο μέσος αριθμός αντιγράφων φορέα ανά κύτταρο, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.20 στα Υλικά και Μέθοδοι. Συγκεκριμένα, η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε για τους γ-εκκινητές ήταν η $\gamma=33.235x-3.15$, ενώ για το γονίδιο αναφοράς η $\gamma=32.223x-3.09$. Θετικές θεωρούνται όσες αποικίες είχαν $VCN \geq 0.1$.

Στην Εικόνα 3.15 παρουσιάζεται ο αριθμός αντιγράφων φορέα ανά κύτταρο για τον κάθε ασθενή (3.15A), ενώ ο μέσος αριθμός αντιγράφων έπειτα από 4 ανεξάρτητα πειράματα παρουσιάζεται στο 3.15B. Αναλυτικά οι τιμές φαίνονται στον Πίνακα 6.

Όσον αφορά την αποτελεσματικότητα μεταγωγής, προσδιορίστηκε ως ο αριθμός των θετικών μεταγμένων αποικιών με $VCN \geq 0.1$ ως προς το σύνολο των υπό έλεγχο αποικιών. Στην Εικόνα 3.15C φαίνεται η αποτελεσματικότητα μεταγωγής ανά ασθενή, ενώ στην Εικόνα 3.15D παρουσιάζεται η μέση αποτελεσματικότητα μεταγωγής και από τους 4 θαλασσαιμικούς ασθενείς. Στον Πίνακα 6, παρουσιάζονται αναλυτικά οι τιμές για την αποτελεσματικότητα μεταγωγής.

Επιπλέον, στην Εικόνα 3.15E φαίνεται η μέση αύξηση στα επίπεδα των F κυττάρων ανά ασθενή, μετά από κανονικοποίηση με το VCN. Για τον Thal 1 ($\beta^+\beta^+$) η μέση αύξηση των F κυττάρων ανά αντίγραφο ιϊκού φορέα ανά κύτταρο υπολογίστηκε στο 4.67%. Το αντίστοιχο ποσοστό για τον Thal 2 ($\beta^+\beta^+$) ανέρχεται στο 3.84%, για τον Thal 3 ($\beta^+\beta^+$) στο 53.99% και για τον Thal 4 ($\beta^0\beta^0$) στο 69.34%. Στην Εικόνα 3.15F φαίνεται η μέση αύξηση των F κυττάρων προς το μέσο VCN και για τους 4 ασθενείς. Το ποσοστό αυτό ισούται με $32.96\% \pm 33.73$.



Εικόνα 3.15: Λειτουργική αξιολόγηση του νέου φορέα GammaThal μέσω υπολογισμού του VCN και της αποτελεσματικότητας μεταγωγής σε MOI=25. (A) Αριθμός αντιγράφων φορέα ανά κύτταρο ανά ασθενή. (B) Μέσος αριθμός αντιγράφων φορέα στο σύνολο των θαλασσαιμικών ασθενών (n=4). (C) Αποτελεσματικότητα μεταγωγής του φορέα GammaThal ανά ασθενή σε MOI=25. (D) Μέση αποτελεσματικότητα μεταγωγής του φορέα GammaThal στο σύνολο των 4 ασθενών σε MOI=25. (E) Μέση ποσοστιαία αύξηση των F-κυττάρων ανά ασθενή έπειτα από κανονικοποίηση με το VCN. Η κόκκινη γραμμή υποδηλώνει το θεραπευτικό όριο που κυμαίνεται στο 30%. (F) Μέση ποσοστιαία αύξηση των F-κυττάρων στο σύνολο των 4 θαλασσαιμικών ασθενών έπειτα από κανονικοποίηση με το VCN. Οι κάθετες γραμμές απεικονίζουν την σταθερά απόκλισης \pm SD

Πίνακας 6: Τιμές μέσου αριθμού αντιγράφων φορέα ανά κύτταρο και αποτελεσματικότητα μεταγωγής σε μονήρεις αποικίες απο κάθε ασθενή

Κωδικός Αριθμός Ασθενούς	Γονότυπος	Μέσος αριθμός αντιγράφων φορέα ανά κύτταρο (VCN)	Αριθμός μονήρων BFU-e που ελέγχθηκαν	Αριθμός μεταγμένων αποικιών BFU-e	Αποτελεσματικότητα μεταγωγής %
Thal 1	$\beta^+\beta^+$	0.926 ± 0.82	20	16	80
Thal 2	$\beta^+\beta^+$	1.907 ± 0.93	20	15	75
Thal 3	$\beta^+\beta^+$	0.241 ± 0.12	30	11	36.66
Thal 4	$\beta^0\beta^0$	0.159 ± 0.07	30	8	26.66
Σύνολο		0.947 ± 0.97	100	50	54.58 ± 26.86

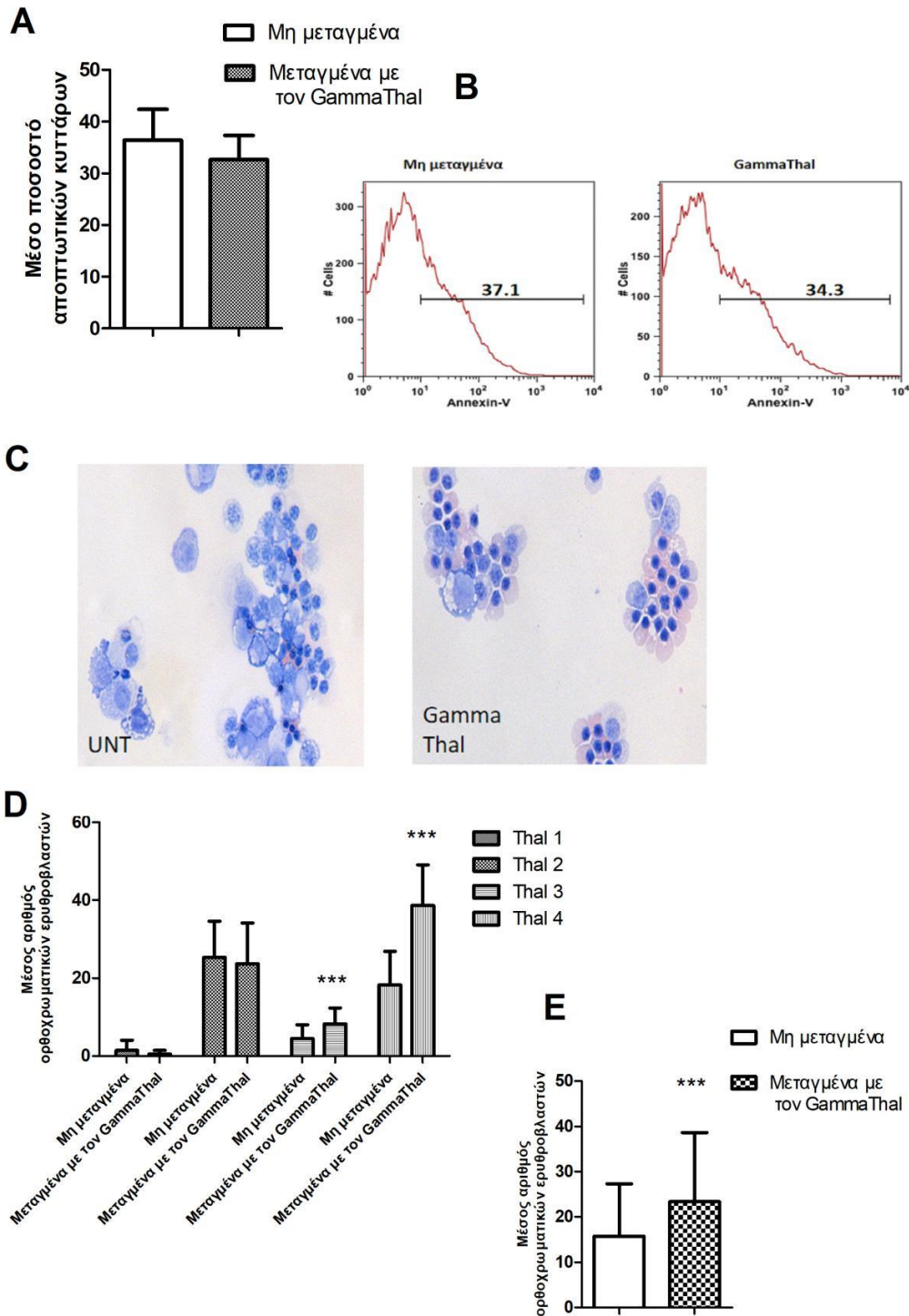
3.4.5 Βελτίωση της ερυθροποίησης έπειτα από μεταγωγή με τον GammaThal

Η ικανότητα του νέου φορέα GammaThal να βελτιώνει την ερυθροποίηση ελέγχθηκε με τον προσδιορισμό της μείωσης του ποσοστού της απόπτωσης στο τέλος της ερυθροειδικής καλλιέργειας (ημέρα 18-20) και την καταμέτρηση των ορθοχρωματικών ερυθροβλαστών έπειτα από χρώση με Wright-Giemsa σε κύτταρα επιστρωμένα σε αντικειμενοφόρο πλάκα με φυγοκέντρηση (cytospin).

