**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
« Εφαρμογές στις Βασικές Ιατρικές Επιστήμες»
Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας**

Διδακτορική Διατριβή

**« Ανάπτυξη και εκτίμηση του δυναμικού επισωματικών και υϊκών φορέων για την
γονιδιακή μεταφορά σε κυτταρικά συστήματα και σε κλινικές δοκιμές στην
γονιδιακή θεραπεία»**

Αριστείδης Π. Γιαννακόπουλος

Πάτρα 2006

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε κατά το χρονικό διάστημα 2002 - 2005 στο εργαστήριο γενικής βιολογίας του πανεπιστημίου Πατρών και στο Wolfson Center for Gene Therapy of Childhood Disease , Institute of Child Health, Great Ormond Street Hospital, University College London.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής:

Την κ. Αγλαΐα Αθανασσιάδου, επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, για την πολύτιμη υποστήριξη και τις χρήσιμες συμβουλές της καθόλη την περίοδο της διατριβής.

Τον Adrian Thrasher για την απεριόριστη εμπιστοσύνη και τις πρωτοβουλίες που μου παραχώρησε κατά τη διάρκεια παραμονής μου στο Λονδίνο.

Τον Γιάννη Ζαρκάδη, μέλος της τριμελούς επιτροπής για τις πολύτιμες συμβουλές του και την καθοδήγηση του στα θέματα της μοριακής βιολογίας.

Τον κ. Νικόλαο Ζούμπο, συν- επιβλέποντα καθηγητή μου για τις χρήσιμες συζητήσεις.

Τον Bobby Gaspar (Paediatric Immunology, Great Ormond Street Hospital) για την συνεργασία στην κλινική μελέτη της γονιδιακής θεραπείας για την ADA-SCID.

Τον Michael Antoniou (Guy's Hospital, London) και την Christine Kinnon (ICH,UCL) για τις εποικοδομητικές συζητήσεις.

Τους Kate Parsley, Fang Zang, Steve Howe για τη συνεργασία και την βοήθειά τους στο Wolfson Center for Gene Therapy Center of Childhood Disease.

Την Jo Buddle για την πολύτιμη βοήθειά της με το FACSorting.

Την Ντούλη Παπαχατζοπούλου για την βοήθειά της στο εργαστήριο γενικής βιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών.

Τους Σταύρο Πολυβίου, Ειρήνη Παπαπέτρου, , Μαρία Χονδρού, Μαρία Δημάκη και τους υπόλοιπους μεταπτυχιακούς φοιτητές στο εργαστήριο γενικής βιολογίας για την βοήθειά τους.

Πίνακας περιεχομένων

Πρόλογος.....	4
---------------	---

Κεφάλαιο 1

1. Εισαγωγή.....	7
1.1 Γονιδιακή μεταφορά.....	8
1.2 Στρατηγικές στην γονιδιακή θεραπεία.....	11
1.3 Φορείς γονιδιακής θεραπείας.....	12
1.4 Επισωματικά οχήματα.....	15
1.5 Scaffold matrix attachment regions (S/MARs).....	21
1.6 Προφίλ αποσταθεροποίησης της διπλής έλικας DNA.....	24
2. Σκοπός της εργασίας.....	27
3. Υλικά και μέθοδοι	28
4. Αποτελέσματα	34
5. Συζήτηση	43
6. Βιβλιογραφία.....	49

Κεφάλαιο 2

1. Εισαγωγή.....	69
1.1 Κλινικές δοκιμασίες στην γονιδιακή θεραπεία.....	70
1.2 Ρετροϊοί - γενικά.....	71
1.3 Ρετροϊκοί φορείς.....	73
1.4 Μηχανισμός της ενσωμάτωσης των ογκορετροϊκών φορέων.....	74
1.5 Ανάλυση των θέσεων ενσωμάτωσης (integration site analysis).....	75
1.6 Μεταλλαξιγένεση μέσω ενσωμάτωσης.....	76

1.7 Τροποποιήσεις στους φορείς για την αύξηση της ασφάλειας τους.....	80
1.8 Υπάρχουσες τεχνικές για την ανάλυση των θέσεων ενσωμάτωσής των ιϊκών φορέων.....	81
1.9 Γονιδιακή θεραπεία για την βαριά μική ανοσοανεπάρκεια που οφείλεται στην έλλειψη απαμινάσης της αδενοσίνης (ADA-SCID).....	85
2. Σκοπός της εργασίας.....	91
3. Υλικά και μέθοδοι.....	92
4. Αποτελέσματα.....	98
5. Συζήτηση.....	111
6. Βιβλιογραφία.....	116
7. Περιλήψεις.....	150
8. Summaries.....	154

Πρόλογος

Η γονιδιακή θεραπεία στοχεύει στην θεραπεία των ασθενειών του ανθρώπου μέσω της τροποποίησης του γενετικού υλικού των κυττάρων του. Η τροποποίηση αυτή συνίσταται κυρίως στην εισαγωγή μιας αλληλουχίας νουκλεοτιδικών βάσεων η λειτουργία της οποίας έχει ως αποτέλεσμα την αναστροφή ενός παθολογικού φαινοτύπου, είτε μέσω αντιστάθμισης ενός ελαττωματικού γονιδίου, είτε μέσω προσθήκης νέας ιδιότητας. Η γονιδιακή μεταφορά αφορά αποκλειστικά και μόνο τα σωματικά κύτταρα καθώς η τροποποίηση των γαμετικών κυττάρων και η κληρονομικότητα αυτής στις μελλοντικές γενεές εγείρει μείζονα ηθικά ζητήματα και δεν γίνεται αποδεκτή. Η γενετική τροποποίηση των σωματικών κυττάρων επηρεάζει μόνον τον ασθενή που υποβάλλεται στη θεραπεία.

Η ανάπτυξη του πεδίου της γονιδιακής θεραπείας οφείλεται στην πρόοδο αφενός μεν της κατανόησης της μοριακής βάσης των ασθενειών αφετέρου της ανάπτυξης των συστημάτων γονιδιακής μεταφοράς στα κύτταρα.

Ο προσδιορισμός της αιτίας διαφόρων νοσημάτων του ανθρώπου στο επίπεδο του DNA και η αποσαφήνιση της σχέσης μεταξύ μοριακής διαταραχής και παθολογικού φαινοτύπου τις τελευταίες δεκαετίες της έρευνας αποτέλεσε τη βάση για την θεώρηση της γονιδιακής θεραπείας ως εναλλακτική προσέγγιση για την αντιμετώπιση των νοσημάτων αυτών. Γι' αυτό και τα μονογονιδιακά νοσήματα αποτελούν τις ασθένειες μοντέλα για την ανάπτυξη και αξιολόγηση θεραπειών που βασίζονται σε γονιδιακές παρεμβάσεις. Βέβαια σήμερα κλινικές δοκιμές γονιδιακής θεραπείας λαμβάνουν χώρα και σε πολυπαραγοντικά νοσήματα, πολύ συχνά στον άνθρωπο, όπως κακοήθη, καρδιαγγειακά, εκφυλιστικά, τα οποία έχουν σαφώς και μια καθορισμένη γενετική συνιστώσα.

Από την άλλη πλευρά η ανάπτυξη της βιοτεχνολογικής υποδομής τόσο στον τομέα του ανασυνδυασμένου DNA όσο και στις κυτταροκαλλιέργειες έκανε δυνατή τη ανάπτυξη συστημάτων γονιδιακής μεταφοράς και αξιολόγησης της λειτουργίας εξωγενών γονιδίων σε κυτταρικά συστήματα και οργανισμούς. Οι φορείς γονιδιακής μεταφοράς συγκεντρώνουν το μεγαλύτερο μέρος της έρευνας για την γονιδιακή θεραπεία και αποτελούν κύριο στοιχείο για την επιτυχία αυτής, η δε μελέτη τους εστιάζεται σε

θέματα επάρκειας και ασφάλειας της γονιδιακής μεταφοράς και θέματα ρύθμισης της έκφρασης του διαγονιδίου.

Η διατριβή αυτή πραγματεύεται θέματα ασφάλειας της γονιδιακής μεταφοράς σε δύο συστήματα:

1. Ένα επισωματικό σύστημα γονιδιακής μεταφοράς, ως συμβολή στην ανάπτυξη φορέων που δεν ενσωματώνονται στο ενδογενές γενετικό υλικό των κυττάρων και έτσι αποφεύγεται η επακόλουθη πρόκληση διαταραχών σε γονίδια του ασθενούς. Τα πειράματα εκπονήθηκαν στο εργαστήριο γενικής Βιολογίας της Ιατρικής σχολής του Παναπιστημίου Πατρών (**κεφάλαιο 1**)

2. Έναν ιικό φορέα σε συνθήκες κλινικής δοκιμής, ως μια μελέτη για τον προσδιορισμό των θέσεων ενσωμάτωσης του στο γενετικό υλικό του ασθενούς με την ανάπτυξη μιας νέας μεθόδου (DSHP-PCR). Η κλινική μελέτη αφορά την γονιδιακή θεραπεία για την πρωτοπαθή ανοσοανεπάρκεια που οφείλεται στην απαμινάση της αδενοσίνης (SCID-ADA). Η κλινική δοκιμή και όλα τα αναλυτικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Wolfson Centre for Gene Therapy of Childhood Disease, Institute of Child Health, Great Ormond Street Hospital (University College London) (**κεφάλαιο 2**)

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

1.1 Γονιδιακή μεταφορά

Η γονιδιακή μεταφορά στα ανθρώπινα κύτταρα συντελείται από τους λεγόμενους φορείς ή οχήματα (vectors). Πρόκειται για βιολογικά συστήματα βασισμένα σε ιούς (ϊικοί φορείς), η συνθετικά (π.χ. λιποσώματα) τα οποία περιέχουν το τμήμα του γενετικού υλικού- DNA που πρέπει να μεταφερθεί στον πυρήνα του κυττάρου. Τα συστήματα αυτά εισάγουν το γενετικό υλικό στο κύτταρο στόχο και εξασφαλίζουν την έκφραση του νέου γονιδίου στο περιβάλλον του πυρήνα του κύτταρο¹. Πιο αναλυτικά ένας ιδανικός φορέας θα πρέπει να έχει τις εξής ιδιότητες:

- **υψηλό ποσοστό διαμόλυνσης των κυττάρων στόχων**
- **κύτταρο- ειδική διαμόλυνση**
- **διαρκή και ιστο-ειδική έκφραση του διαγονιδίου**
- **μη τοξικότητα για το κύτταρο**
- **δυνατότητα μεταφοράς μεγάλου μεγέθους DNA**
- **δυνατότητα παραγωγής του σε μεγάλη κλίμακα**
- **λογικό κόστος**

Αν και είναι γνωστό ότι ο κύριος παράγοντας επιτυχίας της γονιδιακής θεραπείας είναι η ανάπτυξη κατάλληλων οχημάτων γονιδιακής μεταφοράς, εντούτοις μέχρι σήμερα η εντατική έρευνα των τελευταίων δεκαετιών στο πεδίο αυτό δεν έχει αποφέρει τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Αυτό οφείλεται κυρίως στο ότι αν και η γνώση στο πεδίο της μοριακής βιολογίας έχει προχωρήσει αρκετά, αρκετοί μηχανισμοί που αφορούν την μοριακή αλληλεπίδραση του νεοεισερχόμενου γενετικού υλικού με τα διάφορα πρωτεϊνικά συστήματα του πυρήνα του κυττάρου (π.χ. διπλασιασμός, μεταγραφή, γονιδιακή αποσιώπηση) μένουν να αποσαφηνιστούν.

Η γονιδιακή θεραπεία έχει την μεγαλύτερη νοσοειδικότητα από όλες τις συμβατικές θεραπείες, γιατί η εφαρμογή της προϋποθέτει την πλήρη και ακριβή κατανόηση της μοριακής βάσης της ασθένειας σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης και ρύθμισης. Επίσης ο κάθε πληθυσμός κυττάρων του ανθρώπινου σώματος έχει ιδιαίτερα

χαρακτηριστικά (π.χ. διαφορετικοί τύποι υποδοχέων στην κυτταρική μεμβράνη, ύπαρξη ιστικών φραγμών διαφορετικής διαπερατότητας) που τροποποιούν την δυνατότητα πρόσβασης σε αυτόν μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας και κατά συνέπεια τον καθιστά διαφορετικό υπόστρωμα μελέτης για την μεταφορά γονιδίων. Το γεγονός αυτό δημιουργεί την ανάγκη για την ανάπτυξη διαφορετικών , ιστοειδικών και κυτταροειδικών οχημάτων μεταφοράς των γονιδίων. Πρωτεύοντα ρόλο στην μεταφορά ενός γονιδίου στα σωματικά κύτταρα παίζει το είδος του οχήματος που χρησιμοποιείται (π.χ. ρετροϊοί, αδενοϊοί, λιποσώματα κ.λ.) όπου καθορίζει όχι μόνο τον χρόνο ημίσειας ζωής στην κυκλοφορία, την βιοκατανομή στους ιστούς και την αποτελεσματικότητα της εισαγωγής του γονιδίου διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης αλλά και την κατάσταση του διαγονιδίου μέσα στον πυρήνα δηλαδή τα επίπεδα της έκφρασης του γονιδίου και την διατήρηση αυτής. Τα στάδια της πορείας του συστήματος όχημα-γονίδιο από την είσοδό του στην κυκλοφορία μέχρι την εισαγωγή του στον πυρήνα συνοπτικά είναι :

1. Η αλληλεπίδραση του συστήματος όχημα -γονίδιο με συστατικά του ορού ή των υγρών του σώματος (πρωτεΐνες του πλάσματος, κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος).
2. Η στόχευση σε συγκεκριμένο είδος κυττάρου, οργάνου, ή όγκου και η προσκόλληση στην επιφάνεια του κυττάρου .
3. Η εισαγωγή του οχήματος μέσα στο κύτταρο διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης (διάτρηση της μεμβράνης ή ενδοκυττάρωση διαμέσου υποδοχέα)
4. Απελευθέρωση από τα κυτταροπλασματικά διαμερίσματα (ενδοσώματα, λυσοσώματα)
5. Μεταφορά στον πυρήνα διαμέσου του πυρηνικού φακέλου.

