



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής Γ. Βασιλόπουλος

Διδακτορική Διατριβή

**«ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΟΡΕΩΝ FV ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ iPSC ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΩΝ CAR-T ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ
ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ»**

ΥΠΟ

ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΣΗΜΑΝΤΗΡΑΚΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΥ

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2024



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

Η υλοποίηση της παρούσας Διατριβής έγινε καθ' ολοκληρίαν στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ), στο Κέντρο Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής και Μεταφραστικής Έρευνας.

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (18^η/24-07-2024) Συνέλευση του Τμήματος):

1^{ος} Εξεταστής **ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΒΑΣΙΛΟΠΟΥΛΟΣ**
(Επιβλέπων) ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ,
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

2^{ος} Εξεταστής **ΑΣΠΑΣΙΑ ΤΣΕΖΟΥ**
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

3^{ος} Εξεταστής **ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΘΑΝΟΣ**
ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ Α΄, ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ, ΒΑΣΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ, ΙΙΒΕΑΑ

4^{ος} Εξεταστής **ΑΓΛΑΪΑ ΑΘΑΝΑΣΙΑΔΟΥ**
ΟΜΟΤΙΜΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΓΕΝΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΤΜΗΜΑ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

5^{ος} Εξεταστής **ΕΛΕΝΗ ΠΑΠΑΔΑΚΗ**
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

6^{ος} Εξεταστής **ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

7^{ος} Εξεταστής **ΛΙΑΚΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ**
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ τον Επιβλέποντα Καθηγητή Αιματολογίας κο Βασιλόπουλο που με υποδέχτηκε στο Εργαστήριο Γονιδιακής Θεραπείας στο ΙΙΒΕΑΑ και μου επέτρεψε να ασχοληθώ ερευνητικά με το πεδίο της Γονιδιακής Θεραπείας. Ήταν ένας εξαιρετικός δάσκαλος και φίλος. Με καθοδήγησε και με βοήθησε να αναπτύξω τεχνογνωσία στην κατασκευή ρετροϊκών φορέων, στην βιολογία των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων CD34, των iPSCs και τέλος υπήρξε αρωγός στην παραγωγή CAR T κυττάρων και με έκανε και εμένα έναν από τους Foamy Virus guys. Δεν μπορώ να τον ευχαριστήσω για όλη του την υποστήριξη και εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου.

Ευχαριστώ την Ομότιμο Καθηγήτρια κα Αглаΐα Αθανασιάδου. Υπήρξε στην πορεία μου σημαντικός πυλώνας καθοδήγησης, φίλη και σύμβουλος. Με ενέπνευσε σαν ακαδημαϊκός και μου έδωσε την ευκαιρία να διευρύνω τους ορίζοντές μου ερευνητικά και να ασχοληθώ με τους μη ιικούς επισωματικούς φορείς, οι οποίοι θα αποτελέσουν κλειδί για την γονιδιακή θεραπεία στο μέλλον.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ Έλενα Σιαπάτη. Η Έλενα μου μεταλαμπάδευσε τις γνώσεις της στις μοριακές τεχνικές και στην παραγωγή λεντικών φορέων. Με υποστήριξε και ήταν πολύ υπομονετική μαζί στα πρώτα μου βήματα. Με δίδαξε ήθος και πάρα πολλά άλλα.

Ευχαριστώ τα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής την Καθηγήτρια κα Ασπασία Τσέζου και τον Δρ κο Δημήτριο Θάνο, Ερευνητή Α για την υποστήριξη και την καθοδήγηση τους κατά την εκπόνηση αυτής της διδακτορικής διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους και τους οικείους μου. Τους φίλους εκείνους που ήρθαν και που έφυγαν, συμβάλατε σημαντικά να μου διδάξετε το κουράγιο, την υπομονή και την καλή καρδιά. Ευχαριστώ τις φίλες μου Δρ Εκάτη Δρακοπούλου και Δρ Μαρία Γεωργομανώλη οι συζητήσεις μας ήταν μια ανάπαυλα, σας ευχαριστώ για το ήθος και την υποστήριξή σας. Ευχαριστώ την Δρ. Κατερίνα Ζώη η οποία υπήρξε εξαιρετική φίλη και σύμβουλος, οι συζητήσεις μας με βοήθησαν πολύ.

Ευχαριστώ τον κο Θεόδωρο Λούπη και το εργαστήριο Αιματολογίας του ΙΙΒΕΑΑ. Η βοήθεια του κου Λούπη ήταν κομβικής σημασίας για την διεκπεραίωση της αλληλούχισης Τέταρτης Γενιάς των φορέων FV. Ο Θεωδωρής είναι ένας εξαιρετικός φίλος και συνεργάτης.

Ευχαριστώ την Δρ Μίρκα Μώκου (την Μαρίκα της καρδιάς μου). Η συμβολή σου και η βοήθεια σου ήταν καίρια στο να συνεχίσω και να πιστέψω σε εμένα. Ακόμα και αν είσαι μακριά στο μυαλό μου είσαι πάντα δίπλα μου.

Ευχαριστώ τον φίλο μου Φώτη Λάμπρο, για την υποστήριξη και τα επιτραπέζια, ήσουν σημαντικός αρωγός στην προσπάθειά μου.

Ευχαριστώ τους φίλους μου Κώστα Τσαφαράκη, Παντελή Γιαννούλη και Ζέφη Τσαβολάκη ήσασταν εκεί από την αρχή και πάντα στηρίζατε τον αγώνα μου και την προσπάθειά μου, δεν θα τα είχα καταφέρει χωρίς εσάς. Η υπομονή σας και η ευγένειά σας με το άτομό μου ήταν παροιμιώδης.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου, την μητέρα μου για όλες τις θυσίες που έκανε για να είμαι εγώ εδώ σήμερα και για όλη της την υποστήριξη στην διδαλωδή διαδρομή του διδακτορικού. Ευχαριστώ και τις αδερφές μου για τις «καλές κουβέντες» μου δώσανε κουράγιο όταν το είχα μεγάλη ανάγκη.

**«ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΟΡΕΩΝ FV ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ iPSC ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΩΝ CAR-T
ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ»**

ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΣΗΜΑΝΤΗΡΑΚΗΣ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2024

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΒΑΣΙΛΟΠΟΥΛΟΣ (Επιβλέπων)** ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
2. **ΑΣΠΑΣΙΑ ΤΣΕΖΟΥ** ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
3. **ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΘΑΝΟΣ** ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ Α΄, ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ, ΒΑΣΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ, ΙΙΒΕΑΑ

Στη Ζωή και τον Λάμπρο

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- 1.1 Ιστορική αναδρομή της γονιδιακής θεραπείας
- 1.2 Φορείς γονιδιακής θεραπείας και μέθοδοι γονιδιακής μεταφοράς.
 - 1.2.1 Επισωματικοί φορείς DNA-μη ιικά επισώματα
 - 1.2.2 Τρανσποζόνια - σύστημα Sleeping Beauty
 - 1.2.3 Τεχνικές γονιδιακής μεταφοράς επισωματικών φορέων, mRNA και RNP
 - 1.2.4 Φορείς AAV- Να γίνεις επίσωμα ή να μην γίνεις;
 - 1.2.5 Ρετροϊικοί φορείς
 - 1.2.6 Φορείς FV, αρχαίοι φίλοι και μια ασφαλής εναλλακτική

2. ΥΛΙΚΑ και ΜΕΘΟΔΟΙ

- 2.1. Παραγωγή Ιϊκού Υπερκείμενου (φορέων)
- 2.2. Συλλογή φορέων και καθαρισμός
- 2.3. Τιτλοδότηση των ιϊκών φορέων.
- 2.4. Μεταγωγή με ιϊκούς φορείς
- 2.5. Κυτταροκαλλιέργειες
- 2.6. Ανοσομαγνητικοί Διαχωρισμοί
- 2.7. Δοκιμασίες Κυτταροτοξικότητας με Κυτταρομετρία Ροής.
- 2.8 Επαναπρογραμματισμός ανθρώπινων κυττάρων με την χρήση φορέων FV για την παραγωγή επαγόμενων βλαστοκυττάρων-iPSC.
- 2.9. Ανοσοφαινότυπος και Κυτταρομετρία ροής
- 2.10. Κάθετη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών SDS-PAGE και Ανοσοαποτύπωση κατά Western
- 2.11. Μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- 3.1 Κατασκευή Φορέων
- 3.2 Λειτουργικός χαρακτηρισμός φορέων DF.O4.x.MIF και DF.K.x.S σε επίπεδο πλασμιδιακού DNA.
- 3.3. Λειτουργικός χαρακτηρισμός FV φορέων επαναπρογραμματισμού.
- 3.4. Κατασκευή φορέων LV και FV για την παραγωγή αντι-CD19 CAR T κυττάρων από μονάδες ΟΠΑ και περιφερικού αίματος.
 - 3.4.1 Κατασκευή φορέων FV και LV dest για χρήση με το σύστημα κλωνοποίησης Gateway.
 - 3.4.2. Λειτουργικός χαρακτηρισμός φορέων FV.CAR.IF , FV.CAR, LV.CAR.IF και LV.CAR σε επίπεδο πλασμιδιακού DNA.
 - 3.4.3 Ιικοί τίτλοι φορέων FV.CAR και LV.CAR.
 - 3.4.4. Διαμόλυνση T-λεμφοκυττάρων.
 - 3.4.5. Κυτταροτοξικότητα: Τα CAR19 T κύτταρα που παράγονται με FV φορείς εμφανίζουν ισχυρή κυτταροτοξική δράση ενάντια σε CD19+ κυτταρικές σειρές.
 - 3.4.6. Τα FV CAR19 T κύτταρα παράγουν IFN-γ.
 - 3.4.7. Ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός των CAR19 T κυττάρων.
 - 3.4.8. Ανάλυση των θέσεων ενσωμάτωσης των FV φορέων.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Περίληψη

Η γονιδιακή θεραπεία (ΓΘ) στοχεύει στην θεραπεία μονογονιδιακών νόσων μέσω της γενετικής τροποποίησης οργανισμών ή κυττάρων. Οι ιικές μέθοδοι γονιδιακής μεταφοράς έχουν επικρατήσει στις εφαρμογές γονιδιακής θεραπείας λόγω της ευκολίας παραγωγής των φορέων και της αποδοτικότητας της γενετικής μεταφοράς. Εκτός από την εφαρμογή της ΓΘ στα μονογονιδιακά νοσήματα, μεγάλο πεδίο εφαρμογής έχει βρει η γονιδιακή μεταφορά στη δημιουργία των CAR T κυττάρων κάτι που έφερε επανάσταση στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου, καθώς επέτρεψε στα T λεμφοκύτταρα να στοχεύουν αντιγόνα του όγκου ανεξάρτητα του Μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας-I. **Σκοπός** της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η παραγωγή iPSC κυττάρων μέσω ενός συστήματος φορέων FV για την ανεξάντλητη παραγωγή T-κυττάρων και CAR-T κυττάρων. Λόγω αδυναμιών του συστήματος να επιτύχει πλήρη επαναπρογραμματισμό, χρησιμοποιήθηκαν T-κύτταρα από μονάδες ομφαλοπλακουντιακού αίματος και από υγιείς δότες.

Αναπτύχθηκαν Lenti- και Foamy Virus φορείς για την κατασκευή CAR T κυττάρων με ειδικότητα ενάντια στο CD19 αντιγόνο επιφανείας. Οι φορείς παρήγαγαν υψηλούς ιικούς τίτλους και χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή αντι-CD19 CAR T κυττάρων από T λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από μονάδες ΟΠΑ ή από περιφερικό αίμα υγιών δωτών. Η ικανότητα μεταγωγής των FV φορέων για να παράγουν CAR T ήταν συγκρίσιμη με εκείνη των LV ανεξάρτητα από την προέλευση των T λεμφοκυττάρων. Η έκφραση των CAR στην επιφάνεια των κυττάρων ήταν υψηλή τόσο για τα FV CAR19 T όσο και για τα LV CAR 19 T κύτταρα. Λειτουργικά όσον αφορά τον κυτταροτοξικό μηχανισμό τα FV CAR19 T εμφάνιζαν συγκρίσιμη κυτταροτοξική δράση ενάντια στην CD19+ κυτταρική σειρά Raji με τα LV CAR 19 T. Η ανάλυση των θέσεων ενσωμάτωσης των FV φορέων στα FV CAR19 T από περιφερικό αίμα έδειξε να είναι τυχαία και πάνω από τις μισές θέσεις ενσωμάτωσης ταυτοποιήθηκαν σε διαγονιδιακές περιοχές.

Εν κατακλείδι, αναπτύξαμε FV και LV φορείς για την παραγωγή antiCD19 CAR-T κυττάρων, πιστοποιήσαμε τη λειτουργικότητά τους και θέσαμε τη βάση για τη χρήση T-κυττάρων από μονάδες ΟΠΑ που ήταν προς απόρριψη συμβάλλοντας στη λειτουργική αξιολόγηση ενός ανθρώπινου προϊόντος σε μία νέα εφαρμογή.

Summary

Gene therapy (GT) aims at correcting the genetic lesion of monogenic disorders through the transfer of the correct copy of a dysfunctional gene. Viral vectors are widely used to this end owing to the ease of production and the high gene transfer rates. Beyond monogenic disorders, viral vectors have been used for the production of Chimeric Antigen Receptor T-cells (CAR-T cells) that have revolutionized cancer treatment by allowing self-T-cells to attack the tumor, irrespective of HLA Class-I. The Aim of this study was the establishment of iPSC lines for the limitless production of T- and subsequently of CAR-T cells. However, due to production failures, we investigated whether cord blood-derived T-cells could serve this purpose. We developed Lenti- and Foamy Virus derived vectors and generated antiCD-19 CAR-T cells. Both FV and LV were produced at high titers and both could transduce CB- and Peripheral blood-derived T-cells at high efficiency. In addition, cytotoxicity rates against the CD19+ Raji line were comparable between the two cell sources indicating the functional competence of our vectors and of the CB-derived T-cells. In addition, retroviral integration site analysis, confirmed the relatively safe integration profile of FV vectors, something that has been established in other cell types. In conclusion, we developed FV and LV vectors for the production of antiCD19 CAR-T cells, we confirmed their functional competence and we set the stage for the use of CB-derived T-cells. These units were destined for disposal since their CD34+ numbers were lower than the std threshold; our approach has contributed to an alternative use of these units that could lead to a new production line with wide implementations.

1.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ιστορική αναδρομή της γονιδιακής θεραπείας

Η γονιδιακή θεραπεία βασίζεται στην ιδέα της εισαγωγής ενός θεραπευτικού γονιδίου-νουκλεϊκού οξέος στα κύτταρα ενός ασθενούς με σκοπό την γονιδιακή διόρθωση και την βελτίωση του φαινοτύπου του πάσχοντος κυττάρου. Ως ιδέα δε, βρίσκει εύφορο έδαφος στην περίπτωση μονογονιδιακών νοσημάτων.¹ Στα νοσήματα αυτά θα μπορούσε να γίνει εισαγωγή ενός θεραπευτικού γονιδίου για να «διορθωθεί» η γονιδιακή βλάβη και έτσι να διορθωθεί ο παθολογικός φαινότυπος¹. Το παθολογικό γονίδιο αυτό μπορεί να έφερε μεταλλάξεις που το αδρανοποιούν ή προκαλούσαν την παραγωγή μη λειτουργικής ή παθολογικής πρωτεΐνης και η θεραπεία έχει ως στόχο την εισαγωγή ενός «φυσιολογικού» αντίγραφου του παθολογικού γονιδίου. Πλέον, η γονιδιακή θεραπεία περιλαμβάνει την εισαγωγή ενός εναλλακτικού γονιδίου που θα μπορούσε να έχει θεραπευτικό όφελος για τον ασθενή².

Η διαφορά μεταξύ γονιδιακής θεραπείας και κυτταρικής θεραπείας είναι ότι στην περίπτωση της κυτταρικής θεραπείας, κύτταρα του ασθενούς ή ενός υγιούς δότη αφαιρούνται υπόκεινται σε *ex vivo* χειρισμό και στην συνέχεια το παραγόμενο μόσχευμα-κυτταρικό προϊόν επιστρέφει μέσω έγχυσης στον ασθενή για να προσφέρει θεραπευτικό όφελος. Κατά τον *ex vivo* χειρισμό ένας συγκεκριμένος κυτταρικός πληθυσμός από το δείγμα του ασθενούς ή του δότη επιλέγεται για εμπλουτισμό παραδείγματος χάριν κινητοποιημένα Αρχέγονα Αιμοποιητικά Κύτταρα (ΑΑΚ) από περιφερικό αίμα ή η ανάπτυξη αντιγονο-ειδικών Τ λεμφοκυττάρων για αντιμετώπιση ιογενών λοιμώξεων. Η γονιδιακή θεραπεία μπορεί να πραγματοποιηθεί συνδυαστικά με την κυτταρική θεραπεία στην περίπτωση εκείνη που τα κύτταρα του ασθενούς τροποποιούνται γενετικά και υπόκεινται σε *ex vivo* πολλαπλασιασμό και στην συνέχεια χορηγούνται στον ασθενή.

Η γονιδιακή θεραπεία ανάλογα με την θέση εφαρμογής διακρίνεται σε *in situ*, *in vivo* και *ex vivo*. Στην *in situ* γονιδιακή θεραπεία ο φορέας χορηγείται απευθείας στην ανατομική θέση ή στον ιστό όπου είναι επιθυμητή η μεταγωγή ή η διαμόλυνση³. Στην *in vivo* εκδοχή της γονιδιακής θεραπείας η χορήγηση του θεραπευτικού φορέα (ιού ή συμπλόκου νανοσωματίου νουκλεϊκού οξέος) γίνεται στην κυκλοφορία του αίματος. Τέλος, στην *ex vivo* ή *in vitro* γονιδιακή θεραπεία κύτταρα του ασθενούς αφαιρούνται από τον ασθενή εκτίθενται στον θεραπευτικό φορέα και στην συνέχεια μετά από μια σειρά χειρισμών *in vitro*, όπως καλλιέργεια και ποιοτικό έλεγχο εγχέονται στην κυκλοφορία του

ασθενούς ή στην ανατομική θέση όπου υφίσταται η βλάβη⁴. Κάθε μια από τις μεθόδους συνοδεύεται από μειονεκτήματα και πλεονεκτήματα τα οποία όμως δεν πρόκειται να αναλυθούν διότι διαφεύγουν του ενδιαφέροντος της παρούσας διατριβής.

Η γονιδιακή θεραπεία ως ιδέα και προσέγγιση αποτελεί ένα διεπιστημονικό πεδίο που είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με την γενετική μηχανική και την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA ⁵. Για την εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας επιστρατεύονται πολλαπλά εργαλεία και τεχνολογίες από τους προαναφερθέντες επιστημονικούς κλάδους. Χρησιμοποιώντας την γνώση από την αλληλούχηση του ανθρώπινου γονιδιώματος κατασκευάζονται ανασυνδυασμένα γονίδια σε κασέτες έκφρασης με σκοπό την θεραπευτική δράση⁶. Μια κασέτα έκφρασης αποτελείται από την κωδικοποιούσα αλληλουχία ενός γονιδιακού προϊόντος (πρωτεΐνης ή RNA) καθώς και από τις ρυθμιστικές περιοχές και στοιχεία τα οποία είναι απαραίτητα για την έκφρασή της.

Για την μεταφορά της κασέτας εφαρμόζονται διάφορες στρατηγικές ανάλογα με την φύση της εφαρμογής και αν είναι επιθυμητή η μόνιμη γενετική τροποποίηση ενός κυτταρικού πληθυσμού ή εάν είναι επιθυμητή η παροδική γενετική τροποποίηση. Η πιο απλή εφαρμογή είναι η μεταφορά ενός «γυμνού» DNA που εμπεριέχει την αλληλουχία του γενετικού φορτίου με την μέθοδο σχηματισμού συμπλόκων νανοσωματιδίων-DNA. Η στρατηγική αυτή συμπυκνώνει το DNA και επιτρέπει στα κύτταρα την πρόσληψή του. Τα νανοσωμάτια μπορεί να αποτελούνται εκτός από το DNA επιπλέον από ιόντα Ca^{2+} , ή πολυμερή υλικά-polyplexes που σχηματίζονται από επιφανειοδραστικούς παράγοντες όπως ή πολύ-εθυλεν-ιμίνες. Στην ίδια λογική είναι και η χρήση λιποσωμάτων στα οποία πραγματοποιείται εγκλεισμός του DNA. Αυτές οι στρατηγικές και άλλες αντίστοιχες ως σκοπό έχουν να μετατρέψουν ένα φορτισμένο και μεγάλο μακρομόριο όπως το DNA σε μια πιο συμπυκνωμένη «μικρότερη» μορφή και να εξουδετερώσουν το ισχυρό αρνητικό φορτίο του φωσφορικού σκελετού του ώστε να μπορέσει να προσεγγίσει την κυτταρική μεμβράνη και να εισέλθει στο κύτταρο με τον μηχανισμό της ενδοκύτωσης ⁷. Εναλλακτικά το ίδιο αποτέλεσμα μπορεί να επιτευχθεί με την χρήση ισχυρού ηλεκτρικού ρεύματος. Η τεχνική αυτή ονομάζεται ηλεκτροδιάτρηση. Κατά την ηλεκτροδιάτρηση σε ένα μείγμα κυττάρων και νουκλεϊκών οξέων εφαρμόζεται ηλεκτρικό ρεύμα υψηλής τάσης. Η εφαρμογή του ρεύματος δημιουργεί μικρούς πόρους στην κυτταρική μεμβράνη δια μέσου των οποίων εισάγονται τα προς μεταφορά νουκλεϊκά οξέα⁸.

Οι νέες μέθοδοι της μοριακής βιολογίας που προέκυψαν χάρη στην πρόοδο της τεχνολογίας της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR και διαφόρων μεθόδων συναρμολόγησης τμημάτων DNA με βάση την ομολογία μεταξύ των άκρων επιτρέπουν την κατασκευή διαγονιδίων με επιθυμητά χαρακτηριστικά. Αυτά αφορούν τόσο την αλληλουχία αυτή καθαυτή για βελτιστοποιημένη πρωτεϊνική έκφραση όσο και για την προσθήκη επιπλέον ρυθμιστικών στοιχείων όπως υποκινητές, αλληλουχίες-σήματα πολυαδενυλίωσης κ.α.⁹

Επιπλέον, αναπτύχθηκαν νέες τεχνολογία για την γενετική τροποποίηση-αποσιώπηση γονιδίων πέραν του RNAi, όπως του CrispR/Cas9 συστήματος, του TALEN συστήματος και του συστήματος των ZNF νουκλεασών. Τα συστήματα αυτά ως βασική λειτουργία επιτρέπουν την κατευθυνόμενη εκτομή γονιδιακών τμημάτων. Αυτή η διαδικασία συνήθως έχει σαν αποτέλεσμα την πρόκληση σημειακών μεταλλάξεων με αποτέλεσμα την αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης στο παραγόμενο mRNA και συνήθως πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης. Τα συστήματα αυτά έχουν τροποποιηθεί περαιτέρω και έχουν προκύψει δύο παραλλαγές ένα σύστημα ενεργοποίησης μέσω χιμαιρισμού με μεταγραφικούς ενεργοποιητές όπως η VP64 και ένα σύστημα μεταγραφικής απενεργοποίησης μέσω χιμαιρισμού με πρωτεΐνη καταστολέα^{10,11} στα συστήματα που βασίζονται στο CrispR και ZNF.

1.2. Φορείς γονιδιακής θεραπείας και μέθοδοι γονιδιακής μεταφοράς.

Οι φορείς της γονιδιακής θεραπείας διακρίνονται είτε με βάση το είδος του νουκλεϊκού οξέος που χρησιμοποιούν, είτε με βάση τη μέθοδο της γονιδιακής μεταφοράς και τέλος με το είδος της τροποποίησης που επιφέρουν στο γενετικό υλικό (παροδική ή μόνιμη). Επιπλέον, οι φορείς της γονιδιακής θεραπείας διακρίνονται σε ιικούς και μη ιικούς. Οι μη ιικοί φορείς μπορεί να είναι πλασμίδια ή επισώματα (δλδ μόρια DNA που συμπεριφέρονται ως μικρά τεχνητά χρωμοσώματα). Επιπλέον στους μη ιικούς φορείς συμπεριλαμβάνονται και νουκλεϊκά οξέα τα οποία επιτυγχάνουν παροδική γενετική τροποποίηση όπως τα mRNA ή και το μόρια που συμμετέχουν στην γονιδιακή αποσιώπηση siRNA, shRNA κ.α. Οι μη ιικοί φορείς εισάγονται στα κύτταρα μέσω φυσικοχημικών μεθόδων όπως είναι τα λιποσώματα, σύμπλοκα πολυμερών -νουκλεϊκών οξέων, σύμπλοκα ασβεστίου νουκλεϊκών οξέων, ηλεκτροδιάτρησης, ηχοδιάτρησης, φωτοδιάτρησης κ.α. Όλες αυτές οι μέθοδοι επιτρέπουν στα νουκλεϊκά οξέα να διαπεράσουν το φραγμό της κυτταρικής μεμβράνης και να εισέλθουν στο ενδοκυττάριο περιβάλλον. Η κυτταρική μεμβράνη

φυσιολογικά δεν είναι διαπερατή από νουκλεϊνικά οξέα τα οποία είναι διαθέτουν ισχυρό φορτίο και για αυτό τον λόγο δεν μπορούν να περάσουν την λιπιδική διπλοστοιβάδα που είναι υδρόφοβη (μη πολική).

1.2.1 Επισωματικοί φορείς DNA-μη ιικά επισώματα

Οι επισωματικοί φορείς είναι συνήθως κυκλικά μόρια DNA με μέγεθος μεγαλύτερο από 2-3kb (μέγεθος που διαθέτει ένα τυπικό πλασμίδιο). Οι φορείς αυτοί μπορεί να έχουν προέλευση ιική ή μη ιική. Οι μη ιικοί επισωματικοί φορείς ή επισώματα είναι κατ' ουσία πλασμίδια με πολύ μεγάλο μέγεθος. Έχουν την ικανότητα να παραμένουν ως ελεύθερα μόρια DNA στο πυρήνα των κυττάρων, με την παραμονή τους να ξεπερνά χρονικά εκείνη των «τυπικών» πλασμιδίων λόγω μεγέθους. Ένα ιδιαίτερα ελκυστικό χαρακτηριστικό τους είναι η ικανότητά τους να μεταφέρουν μεγάλο γενετικό φορτίο που ξεπερνά συνήθως εκείνο των ρετροϊκών φορέων 6-9kb. Η ιδιότητα αυτή καθιστά τα επισώματα ιδανικά για την μεταφορά «μεγάλων» γονιδίων και γονιδιακών κατασκευών/κασσετών έκφρασης. Επιπλέον τα επισώματα δεν έχουν την τάση να ενσωματώνονται στο γενετικό υλικό του κυττάρου ξενιστή, καθώς τέτοια γεγονότα ανασυνδιασμού παρατηρούνται σπάνια. Το γεγονός αυτό προσδίδει ένα ευνοϊκό προφίλ ασφάλειας στα επισώματα όσον αφορά: 1) τον κίνδυνο μεταλλαξιγένεσης λόγω ένθεσης σε μεταγραφόμενες αλληλουχίες, και 2) τον κίνδυνο εμφάνισης του φαινομένου της ενεργοποίησης της μεταγραφής παρακείμενων γονιδίων από τον υποκινητή της κασσέτας έκφρασης (read-through transcription). Επιπλέον, οι επισωματικοί φορείς έχουν χαμηλότερο κόστος παραγωγής σε μεγάλη κλίμακα σε σχέση με τους ιικούς φορείς, και ευνοϊκότερο ρυθμιστικό πλαίσιο που διέπει την παραγωγή τους σύμφωνα με τα πρότυπα GMP.

Τα επισώματα αποτελούνται από έναν σκελετό που περιέχει μια θέση έναρξης της αντιγραφής του DNA. Η αλληλουχία αυτή μπορεί να προέρχεται από τον ιό SV40, μια ή περισσότερες γονιδιακές κασσέττες έκφρασης για ευκαρυωτικά κύτταρα και ιδανικά, πρέπει να μην περιέχουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά ειδικά αν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές γονιδιακής θεραπείας. Η απουσία ιικής προέλευσης κωδικοποιητικών αλληλουχιών από τα επισώματα τους επιτρέπει να μην ενεργοποιούν το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα του κυττάρου. Επανάσταση στην τεχνολογία των επισωμάτων έφερε η προσθήκη των γενετικών στοιχείων περιοχών SAR/MAR, που μαζί αναφέρονται ως S/MAR (scaffold or matrix attachment regions). Πρόκειται για αλληλουχίες

DNA που επιτρέπουν την αγκυροβόλησή του, στη θεμέλιο ουσία του πυρήνα. Τα στοιχεία S/MAR, εφόσον βρίσκονται εντός ενεργών μεταγραφικών μονάδων, είναι ικανά να διατηρούν τα επισώματα στον πυρήνα και να μην επιτρέπουν την ενσωμάτωσή τους στο χρωμοσωματικό DNA. Επιπλέον προσδίδουν μιτωτική σταθερότητα στο επίσωμα εξασφαλίζοντας την μακροπρόθεσμη παραμονή του στον πυρήνα και τον σωστό διαχωρισμό του διπλασιασμένου επισώματος κατά την μίτωση στα θυγατρικά κύτταρα.

Έναν τέτοιο φορέα έχουμε χρησιμοποιήσει σε αυτή τη διατριβή. Ο φορέας pEPI-1-EGFP περιέχει την αλληλουχία S/MAR από το 5' άκρο του γονιδίου της ανθρώπινης ιντερφερόνης-β. Πρόκειται για μια αλληλουχία με μέγεθος 2,1kb, πλούσια σε δινουκλεοτίδια αδερίνη και θυμιδίνης (AT). Αυτή η λεπτομέρεια είναι σημαντική καθώς φαίνεται ότι όλα τα στοιχεία S/MAR δεν είναι λειτουργικά ισοδύναμα, τουλάχιστον όσον αφορά την ικανότητά τους να μην επιτρέπουν την ενσωμάτωση του στο γενωμικό DNA.

1.2.2 Τρανσποζόνια - σύστημα Sleeping Beauty

Τα τρανσποζόνια ή μεταθετόνια ως σύστημα φορέων για εφαρμογές της γονιδιακής θεραπείας αποτελούν την χρυσή τομή μεταξύ των πλασμιδιακών φορέων και των ρετροϊκών φορέων που θα αναλυθούν παρακάτω.

Εξ ορισμού τα τρανσποζόνια είναι ενδοκυττάρια παράσιτα. Υπάρχουν δύο είδη τα ρέτροτρανσποζόνια, τα οποία χρησιμοποιούν την αντίστροφη μεταγραφή για να πολλαπλασιαστούν και τα DNA τρανσποζόνια¹². Τα DNA τρανσποζόνια μετακινούνται ως ακέραια τμήματα DNA, διαθέτουν την ικανότητα να μεταπηδούν και να αλλάζουν την θέση τους στο γονιδίωμα¹³. Η διαδικασία της μετάθεσης έχει προαπαιτούμενο την ταυτόχρονη συνύπαρξη δύο συνθηκών: πρώτον την παρουσία της τρανσποζάσης, του ενζύμου που διαμεσολαβεί την αντίδραση και δεύτερον ενός τμήματος DNA του οποίου τα άκρα περιέχουν τις αλληλουχίες TIR¹⁴. Οι αλληλουχίες TIR (Terminal Inverted Repeats) είναι τελικές ανάστροφες επαναλήψεις τις οποίες αναγνωρίζει η τρανσποζάση, προσδένεται και με ένα μηχανισμό αποκοπής και επικόλλησης επιτρέπει στο μεταθετό στοιχείο να αλλάξει την θέση του στο γονιδίωμα¹⁴. Φυσιολογικά η τρανσποζάση βρίσκεται μεταξύ των αλληλουχιών TIR, ωστόσο το σύστημα αυτό μπορεί να κατακερματιστεί σε δύο ομάδες αλληλουχιών *in trans* σε δύο διακριτά μόρια νουκλεϊκών οξέων. Το γεγονός αυτό επιτρέπει την δημιουργία ενός συστήματος ένθεσης γονιδίων στο γονιδίωμα. Αρχικά πρέπει να υποκατασταθεί το γονίδιο της τρανσποζάσης, το οποίο περιβάλλεται από τις αλληλουχίες

TIR, από ένα γονίδιο το οποίο θέλουμε να εισάγουμε σε ένα κύτταρο στόχο (transgene ή διαγονίδιο). Αυτή η γονιδιακή κατασκευή TIR-«δια-γονίδιο» -TIR κλωνοποιείται σε ένα πλασμιδιακό φορέα. Αντίστοιχα, η τρανσποζάση κλωνοποιείται σε ένα δεύτερο πλασμίδιο. Τα πλασμίδια αυτά χρησιμοποιούνται για την ταυτόχρονη διαμόλυνση κύτταρων και τότε είναι δυνατόν να ενσωματωθεί η αλληλουχία του διαγονιδίου μέσω της δράσης της τρανσποζάσης στο γονιδίωμα του κυττάρου στόχου.¹³

Φυσιολογικά τα DNA τρανσποζόνια είναι αδρανή στα σπονδυλωτά ως απότοκο της εξέλιξης.¹² Το σύστημα Sleeping Beauty (SB) ή σύστημα «Ωραία Κοιμωμένη», είναι ένα τέτοιο σύστημα που υπέστη «νεκρανάσταση» μέσω γενετικής μηχανικής. Η υπεροικογένεια των Tc1/mariner τρανσποζονίων που απομονώθηκε από τα ψάρια έχασε την ικανότητα μετάθεσης λόγω συγκέντρωσης δηλητηριωδών μεταλλάξεων. Η τρανσποζάση που απαντάται στην Οικογένεια των Σαλμονιδών (Salmonidae) χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή μιας συνθετικής τρανσποζάσης μέσω απαλοιφής των αδρανοποιητικών μεταλλαγών¹⁵. Με τον τρόπο αυτό «ξύπνησαν» το «κοιμώμενο» τρανσποζόνιο, εξ ου και το όνομά του «Ωραία Κοιμωμένη» ή Sleeping Beauty.¹³

Η τρανσποζάση είναι υπεύθυνη για την επιλογή της θέσης ένθεσης. Το υπόστρωμα για την ένθεση αποτελούν τα δινουκλεοτίδια TA και η θέση αυτή αναγεννάται μετά το πέρας της ενσωμάτωσης στα άκρα του ενσωματωμένου τρανσποζονίου. Το σύστημα SB είναι ικανό να μεταφέρει γενετικό φορτίο που δεν ξεπερνά τα 10 kb¹². Όσον αφορά την εγγύτητα σε ενεργές μεταγραφικές μονάδες φαίνεται η θέση ενσωμάτωσης να είναι τυχαία. Περίπου 35% των ενθέσεων γίνονται εντός μεταγραφικών μονάδων και συνήθως εντός ιντρονίων¹⁶. Φαίνεται ότι τα τρανσποζόνια διαθέτουν χαμηλή προτίμηση για να ενσωματώνονται σε γονίδια και αυτό προσδίδει στο σύστημα SB ευνοϊκό προφίλ για χρήση σε εφαρμογές γονιδιακής θεραπείας. Η εφαρμογή των τρανσποζονίων έχει βρει εύφορο έδαφος για την ανάπτυξη CAR T κυττάρων ως εναλλακτικό σύστημα σε σχέση με το ρετροϊκό που κυριαρχεί στην κλινική πράξη.¹⁷

1.2.3 Τεχνικές γονιδιακής μεταφοράς επισωματικών φορέων, mRNA και RNP

Ιδιαίτερου ενδιαφέροντος από τις διάφορες τεχνικές είναι η χρήση συστημάτων λιποσωμάτων που έχουν βρει εφαρμογή στην ανάπτυξη εμβολίων mRNA. Στα συστήματα αυτά το mRNA που κωδικοποιεί ιικές πρωτεΐνες συμπλέκεται με λιποσώματα σχηματίζοντας νανοσωμάτια LNP (lipid nanoparticles) που χρησιμοποιούνται για να διαμολύνουν

μακροφάγα *in vivo*^{18,19}. Στη συνέχεια τα μακροφάγα εκφράζουν τις ιικές πρωτεΐνες, τις κατακερματίζουν στο ανοσοπρωτεάσωμα και στην συνέχεια κάνουν αντιγονοπαρουσίαση εκπαιδεύοντας με τον τρόπο αυτό το ανοσοποιητικό σύστημα του λήπτη. Η τεχνογνωσία που αναπτύχθηκε μέσω των εμβολίων mRNA χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω για την ανάπτυξη *in vivo* γονιδιακών θεραπειών που βασίζονται στο mRNA. Παρόλο που η γενετική τροποποίηση που παρέχεται από το mRNA είναι παροδική δεν είναι απαγορευτική η επαναλαμβανόμενη θεραπεία με περισσότερες των μια εγχύσεων^{19,20}.

Από τις *ex vivo* τεχνικές η ηλεκτροδιάτρηση είναι από τις πιο ανέξοδες και πιο αποδοτικές για την μεταφορά νουκλεϊκών οξέων και ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων για τις εφαρμογές του συστήματος CRISPR-Cas9²¹. Κατά την ηλεκτροδιάτρηση, τα κύτταρα που βρίσκονται σε εναιώρημα εντός διαλύματος με ικανή αγωγιμότητα, υπόκεινται σε ηλεκτρικό ρεύμα υψηλής τάσης. Το ρεύμα ανοίγει πόρους στην κυτταρική μεμβράνη επιτρέποντας σε φορτισμένα μακρομόρια (πρωτεΐνες, RNA, DNA, RNP κα) να εισέλθουν στο κυτταρόπλασμα. Παρόλο που η ηλεκτροδιάτρηση απαιτεί υψηλό αρχικό αριθμό κυττάρων για να διαμολυνθούν γνωρίζει ιδιαίτερη ανάπτυξη λόγω της απλότητας του εξοπλισμού, της χαμηλής τιμής των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται σε αυτήν και της εξέλιξης της τεχνολογίας που πλέον επιτρέπει την χρήση της σε κλειστού τύπου συστήματα κυτταρικής επεξεργασίας⁸. Η απλότητα των αγωγίμων διαλυμάτων, που συνήθως περιέχουν ασβέστιο και οι κλειστές κασέτες επιτρέπουν παραγωγή κυτταρικών θεραπειών σύμφωνα με τα πρότυπα GMP, που χρησιμοποιούνται πλέον στην βιομηχανία των εφαρμογών γονιδιακής θεραπείας- παραγωγής ATMP. Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά, καθώς και το πιο «χαλαρό» ρυθμιστικό πλαίσιο του EMA/FDA που διέπει τα γενετικά τροποποιημένα κύτταρα μέσω ηλεκτροδιάτρησης, καθιστούν την τεχνική αυτή πολύ ελκυστική για εφαρμογές γονιδιακής θεραπείας²².

Παρόλα τα πλεονεκτήματα των μη ιικών μεθόδων γονιδιακής θεραπείας, οι ιικές μέθοδοι αποτελούν τις πιο αποδοτικές όσον αφορά την γονιδιακή μεταφορά σε διάφορα κυτταρικά συστήματα. Οι ιικές μέθοδοι μπορούν να εφαρμοστούν τόσο *ex vivo* όσο και *in vivo*. Η μεγαλύτερη τροχοπέδη των ιικών συστημάτων αποτελεί το μέγεθος του γενετικού φορτίου που δεν ξεπερνά τα 9kb και η επαγωγή του ενδοκυττάριου ανοσολογικού μηχανισμού, καθώς και η εύλογη ανησυχία για μεταλλαξιγένεση - ανάπτυξη κακοηθειών που θα συζητηθούν παρακάτω^{23,24}.

1.2.4 Φορείς AAV- Να γίνεις επίσωμα ή να μην γίνεις;

Οι φορείς AAV ή Αδενο-σχετιζόμενοι ιικοί φορείς, είναι παρβοϊοί που διαθέτουν μονόκλωνο DNA σαν γενετικό υλικό που είναι έγκλειστο σε ένα εικοσαεδρικό καψίδιο. Η αλυσίδα του μονόκλωνου DNA που αποτελεί το γενετικό τους υλικό, μπορεί να είναι είτε η κωδική είτε η αντικωδική. Το γονιδίωμα των ιών αυτών βρίσκεται μεταξύ ανάστροφων ακραίων αλληλουχιών-ITR (inverted terminal repeats), που αυτό-οργανώνονται μέσω συμπληρωματικότητας σε δομές σχήματος T²⁵. Ο ρόλος των δομών T είναι διττός: Πρώτον, λειτουργούν σαν θέσεις έναρξης της αντιγραφής και δεύτερον σαν σήματα πακεταρίσματος του ιικού γονιδιώματος στο καψίδιο του ιού²⁶. Το γονιδίωμα των φορέων AAV μπορεί να ενσωματωθεί στο ανθρώπινο γενετικό τόπο AAVS1 και εκεί να υφίσταται σε λανθάνουσα κατάσταση. Αυτό το φαινόμενο παρατηρείται (i) λόγω ομολογίας μεταξύ των αλληλουχιών των ITR και του γενετικού τόπου AAVS1 και (ii) λόγω της δράσης της ιικής πρωτεΐνης Rep. **OK**

Οι AAV φορείς που χρησιμοποιούνται στη γονιδιακή θεραπεία είναι ανασυνδυασμένοι AAV φορείς (recombinant AAV, rAAV). Το γονιδιώμά τους μεταξύ των αλληλουχιών ITR έχει υποκατασταθεί από γονίδια που είναι επιθυμητό να «μεταφερθούν» σε κυτταρικούς στόχους. Μετά την μεταγωγή των κυττάρων και την είσοδο του ιοσωματίου στο κυτταρόπλασμα, τα ιοσωμάτια μετακινούνται στον πυρήνα όπου αποικοδομείται το καψίδιο και απελευθερώνεται το μονόκλωνο γονιδίωμα του ιού. Σε αυτή την φάση το ιικό γονιδίωμα δεν μεταγράφεται αλλά πρέπει πρώτα να συντεθεί ο συμπληρωματικός κλώνος DNA. Το νέο δίκλωνο μόριο του ιικού DNA είναι πλέον προσβάσιμο στην RNA πολυμεράση για την διαδικασία της μεταγραφής. Η σύνθεση του DNA ξεκινά από την δομή T του ITR στο 3' άκρο του μορίου. Επιπλέον, το ιικό DNA μπορεί να γίνει δίκλωνο μέσω υβριδισμού δύο συμπληρωματικών ιικών αλυσίδων. Τα συμπληρωματικά μόρια DNA έχουν αντιπαράλληλο προσανατολισμό, μια κωδική αλυσίδα ιικού DNA και μια μη-κωδική αλυσίδα ενώ έχουν πακεταριστεί σε διαφορετικά ιοσωμάτια που έχουν επιμολύνει το ίδιο κύτταρο²⁷.

Ο **τροπισμός** των φορέων AAV εξαρτάται από τον ορότυπό τους, με τους διαφορετικούς ορότυπους να επιτρέπουν την μεταγωγή σε διαφορετικούς κυτταρικούς στόχους τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Οι κασέτες έκφρασης περιλαμβάνουν τον υποκινητή, αλληλουχία Kozak που ενισχύει την μετάφραση του διαγονιδίου, βελτιστοποίηση κωδικονίων για αποδοτικότερη μετάφραση και σηματοδοτικές αλληλουχίες για την λήξη της μεταγραφής και την αλληλουχία σήματος πολυαδενυλίωσης²⁸. Παρά τις τεχνολογικές τους εξελίξεις, οι φορείς AAV έχουν κάποια **μειονεκτήματα** στην χρήση τους ως φορείς γονιδιακής

θεραπείας: Πρώτον το μικρό γενετικό φορτίο σε kb που είναι ικανοί να μεταγουν και δεύτερον το γεγονός ότι δεν είναι ικανό το γονιδίωμά τους να αντιγράφεται ανεξάρτητα τη μιτωτική δραστηριότητα του κυττάρου. Αυτό σημαίνει ότι κατά την διάρκεια πολλών μιτωτικών διαιρέσεων το γονιδίωμα του ιικού φορέα τελικά χάνεται από τα θυγατρικά κύτταρα²⁵. Παρόλα αυτά οι φορείς AAV χρησιμοποιούνται και έχουν λάβει αδειοδότηση για θεραπευτική χρήση από τον FDA σε δύο διαφορετικά προϊόντα το Glybera και το Luxturna. Το Luxturna χορηγείται in vivo για την θεραπεία της κληρονομικής δυστροφίας του αμφιβληστροειδή λόγω δυσλειτουργίας και των δύο αλληλομόρφων του γονιδίου *RPE65*²⁹. Το Glybera χορηγείται ενδομυϊκά για να θεραπεύσει την δυσλειτουργία του ενζύμου *LPL* (λιποπρωτεϊνική λιπάση), που προκαλεί σοβαρή οξεία παγκρεατίτιδα, και είναι μια νόσος με πρότυπο μονογονιδιακής υπολειπόμενη κληρονομικότητας³⁰.

1.2.5 Ρετροϊικοί φορείς

Οι ρετροϊοί είναι ιοί των οποίων το γενετικό υλικό είναι RNA. Το όνομά τους προέρχεται από την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής κατά την οποία το γενετικό τους υλικό μετατρέπεται σε δίκλωνο cDNA από την δράση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcriptase-RT)³¹. Η αντίστροφη μεταγραφάση εκτελεί τρεις (3) δράσεις: **(i)** σαν DNA πολυμεράση που χρησιμοποιεί σαν εκμαγείο την αλυσίδα RNA του ιικού γονιδιώματος για να συνθέσει τον συμπληρωματικό κλώνο cDNA του ιικού γονιδιώματος, **(ii)** σαν RNάση H (RNase H), αποικοδομεί το ιικό RNA και **(iii)** πάλι σαν DNA πολυμεράση, χρησιμοποιεί τον κλώνο του cDNA για να συνθέσει την συμπληρωματική αλυσίδα του ιικού DNA, διαθέτοντας δραστικότητα κλασσικής DNA πολυμεράσης. Μετά το πέρας της αντίστροφης μεταγραφής, τα άκρα του ιικού DNA αλληλεπιδρούν με το ένζυμο ιντεγκράση και σχηματίζουν ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο το ιντάσωμα (intasome)³². Η ιντεγκράση καταλύει δύο αντιδράσεις. Αρχικά καταλύει την επεξεργασία των 3' άκρων του δίκλωνου γραμμικού ιικού DNA, υδρολύοντας 2-3 νουκλεοτίδια, για να απελευθερώσει τις 3'-υδροξυλομάδες συντηρημένων δινουκλεοτιδίων-CA. Αμέσως μετά, η ιντεγκράση πραγματοποιεί την μεταφορά αλυσίδας. Η ιντεγκράση χρησιμοποιεί αυτά τα ελεύθερα 3'-υδροξύλια για να κόψει την αλυσίδα του χρωμοσωμικού DNA, ενώ ταυτόχρονα ενώνει τα 3' άκρα του ιικού DNA με τις αλυσίδες του χρωμοσωμικού DNA μέσω φωσφοδιεστερικού δεσμού. Μετά το πέρας της αντίδρασης αυτής το ιικό DNA έχει πλέον ενσωματωθεί στο γενωμικό DNA του κυττάρου^{31,33}.

Η συνισταμένη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης και της ιντεγκράσης είναι μείζον γεγονός κατά την μόλυνση του κυττάρου από τον ρετροϊό. Ο μηχανισμός αυτός της ενσωμάτωσης αποτελεί το πιο ελκυστικό χαρακτηριστικό της εφαρμογής των ρετροϊκών συστημάτων στη γονιδιακή μεταφορά. Η ενσωμάτωση και η αποδοτική έκφραση ενός συστήματος γονιδίων που απαρτίζουν το ρετροϊκό DNA, η διατήρησή τους στο γενωμικό υλικό των θυγατρικών κυττάρων του αρχικά μολυσμένου κυττάρου αποτελεί σημαντική και επιθυμητή ιδιότητα. Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν τους ρετροϊκούς φορείς ιδανικό σύστημα για την γενετική διόρθωση μονογονιδιακών γενετικών νοσημάτων³¹.