Όσον αφορά στον προσδιορισμό της απόπτωσης, αυτή ελέγχθηκε με κυτταρομετρία ροής και έπειτα από χρώση με αντι-Annexin-V FITC και 7-AAD αντισώματα χρησιμοποιώντας το Annexin-V FITC Apoptosis Detection kit και όπως έχει περιγραφεί από τους Drakoroulou et al., 2019 [71]. Στην Εικόνα 3.16Α παρουσιάζεται το μέσο ποσοστό αποπτωτικών στην περίπτωση των μη μεταγμένων και μεταγμένων με τον GammaThal αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, στα μη μεταγμένα κύτταρα ο μέσος αριθμός αποπτωτικών κυττάρων υπολογίστηκε σε 36.4 ± 5.98 , ενώ στην περίπτωση των μεταγμένων κυττάρων με τον GammaThal ισούται με 32.67 ± 4.66 . Η παραπάνω διαφορά δείχνει μια τάση στατιστικά σημαντικής μείωσης ($p=0.063$, $n=3$). Στο αντιπροσωπευτικό ιστόγραμμα στην Εικόνα 3.16B για τα μη μεταγμένα κύτταρα, το ποσοστό Annexin-V/7AAD είναι 37.1%, ενώ για τα μεταγμένα με τον GammaThal 34.3%.

Επιπλέον, η βελτίωση της ερυθροποίησης προσδιορίστηκε και με την καταμέτρηση των ορθοχρωματικών ερυθροβλαστών στα μεταγμένα και στα μη μεταγμένα κύτταρα. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα με φυγοκέντρηση στο τέλος της καλλιέργειας και παρατηρήθηκαν σε φωτονικό μικροκόπιο, την ίδια ημέρα που προσδιορίστηκε η απόπτωση των κυττάρων. Ελέγχθηκαν περίπου 30 διαφορετικά οπτικά πεδία και η καταμέτρηση των ορθοχρωματικών ερυθροβλαστών πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του προγράμματος ImageJ. Αντιπροσωπευτική απεικόνιση των ορθοχρωματικών ερυθροβλαστών έπειτα από χρώση Wright-Giemsa παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.16C, όπου φαίνεται σαφώς η διαφορά στα επίπεδα ερυθροποίησης ανάμεσα στην ομάδα των μη μεταγμένων και μεταγμένων με τον GammaThal, κυττάρων. Γραφική αναπαράσταση του μέσου αριθμού ορθοχρωματικών ερυθροβλαστών ανά ασθενή φαίνεται στην Εικόνα 3.16D, ενώ αναλυτικά οι τιμές και η εμφάνιση στατιστικής σημαντικότητας μετά από two-tailed Student's t-test paired εμφανίζονται στον Πίνακα 7. Ακολούθως, στην Εικόνα 3.12E παρουσιάζεται ο μέσος αριθμός ορθοχρωματικών ερυθροβλαστών ύστερα από 3 ανεξάρτητα πειράματα (ο Thal 1 δεν συμπεριλήφθηκε λόγω μη αρκετών κυττάρων).

Συγκεκριμένα, στην περίπτωση των μη μεταγμένων κυττάρων ο μέσος αριθμός των ορθοχρωματικών ερυθροβλαστών ήταν $15.78(\pm 11.52)$, ενώ ο αντίστοιχος αριθμός για τα μεταγμένα με τον GammaThal είναι $23.37(\pm 15.26)$, μια στατιστικά σημαντική 48.09% ($p=0.0001$, $n=3$).



Εικόνα 3.16: Βελτίωση της ερυθροποίησης έπειτα από μεταγωγή με τον GammaThal με MOI=25. (A) Μέσο ποσοστό αποπτωτικών κυττάρων στα μη μεταγμένα και μεταγμένα με τον GammaThal κύτταρα (paired, two-tailed Student's t-test, $p=0.063$, $n=3$). (B) Αντιπροσωπευτικό ιστόγραμμα του ποσοστού των αποπτωτικών κυττάρων στα μεταγμένα και μη μεταγμένα κύτταρα, έπειτα από κυτταρομετρία ροής. (C) Αντιπροσωπευτική εικόνα ερυθροβλαστών σε cytospin έπειτα από χρώση Wright-Giemsa. (D) Μέσος αριθμός ορθοχρωματικών ερυθροβλαστών ανά ασθενή. (E) Συγκεντρωτικό ιστόγραμμα που απεικονίζει τον μέσο αριθμό ορθοχρωματικών ερυθροβλαστών έπειτα από 3 ανεξάρτητα πειράματα (ο thal 1 δεν έχει συμπεριληφθεί) με κύτταρα θαλασσαιμικών ασθενών (paired, two-tailed Student's t-test, $p=0.0001$). Οι κάθετες γραμμές απεικονίζουν την σταθερά απόκλιση $\pm SD$

Πίνακας 7: Μέση τιμή ορθοχρωματικών ερυθροβλαστών στα διαφορετικά οπτικά πεδία στους 4 θαλασσαιμικούς ασθενείς και εκτίμηση της στατιστικής σημαντικότητας

Κωδικός Αριθμός Ασθενούς	Μέσος αριθμός ορθοχρωματικών ερυθροβλαστών στα μη μεταγμένα κύτταρα	Μέσος αριθμός ορθοχρωματικών ερυθροβλαστών στα μεταγμένα με τον GammaThal κύτταρα	Αριθμός οπτικών πεδίων στα μη μεταγμένα κύτταρα	Αριθμός οπτικών πεδίων στα μεταγμένα με τον GammaThal κύτταρα	Σύγκριση ορθοχρωματικών ερυθροβλαστών στα μεταγμένα με τον GammaThal και μη μεταγμένα κύτταρα
Thal 1*	1.48 ± 2.60	0.51 ± 0.97	29	31	p = 0.057
Thal 2	25.32 ± 9.29	23.7 ± 10.48	31	31	p = 0.507
Thal 3	4.52 ± 3.58	8.28 ± 4.1	33	32	p = 0.0002
Thal 4	18.3 ± 8.59	38.67 ± 10.46	30	31	p = <0.0001
Σύνολο	15.78 ± 11.52	23.37 ± 15.26	91	94	p = 0.0001

* Δεν συμπεριελήφθη στην στατιστική ανάλυση

Στον παρακάτω συγκεντρωτικό Πίνακα 8, παρουσιάζονται οι τιμές της ερυθροειδικής διαφοροποίησης, των F κυττάρων, των επιπέδων έκφρασης της γ-σφαιρίνης σε επίπεδο μεταγράφου, το VCN, η αποτελεσματικότητα μεταγωγής και το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων ανά ασθενή, τόσο για την ομάδα των μη μεταγμένων κυττάρων, όσο και για την ομάδα των μεταγμένων με τον GammaThal.

Πίνακας 8: Συγκεντρωτικά στοιχεία όλων των παραμέτρων ανά θαλασσαιμικό ασθενή

		Δεδομένα κυτταρομετρίας ροής (FACS)								
Δείγμα	Γονότυπος	CD235a		F-κύτταρα		Ανεξίτη/7AAD		m-RNA	VCN	Επίπεδα Μεταγωγής (%)
		Μη μεταγμένα	Gamma Thal	Μη μεταγμένα	Gamma Thal	Μη μεταγμένα	Gamma Thal			
Thal 1	β ⁺ β ⁺	52.2	45.3	36.9	38.5	37.1	34.3	1.15	0.926	80
Thal 2	β ⁺ β ⁺	81.1	85	64.1	68.8	19.8	30.4	2.02	1.907	75
Thal 3	β ⁺ β ⁺	66	61.8	43.8	49.5	42	36.3	1.3	0.241	36.66
Thal 4	β ⁰ β ⁰	70.1	68.9	26.3	29.2	30.1	27.4	1.7	0.159	26.66
Μέσος όρος		67.35	65.25	42.7	46.5	32.25	32.1	1.54	0.947	54.58
P value		p = 0.431		p = 0.0267		p = 0.969		p = 0.07		

3.5 Σύγκριση αποτελεσμάτων μεταξύ υγιών δοτών και θαλασσαιμικών ασθενών

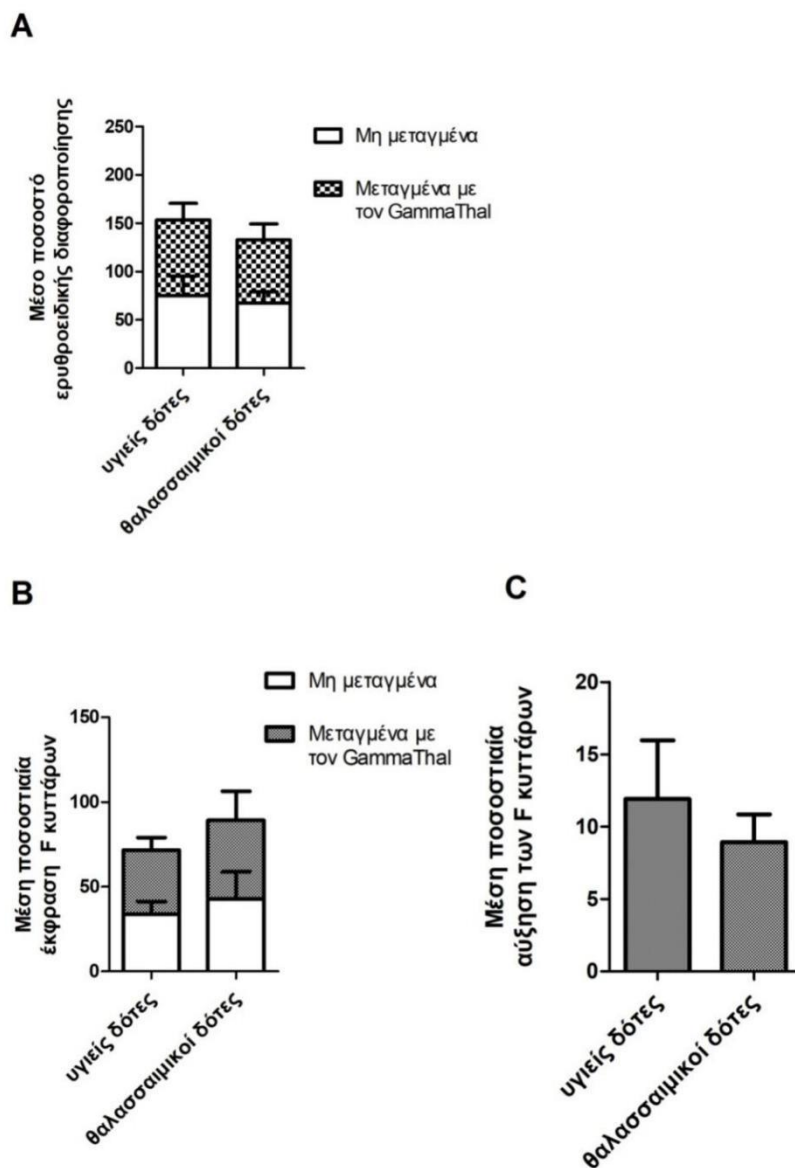
Παρακάτω, συγκρίνεται η αποτελεσματικότητα του νέου φορέα GammaThal στους υγιείς δότες (n=3) σε σχέση με τους θαλασσαιμικούς (n=4). Η σύγκριση γίνεται ως προς τα επίπεδα διαφοροποίησης των CD34+ κυττάρων, την παραγωγή των F κυττάρων και τις διαφορές σε επίπεδο μεταγραφής του HBG1 γονιδίου στην ομάδα των μεταγμένων σε σχέση με την ομάδα των μη μεταγμένων κυττάρων.