Συνεπώς η επιλογή ενός οχήματος με σκοπό την απώτερη εφαρμογή του στην γονιδιακή θεραπεία μιας ασθένειας εξαρτάται από την συμβατότητα των ιδιοτήτων του οχήματος με το μοριακή παθολογία της ασθένειας. Η θεραπεία κάποιων διαταραχών, όπως οι μονογονιδιακές ασθένειες, απαιτεί μακρά διάρκεια έκφρασης του μεταφερόμενου γονιδίου από σχετικά μικρό ποσοστό κυττάρων ενώ η εξολόθρευση των κυττάρων κάποιου όγκου απαιτεί έκφραση μικρότερης διάρκειας αλλά πολύ αποτελεσματικότερη διαμόλυνση. Άλλη μια παράμετρος είναι η επιδιωκόμενη έκφραση

το διαγονιδίου. Για παράδειγμα για την διόρθωση της διαταραχής πήξεως στην αιμορροφιλία χρειάζονται χαμηλά επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου, ενώ αντιθέτως στις θαλασσαιμίες απαιτείται υψηλή έκφραση. Για την επίτευξη διαφορετικής ιστο-ειδικότητας και χρόνο- ειδικότητας στην έκφραση των διαγονιδίων χρειάζονται διαφορετικά ρυθμιστικά στοιχεία στο γονιδίωμα του φορέα ή πιθανόν ένας τελείως διαφορετικός φορέας που να βασίζεται στο γονιδίωμα κάποιου άλλου ιού. Γενικά το κάθε όχημα , αναλόγως της προέλευσής του (ιός που προήλθε ή τμήματα ιού που περιέχει) έχει ένα σύνολο εγγενών ιδιοτήτων που αφορούν την εκλεκτικότητα του ως προς ορισμένους πληθυσμούς κυττάρων, την αποτελεσματικότητα μεταφοράς και τα επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου, την τοξικότητα αυτού για το κύτταρο, την αντιγονικότητα του για τον οργανισμό κ.α.. Συνεπώς στην γονιδιακή θεραπεία στόχος έρευνας και ανάπτυξης είναι πάντα το σύστημα φορέας – (κύτταρο - στόχος).

Η φιλοσοφία της ανάπτυξης ενός οχήματος με σκοπό την γονιδιακή θεραπεία θα μπορούσε να παρουσιαστεί διαγραμματικά ως εξής :

Η ανάλυση των ιών μας δίνει πληροφορίες για την λειτουργία των γονιδίων τους στα διάφορα στάδια μόλυνσης των κυττάρων με αποτέλεσμα, είτε την κατασκευή ιικών συστημάτων με την τροποποίηση των γονιδιωμάτων τους, είτε με την ενσωμάτωση μεμονομένων γονιδίων των ιών για την σύνθεση μη ιικών συστημάτων.

1.2 Στρατηγικές στην γονιδιακή θεραπεία

Η διαφορετική παθογένεια των νοσημάτων σε μοριακό επίπεδο έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη διαφόρων στρατηγικών για την επίτευξη της αναστροφής του παθολογικού φαινοτύπου. Οι κυριότερες από αυτές είναι:

1. **Μεταφορά ενός φυσιολογικού αλληλόμορφου γονιδίου στο κύτταρο-στόχος (Gene replacement / augmentation)^{2;3}.** Κύριο υπόστρωμα αποτελούν οι ασθένειες μονο-γονιδιακού τύπου, όπου διάφορες μεταλλάξεις οδηγούν είτε σε μειωμένη έκφραση είτε σε παντελή έλλειψη έκφρασης ενός γονιδίου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι οι β-θαλασσαιμίες όπου σύνολο μεταλλάξεων έχουν περιγραφεί στο γονίδιο της β- σφαιρίνης με αποτέλεσμα την μειωμένη ύπαρξη β- αλυσίδων ή την παντελή έλλειψη αυτών. Η ύπαρξη ενός πλήθους ετερογενών μεταλλάξεων στο γονίδιο της β- σφαιρίνης παρακάμπτεται με τη μεταφορά ολοκλήρου του αλληλόμορφου⁴⁻⁷.
2. **Μεταφορά γονιδίου που προσδίδει μια νέα ιδιότητα** στο κύτταρο- στόχος. Κυρίως αφορά την μεταφορά γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες γίνονται τοξικές για το κύτταρο όταν χορηγηθεί εξωγενώς ένα φάρμακο. Η εφαρμογή αυτή στοχεύει στην εξολόθρευση των καρκινικών κυττάρων με την μετατροπή τους σε ευαίσθητα κύτταρα σε εξωγενώς χορηγούμενες ουσίες (π.χ. το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο της κινάσης της θυμιδίνης του ιού του απλού έρπητα γίνεται τοξικό για το κύτταρο όταν χορηγηθεί το φάρμακο γαγκκυλοβίρη)⁸⁻¹¹. Επίσης η στρατηγική αυτή περιλαμβάνει και τη μεταφορά των λεγόμενων προστατευτικών γονιδίων, δηλαδή γονίδια των οποίων τα προϊόντα έχουν προστατευτική δράση για το κύτταρο (π.χ. ενδοκυτταρικά αντισώματα)
3. **Μεταφορά γονιδίου για την αναστολή της έκφρασης ενός ενδογενούς γονιδίου.** Στην κατηγορία των νοσημάτων όπου υπάρχουν “gain of function” μεταλλάξεις, όπως νεοπλάσματα που οφείλονται στην υπερέκφραση πρωτο-ογκογονιδίων, η μεταφορά γονιδίων που κωδικοποιούν αντι- νοσηματικές

αλληλουχίες ή siRNAs (small interfering RNAs) μπορεί να οδηγήσει στην αναστολή της έκφρασης του ενδογενούς παθολογικού γονιδίου¹²⁻¹⁴.

4. Διόρθωση μεταλλάξεων με τροποποίηση του γονοτύπου (genome editing)^{15;16}

Η ελκυστική αυτή τακτική της *in situ* ενδο- κυτταρικής διόρθωσης του γονοτύπου περιλαμβάνει διάφορες προσεγγίσεις με νεότερη αυτή της χρήσης νουκλεασών με δομή δακτύλων ψευδαργύρου (zinc finger nucleases), οι οποίες αναγνωρίζουν συγκεκριμένο σημείο του DNA και προκαλούν θραύση στο σημείο αυτό¹⁷. Ακολουθεί η επέμβαση του επιδιορθωτικού μηχανισμού του κυττάρου για την διόρθωση της βλάβης χρησιμοποιώντας ως μήτρα το φυσιολογικό αλληλόμορφο.

1.3 Φορείς γονιδιακής θεραπείας

Τα είδη των φορέων που έχουν αναπτυχθεί για την μεταφορά γονιδίων μπορούν να ταξινομηθούν γενικά σε **ϊικά συστήματα** και **μη ιϊκά συστήματα**.

A) Ιϊκά συστήματα :

Αν και γενικά αναγνωρίζονται σαν τα πιο αποδοτικά συστήματα ως προς την δυνατότητα μεταφοράς γονιδίων η συστηματική χορήγησή τους μέχρι σήμερα περιορίζεται λόγω της αδυναμίας στόχευσης του επιθυμητού πληθυσμού κυττάρων και των φαρμακολογικών και τοξικολογικών ιδιοτήτων αυτών όταν χορηγούνται συστηματικά. Παρ'όλα αυτά τα ιϊκά οχήματα είναι αυτά που έχουν ως επί το πλείστον χρησιμοποιηθεί για την μεταφορά γονιδίων σε κλινικά πρωτόκολλα γονιδιακής θεραπείας. Οι φορείς οι οποίοι έχουν αναπτυχθεί από τους διάφορους ιούς είναι:

- 1. Ογκορετροϊκοί φορείς (RV)** Έχουν εκτεταμένα χρησιμοποιηθεί για την μεταφορά γονιδίων σε *in vitro* και *in vivo* πειράματα ενώ είναι τα οχήματα πάνω στα οποία έχουν βασισθεί τα περισσότερα κλινικά πρωτόκολλα γονιδιακής θεραπείας μέχρι σήμερα. Μπορούν να προσβάλλουν πολλά είδη κυττάρων ενώ διαμολύνουν μόνο κύτταρα που διαιρούνται. Το μέγιστο ένθετο που μπορούν να

φέρουν είναι γύρω στα 8 kb. Το όχημα-ένθετο ενσωματώνεται στο γενετικό υλικό του κυττάρου , πετυχαίνοντας έτσι την σταθερή μεταβίβαση στις επόμενες γενιές κυττάρων¹⁸. Σε πολλές περιπτώσεις γίνεται αντικατάσταση της γλυκοπρωτεΐνης του ιϊκού φακέλου με πρωτεΐνη προερχόμενη από άλλο ιό (pseudotyping) όπως οι GALV (gibbon ape leukemia virus) , VSV-G (vesicular stomatitis virus – glycoprotein) με αποτέλεσμα την αλλαγή του τροπισμού. Η διαδικασία αυτή επιτρέπει την διαμόλυνση διαφορετικών ειδών κυττάρων¹⁹.

2. Lenti – ιϊκοί φορείς (LV)²⁰⁻²² Τα οχήματα προέρχονται από τον ιό HIV-1 καθώς και από άλλους lenti- ιούς. Η κύρια διαφορά με τους RV είναι η δυνατότητα που έχουν να διαμολύνουν μη διαιρούμενα κύτταρα από διάφορους ιστούς (νευρικός, επιθηλιακός), καθώς διαθέτουν ένα στοιχείο πυρηνικής εντόπισης . Μειονέκτημα αυτών είναι οι ανησυχίες που αφορούν την ασφάλεια χρησιμοποίησής των στον άνθρωπο, δεδομένης της παθογονικότητας του μητρικού ιού²³. Γι'αυτό μελετώνται και στελέχη που μολύνουν χιμπατζήδες, ίππους ή αιλουροειδή και όχι τον άνθρωπο. Πολύ πρόσφατα έγινε η εισαγωγή των LV σε κλινικές μελέτες. Η πρώτη αφορά τη μεταφορά αντι-νοσηματικών αλληλουχιών σε λεμφοκύτταρα ασθενών που είχαν μολυνθεί από τον ιό HIV-1 ενώ πολύ σύντομα αναμένεται και η έναρξη μιας δεύτερης στη Γαλλία που αφορά την θεραπεία της β-θαλασσαιμίας²⁴⁻²⁷.

3. Αδενοϊκοί φορείς²⁸⁻³⁴ που βασίζονται στους γνωστούς αδενοϊούς χρησιμοποιήθηκαν εξ'αρχής στην προσπάθεια γονιδιακής θεραπείας της νόσου της κυστικής ίνωσης, λόγω της ευαισθησίας του αναπνευστικού επιθηλίου στην ομάδα αυτή των ιών. (κοινή μόλυνση στον άνθρωπο κυρίως από τους ορότυπους 2 και 5) χωρίς όμως ικανοποιητικά κλινικά αποτελέσματα. Παρουσιάζουν αποδοτική μεταφορά του διαγονιδίου σε διάφορα είδη κυττάρων και ήδη χρησιμοποιούνται για την εισαγωγή γονιδίων σε όγκους , στο ήπαρ, στους μύες, στον εγκέφαλο³⁵⁻³⁹. Αντίθετα με τους ρετροϊούς οι αδενοϊοί δεν ενσωματώνουν το γονιδιώμα τους στα κύτταρα και επομένως προκαλούν μόνο παροδική διαμόλυνση. Κύριο μειονέκτημα των φορέων που βασίζονται στους αδενοϊούς είναι η ανοσογονικότητά τους και η γρήγορη κάθαρση αυτών από το ανοσοποιητικό σύστημα λόγω προϋπαρξής αντισωμάτων στον οργανισμό από

προηγούμενη λοίμωξη. Αποτελούν τους δεύτερους σε χρήση φορείς μετά τους RV σε κλινικές δοκιμές γονιδιακής θεραπείας.

4. Οι adeno-associated ιοί. Φυσιολογικά για να μολύνουν κύτταρα χρειάζονται έναν βοηθητικό ιό όπως ο αδενοϊός. Μπορεί να ενσωματώνει το γονιδιώμα του στα χρωμοσώματα αλλά και να παραμένει ως επίσωμα. Ο άγριος τύπος του ιού έχει την τάση να ενσωματώνεται στο χρωμόσωμα 19. Η ιδιότητα όμως αυτή φαίνεται να χάνεται στο όχημα λόγω αφαίρεσης ενός γονιδίου. Τα AAV οχήματα δεν παρουσιάζουν τοξικότητα ή φλεγμονώδη αντίδραση. Μπορεί να διαμολύνουν μη διαιρούμενα κύτταρα και διάφορους ιστούς (κεντρικό νευρικό σύστημα, ήπαρ, πνεύμονα και μυ)⁴⁰.

5. Φορείς που βασίζονται στους ιούς του απλού έρπητα. Ο HSV 1 είναι ο κύριος ιός της ομάδας πάνω στον οποίον έχουν αναπτυχθεί οχήματα μεταφοράς γονιδίων. Έχουν το πλεονέκτημα της δυνατότητας μεταφοράς γενετικού υλικού μεγέθους τουλάχιστον 30 kb. Διαμολύνουν αποδοτικά πολλούς τύπους κυττάρων. Η εφαρμογή τους αφορά κυρίως νοσήματα του νευρικού συστήματος⁴¹⁻⁴⁷.

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει σημαντικές προσπάθειες για την κατασκευή οχημάτων τα οποία φέρουν γονιδιακές αλληλουχίες από διαφορετικούς ιούς , με σκοπό την απόκτηση από το όχημα χρήσιμων ιδιοτήτων των διαφορετικών αυτών ιών. (συνδυασμός αδενοϊού / AAV , αδενοϊού / ρετροϊού κ.α.)⁴⁸⁻⁵⁰.

B) Μη ιικά συστήματα

Τα μη ιικά συστήματα μεταφέρουν γενετικό υλικό μέσα στα κύτταρα χωρίς την ύπαρξη μολυσματικών , ανασυνδυασμένων , ιικών σωματιδίων. Γυμνό DNA είναι δυνατόν να μεταφερθεί σε ευκαρυωτικά κύτταρα⁵¹⁻⁵⁹ .Σε άλλες περιπτώσεις φυσικές διαδικασίες όπως η ηλεκτροδιάτρηση και η χρήση στερεών σωματιδίων έχουν χρησιμοποιηθεί για την εισαγωγή του γενετικού υλικού. Κυρίως όμως η μεταφορά του γενετικού υλικού γίνεται με την χρήση των λιποσωμάτων , τα οποία σχηματίζουν σύμπλοκα με το DNA. Τα λιποσώματα εισέρχονται στο ευκαρυωτικό κύτταρο είτε με ενδοκυττάρωση , είτε με ανταλλαγή λιπιδίων ή και απλή απορρόφηση. Επίσης έχει πιθανολογηθεί ότι δημιουργούν πόρους στη μεμβράνη οι οποίοι μετά την είσοδο του συμπλόκου κλείνουν . Ανάλογα με την χημική τους σύσταση μπορούν να διακριθούν

στα polyplex (σύμπλοκα κατιονικών πολυμερών – DNA) , lipoplex (σύμπλοκα κατιονικών λιπιδίων – DNA) και lipopolyplex (σύμπλοκα που περιέχουν και κατιονικά πολυμερή και κατιονικά λιπίδια)^{51;52;60-63}. Στην κατηγορία των μη ιικών συστημάτων ανήκουν και τα επισωματικά αυτό-αναπαραγόμενα οχήματα που βασίζονται σε ιούς χρησιμοποιούν όμως μόνο ορισμένα τμήματα του γενετικού υλικού αυτών χωρίς την ύπαρξη άλλων στοιχείων (πρωτεϊνών κ.α.).

