

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Σχολή Επιστημών Υγείας  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*Έκπτυξη Γενετικά Τροποποιημένων Αρχέγονων Αιμοποιητικών  
Κυττάρων χωρίς Επαγωγή Διαφοροποίησης με χρήση Μικρών Μορίων  
(Small Molecules)*

Σπυριδόπουλος Βασίλειος

A.E.M. : 01015

Μέλη Τριμελούς Επιτροπής

Ψαρρά Άννα-Μαρία  
Γιαννάκη Ευαγγελία  
Γιακουντής Αντώνιος

Θεσσαλονίκη, 2020

University of Thessaly

School of Health Science

Biochemistry and Biotechnology Department

DIPLOMA THESIS

Expansion of Genetically Modified Hematopoietic Stem Cells (HSCs)  
without Induction of Differentiation Using Small Molecules

Spyridopoulos Vasileios

A.E.M. : 01015

Members of Evaluation Committee

Psarra Anna-Maria  
Yannaki Evangelia  
Giakountis Antonios

Thessaloniki, 2020

## Μέλη Τριμελούς Επιτροπής

Ψαρρά Άννα-Μαρία

Επίκουρη Καθηγήτρια,  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, (ΤΒΒ),  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Γιαννάκη Ευαγγελία

Αιματολόγος Αιματολογικής Κλινικής και Διευθύντρια Μονάδας  
Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας Γενικού Νοσοκομείου Γ. Παπανικολάου  
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Πανεπιστημίου Washington (Seattle)

Γιακουντής Αντώνιος

Επίκουρος καθηγητής Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής,  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## Περιεχόμενα

### ΤΙΤΛΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες

Περίληψη

1. Εισαγωγή
  - 1.1. Γονιδιακή Θεραπεία
  - 1.2. Ιστορική Αναδρομή
  - 1.3. Φορείς Γονιδιακής Θεραπείας
    - 1.3.1. Μη – ιικοί φορείς
    - 1.3.2. Ιικοί Φορείς
  - 1.4. Είδη Γονιδιακής Θεραπείας – *Ex vivo* Γονιδιακή Θεραπεία
  - 1.5. Αρχέγονα Αιμοποιητικά Κύτταρα – Χαρακτηριστικές Ιδιότητες
  - 1.6. Αντιγόνα Επιφάνειας των Αρχέγονων Αιμοποιητικών Κυττάρων
  - 1.7. Λεντι-ιικοί Φορείς Γονιδιακής Θεραπείας
  - 1.8. Μικρά Μόρια
    - 1.8.1. UM171
  - 1.9. Μέθοδοι *Ex Vivo* Έκπτυξης Αρχέγονων Αιμοποιητικών Κυττάρων
2. Σκοπός
3. Υλικά και Μέθοδοι
  - 3.1. Αντιδραστήρια
  - 3.2. Εργαστηριακός Εξοπλισμός
  - 3.3. Κυτταρικές Σειρές
  - 3.4. Πλασμιδιακός Φορέας Έκφρασης
  - 3.5. Αντιβιοτικά
  - 3.6. Μετασηματισμός Βακτηριακών Στελεχών
  - 3.7. Πολλαπλασιασμός και Απομόνωση Πλασμιδίων από *E.coli* (MiniPrep)
  - 3.8. Προσδιορισμός Συγκέντρωσης Πλασμιδίου
  - 3.9. Πέψεις Πλασμιδίων
  - 3.10. Παραγωγή Πλασμιδίου σε Μεγάλη Κλίμακα (MaxiPrep)
  - 3.11. Παραγωγή Ιικού Φορέα
  - 3.12. Τιτλοδότηση
  - 3.13. Απομόνωση και διαμόλυνση CD34+ κυττάρων με λεντι-ικό φορέα GFP
    - 3.13.1. Απομόνωση CD34+ κυττάρων από ακινητικοποιημένο περιφερικό αίμα με ανοσομαγνητικό διαχωρισμό
    - 3.13.2. Προδιέγερση των CD34+ κυττάρων
    - 3.13.3. Διαμόλυνση των CD34+ κυττάρων με GFP λεντι-ικό φορέα
  - 3.14. Καλλιέργεια διαμολυσμένων CD34+ κυττάρων με Small Molecules
    - 3.14.1. Καλλιέργεια διαμολυσμένων CD34+ κυττάρων με UM171
    - 3.14.2. Ανοσοφαινότυπος αρχέγονων υποπληθυσμών CD34+ κυττάρων
4. Αποτελέσματα
  - 4.1. Αποτελέσματα προϊόντων ηλεκτροφόρησης πλασμιδίων
  - 4.2. Αποτελέσματα απομόνωσης CD34<sup>+</sup> κυττάρων
  - 4.3. Τιτλοδότηση παραγόμενων GFP-λεντι-ικών φορέων
  - 4.4. Συνολικός αριθμός κυττάρων και αποικιών σε καλλιέργεια με small molecules
  - 4.5. Έκπτυξη των CD34+ αρχέγονων υποπληθυσμών παρουσία UM171

4.6. Επίπεδα Έκφρασης του Διαγονιδίου GFP στους αρχέγονους υποπληθυσμούς των CD34

5. Συζήτηση
6. Βιβλιογραφία

## Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία αποτελεί περιγραφή της διπλωματικής μελέτης που εκπονήθηκε στη Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας της Αιματολογικής Κλινικής του Γενικού Νοσοκομείου «Γ. Παπανικολάου» στα πλαίσια των σπουδών μου στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το ακαδημαϊκό έτος 2019 – 2020.

Με την ολοκλήρωση της συγγραφής της εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Ψαρρά Άννα-Μαρία, επίκουρη καθηγήτρια στο τμήμα Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την αρμονική συνεργασία. Την κα. Ευαγγελία Γιαννάκη, Αιματολόγο της Αιματολογικής Κλινικής του Γενικού Νοσοκομείου «Γ. Παπανικολάου», Διευθύντρια της Μονάδας Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας και Αναπληρώτρια καθηγήτρια του Πανεπιστημίου Washington του Seattle, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου και την ευκαιρία που μου προσέφερε με την απόφασή της να μου αναθέσει τη θέση αυτή καθώς και τον κύριο Γιακουντή Αντώνιο, επίκουρο καθηγητή Μοριακής Βιολογίας και Γονιδωματικής του τμήματος Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Επιπλέον, ευχαριστώ τον κ. Αχιλλέα Αναγνωστόπουλο, Συντονιστή Διευθυντή της Αιματολογικής Κλινικής – Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, για την ευκαιρία που μου προσέφερε αποδεχόμενος την αίτησή μου να πραγματοποιήσω τη διπλωματική μου μελέτη στο εργαστήριο αυτό.

Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω την διδακτορική ερευνήτρια Ιωάννα Βαλλιάνου, υπεύθυνη και επιβλέπουσα των πειραμάτων μου για την συμβολή της στην προσπάθειά μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να πω στην διδακτορική ερευνήτρια Αναστασία Παπαδοπούλου, η οποία από την πρώτη στιγμή με υποδέχτηκε με τρόπο εγκάρδιο στο εργαστήριο και ήταν εκεί για εμένα. Στους υποψήφιους διδάκτορες Μαρία Αλβανού, Αφροδίτη Γεωργακοπούλου, Πηνελόπη Παπαγιάννη, Κυριάκο Κουκουλιά και Γιώργο Καλτσούνη για την αμέριστη συμπαράσταση, την καθοδήγηση, την ψυχολογική υποστήριξη και την προθυμία για βοήθεια όποτε μου ήταν απαραίτητη. Χωρίς την υπομονή και την καθοδήγηση τους καθόλη τη διάρκεια του έτους δεν θα μπορούσα να τα έχω καταφέρει. Οι συμβουλές της ομάδας ήταν αναντικατάστατες.

Οφείλω να ευχαριστήσω, επιπλέον, τόσο τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Χρύσα Πανταζή, Παναγιώτα Χριστοφή, Αναστάσιο Κουιμτζίδη και Πάμελα Μελό για την βοήθεια που μου πρόσφεραν, όσο και την κυρία Φανή Ζερβού, νοσηλεύτρια και τεχνολόγο του εργαστηρίου. Ένα σημαντικό ευχαριστώ και στην κυρία Ελένη Σιώτου, κτηνίατρο του εργαστηρίου, για την επιστημονική καθοδήγηση, τις συμβουλές, και τις γνώσεις στο επίπεδο του χειρισμού και φυσιολογίας των πειραματοζώων.

Οφείλω να μην παραλείψω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στους συμφοιτητές και συνεργάτες μου Κυριακή Πασχούδη, Αγγελική Βαρβαράκη, Χρήστο Ζησιάδη, Αναστασία Καραγέργου και Νίκη Θεοδωρίδου, για την αμέριστη συμπαράσταση και το φιλικό κλίμα όσο καιρό έπρεπε να δουλεύουμε ταυτόχρονα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου και συναδέλφους βιοχημικούς, Χρήστο Π., Μαρίνα Γ., Ιωάννα Ρ., Μελίνα Σ., Αφροδίτη Κ. και Κωνσταντίνο Ν. οι οποίοι με την αισιοδοξία και το χαμόγελο τους με βοήθησαν σε αυτό το ταξίδι.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ, όμως, ανήκει στην οικογένειά μου, με την ευρύτερη έννοια. Συγκεκριμένα στον πατέρα μου Σπυριδόπουλο Θεμιστοκλή, στην μητέρα μου Σωτηριάδου Αλεξάνδρα, στην αδερφή μου Σπυριδοπούλου Νικολέτα, καθώς και στις Μαυρίδου Βασιλική, Μαυρίδου Δέσποινα, Σωτηριάδου Σιμέλα και Κάρμη Σεμέλη που είναι για μένα εκτός από

οικογένεια, μια ζεστή αγκαλιά πάντα διαθέσιμη να με ακούσει, να με βοηθήσει, να με νουθετήσει και να με στηρίξει σε κάθε μου απόφαση.

Θεσσαλονίκη, 2020  
Σπυριδόπουλος Βασίλειος

## Περίληψη



Η γονιδιακή θεραπεία έχει δώσει λύση σε πληθώρα νοσημάτων. Μέσα σε αυτά συγκαταλέγονται και ασθένειες του αιμοποιητικού συστήματος η θεραπεία των οποίων περιλαμβάνει μεταμόσχευση γενετικά τροποποιημένων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Παρ' όλη την επιτυχία της μεθόδου, συνεχίζουν να υπάρχουν προβλήματα όπως η απώλεια του αρχέγονου χαρακτήρα. Ταυτόχρονα, η δυνατότητα εμφύτευσης των συγκεκριμένων κυττάρων στον μυελό των οστών, μπορεί να ποικίλει. Πρόσφατες μελέτες κάνουν λόγο για μικρά μόρια (SMs) τα οποία συμβάλουν στην έκπτυξη αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων που απομονώθηκαν από κινητοποιημένο περιφερικό αίμα.

Στην παρούσα μελέτη, έγινε έκπτυξη γενετικά τροποποιημένων αρχέγονων αιμοποιητικών (HSCs) κυττάρων χωρίς επαγωγή διαφοροποίησης με χρήση μικρών μορίων, και συγκεκριμένα με χρήση του παραγώγου πυριμινοϊνδόλης UM171. Χρησιμοποιήθηκαν CD34<sup>+</sup> αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα τα οποία απομονώθηκαν από υγιείς δότες. Η γενετική τροποποίηση την οποία υπέστησαν τα HSCs πραγματοποιήθηκε με χρήση ενός λεντι-ϊικού φορέα, που φέρει το διαγονίδιο της GFP πρωτεΐνης.

Μετά από διαμόλυνση των CD34<sup>+</sup> κυττάρων (MOI 20, 18-24 ώρες), τα κύτταρα χωρίστηκαν στα επιμέρους groups και έγινε έλεγχος της επίδρασης του μικρού μορίου UM171 στην έκπτυξη/διαφοροποίηση των κυττάρων, αλλά και στην έκφραση της πρωτεΐνης GFP. Η παρουσία του UM171, προκάλεσε έκπτυξη των πλέον αρχέγονων υποπληθυσμών των αιμοποιητικών κυττάρων χωρίς απώλεια του αρχέγονου χαρακτήρα τους έως και 7 ημέρες μετά την καλλιέργεια και ενίσχυσε την έκφραση GFP.

Undoubtedly, over the last years there has been remarkable progress in the field of gene therapy for a plethora of diseases, such as those of the hemopoietic system that require transplantation of genetically modified Hematopoietic Stem Cells (HSCs). However, this particular cell line, in the future, can lose its stem cell potential, and at the same time its engraftment potential. Latest research has revealed a number of small molecules (SMs), which can promote the expansion of Hematopoietic Stem Cells isolated from peripheral blood.

In this study, expansion of genetically modified hematopoietic stem cells (HSCs) without induction of differentiation using small molecules, was achieved by UM171, a pyriminoindole derivative.

CD34<sup>+</sup> HSCs were used, isolated from healthy donors. The genetic modification of the HSCs was performed with the use of a lentiviral vector carrying the GFP transgene.

After the transduction of CD34<sup>+</sup> cells, at an MOI of 20 and 18 to 24 hours of culture, cells were separated into groups. In each group, the effect of UM171 on the expansion and differentiation of the cells, as well as on the expression of GFP was tested.

Overall, the results indicate that UM171 promotes the expansion of HSCs, while maintaining their multipotency, after being cultured for 6 days.

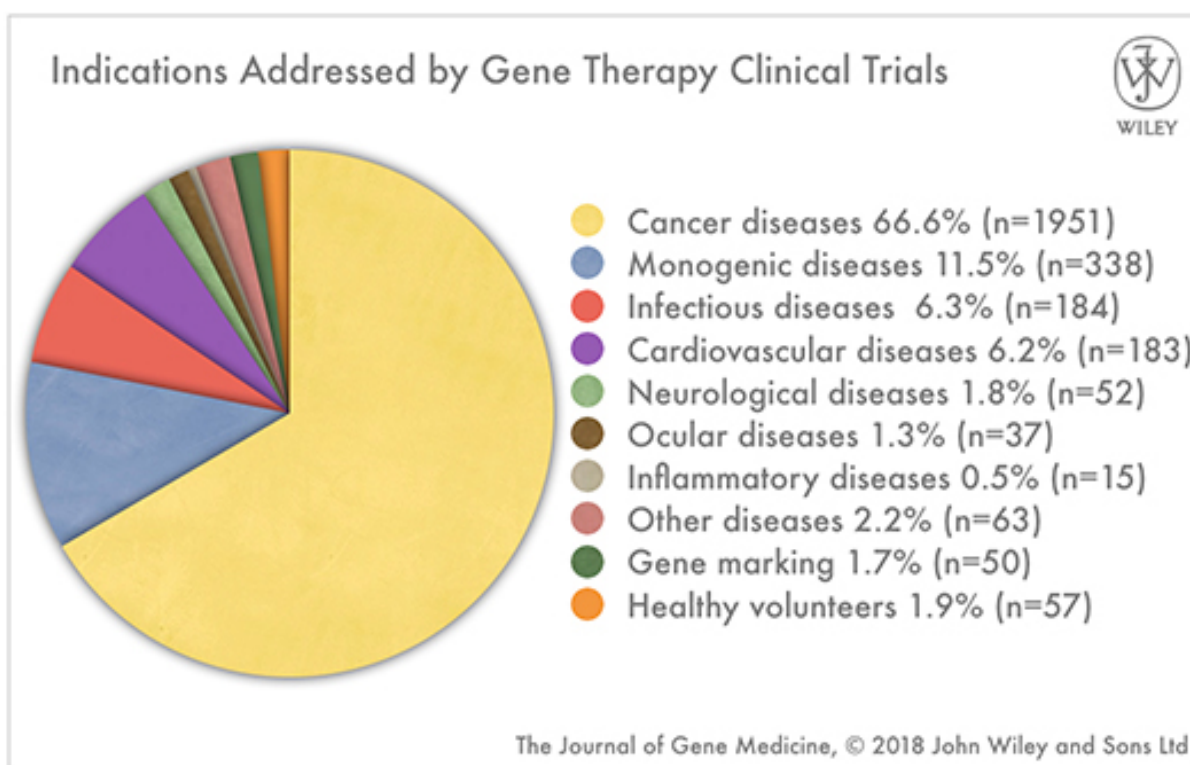
## 1. Εισαγωγή

## 1.1 Γονιδιακή Θεραπεία

### Ορισμός

Η γονιδιακή θεραπεία αποτελεί μια πρωτοποριακή μέθοδο, η οποία στηρίζεται στη μεταφορά ενός φυσιολογικού γονιδίου σε κύτταρα στόχους που φέρουν ένα μεταλλαγμένο γονίδιο το οποίο δεν παράγει επαρκή ποσότητα κάποιας λειτουργικής πρωτεΐνης. Στόχος της γονιδιακής θεραπείας είναι ασθένειες, οι οποίες μπορεί να είναι κληρονομικές (π.χ. β-θαλασσαιμία, κυστική ίνωση, αιμορροφιλία) ή επίκτητες (π.χ. καρκίνος) (Kaji & Leiden, 2001). Η εν λόγω θεραπεία αφορά σωματικά κύτταρα και όχι κύτταρα αναπαραγωγής, έτσι ώστε η γονιδιακή διόρθωση να μη μεταβιβάζεται σε επόμενες γενιές.

Η συντριπτική πλειοψηφία των κλινικών δοκιμών γονιδιακής θεραπείας μέχρι σήμερα έχει ως στόχο την αντιμετώπιση του καρκίνου (66.6%), μονογονιδιακών ασθενειών (11.5%) και μολυσματικών ασθενειών (6.3%) (Εικόνα 1).



**Εικόνα 1.** Εγκεκριμένες κλινικές μελέτες γονιδιακής θεραπείας (Indications Adressed by Gene Therapy Clinical Trials – Wiley.)