3.5.1 Αυξημένη παραγωγή F-κυττάρων μετά από μεταγωγή των CD34⁺ κυττάρων με τον φορέα GammaThal

Στην Εικόνα 3.17A φαίνεται το μέσο ποσοστό ερυθροειδικής διαφοροποίησης στα μη μεταγμένα κύτταρα και στα μεταγμένα με τον φορέα GammaThal, στην ομάδα των υγιών δοτών συγκριτικά με την ομάδα των θαλασσαιμικών. Συγκεκριμένα, το μέσο ποσοστό ερυθροειδικής διαφοροποίησης στους υγιείς δότες, στα μη μεταγμένα κύτταρα ισούται με $74.83 \pm 20.47\%$ και στα μεταγμένα με τον GammaThal με $78.4 \pm 17.15\%$. Στην περίπτωση των θαλασσαιμικών ασθενών αυτά τα ποσοστά ισούνται με $67.35 \pm 11.94\%$ και $65.25 \pm 16.46\%$, αντίστοιχα. Μετά από την στατιστική ανάλυση με τη δοκιμασία unpaired, two-tailed Student's t-test, βρέθηκε ότι οι διαφορές ανάμεσα στην ομάδα των υγιών δοτών και των θαλασσαιμικών, δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Συγκεκριμένα, δεν οδήγησε σε εμφάνιση στατιστικής σημαντικότητας, ούτε η σύγκριση της ομάδας των μη μεταγμένων κυττάρων στους υγιείς και τους θαλασσαιμικούς δότες ($p=0.565$, $n=7$), ούτε η σύγκριση των 2 κατηγοριών δοτών ως προς την μεταγωγή τους με τον GammaThal ($p=0.351$, $n=7$).

Περαιτέρω, τα ποσοστά των διαφοροποιημένων κυττάρων που εκφράζουν την εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη (F-κύτταρα), παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.17B. Συγκεκριμένα φαίνεται πως η μέση ποσοστιαία έκφραση των F-κυττάρων στα μη μεταγμένα κύτταρα στους υγιείς δότες είναι μικρότερη ($33.9 \pm 7.43\%$) από αυτή των θαλασσαιμικών ($42.77 \pm 15.93\%$), μια διαφορά όπου έπειτα από ανάλυση με τη δοκιμασία unpaired, two-tailed Student's t-test, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική ($p=0.419$, $n=7$). Ομοίως, η μέση ποσοστιαία έκφραση F-κυττάρων στα μεταγμένα CD34⁺ κύτταρα, στους υγιείς δότες συγκριτικά με τους θαλασσαιμικούς, δεν φάνηκε να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε στο $46.5 \pm 17.02\%$ έναντι $37.73 \pm 7.31\%$ ($p=0.448$, $n=7$). Τέλος, στην Εικόνα 3.17C παρουσιάζεται

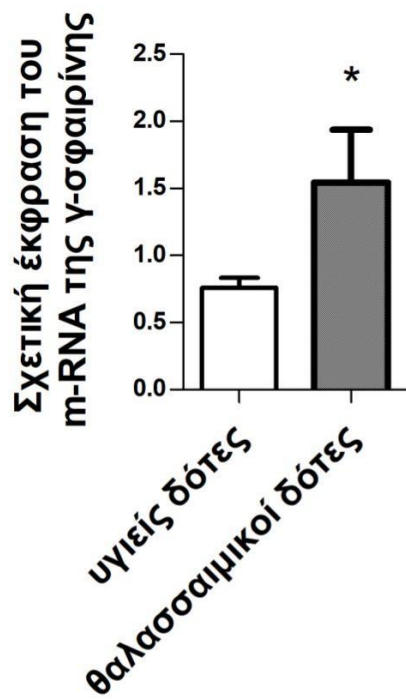
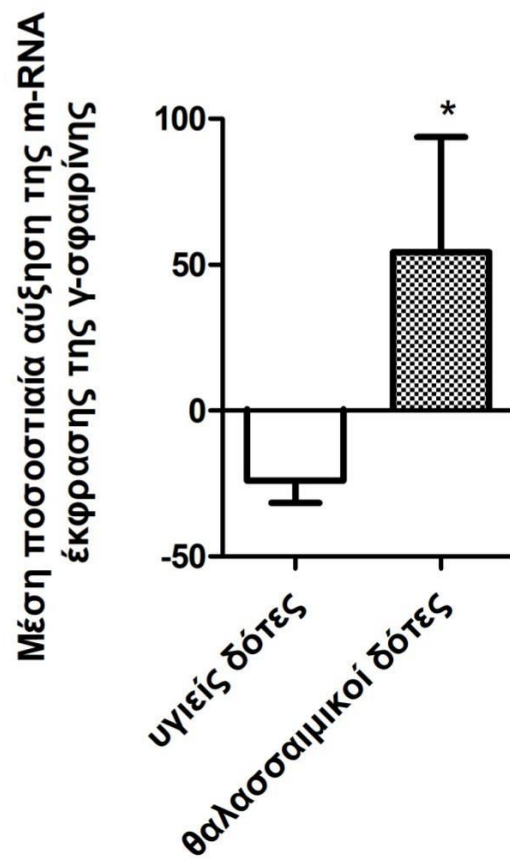
η μέση ποσοστιαία αύξηση των F κυττάρων ανάμεσα στους υγιείς και τους θαλασσαιμικούς δότες, η οποία ήταν $11.92 \pm 7.01\%$ για τους υγιείς δότες, ενώ για τους θαλασσαιμικούς δότες $8.927 \pm 3.86\%$ ($p=0.497$, $n=7$).



Εικόνα 3.17: Αξιολόγηση του νέου φορέα GammaThal στους φυσιολογικούς σε σχέση με τους θαλασσαιμικούς δότες. (A) Μέσο ποσοστό διαφοροποίησης στα μη μεταγμένα και στα μεταγμένα με τον GammaThal CD34⁺ κύτταρα, στους υγιείς και θαλασσαιμικούς δότες (unpaired, two-tailed Student's t-test), είτε συγκρίνοντας την ομάδα των μη μεταγμένων κυττάρων στους υγιείς και τους θαλασσαιμικούς ασθενείς ($p=0.565$, $n=7$), είτε συγκρίνοντας τις δύο ομάδες δωτών ως προς τον GammaThal ($p=0.351$, $n=7$). (B) Μέσο ποσοστό παραγωγής F κυττάρων στα μη μεταγμένα και στα μεταγμένα με τον GammaThal CD34⁺ κύτταρα στις δύο ομάδες (unpaired, two-tailed Student's t-test). Σύγκριση μη μεταγμένων κυττάρων σε θαλασσαιμικούς και υγιείς δότες ($p=0.419$, $n=7$), και σύγκριση μεταγμένων κυττάρων σε θαλασσαιμικούς και υγιείς δότες ($p=0.448$, $n=7$). (C) Σύγκριση μέσης ποσοστιαίας αύξησης των F κυττάρων στα μεταγμένα και μη μεταγμένα κύτταρα στους υγιείς και θαλασσαιμικούς δότες (unpaired, two-tail Student's t-test, $p=0.497$, $n=7$). Οι κάθετες γραμμές απεικονίζουν την σταθερά απόκλισης $\pm SD$

3.5.2 Έκφραση της εμβρυϊκής γ-σφαιρίνης σε επίπεδο μεταγράφου

Η αξιολόγηση της έκφρασης της εμβρυϊκής γ-σφαιρίνης σε επίπεδο μεταγράφου κατόπιν μεταγωγής με τον GammaThal, υπολογίστηκε με την χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR) την ημέρα 15 της υγρής καλλιέργειας ερυθροειδικής διαφοροποίησης, με εκκινητές για το διαγονίδιο της γ -σφαιρίνης. Για την εν λόγω ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ΔΔCT [99]. Στην Εικόνα 3.18Α, φαίνεται η μέση σχετική έκφραση της γ-σφαιρίνης σε επίπεδο μεταγράφου στους θαλασσαιμικούς δότες (1.543 ± 0.39) να είναι μεγαλύτερη από αυτή των υγιών δοτών (0.76 ± 0.08), μια διαφορά που είναι στατιστικά σημαντική (unpaired, two-tailed Student's t-test, $p=0.0211$, $n=7$). Η μέση αύξηση στα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου της γ-σφαιρίνης ανάμεσα στους υγιείς και τους θαλασσαιμικούς δότες, εμφανίζεται στην Εικόνα 3.18Β, όπου και παρατηρείται αύξηση στους θαλασσαιμικούς δότες που ανέρχεται στο $54.25 \pm 39.4\%$. Αντίθετα, στους υγιείς δότες δεν παρατηρείται αύξηση στα επίπεδα μεταγραφής της γ-σφαιρίνης έπειτα από μεταγωγή με τον GammaThal $24 \pm 7.55\%$ (unpaired, two-tailed Student's t-test, $p=0.0211$, $n=7$).