1.4 Επισωματικά οχήματα

Τα επισωματικά αυτό-αναπαραγόμενα οχήματα (replicating episomal vectors-REVs) είναι οχήματα των οποίων το γενετικό υλικό μαζί με το γονίδιο που μεταφέρουν δεν ενσωματώνεται στο γενετικό υλικό του κυττάρου αλλά παραμένει σαν επίσωμα, το οποίο διπλασιάζεται στον πυρήνα του κυττάρου και διαχωρίζεται στα θυγατρικά κύτταρα⁶⁴. Τα κύρια επισωματικά οχήματα που έχουν αναπτυχθεί είναι βασισμένα στους ιούς Epstein-Barr, Simian virus 40 (SV40) και BKV.

Ο **ιός Epstein-Barr** (εικόνα 2) ανήκει στην οικογένεια των γαμμα-ερπητοϊών και μολύνει τα λεμφοκύτταρα. Το 90% περίπου του ενήλικου πληθυσμού της γης εκτιμάται ότι έχει μολυνθεί με τον EBV κατά την διάρκεια της σχολικής ηλικίας. Ο ιός EBV είναι το αίτιο της λοιμώδους μονοπυρήνωσης και έχει συνδεθεί με διάφορα κακοήγη νεοπλάσματα , περιλαμβανομένων νεοπλασμάτων των B κυττάρων όπως το λέμφωμα Burkitt και η νόσος του Hodgkin, καθώς και κάποιους επιθηλιακούς καρκίνους όπως το αδιαφοροποίητο ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα. Το γενετικό υλικό του EBV είναι ένα γραμμικό μόριο DNA διπλής έλικας μεγέθους 172 Kb (εικόνα 2) που βρίσκεται σε ένα εικοσαεδρικό καψίδιο . Εξωτερικά υπάρχει ο φάκελος στην επιφάνεια του οποίου υπάρχουν γλυκοπρωτεΐνες. Κατά την λυσιγονική φάση του ιού εκφράζονται περίπου 10 από τα γονίδια αυτού . Έξι από αυτά αποτελούν τα λεγόμενα πυρηνικά αντιγόνα του ιού Epstein-Barr (Epstein-Barr nuclear antigens) και είναι τα EBNA1 , 2, 3A, 3B, 3C και LP ενώ τα υπόλοιπα είναι τα LMP1, 2A και 2B (integral membrane proteins) και δύο γονίδια που κωδικοποιούν μικρά μόρια RNA (EBER1 και EBER2) .

Το **επισωματικό όχημα που χρησιμοποιούμε** στην εργασία αυτή περιέχει την αλληλουχία του γονιδίου EBNA1 και την αλληλουχία OriP τα οποία είναι και τα

μοναδικά στοιχεία του ιού EBV που είναι απαραίτητα για την διατήρηση του επισώματος στα διαμολυσμένα κύτταρα⁶⁵⁻⁶⁸. Το **γονίδιο EBNA 1** κωδικοποιεί μια φώσφο-πρωτεΐνη η οποία έχει μια θέση πρόσδεσης για το DNA και μια θέση διμερισμού στην καρβοξυτελική της περιοχή (σχήμα 2). Η πρωτεΐνη EBNA 1 διμερίζεται ενώ προσδένεται σε ειδική αλληλουχία του DNA⁶⁹⁻⁷¹. Μέσα στην περιοχή OriP υπάρχουν 24 θέσεις πρόσδεσης για την EBNA 1. Οι θέσεις αυτές είναι συγκεντρωμένες σε δύο συμπλέγματα που αναφέρονται σαν στοιχείο δυαδικής συμμετρίας (dyad symmetry element DS) και οικογένεια επαναλήψεων (family of repeats FR). Το FR σύμπλεγμα αποτελείται από 20 αντίγραφα 30 βάσεων που το καθένα είναι θέση πρόσδεσης με ισχυρή συγγένεια για την EBNA 1 (σχήμα 3). Η αλληλεπίδραση αυτή παίζει ρόλο στην διατήρηση του επισώματος καθώς επίσης και στην αντιγραφή αυτού. Το DS σύμπλεγμα έχει 4 παλίνδρομες θέσεις πρόσδεσης με ενδιάμεση συγγένεια για το διμερές της EBNA 1 η πρόσδεση του οποίου προκαλεί τοπικές αλλαγές στην δομή της χρωματίνης, οι οποίες χαρακτηρίζονται από ευαισθησία στην οξείδωση του υπερμαγγανικού στις δύο από αυτές τις θέσεις. Οι αλλαγές αυτές φαίνεται ότι εντάσσονται στην έναρξη της αντιγραφής του επισώματος. Η λειτουργία της FR περιοχής είναι ανεξάρτητη από τον προσανατολισμό και την απόσταση αυτής ως προς την DS περιοχή. Έχει βρεθεί ότι τα μόρια της EBNA 1 αντιδρούν μεταξύ τους γεφυρώνοντας τμήματα DNA και δημιουργώντας έτσι βρόγχους DNA. Η ιδιότητα αυτή είναι τυπική των πρωτεϊνών της πυρηνικής θεμέλιας ουσίας (nuclear matrix proteins) και σαν συνέπεια θα μπορούσε να σταθεροποιεί την πρόσδεση της EBNA 1 στο DS ή να ελκύει την αντιγραφική μηχανή του κυττάρου. Έχει αποδειχθεί ότι η EBNA 1 δεν είναι απαραίτητη για την σύνθεση του νέου πλασμιδίου. Εντούτοις εν τη απουσία της τα νέα πλασμίδια χάνονται γρήγορα στα διαιρούμενα κύτταρα. Γενικά υποστηρίζεται ότι η EBNA 1 δρα μετασυνθετικά για τη συγκράτηση του επισώματος και τον καταμερισμό αυτών στα θυγατρικά κύτταρα⁷²⁻⁷⁴. Επίσης φαίνεται ότι η EBNA 1 δεν διαθέτει τις ενζυμικές δράσεις των άλλων ιικών ORI προσδενόμενων πρωτεϊνών και δεν φαίνεται να ενεργοποιεί μόρια του πυρήνα του κυττάρου που έχουν αντίστοιχες ενζυμικές δράσεις⁷⁵⁻⁸⁵. Το OriP του EBV που υπάρχει στο επίσωμα αναγνωρίζεται απευθείας από την συνθετική μηχανή του DNA του ανθρώπινου κυττάρου και αντιγράφεται μόνο μια φορά κατά τον κυτταρικό κύκλο νωρίς στην S φάση σε συγχρονισμό με τα υπόλοιπα χρωμοσώματα. Το γεγονός αυτό

διαφοροποιεί το επίσωμα του EBV από αυτό του SV40 και από την αρχή οδήγησε την υπόθεση ότι κάποιος/οι παράγοντας/ες του ευκαρυωτικού κυττάρου που ενσωματώνει τις ενζυμικές δράσεις που δεν έχει η EBNA-1 , συνεργάζεται με αυτήν για την διατήρηση του επισώματος. Με την βοήθεια της τεχνολογίας 2-hybrid έχει δειχθεί πως υπάρχει μια τέτοια κυτταρική πρωτεΐνη, η EBP2 (EBNA-1 binding protein 2), η οποία φαίνεται πως είναι σημαντική για τον καταμερισμό του επισώματος στα θυγατρικά κύτταρα. Τα επισωματικά οχήματα μετά την είσοδό τους στον πυρήνα, αποκτούν νουκλεοσωμικές δομές με την προσέλκυση ιστονών. Η δομική ομοιότητα με τα χρωμοσώματα πιθανόν προσδίδει στα αυτό-αναπαραγόμενα επισωματικά οχήματα ιδιότητες που απορρέουν από την δομή της χρωματίνης και αφορούν την δυνατότητα μεταγραφής των περιεχομένων γονιδίων^{86;87} .

Σχήμα 1 Απεικονίζεται το κυκλικό (dsDNA) γονιδίωμα του ιού Epstein-Barr καθώς και τα πλαίσια ανάγνωσης των πρωτεϊνών που εκφράζονται και την λυσιγονική φάση μόλυνσης του ιού

EBNA - 1

Σχήμα 2 Απεικόνιση της πρωτεΐνης EBNA-1 και των θέσεων αλληλεπίδρασης με άλλα μόρια.

OriP του EBV-οχήματος και δράση της EBNA-1

Σχήμα 3 OriP του οχήματος cos203 και οι θέσεις πρόσδεσης της EBNA-1

Η πρωτεΐνη EBNA-1 έχει και άλλες λειτουργίες⁸⁸⁻⁹⁰ μέσω της πρόσδεσης της στο OriP:

- Διευκολύνει την μεταφορά του επισώματος στον πυρήνα του κυττάρου. Η αλληλουχία του σήματος της πυρηνικής εντόπισης (NLS :nuclear localization signal) της EBNA-1 συνδέεται με μια πρωτεΐνη μεταφοράς, την καρυοφερίνη α2 .
- Μεσολαβεί για την σύνδεση του επισώματος με την θεμέλια ουσία του πυρήνα και τα χρωμοσώματα, λειτουργίες που παίζουν ρόλο στην διατήρηση του επισώματος και στον διαχωρισμό τους στα θυγατρικά κύτταρα .
- Ενισχύει την μεταγραφή γονιδίων που βρίσκονται in cis στο FR που δρα σαν EBNA1-εξαρτώμενος ενισχυτής της μεταγραφής . Η ενίσχυση αυτή εξαρτάται τόσο από το είδος της κυτταρικής σειράς ,όσο και από τον υποκινητή του γονιδίου .
- Προσδένεται στο RNA και πιθανόν να ελέγχει την γονιδιακή έκφραση σε μετα – μεταγραφικό επίπεδο .

Ένα μεγάλο μέρος της μελέτης της πρωτεΐνης EBNA-1 στρέφεται στην πιθανή τοξικότητα που μπορεί να έχει ο ιικός αυτός παράγοντας για το ευκαρυωτικό κύτταρο δεδομένης της απαραίτητης έκφρασης της για την διατήρηση του επισώματος. Η ογκογονικότητα του ιού EBV αποδίδεται κυρίως στις πρωτεΐνες EBNA-2 και LMP1 οι οποίες δεν υπάρχουν στο όχημα. Όσον αφορά την EBNA-1 σε μια μελέτη έχειδειχθεί ότι σε ηπατικά κύτταρα σταθερά διαμολυσμένα με OriP πλασμίδια τόσο υψηλά επίπεδα της EBNA-1 όσο και υψηλός αριθμός επισωμάτων δεν επηρέασε την έκφραση των ειδικών πρωτεϊνών του ηπατικών κυττάρων .Επίσης ήπαρ του οποίου τα κύτταρα (ηπατοκύτταρα) διαμολύνθηκαν με EBV όχημα που είχε ως φορέα λιποσώματα του αιμοσυγκολλητικού ιού της Ιαπωνίας (Japan hemagglutinating virus) δεν παρουσίασε καμία παθολογοανατομική αλλοίωση . Αντίθετα υπάρχουν εργασίες οι οποίες αμφισβητούν την ακινδυνότητα της EBNA-1. Μια μελέτη έδειξε ότι η EBNA-1 μπορεί in vitro να προσδεθεί στο RNA γεγονός που μπορεί in vivo να σημαίνει μετα-μεταφραστική επίδραση στην έκφραση κυτταρικών πρωτεϊνών . Επίσης άλλη μελέτη δείχνει ότι η έκφραση της EBNA-1 σε B λεμφοκύτταρα σε διαγονιδιακά ποντίκια, προδιαθέτει στην δημιουργία B λεμφωμάτων . Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για τον ακριβή καθορισμό του τοξικολογικού προφίλ της πρωτεΐνης για το κύτταρο. Όσον αφορά την αντιγονικότητα της πρωτεΐνης EBNA-1 φαίνεται ότι η EBNA-1 ξεφεύγει της

αντιγόνο-παρουσίασής της από το μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης I. Αυτό οφείλεται στην ύπαρξη στο μόριο της EBNA-1 της επαναλαμβανόμενης αλληλουχία γλυκίνης- αλανίνης⁹¹.

Τα κύρια πλεονεκτήματα των επισωματικών έναντι των κλασσικών ιικών οχημάτων είναι :

1. Αποφυγή του φαινομένου της μεταλλαξιγένεσης μέσω ενσωμάτωσης αφού το εισηγμένο γενετικό υλικό δεν ενσωματώνεται.
2. Η έκφραση του διαγονιδίου ελέγχεται μόνο από τις αλληλουχίες που το συνοδεύουν (υποκινητές, ενισχυτές που ανήκουν στην μεταγραφική μονάδα) και πιθανόν τις αλληλουχίες που αποτελούν μέρος του οχήματος. Αντίθετα η έκφραση των διαγονιδίων που υπόκεινται σε ενσωμάτωση , στα ιικά οχήματα, αναγκαστικά επηρεάζονται από το περιβάλλον της γειτονικής χρωματίνης .
3. Το μέγεθος του DNA που μπορεί να μεταφερθεί με τα επισωματικά οχήματα μπορεί να φθάσει τα 300 kb σε αντίθεση με τα ιικά οχήματα που περιορίζεται (4-30kb) από το αρχικό μέγεθος του μητρικού ιού και την δυνατότητα αντικατάστασης μέρους του ιικού γονιδιώματος μη απαραίτητου για την δράση του ως όχημα μεταφοράς.
4. Η παραγωγή του επισωματικού οχήματος σε μεγάλες ποσότητες (scaling up) είναι εύκολη, χωρίς ανησυχίες για την βιολογική σταθερότητά τους ή την καθαρότητά τους πράγμα που είναι αρκετά δύσκολο να επιτευχθεί στα ιικά συστήματα .

Τα μειονεκτήματα τους σε σχέση με τα ιικά οχήματα είναι :

1. Δεν φαίνεται να έχουν τις δυνατότητες κυτταρικής στόχευσης που έχουν τα κλασσικά ιικά συστήματα τα οποία εκμεταλλεύονται τον τροπισμό των μητρικών ιών για ορισμένους κυτταρικούς πληθυσμούς (π.χ. ο HSV για τα νευρικά κύτταρα).
2. Οι ανησυχίες που υπάρχουν από την έκφραση στον πυρήνα του ευκαρυωτικού κυττάρου των ιικών παραγόντων που δρουν in trans (π.χ. EBNA-1) και είναι απαραίτητοι για την διατήρηση του επισώματος, δεδομένου ότι οι ιοί από τους

οποίους προέρχονται έχουν αποδειχθεί ότι έχουν ογκογενετικές ιδιότητες στον άνθρωπο.

3. Η διαμόλυνση των κυττάρων με τα επισωματικά αυτά οχήματα υπόκειται στις φαρμακολογικές και τοξικολογικές ιδιότητες των ουσιών που φέρουν τα επισωματικά πλασμίδια (π.χ. λιποσώματα).