## 1.2 Ιστορική αναδρομή

Το 1972, οι Friedman και Robin, δημοσίευσαν ένα άρθρο στο περιοδικό Science με τον τίτλο «Gene therapy for human genetic diseases». Το 1984, σχεδιάστηκε το πρώτο σύστημα μεταφοράς ενός φορέα ρετρο-ιού που κατάφερε να εισάγει αποτελεσματικά ξένο DNA σε χρωμοσώματα θηλαστικών. Η πρώτη προσπάθεια τροποποίησης του ανθρώπινου DNA ήταν το 1980 από τον Martin Cline, αλλά η πρώτη γονιδιακή θεραπεία σε άνθρωπο, αποδεκτή από το National Institutes of Health, διεξήχθη τον Μάιο του 1989. Η πρώτη θεραπευτική χρήση της γονιδιακής μεταφοράς καθώς και η πρώτη άμεση εισαγωγή του ανθρώπινου DNA στο γονιδίωμα πραγματοποιήθηκε από τον Άντερσον σε μια δοκιμή το 1990. Πλέον, με τις νέες μεθόδους που παρέχονται από τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA, από το 1989 έως τον Δεκέμβριο 2018, είχαν καταγραφεί παγκοσμίως πάνω από 2900 εγκεκριμένες κλινικές μελέτες που χρησιμοποίησαν τεχνικές γονιδιακής θεραπείας. Όπως απεικονίζεται στην εικόνα 1, η γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου κατέχει την πρώτη θέση, και ακολουθεί και η θεραπεία κληρονομικών επίκτητων ασθενειών σε ποσοστό 11,5 % (Ginn et al., 2013)

Η γονιδιακή θεραπεία για τον καρκίνο εισήχθη το 1992/93 για τη θεραπεία του γλοιοβλαστώματος, μιας κακοήθους μορφής εγκεφαλικού όγκου (Bonnet, 2002; Morrison & Weissman, 1994), όπου χρησιμοποιήθηκε ένας φορέας που εκφράζει antisense IGF-I RNA το οποίο συνδέεται με ισχυρή ανοσολογική και αποπτωτική δράση.

Το 1992, ο Claudio Bordignon, στο San Raffaele, πραγματοποίησε την πρώτη γονιδιακή θεραπεία χρησιμοποιώντας τα αιματοποιητικά βλαστοκύτταρα ως κύτταρα-στόχους για τη γονιδιακή θεραπεία κληρονομικών νοσημάτων και συγκεκριμένα, στην πρώτη επιτυχημένη γονιδιακή θεραπεία για την ανεπάρκεια της απαμινάσης της αδενοσίνης (ADA-SCID), μιάς μορφής ανοσοανεπάρκειας (SCID). Το 1993, ο Andrew Gobeau γεννήθηκε με SCID μετά από προγεννητική γενετική εξέταση. Το αίμα αφαιρέθηκε από τον πλακούντα και τον ομφάλιο λώρο της μητέρας, για να ληφθούν βλαστοκύτταρα. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την απαμινάση της αδενοσίνης (ADA) εισήχθη σε ρετροϊκό φορέα που διαμόλυε τα βλαστοκύτταρα εισάγοντας το γονίδιο στα χρωμοσώματα των βλαστικών κυττάρων. Τα γενετικά τροποποιημένα βλαστοκύτταρα που περιείχαν το γονίδιο ADA εγχύθηκαν στο αίμα του Andrew. Οι ενέσεις του ενζύμου ADA, ως θεραπεία υποκατάστασης της νόσου, χορηγούνταν επίσης εβδομαδιαίως. Για τέσσερα χρόνια τα T λεμφοκύτταρα που προέρχονται από βλαστικά κύτταρα, παρήγαγαν ένζυμα ADA. Μετά από τέσσερα χρόνια όμως χρειάστηκε επαναλαμβανόμενη θεραπεία.

Τον Μάρτιο του 2006, ερευνητές ανακοίνωσαν την επιτυχή χρήση της γονιδιακής θεραπείας για τη θεραπεία δύο ενήλικων ασθενών για X-φυλοσύνδετη χρόνια κοκκιωματώδη νόσο, μια ασθένεια που επηρεάζει τα μυελοειδή κύτταρα και το ανοσοποιητικό σύστημα. Ένα χρόνο αργότερα, άλλοι ερευνητές ανακοίνωσαν την πρώτη δοκιμή γονιδιακής θεραπείας για

κληρονομική ασθένεια του αμφιβληστροειδούς. Η πρώτη δοκιμή διεξήχθη σε ασθενή 23 ετών, τον Robert Johnson, στις αρχές του 2007. Το 2010, αναφέρεται η θεραπεία ενός ασθενή 18 χρόνων με β-θαλασσαιμία. Η τεχνική χρησιμοποίησε λεντικό φορέα για την προσθήκη του ανθρώπινου γονιδίου β-σφαιρίνης σε κεκαθαρμένα κύτταρα αίματος και μυελού που λήφθηκαν από τον ασθενή τον Ιούνιο του 2007.

Η γονιδιακή θεραπεία για την συγγενή τύφλωση που προκαλείται από τη μετάλλαξη RPE65 (Luxturna, Spark Therapeutics) και η γονιδιακή θεραπεία με χιμαιρικούς T κυτταρικούς υποδοχείς για τη Β-λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα (Kymriah, Novartis) είναι οι πρώτες εγκεκριμένες από το FDA, γονιδιακές θεραπείες που εισήλθαν στην αγορά το 2017. Ακολούθησε η γονιδιακή θεραπεία της νωτιαίας μυϊκής ατροφίας (Zolgensma, Novartis) και της β-θαλασσαιμίας (Zynteglo, BlueBirdBio).

### 1.3 Φορείς γονιδιακής θεραπείας

Η γονιδιακή μεταφορά στα κύτταρα στόχους επιτελείται μέσω φορέων (vectors). Η κεντρική ιδέα της γονιδιακής θεραπείας αφορά στην εισαγωγή του θεραπευτικού γονιδίου στο κύτταρο-στόχος ώστε η έκφραση του γονιδίου δυνητικά να θεραπεύσει ή να επιβραδύνει την πρόοδο της ασθένειας. Ο φορέας μεταφέρει το επιθυμητό διαγονίδιο στον πυρήνα του κυττάρου στόχου, το προστατεύει από αποδόμηση και εξασφαλίζει την μεταγραφή του σε ικανοποιητικό βαθμό στα κύτταρα-στόχος και στα θυγατρικά κύτταρά τους εφόσον ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του κυττάρου. (Gardlik R et al. 2005).

Ο ιδεώδης φορέας διακρίνεται από τα εξής χαρακτηριστικά (Glorioso & Fink, 2004):

1. Έυκολη παραγωγή. Θα πρέπει να μπορεί να παράγεται σε μεγάλη κλινική κλίμακα και να έχει χαμηλό κόστος.
2. Σταθερή έκφραση και υψηλό ποσοστό διαμόλυνσης κυττάρων-στόχων. Μετά την εισαγωγή του στα κύτταρα-στόχος θα πρέπει να παράγει φυσιολογική πρωτεΐνη χωρίς να εξασθενεί η έκφρασή του.
3. Ιστοειδικότητα
4. Διαρκή και ρυθμιζόμενη έκφραση του διαγονιδίου
5. Μη ανοσογονικότητα. Δεν θα πρέπει να επάγει ανοσολογική απόκριση μετά την εισαγωγή του στον οργανισμό. Ενδεχόμενη ενεργοποίηση της χυμικής ανοσίας μέσω της παραγωγής αντισωμάτων μπορεί να καταστήσει ανενεργό το πρωτεϊνικό προϊόν και η κυτταρική ανοσία να εξαλείψει τα διαμολυσμένα κύτταρα.
6. Δυνατότητα μεταφοράς μεγάλου μεγέθους ένθετου DNA. Ο φορέας θα πρέπει να έχει τη δυνατότητα πακεταρίσματος αλληλουχιών μεγάλου εύρους μεγεθών.
7. Αναπαραγωγή και ενσωμάτωση. Θα πρέπει να μπορεί να ενσωματώνεται σε συγκεκριμένο σημείο του χρωμοσωμικού DNA του κυττάρου ή να παραμένει σταθερά στον πυρήνα ως επίσωμα χωρίς να αποικοδομείται και να αναπαράγεται ξεχωριστά. Η τυχαία ενσωμάτωση του φορέα στο γενετικό υλικό μπορεί να οδηγήσει

σε αποσιώπηση της έκφρασής του σε περίπτωση ενσωμάτωσης σε ετεροχρωματική περιοχή ή ακόμα και να προκαλέσει εισχωρητική μεταλλαξιγένεση ενεργοποιώντας παρακείμενα ογκογονίδια.

8. Διαμόλυνση διαιρούμενων και μη κυττάρων. Θα πρέπει να μπορεί να διαμολύνει και μη διαιρούμενα κύτταρα όπως πχ τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα που βρίσκονται στη φάση G0 του κυτταρικού κύκλου.
9. Χαμηλό κόστος

Οι ιικοί φορείς διακρίνονται σε ικούς (viral vectors) και σε μη-ικούς προέλευσης (non-viral vectors).

### 1.3.1 Μη – ιικοί φορείς

Οι μη – ιικοί φορείς γονιδιακής μεταφοράς αποτελούνται από ένα «γυμνό» μόριο νουκλεϊκού οξέος (“naked” DNA) απουσία πρωτεϊνών. Συνήθως είναι ένα πλασμιδιακό DNA το οποίο φέρει το διαγονίδιο, του οποίου η έκφραση ελέγχεται από κατάλληλο υποκινητή, ίσως και άλλα ρυθμιστικά στοιχεία, μια αρχή της αντιγραφής του DNA καθώς και γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό για την επιλογή των διαμολυσμένων κυττάρων. Εφόσον δεν έχουν την ικανότητα να εισέλθουν στα κύτταρα – σε αντίθεση με τους ιικούς φορείς - απαιτούν το συνδυασμό τους με μια μέθοδο γονιδιακής μεταφοράς, φυσικής ή χημικής. Σε αυτές τις μεθόδους περιλαμβάνεται η χρήση λιποσωμάτων, η ηλεκτρομεταφορά /ηλεκτροδιάτρηση, η μεταφορά στον πυρήνα/πυρηνοδιάτρηση, η ένεση με εφαρμογή υδροδυναμικής πίεσης, η αερολυματοποίηση του DNA, η γονιδιακή μεταφορά με βομβαρδισμό σφαιριδίων και η ένεση γυμνού DNA με βελόνα. Οι μη – ιικοί φορείς έχουν μικρή πιθανότητα πρόκλησης διαταραχών, μικρή τοξικότητα και ανοσογονικότητα και η παραγωγή τους σε μεγάλη κλίμακα είναι πιο εύκολη και λιγότερο πολύπλοκη, σε σύγκριση με αυτή των ιικών συστημάτων. Ωστόσο, όμως, η σχετικά χαμηλή και παροδική διαμόλυνση που επιτυγχάνουν, η αυξημένη πιθανότητα απώλειας του μεταφερόμενου νουκλεϊκού οξέος κατά τη μιτωτική διαίρεση του κυττάρου, η πιθανότητα αποσιώπησης της έκφρασης του διαγονιδίου από τους κυτταρικούς μηχανισμούς και η πιθανή τοξικότητα των μέσων γονιδιακής μεταφοράς (όπως τα λιποσώματα) αποτελούν μειονεκτήματα στη χρήση των μη – ιικών φορέων (Patil et al., 2019)

### 1.3.2 Ιικοί φορείς

Οι ιικοί φορείς περιλαμβάνουν γενετικά τροποποιημένους ιούς, οι οποίοι έχουν καταστεί αδρανείς και περιέχουν το επιθυμητό θεραπευτικό γονίδιο στο γονιδίωμά τους. Η ικανότητά τους είναι να μεταφέρουν και να ενσωματώνουν το γονίδιο αυτό στο χρωμοσωμικό DNA του κυττάρου – στόχου. Οι τύποι των φορέων αυτών αντιπροσωπεύονται τόσο από DNA όσο και από RNA ιούς, είτε μονόκλωνους είτε δίκλωνους. Οι πιο συχνοί και ευρέως χρησιμοποιούμενοι τύποι ιικών φορέων είναι οι ρετροϊικοί (retro – viral), λεντι – ιικοί (lenti – viral) και οι αδενοϊικοί φορείς (Adeno – viral vectors), ο οποίοι, μαζί και με άλλους, παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1).

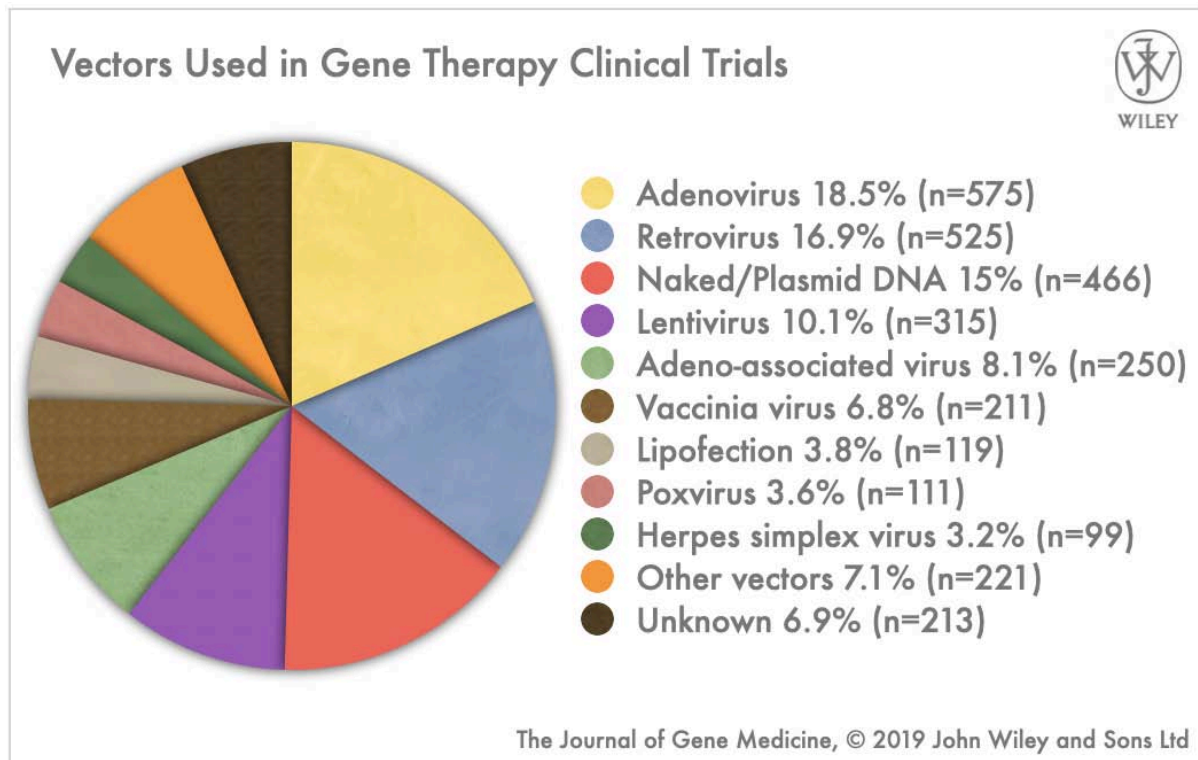
**Πίνακας 1:** Παραδείγματα ιικών φορέων που εφαρμόστηκαν για γονιδιακή θεραπεία (Osawa, Hanada, Hamada, & Nakauchi, 1996; Smith, Weissman, & Heimfeld, 1991)

Ιικός Φορέας	Τύπος γονιδιώματος	Χωρητικότητα ενθέματος	Χαρακτηριστικά
Αδενοϊκοί AD5	dsDNA	< 7,5 kb	- Ευρύ φάσμα ξενιστών - Παροδική έκφραση - Ισχυρή ανοσογονικότητα
Αδενο – σχετιζόμενοι (AAV) AAV2,3,5,6,8,9	ssDNA	< 4 kb	- Σχετικά ευρύ φάσμα ξενιστών - Μη χρωμοσωμική ενσωμάτωση - Ανοσολογική απόκριση
Απλού έρπητα HSV1, HSV	dsDNA	> 30 kb	- Ευρύ φάσμα ξενιστών - Λανθάνουσα λοίμωξη - Μακροπρόθεσμη έκφραση - Χαμηλή τοξικότητα - Μεγάλη χωρητικότητα ενθέματος
Ρετροϊκοί MMSV, MSCV	ssRNA	8 kb	- Διαμόλυνση μόνο διαιρούμενων κυττάρων - Μακροπρόθεσμη έκφραση - Τυχαία ενσωμάτωση
Λεντι – ικοί HIV – 1, HIV – 2	ssRNA	8 kb	- Ευρύ φάσμα ξενιστών - Χαμηλή κυτταροτοξικότητα - Ημιτυχαία ενσωμάτωση - Μακροπρόθεσμη έκφραση
Alphaviruses SFV, SIN, VEE, M1	ssRNA	8 kb	- Ευρύ φάσμα ξενιστών - Χαμηλή ανοσογονικότητα - Εξαιρετικά παροδική έκφραση

Οι πρώτες προσπάθειες γονιδιακής θεραπείας περιλάμβαναν τη χρήση των ρετροϊκών φορέων. Στα χαρακτηριστικά τους περιλαμβάνεται η ικανότητά τους να διαμολύνουν μόνο



διαιρούμενα κύτταρα, η μακροπρόθεσμη έκφρασή τους και η τυχαία ενσωμάτωσή τους στο γονιδίωμα του κυττάρου – στόχου. Σταδιακά οι ρετροϊικοί φορείς αντικαταστάθηκαν από τους λεντι – ιικούς, οι οποίοι αντιθέτως δεν απαιτούν ενεργό κυτταρικό κύκλο για την είσοδό τους στα κύτταρα – στόχους, έχουν ασφαλέστερο προφίλ ενσωμάτωσης και είναι γενετικά πιο σταθεροί. Επιπλέον, έχουν πιο εκτεταμένο εύρος ξενιστών και χαμηλότερη κυτταροτοξικότητα και ενσωματώνονται ημιτυχαία στο γονιδίωμα (Lundstrom, 2018)

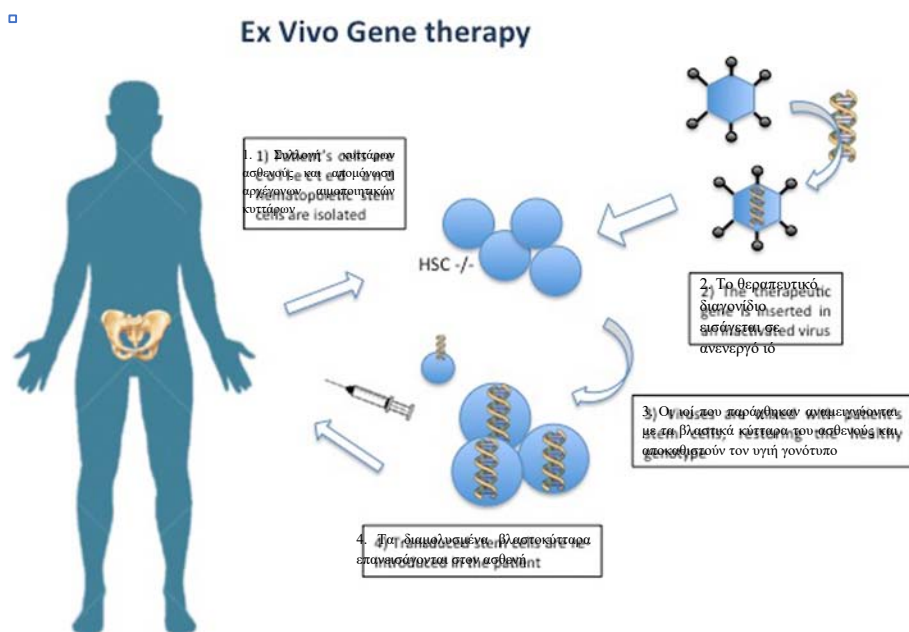


**Εικόνα 2. Εγκεκριμένοι φορείς γονιδιακής θεραπείας (Indications Adressed by Gene Therapy Clinical Trials – Wiley.)**

#### 1.4 Είδη γονιδιακής θεραπείας – Ex vivo γονιδιακή θεραπεία

Η γονιδιακή θεραπεία μπορεί να διαχωριστεί σε δυο κατηγορίες: στη γαμετική και τη σωματική. Η πρώτη έχει σχέση με την τροποποίηση γαμετικών κυττάρων (σπερματοζωάρια και ωάρια), με αποτέλεσμα να υπάρχει δυνατότητα κληρονομής της γενετικής τροποποίησης και στις επόμενες γενιές. Κάτι τέτοιο, βέβαια δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί κλινικά λόγω βιοηθικών ζητημάτων. Η δεύτερη αφορά την τροποποίηση σωματικών κυττάρων και συνεπώς, δεν μεταφέρεται στις επόμενες γενιές.