Η Οικογένεια των *Retroviridae* (Ρετροϊών) χωρίζεται σε δύο Υποοικογένειες: 1) *Orthoretrovirinae* και 2) *Spumaretrovirinae*³⁴. Οι *Orthoretrovirinae* χωρίζονται περαιτέρω στα Γένη: *Alpha-*, *Epsilon-* και *lenti-virus*. Στην Υποοικογένεια των *Spumaretrovirinae* ανήκει το Γένος *Simiispumavirus*, στο οποίο ανήκει το είδος *Eastern chimpanzee simian foamy virus* (*simian foamy virus Pan troglodytes schweinfurthii*) από τον οποίο έχει προκύψει και ο φορέας PFV (Prototype foamy virus), ο οποίος απομονώθηκε πρώτη φορά από μια ανθρώπινη κυτταρική σειρά καρκινώματος ρινοφάρυγγα³⁵.

Οι περισσότεροι Ορθορετροϊοί είναι ογκογόνοι ενώ οι λεντιοί είναι εν δυνάμει ογκογόνοι. Ο ιός HIV-1 (ιός της ανοσοανεπάρκειας του ανθρώπου) προκαλεί το σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS) στα άτομα που μολύνονται από αυτόν και δεν λαμβάνουν αντιρετροϊκά φάρμακα. Ο HIV-1 έχει μελετηθεί εκτενώς λόγω του ιατρικού ενδιαφέροντος για την νόσο που προκαλεί και έχει αποτελέσει την βάση για την ανάπτυξη των φορέων LV ως εργαλείο γονιδιακής μεταφοράς για εφαρμογές στην γονιδιακή θεραπεία³³.

Κατά την μόλυνση αφού πραγματοποιηθεί η αντίστροφη μεταγραφή και η ενσωμάτωση του ιικής προέλευσης DNA στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή ο προϊός έχει την εξής δομή/οργάνωση: Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις δομικές πρωτεΐνες του ιού και τα βοηθητικά μόρια και ένζυμα καθώς και τις αλληλουχίες για την έναρξη της αντίστροφης μεταγραφής και του πακεταρίσματος / εγκαψιδίωσης του ιικού RNA, βρίσκονται μεταξύ 2 ακραίων μακρών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών LTR³⁶. Τα LTR αποτελούνται από τρεις λειτουργικά διακριτές περιοχές που παίζουν καίριο ρόλο για τον κύκλο ζωής και την αναπαραγωγή του ιού εντός του κυττάρου. Η αλληλουχία U5 εδράζεται στο 3' άκρο του LTR και αποτελεί το σήμα πολυαδενυλίωσης του ιικού RNA. Πριν την U5 προηγείται μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία R, η οποία αποτελεί την αλληλουχία από την οποία

συντίθεται η αρνητική αλυσίδα του ιικού DNA κατά την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής. Τέλος η αλληλουχία U3 εδράζεται στο 5' άκρο του LTR και περιέχει τις αλληλουχίες του ιικού υποκινητή και ενισχυτών για την μεταγραφή των ιικών γονιδίων από το DNA του προϊού³³.

Το γονιδίωμα των περισσότερων ρετροϊών αποτελείται από δύο αντίτυπα θετικών μονόκλωνων αλυσίδων RNA. Συνοπτικά, η αντίστροφη μεταγραφή εκκινεί κοντά στο 5' LTR. Ως εκκινητής λειτουργεί το tRNA Lys3, το οποίο υβριδίζεται στην αλληλουχία rbs καθοδικά του 5' LTR. Όταν ολοκληρωθεί η σύνθεση του μη κωδικού κλώνου DNA, η δραστηριότητα της RNάσης H της αντίστροφης μεταγραφάσης αποικοδομεί το υβριδισμένο κομμάτι του RNA του ιού (5' RNA που είναι υβριδισμένο με το νεοσυντεθειμένο DNA). Αυτός ο κλώνος DNA, που διατηρεί και τα 18 ριβονουκλεοτίδια του εκκινητή tRNA, στην συνέχεια υβριδίζεται στην αλληλουχία R στο 3' LTR του ιικού RNA επιτρέποντας να συντεθεί ένας πλήρης συμπληρωματικός κλώνος DNA από την αντίστροφη μεταγραφάση σε όλο το μήκος του ιικού RNA³⁶. Στην συνέχεια η RNάση H, αποδομεί το ιικό RNA πλην της αλληλουχίας rpt (polyurine tract). Η αλληλουχία rpt είναι πλούσια σε πουρίνες και χρησιμεύει ως εκκινητής για την σύνθεση του θετικού κλώνου (κατεύθυνση +) του ιικού DNA με χρήση σαν εκμαγείο του νεοσυντεθειμένου αρνητικού κλώνου του ιικού DNA (κατεύθυνση -). Ο HIV-1 έχει δυο αλληλουχίες rpt με εκείνη που εδράζεται κοντά στο 3' LTR να είναι καίριας σημασίας για την σύνθεση της κωδικής αλυσίδας του ιικού DNA και για τον ιικό πολλαπλασιασμό. Η αλυσίδα του DNA επιμηκύνεται ώσπου να ολοκληρωθεί η σύνθεση του 3' LTR το οποίο περιέχει και 18 νουκλεοτίδια με συμπληρωματική αλληλουχία με το tRNA Lys3 στον κλώνο εκμαγείου. Στη συνέχεια, η υβριδική DNA/RNA αλυσίδα, γίνεται υπόστρωμα για την RNάση H, η οποία απομακρύνει τα ριβονουκλεοτίδια του tRNA αφήνοντας μόνο ένα κατάλοιπο ριβο-αδενοσίνης στο 5' άκρο της αλυσίδας (-) και τον εκκινητή rpt από τον κλώνο (+)³⁷. Στην συνέχεια παρατηρείται ένα φαινόμενο υποκατάστασης εκμαγείου (template switch) όπου ο νεοσυντεθειμένος θετικός κλώνος ιικού DNA υβριδίζεται μέσω συμπληρωματικότητας στην αλληλουχία rbs του δεύτερου αντιτύπου RNA του ιού και από εκεί επιμηκύνεται και προς τις δύο κατευθύνσεις παράγοντας ένα πλήρες δίκλωνο μόριο ιικού DNA. Και τα δύο άκρα του ιικού DNA αποτελούνται από τα LTR που έχουν την ίδια αλληλουχία, και με τις περιοχές/αλληλουχίες U3-R-U5^{36,38}.

Το γονιδίωμα του HIV-1 αποτελείται από τα γονίδια gag pol και env αντίστοιχα των οποίων απαντώνται σε όλους τους ρετροϊούς, μια αλληλουχία Ψ, η οποία είναι απαραίτητη

για την εγκαψιδίωση του ιικού RNA για την παραγωγή ιοσωματίων με ικανότητα μόλυνσης, τα βοηθητικά γονίδια *nef*, *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpr* και την αλληλουχία RRE πάνω στην οποία προσδένεται η πρωτεΐνη Rev του ιού και αυξάνει την ικανότητα εγκαψιδίωσης του ιικού γονιδιώματος σε σημαντικό βαθμό. Το γονίδιο *gag* κωδικοποιεί μια πρόδρομη πρωτεΐνη η οποία μετά από πρωτεολυτική επεξεργασία από την ιική πρωτεάση ρετροπεψίνη παράγει τέσσερις επιμέρους πρωτεΐνες: την βασική πρωτεΐνη p17- MA (Matrix), την πρωτεΐνη p24 CA (Capsid), την πρωτεΐνη p7 NC (Nucleocapsid) του νουκλεοκαψιδίου που αλληλεπιδρά με το ιικό RNA και μαζί απαρτίζουν το καψίδιο του ιού και την πρωτεΐνη p6 η οποία διαδραματίζει καίριο ρόλο στην εκβλάστηση των ιοσωματίων από την κυτταρική μεμβράνη³⁹. Το γονίδιο *pol* κωδικοποιεί τρεις πρωτεΐνες: την ρετροπεψίνη PR, την αντίστροφη μεταγραφάση RT και την ιντεγκράση (INT). Η ρετροπεψίνη διαθέτει ικανότητα αυτο-επεξεργασίας για την παραγωγή ώριμης ρετροπεψίνης από την πρόδρομη πρωτεΐνη Pr55Gag, που αποτελεί το προϊόν της μετάφρασης των γονιδίων *gag/pol* σε μια κοινή πολυπεπτιδική αλυσίδα⁴⁰. Τέλος το γονίδιο *env* κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες του φακέλου. Από το γονίδιο αυτό παράγεται η πρόδρομη πρωτεΐνη gp160, η οποία μετά από πρωτεόλυση ωριμάζει σε 2 πρωτεΐνες την gp41 που διαπερνά την μεμβράνη του ιοσωματίου και είναι διαμεμβρανική και την gp120 που βρίσκεται εκτός της μεμβράνης του ιοσωματίου και δρα σαν ακίδα πρόσδεσης στους φυσικούς υποδοχείς του ιού το αντιγόνο επιφανείας CD4 και τον συνυποδοχέα CCR5 στην επιφάνεια των T λεμφοκυττάρων. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι ο ιός είναι ικανός να μολύνει και μακροφάγα και μονοκύτταρα χρησιμοποιώντας τον υποδοχέα CXCR4 σε χρόνια πάσχοντα άτομα⁴¹.

Η πρωτεΐνη TAT είναι ένας μεταγραφικός ενεργοποιητής ο οποίος αυξάνει δραματικά την μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος από την περιοχή U3 του LTR , που αποτελεί τον ιικό υποκινητή⁴². Η TAT διαδραματίζει, επίσης ρόλο μεταγραφικού παράγοντα και για τα ενδογενή γονίδια του κυττάρου ξενιστή όπου εκτρέπει την γονιδιακή έκφραση για να ευνοείται η αναπαραγωγή του HIV-1. Επίσης εξασθενεί το ενδοκυτταρικό ανοσοποιητικό μηχανισμό του κυττάρου και ευνοεί την ικανότητα μόλυνσης και άλλων κυτταρικών πληθυσμών πέραν των CD4+ T λεμφοκυττάρων⁴³.

Η πρωτεΐνη REV ασκεί ρυθμιστικό ρόλο για την μετάφραση των ιικών πρωτεϊνών. Προσδένεται μέσω της αλληλουχίας RRE στα μετάγραφα του ιού HIV-1, που δεν έχει ολοκληρωθεί το μάτισμά τους, και τα εξάγει από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Εκεί τα μερικώς επεξεργασμένα ιικά μετάγραφα υπόκεινται σε μετάφραση, από την οποία

προκύπτουν οι δομικές πρωτεΐνες του ιού. Λειτουργικά, ο ρόλος της REV είναι να τροποποιεί την γονιδιακή έκφραση του ιικού γονιδιώματος ώστε να αυξάνεται η μετάφραση των δομικών πρωτεϊνών του ιού⁴⁴.

Η αλληλουχία RRE του ιικού mRNA αναγνωρίζεται από την REV η οποία προσδένεται σε αυτήν και εξάγει το ιικό mRNA από τον πυρήνα. Η αλληλουχία RRE εδράζεται στο ιντρόνιο που υπάρχει αμέσως μετά από το γονίδιο *env*^{44,45}.

Οι φορείς LV που χρησιμοποιούνται σήμερα ως φορείς για γονιδιακή θεραπεία είναι τρίτης γενιάς αυτοαδρανοποιούμενοι φορείς. Το γονιδίωμα του HIV-1 έχει διαχωριστεί σε ένα σύστημα 4 πλασμιδίων. Το πλασμίδιο γονιδιακής μεταφοράς φέρει τα LTR του ιού, την αλληλουχία Ψ, ώστε να είναι αποδοτική η παραγωγή λειτουργικών ιοσωματίων, την αλληλουχία RRE ώστε να επιτυγχάνεται η αποδοτική έξοδος του ιικού RNA από τον πυρήνα για την συναρμολόγηση των ιοσωματίων, την αλληλουχία *crpt* ώστε να καθίσταται δυνατή η αντίστροφη μεταγραφή του ιικού RNA στα κύτταρα στόχους και τη γονιδιακή κασέτα έκφρασης του προς μεταφορά γονιδίου. Η αλληλουχία του U3 στο 5' LTR έχει υποκατασταθεί από τους ιικούς υποκινητές του κυτταρομεγαλοϊού - CMV ή από τον ικό υποκινητή του ιού σαρκώματος του Rous - RSV, για να πραγματοποιείται η μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος με υψηλή απόδοση στην κυτταρική σειρά παραγωγής, απουσία της πρωτεΐνης Tat του HIV-1³⁷. Η περιοχή U3 στο 3' LTR έχει απαλειφθεί και αυτό σημαίνει ότι ο ιός αυτοαδρανοποιείται μετά την αντίστροφη μεταγραφή και ενσωμάτωση του DNA του προϊού στο γενωμικό DNA του κυττάρου ξενιστή. Η απουσία της περιοχής U3 σημαίνει ότι απασ και το DNA του προϊού ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του ξενιστή καθίσταται αδύνατη η μεταγραφή ολόκληρου του ιικού γονιδιώματος. Συνεπώς, καθίσταται σχεδόν αδύνατη η παραγωγή ενός ιού με ικανότητα αναπαραγωγής, ακόμα και στην περίπτωση όπου παρατηρηθεί κάποιο σπάνιο γεγονός ανασυνδυασμού κατά την παραγωγή του ιού ή ακόμα και αν ο φορέας LV ανασυνδυαστεί με αγρίου τύπου HIV-1 που μπορεί να έχει μολύνει από πριν τα κύτταρα στόχους. Για τον ίδιο λόγος η απαλοιφή της αλληλουχίας που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TAT, προσφέρει ένα σημαντικό στοιχείο ασφάλειας⁴⁶.

Για να αντιμετωπιστεί η χαμηλή έκφραση των διαγονιδίων που παρατηρούνταν από τους φορείς LV έγινε προσθήκη του στοιχείου WPRE. Η προσθήκη του WPRE στη 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή της κασέτας έκφρασης αυξάνει σημαντικά την έκφραση του διαγονιδίου, ανεξάρτητα από τον υποκινητή και τον τύπο του διαγονιδίου^{23,47}. Οι υπόλοιπες δομικές πρωτεΐνες για την συναρμολόγηση λειτουργικών ιοσωματίων κωδικοποιούνται από

τρία βοηθητικά πλασμίδια: **(i)** Gag/Pol που κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες MA,CA, NC, p6, την αντίστροφη μεταγραφάση, την ιντεγκράση και την PR, **(ii)** το πλασμίδιο Rev που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη REV και **(iii)** το πλασμίδιο VSV-G που κωδικοποιεί τον φάκελο του ιού VSV-G που υποκαθιστά τον εγγενή φάκελο του ιού HIV-1³⁷.

Όσον αφορά το σύστημα παραγωγής οι φορείς lenti παράγονται σε κυτταρική σειρά παραγωγής HEK293T. Αυτή η κυτταρική σειρά από ανθρώπινο εμβρυικό νεφρό φέρει ενσωματωμένη στο γονιδίωμά της την αλληλουχία του μεγάλου αντιγόνου T των ιού SV40 (SV40 Large T antigen- SV40 Tag). Τα κύτταρα αυτά φέρουν την ικανότητα παραγωγής ιικών φορέων λέντι με υψηλότερη απόδοση σε σχέση με την μητρική σειρά HEK293⁴⁸. Ωστόσο, η παρουσία της αλληλουχίας SV40 Tag εγείρει σημαντικό ζήτημα ασφαλείας για τους φορείς που παράγονται στα κύτταρα αυτά και προορίζονται για κλινική χρήση. Ο λόγος είναι ότι έχει διαπιστωθεί ότι τα κύτταρα που έχουν εξαλλαχθεί από το DNA του SV40 Tag είναι ικανά να επάγουν ογκογένεση σε μοντέλα ποντικών, όταν μεταμοσχευθούν σε αυτά. Για τον λόγο αυτό έχουν δημιουργηθεί κυτταρικές σειρές HEK293, από τις οποίες με τη χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 έχουν αφαιρεθεί οι αλληλουχίες DNA του SV40 Tag. Παρόλο που παρατηρείται πτώση στον τίτλο των παραγόμενων ιών, αυτή η μικρή απώλεια στην απόδοση είναι αποδεκτή καθώς ευνοείται το προφίλ ασφαλείας των παραγόμενων φορέων^{48,49}.

Για την εφαρμογή των φορέων σε κλινικές εφαρμογές γονιδιακής θεραπείας πρέπει η παραγωγή τους να γίνεται κατά τα πρότυπα GMP (good manufacturing practice) και cGMP (current GMP) με χρήση υλικών που έχουν κατασκευαστεί επίσης με πρότυπα GMP. Τα θρεπτικά υλικά είναι χημικά καθορισμένα-συνθετικά στα οποία υποκαθίσταται ο βόειος ορός, ο οποίος αποτελεί υλικό με εν δυνάμει μικροβιακό/ μολυσματικό φορτίο⁵⁰.

Κατά την παραγωγή των φορέων LV, οι κυτταρικές σειρές παραγωγής HEK293/ HEK293 T διαμολύνονται με πλασμιδιακά DNA που κωδικοποιούν **(i)** τις δομικές πρωτεΐνες του ιού HIV-1, **(ii)** τον φάκελο του ιού VSV-G και **(iii)** το πλασμίδιο μεταφοράς το οποίο φέρει τα LTR του ιού υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του ιικού υποκινητή RSV ή CMV, όπως περιεγράφηκε παραπάνω. Μεταξύ των LTR παρεμβάλλεται η κασσέττα του προς μεταφορά διαγονιδίου με τις απαραίτητες ρυθμιστικές αλληλουχίες για την έκφρασή του στα κύτταρα στόχους. Τα πλασμίδια μπορούν να σχηματίζουν νανοσωματίδια – σύμπλοκα με διάφορες ενώσεις όπως είναι το φωσφορικό ασβέστιο, λιποσωμάτια όπως με λιποφεκταμίνη και κατιονικά πολυμερή με την PEI (polyethyleneimine). Η αλληλεπίδραση αυτή συμπυκνώνει το DNA, το κάνει αδιάλυτο και το κατακρημνίζει επιτρέποντάς του να διαπεράσει την λιπιδική

διπλοστοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης και να εισέλθει στο κυτταρόπλασμα. Τα περισσότερα σύμπλοκα DNA-νανοσωματιδίων εισέρχονται στο κύτταρο μέσω ενδοκύτωσης. Το DNA εντός των ενδοσωμάτων στην συνέχεια ακολουθεί δύο πιθανές οδούς: Εκείνη της αποικοδόμησης αν ωριμάσει το ενδόσωμα, ή εκείνη της διατάραξης της δομής του ενδοσώματος και απελευθέρωσης του στο κυτταρόπλασμα^{37,51,52}. Στην συνέχεια το πλασμιδιακό DNA εισέρχεται στον πυρήνα όπου τα γονίδια που φέρει να εκφραστούν για να συντεθούν/συναρμολογηθούν στην συνέχεια τα λειτουργικά ιοσωμάτια του φορέα LV. Τα ιοσωμάτια στην συνέχεια εκβλαστώνουν από την κυτταρική μεμβράνη και απελευθερώνονται στο καλλιεργητικό υγρό θρεπτικό μέσο (υπερκείμενο)⁴⁶.

Αυτό το υπερκείμενο της καλλιέργειας είναι εμπλουτισμένο με ιοσωμάτια LV και στην συνέχεια εφαρμόζονται διάφορες φυσικοχημικές μέθοδοι για τον καθαρισμό και την συμπύκνωση των ιοσωματίων. Αρχικά το ιικό υπερκείμενο φυγοκεντρείται σε χαμηλές στροφές 2000 g και φιλτράρεται από ηθμό 0,45μm για να απομακρυνθούν κυτταρικές μεμβράνες και αποπτωτικά σωμάτια από το παρασκεύασμα. Στην συνέχεια μπορεί να συμπυκνωθεί και να καθαριστεί περαιτέρω με υπερφυγοκέντρωση, υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης HPLC και υπερδιήθησης εφαπτομενικής ροής- TFF. Οι τεχνικές HPLC και TFF είναι δυνατόν να πραγματοποιηθούν και εντός καθαρών χώρων (clean rooms) και είναι σύμφωνες με τα πρότυπα GMP. Τέλος, ο συμπυκνωμένος φορέας LV διαθέτει συγκέντρωση 10^7 - 10^8 μονάδες μόλυνσης ανά ml μπορεί να αποθηκευτεί στους -80 °C για μελλοντική χρήση και για κλινική εφαρμογή³⁷.

1.2.6 Φορείς FV, αρχαίοι και ασφαλείς φίλοι

Οι ιοί foamy-FV είναι αρχαίοι ιοί που ανήκουν στην υποοικογένεια Spumaretrovirinae των Retroviridae. Οι FV φορείς είναι πιο αρχαίοι σε σχέση με τις κοντινότερες συγγενικές τους εξελικτικά ομάδες, την Υποοικογένεια των Orthoretrovirinae και την Οικογένεια των Herpesviridae. Ο πρωτοτυπικός ιός FV- PFV απομονώθηκε πρώτη φορά από μια κυτταρική σειρά ρινοφαρυγγικού καρκινώματος και παρόλο που θεωρήθηκε ότι ήταν ενδημικός στον άνθρωπο στην συνέχεια η αλληλούχισή του έδειξε ότι προέρχεται από τον SFV του χιμπατζή. Οι FV είναι ενδημικοί στα ανώτερα θηλαστικά, στους πιθήκους και στα πρωτεύοντα. Σε όλους τους ξενιστές φαίνεται να μην προκαλούν νόσο, και συνεπώς δεν είναι παθογόνοι. Μεταδίδεται κυρίως με το σάλιο και στον άνθρωπο είναι δυνατόν να μεταδοθεί με ζωνόσο

από τους πιθήκους. Ωστόσο μολυσμένα άτομα δεν εμφανίζουν κάποια σχετιζόμενη με την μόλυνση νόσο αλλά παραμένουν χρόνια φορείς⁵³.

Οι ιοί FV διαθέτουν το γονίδιο gag, pol και env όπως οι Ορθοετροϊοί, ωστόσο διαθέτουν και χαρακτηριστικά τα οποία είναι κοινά με τους Herpesviruses. Αρχικά, το γονίδιο της αντίστροφης μεταγραφάσης pol των FV διαθέτει «ανεξάρτητο» κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης AUG, σε αντίθεση με το αντίστοιχο γονίδιο των ρετροϊών, όπου παράγεται ένα ενιαίο προπεπτίδιο GAG-POL. Επιπλέον, in vitro έχει παρατηρηθεί ότι οι FV ολοκληρώνουν την αντίστροφη μεταγραφή στο ιοσωμάτιο, προτού να μολύνουν ένα νέο κύτταρο ξενιστή. Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν τους FV ως ξεχωριστή Υποοικογένεια των Ρετροϊών, διότι δεν απαντώνται σε κανέναν άλλο Γένος που να ανήκει στους Όρθοετροϊούς⁵⁴.

Το γονιδίωμα του προϊού FV οργανώνεται μεταξύ των δύο LTR του ιού. Το 5' LTR ελέγχει την μεταγραφή των γονιδίων gag, pol και env. Στην αλληλουχία του γονιδίου env εδράζεται ένας εσωτερικός υποκινητής (IP) που ελέγχει την μεταγραφή των γονιδίων bet και bel1-3. Οι πρωτεΐνες που προκύπτουν από την μετάφραση των γονιδίων αυτών δεν είναι δομικές για τον ιό αλλά είναι ρυθμιστικά στοιχεία που ρυθμίζουν την αναπαραγωγή του ιού και τον κύκλο της μόλυνσης στο κύτταρο ξενιστή. Η πρωτεΐνη Tas/Bel1 είναι ένας μεταγραφικός ενεργοποιητής που επάγει την μεταγραφή από το 5' LTR του ιού, αλλά και από τον εσωτερικό υποκινητή IP του ιού. Τα γονίδια pol και env μεταγράφονται ως ένα κοινό πρόδρομο mRNA από το οποίο μετά το μάτισμα προκύπτουν δύο διακριτά ώριμα mRNA που κωδικοποιούν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες. Η πρωτεΐνη Gag παράγεται από ένα διακριτό μόριο mRNA. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι μείζονος σημασίας για την ασφάλεια των φορέων για εφαρμογές γονιδιακής θεραπείας διότι τα γονίδια gag και pol διαχωρίζονται σε δύο διακριτά πλασμίδια εν αντιθέσει με εκείνα των LV φορέων που αποτελούν ένα ενιαίο γονίδιο gag/pol όπως περιγράφεται παραπάνω^{55,56}.

Οι φορείς FV παράγονται στην κυτταρική σειρά HEK293T με ένα τρίτης γενιάς σύστημα αποτελούμενο από τέσσερις πλασμιδιακούς φορείς. Από αυτούς, τρεις αποτελούν βοηθητικά πλασμίδια και ένας αποτελεί το πλασμίδιο γονιδιακής μεταφοράς που φέρει τα LTR του ιού, τα απαραίτητα in cis τμήματα για την ενκαψιδίωση και την κασσέτα έκφρασης του διαγονιδίου. Το γονιδίωμα του προϊού έχει διασπαστεί σε τρία βοηθητικά πλασμίδια που κωδικοποιούν τα γονίδια gag, pol και env υπό τον έλεγχο του ιικού υποκινητή CMV. Το πλασμίδιο γονιδιακής μεταφοράς φέρει τα LTR του ιού FV καθώς και απαραίτητες cis-

δραστικές αλληλουχίες που είναι απαραίτητες για την παραγωγή και συναρμολόγηση του ιικού φορέα στην κυτταρική σειρά παραγωγής. Στο 5' LTR, η αλληλουχία U3 έχει υποκατασταθεί από τον υποκινητή CMV. Αυτό καθιστά τον φορέα ανεξάρτητο από την παρουσία της πρωτεΐνης Tas/Bel1 για την μεταγραφή του γονιδιώματός του. Η απαλοιφή της περιοχής U3 από το 5' LTR έχει σαν αποτέλεσμα αφού ολοκληρωθεί η αντίστροφη μεταγραφή και η ενσωμάτωση του προϊόντος στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή, το 5' LTR να αδρανοποιείται και δεν υφίσταται μεταγραφή. Επιπλέον, η περιοχή U3 από το 3' LTR έχει απαλειφθεί. Αυτές οι τροποποιήσεις έχουν καταστήσει του FV φορείς αυτοαδρανοποιούμενους όπως είναι και οι LV φορείς⁵⁶.

Για τη **βελτίωση της ασφάλειας** από τη χρήση αυτών των ιών, έχουν γίνει μία σειρά από παρεμβάσεις. Αρχικά οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες Bel1-3 και Bet έχουν απαλειφθεί από τον φορέα. Στον φορέα διατηρούνται μόνο κάποιες ικές ρυθμιστικές αλληλουχίες που είναι απαραίτητες για την παραγωγή λειτουργικών ισωματίων: η περιοχή CASI αποτελείται από μια αλληλουχία 2,2-2,5kb μεταξύ του 5'LTR και μέρους της 5' αλληλουχίας του γονιδίου gag, και η περιοχή CASII που αποτελείται από την 3' αλληλουχία του γονιδίου pol και την 5' αλληλουχία του γονιδίου env. Στην περιοχή CASII υπάρχουν 4 κεντρικές αλληλουχίες πλούσιες σε πουρίνες που διεκπεραιώνουν διαφορετικές λειτουργίες στην ική αντιγραφή, αλλά εικάζεται ότι μόνο μια από αυτές αποτελεί το ισοδύναμο της περιοχής cPPT των φορέων LV. Επιπλέον, η περιοχή CASI έχει υποβληθεί σε αδρανοποιητικές μεταλλαγές ώστε να μην παράγεται μετάγραφο Gag από το πλασμίδιο γονιδιακής μεταφοράς^{56,57}.

Επίσης, και σε αντίθεση με τους LV και τους γ-ρετροϊκούς φορείς, οι FV φορείς δεν μπορούν να ψευδοτυπηθούν και διατηρούν την ενδογενή πρωτεΐνη του φακέλου. Ο λόγος είναι ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών GAG και ENV είναι απαραίτητη για την συναρμολόγηση του ισωματίου του φορέα FV και την εκβλάστησή του από την κυτταρική μεμβράνη. Τέλος, οι φορείς FV επιδεικνύουν ευρύ τροπισμό και δεν έχει βρεθεί κυτταρικός πληθυσμός που να καθιστά αδύνατη την μεταγωγή από τους ιούς αυτούς.^{58,59}

Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά που διαθέτουν οι φορείς FV τους καθιστούν ιδανικούς για εφαρμογές στην γονιδιακή θεραπεία και την κλινική εφαρμογή της. Το γεγονός ότι παράγονται από ένα σύστημα τριών βοηθητικών στα οποία εκφράζονται μεμονωμένα τα γονίδια FV gag, pol και env μειώνοντας την πιθανότητα να προκύψει FV φορέας κατά την παραγωγή που να είναι ικανός να αναπαράγεται (replication competent retrovirus-RCR)

αυτόνομα στα κύτταρα ξενιστές. Η απαλοιφή των ιικών γονιδίων Bel2-3, Tas/Bel 1 και Bet. Η απαλοιφή της αλληλουχίας U3 από το 3' LTR που καθιστά τους φορείς αυτοαδρανοποιούμενους (SIN, self-inactivating) μετά το πέρας της αντίστροφης μεταγραφής και ενσωμάτωσης του προϊκού DNA στο γονιδίωμα του ξενιστή⁶⁰. Επιπλέον, οι φορείς FV διαθέτουν στα επιμήκη LTR τους αλληλουχίες που δρουν σαν μονωτές μην επιτρέποντας το φαινόμενο της ενεργοποίησης παρακείμενων γονιδίων από την θέση ενσωμάτωσης τους στο γονιδίωμα, όπως συμβαίνει συχνά με άλλους ρετροϊούς⁶¹. Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά δείχνουν ότι οι FV φορείς χαρακτηρίζονται από ένα ευνοϊκό προφίλ ασφάλειας.

Επιπλέον, από μελέτες που εξετάζουν το **προφίλ ενσωμάτωσης** των φορέων FV στο γονιδίωμα, έχει αποδειχθεί ότι οι φορείς αυτοί προτιμούν να ενσωματώνονται λιγότερο συχνά εντός γονιδίων όπως οι λεντικοί φορείς, αλλά κοντά σε θέσεις έναρξης της μεταγραφής και σε ρυθμιστικά στοιχεία όπως οι νησίδες CpG^{62,63}. Τέλος, ένα ακόμα σημαντικό πλεονέκτημα των φορέων FV είναι η ικανότητά τους να μεταφέρουν γενετικό φορτίο μεγαλύτερο σε σχέση με τους lenti φορείς και αυτό γιατί έχουν το μεγαλύτερο σε μέγεθος γονιδίωμα από όλους τους ρετροϊούς⁶⁰.

1.3. Επαναπρογραμματισμός και επαγόμενα βλαστοκύτταρα

Η ανάπτυξη των επαγόμενων βλαστοκυττάρων iPS/iPSCs αποτέλεσε σταθμό για τους τομείς της βιολογίας των βλαστοκυττάρων αλλά και της αναγεννητικής ιατρικής. Τα iPSC διαθέτουν ιδιότητες παρόμοιες με εκείνες των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων. Ενώ τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα απομονώνονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης του εμβρύου, τα iPSCs προέρχονται από «ενήλικα» κύτταρα. Αυτός είναι ο λόγος που η μελέτη και η χρήση τους ερευνητικά και μη δεν επιβαρύνεται από τους ηθικούς περιορισμούς που συνοδεύουν την έρευνα και την χρήση ανθρωπίνων εμβρύων⁶⁴.

Τα iPSCs προκύπτουν μετά από την διαδικασία του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού μέσω της εκτοπικής έκφρασης τουλάχιστον τεσσάρων γονιδίων που ονομάζονται από κοινού παράγοντες Yamanaka. Τα γονίδια αυτά είναι το *oct4*, *sox2*, *c-myc* και το *klf4*. Η εκτοπική έκφραση μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους όπως με την χρήση ιικών φορέων, φορέων DNA, μορίων mRNA και πρωτεϊνών και μικρών χημικών μορίων⁶⁵.

Η απόδοση του επαναπρογραμματισμού ενηλίκων κυττάρων αυξάνει σημαντικά από την χρήση επιπλέον 2 γονιδίων του *lin28* και του *nanog* καθώς και διαφόρων μορίων miRNA και μικρών μορίων, πχ το ασκορβικό, και άλλων που επιφέρουν τροποποιήσεις στο επιγενετικό status των κυττάρων όπως είναι το βαλπροϊκό οξύ και το βουτυρικό οξύ. Με αυτούς τους παράγοντες η απόδοση του επαναπρογραμματισμού μπορεί να φτάσει το εντυπωσιακό ποσοστό του 2% επί του αρχικού πληθυσμού των κυττάρων⁶⁶.

Η ταχύτητα του επαναπρογραμματισμού εξαρτάται από την μέθοδο γονιδιακής μεταφοράς, το status διαφοροποίησης του αρχικού κυτταρικού πληθυσμού και την ηλικία του δότη των κυττάρων. Όσον αφορά την πηγή των κυττάρων, οι ινοβλάστες δέρματος και τα λευκά αιμοσφαίρια (κυρίως T λεμφοκύτταρα) αποτελούν εξαιρετικές πηγές λόγω της ευκολίας απομόνωσής τους και του «αναίμακτου» - ελάσσονος επεμβατικής πράξης που απαιτείται για την συλλογή των κυττάρων. Άλλη εξαιρετική πηγή αποτελούν τα Μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα, ειδικά εκείνα που προέρχονται από τον λιπώδη ιστό, τα Μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών, τα αρχέγονα CD34+ αιμοποιητικά κύτταρα από απορριπτόμενες μονάδες ομφαλοπλακουντιακού αίματος⁶⁷ και Μεσεγχυματικά κύτταρα από την γέλη του Wharton του ομφάλιου λώρου.⁶⁸ Όσον αφορά τον χρόνο που απαιτείται για την παραγωγή των iPSC, οι ιικοί φορείς επιτυγχάνουν τον επαναπρογραμματισμό μετά από 20 μέρες από την έναρξη της διαδικασίας, με τους φορείς DNA και τα μόρια mRNA να απαιτούν δύο εβδομάδες και δώδεκα μέρες αντίστοιχα για την εμφάνιση των πρώτων άωρων αποικιών iPSCs⁶⁹.

Στο θέμα της εφαρμογής, τα iPSCs μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν μοντέλα ασθενειών, την ανάπτυξη οργανοειδών και να αποτελέσουν μια ανεξάντλητη πηγή αυτόλογων ή αλλογενών κυττάρων⁷⁰. Τα iPSCs μπορούν να βρουν εφαρμογή και στο πεδίο των θεραπειών με ανάπτυξη T λεμφοκυττάρων. Οι θεραπείες T λεμφοκυττάρων βρίσκουν εφαρμογή στην θεραπεία του καρκίνου καθώς και σε θεραπεία λοιμωδών-ιογενών νόσων. Αυτό προϋποθέτει τον χειρισμό των T λεμφοκυττάρων ώστε να μπορούν να αναγνωρίσουν συγκεκριμένους τύπους αντιγόνων και την παραγωγή τους σε μεγάλους αριθμούς. Όταν τα T λεμφοκύτταρα προέρχονται από το περιφερικό αίμα του ασθενούς μπορεί να υφίστανται περιορισμοί στον αριθμό των κυττάρων, στο στάδιο διαφοροποίησης και στην λειτουργική τους επάρκεια. Επιπλέον τα iPSCs μπορούν να αποτελέσουν μια ανεξάντλητη πηγή NK κυττάρων⁷¹ και κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων⁷².

Τα NK κύτταρα παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την ανοσοθεραπεία του καρκίνου λόγω των εγγενών ιδιοτήτων τους. Τα NK μπορούν να διακριθούν σε δύο πληθυσμούς ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασης του δείκτη επιφανείας CD56 dim και CD56 bright. Ο πληθυσμός με την χαμηλή έκφραση CD56 διαθέτει κυτταροτοξική δράση⁷³, ενώ ο πληθυσμός με την υψηλή έκφραση μπορεί να διαφοροποιηθεί σε εκείνον με την χαμηλή έκφραση μετά από την έκφραση των πρωτεϊνών CD16 και PEB5⁷⁴. Τα NK κύτταρα καταστρέφουν τα κύτταρα του όγκου με τέσσερις μηχανισμούς: Πρώτον, τα κύτταρα NK CD56 dim απελευθερώνουν περφορίνες (Perforin) και Γρανζύμη Β (Granzyme B) και επάγουν απόπτωση στα κύτταρα του όγκου μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με αυτά⁷⁵.

Δεύτερον, επάγουν απόπτωση στα κύτταρα του όγκου μέσω των μορίων FasL, mTNF και TRAIL που εκφράζονται από τα NK κύτταρα. Ο μηχανισμός διαμεσολαβείται από τα CD56 bright NK και δεν είναι προαπαιτούμενο να αλληλεπιδράσουν τα κύτταρα του όγκου με τους διεγερτικούς υποδοχείς των NK κυττάρων⁷⁶. Τρίτον τα NK αποτελούν διάμεσο μεταξύ της χυμικής ανοσίας (αντισώματα κλάσης IgG1 κ IgG3) ενάντια στον όγκο και της κυτταρικής ανοσίας που απαρτιώνουν τα ίδια τα NK. Συγκεκριμένα τα NK εκφράζουν το μόριο CD16 που προσδένεται στο Fc τμήμα των αντισωμάτων που έχουν οψωνινοποιήσει τον όγκο και καταστρέφουν τα κύτταρα του νεοπλάσματος με τον μηχανισμό ADCC (κυτταρική κυτταροτοξικότητα εξαρτημένη από αντίσωμα)⁷⁷. Τέλος τα NK κύτταρα παράγουν πληθώρα κυτταροκινών συμπεριλαμβανομένης και της IFN-γ που δρουν ενάντια στον όγκο με ποικίλους μηχανισμούς όπως μέσω ενεργοποίησης της έμφυτης ανοσίας και της αναστολής της αγγειογένεσης⁷³.

1.4 Χιμαιρικοί Αντιγονικοί Υποδοχείς

Το φυσιολογικό μονοπάτι της αναγνώρισης και της καταστροφής των κυττάρων του όγκου από τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα αποτελείται από πολλά βήματα και την λειτουργία του Μείζονος συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας Ι (MHC-I). Αρχικά τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα πρέπει να φαγοκύτταρώσουν κύτταρα του όγκου ή θραύσματα νεκρών κυττάρων. Στην συνέχεια τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα μεταναστεύουν στους λεμφαδένες όπου κάνουν αντιγονοπαρουσίαση μέσω των Μείζονος συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας Ι και ΙΙ στα παρθένα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα και στα παρθένα Τ κύτταρα βοηθούς αλληλεπιδρώντας με τους υποδοχείς των Τ λεμφοκυττάρων (TCR) που αυτά εκφράζουν. Όταν γίνει αναγνώριση από τον TCR του συμπλόκου MHC class

I-αντιγόνο του όγκου, τα T λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται. Παράλληλα τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα εκφράζουν και συνδιεγερτικά μόρια όπως το CD80 και το CD86 που είναι απαραίτητα για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων. Ακόμα σε απόκριση της αλληλεπίδρασης παράγουν μια σειρά διεγερτικών κυτταροκινών. Όταν ολοκληρωθούν όλα αυτά τα βήματα τα παρθένα CD8+ T κύτταρα διαφοροποιούνται σε κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα, μεταναστεύουν στην περιφέρεια και τελικά διηθούν τον όγκο και καταστρέφουν τα κύτταρα που έχουν υποστεί εξαλλαγή⁷⁸.

Ωστόσο λόγω του ότι ο όγκος αναπτύσσεται σταδιακά έχει προταθεί το μοντέλο της ανοσολογικής τροποποίησης του όγκου. Κατά την συγκέντρωση μεταλλαγών ο όγκος παράγει και παρουσιάζει μέσω του MHC-I νεο-επιτόπους οι οποίοι είναι μεν ανοσογονικοί, αλλά με κάποιον μηχανισμό αποκρύπτονται από τα κύτταρα του όγκου^{79,80}.

Ωστόσο αυτό το μοντέλο δεν είναι ισχύει για όλους τους όγκους καθώς φαίνεται ότι ένας αριθμός από αυτούς ενώ εκφράζει νεοντιγόνα, διαφεύγει της κυτταροτοξικής δράσης των T λεμφοκυττάρων⁸¹. Επίσης σε μελέτες φαίνεται ότι όταν στοχευθούν μόρια αναστολής του ελέγχου της ανοσολογικής απόκρισης όπως το PD-1 και το CTLA-4 παρατηρείται ισχυρή κυτταροτοξική δράση ενάντια στα κύτταρα του όγκου τόσο σε προκλινικά μοντέλα όσο και στην κλινική πράξη⁸². Μια στρατηγική για να αντιμετωπιστεί η χαμηλή κυτταροτοξική δράση είναι η ανάπτυξη των CAR T κυττάρων. Αυτά τα T κύτταρα αναπτύσσονται με *ex vivo* χειρισμό μπορεί να είναι αυτόλογα ή αλλογενή και τροποποιούνται ώστε να εκφράζουν ένα χιμαιρικό αντιγονικό υποδοχέα (CAR)⁸².

Οι χιμαιρικοί αντιγονικοί υποδοχείς είναι υβριδικά μόρια που απαρτίζονται από επιμέρους πρωτεϊνικές περιοχές. Αποτελούνται από τις μεταβλητές αλυσίδες, την ελαφριά και την βαριά κάποιου αντισώματος, έναν εύκαμπτο σύνδεσμο, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδοκυττάρια περιοχή. Η ελαφριά και βαριά αλυσίδα συνδέονται με ένα εύκαμπτο συνδετικό πεπτίδιο αποτελούμενο από κατάλοιπα GS (linker peptide). Το σύνολο των τριών αυτών πεπτιδίων ονομάζεται scFv. Το εύκαμπτο συνδετικό πεπτίδιο επιτρέπει στην ελαφριά και βαριά αλυσίδα να υιοθετήσουν την κατάλληλη τριτοταγή δομή ώστε να διατηρήσουν την αντιγονική ειδικότητα του πατρικού αντισώματος από το οποίο έχει προκύψει η πρωτοταγής δομή τους. Η διαμεμβρανική περιοχή επιτρέπει την μετάδοση σήματος από το εξωκυττάριο περιβάλλον στον ενδοκυττάριο χώρο. Συγκεκριμένα, όταν αλληλεπιδράσει η αλυσίδα scFv με το αντιγόνο που αναγνωρίζει και το προσδέσει επέρχεται αλλαγή στην στερεοδιάταξή της, η οποία μεταφέρεται στο ενδοκυττάριο περιβάλλον μέσω της διαμεμβρανικής περιοχής. Η

ενδοκυττάρια περιοχή του χιμαιρικού υποδοχέα απαρτίζεται από την περιοχή CD3ζ του υποδοχέα των Τ λεμφοκυττάρων και άλλες συνδιεγερτικές αλληλουχίες. Ανάλογα με τις συνδιεγερτικές ενδοκυττάρια αλληλουχίες που απαρτίζουν τους χιμαιρικούς αντιγονικούς υποδοχείς-CAR αυτοί διακρίνονται σε γενιές. Οι πρώτης γενιάς αντιγονικοί χιμαιρικοί υποδοχείς αποτελούνταν από την περιοχή scFv και το πρωτεϊνικό μοτίβο ITAM από το μόριο CD3ζ ή τον FcRγ⁸³. Οι δεύτερης γενιάς CAR διαθέτουν πέραν της περιοχής από το μόριο CD3ζ επιπλέον κάποια συνδιεγερτική περιοχή που προέρχεται από ένα από τα μόρια CD28, 4-1-BB, CD27 και OX40^{84,85}. Ο τύπος της επιπλέον συνδιεγερτικής περιοχής επηρεάζει τις λειτουργικές ιδιότητες του CAR Τ κυττάρου όσον αφορά την απόκριση του CAR Τ κυττάρου στην δέσμευση του αντιγόνου στον υποδοχέα CAR, την επιβίωσή του *in vivo* και την διαφοροποίησή του⁸⁴. Οι τρίτης γενιάς CAR διαθέτουν δύο επιπλέον συνδιεγερτικές περιοχές όπως CD28-4-1BB, CD28-OX40 και άλλες⁸⁶. Παρόλο που *in vitro* τα τρίτης γενιάς CAR Τ παρουσιάζουν καλύτερη δράση, αυτό δεν έχει μεταφραστεί στην κλινική. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε πολλούς παράγοντες όπως είναι ο μικρός αριθμός των συμμετεχόντων στις κλινικές μελέτες φάσης Ι, η ετερογένεια της νόσου μεταξύ των ασθενών⁸⁷ και οι πολλαπλές χημειοθεραπείες στις οποίες έχουν υποβληθεί προτού να μπορέσουν να συμμετέχουν στην μελέτη. Για τους λόγους αυτούς έχουν αναπτυχθεί ακόμα πιο βελτιστοποιημένες εκδοχές CAR, ώστε να καλυφθεί το τεχνολογικό κενό και η χαμηλή θεραπευτική αποδοτικότητα των τρίτης γενιάς CAR υποδοχέων, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από τις ίδιες «ανεπάρκειες» που υφίστανται στους CAR υποδοχείς δεύτερης γενιάς⁸⁸.

Επιπλέον έχουν αναπτυχθεί στρατηγικές όπου τα CAR Τ κύτταρα εκφράζουν δύο διακριτούς CAR υποδοχείς με ειδικότητα ενάντια σε δύο διαφορετικά αντιγόνα επιφανείας. Αυτά τα CAR Τ αναγνωρίζουν δύο διακριτά αντιγόνα επιφανείας που εκφράζονται στα κύτταρα του όγκου πχ CD19 και CD22. Τα CAR Τ αυτά χρησιμοποιούνται για την θεραπεία ανθεκτικής Οξείας Λεμφοβλαστικής Λευχαιμίας (ΟΛΛ) Β αρχής με στόχο να αποτρέψουν την υποτροπή της νόσου λόγω της απώλειας της έκφραση του μορίου CD19 από τα κύτταρα της λευχαιμίας⁸⁸. Μία παραλλαγή της στρατηγικής των CAR Τ με διπλή ειδικότητα είναι η παραγωγή δύο διακριτών πληθυσμών CAR που ο καθένας φέρει ειδικότητα για το CD19 ή το CD22 και η συνχορήγηση στους ασθενείς ή χορήγηση διαδοχικά πρώτα με το ένα CAR Τ προϊόν και μετά με μια επιπλέον χορήγηση με το δεύτερο⁸⁸.

Η ανάπτυξη των CAR Τ κυττάρων άλλαξε δραματικά την ανοσοθεραπεία του καρκίνου και έχει θεαματικά αποτελέσματα στην θεραπεία των αιματολογικών νεοπλασιών. Μια

πληθώρα **δεύτερης γενιάς CAR-T** θεραπειών έχουν λάβει έγκριση από τις ρυθμιστικές αρχές των ΗΠΑ -FDA και των EMA της Ευρωπαϊκής ένωσης και πλέον είναι διαθέσιμα στην κλινική πράξη. Τα νεοπλάσματα που θεραπεύονται είναι το Β λέμφωμα, η ΟΛΛ Β αρχής και το πολλαπλό μυέλωμα. Ωστόσο παρά τις επιτυχίες ένα ποσοστό των ασθενών εμφανίζει ανθεκτικότητα στην θεραπεία με τα CAR T⁸⁹. Για να μπορέσει η θεραπεία να γίνει διαθέσιμη σε περισσότερους ασθενείς και να επωφεληθούν από αυτή και οι ασθενείς που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στα κλασσικά CAR T δεύτερης γενιάς έχουν αναπτυχθεί πιο προηγμένοι CAR υποδοχείς τέταρτης και πέμπτης γενιάς καθώς και οι CAR νέας γενιάς.

Παρόλο που τα CAR T εφαρμόζονται ως θεραπευτική προσέγγιση σε μια σειρά αιματολογικών νεοπλασμάτων, δεν έχουν την ίδια επιτυχία στους «συμπαγείς όγκους». Η αδυναμία αυτή είναι αποτέλεσμα του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, το οποίο απαρτίζεται από ανοσοτροποποιητικά κύτταρα και μόρια που παράγονται αυτά. Όταν τα CAR T διηθήσουν τον όγκο και βρεθούν εντός του μικροπεριβάλλοντος του όγκου καθίστανται ανεργικά και πεθαίνουν. Στο μικροπεριβάλλον του όγκου εντοπίζονται μεταξύ άλλων T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα MDMCs, M2 μακροφάγα τα οποία αναστέλλουν τα T λεμφοκύτταρα.

