



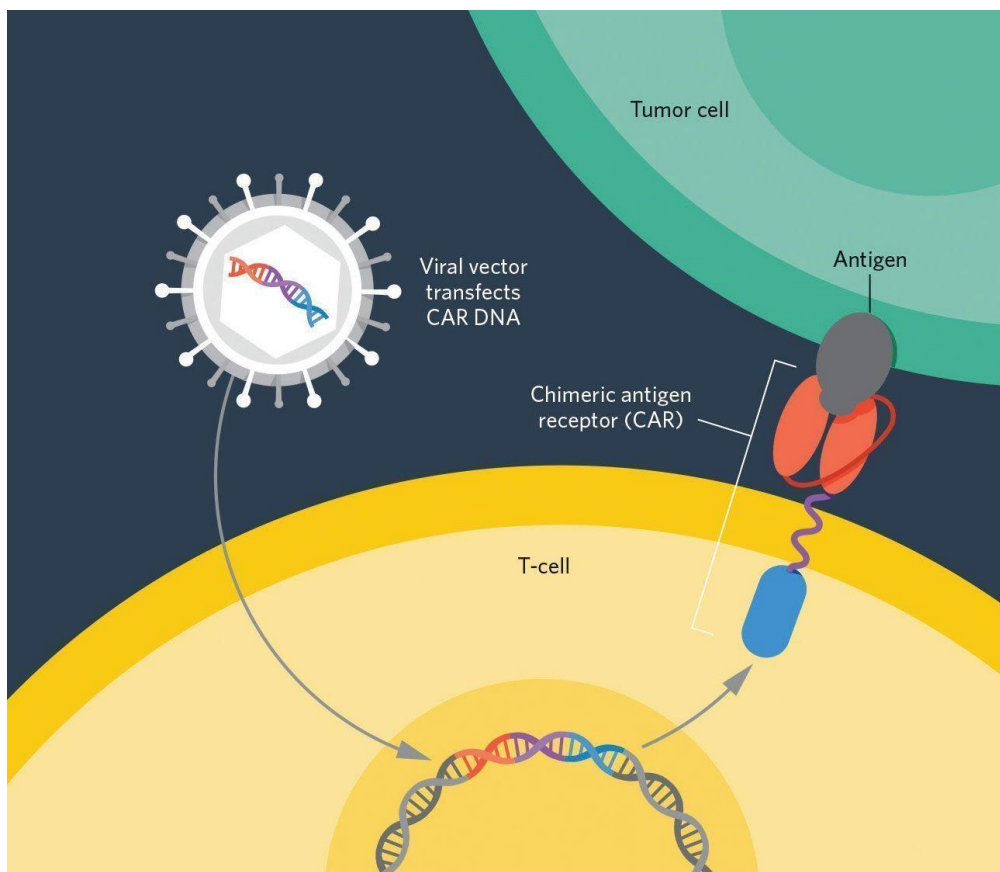
Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
Τμήμα Βιοχημείας
& Βιοτεχνολογίας



Πτυχιακή Εργασία

«Τροποποίηση κυττάρων ανοσοποιητικού για εφαρμογές στη γονιδιακή θεραπεία»

“Immune cell modulation for gene therapy applications”



Παναγιώτα Φωτοπούλου

Φεβρουάριος 2023, Λάρισα

«Τροποποίηση κυττάρων ανοσοποιητικού για εφαρμογές στη γονιδιακή θεραπεία»

“Immune cell modulation for gene therapy applications”

Παναγιώτα Φωτοπούλου

του Παναγιώτη

Επιβλέπων: Γεώργιος Βασιλόπουλος

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γονιδιακής Θεραπείας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

Τριμελής Επιτροπή:

Γεώργιος Βασιλόπουλος, Καθηγητής Παθολογίας και Αιματολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Αντώνιος Γιακουντής, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μαρία Κοντού, Επίκουρος Καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Γεώργιο Βασιλόπουλο, που με καλωσόρισε στο εργαστήριό του και μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία εκεί. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Εμμανουήλ Σημαντηράκη, χάρη στον οποίο μου δόθηκε η ευκαιρία συμμετοχής στην ομάδα του κυρίου Βασιλόπουλου, και την κυρία Ιωάννα Λαζανά, για την καθοδήγησή τους, την ενθάρρυνσή τους, τη στήριξή τους, την υπομονή τους, τη ζεστασιά τους, και φυσικά για το χιούμορ τους. Η εκπαίδευσή μου στο πλευρό σας υπήρξε πραγματικά ένα προνόμιο.

Θα ήθελα επίσης να απευθύνω θερμές ευχαριστίες στα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής της πτυχιακής μου, τον κύριο Αντώνιο Γιακουντή και την κυρία Μαρία Κοντού, καθώς και στους υπόλοιπους καθηγητές του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, που όλα αυτά τα χρόνια μας δίδαξαν με κόπο και αφοσίωση, μας καθοδήγησαν, μας ενέπνευσαν και μας διαμόρφωσαν ως μελλοντικούς επιστήμονες.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας και το Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, για τη συμβολή τους στην περάτωση των σπουδών μου.

Ακολούθως, ένα μεγάλο ευχαριστώ αξίζουν οι φίλοι μου, «Λαρισαίοι» και μη, για την παρέα τους, τη στήριξή τους και τις στιγμές που μοιραστήκαμε, χαρούμενες και μη. Ό,τι κι αν γράψω για εσάς θα είναι λίγο.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κύριο Ευάγγελο Κουρού, που στάθηκε δίπλα μου καθ' όλη τη διάρκεια τούτου του εγχειρήματος και προσέφερε στήριξη, ώθηση και μια αγκαλιά όποτε τη χρειάστηκα.

Το ύστατο ευχαριστώ αξίζει η οικογένειά μου, και ιδιαιτέρως οι γονείς μου, που μου έχουν δώσει ανιδιοτελώς και απλόχερα, τα πάντα. Χωρίς την αγάπη και τη στήριξή σας δε θα είχα καταφέρει τίποτα. Σας ευχαριστώ για όλα.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	3
Περίληψη.....	6
Abstract.....	7
1. Εισαγωγή.....	8
1.1 Το ανοσοποιητικό σύστημα	8
1.2 Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.....	8
1.3 Ο καρκίνος.....	15
1.4 Η γονιδιακή θεραπεία	17
1.5 Το σύνδρομο απελευθέρωσης κυτταροκινών	22
1.6 Μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας.....	24
1.7. Το σύστημα CRISPR/Cas9	26
2. Σκοπός.....	27
3. Υλικά & Μέθοδοι	28
3.1. Πέψη του πλασμιδίου LentiCRISPR v2 με ένζυμα περιορισμού για απομόνωση των τμημάτων του sgRNA backbone και του γονιδίου της Cas9.....	28
3.2. Πέψεις του πλασμιδίου PUC19 με ένζυμα περιορισμού προς εισαγωγή του sgRNA backbone και του γονιδίου της Cas9.....	29
3.3. Ένωση (ligation) των τμημάτων DNA των πέψεων	30
3.4. Μετασχηματισμός βακτηρίων με κυκλικά μόρια DNA	31
3.5. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μικρής κλίμακας καλλιέργεια (mini-prep)....	31
3.6. Κλωνοποίηση πλασμιδίων σε μεγάλη κλίμακα (maxi-prep).....	32
3.7. Έλεγχος προσανατολισμού του sgRNA backbone στο πλασμίδιο PUC19	33
3.8. Αφαίρεση των επιπλέον θέσεων περιορισμού του ενζύμου BsmBI από το sgRNA backbone-PUC19	33
3.9. Επανακυκλοποίηση του γραμμικού sgRNA backbone-PUC19.....	34
3.10. Εισαγωγή της sgRNA αλληλουχίας στο sgRNA backbone του PUC19.....	34
3.11. Αξιολόγηση επιτυχίας της ένθεσης των sgRNA duplex στο sgRNA backbone.....	36
3.12. Διαμόλυνση (transfection) των πλασμιδίων σε κύτταρα HEK293T	37
3.13. Απομόνωση T λεμφοκυττάρων από ολικό αίμα	38
3.14. Ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) των πλασμιδίων σε T λεμφοκύτταρα	39
3.15. Διαμόλυνση (transfection) του LentiCRISPR v2 σε HEK293T	39
3.16. Ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) RNP συμπλόκων σε T λεμφοκύτταρα.....	40
3.17. Παραγωγή και συλλογή ιών lenti CAR19 και foamy από HEK293T	41
3.18. Τιτλοδότηση (titration) των ιών lenti CAR19 και foamy CAR19	43

3.19. Επιμόλυνση (transduction) των T λεμφοκυττάρων με τους ιούς lenti CAR19 και foamy CAR19	43
3.20. Ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) RNP συμπλόκων σε CAR-T κύτταρα	44
3.21. 1 ^η Προσέγγιση – Ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) RNP συμπλόκων σε ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα με TransAct.....	45
3.22. 2 ^η Προσέγγιση – Ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) RNP συμπλόκων σε ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα με Dynabeads Human T-Activator και σε T λεμφοκύτταρα σε ηρεμία	45
3.23. Μοριακός έλεγχος της αποσιώπησης του γονιδίου της β2-μικροσφαιρίνης	47
4. Αποτελέσματα.....	50
4.1. Κατασκευή πλασμιδιακών φορέων Cas9-PUC19 και sgRNA backbone-PUC19.....	50
4.2. Εισαγωγή των γονιδιακών τμημάτων Cas9 και sgRNA backbone στο PUC19	51
4.3. Διαγνωστικές πέψεις των Cas9-PUC19 και sgRNA backbone-PUC19 πλασμιδίων μετά από απομόνωση πλασμιδιακού DNA, από μικρής κλίμακας καλλιέργειες (miniprep) μοναδικών αποικιών μετασηματισμένων βακτηρίων.....	54
4.4. Έλεγχος προσανατολισμού ένθεσης του sgRNA backbone στο PUC19.....	56
4.5. Αφαίρεση των επιπλέον θέσεων περιορισμού του ενζύμου BsmBI από το πλασμίδιο sgRNA backbone-PUC19.....	57
4.6. Πέψεις του επανακυκλοποιημένου sgRNA backbone-PUC19 προς ενσωμάτωση των sgRNA duplex	58
4.7. Κατασκευή φορέων PUC19-b2msg2RNA.Dest και puc19-b2msg3RNA.Dest	58
4.8. Ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) T λεμφοκυττάρων με RNP σύμπλοκα.....	61
4.9. Τιτλοδότηση των ιών lenti CAR και foamy CAR.....	62
4.10. Επιμόλυνση (transduction) των T λεμφοκυττάρων με τους ιούς lenti CAR19 και foamy CAR19	65
4.11. Ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) CAR-T κυττάρων με RNP σύμπλοκα	67
4.12 Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου ηλεκτροδιάτρησης (electroporation) T λεμφοκυττάρων με RNP σύμπλοκα	67
4.13. Μοριακός έλεγχος της αποσιώπησης του γονιδίου της β2-μικροσφαιρίνης.....	69
5. Συζήτηση	71
6. Βιβλιογραφία.....	74

Περίληψη

Εδώ και δεκαετίες, το ζήτημα της θεραπείας των διάφορων τύπων νεοπλασιών βρίσκεται στο επίκεντρο του τομέα της υγείας, καθώς οι ασθένειες αυτές παραμένουν οι πιο απρόβλεπτες, και ως αποτέλεσμα οι πιο δύσκολες στην αντιμετώπιση. Ανά τα χρόνια έχουν αναπτυχθεί διάφορες θεραπείες κατά των διαφόρων μορφών νεοπλασμάτων, όπως είναι η χημειοθεραπεία, η ακτινοθεραπεία, η ανοσοθεραπεία, η χρήση laser και η χειρουργική αφαίρεση των καρκινικών όγκων, κάθε μία εκ των οποίων αποφέρει διαφορετικά ποσοστά ύφεσης και πλήρους ίασης. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία εξετάστηκε ένας τύπος ανοσοθεραπείας εναντίων των αιματολογικών νεοπλασιών, τα αλλογενή T λεμφοκύτταρα που φέρουν χημειοθεραπευτικούς υποδοχείς (CAR-Ts). Πρόκειται για T λεμφοκύτταρα τα οποία έχουν τροποποιηθεί γενετικά ώστε να εκφράζουν υποδοχείς που έχουν χαρακτηριστικά υποδοχέα T και B λεμφοκυττάρου ταυτόχρονα. Αυτοί οι υποδοχείς μπορούν να στοχεύουν συγκεκριμένα μόνο τα νεοπλασματικά κύτταρα. Πρόκειται για μία πολλά υποσχόμενη θεραπεία που αρχικά αναπτύχθηκε εναντίον της οξείας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας των B λεμφοκυττάρων και ορισμένων λεμφωμάτων (διάχυτο από μεγάλα B κύτταρα λέμφωμα, οζώδες λέμφωμα, λέμφωμα μανδύα), όπου και έχει εμφανίσει υψηλά ποσοστά επιτυχίας. Για αυτό το λόγο, η έρευνα έχει επικεντρωθεί στη βελτιστοποίηση της απόδοσης και στην μετρίαση των παρενεργειών των ήδη υπάρχοντων CAR-T θεραπειών. Μία από τις σοβαρότερες παρενέργειες των CAR-T θεραπειών είναι το σύνδρομο απελευθέρωσης κυτταροκινών (CRS), το οποίο οδηγεί σε διάφορα συστημικά αρνητικά αποτελέσματα. Η πρόσφατη έρευνα έχει δείξει ότι, για τον καταρράκτη κυτταροκινών που προκαλεί το CRS, δεν ευθύνεται στο βαθμό που είχε προηγουμένως υποτεθεί η ίδια η δράση των CAR-T. Αντ' αυτού, κεντρικό ρόλο φαίνεται να έχουν οι αλληλεπιδράσεις των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος του ασθενούς με τα CAR-T κύτταρα. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές, μάλιστα, είναι ακόμα περισσότερες όταν τα T λεμφοκύτταρα που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία των CAR-T είναι αλλογενή. Στα πλαίσια αυτά, τα πειράματα της παρούσας εργασίας στόχευσαν στην απαλοιφή των αλλογενών μορίων MHC1 από την επιφάνεια των CAR-T κυττάρων, μέσω του συστήματος τροποποίησης του γονιδιώματος CRISPR/Cas9. Απώτερος σκοπός αυτής της απαλοιφής ήταν η αποτροπή της ενεργοποίησης της ανοσολογικής απόκρισης του ανοσοποιητικού συστήματος του ασθενούς εναντίων των CAR-T, διαδικασία που συνεισφέρει στην υπέρμετρη απελευθέρωση κυτταροκινών, που με τη σειρά της συνεισφέρει στη βαρύτητα του CRS και εμποδίζει την επιβίωση/παραμονή και εγκαθίδρυση των CAR-T κυττάρων στον οργανισμό. Για την απαλοιφή του MHC1 κατασκευάστηκαν δύο πλασμιδιακοί φορείς, με σκοπό την ανάπτυξη ενός παροδικού συστήματος για την αποσιώπηση του γονιδίου της β2-μικροσφαιρίνης, η πρωτεΐνη του οποίου είναι τμήμα του μορίου MHC1. Έγινε διαμόλυνση του συστήματος αυτού σε T λεμφοκύτταρα, όπου όμως δεν παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης MHC1. Αντ' αυτού, λοιπόν, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με το σύστημα τροποποίησης του γονιδιώματος CRISPR/Cas9 σε μορφή ριβονουκλεοπρωτεϊνικών (RNP) συμπλόκων, που έφερε ποσοστά απαλοιφής του μορίου-στόχου από 30% έως 90%.

Abstract

Finding cures for all the different types of neoplasms has been in the forefront of research in medicine for decades. Neoplasms remain the most unpredictable, and as a result the most difficult diseases to manage to date. Several therapies against several types of cancer have been developed during the years, each resulting in varying degrees of remission and cancer eradication. The principal types of therapy that are currently in use are chemotherapy, radiation, immunotherapy, laser therapy and surgery. In this thesis, a certain type of immunotherapy against hematological neoplasms was of interest: the use of allogenic chimeric antigen receptor T cells (CAR-Ts) against cancer cells. CAR-T cells are genetically engineered cells that have been altered to express a receptor that has both the characteristics of a T cell receptor and a B cell receptor. These receptors are able to target only neoplastic cells and do so with great specificity. This type of immunotherapy was initially developed to be used against B-cell precursor ALL and some lymphomas (diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma, mantle cell lymphoma) where it has been very successful. As a result, recent research has been focusing on the betterment of the existing CAR-T cell therapies, as well as the management of their side effects. One of the most serious side effects of CAR-Ts is the cytokine release syndrome (CRS), which can lead to various severe outcomes. Recent research has shown that the interactions between CAR-T cells and immune cells are responsible for the cytokine storm that causes CRS during CAR-T therapy, more so than the activity of CAR-Ts themselves, as was previously believed. These interactions happen in a greater scale when the T cells used for the making of CAR-T cells are allogenic. In this context, the experiments described in the present thesis aimed to erase the allogenic MHC I molecules from the CAR-T cell surface, using the CRISPR/Cas9 gene editing system. The aim of this erasure was to prevent the activation of the patient's immune response against CAR-T cells, a process that not only contributes to the excessive release of cytokines that in turn contributes to the gravity of CRS, but also impedes the survival and the establishment of CAR-T cells in the body. For the erasure of the MHC I molecule, two plasmid carriers were constructed in order to develop a transient system enabling the knockout of the β 2-microglobulin gene, which corresponds to a protein that is part of the MHC I molecule. This plasmid system was transfected to T cells but did not induce a reduction of the MHC I expression. The cells were transfected with the CRISPR/Cas9 gene editing system in the form of ribonucleoprotein (RNP) complexes instead, reducing the expression of the target molecule by up to 30%-90%.

1. Εισαγωγή

1.1 Το ανοσοποιητικό σύστημα

Ως ανοσοποιητικό σύστημα ορίζεται το σύνολο των κυττάρων, των μορίων και των οργάνων που επιστρατεύει ο οργανισμός ενάντια στις εξωτερικές απειλές που ανιχνεύει, είτε αυτές είναι πραγματικές (όπως είναι τα βακτήρια, οι ιοί, τα παράσιτα, τα καρκινικά κύτταρα), είτε δεν παρουσιάζουν, στην πραγματικότητα, κίνδυνο (για παράδειγμα διάφορα ξένα σώματα όπως η σκόνη, η γύρη, οι ουσίες ορισμένων τροφίμων, κάποια αντιβιοτικά κα) ^{1,2}. Για τη διευκόλυνση της μελέτης του, το ανοσοποιητικό σύστημα έχει διαχωριστεί νοητά από τους επιστήμονες σε δύο μέρη: στην έμφυτη και την επίκτητη ανοσία. Καθένα από τα δύο αυτά μέρη παρουσιάζει διαφορετικά χαρακτηριστικά και απαρτίζεται από διαφορετικές κυτταρικές ομάδες, παρόλα αυτά και τα δύο στην πραγματικότητα συνεργάζονται ώστε να προστατεύσουν επιτυχώς τον οργανισμό από τις διάφορες απειλές που αυτός συναντά, μέσω της ανοσολογικής απόκρισης ^{1,2,3}.

Η έμφυτη ανοσία συχνά καλείται ως η «πρώτη γραμμή άμυνας» του οργανισμού, διότι με την ανίχνευση κάποιου εισβολέα είναι το τμήμα του ανοσοποιητικού συστήματος που εξαπολύει πρώτο μια ταχεία ανοσολογική απόκριση. Η απόκριση αυτή πάντα θα είναι ίδιας έντασης και βεληνεκούς, ενώ κάθε φορά θα χρησιμοποιεί τους ίδιους μηχανισμούς άμυνας ^{1,2,3}. Συγκεκριμένα, οι μηχανισμοί της έμφυτης ανοσίας χωρίζονται στους ανατομικούς (όπως είναι το δέρμα και οι βλεννώδεις μεμβράνες), τους φυσιολογικούς (για παράδειγμα αυξομειώσεις της θερμοκρασίας και του pH), τους φαγοκυτταρικούς (δράσεις των μονοκυττάρων, των ουδετερόφιλων και των μακροφάγων) και τους φλεγμονώδεις (όπως είναι οι δράσεις των πρωτεϊνών του ορού και το συμπλήρωμα) ^{1,4}.

Σε αντίθεση, η απόκριση της επίκτητης ανοσίας καθυστερεί σημαντικά (περίπου μία εβδομάδα). Υποκινητές της απόκρισης αυτής είναι τα T και τα B λεμφοκύτταρα ^{1,2,3}. Το μέρος αυτό του ανοσοποιητικού αναλαμβάνει μόνο εφόσον η έμφυτη ανοσία δεν έχει καταφέρει να αντιμετωπίσει επιτυχώς το παθογόνο. Σε αυτή την περίπτωση η επίκτητη ανοσία επιστρατεύεται ώστε η απόκριση στη λοίμωξη να γίνει πιο συγκεκριμένη, σύμφωνα με τα ειδικά χαρακτηριστικά του εκάστοτε παθογόνου ³.

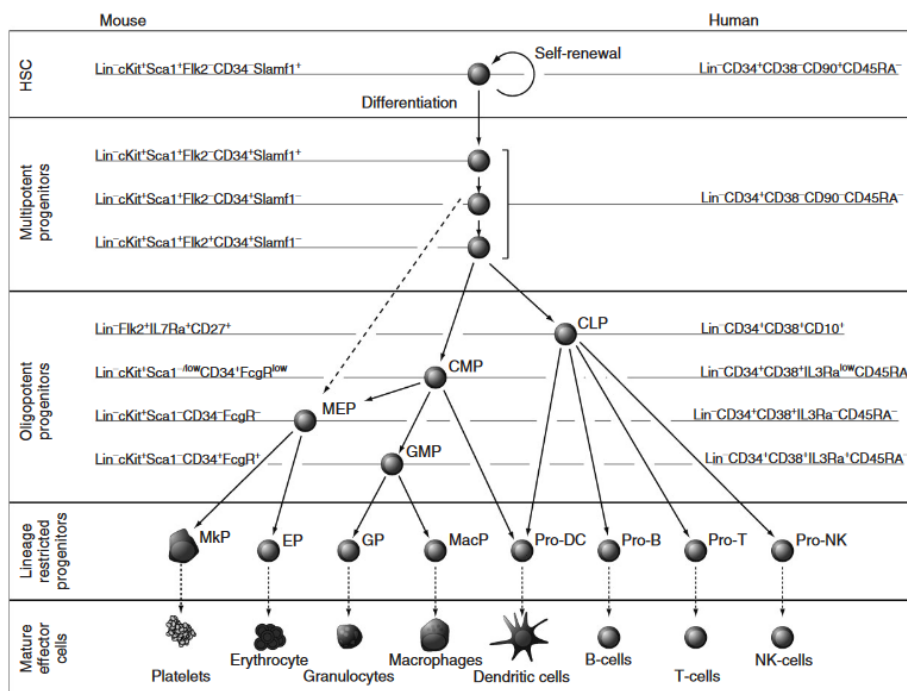
Ένα ακόμα χαρακτηριστικό της επίκτητης ανοσίας είναι ότι μετά το πέρας της έχουν δημιουργηθεί συγκεκριμένα κύτταρα μνήμης, τα οποία σε περίπτωση επαναμόλυνσης από το ίδιο παθογόνο ενεργοποιούνται και οδηγούν σε μία ταχεία και δυνατή απόκριση, η οποία προλαβαίνει να εξολοθρεύσει τον εισβολέα πριν ο οργανισμός εμφανίσει εκ νέου τα συμπτώματα της νόσου. Αντίθετα, η έμφυτη ανοσία δε διαθέτει διαδικασίες δημιουργίας μνήμης ^{3,4}.

1.2 Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος

Οι σημαντικότεροι διαμεσολαβητές της ανοσολογικής απόκρισης είναι τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Αυτά τα κύτταρα κατηγοριοποιούνται είτε στην έμφυτη είτε στην επίκτητη ανοσία και έχουν αρκετές διαφορές στη δομή αλλά και στον τρόπο δράσης τους. Στην έμφυτη ανοσία συγκαταλέγονται τα ουδετερόφιλα, τα

μακροφάγα, τα βασεόφιλα, τα ηωσινόφιλα, τα μαστικά κύτταρα και τα κύτταρα φυσικοί φονιάδες (Natural Killer cells – NK cells). Στην επίκτητη ανοσία συναντώνται τα T λεμφοκύτταρα και τα B λεμφοκύτταρα. Τα δενδριτικά/αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα «γεφυρώνουν» την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων της έμφυτης και των κυττάρων της επίκτητης ανοσίας ¹.

Όλα αυτά τα κύτταρα προκύπτουν από τη διαφοροποίηση ενός αρχικού βλαστοκυττάρου (και στη συνέχεια των απογόνων του) που ονομάζεται αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο (Hematopoietic Stem Cell – HSC), κατά τη διαδικασία της αιμοποίησης που λαμβάνει χώρα στο μυελό των οστών. Πρόκειται για ένα πολυδύναμο κύτταρο (multipotent), δηλαδή για ένα κύτταρο από το οποίο έχουν την ικανότητα να προέλθουν όλα τα κύτταρα του αίματος, ενώ διαθέτει και την ικανότητα της αυτοανανέωσης ^{5,8}. Το HSC λοιπόν, διαφοροποιείται αρχικά σε ένα κύτταρο που καλείται πολυδύναμο προγονικό κύτταρο (Multipotent Progenitor – MPP) το οποίο, αν και πολυδύναμο, έχει χάσει την ικανότητα της αυτοανανέωσης. Μετά από μερικές ακόμη διαδοχικές διαφοροποιήσεις που οδηγούν επίσης σε MPPs, κάνουν την εμφάνισή τους οι πρόγονοι των κυττάρων του ανοσοποιητικού. Πρόκειται για τα αρχέγονα λεμφικά κύτταρα (Common Lymphoid Progenitor – CLP) και για τα αρχέγονα μυελοειδή κύτταρα (Common Myeloid Progenitor – CMP). Τα κύτταρα αυτά είναι ολιγοδύναμα (oligopotent), δηλαδή μπορούν να διαφοροποιηθούν σε συγκεκριμένες, αλλά όχι σε όλες τις κυτταρικές σειρές του αίματος. Πράγματι, τα CMP διαφοροποιούνται σε κύτταρα από τα οποία, μετά από διαδοχικές διαφοροποιήσεις, θα προκύψουν τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας (καθώς και τα ερυθροκύτταρα και τα αιμοπετάλια): τα κοκκιοκύτταρα (ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα, μαστικά κύτταρα) και τα μακροφάγα. Από τα CLP τελικά θα προκύψουν τα B και τα T λεμφοκύτταρα, καθώς και τα NK κύτταρα. Ενδιαφέρον δε είναι ότι τα δενδριτικά κύτταρα μπορούν να προκύψουν κατόπιν διαφοροποιήσεων και της μυελοειδούς και της λεμφικής σειράς ^{5,6,7} (Εικόνα 1).

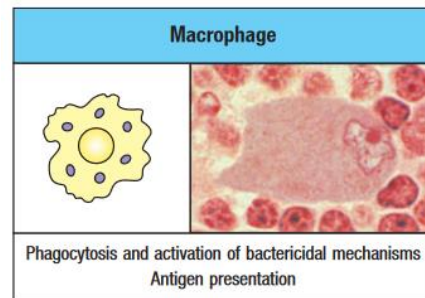


Εικόνα 1: Το μονοπάτι διαφοροποίησης του αρχέγονου πολυδύναμου αιμοποιητικού κυττάρου, από την αρχή έως ότου προκύψουν όλα τα κύτταρα του αίματος ⁵.

Στα πλαίσια αυτής της πτυχιακής εργασίας είναι απαραίτητο να παρουσιαστούν εν συντομία μερικά από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, ώστε να γίνει κατανοητός ο τρόπος δράσης τους στα πλαίσια της ανοσολογικής απόκρισης αργότερα. Παρακάτω, λοιπόν, συνοψίζονται οι λειτουργίες και τα κύρια χαρακτηριστικά των μακροφάγων, των ουδετερόφιλων, των δενδριτικών κυττάρων, των Τ και των Β λεμφοκυττάρων.

Τα μακροφάγα

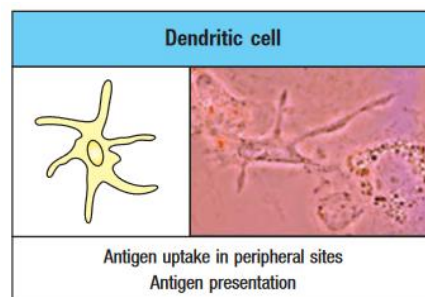
Τα μακροφάγα (Εικόνα 2) είναι κύτταρα που «εντοπίζονται» στους περισσότερους ιστούς του οργανισμού. Αρχικά κυκλοφορούν στο αίμα ως μονοκύτταρα έως ότου βρεθούν στους ιστούς, όπου και διαφοροποιούνται στα μακροφάγα. Τα μακροφάγα περατώνουν διάφορες εργασίες. Διαθέτουν, αρχικά, την ικανότητα να εγκολπώνουν και να φαγοκυτταρώνουν παθογόνους μικροοργανισμούς μέσω διαφόρων υποδοχέων ειδικών στην αναγνώριση ορισμένων δομικών χαρακτηριστικών των εισβολέων (λόγου χάρη, μέσω των μεμβρανικών υποδοχέων τύπου Toll και λεκτίνης), όπως είναι ορισμένες πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες και νουκλεϊκά οξέα που φέρουν πολλά βακτήρια. Με αυτό τον τρόπο όχι μόνο εξοντώνουν τον εισβολέα, αλλά διαμέσου των πρωτεϊνών του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II (Major Histocompatibility Complex – MHC) «παρουσιάζουν» στην επιφάνειά τους θραύσματα αυτού, ώστε να μπορέσουν να αναγνωριστούν από τα Τ και τα Β λεμφοκύτταρα και να ενεργοποιηθεί έτσι η απόκριση της επίκτητης ανοσίας. Από την άλλη, τα μακροφάγα είναι από τα πρώτα κύτταρα που θα συναντήσουν τη μόλυνση στους ιστούς και ως αποτέλεσμα θα αρχίσουν να παράγουν τις απαραίτητες κυτταροκίνες, ώστε να προσελκύσουν άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού στο σημείο (όπως τα ουδετερόφιλα και τα NK κύτταρα) και να επαχθεί η φλεγμονή. Τέλος, είναι οι «ρακοσυλλέκτες» του οργανισμού, υπεύθυνοι για τη φαγοκυττάρωση των νεκρών κυττάρων και των κυτταρικών υπολειμμάτων ^{2,3,9}.



Εικόνα 2: Το μακροφάγο ⁵².

Τα δενδριτικά κύτταρα

Τα δενδριτικά κύτταρα (Εικόνα 3) εδράζονται κυρίως στους ιστούς που βρίσκονται σε επικοινωνία με το εξωτερικό περιβάλλον (όπως είναι το δέρμα, η αναπνευστική οδός και η γαστρεντερική οδός), διότι αυτές είναι οι οδοί μέσω των οποίων τα παθογόνα εισέρχονται στον οργανισμό. Τα κύτταρα αυτά αναγνωρίζουν τους εισβολείς μέσω ειδικών μεμβρανικών υποδοχέων, που είναι όμοιοι με αυτούς που φέρουν τα μακροφάγα. Αυτή η αναγνώριση έχει ως επακόλουθο την ενδοκυττάρωση των παθογόνων και την παραγωγή κυτταροκινών, γεγονός που οδηγούν τελικά στην

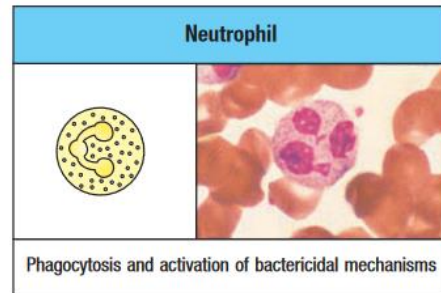


Εικόνα 3: Το δενδριτικό κύτταρο ⁵².

ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων. Κατά την ενεργοποίηση, τα κύτταρα αυτά αλλάζουν μορφολογία και αποκολλώνται από το επιθήλιο στο οποίο εδράζονται, για να οδηγηθούν στους λεμφαδένες. Εκεί συναντούν τα λεμφοκύτταρα, στα οποία «παρουσιάζουν» τμήματα των παθογόνων που έχουν ενδοκυτταρώσει μέσω των MHC τάξης II, ώστε να ενεργοποιηθεί η επίκτητη ανοσία ^{2,9}.

Τα ουδετερόφιλα

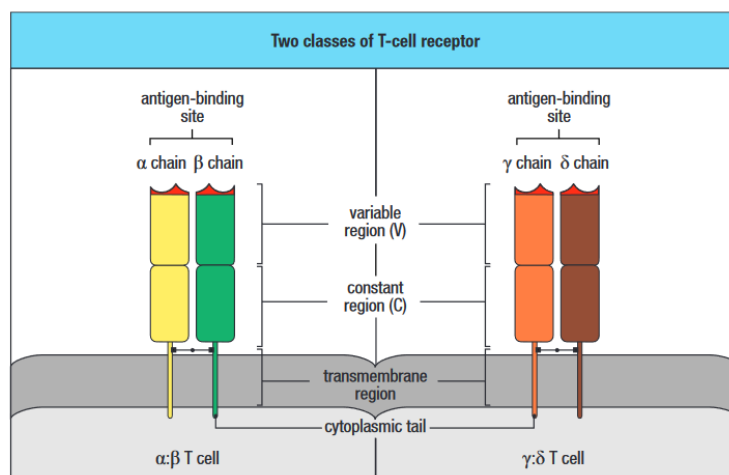
Τα ουδετερόφιλα (Εικόνα 4) είναι ο πολυπληθέστερος κυτταρικός πληθυσμός των λευκοκυττάρων. Συναντώνται στο μυελό των οστών, όπου βρίσκονται αποθηκευμένα σε μεγάλους αριθμούς ³, ενώ ανιχνεύονται και στην κυκλοφορία, στους πνεύμονες, στον σπλήνα και στο ήπαρ ^{11,12}. Όταν ανιχνευθεί κάποια μόλυνση, τα ουδετερόφιλα στρατολογούνται μέσω των κυτταροκινών και σε μεγάλους αριθμούς στους ιστούς που υφίστανται τη φλεγμονή ^{3,10}. Εκεί δρουν έναντι των παθογόνων φαγοκυτταρώνοντάς τα, παράγοντας δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species) εναντίον τους, απελευθερώνοντας μικροβιοκτόνες πρωτεΐνες και πεπτίδια από τα κοκκία τους και ελευθερώνοντας την χαλαρή χρωματίνη του πυρήνα τους, η οποία φέρει τα κοκκία του κυττάρου και λειτουργεί σαν μια «παγίδα», σχεδιασμένη ώστε να εξοντώσει μεγαλύτερου μεγέθους παθογόνα (Neutrophil Extracellular Traps) ^{10,11}.



Εικόνα 4: Το ουδετερόφιλο ³².

Τα T λεμφοκύτταρα

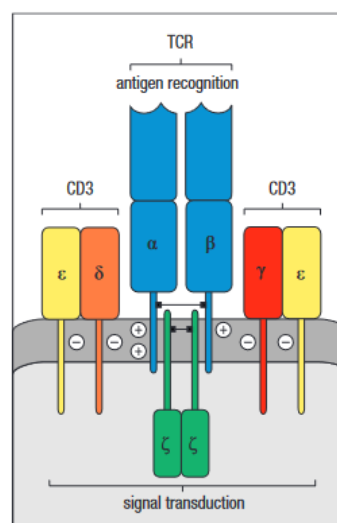
Τα T λεμφοκύτταρα (Εικόνα 5) περιορίζουν τις κινήσεις τους, αρχικά, στο λεμφικό σύστημα. Συγκεκριμένα, κινούνται στα λεμφαγγεία σε ανενεργή μορφή, ώσπου να τους «παρουσιάσουν» από τα μακροφάγα, τα δενδρικά ή τα B λεμφοκύτταρα (αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα – Antigen-presenting Cells – APCs), τα αντιγόνα ενός παθογόνου που η έμφυτη ανοσία δεν έχει καταφέρει να αντιμετωπίσει ³.



Εικόνα 5: Η δομή ενός αβ υποδοχέα T λεμφοκυττάρου (αριστερά) και ενός γδ υποδοχέα T λεμφοκυττάρου (δεξιά) ³.

Όπως και όλα τα λευκοκύτταρα, τα T λεμφοκύτταρα παράγονται στο μυελό των οστών, όμως μεταναστεύουν στο θύμο αδένα για την ωρίμανσή τους. Εκεί ξεκινούν να εκφράζουν ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς αναγνώρισης αντιγόνων, τους υποδοχείς T λεμφοκυττάρων (**T Cell Receptors – TCR**). Οι υποδοχείς αυτοί δομούνται από δύο ανόμοιες αλυσίδες οι οποίες δημιουργούν ένα ετεροδιμερές. Ανάλογα τον τύπο των αλυσίδων από τις οποίες αποτελούνται, ονομάζονται αβ ή γδ TCRs ^{2,13}. Κάθε αλυσίδα διαθέτει μια καρβοξυτελική σταθερή (constant) και μια αμινοτελική μεταβλητή (variable) περιοχή. Η μεταβλητή περιοχή είναι εκείνη που φέρει την ειδικότητα για το εκάστοτε αντιγόνο και ως αποτέλεσμα, η δομή της μεταβάλλεται κατά τη διαδικασία έκφρασης των TCR σε κάθε T λεμφοκύτταρο, ώστε αυτά να είναι ικανά να αναγνωρίσουν μια πληθώρα αντιγόνων (τουλάχιστον 10^{15} αντιγόνα) ^{3,14}.

Κάθε TCR (**Εικόνα 6**) αναγνωρίζει τα αντιγόνα που του «παρουσιάζονται» με τη μορφή του συμπλόκου αντιγόνο-MHC (1^ο σήμα). Άπαξ και γίνει η πρόσδεση TCR με το σύμπλοκο αντιγόνο-MHC, το T λεμφοκύτταρο ενεργοποιείται και ξεκινά ο πολλαπλασιασμός του. Στην ενεργοποίηση του κυττάρου συμμετέχουν και άλλες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη μεταβίβαση του σήματος στον πυρήνα του κυττάρου ώστε να ξεκινήσει η μεταγραφή και η μετάφραση των απαραίτητων για την ενεργοποίηση πρωτεϊνών. Πρόκειται για το σύμπλοκο CD3, το οποίο αποτελούν δύο CD3ε πρωτεΐνες, μία CD3γ και μια CD3δ, καθώς και για το ομοδιμερές των πρωτεϊνών ζ. Το σήμα της ενεργοποίησης μεταβιβάζεται όταν τα ενδοκυτταρικά τμήματα αυτών των περιοχών φωσφορυλιωθούν. Για την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων είναι απαραίτητη επίσης η πρόσδεση του υποδοχέα τους CD28 με τον προσδέτη των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, B7-1 ή B7-2 (2^ο σήμα), αλλά και σήματα κυτταροκινών (3^ο σήμα) ^{3,14}.



Εικόνα 6: Ο υποδοχέας ενός T λεμφοκυττάρου, μαζί με το σύμπλοκο ενεργοποίησής του, CD3, και το ομοδιμερές των πρωτεϊνών ζ ³.