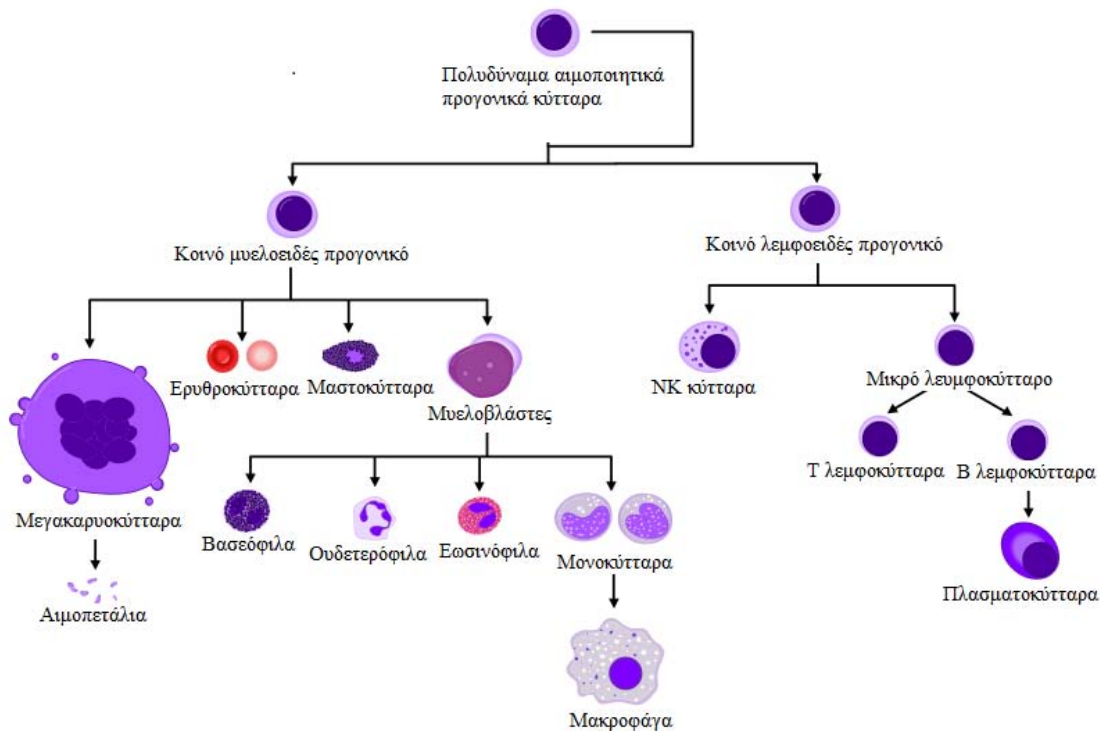
Βάσει του τρόπου μεταφοράς των γενετικώς τροποποιημένων κυττάρων στον ασθενή, η γονιδιακή θεραπεία διαχωρίζεται σε in vivo και ex vivo. Στην in vivo, η διόρθωση των κυττάρων γίνεται μέσα στο σώμα του ασθενούς μέσω τροπισμού του φορέα που ενίεται στην κυκλοφορία προς τον ιστό-στόχο. Συνήθως αφορά ιστούς οι οποίοι είναι δυσπρόσιτοι όπως το ήπαρ ή οι πνεύμονες. Η ex vivo γονιδιακή θεραπεία αφορά εύκολα προσβάσιμα κύτταρα του ασθενή, όπως τα κύτταρα του δέρματος ή τα αιμοποιητικά, τα οποία αφού απομονωθούν από τον πάσχοντα, τροποποιούνται γενετικά σε καλλιέργεια και επαναχορηγούνται. Η διαδικασία αυτή παρουσιάζεται αναλυτικά στην Εικόνα 3.



Εικόνα 3. Διαγραμματική απεικόνιση διαδικασιών που περιλαμβάνονται στην ex vivo γονιδιακή θεραπεία (Fraldi et al., 2018)

### 1.5 Αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα- Χαρακτηριστικές ιδιότητες

Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (Hemopoietic Stem Cells- HSCs) έχουν την δυνατότητα να δώσουν γένεση σε οποιαδήποτε αιμοποιητική κυτταρική σειρά, μέσω μιας συνεχούς δυναμικής διαδικασίας, που ονομάζεται αιμοποίηση και λαμβάνει χώρα στο μυελό των οστών (Εικόνα 3). Τα HSCs ανευρίσκονται στον μυελό των οστών και η διαφοροποίησή τους επάγεται από το μικροπεριβάλλον του μυελού, το οποίο αποτελείται από εξειδικευμένα στρωματικά κύτταρα (stromal cells) και αυξητικούς παράγοντες (growth factors). Τα HSCs αποτελούν ένα πολύ σπάνιο πληθυσμό που αντιστοιχεί σε περίπου 1 ανά 10<sup>4</sup> μονοκύτταρα του μυελού (Osawa et al., 1996; Smith et al., 1991). Διαφοροποιούνται προς δεσμευμένα προγονικά κύτταρα με προκαθορισμένη αναπτυξιακή πορεία (λεμφικά προγονικά κύτταρα ή μυελοειδή προγονικά κύτταρα). Τα δεσμευμένα προγονικά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης, ώστε να παράγονται ώριμες μορφές κυττάρων του αίματος: ουδετερόφιλα, βασεόφιλα, ηωσινόφιλα, μονοκύτταρα/μακροφάγα, T- και B- λεμφοκύτταρα, ερυθροκύτταρα και αιμοπετάλια (Εικόνα 4).



**Εικόνα 4: Διαγραμματική απεικόνιση της ανάπτυξης των διαφορετικών κυττάρων του αίματος από αρχέγονα αιμοποιητικά έως ώριμα κύτταρα (Haematopoiesis - Wikipedia, n.d.)**

Ο ορισμός των HSCs βασίζεται στις παρακάτω μοναδικές λειτουργικές ιδιότητες:

- **Πολυδυναμία.** Ως πολυδυναμία (multipotency) ορίζεται η δυνατότητα διαφοροποίησης των HSCs προς ποικίλες κυτταρικές σειρές. Είναι γνωστό ότι τα HSCs παράγουν τελικά 9 διαφορετικούς τύπους ώριμων κυττάρων.
- **Ικανότητα επαναπληθυσμοποίησης.** Ως ικανότητα επαναπληθυσμοποίησης (repopulating capacity) ορίζεται η ικανότητα των HSCs να αποκαθιστούν το σύνολο της

αιμοποίησης μετά από μεταμόσχευση τους σε λήπτη του οποίου ο μυελός έχει προηγουμένως ολοκληρωτικά καταστραφεί (Osawa et al., 1996; Smith et al., 1991)

➤ **Ικανότητα αυτο-ανανέωσης.** Κύτταρα με ικανότητα αυτοανανέωσης παράγουν πανομοιότυπα κύτταρα απογόνους ως προς τη δυνατότητα πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης και φάσης του κυτταρικού κύκλου, ώστε να διατηρείται πάντα ένας σταθερός αριθμός HSCs στο μυελό, που επαρκεί για την δια βίου παραγωγή των έμμορφων στοιχείων του αίματος. (Domen & Weissman, 1999; Sprangrude et al., 1991).

Εκτός από το μυελό των οστών, HSCs μπορούν να απομονωθούν και από ομφαλιοπλακουντικό αίμα, το οποίο περιέχει μεγαλύτερο αριθμό HSCs από τον μυελό των οστών σε HSCs (Broxmeyer et al., 1989) αλλά και από το κινητοποιημένο περιφερικό αίμα. Βασική πρόκληση στην ανάπτυξη μιας *ex vivo* τεχνολογίας γονιδιακής μεταφοράς είναι η απόκτηση των κυττάρων-στόχων. Στον μυελό των οστών του ανθρώπου, ο πληθυσμός των CD34<sup>+</sup> κυττάρων είναι υπεύθυνος για τις περισσότερες αιμοποιητικές διαδικασίες. Η έκφραση του CD34 αποτελεί τον χαρακτηριστικό δείκτη των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων για κλινική χρήση. Η θεραπεία με διάφορα χημειοθεραπευτικά σχήματα ή κυτοκίνες μπορεί να προκαλέσει την έξοδο των αρχέγονων και προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων από το μυελό των οστών στο περιφερικό αίμα μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται κινητοποίηση (mobilization). Στις μέρες μας τα κινητοποιημένα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα περιφερικού αίματος αποτελούν την προτιμώμενη πηγή αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων για αυτόλογη ή αλλογενή μεταμόσχευση λόγω της υψηλής απόδοσής τους σε CD34<sup>+</sup> κύτταρα τα οποία έχουν την ικανότητα ταχείας εμφύτευσης (To, 1997).

Τα HSCs αποτελούν έναν ιδανικό κυτταρικό στόχο για τη γονιδιακή θεραπεία (Brenner, 1996; Dong, Zu, Liu, & Liang, 2003) για τους εξής λόγους:

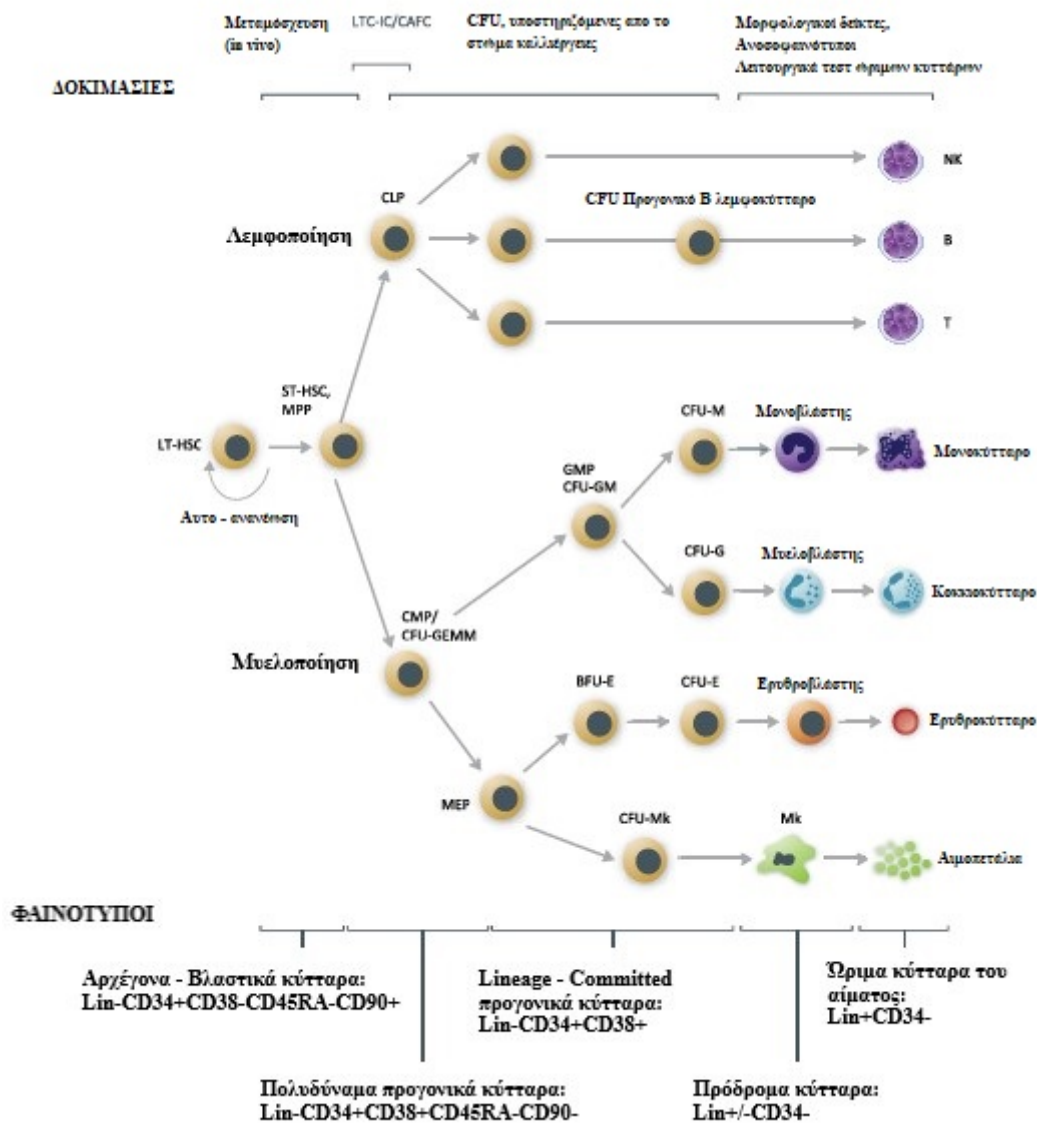
1. Η χορήγηση στον ασθενή ενός σχετικά μικρού αριθμού γενετικά τροποποιημένων HSCs μπορεί να οδηγήσει στη μακροχρόνια - δυνητικά, δια βίου παραγωγή κυττάρων όλων των αιμοποιητικών όλων των αιμοποιητικών κυτταρικών σειρών που φέρουν τη γενετική τροποποίηση-διόρθωση, λόγω της ικανότητας αυτο-ανανέωσης και του τεράστιου δυναμικού πολλαπλασιασμού τους.
2. Οι διαδικασίες συλλογής και μεταμόσχευσής των HSCs αποτελούν διαδικασία ρουτίνας στην κλινική πράξη.
3. Η στόχευση των HSCs λόγω της πολυδυναμίας τους προσφέρει τη δυνατότητα θεραπευτικής αντιμετώπισης ενός ευρέως φάσματος κληρονομικών και επίκτητων, αιματολογικών και μη νοσημάτων, όπως οι κληρονομικές ανοσοανεπάρκειες, αιμοσφαιρινοπάθειες και θαλασσαιμικά σύνδρομα, αιμορροφιλίες και αιματολογικές κακοήθειες.

Η πορεία της διαφοροποίησης και το πόσο ώριμο είναι ένα κύτταρο του αίματος καθορίζεται από το ποιοι υποδοχείς εκφράζονται στην επιφάνεια των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων του ανθρώπου (**Εικόνα 5**). Ανάλογα με το ποσοστό έκφρασης και το συνδυασμό των εκφραζόμενων υποδοχέων, τα HSCs χωρίζονται σε υποπληθυσμούς. Τα ωριμότερα κύτταρα του αίματος εκφράζουν συγκεκριμένα αντιγόνα στην επιφάνειά τους, τα οποία χαρακτηρίζονται ως "lineage" (Lin) αντιγόνα, με παραδείγματα αυτών να αποτελούν οι υποδοχείς CD3 των T λεμφοκυττάρων, οι CD14 των μονοκυττάρων, οι CD16 και CD56 των NK κυττάρων και οι CD19 και CD20 των B λεμφοκυττάρων. Το πρώτο βήμα, επομένως, για την απομόνωση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων είναι η απομάκρυνση των θετικών (Lin<sup>+</sup>) και η επιλογή των αρνητικών (Lin<sup>-</sup>) ως προς τα αντιγόνα "lineage" πληθυσμών.

Αναμφισβήτητα, όμως, ο σημαντικότερος δείκτης των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων στον άνθρωπο είναι ο υποδοχέας – πρωτεΐνη κυτταρικής επιφάνειας CD34. Εκφράζεται στο 1 – 5 % των εμπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών, περίπου στο 1% των κυττάρων του αίματος του ομφάλιου λώρου και σε < 0,1% των κυττάρων του περιφερικού αίματος. Επίσης, τα περισσότερα HSCs του ανθρώπου είναι CD34+. Οι πληθυσμοί Lin-CD34+ των ανθρώπινων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων μπορούν να διαχωριστούν περαιτέρω μέσω χρήσης δεικτών που εκφράζονται διαφορετικά στα προγονικά σε σύγκριση με τα περισσότερα διαφοροποιημένα κύτταρα. Οι πιο συνηθισμένοι δείκτες περιλαμβάνουν τους υποδοχείς CD38, CD45RA και CD90, με τους δύο πρώτους να είναι απόντες ή να εκφράζονται ελαφρώς στα προγονικά κύτταρα και τον τελευταίο να εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα στα προγονικά κύτταρα σε σύγκριση με τα διαφοροποιημένα. Δηλαδή:

- όσο υψηλότερο το ποσοστό έκφρασης των δεικτών CD34 και CD90 σε ένα κύτταρο, τόσο πιο αρχέγονο είναι
- ενώ αντίστοιχα, όσο υψηλότερο το ποσοστό έκφρασης των δεικτών CD38 και CD45RA τόσο πιο ώριμο είναι.

Για παράδειγμα, ένας πληθυσμός Lin-CD34+CD38-CD45RA-CD90+ είναι πιο αρχέγονος σε σύγκριση με έναν Lin-CD34+CD38+CD45RA+CD90- ((*Hematopoietic Stem and Progenitor Cells*, n.d.)Albertus W. Wognum, PhD | Principal Scientist • Stephen J. Szilvassy, 2015).



Εικόνα 5. Πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Σχηματική αναπαράσταση της παραγωγής των ώριμων κυττάρων του αίματος μέσω πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων και των εκφραζόμενων επιφανειακών υποδοχέων τους ((*Hematopoietic Stem and Progenitor Cells*, n.d.)Albertus W. Wognum, PhD | Principal Scientist • Stephen J. Szilvassy, 2015).