Τα **τέταρτης γενιάς CAR-T** ως στρατηγική έχουν να τροποποιήσουν το μικροπεριβάλλον του όγκου προωθώντας την κυτταροτοξική τους δράση και ενεργότητα. Μια σειρά στρατηγικών ακολουθούνται ώστε να επιτευχθεί αυτό. Μια εξ αυτών είναι μέσω της παραγωγής κυτταροκινών από τα CAR T όπως η IL-12. Η IL-12 παράγεται φυσιολογικά από τα φαγοκύτταρα και τα δενδριτικά σε απόκριση σε μικροβιακούς παράγοντες. Η IL-12 στο μικροπεριβάλλον του όγκου ενεργοποιεί τα T λεμφοκύτταρα και διαφοροποιεί τα CD4+ σε Th1 φαινότυπο, κινητοποιεί τα αεργικά CD4+ T κύτταρα μνήμης και επάγει την παραγωγή IFN γ . Επιπλέον, η δράση της IL-12 ενεργοποιεί τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα και τα NK και αυξάνει τόσο τον πληθυσμό τους όσο και την απόδοση παραγωγής Perforin και Granzyme B⁹⁰. Αυτά τα CAR T ονομάζονται TRUCK (T cell Redirected for Universal Cytokine-mediated Killing). Τα TRUCK CAR T έχει φανεί με βάση κλινικές μελέτες να είναι αποτελεσματικά στο Λέμφωμα Hodgkin και στο Πολλαπλό Μυέλωμα αλλά όχι στο διάχυτο μεγάλο λέμφωμα κυττάρων-B (DLBCL)⁸⁶. Τα **ενισχυμένα CAR-T** λειτουργούν μέσω στόχευσης των σημείων ελέγχου της ανοσολογικής απόκρισης στο μικροπεριβάλλον του όγκου⁸⁶. Τα CAR T αυτά εκφράζουν μόρια που αναστέλλουν την σηματοδότηση του μορίου PD-1 με διάφορες μεθόδους. Μια από αυτές είναι η έκκριση αντι-PD-1 scFv-Fc υβριδικών

πρωτεϊνών⁹¹. Μια άλλη μέθοδος είναι η έκφραση υβριδική πρωτεΐνης PD-1-CD28, όπου το εξωκυττάριο μέρος της πρωτεΐνης αποτελείται από το μόριο PD-1 και το ενδοκυττάριο από την σηματοδοτική περιοχή του μορίου CD28⁹¹. Όταν η υβριδική πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα του μορίου PD-1, τον PD-L1 που εκφράζεται από τα κύτταρα του όγκου και το μικροπεριβάλλον του όγκου, αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η δραστηριότητα του CAR T κυττάρου⁹¹.

1.4.1. Αλλογενή CAR-T κύτταρα

Παρόλο που οι θεραπείες CAR-T είναι αυτόλογες από κύτταρα του ασθενούς, η παραγωγή του κυτταρικού προϊόντος είναι δύσκολη. Η διαδικασία παραγωγής είναι κοστοβόρος, χρονοβόρος και ενέχει τον κίνδυνο αποτυχίας παραγωγής προϊόντος. Αυτό αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για ασθενείς με επιθετική νόσο. Ακόμα τα κύτταρα του ασθενούς έχουν υποβληθεί σε τουλάχιστον ένα κύκλο χημειοθεραπείας και ή ακτινοθεραπείας με αποτέλεσμα να μην είναι εύρωστα ή να μην μπορούν να απομονωθούν σε μεγάλους αριθμούς⁹². Αντίθετα τα αλλογενή CAR T προέρχονται από υγιείς δότες T λεμφοκυττάρων μπορούν να παρασκευαστούν σε μεγάλους αριθμούς και να αποθηκευτούν σε μια λογική “off-the-shelf” σε τράπεζες κυττάρων⁹³. Τα αλλογενή CAR T ποιοτικά είναι ανώτερα και πιο εύρωστα σε σχέση με τα αυτόλογα CAR T. Ως πηγή μπορεί να αποτελέσει περιφερικό αίμα, μονάδες ομφαλοπλακουντιακού αίματος που δεν πληρούν τα κριτήρια για να χρησιμοποιηθούν για μεταμόσχευση CD34 κυττάρων, λόγω χαμηλής μάζας της δωρισμένης μονάδας^{94,95}.

Η χρήση αλλογενών CAR T μπορεί να καθίσταται δύσκολη λόγω του φαινομένου της νόσου μοσχεύματος ενάντι ξενιστή (GvHD). Θεωρείται ότι ο υπαίτιος για την εμφάνιση του GvHD είναι ο υποδοχέας των αβ-T λεμφοκυττάρων που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή του CAR T προϊόντος⁹⁶. Η έκφραση του TCR μπορεί να κατασταλεί με πολλαπλά εργαλεία. Με αποσιώπηση χρησιμοποιώντας την τεχνολογία RNAi με χρήση μορίων siRNA που στοχεύουν το mRNA των α και β αλυσίδων του TCR ή με αποσιώπηση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες αυτές με CrispR/Cas9, Talen, ZNF νουκλεάσες και MEGATAL νουκλεάσες. Όλες αυτές οι προσεγγίσεις εισάγουν σημειακές μεταλλάξεις στο γονιδίωμα των CAR T κυττάρων στα γονίδια *trac* και *trbc1* ή *trbc2*⁹⁵.

Ένα ακόμα πρόβλημα που αφορά την εφαρμογή των αλλογενών CAR T είναι η απόρριψή τους από τον ξενιστή. Τα αλλογενή CAR T πρέπει να παραμείνουν στην

κυκλοφορία του ασθενούς και για το λόγο αυτό ο ασθενής πρέπει να λαμβάνει ανοσοκαταστολή ειδικά αν στο θεραπευτικό πρωτόκολλο προβλέπεται επαναχορήγηση αλλογενών CAR T. Μια λύση θα είναι η ανάπτυξη αλλογενών CAR-T TRAC- τα οποία επιπλέον δεν θα διαθέτουν λειτουργικό γονίδιο της κινάσης της δεοξυκυτιδινής ώστε να είναι ανθεκτικά έναντι χημειοθεραπευτικών παραγόντων που στοχεύουν στην καταστροφή των ενδογενών λεμφοκυττάρων του ασθενούς. Μια άλλη στρατηγική θα ήταν να κατασκευαστούν αλλογενή CAR T στα οποία έχει αποσιωπηθεί η έκφραση του μορίου CD52. Στην περίπτωση αυτή ο ασθενής μπορεί να λάβει μονοκλωνικό αντίσωμα alemtuzumab ώστε να απαλειφθούν τα ενδογενή λεμφοκύτταρα χωρίς να επηρεαστούν τα CAR T⁹⁷. Τέλος μια εναλλακτική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί παράλληλα με τις δύο προηγούμενες είναι η αποσιώπηση του γονιδίου *b2m*. Η β2-μικροσφαιρίνη που παράγεται από το γονίδιο αυτό είναι απαραίτητη για να βγει το MHCΙ στην μεμβράνη των κυττάρων, με την αποσιώπηση του γονιδίου της β2-μικροσφαιρίνης αποσιωπάται και η έκφραση του MHC-Class Ι⁹⁸.

Για την γονιδιακή μεταφορά των CAR υποδοχέων στα T κύτταρα χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνολογίες και φορείς της γονιδιακής θεραπείας. Έχουν γίνει κλινικές μελέτες όπου χρησιμοποιείτε το σύστημα τρανσποζονίων / *sleeping beauty*, ως ένας συνδυασμός mRNA της τρανσποζάσης και ενός μορίου DNA που φέρει τα άκρα ITR και την γονιδιακή κατασκευή του CAR υποδοχέα⁹⁹. Έχουν γίνει μελέτες όπου κατασκευάστηκαν CAR T με μη ιικούς επισωμικούς φορείς *nanos/MARt* που βασίστηκαν στην τεχνολογία των φορέων *rEPI-S/MAR*¹⁰⁰. Ωστόσο, εμπορικά διαθέσιμα CAR T προϊόντα πλήρως αδειοδοτημένα από τους FDA και EMA έχουν παραχθεί με την χρήση ανασυνδιασμένων ρετροϊών και λέντι *Kymriah*, *Breyanzi*, *Abecma* και *Carvykti* και γ-ρετροϊούς *Yescarta* και *Tecartus*. Όλα τα προαναφερθέντα CAR T προϊόντα αφορούν το CD19+ Non-Hodgkin λεμφώματα και ΟΛΛ -B, με εξαίρεση τα *Abecma* και *Carvykti* που στοχεύουν το μόριο BCMA για την θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος⁸⁶.

Στην παρούσα φάση, οι ρετροϊκοί φορείς αποτελούν ακόμα πολύτιμα εργαλεία για την ανάπτυξη των CAR-T θεραπειών και για τον λόγο αυτό είναι σημαντικό να αναπτυχθούν και νέοι βελτιωμένοι φορείς ως εναλλακτικά εργαλεία για την γονιδιακή μεταφορά. Οι φορείς όπως οι FV διαθέτουν ικανότητα μεταφοράς μεγαλύτερου γενετικού φορτίου σε σχέση με τους υπόλοιπους ρετροϊούς, έχουν ευνοϊκό προφίλ και θα μπορούσαν να αποτελέσουν σημαντικό εργαλείο για την ανάπτυξη νέας γενιάς CAR T, η κατασκευή των

οποίων απαιτεί όλο και πιο σύνθετα διαγονίδια και μεγαλύτερες κασσέττες γονιδιακής μεταφοράς.

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η ανάπτυξη ενός συστήματος φορέων FV που θα επέτρεπε την παραγωγή iPSCs. Τα κύτταρα αυτά θα αποτελούσαν μια ανεξάντλητη πηγή T-κυτταροτοξικών κυττάρων για εφαρμογές σε κυτταρικές θεραπείες μέσω της παραγωγής CAR-T κυττάρων. Τα T-κύτταρα που θα προέκυπταν από την διαφοροποίηση των iPSCs, θα τροποποιούνταν γενετικά ώστε να εκφράζουν έναν αντιγονικό χιμαιρικό υποδοχέα για την ανοσοθεραπεία νεοπλασμάτων. Ωστόσο λόγω αδυναμιών του συστήματος να επιτύχει πλήρη επαναπρογραμματισμό, αναπτύχθηκαν FV φορείς οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή αντι-CD19 CAR-T κυττάρων, που προέρχονταν από μονάδες ομφαλοπλακουντιακού αίματος και υγιών δοτών.

2.

ΥΛΙΚΑ

και

ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Παραγωγή Ιϊκού Υπερκείμενου (Φορέων)

Η παραγωγή ιϊκού υπερκείμενου απαιτεί την εισαγωγή επιμέρους πλασμιδίων που κωδικοποιούν το ρετροϊκό γονιδίωμα (πλασμίδιο μεταφοράς) το οποίο περιέχει την διαγονιδιακή κασσέτα και τα βοηθητικά πλασμίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες του φακέλου, ιντεγκράση και αντίστροφη μεταγραφάση καθώς και άλλες πρωτεΐνες που είναι απαραίτητα για τον σχηματισμό του ιϊκού σωματίου και την εκβλάστηση του από την κυτταρική μεμβράνη της κυτταρικής σειράς πακεταρίσματος.

Οι FV και LV φορείς παρασκευάζονται στην κυτταρική σειρά HEK293T η οποία προέρχεται από κύτταρα ανθρώπινου εμβρυϊκού νεφρού και έχει τροποποιηθεί γενετικά ώστε να εκφράζει το Large T antigen του ιού των πιθήκων SV40¹⁰¹. Η παρουσία της αλληλουχίας και της πρωτεΐνης αυτής αυξάνει τον τίτλο στην παραγωγή του ιού lenti σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία και φαίνεται να προσδίδει επιπλέον πλεονεκτήματα στο πολλαπλασιαστικό δυναμικό των HEK293T κυττάρων⁴⁹.

Διαμόλυνση των κυτταρικών σειρών HEK293T και LentiX-293T

Σε 20-24 ώρες προ της διαμόλυνσης επιστρώνεται σε φλάσκα T75 ή σε 100mm πιάτο, επαρκής αριθμός HEK293T κυττάρων ώστε την ημέρα του πειράματος να καλύπτουν τουλάχιστον 50% (confluency) της επιφάνειας της καλλιεργητικής επιφάνειας. Πιο συγκεκριμένα, επιστρώνονται 5×10^6 κύτταρα ανά πιάτο. Μία ώρα πριν την διαμόλυνση, τα κύτταρα ανα-τροφοδοτούνται με φρέσκο πλήρες θρεπτικό μέσο **D10** (DMEM high glucose, 10%FBS, 1% Pen/Strep).

Τα πλασμίδια πακεταρίσματος και του φορέα προστίθενται σε ισομοριακές ποσότητες των 0,3 μmol . Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή των ιών φαίνονται στους Πίνακες 1 και 2 όπου και συνοψίζονται οι ποσότητες σε μg για τον κάθε ιό που απαιτούνται για T75 φλάσκα ή 100mm πιάτο.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

Όνομα φορέα	Ποσότητα
pDF.O4.x.M.IF	15 μg
pCINGS	12 μg
pCINPS	1,5 μg
pCINES	0,8 μg
Όνομα φορέα	

pDF.K.x.S	15 ug
pCINGS	12 ug
pCINPS	1,5 ug
pCINES	0,8 ug
Όνομα φορέα	
pDF.CAR19	18 ug
pCINGS	12 ug
pCINPS	1,5 ug
pCINES	0,8 ug

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

Όνομα φορέα	Ποσότητα
pLMfsv2A	12 ug
pSPAX2	10 ug
pMD2.G	1,5 ug
Όνομα φορέα	
pRRL.CAR19	12 ug
pSPAX2	10 ug
pMD2.G	1,5 ug

Στις επόμενες παραγράφους, περιγράφονται οι μεθοδολογίες διαμόλυνσης (transfection) που χρησιμοποιήθηκαν. Η διαμόλυνση των κυττάρων στηρίζεται στο σχηματισμό νανοσωματιδίων / συμπλόκων DNA που επιτρέπουν στο DNA να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη.

Διαμόλυνση κυττάρων με *linear PEI low molecular weight (25.000 Dalton)*

Τα μίγματα που χρησιμοποιήθηκαν στη διαμόλυνση είναι:

Solution A: Μίγμα πλασμιδίων και DMEM plain (RT) σε τελικό όγκο 500 uL

Solution B: PEI linear LMW (1mg/ml) σε όγκο 3,5x του όγκου των πλασμιδίων και plain DMEM plain σε τελικό όγκο 500 uL

- Pulse Vortex

- Προσθήκη solution B στο solution A στάγδην και vortex. Επώαση για 15 min σε RT. Αν πρέπει να προετοιμαστούν πολλές διαμολύνσεις ταυτόχρονα και παρασκευαστεί mastermix τότε η επώαση παρατείνεται στα 30min.
 - Μετά το πέρας της επώασης vortex για 10 sec και προσθήκη στο πιάτο με ήπια ανακίνηση.
 - Επώαση 6-8 ώρες στον κλίβανο CO₂ και αλλαγή θρεπτικού με 10ml φρέσκο μέσο D10.
- Στη διαμόλυνση με αυτήν την μέθοδο, εαν η διαδικασία ξεκινάει το πρωί, είναι δυνατόν η αλλαγή θρεπτικού να γίνει το απόγευμα της ίδιας μέρας.

Διαμόλυνση κυττάρων με CaPO₄

Solution A: Μίγμα πλασμιδίων και CaCl₂ 2M (60ul) και ddH₂O σε τελικό όγκο 500 uL

Solution B: Hepes Buffer Saline 2X (500uL) και Na₂HPO₄ 150mM (5.25uL)

- Κατά την παρασκευή του μίγματος διαμόλυνσης, παρασκευάζεται πρώτα το solution B και στην συνέχεια το solution A.
- Το CaCl₂ προστίθεται τελευταίο και άμεσα αναμιγνύεται στο Solution A και προστίθεται στάγδην στο Solution B υπό συνεχή περιδίνιση ή flicking.
- Το μίγμα αφήνεται να επωαστεί σε θερμοκρασία δωματίου για 12 λεπτά.
- Εφαρμόζεται pulse vortex.
- Μετά το πέρας της επώασης vortex για 10 sec και προσθήκη στο πιάτο με ήπια ανακίνηση.
- Επώαση 16 με 18 ώρες στον κλίβανο CO₂ και αλλαγή θρεπτικού με 10ml φρέσκο μέσο D10

Διαμόλυνση με λιποφεκταμίνη (lipofectamine 2000)

Solution A: Μίγμα πλασμιδίων και Plain DMEM ή Opti-MEM σε τελικό όγκο 1.5 ml

Solution B: Lipofectamine mix (90ul) και DNA σε όγκο 2.5x of lipofectamine volume και Plain DMEM ή Opti-MEM σε τελικό όγκο 1.5 ml

Η lipofectamine και το DMEM ρυθμίζονται σε θερμοκρασία δωματίου.

- Μετά την παρασκευή των διαλυμάτων solution A και solution B, προστίθεται το solution A στο Solution B.
- Pulse vortex
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά

- Pulse vortex
- Προσθήκη διαλύματος διαμόλυνσης στο πιάτο με ήπια ανακίνηση
- Επώαση 16 με 18 ώρες στον κλίβανο CO₂ και αλλαγή θρεπτικού με 10ml φρέσκο μέσο D10

2.2. Συλλογή φορέων και καθαρισμός.

Ανάλογα με τον ιϊκό φορέα μπορούν να πραγματοποιηθούν δύο ή τρεις συλλογές ιού όπως περιγράφεται παρακάτω:

LV φορείς^{46,47}

- 48 και 72 ώρες μετά την διαμόλυνση συλλέγεται το υπερκείμενο της κυτταροκαλλιέργειας και συμπληρώνεται η καλλιέργεια με 8ml φρέσκο θρεπτικό μέσο D10. Ακολουθεί επόμενη συλλογή του υπερκειμένου στον καθορισμένο χρόνο.
- Φυγοκέντρηση του υπερκειμένου 2000g για 10 min. Στο βήμα αυτό αφαιρούνται μακρομοριακά κυτταρικά θραύσματα και νεκρά κύτταρα.
- Φιλτράρισμα του υπερκειμένου με φίλτρο 0,45μm. Η μεμβράνη είναι προτιμότερο να είναι PES (poly-ethyl-sulfonate).
- Το υπερκείμενο μπορεί να αποθηκευτεί στους -80C. Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μεταγωγή ή συμπύκνωση με υπερφυγοκέντρηση.

FV φορείς^{55,56}

- 72 και 96 ώρες μετά την διαμόλυνση συλλέγεται το υπερκείμενο της κυτταροκαλλιέργειας και συμπληρώνεται η καλλιέργεια με 8ml φρέσκο θρεπτικό μέσο D10. Ακολουθεί επόμενη συλλογή του υπερκειμένου στον καθορισμένο χρόνο.
- Φυγοκέντρηση του υπερκειμένου 2000 g για 10-15min. Στο βήμα αυτό αφαιρούνται μακρομοριακά κυτταρικά θραύσματα και νεκρά κύτταρα.
- Φιλτράρισμα του υπερκειμένου με φίλτρο PES 0.45μm.
- Το υπερκείμενο μπορεί να αποθηκευτεί στους -80 °C. Για την κρυοσυντήρηση απαιτείται η προσθήκη 5% DMSO. Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα για μεταγωγή ή συμπύκνωση με υπερφυγοκέντρηση.

Συμπύκνωση με υπερφυγοκέντρηση.

- Το φιλτραρισμένο ιϊκό υπερκείμενο φυγοκεντρείται στις 27.000-28.000 rpm (70.000-80.000g) στην κεφαλή TH641 της υπερφυγοκέντρου HITACHI SORVAL SE100 DISCOVERY για 2 ώρες στους 4-12C.

- Μετά το πέρας της υπερφυγοκέντρωσης, απρρίπτεται το υπερκείμενο ταχέως και παραμένει το ίζημα που αποτελείται κατά μεγάλο μέρος από ιοσωμάτια, καθώς και άλλες πρωτεϊνικής φύσης ενώσεις.
- Στο ίζημα προστίθεται θρεπτικό μέσο, 50-80μl ανά σωληνάριο, με 2% FCS ή 2% BSA Fraction V για τις εφαρμογές όπου η παρουσία του FCS θα είχε ανασταλτική δράση για την έκβαση του πειράματος.
- Το ίζημα υπόκειται σε απόξεση και κατ' επανάληψη ανάδευση με μικροπιπέτα. Στη συνέχεια έχουμε επώαση του συγκεντρωμένου ιού σε θερμοκρασία δωματίου ή στον πάγο για μια ώρα. Αυτή η επώαση επιτρέπει την ενυδάτωση του ιζήματος, ώστε να αυξηθεί η διαλυτότητά του και να αυξηθεί η απόδοση της συγκέντρωσης των ιοσωματίων.
- Τέλος, το ίζημα υπόκειται εκ νέου σε απόξεση και κατ' επανάληψη ανάδευση με μικροπιπέτα για περίπου 30 φορές. Στην συνέχεια μπορεί να χωριστεί σε μικρότερα μέρη και να αποθηκευτεί στους -80 °C για μελλοντική χρήση. Οι συμπυκνωμένοι FV φορείς για να καταψυχθούν, χρειάζονται την παρουσία DMSO (5% v/v) (Appllichem).

2.3. Τιτλοδότηση των ιικών φορέων.

Η τιτλοδότηση των ιικών φορέων πραγματοποιείται με διάφορες μεθόδους και παρέχει πληροφορίες για την απόδοση της παραγωγής ή/και της συμπύκνωσης ενός ιικού φορέα. Ο λειτουργικός τίτλος με την χρήση γονιδίου μάρτυρα όπως η φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP παρέχει πληροφορίες για τον παραγόμενο φορέα και συγκεκριμένα για τον αριθμό των κυττάρων που μια δεδομένη ποσότητά του μπορεί να μετάνει.

Για την τιτλοδοτηση χρησιμοποιείται μία κυτταρική σειρά που μπορεί να υποστεί εύκολα μεταγωγή όπως τα HEK293T, τα HT1080 ή τα κύτταρα HeLa. Τα κύτταρα εκτίθενται στο φορέα και μετά από 72 ή 96 ώρες μετράται η έκφραση του γονιδίου μάρτυρα με κυτταρομετρία ροής (flow cytometry, FCM).

- 10⁵ κύτταρα επιστρώνονται την d-1 σε βοθρία ενός 6well plate.
- Διαφορετικές ποσότητες ιού προστίθενται στα βοθρία, σε τελικό όγκο 1ml.
- Την επόμενη ημέρα ακολουθεί αλλαγή θρεπτικού μέσου D10.
- 72 ώρες αργότερα, μετράται η έκφραση του διαγονιδίου με FCM. Για κάποιους ιικούς φορείς μπορεί να απαιτείται εξωτερική ή εσωτερική χρώση της παραγόμενης πρωτεΐνης, αν στην κασέτα έκφρασης του φορέα δεν υπάρχει γονίδιο μάρτυρα.

Μετά τη μέτρηση με FCM για τον καθορισμό του ποσοστού των κυττάρων που εκφράζουν το GFP (ή άλλο γονίδιο αναφοράς), ο υπολογισμός των μονάδων μεταγωγής (TU) /ml μπορεί να υπολογιστεί με 2 τρόπους:

- $TU/ml = \% \text{ θετικά κύτταρα } [X] \text{ τον αριθμό των κυττάρων στην αρχή της επιμόλυνσης, ως προς τον όγκο του ιού σε ml που χρησιμοποιήθηκε για την μεταγωγή.}$
- $TU/ml = \% \text{ θετικά κύτταρα } [X] \text{ τον αριθμό των κυττάρων στην αρχή της επιμόλυνσης } [X] \text{ παράγοντα αραίωσης.}$

2.4. Μεταγωγή με ιικούς φορείς

Μεταγωγή μεσεγχυματικών κυττάρων από μυελό BM-MSCs

- 4×10^4 BM-MSCs μεταγονται ταυτόχρονα με 600ul K4.X.S2 και 600 ul O4.X.MIF. Ο τίτλος πολλαπλότητας (MOI) για τον κάθε φορέα είναι 3. Οι φορείς έχουν συμπυκνωθεί με στήλες συμπύκνωσης AMICON ULTRA (Merck-Millipore).
- 24 ώρες μετά τη μεταγωγή αφαιρείται το υπερκείμενο και στα κύτταρα προστίθεται φρέσκο D10-LG. (DMEM low glucose, 10%FBS, 1% Pen/Strep).
- Τα κύτταρα καλλιεργούνται για 6-7 μέρες μετά την μεταγωγή για να εκτιμηθεί η απόδοση της μεταγωγής με FCM.

Μεταγωγή CD34+ κυττάρων.

- 5×10^4 κύτταρα μεταγονται ταυτόχρονα με 600ul K4.X.S2 και 600 ul O4.X.MIF. Ο τίτλος πολλαπλότητας για τον κάθε φορέα είναι 3. Οι φορείς έχουν συμπυκνωθεί με υπερφυγοκέντρωση. Οι φορείς έχουν μόλις υποστεί συμπύκνωση και έχουν επαναιωρηθεί σε R10 -2%FCS. Το θρεπτικό μέσο συμπληρώνεται με τις κυτοκίνες SCF, TPO και FLT3 με συγκέντρωση 50ng/ml έκαστη(Peprotech).
- 24 ώρες μετά τη μεταγωγή αφαιρείται το υπερκείμενο και στα κύτταρα προστίθεται φρέσκο StemSpan SFEM(Stemcell Technologies) ή Stemline II (Sigma) ή Stemspan II (Stemcell Technologies). Το θρεπτικό μέσο συμπληρώνεται με τις κυτοκίνες SCF, TPO και FLT3 με συγκέντρωση 50ng/ml έκαστη (Peprotech).
- Τα κύτταρα καλλιεργούνται για 5 μέρες μετά την μεταγωγή για να εκτιμηθεί η απόδοση της μεταγωγής με FCM.

Μεταγωγή ανθρώπινων ινοβλαστών

- 4×10^4 πρωτογενείς ινοβλάστες DF (dermal fibroblasts) μετάγονται ταυτόχρονα με 250ul K4.X.S2 και 250 ul O4.X.MIF σε τελικό όγκο 1ml . Ο τίτλος πολλαπλότητας για τον κάθε φορέα είναι 3. Οι φορείς έχουν συμπυκνωθεί με υπερφυγοκέντρωση.
- 24 ώρες μετά τη μεταγωγή αφαιρείται το υπερκείμενο και στα κύτταρα προστίθεται φρέσκο D10.
- Τα κύτταρα καλλιεργούνται για 6 με 7 μέρες μετά την μεταγωγή για να εκτιμηθεί η απόδοση της μεταγωγής με FCM.

Αντίστοιχο πρωτόκολλο χρησιμοποιείται και για τη μεταγωγή της κυτταρικής σειράς ανθρώπινων ινοβλαστών NuFF.

Μεταγωγή ανθρώπινων T λεμφοκυττάρων από περιφερικό ή μονάδα ΟΠΑ

Για την μεταγωγή, χρησιμοποιούνται T λεμφοκύτταρα που έχουν απομονωθεί με ανοσομαγνητικό διαχωρισμό είτε θετικό (CD3 MACS) είτε αρνητικό (Pan T cells Dynabeads). Πριν την μεταγωγή τα T ενεργοποιούνται παρουσία αντι-CD3/CD28 beads (Dynabeads) είτε TransAct (Miltenyi) αντι-CD3/CD28 ακινητοποιημένο σε πολυμερές υλικό για 2 με 3 ημέρες.

Μεταγωγή με LVCAR19

- 5×10^5 - 3×10^6 T λεμφοκύτταρα από περιφερικό αίμα ή ομάδα ΟΠΑ μετάγονται με τον φορέα LV-CAR 19 (400ul, MOI= 10-20), σε τελικό όγκο complete OpTmizer 1ml, IL-2 10ng/ml και polybrene 8μg/ml.
- 24 ώρες μετά τη μεταγωγή αφαιρείται το υπερκείμενο και στα κύτταρα προστίθεται φρέσκο D10.
- Τα κύτταρα καλλιεργούνται για 6 με 7 μέρες μετά την μεταγωγή για να εκτιμηθεί η απόδοση της μεταγωγής με FC.

Μεταγωγή με FV-CAR19

- 10^5 - 3×10^6 T λεμφοκύτταρα από περιφερικό αίμα ή από μονάδα ΟΠΑ, μετάγονται με τον φορέα FV-CAR 19 (400ul, MOI= 10-20), σε τελικό όγκο complete OpTmizer 1ml, IL-2 10ng/ml και Heparin (Leo) 0,2-0,5units/ml.
- 24 ώρες μετά τη μεταγωγή αφαιρείται το υπερκείμενο και στα κύτταρα προστίθεται φρέσκο complete OpTmizer (Gibco) 1ml, il-7 10ng/ml και il-15 10ng/ml . Η συγκέντρωση των κυττάρων δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 10^6 /ml.
- Τα κύτταρα καλλιεργούνται για 4 με 5 μέρες μετά την μεταγωγή για να εκτιμηθεί η απόδοση της μεταγωγής με FCM.

Μεταγωγή με FV-CAR19 και spin infection

Η μεταγωγή μπορεί να υποβοηθηθεί με τη φυγοκέντρωση των κυττάρων κατά τη διάρκεια της μεταγωγής σε μία διαδικασία που ονομάζεται spin infection.

- 10^5 - 3×10^6 T λεμφοκύτταρα από περιφερικό αίμα ή ομάδα ΟΠΑ μέταγονται με τον φορέα FV-CAR 19 (400ul, MOI= 10-20), σε τελικό όγκο complete OpTmizer 1ml, IL-2 10ng/ml και Heparin (Leo) 0,2-0,5units/ml.
- Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται σε πλάκα με βοθρία στα 1200g για 45min σε θερμοκρασία δωματίου.
- 24 ώρες μετά τη μεταγωγή αφαιρείται το υπερκείμενο και στα κύτταρα προστίθεται φρέσκο complete OpTmizer 1ml, IL-7 10ng/ml και IL-15 10ng/ml. Η συγκέντρωση των κυττάρων δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 10^6 /ml.
- Τα κύτταρα καλλιεργούνται για 4 με 5 μέρες μετά την μεταγωγή για να εκτιμηθεί η απόδοση της μεταγωγής με FCM.

2.5. Κυτταροκαλλιέργειες

HEK293T (ECAAC), Lenti-X293T(Takara Bio), HT1080 και HeLa: Οι συνθήκες καλλιέργειας για αυτές τις κυτταρικές είναι ίδιες. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε D10 και επιστρώνονται σε συγκέντρωση $2-3 \times 10^6$ /T75 φλάσκα. Ανά 2 ημέρες ανακαλλιεργούνται μετά από αποκόλληση από το υπόστρωμα με διάλυμα τρυψίνης-0,1 mM EDTA και $2-3 \times 10^6$ κύτταρα επιστρώνονται εκ νέου. Τα κύτταρα διατηρούνται σε καλλιέργεια έως το passage 20.

NuFF: Η κυτταρική σειρά NuFF καλλιεργείται σε μέσο D10. Τα κύτταρα επιστρώνονται σε συγκέντρωση 10^6 / T75 φλάσκα. Ανά 3-4 ημέρες ανακαλλιεργούνται μετά από αποκόλληση από το υπόστρωμα με διάλυμα τρυψίνης-0,1mM EDTA και 10^6 κύτταρα επιστρώνονται εκ νέου. Τα κύτταρα διατηρούνται σε καλλιέργεια έως το passage 12.

Dermal Fibroblast Human (DF): Η κυτταρική σειρά DF, προέρχεται από πρωτογενείς ινοβλάστες και καλλιεργείται σε μέσο D10. Τα κύτταρα επιστρώνονται σε συγκέντρωση 10^6 /T75 φλάσκα. Ανά 3 ημέρες ανακαλλιεργούνται μετά από αποκόλληση από το υπόστρωμα με διάλυμα τρυψίνης-0,1 mM EDTA και 10^6 κύτταρα επιστρώνονται εκ νέου. Τα κύτταρα διατηρούνται σε καλλιέργεια έως το passage 6.

BM-MSCs και CB-MSCs

Απομόνωση Μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων του μυελού (BM-MSCs)

- Ηπαρινισμένο υλικό προερχόμενο από οστεομυελική παρακέντηση αραιώνεται με 2 όγκους DPBS και επιστοιβάζεται σε φικόλη 1,077 g/ml (Sigma) σε αναλογία 3:1.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 400g χωρίς φρένο σε θερμοκρασία δωματίου για μισή ώρα σε φυγόκεντρο με κεφαλή swing-out.
- Απομονώνεται η στοιβάδα των λευκών αιμοσφαιρίων και στην συνέχεια ακολουθούν 3 πλύσεις με DPBS στα 300g σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, ώστε να απομακρυνθούν τα αιμοπετάλια και η φικόλη.
- Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε συγκέντρωση $5-10 \times 10^6$ /ml D10-LG και επιστρώνονται σε κατάλληλο καλλιεργητικό υπόστρωμα με πυκνότητα 10^6 /cm². Μετά το πέρας 48 ωρών αντικαθίσταται το καλλιεργητικό μέσο με φρέσκο έως ότου τα κύτταρα να φτάσουν σε κάλυψη (confluence) 70-80%. Το passage των κυττάρων στο στάδιο αυτό θεωρείται κατά συνθήκη 0.

Καλλιέργεια BM-MSCs και CB-MSCs

Τα CB-MSCs παραχωρούνται από την Τράπεζα ΟΠΑ του ΙΙΒΕΑΑ και είναι σε passage 2-3. Τα BM-MSCs προέρχονται από αναρροφήσεις μυελού των οστών ασθενών με αιματολογικά νοσήματα στα οποία ο ΜΟ δεν είναι διηθημένος από νόσο. Τα κύτταρα επιστρώνονται σε συγκέντρωση 3.000-4.000/cm² και ανάλογα με τον ρυθμό έκπτυξης απαιτούν ανακαλλιέργεια μια με δύο φορές την εβδομάδα. Το θρεπτικό αντικαθίσταται με φρέσκο κάθε 3 μέρες. Τα κύτταρα συντηρούνται έως το passage 6.

Απομόνωση και καλλιέργεια CB CD34+ κυττάρων.

Απομόνωση CD34+ κυττάρων με ανοσομαγνητικό διαχωρισμό από μονάδες ΟΠΑ.

- Αίμα προερχόμενο από μονάδες ΟΠΑ που είναι ακατάλληλες για μεταμόσχευση λόγω ελλιπούς βάρους ή και κυτταροπενίας αραιώνεται 1:1 με DPBS.
- Το αίμα επιστοιβάζεται σε φικόλη σε αναλογία 3:1 αίμα:φικόλη vol/vol.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 400g χωρίς φρένο σε θερμοκρασία δωματίου για μισή ώρα σε φυγόκεντρο με κεφαλή swing-out.
- Απομονώνεται η στοιβάδα των λευκών αιμοσφαιρίων και στην συνέχεια ακολουθούν τις πλύσεις με DPBS στα 300g σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, ώστε να απομακρυνθούν τα αιμοπετάλια και η φικόλη. Η τελευταία πλύση γίνεται στο ίδιο σωληνάριο τύπου Falcon 50ml.

- Το ίζημα των λευκών αιμοσφαιρίων που προκύπτει υπόκειται σε λύση των ερυθρών σε 10 ml RBC Lysis buffer.
- Το εναίωρημα επάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά στους 4C. Προστίθεται 1ml ορού FCS και 20 ml DPBS ώστε να επανέλθει η ωσμωτική πίεση σε φυσιολογικό επίπεδο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 300g για 10 λεπτά.
- Το ίζημα των λευκών επαναιωρείται σε 200μl MACS buffer/isolation buffer. Στην συνέχεια τα κύτταρα καταμετρούνται με διάλυμα TrypanBlue σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.

Μια μονάδα ΟΠΑ ~60g δίνει από 10^8 - 3×10^8 λευκά.

Καλλιέργεια AAK CD34+ κυττάρων

Τα AAK CD34+ καλλιεργούνται σε πλήρες θρεπτικό μέσο StemSpan SFEM ή StemLine II ή StemSpan II σε συγκέντρωση $0,5-1 \times 10^6$ CD34+ /ml παρουσία SCF, THPO και FLT3 50ng/ml έκαστο. Η καλλιέργεια μπορεί να διατηρηθεί ως 10 μέρες. Εναλλακτικά, τα AAK CD34+ καλλιεργούνται σε πλήρες θρεπτικό μέσο StemSpan SFEM ή StemLine II ή StemSpan II σε συγκέντρωση $0,5-1 \times 10^6$ CD34+ /ml παρουσία SCF, THPO και FLT3 50ng/ml έκαστο, il3 και il6 20ng/ml εκάστη. Η καλλιέργεια μπορεί να διατηρηθεί ως 10 μέρες. Η εναλλακτική συνθήκη καλλιέργειας προωθεί την ταχεία έκπτυξη των CD34+ κυττάρων, αλλά ευνοεί και την διαφοροποίησή τους.

Απομόνωση και καλλιέργεια PB- και CB-T λεμφοκυττάρων

Το πρωτόκολλο αφορά τη μη-ειδική απομόνωση και καλλιέργεια ανθρώπινων T λεμφοκυττάρων προερχόμενα από περιφερικό αίμα (PB) υγιών δοτών και από μονάδες ΟΠΑ προς απόρριψη (CB). Η απομόνωση των T λεμφοκυττάρων είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί ειδικά μέσω ανοσομαγνητικού διαχωρισμού ή μη ειδικά μέσω διέγερσης των T με μαγνητικά σφαιρίδια ή πολυμερούς που περιέχει αντισώματα που δεσμεύουν και ενεργοποιούν το μόριο CD3 και το μόριο CD28 στην μεμβράνη των κυττάρων αυτών. Τα αντι-CD3/CD28 σφαιρίδια ή πολυμερές μιμείται την φυσική διέγερση των T λεμφοκυττάρων από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα.

Μη ειδική απομόνωση T λεμφοκυττάρων με το kit Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 for T Cell Expansion and Activation (Invitrogen)

10^7 PBMCs/CBMCs επαναιωρούνται σε 5ml θρεπτικό μέσο (R10 ή Optmizer-2 ή 7/15) και προστίθενται 125μl μαγνητικά σφαιρίδια Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 for T Cell Expansion and Activation (η προετοιμασία των σφαιριδίων γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες

του κατασκευαστή). Τα κύτταρα επωάζονται για 2-4 ημέρες με τα σφαιρίδια. Τα κύτταρα συλλέγονται σε σωληνάρια Eppendorf χωρητικότητας 2ml και τοποθετούνται στον μαγνήτη Dynal-2. Μετά από 2 λεπτά αφαιρείται το υπερκείμενο που περιέχει τα ενεργοποιημένα T και στην συνέχεια ακολουθούν 2 πλύσεις με 1ml isolation buffer για να απομονωθούν όλα τα T κύτταρα. Τα κύτταρα μετρούνται σε αιμοκυτταρόμετρο με TrypanBlue.

Μη ειδική απομόνωση T λεμφοκυττάρων με το kit T Cell TransAct human (Miltenyi, FDR)

10^7 PBMCs/CBMCs επαναιωρούνται σε 5ml θρεπτικό μέσο (R10: Rpmi, 10%FBS ή Optimizer-2 και hIL7/15 Peprotech) και προστίθενται 50ul πολυμερούς T Cell TransAct human (Miltenyi, FDR). Μετά από 48 ώρες τα κύτταρα υπόκεινται σε 2 πλύσεις με 10 ml R10 ή DPBS ώστε να απομακρυνθεί το πολυμερές. Τα κύτταρα μετρούνται σε αιμοκυτταρόμετρο με Trypan Blue.

Καλλιέργεια T-λεμφοκυττάρων

Ανάλογα με τον χειρισμό τα T λεμφοκύτταρα μπορούν να καλλιεργηθούν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και διαφορετικά θρεπτικά μέσα με διαφορετικών ειδών κυτταροκίνες.

Ενεργοποίηση T λεμφοκυττάρων

Τα T χωρίς ενεργοποίηση/διέγερση μεγαλώνουν αργά και συνήθως αποπίπτουν/ ή υπόκεινται σε κυτταρικό θάνατο. Η διέγερση γίνεται με αντισώματα ενάντια στα μόρια επιφανείας CD3 και CD28 τα οποία μιμούνται την φυσιολογική διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης. Η έκθεση των T στα αντισώματα αυτά μπορεί να γίνει είτε με προσρόφηση των αντισωμάτων στο υπόστρωμα κυτταροκαλλιέργειας είτε με φυσική ακινητοποίηση των αντισωμάτων σε μαγνητικά σφαιρίδια ή πολυμερές ικρίωμα.

Ενεργοποίηση T λεμφοκυττάρων με το kit Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 for T Cell Expansion and Activation (Invitrogen)

5×10^6 T επαναιωρούνται σε 5ml θρεπτικό μέσο (R10 ή Optimizer-2 ή 7/15) και προστίθενται 125μl μαγνητικά σφαιρίδια Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 for T Cell Expansion and Activation (η προετοιμασία των σφαιριδίων γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή). Τα κύτταρα επωάζονται για 2-4 ημέρες με τα σφαιρίδια. Τα κύτταρα συλλέγονται σε σωληνάρια Eppendorf χωρητικότητας 2ml και τοποθετούνται στον μαγνήτη Dynal-2. Μετά από 2 λεπτά αφαιρείται το υπερκείμενο που περιέχει τα ενεργοποιημένα T και στην συνέχεια ακολουθούν 2 πλύσεις με 1ml isolation buffer για να απομονωθούν όλα τα T κύτταρα.

Ενεργοποίηση T λεμφοκυττάρων με το kit T Cell TransAct human (Miltenyi, FDR).

5X10⁶ PBMCs/CBMCs επαναεισφέρονται σε 5ml θρεπτικό μέσο (R10 ή Optmizer-2 ή 7/15) και προστίθενται 50ul πολυμερούς T Cell TransAct human, Miltenyi. Μετά από 48 ώρες τα κύτταρα υπόκεινται σε 2 πλύσεις με 10 ml R10 ή DPBS ώστε να απομακρυνθεί το πολυμερές.

Καλλιέργεια T λεμφοκυττάρων σε R10.

Τα T λεμφοκύτταρα καλλιεργούνται σε μέσον R10 παρουσία 5-10ng/ml IL-2. Η καλλιέργεια αυτή μπορεί να υποστηρίξει χαμηλές συγκεντρώσεις κυττάρων έως 10⁶ T/ml.

Καλλιέργεια T λεμφοκυττάρων σε OpTmizer

Τα T λεμφοκύτταρα καλλιεργούνται σε μέσον OpTmizer παρουσία 5-10ng/ml IL-2 ή 10ng/ml IL-7 και 10ng/ml IL15. Η καλλιέργεια αυτή μπορεί να υποστηρίξει υψηλές συγκεντρώσεις κυττάρων έως 2X10⁶ T/ml. Το συγκεκριμένο θρεπτικό ευνοεί την έκπτυξη των T λεμφοκυττάρων περισσότερο σε σχέση με το R10. Ανεξαρτήτως θρεπτικού μέσου τα κύτταρα ελέγχονται μικροσκοπικά και μακροσκοπικά ημερησίως για τυχόν αναγκαιότητα αλλαγής ή συμπλήρωσης θρεπτικού μέσου, ώστε να μην παραμείνουν τα κύτταρα σε υψηλότερη από την βέλτιστη συγκέντρωση.

Μιτωτική απενεργοποίηση με Mitomycin C

Μιτωτική απενεργοποίηση κυττάρων NuFF.

Τα κύτταρα δεν πρέπει να υπερβαίνουν το passage 16 ώστε να αποτελούν βέλτιστο τροφικό υπόστρωμα. Μια φιάσκα 75cm² με πληρότητα 70-80% (~4,5X10⁶) επωάζεται με 10ml D10 + 60μg/ml MitC για μια ώρα στην συνέχεια τα κύτταρα ξεπλένονται τρεις φορές με PBS. Στη συνέχεια αποκολλώνται με τρυψίνη και ακολουθούν άλλες 2 εκπλύσεις και τα κύτταρα καταμετρώνται σε αιμοκυτταρόμετρο παρουσία Trypan Blue. Τα κύτταρα επιστρώνονται σε πιάτα επιστρωμένα με 1% gelatin (Sigma / Merck -Millipore) σε πυκνότητα 12000/cm².

Μιτωτική απενεργοποίηση κυττάρων SNL.

Τα κύτταρα SNL είναι κυτταρική σειρά επίμυος και είναι γενετικά τροποποιημένα για να εκφράζουν LIF. Ο παράγοντας αυτός είναι απαραίτητος για τον επαναπρογραμματισμό των κυττάρων επίμυος αλλά φαίνεται να μην επηρεάζει την παραγωγή ανθρώπινων iPS. Τα κύτταρα αυτά μπορούν να υποκαταστήσουν την χρήση των πρωτογενών εμβρυονικών ινοβλαστών επίμυος MEFs και των οποίων η παραγωγή είναι πιο χρονοβόρα και προϋποθέτει την θανάτωση εμβρύων.

Τα κύτταρα δεν πρέπει να υπερβαίνουν το passage 16 ώστε να αποτελούν βέλτιστο τροφικό υπόστρωμα. Μια φιάσκα 75cm² με πληρότητα 70-80% (~6X10⁶) επωάζεται με 10ml D10 + 100μg/ml MitC για μια ώρα στην συνέχεια τα κύτταρα ξεπλένονται τρεις φορές με PBS.

Στην συνέχεια αποκολλώνται με τρυψίνη και ακολουθούν άλλες 2 πλύσεις και τα κύτταρα καταμετρώνται σε αιμοκυτταρόμετρο παρουσία Trypan Blue. Τα κύτταρα επιστρώνονται σε πιάτα επιστρωμένα με 1% gelatin (Sigma / Merck -Millipore) σε πυκνότητα 12000/cm².

Μιτωτική απενεργοποίηση κυττάρων Raji.

5X10⁶ κύτταρα Raji στην εκθετική φάση της καλλιέργειας επαναιωρούνται σε θρεπτικό μέσον R10 παρουσία 50μg/ml MitC. Τα κύτταρα επωάζονται για για μια ώρα και στην συνέχεια ξεπλένονται τέσσερις φορές με PBS. Τέλος τα κύτταρα καταμετρώνται σε αιμοκυτταρόμετρο παρουσία Trypan Blue.

2.6. Ανοσομαγνητικοί Διαχωρισμοί

Η τεχνολογία αφορά την εκλεκτική απομάκρυνση ή επιλογή κυττάρων βάσει των αντιγόνων επιφάνειας που σημαίνονται με αντισώματα που είναι συνδεδεμένα με μαγνητικά σωματίδια. Η επιλογή γίνεται μετά από πέρασμα σε ισχυρό μαγνητικό πεδίο.

Ανοσομαγνητικός διαχωρισμός θετικής επιλογής CD34+ κυττάρων με χρήση CD34 MicroBead Kit (Miltenyi, FDR).

Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή με χρήση MS ή LS κολώνων. Εάν ο συνολικός αριθμός κυττάρων δεν ξεπερνά τα 2X10⁸ κύτταρα χρησιμοποιούνται οι MS κολώνες. Αν ο συνολικός αριθμός κυττάρων είναι 2X10⁸-2X10⁹, χρησιμοποιούνται οι LS κολώνες. Το πρωτόκολλο που περιγράφεται αφορά 10⁸ κύτταρα, ωστόσο αν ο αριθμός είναι μεγαλύτερος οι ποσότητες μπορούν να τροποποιηθούν αναλόγως.

- 10⁸ λευκά αιμοσφαίρια επαναιωρούνται σε 300ul MACS buffer. Προσθήκη 100μl FCR block και ανάμιξη. Προσθήκη 100μl CD34 Microbeads και ανάμιξη. Επώαση των κυττάρων στο ψυγείο για 30 λεπτά. Ακολουθεί ξέπλυμα με 10ml MACS buffer και φυγοκέντρηση 300g για 10 λεπτά.
- Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 500μl MACS buffer.
- Η κολώνα MS φορτώνεται στο μαγνήτη MiniMacs και όλη η συσκευή στη μεταλλική πλάτη. Ακολουθεί έκπλυση κολώνας MS με 0,5ml MACS buffer. Φορτώνεται το κυτταρικό εναιώρημα (500μl) στο θάλαμο της κολώνας και αφήνεται να τρέξει με την βαρύτητα. Μόλις σταματήσει η ροή από το ακροφύσιο της κολώνας και ο θάλαμός της έχει αδειάσει από υγρό ακολουθούν άλλες 3 πλύσεις. Κάθε πλύση γίνεται με 500μl MACS buffer όπως περιεγράφηκε προηγουμένως.