Τέλος, τα T λεμφοκύτταρα χωρίζονται στα $CD4^+$ και τα $CD8^+$, ανάλογα με το αν εκφράζουν την CD4 ή τη CD8 πρωτεΐνη επιφανείας. Τα $CD4^+$ T λεμφοκύτταρα έχουν κυρίως βοηθητικό ρόλο (helper cells) στην ανοσία, ρυθμίζοντας την ανοσολογική απόκριση κυρίως μέσω των κυτταροκινών που εκκρίνουν. Συγκεκριμένα, είναι υπεύθυνα για την ενεργοποίηση των B λεμφοκυττάρων, κυττάρων της έμφυτης ανοσίας (μακροφάγα, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα, μαστικά) αλλά και κυττάρων που δεν ανήκουν στο ανοσοποιητικό σύστημα (επιθηλιακά και μεσεγχυματικά) ^{3,14,15}. Τα $CD8^+$ T λεμφοκύτταρα έχουν κυρίως κυτταροτοξικό ρόλο: αναγνωρίζουν κύτταρα που έχουν προσβληθεί από κάποιο παθογόνο (όπως βακτήρια και ιούς), καρκινικά κύτταρα και κύτταρα που παρουσιάζουν βλάβες, ώστε να τα οδηγήσουν στην απόπτωση και τον κυτταρικό θάνατο. Αυτό το επιτυγχάνουν είτε μέσω έκκρισης των κυτταροκινών INF- γ (οδηγεί σε παραγωγή MHC I και αύξηση της απόπτωσης μέσω του συστήματος Fas/FasL) και TNF- α (οδηγεί σε ενεργοποίηση του μονοπατιού κασπασών), είτε μέσω απευθείας επαφής με το κύτταρο. Στη δεύτερη περίπτωση, η απόπτωση και ο κυτταρικός θάνατος επέρχονται είτε μέσω πρόσδεσης του προσδέτη Fas του λεμφοκυττάρου στον υποδοχέα Fas του άλλου κυττάρου, ενεργοποιώντας έτσι το αποπτωτικό μονοπάτι κασπασών, είτε μέσω των γρανενζύμων

(granzymes), δηλαδή πρωτεασών που τα λεμφοκύτταρα ελευθερώνουν στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων-στόχων μέσω των περφορινών¹⁶.

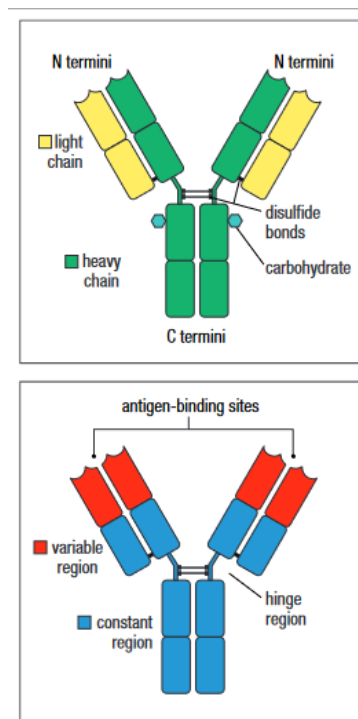
Τα Β λεμφοκύτταρα

Τα Β λεμφοκύτταρα, όπως και τα Τ λεμφοκύτταρα, εντοπίζονται στους λεμφαδένες του λεμφικού συστήματος αναμένοντας την ενεργοποίηση από κάποιο APC, ώστε να εκκινήσουν στη συνέχεια μέρος της επίκτητης ανοσολογικής απόκρισης (σε συνεργασία με τα Τ λεμφοκύτταρα)³.

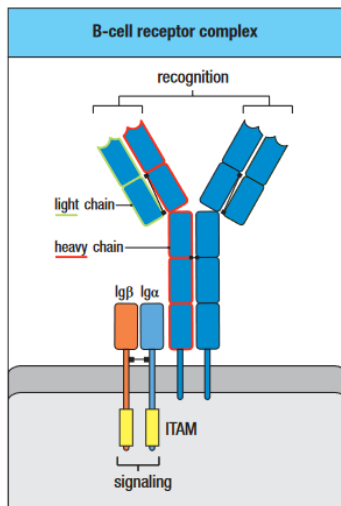
Τα κύτταρα αυτά παράγονται και ωριμάζουν στο μυελό των οστών. Μετά το πέρας της ωρίμανσής τους εκφράζουν στην επιφάνειά τους ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς, τους BCR (**B Cell Receptors**)³ (**Εικόνα 7**). Τους υποδοχείς αυτούς δομούν τέσσερις αλυσίδες, όμοιες ανά ζεύγη: δύο βαριές (heavy) και δύο ελαφρές (light) αλυσίδες. Στο αμινοτελικό άκρο κάθε αλυσίδας βρίσκεται η μεταβλητή (variable) περιοχή του υποδοχέα, όπου φιλοξενούνται τρεις υπερμεταβλητές περιοχές (**Complementary Determining Regions – CDRs**) οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ειδική πρόσδεση του εκάστοτε αντιγονικού επιτόπου. Κάθε Β λεμφοκύτταρο εκφράζει μοναδικούς BCR μετά την ωρίμανση του, ώστε τα Β λεμφοκύτταρα στο σύνολό τους να είναι ικανά να αναγνωρίσουν ένα εξαιρετικά μεγάλο ρεπερτόριο αντιγόνων (τουλάχιστον 10^{10})^{2,9}.

Στο καρβοξυτελικό άκρο κάθε αλυσίδας του BCR βρίσκεται η σταθερή (constant) περιοχή του υποδοχέα. Ο τύπος της σταθερής περιοχής των βαριών αλυσίδων καθορίζει την τάξη του υποδοχέα και κατ' επέκταση του αντισώματος που θα προκύψει κατά την ενεργοποίηση του Β λεμφοκυττάρου. Οι τάξεις είναι οι εξής πέντε: α, γ, δ, ε, μ. Κάθε μία αντιστοιχεί σε έναν τύπο αντισώματος, που μπορεί να είναι IgA, IgG, IgD, IgE ή IgM. Κάθε τύπος αντισώματος δρα με διαφορετικό τρόπο κατά την ανοσολογική απόκριση^{2,9}.

Εκτός του κύριου υποδοχέα, στην επιφάνεια των Β λεμφοκυττάρων και δίπλα στον BCR βρίσκεται ένα ετεροδιμερές το οποίο είναι υπεύθυνο για τη μεταγωγή σήματος στον πυρήνα του κυττάρου κατά την ενεργοποίησή του (**Εικόνα 8**). Η ενεργοποίηση του Β λεμφοκυττάρου γίνεται με τρόπο παρόμοιο με αυτή του Τ λεμφοκυττάρου, μέσω φωσφορυλιώσεων της ενδοκυτταρικής περιοχής του ετεροδιμερούς^{9,55}. Σε αντίθεση με τα Τ λεμφοκύτταρα, η ενεργοποίηση των Β λεμφοκυττάρων δεν απαιτεί την αντιγονοπαρουσίαση μέσω μορίων MHC. Οι CDRs περιοχές του BCR αναγνωρίζουν το αντιγόνο, πράγμα που ενεργοποιεί τις σηματοδοτικές πρωτεΐνες Igα και Igβ, οι ενδοκυτταρικές ουρές των οποίων φωσφορυλιώνονται, εκκινώντας έτσι τη σηματοδότηση που οδηγεί στην ενεργοποίηση του Β λεμφοκυττάρου (1^ο σήμα). Το 2^ο σήμα ενεργοποίησης παρέχουν τα CD4⁺ Τ λεμφοκύτταρα που έχουν ενεργοποιηθεί από το ίδιο αντιγόνο όταν συνδέονται με τα Β λεμφοκύτταρα μέσω MHCII/TCR και CD40/CD40L. Ένα 3^ο σήμα ενεργοποίησης είναι, για ακόμα μια φορά, οι κυτταροκίνες⁹. Έτσι το Β λεμφοκύτταρο ενεργοποιείται πλήρως, αρχίζει να πολλαπλασιάζεται και να διαφοροποιείται σε πλασματοκύτταρο. Τα



Εικόνα 7: Η δομή ενός αντισώματος. Οι βαριές και οι ελαφριές αλυσίδες (πάνω), και οι μεταβλητές και οι σταθερές περιοχές (κάτω)³.



Εικόνα 8: Ο υποδοχέας ενός Β λεμφοκυττάρου, μαζί με τα σηματοδοτικά μόρια Igα και Igβ ⁵⁷.

πλασματοκύτταρα παράγουν διαλυτά αντισώματα, ενώ μετά την ενεργοποίηση των Β λεμφοκυττάρων προκύπτουν και κύτταρα μνήμης, τα οποία διατηρούνται στον οργανισμό ώστε να ενεργοποιηθούν σε περίπτωση επαναμόλυνσης από τον ίδιο μικροοργανισμό. Σε κάποιες περιπτώσεις το 2^ο σήμα έρχεται χωρίς τη συμμετοχή Τ λεμφοκυττάρων, αλλά η ενεργοποίηση τότε δεν είναι το ίδιο ισχυρή. Τα αντισώματα στη συνέχεια λαμβάνουν μέρος στην αντιμετώπιση του παθογόνου με διάφορους τρόπους ^{56,57}.

Η Ανοσολογική Απόκριση

Εφόσον μερικά από τα σημαντικότερα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος έχουν πλέον παρουσιαστεί, είναι επόμενο οι δράσεις τους να συνδεθούν, στη συνέχεια, με τη διαδικασία της ανοσολογικής απόκρισης.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, λοιπόν, κατά την εισβολή ενός παθογόνου στον οργανισμό ενεργοποιούνται πρώτα οι διάφοροι μηχανισμοί της έμφυτης ανοσίας. Αρχικά, τα μακροφάγα που βρίσκονται ήδη κοντά στο σημείο της μόλυνσης, αναγνωρίζουν κάποια μόρια που βρίσκονται στην επιφάνεια των παθογόνων (pathogen-associated molecular patterns) ή άλλα που έχουν εκκρίνει κάποια κύτταρα που έχουν μολυνθεί από το παθογόνο (damage-associated molecular patterns), μέσω ειδικών ενδοκυτταρικών ή εξωκυτταρικών υποδοχέων (TLRs, πρωτεΐνες NOD, δεκτίνες). Αυτή η αναγνώριση έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή κυτταροκινών (IL-1β, IL-2, IL-6, TNF, μεταξύ άλλων) που προάγουν την τοπική και συστηματική φλεγμονή, την αγγειοδιαστολή, ενώ επιπλέον ενεργοποιούν το συμπλήρωμα ^{3,58}. Εκκρίνονται επίσης χημειοκίνες, που στρατολογούν στο σημείο άλλα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας, όπως τα ουδετερόφιλα. Στη διαδικασία έκκρισης κυτταροκινών, αγγειοδιαστολής, κ.α., συμμετέχουν επίσης τα μαστικά κύτταρα, εκκρίνοντας κυτταροκίνες και μόρια όπως οι ιντερφερόνες ⁵⁸. Έτσι, τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα και τα NK κύτταρα αρχίζουν την προσπάθεια καταπολέμησης του παθογόνου μικροοργανισμού μέσω των διαφορετικών μηχανισμών δράσης που μπορεί να εφαρμόσει το καθένα ⁹.

Αν μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα (περίπου μία εβδομάδα) η μόλυνση δεν έχει εξαλειφθεί, έρχεται η ώρα να δράσει η επίκτητη ανοσία. Σε αυτή την περίπτωση, τα δενδριτικά κύτταρα τα οποία έχουν εγκολπώσει και φαγοκυτταρώσει το παθογόνο, μεταναστεύουν μέσω των λεμφαγγείων στους λεμφαδένες. Εκεί συναντούν τα Τ λεμφοκύτταρα στα οποία παρουσιάζουν το αντιγόνο μέσω MHCII. Αυτό οδηγεί στη διαφοροποίησή τους σε CD4⁺ και CD8⁺ δραστικά Τ λεμφοκύτταρα και στον πολλαπλασιασμό τους. Τα Β λεμφοκύτταρα, αντιθέτως, συναντούν στους λεμφαδένες διάφορα ελεύθερα κινούμενα αντιγόνα, τα οποία τα ενεργοποιούν. Έτσι, τα Β λεμφοκύτταρα αρχίζουν να διαφοροποιούνται και να πολλαπλασιάζονται. Στη συνέχεια, αυτές οι ομάδες κυττάρων μεταναστεύουν στο σημείο της φλεγμονής καθοδηγούμενες από κυτταροκίνες και χημειοκίνες, και αρχίζουν να δρουν με πλήρη ισχύ κατά του παθογόνου μικροοργανισμού ^{3,9,59}.

1.3 Ο καρκίνος

Ο «καρκίνος» είναι ένας όρος που δίνεται σε ένα εύρος διαφορετικών ασθενειών οι οποίες χαρακτηρίζονται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό κυττάρων του οργανισμού. Τα κύτταρα αυτά έχουν παρεκκλίνει από τη φυσιολογική για τον οργανισμό μορφή και λειτουργία και ονομάζονται, πλέον, καρκινικά κύτταρα ¹⁷. Η παρέκκλιση αυτή οφείλεται στη σταδιακή συσσώρευση επιβλαβών γενετικών αλλαγών στα κύτταρα ενός ιστού. Τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα στους περισσότερους τύπους καρκίνου συσσωματώνονται και δημιουργούν όγκους (tumors), εκτός από τις περιπτώσεις των λευχαιμιών, των λεμφωμάτων και του μυελώματος, όπου συνήθως δε συναντώνται όγκοι ¹⁹. Τα καρκινικά κύτταρα οδηγούν σε παθολογική κατάσταση διότι μέσω του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού τους διαταράσσουν τη φυσιολογική λειτουργία των ιστών στους οποίους εδράζονται, καθώς και άλλων οργάνων, γειτονικών και μη, σε περίπτωση μετάστασης ¹⁸.

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τη λευχαιμία και το λέμφωμα (τα οποία ενδιαφέρει η παρούσα πτυχιακή εργασία), η κακοήθεια ονομάζεται αιματολογική νεοπλασία και ξεκινά όταν ένα αρχικό κύτταρο, το λεγόμενο cell-of-origin, αρχίζει να συσσωρεύει μεταλλάξεις στο γονιδίωμά του που το καθιστούν νεοπλασματικό. Σε αυτούς τους τύπους κακοήθειας, το cell-of-origin μπορεί να είναι οποιοδήποτε κύτταρο της λεμφικής σειράς. Έτσι, το εκάστοτε κύτταρο ουσιαστικά «ξεφεύγει» από την αυστηρά καθορισμένη διαδικασία της διαφοροποίησής του κατά την αιμοποίηση, αποκτά νέες ιδιότητες και πολλαπλασιάζεται ταχύτατα εις βάρος του υπόλοιπου φυσιολογικού ιστού, και κατ' επέκταση του οργανισμού ^{20,21}.

Η λευχαιμία

Η λευχαιμία είναι ένας τύπος νεοπλασίας που επηρεάζει κυρίως τον μυελό των οστών, αλλά και άλλα όργανα του λεμφικού συστήματος. Οι διάφορες μορφές αυτής της ασθένειας ταξινομούνται σε: **1.** μυελογενή ή λεμφοκυτταρική λευχαιμία, ανάλογα τον κυτταρικό τύπο που επηρεάζεται και **2.** οξεία ή χρόνια λευχαιμία, ανάλογα την ταχύτητα με την οποία εξελίσσεται η ασθένεια ²². Στη συνέχεια θα αναφερθούν οι μορφές της λευχαιμίας που συναντώνται με μεγαλύτερη συχνότητα.

Η **οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία (Acute Lymphocytic Leukemia – ALL)** είναι η μορφή της νόσου που συναντάται συχνότερα στα παιδιά (80%). Πρόκειται για ασθένεια που προκύπτει λόγω πολλαπλασιασμού αρχέγονων λεμφικών κυττάρων (CLP) που έχουν υποστεί μεταλλάξεις και ως αποτέλεσμα δεν έχουν διαφοροποιηθεί ορθά. Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται λεμφοβλάστες. Στο 75% των ενηλίκων οι μεταλλάξεις συναντώνται σε προγονικά κύτταρα των Β λεμφοκυττάρων (το 25% αφορά τα Τ λεμφοκύτταρα). Τα νεοπλασματικά αυτά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και συσσωρεύονται στο μυελό των οστών, στο αίμα και σε άλλα σημεία αιμοποίησης, όπως είναι το ήπαρ και ο σπλήνας ^{23,24}, εκτοπίζοντας έτσι τα φυσιολογικώς διαφοροποιημένα κύτταρα ²⁵.

Η **οξεία μυελογενής λευχαιμία (Acute Myelogenous Leukemia – AML)** χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση μεταλλάξεων στο γεννητικό υλικό των αρχέγονων

μυελοειδών κυττάρων (CMP). Αυτά τα κύτταρα «ξεφεύγουν» από τις συνήθεις διαδικασίες διαφοροποίησης κατά την αιμοποίηση. Ως αποτέλεσμα προκύπτουν οι μυελοβλάστες, νεοπλασματικά κύτταρα τα οποία πολλαπλασιάζονται ταχύτατα και συγκεντρώνονται κυρίως στο μυελό των οστών και το αίμα, όπου εκτοπίζουν έτσι τα φυσιολογικά διαφοροποιημένα κύτταρα. Η ασθένεια αυτή οδηγεί σε ανεπάρκεια του μυελού των οστών, φλεγμονές και σε ανεπάρκειες του ανοσοποιητικού συστήματος [26,27,28](#).

Η **χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (Chronic Lymphocytic Leukemia – CLL)** είναι ο τύπος λευχαιμίας που συναντάται συχνότερα στους ενήλικες του δυτικού κόσμου. Όπως και στην ALL, τα κύτταρα που επηρεάζονται είναι τα CLP. Συγκεκριμένα, στη CLL συναντώνται μη φυσιολογικές μορφές των Β λεμφοκυττάρων (σπανιότερα των Τ), οι οποίες συσσωρεύονται στα αιμοποιητικά όργανα, σε όργανα του λεμφικού συστήματος και στο αίμα. Σε αντίθεση με την ALL, η CLL συνήθως έχει αργή εξέλιξη και οι ασθενείς μπορεί να μη χρειαστούν θεραπεία για χρόνια. Σε ένα ποσοστό των ασθενών όμως, εξελίσσεται εξαιρετικά γρήγορα [29,30](#).

Η **χρόνια μυελογενής λευχαιμία (Chronic Myelogenous Leukemia – CML)** αφορά το 15% των διαγνώσεων λευχαιμίας σε ενήλικες. Προκύπτει από γενετικές αλλαγές στα κύτταρα MLP. «Πρωταγωνιστής» της CML είναι το χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια, η δημιουργία του οποίου οφείλεται σε αμοιβαία μετάθεση τμημάτων των χρωμοσωμάτων 9 και 22. Η μετατόπιση αυτή οδηγεί στη δημιουργία του γονιδίου BCR-ABL1, που παράγει συνεχώς μια κινάση τυροσίνης, η οποία προάγει τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Έτσι, τα νεοπλασματικά κύτταρα συσσωρεύονται στο αίμα αλλά και στο μυελό των οστών, όπου παρεμποδίζουν την διαδικασία της αιμοποίησης. Όπως η CLL, έτσι και η CML είναι χρόνια ασθένεια η οποία πολλές φορές γίνεται αντιληπτή τυχαία, αφού το 50% των ασθενών είναι ασυμπτωματικοί [31,32](#).

Το λέμφωμα

Το λέμφωμα είναι ένας τύπος νεοπλασίας που πλήττει τα όργανα του λεμφικού συστήματος: κυρίως τους λεμφαδένες, αλλά και τον σπλήνα, τον θύμο αδένα και τον μυελό των οστών, όπου είναι δυνατόν να δημιουργηθούν όγκοι. Υπάρχουν διάφορες μορφές λεμφώματος, οι οποίες διαχωρίζονται κυρίως σε δύο κατηγορίες: τα λεμφώματα Hodgkin και τα μη-Hodgkin λεμφώματα [35](#).

«Πρωταγωνιστές» στα **λεμφώματα Hodgkin** είναι ένας τύπος νεοπλασματικών κυττάρων που προέρχονται από τα Β λεμφοκύτταρα και ονομάζονται κύτταρα Reed-Sternberg (RS), τα οποία έχουν την ιδιαιτερότητα ότι είναι μεγάλα δι- ή πολυπύρηννα κύτταρα. Στα λεμφώματα Hodgkin συναντώνται επίσης νεοπλασματικά μονοπύρηννα Β λεμφοκύτταρα που ονομάζονται κύτταρα Hodgkin (H). Οι παραπάνω κυτταρικές ομάδες είναι χαρακτηριστικές στις παρακάτω μορφές της ασθένειας: στην οξώδη σκλήρυνση, τη μικτή κυτταροβρίθεια, στην καθ' υπεροχή λεμφοκυτταρική μορφή και στην ενδεή λεμφοκυτταρική μορφή. Σε μια μορφή της ασθένειας η οποία ονομάζεται οξώδης λεμφοκυτταρική μορφή, χαρακτηριστική είναι η ύπαρξη των lymphocyte-predominant (LP) κυττάρων αντί των H και RS, τα οποία έχουν διαφορετική μορφή και εκφράζουν διαφορετικές μεμβρανικές πρωτεΐνες σε σύγκριση με τα H και RS. Τέλος, σε

σπάνιες μορφές του λεμφώματος Hodgkin εμπλέκονται νεοπλασματικά κύτταρα που προέρχονται από τα T λεμφοκύτταρα [33,34](#).

Τα **μη-Hodgkin λεμφώματα**, από την άλλη, είναι μια εξαιρετικά ετερογενής κατηγορία. Σε αυτή την κατηγορία, τα κύτταρα που μεταλλάσσονται σε νεοπλασματικά συχνότερα είναι τα B λεμφοκύτταρα, αν και υπάρχουν περιπτώσεις που η ασθένεια ξεκινά από τα T λεμφοκύτταρα και τα NK κύτταρα [36,38](#). Οι μεταλλάξεις που είναι υπεύθυνες για τη μετατροπή των κυττάρων σε νεοπλασματικά είναι πιθανόν να προκύψουν κατά τις διάφορες διαδικασίες ωρίμανσης και διαφοροποίησης των B λεμφοκυττάρων, όπως είναι η αλλαγή τάξης, ο VDJ ανασυνδυασμός και οι σωματικές υπερμεταλλάξεις. Τα μη-Hodgkin λεμφώματα είναι δυνατόν να προκύψουν τόσο πριν την ενεργοποίηση των B λεμφοκυττάρων από κάποιο αντιγόνο, όσο και μετά [37](#). Το διάχυτο από μεγάλα B-κύτταρα λέμφωμα είναι η πιο συχνή μορφή λεμφώματος της κατηγορίας, το οποίο συναντάται στους ενήλικες (30%-40%). Άλλες συχνές μορφές της ασθένειας είναι το οζώδες λέμφωμα και το λέμφωμα οριακής ζώνης [38](#).

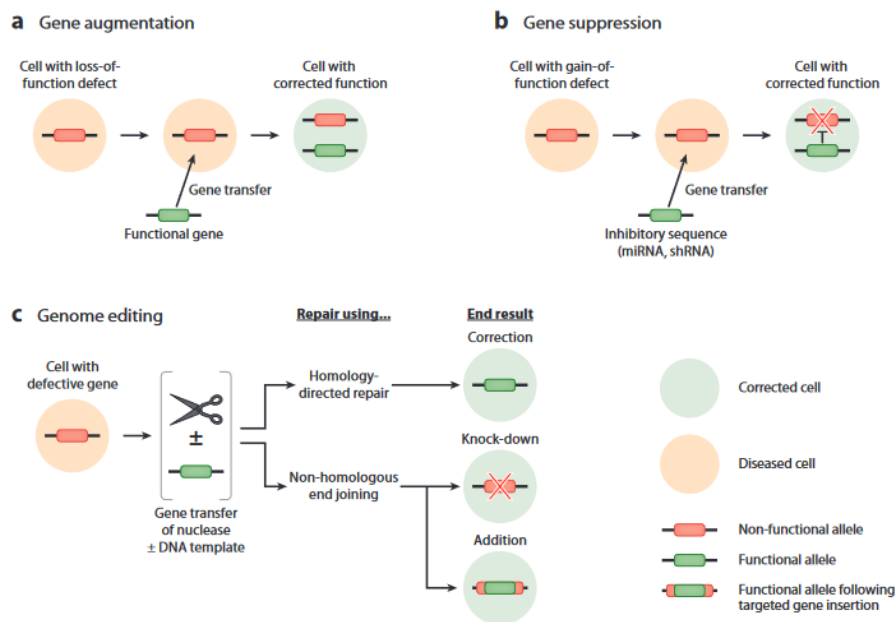
1.4 Η γονιδιακή θεραπεία

Ως «γονιδιακή» θεραπεία θεωρείται οποιαδήποτε διαδικασία στοχεύει στην γενετική τροποποίηση ενός κυττάρου, με σκοπό την θεραπεία μιας ασθένειας ή τη μετρίαση των συμπτωμάτων αυτής [39,42](#). Στόχος της γονιδιακής θεραπείας, ανάλογα την εφαρμογή, μπορεί να είναι η τροποποίηση, η αποσιώπηση ή η αντικατάσταση ενός μεταλλαγμένου γονιδίου στόχου με το φυσιολογικό ομόλογό του. Για να διεκπεραιωθούν τα παραπάνω είναι απαραίτητη η τροποποίηση του κυττάρου σε επίπεδο γονιδιώματος [40,42](#).

Η γονιδιακή θεραπεία αρχικά αφορούσε αποκλειστικά την εισαγωγή ενός γονιδίου σε ένα κύτταρο, παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια αναπτύσσονται τεχνικές αποσιώπησης και «διόρθωσης» ήδη υπάρχοντων γονιδίων (**Εικόνα 9**). Η γενετική αυτή τροποποίηση απαιτεί την εισαγωγή μιας «μηχανής» τροποποίησης του γονιδιώματος (όπως είναι το σύστημα CRISPR/Cas9) στο κύτταρο, όταν στόχος είναι η απαλοιφή ή η «διόρθωση» ενός ελλαττωματικού γονιδίου. Από την άλλη, η εισαγωγή ενός συστήματος σίγησης (όπως είναι το σύστημα RNAi) συνίσταται όταν στόχος είναι η αποσιώπηση του γονιδίου αυτού. Τέλος, σε περίπτωση που ένα γονίδιο δεν είναι λειτουργικό, γίνεται εισαγωγή της φυσιολογικής/λειτουργικής μορφής του στο κύτταρο [40,42](#).

Η μεταφορά ενός γονιδίου ή ενός μηχανισμού τροποποίησης στον πυρήνα του κυττάρου στόχου μπορεί να γίνει είτε με τη χρήση **υκών** (viral), είτε με τη χρήση **μη υκών** (non-viral) φορέων. Στην πρώτη περίπτωση χρησιμοποιούνται ιοί οι οποίοι έχουν τροποποιηθεί γενετικά ώστε να μεταφέρουν στο γονιδίωμά τους το επιθυμητό γονίδιο. Οι ιοί αυτοί μεταφέρουν το γονίδιο στα κύτταρα στόχους μολύνοντας τα. Στη δεύτερη κατηγορία συγκαταλέγονται μόρια DNA και RNA, που εισάγονται στα κύτταρα αυτούσια ώστε να τα τροποποιήσουν γενετικά [43](#). Όταν πρόκειται για νουκλεϊκά οξέα, η μεταφορά ενός γονιδίου γίνεται με διάφορες φυσικές και χημικές μεθόδους, ενώ τα γενετικά τροποποιημένα κύτταρα εισάγονται στον οργανισμό απευθείας [39,41](#). Η

τροποποίηση των κυττάρων μπορεί να γίνει είτε απευθείας *in vivo*, είτε *ex vivo* μετά την απομόνωσή τους από τον οργανισμό ⁴⁰.



Εικόνα 9: Διόρθωση της έκφρασης ενός ελαττωματικού γονιδίου μέσω: **a.** εισαγωγής του φυσιολογικού ομόλογου στο κύτταρο, **b.** σίγησης του ελαττωματικού γονιδίου μέσω ενός συστήματος σίγησης και, **c.** τροποποίησης του ελαττωματικού γονιδίου εισάγωντας μια νουκλεάση, με ή χωρίς το φυσιολογικό ομόλογο ⁴².

Όταν στόχος της θεραπείας είναι η εισαγωγή ενός γονιδίου, υπάρχουν δύο ενδεχόμενα. Από τη μία, όταν η θεραπεία στοχεύει διαιρούμενα κύτταρα, προτιμάται η *ex vivo* τροποποίησή τους και η χρήση ιών που ενσωματώνουν το γενετικό τους υλικό στο γονιδίωμά τους (ώστε το νέο γονίδιο να μεταφερθεί και στους απογόνους του κυττάρου). Αντίθετα, στις *in vivo* θεραπείες, στόχος μπορεί να είναι οποιαδήποτε κυτταρική σειρά που δε διαιρείται, ενώ το νέο γονίδιο παραμένει στο γονιδίωμα σε μορφή επισώματος, ώστε να επιτυγχάνεται σταθερή και μακροπρόθεσμη έκφραση αυτού ⁴².

Οι ιικοί φορείς

Ως υποψήφιοι φορείς στη γονιδιακή θεραπεία έχουν δοκιμασθεί διάφοροι ιοί. Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι ιοί είναι μέλη των αδενοϊών, των παρβοϊών (αδενοεξαρτώμενοι ιοί), των ρετροϊών (πιο επιφανείς οι λεντιοί) και των ερπητοϊών ^{43,44}.

Οι ιικοί φορείς επιλέγονται για τις εφαρμογές της γονιδιακής θεραπείας βάσει ορισμένων χαρακτηριστικών. Για παράδειγμα, στις *in vivo* εφαρμογές, πρέπει να υπάρχει σιγουριά ότι ο ιός δε θα μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό, για αυτό πολλά γονίδια που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό σε αυτούς τους ιούς διαγράφονται. Ως αποτέλεσμα μειώνεται η κυτταροτοξικότητα του ιού και η ανοσολογική απόκριση προς αυτόν. Επίσης, όταν πρόκειται για ιούς που

ενσωματώνονται στο γονιδίωμα, είναι σημαντικό να μην προκαλείται μεταλλαξιγένεση λόγω ένθεσης, που μπορεί να οδηγήσει σε εμφάνιση κακοήθειας ⁴⁴.

Άλλα σημαντικά χαρακτηριστικά που ελέγχονται είναι η δυνατότητα εργαστηριακής παραγωγής του ιού σε μεγάλη ποσότητα, η σταθερότητά του, η απόδοση της επιμόλυνσής (transduction) του, το πλήθος και ο τύπος των κυτταρικών τύπων που μπορεί να επιμολύνει, η διάρκεια της έκφρασης του νέου γονιδίου και το μέγεθος του γονιδίου που μπορεί να μεταφέρει στα κύτταρα ⁴⁴.

Παρά τα διάφορα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα που φέρει η χρήση τους, οι ιικοί φορείς είναι ο επικρατέστερος τύπος φορέα γονιδιακής θεραπείας. Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται συχνότερα, στις *ex vivo* θεραπείες, οι λεντιοί, ενώ στις *in vivo* θεραπείες, οι αδενοεξαρθώμενοι ιοί ⁴².

Οι μη ιικοί φορείς

Τα νουκλεϊκά οξέα μεταφέρονται στα κύτταρα μέσω ορισμένων φυσικών και χημικών μεθόδων. Στις φυσικές μεθόδους συγκαταλέγονται κυρίως η διαμόλυνση μέσω ηλεκτροδιάτρησης, υπερήχων και *gene gun*. Στις χημικές μεθόδους ανήκουν η διαμόλυνση μέσω κατιονικών λιπιδίων, ορισμένων πολυμερών, ολιγονουκλεοτιδίων, πεπτιδίων και νανοσωματιδίων ^{39,45}.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στη γονιδιακή θεραπεία έχουν τα πλεονεκτήματα της μειωμένης μεταλλαξιγένεσης και αντίδρασης ανοσολογικής απόκρισης, αλλά και τη δυνατότητα προσαρμοστικότητας σε σύγκριση με τους ιικούς φορείς. Παρόλα αυτά, η διαμόλυνση (transfection) των νουκλεϊκών οξέων στα κύτταρα μέσω των μεθόδων αυτών γίνεται, συνήθως, λιγότερο αποδοτικά. Τέλος, οι διαφορετικές μέθοδοι παρουσιάζουν διαφορετικό κυτταρικό τροπισμό και διαφορετική διάρκεια έκφρασης των γονιδίων ^{39,45}.

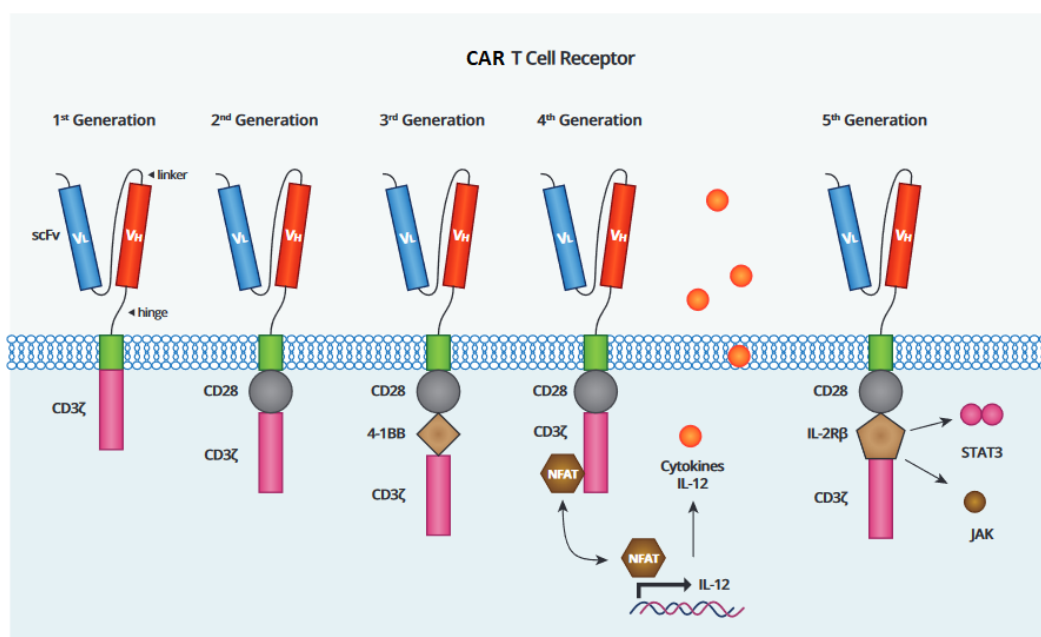
Η παρούσα πτυχιακή εργασία «ασχολείται» με έναν τύπο *ex vivo* γονιδιακής και κυτταρικής θεραπείας, τα γενετικά τροποποιημένα T λεμφοκύτταρα που εκφράζουν χμιαϊκούς αντιγονικούς υποδοχείς, τα οποία χρησιμοποιούνται πλέον κατά της οξείας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας των B λεμφοκυττάρων, ορισμένων λεμφωμάτων θετικών για το αντιγόνο επιφανείας CD19 (διάχυτο από μεγάλα B κύτταρα λέμφωμα, οζώδες λέμφωμα, λέμφωμα μανδύα) και του πολλαπλού μυελώματος.

Οι χμιαϊκοί αντιγονικοί υποδοχείς T λεμφοκυττάρων

Η εύρεση θεραπειών για την ίαση του καρκίνου απασχολεί την ιατρική και την επιστημονική κοινότητα εδώ και δεκαετίες. Παρόλο που ο συγκεκριμένος κλάδος έχει σημειώσει σημαντική πρόοδο ανά τα χρόνια, η αναζήτηση για νέες, ακόμα πιο αποδοτικές θεραπείες συνεχίζεται. Καρπός αυτής της προσπάθειας, μεταξύ άλλων, είναι τα T λεμφοκύτταρα που φέρουν χμιαϊκούς αντιγονικούς υποδοχείς (**Chimeric Antigen Receptor T cells – CAR-Ts**). Πρόκειται για κύτταρα τα οποία έχουν τροποποιηθεί γενετικά ώστε να εκφράζουν έναν χμιαϊκό υποδοχέα, ο οποίος φέρει χαρακτηριστικά

αντισώματος και υποδοχέα T λεμφοκυττάρου ταυτόχρονα. Η χρήση τέτοιων γενετικά τροποποιημένων κυττάρων κατά των αιματολογικών νεοπλασιών έχει το πλεονέκτημα της ειδικής στόχευσης νεοπλασματικών κυττάρων τα οποία φέρουν αντιγόνα ειδικά προς τον νεοπλασματικό ιστό, παρακάμπτοντας την ανοσολογική ανοχή που εμφανίζει ο οργανισμός προς τα μόρια ίδιας προελεύσεως ⁴⁶.

Οι χιμαιρικοί αντιγονικοί υποδοχείς (CARs) (Εικόνα 10) αποτελούνται από μια εξωκυτταρική περιοχή, έναν πρωτεϊνικής φύσεως σύνδεσμο (hinge), μια διαμεμβρανική περιοχή και μία ενδοκυτταρική περιοχή ^{47,48}. Η εξωκυτταρική περιοχή επιτελεί την αναγνώριση ενός επιλεγμένου αντιγόνου επιφανείας των νεοπλασματικών κυττάρων και ονομάζεται scFv (single chain variable Fragment). Αποτελείται από μια ελαφριά (V_L) και μια βαριά (V_H) αλυσίδα αλληλουχίας που αντιστοιχεί με εκείνη ενός μονοκλωνικού αντισώματος, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με έναν πρωτεϊνικής φύσεως εύκαμπτο σύνδεσμο (linker) ⁴⁶. Η εξωκυτταρική περιοχή συνδέεται με τη διαμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα μέσω μιας αρθρωτής περιοχής (hinge), η οποία συνηθέστερα προέρχεται από τα IgG1, IgG2 και IgG4, αλλά μπορεί να προέρχεται και από τα CD28 και CD8a μόρια ⁴⁷. Η διαμεμβρανική περιοχή, ενώ έχει ως κύριο ρόλο την αγκυροβόληση της εξωκυτταρικής περιοχής στη μεμβράνη του κυττάρου ⁴⁸, συμμετέχει και στη σηματοδότηση του CAR-T κυττάρου ⁴⁷.



Εικόνα 10: Οι δομές κάθε γενιάς χιμαιρικού υποδοχέα T λεμφοκυττάρου. Από αριστερά προς τα δεξιά: 1^η, 2^η, 3^η, 4^η και 5^η γενιά ²⁶.

Τέλος, η ενδοκυτταρική περιοχή αποτελείται από ένα ή περισσότερα σηματοδοτικά μόρια. Ανάλογα το είδος και το πλήθος των μορίων που απαρτίζουν αυτή την περιοχή, τα CAR χαρακτηρίζονται ως 1^{ης}, 2^{ης}, 3^{ης} ή 4^{ης} γενιάς. Η 1^η γενιά διαθέτει μόνο το CD3ζ (παλιότερα την Fcγ αλυσίδα), μόριο που προέρχεται από τον TCR και παρέχει το 1^ο σήμα ενεργοποίησης του CAR-T. Η 2^η γενιά, εκτός από το CD3ζ διαθέτει και ένα ακόμα σηματοδοτικό μόριο, συνηθέστερα το CD28 ή το 4-1BB ⁴⁷, το οποίο αποτελεί το 2^ο σήμα ενεργοποίησης του CAR-T, ώστε να ενεργοποιηθεί πλήρως, να αρχίσει να πολλαπλασιάζεται και να εκκρίνει κυτταροκίνες ^{48,49}. Το CD28 χρησιμοποιείται ως

συνδιεγερτικό μόριο αν απαιτείται ταχύς πολλαπλασιασμός και δράση των CAR-T, πράγμα που τα εξαντλεί γρήγορα, ενώ το 4-1BB όταν είναι επιθυμητός ένας πιο σταδιακός πολλαπλασιασμός ώστε τα κύτταρα να μην εξαντληθούν και να παραμείνουν για καιρό εν ενεργεία στον οργανισμό του ασθενούς ^{47,50}. Η 3^η γενιά περιλαμβάνει ένα επιπλέον συνδιεγερτικό μόριο, βελτιώνοντας έτσι τη δράση των CAR-T ⁴⁷, ενώ τα CAR-T 4^{ης} γενιάς απελευθερώνουν και κυτταροκίνες όσο είναι ενεργοποιημένα ⁵¹.