## 1.6 Αντιγόνα επιφάνειας των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων

Τα αιμοποιητικά κύτταρα εκφράζουν διάφορους δείκτες/αντιγόνα επιφάνειας, οι οποίοι μεταβάλλονται ανάλογα με το βαθμό διαφοροποίησης τους. Ο βασικότερος δείκτης, το μόριο CD34 έχει βρεθεί πως εκφράζεται περίπου στο 1% των αιμοποιητικών κυττάρων και παρά το γεγονός ότι δεν είναι μοναδικός για τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, εκφράζεται σε ένα μικρό πληθυσμό που περιέχει και αρχέγονα κύτταρα. Σχεδόν όλα τα κλινικά και πειραματικά πρωτόκολλα που περιλαμβάνουν *ex vivo* καλλιέργειες, γονιδιακή θεραπεία και μεταμόσχευση HSCs, είναι σχεδιασμένα για CD34<sup>+</sup> κυτταρικούς πληθυσμούς (Thomas, 2005). Παρακάτω παρατίθεται ένας πίνακας με μερικά από τα αντιγόνα επιφάνειας των HSCs και τις λειτουργίες τους.

Αντιγόνο επιφάνειας και ιδιότητες	Λειτουργία
<b>CD34, γλυκοπρωτεΐνη (τύπου 1)</b>	Μόριο προσκόλλησης κυττάρου με κύτταρο. Επίσης συμμετέχει στην αναστολή της αιμοποιητικής διαφοροποίησης
<b>CD38, μονή αλυσίδα γλυκοπρωτεΐνης (τύπου 2)</b>	Θετικός και αρνητικός ρυθμιστής της ενεργοποίησης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, εξαρτώμενος από το περιβάλλον. Υψηλά επίπεδα του CD38 αντιγόνου παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της πρώιμης διαφοροποίησης των αιμοποιητικών κυττάρων
<b>CD90, μονή αλυσίδα γλυκοπρωτεΐνης που συνδέεται με το GPI</b>	Παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των HSCs και η θετική επιλογή για τον δείκτη CD90 αυξάνει την καθαρότητα απομόνωσης αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων
<b>CD133, 5-διαμεμβρανική πρωτεΐνη</b>	Μειωμένη έκφραση του CD133 οδηγεί σε κυτταρική διαφοροποίηση. Το αντιγόνο επιφάνειας CD133 εκφράζεται σε προγονικά αιμοποιητικά, ενδοθηλιακά και νευρικά κύτταρα.
<b>CD45, «κοινό λευκοκυτταρικό αντιγόνο», με διάφορες ισομορφές όπως CD45RA</b>	Βασικός ρόλος στην ενεργοποίηση των T και B λεμφοκυττάρων που ρυθμίζεται από το σύμπλεγμα αντιγόνου- υποδοχέα.

Πίνακας 2. Αντιγόνα επιφάνειας των HSCs και οι λειτουργίες τους (Thomas, 2005)

## 1.7 Λεντι-ϊκοί φορείς γονιδιακής θεραπείας

Οι λεντι-ϊκοί φορείς αποτελούν τα τελευταία χρόνια την συνηθέστερη κατηγορία φορέων για τη γονιδιακή θεραπεία που στοχεύει το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο. (Vigna & Naldini, 2000). Οι συγκεκριμένοι, αποτελούν μέρος τη ευρύτερης ομάδας των ρετροϊών, και σε σχέση με τους τελευταίους εμφανίζουν σημαντικά πλεονεκτήματα. Οι λεντι-ϊκοί φορείς, γενικότερα, μπορούν να διαμολύνουν και κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε κυτταρικό κύκλο καθώς και κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε φάση G<sub>0</sub>. Ένα ακόμη πλεονέκτημα που παρέχουν είναι η δυνατότητα να εσωκλείουν διαγονίδια μεγαλύτερου μεγέθους (10kb) και επιπλέον η χρήση τους μειώνει την πιθανότητα μεταλλαξιγένεσης στα κύτταρα που διαμολύνουν, επειδή τείνουν να ενσωματώνονται όχι τόσο κοντά σε πρώτο-ογκογονίδια (Kay, 2011). Ο HIV είναι ο καλύτερα μελετημένος λεντι-ϊος. (Miyoshi, Blömer, Takahashi, Gage, & Verma, 1998).

Οι λεντι-ϊκοί φορείς διαθέτουν περιοχές LTR (Long-Terminal Repeats) αμφοτερόπλευρα του θεραπευτικού διαγονιδίου. Αυτές είναι υπεύθυνες για την ενσωμάτωση του διαγονιδίου στο χρωμοσωμικό DNA του κυττάρου-στόχου. Ταυτόχρονα, οι LTR παρέχουν λειτουργία υποκινητή/ενισχυτή για την εξασφάλιση της έκφρασης των ιικών γονιδίων. Όταν οι LTR αγρίου τύπου εισάγονται στο κύτταρο-στόχο, αυξάνεται η πιθανότητα ενεργοποίησης κοντινών γονιδίων στο σημείο ένθεσης καθώς δεν εξασφαλίζεται η στοχευμένη έκφραση του θεραπευτικού γονιδίου στον πάσχοντα ιστό. Για να ελαχιστοποιηθεί το συγκεκριμένο πρόβλημα, δημιουργήθηκαν οι SIN (Self-Inactivating) αυτό-αδρανοποιούμενοι λεντι-ϊκοί φορείς, στους οποίους ένα κομμάτι της 3' LTR περιοχής απαλείφεται. Έτσι, αδρανοποιείται ο ιικός υποκινητής-ενισχυτής στο ένα άκρο. Κατά την ανάστροφη μεταγραφή, η οποία λαμβάνει χώρα μόλις ο ιικός φορέας εισαχθεί στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-στόχου, η 3' LTR αντιγράφεται και αντικαθιστά την 5' LTR περιοχή, η οποία αδρανοποιείται και αυτή. Κατά συνέπεια, λόγω της αδρανοποίησης των LTR, είναι απαραίτητη η ύπαρξη ενός εσωτερικού υποκινητή μέσα στον ιικό φορέα, ο οποίος τοποθετείται ακριβώς πριν το διαγονίδιο και ρυθμίζει την έκφραση του διαγονιδίου μετά την ενσωμάτωση στο κύτταρο-στόχος και μάλιστα, κατά το δυνατόν ιστοειδικά (Psatha, Karponi, & Yannaki, 2016).

Οι λεντι-ϊκοί φορείς επέτρεψαν την ταχεία επέκταση της γονιδιακής θεραπείας ακόμη και σε σύνθετες γενετικές ασθένειες (όπως β-αιμοσφαιρινοπάθειες) επειδή αυτοί οι φορείς μπορούν να φιλοξενήσουν πολύπλοκες μεταγραφικές μονάδες και να διαμολύνουν HSPCs με υψηλή απόδοση.

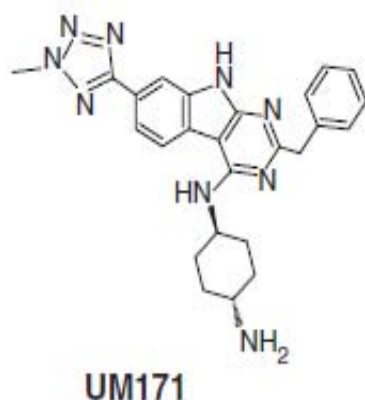


## 1.8 Μικρά Μόρια (SMs)

Τα SMs αποτελούν μια ομάδα χημικών μορίων χαμηλού μοριακού βάρους, τα οποία προάγουν την έκπτυξη των HSCs, είτε περιφερικού είτε ομφαλοπλακουντικού αίματος, διατηρώντας τα χαρακτηριστικά των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Χαρακτηρίστηκαν το 2014 από την Iman Fares και την ομάδα της, οι οποίοι μετά από υψηλής απόδοσης διαλογή μιας βιβλιοθήκης 5280 μορίων που προάγουν την έκπτυξη αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, επέλεξαν τα επτά πιο αποτελεσματικά. Τα μόρια αυτά ήταν ήδη γνωστά ως ανταγωνιστές του υποδοχέα αρυλικών υδρογονανθρακικών ενώσεων (Aryl hydrocarbon receptor, AhR). Ο AhR είναι μεταγραφικός παράγοντας, με επίδραση στις αναπτυξιακές διαδικασίες του λεμφικού και νευρικού συστήματος, στο μεταβολισμό ενός μεγάλου φάσματος αρυλικών ενώσεων και στην τοξικότητα αυτών των παραγόντων. Ακόμα, η ενεργότητά του σχετίζεται με τον αριθμό και βαθμό πολυπλοειδίας των μεγακαρυοκυττάρων και τον αριθμό των αιμοπεταλίων. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ένα SM, το UM171.

### 1.8.1 UM171

Πρόκειται για ένα παράγωγο πυριμιδο-ινδολίου και συγκεκριμένα για ένα συνθετικό ανάλογο του UM729, που αρχικά είχε συντεθεί από την ομάδα της Fares et al (Fares, 2014). Βρέθηκε να είναι από 10 έως 20 φορές πιο ισχυρό από το UM729, με αποτελεσματικές συγκεντρώσεις έκπτυξης των HSCs από 17 έως 19 nM. Τόσο το UM729, όσο και το UM171, αυξάνουν, επίσης, την ικανότητα εγκατάστασης των αιμοποιητικών κυττάρων στον ΜΟ πρωτευόντων, αλλά όχι των τρωκτικών. Η επίδραση του UM171 εξαρτάται από τη συνεχή παρουσία του στο μικροπεριβάλλον των κυττάρων και δε σχετίζεται με τη μίτωση και το ρυθμό διαίρεσης. Ο μοριακός μηχανισμός του παραμένει άγνωστος, καθώς δεν σχετίζεται με τον AhR υποδοχέα αλλά φαίνεται πως καταστέλλει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την ερυθροειδική και τη μεγακαρυοκυτταρική διαφοροποίηση και ενισχύει την έκφραση διαφόρων μορίων κυτταρικής επιφάνειας (Psatha et al., 2016). Ο χημικός τύπος του UM171 απεικονίζεται στην Εικόνα 6.



**Εικόνα 6.** Χημική δομή του UM171 (“4-N-[2-Benzyl-7-(2-methyltetrazol-5-yl)-9H-pyrimido[4,5-b]indol-4-yl]cyclohexane-1,4-diamine | C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>N<sub>9</sub> - PubChem,” n.d.)

## 1.9 Μέθοδοι *Ex Vivo* Έκπτυξης Αρχέγονων Αιμοποιητικών Κυττάρων

Η βελτίωση των μεθόδων έκπτυξης γενετικά τροποποιημένων HSCs προς μεταμόσχευση είναι κρίσιμη για την αποκατάσταση της ομοιόστασης σε ασθενείς αιματολογικών νόσων. Στόχος δεν αποτελεί μόνο η αποτελεσματική καλλιέργεια των HSCs, εξασφαλίζοντας τον υψηλό αριθμό τους και τον αρχέγονο χαρακτήρα τους αλλά και η διατήρηση της ικανότητας των HSCs να εγκαθίστανται στα αιμοποιητικά όργανα, προκειμένου να ανακτήσουν την ομοιόσταση του αιμοποιητικού, σε σύντομο χρόνο και χωρίς παρενέργειες. Η αύξηση της αποτελεσματικότητας της *ex vivo* έκπτυξης των HSCs εστιάζεται γύρω από τρεις άξονες. Αυτοί αφορούν τη συγκαλλιέργεια με στρωματικά κύτταρα, την εισαγωγή γενετικών τροποποιήσεων που ρυθμίζουν την ισορροπία μεταξύ επιβίωσης, πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης και την επίδραση βιολογικών και συνθετικών παραγόντων στις παραπάνω λειτουργίες.

Αναλυτικότερα η πρώτη κατεύθυνση εστιάζεται στην *ex vivo* έκπτυξη HSCs που συγκαλλιεργούνται με μεσεγχυματικά στελεχειαία κύτταρα (MSCs), τα οποία χρησιμεύουν ως τροφοδοτικό στρώμα, παρουσία ή απουσία κυτοκινών. Τα MSCs διαφοροποιούνται κυρίως σε οστεοβλάστες, χονδροκύτταρα και λιποκύτταρα υπό κατάλληλες συνθήκες. Τα αποτελέσματα είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά καθώς παρατηρείται σχεδόν δεκαπλάσια έκπτυξη των HSCs και προτίμηση διαφοροποίησης τους προς την ερυθρή σειρά. Ωστόσο, οι παρατηρούμενες ευεργετικές επιδράσεις είναι δύσκολο να αναπαρχθούν και να ταυτοποιηθούν, καθώς προέρχονται από διαφορετικούς και ετερογενείς πληθυσμούς υποστηρικτικών κυττάρων (Jang et al., 2006)

Επόμενη μέθοδος έκπτυξης *ex vivo* των HSCs που βασίζεται στην εισαγωγή γενετικών τροποποιήσεων, αποτέλεσε η υπερέκφραση μεταγραφικών παραγόντων. Επίκεντρο των ερευνών αυτών αποτέλεσαν τα γονίδια της κλάσης 1 των ομοιοτικών γονιδίων (homeobox, Hox) τα οποία έχουν μεγάλη σημασία στη ρύθμιση της αιμοποίησης και εκφράζονται στα αιμοποιητικά κύτταρα. Συγκεκριμένα το γονίδιο HOXB4, ένας ρυθμιστής της αιμοποιητικής διαφοροποίησης, οδήγησε τα CD34+ κύτταρα με τα οποία συγκαλλιεργήθηκε σε σχεδόν τριπλάσια έκπτυξη, χωρίς όμως να επηρεάζει σημαντικά την πολυδυναμία τους ή την διαδικασία της διαφοροποίησής τους (Antonchuk et al., 2002).

Τέλος ο τρίτος άξονας της έκπτυξης των HSCs εστιάζεται στην επίδραση σύνθετων παραγόντων, στους οποίους συγκαταλέγονται αυξητικοί παράγοντες, κυτοκίνες, προ- και αντι-αποπτωτικοί παράγοντες και ένα μεγάλο φάσμα οργανικών ενώσεων μικρού μοριακού βάρους (μικρά μόρια, small molecules, SM). Αρκετές έρευνες επικεντρώθηκαν αρχικά σε *ex vivo* καλλιέργεια HSCs υψηλής καθαρότητας σε μέσο χωρίς ορό και υψηλές συγκεντρώσεις κυτοκινών (Stem cell factor (SCF), Thrombopoietin (TPO), Flt-3 ligand). Ωστόσο, παρά την προσπάθεια βελτιστοποίησης των συνδυασμών των κυτοκινών, δεν φάνηκε αυτές να επαρκούν για κλινικά σημαντική έκπτυξη, η οποία περιορίστηκε περίπου σε τριπλάσιο αριθμό HSCs. Οι κυτοκίνες λοιπόν φαίνεται ότι εξυπηρετούν έναν πιο επιτρεπτικό ρόλο στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των HSCs, αντί να τα κατευθύνουν προς την αυτοανανέωση (Conneally et al., 1997; Miller & Eaves, 1997).

Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι η σύντομη καλλιέργεια HSCs παρουσία μικρών μορίων, σε συνδυασμό με κυτοκίνες, έχει δείξει να βελτιώνει την εμφύτευσή τους. Τα κύτταρα αυτά επιβιώνουν περισσότερο μετά τη μεταμόσχευση, στον οργανισμό του δέκτη, συγκριτικά με κύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία μόνο κυτοκινών ή δεν εκπτύσσονται καθόλου. Τα μικρά μόρια είναι χρήσιμα τόσο για την πρακτική βελτίωση των μεθόδων καλλιέργειας, όσο

και για την αποκάλυψη των ρυθμιστικών μηχανισμών στους οποίους συμμετέχουν και οι οποίοι επηρεάζουν τη μοίρα των αιμοποιητικών κυττάρων (Fares et al., 2015).

## 2. Σκοπός της Εργασίας

Η γονιδιακή θεραπεία περιλαμβάνει την *ex vivo* γενετική τροποποίηση των κυττάρων του ίδιου του ασθενούς και την εν συνεχεία επιστροφή των κυττάρων αυτών στον ασθενή, είναι δηλ. μια μορφή αυτόλογης μεταμόσχευσης. Ως αυτόλογη διαδικασία, η γονιδιακή θεραπεία, ξεπερνά τα εμπόδια που σχετίζονται με την αλλογενή μεταμόσχευση (GvHD, απαιτούμενη διαρκής ανοσοκαταστολή).

Ωστόσο, το συχνά χαμηλό ποσοστό εμφύτευσης των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων και ο χαμηλός αριθμός τους, αποτέλεσαν σημαντικό περιορισμό στις εφαρμογές της γονιδιακής θεραπείας.

Σκοπός της εργασίας ήταν ο έλεγχος της δυνατότητας του μικρού μορίου (small molecule) UM171 να εκπύσσει τα ανθρώπινα αρχέγονα αιμοποιητικά βλαστοκυττάρια (HSCs), να διατηρεί τον προγονικό χαρακτήρα τους στην καλλιέργεια), καθώς και να βελτιώσει την εμφύτευσή τους.

### 3. Υλικά και Μέθοδοι

### 3.1 Πλασμιδιακός φορέας έκφρασης

Ως φορείς ανασυνδυασμένου DNA χρησιμοποιούνται τα πλασμίδια. Πρόκειται για μικρά δίκλινα μόρια κυκλικού DNA τα οποία αντιγράφονται ξεχωριστά από το χρωμόσωμα του κυττάρου-ξενιστή. Έχουν αυτή τη χρήση διότι

- 1) το μέγεθος τους είναι αρκετά μικρό
- 2) διαθέτουν σημείο έναρξης της αντιγραφής
- 3) έχουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ως γονίδια-δείκτες για την επιλογή των κυττάρων που έχουν μετασχηματιστεί
- 4) διαθέτουν μια κατάλληλη περιοχή για εισαγωγή “ξένου” DNA, μέσα στην οποία υπάρχουν μοναδικές θέσεις αναγνώρισης από περιοριστικές ενδονουκλεάσες (πολυσύνδεσμος)

### 3.2 Αντιβιοτικά

Ούτως ώστε να αποφευχθούν οι επιμολύνσεις στις καλλιέργειες μετασχηματισμένων βακτηρίων, προστίθενται αντιβιοτικά. Τα μετασχηματισμένα βακτήρια, περιλαμβάνουν ως γονίδια επιλογής, γονίδια τα οποία εκφράζουν ανθεκτικότητα σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά. Έτσι, γίνεται η σωστή επιλογή των βακτηρίων που έχουν παραλάβει το γονίδιο επιλογής. Η ποσότητα και το είδος των αντιβιοτικών εξαρτώνται από τα γονίδια-δείκτες που φέρει το πλασμίδιο και από την αντίσταση του βακτηριακού στελέχους στο εκάστοτε αντιβιοτικό.