1.5 Scaffold matrix attachment regions (S/MARs)

Τα τελευταία χρόνια η εικόνα που έχουμε για την δομή του μεταφασικού πυρήνα του ευκαρυωτικού κυττάρου έχει αλλάξει ριζικά. Πλέον θεωρούμε ότι τα μόρια του DNA δεν βρίσκονται τυχαία διασκορπισμένα μέσα σε μία ομογενή πυρηνική ουσία αλλά σχηματίζουν βρόχους αρκετών χιλιάδων κιλοβάσεων με την βοήθεια πρόσδεσης θέσεων της αλληλουχίας του DNA σε πρωτεΐνες του πυρηνικού ικριώματος⁹². Οι περιοχές αυτές της πρόσδεσης του DNA σε πρωτεΐνες του πυρηνικού ικριώματος ονομάστηκαν scaffold ή matrix attachment regions (S/MARs). Έχει υπολογιστεί ότι το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει περίπου 100000 τέτοιες περιοχές⁹³. Η πυρηνική μήτρα (nuclear matrix) ,η οποία ανακαλύφθηκε το 1974 αποτελεί το περιβάλλον μέσα στο οποίο ευρίσκονται οι μοριακές μηχανές της αντιγραφής και της μεταγραφής του DNA καθώς επίσης και τα γονίδια τα οποία μεταγράφονται. Τα S/MARs είναι οι αλληλουχίες του DNA που μεσολαβούν για την επίτευξη των παραπάνω λειτουργιών με το να αποτελούν τα σημεία πρόσδεσης του DNA στην θεμέλια ουσία του πυρήνα. Τα S/MARs ανακαλύφθηκαν περίπου δύο δεκαετίες πριν και ορίστηκαν σαν τα στοιχεία του DNA τα οποία παραμένουν στον πυρηνικό σκελετό μετά την απομόνωση των ιστονών και των άλλων εκλουόντων παραγόντων ή αυτά τα οποία in vitro επανασυνδέονται με την θεμέλια ουσία του πυρήνα.

Στις αλληλουχίες αυτές έχουν αποδοθεί σημαντικές λειτουργίες όπως η οργάνωση του γονιδιώματος και η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Όσον αφορά την οργάνωση έχει βρεθεί ότι S/MARs βρίσκονται στο κέντρο κάθε χρωματίδας και στα τελομερή του μεταφασικού χρωμοσώματος συμβάλλοντας πιθανώς στην συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων κατά την πυρηνική διαίρεση. Ενέχονται επίσης στον σχηματισμό

των ορίων ανάμεσα σε χρωματινικές περιοχές καθώς επίσης και στις αλλαγές της χρωματινικής δομής επηρεάζοντας την έναρξη της αντιγραφής του DNA. Η διάδραση των S/MAR αλληλουχιών με την πυρηνική θεμέλια ουσία είναι διαφορετικής φύσεως από την καλά χαρακτηρισμένη διάδραση μεταξύ πρωτεϊνών και DNA που αφορούν συγκεκριμένα motif DNA^{94;95}. Τοπολογικά τα S/MARs κατανέμονται ομοιογενώς στην περιφερειακή μεμβράνη και στο εσωτερικό ινοκοκκώδες δίκτυο του πυρήνα. Οι λαμινίνες A και B προσδένονται στα S/MARs. Ο άλλος κύριος προσδέτης είναι η πρωτεΐνη SAF-A (scaffold attachment scaffold A) η οποία είναι γνωστή και ως SP120 ή hnRNP-U⁹⁶. Αποτελεί κύριο μέλος των ετερογενών πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνών (hnRNPs). Υπάρχουν δύο ανεξάρτητες θέσεις πρόσδεσης του DNA α) η καρβοξυτελική RNA/ssDNA θέση πρόσδεσης (RGG box) και β) η αμινοξυτελική περιοχή 45 αμινοξέων η οποία αποκόβεται κατά την απόπτωση. Η περιοχή αυτή ονομάζεται SAF-box, υπάρχει σε αρκετές ευκαρυωτικές πρωτεΐνες και αποτελεί τον πρώτο χαρακτηρισμένο ειδικό προσδέτη των S/MARs^{97;98}. Η πρωτεΐνη αυτή αυτοπολυμερίζεται και προσδένεται σύμφωνα με το μοντέλο “mass binding” όπου ενώ κάθε θέση αντιδρά ασθενώς με το DNA το οποίο μπορεί να είναι ένα UE , η σύγχρονη όμως πρόσδεση πολλών σημείων δημιουργεί μια ισχυρή ειδική αντίδραση μεταξύ S/MAR-DNA.

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι ένα άλλο μεγάλο κεφάλαιο στο οποίο φαίνεται να εμπλέκονται τα S/MARs. Έχουν θεωρηθεί σαν μια ξεχωριστή τάξη *cis* ενεργών στοιχείων που επιδρούν στην έκφραση των γειτονικών γονιδίων. Εργασίες έχουν δείξει σημαντική αύξηση της έκφρασης κατά την ενσωματώσή τους δίπλα σε γονίδια στο γονιδίωμα⁹⁹. Άλλες αναφορές προσδίδουν στα S/MARs ιδιότητες μονωτών^{95;100;101}.

Συνεπώς φαίνεται ότι οι αλληλουχίες αυτές εμπλέκονται σε πολλαπλές λειτουργίες ανεξάρτητες μεταξύ τους κατά τα διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου γεγονός το οποίο πιθανώς εξηγεί την μεγάλη ετερογένεια που έχουν τα τμήματα S/MARs όσον αφορά την νουκλεοτιδική τους αλληλουχία. Οι αλληλουχίες αυτές είναι πλούσιες σε AT αλλά αυτό δεν είναι επαρκές για να τις χαρακτηρίσει ως S/MAR. Ένα άλλο πρόβλημα για την ανεύρεση των S/MAR τμημάτων προκύπτουν από την αδυναμία των *in vitro* πειραμάτων. Συνήθως η πειραματική ανεύρεση των S/MARs γίνεται με την χρήση τεχνικών μέτρησης της συγγένειας ενός κλωνοποιημένου τμήματος DNA που

πιθανολογείται ότι έχει ιδιότητες S/MAR με την πυρηνική θεμέλια ουσία. Εντούτοις διαφορετικοί τρόποι απομόνωσης της θεμέλιας ουσίας (2mM NaCL, LIS, ηλεκτροέκλυση) αναδίδουν και διαφορετικά συστατικά αυτής , δηλαδή η θεμέλια ουσία είναι βασικά μια λειτουργικά προσδιορισμένη δομή που εξαρτάται από τις πειραματικές συνθήκες. Το γεγονός αυτό έχει δώσει μεγάλη σημασία στην ανάπτυξη μεθόδων της βιοπληροφορικής για την ταυτοποίηση αλληλουχιών τύπου S/MARs. Μέχρι στιγμής υπάρχουν τρία προγράμματα για την πρόβλεψη των S/MARs με την βοήθεια εφαρμογής θεωρητικών κριτηρίων που χαρακτηρίζουν τις αλληλουχίες αυτές. Α) το Mar finder που βασίζεται στην στατιστική ύπαρξη των S/MARs ως συντηρημένες αλληλουχίες. Αυτές οι αλληλουχίες είναι χαρακτηριστικές θέσεων έναρξης αντιγραφής, θέσεων δράσης τοποισομεράσης II, θέσεων κυρτώματος του DNA καθώς και αλληλουχίες πλούσιες σε AT. Β) το SIDD το οποίο βασίζεται στον καθορισμό αλληλουχιών DNA που εύκολα μπορούν να παρουσιάσουν αποσταθεροποίηση της διπλής έλικας (άνοιγμα αυτής) με ενεργειακά κριτήρια. Γ) το SMARTest που βασίζεται σε ανάλυση της πυκνότητας των S/MAR συμπλόκων¹⁰²⁻¹⁰⁴.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η λειτουργία των αλληλουχιών αυτών στα πλαίσια των επισωματικών οχημάτων που φαίνεται ότι είναι απαραίτητες για την κατάκράτηση αυτών.

Τα S/MARs δεν παρουσιάζουν κάποια consensus αλληλουχία, ενώ το πιο σταθερό χαρακτηριστικό αυτών είναι η τάση να σχηματίζουν μονές αλυσίδες κάτω από εξάσκηση αρνητικής τάσης υπερελίκωσης καθώς επίσης και η δυνατότητα τους να σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές πράγμα το οποίο βεβαίως προϋποθέτει τον χωρισμό των διπλών αλυσίδων. Έτσι οι αλληλουχίες αυτές έχουν αναδυθεί σαν πολύτιμοι δείκτες οι οποίοι μπορούν να μας καθορίσουν ανεξάρτητα ρυθμιζόμενες μεταξύ τους μεταγραφικές μονάδες. Ανάμεσα στις βιομαθηματικές προσεγγίσεις για την ταυτοποίηση τέτοιων στοιχείων ιδιαίτερης αξίας έχει αποδειχθεί η μέθοδος SIDD (stress-induced duplex destabilization) – αποσταθεροποίηση της διπλής έλικας υπό τάση. Είναι μια αναλυτική μέθοδος η οποία προχωρά πέρα από την αξιολόγηση μιας αλληλουχίας DNA με βάση τα διάφορα motifs που περιέχει¹⁰⁵. Τα προφίλ SIDD υπολογίζονται εφαρμόζοντας μια στατιστικο-μηχανική διαδικασία στην οποία η υφιστάμενη σε μια αλληλουχία DNA ενέργεια υπερελίκωσης μοιράζεται στην αποδιάταξη της διπλής

έλικας, στην περιστροφή των προκυπτουσών μονών αλυσίδων και στην απομένουσα υπερελίκωση. Η ανάλυση αυτή οδηγεί στην ανίχνευση τμημάτων DNA που χαρακτηρίζονται ως αποδιατακτέα στοιχεία (unpairing elements UEs) μέσα στα οποία εμπεριέχονται τα πυρηνικά αποδιατακτέα στοιχεία (core unpairing elements CUEs) όπου περιέχουν και τα πρωταρχικά σημεία αποδιάταξης της αλυσίδας DNA.(base unpairing regions –BURs)

Σε όλες τις περιπτώσεις που έχουν εξεταστεί μέχρι σήμερα τα S/MARs συμπίπτουν με περιοχές που έχουν χαρακτηριστεί ως SIDDs στο ευκαρυωτικό γονιδίωμα.

Ένα από τα πρώτα στοιχεία S/MAR που αναγνωρίστηκαν είναι το S/MAR E που βρίσκεται μπροστά από το γονίδιο της ιντερφερόνης B στο μικρό σκέλος του χρωμοσώματος 9 του ανθρώπινου γονιδιώματος. (9q22)^{106;107}. Τόσο η βιολογικές του δράσεις όσο και οι φυσικοχημικές του ιδιότητες έχουν μελετηθεί εκτενώς¹⁰⁸.

1.6 Προφίλ αποσταθεροποίησης της διπλής έλικας DNA

Τα γραμμικά μόρια DNA που βρίσκονται μέσα σε διαλύματα φυσιολογικής συγκεντρώσης ιόντων και σε φυσιολογική θερμοκρασία αποκτούν τη γνωστή B διαμόρφωση όπως περιγράφηκε αρχικά από τους Watson-Crick. Εντούτοις το DNA μπορεί να υπάρξει και σε διαφορετικές διαμορφώσεις. Η πιο σημαντική βιολογική διαμόρφωση είναι αυτή που παρουσιάζει τοπικό διαχωρισμό της διπλής έλικας του DNA. Επειδή αυτός ο διαχωρισμός της διπλής έλικας είναι απαραίτητος τόσο για τον διπλασιασμό όσο και για την μεταγραφή του DNA υπόκειται σε αυστηρό έλεγχο *in vivo*. Μία συνιστώσα του ελέγχου αυτού περιλαμβάνει την ρύθμιση των τάσεων που αναπτύσσονται σε ένα η υπερελικωμένο μόριο DNA. Στους ζωντανούς οργανισμούς το DNA είναι οργανωμένο σε τοπολογικά τμήματα (domains) μεγέθους αρκετών χιλιάδων τάσεων, συνιστώντας είτε κυκλικά μόρια DNA είτε κλειστούς βρόχους DNA στα πλαίσια των χρωμοσωμάτων. Ο τοπολογικός περιορισμός ενός κλειστού μορίου DNA (domain) ισοδυναμεί με αυτόν ενός κυκλικό μορίου DNA. Στις δύο περιπτώσεις ο αριθμός σύνδεσης (linking number L) είναι ο ίδιος και παραμένει σταθερός. Ο αριθμός L

αντιπροσωπεύει τον ολικό αριθμό των στροφών κάθε έλικας DNA γύρω από τον κεντρικό άξονα της. Αλλαγή του αριθμού L μπορεί να προκληθεί μόνο από τη δράση ενζύμων τα οποία μπορούν να διασπάσουν την διπλή έλικα του DNA και να την ξανά ενώσουν. *In vivo* τα ένζυμα αυτά δρουν (συχνά σε συνδυασμό με άλλες διεργασίες) οδηγώντας στη μείωση του αριθμού $L < L_0$ που χαρακτηρίζει την χαλαρή B μορφή της διπλής έλικας. Η αρνητική διαφορά σύνδεσης που προκύπτει $\alpha = L - L_0$ δημιουργεί περιστροφικές τάσεις στο κυκλικό αυτό μόριο DNA θέτοντας το σε μια ενεργητική κατάσταση αρνητικής υπερελίκωσης¹⁰⁹. Η ενέργεια αυτή κατανέμεται στο μόριο DNA με δύο τρόπους: 1) Η B- μορφή το DNA μπορεί να λυγίσει ή και να περιστραφεί αποκτώντας διαμόρφώσεις που απορροφούν αυτή την ενέργεια και 2) τμήματα αλληλουχιών μπορούν να αποχωριστούν οδηγώντας έτσι σε ολική μείωση της υπερελίκωσης του μορίου DNA. Αυτού του τύπου οι μεταβάσεις απορροφούν μέρος της ενέργειας και οδηγούν σε χαλάρωση το υπόλοιπο μόριο DNA. Η εντόπιση του διαχωρισμού της διπλής έλικας στα διάφορα τμήματα αυτής εξαρτάται από την πρωτογενή αλληλουχία τους. Τα ζεύγη βάσεων AT χρειάζονται λιγότερη ενέργεια για να διαχωριστούν από από τα ζεύγη GC. Έτσι οι τοπικές εστίες διαχωρισμού της διπλής έλικας τείνουν να εμφανίζονται πιο συχνά σε περιοχές που είναι πλούσιες σε AT. Το φαινόμενο αυτό των τάσεων διαχωρισμού της διπλής έλικας DNA ονομάζεται δυναμικό αποσταθεροποίησης της διπλής έλικας (Stress-induced duplex destabilization – SIDD)¹¹⁰⁻

114

Η αποσταθεροποίηση κάθε ζεύγους βάσεων σε ένα υπερελικωμένο μόριο DNA στην ισορροπία εκφράζεται από τον τύπο:

$$\bar{G}(x) = \frac{\sum_{i_x} G(i_x) \exp[-G(i_x)/RT]}{\sum_{i_x} \exp[-G(i_x)/RT]}$$

όπου $\hat{G}(x)$ = μέση ενέργεια όλων των διαμορφώσεων, x = θέση βάσης στο μόριο DNA, i_x = διαμόρφωση στην οποία το ζεύγος βάσεων της θέσεως x είναι διαχωρισμένο. ($T = 37^\circ \text{C}$ και R : σταθερά των αερίων). Η ενέργεια που απαιτείται για τον διαχωρισμό του ζεύγους βάσεων x δίνεται από τον τύπο:

$$G(x) = \bar{G}(x) - \bar{G},$$

όπου $\hat{G}$ = μέση ενέργεια κατά την ισορροπία.