Οι πρώτες θεραπείες που χρησιμοποίησαν CAR-T κύτταρα για την καταπολέμηση του καρκίνου αφορούσαν τις αιματολογικές νεοπλασίες και είναι οι μόνες που έχει εγκρίνει ο FDA μέχρι στιγμής. Οι πρώτες εγκρίσεις δόθηκαν στο tisagenlecleucel της Novartis και στο axicabtagene ciloleucel της Gilead, φάρμακα CAR-T κυττάρων που στοχεύουν στην πρωτεΐνη επιφανείας CD19. Οι υπάρχουσες θεραπείες αφορούν τις οξείες λεμφοκυτταρικές λευχαιμίες ⁷², κάποια λεμφώματα μη-Hodgkin (συγκεκριμένα, το διάχυτο από μεγάλα Β κύτταρα λέμφωμα ⁶⁹, το οζώδες λέμφωμα ⁷⁰ και το λέμφωμα από κύτταρα του μανδύα ⁷¹), και πιο πρόσφατα το πολλαπλούν μυέλωμα ⁷³. Οι παραπάνω κακοήθειες έχουν το κοινό ότι αφορούν μη-ορθά διαφοροποιημένους προγόνους των Β λεμφοκυττάρων.

Με εξαίρεση τις CAR-T θεραπείες για το πολλαπλούν μυέλωμα, η αλληλουχία που χρησιμοποιήθηκε για τη δόμηση της scFv περιοχής των CAR-T στις θεραπείες αυτές αντιστοιχεί σε μονοκλωνικό αντίσωμα για το CD19. Πρόκειται για μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη επιφανείας που εκφράζεται σε όλους τους προγόνους των Β λεμφοκυττάρων και συνήθως υπερεκφράζεται στις κακοήθειες που πλήττουν τα Β λεμφοκύτταρα. Έχοντας αυτόν τον στόχο, τα anti-CD19 CAR-T κύτταρα μπορούν να στοχεύουν ειδικά τα νεοπλασματικά αυτά κύτταρα και να τα καταστρέφουν (CD8⁺) ή να ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού εναντίον τους (CD4⁺) ⁷⁴. Αυτό περατώνεται χωρίς την ανάγκη αντιγονοπαρουσίασης μέσω MHC, διότι οι V_L και V_H περιοχές αντισώματος που διαθέτουν τα CAR-T παρακάμπτουν αυτή την, για τα Τ λεμφοκύτταρα αναγκαιότητα ⁴⁷. Έτσι, μπορεί να επιτευχθεί μερική ή ολική ύφεση της ασθένειας, σε υπολογίσιμο μέρος των ασθενών. Μέχρι στιγμής, τα CAR-T ως θεραπεία χρησιμοποιούνται σε νεοπλασίες οι οποίες έχουν πάψει να ανταποκρίνονται στις συμβατικές θεραπείες ⁴⁸, παρόλα αυτά στόχος είναι όσο εξελίσσονται τα πρωτόκολλα και γίνεται περισσότερο κατανοητός ο τρόπος που δρουν τα CAR-T στον οργανισμό, να αρχίζουν να αντιμετωπίζουν κακοήθειες και σε πιο πρώιμα στάδια.

Τα πειράματα της παρούσας πτυχιακής εργασίας έγιναν με σκοπό να εφαρμοστούν στα πλαίσια CAR-T θεραπειών όπου δεν απομονώνονται τα Τ λεμφοκύτταρα των ίδιων των πασχόντων ώστε να δημιουργηθούν τα CAR-T κύτταρα, αλλά με στόχο τα Τ λεμφοκύτταρα να προέλθουν από υγιείς δότες. Και οι δύο προσεγγίσεις εμφανίζουν ορισμένα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Στην περίπτωση των αυτόλογων CAR-T, το κόστος παραγωγής είναι ιδιαίτερα αυξημένο, ενώ η ίδια η παραγωγή διαρκεί ένα υπολογίσιμο χρονικό διάστημα (περίπου ένα μήνα), που μπορεί να αποβεί μοιραίο για τον εν αναμονή ασθενή. Επίσης, στην περίπτωση των αυτόλογων CAR-T, τα Τ λεμφοκύτταρα που μπορούν να ληφθούν από το δότη είναι δυνατόν να είναι λίγα ή σε κακή κατάσταση λόγω αρνητικών επιδράσεων της ασθένειας ή των διαφόρων θεραπειών, πράγμα που είναι δυνατόν να εμποδίσει την παραγωγή CAR-T συνολικά ^{65,66}. Η χρήση αλλογενών CAR-T κυττάρων, αντιθέτως, παρακάμπτει όλα αυτά τα προβλήματα, παρόλα αυτά η χορήγησή τους είναι δυνατόν να προκαλέσει

αντίδραση του μοσχεύματος εναντίων του δέκτη (**Graft-versus-Host Disease – GvHD**) και το αντίστροφο. Ως αποτέλεσμα, τα CAR-T επιτίθενται στους ιστούς του δέκτη με ολέθρια αποτελέσματα, ενώ το ανοσοποιητικό σύστημα του δέκτη τα αναγνωρίζει ως κάτι ξένο και τα καταστρέφει ^{67,68}. Για αυτό το λόγο είναι απαραίτητο τα αλλογενή CAR-T να γίνουν πιο ασφαλή πριν αρχίσουν να χρησιμοποιούνται ευρέως.

Ενδιαφέρον της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποτελεί η αντίδραση του δέκτη εναντίον του μοσχεύματος (**Host-versus-Graft Disease – HvGD**), η οποία έχει ως αφετηρία την αναγνώριση των CAR-T κυττάρων από το ανοσοποιητικό σύστημα του δέκτη. Αυτή η αναγνώριση γίνεται εν μέρη λόγω της ύπαρξης του υποδοχέα CAR-T στην επιφάνεια των CAR-T κυττάρων (ο οποίος είναι έτσι και αλλιώς ένα «ξένο» μόριο), αλλά και μέσω αλληλεπιδράσεων των MHC των CAR-T, τα οποία προέρχονται από τον δότη (αλλογενές μόσχευμα), και των TCR των T λεμφοκυττάρων του οργανισμού. Έτσι, το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού ξεκινά να επιτίθεται στα CAR-T κύτταρα, με αποτέλεσμα τα κύτταρα αυτά να μη μπορούν να επιμείνουν στον οργανισμό και να επιτελέσουν τον σκοπό τους ^{66,68}. Επιπλέον, η ανοσολογική απόκριση που ο οργανισμός εξαπολύει εναντίον των CAR-T συμβάλει στο σύνδρομο απελευθέρωσης κυτταροκινών, το οποίο θα συζητηθεί παρακάτω.

1.5 Το σύνδρομο απελευθέρωσης κυτταροκινών

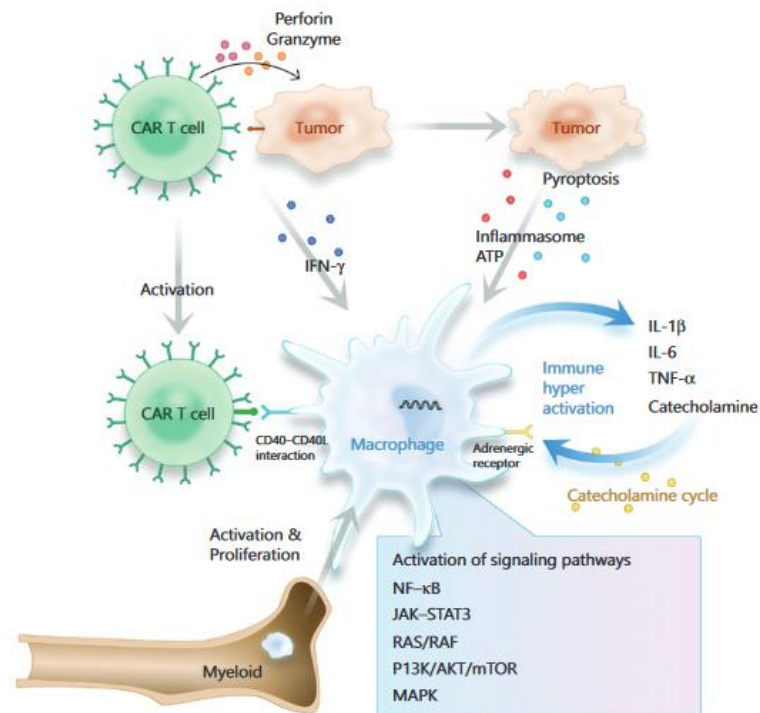
Όπως η πλειονότητα των φαρμακευτικών προϊόντων και θεραπειών, έτσι και η χορήγηση των CAR-T κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ορισμένων παρενεργειών. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία μέσω CAR-T ενδέχεται να εμφανίσουν συμπτώματα του συνδρόμου απελευθέρωσης κυτταροκινών (**Cytokine Release Syndrome – CRS**), αλλά και νευροτοξικότητα (ICANS), απλασία B λεμφοκυττάρων, κυτταροπενίες και κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια ⁵⁰. Παρόλο που πρόκειται για αναστρέψιμες παρενέργειες, είναι δυνατόν να αποβούν μοιραίες για τον ασθενή ⁴⁸.

Το CRS είναι μια μορφή συστημικής φλεγμονώδους αντίδρασης που μπορεί να προκύψει ως αποτέλεσμα κάποιας ασθένειας, σοβαρής μόλυνσης, αλλά και θεραπείας με μονοκλωνικά αντισώματα ή CAR-T κύτταρα ⁵². Στα πλαίσια της θεραπείας με CAR-T, ξεκινά με την ενεργοποίηση και τον επακόλουθο πολλαπλασιασμό των CAR-T κυττάρων, τα οποία με την αναγνώριση του αντιγόνου στόχου του νεοπλασματικού κυττάρου ενεργοποιούνται, και αρχίζουν να παράγουν κυτταροκίνες και χημειοκίνες. Αυτά τα μόρια ενεργοποιούν και επιστρατεύουν και άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού (T, B, NK, μονοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά ⁵²), τα οποία με τη σειρά τους εκκρίνουν εκ νέου κυτταροκίνες και χημειοκίνες που επιστρατεύουν ακόμη περισσότερα κύτταρα κ.ο.κ., δημιουργώντας έτσι έναν κύκλο θετικής ανατροφοδότησης ⁵³. Ως αποτέλεσμα αυτού του καταρράκτη κυτταροκινών που παράγουν όλα αυτά τα κύτταρα, ο ασθενής είναι δυνατόν να εμφανίσει πυρετό, ναυτία, μυαλγίες και αρθραλγίες, ανορεξία, ταχυκαρδία, πτώση της πίεσης, υποξία, πονοκεφάλους, κόπωση, καρδιακή, νεφρική και ηπατική δυσλειτουργία, μεταξύ άλλων ^{48,52,53}.

Οι επικρατέστερες κυτταροκίνες και χημειοκίνες που παρατηρούνται αυξημένες στο αίμα των ασθενών που εμφανίζουν CRS είναι οι IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, INF- γ ⁵⁴, TFN- α , CXCL10 ⁵², GM-CSF, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β και CXCL9 ⁵¹, με σημαντικότερες τις IL-6, IL-10, INF- γ , MCP-1 και GM-CSF ⁷⁵. Το CRS χωρίζεται σε τέσσερις βαθμίδες ανάλογα με τα

συμπτώματα που εμφανίζει ο ασθενής και την υποστήριξη που χρειάζεται σε κάθε βαθμίδα, με την 4^η να είναι η πιο επικίνδυνη ⁴⁸. Η αντιμετώπιση του CRS γίνεται με χρήση του Tocilizumab (αντίσωμα-ανταγωνιστής του υποδοχέα IL-6) ή κορτικοστεροειδών, με την ταυτόχρονη συνδρομή άλλων υποστηρικτικών θεραπειών ⁵².

Το τελευταίο διάστημα, η θεώρηση ότι ο πολλαπλασιασμός των CAR-T κυττάρων είναι το αίτιο για το CRS αμφισβητείται. Παρότι παίζουν σίγουρα κάποιο ρόλο, υπάρχουν ενδείξεις ότι για την υπέρμετρη έκκριση κυτταροκινών που οδηγεί στο CRS, μεγαλύτερη ευθύνη φέρουν τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα και μακροφάγα που ενεργοποιούνται ως απάντηση στην ενεργοποίηση των CAR-T ^{53,64} (Εικόνα 11). Αυτό το γεγονός, μάλιστα, επιδεινώνεται όταν τα T λεμφοκύτταρα που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία των CAR-T είναι αλλογενή, διότι σε αυτήν την περίπτωση το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς δεν ενεργοποιείται μόνο λόγω της δράσης των CAR-T, αλλά και λόγω ανίχνευσης των ξένων πρωτεϊνών που φέρουν τα κύτταρα αυτά στην επιφάνειά τους. Ως αποτέλεσμα, η ενεργοποίηση των μονοκυττάρων και των μακροφάγων και η έκκριση των κυτταροκινών από αυτά είναι ακόμα μεγαλύτερη και δυσχεραίνει έτσι, το ήδη μεγάλο πρόβλημα του CRS ^{66,68}.



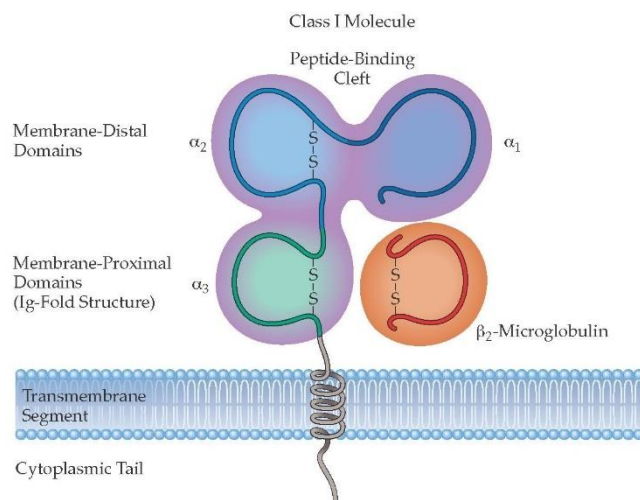
Εικόνα 11: Η συμμετοχή των μακροφάγων στο σύνδρομο απελευθέρωσης κυτταροκινών.

Γίνεται κατανοητό, λοιπόν, ότι η ύπαρξη του μορίου MHC I στην επιφάνεια των αλλογενών CAR-T κυττάρων αποτελεί ένα από τα μόρια-κλειδιά για τη μείωση του CRS και για την επίτευξη της επιβίωσης των CAR-T στον οργανισμό.

1.6 Μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας

Ως μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (**Major Histocompatibility Complex molecules – MHC molecules**) χαρακτηρίζονται ορισμένες γλυκοπρωτεΐνες επιφανείας. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι MHC I, MHC II και MHC III. Οι πρώτες δύο είναι υπεύθυνες για την αναγνώριση αυτό-αντιγόνων και για την αντιγονοπαρουσίαση στα CD8⁺ και CD4⁺ T λεμφοκύτταρα αντίστοιχα. Μέσω των MHC I «παρουσιάζονται» ενδοκυτταρικά αντιγόνα (ιοί), ενώ μέσω των MHC II εξωκυτταρικά αντιγόνα (βακτήρια), και κάθε ένα από τα MHC I και MHC II ακολουθεί διαφορετικό μονοπάτι αντιγονοπαρουσίασης. Η πρωτεΐνη MHC III είναι πολύ διαφορετική από τις MHC I και MHC II στη δομή και στη λειτουργία της, παρόλο που και αυτή συμμετέχει με άλλους τρόπους στην ανοσολογική απόκριση ⁵⁹.

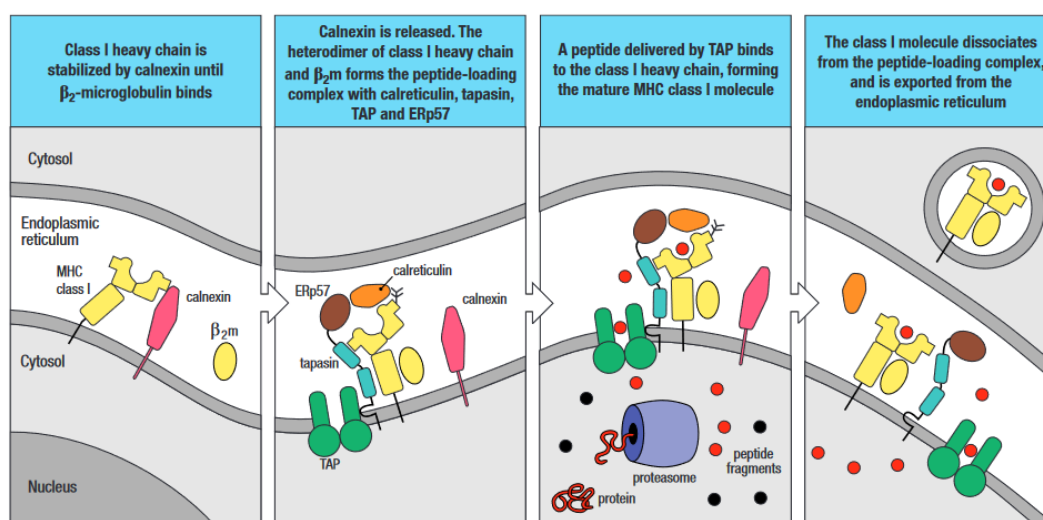
Ενδιαφέρον της παρούσας πτυχιακής είναι η γλυκοπρωτεΐνη MHC I (**Εικόνα 12**). Πρόκειται για μια πρωτεΐνη που δομείται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες: μια μεγάλη α αλυσίδα και μια μικρότερη β αλυσίδα. Η βαριά α αλυσίδα αποτελείται από τρεις διακριτές εξωκυτταρικές περιοχές (α₁, α₂ και α₃), μία διαμεμβρανική και μια μικρή ενδοκυτταρική περιοχή. Η μικρότερη β αλυσίδα ονομάζεται β₂-μικροσφαιρίνη (β₂-microglobulin) και εμφανίζει παρόμοιο μέγεθος και δομή με την α₃ περιοχή της α αλυσίδας. Η β₂-μικροσφαιρίνη συνδέεται με την α αλυσίδα με μη ομοιοπολικούς δεσμούς και δε διαθέτει διαμεμβρανική περιοχή ^{57,59}.



Εικόνα 12: Η δομή του μορίου MHC I.

Η αντιγονοπαρουσίαση, είτε αφορά αυτό-αντιγόνα είτε αφορά αντιγόνα παθογόνων μικροοργανισμών, ξεκινά με την επεξεργασία ημιτελών ή κακώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνικών μορίων. Αυτή τη λειτουργία επιτελεί το πρωτεάσωμα, ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο που ως ρόλο έχει την αποδόμηση τέτοιου είδους πρωτεϊνών σε μικρότερα πεπτίδια. Για την αντιγονοπαρουσίαση μέσω του μορίου MHC I χρησιμοποιείται το ανοσοπρωτεάσωμα ⁵⁹. Μετά το πέρας της διαδικασίας αυτής, τα πεπτίδια που έχουν προκύψει μεταφέρονται από το κυτταρόπλασμα του κυττάρου στο ενδοπλασματικό δίκτυο, μέσω μιας πρωτεΐνης που ονομάζεται TAP ⁶². Ταυτόχρονα, νεοσυντιθέμενα μόρια της βαριάς α αλυσίδας του MHC I φτάνουν στο ενδοπλασματικό δίκτυο και προσδένουν την πρωτεΐνη-συνοδό καλνεξίνη και την πρωτεΐνη ERp57, έως ότου ολοκληρωθεί η αναδίπλωσή τους και συνδεθούν με την β₂-μικροσφαιρίνη. Όταν

αυτό συμβεί, η καλνεξίνη αποσυνδέεται και το MHC I συνδέεται με άλλες πρωτεΐνες, δημιουργώντας το PLC (Peptide Loading Complex). Το PLC αποτελείται από το MHC I, την καλρετικουλίνη, την ταπασίνη, την πρωτεΐνη TAP και την πρωτεΐνη ERp57. Κεντρικής σημασίας πρωτεΐνη στο σύμπλοκο αυτό είναι η ταπασίνη, η οποία φέρνει κοντά το μόριο MHC I και την πρωτεΐνη TAP, ώστε να «φορτωθεί» κάποιο από τα πεπτίδια που εισρέουν στο ενδοπλασματικό δίκτυο πάνω στην κοιλότητα του MHC I. Όταν κάποιο πεπτίδιο προσδεθεί ισχυρά στο MHC I, ο δεσμός ταπασίνη-MHC I διασπάται και το μόριο MHC I απελευθερώνεται από το PLC ^{60,63}. Μέσω ενός κυστιδίου, το σύμπλοκο MHC I-αντιγονικού πεπτιδίου προχωρά στο σύμπλεγμα Golgi, όπου γλυκοζυλιώνεται, και στη συνέχεια μετακινείται στην επιφάνεια του κυττάρου και παραμένει στην κυτταρική μεμβράνη, έτοιμο να αναγνωριστεί από τα CD8⁺ Τ λεμφοκύτταρα ⁶¹ (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Απεικόνιση της διαδικασίας συναρμολόγησης της γλυκοπρωτεΐνης MHC I, της φόρτωσης του αντιγονικού πεπτιδίου στην κοιλότητά της, και της μετανάστευσης του συμπλόκου MHC I-πεπτίδιο στην επιφάνεια του κυττάρου για αντιγονοπαρουσίαση ³.

Η διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης μέσω MHC II ακολουθεί διαφορετικά βήματα ώστε να επιτευχθεί η συναρμολόγηση του συμπλόκου MHC II-αντιγονικό πεπτίδιο. Το συγκεκριμένο μονοπάτι, όμως, δεν αφορά την παρούσα εργασία.

Έχοντας υπόψιν όλα τα παραπάνω, λοιπόν, είναι κατανοητό ότι το μόριο MHC I είναι ένα από τα «ξένα» μόρια που βρίσκονται στη μεμβράνη των αλλογενών Τ λεμφοκυττάρων από τα οποία δημιουργούνται τα CAR-T κύτταρα. Η ύπαρξη αυτού του αλλογενούς μορίου καθιστά το κύτταρο αναγνωρίσιμο από το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς, γεγονός που οδηγεί σε αντίδραση του ξενιστή ενάντια στο μόσχευμα (HvGD). Από την άλλη, μόρια όπως είναι ο TCR που φέρουν τα αλλογενή αυτά Τ λεμφοκύτταρα μπορούν να αναγνωρίσουν τα κύτταρα του ασθενούς ως ξένα, κάτι που οδηγεί στο σύνδρομο αντίδρασης του μοσχεύματος ενάντια στον ξενιστή (GvHD). Λόγω των GvHD και HvGD παράγεται ένα πλήθος κυτταροκινών, το οποίο με τη σειρά του συνεισφέρει στο CRS και στα συμπτώματά του.

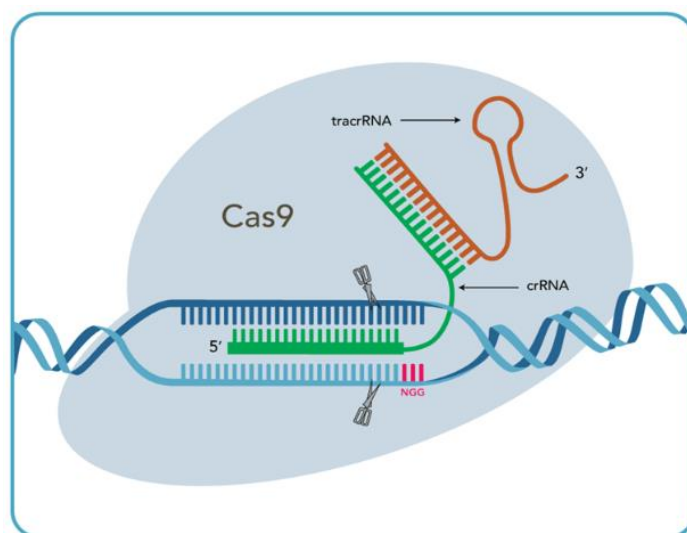
Για την μετρίαση των GvHD, HvGD και CRS, στην παρούσα πτυχιακή εργασία εξετάστηκε η απαλοιφή του MHC I μορίου από την επιφάνεια των CAR-T κυττάρων. Αυτό

περατώθηκε χρησιμοποιώντας το σύστημα τροποποίησης του γονιδιώματος, CRISPR/Cas9, το οποίο στόχευσε στην αδρανοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί το μόριο της β2-μικροσφαιρίνης, στο γονιδίωμα των T λεμφοκυττάρων.

1.7. Το σύστημα CRISPR/Cas9

Το ακρωνύμιο **CRISPR** αναφέρεται στις **Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats**, δηλαδή σε συγκεκριμένες μικρού μήκους αλληλουχίες, οι οποίες εντοπίστηκαν ομαδοποιημένες στο γονιδίωμα ορισμένων βακτηρίων και αρχαίων. Αυτές οι αλληλουχίες (spacers) αντιστοιχούν σε συγκεκριμένα σημεία του γονιδιώματος ορισμένων μικροοργανισμών, όπως είναι οι DNA ιοί και τα πλασμίδια. Τα βακτηριακά κύτταρα και τα κύτταρα των αρχαίων χρησιμοποιούν αυτές τις αλληλουχίες ως οδηγούς ορισμένων RNA-εξαρτώμενων DNA ενδονουκλεασών, που ονομάζονται **Cas** (**CRISPR associated proteins**) και έχουν την ικανότητα να επάγουν την πέψη του δίκλωνου DNA του μικροοργανισμού-εισβολέα, στο σημείο που υποδεικνύει η εκάστοτε RNA αλληλουχία (που μεταγράφεται από ένα σημείο των CRISPR και εμφανίζει μερική συμπληρωματικότητα με την αλληλουχία του DNA του μικροοργανισμού-εχθρού). Για να δράσει το σύστημα CRISPR/Cas, ένα ένζυμο Cas και ένα crRNA/tracrRNA σύμπλοκο δημιουργούν ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο (RNP) (**Εικόνα 14**). Η αλληλουχία-οδηγός, spacer, αντιστοιχεί στο crRNA. Έτσι, το παραπάνω σύστημα δρα ως μία μορφή επίκτητης ανοσίας των βακτηρίων και των αρχαίων [87,88](#).

Το σύστημα CRISPR/Cas έχει πλέον τροποποιηθεί σύμφωνα με τις ανάγκες της επιστημονικής κοινότητας, ώστε να χρησιμοποιηθεί για τη γενετική τροποποίηση των γονιδίων διαφόρων κυττάρων. Η πρωτεΐνη Cas που χρησιμοποιείται συχνότερα είναι η Cas9. Το crRNA/tracrRNA σύμπλοκο έχει πλέον ενωθεί σε ένα ενιαίο μόριο RNA που ονομάζεται **single-guide RNA (sgRNA)**. Σε αυτό το μόριο, η αλληλουχία της περιοχής που αντιστοιχεί στο crRNA (20bp) τροποποιείται ανάλογα με το γονίδιο-στόχο του κάθε πειράματος. Το συνολικό μήκος ενός sgRNA έχει, συνήθως, μήκος περίπου 100bp [88,89](#).



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση του ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου του CRISPR/Cas9 συστήματος γενετικής τροποποίησης. Διακρίνονται: το crRNA (πράσινο), το tracrRNA (πορτοκαλί), το ένζυμο της Cas9 (αχνό γαλάζιο), και το DNA-στόχος του συστήματος που υφίσταται πέψη (γαλάζιο, μπλε) [91](#).

2. Σκοπός

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών επιφανείας (CAR, TCR, MHC) των αλλογενών CAR-T κυττάρων με τα κύτταρα του ενδογενούς ανοσοποιητικού του ασθενούς φαίνεται να φέρει ένα μεγάλο μέρος της ευθύνης για το GvHD και το HnGD, και κατ' επέκταση για το CRS που παρατηρείται κατά τη θεραπεία εναντίον των αιματολογικών νεοπλασιών μέσω CAR-T κυττάρων. Εκτός αυτού, οι αλληλεπιδράσεις αυτές ευθύνονται και για τη μειωμένη επιβίωση των CAR-T κυττάρων στον οργανισμό του θεραπευόμενου. Για αυτό το λόγο, η έρευνα έχει αρχίσει να επικεντρώνεται σε τρόπους μέσω των οποίων οι αλληλεπιδράσεις αυτές θα πάψουν να συμβαίνουν.

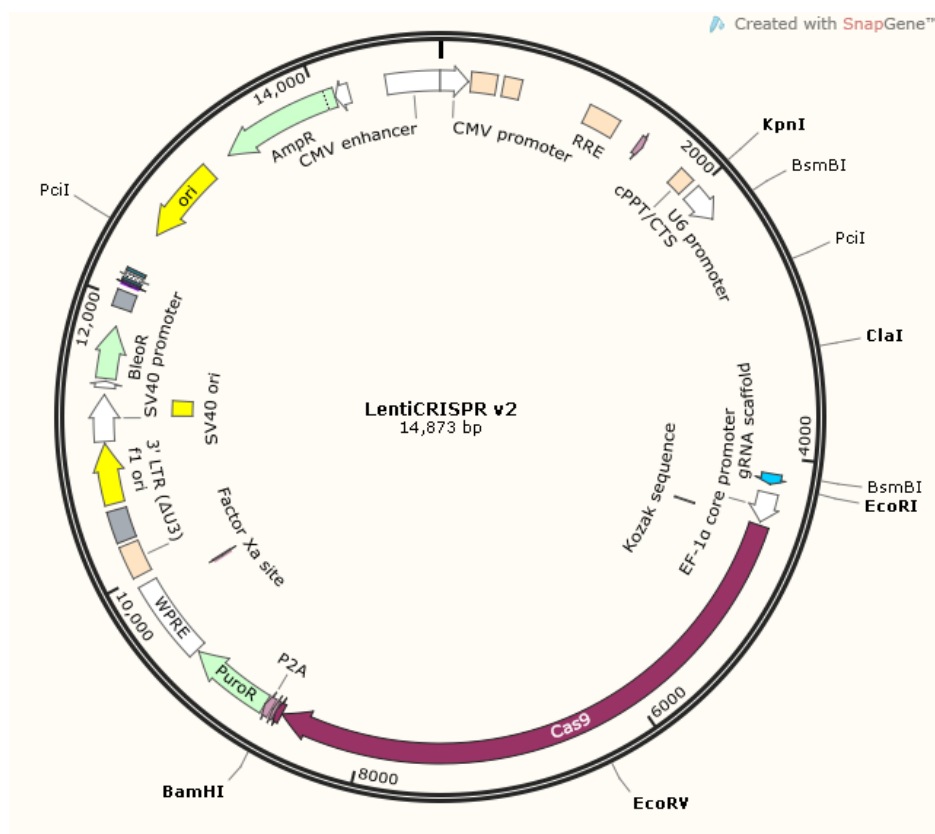
Στα πλαίσια αυτής της πτυχιακής εργασίας, σκοπός ήταν η απαλοιφή του μορίου MHC από τα T λεμφοκύτταρα που θα χρησιμοποιούνταν για τη δημιουργία CAR-T κυττάρων, με τη χρήση της τεχνολογίας επεξεργασίας των νουκλεϊκών οξέων, CRISPR/Cas9. Η απαλοιφή του τάξης I MHC μορίου από την επιφάνεια των T λεμφοκυττάρων έγινε μέσω επαγωγής σημειακών μεταλλάξεων στο γονίδιο της β2-μικροσφαιρίνης. Οι σημειακές μεταλλάξεις δεν επιτρέπουν την παραγωγή μιας λειτουργικής β2-μικροσφαιρίνης, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να παρουσιαστεί στη μεμβράνη του T λεμφοκυττάρου μία ώριμη MHC πρωτεΐνη.

3. Υλικά & Μέθοδοι

3.1. Πέψη του πλασμιδίου LentiCRISPR v2 με ένζυμα περιορισμού για απομόνωση των τμημάτων του sgRNA backbone και του γονιδίου της Cas9

Σκοπός της πέψης αυτής ήταν η απομόνωση του γονιδίου της πρωτεΐνης Cas9 από το πλασμίδιο LentiCRISPR v2. Η απεικόνιση των αλληλουχιών του πλασμιδίου παρουσιάζεται παρακάτω (Εικόνα 15). Η πέψη είχε ως εξής:

15μl LentiCRISPR v2 (1μg/μl)
10μl CutSmart buffer
1,5μl BamHI (High Fidelity – HF)
1,5μl KpnI (HF)
1,5μl EcoRI
70,5μl Water for Injection (W.F.I.)



Εικόνα 15: Χάρτης του πλασμιδίου LentiCRISPR v2 και μερικών περιοριστικών ενζύμων ενδιαφέροντος, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SnapGene.

Η αντίδραση είχε τελικό όγκο 100μl και έγινε σε θερμοκρασία 37°C, σε υδατόλουτρο, στο οποίο παρέμεινε για 2 ώρες.

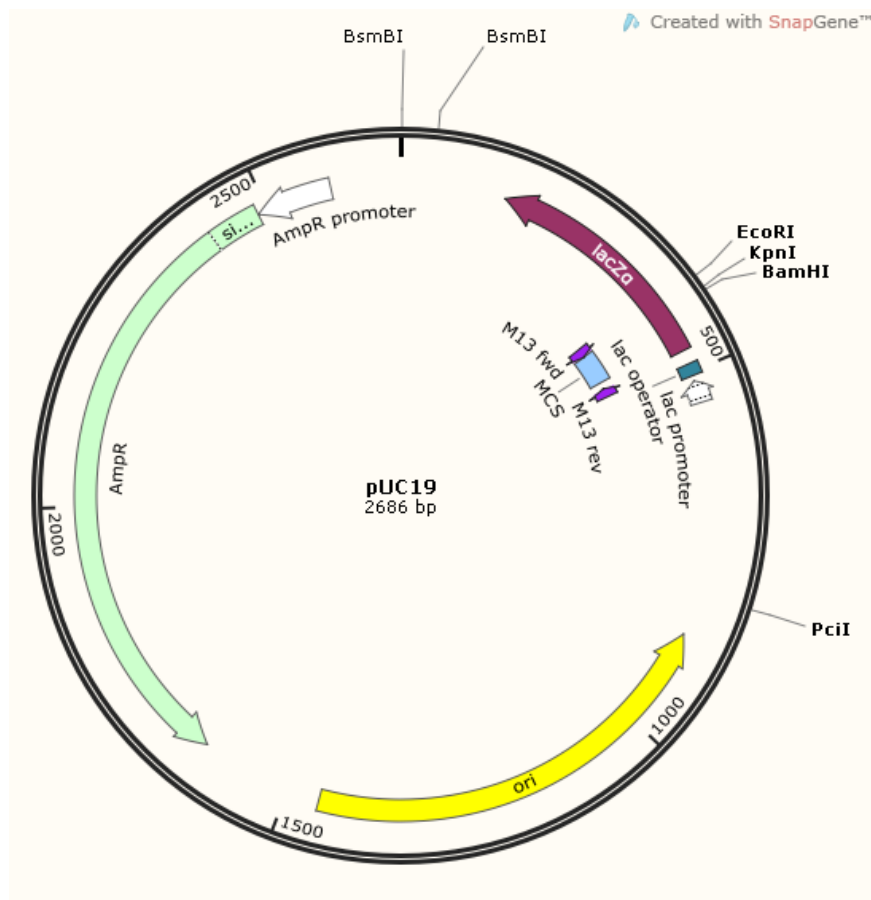
Στη συνέχεια έγινε έλεγχος των προϊόντων της πέψης μέσω ηλεκτροφορήσεως, σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 0,8% (0,4g αγαρόζης διαλυμένα σε 50ml TAE (1x) + 7ml βρωμιούχο αιθίδιο).

Εφόσον διαπιστώθηκε η επιτυχία της πέψης απομονώθηκαν οι ζώνες που περιείχαν το γονίδιο της Cas9, υπό τον έλεγχο του υποκινητή EF-1α, και το τμήμα μεταξύ του υποκινητή U6 και ανοδικά του υποκινητή EF-1α (sgRNA backbone), από το πήκτωμα. Στη συνέχεια, έγινε επεξεργασία των μπαντών αυτών με τη χρήση του QIAEX II Gel Extraction Kit της Qiagen και ελήφθη το DNA.

Τέλος, μετρήθηκε η ποσότητα του DNA που ελήφθη στον Qubit 4 Fluorometer με τη χρήση του Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit.

3.2. Πέψεις του πλασμιδίου PUC19 με ένζυμα περιορισμού προς εισαγωγή του sgRNA backbone και του γονιδίου της Cas9

Σκοπός των πέψεων αυτών ήταν το πλασμίδιο PUC19 να γίνει γραμμικό, με άκρα συγκεκριμένης αλληλουχίας. Οι πέψεις έγιναν η μία μετά την άλλη, επειδή οι θέσεις περιορισμού του κάθε ενζύμου ήταν πολύ κοντά η μία στην άλλη ώστε τα ένζυμα να μπορέσουν να δράσουν με αποδοτικό τρόπο. Η απεικόνιση των αλληλουχιών του πλασμιδίου παρουσιάζεται παρακάτω (Εικόνα 16). Οι πέψεις είχαν ως εξής:



Εικόνα 16: Χάρτης του πλασμιδίου PUC19 και μερικών περιοριστικών ενζύμων ενδιαφέροντος, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SnapGene.

1^{ος} πέψεις:

50μl PUC19 (29,4ng/μl)	50μl PUC19 (28,4ng/μl)
7μl CutSmart buffer	7μl CutSmart buffer
1,5μl BamHI (HF)	1,5μl KpnI (HF)
11,5μl W.F.I.	11,5μl W.F.I.

Οι αντιδράσεις είχαν τελικό όγκο 70μl και έγιναν σε θερμοκρασία 37°C, σε υδατόλουτρο, στο οποίο παρέμειναν για 1,5 ώρα. Στη συνέχεια, κάθε προϊόν «καθαρίστηκε» σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit, της New England Biolabs. Έπειτα έγιναν οι επόμενες πέψεις, ως εξής:

2^{ος} πέψεις:

13μl PUC19 (BamHI – HF)	13μl PUC19 (KpnI – HF)
3μl 2.1 buffer	3μl 2.1 buffer
1,5μl EcoRI	1,5μl EcoRI
12,5μl W.F.I.	12,5μl W.F.I.

Οι αντιδράσεις είχαν τελικό όγκο 30μl και έγιναν σε θερμοκρασία 37°C, σε υδατόλουτρο, στο οποίο παρέμειναν για 1,5 ώρα. Στη συνέχεια έγινε έλεγχος των προϊόντων της πέψης μέσω ηλεκτροφορήσεως και απομονώθηκαν οι ζώνες που διέθεταν τα επιθυμητά τμήματα. Το DNA από τις ζώνες αυτές απομονώθηκε χρησιμοποιώντας το Monarch® DNA Gel Extraction Kit της New England Biolabs. Τέλος, η ποσότητα του DNA των αντιδράσεων μετρήθηκε στον Qubit 4 Fluorometer με τη χρήση του Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit.