Τα πλασμίδια, στη φύση, διαθέτουν γονίδια που κωδικοποιούν υδρολυτικά ένζυμα, τα οποία εξουδετερώνουν ορισμένα αντιβιοτικά. Για αυτό τον λόγο, παρέχουν στα βακτηριακά κύτταρα που τα φέρουν, ανθεκτικότητα στα συγκεκριμένα αντιβιοτικά, επιτρέποντας τους να αναπτύσσονται παρουσία των αντιβιοτικών αυτών. Κατά συνέπεια, τα βακτηριακά κύτταρα που φιλοξενούν πλασμίδια παρέχουν σε αυτά όλους τους απαραίτητους ρυθμιστικούς και ενζυμικούς μηχανισμούς για την αντιγραφή του πλασμιδιακού DNA, τη μεταγραφή των πλασμιδιακών γονιδίων αλλά και τη μετάφραση των αντίστοιχων αγγελιοφόρων RNA σε πρωτεΐνες, όπως για παράδειγμα τα ένζυμα που υδρολύουν τα αντιβιοτικά. Αξίζει να γίνει λόγος, επίσης, σε ειδικές ακολουθίες βάσεων που διαθέτουν όλα τα πλασμίδια, τις *ori* (origin of replication). Αυτή, η περιοχή αντιγραφής, επιτρέπει την έναρξη αντιγραφής τους και άρα, τον αυτόνομο πολλαπλασιασμό τους, ανεξάρτητα από την αντιγραφή του βακτηριακού χρωμοσώματος. Έτσι, όταν το βακτήριο διαιρείται, κάθε θυγατρικό κύτταρο που προκύπτει εξασφαλίζει την παρουσία τουλάχιστον ενός αντιγράφου από το εμπεριεχόμενο, στο μητρικό κύτταρο, πλασμίδιο και συνεπώς, όλη την γενετική πληροφορία που εμπεριέχεται στο πλασμίδιο.

Στην προκειμένη εργασία, χρησιμοποιήθηκε Καρβενικιλίνη (Carbenicillin, Crb)

Πρόκειται για υποκατάστατο της αμπικιλίνης και κατατάσσεται στην υποκατηγορία των καρβοξυπενικιλινών, των πενικιλινών. Έχει δράση σε Gram- βακτήρια και είναι πιο ανθεκτικές στη δράση β-λακταμασών σε σχέση με την αμπικιλίνη.

### 3.3 Μετασχηματισμός Βακτηριακών Στελεχών

Για την παραγωγή των τριών πλασμιδίων, που παράγουν τον ιικό φορέα για τον οποίο γίνεται αναφορά, χρησιμοποιήθηκαν One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. Coli* βακτήρια (Invitrogen), τα οποία είχαν μετασχηματιστεί χημικά.

#### Μέθοδος

Έχοντας προθερμάνει τα πιάτα με LB Broth και agar στους 37°C, στον βακτηριακό κλίβανο, το shaker στους 37°C, και το heat blocker στους 42°C, τα *E.Coli* competent cells απομακρύνονται από τους -80°C, όπου φυλάσσονται και τοποθετούνται στον πάγο, όπου αφήνονται να ξεπαγώσουν, μαζί με τα Erpendorf, ούτως ώστε κι αυτά να αποκτήσουν την αντίστοιχη θερμοκρασία. Έπειτα, σε 50μL Βακτηρίων προσθέτονται 100ng του εκάστοτε πλασμιδίου, αναδεύονται ελαφρώς και επωάζονται στον πάγο για 30 λεπτά. Ακολουθεί θερμικό σοκ, με επώαση στο heat blocker για 90 δευτερόλεπτα και πάλι επώαση στον πάγο για 5 λεπτά. Στο τέλος αυτής της διαδικασίας, προστίθεται 1mL LB Broth και ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση στα 225rpm, στους 37°C για 1 ώρα. Ταυτόχρονα, τοποθετούνται τα LB Agar plates στον βακτηριακό κλίβανο για να φτάσουν τους 37°C. Μετά το πέρας της μιας ώρας επιστρώνονται με μικροβιολογικό κρίκο 50 και 100 μλ από τις παραπάνω βακτηριακές καλλιέργειες στα τρυβλία. Ακολουθεί overnight επώαση, στον βακτηριακό κλίβανο, και διατήρηση των αποικιών στους 4°C.

### 3.4 Πολλαπλασιασμός και απομόνωση του πλασμιδίου από τα κύτταρα *E.coli* (miniprep)

Γίνεται επιλογή 3 αποικιών, οι οποίες έπειτα θα αναπτυχθούν σε μικρές υγρές καλλιέργειες. Χρησιμοποιείται για τη διαδικασία 4ml θρεπτικού μέσου LB, το οποίο περιέχει το αντιβιοτικό Καρβενικιλίνη σε συγκέντρωση 100μg/ml. Έπειτα, γίνεται εμβολιασμός της καλλιέργειας με μία αποικία από τη στερεή καλλιέργεια του LB Agar plate (1 αποικία/4ml συνολικού όγκου καλλιέργειας). Τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται για 16-18h στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση. Τελικά, γίνεται απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τα βακτήρια με χρήση του NucleoSpin® Plasmid kit, της Macherey-Nagel.

Στη συγκεκριμένη μέθοδο, χρησιμοποιούνται ποικίλα buffers ανάλογα το στάδιο της διαδικασίας. Αρχικά, το βακτηριακό ίζημα που προκύπτει μέσω φυγοκέντρησης από μικρές υγρές καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν εργαστηριακά, επαναιωρείται με χρήση του Buffer A1 και το πλασμιδιακό DNA απελευθερώνεται από τα *E.Coli* κύτταρα με το Buffer A2 το οποίο περιλαμβάνει SDS και οδηγεί σε αλκαλική λύση. Έπειτα, το Buffer A3 σταθεροποιεί το



πλασμιδιακό DNA και δημιουργεί κατάλληλες συνθήκες για να προσδεθεί στην μεμβράνη πυριτίου (silica membrane) της στήλης NucleoSpin® Plasmid QuickPure. Οι πρωτεΐνες που κατακρημνίζονται, το γενωμικό DNA καθώς και τα κυτταρικά θραύσματα που απέμειναν, απομακρύνονται μέσω φυγοκέντρησης. Στη συνέχεια, μέσω φυγοκεντρήσεων και των Buffers AW, A4 και AE, απομονώνεται το πλασμιδιακό DNA σε νέο Eppendorf.

### 3.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του πλασμιδίου

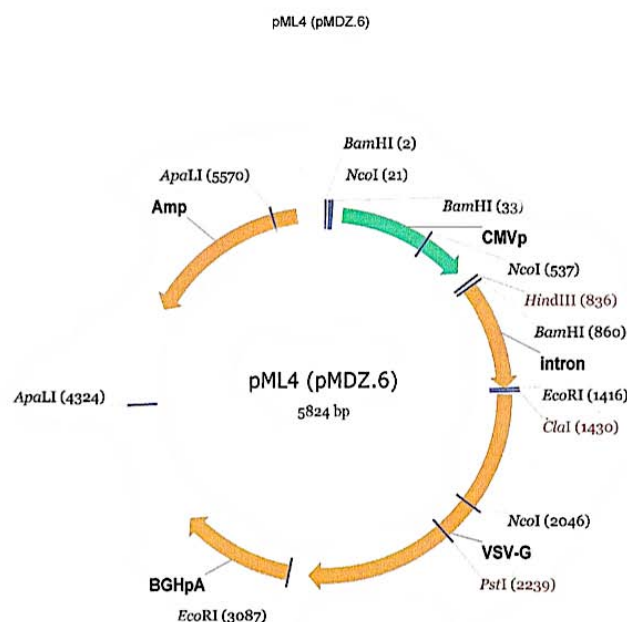
Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του πλασμιδίου, χρησιμοποιήθηκε το σπεκτροφωτόμετρο NanoDrop 2000.

#### Αρχή μεθόδου

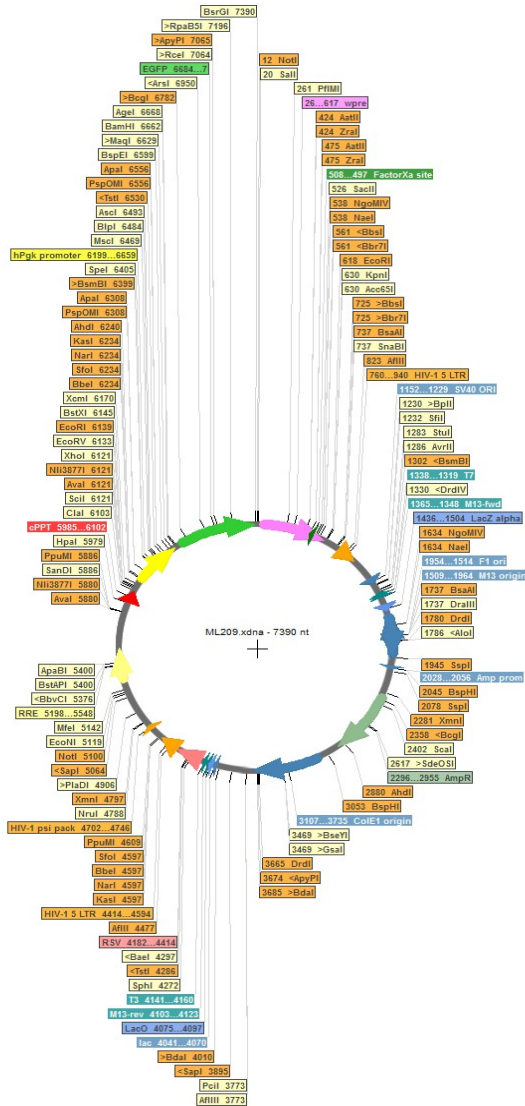
Το DNA απορροφά έντονα το φως σε μήκος κύματος 260nm. Έτσι, για τον ποσοτικό προσδιορισμό του είναι απαραίτητη η μέτρηση των τιμών απορρόφησης των δειγμάτων στα 260nm και 280 nm ( $^{260}/_{280}$ ). Η τιμή της οπτικής πυκνότητας στα 260 nm ( $OD_{260}$ ) επιτρέπει τον προσδιορισμό των νουκλεϊκών οξέων στο δείγμα. Τιμή  $OD_{260}$  ίση με 1 αντιστοιχεί με 50μg/ml. Η συγκέντρωση του DNA προκύπτει από τον τύπο Beer-Lamberts

$$C = (A \cdot \epsilon) / b$$

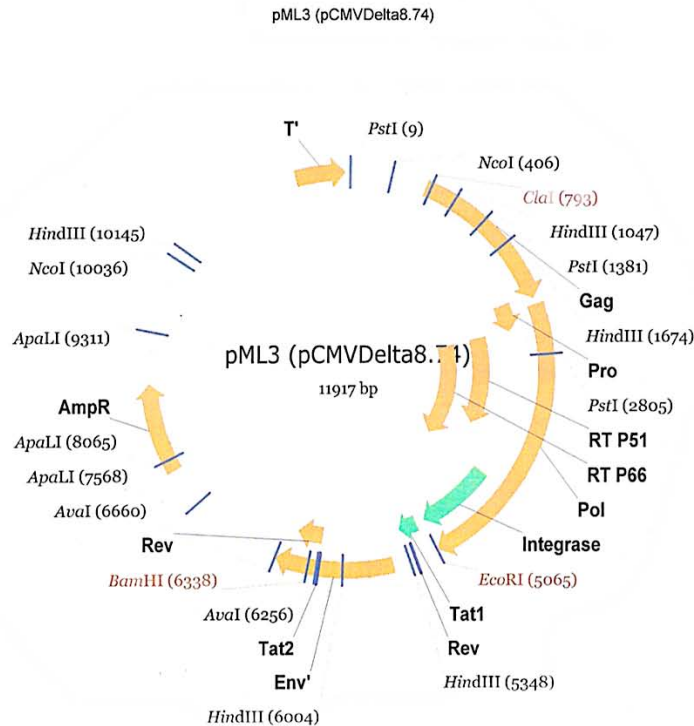
όπου C η συγκέντρωση του δείγματος, A η απορρόφηση,  $\epsilon$  η γραμμομοριακή απορροφητικότητα και b η οπτική διαδρομή.



**Εικόνα 7. Πλασμιδιακός χάρτης Ενν**



Εικόνα 8. Πλασμιδιακός χάρτης GFP



**Εικόνα 9. Πλασμιδιακός χάρτης Gag/Pol**

### 3.6 Πέψεις πλασμιδίων

Βάσει των διαφορετικών χαρτών για τον κάθε πλασμιδιακό φορέα που μας ενδιαφέρει, έπρεπε με χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών EcoRI και BamHI, να ελεγχθούν αν τα πλασμίδια που παράχθηκαν ήταν τα θεμιτά και δεν υπήρξε πχ. κάποια μόλυνση με ξένο DNA. Έτσι, αυτό που αναμενόταν ήταν αντίστοιχα για τα πλασμίδια που εκφράζουν τις πρωτεΐνες env, gag και gfr: δύο (2) ζώνες μοριακού βάρους 4153 bp και 1671 bp, δύο (2) ζώνες μοριακού βάρους 10644 bp και 1273 bp, και τρεις (3) ζώνες μοριακού βάρους 5515 bp, 1346 bp και 523 bp.

Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί τι αντιπροσωπεύουν καθεμία από τις τρεις πρωτεΐνες που μεταφράζονται μέσω αυτών των πλασμιδίων, και τελικά δημιουργούν τον lenti-ιό που χρειάζεται για το συγκεκριμένο πείραμα:

- GFP (Green Fluorescent Protein): Πρόκειται για γονίδιο αναφοράς που χρησιμοποιείται στο συγκεκριμένο πείραμα, στη θέση θεραπευτικού γονιδίου. Είναι μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους 26.9 kDa και 238 αμινοξέων, η οποία όταν εκτεθεί στο υπεριώδες φως εκπέμπει πράσινο φθορίζον φως. (Prendergast & Mann, 1978)
- Env: Για τον ιικό φάκελο, χρησιμοποιείται το γονίδιο VSV-G, λόγω του μεγάλου τροπισμού του εν λόγω γονιδίου.
- Gag-Pol: Το Gag είναι γονίδιο «πακεταρίσματος» του ιού, ενώ το pol μεταφράζει πολυμεράση.

Κατά την πέψη, χρησιμοποιήθηκαν τα BamHI (20.000 units/ml) και EcoRI(20.000 units/ml) τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη ποσότητας 0.5μg DNA. Στην διπλή πέψη, με BamHI και EcoRI, χρησιμοποιήθηκε Tango Buffer, ενώ στην απλή πέψη με EcoRI, χρησιμοποιήθηκε Buffer του συγκεκριμένου ενζύμου. Και στις δύο περιπτώσεις τα buffers χορηγήθηκαν μαζί με τα ένζυμα από την εταιρεία. Τέλος, τόσο η απλή, όσο και η διπλή πέψη έγιναν στους 37°C, για μία (1) ώρα.

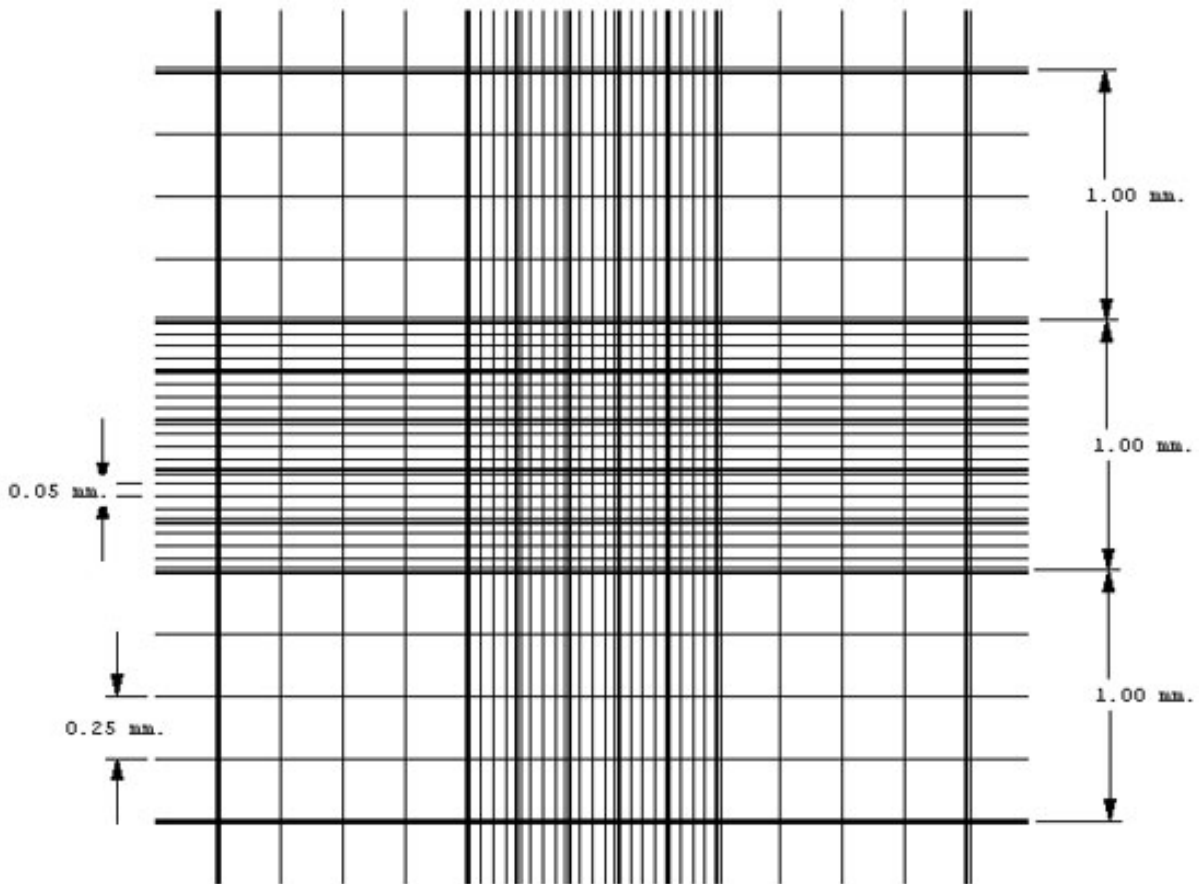
Τα αποτελέσματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 0.8%. Η αγαρόζη διαλύθηκε σε 100ml διαλύματος 5%TBE και στη συνέχεια προστέθηκαν 5μL SYBR Green για να εμφανίζονται οι πλασμιδιακές μπάντες.