- Η κολώνα με τα δεσμευμένα κύτταρα μεταφέρεται σε σωληνάριο Falcon 15ml προστίθεται 1ml MACS buffer και με το έμβολο ταχέως απομακρύνονται τα κύτταρα από την στήλη.
- Τα κύτταρα μετρώνται με αιμοκυτταρόμετρο παρουσία Trypan blue.

Ανοσομαγνητικός διαχωρισμός θετικής επιλογής CD34+ κυττάρων με χρήση EasySep™ Human CD34 Positive Selection Kit II (StemCell Technologies, BC, Canada)

Το πρωτόκολλο που περιγράφεται αφορά 10^8 κύτταρα, ωστόσο αν ο αριθμός είναι μεγαλύτερος οι ποσότητες μπορούν να τροποποιηθούν αναλόγως.

- 10^8 λευκά αιμοσφαίρια επαναιωρούνται σε 1ml Isolation buffer.
- Προστίθενται 100μl selection cocktail και ακολουθεί ανάμιξη.
- Επώαση των κυττάρων για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Περιδίνιση των RapidSpheres για 30sec και προσθήκη 100μl RapidSpheres στο διάλυμα κυττάρων αντισώματος και ήπια ανάδευση με πιπέτα.
- Επώαση 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη 1.5ml isolation buffer και ήπια ανάδευση με πιπέτα.
- Μεταφορά σε σωληνάρια τύπου RIA στον μαγνήτη EasySep ή μεταφορά του κυτταρικού μίγματος σε 2 σωληνάρια Eppendorf χωρητικότητας 2ml και μεταφορά στον μαγνήτη Dynal-2.
- Επώαση για 3 λεπτά στο μαγνητικό πεδίο. Απόρριψη υπερκειμένου.
- Προσθήκη 1,5ml Isolation buffer σε κάθε σωληνάριο, αφαίρεση από τον μαγνητικό πεδίο και επαναιώρηση με πιπέτα.
- Επαναφορά σωληναρίων στο μαγνητικό πεδίο και επώαση για 3 λεπτά. Η πλύση αυτή επαναλαμβάνεται για 4 φορές ακόμα.

Μετά την τελευταία πλύση τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 1ml isolation buffer και μεταφέρονται σε Falcon χωρητικότητας 15ml. Τα κύτταρα μετρώνται με αιμοκυτταρόμετρο παρουσία Trypan blue.

Ανοσομαγνητικός διαχωρισμός θετικής επιλογής PB- και CB-T λεμφοκυττάρων με το kit CD3 MicroBeads, human (Miltenyi, FDR)

Το πρωτόκολλο που περιγράφεται αφορά 10^7 κύτταρα, ωστόσο αν ο αριθμός είναι μεγαλύτερος οι ποσότητες μπορούν να τροποποιηθούν αναλόγως και να συνδυαστεί η απομόνωση με τις στήλες LS.

- 10^7 λευκά αιμοσφαίρια επαναιωρούνται σε 0,08ml Isolation buffer. Προστίθενται 20μl CD3 MicroBeads και ακολουθεί ανάμιξη.
- Επώαση των κυττάρων για 15 λεπτά στους 4 °C (ψυγείο).
- Προσθήκη 2ml MACS buffer και φυγοκέντρωση 300g για 10 λεπτά.
- Πλήρης αφαίρεση υπερκειμένου και επαναιώρηση σε 500μl MACS buffer.
- Εφαρμογή της κολώνας MACS MS στον μαγνήτη mini-MACS. Έκπλυση της κολώνας MS με 500μl MACS buffer. Η κολώνα αφήνεται να αδειάσει υπό την δράση της βαρύτητας όταν ο θάλαμος είναι κενός προστίθεται όλο το κυτταρικό εναιώρημα από το προηγούμενο βήμα.
- Η κολώνα αφήνεται να αδειάσει υπό την δράση της βαρύτητας έως ότου ο θάλαμος είναι κενός.
- Πραγματοποιούνται τρεις πλύσεις με 500μl MACS buffer εκάστη. Η προσθήκη νέου buffer γίνεται μόλις ο θάλαμος της κολώνας έχει αδειάσει.
- Μετά το πέρας της τρίτης πλύσης η κολώνα αφαιρείται από τον μαγνήτη και μεταφέρεται σε σωληνάριο τύπου Falcon 15ml. Προστίθεται 1ml MACS buffer στο θάλαμο και μετά ταχέως και με μια κίνηση προσαρμόζεται το έμβολο και απομακρύνονται τα κύτταρα ταχέως.
- Τα κύτταρα μετρώνται με αιμοκυτταρόμετρο παρουσία Trypan blue.

Ανοσομαγνητικός διαχωρισμός αρνητικής επιλογής PB- και CB- T λεμφοκυττάρων με το Dynabeads Untouched Human T Cells kit

Το πρωτόκολλο που περιγράφεται αφορά 5×10^7 λευκοκύτταρα, ωστόσο αν ο αριθμός είναι μεγαλύτερος οι ποσότητες μπορούν να τροποποιηθούν αναλόγως.

- 5×10^7 λευκοκύτταρα επαναιωρούνται σε 500μl Isolation Buffer.
- Προστίθενται 100ul FCS και ακολουθεί ανάμιξη.
- Ακολουθεί προσθήκη 100ul Antibody mix (περιέχονται αντισώματα για όλα τα αντιγόνα που εκφράζονται στην επιφάνεια των B, NK, μακροφάγων και λοιπών λευκών αιμοσφαιρίων πλην του υποπληθυσμού των T λεμφοκυττάρων).
- Ακολουθεί επώαση 20min στο ψυγείο (2-8 °C).
- Τα κύτταρα ξεπλένονται με 4ml Isolation buffer, ανάδευση και φυγοκέντρωση στα 350g για 8min στους 4 °C.

- Αφαιρείται το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε Isolation Buffer. Στο στάδιο αυτό τα κύτταρα διαχωρίζονται σε 2 erpendorf χωρητικότητας 2ml. Προστίθενται στο κάθε φιαλίδιο 250 µl Dynabeads, τα οποία προέρχονται από πλύση σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Το μίγμα κυττάρων -beads τοποθετείται σε «μπλαρίνα» ρυθμισμένη στα 10rpm για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά την επώαση προστίθεται 1.5ml Isolation buffer/ φιαλίδιο και το περιεχόμενο αναδεύεται με πιπέτα 10 φορές.
- Τα φιαλίδια τοποθετούνται σε μαγνητικό πεδίο-Dynamag-2 για 2 λεπτά. Μετά την επώαση το υπερκείμενο συλλέγεται σε σωληνάριο που περιέχει τα «παρθένα» T λεμφοκύτταρα.
- Τα σφαιρίδια εκπλύνονται εκ νέου με 2ml Isolation buffer και επαναιωρούνται με ανάμιξη με πιπέτα για 10 φορές και επάζονται εντός μαγνητικού πεδίου για 2 λεπτά. Με το πέρας της επώασης συλλέγεται το υπερκείμενο στο ίδιο σωληνάριο falcon όπως περιγράφεται παραπάνω.

Τα κύτταρα καταμετρώνται με αιμοκυτταρόμετρο παρουσία Trypan blue.

Ανάπτυξη CAR T κυττάρων με κυτταροτοξική δράση ενάντια σε κύτταρα που εκφράζουν το επιφανειακό μόριο CD19.

Η παραγωγή anti-CD19 CAR T γίνεται με μεταγωγή με LV ή FV φορείς. Η παραγωγή των ιικών φορέων περιγράφεται ενδελεχώς στο 3.1 για την παραγωγή των υπερκειμένων προτιμάται διαμόλυνση με PEI ή Lipofectamine 2000 καθώς παράγει φορείς με πολύ υψηλή και ικανή συγκέντρωση για εφαρμογές γονιδιακής θεραπείας. Επιπλέον τα αντιδραστήρια αυτά μπορούν να παραχθούν με προδιαγραφή για GMP ή c-GMP. Οι φορείς υπόκεινται σε συμπύκνωση με υπερφυγοκέντρωση. Σε προηγούμενο εδάφιο περιγράφεται η διαδικασία ιικής μεταγωγής των T λεμφοκυττάρων με τους δύο φορείς : τον LV.CAR19 και τον FV.CAR19. Τα κύτταρα μετά την μεταγωγή ξεπλένονται και συντηρούνται σε OpTmizer 7/15. Σε συγκέντρωση 10^6 CAR19 T /ml. Οι κυτταροκίνες αναπληρώνονται ανά 2 μέρες. Όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε εκθετική φάση τότε διαμοιράζονται σε βοθρία 12well πιάτου σε αναλογία 1:2 με βέλτιστη συγκέντρωση $1-4 \times 10^6$ ανά βοθρίο. Η καλλιέργεια διαρκεί 10 -14 μέρες. Όταν παρατηρηθεί τα T να γίνουν αεργικά τότε αυτά ενεργοποιούνται εκ νέου με T

Cell TransAct human σε συγκέντρωση 1:100 δηλαδή για 1ml κυτταρικού εναιωρήματος προστίθενται 10μl αντιδραστηρίου και τα κύτταρα καλλιεργούνται για 48 ώρες. Στην συνέχεια ξεπλένονται και προστίθεται φρέσκο θρεπτικό μέσο.

Σε περιπτώσεις που το ποσοστό μεταγωγής είναι χαμηλό τότε τα κύτταρα πρέπει είτε να καθαριστούν με κυτταρομετρικό διαχωρισμό (FACS) είτε ο πληθυσμός των CAR T μπορεί να υποστεί κλωνική έκπτυξη με συγκαλλιέργεια των κυττάρων με μιτωτικά αδρανή κύτταρα που υπερεκφράζουν στην μεμβράνη τους το μόριο CD19, όπως η κυτταρική σειρά λεμφώματος Burkitt Raji.

Πρωτόκολλο κλωνικής έκπτυξης CAR19 CAR T κυττάρων

Σε 5ml θρεπτικό OpTmizer 7/15 προστίθενται 10^6 CART και 5×10^6 μιτωτικά αδρανή Raji (αναλογία 1:5 CAR19T προς Raji) για 7 μέρες. Συνήθως αυτό το βήμα εμπλουτισμού μπορεί να αυξήσει την αναλογία του πληθυσμού σε πάνω από 50% CAR19+ T κύτταρα.

2.7 Δοκιμασίες Κυτταροτοξικότητας με Κυτταρομετρία Ροής.

Υπάρχουν διακριτοί τρόποι μέτρησης της κυτταροτοξικής δράσης από κυτταροτοξικά κύτταρα. Εν συντομία ο κλασικός τρόπος περιλαμβάνει την σήμανση των κυττάρων στόχων με ραδιενεργό χρώμιο ^{51}Cr , την συγκαλλιέργεια με τα δραστικά κύτταρα και την μέτρηση του απελευθερωμένου ραδιενεργού χρωμίου στο υπερκείμενο της συγκαλλιέργειας σαν συνέπεια της κυτταροτοξικής δράσης και της λύσης των κυττάρων στόχων. Εναλλακτικά, μπορεί να μετρηθεί η απελευθέρωση της LDH ως έμμεσος μάρτυρας κυτταρικού θανάτου ή και η απελευθέρωση της χρωστικής calcein-AM με την οποία σημαίνονται τα κύτταρα στόχοι. Στην παρούσα μελέτη, εφαρμόστηκε ένα πρωτόκολλο μέτρησης κυτταροτοξικής δράσης με κυτταρομετρία ροής. Στην εφαρμογή αυτή τα κύτταρα στόχοι σημαίνονται με CFSE ή με το αντιδραστήριο CellTrace CFSE ή Violet (Invitrogen).

Χρώση κυττάρων στόχων Raji με CFSE.

- 3- 5×10^6 Raji ξεπλένονται με PBS και επαναιωρούνται σε 1ml PBS.
- Προσθήκη 1μl CFSE(Invitrogen) stock 1mM ή 500μM
- Επώαση στο σκοτάδι στους 37°C για 20min
- Προσθήκη 100μl FCS και 9ml D10 ή R10. Ανάδευση και επώαση για 10 min στον κλίβανο.
- Φυγοκέντρηση στα 1200 rpm για 8 min.
- Επαναιώρηση των κυττάρων σε 500ul R10 ή R10 χωρίς phenol Red.

- Μέτρηση των κυττάρων και επαναιώρηση σε τελική συγκέντρωση 3×10^6 Raji/ml

Μέτρηση CAR19 T κυττάρων και μη-μετηγμένων T λεμφοκυττάρων που χρησιμοποιούνται σαν δείγμα ελέγχου. Τα T λεμφοκύτταρα και τα CAR T μεγαλώνουν παράλληλα και πρέπει να βρίσκονται στην ίδια φάση όσον αφορά την ενεργοποίησή τους. Επαναιωρούνται σε μέσο R10 σε συγκέντρωση 10×10^6 κύτταρα/ml.

Σε πιάτο με 96 βοθρία με κοίλο πυθμένα (u-bottom 96well plate) προστίθενται 50 µl R10 θρεπτικό μέσον. Προσθήκη 100ul Raji CFSE και ανάλογα με το πείραμα η αντίστοιχη ποσότητα με CAR T/ T λεμφοκύτταρα, ώστε να προκύψουν οι λόγοι 10:1, 5:1, 3:1 και 1:1 T λεμφοκύτταρα/ κύτταρα Raji. Πιο συγκεκριμένα προστίθενται 30 µl , 15µl , 9µl και 3µl αντίστοιχα. Επιπλέον μετά την ολοκλήρωση των διαφορετικών συνθηκών συγκαλλιέργειας προστίθεται 100ul ή 200ul θρεπτικού μέσου R10. Τα κύτταρα μπορούν να φυγοκεντρηθούν στα 200g για 5 λεπτά ώστε να καθιζάνουν. Η επώαση διαρκεί από 4 έως 18 ώρες ανάλογα με την ισχύ του CAR υποδοχέα και ο χρόνος αυτός προκύπτει εμπειρικά. Επιπλέον σε ένα βοθρίο σε 200ul θρεπτικό μέσο προστίθενται 100ul Raji τα οποία αποτελούν το αρνητικό δείγμα ελέγχου.

Μετά το πέρας της επώασης ανάλογα με τον τύπο του θρεπτικού μέσου τα κύτταρα είτε ξεπλένονται με PBS ή ακολουθεί απευθείας η προσθήκη 7AAD και επώαση στο ψυγείο για 5 λεπτά και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Για να μπορέσει να καταστεί δυνατή η απευθείας προσθήκη του 7AAD θα πρέπει το θρεπτικό να μην έχει τον δείκτη pH phenol Red.

Στρατηγική ανάλυσης

- Τα κύτταρα αναλύονται με την εξής προσέγγιση:
- GATE total cells FS/SS → GATE CFSE+ → DOT PLOT CFSE/7AAD
- Τα διπλά θετικά CFSE+ 7AAD+ αποτελούν τα νεκρά Raji

Μέτρηση παραγωγής Ιντερφερόνης-γ (IFN-γ) ως δείκτης ενεργοποίησης των CAR T κυττάρων.

Η παραγωγή IFN-γ, IL-2 και άλλων κυτταροκινών αποτελούν έμμεσους δείκτες της ενεργοποίησης των CAR T κυττάρων λόγω της αναγνώρισης του μορίου επιφανείας στα κύτταρα στόχου από τον CAR υποδοχέα.

2×10^5 κύτταρα στόχοι Raji συνεπιάζονται για 24 ώρες με 2×10^5 anti-CD19 CAR T κύτταρα σε 48well plate σε 500ul θρεπτικού R10 (αναλογία CAR-T: Raji 1:1). Συλλέγεται το

υπερκείμενο και ποσοτικοποιείται η παραγωγή IFN- γ με το kit Human IFN- γ Mini TMB ELISA Development Kit (Peprotech, Madison USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιείται το βελτιστοποιημένο TMB από την Merck-Millipore.

2.8 Επαναπρογραμματισμός ανθρώπινων κυττάρων με την χρήση φορέων FV για την παραγωγή επαγόμενων βλαστοκυττάρων – iPSC.

Επαναπρογραμματισμός ανθρώπινων κυττάρων σε τροφικό στρώμα κυττάρων

- Ημέρα 1

Την ημέρα της μεταγωγής 5×10^4 BM-MSCs/ NuFF ή DF υπόκεινται σε μεταγωγή με συμπυκνωμένα ιικά υπερκείμενα FV DF.O4.x.M.IF και DF.K.x.S όπως περιγράφεται στο 3.4.1-3.4.3. Την επόμενη ημέρα τα κύτταρα ξεπλένονται 2 φορές με PBS και καλλιεργούνται περαιτέρω για 5 μέρες στο κλασσικό θρεπτικό μέσο.

- Ημέρα 6 ή 8

Προετοιμασία τροφικού στρώματος όπως περιγράφεται στο 3.5.10

- Ημέρα 7 ή 9

Τα κύτταρα αποκολλώνται με Τρυψίνη 1X καταμετρώνται στο αιμοκυτταρόμετρο και τοποθετούνται σε καλλιέργεια παρουσία ή απουσία τροφικού στρώματος.

Παρουσία τροφικού στρώματος: 20000 μετηγμένα κύτταρα προστίθενται σε συγκαλλιέργεια σε 2ml θρεπτικό D10.

- Ημέρα 8 ή 10

Μετά από 24 ώρες το θρεπτικό αντικαθίσταται από μέσον επαναπρογραμματισμού **F12-KOSR**: DMEM/F12-KOSR20%(Gibco), 1% Sodium pyruvate(Gibco), 1% non-essential aminoacids(Gibco), 2mM glutamax(Gibco), 50 μ M β -mercaptoethanol (Gibco), 10ng/ml bFGF (Peprotech), 100 μ g/ml sodium ascorbate (Sigma), 200 μ M sodium butyrate (Sigma). Η αλλαγή του θρεπτικού γίνεται κάθε μέρα

- Ημέρα 30- 50

Τα κύτταρα ελέγχονται καθημερινά στο μικροσκόπιο για την εμφάνιση αποικιών IPS.

Στο στάδιο αυτό αν εμφανιστούν αποικίες με την τυπική μορφολογία ES κυττάρων, δηλαδή μεγάλο λόγο πυρήνα προς κυτταρόπλασμα, μικρού μεγέθους κύτταρα που σχηματίζουν αποικίες με μεγάλη συνοχή και ευκρινή όρια και οι οποίες διαθέτουν «υψος» στο κέντρο τους, τότε πρέπει να αποκολληθούν και να ανακαλλιεργηθούν.

Μέθοδος μηχανικής αποκόλλησης-1

Με χρήση ακροφυσίου πιπέτας όγκου 200μl με μεγάλο διαμέτρημα ακροφυσίου η αποικία χαράσσεται με διαγώνιες γραμμές ώστε να προκύψουν ρόμβοι με μέγεθος περίπου 250 κυττάρων. Στην συνέχεια τα τμήματα αυτά αποκολλώνται με προώθηση του ακροφυσίου και αναρρόφηση και τοποθετούνται σε μικρότερης διαμέτρου καλλιεργητικά δοχεία 12-well ή 6-well plates τα οποία είναι επιστρωμένα με τροφικά κύτταρα ή Matrigel-GFR (Corning).

Μέθοδος μηχανικής αποκόλλησης-2

Μικροτόμηση με γυάλινο μικροτόμο. Διαμορφώνεται γυάλινη πιπέτα Pasteur σε μικρονυστέρι με την μέθοδο θέρμανσης και έλξης 2 σταδίων. Ακολουθείται χάραξη της αποικίας και ανακαλλιέργειας όπως περιγράφεται παραπάνω.

Μέθοδος ενζυμικής αποκόλλησης.

Για την μέθοδο αυτή μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα ενζυμικά mix όπως κολλαγενάση, τρυψίνη, γενετικά τροποποιημένη τρυψίνη (TrypLe -Gibco) ή Accutase (Sigma ή Merck). Στο παρών πρωτόκολλο εφαρμόζεται Dispase. Η Dispase είναι ένα ήπιο ένζυμο το οποίο σηκώνει επιλεκτικά μόνο τα ips κύτταρα. Πριν την επώαση με δισπάση τα κύτταρα επωάζονται για 1 ώρα παρουσία Rock inhibitor-Y σε συγκέντρωση 10μM. Απορρίπτεται το θρεπτικό και προστίθεται η δισπάση.

Η επώαση είναι σύντομη 2-4 λεπτά, απαιτούνται ελάχιστα πιπεταρίσματα ώστε να μην θραυθούν οι αποικίες σε μικρά κομμάτια. Οι αποικίες ξεπλένονται από την δισπάση σε θρεπτικό F12-KOSR φυγοκεντρούνται σε χαμηλές στροφές εως 200g για 4 λεπτά και επαναιωρούνται σε κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού μέσου παρουσία 10ng/ml b-FGF. Ανακαλλιέργεια σε αραιώση 1:2 -1:4 ανάλογα με τον σχεδιασμό του πειράματος.

Μέθοδος μη-ενζυμικής αποκόλλησης με EDTA

Ένας άλλος τρόπος για να αποκολληθούν τα κύτταρα είναι η εφαρμογή ενός ισοωσμωτικού διαλύματος PBS- NaCl 0,9%-EDTA 0,5mM. Αυτό το διάλυμα αποδεδειγμένα είναι συμβατό με ανακαλλιέργεια iPS και PSCs και κάνει την προσθήκη ROCK inhibitor προαιρετική. Επίσης το διάλυμα αυτό εξουδετερώνεται εύκολα με την απλή προσθήκη ελάχιστης ποσότητας θρεπτικού υλικού.

- Ήπια έκπλυση κυττάρων δις με PBS και επώαση για 30 δευτερόλεπτα ανά πλύση.
- Προσθήκη 1ml PBS EDTA /10 cm². Άμεση αναρρόφηση.
- Προσθήκη 1ml PBS EDTA /10 cm² και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά. Στο χρόνο αυτό γίνεται μικροσκοπική παρατήρηση και οι έντονη συνοχή της αποικίας φαίνεται διαταραγμένη κατά τόπους.

- Αφαίρεση διαλύματος EDTA αν δεν έχουν σηκωθεί κομμάτια της αποικίας.
- Προσθήκη 1ml πλήρους θρεπτικού μέσου και ανάμιξη με πιπέτα έως 5 φορές.
- Μεταφορά σε νέα well με αραιώση 1:2 -1:4 ανάλογα με τον σχεδιασμό του πειράματος.

Επαναπρογραμματισμός ανθρωπίνων κυττάρων απουσία τροφικών κυττάρων.

Ακολουθείται η διαδικασία όπως περιγράφεται παραπάνω μέχρι την μέρα 7.

- Ημέρα 8

Τα κύτταρα επιστρώνονται σε κατάλληλα βοθρία επικαλυμμένα με Matrigel GFR ή Matrigel ESC qualified (Corning) σε συγκέντρωση 150 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Συνήθως απαιτούνται 40000 μετεγμένα κύτταρα για ένα πείραμα σε ένα 6well. Αν χρησιμοποιούμε CD34+ κύτταρα τότε χρησιμοποιείται πυκνότερο Matrigel 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ και ο αριθμός των κυττάρων είναι τουλάχιστον 100000/ 6well.

- Ημέρα 9-28

Τα κύτταρα ελέγχονται καθημερινά στο μικροσκόπιο για την εμφάνιση αποικιών IPS. Στο στάδιο αυτό αν εμφανιστούν αποικίες με την τυπική μορφολογία ES κυττάρων, δηλαδή μεγάλο λόγο πυρήνα προς κυτταρόπλασμα, μικρού μεγέθους κύτταρα που σχηματίζουν αποικίες με μεγάλη συνοχή και ευκρινή όρια και οι οποίες διαθέτουν «υψος» στο κέντρο τους, τότε πρέπει να αποκολληθούν και να ανακαλλιεργηθούν. Αν δεν έχουν εμφανιστεί αποικίες ως τότε τα κύτταρα πρέπει να ανακαλλιεργηθούν σε νέα πιάτα γιατί ο χρόνος ζωής του Matrigel φτάνει τις 20 μέρες. Η ανακαλλιέργεια γίνεται με PBS EDTA ή Tryple όπως έχει περιγραφεί παραπάνω.

- Ημέρα 28-50

Όταν εμφανιστούν αποικίες που προσομοιάζουν ES αυτές ανακαλλιεργούνται όπως έχει περιγραφεί. Τις 2 πρώτες μέρες τα κύτταρα ανακάμπτουν από την ανακαλλιέργεια. Την τρίτη και τέταρτη οι αποικίες μεγαλώνουν σε επιφάνεια και έχουν τα χαρακτηριστικά άκρα. Συνήθως 5 μέρες μετά την ανακαλλιέργεια, η διαδικασία πρέπει να επαναληφθεί.

Συντήρηση iPS

Ανεξάρτητα της μεθόδου οι ώριμες αποικίες iPS μεταφέρονται σε βοθρία επικαλυμμένα Matrigel GFR και συντηρούνται σε θρεπτικό μέσο mTESR1 ή TERS-E8 (StemCell Tec) και τα δυο θρεπτικά περιέχουν TGF- β που είναι απαραίτητος για την συντήρηση των ES/PSCs. Η ανακαλλιέργεια γίνεται με δισπάση ή με PBS-EDTA όπως περιγράφεται στο 3.8.1 και

επαναλαμβάνεται ανά 4-5 μέρες. Στις 2 πρώτες ανακαλλιέργειες τα iPS μπορεί να μην διαθέτουν την τυπική морφολογία διότι στο στάδιο αυτό οι αποικίες είναι ακόμα ασταθείς. Αν ωστόσο παρατηρηθεί χαμηλός ρυθμός πολλαπλασιασμού και στατικότητα στην καλλιέργεια ή μορφολογία που δεν είναι τυπική των iPS κατά πάσα πιθανότητα ο επαναπρογραμματισμός δεν είναι επιτυχής και πρόκειται είτε για εξαλλαγμένα παράγωγα κύτταρα λόγω της διαδικασίας είτε για ενδιάμεσα επαναπρογραμματισμένα κύτταρα που δεν μπορούν να ολοκληρώσουν την μετατροπή τους σε «πραγματικά» iPS.

Χαρακτηρισμός iPS με αλκαλική φωσφατάση.

Η αλκαλική φωσφατάση είναι ένα ένζυμο που εκφράζεται σε πολλούς ιστούς όπως το επιθήλιο του εντέρου κ.α. Τα ES εκφράζουν υψηλά επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης και για αυτό τον λόγο αυτό η ανίχνευση της δραστηριότητάς της αποτελεί μέθοδο ταυτοποίησης αποικιών iPS. Η ανίχνευση της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης γίνεται με το kit της Merck Alkaline Phosphatase Detection Kit.

- Αφαίρεση θρεπτικού και πλύση με 2ml PBS.
- Μονιμοποίηση με 2% PFA (Appllichem) για 20min σε θερμοκρασία δωματίου
- 2 πλύσεις με 2ml PBS.
- Προσθήκη 1,5 ml διαλύματος Naphthol/Fast Red Violet: Ανάμιξη Fast Red Violet (FRV) με Naphthol AS-BI phosphate και νερού σε αναλογία 2:1:1 μέρη. Επώαση για 20min στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.
- Έκπλυση κυττάρων με 2ml TBST: 20mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 NaCl, 0.05% Tween-20.
- Προσθήκη 2ml PBS και ανάλυση στο οπτικό μικροσκόπιο.

2.9 Ανοσοφαινότυπος και Κυτταρομετρία ροής

Χρώση εξωκυττάρων επιφανειακών μαρτύρων

- Κυτταρικό εναιώρημα ξεπλένεται με buffer κυτταρομετρίας και φυγοκέντρηση 1300rpm για 8 λεπτά.
- Επαναιώρηση κυττάρων στα 100μl με buffer κυτταρομετρίας και προσθήκη αντισώματος 1-2ul για έως 10^6 κύτταρα.
- Επώαση στο σκοτάδι σε RT για 15 λεπτά ή στο ψυγείο για 30 λεπτά.
- Έκπλυση με 3ml buffer κυτταρομετρίας και φυγοκέντρηση 1300rpm για 8 λεπτά.
- Επαναιώρηση κυττάρων με 50 ή 100ul buffer κυτταρομετρίας.

Χρώση με δευτερογενές αντίσωμα

Σε περίπτωση που το πρώτο αντίσωμα δεν φέρει χρωμοφόρο φθορίζον μόριο, μπορεί να γίνει σήμανση και ενίσχυση του σήματος με εφαρμογή δευτερογενούς αντισώματος. Αυτό το δευτερογενές αντίσωμα διαθέτει ειδικότητα ενάντια στην σταθερή περιοχή Fc του είδους στο οποίο παράχθηκε το πρωτογενές αντίσωμα anti-IgG και είναι συζευγμένο με φθορίζον μόριο, πχ FITC, PE κλπ.

- Σε Eppendorf tube προετοιμάζουμε μίγμα buffer κυτταρομετρίας και αραίωσης του δευτερογενούς αντισώματος 1:500-1:1000 ανάλογα με το αντίσωμα.
- Στο δείγμα προσθέτουμε ίσο όγκο αραιωμένου δευτερογενούς αντισώματος ώστε να έχουμε τελική αραίωση 1:1000-1:2000 και επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά
- Εφαρμόζονται 2 πλύσεις με 3ml buffer κυτταρομετρίας και φυγοκέντρηση 1300rpm για 8 λεπτά.
- Το δείγμα επαναιωρείται σε 300μl buffer κυτταρομετρίας.
- Αν πρόκειται να μετρηθεί απαιτείται η προσθήκη 3μl 7-AAD ή 3μl PI για διάκριση μεταξύ ζωντανών και νεκρών κυττάρων. Ακολουθεί επώαση για 5-10' στο σκοτάδι και μετά μπορεί να γίνει η μέτρηση στο κυτταρόμετρο.

Αν πρόκειται να μονιμοποιήσουμε τα κύτταρα και να τα εξετάσουμε με κυτταρομετρία τότε μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε μια χρωστική ζόμπι η οποία προσδένεται στο ενδοκυττάριο τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης μη αντιστρεπτά παράγοντας έντονο φθορισμό στα νεκρά κύτταρα. Η ακέραια κυτταρική μεμβράνη δεν είναι διαπερατή από την χρωστική αυτή.

Μονιμοποίηση Κυττάρων με 4% PFA ή 10% Formalin.

- Κυτταρικό εναιώρημα 10^6 κυττάρων επαναιωρείται σε 100ul buffer κυτταρομετρίας.
- Προσθήκη με παράλληλη περιδίνιση στάγδην 1ml 4% PFA.
- Επώαση κυττάρων σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 20 λεπτά.
- Ακολουθούν 2 πλύσεις με 2.5ml buffer κυτταρομετρίας και φυγοκέντρηση στα 2000 rpm για 10 λεπτά.
- Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 300μl buffer κυτταρομετρίας και μπορούν να φυλαχθούν στο ψυγείο μέχρι και 3 εβδομάδες με ελάχιστη αλλοίωση της χρώσης.

Μονιμοποίηση κυττάρων για ανάλυση έκφρασης EGFP.

Η πρωτεΐνη EGFP είναι ένα παράγωγο της wtGFP που παράγει πιο έντονο φθορισμό. Και οι δύο πρωτεΐνες είναι ευαίσθητες στο pH, στα οργανικά διαλύματα και στις αλκοόλες. Για το

λόγο αυτό η μονιμοποίησή τους καθίσταται δύσκολη διότι μετουσιώνονται. Η παρουσία δεμορίων όπως μεθανόλης και άλλων που χρησιμοποιούνται σαν σταθεροποιητές στα εμπορικά διαθέσιμα παρασκευάσματα PFA ή formalin μετουσιώνει πλήρως τις πρωτεΐνες και αποτελεί τροχοπέδη για την ανίχνευση τους σε μονιμοποιημένα δείγματα με κυτταρομετρία ροής. Το πρόβλημα της μονιμοποίησης επιλύεται με παρασκευή διαλύματος 4%PFA σε PBS pH=7, το οποίο φυλάσσεται στην κατάψυξη.

- Σε 1 ml κυτταρικό εναιώρημα με τα κύτταρα που εκφράζουν GFP προστίθενται στάγδην 200-250ul 4% PFA. Τα κύτταρα αναδεύονται με σύντομη περιδίνιση και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Η τελική συγκέντρωση PFA είναι 0,8-1%
- 2 πλύσεις με προσθήκη 2ml buffer κυτταρομετρίας και φυγοκέντρηση στις 1600 στροφές για 10 λεπτά.
- Τα κύτταρα επαναιωρούνται με 200μl buffer κυτταρομετρίας και φυλάσσονται στο ψυγείο για έως και 4 μέρες.

Ο χρόνος συντήρησης του δείγματος είναι μικρότερος λόγω της ηπιότερης μονιμοποίησης.

Χρώση ενδοκυττάρων μορίων

Τα μονιμοποιημένα κύτταρα μπορεί προηγουμένως να έχουν υποστεί και εξωκυττάρια χρώση όπως περιγράφεται παραπάνω

- Σε 200ul κυτταρικό εναιώρημα προστίθενται 200μl saponin παγωμένης saponin 0,4%-0,5%BSA.
- Επώαση στο ψυγείο για 10 λεπτά. Έκπλυση με 1ml 0,1% saponin PBS-0,5% BSA φυγοκέντρηση 2000rpm για 10 λεπτά στους 4 °C και επαναιώρηση κυττάρων σε 100ul παγωμένο 0,1% saponin PBS-0,5% BSA .
- Προσθήκη 1-2ul πρωτογενούς αντισώματος και επώαση στο ψυγείο για 30 λεπτά.
- 2 εκπλύσεις με 2ml παγωμένου 0,1% saponin PBS-0,5% BSA φυγοκέντρηση 2000rpm για 10 λεπτά στους 4 °C.
- Επαναιώρηση κυττάρων σε 300ul buffer κυτταρομετρίας.
- Εάν το πρωτογενές αντίσωμα δεν είναι σημασμένο με φθοριόχρωμα ακολουθείται το πρωτόκολλο χρώσης με δευτερογενές αντίσωμα 3.9.2, με την διαφοροποίηση ότι όλα τα διαλύματα υποκαθίστανται από παγωμένο 0,1% saponin PBS-0,5% BSA και η φυγοκέντρηση γίνεται στα 2000rpm για 10 λεπτά στους 4 °C.

Η Saponin καθιστά διάτρητη την μεμβράνη παροδικά-αντιστρεπτά. Εάν απομακρυνθεί με έκπλυση τότε οι πόροι στην μεμβράνη κλείνουν. Για το λόγο αυτό είναι σημαντική η παρουσία της καθ' όλη την διάρκεια του πρωτοκόλλου της ενδογενούς χρώσης.

2.10. Κάθετη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών SDS-PAGE και Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων

10X Running buffer

- 144g Glycine (Sigma Aldrich)
- 30g Trizma Base (Sigma Aldrich / Applichem)
- Διάλυση σε 1L ddH₂O

1X Running buffer

- 100ml 10X Running buffer
- 10ml SDS 10% (Sigma Aldrich) σε MiliQ grade water
- 890ml ddH₂O

Transfer buffer (Παρασκευάζεται εκ νέου προ χρήσης).

- 100ml 10X Running buffer
- 200ml Methanol (Applichem)
- 700ml ddH₂O

10X TBS buffer

- 43,8g NaCl (Sigma Aldrich)-1,5M
- 150mM Tris-HCl, pH=7,4
- Προσθήκη ddH₂O ως τον τελικό όγκο 500ml

TBS-T buffer

- 150mM NaCl
- 15mM Tris-HCl, pH=7,4
- 0,1% v/v Tween-20
- ddH₂O εως 1L

4X sample buffer

- 62,5mM Tris-HCl, pH=6,8
- 25% v/v SDS (Sigma)
- 5% v/v β-μερκαπτοαιθανόλη(Sigma Aldrich)

- 10% v/v γλυκερόλη (Fluca)
- 0,05% w/v μπλε βρωμοφαινόλης (Applichem)

Protein Lysis buffer (10mM Tris-HCl (Sigma), pH 8.0, 1mM EDTA (Sigma), 0.5mM EGTA(Sigma), 1% Triton X-100(Sigma), 0,1% Sodium Deoxycholate (Sigma), 0.1% SDS(Sigma), 140mM NaCl (Applichem))

Παρασκευή gel ακρυλαμιδίου.

Το gel ακρυλαμίδης αποτελείται από 2 επιμέρους gel με διαφορετική πυκνότητα ακρυλαμιδίου- bis-ακρυλαμίδης. Τα επιμέρους gel με βάση την σειρά παρασκευής και τοποθέτησης στο εκμαγείο/cast (BioRad) είναι το Running και το Stacking gel.

Running gel 10% w/v

- 3,65ml ddH₂O
- 3,75ml 1M Tris-HCl pH=8,8
- 3,2ml 30% Acrylamide/bis-acrylamide mix (BioRad)
- 100μl 10% v/v SDS in MiliQ H₂O
- 5μl TEMED (Sigma)
- 50μl 10% w/v APS (Sigma)

Αφού στερεοποιηθεί προστίθεται από πάνω το stacking gel.

Stacking gel 4% w/v

- 3,72ml ddH₂O
- 625μl 1M Tris-HCl pH=6,8
- 650μl 30% Acrylamide/bis-acrylamide mix (BioRad)
- 50μl 10% v/v SDS in MiliQ H₂O
- 5μl TEMED (Sigma)
- 50μl 10% w/v APS (Sigma)

Απομόνωση και Εκχύλιση πρωτεϊνών

- Σε ίζημα κυττάρων προστίθενται 90μl Protein Lysis Buffer
- Προσθήκη 10μl PIC (10% v/v ανά δείγμα, 7X στοκ) (SIGMA)
- Προσθήκη 1μl (1%) PMSF (Applichem)
- Ανάδευση με πιπέτα 20 φορές και επώαση στον πάγο για 10 min.
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 13000 rpm στους 4C.
- Το υπερκείμενο φυλάσσεται σε νέο σωληνάριο Eppendorf 1,5ml.

- Προσθήκη 4X sample buffer και βρασμός δείγματος στους 99 °C για 5 λεπτά και στην συνέχεια μεταφορά του σωληναρίου σε πάγο.
- Σύντομη φυγοκέντρηση και φόρτωση του δείγματος σε βοθρίο gel PAGE.

Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Ακολουθούνται οι οδηγίες του κατασκευαστή (Sigma)

- Δείγματα για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης BSA
- Πειραματικά δείγματα για μέτρηση
- Μαθηματικός υπολογισμός για τον υπολογισμό της συνολικής μάζας πρωτεΐνης στα δείγματα

Κάθετη αποδιατακτική ηλεκτροφόριση πρωτεϊνών SDS-PAGE

Το gel PAGE τοποθετείται σε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρισης BioRad. Τα δείγματα φορτώνονται στα βοθρία του Stacking gel SDS PAGE. Τα δείγματα προστίθενται ώστε ανα βοθρίο να περιέχεται ίση πρωτεϊνική μάζα. Φορτώνεται πρωτεϊνικός μάρτυρας Μοριακού βάρους BioRad Protein Ladder (BioRad). Σε τυχόν κενά βοθρία φορτώνεται sampling buffer . Η ηλεκτροφόρηση τρέχει στα 100V εως ότου τα δείγματα να περάσουν το μέτωπο που σχηματίζεται μεταξύ Stacking και Running gel. Στην συνέχεια η ένταση του ρεύματος μεταβάλλεται στα 120V.

Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF

Η μεμβράνη PVDF υπόκειται σε χημική επεξεργασία προτού να μπορεί να πραγματοποιηθεί μεταφορά πρωτεϊνών πάνω της:

- Επώαση 30 sec με μεθανόλη.
- Πλύση για 2min σε ddH₂O.
- Επώαση για 15min σε transfer buffer

Το gel με τα δείγματα στυπώνεται σε μεμβράνη PVDF και τοποθετείται στην κασσέτα μεταφοράς σε transfer buffer υπό συνεχή ανάδευση. Η μεταφορά πραγματοποιείται υπό ηλεκτρικό ρεύμα 100V για 1h σε χαμηλή θερμοκρασία.

Ανοσοαποτύπωση κατά Western.

- Μετά την μεταφορά των πρωτεϊνών από το gel PAGE στην μεμβράνη, η μεμβράνη πλένεται για 3-φορές για 5 λεπτά/πλύση υπό ανάδευση με TBS-T buffer.
- Η μεμβράνη επώαζεται για 2 ώρες υπό ανάδευση με διάλυμα TBS-T 2% w/v BSA υπό ανάδευση.

- Η μεμβράνη πλένεται τρεις με TBS-T buffer για 10 λεπτά/πλύση υπό ανάδευση.
- Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται για 18h με το πρώτο αντίσωμα (όπως φαίνεται στον παρακείμενο πίνακα) που έχει διαλυθεί σε TBS-T 2% w/v BSA:

Πρωτεΐνη	Αραίωση	Είδος ζώου Παραγωγής/Εταιρία
SOX2	1:1000	Rabbit antibody/ Millipore
OCT3/4	1:1000	Rabbit antibody/Abcam
c-MYC	1:1000	Invitrogen
KLF4	1:1000	Santa Cruz
b-actin	1:1000 (2h σε RT)	Rabbit Antibody/Millipore

- Η μεμβράνη ξεπλένεται τρεις με TBS-T για 10 λεπτά/πλύση υπό ανάδευση.
- Η μεμβράνη επωάζεται με δεύτερο αντίσωμα goat αντι-Rabbit συζευγμένο με το ένζυμο HRP(Millipore). Το αντίσωμα υπόκειται σε αραίωση 1:1000 σε TBS-T 2% w/v BSA.
- Η μεμβράνη ξεπλένεται τρεις με TBS-T για 10 λεπτά/πλύση υπό ανάδευση.

Αυτοραδιογραφία και εμφάνιση φιλμ αυτοραδιογραφίας

Η μεμβράνη επωάζεται για 1-5 min με το αντιδραστήριο ECL(GE Healthcare/Thermo Scientific), εντός της κασέτας αυτοραδιογραφίας. Στη συνέχεια στον σκοτεινό θάλαμο ένα κομμάτι film αυτοραδιογραφίας τοποθετείται πάνω από την μεμβράνη και η κασέτα σφραγίζεται για 5-10min ανάλογα με το αντίσωμα. Η εμφάνιση του Film πραγματοποιείται στην συσκευή Epson.

2.11. Μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας

Κατασκευή φορέων DF.K.x.S και DF.O.x.M.IF

Μοριακή κλωνοποίηση των γονιδίων klf4 και c-myc.

Το γονίδιο c-myc απομονώθηκε μέσω ενίσχυσης με PCR από τον φορέα pMX-hc-myc.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα/τελική συγκέντρωση
pMX-cmyc	300ng
5x pfu DNA pol buffer	1X
dNTPs	200nM
CMF	200nM
CMR	200nM
Pfu DNA polymerase	0,5u
ddH2O	50μl τελικό όγκο

CMF: CCATCGATATGCCCTCAACGTTA, CMR:TCGGATCCTTACGCACAAGAGTTC

Το πρόγραμμα του θερμικού κυκλοποιητή αποδίδεται στον παρακάτω πίνακα . Η PCR διαρκεί 35 κύκλους. Κατά την διάρκεια του κύκλου final extension προστίθεται στην αντίδραση 0,5μl DreamTaq DNA polymerase (Thermo) ώστε να προστεθεί στο προϊόν ενίσχυσης ουρά πολύ-αδενίνης.

Init Denat	Denat	Anneal	Extension	Final Extension
94° C	94° C	6° C	72° C	72° C
2min	50sec	1min	1,3min	7min

Το προϊόν της PCR ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης -TAE 1% το οποίο περιέχει βρωμιούχο εθίδιο. Ο μάρτυρας μοριακών βαρών που χρησιμοποιείται είναι ο 1kb DNA ladder (New England Biolabs-NEB).

Το ανθρώπινο γονίδιο klf4 απομονώθηκε από το πλασμίδιο pMX-hklf4 με PCR με εκκινητές που αναγνώριζαν και ενίσχυαν το γονίδιο ειδικά και εκλεκτικά.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα/τελική συγκέντρωση
pMX-hklf4	10ng
10X Dreamtaq DNA pol buffer	0,7X ώστε η τελική συγκέντρωση του Mg ²⁺ 1,5mM
dNTPs	200nM
KFFCLA	200nM
K4BAM	200nM
Dreamtaq DNA polymerase	0,5u
ddH2O	50μl τελικό όγκο

KFFCLA:ATATCGATATGGCTGTCAGCGACGC, K4BAM: CCGGATCCTTAAAAATGCCTCTTCATG

Το πρόγραμμα του θερμικού κυκλοποιητή αποδίδεται στον παρακάτω πίνακα . Η PCR διαρκεί για 35 κύκλους.

Init Denat	Denat	Anneal	Extension	Final Extension
94° C	94° C	65° C	72° C	72° C
2min	50sec	1min	1,5 min	7min

Το προϊόν της PCR ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης -TAE 1% το οποίο περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο. Ο μάρτυρας μοριακών βαρών που χρησιμοποιείται είναι ο 1kb DNA ladder (New England Biolabs-NEB).

Εκχύλιση DNA από πήκτωμα αγαρόζης.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η επιθυμητή ζώνη που περιέχει το προϊόν της PCR c-myc αποκόπτεται από το πήκτωμα με νυστέρι. Η ζώνη ζυγίζεται σε ζυγό ακριβείας και ακολουθείται το πρωτόκολλο του kit GeneJet DNA gel extraction kit (Fermentas) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Μετά την εκχύλιση 2μl από το DNA ηλεκτροφορείται και ακολουθεί ποσοτικοποίησή του στο σύστημα Dolphin ή/και densitometry όπου καθορίζεται η ποσότητα του DNA με σχετική ποσοτικοποίηση. Η ένταση της ζώνης του υπο διερεύνηση δείγματος γίνεται με σύγκριση με εκείνη του μάρτυρα μοριακού βάρους (1Kb DNA ladder-NEB), του οποίου η μάζα είναι γνωστή.

Κλωνοποίηση με την μέθοδο TA.

Σε αυτήν την τεχνική επιτυγχάνεται κλωνοποίηση μέσω αντίδραση λιγκάσης μεταξύ δύο τμημάτων DNA με προεξέχοντα τα οποία είναι συμπληρωματικά. Συγκεκριμένα, η κλασσική DNA Taq πολυμεράση προσθέτει στο τέλος των προϊόντων ενίσχυσης μια αδενοσίνη. Ο φορέας κλωνοποίησης είναι γραμμικός και τα άκρα του έχουν τροποποιηθεί ώστε να υπάρχει μια θυμιδίνη. Ο φορέας κλωνοποίησης είναι ο pGEM-T-easy (Promega). Ακολουθείται το πρωτόκολλο αντίδρασης λιγκάσης με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η αντίδραση λιγκάσης πραγματοποιείται στους 4° C για 16 ώρες και χρησιμοποιείται η T4 DNA λιγκάση της NEB .

Βακτηριδιακός μετασχηματισμός

Χημικός μετασχηματισμός

- 1μl της αντίδρασης λιγάσης χρησιμοποιείται για να μετασχηματιστούν τα χημικά δεκτικά βακτήρια E.coli στέλεχος JM-109(Promega) ή Top10 (Invitrogen).
- Το στοκ των βακτηρίων αποψύχεται για περίπου 5 λεπτά στον πάγο.
- Προσθήκη πλασμιδίου ή προϊόντος αντίδρασης λιγάσης και ήπια ανάδευση.
- Επώαση βακτηριακού εναιωρήματος για 30 λεπτά στον πάγο
- Επαγωγή θερμικού σοκ με επώαση των βακτηρίων 42 °C 30-40 sec (ανάλογα με το στέλεχος των βακτηρίων. Ο βέλτιστος χρόνος καθορίζεται πειραματικά στην περίπτωση που τα βακτήρια παρασκευαστούν in house.)
- Επώαση στον πάγο για 2-3 λεπτά
- Προσθήκη 900 μl θρεπτικού μέσου SOC και επώαση σε επωαστήρα για 1h υπό ανάδευση 250rpm.
- 100 μl καλλιέργεια επιστρώνονται σε στερεό θρεπτικό μέσον LB-agar 1,2% συμπληρωμένο με 100μg/ml αμπικιλίνη ή 50μg/ml καναμυκίνη ανάλογα με το γονίδιο ανθεκτικότητας του πλασμιδιακού φορέα.
- Τα πιάτα με την καλλιέργεια επωάζονται έως 18h στους 37 °C

Μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση

Τα στελέχη που χρησιμοποιούνται είναι τα XL1-blue (Promega), DH10b (Thermo), DH5a (Thermo) και τα NEB10 electrocompetent cells (NEB).