3.3. Ένωση (ligation) των τμημάτων DNA των πέψεων

Η αντίδραση του ligation αποσκοπούσε στη δημιουργία ενός κυκλικού μορίου Cas9-PUC19 και ενός κυκλικού μορίου sgRNA backbone-PUC19. Οι αντιδράσεις είχαν ως εξής:

❖ Για τα Cas9-PUC19 και sgRNA backbone-PUC19:

3μl PUC19 (BamHI + EcoRI)	1μl PUC19 (KpnI + EcoRI)
2,5μl Cas9	5,7μl sgRNA backbone
2μl buffer T4 λιγάσης	2μl buffer T4 λιγάσης
1μl T4 λιγάση	1μl T4 λιγάση
11,5μl W.F.I.	10,3μl W.F.I.

❖ **Για τα control των παραπάνω:**

3μl PUC19 (BamHI + EcoRI)	1μl PUC19 (KpnI + EcoRI)
2μl buffer T4 λιγάσης	2μl buffer T4 λιγάσης
1μl T4 λιγάση	1μl T4 λιγάση
11,5μl W.F.I.	10,3μl W.F.I.

❖ **Για τις συνθήκες των αντιδράσεων ligation:**

Βήμα 1: 16°C, 1min
Βήμα 2: 21°C, 1min
Βήμα 3: Επανάληψη 999X

Η αντίδραση αφέθηκε όλη τη νύχτα σε θερμοκυκλοποιητή της Bio-Rad.

Την επομένη έγινε διαγνωστικός έλεγχος των αντιδράσεων του ligation μέσω ηλεκτροφορήσεώς τους σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 0,8%.

3.4. Μετασηματισμός βακτηρίων με κυκλικά μόρια DNA

Ειδικά στελέχη του βακτηρίου *Escherichia coli* μετασηματίστηκαν με το κυκλικό DNA που δημιουργήθηκε κατά την αντίδραση του ligation. Για το μετασηματισμό χρησιμοποιήθηκαν τα κυκλικά μόρια Cas9-PUC19, sgRNA backbone-PUC19 και η μία αντίδραση control με το PUC19 (BamHI + EcoRI), στην οποία δεν υπήρχε το τμήμα του γονιδίου της Cas9.

Για τον μετασηματισμό, αρχικά τα βακτήρια *E. coli* που βρίσκονταν σε glycerol stock ξεπάγωσαν πάνω στον πάγο για 10 λεπτά. 100μl βακτηρίων μεταφέρθηκαν έπειτα σε Eppendorf, στα οποία προστέθηκαν 4μl κυκλικού DNA (προϊόν αντίδρασης λιγάσης). Μετά από ανάδευση το μείγμα έμεινε στον πάγο για 30 λεπτά. Έπειτα τα Eppendorf τοποθετήθηκαν στο υδατόλουτρο στους 42°C για 30 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, αμέσως μεταφέρθηκαν στον πάγο για 3 λεπτά. Μόλις παρήλθε αυτό το διάστημα, τοποθετήθηκαν 400μl θρεπτικού υλικού LB (σύνθεση: 900ml W.F.I., 10g τρυπτόνης, 5g εκχύλισμα μαγιάς, 10g NaCl) σε κάθε Eppendorf και το μείγμα μετακινήθηκε σε Falcon. Στη συνέχεια, τα Falcon αυτά μεταφέρθηκαν σε επωαστήρα υπό ανάδευση, όπου παρέμειναν για 1 ώρα στους 37°C στα 225rpm. Τέλος, από το κάθε tube απομονώθηκαν 100μl βακτηρίων τα οποία επιστρώθηκαν σε τρυβλίο Petri 100mm [περιείχε: στέρεο θρεπτικό LB (στο οποίο είχαν προστεθεί 15g άγαρ) και αμπικιλίνη 100μg/ml]. Τα τρία τρυβλία έμειναν στον κλίβανο για περίπου 22 ώρες.

3.5. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μικρής κλίμακας καλλιέργεια (mini-prep)

Από κάθε τρυβλίο Petri, επιλέχθηκαν πέντε μοναδιαίες αποικίες (εκτός από το control, το οποίο δεν εμφάνισε αποικίες, όπως και έπρεπε) οι οποίες εμβολιάστηκαν σε ένα ξεχωριστό Falcon η κάθε μία, το οποίο περιείχε 3ml LB και 3μl αμπικιλίνης. Τα Falcon έπειτα μεταφέρθηκαν σε επωαστήρα υπό ανάδευση όπου και παρέμειναν για περίπου 20 ώρες στους 37°C.

Την επομένη είχαν μεγαλώσει τρεις αποικίες του Cas9-PUC19 και πέντε του sgRNA backbone-PUC19. Έγινε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA κάθε καλλιέργειας ακολουθώντας το πρωτόκολλο του PureLink™ HiPure Plasmid Miniprep Kit της Invitrogen. Μετά την απομόνωση του DNA έγινε ποσοτικοποίησή του χρησιμοποιώντας το Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit.

Η ορθότητα της δομής των πλασμιδίων επαληθεύτηκε μέσω πέψων με διάφορα περιοριστικά ένζυμα. Οι αντιδράσεις είχαν ως εξής:

✚ Για το πλασμίδιο Cas9-PUC19:

10μl Cas9-PUC19	
3μl CutSmart buffer	8μl Cas9-PUC19
1,5μl KpnI (HF)	3μl 3.1 buffer
1,5μl EcoRI	1,5μl EcoRV
14μl W.F.I.	17,5μl W.F.I.

✚ Για το πλασμίδιο sgRNA backbone-PUC19:

10μl sgRNA backbone-PUC919		
3μl CutSmart buffer	8μl sgRNA backbone-PUC919	8μl sgRNA backbone-PUC919
1,5μl BamHI (HF)	3μl 3.1 buffer	3μl 3.1 CutSmart buffer
1,5μl EcoRI	1,5μl Bsmbl	1,5μl ClaI
14μl W.F.I.	17,5μl W.F.I.	17,5μl W.F.I.

Οι αντιδράσεις είχαν τελικό όγκο 30μl και έγιναν όλες σε υδατόλουτρο, στους 37°C, και διήρκησαν 1 ώρα.

Οι πέψεις αυτές στη συνέχεια ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8%, φανερώνοντας ότι τα βακτήρια μιας καλλιέργειας του Cas9-PUC19 και μιας καλλιέργειας του sgRNA-PUC19 είχαν όντως μετασχηματιστεί με τα ligated αυτά πλασμίδια.

3.6. Κλωνοποίηση πλασμιδίων σε μεγάλη κλίμακα (maxiprep)

Αφού εξακριβώθηκαν οι καλλιέργειες που έφεραν τα επιθυμητά πλασμίδια, από το απομονωμένο DNA αυτών έγινε ξανά μετασχηματισμός βακτηρίων *E. coli*. Συγκεκριμένα, αυτό το αρκετά πυκνό DNA αραιώθηκε σε W.F.I. σε τελική συγκέντρωση 1ng/μl. Ακολουθήθηκε η διαδικασία μετασχηματισμού που περιγράφηκε παραπάνω, με τις διαφορές ότι το μείγμα βακτηρίων-DNA διαλύθηκε σε 900μl θρεπτικού SOC (0.5% Yeast Extract, 2% Tryptone, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20mM Glucose), και ότι στα τρυβλία Petri στρώθηκαν τελικά 10μl μετασχηματισμένων βακτηρίων.

Την επομένη, μία αποικία από κάθε τρυβλίο Petri εμβολιάστηκε σε ένα Falcon που περιείχε 3ml LB και 3μl αμπικιλλίνης (miniprep). Τα παραπάνω αφέθηκαν σε επωαστήρα υπό ανάδευση στα 225rpm και στους 37°C για 18 ώρες.

Την επόμενη μέρα έγινε η προετοιμασία των καλλιιεργειών για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια (maxiprep) που θα ακολουθούσε. Στα πλαίσια αυτά, σε δύο μεγάλες φλάσκες προστέθηκαν, στην κάθε μία: 200ml LB, 100ml αμπικιλίνης και 200ml βακτηρίων από κάθε μία από τις μικρές καλλιέργειες για miniprep. Οι δύο φλάσκες αφέθηκαν στον κλίβανο επώασης για 18 ώρες στα 225rpm και στους 37°C.

Τέλος, την επομένη έγινε η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τις μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες (maxiprep), με βάση το πρωτόκολλο του PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit της Invitrogen, και το DNA ποσοτικοποιήθηκε την επόμενη μέρα με το Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit.

3.7. Έλεγχος προσανατολισμού του sgRNA backbone στο πλασμίδιο PUC19

Ο έλεγχος αυτός έγινε μέσω πέψων του sgRNA backbone-PUC19 πλασμιδίου με περιοριστικά ένζυμα. Οι πέψεις αυτές είχαν ως εξής:

3,3μl sgRNA backbone-PUC19 (302ng/μl)	3,3μl sgRNA backbone-PUC19 (302ng/μl)
3μl 3.1 buffer	3μl 3.1 buffer
1μl PciI	1,5μl BmbI
22,7μl W.F.I.	22,2μl W.F.I.

Και οι δύο αντιδράσεις είχαν τελικό όγκο 30μl και έλαβαν χώρα σε υδατόλουτρο για 30 λεπτά. Η 1^η αντίδραση έγινε στους 37°C, ενώ η 2^η αντίδραση στους 55°C. Στη συνέχεια, ο προσανατολισμός του sgRNA backbone μέσα στο πλασμίδιο επαληθεύτηκε μέσω ηλεκτροφορήσεως σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8%.

3.8. Αφαίρεση των επιπλέον θέσεων περιορισμού του ενζύμου BsmBI από το sgRNA backbone-PUC19

Στόχος της αντίδρασης ήταν η λήψη ενός γραμμικού μορίου χωρίς τις 2 θέσεις περιορισμού BsmBI. Αρχικά, το πλασμιδιακό DNA αραιώθηκε σε W.F.I. σε τελική συγκέντρωση 2ng/μl. Στη συνέχεια διεξήχθη η αντίδραση PCR, σε θερμοκυκλοποιητή της Bio-Rad, για 3,5 ώρες. Οι αντιδράσεις είχαν ως εξής:

✚ Για το sgRNA backbone-PUC19:

1μl sgRNA backbone-PUC19
 10μl Kappa buffer (5X)
 1μl dNTPs
 2μl forward primer
 2μl reverse primer
 2μl Kappa DNA πολυμεράση
 32μl W.F.I.

✚ Για το control:

1μl PUC19
 10μl Kappa buffer (5X)
 1μl dNTPs
 2μl forward primer
 2μl reverse primer
 2μl Kappa DNA πολυμεράση
 32μl W.F.I.

✚ Για τις συνθήκες της PCR:

Initial denaturation: 95°C, 3mins

Denaturation: 98°C, 20sec

Annealing: 60°C, 15sec

Extension: 72°C, 5mins

Επανάληψη βημάτων 2-4: 30X

Final extension: 72°C, 10mins

Στη συνέχεια τα προϊόντα των PCR ελέγχθηκαν μέσω ηλεκτροφορήσεως σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 0,8%.

3.9. Επανακυκλοποίηση του γραμμικού *sgRNA backbone-PUC19*

Αρχικά, τα δύο προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 0,8%. Στη συνέχεια, οι ζώνες ενδιαφέροντος απομονώθηκαν από το πήκτωμα και το DNA απομονώθηκε από το gel με τη χρήση του PureLink™ Quick Gel Extraction Kit της Invitrogen. Έπειτα έγινε ποσοτικοποίηση του DNA χρησιμοποιώντας το Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit.

Στη συνέχεια, έγινε πέψη του DNA που απομονώθηκε με περιοριστικό ένζυμο, ως εξής:

100μl <i>sgRNA backbone-PUC19</i> (PCR)
12μl 2.1 buffer
1,5μl EcoRI
6,5μl W.F.I.

Η αντίδραση είχε τελικό όγκο 120μl και διήρκησε 1 ώρα. Έγινε σε υδατόλουτρο στους 37°C. Μετά το πέρας της μίας ώρας προστέθηκε στο μείγμα 1μl του περιοριστικού ενζύμου DpnI, που μπορεί να πέψει τυχόν εναπομείναντα κυκλικά μεθυλιωμένα μόρια του αρχικού πλασμίδιου. Η αντίδραση αφέθηκε να συνεχιστεί για 40 λεπτά ακόμη.

Έπειτα, το προϊόν της πέψης καθαρίστηκε με τη χρήση του Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit, της New England Biolabs. Τέλος, η επανακυκλοποίηση του γραμμικού DNA έγινε με μία αντίδραση ligation, η οποία είχε ως εξής:

3μl <i>sgRNA backbone-PUC19</i> PCR (EcoRI)
2μl buffer T4 λιγάσης
1μl T4 λιγάση
14μl W.F.I.

Η αντίδραση κράτησε 1 ώρα, στον θερμοκυκλοποιητή, και οι συνθήκες της ήταν ίδιες με αυτές που έχουν περιγραφεί παραπάνω.

3.10. Εισαγωγή της *sgRNA αλληλουχίας* στο *sgRNA backbone* του *PUC19*

Αρχικά, έγινε μετασχηματισμός βακτηρίων *E. coli* με το νέο πλασμίδιο. Η διαδικασία είναι η ίδια που περιγράφηκε παραπάνω, με τη διαφορά ότι η ποσότητα

πλασμιδίου που χρησιμοποιήθηκε αυτή τη φορά ήταν 2μl. Επίσης, πριν τα βακτήρια μπουν στον επωαστήρα υπό ανάδευση εμβολιάστηκαν σε 900μl SOC. Τέλος, τα βακτήρια επιστρώθηκαν σε δύο τρυβλία Petri: στο 1^ο επιστρώθηκαν 10μl βακτηρίων και στο 2^ο, 100μl.

Την επομένη έγιναν υγρές καλλιέργειες των αποικιών που προέκυψαν στα τρυβλία. Απομονώθηκαν πέντε αποικίες από το τρυβλίο των 100μl, οι οποίες εμβολιάστηκαν σε Falcon που περιείχαν 4μl LB και αμπικιλλίνης. Οι συνθήκες επώασης ήταν οι ίδιες όπως πάντα.

Την επομένη έγινε απομόνωση DNA από κάθε καλλιέργεια με το E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit II της Omega Bio-Tek. Έπειτα το DNA ποσοτικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit.

Έπειτα προετοιμάστηκαν πέψεις με το περιοριστικό ένζυμο Bsmbl. Οι πέψεις είχαν ως εξής:

10μl sgRNA-PUC19 lig
3μl 3.1 buffer
1μl Bsmbl
16μl W.F.I.

Η παραπάνω αντίδραση έγινε πέντε φορές, μια με το DNA από κάθε miniprep. Όλες είχαν τελική συγκέντρωση 30μl και έγιναν στους 55°C, για 1,5 ώρα. Στη συνέχεια το αποτέλεσμα των πέντε αντιδράσεων ελέγχθηκε μέσω ηλεκτροφορήσεως σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8%. Από τις ζώνες που προέκυψαν απομονώθηκε η εντονότερη, από την οποία ελήφθη το DNA χρησιμοποιώντας το PureLink™ Quick Gel Extraction Kit της Invitrogen. Στη συνέχεια το DNA αυτό ποσοτικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit.

Οι αλληλουχίες sgRNA (crRNA) για τη β2-μικροσφαιρίνη προς ενσωμάτωση στο PUC19 ήταν δύο, και ήρθαν με τη μορφή δύο ολιγονουκλεοτιδίων η κάθε μία, τα οποία έπρεπε στη συνέχεια να ενωθούν. Και οι δύο αλληλουχίες sgRNA στόχευαν στο 1^ο εξόνιο του γονιδίου της β2-μικροσφαιρίνης. Η διαδικασία έγινε στο θερμοκυκλοποιητή, ως εξής:

🧪 Αντιδράσεις για τη δημιουργία κάθε sgRNA duplex:

2μl oligo1 (100μM)
2μl oligo2 (100μM)
16μl STE buffer

🧪 Συνθήκες:

Βήμα 1: 95°C, 5mins
Βήμα 2: Μείωση της θερμοκρασίας 3°C/min μέχρι τους 25°C

Όπου για το STE buffer: 10mM TrisHCl, 50mM NaCl, 0,1mM EDTA.

Οι αλληλουχίες των δύο ολιγονουκλεοτιδίων είχαν ως εξής:

- ❖ Αλληλουχία 1^{ου} sgRNA: 5'-TGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCGGTGTTTC-3'
3'-ACCGGAATCGACACGAGCGGCCACAAAG-5'

- ❖ Αλληλουχία 2^{ου} sgRNA: 5'-GGAGGCTATCCAGCGTGAGTCGGTGTTC-3'
3'-CCTCCGATAGGTCCGACTCAGCCACAAAG-5'

Στη συνέχεια οι δύο αλληλουχίες του sgRNA της β2-μικροσφαιρίνης ενσωματώθηκαν στο πλασμίδιο σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, αφού πρώτα αραιώθηκαν σε W.F.I. σε αναλογία 1:200:

2,5μl PUC19 (Bsmbl)
1μl sgRNA duplex
2μl buffer T4 λιγάσης
1μl T4 λιγάση
13,5μl W.F.I.

Τα δύο Eppendorf αφέθηκαν στο ψυγείο ώστε να γίνει η αντίδραση. Η αντίδραση έγινε δύο φορές και σε κάθε Eppendorf είχε όγκο 20μl.

3.11. Αξιολόγηση επιτυχίας της ένθεσης των sgRNA duplex στο sgRNA backbone

Αρχικά έγινε μετασχηματισμός βακτηρίων *E. coli* με τα δύο νέα πλασμίδια, που περιέχουν πλέον τα δύο sgRNA για τη β2-μικροσφαιρίνη. Η διαδικασία ήταν η ίδια που περιγράφηκε παραπάνω, μόνο που αυτή τη φορά χρησιμοποιήθηκαν 3μl πλασμιδιακού DNA για το μετασχηματισμό. Επίσης, πριν τα βακτήρια μπουν στον επωαστήρα υπό ανάδευση εμβολιάστηκαν σε 900μl LB. Τα βακτήρια στρώθηκαν σε δύο τρυβλία Petri, ένα για κάθε πλασμίδιο.

Την επόμενη μέρα διεξήχθη colony PCR των αποικιών. Το διάλυμα μετασχηματισμένων βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε αντίδραση προέκυψε διαλύοντας μία βακτηριακή αποικία σε 20μl W.F.I.. Για κάθε πλασμίδιο απομονώθηκαν από τα τρυβλία Petri δέκα αποικίες (συνολικά είκοσι). Για κάθε πλασμίδιο δημιουργήθηκε επιπλέον μία αντίδραση για θετικό και μία για αρνητικό control. Οι αντιδράσεις είχαν ως εξής:

Για την colony PCR:

2μl βακτήρια
2μl DreamTaq buffer
1μl dNTPs
0,5μl forward primer
0,5μl reverse primer
0,2μl DreamTaq πολυμεράση
13,8μl W.F.I.

Για τις συνθήκες της PCR:

- ❖ Initial denaturation: 95°C, 5mins
- ❖ Denaturation: 98°C, 30sec
- ❖ Annealing: 55°C, 30sec
- ❖ Extension: 72°C, 40sec
- ❖ Επανάληψη βημάτων 2-4: 34X
- ❖ Final extension: 72°C, 3mins

- ❖ Όπου forward primer: sgCF
Αλληλουχία: 5'-AATAGGGGTCCGCGCAC-3'

- ❖ Όπου reverse primer: B2mg2cR (1^o duplex) ή sg3PCRR (2^o duplex)
Αλληλουχία B2mg2cR: 5'-CAGCTAAGGCCAGTTTTAGAGCTAG-3'
Αλληλουχία sg3PCRR: 5'-TAGCCTCCGTTTTAGAGCTAG-3'

Η αντίδραση έγινε στο θερμοκυκλοποιητή και κράτησε 1,5 ώρα.

Στη συνέχεια έγινε έλεγχος των προϊόντων των αντιδράσεων PCR μέσω ηλεκτροφόρησης, σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5%. Με γνώμονα τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, επιλέχθηκαν τις αποικίες που αντιστοιχούσαν στις εντονότερες ζώνες. Επιλέχθηκαν τέσσερις αποικίες για κάθε πλασμίδιο. Από τα διαλύματα βακτηρίων που φτιάχτηκαν νωρίτερα, εμβολιάστηκαν 10μl σε 3ml θρεπτικού LB με 3μl αμπικιλίνης. Οι οχτώ καλλιέργειες αφέθηκαν να αναπτυχθούν για 20 ώρες.

Την επόμενη μέρα απομονώθηκαν τα πλασμίδια από τέσσερις από τις καλλιέργειες αυτές (δύο για κάθε πλασμίδιο) χρησιμοποιώντας το E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit II της Omega Bio-Tek, και το πλασμιδιακό DNA ποσοτικοποιήθηκε με χρήση του Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit.

Τις ημέρες που ακολούθησαν έγινε επίσης maxiprep των δύο πλασμιδίων sgRNA-PUC19.

Εφόσον πλέον τα πλασμίδια έχουν δημιουργηθεί και είναι έτοιμα για χρήση, ακολούθησαν τα πειράματα σε κυτταρικές σειρές.

3.12. Διαμόλυνση (transfection) των πλασμιδίων σε κύτταρα HEK293T

Αρχικά, έγινε έλεγχος της απόδοσης του συστήματος CRISPR/Cas9 που φέρουν τα πλασμίδια που δημιουργήθηκαν, σε κύτταρα της κυτταρικής σειράς **HEK293T** (Human Embryonic Kidney 293 cells που εκφράζουν μια μεταλλαγμένη μορφή του SV40 large T αντιγόνου).

Σε 6-well plate κυτταροκαλλιιεργειών είχαν επιστρωθεί και αφεθεί να αναπτυχθούν, σε κλίβανο και σε θερμοκρασία 37°C και παρουσίας 5% CO₂, κύτταρα HEK293T σε 1ml DMEM (high glucose) της Gibco™ που περιείχε 10% FCS (qualified, heat-inactivated), επίσης της Gibco™. Όταν τα κύτταρα μεγάλωσαν στα well έως 80%-90% confluency, ήταν έτοιμα να δεχτούν το πλασμιδιακό DNA.

Την ημέρα της διαμόλυνσης, αρχικά αφαιρέθηκε από το κάθε επιστρωμένο well το θρεπτικό υλικό και αντικαταστάθηκε με 1ml φρέσκου θρεπτικού μέσου. Στη συνέχεια, σε δύο Eppendorf προστέθηκαν 400μl DMEM σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Στο ένα προστέθηκαν συνολικά 2μg DNA (1^o sgRNA-PUC19 και Cas9-PUC19) και έγινε ανάδευση του μείγματος. Στο δεύτερο Eppendorf προστέθηκε PEI (polyethylenimine), τετραπλάσιων μl της μάζας του DNA (άρα 8μl), και έγινε ανάδευση του μείγματος. Έπειτα έγινε προσθήκη του μείγματος με το PEI στο μείγμα με το DNA, στάγδην. Το μείγμα PEI και DNA, στη συνέχεια, αναδεύτηκε σε vortex για μερικά δευτερόλεπτα και αφέθηκε σε RT για 20 λεπτά. Μετά το πέρας των 20 λεπτών, το περιεχόμενο του Eppendorf προστέθηκε στάγδην στα HEK293T, στο αντίστοιχο well. Η ίδια ακριβώς διαδικασία ακολούθηθηκε και για το 2^o sgRNA-PUC19 και Cas9-PUC19. Το 6-well plate

έπειτα μετακινήθηκε στον κλίβανο όπου αφέθηκε να επωαστεί μέχρι την επόμενη ημέρα.

Την επομένη, το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε και αντικαταστάθηκε με 1ml νέου, ώστε να αφαιρεθεί το τοξικό PEI. Έπειτα το plate επιστράφηκε στον κλίβανο.

Μετά από τέσσερις ημέρες, τα κύτταρα προετοιμάστηκαν για κυτταρομετρία ροής, ως εξής. Αρχικά, τοποθετήθηκαν 100μl κυττάρων από την κάθε συνθήκη σε σωληνάρια κυτταρομετρίας μαζί με 1ml PBS 0,1% BSA. Τα σωληνάρια αυτά φυγοκεντρήθηκαν σε 1.500rpm για 5 λεπτά. Έπειτα το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το βήμα αυτό επαναλήφθηκε ακόμη μία φορά. Στη συνέχεια, μετά την απόρριψη του υπερκειμένου προστέθηκε σε κάθε σωληνάριο 1μl του αντισώματος β2-Microglobulin Mouse anti-Human [PE, Clone: TÛ99] της BD Biosciences, το οποίο προσδένεται στην πολυπεπτιδική αλυσίδα της β2-μικροσφαιρίνης του MHC1. Μετά από ανάδευση μερικών δευτερολέπτων μέσω vortex, τα σωληνάρια αφέθηκαν προς επώαση στο ψυγείο για 20-30 λεπτά. Στη συνέχεια, σε κάθε σωληνάριο προστέθηκαν 2ml PBS 0,1% BSA και το μείγμα φυγοκεντρήθηκε ξανά σε 1.500rpm για 5 λεπτά. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για το Purified anti-human HLA-A,B,C Antibody [BV510, Clone: W6/32] αντίσωμα της BioLegend®, το οποίο προσδένεται στη μεγάλη πολυπεπτιδική αλυσίδα του MHC1. Μετά την τελική φυγοκέντρηση με PBS 0,1% BSA, προστέθηκαν σε κάθε σωληνάριο 0,6μl χρωστικής 7-AAD, η οποία είναι ικανή να προσδένεται μόνο στο DNA νεκρών κυττάρων. Μετά από αυτό το βήμα, τα σωληνάρια ήταν έτοιμα για τη διεξαγωγή της κυτταρομετρίας.

Εφόσον η αποσιώπηση του γονιδίου φάνηκε να πέτυχε στα HEK293T, σειρά έχει η αποσιώπηση σε T λεμφοκύτταρα.

3.13. Απομόνωση T λεμφοκυττάρων από ολικό αίμα

Αρχικά, σε ένα Falcon των 15ml επισιβάστηκε αίμα σε Ficoll σε αναλογία 2:1, αίμα:Ficoll. Τα Falcon έπειτα μεταφέρθηκαν σε φυγόκεντρο, όπου φυγοκεντρήθηκαν στους 19°C και στα 1.750rpm για 20 λεπτά χωρίς φρένο. Μετά το πέρας του διαστήματος αυτού, απομονώθηκε το buffy coat (περιέχει τα λευκοκύτταρα) που είχε σχηματιστεί, σε ένα Falcon των 15ml. Σε αυτό το Falcon προστέθηκαν 5ml DMEM complete (DMEM + 10% FCS + 1% Penicillin-Streptomycin) και έγινε ανάδευση του μείγματος ώστε τα κύτταρα να διαλυθούν στο υγρό. Έπειτα το Falcon φυγοκεντρήθηκε σε 1.500rpm για 5 λεπτά. Απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το ίδιο ακριβώς βήμα επαναλήφθηκε αυτούσιο, με DPBS (DPBS, no calcium, no magnesium). Τέλος, μετά την αφαίρεση του υπερκειμένου τα κύτταρα διαλύθηκαν σε 1ml RPMI complete.

Το πλήθος των απομονωμένων **PBMCs** (Peripheral Blood Mononuclear Cells) μετρήθηκε ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία. Αρχικά, σε δύο well ενός 96-well plate τοποθετήθηκαν 45μl Trypan Blue Solution 0,4% της Gibco™. Στο πρώτο well έπειτα τοποθετήθηκαν 5μl διαλύματος των PBMCs. Το μείγμα του well ανακατεύτηκε και έπειτα από αυτό απομονώθηκαν 5μl και τοποθετήθηκαν στο διπλανό well. Μετά από ανάμειξη, 10μl από το δεύτερο well τοποθετήθηκαν σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer και τα PBMCs μετρήθηκαν κάτω από μικροσκόπιο.

Στη συνέχεια, τα T λεμφοκύτταρα απομονώθηκαν από τα PBMCs με τη χρήση του Dynabeads® Untouched™ Human T Cells Kit της Invitrogen. Τέλος, μετρήθηκαν ακολουθώντας τη μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω.

3.14. Ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) των πλασμιδίων σε T λεμφοκύτταρα

Μετά την απομόνωση των T λεμφοκυττάρων, έγινε ηλεκτροδιάτρηση αυτών, ακολουθώντας επ' ακριβώς το πρωτόκολλο του Amara® Human T Cell Nucleofector® Kit (for unstimulated human T cells). Αυτή τη φορά, και τα δύο πλασμίδια των sgRNA για τη β2-μικροσφαιρίνη διαμολύνθηκαν στα ίδια κύτταρα, μαζί με το πλασμίδιο που έφερε την Cas9.

Έπειτα, τα electroporated T λεμφοκύτταρα προστέθηκαν σε 12-well plate με 2ml Optimizer complete (Optimizer με: Gibco™ CTS™ OpTmizer™ T Cell Expansion SFM + 1% Penicillin-Streptomycin + 1% Glutamax + 5% FCS). Μετά από σύντομη ανάδευση, τα κύτταρα αφέθηκαν στον κλίβανο μέχρι την επόμενη μέρα.

Την επομένη, τα κύτταρα αυτά απομονώθηκαν ώστε να ελεγχθεί το αποτέλεσμα της ηλεκτροδιάτρησης μέσω κυτταρομετρίας ροής. Η προετοιμασία των κυττάρων για την κυτταρομετρία ροής έγινε κατά τη διαδικασία που περιγράφηκε και παραπάνω, χρησιμοποιώντας τα ίδια αντισώματα. Δυστυχώς, δεν παρατηρήθηκε απαλοιφή του μορίου MHCI στα T λεμφοκύτταρα.

Παρόλα αυτά, με την ελπίδα ότι απαιτείται περισσότερος χρόνος για την διεξαγωγή της αντίδρασης, έγινε στη συνέχεια ενεργοποίηση των εναπομεινάντων T λεμφοκυττάρων. Αρχικά τα κύτταρα απομονώθηκαν και μετρήθηκαν. Έπειτα, 3×10^6 T λεμφοκύτταρα τοποθετήθηκαν σε ένα well ενός 6-well plate μαζί με 1ml Optimizer complete. Στο well αυτό προστέθηκαν 30μl T Cell TransAct™ (Human) Kit της Miltenyi Biotec, 1,5μl IL-7 και 1,5μl IL-15. Τέλος, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν στον κλίβανο προς επώαση.

Μετά από τρεις ημέρες έγινε αλλαγή του θρεπτικού υλικού. Την 4^η μέρα, τα ενεργοποιημένα πλέον T λεμφοκύτταρα προετοιμάστηκαν ξανά ώστε να παρατηρηθούν μέσω κυτταρομετρίας ροής, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Δυστυχώς, ούτε αυτή τη φορά φάνηκε μείωση του MHCI στην επιφάνεια των T λεμφοκυττάρων.

3.15. Διαμόλυνση (transfection) του LentiCRISPR v2 σε HEK293T

Κύτταρα HEK293T, τα οποία μεγάλωναν σε surface treated T75 φλάσκα, απομονώθηκαν και επιστρώθηκαν σε ένα 6-well plate. Σε κάθε well επιστρώθηκαν 600.000 κύτταρα και 2ml DMEM complete. Έπειτα αφέθηκαν στον κλίβανο να επωαστούν.

Την επομένη έγινε η διαμόλυνση του πλασμιδίου LentiCRISPR v2, σε μία απόπειρα να διαπιστωθεί αν κάποιο στοιχείο που διέθετε το πλασμίδιο αυτό είχε παραλειφθεί κατά τη δημιουργία του πλασμιδίου Cas9-PUC19. Σκοπός ήταν να διαπιστωθεί αν η χαμηλή απόδοση που παρατηρήθηκε κατά την αποσιώπηση του MHCI μορίου οφειλόταν στο σύστημα (πλασμιδιακό DNA) ή σε κάποια άλλη αιτία η οποία δεν είχε προβλεφθεί κατά την κλωνοποίηση στους δύο διακριτούς φορείς. Η διαμόλυνση έγινε με τη χρήση PEI. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ακριβώς ίδια με αυτή που

περιγράφηκε παραπάνω, μόνο που κάθε Eppendorf αυτή τη φορά διέθετε 50μl DMEM, και το PEI που χρησιμοποιήθηκε ήταν 4,5μl. Για τη διαδικασία της διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκαν δύο well, ένα για διαμόλυνση του ζεύγους 1^ο sgRNA-PUC19 + LentiCRISPR v2, και ένα για τη διαμόλυνση του ζεύγους 2^ο sgRNA-PUC19 + LentiCRISPR v2.

Μετά από μερικές ημέρες, η απόδοση της διαμόλυνσης παρατηρήθηκε στο κυτταρόμετρο. Η διαδικασία προετοιμασίας των HEK293T για την κυτταρομετρία έγινε όπως παραπάνω, με τα ίδια αντισώματα. Δυστυχώς, για ακόμη μια φορά δεν παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης των MHCI μορίων στην επιφάνεια των κυττάρων.

Εφόσον τα πλασμίδια που έχουν δημιουργηθεί και δοκιμαστεί μέχρι στιγμής δεν έχουν φέρει επιθυμητά αποτελέσματα, εστάλησαν προς αλληλούχηση για να εξακριβωθεί πως δεν είχε γίνει κάποιο σφάλμα κατά τη διαδικασία δημιουργίας τους. Η αλληλούχηση αυτή έδειξε ότι τα πλασμίδια είχαν κλωνοποιηθεί επιτυχώς και οι αλληλουχίες ήταν ακέραιες.

Αποφασίστηκε αλλαγή προσέγγισης, εφόσον η προσέγγιση των πλασμιδιακών φορέων φάνηκε πως δεν κατάφερε αποδοτικά να επιτύχει την αδρανοποίηση της β2-μικροσφαιρίνης. Έγινε λοιπόν χρήση ριβονουκλεοπρωτεϊνικών (RNP) συμπλόκων, δηλαδή συμπλόκων του ενζύμου της Cas9 μαζί με κάποιο guide RNA, το οποίο είναι υπεύθυνο να καθοδηγήσει το σύμπλοκο στο εκάστοτε επιθυμητό σημείο του γονιδιώματος για αποκοπή. Οι αλληλουχίες στόχευσης του MHCI ήταν και πάλι δύο, ως αποτέλεσμα δημιουργήθηκαν δύο διαφορετικά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα.

3.16. Ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) RNP συμπλόκων σε T λεμφοκύτταρα

Αρχικά έγινε απομόνωση PBMCs από ολικό αίμα, με τη χρήση Ficoll, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Αυτά μετρήθηκαν στο μικροσκόπιο, χρησιμοποιώντας το Trypan Blue Solution 0,4% της Gibco™. Στη συνέχεια, από τα PBMCs απομονώθηκαν τα T λεμφοκύτταρα χρησιμοποιώντας το Dynabeads® Untouched™ Human T Cells Kit της Invitrogen. Έπειτα, τα κύτταρα μετρήθηκαν για ακόμη μια φορά με τον ίδιο τρόπο.

Στη συνέχεια έγινε ηλεκτροδιάτρηση των T λεμφοκυττάρων, με τα RNP σύμπλοκα, χρησιμοποιώντας το Nucleofector® 2b Device. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε βασίστηκε στο Alt-R™ CRISPR-Cas9 System της Integrated DNA Technologies.

Αρχικά έπρεπε να υβριδιστούν τα ολιγονουκλεοτίδια RNA, το Alt-R CRISPR-Cas9 crRNA και το Alt-R CRISPR-Cas9 tracrRNA, σε ένα σύμπλοκο που ονομάζεται sgRNA. Για την περάτωση του παραπάνω, κάθε ολιγονουκλεοτίδιο [δύο crRNA, ένα tracrRNA (κοινό)] διαλύθηκε σε IDTE buffer, έτσι ώστε να βρίσκεται σε τελική συγκέντρωση 100μM. Στη συνέχεια, κάθε crRNA αναμείχθηκε με το tracrRNA σε Eppendorf, όπως φαίνεται παρακάτω:

5μl Alt-R CRISPR-Cas9 crRNA (100μM)
5μl Alt-R CRISPR-Cas9 tracrRNA (100μM)

Τα δύο crRNA που χρησιμοποιήθηκαν στόχευαν στο 2^ο εξόνιο του γονιδίου της β2-μικροσφαιρίνης και οι αλληλουχίες τους ήταν οι εξής:

- ❖ Αλληλουχία 1ου crRNA (Hs.Cas9.B2M.1.AA): 5'-CGTGAGTAAACCTGAATCTT-3'
- ❖ Αλληλουχία 2ου crRNA (Hs.Cas9.B2M.1.AB): 5'-AAGTCAACTTCAATGTCGGA-3'

Ως αποτέλεσμα, κάθε μια από τις δύο αντιδράσεις είχε τελικό όγκο 10μl. Στη συνέχεια, τα δύο Erppendorf θερμάνθηκαν στους 95°C στο θερμοκυκλοποιητή για 5 λεπτά. Μετά το πέρασ των 5 λεπτών οι αντιδράσεις αφέθηκαν να κρυσώσουν σε RT.

Για τη συναρμολόγηση των RNP συμπλόκων, δηλαδή τον σχηματισμό συμπλόκου του crRNA/tracrRNA duplex με το ένζυμο της Cas9, οι δύο αντιδράσεις είχαν ως εξής:

16μl PBS
2,4μl Alt-R guide RNA (crRNA/tracrRNA)
1,8μl Alt-R Cas9 enzyme (62μM stock)

Κάθε αντίδραση είχε τελικό όγκο ~20μl και επώαστηκε σε RT για 20 λεπτά.

Στη συνέχεια προετοιμάστηκαν οι αντιδράσεις ηλεκτροδιάτρησης των T λεμφοκυττάρων. Για κάθε αντίδραση ηλεκτροδιάτρησης χρησιμοποιήθηκαν 10⁷ T λεμφοκύτταρα, από τα οποία αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό μέσω φυγοκέντρησης (1500rpm για 10 λεπτά). Επαναδιαλύθηκαν σε 100μl Nucleofector® Solution. Στα κύτταρα, έπειτα, προστέθηκαν 5μl μείγματος από το κάθε RNP και 0,5μl Electroporation Enhancer. Μετά από την ομογενοποίηση του μείγματος αυτού, μεταφέρθηκε όλο σε cuvette και στη συνέχεια στο Nucleofector® 2b Device, όπου έγινε ηλεκτροδιάτρηση των κυττάρων στο πρόγραμμα U-014. Όταν η διαδικασία ολοκληρώθηκε προστέθηκαν 200μl Optimizer complete στο cuvette, και έπειτα τα κύτταρα μετακινήθηκαν σε well ενός 48-well plate μαζί με άλλα 500μl Optimizer complete.

Τέλος, 24 ώρες αργότερα τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με 100μl του T Cell TransAct™ (Human) Kit της Miltenyi Biotec και 10μl IL-7, IL-15, όπως έχει ήδη περιγραφεί παραπάνω, και αφέθηκαν στον κλίβανο προς επώαση.

Την 3^η ημέρα της επώασης έγινε αλλαγή του θρεπτικού υλικού των δύο well, και την επομένη τα κύτταρα προετοιμάστηκαν για παρατήρηση στο κυτταρόμετρο. Η διαδικασία προετοιμασίας ήταν ακριβώς η ίδια που έχει περιγραφεί και παραπάνω, μόνο που η αυτή τη φορά χρησιμοποιήθηκε μόνο το αντίσωμα Purified anti-human HLA-A,B,C Antibody [BV510, Clone: W6/32] της BioLegend®.

Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας αυτή τη φορά έδειξαν μια μείωση του μορίου MHCI από την επιφάνεια των T λεμφοκυττάρων στο 30% του πληθυσμού, οπότε το πείραμα πλέον μπορούσε να επαναληφθεί με CAR-T κύτταρα.