### 3.7 Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών HeLa και 293T

Η καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών ήταν διαδικασία παρόμοια και στις δύο περιπτώσεις. Τα κύτταρα απομακρύνονταν από τους -80°C, και τοποθετούνταν σε καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο DMEM (DMEM + 10% FBS + 1% Penicillin – Streptomycin + 2mM L-Glutamine, GIBCO). Κατά τη διάρκεια των ανακαλλιεργειών, για την ανασήκωση των κυττάρων και την επανατοποθέτηση τους σε νέες φλάσκες, χρησιμοποιήθηκε Trypsin (GIBCO), η οποία είναι μια πρωτεάση που επιτρέπει την διάσπαση δεσμών οι οποίοι δημιουργούνται μεταξύ των κυττάρων και με το υλικό στο οποίο λαμβάνει χώρα η καλλιέργεια. Η μόνη διαφορά είναι ότι τα HeLa κύτταρα, χρειάζονται επώαση 5 λεπτών, σε κλίβανο 37°C και 5% CO<sub>2</sub>, για να δράσει κατάλληλα η Trypsin.

### 3.8 Καταμέτρηση κυττάρων

Η καταμέτρηση έγινε με χρήση πλάκας Neubauer. Σε κάθε διαδικασία, έγινε χρώση των 293T και HeLa με Trypan Blue και των CD34 με Turk's Solution. Η εικόνα που δίνεται μέσω μιας πλάκας Neubauer επιτρέπει τον διαχωρισμό μεγάλων, αραιών τετραγώνων από μικρότερα, πυκνότερα. Ταυτόχρονα, όλα περικλείονται εντός ενός μεγαλύτερου, πιο έντονου τετραγώνου. Στα πρώτα, γίνεται καταμέτρηση των κυττάρων εντός των χωρικών ορίων τους και τελικά βγαίνει ο μέσος όρος των κυττάρων και των τεσσάρων αραιών τετραγώνων.



Εικόνα 10. Άποψη από μέτρηση με πλάκα Neubauer

### 3.9 Παραγωγή πλασμιδίων σε μεγάλη κλίμακα (MaxiPrep)

Έπειτα, για να παραχθεί η κατάλληλη ποσότητα των πλασμιδίων που χρειάστηκαν για την διαμόλυνση των HEK 293T κυττάρων, με στόχο την παραγωγή του επιθυμητού λεντικού φορέα, έγινε παραγωγή τους σε μεγάλη κλίμακα. Από τις mini καλλιέργειες, μεταφέρθηκε ποσότητα σε 300ml αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού LB Broth. Ακολούθησε ολονύχτια επώαση στους 37°C και χρήση του kit NucleoBond Xtra (Macherey-Nagel) για την λύση των βακτηρίων και την απομόνωση των πλασμιδίων.

Η αρχή αυτής της μεθόδου στηρίζεται στην λύση των βακτηριακών κυττάρων μέσω ενός βελτιστοποιημένου συστήματος buffers, τα οποία βασίζονται στην μέθοδο λύσης NaOH/SDS των Birnboim και Doly. Στο τέλος της διαδικασίας, ακολούθησε κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη (Ethanol Precipitation), και CH<sub>3</sub>COONa. Συγκεκριμένα, προστέθηκαν CH<sub>3</sub>COONa και αιθανόλη 100% σε αναλογίες όγκων 0.1 προς 2.5. Ακολούθησε επώαση overnight στους 4°C φυγοκέντρηση στις 14000 rpm, για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C, έκπλυση με 70% αιθανόλη και επαναδιάλυση του ιζήματος σε νερό.

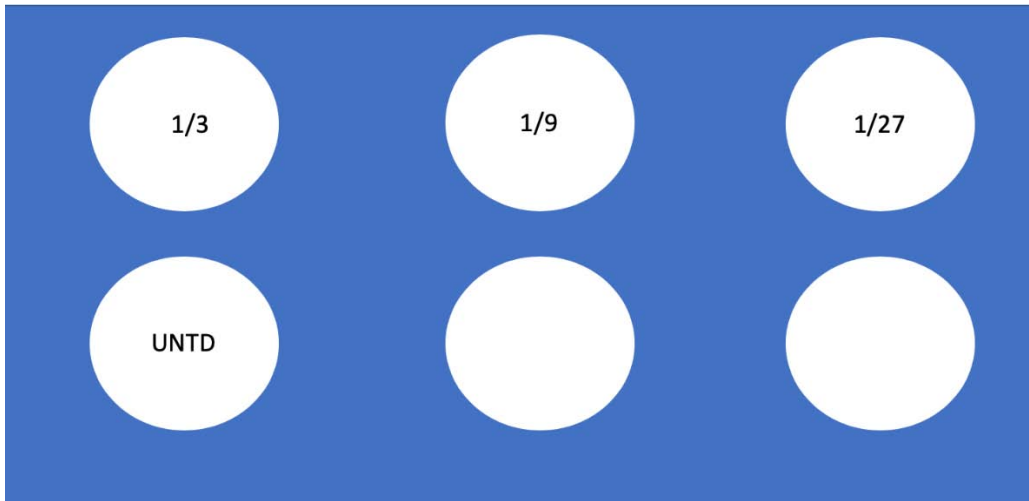
### 3.10 Παραγωγή ιικού φορέα

Για την παραγωγή των ιικών σωματίων, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά πακεταρίσματος 293T. Αρχικά, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 5 περίπου ημέρες σε θρεπτικό μέσο DMEM (DMEM + 10% FBS + 1% Penicillin – Streptomycin + 2mM L-Glutamine, GIBCO) με ενδιάμεσες ανακαλλιέργειες. Όταν εκπύχθηκαν σε ικανοποιητικά επίπεδα, επιστρώθηκαν σε τριβλία επιφάνειας 100mm ( $5 \times 10^6$  κύτταρα/τριβλίο), στα οποία προηγουμένως είχε επιστρωθεί ρυθμιστικό διάλυμα επικάλυψης (coating buffer) (1% διάλυμα ζελατίνης + poly-L λυσίνη + PBS, Sigma), το οποίο βοηθά στην ισχυρή προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια του τριβλίου. Την επόμενη ημέρα, τα τρία πλασμίδια (ποσότητες/τριβλίο: 10μg GFP, 7,5 μg gag-pol και 2,5 μg env) προστέθηκαν στην καλλιέργεια με τη μέθοδο της κατακρήμνισης με φωσφορικό ασβέστιο. Στόχος ήταν να συναρμολογηθούν τα ιικά σωματίδια και τελικά να εισέλθουν στα κύτταρα (διαδικασία transfection). Το υπερκείμενο της υγρής καλλιέργειας που περιείχε τα έτοιμα συναρμολογημένα ιικά σωματίδια συλλέχθηκε 24 και 48 ώρες μετά και συμπυκνώθηκε 2000 φορές με φυγοκέντρηση.

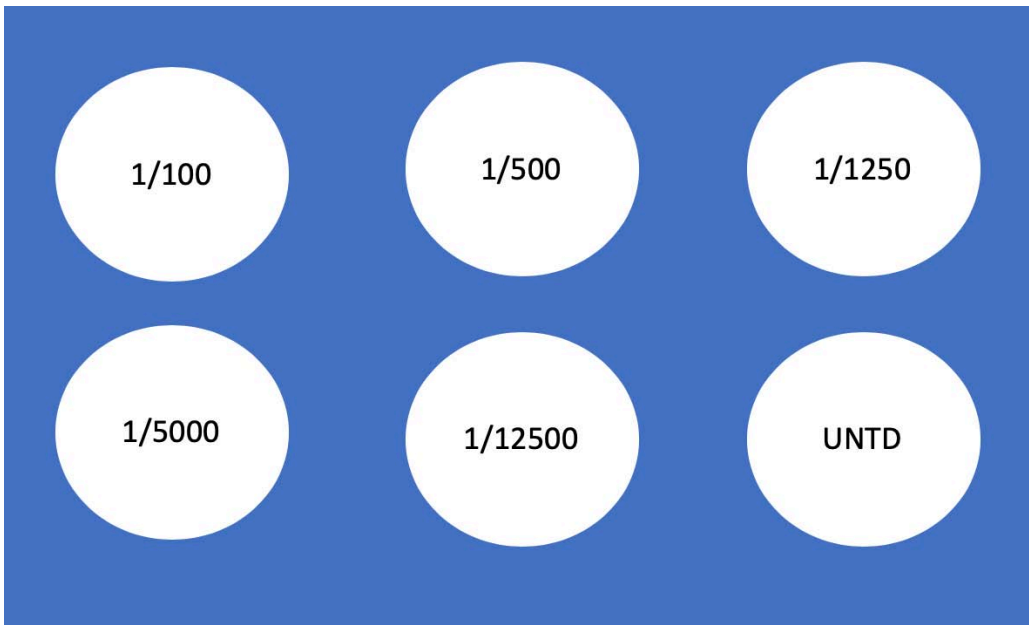
#### 3.10.1 Τιτλοδότηση

Για την τιτλοδότηση, δηλαδή τη συγκέντρωση των ιικών σωματίων ανά ml στο συμπυκνωμένο εναιώρημα μετά τη διαμόλυνση, χρησιμοποιήθηκε η καρκινική κυτταρική σειρά HeLa. Αρχικά, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για περίπου πέντε μέρες σε θρεπτικό μέσο DMEM, συμπληρωμένο με 10% FBS, 1% Penicillin – Streptomycin, και 2mM L-Glutamine, με στόχο την έκπτυξη ικανοποιητικού αριθμού. Έπειτα, μικρή ποσότητα του συμπυκνωμένου ιικού εναιωρήματος αραιώθηκε διαδοχικά (1:100 – 1:12500) και προστέθηκε με 8μg/ml Protamine Sulfate, σε δισκία των 6 θέσεων με  $1 \times 10^5$  κύτταρα HeLa/οπή. Το Protamine Sulfate βοηθάει στο transduction και ως θετικά φορτισμένο κατιόν, μειώνει τις δυνάμεις απώθησης μεταξύ του κυττάρου και του ιού. Επιπλέον, ρυθμίζει την πρόσδεση του φορέα στην κυτταρική επιφάνεια. Διαδοχικές αραιώσεις παρόμοιου τύπου (1:3 – 1:27) ετοιμάστηκαν και για το αντίστοιχο μη συμπυκνωμένο ιού εναιώρημα, ως μέτρου σύγκρισης του βαθμού συμπύκνωσης που επετεύχθη μετά την φυγοκέντρηση. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν μη διαμολυσμένα HeLa (untransduced controls, UNTD) ως αρνητικοί μάρτυρες. Μετά την διαμόλυνση, στις 24 ώρες έγινε αλλαγή θρεπτικού μέσου, και στις 72 ώρες τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ελέγχθηκαν με κυτταρομετρία ροής για τον προσδιορισμό της έκφρασης της πρωτεΐνης GFP. Ο τίτλος του ιικού φορέα σε ιικά σωματίδια/ml υπολογίστηκε με τον εξής τύπο:

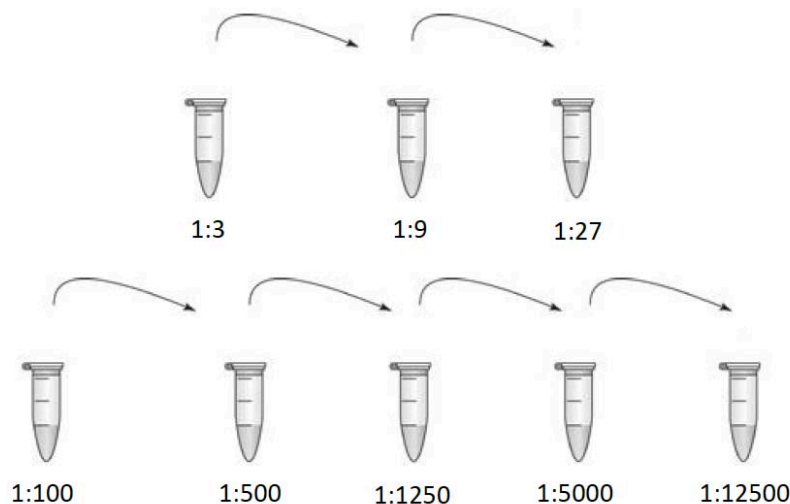
$$\text{Ποσοστό έκφρασης} \times \frac{1}{\text{αραιώση}} \times \text{αριθμός κυττάρων στο Titration Day1}$$



**Εικόνα 11.** Σχηματική αναπαράσταση δισκίου 6 θέσεων με διαδοχικές αραιώσεις μη συμπυκνωμένου ιού



**Εικόνα 12.** Σχηματική αναπαράσταση δισκίου 6 θέσεων με διαδοχικές αραιώσεις συμπυκνωμένου ιού



**Εικόνα 13.** Σχηματική αναπαράσταση διαδοχικών αραιώσεων κατά την παραγωγή του ιού.

### 3.11 Απομόνωση και διαμόλυνση CD34+ κυττάρων με λεντι-ικό φορέα GFP

#### 3.11.1 Απομόνωση CD34+ κυττάρων από κινητοποιημένο περιφερικό αίμα με ανοσομαγνητικό διαχωρισμό

Τα συγκεκριμένα κύτταρα προήλθαν από κινητοποιημένο περιφερικό αίμα. Η διαδικασία έγινε με χρήση του MACS CD34 Microbead Kit, Human (Miltenyi) και αρχή της μεθόδου ήταν η διαδικασία ανοσομαγνητικού διαχωρισμού θετικής επιλογής με μαγνητικό πεδίο. Τα CD34 αντισώματα που είναι μαγνητικά σημασμένα, προσκολλώνται στον CD34 υποδοχέα των PBMCs και έπειτα φορτώνονται σε κατάλληλη μαγνητική συσκευή που περιλαμβάνει στήλη, στην οποία θα λάβει χώρα ο διαχωρισμός. Πριν από τη διαδικασία, πρέπει να παρασκευαστεί ο απαραίτητος όγκος MACS Buffer, ο οποίος φιλτράρεται και διατηρείται στους 4 °C. Αποτελείται από αναλογία 1 (MACS BSA Stock Solution): 20 (autoMACS Rinsing Solution). Το δείγμα, έπειτα, υπόκειται σε διαδοχικές πλύσεις με MACS Buffer καθώς και διαδοχικές φυγοκεντρήσεις στους 4 °C, 400g για δεκαπέντε (15) λεπτά. Στο επόμενο στάδιο, γίνεται χρώση του δείγματος με Turk's Solution, η οποία σπάει τα κυτταρικά τοιχώματα των λευκών, ερυθρών αιμοσφαιρίων καθώς και των αιμοπεταλίων, ενώ ταυτόχρονα χρωματίζει τους πυρήνες των λευκών αιμοσφαιρίων. Βγαίνει ο μέσος όρος των κυττάρων και επιλέγεται ο κατάλληλος όγκος του blocking reagent και των microbeads ούτως ώστε να καλυφθούν τα PBMCs.

Στο στάδιο αυτό, γίνεται επιλογή του αρνητικού κλάσματος CD34-, το οποίο αποτελεί το αρνητικό control στην κυτταρομετρία ροής και το επόμενο, είναι η επιλογή των CD34+ κυττάρων.

Όταν έρθει η στιγμή της κυτταρομετρίας ροής, γίνεται χρώση και του αρνητικού και του θετικού κλάσματος με CD34 APC Και CD45 PerCP (BD Biosciences). Η διαδικασία περιλαμβάνει την χρώση όγκου 100 μL κυττάρων, και προϋποθέτει την επώαση με τα αντισώματα σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι για 15 λεπτά, πλύση με προσθήκη PBS



καθώς και την μετέπειτα φυγοκέντρωση στις 2000rpm για 7 λεπτά ούτως ώστε να απομακρυνθούν τα κύτταρα που δεν βιάφτηκαν. Τα αποτελέσματα από την κυταρομετρία ροής, στο θετικό κλάσμα, απεικονίζονται στην Εικόνα νούμερο 13.

### 3.11.2 Προ-διέγερση των CD34 κυττάρων

Την ημέρα 1 έπρεπε να γίνει επώαση για εικοσιτέσσερις (24) ώρες των CD34+ κυττάρων σε θρεπτικό μέσο StemSpan SFEM II, μαζί με τις κατάλληλες κυτοκίνες, SCF (100ng/ml), Flt3 (100ng/ml), TPO (100 ng/ml). Η συγκεκριμένη επώαση έγινε σε δισκία των 6 οπών, κατάλληλα για καλλιέργεια κυτταρικού εναιωρήματος. Αυτή η διαδικασία συνέβη για να ενδυναμωθούν τα κύτταρα, τα οποία είναι ιδιαίτερα ευάλωτα σε αυτό το στάδιο και οδηγούνται συχνά στον κυτταρικό θάνατο.

### 3.11.3 Διαμόλυνση των CD34+ κυττάρων με GFP λέντι-ικό φορέα

Η διαμόλυνση με τον λεντι-ικό φορέα διευκολύνθηκε με χρήση του RetroNectin, ενός ανασυνδυασμένου θραύσματος ανθρώπινης φιβρονεκτίνης (recombinant human fibronectin fragment). Στην συγκεκριμένη διαδικασία, τα κύτταρα επώαστηκαν για 2 ώρες στον θάλαμο νηματικής ροής όπου γίνεται χειρισμός των κυττάρων. Εν συνεχεία, η retronectin αφαιρέθηκε, προστέθηκε Human Serum Albumin (HSA) 2% για μη ειδική πρόσδεση για 30 λεπτά. Τέλος, γίνονται 3 πλύσεις με PBS.

## 3.12 Καλλιέργεια διαμολυσμένων CD34+ κυττάρων με small molecules και ανοσοφαινότυπος

### 3.12.1. Καλλιέργεια διαμολυσμένων CD34+ κυττάρων με UM171

Διαμόλυνση με λεντι-ικό φορέα αναφοράς και έκπτυξη CD34+ κυττάρων

Την ημέρα 1 100.000 CD34+ διεγείρονται σε καλλιέργητικό μέσο (Stem Span SFEM, cat no, Stem Cell Technologies) απουσία ορού και παρουσία τριών αυξητικών κυτοκινών: h-SCF (100 ng/ml), h-FLT3L (100 ng/ml), h-TPO(100 ng/ml).