A**B**

Εικόνα 3.18: Αύξηση της έκφρασης της γ-σφαιρίνης σε επίπεδο μεταγράφου. (A) Μέση σχετική έκφραση της γ-σφαιρίνης σε επίπεδο μεταγράφου στα μεταγμένα με τον φορέα GammaThal CD34⁺ κύτταρα σε σχέση με τα μη μεταγμένα στους υγιείς και θαλασσαιμικούς δότες (unpaired, two-tailed Student's t-test $p=0.0211$, $n=7$). (B) Μέση αύξηση της έκφρασης της γ-σφαιρίνης στους υγιείς και στους θαλασσαιμικούς δότες (unpaired, two-tailed Student's t-test, $p=0.0211$, $n=7$). Η κανονικοποίηση έγινε έναντι του γονιδίου της α-σφαιρίνης. Οι κάθετες γραμμές απεικονίζουν την σταθερά απόκλιση $\pm SD$

Συζήτηση - Συμπεράσματα

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, κατασκευάσαμε έναν νέο λεντιϊκό φορέα γ-σφαιρίνης, τον GammaThal, βασισμένοι στον προηγουμένως χαρακτηρισμένο μας φορέα GGHI-mB-3D [71]. Ο νέος λεντιϊκός φορέας GammaThal φέρει δύο επιπρόσθετα στοιχεία που οδηγούν τόσο σε ακριβή ποσοτικοποίηση της εξωγενούς εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης μέσω μεταγωγής, αλλά και στην αύξηση της αποτελεσματικότητας μεταγωγής.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μια σημειακή μεταλλαγή τύπου αλλοίωσης νοήματος (missense) 220G→A (Forest Park) στο εξόνιο 2 του HBG1 γονιδίου, δηλαδή του γ γονιδίου, η οποία σε επίπεδο πρωτεΐνης οδηγεί σε αλλαγή ενός αμινοξέος και συγκεκριμένα του ασπαρτικού οξέος σε ασπαραγίνη (Asp74→Asn). Αυτή η μεταλλαγή, μειώνει την κινητικότητα της αιμοσφαιρίνης HbF-Forest Park σε αλκαλικό pH, με αποτέλεσμα να δίνει διαφορετικό πρότυπο έκλουσης από τις άλλες αιμοσφαιρίνες έπειτα από χρωματογραφία στήλης DEAE [79]. Με τον εν λόγω πολυμορφισμό αναμένουμε τη *δυνατότητα διάκρισης* της γ -σφαιρίνης του φορέα από την ενδογενή στα μεταγμένα CD34⁺ κύτταρα, και συνεπώς την *ακριβή ποσοτικοποίηση της συνεισφοράς του φορέα στην συνολική αύξηση της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης*. Στα χρονικά πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, η επιτυχία της σημειακής μεταλλαξιγένεσης επιβεβαιώθηκε με αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS), ενώ τα αποτελέσματα από την HPLC, για την επιβεβαίωση του διαφορετικού προτύπου αναμένονται. Σχετικά με την αυξημένη μεταγωγή, ο GammaThal φέρει τον εναλλακτικό γλυκοπρωτεϊνικό φάκελο HF του στελέχους Edmonston του ιού της ιλαράς [82]. Ο συγκεκριμένος φάκελος προσδίδει τροπισμό προς τα κύτταρα που εκφράζουν τους υποδοχείς CD46 και SLAM [101]. Ο υποδοχέας CD46 εκφράζεται [83] σε υψηλό βαθμό στα λεμφοκύτταρα και στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα CD34⁺, ενώ ο SLAM εκφράζεται κυρίως σε λεμφοκύτταρα και δενδριτικά και σχεδόν καθόλου στα αρχέγονα αιμοποιητικά CD34⁺ κύτταρα [84, 85]. Η ψευδοτύπωση τόσο του GammaThal όσο και του αρχικού GGHI-mB-3D οδήγησε σε φορείς με λειτουργικό μέσο τίτλο 3.88×10^6 και 5.48×10^6 , αντίστοιχα. Ο σχετικά χαμηλός τίτλος που παρατηρήθηκε, συμφωνεί τόσο με την υπάρχουσα βιβλιογραφία [102], όσο και με δικές μας παρατηρήσεις σχετικά με λεντιϊκούς φορείς με τον συγκεκριμένο φάκελο. Σύμφωνα με αδημοσίευτα δεδομένα του Εργαστηρίου Κυτταρικής και Γονιδιακής Θεραπείας του κέντρου Βασικής Έρευνας στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (IIBEAA), η παραγωγή λεντιϊκού φορέα IFNβ/HF οδήγησε σε μέσο λειτουργικό τίτλο 1.1×10^6 όταν η τιτλοποίηση πραγματοποιήθηκε στην κυτταρική σειρά H929 και σε 1.9×10^6 όταν η τιτλοποίηση έγινε στην κυτταρική σειρά JN3. Αυτές οι κυτταρικές σειρές εμφανίζουν το ίδιο πρότυπο έκφρασης του αντιγόνου επιφανείας CD46 όπως η κυτταρική σειρά HEK293T. Εκτιμάται ότι ο χαμηλότερος λειτουργικός τίτλος των παραπάνω

φορέων συγκριτικά με φορείς που φέρουν τον ευρέως χρησιμοποιούμενο φάκελο VSV-G [82], οφείλεται στη δημιουργία συγκυτίων κατά την παραγωγή του ιού στην κυτταρική σειρά HEK 293, η οποία εκφράζει τον υποδοχέα CD46, όπως τεκμηριώθηκε πρόσφατα [103].

Αρχικά, αξιολογήθηκε ο νέος λεντιϊκός φορέας GammaThal σε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα υγιών δοτών με σκοπό να ελεγχθεί η δυνατότητα υψηλής έκφρασης του διαγονιδίου σε χαμηλή πολλαπλότητα μόλυνσης MOI=25. Η επιλογή του συγκεκριμένου MOI βασίστηκε στην υπάρχουσα βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους Drakoroulou et al 2019 [71], μεταγωγή φυσιολογικών CD34⁺ κυττάρων με τον GGHI-mB-3D/BaEVRless με MOI=25, επέφερε μέση αύξηση στα επίπεδα των F-κυττάρων 20.1%, ενώ μεταγωγή με τον GGHI-mB-3D/VSV-G δεν κατάφερε να οδηγήσει σε αύξηση. Επιπλέον, *in vitro* πειράματα μεταγωγής των CD34⁺ κυττάρων με GFP/HF και MOI 10, τόσο στο εργαστήριο μας, όσο και από τους Levy et al 2017 [82], έδειξαν ότι ακόμα και σε τόσο χαμηλό MOI, η έκφραση των GFP θετικών κυττάρων είναι υψηλή (>50%). Συνεπώς, υποθέσαμε ότι μεταγωγή με τον GammaThal σε MOI 25, ενδεχομένως να ήταν αρκετή να οδηγήσει σε υψηλά ποσοστά έκφρασης του διαγονιδίου.

Σε πρώτη φάση, στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε *in vitro* αξιολόγηση σε κύτταρα φυσιολογικών ασθενών. Έπειτα από 3 ανεξάρτητα πειράματα σε κύτταρα από φυσιολογικούς δότες, παρατηρήθηκε ότι ο νέος φορέας GammaThal δύναται να επιφέρει μια μικρή αύξηση F-κυττάρων 11.92% με μέσο VCN 0.25. Σε επίπεδο μεταγράφου, η έκφραση του mRNA της γ-σφαιρίνης στα μεταγμένα με τον GammaThal κύτταρα σε σχέση με τα μη μεταγμένα βρέθηκε να είναι 0.76 (p=0.031, n=3). Η παρατηρούμενη διαφορά στα επίπεδα μεταγραφής του γ-γονιδίου μεταξύ των μεταγμένων και μη μεταγμένων κυττάρων, δεν συμφωνεί με την υπάρχουσα βιβλιογραφία όπου μετά την μεταγωγή παρατηρείται αύξηση των επιπέδων μεταγραφής της γ-σφαιρίνης. Συγκεκριμένα, οι Wilber et al 2011 [74], παρατήρησαν μια αύξηση στα επίπεδα του mRNA κατά 3-4 φορές στα μεταγμένα φυσιολογικά CD34⁺ κύτταρα σε σχέση με τα μη μεταγμένα, ενώ σε μια μελέτη των Yan Dai et al 2019 [104], η αύξηση αυτή ήταν κατά 4.3 φορές. Πιθανολογούμε ότι αυτή η ασυμφωνία με τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα, έγκειται στην ημέρα ανίχνευσης των επιπέδων mRNA της γ-σφαιρίνης, καθώς στις παραπάνω μελέτες η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε τις ημέρες 8 και 11 για τους Wilber et al 2011 [74], και την ημέρα 12 για τους Yan Dai et al 2019 [104], ενώ στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε την ημέρα 15. Για να διευκρινιστεί το αν έχουν υποεκτιμηθεί τα επίπεδα μεταγραφής της γ-σφαιρίνης μετά την μεταγωγή στην ομάδα των υγιειών δοτών λόγω της ημέρας ανίχνευσής τους, σχεδιάζεται να

πραγματοποιηθούν περαιτέρω αναλύσεις σε πρωιμότερα στάδια της ερυθροειδικής διαφοροποίησης.