3.17. Παραγωγή και συλλογή ιών lenti CAR19 και foamy από HEK293T

Για την παραγωγή των ιών απαιτήθηκε αρχικά επίστρωση HEK293T σε τρυβλία Petri. Η επίστρωση έγινε σε πέντε τρυβλία, στα οποία τα κύτταρα αφέθηκαν να μεγαλώσουν έως περίπου 90% confluency. Όταν αυτό επιτεύχθηκε, έγινε διαμόλυνση των πλασμιδίων που έφεραν τα απαραίτητα γονίδια για την παραγωγή των ιών lenti και

foamy, μαζί με το πλασμίδιο που έφερε το γονίδιο CAR. Οι αντιδράσεις για τη δημιουργία κάθε ιού είχαν ως εξής:

✚ Για τον ιό foamy:

37,02μl foamy CAR19 transfer plasmid

12,21μl PCINGS

1,41μl PCINPS

2,46μl PCINES

~53μl DNA

✚ Για τον ιό lenti:

12,04μl lenti CAR19 transfer plasmid

62,5μl PSPACX2

6,52μl PMDG2

~81μl DNA

Για τη διαμόλυνση με PEI στα HEK293T, χρειάστηκαν δύο Eppendorf για κάθε ιό. Όλα τα Eppendorf είχαν τελικό όγκο αντίδρασης 400μl. Για τον ιό foamy, στο ένα Eppendorf τοποθετήθηκαν 347μl DMEM και 53μl DNA, ενώ στο άλλο 284μl DMEM και 116μl PEI. Για τον ιό lenti, στο ένα Eppendorf τοποθετήθηκαν 320μl DMEM και 81μl DNA, ενώ στο άλλο 264μl DMEM και 136μl PEI. Έπειτα μεταφέρθηκε στάγδην το μείγμα του PEI στο μείγμα του DNA, και στο τελικό μείγμα έγινε σύντομο vortex. Τα δύο, πλέον, Eppendorf για την κάθε αντίδραση αφέθηκαν να επωαστούν για 20 λεπτά σε RT. Το τελικό μείγμα για κάθε διαμόλυνση είχε τελικό όγκο 800μl. Για κάθε τρυβλίο Petri προετοιμάστηκε ένα τέτοιο μείγμα ξεχωριστά, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Στη συνέχεια, σε κάθε τρυβλίο Petri (τα οποία περιείχαν 8ml DMEM 10% FCS το καθένα), μεταφέρθηκαν στάγδην 800μl από κάθε τελική αντίδραση. Συνολικά δημιουργήθηκαν τρία τρυβλία για τον ιό foamy και δύο για τον ιό lenti. Τα πέντε τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας τοποθετήθηκαν στον κλίβανο προς επώαση. Έξι ώρες αργότερα αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο και αντικαταστάθηκε με 10ml φρέσκου DMEM 10% FCS.

Μετά από δύο ημέρες έγινε η 1^η συλλογή του υπερκειμένου των τρυβλίων, μόνο για τον ιό lenti, όπου το θρεπτικό υλικό συλλέχθηκε με πιπέτα και αντικαταστάθηκε με 10ml φρέσκου. Το θρεπτικό που συλλέχθηκε τοποθετήθηκε σε Falcon και φυγοκεντρήθηκε στα 3.000g για 10 λεπτά, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν κύτταρα που είχαν αποκολληθεί. Έπειτα, το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης περάστηκε από φίλτρο 0,45μm, ώστε να απομακρύνονταν από αυτό μικρά κυτταρικά θραύσματα. Τέλος, η πλειονότητα του ιού αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη στους -80°C σε Falcon, ενώ κρατήθηκαν 200μl για την επακόλουθη τιτλοδότησή του. Στην περίπτωση του ιού foamy, προστέθηκε DMSO με τελική συγκέντρωση 5% v/v.

Την επομένη έγινε η 2^η συλλογή του ιού lenti και η 1^η συλλογή του ιού foamy. Μετά από μία ημέρα ακόμη έγινε η 2^η συλλογή του ιού foamy. Για τον καθαρισμό και την αποθήκευση του υπερκειμένου ακολουθήθηκε επ' ακριβώς η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω.

Την ημέρα της 2^{ης} συλλογής του ιού foamy έγινε και τη συμπύκνωση των ιών. Αυτό έγινε τοποθετώντας, αρχικά, όλο το υπερκείμενο που είχε συλλεχθεί τις προηγούμενες μέρες στα ειδικά σωληνάρια της υπερφυγοκέντρου. Κάθε σωληνάριο ζυγίστηκε, ώστε όλα να είχαν το ίδιο βάρος ως και το 2^ο δεκαδικό ψηφίο. Έπειτα, τα σωληνάρια μεταφέρθηκαν όλα στην υπερφυγόκεντρο HITACHI SORVAL 100SE DISCOVERY, όπου φυγοκεντρήθηκαν στα 27.000rpm για 1,5 ώρα. Μετά το πέρας αυτής της ώρας, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και σε κάθε σωληνάριο προστέθηκαν 50μl θρεπτικού υλικού. Το ίζημα του ιού επαναιωρήθηκε και συλλέχθηκε σε Eppendorf 1,5ml. Για κάθε ιό απομονώθηκαν 20μl συμπυκνωμένου ιού για την επακόλουθη τιτλοδότηση.

3.18. Τιτλοδότηση (titration) των ιών lenti CAR19 και foamy CAR19

Τις προηγούμενες ημέρες είχαν επιστρωθεί σε 12-well plate, κύτταρα HEK293T. Την ημέρα της τιτλοδότησης, τα κύτταρα καταμετρήθηκαν. Χρησιμοποιήθηκαν 110.000 κύτταρα HEK293T ανά τιτλοδότηση. Το θρεπτικό υλικό του κάθε well αντικαταστάθηκε με 1ml φρέσκου. Σε κάθε well προστέθηκε ορισμένη ποσότητα ιού, συμπυκνωμένου και μη, και για τους δύο ιούς. Συνολικά υπήρχαν έξι well για τον ιό lenti και έξι well για τον ιό foamy. Οι ποσότητες ιού που προστέθηκαν σε κάθε well, είχαν ως εξής και για τους δύο ιούς που τιτλοδοτήθηκαν:

- ❖ **Μη συμπυκνωμένος ιός (crude):** 25μl, 50μl, 100μl
- ❖ **Συμπυκνωμένος ιός (concentrated):** 1μl, 5μl, 10μl

Στη συνέχεια, τα κύτταρα αφέθηκαν στον κλίβανο προς επώαση. Η απόδοση επιμόλυνσης του κάθε ιού μετρήθηκε μετά από 3 ημέρες μέσω κυτταρομετρίας ροής, χρησιμοποιώντας την πρωτεΐνη Recombinant human CD19 protein (Fc Chimera) της Abcam, η οποία προσδένεται πάνω στον υποδοχέα CAR, και το αντίσωμα Goat F(ab')₂ Anti-Human IgG – Fc [PE, pre-adsorbed] της Abcam, το οποίο προσδένεται πάνω στην περιοχή Fc της χμιαϊκής πρωτεΐνης CD19 και φέρει το φθορίζον μόριο PE, που ανιχνεύει το κυτταρόμετρο. Η διαδικασία της τιτλοδότησης είχε ως σκοπό την καταμέτρηση του λειτουργικού τίτλου του ιού, δηλαδή της ποσότητας των ισωματιών που παρήχθησαν.

3.19. Επιμόλυνση (transduction) των T λεμφοκυττάρων με τους ιούς lenti CAR19 και foamy CAR19

Αρχικά, τα T λεμφοκύτταρα απομονώθηκαν από το ολικό αίμα όπως ακριβώς έχει περιγραφεί και προηγουμένως και ενεργοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το T Cell TransAct™ (Human) Kit της Miltenyi Biotec και τις κυτταροκίνες IL-7 και IL-15. Μετά την ενεργοποίηση των κυττάρων, παρέμειναν στον κλίβανο για 3 ημέρες.

Μετά το πέρας των τριών ημερών, στα well ενός 12-well plate τοποθετήθηκαν 10⁶ T λεμφοκύτταρα. Έπειτα, σε κάθε well που θα τοποθετούνταν ο ιός lenti τοποθετήθηκαν 8μl polybrene, ενώ σε κάθε well του ιού foamy τοποθετήθηκαν 5μl heparin. Επίσης, σε κάθε well τοποθετήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις των ιών lenti και foamy, μαζί με 1μl από τις IL-7 και IL-15. Τέλος, συμπληρώθηκε η απαραίτητη ποσότητα Optimizer complete, ώστε σε κάθε well να υπάρχει τελικός όγκος 1ml. Το plate σφραγίστηκε με ταινία parafilm στις άκρες και μεταφέρθηκε σε φυγόκεντρο, όπου

φυγοκεντρήθηκε στις 1.200g για 1 ώρα και σε RT. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης το 12-well plate μεταφέρθηκε στον κλίβανο προς επώαση.

Την επόμενη ημέρα από την επιμόλυνση των ιών έγινε αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού κάθε well.

Την 3^η ημέρα μετά την επιμόλυνση, τους έγινε κυτταρομετρία ροής για να μετρηθεί το ποσοστό έκφρασης του υποδοχέα CAR στην επιφάνειά τους. Για την κυτταρομετρία χρησιμοποιήθηκε η ίδια διαδικασία και οι ίδιες πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν και στην κυτταρομετρία που έγινε για την τιτλοδότηση. Έπειτα, τα κύτταρα παρέμειναν στον κλίβανο για πέντε ημέρες ακόμη, ώστε η ενεργοποίηση να εξασθενούσε και να ήταν δυνατή η ηλεκτροδιάτρηση των κυττάρων με το πρόγραμμα του Nucleofector® 2b Device για μη ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα (U-014).

3.20. Ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) RNP συμπλόκων σε CAR-T κύτταρα

Η δημιουργία των RNA duplex και των RNP συμπλόκων, καθώς και η ηλεκτροδιάτρηση, έγιναν ακολουθώντας τα βήματα που περιγράφηκαν και παραπάνω. Αμέσως μετά την ηλεκτροδιάτρηση τα CAR-T ενεργοποιήθηκαν εκ νέου, ακολουθώντας τη γνωστή διαδικασία, και τοποθετήθηκαν στον κλίβανο. Την επομένη έγινε αλλαγή του θρεπτικού τους υλικού και αφέθηκαν εκ' νέου στον κλίβανο.

Την 5^η ημέρα μετά την ηλεκτροδιάτρηση, τα κύτταρα προετοιμάστηκαν ώστε να παρατηρηθούν μέσω κυτταρομετρίας ροής. Η διαδικασία χρώσης είχε όπως περιγράφηκε παραπάνω. Χρησιμοποιήθηκαν η πρωτεΐνη Recombinant human CD19 protein (Fc Chimera) της Abcam και το αντίσωμα Goat F(ab')₂ Anti-Human IgG - Fc [PE, pre-adsorbed] της Abcam, ώστε να ανιχνευθεί η έκφραση του υποδοχέα CAR στα T λεμφοκύτταρα, και το Purified anti-human HLA-A,B,C Antibody [BV510, Clone: W6/32] αντίσωμα της BioLegend®, ώστε να ανιχνευθεί η έκφραση του MHC1.

Η παρατήρηση στην κυτταρομετρία ροής έδειξε ότι, όπως και την προηγούμενη φορά, υπήρξε μείωση της έκφρασης του μορίου MHC1 στην κυτταρική μεμβράνη, αυτή τη φορά της τάξεως του 68% στον κυτταρικό πληθυσμό.

Αποφασίστηκε η εκ νέου διεξαγωγή των παραπάνω πειραμάτων της ηλεκτροδιάτρησης, με σκοπό αφενός την περαιτέρω βελτίωση του ποσοστού επιτυχίας της αποσιώπησης της β2-μικροσφαιρίνης σε μεγαλύτερο ποσοστό των T λεμφοκυττάρων, και αφετέρου την εξακρίβωση ότι το ποσοστό απαλοιφής του μορίου MHC1 είναι επαναλήψιμο. Για την περάτωση των νέων ηλεκτροδιατρήσεων, ακολουθήθηκαν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις. Κατά την πρώτη προσέγγιση τα T λεμφοκύτταρα ενεργοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το TransAct, ενώ κατά τη δεύτερη προσέγγιση τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας Dynabeads. Επιπλέον, κατά τη 2^η προσέγγιση έγινε ηλεκτροδιάτρηση και σε κύτταρα τα οποία δεν ήταν αρχικά ενεργοποιημένα. Τέλος, και στις δύο προσεγγίσεις αυξήθηκε η ποσότητα των RNP συμπλόκων που χορηγήθηκε σε σχέση με τα προηγούμενα πειράματα, αλλά η αύξηση αυτή δεν ήταν ίδια και στις δύο περιπτώσεις.

3.21. 1^η Προσέγγιση – Ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) RNP συμπλόκων σε ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα με TransAct

Αρχικά, PBMCs τα οποία είχαν ληφθεί από δότες ενεργοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το TransAct™ (Human) Kit της Miltenyi Biotec και IL-2, όπως έχει ήδη περιγραφεί, και τοποθετήθηκαν στον κλίβανο προς επώαση. Μετά από τρεις ημέρες έγινε αλλαγή του θρεπτικού τους υλικού, ώστε να απομακρυνόταν το TransAct, και το plate επανατοποθετήθηκε στον κλίβανο για τρεις ημέρες ακόμη.

Την 3^η ημέρα τα κύτταρα μετρήθηκαν, και από αυτά απομονώθηκαν τα T λεμφοκύτταρα ακολουθώντας το Dynabeads® Untouched™ Human T Cells Kit της Invitrogen.

Στη συνέχεια έγινε η προετοιμασία των RNP συμπλόκων για την ηλεκτροδιάτρηση. Αυτή τη φορά χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις RNPs. Η αντίδραση είχε ως εξής:

3μl 1 ^ο Alt-R guide RNA (crRNA/tracrRNA)
3μl 2 ^ο Alt-R guide RNA (crRNA/tracrRNA)
4μl Alt-R Cas9 enzyme (62μM stock)

Χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια gRNA duplex που είχαν παραχθεί αρχικά. Μετά από ανάδευση του μείγματος, το Eppendorf αφέθηκε για 10 λεπτά σε RT. Στη συνέχεια, στο μείγμα αυτό προστέθηκαν 4μl Electroporation Enhancer. Το μείγμα είχε τελικό όγκο 14μl.

Στη συνέχεια, προετοιμάστηκαν οι αντιδράσεις ηλεκτροδιάτρησης των T λεμφοκυττάρων. Για κάθε αντίδραση ηλεκτροδιάτρησης χρησιμοποιήθηκαν 10⁷ T λεμφοκύτταρα, από τα οποία αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό μέσω φυγοκέντρησης (1.500 rpm για 10 λεπτά). Τα κύτταρα αυτά επαναιωρήθηκαν σε 100μl Nucleofector® Solution, και έπειτα σε αυτά προστέθηκαν 7μl του μείγματος των RNP. Μετά από ομογενοποίηση του μείγματος αυτού, αφέθηκε για 1 λεπτό σε RT προς επώαση. Στη συνέχεια, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε cuvette και στη συνέχεια στο Nucleofector® 2b Device, όπου έγινε η ηλεκτροδιάτρησή τους στο πρόγραμμα U-014. Μετά το πέρας της ηλεκτροδιάτρησης στην cuvette προστέθηκαν 200μl RPMI complete (RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™ Supplement της Gibco™), και έπειτα το μείγμα αφέθηκε για 10 λεπτά σε RT. Τέλος, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε 24-well-plate με 1ml RPMI complete, και αφέθηκαν να επωαστούν στον κλίβανο. Την επόμενη μέρα έγινε αλλαγή θρεπτικού των κυττάρων και προστέθηκαν σε αυτά 0,5μl IL-2.

Η παραπάνω διαδικασία έγινε δύο φορές.

3.22. 2^η Προσέγγιση – Ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) RNP συμπλόκων σε ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα με Dynabeads Human T-Activator και σε T λεμφοκύτταρα σε ηρεμία

Αρχικά, PBMCs τα οποία είχαν ληφθεί από δότες ενεργοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 for T Cell Expansion and Activation της Gibco™, και τοποθετήθηκαν στον κλίβανο προς επώαση, για πέντε ημέρες, σε Optimizer complete με IL-2.

Παράλληλα, την ημέρα που θα γινόταν η ηλεκτροδιάτρηση απομονώθηκαν από ολικό αίμα δότη, χρησιμοποιώντας Ficoll όπως έχει ήδη περιγραφεί, PBMCs. Τα PBMCs έπειτα μετρήθηκαν και από αυτά απομονώθηκαν τα T λεμφοκύτταρα, ακολουθώντας το Dynabeads® Untouched™ Human T Cells Kit της Invitrogen. Τα κύτταρα αυτά αφέθηκαν μη ενεργοποιημένα.

Στη συνέχεια έγινε η προετοιμασία για την ηλεκτροδιάτρηση. Συγκρίνοντας με την προηγούμενη αντίδραση, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις RNPs. Η αντίδραση δημιουργίας των RNP συμπλόκων είχε ως εξής:

4μl 1° Alt-R guide RNA (crRNA/tracrRNA)
4μl 2° Alt-R guide RNA (crRNA/tracrRNA)
6,45μl Alt-R Cas9 enzyme (62μM stock)
19,5μl PBS

Χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια gRNA duplex που είχαν δημιουργηθεί αρχικά. Μετά από ανάδευση του μείγματος, το Eppendorf αφέθηκε για 20 λεπτά σε RT.

Τα ενεργοποιημένα με Dynabeads κύτταρα, μετά από ανάδευση τοποθετήθηκαν σε Eppendorf και έπειτα στον μαγνήτη DynaMag™-2 της Invitrogen, ώστε να απομακρυνθούν τα Dynabeads. Έπειτα, τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε θρεπτικό υλικό και επανατοποθετήθηκαν στο μαγνήτη. Τέλος, επαναιωρήθηκαν σε PBS και φυγοκεντρήθηκαν σε 100g για 7 λεπτά. Η πλύση αυτή έγινε δύο φορές.

Στη συνέχεια προετοιμάστηκαν οι αντιδράσεις ηλεκτροδιάτρησης των T λεμφοκυττάρων, οι οποίες έγιναν με ακριβώς τον ίδιο τρόπο, μόνο που αυτή τη φορά στα κύτταρα προστέθηκαν 16μl του μείγματος των RNP με 2μl Electroporation Enhancer. Επίσης, για τα ενεργοποιημένα κύτταρα η ηλεκτροδιάτρηση έγινε με το πρόγραμμα T-020, ενώ στα μη ενεργοποιημένα κύτταρα εφαρμόστηκε το πρόγραμμα U-014. Τέλος, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε 24-well-plate με 1ml RPMI complete και αφέθηκαν να επωαστούν στον κλίβανο, χωρίς την προσθήκη IL-2.

Τα μη ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα ενεργοποιήθηκαν την επόμενη ημέρα χρησιμοποιώντας το TransAct™ (Human) Kit της Miltenyi Biotec και IL-2. Έπειτα επιστράφηκαν στον κλίβανο για επώαση.

Μετά από μερικές ημέρες, τα κύτταρα των παραπάνω πειραμάτων προετοιμάστηκαν ώστε να παρατηρηθούν μέσω κυτταρομετρίας ροής. Οι χρώσεις έγιναν όπως έχει ήδη περιγραφεί, χρησιμοποιώντας το Purified anti-human HLA-A,B,C Antibody [BV510, Clone: W6/32] αντίσωμα της BioLegend®, ώστε να μετρηθεί το ποσοστό έκφρασης του MHC I.

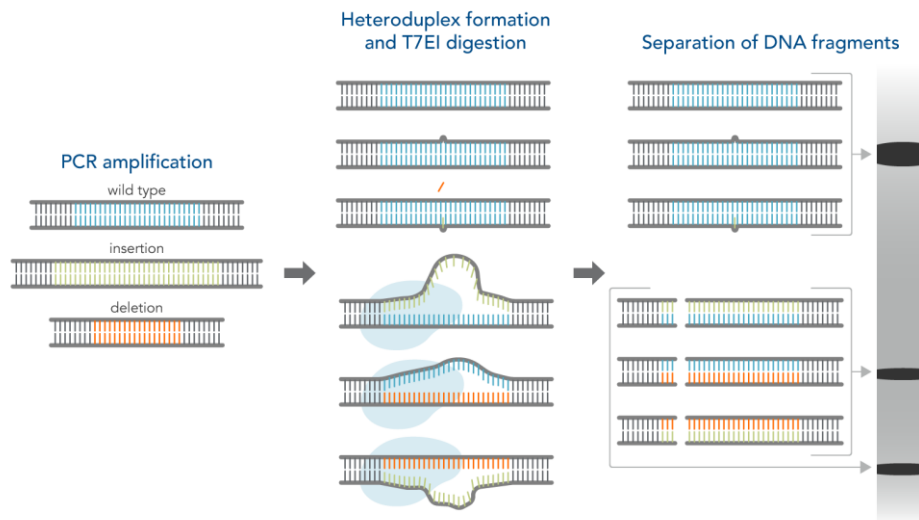
Αυτή τη φορά παρατηρήθηκε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό ελάττωσης του MHC I στα κύτταρα, που έφτασε έως και το 90%.

3.23. Μοριακός έλεγχος της αποσιώπησης του γονιδίου της β2-μικροσφαιρίνης

Για να εξακριβωθεί και σε μοριακό επίπεδο ότι τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας αντικατόπτριζαν πραγματικά την αποσιώπηση της β2-μικροσφαιρίνης, έγινε έλεγχος του DNA που απομονώθηκε από τα κύτταρα στα οποία έγινε η ηλεκτροδιάτρηση.

Αρχικά, λοιπόν, απομονώθηκαν κύτταρα από κάθε πείραμα ηλεκτροδιάτρησης που έγινε. Συνολικά είχαν γίνει τέσσερα διαφορετικά πειράματα ηλεκτροδιάτρησης, οπότε απομονώθηκαν τέσσερις πληθυσμοί T λεμφοκυττάρων. Στη συνέχεια, έγινε επεξεργασία του κάθε ενός από τους τέσσερις αυτούς πληθυσμούς ακολουθώντας επ' ακριβώς το NucleoSpin® Tissue Kit της Macherey-Nagel, ώστε να γίνει εκχύλιση του γενωμικού DNA, στο οποίο θα ελεγχθεί η απόδοση της αποκοπής του γονιδίου της β2-μικροσφαιρίνης μέσω CRISPR/Cas9.

Στη συνέχεια ακολουθήθηκε το Alt-R™ Genome Editing Detection Kit της Integrated DNA Technologies. Πρόκειται για μία διαδικασία που περιλαμβάνει την ενίσχυση του τμήματος του DNA που τροποποιήθηκε γενετικά, μέσω PCR. Στη συνέχεια γίνεται διαχωρισμός των δύο αλυσίδων των προϊόντων της PCR και ακολουθεί ο εκ νέου υβριδισμός τους. Στον πληθυσμό των κυττάρων από τα οποία εκχυλίζεται το DNA υπάρχουν κύτταρα που έχουν τροποποιηθεί γενετικά, καθώς και μη τροποποιημένα κύτταρα. Κατά την αντίδραση της PCR προκύπτουν δύο είδη ενισχυμένων προϊόντων: 1. προϊόντα ενίσχυσης στα οποία το CRISPR σύστημα έχει απαλείψει μία βάση ή γονιδιακό τμήμα, και 2. προϊόντα ενίσχυσης από μη τροποποιημένα κομμάτια DNA. Ως αποτέλεσμα, τα νέα δίκλιωνα μόρια που προκύπτουν είτε εμφανίζουν κανονικό και πλήρη υβριδισμό, αν δεν έχει επιτύχει η γενετική τροποποίηση του DNA, είτε εμφανίζουν βρόχους λόγω μερικού υβριδισμού από κενά στην αλληλουχία μιας εκ των δύο αλυσίδων, αν αυτή έχει επιτύχει. Έπειτα, στο μείγμα αυτό των μορίων προστίθεται η T7EI περιοριστική ενδονουκλεάση, η οποία αναγνωρίζει τους βρόχους αυτούς, αν υπάρχουν, και κόβει το DNA σε εκείνο το σημείο. Παρακάτω φαίνεται μια σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας που μόλις περιγράφηκε (**Εικόνα 17**).



Εικόνα 17: Απεικόνιση της PCR, της δημιουργίας ετεροδιμερών και των πέψων του DNA από την περιοριστική ενδονουκλεάση T7E1 ⁸⁶.

Η παραπάνω διαδικασία έγινε όπως ακριβώς περιγράφηκε στο Alt-R™ Genome Editing Detection Kit της Integrated DNA Technologies, με τη διαφορά ότι η PCR διεξήχθη χρησιμοποιώντας το ένζυμο Q5 DNA πολυμεράση, αντί για την DNA πολυμεράση KAPA που πρότεινε το Kit.

🧪 Η βάση των τεσσάρων αντιδράσεων είχε ως εξής:

x DNA ηλεκτροδιάτρητων κυττάρων (40ng)

10μl Q5 buffer 5X

2,5μl forward primer 10μM

2,5μl reverse primer 10μM

1μl dNTPs 10mM

0,5μl Q5 DNA πολυμεράση

γ W.F.I. (έως τελικό όγκο 50μl)

- ❖ Όπου forward primer: b2mgenF
Αλληλουχία: 5'-CAGAAGTCCTTGAGAGCCTCC-3'
- ❖ Όπου forward primer: B2MgenR
Αλληλουχία: 5'-CCATACCTGGGGCCATACAC-3'

✚ Για τις δύο αντιδράσεις ελέγχου-control του kit:

1μl Alt-R Control A (template/primer mix)	2μl Alt-R Control B (template/primer mix)
5μl Q5 buffer 5X	5μl Q5 buffer 5X
1,2μl dNTPs 10mM	1,2μl dNTPs 10mM
0,5μl Q5 DNA πολυμεράση	0,5μl Q5 DNA πολυμεράση
17,3μl W.F.I.	17,3μl W.F.I.

✚ Για τις συνθήκες της PCR:

Initial denaturation: 98°C, 3mins

Denaturation: 98°C, 15sec

Annealing: 68°C, 10sec

Extension: 72°C, 70sec

Επανάληψη βημάτων 2-4: 33X

Final extension: 72°C, 5mins

Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα στον θερμοκυκλοποιητή και διήρκησαν 1 ώρα και 25 λεπτά.

Στη συνέχεια, ακολούθησε ο διαχωρισμός των αλυσίδων των προϊόντων της κάθε αντίδρασης PCR και η εκ νέου υβριδοποίησή τους. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα δύο control του kit. Οι αντιδράσεις ήταν συνολικά έξι (τέσσερα DNA δειγμάτων, δύο DNA control) έλαβαν μέρος στον θερμοκυκλοποιητή και είχαν ως εξής:

10μl PCR προϊόν
2μl T7EI Reaction Buffer
6μl W.F.I.

Όσον αφορά τα control του kit οι αντιδράσεις ήταν οι ίδιες, μόνο που το DNA που ενισχύθηκε στις περιπτώσεις εκείνες ήταν 10μl Control A και 5μl Control A + 5μl Control B. Όλες οι αντιδράσεις είχαν τελικό όγκο 18μl. Στον θερμοκυκλοποιητή εφαρμόστηκαν οι εξής συνθήκες:

Denaturation: 95°C, 10mins
Ramp 1: Μείωση της θερμοκρασίας 2°C/sec μέχρι τους 85°C
Ramp 2: Μείωση της θερμοκρασίας 0,3°C/sec μέχρι τους 25°C

Τέλος, σε κάθε Eppendorf προστέθηκαν επιπλέον 2μl T7 ενδονουκλεάσης I (1U/μl) και το μείγμα επώαστηκε στο υδατόλουτρο, στους 37°C, για 1 ώρα.

Μετά την ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου, τα προϊόντα των αντιδράσεων ελέγχθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 1%. Από την ηλεκτροφόρηση προέκυψε ότι η αδρανοποίηση της β2-μικροσφαιρίνης είχε όντως συμβεί, οπότε και τα αποτελέσματα που έδωσαν οι κυτταρομετρίες ήταν επίσης αληθή.

4. Αποτελέσματα

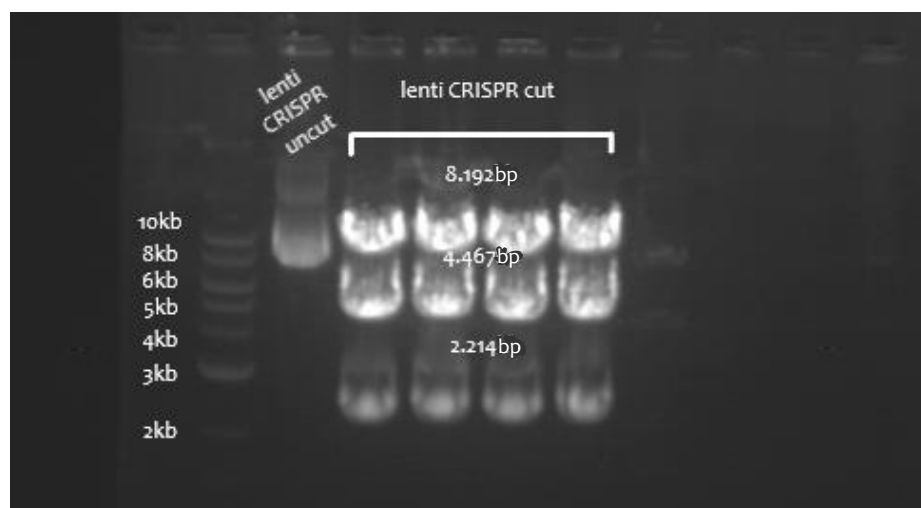
4.1. Κατασκευή πλασμιδιακών φορέων Cas9-PUC19 και sgRNA backbone-PUC19.

Αρχικά, έγιναν πέψεις των PUC19 και LentiCRISPR v2 ώστε να απομονωθούν τα απαραίτητα τμήματα DNA από το LentiCRISPR v2 (γονίδιο Cas9 και sgRNA backbone), και του πλασμιδιακού φορέα PUC19, ώστε να αποκτήσει τα κατάλληλα κολλώδη άκρα. Το αποτέλεσμα των πέψεων των πλασμιδίων αυτών ελέγχθηκε μέσω ηλεκτροφορήσεων του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 0,8% (**Εικόνα 18**, **Εικόνα 19**). Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση φαίνονται παρακάτω:

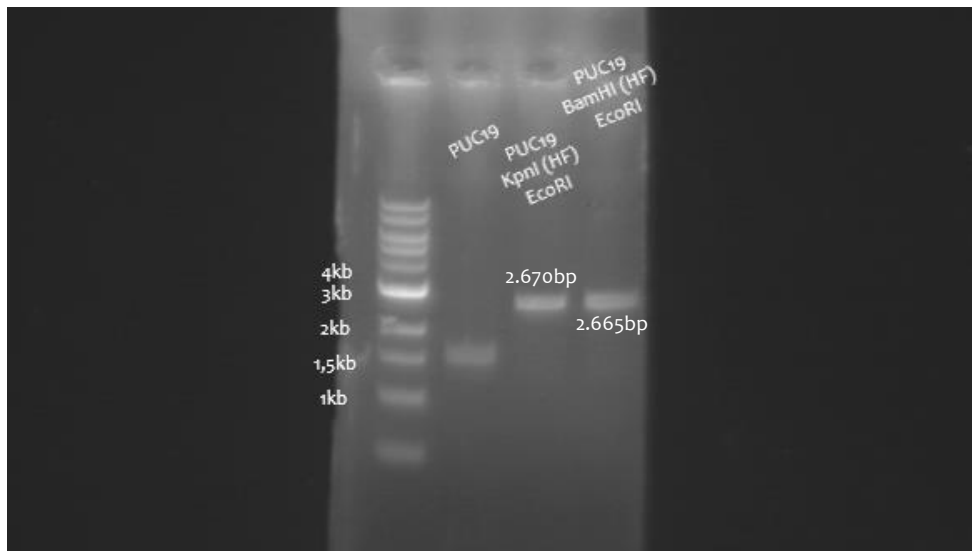
- ❖ Για το PUC19: EcoRI, KpnI (HF) και EcoRI, BamHI (HF)
- ❖ Για το LentiCRISPR v2: BamHI (HF), KpnI (HF), EcoRI

Οι αναμενόμενες ζώνες από την κάθε πέψη είχαν τα εξής μήκη:

- ❖ Για την 1^η αντίδραση PUC19: 2.670bp
- ❖ Για την 2^η αντίδραση PUC19: 2.665bp
- ❖ Για το LentiCRISPR v2: 8.192bp, 4.467bp, 2.214bp



Εικόνα 18: Οι πέψεις που έγιναν στο πλασμίδιο lenti CRISPR v2. Επισημαίνονται τα μήκη των ζωνών του μάρτυρα μοριακών βαρών 1kb DNA ladder. Ακολουθεί το πλασμίδιο LentiCRISPR v2 στη θέση του control, το οποίο δεν έχει υποστεί πέψη. Η ζώνη του control παρατηρείται πιο χαμηλά από ό,τι ήταν αναμενόμενο επειδή το πλασμίδιο εμφανίζει υπερελίκωση. Στη συνέχεια φαίνονται οι πέψεις που υπέστη το πλασμίδιο lenti CRISPR v2 με τα ένζυμα KpnI (HF), BamHI (HF) και EcoRI, όπου έδωσαν τις ζώνες 8.192bp, 4.467bp και 2.214bp.



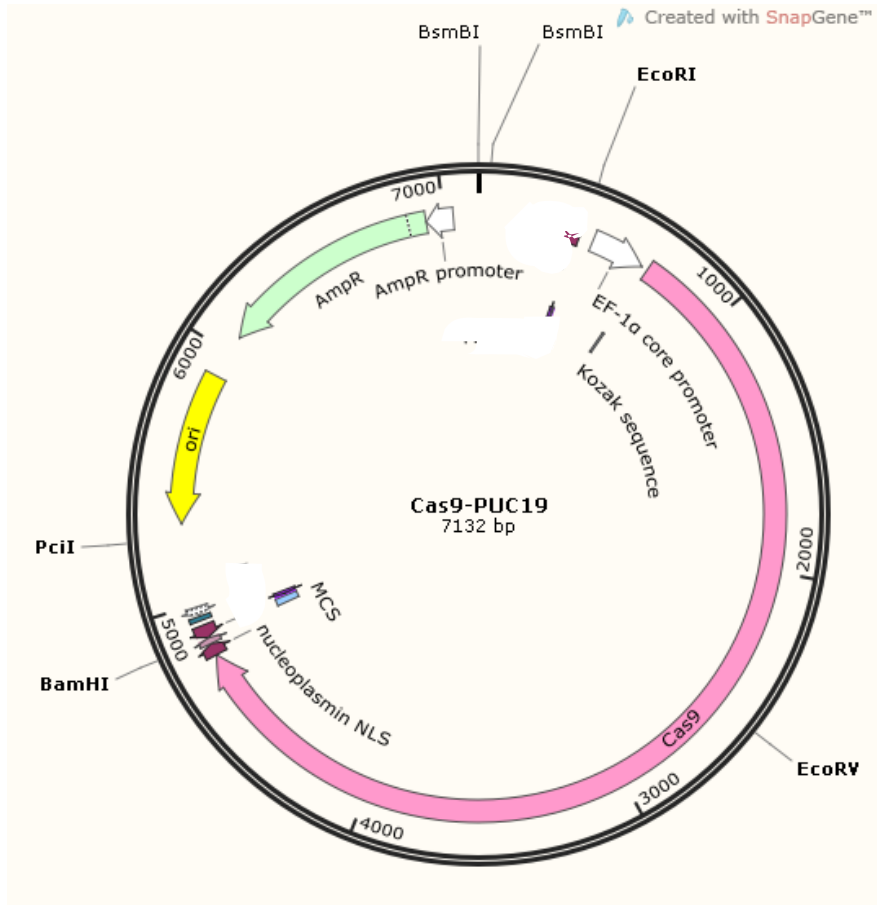
Εικόνα 19: Οι πέψεις που έγιναν στο πλασμίδιο PUC19. Επισημαίνονται τα μήκη των ζωνών του μάρτυρα μοριακών βαρών 1kb DNA ladder. Ακολουθεί το πλασμίδιο PUC19 στη θέση του control, το οποίο δεν έχει υποστεί πέψη. Η ζώνη του control παρατηρείται πιο χαμηλά από ό,τι ήταν αναμενόμενο επειδή το πλασμίδιο εμφανίζει υπερελίκωση. Στη συνέχεια φαίνονται οι πέψεις που υπέστη το πλασμίδιο PUC19 με τα ένζυμα KpnI (HF) και EcoRI, και με τα ένζυμα BamHI (HF) και EcoRI, όπου έδωσαν τις ζώνες 2.670bp και 2.665bp.

Σύμφωνα με τις παραπάνω εικόνες της ανάλυσης των προϊόντων πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης, οι ζώνες που έχουν προκύψει ταυτίζονται με τις αναμενόμενες. Ακολούθησε, λοιπόν, η απομόνωση των επιθυμητών τμημάτων DNA από το gel, με σκοπό να χρησιμοποιηθούν στα παρακάτω πειράματα.

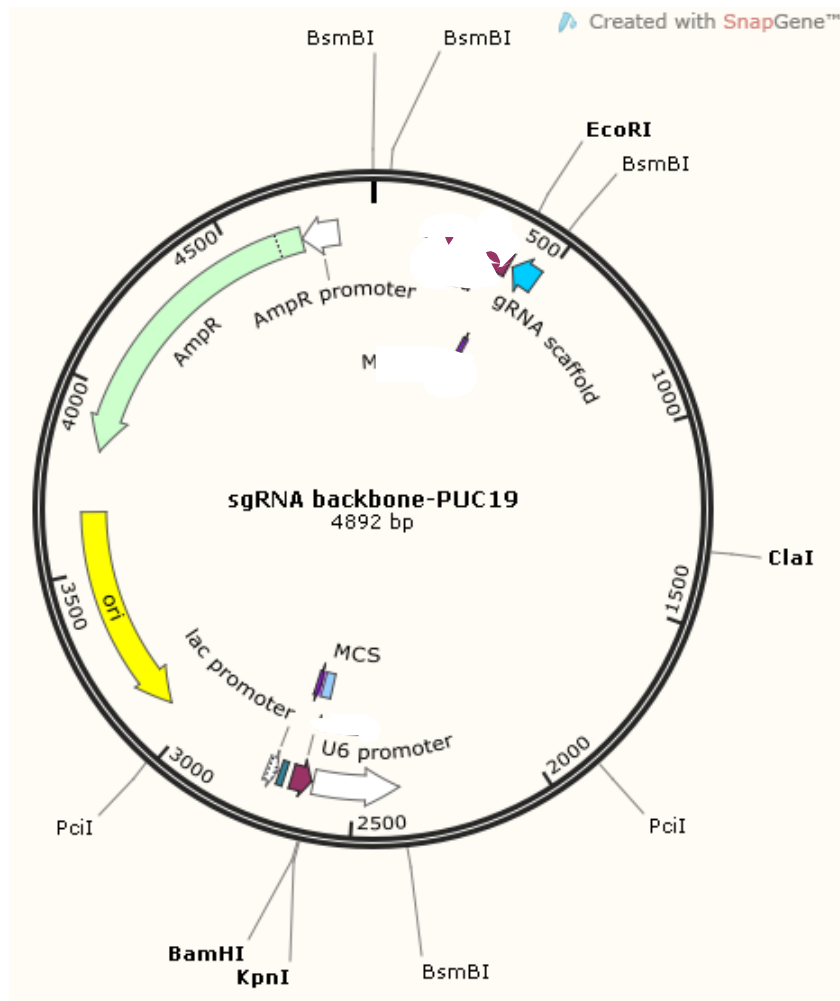
4.2. Εισαγωγή των γονιδιακών τμημάτων Cas9 και sgRNA backbone στο PUC19

Ακολούθησε η ένωση των τμημάτων του γονιδίου της Cas9 και του sgRNA backbone με το γραμμικό πλέον PUC19, μέσω αντίδρασης με την T4 DNA λιγάση, ώστε να δημιουργηθούν δύο νέα πλασμίδια. Το sgRNA backbone δρα ως σκελετός για την θέση-κατευθυνόμενη κλωνοποίηση οποιουδήποτε sgRNA στον νέο πλασμιδιακό φορέα, με την χρήση του ενζύμου BsmBI. Το BsmBI δημιουργεί άκρα τα οποία δεν είναι πάντα συμβατά μεταξύ τους, αλλά εξαρτώνται από την αλληλουχία της θέσης αναγνώρισης του ενζύμου.