Το γράφημα του $G(x)$ ως προς το x ονομάζεται προφίλ αποσταθεροποίησης της διπλής έλικας του DNA. Θέσεις όπου ο διαχωρισμός των βάσεων ευνοείται έχουν αρνητική τιμή $G(x)$, ενώ θέσεις όπου ο διαχωρισμός των βάσεων δεν ευνοείται έχουν θετική τιμή. Μια περιοχή όπου υπάρχει αποσταθεροποίηση της διπλής έλικας DNA χαρακτηρίζεται από ένα γράφημα $G(x)$ στην περιοχή των αρνητικών τιμών¹¹⁵.

1.7 Αλληλουχίες έναρξης διπλασιασμού στο ευκαρυωτικό γονιδίωμα (Initiation Origin – IR)

Οι αλληλουχίες έναρξης διπλασιασμού στο ευκαρυωτικό γονιδίωμα είναι οι περιοχές στις οποίες εμφανίζονται οι φουρκέτες διπλασιασμού του DNA. Στις περιοχές αυτές προσδένεται το πρωτεϊνικό σύμπλοκο της αντιγραφικής μηχανής του κυττάρου και ξεκινά ο διπλασιασμός του DNA. Στον γενετικό τόπο του σφαιρινικού συμπλέγματος β έχει δειχθεί ότι η αντιγραφή ξεκινά από το IR που βρίσκεται μεταξύ των δύο γονιδίων της β σφαιρίνης¹¹⁶. Σε πειράματα γονιδιακής μεταφοράς το IR μπορούσε να ξεκινήσει τη διαδικασία διπλασιασμού περιοχών στις οποίες απουσίαζε η ενδογενής δυνατότητα έναρξης της αντιγραφής του DNA¹¹⁷. Οι αλληλουχίες έναρξης διπλασιασμού δεν χαρακτηρίζονται από κάποιο συγκεκριμένο motif αλλά είναι αλληλουχίες με υψηλό ποσοστό A/T και ομοιάζουν με τις θέσεις πρόσδεσης του προ αντιγραφικού συμπλοκών στον ζυμομήκυτα¹¹⁸. Επίσης χαρακτηρίζονται από προφίλ υψηλής αποσταθεροποίησης.

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η διερεύνηση του ρόλου των στοιχείων S/MAR στο πλαίσιο των επισωματικών φορέων για την δημιουργία ασφαλών, μη τοξικών επισωματικών φορέων. Τα δεδομένα που υπάρχουν ως προς την λειτουργία του S/MAR στην επισωματική διατήρηση προκύπτουν από τον φορέα pEPI-1 , ένα πρωτότυπο σύστημα που ενσωματώνει επίσης την έναρξη αντιγραφής του ιού SV40. Στην εργασία αυτή χρησιμοποιούμε τους φορείς που βασίζονται στον ιό EBV που έχουν το δικό τους σύστημα επισωματικής διατήρησης και διερευνούμε την δυνατότητα της αλληλουχίας S/MAR να υποκαταστήσει λειτουργικά τον ιϊκό μηχανισμό επισωματικής διατήρησης καθώς επίσης και τον τρόπο με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτό.

Υλικά και μέθοδοι

Κυτταροκαλλιέργειες

Όλες οι διαδικασίες έγιναν σε περιβάλλον άσηπτο σε εστία νηματικής ροής (hood). Τα κύτταρα Jurkat καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός (fetal calf serum, FCS) , 2 mM L-γλουταμίνη, 50 U/ml πενικιλίνη και 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ στρεπτομυκίνη και επώαστηκαν σε κλίβανο σε περιβάλλον 37°C και 5% CO₂. Κάθε 48 ώρες περίπου γινόταν ανανέωση του θρεπτικού υλικού έτσι ώστε η συγκέντρωση των κυττάρων να διατηρείται περίπου στα 5×10^5 κύτταρα ανά ml καλλιεργητικού υλικού. Η καταμέτρηση των κυττάρων έγινε με την χρήση αιμοκυτομέτρου Neubauer και για την εκτίμηση των μη βιώσιμων κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Trypan blue. Η εγκατάσταση σταθερά διαμολυσμένων καλλιεργειών κυττάρων Jurkat έγινε με την προσθήκη υδρομυκίνης η συγκέντρωση της οποίας είχε καθοριστεί με προκαταρκτικά πειράματα στα 500 mg/ml επιλογή διήρκεσε περίπου δύο εβδομάδες, διάστημα που χρειάστηκε για την πλήρη θανάτωση της παράλληλης καλλιέργειας των μη διαμολυσμένων κυττάρων μαρτύρων. Όλες οι καλλιέργειες διατηρήθηκαν για χρονικό διάστημα 90 ημερών από την ημέρα που έγινε η διαμόλυνση.

Κατασκευή πλασμιδίων

Το εμπορικά διαθέσιμο pCEP4(Invitrogen, San Diego, CA) περιέχει την αρχή διπλασιασμού του ιού EBV, το πυρηνικό αντιγόνο (EBNA-1) , καθώς και το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υδρομυκίνη. Το πλασμίδιο pCEP4 / eGFP κατασκευάστηκε με υποκλωνοποίηση του γονιδίου eGFP ως ένα τμήμα NheI /BglII (745 bp) στο pCEP4 που προηγουμένως είχε κατατμηθεί με το ένζυμο NheI.

Το πλασμίδιο pEBS / eGFP δημιουργήθηκε με την υποκλωνοποίηση ενός τμήματος NheI/BamHI 2760 βάσεων που περιέχει τον υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού συνδεδεμένο με το γονίδιο eGFP και το S/MAR, στον πολυσυνδέτη του pCEP4.

Η απάλειψη του γονιδίου της EBNA-1 από το πλασμίδιο pEBS / eGFP έγινε με την απομάκρυνση του τμήματος AvrII - SgrAI μετά από κατάτμηση με τα αυτά ένζυμα και

έτσι προέκυψε το πλασμίδιο pESdER /eGFP. Το πλασμίδιο pESdER-IR/eGFP προήλθε από το pEBS/eGFP αφού κατατμήθηκε με τα ένζυμα AvrII και SalI απομακρύνοντας το τμήμα DNA που περιέχει το γονίδιο της EBNA-1 και το OriP. Το τμήμα IR (AvrII – EcoRI) συνδέθηκε στο άκρο AvrII του φορέα. Τα νέα άκρα του φορέα που προέκυψαν γέμισαν με νουκλεοτίδια με την αντίδραση της πολυμεράσης και ο φορέας κυκλοποιήθηκε.

Η παρασκευή πλασμιδιακού DNA έγινε με τη χρήση του Endofree® Plasmid Kit (Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ώστε να εξασφαλιστεί υψηλή καθαρότητα και ελαχιστοποίηση της περιεκτικότητας σε ενδοτοξίνες. Στο σχήμα που ακολουθεί απεικονίζονται τα πλασμίδια και οι αλληλουχίες που αυτά περιέχουν.

Κατασκευή των πλασμιδίων pCEP4/eGFP, pEBS/eGFP και pESdER/eGFP

Διαμόλυνση κυττάρων

Τα κύτταρα Jurkat διαμολύνθηκαν με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης. η συσκευή η οποία χρησιμοποιήθηκε γι' αυτό ήταν η GenePulser II της Biorad με συνθήκες τα επιλέχθηκαν για το είδος των κυττάρων με προκαταρκτικά πειράματα όπου ελέγχθηκε η επίδραση διαφόρων παραμέτρων στην απόδοση της διαμόλυνσης όπως το δυναμικό, η χωρητικότητα, το είδος του ρυθμιστικού διαλύματος, η συγκέντρωση των κυττάρων, και τέλος η συγκέντρωση πλασμιδιακού DNA. Η ποσότητα των κυττάρων για κάθε διά μολυνση 2×10^6 κύτταρα / ml ενώ η ποσότητα πλασμιδιακού DNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν γύρω στα 20 μg με την ακριβή ποσότητα να κυμαίνεται ανάλογα με το μέγεθος το πλασμιδίου έτσι ώστε να η μοριακή αναλογία μεταξύ των διαφορετικών πλασμιδίων να είναι 1 /1. Οι κυβέττες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0,2 cm. Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με διάλυμα PBS και κατόπιν μεταφέρθηκαν στην κυβέττα όπου έγινε η ηλεκτροδιάτρηση με τις εξής συνθήκες: 220V , 975 μF ($t_{\text{αποφόρτισης}}=25\text{msec}$). στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε φλάσκες καλλιεργητικού υλικού 75 cm^2 και επώαστηκαν στους 37 °C και 5% CO_2 . Το βουτυρικό νάτριο, τριχοστατίνη A και η 5' αζα κυτιδίνη χρησιμοποιήθηκαν με τελικές συγκεντρώσεις 5mM, 1 μM , 5 $\mu\text{mol/L}$ αντίστοιχα.

Μικροσκοπία φθορισμού και κυτταρομετρία ροής

Για την ανίχνευση της έκφρασης της eGFP, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν σε PBS και επαναδιαλύθηκαν σε PBS για να ακολουθήσει ανάλυση με τον κυτταρομετρητή FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) ο οποίος έχει λέιζερ αργού στα 488 nm για την διέγερση της πρωτεΐνης eGFP και το φίλτρο 530/30 nm για την ανίχνευση των εκπομπών φθορισμού. Για κάθε δείγμα συλλέχθηκαν 5000 γεγονότα. Η ανίχνευση του φθορισμού της eGFP έγινε με τη χρήση μικροσκοπίου ανάστροφου φθορισμού (Nikon Eclipse TE 2000).

Ανάλυση κατά Southern

Ολικό DNA από την κυτταρική σειρά Jurkat απομονώθηκε με τη χρήση του DNA Extraction kit Qiagen σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ποσότητα DNA 10 µg κατατμήθηκε με το ένζυμο περιορισμού BamHI, διαχωρίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.75% και μεταφέρθηκε σε nylon μεμβράνη (ZetaProbe Biorad). Η μεμβράνη υβριδοποιήθηκε με ένα ραδιοσημασμένο τμήμα κοινό για όλα τα πλασμίδια που προήλθε από την κατάτμηση αυτών με το ένζυμο περιορισμού BsrGI και έχει μέγεθος 965 bp. Το τμήμα αυτό περιέχει τον εκκινητή pCMV και μέρος του γονιδίου της eGFP. Η ηλεκτροφόρηση του DNA, η μεταφορά κατά Southern και η υβριδοποίηση με τον ραδιοσημασμένο ιχνηθέτη έγιναν με καθιερωμένες μεθόδους. Όλοι οι ιχνηθέτες σημάνθηκαν με τη μέθοδο των τυχαίων εκκινητών με το NEBlot Kit (New England Biolabs) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Οι αντιδράσεις πολυμεράσης για την ανίχνευση του γονιδίου ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τους κινητές forward 5'-CGTCTGCTGCTCCATACAAGCC-3' και reverse 5'TGCCTGAAACCGAACTGCCCC-3'. Το προϊόν που παράγεται από την ενίσχυση αντιστοιχεί σε ζώνη 481 βάσεων κατά την ηλεκτροφόρηση.

Υπολογισμός προφίλ αποσταθεροποίησης της διπλής έλικας DNA

Η ανάλυση των προφίλ αποσταθεροποίησης πραγματοποιήθηκε με την χρήση του λογισμικού WebSIDD το οποίο είναι διαθέσιμο στο διαδίκτυο¹¹⁹. Το λογισμικό αυτό είναι βασισμένο σε αλγόριθμους οι οποίοι έχουν αναπτυχθεί από τον Benham και συν. Η μέθοδος αυτή υπολογίζει με στατιστική μηχανική όλες τις καταστάσεις αποδιάταξης που μπορεί να υπάρχουν σε ένα υπερελικωμένο μόριο DNA κατά την ενεργειακή ισορροπία.

Έπειτα υπολογίζει σε κατάσταση ισορροπίας την πιθανότητα αποδιάταξης κάθε ζεύγους βάσεων που απαρτίζουν τη διπλή έλικα DNA. Ο υπολογισμός της ελεύθερης ενέργειας $G(x)$ επιτρέπει επίσης τον προσδιορισμό μερικώς αποσταθεροποιημένων αλληλουχιών σαν μέτρο προσβασιμότητας σε διάφορους παράγοντες που προσδένονται στο DNA. Όλες οι ενεργειακές παράμετροι που χρησιμοποιεί η μέθοδος έχουν προσδιοριστεί πειραματικά¹²⁰.

Αποτελέσματα

Όλα τα πλασμίδια (pCEP4/eGFP, pEBS/eGFP , pESdER-IR/eGFP) πριν την διαμόλυνση των κυτταρικών σειρών υποβλήθηκαν σε ανάλυση με τα περιοριστικά ένζυμα AseI / SalI για να διαπιστωθεί η ακεραιότητα των μορίων τους και να αποκλειστεί οποιαδήποτε πιθανότητα ανασυνδυασμού. Στην εικόνα 1.1 διακρίνονται οι ζώνες που προκύπτουν από την ανάλυση κάθε πλασμιδίου και είναι οι αναμενόμενες με βάση την θεωρητική ανάλυση των νεο-κατασκευασμένων πλασμιδίων.

Εικόνα 1.1

Ηλεκτροφορητικό προφίλ της ανάλυσης με περιοριστικά ένζυμα των πλασμιδίων :

1. pCEP4
2. pCEP4/eGFP
3. pEBS/eGFP
4. pESdER/eGFP

M : δείκτης μεγέθους 1-10 kb

Ακολούθησαν πειράματα διαμόλυνσης της κυτταρικής σειράς Jurkat με τα παραπάνω πλασμίδια που περιείχαν όλα το γονίδιο της πρωτεΐνης eGFP, ενώ διατηρήθηκε σταθερή η αναλογία των μορίων πλασμίδια / αριθμός κυττάρων σε κάθε διαμόλυνση. Όλα τα πειράματα διαμόλυνσης και η περαιτέρω αναλύσεις έγιναν τρεις φορές για το κάθε πλασμίδιο.