Την ημέρα 2 πραγματοποιείται διαμόλυνση με λεντι-ικό φορέα που φέρει το γονίδιο αναφοράς GFP. Η διαμόλυνση πραγματοποιείται σε τριβλία τα οποία είχαν κατεργαστεί με 2 µg/cm<sup>2</sup> RetroNectin® (Takara), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ρετρονεκτίνη είναι ανασυνδυασμένη φιβρονεκτίνη που ευνοεί την αύξηση της απόδοσης της διαμόλυνσης. Κατόπιν, προστίθεται κατάλληλος όγκος (V<sub>ιού</sub>) του εναιωρήματος ιοσωματίων, ο οποίος υπολογίζεται βάση του τύπου:

$$\frac{N_{\text{κυττάρων}} \times \text{MOI}}{\text{τίτλος ιού (titer)}} = V_{\text{ιού}} \text{ (ml)}$$

Όπου MOI είναι η πολλαπλότητα διαμόλυνσης (multiplicity of infection), δηλαδή ο αριθμός των ιών που υπολογίζεται να διαμολύνουν κάθε ένα από τα κύτταρα. Στον συγκεκριμένο

πειραματικό σχεδιασμό το MOI είναι 20. Η καλλιέργεια επωάζεται σε θερμοκρασία 37 βαθμών Κελσίου και συγκέντρωση CO<sub>2</sub> 5% για 16-20 ώρες.

Την ημέρα 3 τα κύτταρα συλλέγονται, ώστε να εκπλυθούν από τη περίσσεια ισοωματίων και να καταμετρηθούν και γίνεται η προσθήκη του UM171 σε τελική συγκέντρωση 35 nM. Τα κύτταρα μάρτυρας (control) έλαβαν DMSO, το διαλυτικό μέσο στο οποίο πραγματοποιήθηκε η ανασύσταση-επαναδιάλυση των Small Molecules σε μέγιστη συγκέντρωση 0,1% v/v.

Η καλλιέργεια τερματίζεται την ημέρα 7 οπότε και προσδιορίζεται ο συνολικός αριθμός των CD34+ κυττάρων. Παράλληλα, προσδιορίζεται ο ανοσοφαινότυπος των αρχέγονων υποπληθυσμών των CD34 και τα ποσοστά έκφρασης του διαγονιδίου GFP με κυτταρομετρία ροής.

### 3.12.2 Ανοσοφαινότυπος αρχέγονων υποπληθυσμών CD34+ κυττάρων

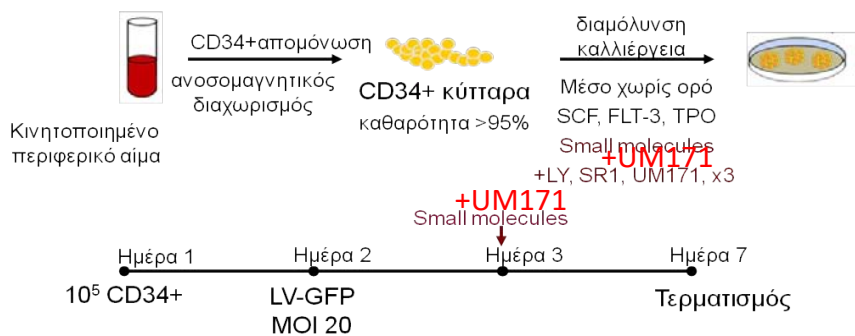
Οι αρχέγονοι υποπληθυσμοί που ελέγχθηκαν ήταν οι εξής :

1. CD34APC/CD38PE
2. CD34APC/CD38PE/CD90PERCP
3. CD34APC/CD45RAPERCP/CD133PE

50000 κύτταρα διαλύονται σε 100μL PBS στα οποία προστίθενται τα μονοκλωνικά αντισώματα με τους συνδυασμούς που προαναφέρθηκαν :

- anti-human CD34 APC (allophycocyanin, clone: 581) (BD Biosciences)
- anti-human CD45 PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein Complex, clone: HI30) (BD Biosciences)
- anti-human CD38PE (clone: HIT2) (BD Biosciences)
- anti-human CD90PERCP (Thy-1 membrane glycoprotein, clone: 5E10) (EXBI)
- anti-human CD133PE (prominin-1, clone REA753) (MACs; Miltenyi Biotec)

Ακολουθεί ανάδευση (Vortex) και επώαση για 15 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας των 10 λεπτών προστίθεται 1 ml PBS, και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min στις 2000 rpm στροφές. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και ελέγχεται η έκφραση των παραπάνω αρχέγονων πληθυσμών με κυτταρομετρία ροής. Παράλληλα προσδιορίζονται και τα επίπεδα έκφρασης της GFP στους παραπάνω αρχέγονους υποπληθυσμούς.



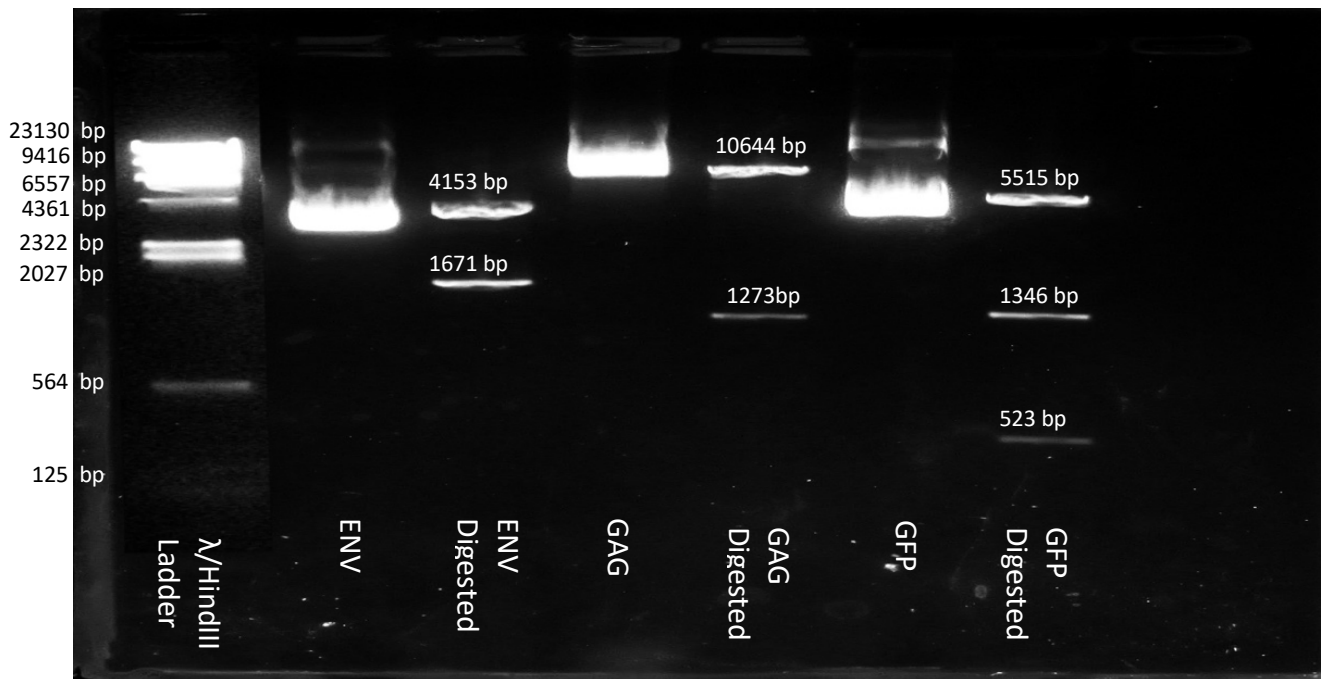
**Εικόνα 14.** Σχηματική απεικόνιση του πρωτοκόλλου έκπτυξης των CD34+ κυττάρων

### 3.13 Στατιστική Επεξεργασία

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή (mean)  $\pm$  τυπική απόκλιση (SD). Για την εκτίμηση της στατιστικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης (ANOVA). Την εύρεση σημαντικής διαφοράς ακολούθησε η post-hoc δοκιμασία Student-Newmann-Keuls, προκειμένου να εντοπιστεί διαφορά ανάμεσα στα διάφορα ζεύγη επιδράσεων με τα Small Molecules και με τον μάρτυρα (DMSO). Η ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα Graph Pad Prism 4.0. Το μικρότερο επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας που έγινε αποδεκτό ορίστηκε στο  $p < 0.05$ . Ns: non significant, μη στατιστικά σημαντικό, P-value : \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4. Αποτελέσματα

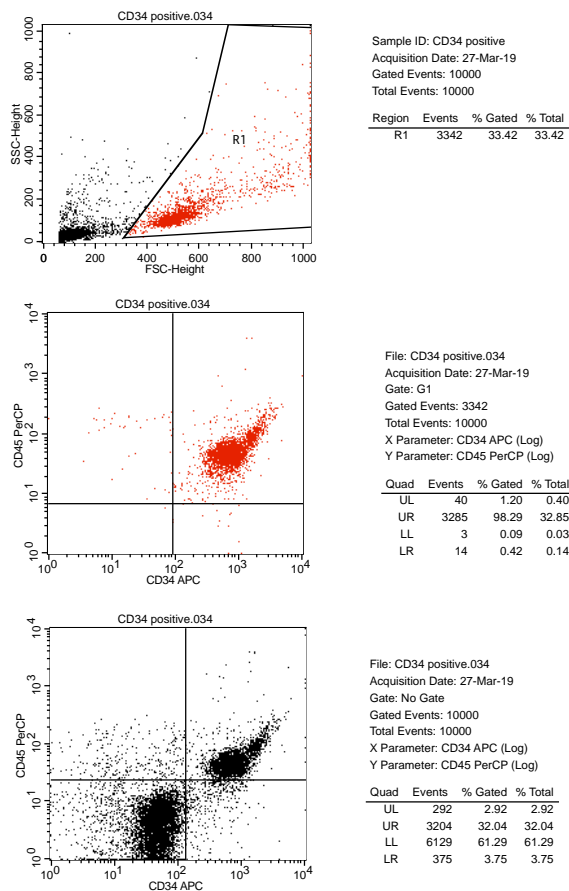
#### 4.1 Αποτελέσματα προϊόντων ηλεκτροφόρησης πλασμιδίων



Εικόνα 16. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης πλασμιδίων

Για τα πλασμίδια που εκφράζουν τις πρωτεΐνες env, gag και gfp, το αποτέλεσμα των πέψεων με τις κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες ήταν το εξής: δύο (2) ζώνες μοριακού βάρους 4153 bp και 1671 bp, δύο (2) ζώνες μοριακού βάρους 10644 bp και 1273 bp, και τρεις (3) ζώνες μοριακού βάρους 5515 bp, 1346 bp και 523 bp.

## 4.2 Αποτελέσματα απομόνωσης CD34<sup>+</sup> κυττάρων



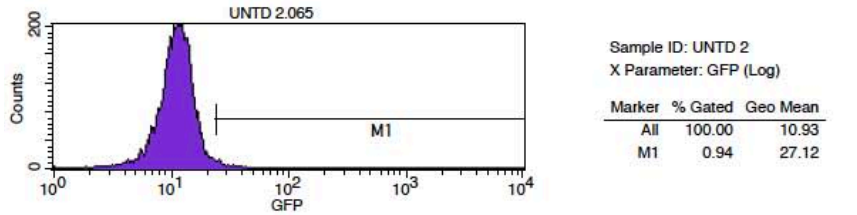
**Εικόνα 15. Αποτελέσματα καθαρότητας CD34<sup>+</sup> κυττάρων.**

Βάσει των ρυθμίσεων και των ορίων που τέθηκαν στο πρόγραμμα του κυτταρόμετρου ροής, προκύπτει από την εικόνα ότι στο συγκεκριμένο δείγμα είχαμε καθαρότητα 98.29%, αποτέλεσμα επιθυμητό, από τη στιγμή που ζητούμενο είναι κύτταρα με καθαρότητα μεγαλύτερη του 95%.

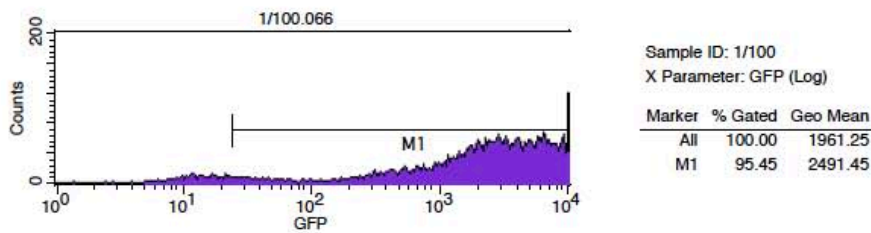
### 4.3 Τιτλοδότηση παραγόμενων GFP-λεντι-ικών φορέων

Για τον υπολογισμό του τίτλου των παραγόμενων λεντι-ικών φορέων έγινε καταμέτρηση του φθορισμού της GFP με κυτταρομετρία ροής. Ο φθορισμός μετρήθηκε για κάθε ομάδα κυττάρων HeLa που διαμολύνθηκε με μία από τις διαδοχικές αραιώσεις του ιικού εναιωρήματος. Στις εικόνες 17 και 18 παρουσιάζονται τα ιστογράμματα της συγκεκριμένης ανάλυσης, για τον τίτλο του συμπυκνωμένου και του μη συμπυκνωμένου ιού αντίστοιχα.

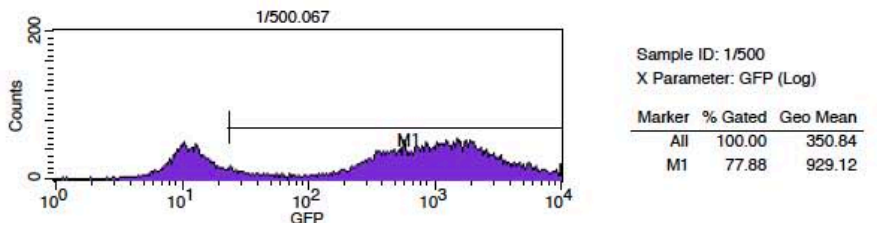
#### Μη διαμολυσμένα κύτταρα – 0.94% GFP



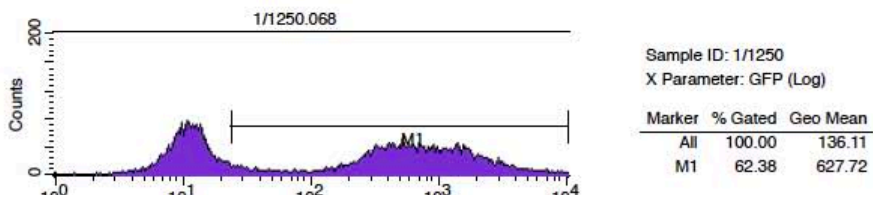
#### Αραίωση 1:100 συμπυκνωμένου ιού – 95.45 % GFP



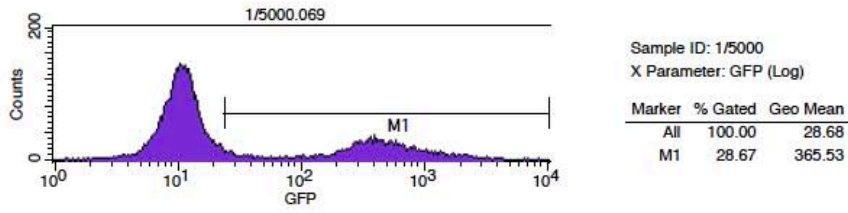
#### Αραίωση 1:500 συμπυκνωμένου ιού – 77.88 % GFP



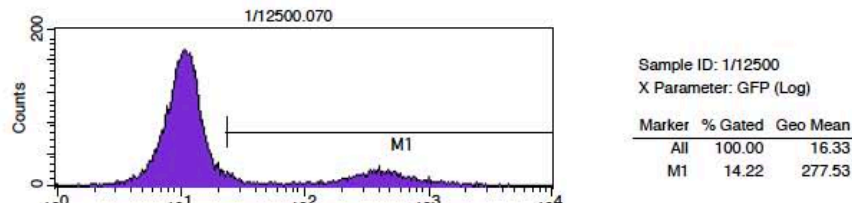
#### Αραίωση 1:1250 συμπυκνωμένου ιού – 62.38 % GFP



### Αραίωση 1:5000 συμπυκνωμένου ιού – 28.67 % GFP

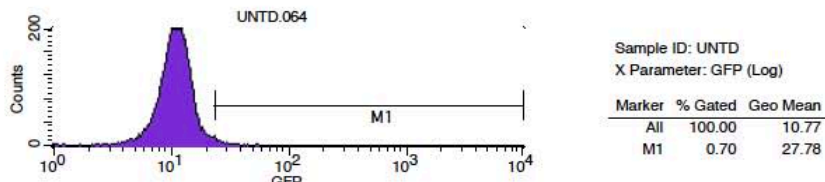


### Αραίωση 1:12500 συμπυκνωμένου ιού – 14.22% GFP

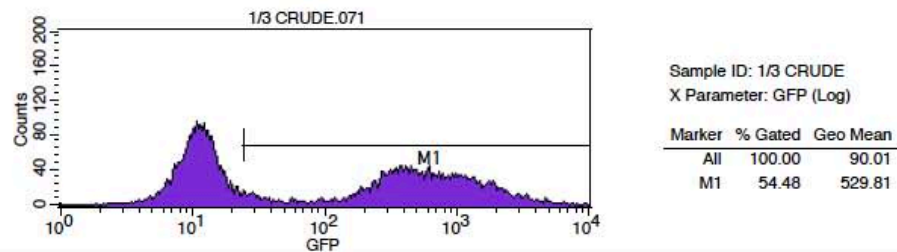


**Εικόνα 17.** Ιστογράμματα καταμέτρησης του φθορισμού προερχόμενου από τη GFP σε ελαιωρήματα κυττάρων HeLa, διαμολυσμένων από συμπυκνωμένο ελαιώρημα GFP-λεντι-ικών φορέων, σε σύγκριση με μη διαμολυσμένα κύτταρα ως ομάδα ελέγχου. Τα εύρη αραιώσεων είναι 1:100, 1:500, 1:1250, 1:5000 και 1:12500.

### Μη διαμολυσμένα κύτταρα – 0.70% GFP

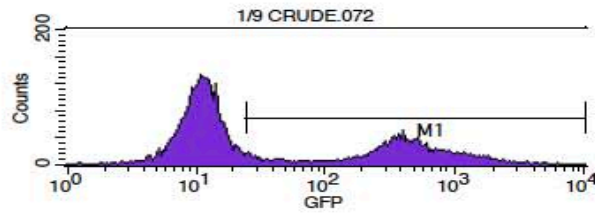


### Αραίωση 1:3 μη συμπυκνωμένου ιού – 54.48 % GFP





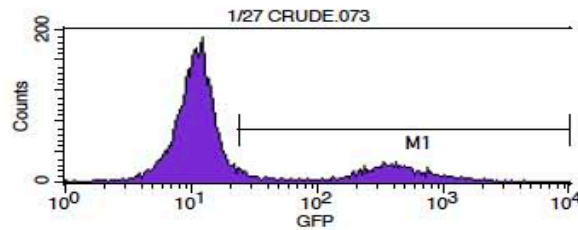
Αραίωση 1:9 μη συμπυκνωμένου ιού – 35.10 % GFP



Sample ID: 1/9 CRUDE  
X Parameter: GFP (Log)

Marker	% Gated	Geo Mean
All	100.00	37.20
M1	35.10	380.16

Αραίωση 1:27 μη συμπυκνωμένου ιού – 17.44% GFP



Sample ID: 1/27 CRUDE  
X Parameter: GFP (Log)

Marker	% Gated	Geo Mean
All	100.00	18.69
M1	17.44	300.88

**Εικόνα 18.** Ιστογράμματα καταμέτρησης του φθορισμού προερχόμενου από τη GFP σε εναιωρήματα κυττάρων HeLa, διαμολυσμένων από μη συμπυκνωμένο εναιωρήμα GFP-λεντι-ϊκών φορέων, σε σύγκριση με μη διαμολυσμένα κύτταρα ως ομάδα ελέγχου. Τα εύρη αραιώσεων είναι 1:3, 1:9, 1:27.