Η ένωση των τμημάτων DNA πραγματοποιήθηκε με διεξαγωγή αντίδρασης ligation σε θερμοκυκλοποιητή. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για το ligation ήταν η T4 DNA λιγάση. Οι χάρτες των δύο νέων πλασμιδίων που προέκυψαν μετά την αντίδραση, του Cas9-PUC19 και του sgRNA backbone-PUC19, φαίνονται παρακάτω (**Εικόνα 20, Εικόνα 21**).

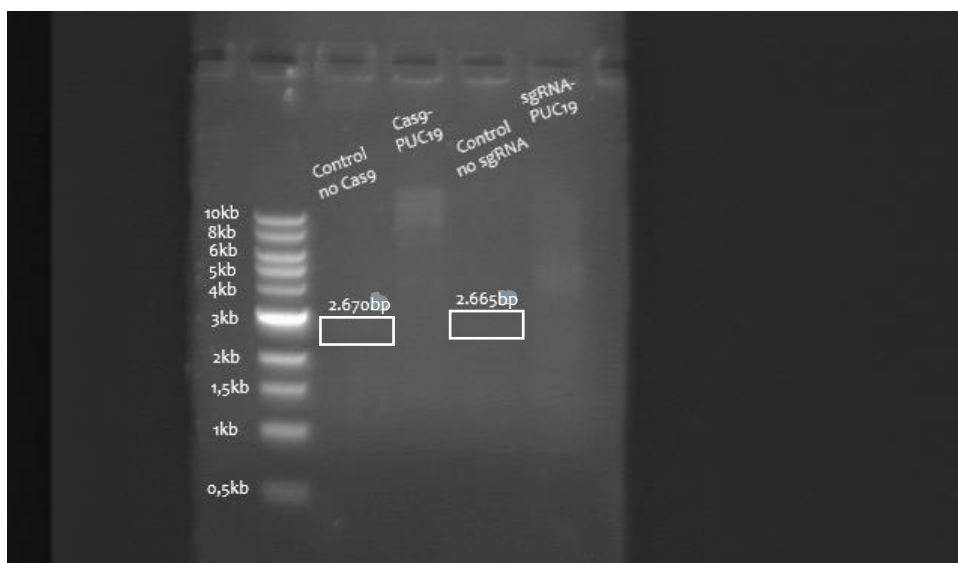


Εικόνα 20: Χάρτης του πλασμιδίου Cas9-PUC19 και μερικών περιοριστικών ενζύμων ενδιαφέροντος, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SnapGene.



Εικόνα 21: Χάρτης του πλασμιδίου sgRNA backbone-PUC19 και μερικών περιοριστικών ενζύμων ενδιαφέροντος, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SnapGene.

Το αποτέλεσμα των αντιδράσεων ligation ελέγχθηκε μέσω ηλεκτροφορήσεως του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 0,8% (**Εικόνα 22**).



Εικόνα 22: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης λιγάσης των Cas9 και PUC19, και των sgRNA backbone και PUC19. Στην πρώτη στήλη φαίνονται οι ζώνες του μάρτυρα 1kb DNA ladder. Στις στήλες 2 και 4 φαίνονται (αχνά) τα δείγματα ελέγχου control της κάθε αντίδρασης λιγάσης. Ως control χρησιμοποιήθηκαν αντιδράσεις λιγάσης που δε διέθεταν το Cas9 γονίδιο και το sgRNA backbone, και ως αποτέλεσμα δεν πραγματοποιήθηκαν. Στις στήλες 3 και 5 φαίνεται το χαρακτηριστικό smear που υποδηλώνει την επιτυχή κυκλοποίηση των τμημάτων DNA που ενώθηκαν σε κάθε περίπτωση.

Σύμφωνα με την παραπάνω εικόνα της ανάλυσης των προϊόντων του ligation σε πήκτωμα αγαρόζης, οι ζώνες που έχουν προκύψει ταυτίζονται με τις αναμενόμενες. Οπότε το ligation ήταν επιτυχές, και με τα πλασμίδια που δημιουργήθηκαν από αυτό μπορούν να μετασχηματιστούν βακτήρια.

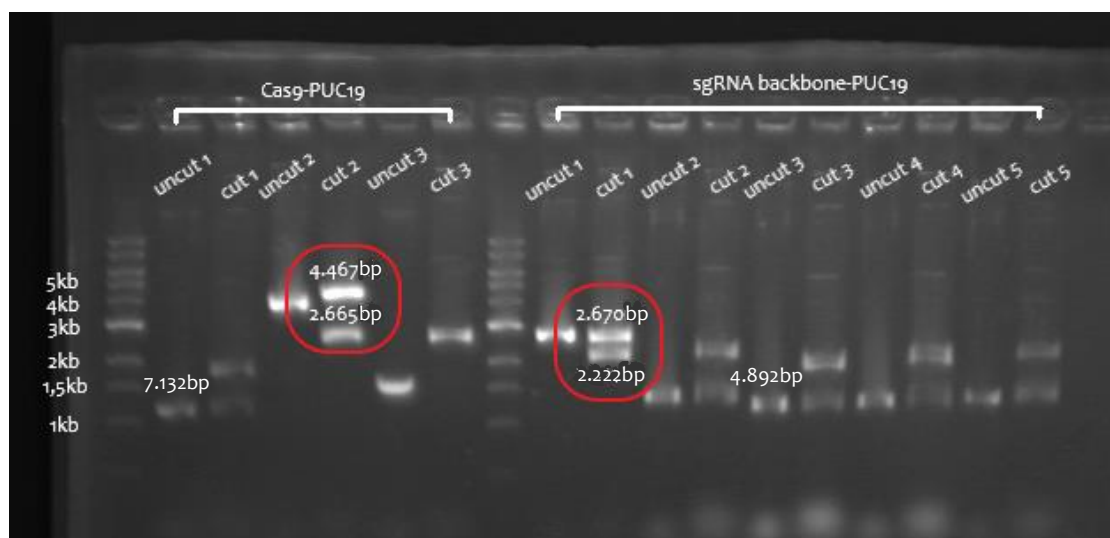
4.3. Διαγνωστικές πέψεις των Cas9-PUC19 και sgRNA backbone-PUC19 πλασμιδίων μετά από απομόνωση πλασμιδιακού DNA, από μικρής κλίμακας καλλιέργειες (mini-prep) μοναδικών αποικιών μετασχηματισμένων βακτηρίων

Οι πέψεις έγιναν στο πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε από αποικίες βακτηρίων *E. coli*, τα οποία είχαν αρχικά μετασχηματιστεί με το πλασμιδιακό DNA-προϊόν της αντίδρασης λιγάσης και στη συνέχεια επιστρωθεί σε τρυβλία Petri. Έπειτα, μοναδικές αποικίες από κάθε τρυβλίο Petri ανακαλλιεργήθηκαν σε μικρής κλίμακας υγρές καλλιέργειες. Οι αποικίες που επιλέχθηκαν και ήταν προϊόν μετασχηματισμού με το πλασμίδιο Cas9-PUC19 ήταν τρεις, ενώ εκείνες που απομονώθηκαν και είχαν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο sgRNA backbone-PUC19 ήταν πέντε. Το αποτέλεσμα των πέψεων ελέγχθηκε μέσω ηλεκτροφορήσεων του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 0,8% (**Εικόνα 23**). Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση φαίνονται παρακάτω:

- ❖ Για το Cas9-PUC19: BamHI (HF), EcoRI
- ❖ Για το sgRNA backbone-PUC19: KpnI (HF), EcoRI

Οι αναμενόμενες ζώνες από την κάθε πέψη είχαν τα εξής μήκη:

- ❖ Για το Cas9-PUC19: 4.467bp, 2.665bp
- ❖ Για το sgRNA backbone-PUC19: 2.670bp, 2.222bp



Εικόνα 23: Διαγνωστικές πέψεις που έγιναν στο πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε από βακτηριακές αποικίες, οι οποίες αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες μικρής κλίμακας. Οι αποικίες προέκυψαν μετά τον μετασχηματισμό με τα προϊόντα της αντίδρασης λιγάσης, Cas9-PUC19 και sgRNA backbone-PUC19. Αρχικά επισημαίνονται τα μήκη των ζωνών του μάρτυρα μοριακών βαρών 1kb DNA ladder. Ακολουθούν οι πέψεις του πλασμιδιακού DNA των βακτηριακών αποικιών 1-3 που μετασχηματίστηκαν με το Cas9-PUC19. Στη συνέχεια φαίνονται οι πέψεις του πλασμιδιακού DNA των βακτηριακών αποικιών 1-5 που έλαβαν το sgRNA backbone-PUC19. Παρατηρείται ότι από όσες απομονώθηκαν από τα τρυβλία Petri, μόνο η 2^η από τις τρεις είχε όντως λάβει το πλασμίδιο Cas9-PUC19, ενώ από τις 5 αποικίες για το sgRNA backbone-PUC19, μόνο η 1^η είχε λάβει το πλασμίδιο αυτό στην πραγματικότητα.

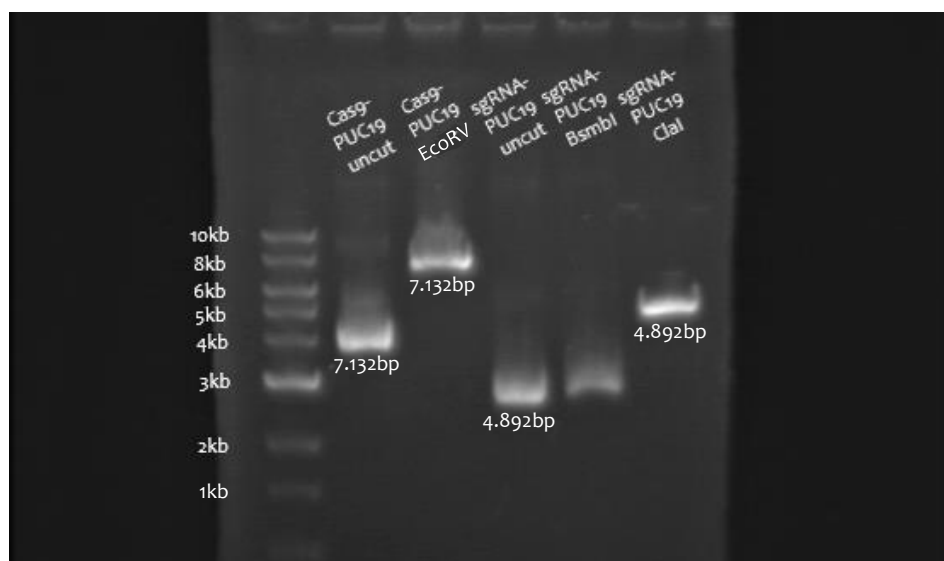
Σύμφωνα με την παραπάνω εικόνα της ανάλυσης των προϊόντων των πέψεων του πλασμιδιακού DNA σε πήκτωμα αγαρόζης, προκύπτουν τα εξής: από τις αποικίες που μετασχηματίστηκαν με το προϊόν της αντίδρασης λιγάσης Cas9-PUC19, μόνο η 2^η αποικία εμφανίζει το αναμενόμενο πρότυπο ζώνωσης. Αντίστοιχα, για εκείνες που προέκυψαν από μετασχηματισμό με το προϊόν της αντίδρασης λιγάσης sgRNA backbone-PUC19, μόνο η 1^η αποικία φαίνεται πως εμφανίζει το αναμενόμενο πρότυπο ζώνωσης.

Για επιβεβαίωση ότι οι συγκεκριμένες αποικίες είχαν λάβει όντως τους ανασυνδυασμένους φορείς με τα αντίστοιχα ενθέματα, διεξήχθησαν επιπλέον πέψεις στις δύο αυτές θετικές αποικίες. Το αποτέλεσμα των πέψεων ελέγχθηκε ξανά μέσω ηλεκτροφορήσεων του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης πυκνότητας 0,8% (**Εικόνα 24**). Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση φαίνονται παρακάτω:

- ❖ Για το Cas9-PUC19: EcoRV
- ❖ Για το sgRNA backbone-PUC19: BsmBI, ClaI

Οι αναμενόμενες ζώνες από την κάθε πέψη είχαν τα εξής μήκη:

- ❖ Για το Cas9-PUC19: 7.132bp
- ❖ Για το sgRNA backbone-PUC19 με το BsmBI: 2.531bp, 1.885bp, 434bp, 42bp
- ❖ Για το sgRNA backbone-PUC19 με το ClaI: 4.892bp



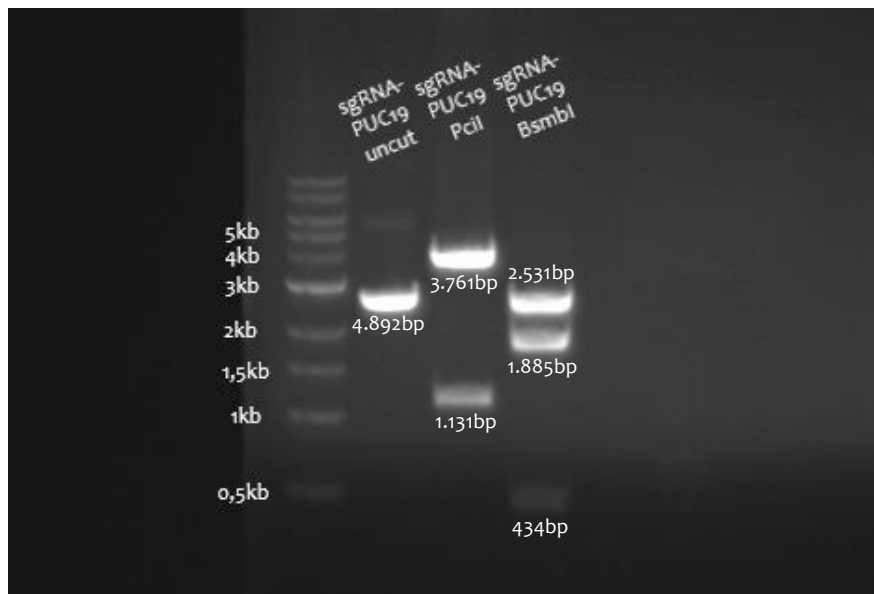
Εικόνα 24: Οι πέψεις που έγιναν στα ανασυνδυασμένα πλασμίδια Cas-PUC19 και sgRNA backbone-PUC19. Επισημαίνονται τα μήκη των ζωνών του μάρτυρα μοριακών βαρών 1kb DNA ladder. Ακολουθεί η πέψη του Cas9-PUC19 με το ένζυμο EcoRV, όπου έδωσε τη ζώνη 7.132bp, και οι πέψεις του sgRNA backbone-PUC19 με το ένζυμο Bsmbl, όπου δεν έδωσε τις αναμενόμενες ζώνες, και με το ένζυμο ClaI, όπου έδωσε τη ζώνη 4.892bp.

Σύμφωνα με την παραπάνω εικόνα της ανάλυσης των προϊόντων των πέψεων σε πήκτωμα αγαρόζης, μόνο η 2^η αποικία που προέκυψε από τον μετασχηματισμό με τον φορέα Cas9-PUC19 εμφανίζει το αναμενόμενο πρότυπο ζώνωσης, μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRV. Ωστόσο, η 1^η αποικία από εκείνες που προέκυψαν μετά τον μετασχηματισμό με τον φορέα sgRNA backbone-PUC19, δε φαίνεται να εμφανίζει το αναμενόμενο πρότυπο ζώνωσης μετά από πέψη με το ένζυμο Bsmbl. Αυτή η πέψη επαναλήφθηκε στη συνέχεια με νέο ένζυμο Bsmbl. Παρόλα αυτά, οι αποικίες που απομονώθηκαν όντως διέθεταν τα εν λόγω πλασμίδια, και οι καλλιέργειές τους χρησιμοποιήθηκαν για υγρές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας.

4.4. Έλεγχος προσανατολισμού ένθεσης του sgRNA backbone στο PUC19

Ο έλεγχος του προσανατολισμού του sgRNA backbone στο PUC19 ελέγχθηκε μέσω πέψεων με τα περιοριστικά ένζυμα PciI και Bsmbl. Ανάλογα τα μήκη που θα προέκυπταν από αυτές τις πέψεις, φανεωνόταν και ο προσανατολισμός ένθεσης του sgRNA backbone στο PUC19. Το αποτέλεσμα των πέψεων ελέγχθηκε μέσω ηλεκτροφορήσεως του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 0,8% (**Εικόνα 25**). Οι αναμενόμενες ζώνες από την κάθε πέψη είχαν τα εξής μήκη:

- ❖ Για το sgRNA backbone-PUC19 με το PciI: 3.761bp, 1.131bp
- ❖ Για το sgRNA backbone-PUC19 με το Bsmbl: 2.531bp, 1.885bp, 434bp, 42bp

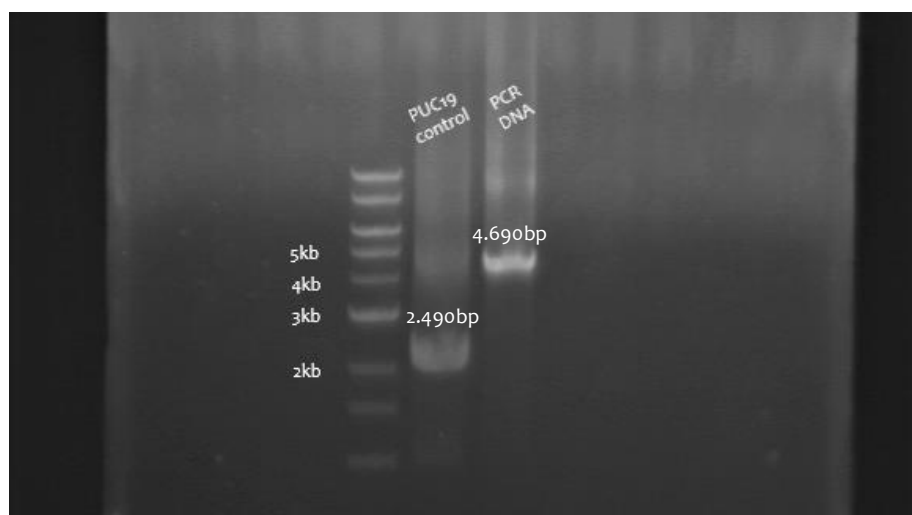


Εικόνα 25: Οι πέψεις που έγιναν στο πλασμίδιο sgRNA backbone-PUC19 για την εξακρίβωση του προσανατολισμού του ενθέματος στον φορέα PUC19. Επισημαίνονται τα μήκη των ζωνών του μάρτυρα μοριακών βαρών 1kb DNA ladder. Ακολουθούν οι πέψεις του sgRNA backbone-PUC19 με τα ένζυμα PciI και Bsmbl, όπου έδωσαν τις ζώνες 3.761bp, 1.131bp και 2.531bp, 1.885bp, 434bp, 42bp αντίστοιχα.

Σύμφωνα με την παραπάνω εικόνα της ανάλυσης των προϊόντων των πέψεων σε πήκτωμα αγαρόζης, οι ζώνες που έχουν προκύψει ταυτίζονται με τις αναμενόμενες. Όποτε, επιβεβαιώθηκε ότι το πλασμίδιο sgRNA backbone-PUC19 έχει δομηθεί σωστά και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε παρακάτω πειράματα.

4.5. Αφαίρεση των επιπλέον θέσεων περιορισμού του ενζύμου BsmBI από το πλασμίδιο sgRNA backbone-PUC19

Κατά την κατασκευή του φορέα sgRNA backbone-PUC19, δεν προβλέφθηκε ότι υπήρχαν 2 υφιστάμενες θέσεις αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου BsmBI, ανοδικά από την θέση κλωνοποίησης. Η αφαίρεση των δύο θέσεων περιορισμού του BsmBI, που υπήρχαν στο πλασμίδιο sgRNA backbone-PUC19, ήταν απαραίτητη γιατί θα εμπόδιζε την ενσωμάτωση της sgRNA αλληλουχίας στο sgRNA backbone στα επόμενα στάδια πειραμάτων. Συγκεκριμένα, ο πλασμιδιακός φορέας έφερε 2 επιπλέον θέσεις BsmBI, οι οποίες δεν ήταν δυνατόν να αφαιρεθούν στο πρώτο στάδιο της κλωνοποίησης του sgRNA backbone. Η αφαίρεση των θέσεων από το πλασμίδιο πραγματοποιήθηκε μέσω PCR. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στόχευαν εκατέρωθεν των 2 επιπλέον θέσεων αναγνώρισης του BsmBI. Ο κάθε εκκινητής έφερε την αλληλουχία θέσεως περιορισμού του ενζύμου EcoRI. Η αναμενόμενη ζώνη που προέκυψε από την PCR είχε μήκος 4.690bp, ενώ το control-φορέας PUC19 είχε μήκος 2.490bp. Εκτός από την κύρια αντίδραση PCR έγινε και μια ακόμη παράλληλη PCR, που έδρασε σαν θετικός μάρτυρας. Το αποτέλεσμα των PCR ελέγχθηκε μέσω ηλεκτροφορήσεων του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 0,8% (Εικόνα 26).



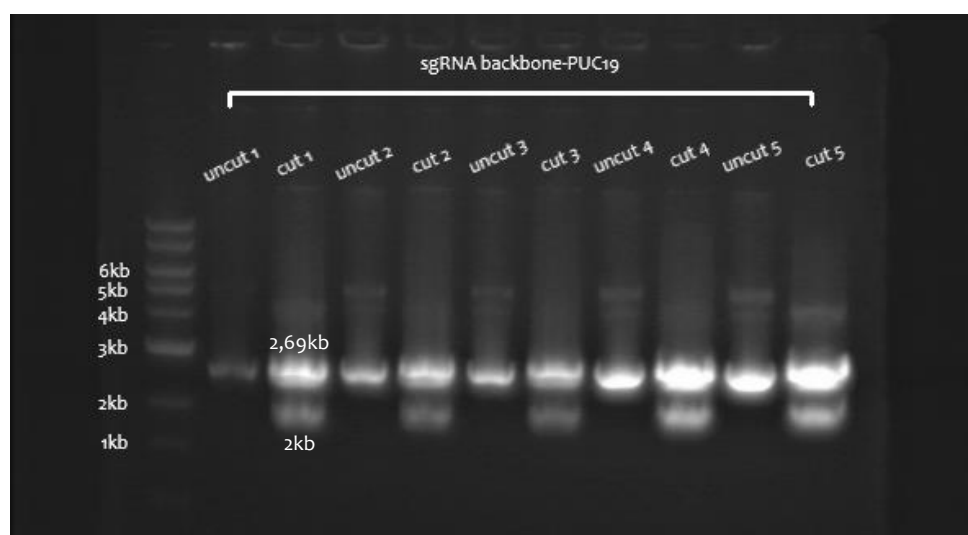
Εικόνα 26: Τα προϊόντα της PCR που έγινε στο πλασμίδιο sgRNA backbone-PUC19. Επισημαίνονται τα μήκη των ζωνών του μάρτυρα μοριακών βαρών 1kb DNA ladder. Ακολουθεί το PCR control, μήκους 2.490bp, και το προϊόν της PCR του sgRNA backbone-PUC19 μήκους 4.690bp.

Σύμφωνα με την παραπάνω εικόνα της ανάλυσης των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης, οι ζώνες που έχουν προκύψει ταυτίζονται με τις αναμενόμενες. Πλέον, λοιπόν, έχει δημιουργηθεί ένα γραμμικό μόριο DNA χωρίς τις ανεπιθύμητες θέσεις περιορισμού του ενζύμου BsmBI, στο οποίο στη συνέχεια διεξήχθη πέψη με το ένζυμο EcoRI, και έπειτα έγινε επανακυκλοποίηση αυτού μέσω του ενζύμου T4 DNA λιγάση. Το επανακυκλοποιημένο πλασμίδιο στη συνέχεια εισήχθη σε βακτήρια *E. coli*, τα

οποία καλλιεργήθηκαν και επιστρώθηκαν σε τρυβλίο Petri. Από το τρυβλίο Petri ελήφθησαν πέντε αποικίες, απ' όπου προέκυψαν πέντε υγρές καλλιέργειες, από τις οποίες απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA.

4.6. Πέψεις του επανακυκλοποιημένου sgRNA backbone-PUC19 προς ενσωμάτωση των sgRNA duplex

Μετά την αφαίρεση των ανεπιθύμητων θέσεων BsmBI από το πλασμίδιο, είχαν μείνει μόνο οι δύο επιθυμητές στο εσωτερικό της αλληλουχίας του sgRNA backbone. Έγινε, λοιπόν, πέψη του επανακυκλοποιημένου πλασμιδίου στις θέσεις αυτές με το BsmBI, χρησιμοποιώντας πλασμιδιακό DNA από τις υγρές καλλιέργειες των πέντε μετασχηματισμένων αποικιών. Εκεί θα γινόταν η εισαγωγή των δύο sgRNA duplex. Τα αποτελέσματα των πέψεων ελέγχθηκαν μέσω ηλεκτροφορήσεων του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 0,8% (Εικόνα 27). Οι αναμενόμενες ζώνες από την κάθε πέψη είχαν τα εξής μήκη: 2kb και 2,69kb.



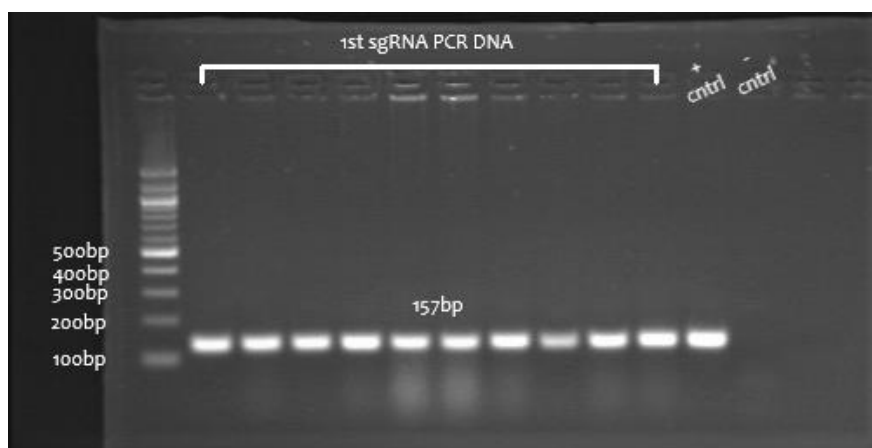
Εικόνα 27: Ηλεκτροφόρηση πέψεων του επανακυκλοποιημένου sgRNA backbone-PUC19 με το ένζυμο BsmBI. Επισημαίνονται τα μήκη των ζωνών του μάρτυρα μοριακών βαρών 1kb DNA ladder. Έπειτα φαίνεται το control και η πέψη του DNA κάθε μιας από τις 5 αποικίες. Τα μήκη των ζωνών των πέψεων ήταν 2kb και 2,69kb.

Σύμφωνα με την παραπάνω εικόνα της ανάλυσης των προϊόντων των πέψεων σε πήκτωμα αγαρόζης, οι ζώνες που έχουν προκύψει ταυτίζονται με τις αναμενόμενες, οπότε μέσω gel extraction απομονώθηκε η ζώνη μήκους 2,69kb, ώστε να ενσωματωθούν σε αυτή τα δύο sgRNA duplex, σε παρακάτω πειράματα.

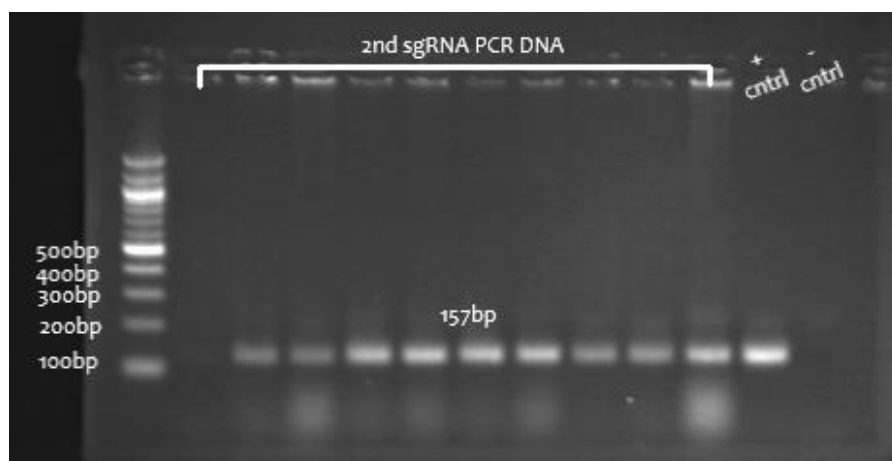
4.7. Κατασκευή φορέων PUC19-b2msg2RNA.Dest και puc19-b2msg3RNA.Dest

Δύο sgRNA ολιγονουκλεοτίδια υβριδίστηκαν και κλωνοποιήθηκαν στον γραμμοποιημένο φορέα sgRNA backbone-PUC19. Ο φορέας είχε γίνει γραμμικός μετά από πέψη περιορισμού με το ένζυμο BsmBI, και αφότου είχε αφαιρεθεί από αυτόν ένα τμήμα «άχρηστου» DNA μήκους 2kbp. Τα δύο ολιγονουκλεοτίδια στόχευαν περιοχές του ανθρώπινου γονιδίου της β2-μικροσφαιρίνης. Τα άκρα τους ήταν συμβατά με τα κολλώδη άκρα που δημιουργήθηκαν στον φορέα sgRNA backbone-PUC19 μετά την

πέψη αυτού με το ένζυμο BsmBI. Μέσω δύο αντιδράσεων ligation, χρησιμοποιώντας το ένζυμο T4 λιγάση, έγινε η εισαγωγή καθενός εκ των δύο sgRNA duplex, στο πλασμίδιο PUC19. Στη συνέχεια, βακτήρια *E. coli* μετασηματίστηκαν με αυτά τα νέα πλασμίδια και καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία Petri. Από κάθε τρυβλίο Petri, απομονώθηκαν δέκα βακτηριακές αποικίες, και σε κάθε μία έγινε colony PCR με εκκινητές που στόχευαν ο ένας εντός της αλληλουχίας του sgRNA και ο δεύτερος στον πλασμιδιακό φορέα. Τα αποτελέσματα των PCR ελέγχθηκαν μέσω ηλεκτροφορήσεων του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 2,5% (Εικόνα 28, Εικόνα 29). Οι αναμενόμενες ζώνες της κάθε PCR είχαν μήκος 157bp.



Εικόνα 28: Απεικόνιση των προϊόντων των PCR ενός τμήματος του 1^{ου} sgRNA πλασμιδίου. Επισημαίνονται τα μήκη των ζωνών του μάρτυρα μοριακών βαρών 100bp DNA ladder. Έπειτα φαίνονται τα προϊόντα της αντίδρασης PCR κάθε βακτηριακής αποικίας. Ακολουθούν το θετικό και το αρνητικό control.

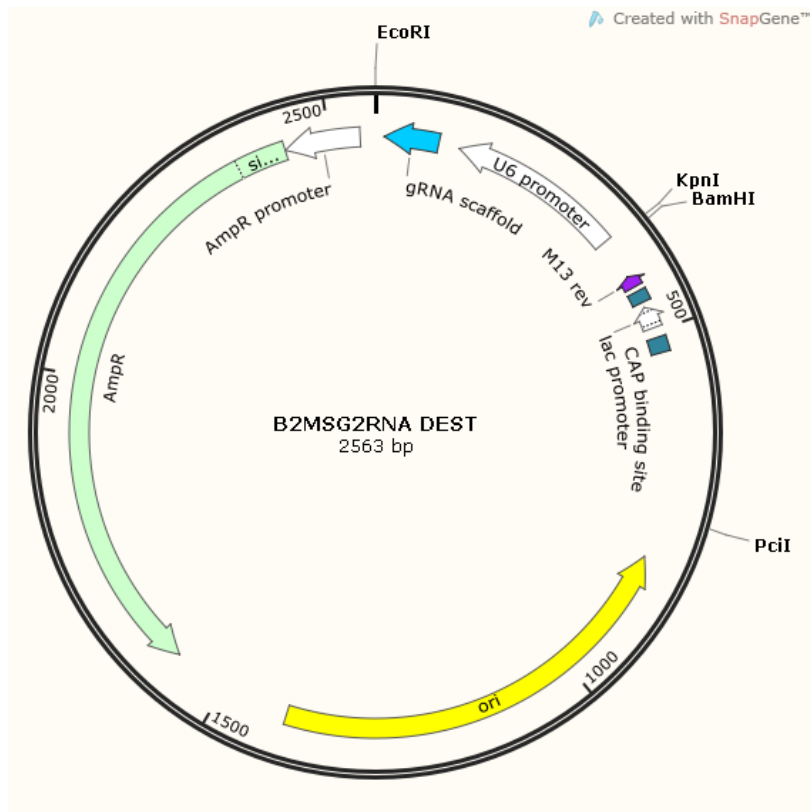


Εικόνα 29: Απεικόνιση των προϊόντων των PCR ενός τμήματος του 2^{ου} sgRNA πλασμιδίου. Επισημαίνονται τα μήκη των ζωνών του μάρτυρα μοριακών βαρών 100bp DNA ladder. Έπειτα φαίνονται τα προϊόντα της αντίδρασης PCR κάθε βακτηριακής αποικίας. Φαίνεται ότι μόνο μία αποικία δεν είχε λάβει το επιθυμητό πλασμίδιο. Ακολουθούν το θετικό και το αρνητικό control.

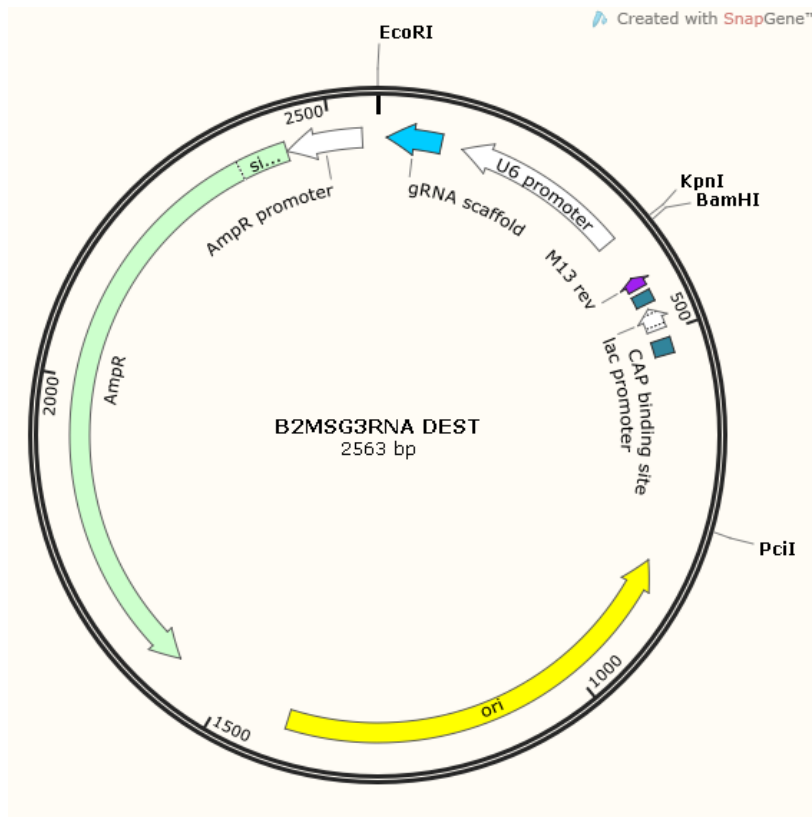
Σύμφωνα με τις παραπάνω εικόνες της ανάλυσης των προϊόντων των αντιδράσεων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης, οι ζώνες που έχουν προκύψει ταυτίζονται με τις αναμενόμενες. Πλην μίας αποικίας του 2^{ου} sgRNA, όλες οι βακτηριακές αποικίες έφεραν πλασμίδια στα οποία είχε γίνει επιτυχώς η ένθεση των δύο sgRNA duplex. Έμνε

λοιπόν στη συνέχεια, οι αποικίες αυτές να καλλιεργηθούν σε υγρό μέσο, ώστε αργότερα να απομονωθεί το πλασμιδιακό DNA από αυτές μέσω καλλιέργειας μεγάλης κλίμακας.

Οι χάρτες των δύο τελικών πλασμιδίων sgRNA-PUC19 φαίνονται παρακάτω (Εικόνα 30, Εικόνα 31):



Εικόνα 30: Χάρτης του πλασμιδίου PUC19-b2msg2RNA.Dest και μερικών περιοριστικών ενζύμων ενδιαφέροντος, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SnapGene.



Εικόνα 31: Χάρτης του πλασμιδίου PUC19-b2msg3RNA.Dest και μερικών περιοριστικών ενζύμων ενδιαφέροντος, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SnapGene.

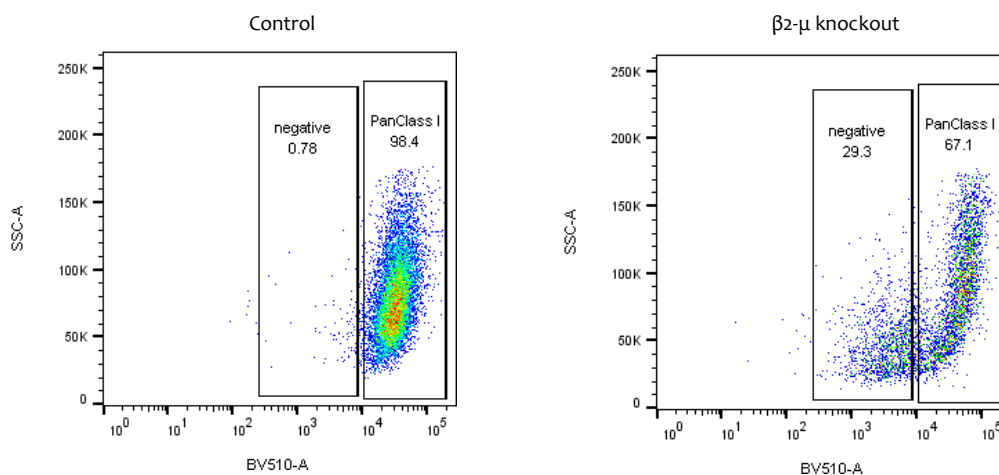
Εφόσον πλέον όλα τα πλασμίδια ήταν έτοιμα, ακολούθησαν οι διαδικασίες δοκιμών της λειτουργικότητάς τους σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. Οι δοκιμές αυτές, δυστυχώς, δεν έδωσαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα, καθώς παρατηρήθηκε χαμηλή απόδοση γονιδιακής τροποποίησης. Για το λόγο αυτό, ελήφθη η απόφαση τα πειράματα να προχωρήσουν με τη χρήση RNP συμπλόκων. Πρόκειται για ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα sgRNA-Cas9, τα οποία μπορούν να εισαχθούν στα κύτταρα στόχους μέσω ηλεκτροδιάτρησης. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών.