- Το στοκ των βακτηρίων αποψύχεται για περίπου 5 λεπτά στον πάγο.
- Το στοκ πλασμιδίου ή του προϊόντος αντίδρασης λιγάσης αραιώνεται 10 φορές (τελική συγκέντρωση 1-2ng/μl)
- Σε κυβέτα electroporation που έχει ψυχθεί στον πάγο για 10 λεπτά προστίθεται το μίγμα βακτηριακού κυτταρικού εναιωρήματος και DNA.
- Η κυβέτα τοποθετείται στην συσκευή BTX ECM 399/630 και εφαρμόζεται ηλεκτρικό ρεύμα: 2 kV, 200 Ω and 25 μF και αναμενόμενο χρόνο παλμού 5,1msec.
- Προσθήκη 900 μl θρεπτικού μέσου SOC και επώαση σε επωαστήρα για 1,5h υπό ανάδευση 250rpm.
- 100 μl καλλιέργεια επιστρώνονται σε στερεό θρεπτικό μέσον LB-agar 1,2% συμπληρωμένο με 100μg/ml αμπικιλίνη ή 50μg/ml καναμυκίνη ανάλογα με το γονίδιο ανθεκτικότητας του πλασμιδιακού φορέα.
- Τα πιάτα με την καλλιέργεια επωάζονται έως 18h στους 37 °C.

Colony PCR

Για την εξακρίβωση των κλώνων που περιέχουν το διαγονίδιο εφαρμόζεται PCR με εκκινητές για το γονίδιο c-myc και klf4. Κάθε αποικία επαναιωρείται σε 10μl ddH₂O. 2μl κυτταρικού ελαιώματος προστίθενται απευθείας στην αντίδραση της PCR.

Colony PCR για την ανίχνευση του κλώνου pGEM-klf4.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα/τελική συγκέντρωση
Βακτηριακό ελαιώρημα	2μl
10X Dreamtaq DNA pol buffer	0,7X ώστε η τελική συγκέντρωση του Mg ²⁺ 1,5mM
dNTPs	200nM
KFFCLA	200nM
K4BAM	200nM
Dreamtaq DNA polymerase	0,3u
ddH ₂ O	30μl τελικό όγκο

Η PCR διαρκεί 30 κύκλους, σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα

Init Denat	Denat	Anneal	Extension	Final Extension
94° C	94° C	65° C	72° C	72° C
10min	50sec	1min	1,5 min	7min

Το προϊόν της PCR ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης -TAE 1% το οποίο περιέχει βρωμιούχο εθίδιο. Ο μάρτυρας μοριακών βαρών που χρησιμοποιείται είναι ο 1kb DNA ladder (New England Biolabs-NEB).

Colony PCR για την ανίχνευση του κλώνου pGEM-c-myc.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα/τελική συγκέντρωση
Βακτηριακό ελαιώρημα	2ul
10X Dreamtaq DNA pol buffer	1X
dNTPs	200nM
CMF	200nM
CMR	200nM
Dreamtaq DNA polymerase	0,5u

ddH ₂ O	30μl τελικό όγκο
--------------------	------------------

Η PCR διαρκεί 30 κύκλους, σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα

Init Denat	Denat	Anneal	Extension	Final Extension
94° C	94° C	6° C	72° C	72° C
10min	50sec	1min	1,5 min	7min

Το προϊόν της PCR ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης -TAE 1% το οποίο περιέχει βρωμιούχο εθίδιο. Ο μάρτυρας μοριακών βαρών που χρησιμοποιείται είναι ο 1kb DNA ladder (New England Biolabs-NEB). Οι θετικές αποικίες επαναιωρούνται σε 3ml LB συμπληρωμένο με 100μg/ml αμπικιλίνη σε σωληνάριο με κοίλο πυθμένα 14 ml. Η καλλιέργεια επωάζεται για 18h στους 37C υπό ανάδευση 250rpm.

Απομόνωση πλασμιδίου μικρής κλίμακας-miniprep

Μετά από την επώαση της υγρής καλλιέργειας 1,5ml χρησιμοποιείται για την εκχύλιση πλασμιδιακού DNA. Ακολουθείτε πρωτόκολλο αλκαλικής λύσης με το kit Monarch plasmid miniprep kit (NEB) ή το Purelink Hipure plasmid miniprep kit (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Διαγνωστική πέψη πλασμιδιακού DNA με περιοριστική ενδονουκλεάση για ανάλυση τμημάτων περιορισμού

Το πλασμίδιο pGEM-cMyc υπόκειται σε περιοριστική πέψη για 1h στους 37° C με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI ή την NotI. Και τα δύο ένζυμα παράγονται από την NEB.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα/τελική συγκέντρωση	Αντιδραστήριο	Ποσότητα/τελική συγκέντρωση
pGEM-c-myc	5ul	pGEM-c-myc	5ul
NEB EcoRI buffer	3μl	NEB buffer 3,1	3μl
EcoRI	1μl	NotI	1μl
ddH ₂ O	30μl τελικό όγκο	ddH ₂ O	30μl τελικό όγκο

Τα προϊόντα των πέψεων αναλύονται σε πήκτωμα αγαρόζης -TAE 1% το οποίο περιέχει βρωμιούχο εθίδιο. Ο μάρτυρας μοριακών βαρών που χρησιμοποιείται είναι ο 1kb DNA ladder (New England Biolabs-NEB).

Αναμενόμενο πρότυπο ζώνωσης:

	NotI	EcoRI
Fragment 1	1320	1320
Fragment 2	3015bp	3015bp

Το πλασμίδιο pGEM-klf4 υπόκειται σε περιοριστική πέψη για 1h στους 37° C με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI ή την NotI. Και τα δύο ένζυμα παράγονται από την NEB.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα/τελική συγκέντρωση	Αντιδραστήριο	Ποσότητα/τελική συγκέντρωση
pGEM-klf4	5ul	pGEM-klf4	5ul
NEB buffer 3,1	3μl	NEB buffer 4,1	3μl
NotI	1μl	ClaI	1μl
		BamHI	1μl
ddH2O	30μl τελικό όγκο	ddH2O	30μl τελικό όγκο

Αναμενόμενο πρότυπο ζώνωσης:

	NotI	ClaI + BamHI
Fragment 1	1400bp	1400bp
Fragment 2	3015p	3015bp

Κλωνοποίηση του γονιδίου c-Myc στον φορέα pIRESpuro3 για την κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα pIRESpuro3-c-myc.

Το γονίδιο c-Myc αποκόπτεται από τον πλασμιδιακό φορέα pGEM-cMyc με πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI (NEB). Παράλληλα ο πλασμιδιακός φορέας pIRESpuro3 έχει γίνει γραμμικός μετά από πέψη περιορισμού με το ίδιο ένζυμο (EcoRI).

Τα 2 τμήματα DNA υπόκεινται σε αντίδραση παρουσία T4 DNA λιγάσης (NEB) σε αναλογία 1:3 pIRESpuro3:c-myc DNA, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η επώση της αντίδρασης γίνεται στους 4 °C για 16h.

Τα προϊόντα της αντίδρασης λιγάσης χρησιμοποιούνται για να μετασχηματίσουν E. coli NEB10 electrocompetent cells (NEB) όπως περιγράφηκε.

Απομονώνονται μοναδιαίες αποικίες και καλλιεργούνται σε υγρές καλλιέργειες μικρής κλίμακας και απομονώνεται πλασμιδιακό DNA όπως στο 4.6 και 4.7. Στην συνέχεια το

πλασμίδιο υπόκειται σε περιοριστική πέψη με EcoRI με τα αναμενόμενα τμήματα να είναι 1300bp και 5200bp. Οι θετικοί κλώνοι χρησιμοποιούνται για την παρασκευή βακτηριακού στοκ γλυκερόλης και κρυοσυντήρησης στους -80 °C.

Κλωνοποίηση του γονιδιακού τμήματος c-myc στον πλασμιδιακό φορέα pIRES2EGFP για την κατασκευή του pc-myc.IRES2EGFP.

Το γονιδιακό τμήμα c-myc αποκόπτεται από τον φορέα pIRESpuro3-c-myc μετά από πέψη περιορισμού με τα ένζυμα NheI (NEB) και BamHI (NotI). Ο φορέας pIRES2EGFP γίνεται γραμμικός μετά από πέψη με τα ίδια ένζυμα. Τα δύο τμήματα DNA υπόκεινται σε αντίδραση παρουσία T4 DNA λιγκάσης (NEB) σε αναλογία 3:1 c-myc:pIRES2EGFP DNA, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η επώαση της αντίδρασης γίνεται στους 4°C για 16h.

Τα προϊόντα της αντίδρασης λιγκάσης χρησιμοποιούνται για να μετασχηματίσουν E. coli Stbl2 (Invitrogen) όπως περιγράφεται ανωτέρω. Τα βακτήρια επιστρώνονται σε πιάτο LB-agar συμπληρωμένο με 50 µg/ml καναμυκίνη. Απομονώνονται μοναδικές αποικίες υπόκεινται σε πρωτόκολλο colony PCR με το ζεύγος εκκινητών GFPF και GFPR. Οι θετικοί κλώνοι καλλιεργούνται σε υγρές καλλιέργειες μικρής κλίμακας και απομονώνεται πλασμιδιακό DNA. Στην συνέχεια το πλασμίδιο υπόκειται σε περιοριστική πέψη με AgeI και NotI με τα αναμενόμενα τμήματα να είναι 2700bp και 5300 bp. Οι θετικοί κλώνοι χρησιμοποιούνται για την παρασκευή βακτηριακού στοκ γλυκερόλης και κρυοσυντήρησης στους -80 °C.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα/τελική συγκέντρωση
Βακτηριακό ελαιώρημα	2µl
10X Dreamtaq DNA pol buffer	1X
dNTPs	200nM
GFPF	200nM
GFPR	200nM
Dreamtaq DNA polymerase	0,3u
ddH2O	30µl τελικό όγκο

GFPF: ACCCCGACCACATGAAGCAGC, GFPR: CTGTGGGGTCTTTGCTCAGGG

Η PCR διαρκεί 30 κύκλους, σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα

Init Denat	Denat	Anneal	Extension	Final Extension
94° C	94° C	58° C	72° C	72° C
10min	50sec	0,5min	1min	5min

Κατασκευή του φορέα DF.O4.x.MIF

Ο φορέας DF.O4.x.MIF κατασκευάστηκε με την κλωνοποίηση του γονιδιακού τμήματος c-mycIRES2EGFP στον φορέα DF.O4.x.S, με την υποκατάσταση του γονιδίου sox2. Το τμήμα DNA c-mycIRES2EGFP αποκόπτεται από τον πλασμιδιακό φορέα pc-mycIRES2EGFP μετά από πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα AgeI και NotI (NEB). Ο φορέας DF.O4.x.S γίνεται γραμμικός και αφαιρείται το γονίδιο sox2 μετά από πέψη με τα ίδια ένζυμα. Ο γραμμικός φορέας που προκύπτει είναι ο DF.O4.x.

Τα δύο τμήματα DNA υπόκεινται σε αντίδραση παρουσία T4 DNA λιγάσης (NEB) σε αναλογία 3:1 c-mycIRES2EGFP: DF.O4.x DNA, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η επώαση της αντίδρασης γίνεται στους 4 °C για 16h.

Τα προϊόντα της αντίδρασης λιγκάσης χρησιμοποιούνται για να μετασχηματίσουν E. coli Stbl2 (Invitrogen) όπως περιγράφηκε. Απομονώνονται μοναδικές αποικίες και υπόκεινται σε πρωτόκολλο colony PCR με το ζεύγος εκκινητών CMF και CMR, όπως περιγράφεται ανωτέρω.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα/τελική συγκέντρωση
Βακτηριακό εναιώρημα	2μl
10X Dreamtaq DNA pol buffer	1X
dNTPs	200nM
CMF	200nM
CMR	200nM
Dreamtaq DNA polymerase	0,3u
ddH2O	30μl τελικό όγκο

Η PCR διαρκεί 30 κύκλους,

σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα

Init Denat	Denat	Anneal	Extension	Final Extension
94° C	94° C	60° C	72° C	72° C
10min	50sec	0,5min	1min	5min

Οι θετικοί κλώνοι καλλιεργούνται σε υγρές καλλιέργειες μικρής κλίμακας και απομονώνεται πλασμιδιακό DNA. Στην συνέχεια το πλασμίδιο υπόκειται σε περιοριστική πέψη με BamHI, με αναμενόμενα τμήματα μεγέθους 7,8kb και 2,8, με ClaI με αναμενόμενα τμήματα 9,4kb, 0,8kb και 0,4kb και με NotI με αναμενόμενο τμήμα 10,6kb. Οι θετικοί κλώνοι χρησιμοποιούνται για την παρασκευή βακτηριακού στοκ γλυκερόλης και κρυοσυντήρησης στους -80C.

Κατασκευή φορέα DF.K.x.S

Ο φορέας DF.K.x.S κατασκευάστηκε με την κλωνοποίηση του γονιδιακού τμήματος klf4 στον φορέα DF.O4.x.S, με την υποκατάσταση του γονιδίου Oct4. Το τμήμα DNA klf4 αποκόπτεται από τον πλασμιδιακό φορέα pGEM-klf4 μετά από πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα ClaI και BamHI (NEB). Ο φορέας DF.O4.x.S γίνεται γραμμικός και αφαιρείται το γονίδιο oct4 μετά από πέψη με τα ίδια ένζυμα. Ο γραμμικός φορέας που προκύπτει είναι ο DF.x.S.

Τα δύο τμήματα DNA υπόκεινται σε αντίδραση παρουσία T4 DNA λιγκάσης (NEB) σε αναλογία 3:1 klf4: DF.x.S DNA, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η επώαση της αντίδρασης γίνεται στους 4C για 16h. Τα προϊόντα της αντίδρασης λιγκάσης χρησιμοποιούνται για να μετασχηματίσουν E. coli Stbl2 (Invitrogen) όπως περιγράφεται ανωτέρω. Απομονώνονται μοναδικές αποικίες υπόκεινται σε πρωτόκολλο colony PCR με το ζεύγος εκκινητών klf4-internal-seq και K4R, όπως περιγράφεται ανωτέρω.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα/τελική συγκέντρωση
Βακτηριακό εναιώρημα	2μl
10X Dreamtaq DNA pol buffer	1X
dNTPs	200nM
klf4internalseq	200nM
K4R	200nM
Dreamtaq DNA polymerase	0,3u
ddH2O	30μl τελικό όγκο

KLF4seq internal:

ATTGGACCCGGTGTACATTC, K4R: TTAAAAATGCCTCATGTGTAAGGCG

Η PCR διαρκεί 30 κύκλους, σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα:

Init Denat	Denat	Anneal	Extension	Final Extension
------------	-------	--------	-----------	-----------------

94° C	94° C	60° C	72° C	72° C
10min	50sec	0,5min	1min	5min

Οι θετικοί κλώνοι καλλιεργούνται σε υγρές καλλιέργειες μικρής κλίμακας και απομονώνεται πλασμιδιακό DNA. Στην συνέχεια το πλασμίδιο υπόκειται σε περιοριστική πέψη με ClaI και BamHI με τα αναμενόμενα τμήματα να είναι 1,4kb και 7,3kb. Οι θετικοί κλώνοι χρησιμοποιούνται για την παρασκευή βακτηριακού στοκ γλυκερόλης και κρυοσυντήρησης στους -80 °C.

Κατασκευή φορέων FV και LV για την παραγωγή CAR T κυττάρων

Κατασκευή FV-GW.DEST και LV.GW.DEST για κλωνοποίηση με τη μέθοδο Gateway.

Η μέθοδος κλωνοποίησης Gateway αποτελεί μια μέθοδο κλωνοποίησης ανεξάρτητης από την αντίδραση λιγκάσης για να ενωθούν μεταξύ τους δύο τμήματα DNA. Η μέθοδος αυτή εκμεταλλεύεται τον μηχανισμό τον οποίο χρησιμοποιεί ο φάγος λ κατά τους κύκλους λυσιγονίας - λύσης της μόλυνσης των βακτηριακών κυττάρων. Τα ένζυμα του φάγου λάμδα αναγνωρίζουν συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που αποτελούν υπόστρωμα για την ενσωμάτωση και εκτομή του φαγικού DNA στο και από το βακτηριακό DNA. Η αλληλουχίες αυτές αποτελούνται από μερικές δεκάδες έως και εκατοντάδες ζεύγη βάσεων. Το γεγονός αυτό καθιστά την πιθανότητα λάθους της αντίδρασης πολύ μικρή¹⁰².

Το σύστημα αυτό αποτελείται από δύο ειδών αντιδράσεις που η κάθε μια απαιτεί την παρουσία διακριτών ομόλογων αλληλουχιών και διακριτών συνδυασμών ενζύμων. Το BP σύστημα και το LR σύστημα.

Στο BP σύστημα οι αλληλουχίες attB ανασυνδυάζονται με τις αλληλουχίες attP παράγοντας τις αλληλουχίες attL και attR και την δράση των ενζύμων Int (ιντεγκράση) και IHF (integration host factor) του φάγου. Αντίστοιχα το LR σύστημα προαπαιτεί την παρουσία των αλληλουχιών attL και attR και την συγχρονισμένη δράση τριών ενζύμων Int, IHF και Xis (εκτομάση). Παράλληλα μεταλλαγές στις αλληλουχίες attL και attR τις καθιστούν συμβατές μόνο με τις ομόλογές τους επιτρέποντας στο σύστημα να μπορεί να εφαρμοστεί στην συναρμολόγηση πολλαπλών γονιδιακών αλληλουχιών¹⁰³. Η συναρμολόγηση αυτή είναι θεσηκατευθυνόμενη μέσω ομολογίας και προσανατολισμένη. Επιτρέπει την συναρμολόγηση μεγάλων γονιδιακών κατασκευών (ως πέντε τμήματα DNA) και την παραγωγή προϊόντων μήκους μερικών χιλιάδων βάσεων¹⁰⁴.

Για την κατασκευή των φορέων Gateway η γονιδιακή κασέτα απομονώθηκε από το φορέα pMule.Lenti-Dest.-EGFP μετά από πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRV. Η γονιδιακή κασέτα αποτελούνταν από τα στοιχεία AttR1-CmR-ccdB-AttR2. Το CmR είναι το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό χλωραμφενικόλη, ενώ το ccdB είναι το γονίδιο αυτοκτονίας. Το γονίδιο ccdB κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη αναστολέα της βακτηριακής γυράσης. Τα πλασμίδια που φέρουν το γονίδιο ccdB αναπτύσσονται μόνο σε βακτηριακά στελέχη E.coli τα οποία φέρουν το μεταλλάξεις στο γονίδιο της γυράσης, όπως την *gyrA462* στο στέλεχος DB3,1 survival (Invitrogen), που τα καθιστά ανθεκτικά στην έκφραση της πρωτεΐνης.

Για την κατασκευή του φορέα LV.GW.DEST, ως γονιδίωμα σκελετός χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pRRL.SIN.cPPT.PGK.EGFP.WPRE (Addgene, plasmid#12252). Από τον φορέα αυτό αφαιρέθηκε η κασέτα PGK.EGFP μετά από πέψη περιορισμού με τα ένζυμα EcoRV και SalI (NEB) στην συνέχεια το προϊόν της πέψης επώαστηκε με το θραύσμα Klenow στους 37 °C για 1 h ώστε το DNA του φορέα να έχει τυφλά άκρα.

Τα 2 τμήματα DNA pRRL.SIN.cPPT.WPRE και η κασέτα AttR1-CmR-ccdB-AttR2 επώαστηκαν σε αναλογία 1:3 σε αντίδραση με T4 DNA λιγάση (NEB) για 16 ώρες στους 16 °C. Το προϊόν της αντίδρασης λιγάσης χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό 100μl E. coli DB3,1 survival, όπως περιγράφεται στο 4.4.1. Η βακτηριακή καλλιέργεια επιστρώνεται σε στέρεο θρεπτικό LB-agar συμπληρωμένο με αμπικιλίνη και χλωραμφενικόλη 20μg/ml. Οι αποικίες ελέγχθηκαν με colony PCR με τους αντίστοιχους εκκινητές.

Οι αποικίες που έφεραν την κασέτα με τον σωστό προσανατολισμό χρησιμοποιήθηκαν για μικρής κλίμακας υγρή καλλιέργειας σε LB συμπληρωμένο με αμπικιλίνη 100μg/ml και χλωραμφενικόλη 20μg/ml. Από την καλλιέργεια αυτή απομονώθηκε πλασμίδιο και παρασκευάστηκε στοκ γλυκερόλης για κρυοσυντήρηση στους -80C.

Για την κατασκευή του φορέα FV.GW.DEST, ως γονιδίωμα σκελετός χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pDF.xFF. Από τον φορέα αυτό αφαιρέθηκε η κασέτα ΔNGFR.xEGFP μετά από πέψη περιορισμού με τα ένζυμα BamHI και NotI (NEB) στην συνέχεια το προϊόν της πέψης επώαστηκε με το θραύσμα Klenow στους 37 °C για 1 h ώστε το DNA του φορέα να έχει τυφλά άκρα.

Τα 2 τμήματα DNA pDF και η κασέτα AttR1-CmR-ccdB-AttR2 επώαστηκαν σε αναλογία 1:3 σε αντίδραση με T4 DNA λιγάση (NEB) για 16 ώρες στους 16 °C. Το προϊόν της αντίδρασης

λιγάνης χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό 100μl *E. coli* DB3,1 survival, όπως περιγράφεται στο 4.4.1. Η βακτηριακή καλλιέργεια επιστρώνεται σε στερεό θρεπτικό LB-agar συμπληρωμένο με αμπικιλίνη και χλωραμφενικόλη 20μg/ml. Οι αποικίες ελέγχθηκαν με colony PCR με τους αντίστοιχους εκκινητές. Οι αποικίες που έφεραν την κασέτα με τον σωστό προσανατολισμό χρησιμοποιήθηκαν για μικρής κλίμακας υγρή καλλιέργειας σε LB συμπληρωμένο με αμπικιλίνη 100μg/ml και χλωραμφενικόλη 20μg/ml. Από την καλλιέργεια αυτή απομονώθηκε πλασμίδιο και παρασκευάστηκε στοκ γλυκερόλης για κρυοσυντήρηση στους -80 °C.

Κατασκευή των FV-CAR19 και LV-CAR19

Για την κατασκευή του anti-CD19 CAR χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία του αντισώματος FMC63 όπως περιγράφεται στο Kochenderfer et al, 2009¹⁰⁵. Το διαγονίδιο του CAR υποδοχέα τέθηκε υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του υποκινητή EF1a με το ιντρόνιο του. Ο συνδυασμός αυτός επιτρέπει υψηλή έκφραση mRNA ανεξάρτητα από το κυτταρικό πλαίσιο. Η αλληλουχία του EF1a.CAR19 τοποθετήθηκε μεταξύ των αλληλουχιών attL1 και attL2. Η γονιδιακή κατασκευή συντέθηκε από την εταιρεία Geneart και αποθηκεύτηκε στον πλασμιδιακό φορέα pMK. Είχε δε βελτιστοποιηθεί ως προς τα κωδικόνια. Έχοντας ολοκληρώσει την κατασκευή των φορέων Gateway, ο φορέας pMK και ο φορέας FV.GW.DEST ή αντίστοιχα ο φορέας LV.GW.DEST επώαστηκαν σε αντιδράσεις ανασυνδυασμού με το σύστημα ενζύμων LR clonase (Invitrogen) ως εξής:

Αντιδραστήριο	Ποσότητα	Αντιδραστήριο	Ποσότητα
FV.GW.DEST	150ng	LV.GW.DEST	150ng
pMK.CAR19	50ng	pMK.CAR19	50ng
5X LR clonase buffer	2ul	5X LR clonase buffer	2ul
ddH2O	Ως 8μl	ddH2O	Ως 8μl
LR clonase	2μl	LR clonase	2μl
	10μl τελικό όγκο	ddH2O	10μl τελικό όγκο

Οι αντιδράσεις επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες. Στην συνέχεια έγινε προσθήκη 1μl πρωτεΐνης K και οι αντιδράσεις επώαστηκαν στους 37 °C για 15 min. Στη συνέχεια 1μl από την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε για να μετασχηματίσει 100μl *E. coli* στέλεχος NEBstable όπως έχει περιγραφεί. 100μl βακτηριακής καλλιέργειας επιστρώθηκαν

σε στέρεο θρεπτικό μέσο LB agar συμπληρωμένο με 100μg/ml αμπικιλίνη. Η καλλιέργεια επωάστηκε για 20 ώρες στους 30 °C. Οι θετικοί κλώνοι ταυτοποιήθηκαν με colony PCR με τα ζεύγη εκκινητών pDF-attR1-R2-seq-rev και Cd3z-pMule-cPCR-F1 για τον φορέα FV-CAR19 και τα ζεύγη εκκινητών Cd3z-pMule-cPCR-R1 και Cd3z-pMule-cPCR-F1 αντίστοιχα. Η θερμοκρασία για το annealing ήταν 60 °C και ο χρόνος του extension 30 sec. Οι θετικοί κλώνοι τοποθετήθηκαν σε υγρή καλλιέργεια μικρής κλίμακας σε θρεπτικό μέσον LB συμπληρωμένο με 100μg/ml αμπικιλίνη. Τέλος, πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας.

Παρασκευή πλασμιδίων σε μεγάλη κλίμακα-maxiprep.

Για την παραγωγή ικών υπερκειμένων απαιτείται η παραγωγή των πλασμιδιακών φορέων σε στοκ με υψηλή συγκέντρωση. Τα βακτήρια που έχουν μετασχηματιστεί επιστρώνονται σε τρυβλία LB-agar συμπληρωμένα με αμπικιλίνη 100μg/ml. Επωάζονται στους 32 °C για 20h. Στην συνέχεια μια μονήρης αποικία χρησιμοποιείται για να εμβολιάσει μια υγρή καλλιέργεια LB agar μικρής κλίμακας η οποία αναπτύσσεται υπό ανάδευση 250rpm στις συνθήκες που περιγράφονται παραπάνω. Η καλλιέργεια αυτή αποτελεί στοκ για την παραγωγή μεγάλης κλίμακας καλλιέργειας.

200ml LB συμπληρωμένα με αμπικιλίνη 100μg/ml εμβολιάζεται με 100 ή 200μl από τη μικρότερη στοκ καλλιέργεια (τελική αραίωση 1:2000-1:1000) σε κωνική φιάλη 2L. Οι καλλιέργειες επωάζονται υπό συνεχή ανάδευση στα 250rpm στους 32 °C για 20h αυστηρά. Το OD600 πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 2,5 και 3.

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA γίνεται με το kit PureLink HiPure Plasmid Maxiprep kit (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνοπτικά:

- 200ml υγρής βακτηριακής καλλιέργειας φυγοκεντρούνται στα 3000g για 12min
- Απορρίπτεται το υπερκείμενο πλήρως. Προσθήκη 10ml διαλύματος επαναιώρισης buffer R3 και πλήρης επανέωρηση του ιζήματος κυττάρων.
- Προσθήκη 10ml διαλύματος αλκαλικής λύσης buffer L3 και ήπια ανάδευση 6-7 φορές. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- Προσθήκη 10ml διαλύματος εξουδετέρωσης N3 και ήπια ανάδευση έως ότου το διάλυμα με τα κύτταρα που έχουν υποστεί λύση να ομογενοποιηθεί.
- Μεταφορά του μίγματος σε κατάλληλα κωνικά φιαλίδια και φυγοκέντριση στις 15000 g για 10 min στους 16 °C .

- Το υπερκείμενο φορτώνεται σε στήλη χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής, η οποία έχει προηγουμένως εξισορροπηθεί με 30ml equilibration buffer. Το υπερκείμενο αφήνεται να ρεύσει από την στήλη με την επίδραση της βαρύτητας.
- Η στήλη εκπλένεται με 60ml wash buffer.
- Προστίθενται 15ml διαλύματος έκλουσης elution buffer.
- Στο διάλυμα προστίθενται 10,5 ml ισοπροπανόλης και το μίγμα φυγοκεντρείται 15000g για μισή ώρα στους 4 °C.
- Το ίζημα ξεπλένεται 2 φορές με 70% αιθανόλη και φυγοκέντριση 13000 rpm για 7 λεπτά στους 4 °C.
- Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει και επαναιωρείται σε 300μl 5mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH=7,8.

Αλληλούχιση φορέων κατά Sanger.

Όλοι οι φορείς εξετάστηκαν ως προς την αρτιότητα του κλωνοποιημένης κασέτας μέσω κλασσικής αλληλούχισης Sanger.

Ανάλυση θέσεων ενσωμάτωσης στο γονιδίωμα (RIS)

Κατασκευή Βιβλιοθηκών DNA

Για την ανάλυση των θέσεων ένθεσης των φορέων FV στο γονιδίωμα των FV CAR T κυττάρων ακολουθήθηκε η διαδικασία κατασκευής βιβλιοθηκών DNA Linear Amplification mediated PCR (LAM-PCR) όπως περιγράφεται στο Beard et al, 2014¹⁰⁶ και στο Wells et al, 2020¹⁰⁷. DNA απομονώθηκε από 3x10⁶ FV CAR19 T κυτταρα με το κιτ NucleoSpin Tissue, Mini kit for DNA from cells and tissue (Macherey Nagel) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Όλα τα ολιγονουκλεοτίδια και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν συντέθηκαν από την IDT και ο καθαρισμός τους από τον κατασκευαστή πραγματοποιήθηκε με HPLC.

Υβριδισμός Linker

Για να παρασκευαστεί ο linker-adaptor συντέθηκαν τα νουκλεοτίδια LinkerT και Linker3c6.

LinkerT: AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNNNNTAGTGCTCCGCTTAGAGGACT

Linker3c6:5PHOS-GTCCTCTAAGCGGAGCACTA/3C6

Το LinkerT έφερε μια μοναδική αλληλουχία 8 τυχαίων ολιγονουκλεοτιδίων – μοναδικών μοριακών ταυτοτήτων-UMI, ενώ μετά τον υβριδισμό με το Linker3c6 υπήρχε ελεύθερο ένα

κατάλοιπο T στο 3' ακρο. Το Linker3c6 έφερε στο 3' ακρο ένα μόριο εξανοδιόλης που δεν επιτρέπει στην DNA πολυμεράση να επιμηκύνει προς το 5' άκρο του Linker.

- Τα 2 oligos επαναϊωρούνται σε συγκέντρωση 200μM με buffer STE (1X low-EDTA TE pH 8.0 + 50 mM NaCl). Επώαση για 10min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ανάμιξη 20μl από κάθε oligo ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 100μM.
- Επώαση στο θερμοκυκλοποιητή (Thermocycler) 95 °C για 5min.
- Στην συνέχεια στο μίγμα η θερμοκρασία μειώνεται με ρυθμό 2 °C /min για 30 min.
- Επώαση του μίγματος για 30 min στους 4 °C.

Θραυσματοποίηση DNA και αντίδραση λιγάσης με το Linker-adaptor

Η βιβλιοθήκη προετοιμάστηκε με το kit NEB Next Ultra II FS DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνοπτικά:

Θραυσματοποίηση DNA

4,6μl (300ng) FV CAR19 T DNA

7μl FS buffer

2μl FS enzyme mix

21,4μl molecular biology grade H₂O

- Το μίγμα επωάζεται στο thermocycler:
- 37 °C για 10min ώστε να διασπαστεί το DNA σε τμήματα εύρους 300-700 bp
- 65 °C για 30 min
- 4 °C

Αντίδραση αντίδραση λιγάσης DNA με το adaptor

35μl θραυσμάτων DNA (ο πλήρης όγκος της αντίδρασης από το προηγούμενο βήμα)

1,5μl adapter-linker stock

30μl Ultra FS ligation mix

1μl Ultra FS ligation enhancer

Η αντίδραση επωάζεται στους 20 °C για 10 min και στην συνέχεια στους 4 °C.

Καθαρισμός DNA με μαγνητικά σφαιρίδια-NGS DNA magnetic beads (Macherey-Nagel)

Για την απομάκρυνση μικρών τμημάτων DNA καθώς και μορίων adaptor-linker που παραμένουν αδέσμευτα.

- 68μl αντίδρασης λιγάσης
- 51μl μαγνητικά σφαιρίδια

- Ανάδευση 10 φορές με πιπέτα και επώαση 10min σε RT.
- Επώαση σε μαγνητικό πεδίο για 3min και αφαίρεση υπερκλειμένου.
- Έκπλυση 2 φορές με 180μl 80% αιθανόλης σε H₂O για μοριακή βιολογία, χωρίς επαναιώρηση των σφαιριδίων ενδιάμεσα.
- Απόρριψη αιθανόλης και εξάτμιση στον αέρα για 5 min.
- Προσθήκη 70μl low TE buffer Tris-HCl pH=8, επαναιώρηση των σφαιριδίων και επώαση στο μαγνήτη για 5 min.
- Απομόνωση υπερκλειμένου σε νέο Eppendorf και επανάληψη της διαδικασίας με τις εξής αλλαγές:
- Προσθήκη 53μl μαγνητικών σφαιριδίων.
- Επαναιώρηση μετά την απόρριψη της αιθανόλης σε 35μl low TE buffer Tris-HCl pH=8, επαναιώρηση των σφαιριδίων και επώαση στο μαγνήτη για 5 min.
- Το υπερκείμενο συλλέγεται σε νέο σωληνάριο Eppendorf και περιέχει καθαρά τα τμήματα DNA ομοιοπολικά δεσμευμένα με τους adaptor-linker.

Exponential PCR με βιοτυνιλωμένους εκκινητές που στοχεύουν το FV LTR.

- 10μl καθαρό προϊόν λιγάσης
- 2μl biot-FV primer (10μM stock)
- 2μl 1st linker primer (10μM stock)
- 11μl WFI
- 25μl 2X Q5 DNA polymerase mix (New England Biolabs)

Η PCR διαρκεί για 32 κύκλους με το παρακάτω πρόγραμμα:

Init Denat	Denat	Anneal	Extension	Final Extension
98° C	98° C	60° C	72° C	72° C
2min	25sec	0,5min	1min	3min

LINKER1ST: AGTTCAGACGTGTGCTCTT biotFV: 5'Biosg/ACCGACTTGATTGAGAACC

Εμπλουτισμός προϊόντων PCR για τα FV LTR

Ο εμπλουτισμός των προϊόντων PCR που στοχεύουν τα FV LTR-linker γίνεται μέσω δέσμευσης σε στατική φάση χρησιμοποιώντας τα μαγνητικά σφαιρίδια με στρεπταβιδίνη (M-280 Thermo ή Kara HyCapture bead Roche).

- 80μl μαγνητικών σφαιριδίων στρεπταβιδίνης εκπλένονται με 1ml 1mg/ml BSA σε H₂O. Τοποθέτηση σε μαγνητικό πεδίο και απόρριψη υπερκειμένου
- Προσθήκη 300μl BSA 1mg/ml σε H₂O, ανάδευση με vortex. Τοποθέτηση σε μαγνητικό πεδίο και αφαίρεση υπερκειμένου.
- Προσθήκη 1X binding buffer (0,01% Triton-X-100, 10mM NaCl, 5mM Tris-HCl, 0,5mM EDTA pH=7,5) και ανάδευση με vortex για 10 sec. Φυγοκέντρωση για 5 sec και διαμοιρασμός εναιωρήματος 50μl σε 3 νέα σωληνάρια erppendorf.
- Τοποθέτηση σε μαγνητικό πεδίο, απόρριψη υπερκειμένου και άμεση προσθήκη 50μl 1x binding buffer.
- Προσθήκη προϊόντος PCR και ανάδευση με πιπέτα. Προσθήκη επιπλέον 200μl 1x binding buffer και επώαση υπο ανάδευση σε αναδευτήρα φιαλιδίων για 40 min.
- Φυγοκέντρωση για 5 sec. Τοποθέτηση σε μαγνητικό πεδίο για 3 λεπτά και απόρριψη υπερκειμένου.
- Επαναιώρηση σε 100μl σε WFI. Τοποθέτηση σε μαγνητικό πεδίο για 3 λεπτά και απόρριψη υπερκειμένου.
- Προσθήκη 20μl φορμαμιδίου ή DMF και επώαση στους 65 °C για 5min με σύντομο vortex ανά 1 min.
- Τοποθέτηση σε μαγνητικό πεδίο για 3 min συλλογή του υπερκειμένου σε νέο Eppendorf.
- Προσθήκη 50μl WFI.
- Προσθήκη 53μl μαγνητικών σφαιριδίων-NGS DNA magnetic beads (Macherey-Nagel).
- Για τον καθαρισμό ακολουθείται η διαδικασία όπως περιγράφεται παραπάνω στο εδάφιο «Καθαρισμός DNA με μαγνητικά σφαιρίδια-NGS DNA magnetic beads (Macherey-Nagel)»
- Το προϊόν εκλούεται σε 22μl elution buffer

Nested PCR- κατασκευή βιβλιοθήκης

2μl καθαρισμένου προϊόντος από την exponential PCR που περιγράφηκε παραπάνω

2μl N1Li705R (10μM stock)

2μl FV2Nest507F (10μM stock)

19μl ddH₂O

25μl 2X Q5 DNA polymerase mix (New England Biolabs)

Η PCR διαρκεί για 20 κύκλους με το παρακάτω πρόγραμμα:

Init Denat	Denat	Anneal	Extension	Final Extension
98° C	98° C	60° C	72° C	72° C
2min	25sec	0,5min	1min	3min

FV2Nest507F:

AATGATACGGCGACCAACGAGATCTACAC/CAGGACGT/ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCG
ATCT/GCTAAGGGAGACATCTAGTG

N1Li705R:

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT/ATTCAGAA/GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC

Στην συνέχεια το προϊόν της PCR καθαρίζεται με μαγνητικά σφαιρίδια όπως περιγράφεται στο εδάφιο «Καθαρισμός DNA με μαγνητικά σφαιρίδια-NGS DNA magnetic beads (Macherey-Nagel)» και εκλούεται σε 20μl elution buffer.

Η ανάλυση και Αλληλούχιση NGS πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Αιματολογίας του ΙΙΒΕΑΑ στο MinION Oxford Nanopore Technologies) για την αλληλούχιση. Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τα εργαλεία Homer¹⁰⁸.

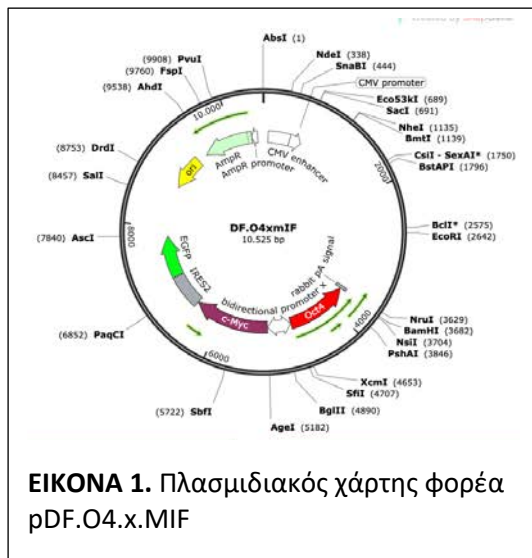
3.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

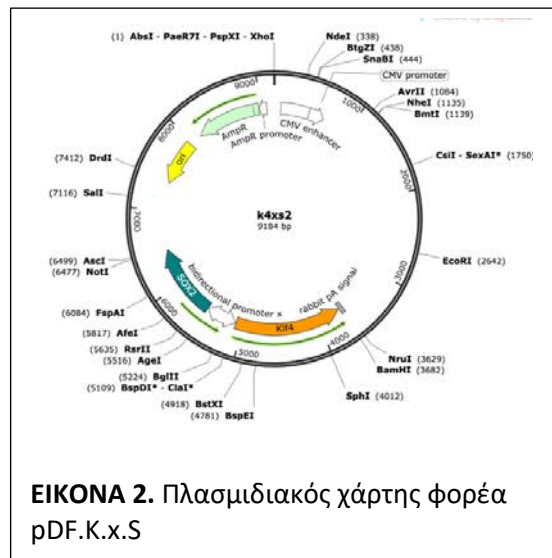
3.1 Κατασκευή Φορέων

Κατασκευάστηκαν 2 FV φορείς με κλασσικές μεθόδους μοριακής κλωνοποίησης, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι και η ακεραιότητα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των επιμέρους γενετικών στοιχείων ελέγχθηκε με αλληλούχιση κατά Sanger. Οι φορείς ήταν ο pDF.O4.x.M.IF και ο pDF.K.x.S. (Εικόνες 1 & 2).

Οι φορείς έφεραν ζεύγη γονιδίων υπό τον μεταγραφικό έλεγχο ενός αμφίδρομου



ΕΙΚΟΝΑ 1. Πλασμιδιακός χάρτης φορέα pDF.O4.x.M.IF



ΕΙΚΟΝΑ 2. Πλασμιδιακός χάρτης φορέα pDF.K.x.S

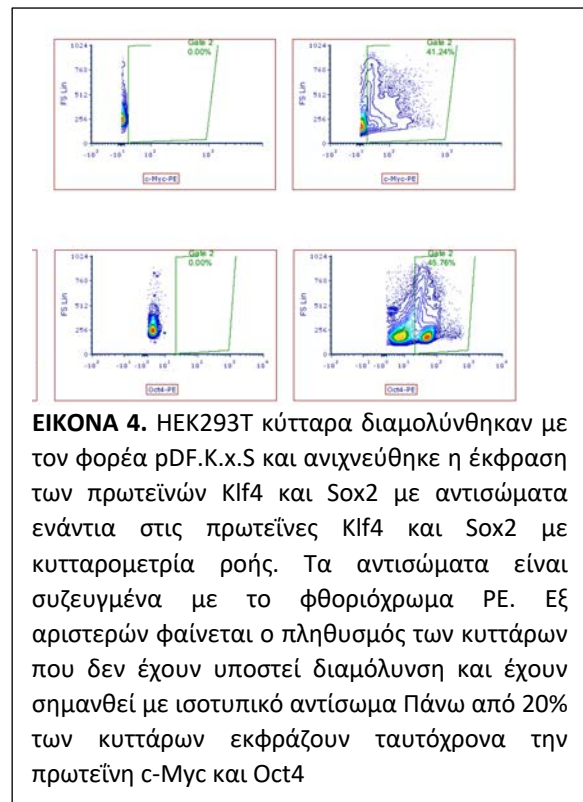
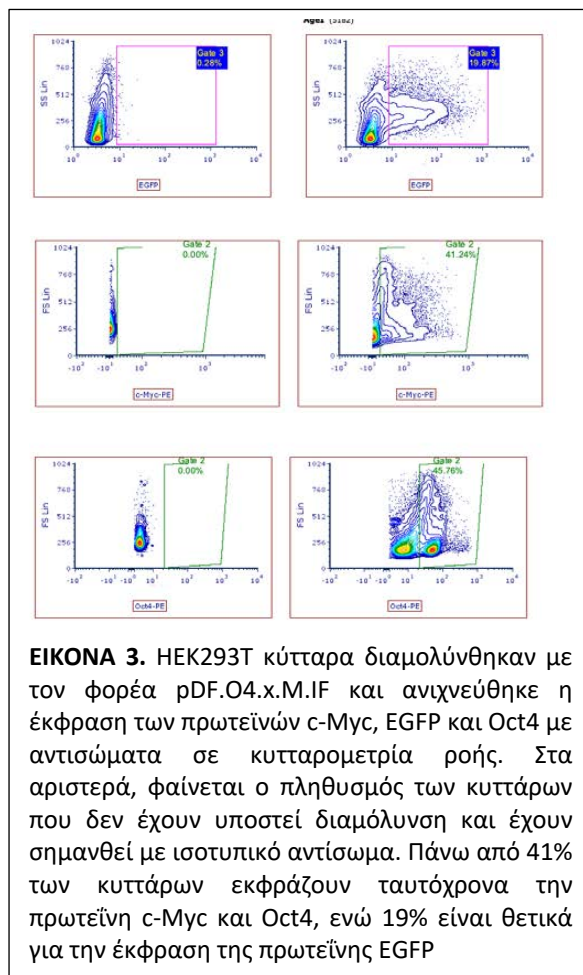
ανθρώπινου υποκινητή ο οποίος εδράζεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα X. Ο υποκινητής αυτός ελέγχει μεταγραφικά τα γονίδια *hnrh2* και *gla*, τα οποία μεταγράφονται με αντίθετο προσανατολισμό το ένα από το άλλο. Ο φορέας pDF.O4.x.M.IF περιέχει στην κασέτα έκφρασης τα γονίδια *oct4*, *c-myc* και *EGFP* υπό τον μεταφραστικό έλεγχο του στοιχείου IRES2. Ο φορέας pDF.K.x.S. φέρει τα γονίδια *klf4* και *sox2*. Ο υποκινητής x είναι ικανός να εκφράζει μετάγραφα και πρωτεΐνες σε αναλογία σχεδόν ένα προς ένα.

3.2 Λειτουργικός χαρακτηρισμός φορέων DF.O4.x.MIF και DF.K.x.S σε επίπεδο πλασμιδιακού DNA.

Αρχικά ελέγχθηκε η ικανότητα των φορέων σε επίπεδο DNA να παράγουν λειτουργικά μετάγραφα, τα οποία με την σειρά τους μεταφράζονταν στις πρωτεΐνες Oct4, c-Myc και EGFP (**Εικόνα 3**) και αντίστοιχα Klf4 και Sox2 (**Εικόνα 4**), με κυτταρομετρία ροής. Για τον λόγο αυτό 2×10^6 HEK293T κύτταρα υπέστησαν διαμόλυνση με 2μg πλασμιδιακού DNA από τους φορείς pDF.O4.x.M.IF και pDF.K.x.S. 48 ώρες αργότερα τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το υπόστρωμα καλλιέργειας μονιμοποιήθηκαν με 4% φορμαλδεΰδης και υπέστησαν ενδοκυττάρια χρώση με αντισώματα επίμους ενάντια στις πρωτεΐνες Oct4, c-Myc, Klf4 και Sox2. Τα αντισώματα ήταν συζευγμένα με το φθοριόχρωμα φυκοερυθρίνη (PE). Παράλληλα

ο φορέας pDF.O4.x.M.IF παράγει την πρωτεΐνη EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) η οποία παράγει πράσινο φθορισμό όταν διεγερθεί με φωτεινή πηγή με μήκος κύματος 488nm.

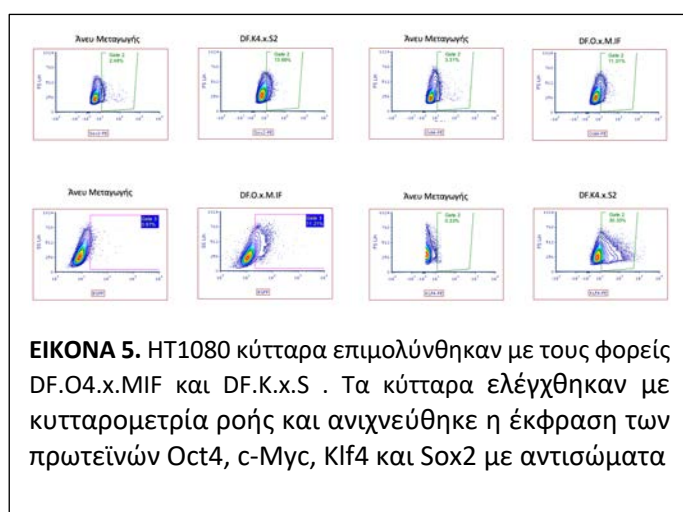
Μετά την χρώση τα κύτταρα αναλύονται με κυτταρομετρία ροής. Ο φορέας pDF.O4.x.M.IF έχει διαμολύνει 40% των κυττάρων HEK293T με τα επίπεδα της έκφρασης του c-Myc και του Oct4 να είναι συγκρίσιμα 41% και 45% αντίστοιχα. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης είναι χαμηλότερα 20%. Αυτό το χαμηλότερο επίπεδο έκφρασης μπορεί να παρατηρείται λόγω της μονιμοποίησης με φορμαλδεϋδη, η οποία επηρεάζει την τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης. Αντίστοιχα είναι τα αποτελέσματα από τα κύτταρα HEK293T που έχουν διαμολυνθεί με τον φορέα pDF.K.x.S εκφράζουν στα ίδια επίπεδα και τις δύο πρωτεΐνες Klf4 και Sox2, με 19% και 16% να εκφράζουν τις πρωτεΐνες αυτές αντίστοιχα.