Βασισμένοι στα παραπάνω αποτελέσματα, ο νέος φορέας GammaThal αξιολογήθηκε σε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα θαλασσαιμικών δοτών είτε με φαινότυπο β^+ είτε με β^0 . Αρχικά, παρατηρήθηκε ότι η μεταγωγή με τον φορέα δεν επηρεάζει αρνητικά την ερυθροειδική διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών, κάτι που αναμέναμε [105, 106] και έχει παρατηρηθεί και απο προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας (Drakoroulou et al 2019 [71] και Paranikolaou et al 2012 [70]). Σύμφωνα με τους Migliaccio et al 2002 [106] κατά τη διάρκεια της *in vitro* διαφοροποίησης $CD34^+$ κυττάρων υγιή δότη με την χρήση κυτοκινών, IL-3, hSCF, EPO, οιστραδιόλη και δεξαμεθαζόνη (δηλ. με τις ίδιες κυττοκίνες που χρησιμοποιήθηκαν και στην παρούσα μελέτη), το ποσοστό έκφρασης του $CD235a$ αυξάνοταν κατά την διαφοροποίηση. Συγκεκριμένα, έπειτα από ανάλυση με κυτταρομετρία ροής και με βάση τον επιφανειακό ερυθροειδικό δείκτη έναντι της ανθρώπινης γλυκοφορίνης A, $CD235a$, φάνηκε ότι η διαφοροποίηση στα μεταγμένα και μη μεταγμένα κύτταρα ήταν παρόμοια (65.25% και 67.35% αντίστοιχα). Όσον αφορά στο μέσο ποσοστό έκφρασης των διαφοροποιημένων κυττάρων που εκφράζουν την ανθρώπινη εμβρυική αιμοσφαιρίνη (F-κύτταρα) στα μεταγμένα με τον GammaThal κύτταρα, αυτό ανήλθε στο 46.5% ενώ στα μη μεταγμένα 42.7%, μια διαφορά της τάξης του 8.92% η οποία είναι στατιστικά σημαντική ($p=0.026$, $n=4$). Η εν λόγω αύξηση των F-κυττάρων πραγματοποιήθηκε με μέσο αριθμό αντιγράφων φορέα ανά κύτταρο $VCN = 0.947$, τιμή η οποία πλησιάζει το ιδανικό VCN το οποίο σύμφωνα με την βιβλιογραφία [107] κυμαίνεται από 1-2 αντίγραφα λεντιϊκού φορέα ανά κύτταρο για την γονιδιακή θεραπεία της β -θαλασσαιμίας. Χαμηλές τιμές VCN κάτω από 1, έχουν τεκμηριωθεί απο ένα μεγάλο αριθμό εργασιών με αντίστοιχα ευρήματα. Συγκεκριμένα, οι Drakoroulou et al. 2019 [71], έδειξαν ότι έπειτα από μεταγωγή των $CD34^+$ κυττάρων με τον λεντιϊκό φορέα γ -σφαιρίνης GGHI-mB-3D και φάκελο BaEVRless με $MOI=50$, ο μέσος αριθμός αντιγράφων φορέα ανά κύτταρο ήταν 0.86. Κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες, παρατηρήθηκε ότι ο μέσος λόγος $\Delta\gamma/\alpha=0.74$. Συγκριτικά με εκείνον της ομάδας ελέγχου που ήταν 0.35, έπειτα από κανονικοποίηση με το VCN , οδηγεί σε μια μέση αύξηση της HbF της τάξης του 118%. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιώντας χαμηλότερο MOI , ο VCN που επετεύχθη ήταν υψηλότερος, γεγονός που υποδηλώνει σημαντική αποτελεσματικότητα μεταγωγής του φορέα. Σε μελέτη με τον GLOBE [108], ο μέσος VCN ήταν 1.6, όμως σε 4 από τους 22 ασθενείς ο VCN στις αποικίες BFU-e κυμαινόταν από 0.4-0.9. Σύμφωνα με τους Persons et al., 2001 [109], η μέση αύξηση της HbF ως προς τον μέσο VCN για να επέλθει θεραπευτική βελτίωση πρέπει να είναι άνω του 30%.

Τα πρωταρχικά αποτελέσματα της HPLC των τετραμερών για τον $\beta^0\beta^0$ θαλασσαιμικό ασθενή Thal 4, δείχνουν ότι ο λόγος HbF/HbA στα μη μεταγμένα κύτταρα ήταν 0.57, ενώ στα μεταγμένα 0.77, μια αύξηση 35.08%, η οποία έπεται από κανονικοποίηση με τον μέσο VCN του συγκεκριμένου ασθενή (VCN=0.159) ανέρχεται στο 220.62%. Με βάση τα όσα γνωρίζουμε, δεν έχει παρατηρηθεί στο παρελθόν τόσο σημαντική αύξηση, έπεται από μεταγωγή σε τόσο χαμηλό MOI. Καθώς η ποσοτικοποίηση της HbF στα κύτταρα των θαλασσαιμικών δοτών με HPLC δεν έχει ολοκληρωθεί, μετά από κανονικοποίηση με τον μέσο VCN, της μέσης αύξησης των F-κυττάρων στα μεταγμένα με τον GammaThal κύτταρα. Όπως αυτά προσδιορίστηκαν με κυτταρομετρία ροής, η αύξηση των F-κυττάρων ανά αντίγραφο φορέα και ανά κύτταρο, που σημειώθηκε στους θαλασσαιμικούς ασθενείς της παρούσας μελέτης ήταν $32.96 \pm 33.73\%$. Σύμφωνα με τους Persons et al 2003 [59], μεταγωγή με γ -λεντιϊκό φορέα *in vivo* σε θαλασσαιμικό μοντέλο ποντικού και συσχέτιση του ποσοστού των F-κυττάρων με τον VCN ($r^2=0.47$) έδειξε ότι ποσοστό έκφρασης HbF υψηλότερο του 15% οδηγεί σε ποσοστό F-κυττάρων προς VCN ίσο με 33.5%. Στην περίπτωση του GammaThal και των πειραμάτων στα κύτταρα των θαλασσαιμικών ασθενών, υπάρχει ακόμα πιο ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στο ποσοστό έκφρασης των F-κυττάρων και του VCN ($r^2=0.64$). Βάσει των παραπάνω, η αύξηση των F-κυττάρων που παρατηρήθηκε κατόπιν μεταγωγής με τον GammaThal σε MOI 25, είναι ενθαρρυντική. Καθώς όμως η εγγενής ετερογένεια μεταξύ των θαλασσαιμικών δειγμάτων είναι σημαντική, όπως αυτή τεκμηριώνεται από τον γονότυπο του έκαστοτε ασθενή και την υψηλή σταθερά απόκλισης στη μέση τιμή της έκφρασης των F-κυττάρων προς τον VCN ($32.96 \pm 33.73\%$), κρίνεται απαραίτητη η διεξαγωγή επιπλέον πειραμάτων με μεγαλύτερο αριθμό αντιπροσωπευτικών δειγμάτων τόσο με γονότυπο β^0/β^0 , όσο και β^+/ β^+ και β^0/β^+ , ώστε να οδηγηθούμε σε ασφαλή συμπεράσματα.

Όσον αφορά στην μέση αποτελεσματικότητα μεταγωγής του νέου λεντιϊκού φορέα GammaThal, αυτή ανήλθε στο 54.58% εμφανίζοντας ισχυρή συσχέτιση με το VCN (Spearman, $r=0.8$, $p=0.33$). Παρόλα αυτά, ο ασθενής με το υψηλότερο VCN (Thal 2, VCN=1.907) δεν εμφάνισε την υψηλότερη αποτελεσματικότητα μεταγωγής (Thal 2, αποτελεσματικότητα μεταγωγής 75%). Την υψηλότερη αποτελεσματικότητα μεταγωγής 80% εμφάνισε ο Thal 1 με μέσο VCN=0.926. Επιπλέον, οι ασθενείς που εμφάνισαν την υψηλότερη αύξηση στα επίπεδα των F-κυττάρων δεν συνδέονταν και με την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα μεταγωγής (Πίνακας 8). Συγκεκριμένα ο Thal 1 που εμφάνισε την υψηλότερη αποτελεσματικότητα μεταγωγής 80%, παρουσίασε μια αύξηση των F-κυττάρων της τάξης του 4.336%, ενώ ο ασθενής Thal 3 παρουσίασε την υψηλότερη αύξηση F-κυττάρων 13.013% με αποτελεσματικότητα μεταγωγής 36.66%. Αυτό υποδηλώνει ότι η έκφραση του διαγονιδίου