Το αρχικό ποσοστό της διαμόλυνσης των κυττάρων Jurkat το οποίο εκτιμήθηκε τόσο με μικροσκοπία φθορισμού όσο και με κυτταρομετρία ροής κυμάνθηκε γύρω στο 30% και ήταν παρόμοιο για όλα τα πλασμίδια / φορείς.

Τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με τον φορέα pCEP4/eGFP συνέχισαν να φθορίζουν καθόλη την διάρκεια της καλλιέργειας (εικόνα 1,2 και 1,3) . Αντιθέτως τα διαμολυσμένα με τους φορείς pEBS/eGFP και pESdER/eGFP κύτταρα έπαψαν να φθορίζουν μετά την όγδοη ημέρα όπως φαίνεται τόσο στην μικροσκοπία φθορισμού όσο και από την κυτταρομετρία ροής (Εικόνα 1.3).

Εικόνα 1.2 κύτταρα Jurkat διαμολυσμένα με τον φορέα pCEP4 / eGFP. Απλή μικροσκοπία (A) και μικροσκοπία φθορισμού (B) ενός κυτταρικού κλώνου μετά από κάποιες διαιρέσεις αυτού (5^η ημέρα μετά από την διαμόλυνση) απόδειξη του ότι ο φορέας pCEP4 / eGFP διπλασιάζεται και τα νέα μόρια μεταβιβάζονται στα θυγατρικά κύτταρα όπου εκφράζουν το το γονίδιο της πρωτεΐνης eGFP που μεταφέρουν.

Εικόνα 1.3 Προσδιορισμός του ποσοστού των φθορίζοντων κυττάρων με κυτταρομετρία ροής σε κυτταρικές καλλιέργειες διαμολυσμένες με τους φορείς pCEP4/eGFP, pEBS/eGFP και pESdER/eGFP στο χρονικό διάστημα των 4 εβδομάδων

Ο φορέας pCEP4 πολλαπλασιάζεται επισωματικά λόγω της ύπαρξης της πρωτεΐνης EBNA-1 και του OriP του ιού EBV και χρησιμοποιεί τον εκκινητή του κυτταρομεγαλοϊού για την μεταγραφή του γονιδίου eGFP. Το πλασμίδιο pCEP4/ eGFP επιτυγχάνει σταθερή διαμόλυνση των κυττάρων Jurkat, με τα κύτταρα να φθορίζουν καθόλη τη διάρκεια διατήρησης της καλλιέργειας όπως διαπιστώνεται με την μικροσκοπία φθορισμού. Στην εικόνα 1,2 φαίνεται η διαίρεση ενός κλώνου T κυττάρου Jurkat με όλους τους θυγατρικούς να φθορίζουν, γεγονός που υποδηλώνει τον πολλαπλασιασμό του φορέα pCEP4/ eGFP και τον καταμερισμό αυτού στα θυγατρικά κύτταρα. Αντιθέτως οι φορείς pEBS/eGFP και pESdER/eGFP παρουσίασαν μόνο μια παροδική έκφραση του γονιδίου eGFP μειούμενη μέχρι την ημέρα 8 όπου μετά το χρονικό αυτό σημείο δεν ανιχνεύθηκε φθορισμός.

Η επισωματική κατάσταση των φορέων διερευνήθηκε με ανάλυση κατά Southern (εικόνα 1,3). Όπως αναμένεται ο φορέας pCEP4/eGFP βρίσκεται σε επισωματική κατάσταση, ενώ αντιθέτως οι φορείς pEBS/eGFP και pESdER/eGFP δεν ανιχνεύονται καθόλου στην καλλιέργεια.

Για να δούμε στην προκειμένη περίπτωση την κατάσταση του φορέα pCEP4 / eGFP καθώς και των φορέων pEBS / eGFP και pESdER-1 / eGFP προχωρήσαμε σε ανάλυση κατά Southern (εικόνα 1.4). Η καθολική απουσία ζωνών στις σειρές ανάλυσης των pEBS/eGFP και pESdER/eGFP μπορεί να σημαίνει είτε εξαφάνιση του γονιδιώματος των φορέων από τα θυγατρικά κύτταρα λόγω αδυναμίας πολλαπλασιασμού ή καταμερισμού τους (plasmid dilution), είτε ενσωμάτωση του φορέα στο γονιδίωμα του κυττάρου. Το ερώτημα αυτό διερευνήσαμε με την ανίχνευση του γονιδίου ανθεκτικότητας στην υδρομυκίνη με την εφαρμογή της αντίδρασης πολυμεράσης σε DNA που απομονώθηκε από τα διαμολυσμένα κύτταρα των καλλιεργειών (εικόνα 1.5) . Και στις δύο περιπτώσεις των φορέων pEBS/eGFP και pESdER/eGFP δεν ανιχνεύθηκε το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υδρομυκίνη πράγμα που υποστηρίζει την εξαφάνιση των πλασμιδίων από τις καλλιέργειες και όχι την ενσωμάτωση αυτών στο γενετικό υλικό του κυττάρου. Σε μια σειρά πειραμάτων προσθέσαμε επίσης στις καλλιέργειες ουσίες όπως το βουτυρικό νάτριο(5mM) και η τριχοστατίνη A που είναι αναστολείς των αποακετυλασών των ιστονών (1μM), καθώς και 5'-αζα-κυτιδίνη που είναι αναστολέας της μεθυλίωσης , με σκοπό να μελετήσουμε εάν η διαφορετική αυτή συμπεριφορά των

πλασμιδίου που φέρουν S/MAR οφείλεται στη δράση επιγενετικών παραγόντων. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών δεν έδειξαν κάποια διαφορά είτε στην επισωματική κατάσταση είτε στην κινητική φθορισμού της πρωτεΐνης eGFP. Θεωρώντας το γεγονός ότι η προσθήκη του στοιχείου S/MAR στους παραπάνω φορείς που βασίζονται στον ιό EBV (pEBS/eGFP και pESdER/eGFP) οδηγεί στην απώλεια της επισωματικής κατάστασης του φορέα χωρίς κάποια εμφανή μοριακή δράση του S/MAR στο σύστημα επισωματικής διατήρησης (διάδραση της EBNA-1 με το OriP), υπολογίσαμε το προφίλ του δυναμικού αποσταθεροποίησης της διπλής έλικας υπό τάση (stress-induced duplex destabilization -SIDD) χρησιμοποιώντας το λογισμικό WebSIDD¹²¹ (εικόνα 1.6). Ενώ η περιοχή OriP του πλασμιδίου pCEP4 περιέχει μια αρκετά αποσταθεροποιημένη αλληλουχία με πολύ χαμηλές τιμές G, η ίδια ακριβώς αλληλουχία σταθεροποιείται όταν το S/MAR υποκλωνοποιείται στον φορέα pCEP4. Η ίδια ενεργειακή μετάβαση παρατηρείται και στον φορέα pESdER/eGFP στον οποίον έχει διαγραφεί το γονίδιο της EBNA-1. Βασιζόμενοι στις παραπάνω παρατηρήσεις αποδώσαμε την απώλεια της επισωματικής κατάστασης των παραπάνω φορέων που φέρουν το S/MAR στην ενεργειακή αυτή μετάβαση της περιοχής OriP προς την σταθεροποίηση. Για να επιβεβαιώσουμε αυτή την υπόθεση κατασκευάσαμε ένα νέο πλασμίδιο στο οποίο αντικαταστήσαμε την περιοχή OriP με την περιοχή έναρξης διπλασιασμού (initiation region -IR) του γονιδίου της β-σφαιρίνης. Ακολούθησε διαμόλυνση με ηλεκτροδιάτρηση των κυττάρων Jurkat εφαρμόζοντας τις ίδιες συνθήκες με τους προηγούμενους φορείς. Διαπιστώθηκε ότι το στοιχείο IR είναι ικανό να αποκαταστήσει την επισωματική κατάσταση του φορέα όπως φαίνεται και στην ανάλυση κατά Southern (εικόνα 1,4). Μετά από τρεις βδομάδες καλλιέργειας αφαιρέσαμε το αντιβιοτικό της υγρομυκίνης για να μπορούμε να εκτιμήσουμε τις διαφορές στη δυνατότητα διατήρησης των φορέων pCEP4/eGFP και pESdER-IR/eGFP. Ήταν ενδιαφέρουσα η παρατήρηση ότι στην περίπτωση του φορέα pESdER-IR/eGFP μετά την απομάκρυνση της υγρομυκίνης όλα τα κύτταρα της καλλιέργειας συνέχισαν να φθορίζουν, πράγμα που δηλώνει την μιτωτική σταθερότητα που προσδίδει στο φορέα η ύπαρξη του S/MAR. Αντιθέτως στην καλλιέργεια των κυττάρων διαμολυσμένων από τον φορέα pCEP4/eGFP παρουσιάζει μια μείωση στο ποσοστό των κυττάρων που φθορίζουν

στο χρόνο λόγω της ατέλειας του μηχανισμού κατακράτησης των φορέων που βασίζονται στον EBV.

Εικόνα 1.4 Ανάλυση κατά Southern για τη διαπίστωση της κατάστασης των φορέων.

1. pCEP4/eGFP
2. pEBS/eGFP
3. pESdER/eGFP
4. pESdER-IR/eGFP

M. Γραμμικό μόριο pCEP4/eGFP ως μάρτυρας μεγέθους

Εικόνα 1.5

Αντίδραση πολυμεράσης για την ανίχνευση του γονιδίου της υγρομυκίνης στο DNA διαμολυσμένων κυττάρων από :

1. pCEP4/eGFP
2. pEBS/eGFP
3. pESdER/eGFP

M : δείκτης μεγέθους DNA 1 kb

Εικόνα 1.6 Ενεργειακά προφίλ αποσταθεροποίησης της διπλής έλικας του μορίου DNA των φορέων pCEP4/eGFP, pEBS/eGFP, pESdER/eGFP και pESdER-IR/eGFP

Εικόνα 1,7

Ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν την πρωτεΐνη eGFP όπως προσδιορίστηκε με κυτταρομετρία ροής στις κυτταρικές καλλιέργειες που έχουν διαμολυνθεί με τους φορείς pCEP4/eGFP, pEBS/eGFP, pESdER/eGFP και pESdER-IR/eGFP κατά τη διάρκεια χρονικής περιόδου 12 εβδομάδων. Η απομάκρυνση το αντιβιοτικού της υγρομυκίνης έγινε στην αρχή της 4^{ης} εβδομάδος.

Συζήτηση

Στην εργασία αυτή προσπαθήσαμε να καθορίσουμε το ρόλο των S/MAR στα πλαίσια των φορέων οι οποίοι βασίζονται στο ιό EBV. Είναι γνωστό ότι οι φορείς που περιέχουν την αρχή διπλασιασμού του ιού EBV και το γονίδιο της πρωτεΐνης EBNA-1 μπορούν να επιτύχουν τον πολλαπλασιασμό και καταμερισμό τους σε συγχρονισμό με τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου¹²². Εντούτοις σε μακροπρόθεσμες κυτταρικές καλλιέργειες χωρίς την εφαρμογή πίεσης επιλογής με αντιβιοτικό υπάρχει η τάση να χάνεται το πλασμίδιο λόγω του ότι ο μηχανισμός του καταμερισμού των φορέων βασισμένων στον EBV δεν είναι τέλειος¹²³⁻¹²⁵. Η απώλεια της επισωματικής κατάστασης των φορέων pEBS/eGFP και pESdER/eGFP μετά την προσθήκη του S/MAR δεν ήταν αναμενόμενη για τους εξής λόγους: 1) το τμήμα S/MAR είχε υποκλωνοποιηθεί ακριβώς στην ίδια θέση όπως και στον φορέα pEPI-1, δηλαδή ανάμεσα στο γονίδιο eGFP και στο σήμα πολυαδενυλίωσης SV40, με αποτέλεσμα η μεταγραφή να μπορεί προχωρήσει και μέσα στο S/MAR υπό την οδήγηση του εκκινήτη pCMV. Προσφάτως έχει αναφερθεί ότι είναι απαραίτητη η μεταγραφή της αλληλουχίας S/MAR την διατήρηση της επισωματικής κατάστασης, ενώ διαγραφή ή αναστροφή της κατεύθυνσης αυτού του οδηγεί σε ενσωμάτωση του φορέα¹²⁶. 2) Το S/MAR δεν φαίνεται να επηρεάζει το σύστημα καταμερισμού του πλασμιδίου που βασίζεται στην διάδραση της πρωτεΐνης EBNA-1 με το OriP με κάποιο εμφανή μοριακό μηχανισμό στην περίπτωση του φορέα pEBS/eGFP. Επομένως αρχικά αναμενόταν ότι η προσθήκη του S/MAR θα οδηγούσε σε περαιτέρω βελτίωση της μιτωτικής σταθερότητας του φορέα και θα διόρθωνε την σταδιακή απώλεια των πλασμιδίων στις κυτταρικές καλλιέργειες χωρίς την προσθήκη επιλογής μέσω της διάδρασης του S/MAR με την πυρηνική θεμέλια ουσία. Στην περίπτωση του φορέα pESdER-eGFP αναμενόταν ότι το S/MAR θα μπορούσε λειτουργικά να αντικαταστήσει την πρωτεΐνη EBNA-1 και να διατηρήσει την επισωματική κατάσταση του πλασμιδίου με τον ίδιο τρόπο λειτουργίας όπως στον φορέα pEPI-1.

Τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η παρουσία του S/MAR δεν είναι ικανή να προσδώσει μιτωτική σταθερότητα στους φορείς που βασίζονται στον ιό EBV σε αντίθεση με την δράση S/MAR όπως έχει περιγραφεί στην περίπτωση του φορέα pEPI-1. Αποκλείσαμε την πιθανή ανάμειξη επιγενετικών

παραγόντων στην διαφορετική συμπεριφορά των EBV- πλασμιδίων που περιέχουν το S/MAR, καθώς δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά όταν προστέθηκαν στις καλλιέργειες αναστολείς των απακετυλασών των ιστονών (βουτυρικό νάτριο και τριχοστατίνη Α) ή αναστολέας της μεθυλίωσης (5-αζακυτιδίνη). Επιπροσθέτως η προώθηση της μεταγραφής μέσα στο στοιχείο S/MAR συμβάλλει σε μια ανοιχτή μορφή της χρωματίνης^{101;127;128}. Τα στοιχεία αυτά οδηγούν στην αναζήτηση της διαφορετικής συμπεριφοράς των πλασμιδίων σε ιδιότητες που προκύπτουν από την πρωτοταγή δομή του κυκλικού μορίου DNA των φορέων και οι οποίες μεταβάλλονται από την προσθήκη αλληλουχιών σαν το S/MAR. Υπάρχουν πολλές εργασίες που συνδέουν το δυναμικό της αποδιάταξης της διπλής έλικας DNA όπως αυτή εκφράζεται από τον υπολογισμό του αποσταθεροποιητικού προφίλ (SIDD) με το δυναμικό του πολλαπλασιασμού του φορέα καθώς και την μεταγραφική ρύθμιση των στοιχείων του^{115;129-131}. Η προσέγγιση αυτή αποκτά ιδιαίτερη σημασία στα πλαίσια των επίσωματικών φορέων καθώς κάθε αλλαγή της αλληλουχίας τους, δημιουργεί μια ενεργειακή μετάβαση η οποία επηρεάζει όλη την αλληλουχία του φορέα οδηγώντας σε μια ανακατανομή του δυναμικού αποδιάταξης της διπλής έλικας στα διάφορα σημεία του επισώματος. Η αποδιάταξη του DNA είναι ένα φαινόμενο με συμπεριφορά που εξαρτάται από το αν οδηγείται από την υπερελίκωση ενός περιορισμένου και συγκεκριμένου τμήματος γενετικού υλικού όπως είναι ένα κυκλικό μόριο ή απλά από την θερμοκρασία στην περίπτωση ανοικτών γραμμικών μορίων DNA¹³²⁻¹³⁴. Στην περίπτωση ενός κυκλικού μορίου DNA ο περιορισμός της δυνατότητας υπερελίκωσης συνδέει το δυναμικό αποδιάταξης όλων των ζευγών βάσεων μεταξύ τους. Αυτή η σύνδεση συμβαίνει διότι η αποδιάταξη ενός ζεύγους βάσεων σε κάποιο σημείο του μορίου προκαλεί νέο καταμερισμό της υπερελίκωσης σε όλο το μόριο DNA. Με αυτόν τρόπο κάθε ζεύγος βάσεων επηρεάζεται από την αποδιάταξη οποιουδήποτε άλλου ζεύγους βάσεων¹¹⁵. Το φαινόμενο αυτό εξηγεί την πολύπλοκη, διαδραστική ενεργειακή μετάβαση του δυναμικού αποδιάταξης της διπλής έλικας σε ένα κυκλικό μόριο όπως το επίσωμα. Για παράδειγμα μια τιμή του $G(x)$ είναι γύρω στο 10 Kcal/mol δηλώνει σταθερότητα του ζεύγους βάσεων x κάτω από ένα δεδομένο επίπεδο υπερελίκωσης. Αντιθέτως τιμές $G(x)$ κοντά στο μηδέν δηλώνουν χαμηλή αποσταθεροποιητική τάση με υψηλές πιθανότητες. Αν θεωρήσουμε ένα σύστημα το οποίο μπορεί να λάβει δύο διαφορετικές καταστάσεις, G1 και G2, τότε στην ισορροπία ο

λόγος του αριθμού των κυκλικών μορίων DNA σε κάθε ενεργειακή κατάσταση θα διαφέρει λογαριθμικά σύμφωνα με την εξίσωση $f1/f2 = \exp [-(G1 - G2)/RT]$, όπου $RT=0.616 \text{ kcal/mol}$ στην θερμοκρασία των 37°C . Εάν αυτή η ισορροπία αφορά το άνοιγμα της διπλής έλικας του DNA σε μια συγκεκριμένη περιοχή με την αντιστρεπτή δράση ενός άλλου μορίου (π.χ. ενός παράγοντα που συνδέεται στο DNA) τότε η διαφορά $G1-G2$ ισοδυναμεί με την αποσταθεροποίηση η οποία προκαλείται από την υπερελίκωση. Επίσης το $G(x)$ αποτελεί ένα μέτρο μερικής αποσταθεροποίησης μιας περιοχής με την βιολογική σημασία του προσδιορισμού του θεωρητικού δυναμικού προσβασιμότητας της συγκεκριμένης περιοχής σε διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες^{115;135-137}.

Το πλασμιδίο pESdER-IR/eGFP που περιέχει το στοιχείο IR αντί του OriP του EBV και το S/MAR πολλαπλασιάζεται επισωματικά ενώ επιπροσθέτως παρουσιάζει και υψηλή με μιτωτική σταθερότητα μετά από πολλές κυτταρικές γενεές χωρίς αντιβιοτική επιλογή, μια ιδιότητα η οποία πριν έχει περιγραφεί για τον φορέα pEPI-1. Και στην περίπτωση του φορέα pESdER-IR/eGFP το S/MAR έχει υποκλωνοποιηθεί στην ίδια θέση με τον φορέα pEPI-1 όσον αφορά τη θέση του σε σχέση με τις άλλες αλληλουχίες του φορέα. Το γονίδιο τις πρωτεΐνης EBNA-1 δεν υπάρχει και έτσι η κατακράτηση του πλασμιδίου συμβαίνει μόνο μέσω της λειτουργίας του S/MAR. Επίσης το γεγονός ότι το πλασμιδίο pESdER/eGFP δεν πολλαπλασιάζεται επισωματικά σε αντίθεση με το pESdER-IR/eGFP, δηλώνει ότι το S/MAR από μόνο του δεν είναι ικανό να διατηρήσει την επισωματική κατάσταση του φορέα αλλά χρειάζεται την παρουσία μιας αλληλουχίας η οποία έχει προφίλ υψηλής αποσταθεροποίησης και η οποία διατηρεί αυτό το προφίλ μετά την ενεργειακή ανακατανομή του λόγω της ενσωμάτωσης του S/MAR μέσα στο φορέα. Αυτή είναι πιθανά η βάση της εξήγησης της διαφορετικής συμπεριφοράς του πλασμιδίου όσον αφορά το δυναμικό πολλαπλασιασμό του όταν περιέχει μια S/MAR αλληλουχία η οποία μπορεί να επηρεάσει σοβαρά το δυναμικό αποσταθεροποίησης της περιοχής OriP. Η σημασία της ύπαρξης μιας αποσταθεροποιημένης περιοχής μέσα στο OriP για την έναρξη του διπλασιασμού του φορέα είχε αρχικά δειχθεί από το γεγονός ότι μόνο τμήματα DNA που είχαν αποσταθεροποιημένο προφίλ (SIDD) μπορούσαν να αντικαταστήσουν την περιοχή αυτή και παράλληλα να διατηρούν άθικτη την ικανότητα διπλασιασμού του πλασμιδίου¹³⁸.

Για την διατήρηση της επισωματικής κατάστασης ενός πλασμιδίου οι δύο προϋποθέσεις είναι ο διπλασιασμός και ο επιτυχημένος διαχωρισμός του στα θυγατρικά κύτταρα. Έχει αναφερθεί ότι το S/MAR, στην περίπτωση του φορέα pEPI-1, στη διαδικασία καταμερισμού του φορέα κατά τη διάρκεια της μίτωσης συνδέεται με υψηλή συγγένεια με τον παράγοντα SAF-A (scaffold attachment factor A) που αποτελεί στοιχείο της χρωματίνης¹³⁹. Επίσης έχειδειχθεί ότι τα S/MAR δεν αποτελούν τις κύριες περιοχές για την έναρξη της αντιγραφής του DNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα¹⁴⁰. Στο πλασμίδιο pESdER-IR/eGFP η παρουσία του S/MAR δεν φαίνεται να επηρεάζει την λειτουργία καταμερισμού αλλά τον πολλαπλασιασμό αυτού. Υποθέτουμε ότι το S/MAR δρα σαν μια πηγή αποσταθεροποίησης, έχοντας ωστόσο μια σταθεροποιητική δράση σε όλες τις υπόλοιπες αλληλουχίες του φορέα και κυρίως στο OriP, που είναι και η πιο αποσταθεροποιημένη. Αυτό οφείλεται στην ενεργειακή ανακατανομή που προκαλεί η ενσωμάτωση του S/MAR όπως περιγράφηκε πιο πάνω. Η σταθεροποιημένη αυτή η κατάσταση του OriP ισοδυναμεί με την ύπαρξη του μεγαλύτερου αριθμού των κυκλικών μορίων DNA σε κλειστή δομή κάνοντας το OriP λιγότερο προσβάσιμο στην πρόσδεση παραγόντων της αντιγραφικής μηχανής. Το S/MAR, αν και το ίδιο αποσταθεροποιημένο δεν είναι ικανό να υποστηρίξει τον διπλασιασμό του επισώματος από μόνο του, δεδομένου ότι δεν προσδένονται σε αυτό με υψηλή συγγένεια παράγοντες της αντιγραφικής μηχανής¹⁴¹ του κυττάρου. Η αντικατάσταση του OriP με το IR οδηγεί σε επανάκτηση της επισωματικής κατάστασης γιατί το IR δεν χάνει το προφίλ αποσταθεροποίησης του επί της παρουσίας του S/MAR και μπορεί να υποστηρίξει το διπλασιασμό του φορέα pESdER-IR/eGFP. Εντούτοις δεν συνεπάγεται ότι η περιοχή IR δρα ως περιοχή πρόσδεσης του συμπλόκου της αντιγραφικής μηχανής (ORC). Παλαιότερη εργασία πάνω στο θέμα αυτό έχει δείξει ότι η πρόσδεση του ORC τόσο στα πλαίσια του φορέα pEPI-1 όσο και σε πλασμίδια τα οποία περιέχουν στοιχεία από το γονιδίωμα του ζυμομύκητα (yeast retention elements) συμβαίνει με τρόπο που δεν εξαρτάται από την πρωτοταγή δομή της αλληλουχίας του DNA¹⁴². Μια αποσταθεροποιημένη περιοχή εκτός του S/MAR πιθανώς χρειάζεται για την πρώτη πρόσδεση του προ- αντιγραφικού συμπλόκου παρέχοντας εύκολη αποδιάταξη της διπλής έλικας. Η πρόσδεση του συμπλόκου αυτού, το οποίο έχει μεταξύ των άλλων και δράση έλικας, μπορεί να προκαλέσει περαιτέρω αλλαγή του προφίλ SIDD ολόκληρου του

φορέα και να οδηγήσει σε ευνοϊκές συνθήκες πρόσδεσης της αντιγραφικής μηχανής σε διάφορα σημεία του φορέα συντελώντας στον πολλαπλασιασμό αυτού ως επίσωμα.

Από την ανάλυση του προφίλ SIDD του πλασμιδίου pEPI-1 μπορούμε να δούμε ότι εκτός από το S/MAR η περιοχή που παρουσιάζει υψηλά αποσταθεροποιημένο προφίλ είναι εκείνη που ανήκει στον εκκινήτη της β-λακταμάσης. Η αλληλουχία αυτή ίσως αποτελεί το εναρκτήριο σημείο της αποσταθεροποίησης που χρειάζεται για την αντιγραφή του πλασμιδίου.

Συμπερασματικά θεωρούμε ότι η επισωματική συμπεριφορά ενός πλασμιδίου χρειάζεται, εκτός από στοιχεία σαν το S/MAR, τουλάχιστον άλλο ένα τμήμα DNA το οποίο να διατηρεί το προφίλ αποσταθεροποίησης επί παρουσίας του S/MAR. Προτείνουμε ότι οι υπολογισμοί του προφίλ αποσταθεροποίησης (SIDD) πρέπει να αποτελούν αναπόσπαστο μέρος της σχεδίασης επισωματικών συστημάτων γονιδιακής μεταφοράς.

Βιβλιογραφία

Βιβλιογραφία

1. Verma, I.M. and M.D. Weitzman. 2005. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu. Rev. Biochem.* 74:711-738.
2. Somia, N. and I.M. Verma. 2000. Gene therapy: trials and tribulations. *Nat. Rev. Genet.* 1:91-99.
3. Verma, I.M. and R.K. Naviaux. 1991. Human gene therapy. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1:54-59.
4. Bank, A., R. Dorazio, and P. Leboulch. 2005. A Phase I/II Clinical Trial of {beta}-Globin Gene Therapy for {beta}-Thalassemia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1054:308-316.
5. Sadelain, M., L. Lisowski, S. Samakoglu, S. Rivella, C. May, and I. Riviere. 2005. Progress Toward the Genetic Treatment of the {beta}-Thalassemias. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1054:78-91.
6. Malik, P. and P.I. Arumugam. 2005. Gene Therapy for {beta}-Thalassemia. *Hematology. (Am. Soc. Hematol. Educ. Program.)* 45-50.
7. Schrier, S. 2004. New treatment options for thalassemia. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* 2:783-784.
8. Deng, W.P., C.C. Wu, C.C. Lee, W.K. Yang, H.E. Wang, R.S. Liu, H.J. Wei, J.G. Gelovani, J.J. Hwang, D.M. Yang, Y.K. Fu, and C.W. Wu. 2006. Serial in vivo imaging of the lung metastases model and gene therapy using HSV1-tk and ganciclovir. *J. Nucl. Med.* 47:877-884.

9. Ossevoort,M., A.Zaldumbide, S.J.Cramer, E.I.van der Voort, R.E.Toes, and R.C.Hoeben. 2006. Characterization of an immuno 'stealth' derivative of the herpes simplex virus thymidine-kinase gene. *Cancer Gene Ther.* 13:584-591.
10. Young,M., N.Overlid, K.Konopka, and N.Duzgunes. 2005. Gene therapy for oral cancer: efficient delivery of a 'suicide gene' to murine oral cancer cells in physiological milieu. *J.Calif.Dent.Assoc.* 33:967-971.
11. Yang,S.H., T.K.Oh, and S.T.Kim. 2005. Increased anti-tumor effect by a combination of HSV thymidine kinase suicide gene therapy and interferon-gamma/GM-CSF cytokine gene therapy in CT26 tumor model. *J.Korean Med.Sci.* 20:932-937.
12. Rondinone,C.M. 2006. Therapeutic potential of RNAi in metabolic diseases. *Biotechniques* Suppl:31-36.
13. Gaur,R.K. 2006. RNA interference: a potential therapeutic tool for silencing splice isoforms linked to human diseases. *Biotechniques* Suppl:15-22.
14. Lage,H. 2005. Potential applications of RNA interference technology in the treatment of cancer. *Future.Oncol.* 1:103-113.
15. Bertoni,C., G.E.Morris, and T.A.Rando. 2005. Strand bias in oligonucleotide-mediated dystrophin gene editing. *Hum.Mol.Genet.* 14:221-233.

16. Gruenert,D.C., E.Bruscia, G.Novelli, A.Colosimo, B.Dallapiccola, F.Sangiuolo, and K.K.Goncz. 2003. Sequence-specific modification of genomic DNA by small DNA fragments. *J.Clin.Invest* 112:637-641.
17. Durai,S., M.Mani, K.Kandavelou, J.Wu, M.H.Porteus, and S.Chandrasegaran. 2005. Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 33:5978-5990.
18. Barquinero,J., H.Eixarch, and M.Perez-Melgosa. 2004. Retroviral vectors: new applications for an old tool. *Gene Ther.* 11 Suppl 1:S3-S9.
19. Anderson,J.L. and T.J.Hope. 2005. Intracellular trafficking of retroviral vectors: obstacles and advances. *Gene Ther.* 12:1667-1678.
20. Lever,A.M., P.M.Strappe, and J.Zhao. 2004. Lentiviral vectors. *J.Biomed.Sci.* 11:439-449.
21. Naldini,L. and I.M.Verma. 2000. Lentiviral vectors. *Adv.Virus Res.* 55:599-609.
22. Kafri,T., H.van Praag, F.H.Gage, and I.M.Verma. 2000. Lentiviral vectors: regulated gene expression. *Mol.Ther.* 1:516-521.
23. Dropulic,B. 2005. Genetic modification of hematopoietic cells using retroviral and lentiviral vectors: safety considerations for vector design and delivery into target cells. *Curr.Hematol.Rep.* 4:300-304.