3.3. Λειτουργικός χαρακτηρισμός FV φορέων επαναπρογραμματισμού.

Στη συνέχεια, έγινε παραγωγή ιών σε κύτταρα HEK293 και εξετάστηκε η ικανότητα των ιικών φορέων να επιμολύνουν επιτυχώς κυτταρικές σειρές και να επάγουν την υπερέκφραση των γονιδίων Klf4, Sox2, Oct4, c-Myc και EGFP. Για τον λόγο αυτό, 200μl ιικού υπερκειμένου από τους δύο φορείς DF.O4.x.MIF και DF.K.x.S χρησιμοποιήθηκε για να επιμολύνουν HT1080. Μετά από 72 ώρες, τα κύτταρα συλλέχθηκαν μονιμοποιήθηκαν με 4% φορμαλδεΰδη και υπέστησαν ενδοκυττάρια χρώση με αντισώματα για στις πρωτεΐνες Oct4, c-Myc, Klf4 και Sox2. Τα δείγματα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην

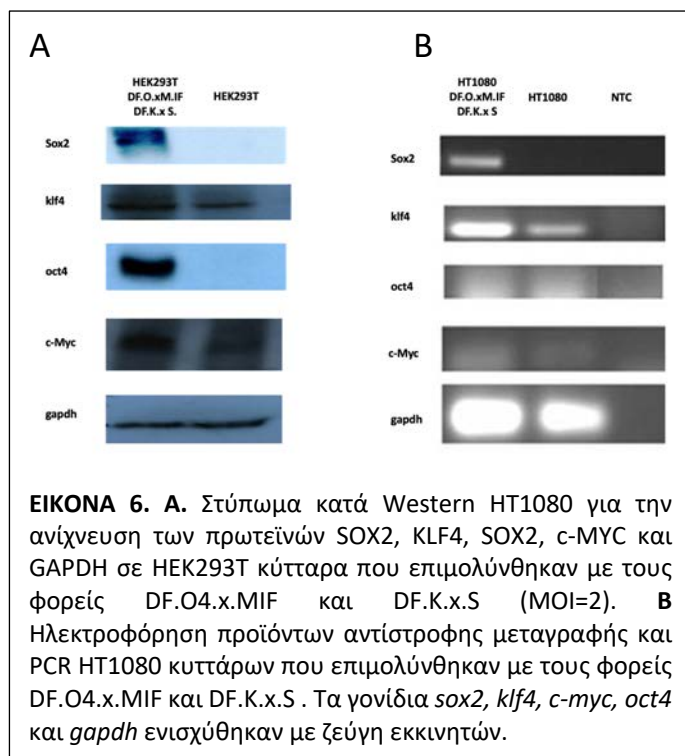
Εικόνα 5. Οι ιικοί φορείς είναι ικανοί να επάγουν την υπερέκφραση των πρωτεϊνών Klf4,



Sox2, c-Myc, Oct4 και EGFP. 10% των επιμολυσμένων κυττάρων υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Sox2, 30% την πρωτεΐνη Klf4, 10% την πρωτεΐνη Oct4 και αντίστοιχο ποσοστό την πρωτεΐνη EGFP.

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η ικανότητα των φορέων να υπερεκφράζουν τα γονίδια αυτά σε επίπεδο mRNA

(**Εικόνα 6A**) και πρωτεΐνης (**Εικόνα 6B**) με ανοσοαποτύπωμα κατά Western. HT1080 κύτταρα επιμολύνθηκαν με τους φορείς DF.O4.x.MIF και DF.K.x.S, 48 ώρες μετά την επιμόλυνση τα κύτταρα συλλέχθηκαν και απομονώθηκε ολικό RNA με την μέθοδο Trizol. 500ng ολικού RNA υπέστησαν αντίστροφη μεταγραφή και PCR με ζεύγη εκκινητών που στόχευαν τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των γονιδίων *sox2*, *klf4*, *c-myc*, *oct4* και *gapdh*. Οι αντιδράσεις υπόκεινται σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5% σε διάλυμα TAE. Η επιμόλυνση με τους ιικούς φορείς DF.O4.x.MIF και DF.K.x.S αύξησε την έκφραση των γονιδίων αυτών.



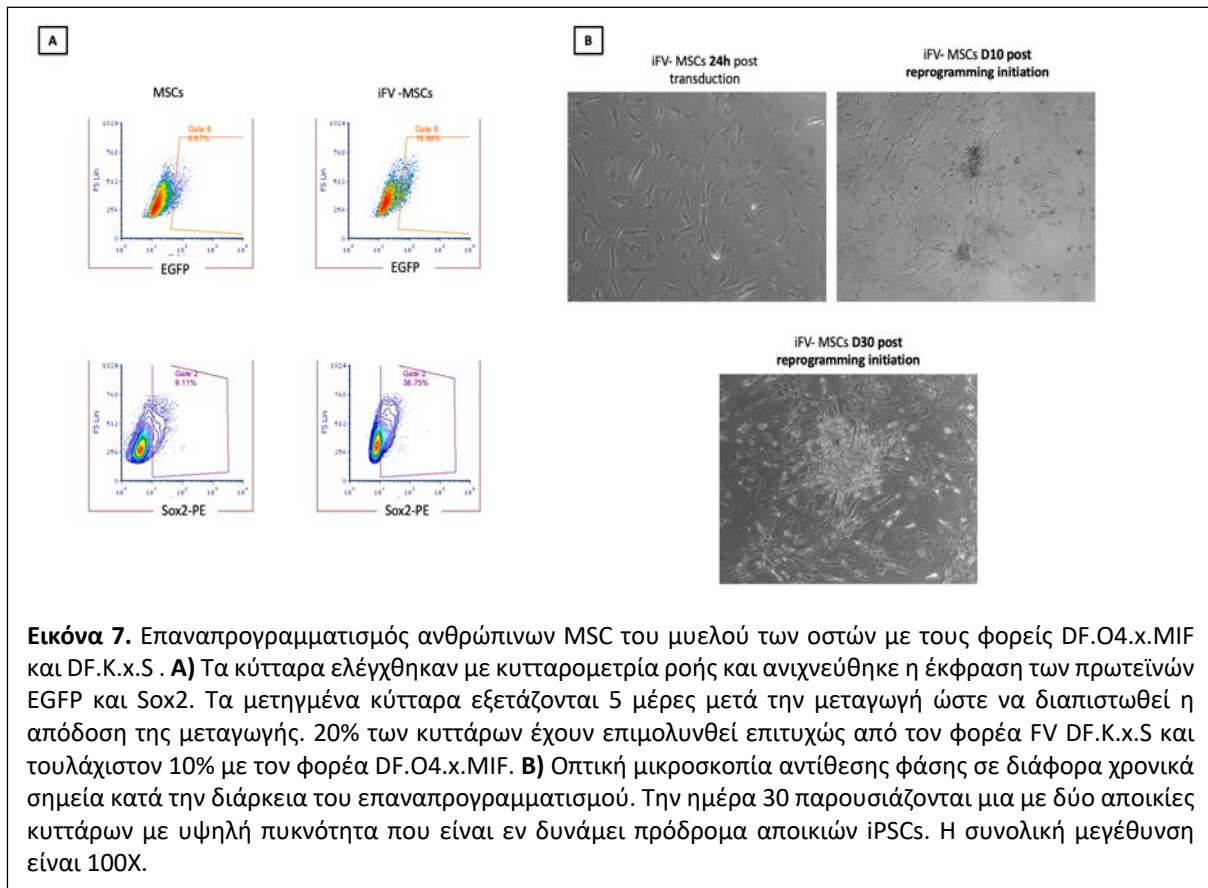
Για τον έλεγχο της έκφρασης της πρωτεΐνης, HEK293T κύτταρα επιμολύνθηκαν με τους φορείς DF.O4.x.MIF και DF.K.x.S με MOI=2 για κάθε φορέα. 3×10^6 κύτταρα συλλέχθηκαν απομονώθηκε ολική πρωτεΐνη από το κυτταρόλυμα και 10μg ολικής πρωτεΐνης υπέστησαν αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE), στύπώθηκαν σε μεμβράνη PVDF με ηλεκτρομεταφορά και στην συνέχεια αναλύθηκαν με ανοσοστύπωμα κατά Western με

αντισώματα που στοχεύουν τις πρωτεΐνες KLF4, SOX2, c-MYC, OCT4 και GAPDH. Παρατηρήθηκε ότι η επιμόλυνση με τους φορείς ήταν ικανή να επάγει την υπερέκφραση των πρωτεϊνών αυτών. την υπερέκφραση των πρωτεϊνών αυτών. MYC, OCT4 και GAPDH. Παρατηρήθηκε ότι η επιμόλυνση με τους φορείς ήταν ικανή να επάγει την υπερέκφραση των πρωτεϊνών αυτών. Εφόσον είχε ελεγχθεί η νουκλεοτιδική ακεραιότητα των φορέων σε επίπεδο DNA και η ικανότητά τους να επιμολύνουν κυτταρικές σειρές και να επάγουν την υπερέκφραση -εκτοπική έκφραση των τεσσάρων γονιδίων σε επίπεδο mRNA και σε επίπεδο πρωτεΐνης, οι φορείς χρησιμοποιήθηκαν συνδυαστικά (DF.O4.x.MIF και DF.K.x.S) για να επιμολύνουν ανθρώπινα κύτταρα: Μεσεγχυματικά Στρωματικά κύτταρα Μυελού οστών, Αρχεγονα αιμοποιητικά κύτταρα από ομφαλοπλακουντιακό αίμα και ινοβλάστες δέρματος, καθώς και την κυτταρική σειρά ινοβλαστών δέρματος NuFF με σκοπό τον επαναπρογραμματισμό και την κατασκευή επαγόμενων βλαστοκυττάρων (iPSCs).

Επαναπρογραμματισμός Μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων μυελού οστών

Μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα (MSC) του μυελού οστών υπέστησαν μεταγωγή με συμπυκνωμένα με υπερφυγοκέντρωση υπερκείμενα από τους δύο FV φορείς DF.O4.x.MIF και DF.K.x.S. Ο κάθε φορέας χρησιμοποιήθηκε σε MOI=3 για να επιμολύνει 4×10^4 MSC. MOI ορίζεται η πολλαπλότητα μόλυνσης ή αλλιώς πόσα ιοσωμάτια αντιστοιχούν σε συγκεκριμένο αριθμό κυττάρων. Επί παραδείγματι MOI=3 σημαίνει ότι χρησιμοποιούνται $1,2 \times 10^5$ ιοσωμάτια για να επιμολύνουν 4×10^4 MSC. Τα κύτταρα μετά την επιμόλυνση

καλλιιεργήθηκαν για 4-5 ημέρες και στην συνέχεια ανακαλλιιεργήθηκαν σε πλάκες με βοθρία 10cm² (6-well plates) που είχαν επιστρωθεί με gelatin 1% με θρεπτικό μέσο iPS-F12-butyrate (150uM) (10ng/ml bFGF). Η αλλαγή του θρεπτικού μέσου γινόταν καθημερινά, ενώ ανά δεύτερη μέρα πραγματοποιήθηκε αλλαγή θρεπτικού μέσου. Οι καλλιιεργειες διήρκεσαν 40 ημέρες και ενδεικτικά αποτελέσματα από την μεταγωγή των κυττάρων όπως αναλύθηκε με κυτταρομετρία και οπτική μικροσκοπία αντίθεσης φάσης παρουσιάζονται στην **Εικόνα 7**.

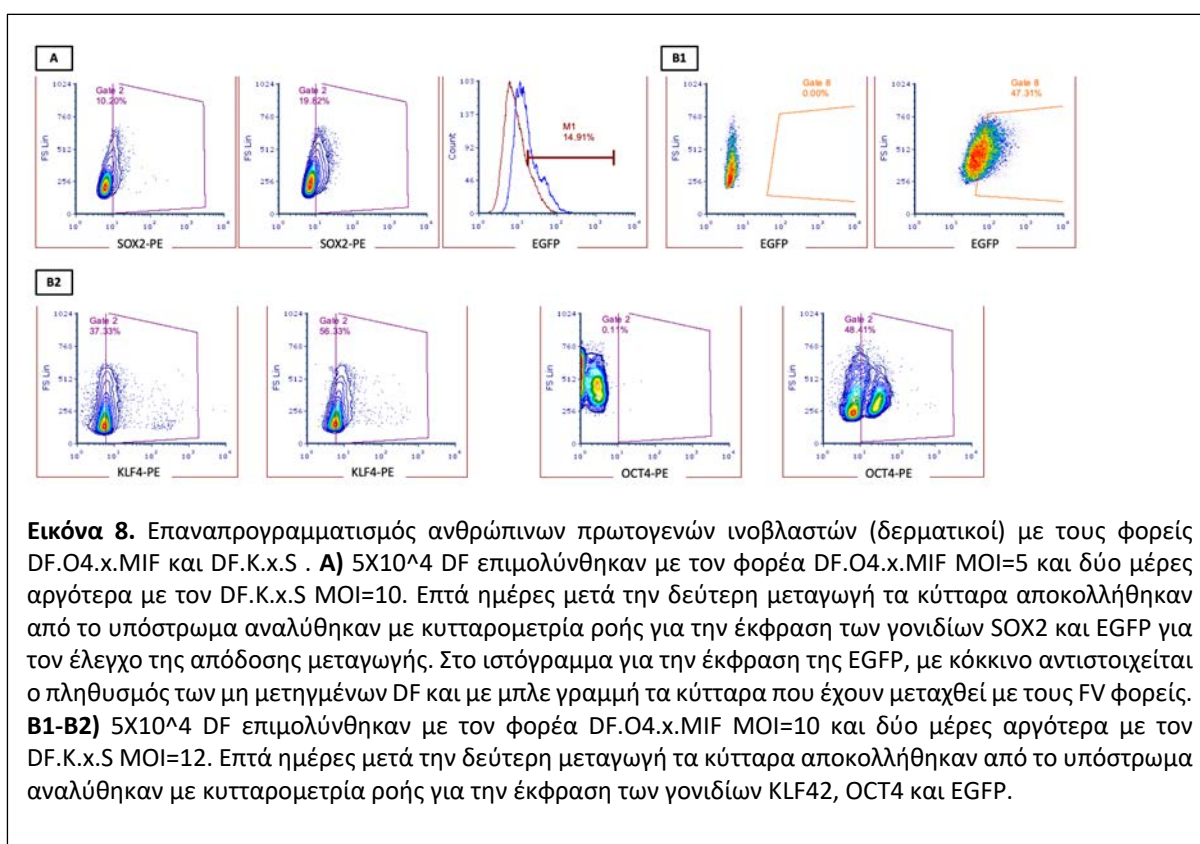


Εικόνα 7. Επαναπρογραμματισμός ανθρώπινων MSC του μυελού των οστών με τους φορείς DF.O4.x.MIF και DF.K.x.S. **A)** Τα κύτταρα ελέγχθηκαν με κυτταρομετρία ροής και ανιχνεύθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών EGFP και Sox2. Τα μετεγμένα κύτταρα εξετάζονται 5 μέρες μετά την μεταγωγή ώστε να διαπιστωθεί η απόδοση της μεταγωγής. 20% των κυττάρων έχουν επιμολυνθεί επιτυχώς από τον φορέα FV DF.K.x.S και τουλάχιστον 10% με τον φορέα DF.O4.x.MIF. **B)** Οπτική μικροσκοπία αντίθεσης φάσης σε διάφορα χρονικά σημεία κατά την διάρκεια του επαναπρογραμματισμού. Την ημέρα 30 παρουσιάζονται μια με δύο αποικίες κυττάρων με υψηλή πυκνότητα που είναι εν δυνάμει πρόδρομα αποικιών iPSCs. Η συνολική μεγέθυνση είναι 100X.

Τα κύτταρα σταδιακά πολλαπλασιάζονται με μικρότερη ταχύτητα. Εμφανίζουν αποικίες με κύτταρα των οποίων η οργάνωση είναι άναρχη, μεταβάλλεται η αναλογία πυρήνα κυτταροπλάσματος (αυξάνει) και εμφανίζουν αυξημένη πυκνότητα. Παρόλα αυτά οι αποικίες δεν μεγαλώνουν γρήγορα, είναι ασταθείς, είναι ισχυρά προσκολλημένες στο υπόστρωμα είτε αν τα κύτταρα αποκολλώνται μηχανικά είτε αν τα κύτταρα αποκολλούνται με ενζυμική λύση. Κατά την ανακαλλιιεργεια σε βοθρία με Matrigel -GFR και θρεπτικό μέσον TERS-E1 τα κύτταρα υπόκεινται σε διαφοροποίηση και αναστροφή κυτταρικού τύπου. Για τον λόγο αυτό επιχειρήθηκε επαναπρογραμματισμός ανθρώπινων ινοβλαστών δέρματος είτε πρωτογενών κυττάρων DF είτε της κυτταρικής σειράς ανθρώπινων ινοβλαστών NuFF.

Επαναπρογραμματισμός ανθρώπινων πρωτογενών ινοβλαστών DF (dermal fibroblasts).

Πρωτογενείς ανθρώπινοι ινοβλάστες DF υπέστησαν μεταγωγή με τους φορείς FV DF.O4.x.MIF και DF.K.x.S. Στην **Εικόνα 8** παρουσιάζονται δεδομένα από δύο ενδεικτικά πειράματα. Στο πρώτο πείραμα 5×10^4 DF επιμολύνθηκαν με τον φορέα DF.O4.x.MIF MOI=5 και δύο μέρες αργότερα με τον DF.K.x.S MOI=10. Τα υπερκείμενα είχαν συμπυκνωθεί με υπερφυγοκέντρωση. Επτά ημέρες μετά την δεύτερη μεταγωγή τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το υπόστρωμα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την έκφραση των γονιδίων SOX2 και EGFP για τον έλεγχο της απόδοσης μεταγωγής. Στην συνέχεια επιστρώθηκαν σε βοθρία 10cm² τα οποία είχαν επιστρωθεί με Matrigel-GFR. Η πυκνότητα των κυττάρων κατά την



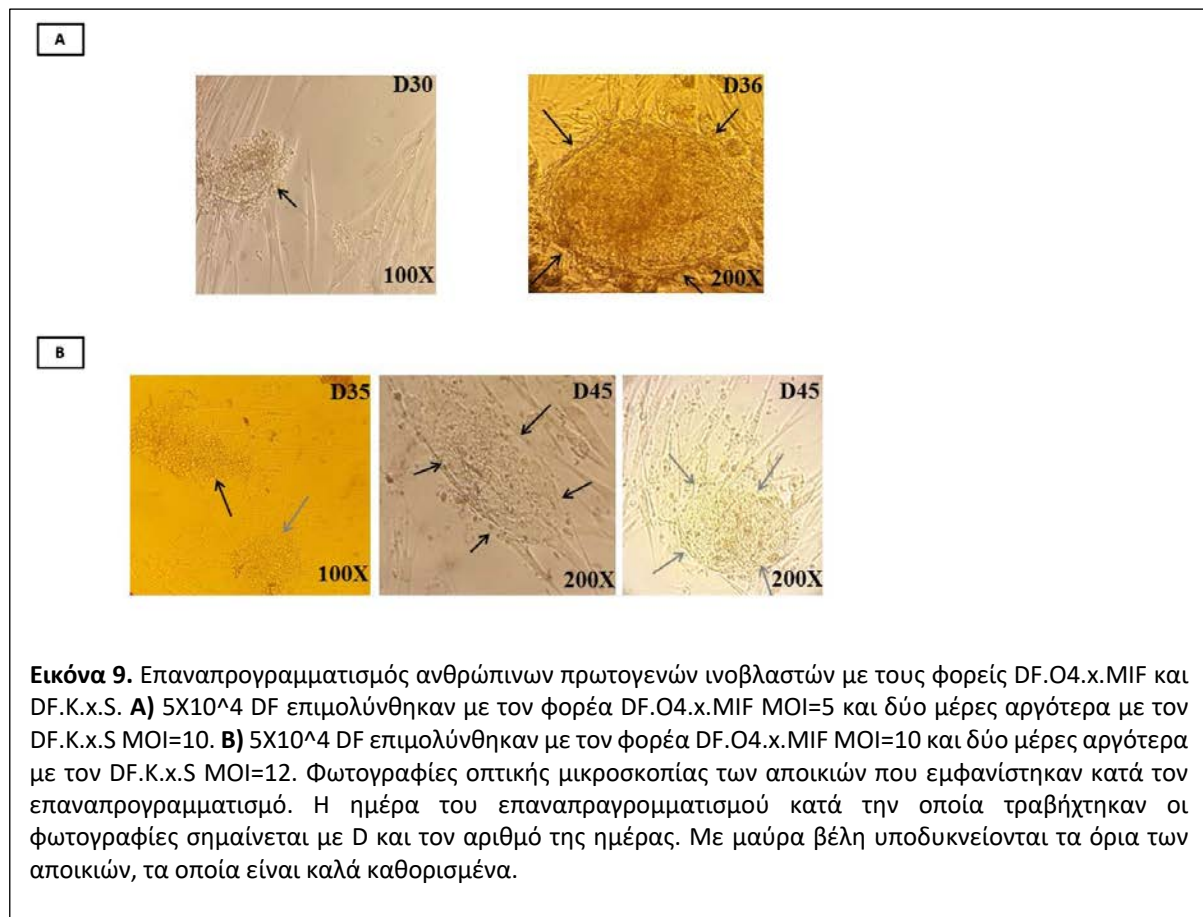
Εικόνα 8. Επαναπρογραμματισμός ανθρώπινων πρωτογενών ινοβλαστών (δερματικοί) με τους φορείς DF.O4.x.MIF και DF.K.x.S . **A)** 5×10^4 DF επιμολύνθηκαν με τον φορέα DF.O4.x.MIF MOI=5 και δύο μέρες αργότερα με τον DF.K.x.S MOI=10. Επτά ημέρες μετά την δεύτερη μεταγωγή τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το υπόστρωμα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την έκφραση των γονιδίων SOX2 και EGFP για τον έλεγχο της απόδοσης μεταγωγής. Στο ιστόγραμμα για την έκφραση της EGFP, με κόκκινο αντιστοιχείται ο πληθυσμός των μη μεταγμένων DF και με μπλε γραμμή τα κύτταρα που έχουν μεταχθεί με τους FV φορείς. **B1-B2)** 5×10^4 DF επιμολύνθηκαν με τον φορέα DF.O4.x.MIF MOI=10 και δύο μέρες αργότερα με τον DF.K.x.S MOI=12. Επτά ημέρες μετά την δεύτερη μεταγωγή τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το υπόστρωμα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την έκφραση των γονιδίων KLF4, OCT4 και EGFP.

επίστρωση ήταν 4×10^4 και καλλιεργήθηκαν με θρεπτικό μέσο επαναπρογραμματισμού TESR-E7 με την προσθήκη 200μM βουτυρικού. Την ημέρα 12 μετά την έναρξη του επαναπρογραμματισμού τα κύτταρα αποκολλήθηκαν με διάλυμα 1mM EDTA -PBS και επιστρώθηκαν σε δύο νέα βοθρία που είχαν επικαλυφθεί με Matrigel (αναλογία 1:2). Η καλλιέργεια διήρκεσε 36 ημέρες με 2 αποικίες να εμφανίζονται την ημέρα 30. Την ημέρα 40 η αποικία υπέστη διαφοροποίηση και αναστροφή φαινοτύπου. Η αποικία είχε ξεκάθαρα

όρια αλλά δεν είχε σταθεροποιηθεί και δεν πολλαπλασιαζόταν ταχέως, μάλλον επρόκειτο για ενδιάμεσο επαναπρογραμματισμού.

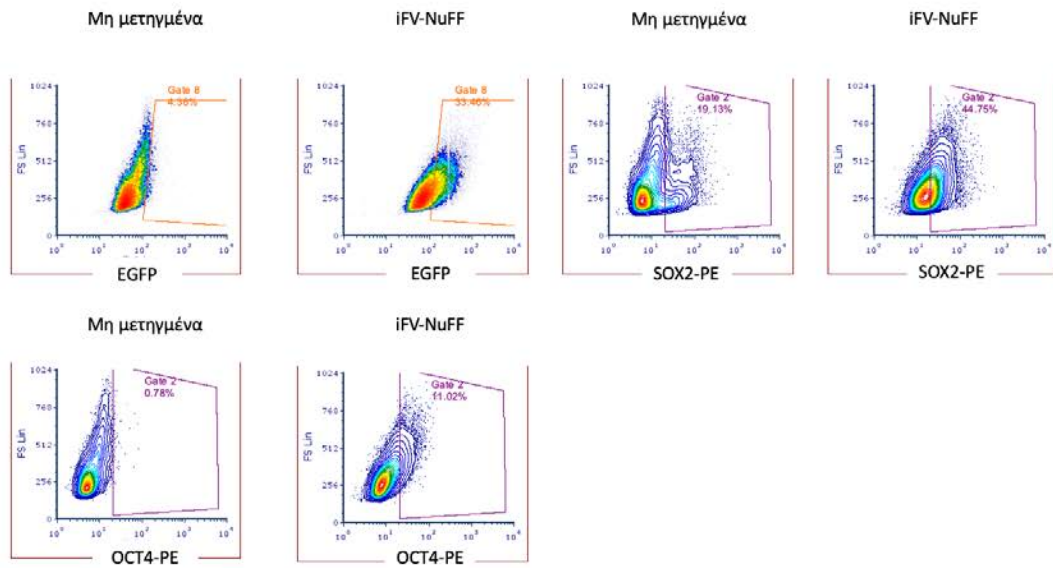
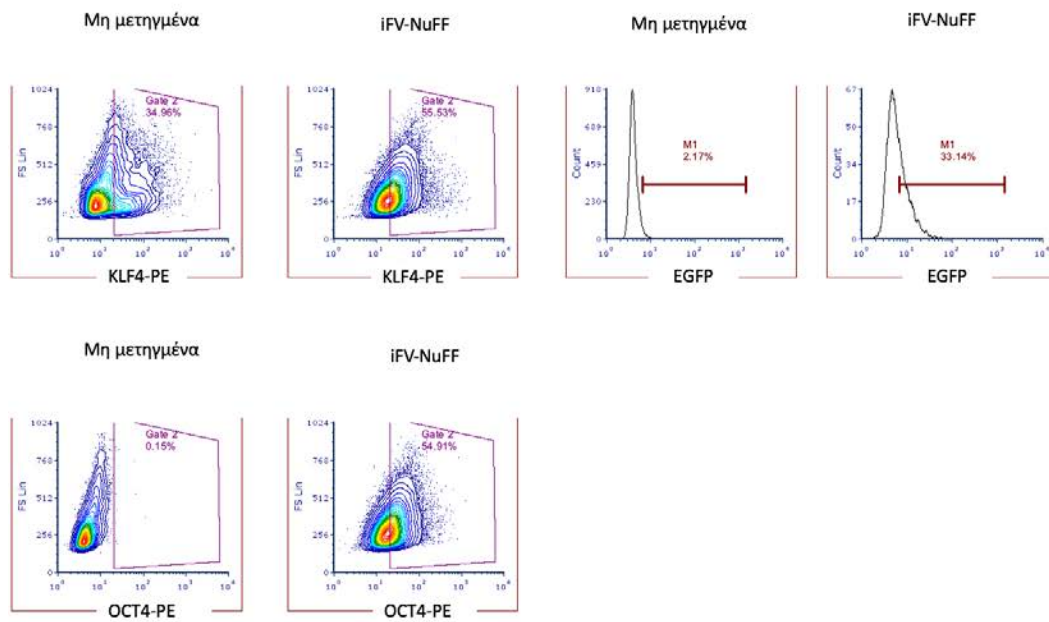
Αντίστοιχα σε δεύτερο πείραμα το οποίο παρουσιάζεται στην **Εικόνα 9**, 5×10^4 DF επιμολύνθηκαν με τον φορέα DF.O4.x.MIF MOI=10 και δύο μέρες αργότερα με τον DF.K.x.S MOI=12. Ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται παραπάνω. Η καλλιέργεια του επαναπρογραμματισμού διήρκεσε 45 ημέρες. Την ημέρα 47 τα κύτταρα αποκολλήθηκαν και επιστρώθηκαν σε νέα βοθρία όπου και οι αποικίες διαφοροποιήθηκαν. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα αρχικά κύτταρα ήταν «γηρασμένα» με γενιά p10. Σε ένα από τα βοθρία που προέκυψαν από το δεύτερο πείραμα πραγματοποιήθηκε χρώση αλκαλικής φωσφατάσης στις αποικίες (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Οι αποικίες ήταν ασθενώς θετικές που είναι δείκτης μερικού επαναπρογραμματισμού των κυττάρων.

Συνολικά, οι φορείς FV είναι ικανοί να επιμολύνουν τα DF κύτταρα σε ικανοποιητικό ποσοστό για το πρώτο πείραμα πάνω από 15% των κυττάρων ήταν θετικά για την έκφραση της πρωτεΐνης SOX2 και EGFP. Στο δεύτερο πείραμα το ποσοστό μεταγωγής ήταν υψηλότερο από 40% και για όλους τους παράγοντες υπό διερεύνηση OCT4, KLF4 και EGFP. Το γεγονός των αποτυχημένων προσπαθειών επαναπρογραμματισμού μας οδήγησε να διερευνήσουμε εναλλακτικές πηγές κυττάρων για το σύστημα επαναπρογραμματισμού, όπως τα κύτταρα NuFF που είναι επίσης κυτταρική σειρά νεογνικών ανθρώπινων ινοβλαστών, η οποία όμως έχει μεγαλύτερη «βλαστικότητα» σε σχέση με τα πρωτογενή δερματικής προέλευσης κύτταρα.



Επαναπρογραμματισμός ανθρώπινων ινοβλαστών NuFF (foreskin fibroblasts).

Τα νεογνικά κύτταρα NuFF επιμολύνθηκαν με τους φορείς FV DF.O4.x.MIF και DF.K.x.S. Στην **Εικόνα 10** παρουσιάζονται δεδομένα από δύο ενδεικτικά πειράματα. Στο πρώτο πείραμα 5×10^4 NuFF επιμολύνθηκαν με τον φορέα DF.O4.x.MIF MOI=12 και δύο μέρες αργότερα με τον DF.K.x.S MOI=12. Τα υπερκείμενα είχαν συμπυκνωθεί με υπερφυγοκέντρωση. Επτά ημέρες μετά την δεύτερη μεταγωγή τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το υπόστρωμα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την έκφραση των γονιδίων SOX2, OCT4 και EGFP για τον έλεγχο της απόδοσης μεταγωγής. Στην συνέχεια επιστρώθηκαν σε βοθρία 10cm² τα οποία είχαν επιστρωθεί με Matrigel-GFR. Η πυκνότητα των κυττάρων κατά την επίστρωση ήταν 4×10^4 και καλλιεργήθηκαν με θρεπτικό μέσο επαναπρογραμματισμού TESR-E7 με 200μM βουτυρικού. Την ημέρα 12 μετά την έναρξη του επαναπρογραμματισμού τα κύτταρα αποκολλήθηκαν με διάλυμα 1mM EDTA -PBS και επιστρώθηκαν σε δύο νέα βοθρία που είχαν επικαλυφθεί με Matrigel (αναλογία 1:2) Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε και την ημέρα 20. Η καλλιέργεια διήρκεσε 40 ημέρες.

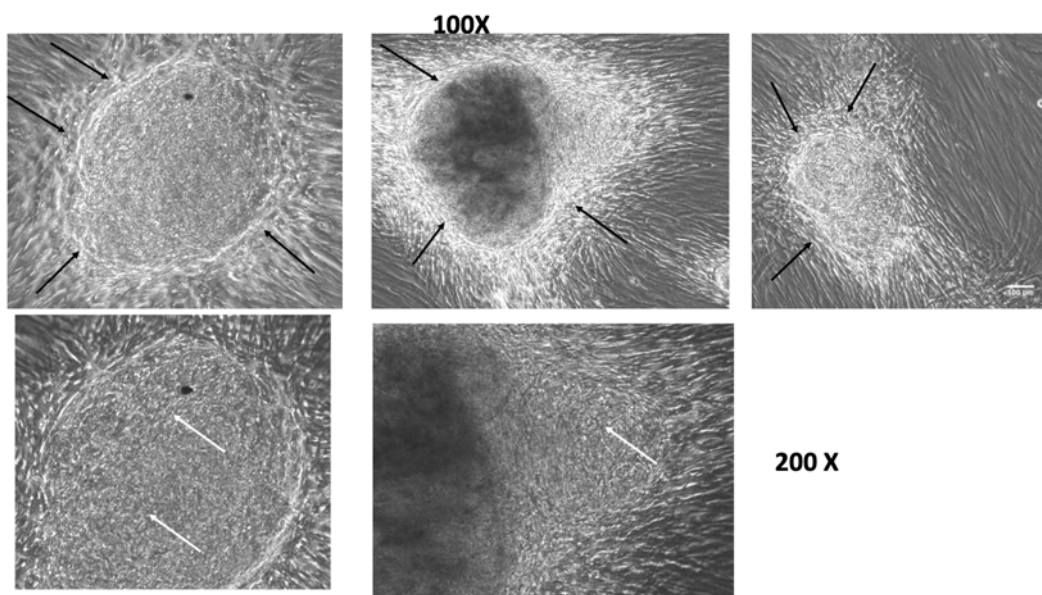
A**B**

Εικόνα 10. Επαναπρογραμματισμός ανθρώπινων πρωτογενών ινοβλαστών NuFF με τους φορείς DF.O4.x.MIF και DF.K.x.S . **A)** 5×10^4 NuFF επιμολύνθηκαν με τον φορέα DF.O4.x.MIF MOI=12 και δύο μέρες αργότερα με τον DF.K.x.S MOI=12. Επτά ημέρες μετά την δεύτερη μεταγωγή τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το υπόστρωμα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την έκφραση των γονιδίων SOX2, OCT4 και EGFP για τον έλεγχο της απόδοσης μεταγωγής. **B)** 5×10^4 NuFF επιμολύνθηκαν με τον φορέα DF.O4.x.MIF MOI=25 και δύο μέρες αργότερα με τον DF.K.x.S MOI=25. Επτά ημέρες μετά την δεύτερη μεταγωγή τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το υπόστρωμα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την έκφραση των γονιδίων KLF42, OCT4 και EGFP για τον έλεγχο της απόδοσης μεταγωγής.

Σε ένα επόμενο πείραμα 5×10^4 NuFF επιμολύνθηκαν με τον φορέα DF.O4.x.MIF MOI=25 και δύο μέρες αργότερα με τον DF.K.x.S MOI=25. Επτά ημέρες μετά την δεύτερη μεταγωγή τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το υπόστρωμα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την έκφραση των γονιδίων KLF42, OCT4 και EGFP για τον έλεγχο της απόδοσης μεταγωγής. Στη συνέχεια επιστρώθηκαν σε βοθρία 10cm² τα οποία είχαν επιστρωθεί με Matrigel-GFR (**Εικόνα 11**). Η πυκνότητα των κυττάρων κατά την επίστρωση ήταν 4×10^4 και καλλιιεργήθηκαν με θρεπτικό μέσο επαναπρογραμματισμού TERS-E7 με 200μM βουτυρικού. Την ημέρα 12 μετά την έναρξη της καλλιέργειας, τα κύτταρα αποκολλήθηκαν με διάλυμα 1mM EDTA -PBS και επιστρώθηκαν σε δύο νέα βοθρία που είχαν επικαλυφθεί με Matrigel (αναλογία 1:2) Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε και την μέρα 20. Η καλλιέργεια διήρκεσε 40 ημέρες.

Οι φορείς FV είναι ικανοί να επιμολύνουν τα NuFF κύτταρα σε ικανοποιητικό ποσοστό για το πρώτο πείραμα πάνω από 24% των κυττάρων παρουσιάζουν αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης SOX2, ένα 11% αυτών εκφράζουν OCT4 και 30% EGFP. Στο δεύτερο πείραμα το ποσοστό μεταγωγής ήταν υψηλότερο από 20% για το KLF4, 30% για την EGFP και πάνω από 40% για την OCT4. Λόγω της εγγενούς δράσης του υποκινητή x μπορούμε να υποθέσουμε ότι ο παράγοντας SOX2 εκφράζεται σε ίση αναλογία με τον KLF4, δηλαδή 20% και αντίστοιχα για τον παράγοντα c-Myc 'ότι η έκφραση του αυξάνει σε 40% των κυττάρων όπως και του OCT4.

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 11** τα κύτταρα NuFF έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την δομή και το μέγεθος των αποικιών. 30 μέρες μετά την εκκίνηση της διαδικασίας του επαναπρογραμματισμού παρατηρήθηκε ο σχηματισμός μεγάλων αποικιών με μεγάλη αναλογία πυρήνα-κυτταροπλάσματος, με ξεκάθαρα όρια αποικιών. Ωστόσο, προέκυψαν παρόμοια προβλήματα όπως και με τις προηγούμενες προσπάθειες. Πιο συγκεκριμένα οι αποικίες ήταν ασταθείς παρόλο που τα κύτταρα πολλαπλασιάζονταν ταχέως ειδικά μετά την διαδικασία αποκόλλησης την ημέρα 20 του επαναπρογραμματισμού.



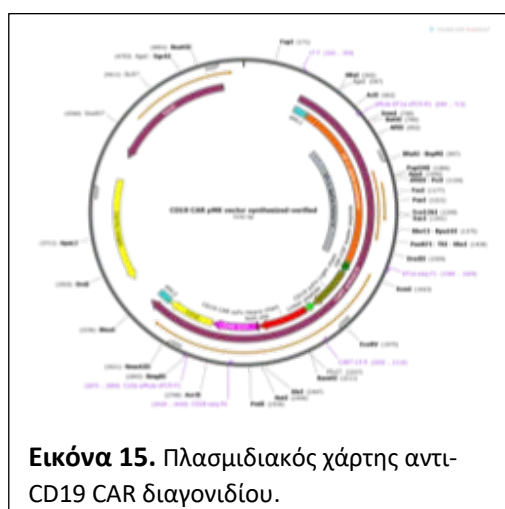
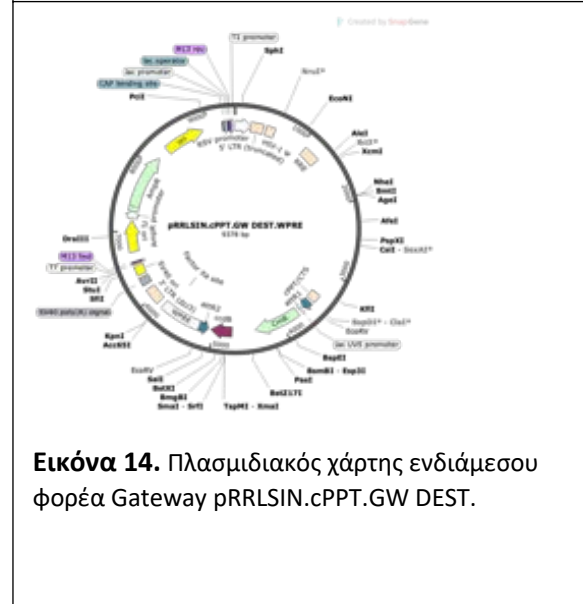
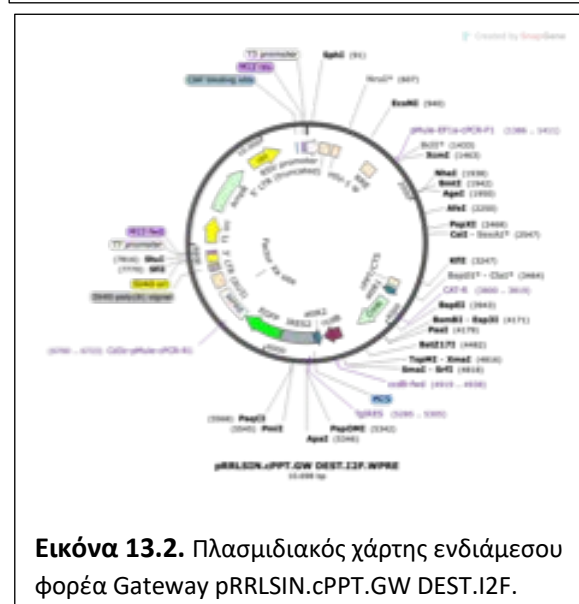
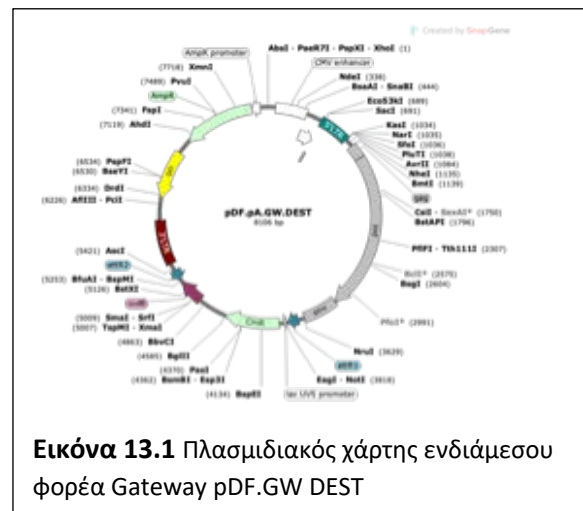
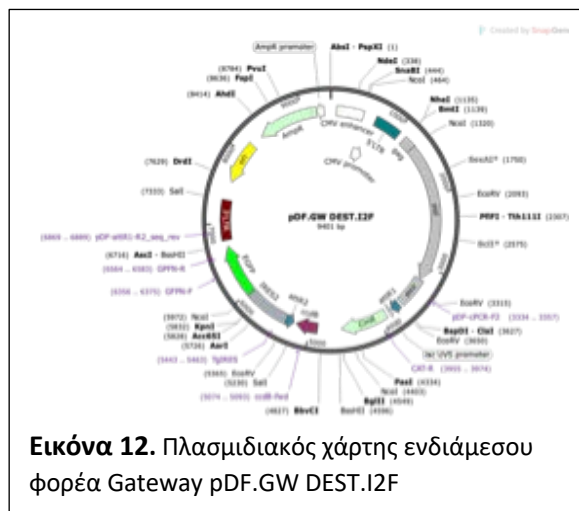
Εικόνα 11 Επαναπρογραμματισμός ανθρώπινων πρωτογενών ινοβλαστών NuFF με τους φορείς DF.O4.x.MIF και DF.K.x.S . 5×10^4 NuFF επιμολύνθηκαν με τον φορέα DF.O4.x.MIF MOI=25 και δύο μέρες αργότερα με τον DF.K.x.S MOI=25. Τριάντα μέρες μετά την έναρξη του πρωτοκόλλου επαναπρογραμματισμού προκύπτουν αποικίες διαφόρων μεγεθών από 100 μ m έως και πάνω από 300 μ m. Τα όρια των αποικιών είναι ευδιάκριτα (μαύρα βέλη). Ενδεικτικές φωτογραφίες αποικιών σε δύο τελικές μεγεθύνσεις 100X και 200X. Με τα λευκά βέλη τονίζονται τα κύτταρα που απαρτίζουν την αποικία τα οποία έχουν μορφή σφαιρική με μεγάλη αναλογία πυρήνα προς κυτταρόπλασμα και υψηλή κυτταρική πυκνωση που φαίνεται στο «κέντρο» της αποικίας. Η δομές αυτές είναι χαρακτηριστικές πρώιμων αποικιών iPSCs οι οποίες απαιτούν 4-5 ανακαλλιέργειες για να σταθεροποιηθούν και να γίνουν «πραγματικές» αποικίες iPSCs

3.4. Κατασκευή φορέων LV και FV για την παραγωγή αντι-CD19 CAR T κυττάρων από μονάδες ΟΠΑ και περιφερικού αίματος.

3.4.1 Κατασκευή φορέων FV και LV dest για χρήση με το σύστημα κλωνοποίησης Gateway.

Λόγω του γεγονότος ότι οι κασέτα έκφρασης των χιμαιρικών αντιγονικών υποδοχέων αποτελείται από πολλαπλά γονιδιακά τμήματα, τα οποία έχουν μεγάλο γενετικό φορτίο συνήθως μεγαλύτερου των 3kbp προτιμήθηκε η χρήση του συστήματος Gateway.

Κατασκευάστηκαν τέσσερις πρόδρομοι ενδιάμεσοι φορείς οι pDF.GWDEST.I2F, pDF.GWDEST, pRRLSIN.cPPT.GWDEST.I2F και ο pRRLSIN.cPPT.GWDEST, οι πλασμιδιακοί χάρτες των οποίων απεικονίζονται στις **Εικόνες 12 14**.

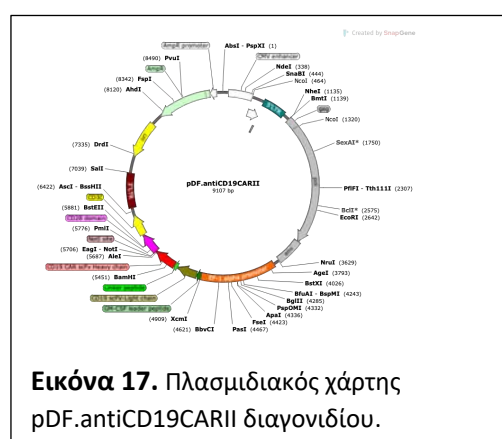
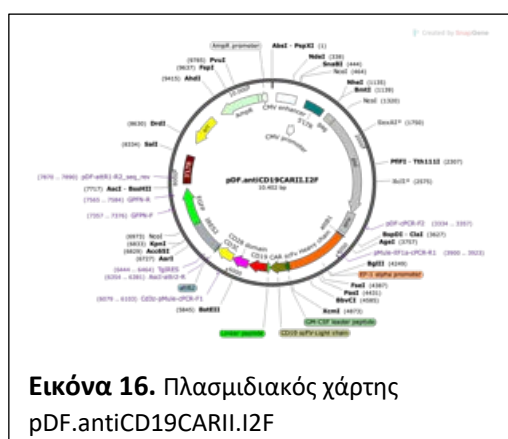


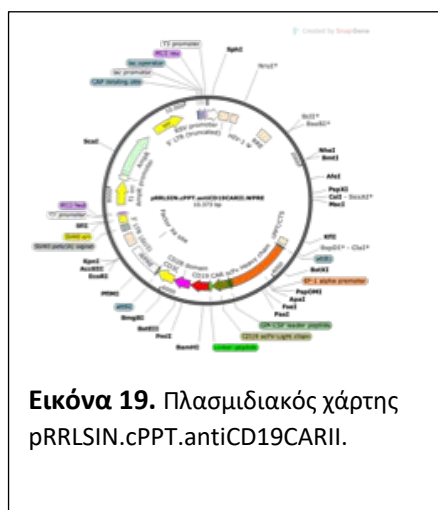
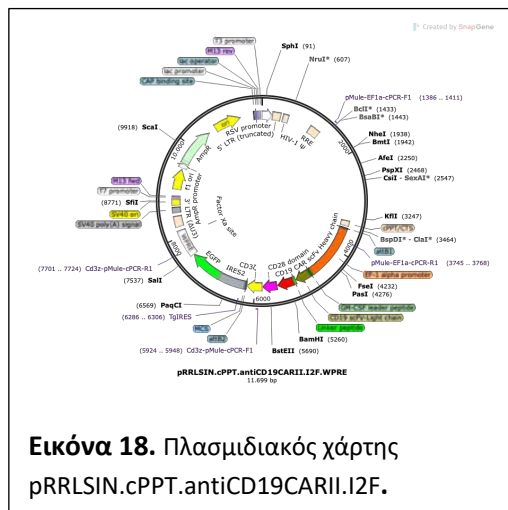
Η διαγονιδιακή κασσέτα που κωδικοποιεί τον αντι-CD19 CAR υποδοχέα απεικονίζεται στον πλασμιδιακό χάρτη του φορέα pMK της **Εικόνας 15**. Μεταξύ των αλληλουχιών attL1 και attL2 έχουν συντεθεί από την εταιρεία GeneART τα επιμέρους γενετικά στοιχεία που απαρτίζουν την κασέτα έκφρασης: Η έκφραση της κασσέτας βρίσκεται υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του υποκινητή EF1a με το ιντρόνιό του. Η πρωτεΐνη του CAR στοχεύεται στην

κυτταρική μεμβράνη μέσω ενός σηματοδοτικού πεπτιδίου στόχευσης στην μεμβράνη που προέρχεται από τον κυτταροκίνη GM-CSF. Ακολουθεί το scFV από το αντίσωμα επίμου του κλώνου FMC63 το οποίο διαθέτει ειδικότητα ενάντια στο ανθρώπινο αντιγόνο επιφανείας

CD19. Η περιοχή scFV απαρτίζεται από τις κωδικοποιούσες αλληλουχίες DNA της ελαφριάς και βαριάς αλυσίδας του FMC63 οι οποίες ενώνονται μεταξύ τους από έναν εύκαμπτο σύνδεσμο μεταξύ τους από 7 επαναλήψεις του διπεπτιδίου γλυκίνης-σερίνης. Αυτός ο εύκαμπτος σύνδεσμος επιτρέπει στις επιμέρους πρωτεϊνικές περιοχές που προκύπτουν από την μετάφραση των 2 αλυσίδων να αναδιπλωθούν και να υιοθετήσουν την «φυσιολογική» τριτοταγή δομή του αντισώματος στον εξωκυττάριο χώρο. Η μετάδοση σήματος στον ενδοκυττάριο χώρο μεσολαβείται από την διαμεμβρανική περιοχή του CD28 και επίσης κωδικοποιείται και η συνδιεγερτική ενδοκυττάρια περιοχή του μορίου. Τέλος η σηματοδότηση που ενεργοποιεί το T λεμφοκύτταρο παρέχεται από την περιοχή-αλυσίδα CD3ζ.