δεν εξαρτάται μόνο από την αποτελεσματικότητα μεταγωγής και τον VCN, αλλά και από το πρότυπο (pattern) ενσωμάτωσής του στο γονιδίωμα του θαλασσαιμικού κυττάρου, όπως είχε παρατηρηθεί και σε προηγούμενες μελέτες του Εργαστηρίου μας [70, 71]. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία [82], μεταγωγή CD34⁺ κυττάρων με λεντιϊκό φορέα GFP/HF σε MOI=10 οδηγεί σε αποτελεσματικότητα μεταγωγής ~90%, έπειτα από υπολογισμό της με κυτταρομετρία ροής 3 ημέρες μετά την μεταγωγή. Η αυξημένη μεταγωγή των Levy et al 2017 [102] οφείλεται πιθανόν στον διαφορετικό τρόπο προσδιορισμού της αποτελεσματικότητας της μεταγωγής, η οποία έγινε με κυτταρομετρία ροής λίγες η μέρες αμέσως μετά την μεταγωγή, ενώ στην περίπτωση του GammaThal ο προσδιορισμός της αποτελεσματικότητας μεταγωγής έγινε σε ερυθροειδικές αποικίες 12 ημέρες μετά την μεταγωγή με PCR και qPCR.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, υπάρχει μια στατιστικά σημαντική αύξηση των F- κυττάρων στα μεταγμένα σε σχέση με τα μη μεταγμένα κύτταρα. Αυτή η αύξηση $32.96 \pm 33.73\%$, εμφανίζει ισχυρή συσχέτιση με την μέση αύξηση της έκφρασης της γ -σφαιρίνης σε επίπεδο μεταγράφου (Spearman, $r=0.8$, $p=0.33$). Συγκεκριμένα, η μέση αύξηση σε επίπεδο m-RNA μετά από 4 ανεξάρτητα πειράματα υπολογίστηκε στο $54.2\% \pm 39.4$, και συγκρίνοντας την με τα επίπεδα αύξησης της έκφρασης της γ -σφαιρίνης σε επίπεδο μεταγράφου στους υγιείς δότες ($-24 \pm 7.55\%$), παρατηρούμε μια στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.021$, $n=7$), γεγονός που υποδηλώνει διαφορετική ανταπόκριση μεταξύ υγιών και θαλασσαιμικών δοτών. Η διαφορά αυτή αντανακλά την διαφορά της μεταγραφικής ενεργότητας των εμβρυϊκών γ -γονιδίων μεταξύ υγιών και θαλασσαιμικών κυττάρων, δεδομένου ότι στα πρώτα η δομή της χρωματίνης είναι κλειστή, εν αντιθέσει με την κατάσταση ενεργότητας ανοιχτής χρωματίνης στα ενήλικα θαλασσαιμικά αρχέγονα αιμοποιητικά CD34⁺ κύτταρα, όπως υποστηρίζεται και από τους Enver et al 1988 [110], και Lessard et al 2015 [111]. Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα από *in vivo* θαλασσαιμικό μοντέλο, έκφραση των επιπέδων της γ -σφαιρίνης στο 13% σε σχέση με την α -σφαιρίνη, οδηγούν σε έκφραση της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης στο 27%, ποσοστό το οποίο είναι σχεδόν θεραπευτικό [109]. Συνεπώς η αύξηση λόγω του φορέα GammaThal είναι σημαντική και δυνητικά ικανή να επιφέρει θεραπευτική βελτίωση *in vitro*.

Το παραπάνω επιβεβαιώνεται τόσο με την μείωση του μέσου ποσοστού αποπτωτικών κυττάρων όσο και από την αύξηση των ορθοχρωματικών ερυθροβλαστών στους θαλασσαιμικούς δότες. Συγκεκριμένα, και μετά από 3 ανεξάρτητα πειράματα σε θαλασσαιμικούς δότες (ο Thal 2 δεν συμπεριλήφθηκε ως outlier), το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων κατόπιν μεταγωγής ήταν $32.67 \pm 4.66\%$ έναντι $36.4 \pm 5.98\%$, στα μη μεταγμένα κύτταρα ($p=0.067$, $n=3$). Παρατηρήθηκε μια τάση μείωσης στο ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων της τάξης του 10.24% ($p=0.067$, $n=3$), η οποία μείωση είχε απόλυτη

συσχέτιση με την μέση αύξηση των F-κυττάρων ($r=1$, $p=0.33$). Πράγματι, ο ασθενής Thal 4 που εμφάνισε την μεγαλύτερη αύξηση στα επίπεδα των F-κυττάρων (13.01%) είχε και την μεγαλύτερη μείωση απόπτωσης (13.57%). Ακόμα, μετά απο την ανάλυση HPLC τετραμερούς για τον συγκεκριμένο ασθενή, σημειώθηκε μια αύξηση στον λόγο HbF/HbA μετά την μεταγωγή με τον GammaThal, της τάξης του 35.08%. Σχετικά με τη μη στατιστική διαφορά στο μέσο ποσοστό της Annexin-V στα μη μεταγμένα και στα μεταγμένα κύτταρα, σχετικές μελέτες [112, 113] αναφέρουν ότι η απόπτωση στα όψιμα στάδια της ερυθροποίησης δεν είναι πάντα αυξημένη στους θαλασσαιμικούς ασθενείς. Αντιθέτως, η διαφορά στην βελτίωση της απόπτωσης είναι δυνατό να τεκμηριωθεί σε πρωιμότερα στάδια της ερυθροποίησης.

Την τάση για βελτίωση της ερυθροποίησης και διόρθωση του φαινοτύπου επιβεβαιώνει και η αύξηση των ορθοχρωματικών ερυθροβλαστών, όπως παρατηρήθηκε έπειτα από χρώση Wright-Giemsa. Συγκεκριμένα, ο μέσος αριθμός ορθοχρωματικών ερυθροβλαστών στα μη μεταγμένα κύτταρα έπειτα από 3 ανεξάρτητα πειράματα (δεν υπήρχαν αρκετά κύτταρα στον Thal 1), υπολογίστηκε στο 15.78 ± 11.52 , ενώ για τα μεταγμένα κύτταρα με τον GammaThal ο αριθμός ήταν υψηλότερος και ίσος με 23.37 ± 15.26 ($p=0.0001$).

Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα από τον GammaThal είναι ενθαρρυντικά, κυρίως λαμβάνοντας υπόψιν τα αρχικά αποτελέσματα απο την HPLC τετραμερούς για τον Thal 4, όμως χρίζουν περαιτέρω βελτιώσεων. Αρχικά, στοχεύουμε να αυξήσουμε τον λειτουργικό τίτλο του GammaThal τιτλοποιώντας τον σε μια νέα κυτταρική σειρά συσκευασίας 293T CD46^{-/-} που δεν εκφράζει τον υποδοχέα CD46, ώστε να μειωθεί/μηδενιστεί η δημιουργία συγκυτίων που οδηγούν σε χαμηλο τίτλο [103]. Ακόμα, κρίνεται απαραίτητη η διεξαγωγή επιπλέον πειραμάτων σε θαλασσαιμικούς ασθενείς με υψηλότερο MOI (30-50), καθώς και σε *in vivo* πειράματα διόρθωσης του θαλασσαιμικού φαινοτύπου σε εξανθρωπισμένο (humanized) θαλασσαιμικό μοντέλο ποντικού (NSG), ώστε να διαπιστωθεί αν ο GammaThal μπορεί να αποτελέσει έναν αποτελεσματικό φορέα για την κλινική εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας της β-θαλασσαιμίας. Τέλος, έχουν προγραμματιστεί πειράματα για τον χαρακτηρισμό του προτύπου ενσωμάτωσης (integration site analysis) του διαγονιδίου στα κύτταρα-στόχους, σε συνδυασμό με την ανάλυση του μεταγραφικού προτύπου της έκφρασης των γ-γονιδίων ώστε να προσδιοριστεί ο βαθμός της τυχόν γενοτοξικότητας του GammaThal και να βρεθεί, εαν και σε ποιο βαθμό τα επίπεδα έκφρασης της γ-σφαιρίνης επηρεάζονται από το παρακείμενο περιβάλλον της ένθεσης, με βάση προηγούμενες μελέτες μας [114].

Συμπερασματικά, στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας κατασκευάσαμε έναν νέο, βελτιωμένο λεντιϊκό φορέα γ-σφαιρίνης, τον GammaThal που επιτρέπει την ακριβή

ποσοτικοποίηση της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης που προέρχεται από τον φορέα, και επιπλέον οδηγεί σε αυξημένο τροπισμό και αποτελεσματικότητα μεταγωγής των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων CD34⁺ λόγω του νέου ψευδοτυπημένου γλυκοπρωτεϊνικού φακέλου HF. Αξιολόγηση του εν λόγω φορέα σε κύτταρα θαλασσαιμικών δοτών, έδειξε ότι δύναται να βελτιώσει την ερυθροποίηση *in vitro* σε χαμηλή πολλαπλότητα μόλυνσης (MOI=25) και με χαμηλό μέσο αριθμό αντιγράφων του φορέα ανά κύτταρο, και συνεπώς θα μπορούσε δυνητικά να αποτελέσει έναν νέο φορέα για την περαιτέρω βελτίωση της τρέχουσας γονιδιακής θεραπείας για τη β-θαλασσαιμία.

Βιβλιογραφία

1. Schechter, A.N., *Hemoglobin research and the origins of molecular medicine*. Blood, 2008. **112**(10): p. 3927-38.
2. Thom, C.S., et al., *Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013. **3**(3): p. a011858.
3. Giardina, B., et al., *The multiple functions of hemoglobin*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1995. **30**(3): p. 165-96.
4. Levings, P.P. and J. Bungert, *The human beta-globin locus control region*. Eur J Biochem, 2002. **269**(6): p. 1589-99.
5. Kiefer, C.M., et al., *Epigenetics of beta-globin gene regulation*. Mutat Res, 2008. **647**(1-2): p. 68-76.
6. Sankaran, V.G. and S.H. Orkin, *The switch from fetal to adult hemoglobin*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013. **3**(1): p. a011643.
7. Wilber, A., A.W. Nienhuis, and D.A. Persons, *Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching: new therapeutic opportunities*. Blood, 2011. **117**(15): p. 3945-53.
8. Sankaran, V.G., J. Xu, and S.H. Orkin, *Advances in the understanding of haemoglobin switching*. Br J Haematol, 2010. **149**(2): p. 181-94.
9. Thein, S.L., et al., *Detection of a major gene for heterocellular hereditary persistence of fetal hemoglobin after accounting for genetic modifiers*. Am J Hum Genet, 1994. **54**(2): p. 214-28.
10. Forget, B.G., *Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **850**: p. 38-44.
11. Thein, S.L., et al., *Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(R2): p. R216-23.
12. Ye, L., et al., *Genome editing using CRISPR-Cas9 to create the HPFH genotype in HSPCs: An approach for treating sickle cell disease and beta-thalassemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(38): p. 10661-5.
13. Superti-Furga, G., et al., *The -117 mutation in Greek HPFH affects the binding of three nuclear factors to the CCAAT region of the gamma-globin gene*. EMBO J, 1988. **7**(10): p. 3099-107.