Ο τίτλος του ιικού φορέα που παράχθηκε υπολογίζεται βάσει του τύπου που αναφέρθηκε και στην ενότητα Μέθοδοι και Υλικά :

$\text{Τίτλος (IU/ml)} = \%GFP \times \text{παράγοντας αραιώσης} \times \text{αριθμός διαμολυσμένων κυττάρων}$

Ο τίτλος του ιού είναι ίσος με  $1.38 \times 10^8$  ιικά σωματίδια.

Αναλυτικότερα, την πρώτη μέρα της τιτλοδότησης του συγκεκριμένου ιού, τα κύτταρα που καταμετρήθηκαν ήταν ίσα με 155.250. Σύμφωνα με αυτά τα στοιχεία και τον τύπο, προκύπτει για κάθε αραιώση

$$1:100 \rightarrow \frac{95.45}{100} \times 100 \times 155250 = 14828612.5$$

$$1:500 \rightarrow \frac{77.88}{100} \times 500 \times 155250 = 60454350$$

$$1:1250 \rightarrow \frac{62.38}{100} \times 1250 \times 155250 = 121056187.5$$

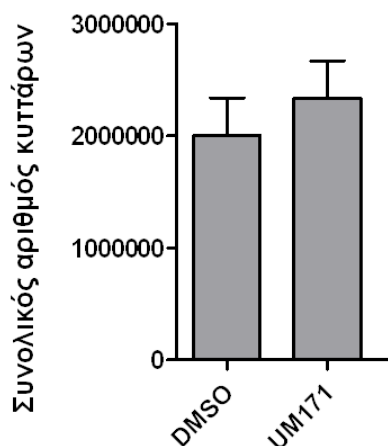
$$1:5000 \rightarrow \frac{28.67}{100} \times 5000 \times 155250 = 222580875$$

$$1:12500 \rightarrow \frac{14.22}{100} \times 12500 \times 155250 = 275956875$$

Ο μέσος όρος όλων των αραιώσεων είναι ίσος με 138973380.  
Συμπερασματικά, ο τίτλος του ιού είναι ίσος με  $1.38 \times 10^8$  ιικά σωματίδια.

#### 4.4 Συνολικός αριθμός κυττάρων και αποικιών σε καλλιέργεια με small molecules

Τα CD34<sup>+</sup> κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία των μικρών μορίων για 5 ημέρες. Την ημέρα τερματισμού της καλλιέργειας (ημέρα 7) καταμετρήθηκε ο συνολικός αριθμός των CD34<sup>+</sup> κυττάρων, που είχαν εκπτυχθεί σε κάθε συνθήκη. Τα SMs, όπως φαίνεται και στην Εικόνα, δεν επηρεάζουν τον συνολικό αριθμό των κυττάρων, ο οποίος υπολογίζεται περίπου στα  $2 \times 10^6$  και είναι σχετικά στα ίδια επίπεδα στην ομάδα UM171 και στην ομάδα ελέγχου DMSO.



**Εικόνα 19.** Επίδραση των small molecules στον συνολικό αριθμό των CD34 κυττάρων

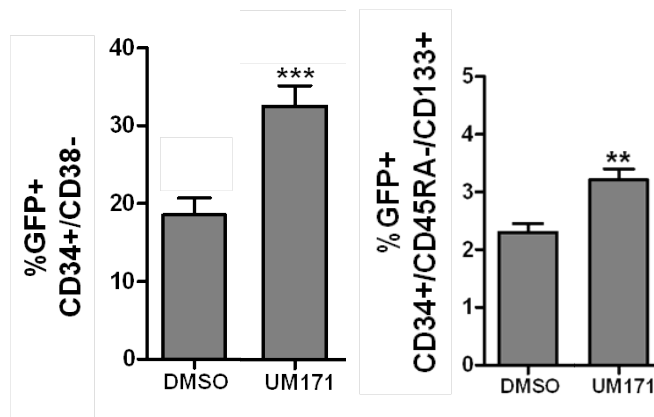
#### 4.5 Έκπτυξη των CD34+ αρχέγονων υποπληθυσμών παρουσία UM171

Την ημέρα τερματισμού της καλλιέργειας (ημέρα 7) ένα κλάσμα των CD34<sup>+</sup> που εκπτύχθηκε παρουσία UM171 αναλύθηκε με κυτταρομετρία ροής προκειμένου να προσδιοριστούν τα ποσοστά έκπτυξης των αρχέγονων υποπληθυσμών των CD34<sup>+</sup>. Στην Εικόνα 20 παρουσιάζονται τα ποσοστά έκπτυξης των αρχέγονων υποπληθυσμών CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup> και CD34<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD133<sup>+</sup> παρουσία small molecules σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρα DMSO. Παρατηρείται πως το UM171 οδήγησε σε σημαντικό εμπλουτισμό και έκπτυξη των HSCs των παραπάνω φαινοτύπων. Και στα τρία διαγράμματα φαίνεται πως τα CD34<sup>+</sup> κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία του UM171 παρουσιάζουν τουλάχιστον διπλάσια έκπτυξη σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου που έλαβαν DMSO.

**Εικόνα 20.** Έκπτυξη των CD34<sup>+</sup> αρχέγονων υποπληθυσμών παρουσία Small molecules Η έκπτυξη για κάθε υποπληθυσμό παρουσιάζεται κανονικοποιημένη ως προς την ομάδα ελέγχου. Ns: non significant, μη στατιστικά σημαντικό, P-value: \*\* p< 0.01, \*\*\* p<0.001.

#### 4.6 Επίπεδα Έκφρασης του Διαγονιδίου GFP στους αρχέγονους υποπληθυσμούς των CD34+

Την ημέρα τερματισμού της καλλιέργειας παρουσία *small molecules*, ένα κλάσμα των CD34<sup>+</sup> κυττάρων που διαμολύνθηκαν με τον λεντι-ικό φορέα GFP αναλύθηκε με κυτταρομετρία ροής ως προς την έκφραση του διαγονιδίου GFP. Το UM171 ενισχύει τα ποσοστά έκφρασης του διαγονιδίου GFP στους αρχέγονους υποπληθυσμούς. Αναλυτικά στον υποπληθυσμό CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> το ποσοστό της έκφρασης του διαγονιδίου (UM171: 32,1%, p<0.001) είναι αυξημένο >10%, στον υποπληθυσμό CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup> (UM171: 11,3% p < 0.05) κατά 4-5%, ενώ στον υποπληθυσμό CD34<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD133<sup>+</sup> (UM171: 3,2% p<0.01) περίπου 1% σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου DMSO.



**Εικόνα 21.** Επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου GFP στους αρχέγονους υποπληθυσμούς των CD34<sup>+</sup>

## 5. Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια αδιαμφισβήτητα έχει σημειωθεί αξιοσημείωτη πρόοδος στη γονιδιακή θεραπεία ασθενειών που σχετίζονται με την μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSCs). Ωστόσο, η βελτιστοποίησή της τεχνικής, όσον αφορά στην διατήρηση του αρχέγονου χαρακτήρα των HSCs, καθώς και την ικανότητα εμφύτευσης τους στον μυελό των οστών, κρίνεται απαραίτητη.

Η χρήση των λεντι-ικών φορέων ως συστήματα μεταφοράς διαγονιδίων, έχει αποδειχθεί πως αποτελεί ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο λόγω των σημαντικών πλεονεκτημάτων τους. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία πως το small molecule UM171 έχει την ικανότητα αφενός να προάγει τον πολλαπλασιασμό και την αυτοανανέωση των ανθρώπινων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, και αφετέρου να διατηρεί τον αρχέγονό τους χαρακτήρα. Η αποφυγή της ασταθούς διαφοροποίησης των κυττάρων αυτών και η καθυστέρησή της πιστεύεται ότι είναι δυνατόν να διαδραματίσουν καθοριστικό ρόλο στην επιτυχή διαμόλυνσή τους, τη μεταφορά και την εμφύτευσή τους στον μυελό των οστών μετά από μεταμόσχευση.

Επιπρόσθετα, προσδιορίστηκε η επίδραση του μικρού μορίου UM171 στην έκπτυξη των φυσιολογικών CD34+ κυττάρων και στην ικανότητά του να διατηρεί τον προγονικό χαρακτήρα των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων μέσω καθυστέρησης της διαφοροποίησής τους. Παράλληλα, διερευνήθηκε εάν η παρουσία του UM171 επηρεάζει το ποσοστό έκφρασης της GFP.

Η χρήση του UM171 ως μέσου προαγωγής της έκπτυξης των κυττάρων κρίνεται αποτελεσματική στην περίπτωση των φυσιολογικών CD34+ κυττάρων (Li et al., 2017; Psatha et al., 2017)

Σημαντικό γεγονός αποτέλεσε η διαπίστωση πως το UM171, ιδίως στις καλλιέργειες των φυσιολογικών CD34+ κυττάρων συνέβαλε στην καθυστέρηση της διαφοροποίησής τους και στη διατήρηση ενός προγονικού χαρακτήρα. Κατ' αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η αποφυγή της απώλειας έκφρασης του διαγονιδίου, ως επακόλουθο της ασταθούς ωρίμανσης που υφίστανται τα κύτταρα αυτά υπό καλλιεργητικές συνθήκες.

Συνοψίζοντας, η *ex vivo* έκπτυξη των διαμόλυσμένων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (CD34+) με τη χρήση του UM171 είναι εφικτή, ενώ επιπρόσθετα, διατηρεί τον αρχέγονο χαρακτήρα των CD34+ κυττάρων, 5 ημέρες μετά τη διαμόλυνση με τον λεντι-ικό φορέα και επάγει την έκφραση της GFP.

Η προτεινόμενη διαδικασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ξεπεραστούν ορισμένοι περιορισμοί της γονιδιακής θεραπείας, όπως ο χαμηλός αριθμός διαθέσιμων κυττάρων και το χαμηλό ποσοστό εμφύτευσης των γενετικά επεξεργασμένων κυττάρων.

## 6. Βιβλιογραφία



- 4-N-[2-Benzyl-7-(2-methyltetrazol-5-yl)-9H-pyrimido[4,5-b]indol-4-yl]cyclohexane-1,4-diamine | C25H27N9 - PubChem. (n.d.). Retrieved November 14, 2019, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/71714981>
- Bonnet, D. (2002). Haematopoietic stem cells. *The Journal of Pathology*, 197(4), 430–440. <https://doi.org/10.1002/path.1153>
- Brenner, M. K. (1996). Gene transfer to hematopoietic cells. *New England Journal of Medicine*, Vol. 335, pp. 337–339. <https://doi.org/10.1056/NEJM199608013350508>
- Broxmeyer, H. E., Douglas, G. W., Hangoc, G., Cooper, S., Bard, J., English, D., ... Boyse, E. A. (1989). Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(10), 3828–3832. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.10.3828>
- Domen, J., & Weissman, I. L. (1999, May). Self-renewal, differentiation or death: Regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Molecular Medicine Today*, Vol. 5, pp. 201–208. [https://doi.org/10.1016/S1357-4310\(99\)01464-1](https://doi.org/10.1016/S1357-4310(99)01464-1)
- Dong, W. J., Zu, Z. X., Liu, D. P., & Liang, C. C. (2003, April 1). Development of gene therapy for hematopoietic stem cell using viral vectors. *Acta Genetica Sinica*, Vol. 30, pp. 382–388. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402447>
- Fares, I., Chagraoui, J., Gareau, Y., Gingras, S., Ruel, R., Mayotte, N., ... Sauvageau, G. (2014). Pyrimidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal HHS Public Access. *Science*, 345(6203), 1509–1512. <https://doi.org/10.1126/science.1256337>
- Gardlík R, Pálffy R, Hodosy J, Lukács J, Turna J, Celec P. Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med Sci Monit*. 2005 Apr;11(4):RA110-21. Epub 2005 Mar 24. PMID: 15795707
- Glorioso, J. C., & Fink, D. J. (2004). Herpes Vector-Mediated Gene Transfer in Treatment of Diseases of the Nervous System. *Annual Review of Microbiology*, 58(1), 253–271. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123709>
- Hematopoietic Stem and Progenitor Cells*. (n.d.).
- Kaji, E. H., & Leiden, J. M. (2001). Gene and stem cell therapies. *Journal of the American Medical Association*, 285(5), 545–550. <https://doi.org/10.1001/jama.285.5.545>
- Kay, M. A. (2011, May). State-of-the-art gene-based therapies: The road ahead. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 12, pp. 316–328. <https://doi.org/10.1038/nrg2971>
- Miyoshi, H., Blömer, U., Takahashi, M., Gage, F. H., & Verma, I. M. (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *Journal of Virology*, 72(10), 8150–8157. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9733856>
- Morrison, S. J., & Weissman, I. L. (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*, 1(8), 661–673. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90037-X](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90037-X)
- Osawa, M., Hanada, K. I., Hamada, H., & Nakauchi, H. (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34- low/negative hematopoietic stem cell. *Science*, 273(5272), 242–245. <https://doi.org/10.1126/science.273.5272.242>
- Psatha, N., Karponi, G., & Yannaki, E. (2016, July 1). Optimizing autologous cell grafts to improve stem cell gene therapy. *Experimental Hematology*, Vol. 44, pp. 528–539. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2016.04.007>
- Smith, L. G., Weissman, I. L., & Heimfeld, S. (1991). Clonal analysis of hematopoietic stem-cell differentiation in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(7), 2788–2792. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.7.2788>

- Spangrude, G. J., Smith, L., Uchida, N., Ikuta, K., Heimfeld, S., Friedman, J., & Weissman, I. L. (1991). Mouse hematopoietic stem cells. *Blood*, Vol. 78, pp. 1395–1402. <https://doi.org/10.1182/blood.v78.6.1395.bloodjournal7861395>
- Thomas, E. D. (2005, February). Bone marrow transplantation from the personal viewpoint. *International Journal of Hematology*, Vol. 81, pp. 89–93. <https://doi.org/10.1532/IJH97.04197>
- Vigna, E., & Naldini, L. (2000). Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *The Journal of Gene Medicine*, 2(5), 308–316. [https://doi.org/10.1002/1521-2254\(200009/10\)2:5<308::AID-JGM131>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1521-2254(200009/10)2:5<308::AID-JGM131>3.0.CO;2-3)
- Antonchuk, J., Sauvageau, G., & Humphries, R. K. (2002). HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell*, 109(1), 39–45. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00697-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00697-9)
- Conneally, E., Cashman, J., Petzer, A., & Eaves, C. (1997). Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lymphomyeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(18), 9836–9841. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.18.9836>
- Fares, I., Rivest-Khan, L., Cohen, S., & Sauvageau, G. (2015). Small molecule regulation of normal and leukemic stem cells. *Current Opinion in Hematology*, 22(4), 309–316. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000151>
- Fraldi, A., Serafini, M., Sorrentino, N. C., Gentner, B., Aiuti, A., & Bernardo, M. E. (2018). Gene therapy for mucopolysaccharidoses: In vivo and ex vivo approaches 10 Technology 1004 Medical Biotechnology. *Italian Journal of Pediatrics*, 44(Suppl 2). <https://doi.org/10.1186/s13052-018-0565-y>
- Ginn, S. L., Alexander, I. E., Edelstein, M. L., Abedi, M. R., & Wixon, J. (2013). Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. In *Journal of Gene Medicine* (Vol. 15, Issue 2, pp. 65–77). <https://doi.org/10.1002/jgm.2698>
- Haematopoiesis - Wikipedia*. (n.d.). Retrieved May 21, 2020, from <https://en.wikipedia.org/wiki/Haematopoiesis>
- Hematopoietic Stem and Progenitor Cells*. (n.d.).
- Jang, Y. K., Jung, D. H., Jung, M. H., Kim, D. H., Yoo, K. H., Sung, K. W., Koo, H. H., Oh, W., Yang, Y. S., & Yang, S. E. (2006). Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for ex vivo expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Annals of Hematology*, 85(4), 212–225. <https://doi.org/10.1007/s00277-005-0047-3>
- Li, X., Xia, C., Wang, T., Liu, L., Zhao, Q., Yang, D., Hu, F., Zhang, M., Huang, K., Geng, Y., Zheng, Y., Guan, Y., Wu, H., Chen, X., Pan, G., Chen, J., Du, J., & Wang, J. (2017). Pyrimidoindole derivative UM171 enhances derivation of hematopoietic progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Research*, 21, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.03.014>
- Lundstrom, K. (2018). Viral Vectors in Gene Therapy. *Diseases*, 6(2), 42. <https://doi.org/10.3390/diseases6020042>
- Miller, C. L., & Eaves, C. J. (1997). Expansion in vitro of adult murine hematopoietic stem cells with transplantable lymphomyeloid reconstituting ability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(25), 13648–13653. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.13648>

- Patil, S., Gao, Y. G., Lin, X., Li, Y., Dang, K., Tian, Y., Zhang, W. J., Jiang, S. F., Qadir, A., & Qian, A. R. (2019). The development of functional non-viral vectors for gene delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21).  
<https://doi.org/10.3390/ijms20215491>
- Psatha, N., Georgolopoulos, G., Phelps, S., & Papayannopoulou, T. (2017). Brief Report: A Differential Transcriptomic Profile of Ex Vivo Expanded Adult Human Hematopoietic Stem Cells Empowers Them for Engraftment Better than Their Surface Phenotype. *Stem Cells Translational Medicine*, 6(10), 1852–1858. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0048>
- Thomas, E. D. (2005). Bone marrow transplantation from the personal viewpoint. In *International Journal of Hematology* (Vol. 81, Issue 2, pp. 89–93). *Int J Hematol*.  
<https://doi.org/10.1532/IJH97.04197>
- Vigna, E., & Naldini, L. (2000). Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *The Journal of Gene Medicine*, 2(5), 308–316. [https://doi.org/10.1002/1521-2254\(200009/10\)2:5<308::AID-JGM131>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1521-2254(200009/10)2:5<308::AID-JGM131>3.0.CO;2-3)