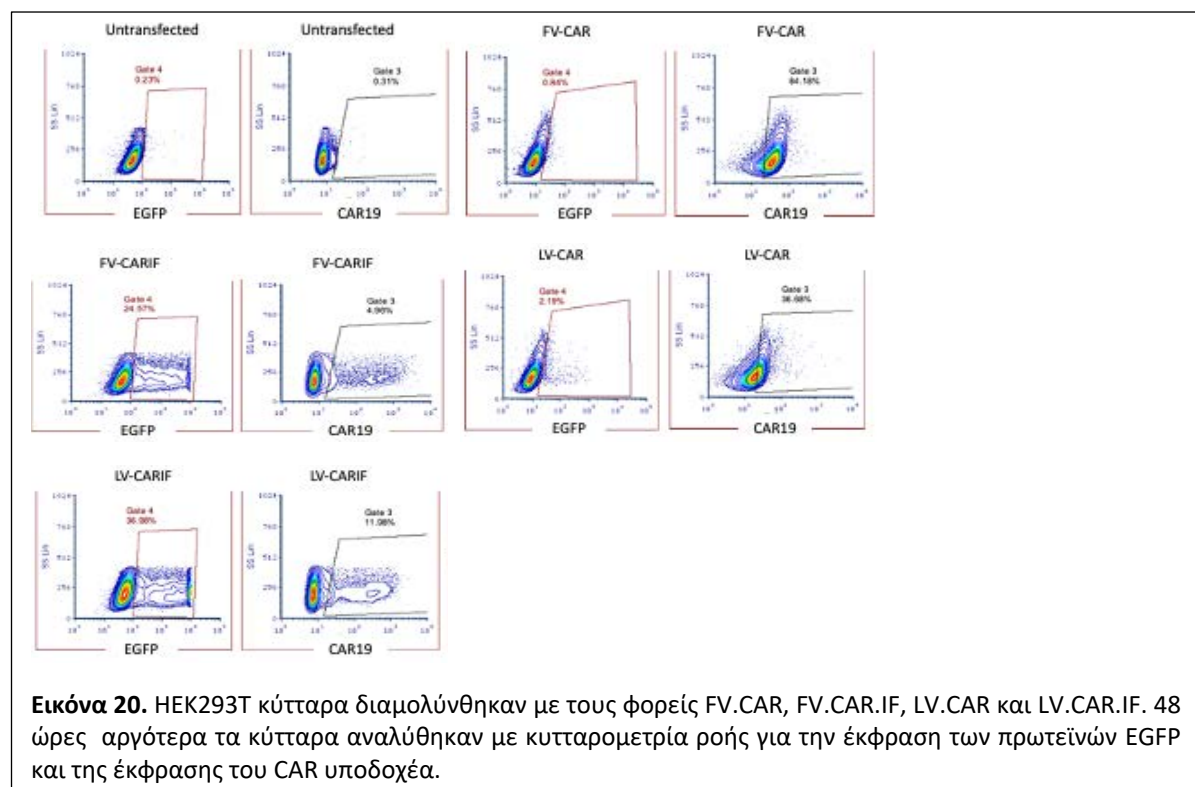
Οι ενδιάμεσοι φορείς Gateway ανασυνδυάζονται με τον φορέα pMK μέσω αντίδρασης κλωνάσης LR και προκύπτουν τέσσερις ρετροϊικοί φορείς έκφρασης του CAR19. Δυο FV φορείς οι pDF.antiCD19CARII.I2F, pDF.antiCD19CARII και δύο LV φορείς οι pRRLSIN.cPPT.antiCD19CARII.I2F και pRRLSIN.cPPT.antiCD19CARII, οι χάρτες των οποίων εικονίζονται στις **Εικόνες 16-19**. Οι pDF.antiCD19CARII.I2F και pRRLSIN.cPPT.antiCD19CARII.I2F είναι δικιστρονικοί και εκφράζουν επιπλέον την πρωτεΐνη EGFP. Εφεξής οι φορείς pDF.antiCD19CARII.I2F και pDF.antiCD19CARII θα αναφέρονται αντίστοιχα ως FV.CAR.IF και FV.CAR. Αντίστοιχα οι pRRLSIN.cPPT.antiCD19CARII.I2F και pRRLSIN.cPPT.antiCD19CARII ως LV.CAR.IF και LV.CAR.



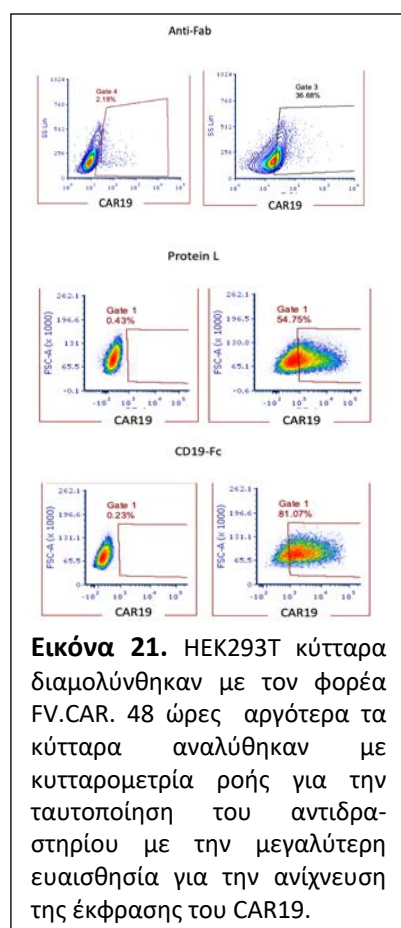


3.4.2. Λειτουργικός χαρακτηρισμός φορέων FV.CAR.IF , FV.CAR, LV.CAR.IF και LV.CAR σε επίπεδο πλασμιδιακού DNA.

Αρχικά ελέγχθηκε η ικανότητα των φορέων σε επίπεδο DNA να παράγουν λειτουργικά μεταγράφα του CAR και EGFP, τα οποία με την σειρά τους μεταφράζονται στον χιμαιρικό αντιγονικό υποδοχέα και στην πρωτεΐνη EGFP **(Εικόνα 20)** με κυτταρομετρία ροής. Για τον λόγο αυτό 2×10^6 HEK293T κύτταρα υπέστησαν διαμόλυνση με 2μg πλασμιδιακού DNA με τους φορείς FV.CAR.IF , FV.CAR, LV.CAR.IF και LV.CAR. 48 ώρες αργότερα τα υπόκεινται σε χρώση με αντίσωμα ε



μεταβλητή περιοχή αντισώματος Fab και δύναται να ανιχνεύσει έμμεσα τον CAR υποδοχέα. Μετά την χρώση τα κύτταρα αναλύονται με κυτταρομετρία ροής. Ο φορέας FV.CAR έχει διαμολύνει 84% των κυττάρων και ο LV.CAR 36,68%. Αντίστοιχα, ο φορέας FV.CAR.IF διαμόλυνε 24,6% των κυττάρων. Το 24,6% έκφραζε EGFP, η έκφραση του CAR ανιχνεύεται σε 4,9% των κυττάρων αυτών. Ο φορέας LV.CAR.IF διαμολύνει 37% των κυττάρων σύμφωνα με τα EGFP+ κύτταρα, ωστόσο μόνο 12% των κυττάρων εκφράζει CAR υποδοχέα. Επειδή παρατηρούνταν συχνά τέτοιες διακυμάνσεις και επειδή η απόδοση της διαμόλυνσης ήταν χαμηλότερη της αναμενόμενης, ίσως η χρήση αντισωμάτων για την ανίχνευση του CAR να μην είναι βέλτιστη. Για τον λόγο αυτό συγκρίθηκε η απόδοση των αντισωμάτων για την ανίχνευση του CAR με άλλα αντιδραστήρια όπως είναι η πρωτεΐνη L και ανασυνδυασμένη χιμαιρική πρωτεΐνη CD19- ανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη (CD19-Fc chimeric protein).



2x10⁶ HEK293T κύτταρα υπέστησαν διαμόλυνση με 2μg πλασμιδιακού DNA με τον φορέα FV.CAR. 48 ώρες αργότερα τα κύτταρα αποκολλούνται από το υπόστρωμα καλλιέργειας, χωρίζονται σε 3 μέρη και υπόκεινται ξεχωριστά σε χρώση με αντίσωμα ενάντια στη μεταβλητή περιοχή αντισώματος Fab σημασμένο με PE, με σύμπλοκο protein L-biotin και ανιχνεύεται με σύμπλοκο streptavidin-PE και hrCD10-Fc chimeric protein και ανιχνεύεται με anti-human IgG-PE αντίσωμα, το οποίο προσδένεται στο Fc τμήμα της πρωτεΐνης. Μετά την χρώση τα κύτταρα αναλύονται με κυτταρομετρία ροής (**Εικόνα 21**). Με το anti-Fab αντίσωμα 36,7% είναι θετικά για την έκφραση του CAR υποδοχέα. Με την πρωτεΐνη L έκφραση του CAR ανιχνεύεται στο 54,75% των κυττάρων και με την CD19 χιμαιρική πρωτεΐνη η έκφραση του CAR ανιχνεύεται στο 81% των κυττάρων που είναι και το αναμενόμενο ποσοστό απόδοσης της διαμόλυνσης. Μετά από το πείραμα αυτό φαίνεται

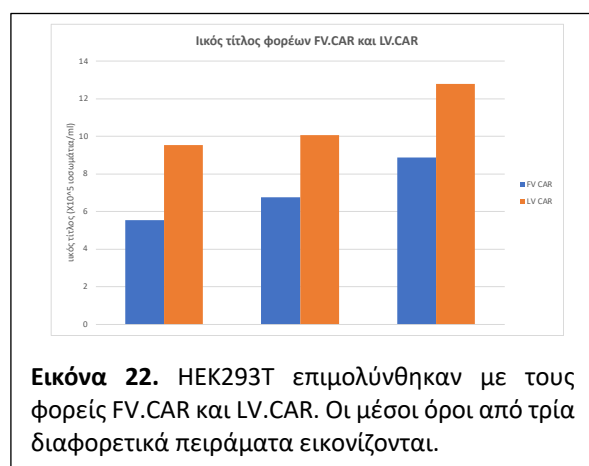
ξεκάθαρα ότι η πιο ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης είναι εκείνη με την χιμαιρική CD19 πρωτεΐνη και /ή με την πρωτεΐνη L παρόλο που και εκείνη υποεκτιμά την πραγματική έκφραση του CAR υποδοχέα. Η πρωτεΐνη L προέρχεται από το βακτήριο *Protein L Peptostreptococcus magnus* και προσδένει μη ειδικά τις τύπου κάπα ελαφριές αλυσίδες από

τα αντισώματα επίμυος και για το λόγο αυτό είναι λιγότερο ευαίσθητη στην διαφορά δομής που μπορεί να υπάρχει μεταξύ «φυσικού» αντισώματος και της τρισδιάστατης δομής του scFv του CAR υποδοχέα.

3.4.3 Ιικοί τίτλοι φορέων FV.CAR και LV.CAR.

Στη συνέχεια, έγινε παραγωγή ιών σε κύτταρα HEK293T και εξετάστηκε η ικανότητα των ικών φορέων να επιμολύνουν επιτυχώς κυτταρικές σειρές και να επάγουν την έκφραση του CAR υποδοχέα. Για τον λόγο αυτό, 100μl, 50μl και 25μl ιικού υπερκειμένου από τους δύο φορείς FV.CAR και LV.CAR χρησιμοποιήθηκαν για να επιμολύνουν 10^5 HEK293T. Μετά από 72 ώρες, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και υπέστησαν χρώση με CD19-Fc πρωτεΐνη. Τα δείγματα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Ενδεικτικά αποτελέσματα από τρεις τιτλοδοτήσεις φαίνονται στην **Εικόνα 22**.

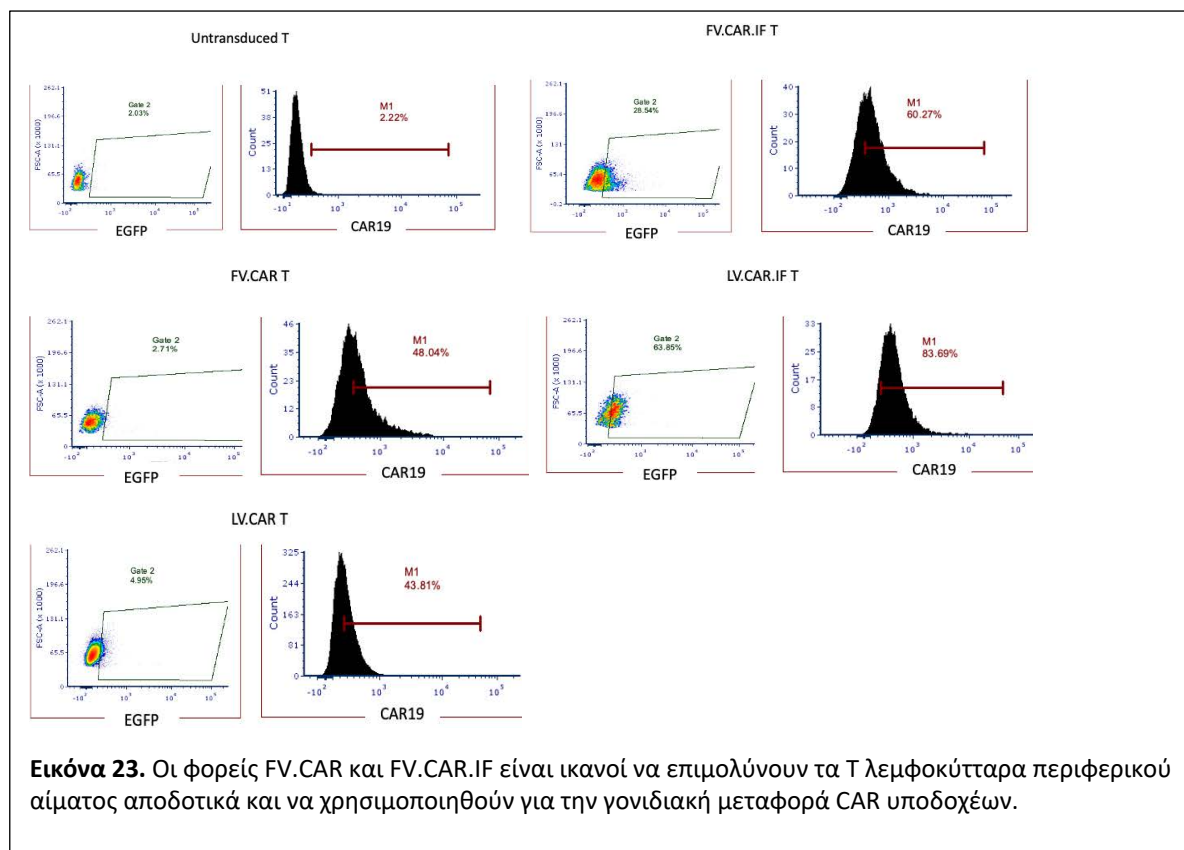
Οι λειτουργικοί τίτλοι των φορέων FV.CAR και FV.CAR.IF κυμαίνονταν μεταξύ $5,5-8,87 \times 10^5$ TU/ml, αντίστοιχα εκείνοι των φορέων LV.CAR και LV.CAR.IF κυμαίνονταν μεταξύ $0,95-1,27 \times 10^6$ TU/ml. Οι φορείς FV παράγουν υψηλούς ιικούς τίτλους για τους φορείς με τις



κασσέτες έκφρασης CAR19 ικανούς μετά από συμπύκνωση να ξεπεράσουν 10^7 TU/ml. Επίσης τα επίπεδα των μη συμπυκνωμένων FV ικών φορέων είναι συγκρίσιμα με εκείνα των LV φορέων.

3.4.4. Διαμόλυνση Τ-λεμφοκυττάρων. Οι FV φορείς είναι ικανοί να επιμολύνουν ανθρώπινα Τ λεμφοκύτταρα με υψηλή

απόδοση και συγκρίσιμη με εκείνη που επιτυγχάνουν οι LV φορείς. Μετά από συμπύκνωση των ικών υπερκειμένων είτε με υπερφυγοκέντρωση είτε με την μέθοδο TFF, οι συμπυκνωμένοι ιικοί φορείς χρησιμοποιούνται για να επιμολύνουν ανθρώπινα Τ λεμφοκύτταρα από διαφορετικές πηγές όπως από μονάδες ομφαλοπλακουντιακού αίματος και από περιφερικό αίμα (**Εικόνα 23**).

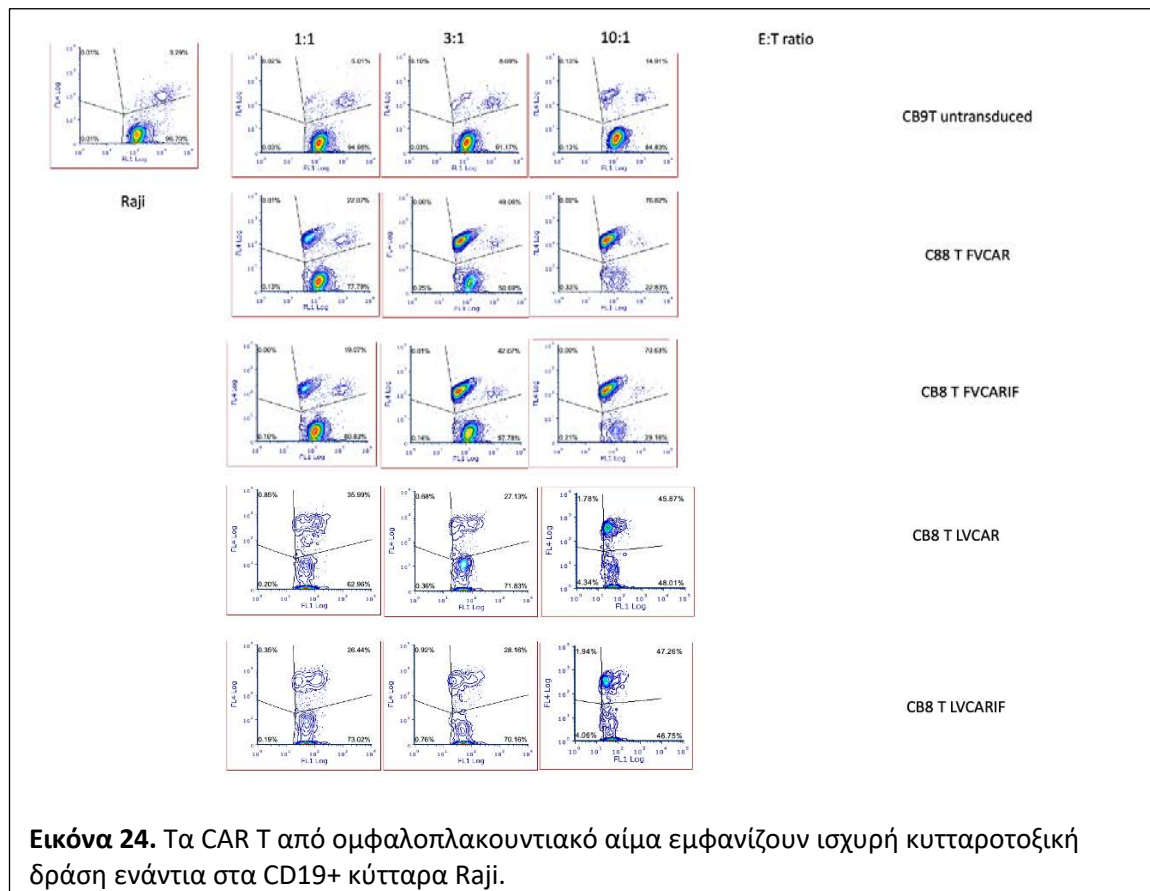


Οι διαμολύνσεις με τους FV/LV φορείς έχουν γίνει παρουσία Ηπαρίνης χαμηλού μοριακού βάρους. Οι FV.CAR και FV.CAR.IF παρουσία ηπαρίνης μπορούν να επιμολύνουν 48% και 60% των T λεμφοκυττάρων, ενώ οι φορείς LV.CAR και LV.CAR.IF, 44% και 84% αντίστοιχα. Φαίνεται ότι οι FV και LV φορείς είναι ικανοί να μεταγουν εξίσου αποδοτικά ανθρώπινα T λεμφοκύτταρα για την έκφραση CAR υποδοχέων.

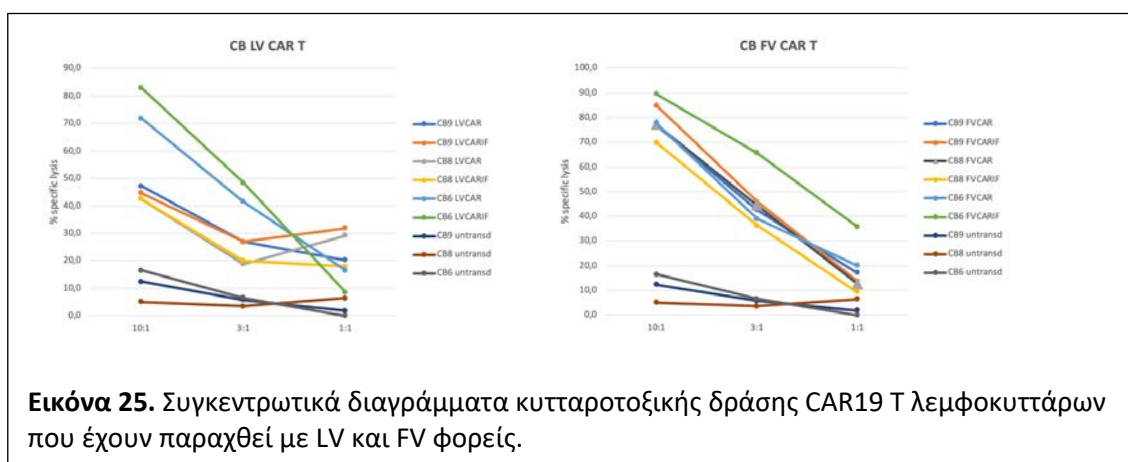
3.4.5. Κυτταροτοξικότητα: Τα CAR19 T κύτταρα που παράγονται με FV φορείς εμφανίζουν ισχυρή κυτταροτοξική δράση ενάντια σε CD19+ κυτταρικές σειρές.

Λεμφοκύτταρα προερχόμενα από μονάδες ΟΠΑ επιμολύνθηκαν με τους φορείς FV σε MOI=3-5 παρουσία ηπαρίνης και LV φορείς με MOI=10. 10 μέρες μετά την επιμόλυνση και την επέκταση των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν δοκιμές κυτταροτοξικότητας ενάντια σε κύτταρα λεμφώματος Burkitt Raji. Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν υψηλά επίπεδα CD19 στην μεμβράνη τους. Τα CAR T κύτταρα επώαστηκαν σε διαφορετικές αναλογίες δραστικών κυττάρων: κύτταρα στόχους για 18h (**Εικόνα 24**). Για την διάκριση των κυττάρων στόχων από τα CAR T κύτταρα, τα κύτταρα Raji σημαίνονται με την χρωστική CFSE. Επιπλέον για την

διάκριση μεταξύ ζωντανών και νεκρών κυττάρων τα κύτταρα σημαίνονται με την χρωστική 7AAD προ της κυτταρομετρικής ανάλυσης.

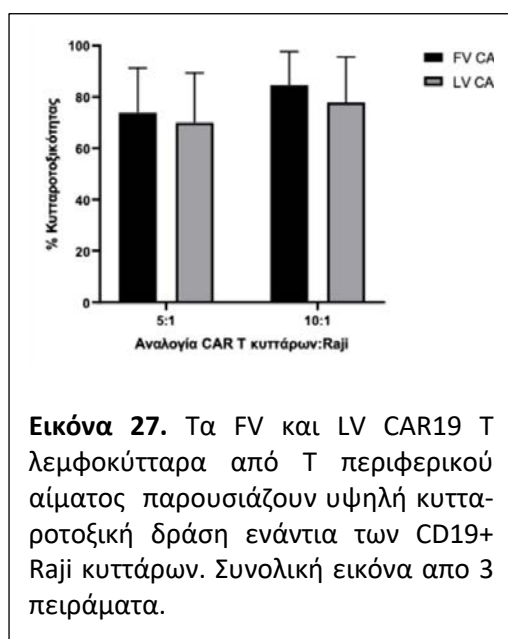
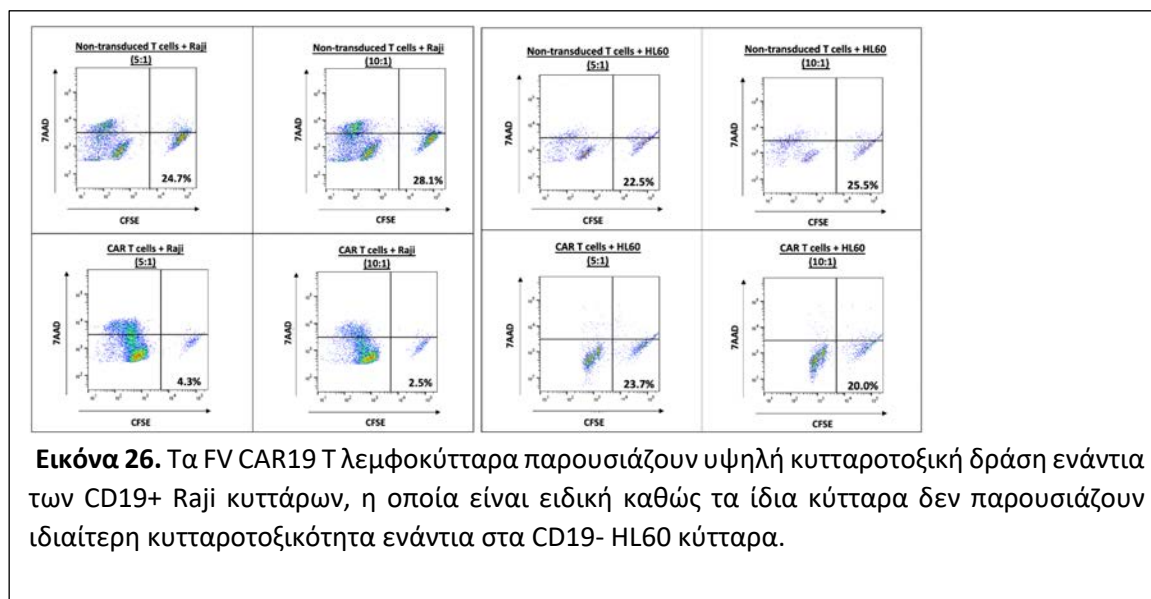


Τα CAR19 T κύτταρα που έχουν παραχθεί από μονάδες ομφαλοπλακουντιακού αίματος με FV φορείς παρουσιάζουν υψηλή κυτταροτοξική δράση που φτάνει και το 90% και είναι συγκρίσιμα με τα CAR19 T προέρχονται από LV φορείς (**Εικόνα 25**).



Στη συνέχεια ως πηγή T λεμφοκυττάρων για την παραγωγή CAR19 T κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το περιφερικό αίμα. Τα T λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος

παρουσίαζαν τα ίδια επίπεδα μεταγωγής με εκείνα που προέρχονταν από το περιφερικό αίμα και για τους FV και για τους LV φορείς (**Εικόνα 27**). Σε δοκιμές κυτταροτοξικότητας ενάντια στην κυτταρική σειρά Raji (CD19+) τα FV CAR19 T κύτταρα επιδεικνύουν υψηλή κυτταροτοξικότητα η οποία είναι ειδική, καθώς ενάντια στην κυτταρική σειρά HL60 (που είναι CD19 αρνητικά) δεν παρουσιάζουν κυτταροτοξική δράση (**Εικόνα 26**).

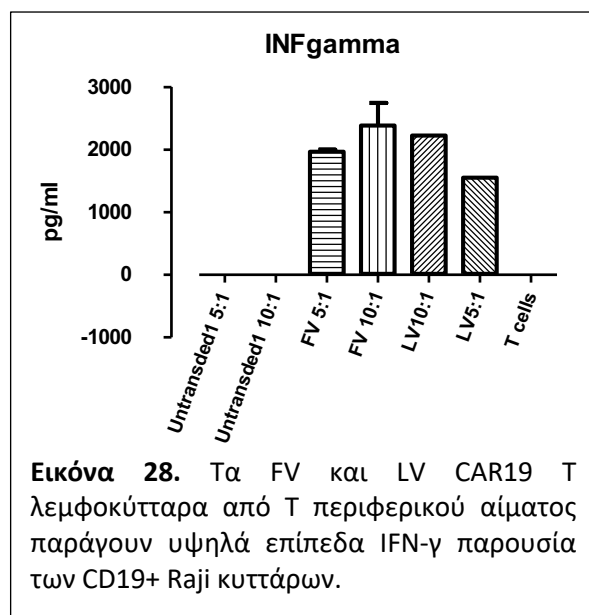


Τα CAR19 T λεμφοκύτταρα από περιφερικό αίμα που παράγονται με LV και FV φορείς παρουσιάζουν υψηλή κυτταροτοξικότητας που φτάνει το 85% για τα FV CAR19 T λεμφοκύτταρα και αντίστοιχα 78% για τα LV CAR19 T. Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι οι φορείς FV είναι ικανοί να μεταφέρουν αποδοτικά σε T λεμφοκύτταρα την κασσέτα αντι-CD19 CAR υποδοχέα. Τα CAR T κύτταρα που παράγονται είναι εξίσου αποδοτικά σε δοκιμές *in vitro* κυτταροτοξικότητας με τα CAR T που έχουν παραχθεί με LV φορείς. Επιπλέον, τα πειράματα δείχνουν ότι η αρχική πηγή

λεμφοκυττάρων μπορεί να είναι είτε οι μονάδες ΟΠΑ είτε το περιφερικό αίμα.

3.4.6. Τα FV CAR19 T κύτταρα παράγουν IFN-γ.

Επιπλέον για τον λειτουργικό χαρακτηρισμό των CAR19 T κυττάρων μετρήθηκε η παραγωγή IFN-γ από την συγκαλλιέργεια CAR19 T κυττάρων με τα CD19+ κύτταρα Raji για 24 ώρες (Εικόνα 28). Τα επίπεδα IFN-γ στα υπερκείμενα των συγκαλλιεργειών μετρώνται με ELISA. Τα FV CAR19 T κύτταρα παράγουν πάνω από 2ng/ml, όπως και τα LV CAR19 T κύτταρα. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με εκείνα της κυτταροτοξικότητας που παρουσιάστηκαν



Εικόνα 28. Τα FV και LV CAR19 T λεμφοκύτταρα από T περιφερικού αίματος παράγουν υψηλά επίπεδα IFN-γ παρουσία των CD19+ Raji κυττάρων.

παραπάνω. Οι φορείς FV παράγουν εξίσου αποδοτικά CAR T κύτταρα με τους LV φορείς. Επιπλέον παρατηρείται ότι τα CAR T κύτταρα παρουσιάζουν μεγάλη ειδικότητα καθώς τα παραγόμενα επίπεδα από μη μετηγμένα κύτταρα παρουσία των κυττάρων Raji είναι μηδαμινά. Επιπλέον η παραγωγή της IFN-γ δεν είναι απότοκο της ενεργοποίησης των T κυττάρων που προηγήθηκε για την μεταγωγή των T κυττάρων με τους FV και LV φορείς, καθώς τα μη μετηγμένα T

λεμφοκύτταρα δεν φαίνεται να παράγουν από μόνα τους IFN-γ.

3.4.7. Ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός των CAR19 T κυττάρων.

Τέλος, στα CAR19 T λεμφοκύτταρα έγινε ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμό με κυτταρομετρία ροής (Πίνακας). 10 μέρες μετά την μεταγωγή μετρήθηκε το ποσοστό των T βοηθητικών κυττάρων (CD4+), των T κυτταροτοξικών (CD8+), της έκφρασης του CD45RO+

		Non-transduced (%)	FV CAR (%)	LV CAR (%)
	% CD4 ⁺	85	85	83
	% CD8 ⁺	12	10	11
Gate on CD4 ⁺ cells	% CD45RO ⁺	99.4	99	98
	% PD1 ⁺	89.8	85	34
Gate on CD8 ⁺ cells	% CD45RO ⁺	98.1	99	99
	% PD1 ⁺	40.2	27	11

Πίνακας. Ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός FV και LV CAR19 T λεμφοκυττάρων από T κύτταρα περιφερικού αίματος

(κύτταρα μνήμης TSCM, TCM), καθώς και του αντιγόνου επιφανείας PD-1 που αποτελεί έναν από τους δείκτες εξουθένωσης των T λεμφοκυττάρων. Παρατηρείται ότι η μεταγωγή και η

ενεργοποίηση των T κυττάρων δεν μεταβάλλει την συχνότητα των CD4+ και CD8+ κυττάρων στα CAR19+

FV και LV CAR19 T λεμφοκύτταρα. Η παρουσία της IL7 και IL15 κατά την καλλιέργεια διατηρεί τα κύτταρα στην πλειονότητά τους να διατηρούν ένα φαινότυπο TCM (CD45RO+) και για τα Th και για Tcyt, ανεξάρτητα από τον φορέα που χρησιμοποιείται για τον φορέα παραγωγής των CAR T. Η έκφραση του αντιγόνου PD-1 είναι υψηλότερη στα CD4+ FV CAR19 T (85%) έναντι στα LV CAR19T λεμφοκύτταρα. Ωστόσο η τάση αυτή δεν παρατηρείται στα CD8+ CAR T κύτταρα, 27% των CD8+ FV CAR19 T είναι PD-1+, ενώ 11% των CD8+ LV CAR19 T εκφράζουν PD-1. Από μόνη της η έκφραση του PD-1 δεν μπορεί να εκτιμηθεί ως δείκτης εξουθένωσης των T λεμφοκυττάρων, καθώς η έκφραση του αντιγόνου αυτού είναι υψηλή όταν τα κύτταρα είναι ενεργοποιημένα και μετά μειώνεται. Πρέπει να συνεκτιμηθεί επιπλέον και η έκφραση των αντιγόνων επιφανείας TIM3 και LAG-3.

3.4.8. Ανάλυση των θέσεων ενσωμάτωσης των FV φορέων

Μετά την ολοκλήρωση της ανάλυσης των ποιοτικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών των CAR T κυττάρων διερευνήθηκαν οι θέσεις ένθεσης των φορέων FV στα CAR T κύτταρα που παράχθηκαν με αυτούς τους φορείς με NGS 4^{ης} γενιάς χρησιμοποιώντας το MinION (Oxford Nanopore Technologies) για την αλληλούχηση. Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τα εργαλεία Homer¹⁰⁸ και συνοψίζεται στον **Πίνακα 2**.

Πίνακας 2. Θέσεις Ενσωμάτωσης των φορέων FV στο γονιδίωμα των FV CAR19 T λεμφοκυττάρων

Annotation	Number of peaks	Total size (bp)	Log2Ratio (obs/exp)	LogP enrichment
3UTR	12	26833139	0,453	-1,75
miRNA	0	97618	-0,045	0,032
ncRNA	2	7044070	-0,202	0,518
TTS	17	32404629	0,684	-3,19
pseudo	1	2111155	0,536	-0,697
Exon	16	37120946	0,4	-1,812
Intron	445	1257910936	0,115	-4,155
Intergenic	495	1684358172	-0,152	8,165
Promoter	16	35946139	0,447	-1,995
5UTR	4	2601483	2,235	-4,503
snoRNA	0	357	0	0
scRNA	0	97	0	0
rRNA	0	25562	-0,012	0,008

Στον **Πίνακα 2** συνοψίζονται τα αποτελέσματα της αλληλούχησης νέας γενιάς για να ταυτοποιηθούν οι θέσεις ένθεσης των φορέων FV στο γονιδίωμα των FV CAR19 T κυττάρων. Ταυτοποιήθηκαν 1008 μοναδικές θέσεις ενσωμάτωσης των φορέων FV στο γονιδίωμα των

κυττάρων που αναλύθηκαν. Το μοτίβο ενσωμάτωσης των FV φορέων φαίνεται να είναι τυχαίο με μια ισχυρή προτίμηση στο 5'UTR με τον δείκτη Log2Ratio να είναι 2,235. Ωστόσο, οι θέσεις αυτές σε απόλυτο αριθμό είναι μόνο τέσσερις από τις 1008 που απομονώθηκαν. Η πλειονότητα των θέσεων ενσωμάτωσης είναι τυχαίες, καθώς ο δείκτης Log2 Ratio να είναι κάτω από 1. Περίπου οι μισές θέσεις ενσωμάτωσης ταυτοποιούνται σε διαγονιδιακές περιοχές, μεταξύ των γονιδίων. Οι άλλες μισές ανιχνεύονται εντός ιντρονίων, ωστόσο τα ιντρόνια αυτά προέρχονται κυρίως από στοιχεία alu, SINES και LINES.

4.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα διατριβή παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της έρευνας που πραγματοποιήθηκε για την παραγωγή iPSCs κυττάρων μέσω επαναπρογραμματισμού με τους παράγοντες Yamanaka. Τα EB που θα προέκυπταν στην συνέχεια θα χρησιμοποιούνταν για την παραγωγή T λεμφοκυττάρων. Αυτά τα T λεμφοκύτταρα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την δημιουργία τράπεζας αλλογενών CAR T κυττάρων. Μονάδες από αυτά τα CAR T κύτταρα θα μπορούσαν να προετοιμαστούν να κρυοσυντηρηθούν και όταν προέκυπτε η ανάγκη να χορηγηθούν σε ιστοσυμβατούς δότες. Η ίδια λογική ακολουθείται και στην περίπτωση των ειδικών για ιούς T λεμφοκυττάρων(virus specific T cells- VSTs)¹⁰⁹. Επιπλέον άλλες ομάδες έχουν ήδη αναπτύξει T λεμφοκύτταρα από ανθρώπινα iPSCs με σκοπό την δημιουργία τράπεζας CAR T κυττάρων στην λογική off-the-self.

Αρχικά τα γονίδια που κωδικοποιούν τους παράγοντες Yamanaka κλωνοποιήθηκαν σε ζεύγη εκατέρωθεν του ανθρώπινου υποκινητή X τον οποίον είχε ταυτοποιήσει η ομάδα του καθηγητή του Βασιλόπουλου¹¹⁰. Ο υποκινητής αυτός εδράζεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα X και ελέγχει την μεταγραφή των ανθρώπινων γονιδίων *gla* και *hnrnp2*, τα οποία μεταγράφονται προς αντίθετες μεταξύ τους κατευθύνσεις ως προς το DNA¹¹⁰. Ο υποκινητής αυτός αποδείχθηκε ότι είχε την ικανότητα να παράγει μετάγραφα σε αναλογία 1:1¹¹⁰. Η κασέτα έκφρασης είχε κλωνοποιηθεί σε ένα πλασμίδιο φορέα FV-πλασμίδιο μεταφοράς. Σε επίπεδο πλασμιδιακού DNA οι φορείς FV DF.K.x.S και DF.O.x.M.IF παρήγαγαν υψηλά επίπεδα πρωτεϊνών KLF4, SOX2, OCT4 και c-MYC και ήταν καθόλα λειτουργικοί και σε επίπεδο μεταγραφής αλλά και σε επίπεδο πρωτεϊνικής έκφρασης όπως αυτή ανιχνεύθηκε με κυτταρομετρίας ροής.

Οι τρίτης γενιάς FV φορείς παράχθηκαν με τους πλασμιδιακοί φορείς που κατασκευάστηκαν μέσω διαμόλυνσης της κυτταρικής σειράς HEK293T μαζί με τα βοηθητικά πλασμίδια που κωδικοποιούν τα ιικά γονίδια *gag*, *pol* και *env*. Τα παραγόμενα ιωσωμάτια απελευθερώνονταν από τα κύτταρα στο υπερκείμενο θρεπτικό μέσο της κυτταροκαλλιέργειας -ικό υπερκείμενο μέσο- το οποίο συλλέχθηκε για καθαρισμό και συμπύκνωση. Οι ιικοί φορείς DF.K.x.S και DF.O.x.M.IF χρησιμοποιήθηκαν για την επιμόλυνση HEK293T κυττάρων με MOI=2 έκαστος και στην συνέχεια ανιχνεύθηκε η παραγωγή των πρωτεϊνών KLF4, SOX2, OCT4 και c-MYC με ανοσοαποτύπωση Western. Η ικανότητα μεταγραφής και υπερέκφρασης των τεσσάρων γονιδίων *klf4*, *sox2*, *oct4* και *c-myc* ελέγχθηκε μετά από παραγωγή των κυττάρων HT1080. Από τα κύτταρα αυτά πραγματοποιήθηκε απόμονωση ολικού RNA, αντίστροφης μεταγραφής και PCR με ζεύγη

εκκινητών που στοχεύουν τα αντίστοιχα γονίδια. Οι φορείς είχαν την ικανότητα να υπερεκφράζουν εκτοπικά τα mRNA και κατ' επέκταση τις πρωτεΐνες KLF4, SOX2, OCT4 και c-MYC.

Διάφορα πρωτογενή ανθρώπινα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για τον επαναπρογραμματισμό και την παραγωγή κυττάρων iPSC. Αρχικά οι φορείς FV επιχειρήθηκε να χρησιμοποιηθούν για τον επαναπρογραμματισμό μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων από τον μυελό των οστών, τα οποία οι FV φορείς είναι ικανοί να μολύνουν με μεγάλη απόδοση¹¹¹. Οι φορείς FV επιμόλυναν τα μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα με απόδοση 40% για τον φορέα DF.K.x.S και 18 για τον φορέα DF.O.x.M.IF. Παρόλα αυτά δεν κατέστη δυνατόν να παραχθούν iPSC από αυτά τα κύτταρα καθώς η αποικίες που απομονώθηκαν επαναδιαφοροποιούνταν σε κύτταρα με μορφολογία ινοβλάστη. Άλλες ομάδες έχουν επιτυχώς επαναπρογραμματίσει επιτυχώς MSCs με το σύστημα φορέων FV χρησιμοποιώντας μια πολυκιστρονική κασέτα που περιελάμβανε και τους 4 παράγοντες Yamanaka υπό τον έλεγχο ενός ισχυρού υποκινητή MLV. Επιπλέον η απόδοση επαναπρογραμματισμού ήταν αντίστοιχη με εκείνη που έχει επιτευχθεί με LV φορείς με την συμπερίληψη ενός shRNA ενάντια στον παράγοντα p53¹¹².

Στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή κυττάρων άνθρωποι ινοβλάστες δέρματος ενηλίκου(DF) και νεογνικοί ινοβλάστες δέρματος(NuFF). Οι φορείς επίσης επιμόλυναν τα κύτταρα αυτά με καλή απόδοση, παρόλα αυτά δεν έγινε εφικτό να παραχθούν «σταθεροποιημένες» αποικίες iPSC. Στην περίπτωση των κυττάρων DF ίσως η πηγή των κυττάρων (ενήλικες και η παρατεταμένη καλλιέργεια *in vitro* passage 10 να είχαν αρνητικό αντίκτυπο στον επαναπρογραμματισμό καθώς οι αποικίες εμφανίζονταν οψίμα μετά την 30^η μέρα από την εκκίνηση του επαναπρογραμματισμού. Η ηλικία του δωρητή και η ανατομική θέση από την οποία έχει ληφθεί η βιοψιά, παίζουν ρόλο στην απόδοση του επαναπρογραμματισμού^{113,114}. Τα κύτταρα NuFF ήταν εκείνα που έδωσαν πολύ συχνά αποικίες που προσομοίαζαν εκείνες των «πραγματικών» iPSC, σε ένα εύλογο χρονικό διάστημα, παρόλο που οι αποικίες αυτές ήταν ασταθείς.

Ίσως ο ανθρώπινος αμφίδρομος υποκινητής που ήλεγχε την υπερέκφραση των παραγόντων επαναπρογραμματισμού να μην ήταν επαρκής ώστε να διατηρήσει τα τέσσερα αυτά γονίδια σε υψηλά μεταγραφικά επίπεδα. Η διατήρηση της μεταγραφικής ενεργότητας είναι καίριας σημασίας καθώς φαίνεται ότι απαιτείται συγκεκριμένη στοιχειομετρία στα επίπεδα του mRNA των γονιδίων *klf4*, *sox2*, *oct4* και *c-myc*, ώστε να επιτευχθεί ο

επαναπρογραμματισμός^{115,116}.

Πιθανώς μια λύση στο πρόβλημα αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει η προσθήκη ενός γενετικού στοιχείου που θα δρούσε ως ενισχυτής. Τέτοια στοιχεία είναι τα στοιχεία UCOE-A2UCOE γενικευμένα στοιχεία ανοίγματος δομής χρωματίνης (ubiquitous chromatin opening elements). Τα στοιχεία αυτά αποδεδειγμένα αποτρέπουν την μεθυλίωση εγγύς εκκινητών είτε αν αυτοί αποτελούν ικής προέλευσης είτε αν αυτοί είναι ενδογενείς¹¹⁷. Το πρώτο εμπόδιο στην εφαρμογή μιας τέτοιας προσέγγισης αποτελεί το γενετικό φορτίο του στοιχείου A2UCOE το οποίο έχει μέγεθος 1,5kb¹¹⁸. Το φορτίο αυτό είναι δυνατόν να μειωθεί καθώς έχει χαρακτηριστεί η βασική περιοχή CBX3-UCOE, που αποτελεί μεν μέρος του ευρύτερου στοιχείου A2UCOE έχει δε μικρότερο γενετικό φορτίο (0,7kb) και διατηρεί τις ιδιότητες του ακέραιου A2UCOE τόσο σε πολυδύναμα όσο και σε πλειοδύναμα(PSCs-iPSCs) κύτταρα¹¹⁹. Όσον αφορά την θέση στην οποία μπορεί να κλωνοποιηθεί στον αμφίδρομο υποκινητή στην θέση αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου BglII που βρίσκεται ενδιάμεσα στην αλληλουχία του στοιχείου. Χρησιμοποιώντας το λογισμικό ConTra v3¹²⁰ ταυτοποιήθηκαν τρεις θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων εκατέρωθεν αυτής του περιοριστικού ενζύμου. Εναλλακτικά, θα μπορούσε να τροποποιηθεί η κασέτα έκφρασης με εξ ολοκλήρου ανακατασκευή. Ο υποκινητής να υποκατασταθεί από τον βασικό υποκινητή EF1a και οι παράγοντες Yamanaka να κλωνοποιηθούν ανα ζεύγη με αλληλουχίες που κωδικοποιούν 2A πεπτίδια να παρεμβάλλονται μεταξύ των γονιδίων.