14. Motta, I., et al., *Curing Hemoglobinopathies: Challenges and Advances of Conventional and New Gene Therapy Approaches*. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2019. **11**(1): p. e2019067.
15. Chaisue, C., et al., *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**(18): p. 1373-7.
16. Williams, T.N. and D.J. Weatherall, *World distribution, population genetics, and health burden of the hemoglobinopathies*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. **2**(9): p. a011692.
17. Weatherall, D.J. and J.B. Clegg, *Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem*. *Bull World Health Organ*, 2001. **79**(8): p. 704-12.
18. Mettananda, S. and D.R. Higgs, *Molecular Basis and Genetic Modifiers of Thalassemia*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2018. **32**(2): p. 177-191.
19. Farashi, S. and C.L. Harteveld, *Molecular basis of alpha-thalassemia*. *Blood Cells Mol Dis*, 2018. **70**: p. 43-53.
20. Galanello, R. and A. Cao, *Gene test review. Alpha-thalassemia*. *Genet Med*, 2011. **13**(2): p. 83-8.
21. Cunningham, M.J., *Update on thalassemia: clinical care and complications*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2010. **24**(1): p. 215-27.
22. Thein, S.L., *Genetic insights into the clinical diversity of beta thalassaemia*. *Br J Haematol*, 2004. **124**(3): p. 264-74.
23. Thein, S.L., *The molecular basis of beta-thalassemia*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013. **3**(5): p. a011700.
24. De Sanctis, V., et al., *beta-Thalassemia Distribution in the Old World: an Ancient Disease Seen from a Historical Standpoint*. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2017. **9**(1): p. e2017018.
25. Galanello, R. and R. Origa, *Beta-thalassemia*. *Orphanet J Rare Dis*, 2010. **5**: p. 11.
26. Thein, S.L., *Molecular basis of beta thalassemia and potential therapeutic targets*. *Blood Cells Mol Dis*, 2018. **70**: p. 54-65.

27. Nienhuis, A.W. and D.G. Nathan, *Pathophysiology and Clinical Manifestations of the beta-Thalasseмииs*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(12): p. a011726.
28. Fibach, E. and E.A. Rachmilewitz, *Pathophysiology and treatment of patients with beta-thalassemia - an update*. F1000Res, 2017. **6**: p. 2156.
29. Mathews, V., A. Srivastava, and M. Chandy, *Allogeneic stem cell transplantation for thalassemia major*. Hematol Oncol Clin North Am, 2014. **28**(6): p. 1187-200.
30. Bank, A., *Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities*. Blood, 2006. **107**(2): p. 435-43.
31. Sripichai, O. and S. Fucharoen, *Fetal hemoglobin regulation in beta-thalassemia: heterogeneity, modifiers and therapeutic approaches*. Expert Rev Hematol, 2016. **9**(12): p. 1129-1137.
32. Kay, M.A., *State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(5): p. 316-28.
33. Ginn, S.L., et al., *Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update*. J Gene Med, 2018. **20**(5): p. e3015.
34. Friedmann, T., *Progress toward human gene therapy*. Science, 1989. **244**(4910): p. 1275-81.
35. Verma, I.M. and M.D. Weitzman, *Gene therapy: twenty-first century medicine*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 711-38.
36. Mavilio, F. and G. Ferrari, *Genetic modification of somatic stem cells. The progress, problems and prospects of a new therapeutic technology*. EMBO Rep, 2008. **9 Suppl 1**: p. S64-9.
37. Smith, K.R., *Gene transfer in higher animals: theoretical considerations and key concepts*. J Biotechnol, 2002. **99**(1): p. 1-22.
38. Kaufmann, K.B., et al., *Gene therapy on the move*. EMBO Mol Med, 2013. **5**(11): p. 1642-61.
39. Kumar, S.R., et al., *Clinical development of gene therapy: results and lessons from recent successes*. Mol Ther Methods Clin Dev, 2016. **3**: p. 16034.

40. Stathopoulos, P.B., *Taking the good out of the bad: lentiviral-based gene therapy of the hemoglobinopathies*. Biotechnol Adv, 2003. **21**(6): p. 513-26.
41. Robbins, P.D., H. Tahara, and S.C. Ghivizzani, *Viral vectors for gene therapy*. Trends Biotechnol, 1998. **16**(1): p. 35-40.
42. Sharon, D. and A. Kamen, *Advancements in the design and scalable production of viral gene transfer vectors*. Biotechnol Bioeng, 2018. **115**(1): p. 25-40.
43. Lukashev, A.N. and A.A. Zamyatnin, Jr., *Viral Vectors for Gene Therapy: Current State and Clinical Perspectives*. Biochemistry (Mosc), 2016. **81**(7): p. 700-8.
44. Chang, T. and J.K. Yee, *General principles of retrovirus vector design*. Methods Enzymol, 2012. **507**: p. 1-14.
45. Thomas, C.E., A. Ehrhardt, and M.A. Kay, *Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy*. Nat Rev Genet, 2003. **4**(5): p. 346-58.
46. Totsch, S.K., et al., *Oncolytic herpes simplex virus immunotherapy for brain tumors: current pitfalls and emerging strategies to overcome therapeutic resistance*. Oncogene, 2019. **38**(34): p. 6159-6171.
47. Logan, A.C., C. Lutzko, and D.B. Kohn, *Advances in lentiviral vector design for gene-modification of hematopoietic stem cells*. Curr Opin Biotechnol, 2002. **13**(5): p. 429-36.
48. Cooray, S., S.J. Howe, and A.J. Thrasher, *Retrovirus and lentivirus vector design and methods of cell conditioning*. Methods Enzymol, 2012. **507**: p. 29-57.
49. Shaw, A. and K. Cornetta, *Design and Potential of Non-Integrating Lentiviral Vectors*. Biomedicines, 2014. **2**(1): p. 14-35.
50. Miyoshi, H., et al., *Development of a self-inactivating lentivirus vector*. J Virol, 1998. **72**(10): p. 8150-7.
51. Cronin, J., X.Y. Zhang, and J. Reiser, *Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping*. Curr Gene Ther, 2005. **5**(4): p. 387-98.
52. Joglekar, A.V. and S. Sandoval, *Pseudotyped Lentiviral Vectors: One Vector, Many Guises*. Hum Gene Ther Methods, 2017. **28**(6): p. 291-301.

53. Vigna, E. and L. Naldini, *Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy*. J Gene Med, 2000. **2**(5): p. 308-16.
54. Schlimgen, R., et al., *Risks Associated With Lentiviral Vector Exposures and Prevention Strategies*. J Occup Environ Med, 2016. **58**(12): p. 1159-1166.
55. Kappes, J.C. and X. Wu, *Safety considerations in vector development*. Somat Cell Mol Genet, 2001. **26**(1-6): p. 147-58.
56. May, C., et al., *Therapeutic haemoglobin synthesis in beta-thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human beta-globin*. Nature, 2000. **406**(6791): p. 82-6.
57. Pawliuk, R., et al., *Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy*. Science, 2001. **294**(5550): p. 2368-71.
58. Imren, S., 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**(22): p. 14380-5.
59. Persons, D.A., et al., *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**(6): p. 2175-83.
60. Rivella, S., et al., *A novel murine model of Cooley anemia and its rescue by lentiviral-mediated human beta-globin gene transfer*. Blood, 2003. **101**(8): p. 2932-9.
61. Puthenveetil, G., et al., *Successful correction of the human beta-thalassemia major phenotype using a lentiviral vector*. Blood, 2004. **104**(12): p. 3445-53.
62. Miccio, A., 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**(30): p. 10547-52.
63. Cavazzana-Calvo, M., et al., *Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia*. Nature, 2010. **467**(7313): p. 318-22.
64. Rai, P. and P. Malik, *Gene therapy for hemoglobin disorders - a mini-review*. J Rare Dis Res Treat, 2016. **1**(2): p. 25-31.