4.8. Ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) T λεμφοκυττάρων με RNP σύμπλοκα

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, παρήχθησαν δύο είδη RNP συμπλόκων, καθένα εκ των οποίων ήταν ικανό να στοχεύσει και να τροποποιήσει σε διαφορετικό σημείο το γονίδιο της β2-μικροσφαιρίνης στο γονιδίωμα των ανθρώπινων T λεμφοκυττάρων. Κάθε RNP σύμπλοκο αποτελούνταν από το ένζυμο της Cas9 και ένα guide RNA (crRNA/tracrRNA duplex). Η αλληλουχία των crRNA προέκυψε από τη βάση δεδομένων της Integrated DNA Technologies.

Παρακάτω απεικονίζονται (Εικόνα 32) τα αποτελέσματα του αρχικού πειράματος ηλεκτροδιάτρησης των T λεμφοκυττάρων με τα RNP σύμπλοκα. Χρησιμοποιήθηκαν και τα δύο σύμπλοκα στα ίδια T λεμφοκύτταρα. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν μέσω κυτταρομετρίας ροής. Η χρώση τους έγινε χρησιμοποιώντας το

HLA-ABC αντίσωμα, που προσδένεται στην α πολυπεπτιδική αλυσίδα του MHC I και ήταν σημασμένο με BV510, ένα φθορίζον μόριο. Απουσία της β2-μικροσφαιρίνης, δεν είναι δυνατόν να βγει το σύμπλοκο MHC I στην κυτταρική μεμβράνη. Αυτό σημαίνει ότι η απουσία έκφρασης της β2-μικροσφαιρίνης μπορεί να ανιχνευθεί έμμεσα στην επιφάνεια των κυττάρων, μέσω της απουσίας έκφρασης του μορίου MHC I.



Εικόνα 32: Γραφήματα που απεικονίζουν έναν πληθυσμό T λεμφοκυττάρων ως control, που δεν έχουν υποστεί ηλεκτροδιάτρηση (αριστερά), και τα T λεμφοκύτταρα που έχουν υποστεί ηλεκτροδιάτρηση με RNPs (δεξιά). Σε σύγκριση με τον control πληθυσμό, παρατηρείται ότι το 29,3% των T λεμφοκυττάρων που υπέστησαν την ηλεκτροδιάτρηση δεν εκφράζουν πλέον το μόριο MHC I. Τα κύτταρα έχουν υποστεί χρώση με το HLA-ABC αντίσωμα, σημασμένο με BV510.

Τα παραπάνω γραφήματα μαρτυρούν πως ο πληθυσμός των T λεμφοκυττάρων δεν υπέστη πλήρη αποσιώπηση της β2-μικροσφαιρίνης, όπως ήταν θεμιτό. Αντιθέτως, η αποσιώπηση του γονιδίου ήταν της τάξεως του 29,3% στον πληθυσμό. Παρόλα αυτά επρόκειτο για ένα ενθαρρυντικό αποτέλεσμα, οπότε ήταν πλέον δυνατό τα RNP σύμπλοκα να δοκιμαστούν και σε CAR-T κύτταρα.

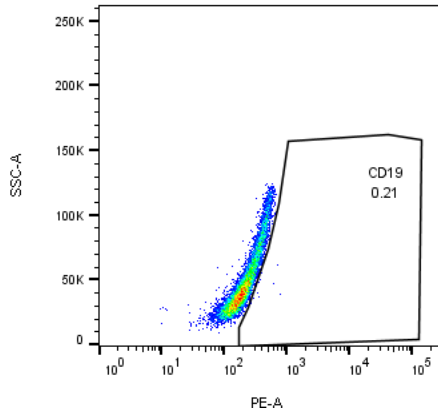
4.9. Τιτλοδότηση των ιών lenti CAR και foamy CAR

Αφού παρατηρήθηκε μερική επιτυχία στην πρώτη ηλεκτροδιάτρηση που διεξήχθη στα T λεμφοκύτταρα, έμενε το CRISPR να δοκιμαστεί και σε CAR-T κύτταρα. Η διαδικασία αυτή ξεκίνησε με την παραγωγή ιών, αρχικά μέσω διαμόλυνσης των αντίστοιχων πλασμιδίων σε κύτταρα HEK293T. Αφού οι καλλιέργειες αυτές έμειναν μερικές ημέρες στον κλίβανο προς επώαση, απομονώθηκε το υπερκείμενό τους στο οποίο είχαν απελευθερωθεί οι ιικοί φορείς foamy CAR19 και lenti CAR19. Το υπερκείμενο αυτό συμπυκνώθηκε μέσω υπερφυγοκέντρησης και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για την τιτλοδότηση των ιών, μαζί με μη συμπυκνωμένο υπερκείμενο, ώστε να γίνει δυνατός ο προσδιορισμός της ποσότητας των ιοσωματίων που παρήχθησαν μέσω της διαμόλυνσης στα κύτταρα HEK293T. Παρήχθησαν δύο ιοί, ο lenti CAR19 και ο foamy CAR19.

Για την τιτλοδότηση των ιών, HEK293T επιμολύνθηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις συμπυκνωμένου και μη συμπυκνωμένου (crude) ιού. Για τον υπολογισμό του λειτουργικού τίτλου των ιών, μετά από τρεις ημέρες επώασης τα κύτταρα παρατηρήθηκαν μέσω κυτταρομετρίας ροής, ώστε να εξακριβωθεί το ποσοστό έκφρασης του υποδοχέα CAR19 στην επιφάνειά τους (**Εικόνα 33 έως Εικόνα**

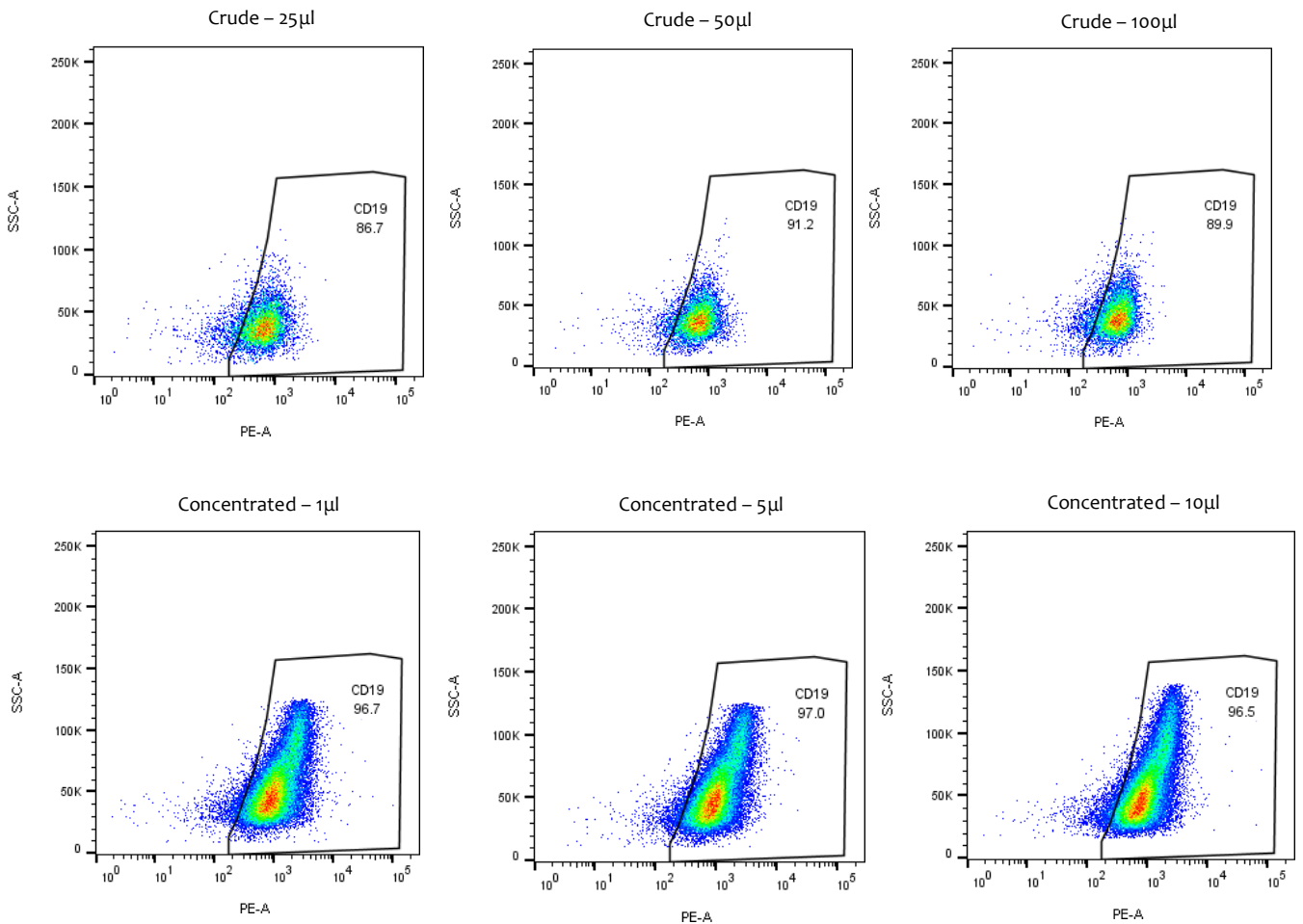
36). Η χρώση των κυττάρων έγινε αρχικά με την χιμαιρική πρωτεΐνη CD19-Fc, η οποία προσδένεται πάνω στον υποδοχέα CAR, και στη συνέχεια με το αντίσωμα goat-anti-human, το οποίο προσδένεται πάνω στην Fc περιοχή της χιμαιρικής πρωτεΐνης CD19 και ήταν σημασμένο με PE, ένα φθορίζον μόριο.

❖ Για τα κύτταρα control (lenti CAR):



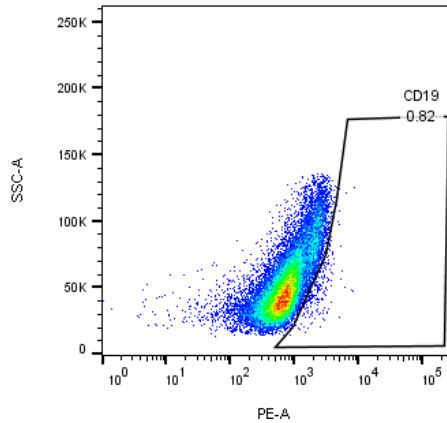
Εικόνα 33: Γράφημα που απεικονίζει τον control πληθυσμό κυττάρων HEK293T, που δεν έχουν επιμολυνθεί με ιό lenti. Τα κύτταρα αυτά έχουν υποστεί χρώση με CD19-Fc και goat-anti-human-PE.

❖ Για τα κύτταρα που επιμολύνθηκαν με τον ιό lenti CAR:



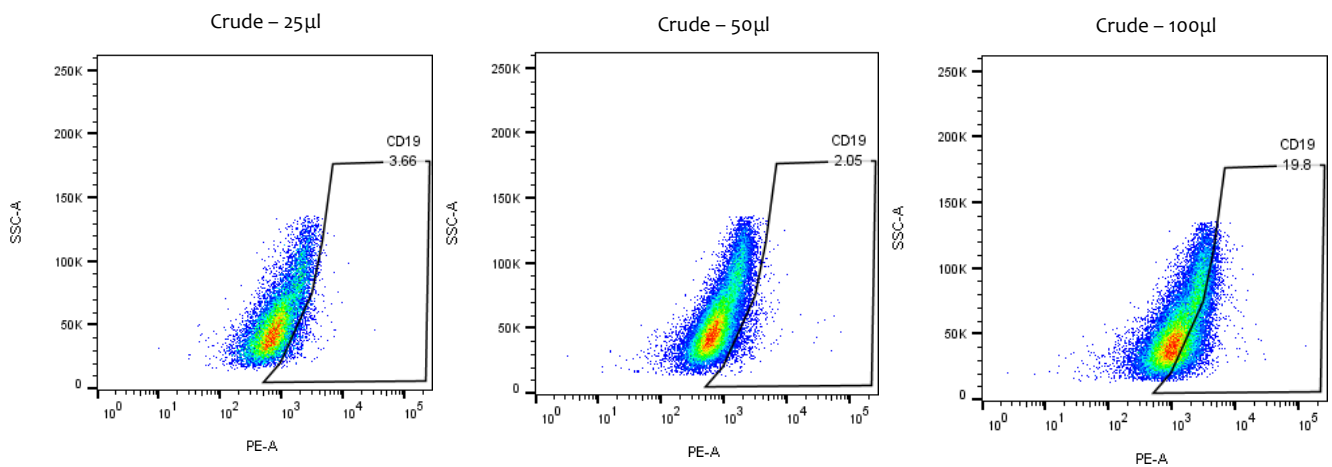
Εικόνα 34: Γραφήματα που απεικονίζουν κύτταρα HEK293T που έχουν επιμολυνθεί με διαφορετικές ποσότητες συμπυκνωμένου (1μl, 5μl, 10μl) και μη συμπυκνωμένου (25μl, 50μl, 100μl) ιού lentiviral CAR19. Σε σύγκριση με τον control πληθυσμό, παρατηρείται ότι τα κύτταρα εκφράζουν πλέον τον CAR υποδοχέα. Αναγράφονται και τα ποσοστά των κυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα κάθε φορά.

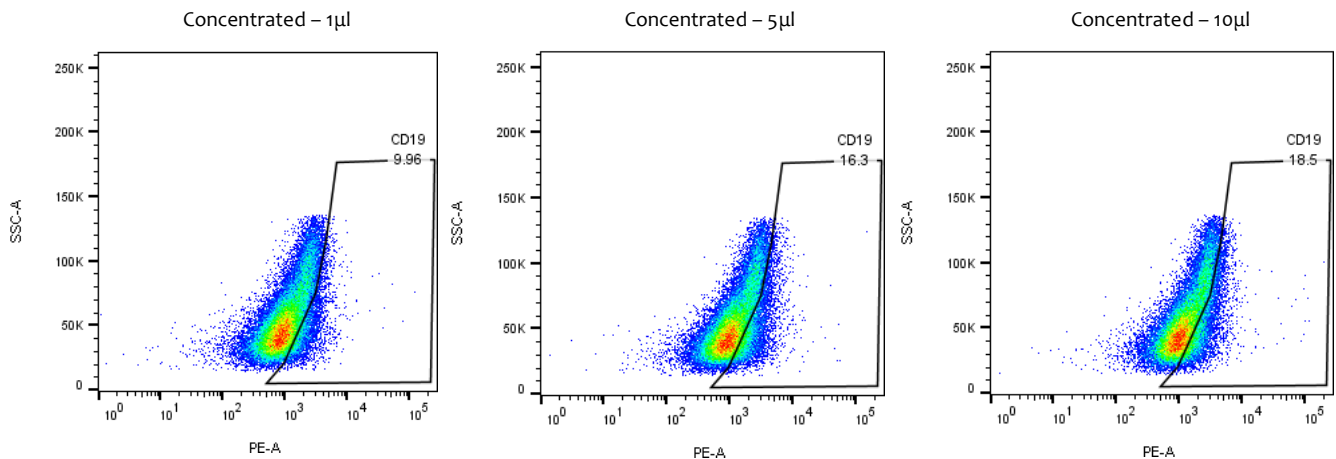
❖ Για τα κύτταρα control (foamy CAR):



Εικόνα 35: Γράφημα που απεικονίζει τον control πληθυσμό κυττάρων HEK293T, που δεν έχουν επιμολυνθεί με ιό foamy. Τα κύτταρα αυτά έχουν υποστεί χρώση με CD19-Fc και goat-anti-human-PE.

❖ Για τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με τον ιό foamy CAR:





Εικόνα 36: Γραφήματα που απεικονίζουν κύτταρα HEK293T που έχουν επιμολυνθεί με διαφορετικές ποσότητες συμπυκνωμένου (1µl, 5µl, 10µl) και μη συμπυκνωμένου (25µl, 50µl, 100µl) ιού foamy CAR. Σε σύγκριση με τον control πληθυσμό, παρατηρείται ότι τα κύτταρα εκφράζουν πλέον τον CAR υποδοχέα. Αναγράφονται και τα ποσοστά των κυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα κάθε φορά.

Ο τίτλος ισοματίων υπολογίζεται με βάση τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{Ισοματία/ml} = \frac{\text{αριθμός κυττάρων προς επιμόλυνση} \times \text{ποσοστό θετικών κυττάρων}}{\text{όγκος ικού υπερκειμένου (ml)}}$$

Για τον υπολογισμό του τίτλου του κάθε ιού επιλέχθηκαν τα κύτταρα που είχαν επιμολυνθεί με 5µl συμπυκνωμένου ιού, που ήταν η ενδιάμεση ποσότητα μεταξύ του 1µl και των 10µl. Τα κύτταρα που είχαν επιμολυνθεί ήταν 110.000. Το ποσοστό θετικών κυττάρων για τον CAR στην περίπτωση του lenti ήταν 97%, ενώ στην περίπτωση του foamy ήταν 16,3%. Οπότε, ο τύπος έχει ως εξής:

- ❖ Για τον lenti CAR: $\text{Ισοματία/ml} = \frac{110.000 \times 0,97}{0,005} = 21.340.000 \text{ Ισοματία/ml}$
- ❖ Για τον foamy CAR: $\text{Ισοματία/ml} = \frac{110.000 \times 0,16}{0,005} = 3.520.000 \text{ Ισοματία/ml}$

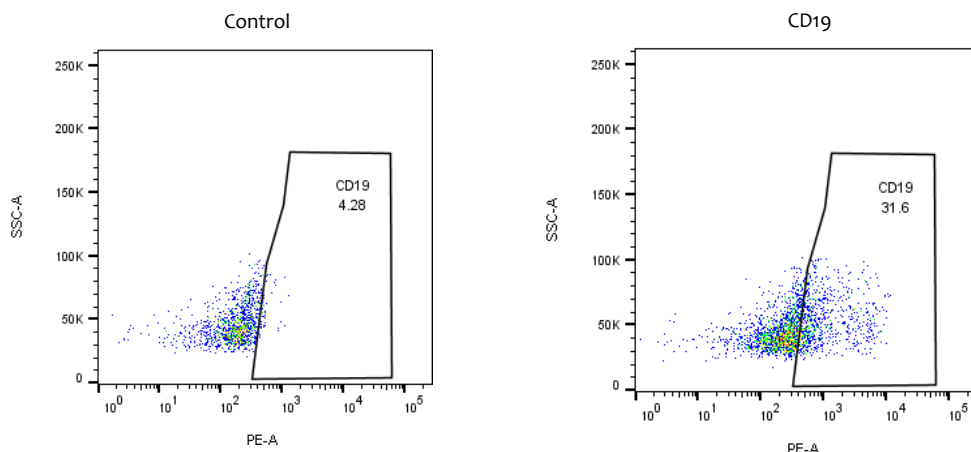
4.10. Επιμόλυνση (transduction) των T λεμφοκυττάρων με τους ιούς lenti CAR19 και foamy CAR19

Μετά την τιτλοδότηση των ιών ακολούθησε η δημιουργία των CAR-T κυττάρων. Για να συμβεί αυτό αρχικά απομονώθηκαν T λεμφοκύτταρα από ολικό αίμα. Στη συνέχεια τα T λεμφοκύτταρα, αφού ενεργοποιήθηκαν, τοποθετήθηκαν σε 12-well plate. Σε κάθε well τοποθετήθηκε ορισμένη ποσότητα ιού. Έπειτα τα T λεμφοκύτταρα αφέθηκαν στον κλίβανο για τρεις ημέρες.

Η επιμόλυνση των κυττάρων με τον ιό lenti είναι ικανοποιητική όταν η αναλογία ισοματίων και κυττάρων είναι μεταξύ 10-20 ισοματία ανά κύτταρο. Αντίστοιχα, για τον ιό foamy η αναλογία πρέπει να είναι μεταξύ 5-10 ισοματία ανά κύτταρο. Με βάση τους τίτλους που προέκυψαν, η αναλογία για τον ιό lenti θα ήταν $\frac{21,34}{1}$, ενώ για τον ιό foamy θα ήταν $\frac{3,52}{1}$, αν για την επιμόλυνση χρησιμοποιούνταν 10^6 T λεμφοκύτταρα. Σύμφωνα με τις παραπάνω αναλογίες, η επιμόλυνση με τον ιό foamy μπορεί να ήταν χαμηλότερης απόδοσης.

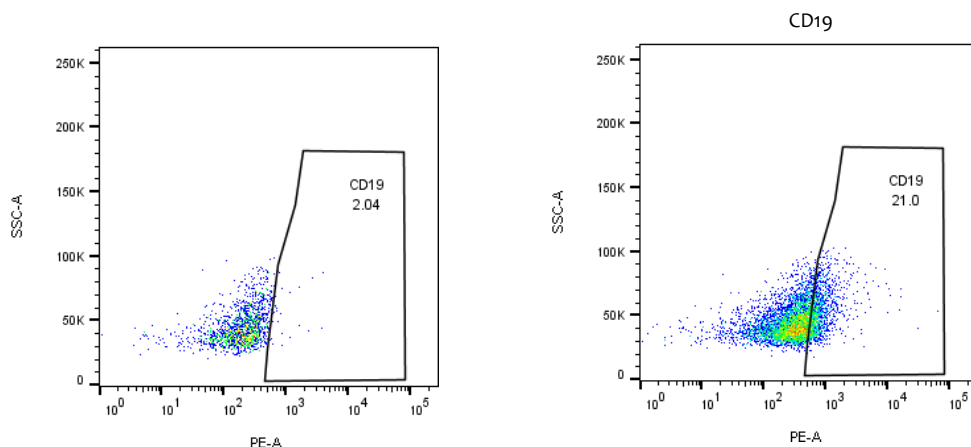
Η έκφραση των CAR υποδοχέων στα κύτταρα μετρήθηκε μέσω κυτταρομετρίας ροής (Εικόνα 37, Εικόνα 38) την 3^η ημέρα μετά τη επιμόλυνση, χρησιμοποιώντας και πάλι την πρωτεΐνη CD19 και το goat-anti-human ως δεύτερο αντίσωμα (το οποίο στοχεύει την Fc περιοχή της πρωτεΐνης CD19Fc) όπως ακριβώς και προηγουμένως, ώστε να μετρηθεί η ανίχνευση του φθορίζοντος μορίου PE.

❖ Για τον ιό lenti CAR:



Εικόνα 37: Γραφήματα που απεικονίζουν έναν πληθυσμό Τ λεμφοκυττάρων ως control, που δεν έχουν υποστεί επιμόλυνση (αριστερά), και τα Τ λεμφοκύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με τον ιό lenti CAR (δεξιά). Σε σύγκριση με τον control πληθυσμό, παρατηρείται ότι το 31,6% των Τ λεμφοκυττάρων που επιμολύνθηκαν εκφράζουν τον CAR υποδοχέα.

❖ Για τον ιό foamy CAR:



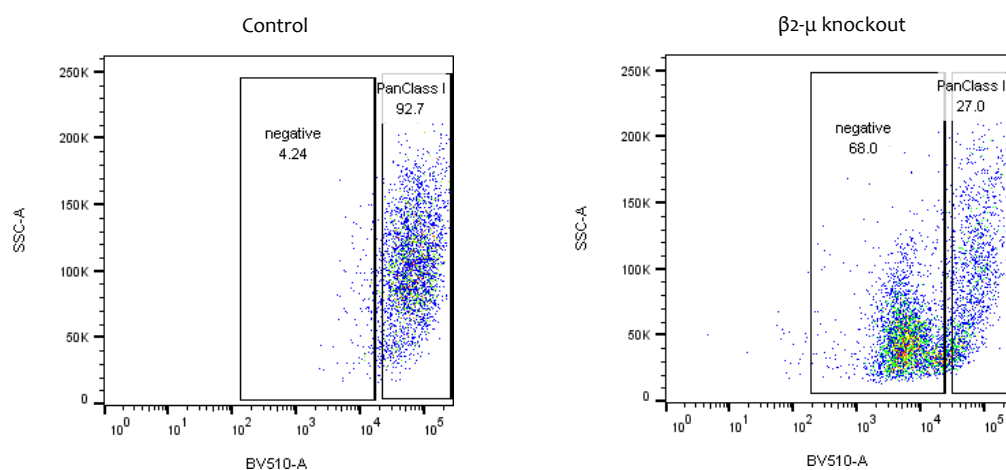
Εικόνα 38: Γραφήματα που απεικονίζουν έναν πληθυσμό Τ λεμφοκυττάρων ως control, που δεν έχουν υποστεί επιμόλυνση (αριστερά), και τα Τ λεμφοκύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με τον ιό foamy CAR (δεξιά). Σε σύγκριση με τον control πληθυσμό, παρατηρείται ότι το 21% των Τ λεμφοκυττάρων που επιμολύνθηκαν εκφράζουν τον CAR υποδοχέα.

Όπως προκύπτει και από τα παραπάνω γραφήματα, τα ποσοστά έκφρασης των υποδοχέων CAR στα Τ λεμφοκύτταρα αφορούσαν το 31,6% των κυττάρων για τον ιό lenti και το 21% για τον ιό foamy. Τα παραπάνω ποσοστά ήταν αναμενόμενα και ικανοποιητικά, οπότε το επόμενο βήμα ήταν η ηλεκτροδιάτρηση αυτών των κυττάρων με RNP σύμπλοκα.

4.11. Ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) CAR-T κυττάρων με RNP σύμπλοκα

Ύστερα από πέντε ημέρες αναμονής, έγινε η ηλεκτροδιάτρηση των CAR-T κυττάρων με τα RNP σύμπλοκα. Όπως και στην προηγούμενη ηλεκτροδιάτρηση, χρησιμοποιήθηκαν και τα δύο RNP σύμπλοκα στον ίδιο πληθυσμό κυττάρων. Ακολούθησε η εκ νέου ενεργοποίηση των κυττάρων και η επώασή τους στον κλίβανο. Μετά από πέντε ημέρες έγινε κυτταρομετρία ροής των CAR-T (Εικόνα 39), ώστε να διαπιστωθεί εάν υπήρξε μείωση στην έκφραση των μορίων MHCI στην επιφάνειά τους, και αν πράγματι υπήρξε, το ποσοστό αυτής.

Κατά την προετοιμασία των κυττάρων για την κυτταρομετρία ροής, έγινε χρώση αυτών χρησιμοποιώντας το αντίσωμα HLA-ABC, το οποίο προσδένεται στην α πολυπεπτιδική αλυσίδα του μορίου MHCI, και ήταν σημασμένο με το φθορίζον μόριο BV510.



Εικόνα 39: Γραφήματα που απεικονίζουν έναν πληθυσμό CAR-T κυττάρων ως control, που δεν έχουν υποστεί ηλεκτροδιάτρηση (αριστερά), και τα CAR-T κύτταρα που έχουν υποστεί ηλεκτροδιάτρηση με RNPs (δεξιά). Σε σύγκριση με τον control πληθυσμό, παρατηρείται ότι το 68% των CAR-T που υπέστησαν την ηλεκτροδιάτρηση δεν εκφράζουν πλέον το μόριο MHCI. Τα κύτταρα έχουν υποστεί χρώση με το HLA-ABC αντίσωμα, σημασμένο με BV510.

Τα παραπάνω γραφήματα μαρτυρούν πως ο πληθυσμός των CAR-T κυττάρων δεν εμφάνισε ολική αποσιώπηση της β2-μικροσφαιρίνης, όπως ήταν θεμιτό. Αντιθέτως, η αποσιώπηση του γονιδίου ήταν της τάξεως του 68% στον πληθυσμό, μεγαλύτερο ποσοστό σε σύγκριση με αυτό της ηλεκτροδιάτρησης που έγινε αρχικά στα T λεμφοκύτταρα.

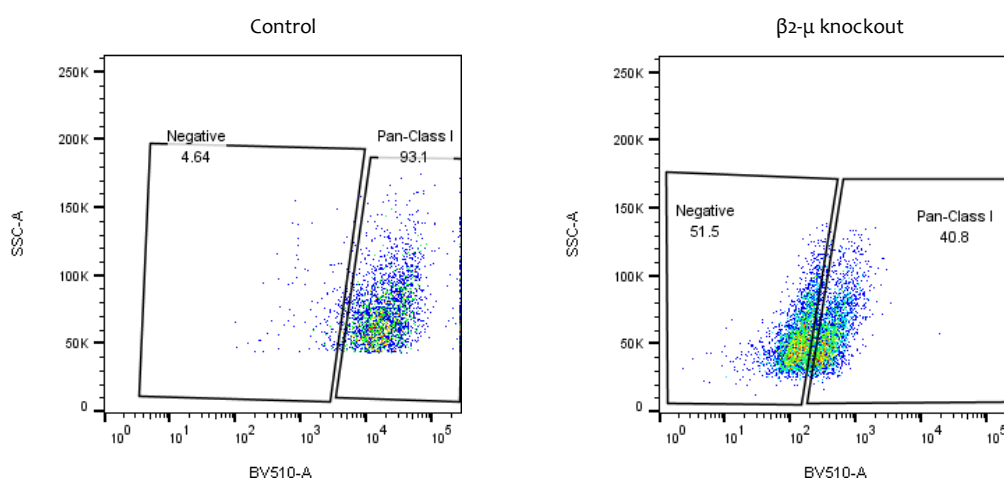
4.12 Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου ηλεκτροδιάτρησης (electroporation) T λεμφοκυττάρων με RNP σύμπλοκα

Εξετάζοντας τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων, κρίθηκε απαραίτητη η εφαρμογή τροποποιήσεων στη μεθοδολογία της ηλεκτροδιάτρησης με στόχο την επίτευξη ακόμη μεγαλύτερου ποσοστού απαλοιφής του μορίου MHCI (και κατ' επέκταση της β2-μικροσφαιρίνης), αλλά και την επαλήθευση των αποτελεσμάτων που έχουν ληφθεί μέχρι στιγμής. Με αυτό το σκεπτικό, έγιναν εκ νέου πειράματα ηλεκτροδιάτρησης σε T λεμφοκύτταρα.

Ακολουθήθηκαν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις, όπως έχει ήδη περιγραφεί, και έγιναν τέσσερα διαφορετικά πειράματα ηλεκτροδιάτρησης. Σε κάθε προσέγγιση ελέγχθηκε μια διαφορετική μέθοδος ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων και χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές ποσότητες των RNP συμπλόκων. Όπως και προηγουμένως, χρησιμοποιήθηκαν και τα δύο είδη των RNP συμπλόκων ταυτόχρονα στον ίδιο πληθυσμό κυττάρων. Μετά την ηλεκτροδιάτρηση έγινε κυτταρομετρία ροής στα δείγματα, ώστε να διαπιστωθεί το ποσοστό της απαλοιφής του μορίου MHCI. Για τη χρώση της κυτταρομετρίας χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα HLA-ABC, το οποίο προσδένεται στην α πολυπεπτιδική αλυσίδα του μορίου MHCI και ήταν σημασμένο με το φθορίζον μόριο BV510.

Τα ποσοστά αποσιώπησης της β2-μικροσφαιρίνης αυτή τη φορά κυμαίνονταν από 20% έως 60% και 90%. Επομένως, προέκυψε ότι αφενός τα αποτελέσματα ήταν επαναλήψιμα, και αφετέρου ότι ήταν πιθανόν να ληφθούν ακόμη μεγαλύτερα ποσοστά απαλοιφής της MHCI, όπως και έγινε.

Παρακάτω (Εικόνα 40) απεικονίζεται ενδεικτικά το αποτέλεσμα μίας εκ των κυτταρομετριών που έγιναν. Τα κύτταρα, προτού υποστούν ηλεκτροδιάτρηση, είχαν ενεργοποιηθεί με Dynabeads.



Εικόνα 40: Γραφήματα που απεικονίζουν έναν πληθυσμό T λεμφοκυττάρων ως control, που δεν έχουν υποστεί ηλεκτροδιάτρηση (αριστερά), και τα T λεμφοκύτταρα που έχουν υποστεί ηλεκτροδιάτρηση με RNPs (δεξιά). Σε σύγκριση με τον control πληθυσμό, παρατηρείται ότι το 51,5% των T λεμφοκυττάρων που υπέστησαν την ηλεκτροδιάτρηση δεν εκφράζουν πλέον το μόριο MHCI (αριστερά), ενώ το 40,8% εμφανίζουν μειωμένη έκφραση του μορίου. Τα κύτταρα έχουν υποστεί χρώση με το HLA-ABC αντίσωμα, σημασμένο με BV510.

Τα παραπάνω γραφήματα δείχνουν ότι το 90% των κυττάρων που εξετάστηκαν έχει υποστεί αποσιώπηση της β2-μικροσφαιρίνης. Συγκεκριμένα, αριστερά φαίνεται ένας πληθυσμός T λεμφοκυττάρων πλήρως αρνητικός για την πρωτεΐνη MHCI (51,5%), ενώ δεξιά απεικονίζονται T λεμφοκύτταρα τα οποία εμφανίζουν μείωση της έκφρασης του MHCI (40,8%). Στη δεύτερη περίπτωση μπορούμε να υποθέσουμε ότι ένα από τα δύο αντίγραφα του γονιδίου της β2-μικροσφαιρίνης έχει υποστεί μερική απαλοιφή.

Συμπερασματικά, λοιπόν, οι τροποποιήσεις που έγιναν στο πρωτόκολλο της ηλεκτροδιάτρησης των RNP συμπλόκων απέδωσαν, αφού στα τελευταία πειράματα παρατηρήθηκε σχεδόν ολική απαλοιφή του μορίου MHCI. Ειδικότερα, φαίνεται πως η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων με Dynabeads οδήγησε σε αύξηση της απόδοσης της γενετικής τροποποίησης. Αυτή η αύξηση πιθανότατα οφείλεται σε αυξημένη

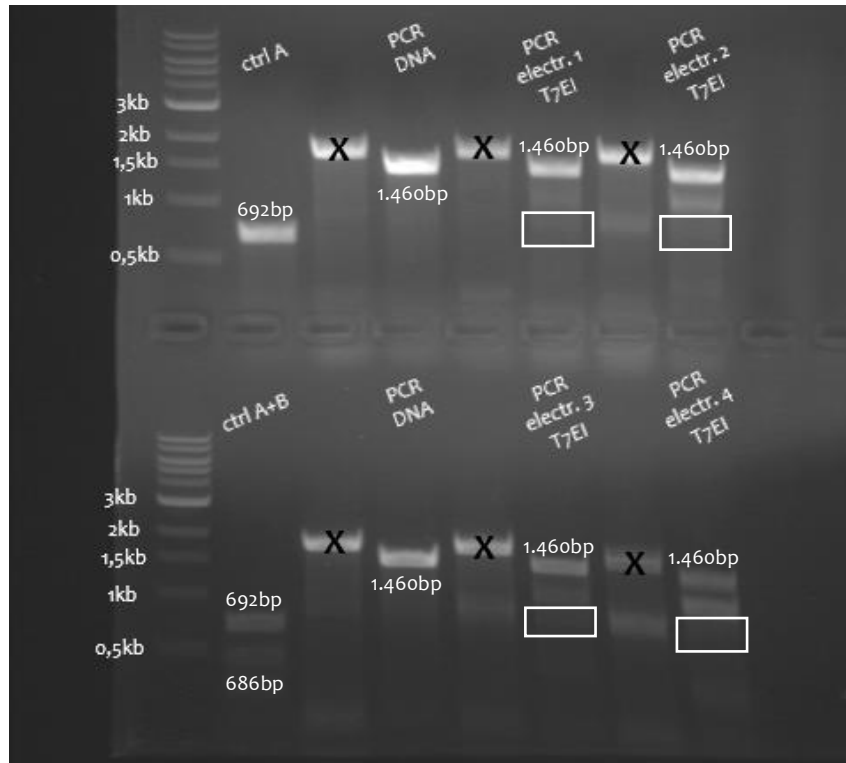
βιωσιμότητα των τροποποιημένων κυττάρων και σε μεγαλύτερη συμβατότητα της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε με τη συσκευή, αλλά και με τη μέθοδο ηλεκτροδιάτρησης.

Τέλος, μία αλλαγή που φαίνεται να έπαιξε επίσης ρόλο ήταν και το θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιέργειας, που ήταν RPMI με 10% FCS. Παρόλο που το αναμενόμενο ήταν ότι η χρήση του θρεπτικού μέσου Optimizer θα ευνοούσε την επιβίωση των τροποποιημένων T λεμφοκυττάρων, φάνηκε ότι η χρήση του RPMI έδωσε καλύτερα αποτελέσματα. Το Optimizer είναι ένα μέσο που ευνοεί την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων, ωστόσο η ιδιότητά του αυτή ίσως το καθιστά ασύμβατο με το Nucleofector 2b, το οποίο, ως παλιότερο μηχάνημα, ενδέχεται να αποτελεί μια πιο «επιθετική» μέθοδο ηλεκτροδιάτρησης. Τα κύτταρα που κατόρθωσαν να επανακάμψουν σε RPMI το πρώτο 24ωρο μετά την ηλεκτροδιάτρηση, ίσως λόγω βραδύτερου πολλαπλασιασμού, παρουσίασαν μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης και σταθερότητας.

4.13. Μοριακός έλεγχος της αποσιώπησης του γονιδίου της β2-μικροσφαιρίνης

Η επιτυχής απαλοιφή του μορίου MHCI από την επιφάνεια των T λεμφοκυττάρων, που αρχικά εξακριβώθηκε μέσω κυτταρομετρίας ροής, έπρεπε να επαληθευτεί και σε επίπεδο γονιδιώματος. Για αυτό τον λόγο, κύτταρα από τα παραπάνω πειράματα απομονώθηκαν, ώστε στη συνέχεια να εκχυλιστεί με τη σειρά του το γενετικό τους υλικό. Έπειτα, το τμήμα του DNA στο οποίο έδρασαν τα RNP σύμπλοκα ενισχύθηκε μέσω PCR, και ακολούθως αποδιατάχθηκε και υβριδίστηκε εκ νέου. Στον πληθυσμό των κυττάρων από τα οποία εκχυλίστηκε το DNA υπήρχαν κύτταρα που είχαν τροποποιηθεί γενετικά, καθώς και μη τροποποιημένα κύτταρα. Κατά την αντίδραση της PCR προέκυψαν δύο είδη ενισχυμένων προϊόντων: 1. προϊόντα ενίσχυσης στα οποία το CRISPR σύστημα είχε απαλείψει μία βάση ή γονιδιακό τμήμα, και 2. προϊόντα ενίσχυσης από μη τροποποιημένα κομμάτια DNA. Μετά από έναν κύκλο διάστασης και υβριδισμού των παραπάνω προϊόντων, προέκυψαν ομόλογα και ετερόλογα δίκλινα μόρια. Τα νέα δίκλινα μόρια είτε εμφάνιζαν κανονικό και πλήρη υβριδισμό (ομόλογα), αν δεν είχε επιτύχει η γενετική τροποποίηση του DNA, είτε εμφάνιζαν βρόχους (ετερόλογα) ως αποτέλεσμα μερικού υβριδισμού λόγω μη συμπληρωματικότητας των δύο αλυσίδων, αν το ένζυμο της Cas9 είχε προκαλέσει σημειακή μετάλλαξη στη μία από αυτές. Έπειτα, στο μείγμα αυτό των μορίων DNA από την PCR προστέθηκε η T7EI περιοριστική ενδονουκλεάση, η οποία είναι ικανή να αναγνωρίζει τους βρόχους αυτούς, όταν υπάρχουν, και να κόβει το DNA σε εκείνο το σημείο. Τέλος, το αποτέλεσμα κάθε αντίδρασης PCR ελέγχθηκε μέσω ηλεκτροφορήσεως σε πήκτωμα αγαρόζης πυκνότητας 0,8% (Εικόνα 41).