Οι φορείς FV εμφανίζουν μέτρια αποδοτικότητα *in vitro* ως προς την ικανότητά τους να επιμολύνουν T λεμφοκύτταρα¹²¹. Αντίστοιχα, αρχικά παρατηρήθηκε χαμηλή απόδοση μεταγωγής που δεν ξεπερνούσε το 10%. Επίσης παρατηρήθηκε ότι η μεταγωγή ήταν συνυφασμένη με την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων (Τα αποτελέσματα δεν περιέχονται). Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε ηπαρίνη ως ενισχυτικό μέσο της επιμόλυνσης. Πράγματι, η χρήση φαρμακευτικής καθαρότητας ηπαρίνης σε χαμηλά επίπεδα (0,5IU/ml) ενίσχυε την απόδοση της επιμόλυνσης σε ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα από μονάδες ΟΠΑ. Η απόδοση μεταγωγής κυμαινόταν από 48-60%, 4,8-6 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την αρχικά παρατηρούμενη¹²¹. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στα T λεμφοκύτταρα από περιφερικό αίμα.

Η λογική πίσω από την χρήση της ηπαρίνης ως ενισχυτικό μέσο της αποδοτικότητας της επιμόλυνσης ήταν η εξουδετέρωση των φορτίων στην κυτταρική μεμβράνη¹²². Με την προσθήκη της ηπαρίνης ο σκοπός ήταν να αυξηθούν περεταίρω τα αρνητικά φορτία στην

μεμβράνη των T λεμφοκυττάρων και με τον τρόπο αυτό να διευκολυνθεί η επιμόλυνση των κυττάρων με τους FV φορείς. Αντίστοιχα σε λεντιϊκά ρετροϊκά συστήματα η χρήση κατιονικών πολυμερών ιόντων, όπως το polybrene, εξουδετερώνουν τα αρνητικά φορτία της κυτταρικής μεμβράνης και διευκολύνουν την προσέγγιση των ιοσωματίων με την κυτταρική μεμβράνη¹²³. Η περιοχή πρόσδεσης του ιού FV στον υποδοχέα των κυττάρων RBD εδράζεται στο καρβοξυτελικό άκρο της περιοχής SU της πρωτεΐνης του φακέλου Εην του ιού¹²⁴ και διαθέτει θετικό φορτίο¹²⁵.

Τα FV CAR19 T λεμφοκύτταρα συγκρίθηκαν λειτουργικά με εκείνα που παράχθηκαν με LV φορείς (LV CAR19 T λεμφοκύτταρα). Αρχικά, διερευνήθηκε η κυτταροτοξική δραστηριότητα των FV CAR19 T λεμφοκυττάρων *in vitro* ενάντια σε κυτταρικές σειρές που εκφράζουν το αντιγόνο CD19 στην κυτταρική τους μεμβράνη. FV CAR19 T λεμφοκύτταρα που παράχθηκαν από T λεμφοκύτταρα από μονάδες ΟΠΑ ή περιφερικό αίμα συγκαλλιεργήθηκαν με κύτταρα Raji (λέμφωμα Burkitt, CD19+) σε διαφορετικές αναλογίες CAR T κυττάρων προς κύτταρα Raji. Τα κύτταρα Raji είχαν σημειωθεί με την χρωστική CFSE και η διάκριση μεταξύ ζωντανών και νεκρών κυττάρων έγινε με την χρωστική 7-AAD, η οποία προσδένεται στο DNA. Μετά το πέρας της συγκαλλιέργειας τα κύτταρα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Αντίστοιχα πειράματα πραγματοποιήθηκαν και με CAR19 T κύτταρα που παράχθηκαν με LV φορείς. Τα CAR19 T λεμφοκύτταρα που προέρχονταν από μονάδες ΟΠΑ και που παράχθηκαν με τους FV φορείς παρουσίαζαν δοσοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση ενάντια στα κύτταρα Raji. Στην αναλογία 10 CAR19 T κύτταρα προς 1 κύτταρο Raji η κυτταροτοξικότητα κυμαινόταν μεταξύ 90-70%, αντίστοιχες τιμές παρατηρήθηκαν και με τα CAR19T κύτταρα που παράχθηκαν με την χρήση φορέων LV. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με αντίστοιχες ερευνητικές εργασίες που υπάρχουν στην βιβλιογραφία στις οποίες αντι-CD19 CAR T κύτταρα που προέρχονται από ομφαλοπλακουντιακό αίμα και στα οποία η γονιδιακή κατασκευή του CAR υποδοχέα έχει μεταφερθεί με φορείς LV, εμφανίζουν υψηλή κυτταροτοξική δράση *in vitro* ενάντια σε CD19+ κυτταρικές σειρές^{126,127}.

Αντίστοιχα ήταν τα αποτελέσματα της δοκιμής κυτταροτοξικότητας των CAR19 T λεμφοκυττάρων που προήλθαν από T λεμφοκύτταρα από περιφερικό αίμα με τα επίπεδα της κυτταροτοξικότητας στην αναλογία δέκα CAR19 T κύτταρα προς ένα κύτταρο Raji να φθάνει στο 85% για τα FV CAR19T και 75% για τα LV CAR19 T κύτταρα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι οι FV φορείς είναι ικανοί να μεταφέρουν την κασσέτα έκφρασης του CAR υποδοχέα σε T λεμφοκύτταρα εξίσου αποδοτικά με τους LV φορείς. Η

πηγή των T λεμφοκυττάρων δεν φαίνεται να επηρεάζει την ικανότητα μεταγωγής των φορέων. Επιπλέον, τα FV CAR19 T λεμφοκύτταρα παρουσιάζουν παρόμοια κυτταροτοξική δράση με τα CAR19 T λεμφοκύτταρα που παράχθηκαν με LV φορείς. Από την άποψη αυτή προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι FV και LV φορείς είναι ισοδύναμοι ως προς την ικανότητά τους για να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή CAR T κυττάρων.

Μεταξύ των πιο καίριων λειτουργικών ιδιοτήτων των T λεμφοκυττάρων είναι η έκκριση προφλεγμονωδών παραγόντων όπως η ιντερφερόνη γάμμα (IFN-γ). Η IFN-γ παράγεται από τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα. Για το λόγο αυτό μετρήθηκε η ικανότητα των CAR19 T να εκκρίνουν IFN-γ μετά από συγκαλλιέργεια για 24 ώρες με κύτταρα Raji. Τα CAR19 T λεμφοκύτταρα που παράχθηκαν με FV φορείς, έκκριναν IFN-γ που κυμαινόταν από 1500 έως πάνω από 2000 pg/ml. Αντίστοιχα, τα CAR19 T λεμφοκύτταρα που παράχθηκαν με LV φορείς, έκκριναν IFN-γ που κυμαινόταν από 1400 έως 2000 pg/ml. Φαίνεται ότι ο φορέας που χρησιμοποιείται για την μεταφορά του CAR19 υποδοχέα στα T λεμφοκύτταρα δεν επηρεάζει λειτουργικά τα CAR19 T κύτταρα που προκύπτουν, τουλάχιστον όσον αφορά την ικανότητά τους να διεγείρονται και να ενεργοποιούνται όταν απαντούν κύτταρα που εκφράζουν CD19. Οι δύο φορείς παράγουν λειτουργικά ισοδύναμα CAR T λεμφοκύτταρα.

Ο ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός των CAR T κυττάρων έδειξε ότι η μεταγωγή και η ενεργοποίηση των T κυττάρων δεν μεταβάλλει την συχνότητα των CD4+ και CD8+ κυττάρων στα CAR19+ T κύτταρα ανεξάρτητα από τον φορέα μέσω του οποίου έχουν παραχθεί είτε FV είτε LV. Η παρουσία της IL7 και IL15 κατά την καλλιέργεια διατηρεί τα κύτταρα στην πλειονότητά τους να διατηρούν ένα φαινότυπο TCM/TEM (CD45RO+) και για τα βοηθητικά T (CD4+) και για T κυτταροτοξικά (CD8+) T λεμφοκύτταρα, ανεξάρτητα από τον φορέα που χρησιμοποιείται για τον φορέα παραγωγής των CAR T. Οι παρατηρήσεις αυτές συμφωνούν με την βιβλιογραφία όπου αντίστοιχα παρατηρείται ότι η μεταγωγή των T λεμφοκυττάρων με LV φορείς για την παραγωγή CAR T δεν επηρεάζει την αρχική αναλογία των CD4+ και CD8+ T λεμφοκυττάρων¹²⁸. Ωστόσο η αναλογία των CD4+ προς CD8+ παίζει σημαντικό ρόλο στην θεραπευτική αποτελεσματικότητα των CAR T προϊόντων με την αναλογία 1:1 CD4:CD8 να αναφέρεται ως εκείνη με την υψηλότερη κυτταροτοξική δράση¹²⁸.

Τα FV CAR19 T κύτταρα είναι εμπλουτισμένα για T βοηθητικά (CD4+) λεμφοκύτταρα στα οποία η έκφραση του αντιγόνου PD-1 είναι υψηλότερη στα FV (85%) έναντι των LV CAR19T λεμφοκυττάρων. Ωστόσο η τάση αυτή δεν παρατηρείται στα CD8+ CAR T κύτταρα:

27% των CD8+ FV CAR19 T είναι PD-1+, ενώ 11% των CD8+ LV CAR19 T εκφράζουν PD-1. Από μόνη της η έκφραση του PD-1 δεν μπορεί να εκτιμηθεί ως δείκτης εξουθένωσης των T λεμφοκυττάρων, καθώς η έκφραση του αντιγόνου αυτού είναι υψηλή όταν τα κύτταρα είναι ενεργοποιημένα και μετά μειώνεται. Πρέπει να συνεκτιμηθεί επιπλέον και η έκφραση των αντιγόνων επιφανείας TIM3 και LAG-3¹²⁹.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα διδακτορική διατριβή αναπτύχθηκαν φορείς FV για την γονιδιακή μεταφορά και γενετική τροποποίηση κυττάρων με σκοπό την κατασκευή iPSCs, τα οποία στην συνέχεια θα χρησιμοποιούνταν για την ανάπτυξη «τυποποιημένων» (off-the-shelf) CAR T κυττάρων. Κατασκευάστηκαν δύο FV φορείς που έκφραζαν τους παράγοντες Yamanaka σε ζεύγη υπό τον έλεγχο ενός ανθρώπινου αμφίδρομου υποκινητή προερχόμενου από το χρωμόσωμα X. Οι φορείς αυτοί ήταν ικανοί να επιτύχουν χαμηλής απόδοσης κυτταρικό επαναπρογραμματισμό σε ανθρώπινα κύτταρα. Από το σύστημα αυτό προέκυψαν ασταθείς πρωτογενείς αποικίες iPSC οι οποίες όμως δεν κατέστη δυνατόν να ολοκληρώσουν επιτυχώς τον επαναπρογραμματισμό ώστε να παραχθούν κυτταρικές σειρές iPSC.

Παράλληλα, διερευνήθηκε η ικανότητα των φορέων FV να χρησιμοποιηθούν για την γονιδιακή μεταφορά γονιδιακών κατασκευών χιμαιρικών υποδοχέων CAR σε T λεμφοκύτταρα. Κατασκευάστηκαν δύο φορείς FV οι pDF.antiCD19CARII.I2F, pDF.antiCD19CARII και δύο LV φορείς οι pRRLSIN.cPPT.antiCD19CARII.I2F και pRRLSIN.cPPT.antiCD19CARII. Αυτοί οι φορείς περιείχαν μια γονιδιακή κασέτα ενός δεύτερης γενιάς CAR υποδοχέα ενάντια στο ανθρώπινο αντιγόνο επιφανείας CD19. Η γονιδιακή κατασκευή αποτελούνταν από: το scFV του αντισώματος FMC63, την διαμεμβρανική και σηματοδοτική περιοχή της πρωτεΐνης CD28 και την πρωτεΐνη CD3ζ. Οι φορείς pRRLSIN.cPPT.antiCD19CARII.I2F και pDF.antiCD19CARII.I2F ήταν δι-σιστρονικοί. Πέραν της έκφρασης του CAR υποδοχέα έκφραζαν επίσης και την φθορίζουσα πρωτεΐνη EGFP. Οι προκλινικοί φορείς pDF.antiCD19CARII(FV CAR19) και pRRLSIN.cPPT.antiCD19CARII (LVCAR19) μελετήθηκαν περαιτέρω.

Οι φορείς FV ήταν ικανοί να μολύνουν T λεμφοκύτταρα από ομφαλοπλακουντικό αίμα και περιφερικό αίμα με υψηλή απόδοση. Κατέστη δυνατόν να παραχθούν σε αρκετά υψηλά επίπεδα, κάτι που δίνει τη δυνατότητα μελλοντικά να παραχθούν σε μεγάλη κλίμακα για την χρήση τους σε κλινική εφαρμογή (8×10^5 - 9×10^5 TU/ml). Κατέστη επίσης δυνατή η απομόνωση, η συμπύκνωση και ο καθαρισμός τους με την μέθοδο TFF χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα της PALL Minimate EVOS. Τα CAR T λεμφοκύτταρα που προέκυψαν παρουσίασαν

in vitro υψηλή κυτταροτοξική δράση ενάντια της CD19+ κυτταρικής σειράς λεμφώματος Burkitt Raji. Η δραστηριότητα των FV CAR19 T κυττάρων φάνηκε να είναι συγκρίσιμη με εκείνη που προέκυψε από τα LV CAR19 T λεμφοκύτταρα που παράχθηκαν από LV φορείς με την ίδια γονιδιακή κατασκευή CAR19. Επιπλέον τα FV CAR19 T κύτταρα ήταν ικανά να εκκρίνουν υψηλές συγκεντρώσεις IFN γ στο θρεπτικό μέσο μετά από διέγερση με τα CD19+ Raji κύτταρα, σε επίπεδα αντίστοιχα με εκείνα που παράχθηκαν από τα LV CAR19 T κύτταρα.

Τα FV CAR 19 T ήταν πολωμένα προς ένα φαινότυπο T δραστικού κυττάρου μνήμης (TEM) τόσο τα CD4+ όσο και τα CD8+. Επίσης τα CD8+ FV CAR19 T κύτταρα είχαν χαμηλή έκφραση του δείκτη εξασθένησης T PD-1, συγκρίσιμα με εκείνα των LV CAR19 CD8+ T κυττάρων. Η μόνη σημαντική διαφορά που παρατηρήθηκε στα CD4+ FV CAR19 T κύτταρα που παρουσίαζαν πολύ υψηλότερη έκφραση του δείκτη PD-1 σε σχέση με CD4+ LV CAR19 T κύτταρα, που αποδίδεται σε εγγενείς διαφορές όσον αφορά τον αρχικό αριθμό των T λεμφοκυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν για την μεταγωγή με τον φορέα FV.

Τα FV CAR19 T κύτταρα χρήζουν επιπλέον διερεύνησης. Αρχικά πρέπει να εφαρμοστούν σε ένα προκλινικό μοντέλο λεμφώματος σε ποντίκια και να διερευνηθεί η αποδοτικότητά τους *in vivo*. Μελλοντικά, θα πρέπει να διερευνηθεί η ανάπτυξη FV φορέων για CAR δεύτερης γενιάς τα οποία θα έχουν υποκατεστημένη την σηματοδοτική περιοχή του CD28 από εκείνη των μορίων 4-1-BB ή και OX-40. Εκτός από τα κλασσικά T λεμφοκύτταρα θα πρέπει να διερευνηθεί η εφαρμογή των FV φορέων για την παραγωγή CAR-NK κυττάρων, γ/δ CAR T κυττάρων και Μακροφάγων CAR κυττάρων. Οι φορείς FV λόγω των εγγενών ιδιοτήτων των LTR στοιχείων τους που προσφέρουν «μόνωση» στα γενετικά στοιχεία που ενθέτουν στο γονιδίωμα, της προτίμησης ένθεσης του ιού εκτός υποκινητών και ενεργά μεταγραφόμενων γονιδίων σε περιοχές cLAD του DNA αποτελούν μια εν δυνάμει ασφαλέστερη επιλογή για εφαρμογές γονιδιακής θεραπείας. Επιπλέον, είναι γνωστό πως οι μακρόχρονοι φορείς του ιού, δεν εκδηλώνουν καμία παθολογία ενώ είναι ικανοί να μεταφέρουν μεγάλο γενετικό φορτίο (max 8-9 kb) γεγονός που τους καθιστά ιδανικούς για την ανάπτυξη CAR T λεμφοκυττάρων για θεραπευτική χρήση.

Τέλος, όσον αφορά τις θέσεις ενσωμάτωσης των FV φορέων στο ανθρώπινο γονιδίωμα των FV CAR19 T κυττάρων, φαίνεται να είναι τυχαίες με περισσότερες από τις μισές να έχουν εντοπιστεί μεταξύ των γονιδίων. Από την βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι οι FV φορείς προτιμούν να ενσωματώνονται κοντά σε νησίδες CpG σε απόσταση περίπου 1kb και εγγύς υποκινητών των γονιδίων, αλλά όχι εντός της κωδικοποιούσας αλληλουχίας όπως συμβαίνει

με τους LV φορείς^{62,63}. Το γεγονός αυτό καθιστά τους φορείς ασφαλείς για εναλλακτική χρήση σε σχέση με τους LV φορείς. Είναι η πρώτη φορά που χρησιμοποιείται η τεχνολογία NGS 4ης γενιάς για να ταυτοποιηθούν οι θέσεις ένθεσης των FV φορέων σε ανθρώπινα T λεμφοκύτταρα

5.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Papanikolaou, E. & Bosio, A. The Promise and the Hope of Gene Therapy. *Front. Genome Ed.* **3**, (2021).
2. Gene therapy comes of age | Science. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aan4672>.
3. Santos, H. S. *et al.* In Situ Gene Therapy. *Curr. Gene Ther.* **21**, 406–430.
4. Wu, X. *et al.* Development and clinical translation of ex vivo gene therapy. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **20**, 2986–3003 (2022).
5. TAMURA1, R. & TODA, M. Historic Overview of Genetic Engineering Technologies for Human Gene Therapy. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* **60**, 483–491 (2020).
6. Powell, S. K., Rivera-Soto, R. & Gray, S. J. Viral Expression Cassette Elements to Enhance Transgene Target Specificity and Expression in Gene Therapy. *Discov. Med.* **19**, 49–57 (2015).
7. Zabner, J., Fasbender, A. J., Moninger, T., Poellinger, K. A. & Welsh, M. J. Cellular and Molecular Barriers to Gene Transfer by a Cationic Lipid *. *J. Biol. Chem.* **270**, 18997–19007 (1995).
8. Rakoczy, K. *et al.* Electroporation in Clinical Applications—The Potential of Gene Electrotransfer and Electrochemotherapy. *Appl. Sci.* **12**, 10821 (2022).
9. Alnasser, S. M. Review on mechanistic strategy of gene therapy in the treatment of disease. *Gene* **769**, 145246 (2021).
10. Bhardwaj, A. & Nain, V. TALENs—an indispensable tool in the era of CRISPR: a mini review. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **19**, 125 (2021).
11. Khalil, A. M. The genome editing revolution: review. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **18**, 68 (2020).
12. Sleeping Beauty Transposition: Biology and Applications for Molecular Therapy: Molecular Therapy. [https://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/fulltext/S1525-0016\(03\)00377-0#seccestitle30](https://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/fulltext/S1525-0016(03)00377-0#seccestitle30).
13. Sandoval-Villegas, N., Nurieva, W., Amberger, M. & Ivics, Z. Contemporary Transposon Tools: A Review and Guide through Mechanisms and Applications of Sleeping Beauty, piggyBac and Tol2 for Genome Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 5084 (2021).

14. Kebriaei, P., Izsvák, Z., Narayanavari, S. A., Singh, H. & Ivics, Z. Gene Therapy with the Sleeping Beauty Transposon System. *Trends Genet.* **33**, 852–870 (2017).
15. Ivics, Z., Hackett, P. B., Plasterk, R. H. & Izsvák, Z. Molecular Reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like Transposon from Fish, and Its Transposition in Human Cells. *Cell* **91**, 501–510 (1997).
16. Vigdal, T. J., Kaufman, C. D., Izsvák, Z., Voytas, D. F. & Ivics, Z. Common Physical Properties of DNA Affecting Target Site Selection of *Sleeping Beauty* and other Tc1/*mariner* Transposable Elements. *J. Mol. Biol.* **323**, 441–452 (2002).
17. Prommersberger, S. *et al.* Generation of CAR-T Cells with Sleeping Beauty Transposon Gene Transfer. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2521**, 41–66 (2022).
18. Swetha, K. *et al.* Recent Advances in the Lipid Nanoparticle-Mediated Delivery of mRNA Vaccines. *Vaccines* **11**, 658 (2023).
19. Hassett, K. J. *et al.* Optimization of Lipid Nanoparticles for Intramuscular Administration of mRNA Vaccines. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **15**, 1–11 (2019).
20. Perrotta, C. *et al.* Updated Considerations for the Immunopharmacological Aspects of the “Talented mRNA Vaccines”. *Vaccines* **11**, 1481 (2023).
21. Young, J. L. & Dean, D. A. Electroporation-Mediated Gene Delivery. *Adv. Genet.* **89**, 49–88 (2015).
22. Pisani, S. *et al.* Electroporation in Head-and-Neck Cancer: An Innovative Approach with Immunotherapy and Nanotechnology Combination. *Cancers* **14**, 5363 (2022).
23. Bulcha, J. T., Wang, Y., Ma, H., Tai, P. W. L. & Gao, G. Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**, 1–24 (2021).
24. Ghosh, S., Brown, A. M., Jenkins, C. & Campbell, K. Viral Vector Systems for Gene Therapy: A Comprehensive Literature Review of Progress and Biosafety Challenges. *Appl. Biosaf.* **25**, 7–18 (2020).
25. Wang, D., Tai, P. W. L. & Gao, G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **18**, 358–378 (2019).

26. Sonntag, F., Schmidt, K. & Kleinschmidt, J. A. A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 10220–10225 (2010).
27. Nakai, H., Storm, T. A. & Kay, M. A. Recruitment of Single-Stranded Recombinant Adeno-Associated Virus Vector Genomes and Intermolecular Recombination Are Responsible for Stable Transduction of Liver In Vivo. *J. Virol.* **74**, 9451–9463 (2000).
28. Gray, S. J. *et al.* Optimizing Promoters for Recombinant Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Expression in the Peripheral and Central Nervous System Using Self-Complementary Vectors. *Hum. Gene Ther.* **22**, 1143–1153 (2011).
29. Darrow, J. J. Luxturna: FDA documents reveal the value of a costly gene therapy. *Drug Discov. Today* **24**, 949–954 (2019).
30. Bryant, L. M. *et al.* Lessons Learned from the Clinical Development and Market Authorization of Glybera. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* **24**, 55–64 (2013).
31. Maertens, G. N., Engelman, A. N. & Cherepanov, P. Structure and function of retroviral integrase. *Nat. Rev. Microbiol.* **20**, 20–34 (2022).
32. Labbé, R. P., Vessillier, S. & Rafiq, Q. A. Lentiviral Vectors for T Cell Engineering: Clinical Applications, Bioprocessing and Future Perspectives. *Viruses* **13**, 1528 (2021).
33. Hu, W.-S. & Hughes, S. H. HIV-1 Reverse Transcription. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006882 (2012).
34. Coffin, J. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Retroviridae 2021. *J. Gen. Virol.* **102**, 001712 (2021).
35. Pinto-Santini, D. M., Stenbak, C. R. & Linial, M. L. Foamy virus zoonotic infections. *Retrovirology* **14**, 55 (2017).
36. Hughes, S. H. Reverse Transcription of Retroviruses and LTR Retrotransposons. *Microbiol. Spectr.* **3**, MDNA3 (2015).
37. Milone, M. C. & O'Doherty, U. Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia* **32**, 1529–1541 (2018).

38. Delviks, K. A. & Pathak, V. K. Effect of Distance between Homologous Sequences and 3' Homology on the Frequency of Retroviral Reverse Transcriptase Template Switching. *J. Virol.* **73**, 7923–7932 (1999).
39. Müller, B., Patschinsky, T. & Kräusslich, H.-G. The Late-Domain-Containing Protein p6 Is the Predominant Phosphoprotein of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Particles. *J. Virol.* **76**, 1015–1024 (2002).
40. Troyano-Hernández, P., Reinoso, R. & Holguín, A. Genetic Diversity and Low Therapeutic Impact of Variant-Specific Markers in HIV-1 Pol Proteins. *Front. Microbiol.* **13**, 866705 (2022).
41. Arrildt, K. T., Joseph, S. B. & Swanstrom, R. The HIV-1 Env Protein: A Coat of Many Colors. *Curr. HIV/AIDS Rep.* **9**, 52–63 (2012).
42. Clark, E., Nava, B. & Caputi, M. Tat is a multifunctional viral protein that modulates cellular gene expression and functions. *Oncotarget* **8**, 27569–27581 (2017).
43. Huang, L., Bosch, I., Hofmann, W., Sodroski, J. & Pardee, A. B. Tat Protein Induces Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Coreceptors and Promotes Infection with both Macrophage-Tropic and T-Lymphotropic HIV-1 Strains. *J. Virol.* **72**, 8952–8960 (1998).
44. Pai, S., Mudgal, J., Kamath, B. V. & Pai, K. S. R. An insight on promising strategies hoping to cure HIV-1 infection by targeting Rev protein—short review. *Pharmacol. Rep.* **73**, 1265–1272 (2021).
45. Fernandes, J., Jayaraman, B. & Frankel, A. The HIV-1 Rev response element. *RNA Biol.* **9**, 6–11 (2012).
46. Dull, T. *et al.* A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. *J. Virol.* **72**, 8463–8471 (1998).
47. Zufferey, R., Donello, J. E., Trono, D. & Hope, T. J. Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element Enhances Expression of Transgenes Delivered by Retroviral Vectors. *J. Virol.* **73**, 2886–2892 (1999).
48. Croissant, C. *et al.* A new T-antigen negative HEK293 cell line with improved AAV productivity. *Biotechnol. Bioeng.* **120**, 1953–1960 (2023).

49. Bae, D. H. *et al.* Design and Testing of Vector-Producing HEK293T Cells Bearing a Genomic Deletion of the SV40 T Antigen Coding Region. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **18**, 631–638 (2020).
50. Kuroda, H., Kutner, R. H., Bazan, N. G. & Reiser, J. Simplified lentivirus vector production in protein-free media using polyethylenimine-mediated transfection. *J. Virol. Methods* **157**, 113–121 (2009).
51. Bakan, F. Gene Delivery by Hydroxyapatite and Calcium Phosphate Nanoparticles: A Review of Novel and Recent Applications. in *Hydroxyapatite - Advances in Composite Nanomaterials, Biomedical Applications and Its Technological Facets* (IntechOpen, 2017).
doi:10.5772/intechopen.71062.
52. Degors, I. M. S., Wang, C., Rehman, Z. U. & Zuhorn, I. S. Carriers Break Barriers in Drug Delivery: Endocytosis and Endosomal Escape of Gene Delivery Vectors. *Acc. Chem. Res.* **52**, 1750–1760 (2019).
53. Rethwilm, A. & Bodem, J. Evolution of Foamy Viruses: The Most Ancient of All Retroviruses †. *Viruses* **5**, 2349–2374 (2013).
54. Jackson, D. L., Lee, E.-G. & Linial, M. L. Expression of Prototype Foamy Virus Pol as a Gag-Pol Fusion Protein Does Not Change the Timing of Reverse Transcription. *J. Virol.* **87**, 1252–1254 (2013).
55. Vassilopoulos, G., Trobridge, G., Josephson, N. C. & Russell, D. W. Gene transfer into murine hematopoietic stem cells with helper-free foamy virus vectors. *Blood* **98**, 604–609 (2001).
56. Trobridge, G., Josephson, N., Vassilopoulos, G., Mac, J. & Russell, D. W. Improved foamy virus vectors with minimal viral sequences. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **6**, 321–328 (2002).
57. Trobridge, G. D. Foamy virus vectors for gene transfer. *Expert Opin. Biol. Ther.* **9**, 1427–1436 (2009).
58. Hütter, S., Zurnic, I. & Lindemann, D. Foamy Virus Budding and Release. *Viruses* **5**, 1075–1098 (2013).

59. Pietschmann, T. *et al.* Foamy Virus Capsids Require the Cognate Envelope Protein for Particle Export. *J. Virol.* **73**, 2613–2621 (1999).
60. Lindemann, D. & Rethwilm, A. Foamy Virus Biology and Its Application for Vector Development. *Viruses* **3**, 561–585 (2011).
61. Hendrie, P. C., Huo, Y., Stolitenko, R. B. & Russell, D. W. A rapid and quantitative assay for measuring neighboring gene activation by vector proviruses. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **16**, 534–540 (2008).
62. Trobridge, G. D. *et al.* Foamy virus vector integration sites in normal human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 1498–1503 (2006).
63. Nowrouzi, A. *et al.* Genome-wide mapping of foamy virus vector integrations into a human cell line. *J. Gen. Virol.* **87**, 1339–1347 (2006).
64. Moradi, S. *et al.* Research and therapy with induced pluripotent stem cells (iPSCs): social, legal, and ethical considerations. *Stem Cell Res. Ther.* **10**, 341 (2019).
65. Raab, S., Klingenstein, M., Liebau, S. & Linta, L. A Comparative View on Human Somatic Cell Sources for iPSC Generation. *Stem Cells Int.* **2014**, 768391 (2014).
66. Ray, A. *et al.* An Overview on Promising Somatic Cell Sources Utilized for the Efficient Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rev. Rep.* **17**, 1954–1974 (2021).
67. Fransen, L. F. H. & Leonard, M. O. Induced pluripotent and CD34+ stem cell derived myeloid cells display differential responses to particle and dust mite exposure. *Sci. Rep.* **13**, 9375 (2023).
68. Dupuis, V. & Oltra, E. Methods to produce induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells: Mesenchymal stem cells from induced pluripotent stem cells. *World J. Stem Cells* **13**, 1094–1111 (2021).
69. Quintanilla, R. H., Asprer, J., Sylakowski, K. & Lakshmipathy, U. Kinetic Measurement and Real Time Visualization of Somatic Reprogramming. *J. Vis. Exp. JoVE* 54190 (2016)
doi:10.3791/54190.

70. Induced pluripotent stem cells (iPSCs): molecular mechanisms of induction and applications | Signal Transduction and Targeted Therapy. <https://www.nature.com/articles/s41392-024-01809-0>.
71. Netsrithong, R., Garcia-Perez, L. & Themeli, M. Engineered T cells from induced pluripotent stem cells: from research towards clinical implementation. *Front. Immunol.* **14**, 1325209 (2024).
72. Iriguchi, S. *et al.* A clinically applicable and scalable method to regenerate T-cells from iPSCs for off-the-shelf T-cell immunotherapy. *Nat. Commun.* **12**, 430 (2021).
73. Chu, J. *et al.* Natural killer cells: a promising immunotherapy for cancer. *J. Transl. Med.* **20**, 240 (2022).
74. Freud, A. G., Mundy-Bosse, B. L., Yu, J. & Caligiuri, M. A. The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. *Immunity* **47**, 820–833 (2017).
75. Zwirner, N. W., Domaica, C. I. & Fuertes, M. B. Regulatory functions of NK cells during infections and cancer. *J. Leukoc. Biol.* **109**, 185–194 (2021).
76. Myers, J. A. & Miller, J. S. Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **18**, 85–100 (2021).
77. Hatjiharissi, E. *et al.* Increased natural killer cell expression of CD16, augmented binding and ADCC activity to rituximab among individuals expressing the FcγRIIIa-158 V/V and V/F polymorphism. *Blood* **110**, 2561–2564 (2007).
78. Chen, D. S. & Mellman, I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* **39**, 1–10 (2013).
79. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion | Science. https://www.science.org/doi/10.1126/science.1203486?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed.
80. Matsushita, H. *et al.* Cancer Exome Analysis Reveals a T Cell Dependent Mechanism of Cancer Immunoediting. *Nature* **482**, 400–404 (2012).

81. Rooney, M. S., Shukla, S. A., Wu, C. J., Getz, G. & Hachohen, N. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell* **160**, 48–61 (2015).
82. Alnefaie, A. *et al.* Chimeric Antigen Receptor T-Cells: An Overview of Concepts, Applications, Limitations, and Proposed Solutions. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **10**, 797440 (2022).
83. Gross, G., Waks, T. & Eshhar, Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 10024–10028 (1989).
84. Tan, J. *et al.* Chimeric antigen receptors containing the OX40 signalling domain enhance the persistence of T cells even under repeated stimulation with multiple myeloma target cells. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **15**, 39 (2022).
85. Hombach, A. *et al.* Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 zeta signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3 zeta signaling receptor molecule. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **167**, 6123–6131 (2001).
86. Tomasik, J., Jasiński, M. & Basak, G. W. Next generations of CAR-T cells - new therapeutic opportunities in hematology? *Front. Immunol.* **13**, 1034707 (2022).
87. A Phase I/IIa Trial Using CD19-Targeted Third-Generation CAR T Cells for Lymphoma and Leukemia | Clinical Cancer Research | American Association for Cancer Research.
<https://aacrjournals.org/clincancerres/article/24/24/6185/15291/A-Phase-I-IIa-Trial-Using-CD19-Targeted-Third>.
88. Zhao, J., Song, Y. & Liu, D. Clinical trials of dual-target CAR T cells, donor-derived CAR T cells, and universal CAR T cells for acute lymphoid leukemia. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **12**, 17 (2019).
89. Cheng, J. *et al.* Understanding the Mechanisms of Resistance to CAR T-Cell Therapy in Malignancies. *Front. Oncol.* **9**, 1237 (2019).

90. Chmielewski, M. & Abken, H. CAR T cells transform to trucks: chimeric antigen receptor–redirected T cells engineered to deliver inducible IL-12 modulate the tumour stroma to combat cancer. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **61**, 1269–1277 (2012).
91. Hawkins, E. R., D’Souza, R. R. & Klampatsa, A. Armored CAR T-Cells: The Next Chapter in T-Cell Cancer Immunotherapy. *Biol. Targets Ther.* **15**, 95–105 (2021).
92. Ceppi, F. *et al.* Lymphocyte apheresis for chimeric antigen receptor T-cell manufacturing in children and young adults with leukemia and neuroblastoma. *Transfusion (Paris)* **58**, 1414–1420 (2018).
93. Zhao, J., Lin, Q., Song, Y. & Liu, D. Universal CARs, universal T cells, and universal CAR T cells. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **11**, 132 (2018).
94. Depil, S., Duchateau, P., Grupp, S. A., Mufti, G. & Poirot, L. ‘Off-the-shelf’ allogeneic CAR T cells: development and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* **19**, 185–199 (2020).
95. Martínez Bedoya, D., Dutoit, V. & Migliorini, D. Allogeneic CAR T Cells: An Alternative to Overcome Challenges of CAR T Cell Therapy in Glioblastoma. *Front. Immunol.* **12**, (2021).
96. Abdelhakim, H., Abdel-Azim, H. & Saad, A. Role of $\alpha\beta$ T Cell Depletion in Prevention of Graft versus Host Disease. *Biomedicines* **5**, 35 (2017).
97. Valton, J. *et al.* A Multidrug-resistant Engineered CAR T Cell for Allogeneic Combination Immunotherapy. *Mol. Ther.* **23**, 1507–1518 (2015).
98. Zheng, D., Wang, X. & Xu, R.-H. Concise Review: One Stone for Multiple Birds: Generating Universally Compatible Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **34**, 2269–2275 (2016).
99. Prommersberger, S. *et al.* CARAMBA: a first-in-human clinical trial with SLAMF7 CAR-T cells prepared by virus-free Sleeping Beauty gene transfer to treat multiple myeloma. *Gene Ther.* **28**, 560–571 (2021).
100. Bozza, M. *et al.* A nonviral, nonintegrating DNA nanovector platform for the safe, rapid, and persistent manufacture of recombinant T cells. *Sci. Adv.* **7**, eabf1333 (2021).

101. Sullivan, C. S. & Pipas, J. M. T Antigens of Simian Virus 40: Molecular Chaperones for Viral Replication and Tumorigenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 179–202 (2002).
102. Reece-Hoyes, J. S. & Walhout, A. J. M. Gateway Recombinational Cloning. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2018**, pdb.top094912 (2018).
103. Hartley, J. L., Temple, G. F. & Brasch, M. A. DNA Cloning Using In Vitro Site-Specific Recombination. *Genome Res.* **10**, 1788–1795 (2000).
104. Petersen, L. K. & Stowers, R. S. A Gateway MultiSite Recombination Cloning Toolkit. *PLOS ONE* **6**, e24531 (2011).
105. Kochenderfer, J. N. *et al.* Construction and preclinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J. Immunother. Hagerstown Md* **1997** **32**, 689–702 (2009).
106. Beard, B. C., Adair, J. E., Trobridge, G. D. & Kiem, H.-P. High-Throughput Genomic Mapping of Vector Integration Sites in Gene Therapy Studies. in *Hematopoietic Stem Cell Protocols* (eds. Bunting, K. D. & Qu, C.-K.) 321–344 (Springer, New York, NY, 2014). doi:10.1007/978-1-4939-1133-2_22.
107. Wells, D. W. *et al.* An analytical pipeline for identifying and mapping the integration sites of HIV and other retroviruses. *BMC Genomics* **21**, 216 (2020).
108. Heinz, S. *et al.* Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol. Cell* **38**, 576–589 (2010).
109. Quach, D. H., Lulla, P. & Rooney, C. M. Banking on virus-specific T cells to fulfill the need for off-the-shelf cell therapies. *Blood* **141**, 877–885 (2023).
110. Andrianaki, A., Siapati, E., Hirata, R., Russell, D. & Vassilopoulos, G. Dual transgene expression by foamy virus vectors carrying an endogenous bidirectional promoter. *Gene Ther.* **17**, 380–388 (2010).
111. Sweeney, N. P. *et al.* Rapid and Efficient Stable Gene Transfer to Mesenchymal Stromal Cells Using a Modified Foamy Virus Vector. *Mol. Ther.* **24**, 1227–1236 (2016).

112. Deyle, D. R. *et al.* Normal Collagen and Bone Production by Gene-targeted Human Osteogenesis Imperfecta iPSCs. *Mol. Ther.* **20**, 204–213 (2012).
113. Mackey, L. C. *et al.* Epigenetic Enzymes, Age, and Ancestry Regulate the Efficiency of Human iPSC Reprogramming. *STEM CELLS* **36**, 1697–1708 (2018).
114. Sacco, A. M. *et al.* Diversity of dermal fibroblasts as major determinant of variability in cell reprogramming. *J. Cell. Mol. Med.* **23**, 4256–4268 (2019).
115. Papapetrou, E. P. *et al.* Stoichiometric and temporal requirements of Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc expression for efficient human iPSC induction and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 12759–12764 (2009).
116. Schmitt, C. E. *et al.* Fluorescent tagged episomals for stoichiometric induced pluripotent stem cell reprogramming. *Stem Cell Res. Ther.* **8**, 132 (2017).
117. Pfaff, N. *et al.* A ubiquitous chromatin opening element prevents transgene silencing in pluripotent stem cells and their differentiated progeny. *STEM CELLS* **31**, 488–499 (2013).
118. Brendel, C. *et al.* Physiological regulation of transgene expression by a lentiviral vector containing the A2UCOE linked to a myeloid promoter. *Gene Ther.* **19**, 1018–1029 (2012).
119. Müller-Kuller, U. *et al.* A minimal ubiquitous chromatin opening element (UCOE) effectively prevents silencing of juxtaposed heterologous promoters by epigenetic remodeling in multipotent and pluripotent stem cells. *Nucleic Acids Res.* **43**, 1577–1592 (2015).
120. Kreft, Ł. *et al.* ConTra v3: a tool to identify transcription factor binding sites across species, update 2017. *Nucleic Acids Res.* **45**, W490–W494 (2017).
121. Nasimuzzaman, M. & Persons, D. A. Cell Membrane-associated Heparan Sulfate Is a Receptor for Prototype Foamy Virus in Human, Monkey, and Rodent Cells. *Mol. Ther.* **20**, 1158–1166 (2012).
122. Weiss, R. J., Esko, J. D. & Tor, Y. Targeting Heparin- and Heparan Sulfate-Protein Interactions. *Org. Biomol. Chem.* **15**, 5656–5668 (2017).

123. Denning, W. *et al.* Optimization of the transductional efficiency of lentiviral vectors: effect of sera and polycations. *Mol. Biotechnol.* **53**, 308–314 (2013).
124. Duda, A., Lüftenegger, D., Pietschmann, T. & Lindemann, D. Characterization of the Prototype Foamy Virus Envelope Glycoprotein Receptor-Binding Domain. *J. Virol.* **80**, 8158 (2006).
125. Pietschmann, T., Zentgraf, H., Rethwilm, A. & Lindemann, D. An Evolutionarily Conserved Positively Charged Amino Acid in the Putative Membrane-Spanning Domain of the Foamy Virus Envelope Protein Controls Fusion Activity. *J. Virol.* **74**, 4474–4482 (2000).
126. Frontiers | Cord blood-derived CD19-specific chimeric antigen receptor T cells: an off-the-shelf promising therapeutic option for treatment of diffuse large B-cell lymphoma.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1139482/full>.
127. Liu, D.-D. *et al.* Umbilical cord blood: A promising source for allogeneic CAR-T cells. *Front. Oncol.* **12**, 944248 (2022).
128. Zhang, H., Zhao, P. & Huang, H. Engineering better chimeric antigen receptor T cells. *Exp. Hematol. Oncol.* **9**, 34 (2020).
129. Yin, X., He, L. & Guo, Z. T-cell exhaustion in CAR-T-cell therapy and strategies to overcome it. *Immunology* **169**, 400–411 (2023).

Article

Non-Viral Episomal Vector Mediates Efficient Gene Transfer of the β -Globin Gene into K562 and Human Haematopoietic Progenitor Cells

Vassileios M. Lazaris ^{1,†}, Emmanouil Simantirakis ^{2,†}, Eleana F. Stavrou ¹, Meletios Verras ¹, Argyro Sgourou ³, Maria K. Keramida ⁴, George Vassilopoulos ² and Aglaia Athanassiadou ^{1,*}

- ¹ Department of General Biology, Medical School, University of Patras, 26504 Patras, Greece; vlazaris@gmail.com (V.M.L.); staurou@upatras.gr (E.F.S.); meletver@gmail.com (M.V.)
 - ² Centre of Basic Research, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens (BRFAA), 11527 Athens, Greece; esimantirakis@gmail.com (E.S.); gvasilop@bioacademy.gr (G.V.)
 - ³ Biology Laboratory, School of Science and Technology, Hellenic Open University, 26335 Patras, Greece; sgourou@eap.gr
 - ⁴ IVF and Andrology Labs, IVF Unit, General University Hospital of Patras, 26504 Patras, Greece; maria_keram@yahoo.gr
- * Correspondence: athanass@med.upatras.gr
- † These authors contributed equally to this work.



Citation: Lazaris, V.M.; Simantirakis, E.; Stavrou, E.F.; Verras, M.; Sgourou, A.; Keramida, M.K.; Vassilopoulos, G.; Athanassiadou, A. Non-Viral Episomal Vector Mediates Efficient Gene Transfer of the β -Globin Gene into K562 and Human Haematopoietic Progenitor Cells. *Genes* **2023**, *14*, 1774. <https://doi.org/10.3390/genes14091774>

Academic Editors: Christos K. Kontos and Antonia Follenzi

Received: 22 May 2023

Revised: 13 July 2023

Accepted: 4 September 2023

Published: 8 September 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: β -Thalassemia is a subgroup of inherited blood disorders associated with mild to severe anemia with few and limited conventional therapy options. Lately, lentiviral vector-based gene therapy has been successfully applied for disease treatment. However, the current development of non-viral episomal vectors (EV), non-integrating and non-coding for viral proteins, may be helpful in generating valid alternatives to viral vectors. We constructed a non-viral, episomal vector pEP β -globin for the physiological β -globin gene based on two human chromosomal elements: the scaffold or matrix attachment region (S/MAR), allowing for long nuclear retention and non-integration and the β -globin replication initiation region (IR), allowing for enhancement of replication and establishment. After nucleofections into K562 cells with a transfection efficiency of $24.62 \pm 7.7\%$, the vector induces stable transfection and is detected in long-term cultures as a non-integrating, circular episome expressing the β -globin gene efficiently. Transfections into CD34+ cells demonstrate an average efficiency of $15.57 \pm 11.64\%$. In the colony-forming cell assay, fluorescent colonies are 92.21% , which is comparable to those transfected with vector pEP-IR at 92.68% . Additionally, fluorescent colonies produce β -globin mRNA at a physiologically 3-fold higher level than the corresponding non-transfected cells. Vector pEP β -globin provides the basis for the development of therapeutic EV for gene therapy of β -thalassemias.

Keywords: non-viral vector; non-integrating; episomal; β -globin; β -Thalassemia; S/MAR; IR; gene therapy

1. Introduction

Gene therapy is currently a promising strategy for the treatment of incurable diseases where only supportive therapy can be administered. The European Medicines Agency (EMA) has approved a few medicinal products, including a vector for the gene therapy of β -thalassemia for non- β^0/β^0 genotype of the adult β -globin gene. The human β -globin gene, after the switching of the γ - to β -globin gene expression, is expressed in the adult stage of human life, in the red bone marrow, during erythropoiesis and particularly in reticulocytes and erythrocytes [1].

β -Thalassemia is a severe congenital hemolytic anemia caused by decreased or absent β -globin peptides, mainly due to mutations in the β -globin gene locus. There are at least 350 mutations in the β -globin gene worldwide. As a result, β -thalassemia patients present

Review

FV Vectors as Alternative Gene Vehicles for Gene Transfer in HSCs

Emmanouil Simantirakis ¹, Ioannis Tsironis ¹ and George Vassilopoulos ^{1,2,*}

¹ Gene Therapy Lab, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, Division of Genetics and Gene Therapy, Basic Research II, 11527 Athens, Greece; esimantirakis@bioacademy.gr (E.S.); tsironis@upatras.gr (I.T.)

² Division of Hematology, University of Thessaly Medical School, 41500 Larissa, Greece

* Correspondence: gvasilop@bioacademy.gr

Received: 8 January 2020; Accepted: 15 March 2020; Published: 19 March 2020



Abstract: Hematopoietic Stem Cells (HSCs) are a unique population of cells, capable of reconstituting the blood system of an organism through orchestrated self-renewal and differentiation. They play a pivotal role in stem cell therapies, both autologous and allogeneic. In the field of gene and cell therapy, HSCs, genetically modified or otherwise, are used to alleviate or correct a genetic defect. In this concise review, we discuss the use of SFVpsc_huHSRV.13, formerly known as Prototype Foamy Viral (PFV or FV) vectors, as vehicles for gene delivery in HSCs. We present the properties of the FV vectors that make them ideal for HSC delivery vehicles, we review their record in HSC gene marking studies and their potential as therapeutic vectors for monogenic disorders in preclinical animal models. FVs are a safe and efficient tool for delivering genes in HSCs compared to other retroviral gene delivery systems. Novel technological advancements in their production and purification in closed systems, have allowed their production under cGMP compliant conditions. It may only be a matter of time before they find their way into the clinic.

Keywords: foamy virus; gene therapy; HSC; gene marking; FV gene transfer to HSCs; gene therapy alternatives

1. Introduction

Hematopoietic Stem Cells (HSCs) are rare cells residing in the Bone Marrow (BM) that can support blood cell production for the lifetime of an individual. This is achieved through HSCs potential to differentiate and self-renew [1]. The self-renewal process is the central dogma in stem cell biology and is a character that is lost when HSCs are extensively manipulated ex vivo; this observation argues for the substantial contribution of the BM milieu in supporting HSCs. Practically, both HSC nature and BM nurture, in a coordinated interplay, allow HSCs to express their unique characters [2]. What has been elusive is the HSC per se; HSC cannot be identified by morphology but only by surface markers and functional assays.

In humans, HSCs are considered as CD34+ cells residing in the mononuclear cell population of the BM. Not all HSCs are CD34+ but a significant fraction of CD34+ cells are HSCs; this circular argument can be rephrased to convey that CD34+ cells are enriched in HSC and CD34 marking is used to assay whether a certain cell population has enough HSC to serve as a donor for a transplantation experiment [3]. The latter is the sole surrogate marker to assay whether a population of cells has the potential to support hematopoiesis in a myeloablated host. In addition, Stem Cell Transplantation (SCT), is the ultimate marker to support the potential of a viral vector to correct a genetic defect in a HSC; the marked or corrected cells of the donor will be present in the blood cells of the recipient host and will provide phenotypic correction for a lifetime.