65. Karponi, G. and N. Zogas, *Gene Therapy For Beta-Thalassemia: Updated Perspectives*. *Appl Clin Genet*, 2019. **12**: p. 167-180.
66. Thompson, A.A., et al., *Gene Therapy in Patients with Transfusion-Dependent beta-Thalassemia*. *N Engl J Med*, 2018. **378**(16): p. 1479-1493.
67. Negre, O., et al., *Gene Therapy of the beta-Hemoglobinopathies by Lentiviral Transfer of the beta(A(T87Q))-Globin Gene*. *Hum Gene Ther*, 2016. **27**(2): p. 148-65.
68. Hoban, M.D., S.H. Orkin, and D.E. Bauer, *Genetic treatment of a molecular disorder: gene therapy approaches to sickle cell disease*. *Blood*, 2016. **127**(7): p. 839-48.
69. Sunshine, H.R., J. Hofrichter, and W.A. Eaton, *Requirement for therapeutic inhibition of sickle haemoglobin gelation*. *Nature*, 1978. **275**(5677): p. 238-40.
70. Papanikolaou, E., et al., *The new self-inactivating lentiviral vector for thalassemia gene therapy combining two HPFH activating elements corrects human thalassemic hematopoietic stem cells*. *Hum Gene Ther*, 2012. **23**(1): p. 15-31.
71. Drakopoulou, E., et al., *A Novel BaEVRless-Pseudotyped gamma-Globin Lentiviral Vector Drives High and Stable Fetal Hemoglobin Expression and Improves Thalassemic Erythropoiesis In Vitro*. *Hum Gene Ther*, 2019. **30**(5): p. 601-617.
72. Frecha, C., et al., *A novel lentiviral vector targets gene transfer into human hematopoietic stem cells in marrow from patients with bone marrow failure syndrome and in vivo in humanized mice*. *Blood*, 2012. **119**(5): p. 1139-50.
73. Girard-Gagnepain, A., et al., *Baboon envelope pseudotyped LVs outperform VSV-G-LVs for gene transfer into early-cytokine-stimulated and resting HSCs*. *Blood*, 2014. **124**(8): p. 1221-31.
74. Wilber, A., et al., *Therapeutic levels of fetal hemoglobin in erythroid progeny of beta-thalassemic CD34+ cells after lentiviral vector-mediated gene transfer*. *Blood*, 2011. **117**(10): p. 2817-26.
75. Hanawa, H., et al., *Extended beta-globin locus control region elements promote consistent therapeutic expression of a gamma-globin lentiviral vector in murine beta-thalassemia*. *Blood*, 2004. **104**(8): p. 2281-90.

76. Zhao, H.F., et al., *Lentiviral Transfer of gamma-Globin with Fusion Gene NUP98-HOXA10HD Expands Hematopoietic Stem Cells and Ameliorates Murine beta-Thalassemia*. *Mol Ther*, 2017. **25**(3): p. 593-605.
77. Zhao, H., et al., *Amelioration of murine beta-thalassemia through drug selection of hematopoietic stem cells transduced with a lentiviral vector encoding both gamma-globin and the MGMT drug-resistance gene*. *Blood*, 2009. **113**(23): p. 5747-56.
78. Malik, P., et al., *Gene Therapy for Sickle Cell Anemia Using a Modified Gamma Globin Lentivirus Vector and Reduced Intensity Conditioning Transplant Shows Promising Correction of the Disease Phenotype*. *Blood*, 2018. **132**(Supplement 1): p. 1021-1021.
79. Chen, S.S., et al., *Hb F-Forest Park, a new A gamma variant with two amino acid substitutions, 75(E19)Ile----Thr and 73(E17)Asp----Asn, which can be identified in adults by gene-mapping analysis*. *Biochim Biophys Acta*, 1985. **832**(3): p. 242-7.
80. Malvoisin, E. and T.F. Wild, *Measles virus glycoproteins: studies on the structure and interaction of the haemagglutinin and fusion proteins*. *J Gen Virol*, 1993. **74 (Pt 11)**: p. 2365-72.
81. Buchholz, C.J., M.D. Muhlebach, and K. Cichutek, *Lentiviral vectors with measles virus glycoproteins - dream team for gene transfer?* *Trends Biotechnol*, 2009. **27**(5): p. 259-65.
82. Levy, C., et al., *Measles virus envelope pseudotyped lentiviral vectors transduce quiescent human HSCs at an efficiency without precedent*. *Blood Adv*, 2017. **1**(23): p. 2088-2104.
83. Thulke, S., et al., *Quantitative expression analysis of HHV-6 cell receptor CD46 on cells of human cord blood, peripheral blood and G-CSF mobilised leukapheresis cells*. *Virology*, 2006. **3**: p. 77.
84. Aversa, G., et al., *SLAM and its role in T cell activation and Th cell responses*. *Immunol Cell Biol*, 1997. **75**(2): p. 202-5.
85. Manchester, M., et al., *Targeting and hematopoietic suppression of human CD34+ cells by measles virus*. *J Virol*, 2002. **76**(13): p. 6636-42.
86. Collins, F.S., et al., *A point mutation in the A gamma-globin gene promoter in Greek hereditary persistence of fetal haemoglobin*. *Nature*, 1985. **313**(6000): p. 325-6.

87. Chen, H., C.H. Lowrey, and G. Stamatoyannopoulos, *Analysis of enhancer function of the HS-40 core sequence of the human alpha-globin cluster*. *Nucleic Acids Res*, 1997. **25**(14): p. 2917-22.
88. Katsantoni, E.Z., et al., *Persistent gamma-globin expression in adult transgenic mice is mediated by HPFH-2, HPFH-3, and HPFH-6 breakpoint sequences*. *Blood*, 2003. **102**(9): p. 3412-9.
89. Tuan, D., et al., *Different 3' end points of deletions causing delta beta-thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin: implications for the control of gamma-globin gene expression in man*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983. **80**(22): p. 6937-41.
90. Yu, J. and J.E. Russell, *Structural and functional analysis of an mRNP complex that mediates the high stability of human beta-globin mRNA*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(17): p. 5879-88.
91. Chakalova, L., et al., *The Corfu deltabeta thalassemia deletion disrupts gamma-globin gene silencing and reveals post-transcriptional regulation of HbF expression*. *Blood*, 2005. **105**(5): p. 2154-60.
92. Jiang, Y., X.S. Xu, and J.E. Russell, *A nucleolin-binding 3' untranslated region element stabilizes beta-globin mRNA in vivo*. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(6): p. 2419-29.
93. Russell, J.E., *A post-transcriptional process contributes to efficient gamma-globin gene silencing in definitive erythroid cells*. *Eur J Haematol*, 2007. **79**(6): p. 516-25.
94. Zufferey, R., et al., *Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors*. *J Virol*, 1999. **73**(4): p. 2886-92.
95. Arumugam, P.I., et al., *Improved human beta-globin expression from self-inactivating lentiviral vectors carrying the chicken hypersensitive site-4 (cHS4) insulator element*. *Mol Ther*, 2007. **15**(10): p. 1863-71.
96. Fernandes, J., B. Jayaraman, and A. Frankel, *The HIV-1 Rev response element: an RNA scaffold that directs the cooperative assembly of a homo-oligomeric ribonucleoprotein complex*. *RNA Biol*, 2012. **9**(1): p. 6-11.
97. Manganini, M., et al., *A human immunodeficiency virus type 1 pol gene-derived sequence (cPPT/CTS) increases the efficiency of transduction of human nondividing*

- monocytes and T lymphocytes by lentiviral vectors*. Hum Gene Ther, 2002. **13**(15): p. 1793-807.
98. Barde, I., P. Salmon, and D. Trono, *Production and titration of lentiviral vectors*. Curr Protoc Neurosci, 2010. **Chapter 4**: p. Unit 4 21.
99. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
100. Amoyal, I. and E. Fibach, *Flow cytometric analysis of fetal hemoglobin in erythroid precursors of beta-thalassemia*. Clin Lab Haematol, 2004. **26**(3): p. 187-93.
101. Frecha, C., et al., *Stable transduction of quiescent T cells without induction of cycle progression by a novel lentiviral vector pseudotyped with measles virus glycoproteins*. Blood, 2008. **112**(13): p. 4843-52.
102. Levy, C., et al., *Lentiviral vectors displaying modified measles virus gp overcome pre-existing immunity in in vivo-like transduction of human T and B cells*. Mol Ther, 2012. **20**(9): p. 1699-712.
103. Ozog, S., et al., *CD46 Null Packaging Cell Line Improves Measles Lentiviral Vector Production and Gene Delivery to Hematopoietic Stem and Progenitor Cells*. Mol Ther Methods Clin Dev, 2019. **13**: p. 27-39.
104. Dai, Y., et al., *BCL2L1 is associated with gamma-globin gene expression*. Blood Adv, 2019.**3**(20): p. 2995-3001.
105. di Giacomo, V., et al., *Expression of signal transduction proteins during the differentiation of primary human erythroblasts*. J Cell Physiol, 2005. **202**(3): p. 831-8.
106. Migliaccio, G., et al., *In vitro mass production of human erythroid cells from the blood of normal donors and of thalassemic patients*. Blood Cells Mol Dis, 2002. **28**(2): p. 169-80.
107. Lisowski, L. and M. Sadelain, *Locus control region elements HS1 and HS4 enhance the therapeutic efficacy of globin gene transfer in beta-thalassemic mice*. Blood, 2007. **110**(13): p. 4175-8.
108. Roselli, E.A., et al., *Correction of beta-thalassemia major by gene transfer in haematopoietic progenitors of pediatric patients*. EMBO Mol Med, 2010. **2**(8): p. 315-28.

109. Persons, D.A., et al., *Functional requirements for phenotypic correction of murine beta-thalassemia: implications for human gene therapy*. *Blood*, 2001. **97**(10): p. 3275-82.
110. Enver, T., et al., *Developmental programs of human erythroleukemia cells: globin gene expression and methylation*. *Mol Cell Biol*, 1988. **8**(11): p. 4917-26.
111. Lessard, S., et al., *Comparison of DNA methylation profiles in human fetal and adult red blood cell progenitors*. *Genome Med*, 2015. **7**(1): p. 1.
112. Forster, L., et al., *Differential gene expression analysis in early and late erythroid progenitor cells in beta-thalassaemia*. *Br J Haematol*, 2015. **170**(2): p. 257-67.
113. Forster, L., et al., *Cell cycle, proliferation and apoptosis in erythroblasts cultured from patients with beta-thalassaemia major*. *Br J Haematol*, 2016. **175**(3): p. 539-542.
114. Papanikolaou, E., et al., *Cell cycle status of CD34(+) hemopoietic stem cells determines lentiviral integration in actively transcribed and development-related genes*. *Mol Ther*, 2015. **23**(4) p.:683-96.

<<Δηλώνω ρητά ότι το κείμενο της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας δεν αποτελεί προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον>>

Τσεμπερά Ευγενία