Τα δείγματα DNA που ενισχύθηκαν ήταν τέσσερα, όσα και οι πληθυσμοί στους οποίους έγινε επιτυχής γενετική τροποποίηση. Το προϊόν των PCR είχε μήκος 1.460bp. Οι αναμενόμενες ζώνες των πέψεων με την T7EI δεν ήταν δυνατόν να υπολογιστούν επακριβώς, εξαιτίας της φύσεως του πειράματος. Το μήκος τους ήταν κατά προσέγγιση 700bp.



Εικόνα 41: Απεικόνιση των πέψεων των προϊόντων των PCR, τμήματος του γονιδίου της β2-μικροσφαιρίνης. Επισημαίνονται τα μήκη των ζωνών του μάρτυρα μοριακών βαρών 1kb DNA ladder. Ακολουθούν τα control A και A+B, που δρα ως εσωτερικά αρνητικά και θετικά control του kit. Έπειτα φαίνεται το PCR DNA που δρα ως αρνητικό control της πέψης, και ακολουθούν οι ζώνες των πέψεων με το ένζυμο T7EI. Το άκοπο προϊόν της PCR είχε μήκος 1.460bp. Τα επιθυμητά τμήματα των πέψεων με το ένζυμο T7EI φαίνονται στο εσωτερικό των λευκών πλαισίων και είχαν μήκος 700bp.

Σύμφωνα με την παραπάνω εικόνα της ανάλυσης των προϊόντων των πέψεων των αντιδράσεων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης, οι ζώνες που έχουν προκύψει ταυτίζονται με τις αναμενόμενες. Εφόσον η ενδονουκλεάση T7EI κατόρθωσε να ανιχνεύσει, και συνεπώς να πέσει τους βρόχους των προϊόντων αυτών, συμπεραίνεται ότι πραγματικά έγινε η επιθυμητή γενετική τροποποίηση του γονιδιώματος των T λεμφοκυττάρων μέσω των RNP συμπλόκων.

5. Συζήτηση

Η χορήγηση T λεμφοκυττάρων που φέρουν χιμαιρικούς αντιγονικούς υποδοχείς (CAR-Ts) σε ασθενείς που πάσχουν από ορισμένους τύπους λευχαιμιών και λεμφωμάτων, αποτελεί μια μορφή ανοσοθεραπείας που έχει επιδείξει μεγάλα ποσοστά ύφεσης των ασθενών που έχουν υποβληθεί σε αυτήν ⁴⁸. Παρόλα αυτά, όπως συμβαίνει με κάθε θεραπεία, είναι ανάγκη και τα CAR-T κύτταρα να τροποποιούνται και να αναδιαμορφώνονται συνεχώς, ώστε να αυξάνεται ολοένα η απόδοσή τους και να μειώνονται οι παρενέργειες που προκαλούν στον ασθενή. Με αυτό το σκεπτικό, η παρούσα πτυχιακή εργασία εξέτασε έναν τρόπο μέσω του οποίου θα ήταν δυνατή η μετρίαση του GvHD και του HnGD, τα οποία συμβάλλουν σε μια από τις κύριες παρενέργειες που παρατηρούνται κατά τη δράση των CAR-T κυττάρων, στο σύνδρομο απελευθέρωσης κυτταροκινών (CRS), ειδικά αν τα CAR-T κύτταρα είναι αλλογενή ⁵⁰. Έχει τονιστεί από πληθώρα ερευνών ότι για το CRS δεν είναι υπεύθυνη η δράση των CAR-T κυττάρων στο βαθμό που είχε προηγουμένως υποτεθεί, καθώς μεγαλύτερο ρόλο φαίνεται να έχει η αναγνώριση από, και η αλληλεπίδραση αυτών με το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς (GvHD και HnGD) ⁵³. Μάλιστα, η αλληλεπίδραση αυτή είναι μεγαλύτερη όταν τα CAR-T κύτταρα δημιουργούνται από αλλογενή T λεμφοκύτταρα, καθώς στην περίπτωση εκείνη τα κύτταρα φέρουν πολλά αλλογενή μόρια επιφανείας (όπως είναι οι πρωτεΐνες MHC1 και οι TCR), σε αντίθεση με τα αυτόλογα CAR-T, τα οποία το μοναδικό «ξένο» μόριο που φέρουν είναι ο υποδοχέας CAR. Επιπλέον, η αναγνώριση των CAR-T από το ανοσοποιητικό σύστημα του δέκτη οδηγεί σε μειωμένα ποσοστά επιβίωσης και εγκαθίδρυσής τους στον οργανισμό του, κάτι που μπαίνει εμπόδιο στη θεραπεία ⁶⁶.

Έχοντας υπόψη τα παραπάνω, λοιπόν, η παρούσα πτυχιακή εργασία στόχευσε στην απαλοιφή της πρωτεΐνης MHC1 από την επιφάνεια αλλογενών κυττάρων CAR-T, μέσω της τεχνολογίας επεξεργασίας των νουκλεϊκών οξέων CRISPR/Cas9, με απώτερο σκοπό να εξεταστεί μελλοντικά κατά πόσο τα επίπεδα του GvHD και του HnGD, και κατ' επέκταση του CRS, μειώνονται κατά τη θεραπεία, αλλά και κατά πόσο τα CAR-T επιμένουν στον οργανισμό του δέκτη μετά την τροποποίηση αυτή.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε αρχικά περιελάμβανε την κατασκευή δύο πλασμιδιακών φορέων, για την ανάπτυξη ενός παροδικού συστήματος με σκοπό την αδρανοποίηση του γονιδίου της β2-μικροσφαιρίνης. Για την περάτωση του παραπάνω, αρχικά έγινε η απομόνωση και η ενσωμάτωση της αλληλουχίας του γονιδίου της πρωτεΐνης Cas9 και δύο αλληλουχιών sgRNA, στο πλασμίδιο PUC19. Στη συνέχεια, τα νεοσύστατα πλασμίδια Cas9-PUC19 και sgRNA-PUC19 θα εισάγονταν στα T λεμφοκύτταρα. Το αναμενόμενο αποτέλεσμα ήταν η έκφραση μιας λειτουργικής CRISPR/Cas9 μηχανής που θα στόχευε σε δύο σημεία του πρώτου εξονίου ^{79,80} του γονιδίου της β2-μικροσφαιρίνης, προσεκτικά επιλεγμένα ώστε η ορθή συναρμολότητα του μορίου MHC1 να μην ήταν δυνατόν να συμβεί και το MHC1 μόριο να ήταν αδύνατον να ταξιδέψει στην επιφάνεια του CAR-T κυττάρου ως αποτέλεσμα ⁶⁰.

Παρόλα αυτά, κατά τις κυτταρομετρίες που διεξήχθησαν σε HEK293T αλλά και σε T λεμφοκύτταρα που είχαν λάβει τα παραπάνω πλασμίδια, δεν παρατηρήθηκε πλήρης ή μερική απαλοιφή του μορίου MHC1, παρόλο που τα πειράματα έγιναν κατ' επανάληψη και με διαφορετικές συνθήκες κάθε φορά. Τα πλασμίδια που

δημιουργήθηκαν, λοιπόν, εστάλησαν προς αλληλούχηση ώστε να εξακριβώνονταν τυχόν λάθη που ενδεχομένως προέκυψαν κατά τη δημιουργία τους. Τα αποτελέσματα των αλληλουχήσεων των τριών πλασμιδίων δεν φανέρωσαν λάθη στις αλληλουχίες τους, ενώ οι πέψεις ελέγχου που είχαν διεξαχθεί κατά τη διαδικασία δημιουργίας τους δεν είχαν φανερώσει λάθη στον προσανατολισμό των γονιδίων. Το συμπέρασμα, το οποίο επιβεβαιώνει και η βιβλιογραφία, ήταν ότι η χρήση πλασμιδιακών φορέων για τη γενετική τροποποίηση του DNA φέρει πολλά προβλήματα. Συγκεκριμένα, η ύπαρξη δυσκολίας στην εισαγωγή των πλασμιδίων στον πυρήνα του κυττάρου, το μεγάλο χρονικό διάστημα που μεσολαβεί για τη σύσταση και τη δράση της CRISPR/Cas9 μηχανής, καθώς και η παραμονή των πλασμιδίων στον πυρήνα που μπορεί να οδηγήσει σε εκτός του στόχου (off-target) επιδράσεις στο DNA, μειώνουν σε πολύ μεγάλο βαθμό την απόδοση των πλασμιδιακών φορέων. Τέλος, δεν είναι όλα τα κύτταρα δεκτικά σε εξωγενές DNA, με αποτέλεσμα σε πολλές περιπτώσεις να παρατηρείται κυτταροτοξικότητα [87,89](#).

Αποφασίστηκε, λοιπόν, να γίνει αλλαγή της μεθόδου που ακολουθήθηκε. Αντί για τα πλασμίδια που είχαν δομηθεί, αποφασίστηκε η χρήση συμπλόκων RNP. Ένα RNP σύμπλοκο αποτελείται από το ένζυμο της Cas9 και ένα guide RNA duplex, το οποίο κατευθύνει το ένζυμο σε ένα επιλεγμένο σημείο του DNA του κυττάρου, όπου θα γίνει η γενετική τροποποίηση. Η επιλογή της γενετικής τροποποίησης του DNA μέσω RNP συμπλόκων έγινε, έναντι άλλων μεθόδων, διότι έχει παρατηρηθεί πως είναι η πιο ακριβής και η πιο αποδοτική [78,81](#). Συγκεκριμένα, η γενετική τροποποίηση μέσω RNP συμπλόκων έχει παρατηρηθεί πως εμφανίζει μεγαλύτερη επί του στόχου (on-target) απόδοση, λιγότερες εκτός του στόχου (off-target) επιδράσεις, ταχύτερη γενετική τροποποίηση, χαμηλότερα επίπεδα κυτταροτοξικότητας και μειωμένη ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος σε σύγκριση με την εισαγωγή της μηχανής CRISPR/Cas9 στο κύτταρο μέσω πλασμιδιακών και ιικών φορέων ή μέσω mRNA μορίων [87,88,89,90](#).

Δομήθηκαν, λοιπόν, δύο RNP σύμπλοκα, κάθε ένα εκ των οποίων στόχευε και πάλι σε ένα διαφορετικό σημείο του γονιδίου της β2-μικροσφαιρίνης. Αυτή τη φορά στόχος ήταν το δεύτερο εξόνιο του γονιδίου, όπου στόχευαν τα προτεινόμενα gRNA της Integrated DNA Technologies, τα οποία επιλέχθηκαν χρησιμοποιώντας το [Alt-R™ Predesigned Cas9 crRNA Selection Tool](#). Στη συνέχεια, έγινε ηλεκτροδιάτρηση των συμπλόκων αυτών σε T λεμφοκύτταρα και τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν μέσω κυτταρομετρίας ροής.

Αρχικά έγινε ηλεκτροδιάτρηση των RNP συμπλόκων σε T λεμφοκύτταρα, και έπειτα σε CAR-T κύτταρα. Στη συνέχεια τα T λεμφοκύτταρα παρατηρήθηκαν μέσω κυτταρομετρίας ροής, η οποία φανέρωσε ότι από τον συνολικό πληθυσμό των κυττάρων που εξετάστηκαν, μόνο στο 30% είχε γίνει απαλοιφή του μορίου MHCI. Όσον αφορά τα CAR-T κύτταρα, η απαλοιφή που παρατηρήθηκε ήταν της τάξεως του 68% στον πληθυσμό, το οποίο ήταν πολύ ενθαρρυντικό αποτέλεσμα. Παρόλα αυτά, έπρεπε αφενός να εξακριβωθεί ότι το αποτέλεσμα αυτό δεν ήταν προϊόν τυχαιότητας, και αφετέρου να γίνουν προσπάθειες για ακόμη μεγαλύτερα ποσοστά απαλοιφής.

Στην προσπάθεια να επιτευχθούν οι παραπάνω στόχοι, έγιναν διάφορες αλλαγές στο πρωτόκολλο που μέχρι εκείνη τη στιγμή χρησιμοποιούνταν. Συγκεκριμένα, δοκιμάστηκε η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων και με το T Cell TransAct™ (Human) Kit της Miltenyi Biotec και με τα Dynabeads™ Human T-Activator

CD3/CD28 for T Cell Expansion and Activation της Gibco™. Επίσης, η ποσότητα των RNP συμπλόκων που χρησιμοποιούνταν στην ηλεκτροδιάτρηση αυξήθηκε από τα 5μl, στα 7μl (1^η προσέγγιση – ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα με TransAct) και στα 16μl (2^η προσέγγιση – ενεργοποιημένα με Dynabeads και μη ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα).

Και οι δύο μέθοδοι ενεργοποίησης λειτουργούν ενεργοποιώντας τα T λεμφοκύτταρα με τη χρήση αντισωμάτων ενάντια στα μόρια CD3 και το CD28, αλλά αλλάζει ο τρόπος που τα αντισώματα παρουσιάζονται στα κύτταρα κάθε φορά. Στην περίπτωση των Dynabeads, τα αντι-CD3 και αντι-CD28 είναι ακινητοποιημένα σε μαγνητικά σφαιρίδια, ενώ στην περίπτωση του TransAct σε ένα πολυμερές υλικό.

Εφόσον, λοιπόν, εφαρμόστηκαν οι παραπάνω αλλαγές, διεξήχθησαν κι άλλα πειράματα ηλεκτροδιάτρησης με RNP σύμπλοκα σε T λεμφοκύτταρα. Και για αυτά τα πειράματα, η απαλοιφή του μορίου MHCI μελετήθηκε μέσω κυτταρομετρίας ροής. Εν τέλει φάνηκε ότι οι τροποποιήσεις που έγιναν είχαν αντίκτυπο, καθώς στα πειράματα αυτά ανιχνεύθηκε απαλοιφή του MHCI της τάξεως του 50% και 90% στον κυτταρικό πληθυσμό. Η αύξηση της απόδοσης της γενετικής τροποποίησης αποδόθηκε στη χρήση ενός «κατώτερου» θρεπτικού μέσου, του RPMI, το οποίο σε σχέση με το Optimizer έδωσε καλύτερα αποτελέσματα ως προς την επιβίωση των τροποποιημένων κυττάρων. Συγκεκριμένα, τα T λεμφοκύτταρα παρουσίασαν χαμηλότερα ποσοστά πολλαπλασιασμού στο RPMI, σε σχέση με το Optimizer. Το θρεπτικό μέσο μπορεί να αποτελέσει μια κρίσιμη συνθήκη για την επιτυχία ενός πειράματος, ειδικά όταν η τεχνολογία που χρησιμοποιείται για την ηλεκτροδιάτρηση φαίνεται να είναι πολύ «επιθετική» για τα T λεμφοκύτταρα, όπως ίσως συνέβη στην περίπτωση της συσκευής Nucleofector 2b.

Τα παραπάνω ποσοστά συμφωνούν με αυτά που απαντώνται στη βιβλιογραφία, όπου η απαλοιφή του μορίου MHCI από την επιφάνεια T λεμφοκυττάρων χρησιμοποιώντας τα RNP σύμπλοκα φτάνει τα ποσοστά 40%-55% [82,83](#). Σε άλλους κυτταρικούς τύπους όπως είναι οι ινοβλάστες, τα HEK293T και τα μακροφάγα, τα ποσοστά απαλοιφής κυμαίνονται μεταξύ 45% και 90% [83,84,85](#).

Εφόσον η γενετική τροποποίηση του γονιδίου της β2-μικροσφαιρίνης έγινε επιτυχώς σε ικανοποιητικό ποσοστό των T λεμφοκυττάρων, τα κύτταρα αυτά μένει να μετατραπούν σε CAR-T κύτταρα και να δοκιμαστούν μελλοντικά σε ποντίκια οργανισμούς μοντέλα. Απαραίτητη προϋπόθεση για την διεξαγωγή τέτοιων δοκιμών είναι η καταστροφή του ενδογενούς μυελού των οστών των ποντικών και η μεταμόσχευση ανθρώπινου, ώστε τα λευκοκύτταρά τους να φέρουν τα ανθρώπινα μόρια επιφανείας και να μπορεί να γίνει άμεση σύγκριση με τον ανθρώπινο οργανισμό. Στα συγκεκριμένα ποντίκια θα πρέπει να έχει επαχθεί λέμφωμα ή λευχαιμία όπου υπερεκφράζεται η πρωτεΐνη CD19, με σκοπό να παρατηρηθεί κατά πόσο η απαλοιφή του μορίου MHCI από τα CAR-T κύτταρα συμβάλλει στη μείωση του GvHD, του HvGD και του CRS κατά τη θεραπεία. Μέσω των κλινικών δοκιμών θα διαπιστωθεί επίσης κατά πόσο η επιμονή των CAR-T στον οργανισμό βελτιώνεται σε ασθενείς που πάσχουν από αυτές τις ασθένειες.

6. Βιβλιογραφία

1. Tomar N, De RK. 2014. A Brief Outline of the Immune System. In: De RK, Tomar N, editors. Immunoinformatics [Internet]. Vol. 1184. New York, NY: Springer New York; [accessed 2022 May 5]; p. 3–12. doi:[10.1007/978-1-4939-1115-8_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1115-8_1)
2. Delves PJ, Roitt IM. 2000. The Immune System. New England Journal of Medicine [Internet]. [accessed 2022 Jun 7] 343(1):37–49. doi:[10.1056/NEJM200007063430107](https://doi.org/10.1056/NEJM200007063430107)
3. Parham P, Janeway C. 2015. The immune system. Fourth edition. New York, NY: Garland Science, Taylor & Francis Group.
4. McComb S, Thiriot A, Akache B, Krishnan L, Stark F. 2019. Introduction to the Immune System. In: Fulton KM, Twine SM, editors. Immunoproteomics [Internet]. Vol. 2024. New York, NY: Springer New York; [accessed 2022 May 5]; p. 1–24. doi:[10.1007/978-1-4939-9597-4_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9597-4_1)
5. Seita J, Weissman IL. 2010. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. WIREs Mechanisms of Disease. 2(6):640–653. doi:[10.1002/wsbm.86](https://doi.org/10.1002/wsbm.86)
6. Mosaad YM. 2014. Hematopoietic stem cells: An overview. Transfusion and Apheresis Science. 51(3):68–82. doi:[10.1016/j.transci.2014.10.016](https://doi.org/10.1016/j.transci.2014.10.016)
7. Zhang Y, Gao S, Xia J, Liu F. 2018. Hematopoietic Hierarchy – An Updated Roadmap. Trends in Cell Biology. 28(12):976–986. doi:[10.1016/j.tcb.2018.06.001](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.06.001)
8. Chiba Y, Mizoguchi I, Hasegawa H, Ohashi M, Orii N, Nagai T, Sugahara M, Miyamoto Y, Xu M, Owaki T, Yoshimoto T. 2018. Regulation of myelopoiesis by proinflammatory cytokines in infectious diseases. Cell Mol Life Sci. 75(8):1363–1376. doi:[10.1007/s00018-017-2724-5](https://doi.org/10.1007/s00018-017-2724-5)
9. Abbas AK, Pillai S, Lichtman AH. 2013. Basic Immunology. Fourth Edition. :342.
10. Rosales C. 2020. Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity. J Leukoc Biol. 108(1):377–396. doi:[10.1002/JLB.4MIR0220-574RR](https://doi.org/10.1002/JLB.4MIR0220-574RR)
11. Kolaczowska E, Kubes P. 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. Nat Rev Immunol. 13(3):159–175. doi:[10.1038/nri3399](https://doi.org/10.1038/nri3399)
12. Liew PX, Kubes P. 2019. The Neutrophil's Role During Health and Disease. Physiological Reviews. 99(2):1223–1248. doi:[10.1152/physrev.00012.2018](https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2018)
13. Jiang H, Chess L. 2006. Regulation of Immune Responses by T Cells. N Engl J Med. 354(11):1166–1176. doi:[10.1056/NEJMra055446](https://doi.org/10.1056/NEJMra055446)
14. Delves PJ, Roitt IM. 2000. The Immune System [Internet]. [accessed 2022 Jun 7]. doi:[10.1056/NEJM200007133430207](https://doi.org/10.1056/NEJM200007133430207)
15. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. 2012. CD4⁺ T Cells: Differentiation and Functions. Clinical and Developmental Immunology. 2012:1–12. doi:[10.1155/2012/925135](https://doi.org/10.1155/2012/925135)

16. Andersen MH, Schrama D, Straten P, Becker JC. 2006. Cytotoxic T Cells. *Journal of Investigative Dermatology*. 126(1):32–41. doi:[10.1038/sj.jid.5700001](https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700001)
17. Cancer. [accessed 2022 Jun 10]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
18. Torpy JM, Lynn C, Glass RM. 2010. Cancer: The Basics. *JAMA* [Internet]. [accessed 2022 Jun 10] 304(14):1628. doi:[10.1001/jama.304.14.1628](https://doi.org/10.1001/jama.304.14.1628)
19. What Is Cancer? 2007. [accessed 2022 Jun 10]. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
20. Visvader JE. 2011. Cells of origin in cancer. *Nature*. 469(7330):314–322. doi:[10.1038/nature09781](https://doi.org/10.1038/nature09781)
21. Blanpain C. 2013. Tracing the cellular origin of cancer. *Nat Cell Biol*. 15(2):126–134. doi:[10.1038/ncb2657](https://doi.org/10.1038/ncb2657)
22. Leukemia - Symptoms and causes. Mayo Clinic [Internet]. [accessed 2022 Jun 14]. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/leukemia/symptoms-causes/syc-20374373>
23. Onciu M. 2009. Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 23(4):655–674. doi:[10.1016/j.hoc.2009.04.009](https://doi.org/10.1016/j.hoc.2009.04.009)
24. Terwilliger T, Abdul-Hay M. 2017. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J*. 7(6):e577–e577. doi:[10.1038/bcj.2017.53](https://doi.org/10.1038/bcj.2017.53)
25. Acute lymphocytic leukemia - Symptoms and causes. Mayo Clinic [Internet]. [accessed 2022 Jun 14]. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/acute-lymphocytic-leukemia/symptoms-causes/syc-20369077>
26. Shipley JL, Butera JN. 2009. Acute myelogenous leukemia. *Experimental Hematology*. 37(6):649–658. doi:[10.1016/j.exphem.2009.04.002](https://doi.org/10.1016/j.exphem.2009.04.002)
27. Faderl S, Kantarjian HM. 2018. Clinical Manifestations and Treatment of Acute Myeloid Leukemia. In: *Hematology* [Internet]. [place unknown]: Elsevier; [accessed 2022 Jun 14]; p. 924–943. doi:[10.1016/B978-0-323-35762-3.00059-7](https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35762-3.00059-7)
28. Acute myelogenous leukemia - Symptoms and causes. Mayo Clinic [Internet]. [accessed 2022 Jun 14]. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/acute-myelogenous-leukemia/symptoms-causes/syc-20369109>
29. Scarfò L, Ferreri AJM, Ghia P. 2016. Chronic lymphocytic leukaemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 104:169–182. doi:[10.1016/j.critrevonc.2016.06.003](https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.06.003)
30. Chronic lymphocytic leukemia - Symptoms and causes. Mayo Clinic [Internet]. [accessed 2022 Jun 17]. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/chronic-lymphocytic-leukemia/symptoms-causes/syc-20352428>
31. Jabbour E, Kantarjian H. 2018. Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am J Hematol*. 93(3):442–459. doi:[10.1002/ajh.25011](https://doi.org/10.1002/ajh.25011)

32. Chronic myelogenous leukemia - Symptoms and causes. Mayo Clinic [Internet]. [accessed 2022 Jun 17]. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/chronic-myelogenous-leukemia/symptoms-causes/syc-20352417>
33. Küppers R, Engert A, Hansmann M-L. 2012. Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest.* 122(10):3439–3447. doi:[10.1172/JCI61245](https://doi.org/10.1172/JCI61245)
34. Ansell SM. 2015. Hodgkin Lymphoma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings.* 90(11):1574–1583. doi:[10.1016/j.mayocp.2015.07.005](https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.07.005)
35. Lymphoma - Symptoms and causes. Mayo Clinic [Internet]. [accessed 2022 Jun 19]. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/lymphoma/symptoms-causes/syc-20352638>
36. Non-Hodgkin's lymphoma - Symptoms and causes. Mayo Clinic [Internet]. [accessed 2022 Jun 20]. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/non-hodgkins-lymphoma/symptoms-causes/syc-20375680>
37. Nogai H, Dörken B, Lenz G. 2011. Pathogenesis of Non-Hodgkin's Lymphoma. *JCO.* 29(14):1803–1811. doi:[10.1200/JCO.2010.33.3252](https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.3252)
38. Pratap S, Scordino TS. 2019. Molecular and cellular genetics of non-Hodgkin lymphoma: Diagnostic and prognostic implications. *Experimental and Molecular Pathology.* 106:44–51. doi:[10.1016/j.yexmp.2018.11.008](https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2018.11.008)
39. Amer MH. 2014. Gene therapy for cancer: present status and future perspective. *Mol and Cell Ther.* 2(1):27. doi:[10.1186/2052-8426-2-27](https://doi.org/10.1186/2052-8426-2-27)
40. Dunbar CE, High KA, Joung JK, Kohn DB, Ozawa K, Sadelain M. 2018. Gene therapy comes of age. *Science.* 359(6372):eaan4672. doi:[10.1126/science.aan4672](https://doi.org/10.1126/science.aan4672)
41. Mali S. 2013. Delivery systems for gene therapy. *Indian J Hum Genet.* 19(1):3. doi:[10.4103/0971-6866.112870](https://doi.org/10.4103/0971-6866.112870)
42. Anguela XM, High KA. 2019. Entering the Modern Era of Gene Therapy. *Annu Rev Med.* 70(1):273–288. doi:[10.1146/annurev-med-012017-043332](https://doi.org/10.1146/annurev-med-012017-043332)
43. Lukashev AN, Zamyatnin AA. 2016. Viral vectors for gene therapy: Current state and clinical perspectives. *Biochemistry Moscow [Internet].* [accessed 2022 Oct 24] 81(7):700–708. doi:[10.1134/S0006297916070063](https://doi.org/10.1134/S0006297916070063)
44. Gardlík R, Pálffy R, Hodosy J, Lukács J, Turňa J, Celec P. Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med Sci Monit.*:13. [Internet] <https://medscimonit.com/abstract/index/idArt/15907>
45. Wirth T, Ylä-Herttuala S. 2014. Gene Therapy Used in Cancer Treatment. *Biomedicines.* 2(2):149–162. doi:[10.3390/biomedicines2020149](https://doi.org/10.3390/biomedicines2020149)
46. Feins S, Kong W, Williams EF, Milone MC, Fraietta JA. 2019. An introduction to chimeric antigen receptor (CAR) T-cell immunotherapy for human cancer. *Am J Hematol.* 94(S1):S3–S9. doi:[10.1002/ajh.25418](https://doi.org/10.1002/ajh.25418)

47. Guedan S, Calderon H, Posey AD, Maus MV. 2019. Engineering and Design of Chimeric Antigen Receptors. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*. 12:145–156. doi:[10.1016/j.omtm.2018.12.009](https://doi.org/10.1016/j.omtm.2018.12.009)
48. Boyiadzis MM, Dhodapkar MV, Brentjens RJ, Kochenderfer JN, Neelapu SS, Maus MV, Porter DL, Maloney DG, Grupp SA, Mackall CL, et al. 2018. Chimeric antigen receptor (CAR) T therapies for the treatment of hematologic malignancies: clinical perspective and significance. *J Immunotherapy Cancer*. 6(1):137. doi:[10.1186/s40425-018-0460-5](https://doi.org/10.1186/s40425-018-0460-5)
49. Egri N, Ortiz de Landazuri I, San Bartolomé C, Ortega JR, Español-Rego M, Juan M. 2020. CART manufacturing process and reasons for academy-pharma collaboration. *Immunology Letters*. 217:39–48. doi:[10.1016/j.imlet.2019.10.014](https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.10.014)
50. Abramson JS. 2020. Anti-CD19 CAR T-Cell Therapy for B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma. *Transfusion Medicine Reviews*. 34(1):29–33. doi:[10.1016/j.tmr.2019.08.003](https://doi.org/10.1016/j.tmr.2019.08.003)
51. Santomaso B, Bachier C, Westin J, Rezvani K, Shpall EJ. 2019. The Other Side of CAR T-Cell Therapy: Cytokine Release Syndrome, Neurologic Toxicity, and Financial Burden. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*.(39):433–444. doi:[10.1200/EDBK_238691](https://doi.org/10.1200/EDBK_238691)
52. Chen H, Wang F, Zhang P, Zhang Y, Chen Y, Fan X, Cao X, Liu J, Yang Y, Wang B, et al. 2019. Management of cytokine release syndrome related to CAR-T cell therapy. *Front Med*. 13(5):610–617. doi:[10.1007/s11684-019-0714-8](https://doi.org/10.1007/s11684-019-0714-8)
53. Wei J, Liu Y, Wang C, Zhang Y, Tong C, Dai G, Wang W, Rasko JEJ, Melenhorst JJ, Qian W, et al. 2020. The model of cytokine release syndrome in CAR T-cell treatment for B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Sig Transduct Target Ther*. 5(1):134. doi:[10.1038/s41392-020-00256-x](https://doi.org/10.1038/s41392-020-00256-x)
54. Liu J, Zhou G, Zhang L, Zhao Q. 2019. Building Potent Chimeric Antigen Receptor T Cells With CRISPR Genome Editing. *Front Immunol*. 10:456. doi:[10.3389/fimmu.2019.00456](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00456)
55. Matsuuchi L, Gold MR. 2001. New views of BCR structure and organization. *Current Opinion in Immunology*. 13(3):270–277. doi:[10.1016/S0952-7915\(00\)00215-6](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(00)00215-6)
56. Harwood NE, Batista FD. 2010. Early Events in B Cell Activation. *Annu Rev Immunol*. 28(1):185–210. doi:[10.1146/annurev-immunol-030409-101216](https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101216)
57. Murphy K, Weaver C. 2016. *Janeway's Immunobiology*. Ninth Edition.
58. Medzhitov R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 449(7164):819–826. doi:[10.1038/nature06246](https://doi.org/10.1038/nature06246)
59. Punt J, Stranford S, Jones P, Owen J. 2018. *Kuby Immunology*. Eighth Edition.
60. Donaldson JG, Williams DB. 2009. Intracellular Assembly and Trafficking of MHC Class I Molecules. *Traffic*. 10(12):1745–1752. doi:[10.1111/j.1600-0854.2009.00979.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00979.x)
61. Cresswell P. 2000. Intracellular Surveillance: Controlling the Assembly of MHC Class I-Peptide Complexes. *Traffic*. 1(4):301–305. doi:[10.1034/j.1600-0854.2000.010402.x](https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2000.010402.x)
62. Cresswell P, Androlewicz MJ, Ortmann B. 2007. Assembly and Transport of Class I MHC-Peptide Complexes. In: Chadwick DJ, Marsh J, editors. *Novartis Foundation Symposia*

[Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.; [accessed 2022 Nov 21]; p. 150–169. doi:[10.1002/9780470514672.ch10](https://doi.org/10.1002/9780470514672.ch10)

63. Antoniou AN, Powis SJ, Elliott T. 2003. Assembly and export of MHC class I peptide ligands. *Current Opinion in Immunology*. 15(1):75–81. doi:[10.1016/S0952-7915\(02\)00010-9](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(02)00010-9)

64. Guo H, Qian L, Cui J. 2021. Focused evaluation of the roles of macrophages in chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy associated cytokine release syndrome. *Cancer Biol Med*. 18:0–0. doi:[10.20892/j.issn.2095-3941.2021.0087](https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2021.0087)

65. Depil S, Duchateau P, Grupp SA, Mufti G, Poirot L. 2020. ‘Off-the-shelf’ allogeneic CAR T cells: development and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 19(3):185–199. doi:[10.1038/s41573-019-0051-2](https://doi.org/10.1038/s41573-019-0051-2)

66. Aftab BT, Sasu B, Krishnamurthy J, Gschweng E, Alcazer V, Depil S. 2020. Toward “off-the-shelf” allogeneic CAR T cells. *Adv Cell Gene Ther* [Internet]. [accessed 2022 Nov 28] 3(3). doi:[10.1002/acg2.86](https://doi.org/10.1002/acg2.86)

67. Graham C, Jozwik A, Pepper A, Benjamin R. 2018. Allogeneic CAR-T Cells: More than Ease of Access? *Cells*. 7(10):155. doi:[10.3390/cells7100155](https://doi.org/10.3390/cells7100155)

68. Qasim W. 2019. Allogeneic CAR T cell therapies for leukemia. *Am J Hematol*. 94(S1):S50–S54. doi:[10.1002/ajh.25399](https://doi.org/10.1002/ajh.25399)

69. Fisher A. 2020. FDA approves CAR-T cell therapy to treat adults with certain types of large B-cell lymphoma. FDA [Internet]. [accessed 2022 Nov 30]. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-car-t-cell-therapy-treat-adults-certain-types-large-b-cell-lymphoma>

70. U.S. Food and Drug Administration. 2021. FDA D.I.S.C.O. Burst Edition: Yescarta (axicabtagene ciloleucel) for adult patients with relapsed or refractory follicular lymphoma after two or more lines of systemic therapy. FDA [Internet]. [accessed 2022 Nov 30]. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-disco-burst-edition-yescarta-axicabtagene-ciloleucel-adult-patients-relapsed-or-refractory>

71. Richards M. 2020. FDA Approves First Cell-Based Gene Therapy For Adult Patients with Relapsed or Refractory MCL. FDA [Internet]. [accessed 2022 Nov 30]. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-cell-based-gene-therapy-adult-patients-relapsed-or-refractory-mcl>

72. U.S. Food and Drug Administration. 2019. FDA approves tisagenlecleucel for B-cell ALL and tocilizumab for cytokine release syndrome. FDA [Internet]. [accessed 2022 Nov 30]. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-tisagenlecleucel-b-cell-all-and-tocilizumab-cytokine-release-syndrome>

73. Capobianco A. 2021. FDA Approves First Cell-Based Gene Therapy for Adult Patients with Multiple Myeloma. FDA [Internet]. [accessed 2022 Dec 1]. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-cell-based-gene-therapy-adult-patients-multiple-myeloma>

74. Wilkins O, Keeler AM, Flotte TR. 2017. CAR T-Cell Therapy: Progress and Prospects. *Human Gene Therapy Methods*. 28(2):61–66. doi:[10.1089/hgtb.2016.153](https://doi.org/10.1089/hgtb.2016.153)

75. Murthy H, Iqbal M, Chavez JC, Kharfan-Dabaja MA. 2019. Cytokine Release Syndrome: Current Perspectives. *ITT*. Volume 8:43–52. doi:[10.2147/ITT.S202015](https://doi.org/10.2147/ITT.S202015)
76. King D. 2020. Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Cell Therapy. *AllCells* [Internet]. [accessed 2022 Dec 2]. <https://allcells.com/chimeric-antigen-receptor-car-t-cell-therapy/>
77. MHC-associated Peptide Proteomics (MAPPS) Assay - Creative Biolabs. [accessed 2022 Dec 5]. <https://www.creative-biolabs.com/car-t/mhc-associated-peptide-proteomics-mapps-assay.htm>
78. Thongsin N, Wattanapanitch M. 2021. CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein Complex-Mediated Efficient B2M Knockout in Human Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs). In: Nagy A, Turksen K, editors. *Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells* [Internet]. Vol. 2454. New York, NY: Springer US; [accessed 2023 Jan 20]; p. 607–624. doi:[10.1007/7651_2021_352](https://doi.org/10.1007/7651_2021_352)
79. Ranjbar M, Amiri F, Nourigorji M, Torabizadeh F, Dara M, Dianatpour M. 2022. B2M gene knockout in HEK293T cells by non-viral delivery of CRISPR-Cas9 system for the generation of universal cells. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* [Internet]. [accessed 2023 Jan 20] 23(1):62. doi:[10.1186/s43042-022-00267-z](https://doi.org/10.1186/s43042-022-00267-z)
80. Liu X, Zhang Y, Cheng C, Cheng AW, Zhang X, Li N, Xia C, Wei X, Liu X, Wang H. 2017. CRISPR-Cas9-mediated multiplex gene editing in CAR-T cells. *Cell Res*. 27(1):154–157. doi:[10.1038/cr.2016.142](https://doi.org/10.1038/cr.2016.142)
81. Sioud M, editor. 2020. *RNA Interference and CRISPR Technologies: Technical Advances and New Therapeutic Opportunities* [Internet]. New York, NY: Springer US; [accessed 2023 Jan 22]. doi:[10.1007/978-1-0716-0290-4](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0290-4)
82. Kotowski M, Sharma S. 2020. CRISPR-Based Editing Techniques for Genetic Manipulation of Primary T Cells. *MPs*. 3(4):79. doi:[10.3390/mps3040079](https://doi.org/10.3390/mps3040079)
83. Kholosy WM, Visscher M, Ogink K, Buttstedt H, Griffin K, Beier A, Gerlach JP, Molenaar JJ, Geijsen N, de Boer M, Chatsisvili A. 2021. Simple, fast and efficient iTOP-mediated delivery of CRISPR/Cas9 RNP in difficult-to-transduce human cells including primary T cells. *Journal of Biotechnology*. 338:71–80. doi:[10.1016/j.jbiotec.2021.07.006](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.07.006)
84. Martufi M, Good RB, Rapiteanu R, Schmidt T, Patili E, Tvermosegaard K, New M, Nanthakumar CB, Betts J, Blanchard AD, Maratou K. 2019. Single-Step, High-Efficiency CRISPR-Cas9 Genome Editing in Primary Human Disease-Derived Fibroblasts. *The CRISPR Journal*. 2(1):31–40. doi:[10.1089/crispr.2018.0047](https://doi.org/10.1089/crispr.2018.0047)
85. Freund EC, Lock JY, Oh J, Maculins T, Delamarre L, Bohlen CJ, Haley B, Murthy A. 2020. Efficient gene knockout in primary human and murine myeloid cells by non-viral delivery of CRISPR-Cas9. *Journal of Experimental Medicine*. 217(7):e20191692. doi:[10.1084/jem.20191692](https://doi.org/10.1084/jem.20191692)
86. Alt-R Genome Editing Detection Kit. *Integrated DNA Technologies* [Internet]. [accessed 2023 Jan 25]. <https://www.idtdna.com/pages/products/crispr-genome-editing/alt-r-genome-editing-detection-kit>
87. Wilbie D, Walther J, Mastrobattista E. 2019. Delivery Aspects of CRISPR/Cas for in Vivo Genome Editing. *Acc Chem Res*. 52(6):1555–1564. doi:[10.1021/acs.accounts.9b00106](https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00106)

88. Liu C, Zhang L, Liu H, Cheng K. 2017. Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. *Journal of Controlled Release*. 266:17–26. doi:[10.1016/j.jconrel.2017.09.012](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.012)
89. Glass Z, Lee M, Li Y, Xu Q. 2018. Engineering the Delivery System for CRISPR-Based Genome Editing. *Trends in Biotechnology*. 36(2):173–185. doi:[10.1016/j.tibtech.2017.11.006](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.11.006)
90. Bloomer H, Khirallah J, Li Y, Xu Q. 2022. CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein-mediated genome and epigenome editing in mammalian cells. *Advanced Drug Delivery Reviews* [Internet]. [accessed 2023 Jan 26] 181:114087. doi:[10.1016/j.addr.2021.114087](https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.114087)
91. CRISPR genome editing | IDT. Integrated DNA Technologies [Internet]. [accessed 2023 Feb 13]. <https://www.idtdna.com/pages/products/crispr-genome-editing>