24. Ralph,G.S., K.Binley, L.F.Wong, M.Azzouz, and N.D.Mazarakis. 2006. Gene therapy for neurodegenerative and ocular diseases using lentiviral vectors. *Clin.Sci.(Lond)* 110:37-46.
25. Manilla,P., T.Rebello, C.Afable, X.Lu, V.Slepushkin, L.M.Humeau, K.Schonely, Y.Ni, G.K.Binder, B.L.Levine, R.R.MacGregor, C.H.June, and B.Dropulic. 2005. Regulatory considerations for novel gene therapy products: a review of the process leading to the first clinical lentiviral vector. *Hum.Gene Ther.* 16:17-25.
26. Teschemacher,A.G., S.Wang, T.Lonergan, H.Duale, H.Waki, J.F.Paton, and S.Kasparov. 2005. Targeting specific neuronal populations using adeno- and lentiviral vectors: applications for imaging and studies of cell function. *Exp.Physiol* 90:61-69.
27. Malik,P., P.I.Arumugam, J.K.Yee, and G.Puthenveetil. 2005. Successful Correction of the Human Cooley's Anemia {beta}-Thalassemia Major Phenotype Using a Lentiviral Vector Flanked by the Chicken Hypersensitive Site 4 Chromatin Insulator. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1054:238-249.
28. Bangari,D.S. and S.K.Mittal. 2006. Development of nonhuman adenoviruses as vaccine vectors. *Vaccine* 24:849-862.
29. Maeda,M., K.Namikawa, I.Kobayashi, N.Ohba, Y.Takahara, C.Kadono, A.Tanaka, and H.Kiyama. 2006. Targeted gene therapy toward astrocytoma using a Cre/loxP-based adenovirus system. *Brain Res.* 1081:34-43.

30. Mathis,J.M., M.A.Stoff-Khalili, and D.T.Curiel. 2005. Oncolytic adenoviruses - selective retargeting to tumor cells. *Oncogene* 24:7775-7791.
31. Ko,D., L.Hawkins, and D.C.Yu. 2005. Development of transcriptionally regulated oncolytic adenoviruses. *Oncogene* 24:7763-7774.
32. Mizuguchi,H. and T.Hayakawa. 2004. Targeted adenovirus vectors. *Hum.Gene Ther.* 15:1034-1044.
33. McConnell,M.J. and M.J.Imperiale. 2004. Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Hum.Gene Ther.* 15:1022-1033.
34. Verma,I. 1999. Potential of adenovirus as a vector for sustained gene expression. *J.Gene Med.* 1:64-66.
35. Roth,J.A. 2006. Adenovirus p53 gene therapy. *Expert.Opin.Biol.Ther.* 6:55-61.
36. Kaplan,J.M. 2005. Adenovirus-based cancer gene therapy. *Curr.Gene Ther.* 5:595-605.
37. Kanerva,A. and A.Hemminki. 2004. Modified adenoviruses for cancer gene therapy. *Int.J.Cancer* 110:475-480.
38. Nazir,S.A. and J.P.Metcalf. 2005. Innate immune response to adenovirus. *J.Investig.Med.* 53:292-304.
39. Alba,R., A.Bosch, and M.Chillon. 2005. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther.* 12 Suppl 1:S18-S27.

40. Gentry,B.G., P.D.Boucher, and D.S.Shewach. 2006. Hydroxyurea induces bystander cytotoxicity in cocultures of herpes simplex virus thymidine kinase-expressing and nonexpressing HeLa cells incubated with ganciclovir. *Cancer Res.* 66:3845-3851.
41. Latchman,D.S. 2005. Herpes simplex virus-based vectors for the treatment of cancer and neurodegenerative disease. *Curr.Opin.Mol.Ther.* 7:415-418.
42. Argnani,R., M.Lufino, M.Manservigi, and R.Manservigi. 2005. Replication-competent herpes simplex vectors: design and applications. *Gene Ther.* 12 Suppl 1:S170-S177.
43. Senior,S.L. and R.Wade-Martins. 2005. Herpes simplex virus type 1 amplicon vectors for the infectious delivery and expression of genomic DNA loci. *Curr.Opin.Mol.Ther.* 7:337-345.
44. Glorioso,J.C. and D.J.Fink. 2004. Herpes vector-mediated gene transfer in treatment of diseases of the nervous system. *Annu.Rev.Microbiol.* 58:253-271.
45. Oehmig,A., C.Fraefel, and X.O.Breakefield. 2004. Update on herpesvirus amplicon vectors. *Mol.Ther.* 10:630-643.
46. Calderwood,M.A., R.E.White, and A.Whitehouse. 2004. Development of herpesvirus-based episomally maintained gene delivery vectors. *Expert.Opin.Biol.Ther.* 4:493-505.

47. Gentry,B.G., P.D.Boucher, and D.S.Shewach. 2006. Hydroxyurea induces bystander cytotoxicity in cocultures of herpes simplex virus thymidine kinase-expressing and nonexpressing HeLa cells incubated with ganciclovir. *Cancer Res.* 66:3845-3851.
48. Epstein,A.L. and R.Manservigi. 2004. Herpesvirus/retrovirus chimeric vectors. *Curr.Gene Ther.* 4:409-416.
49. Oehmig,A., C.Fraefel, X.O.Breakefield, and M.Ackermann. 2004. Herpes simplex virus type 1 amplicons and their hybrid virus partners, EBV, AAV, and retrovirus. *Curr.Gene Ther.* 4:385-408.
50. Nishikawa,M., Y.Takakura, and M.Hashida. 2005. Pharmacokinetics of plasmid DNA-based non-viral gene medicine. *Adv.Genet.* 53:47-68.
51. Conwell,C.C. and L.Huang. 2005. Recent advances in non-viral gene delivery. *Adv.Genet.* 53:3-18.
52. Chen,W.C. and L.Huang. 2005. Non-viral vector as vaccine carrier. *Adv.Genet.* 54:315-337.
53. Miao,C.H. 2005. A novel gene expression system: non-viral gene transfer for hemophilia as model systems. *Adv.Genet.* 54:143-177.
54. Medina-Kauwe,L.K., J.Xie, and S.Hamm-Alvarez. 2005. Intracellular trafficking of nonviral vectors. *Gene Ther.* 12:1734-1751.

55. Dean,D.A., D.D.Strong, and W.E.Zimmer. 2005. Nuclear entry of nonviral vectors. *Gene Ther.* 12:881-890.
56. Alton,E.W. 2004. Use of nonviral vectors for cystic fibrosis gene therapy. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 1:296-301.
57. Montier,T., P.Delepine, C.Pichon, C.Ferec, D.J.Porteous, and P.Midoux. 2004. Non-viral vectors in cystic fibrosis gene therapy: progress and challenges. *Trends Biotechnol.* 22:586-592.
58. Rodriguez,E.G. 2004. Nonviral DNA vectors for immunization and therapy: design and methods for their obtention. *J.Mol.Med.* 82:500-509.
59. Kostarelos,K. and A.D.Miller. 2005. Synthetic, self-assembly ABCD nanoparticles; a structural paradigm for viable synthetic non-viral vectors. *Chem.Soc.Rev.* 34:970-994.
60. Lungwitz,U., M.Breunig, T.Blunk, and A.Gopferich. 2005. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *Eur.J.Pharm.Biopharm.* 60:247-266.
61. Wang,X.P., K.Yazawa, N.S.Templeton, J.Yang, S.Liu, Z.Li, M.Li, Q.Yao, C.Chen, and F.C.Brunicardi. 2005. Intravenous delivery of liposome-mediated nonviral DNA is less toxic than intraperitoneal delivery in mice. *World J.Surg.* 29:339-343.
62. Aris,A. and A.Villaverde. 2004. Modular protein engineering for non-viral gene therapy. *Trends Biotechnol.* 22:371-377.

63. Conese,M., C.Auriche, and F.Ascenzioni. 2004. Gene therapy progress and prospects: episomally maintained self-replicating systems. *Gene Ther.* 11:1735-1741.
64. Yoo,H.S., O.Mazda, H.Y.Lee, J.C.Kim, S.M.Kwon, J.E.Lee, I.C.Kwon, H.Jeong, Y.S.Jeong, and S.Y.Jeong. 2006. In vivo gene therapy of type I diabetic mellitus using a cationic emulsion containing an Epstein Barr Virus (EBV) based plasmid vector. *J.Control Release* 112:139-144.
65. Mazda,O. 2002. Improvement of nonviral gene therapy by Epstein-Barr virus (EBV)-based plasmid vectors. *Curr.Gene Ther.* 2:379-392.
66. Cui,F.D., T.Kishida, S.Ohashi, H.Asada, K.Yasutomi, E.Satoh, T.Kubo, S.Fushiki, J.Imanishi, and O.Mazda. 2001. Highly efficient gene transfer into murine liver achieved by intravenous administration of naked Epstein-Barr virus (EBV)-based plasmid vectors. *Gene Ther.* 8:1508-1513.
67. Franken,M., A.Estabrooks, L.Cavacini, B.Sherburne, F.Wang, and D.T.Scadden. 1996. Epstein-Barr virus-driven gene therapy for EBV-related lymphomas. *Nat.Med.* 2:1379-1382.
68. He,J. and Z.Q.Zhang. 2005. [Progress of EBNA1/oriP-based plasmid applied in gene therapy]. *Sheng Wu Gong.Cheng Xue.Bao.* 21:507-510.
69. Bashaw,J.M. and J.L.Yates. 2001. Replication from oriP of Epstein-Barr virus requires exact spacing of two bound dimers of EBNA1 which bend DNA. *J.Virol.* 75:10603-10611.

70. Hsieh,D.J., S.M.Camiolo, and J.L.Yates. 1993. Constitutive binding of EBNA1 protein to the Epstein-Barr virus replication origin, oriP, with distortion of DNA structure during latent infection. *EMBO J.* 12:4933-4944.
71. He,J. and Z.Q.Zhang. 2005. [Progress of EBNA1/oriP-based plasmid applied in gene therapy]. *Sheng Wu Gong.Cheng Xue.Bao.* 21:507-510.
72. Leight,E.R. and B.Sugden. 2000. EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. *Rev.Med.Virol.* 10:83-100.
73. He,J. and Z.Q.Zhang. 2005. [Progress of EBNA1/oriP-based plasmid applied in gene therapy]. *Sheng Wu Gong.Cheng Xue.Bao.* 21:507-510.
74. Humme,S., G.Reisbach, R.Feederle, H.J.Delecluse, K.Bousset, W.Hammerschmidt, and A.Schepers. 2003. The EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) enhances B cell immortalization several thousandfold. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:10989-10994.
75. Chuang,T.C., Y.J.Lee, J.Y.Liu, Y.S.Lin, J.W.Li, V.Wang, S.L.Law, and M.C.Kao. 2003. EBNA1 may prolong G(2)/M phase and sensitize HER2/neu-overexpressing ovarian cancer cells to both topoisomerase II-targeting and paclitaxel drugs. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 307:653-659.
76. Black,J. and J.M.Vos. 2002. Establishment of an oriP/EBNA1-based episomal vector transcribing human genomic beta-globin in cultured murine fibroblasts. *Gene Ther.* 9:1447-1454.

77. Leight,E.R. and B.Sugden. 2000. EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. *Rev.Med.Virol.* 10:83-100.
78. Lee,M.A., M.E.Diamond, and J.L.Yates. 1999. Genetic evidence that EBNA-1 is needed for efficient, stable latent infection by Epstein-Barr virus. *J.Virol.* 73:2974-2982.
79. Kim,A.L., M.Maher, J.B.Hayman, J.Ozer, D.Zerby, J.L.Yates, and P.M.Lieberman. 1997. An imperfect correlation between DNA replication activity of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) and binding to the nuclear import receptor, Rch1/importin alpha. *Virology* 239:340-351.
80. Yates,J.L., S.M.Camiolo, S.Ali, and A.Ying. 1996. Comparison of the EBNA1 proteins of Epstein-Barr virus and herpesvirus papio in sequence and function. *Virology* 222:1-13.
81. Shah,W.A., R.F.Ambinder, G.S.Hayward, and S.D.Hayward. 1992. Binding of EBNA-1 to DNA creates a protease-resistant domain that encompasses the DNA recognition and dimerization functions. *J.Virol.* 66:3355-3362.
82. Ambinder,R.F., M.A.Mullen, Y.N.Chang, G.S.Hayward, and S.D.Hayward. 1991. Functional domains of Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1. *J.Virol.* 65:1466-1478.
83. Leight,E.R. and B.Sugden. 2000. EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. *Rev.Med.Virol.* 10:83-100.

84. Wysokenski,D.A. and J.L.Yates. 1989. Multiple EBNA1-binding sites are required to form an EBNA1-dependent enhancer and to activate a minimal replicative origin within oriP of Epstein-Barr virus. *J.Virol.* 63:2657-2666.
85. Ossevoort,M., B.M.Visser, D.J.van den Wollenberg, E.I.van der Voort, R.Offringa, C.J.Melief, R.E.Toes, and R.C.Hoebe. 2003. Creation of immune 'stealth' genes for gene therapy through fusion with the Gly-Ala repeat of EBNA-1. *Gene Ther.* 10:2020-2028.
86. Heng,H.H., S.Goetze, C.J.Ye, G.Liu, J.B.Stevens, S.W.Bremer, S.M.Wykes, J.Bode, and S.A.Krawetz. 2004. Chromatin loops are selectively anchored using scaffold/matrix-attachment regions. *J.Cell Sci.* 117:999-1008.
87. Sumer,H., R.Saffery, N.Wong, J.M.Craig, and K.H.Choo. 2004. Effects of scaffold/matrix alteration on centromeric function and gene expression. *J.Biol.Chem.* 279:37631-37639.
88. Liebich,I., J.Bode, I.Reuter, and E.Wingender. 2002. Evaluation of sequence motifs found in scaffold/matrix-attached regions (S/MARs). *Nucleic Acids Res.* 30:3433-3442.
89. Bode,J., T.Schlake, M.Rios-Ramirez, C.Mielke, M.Stengert, V.Kay, and D.Klehr-Wirth. 1995. Scaffold/matrix-attached regions: structural properties creating transcriptionally active loci. *Int.Rev.Cytol.* 162A:389-454.

90. Gohring,F. and F.O.Fackelmayer. 1997. The scaffold/matrix attachment region binding protein hnRNP-U (SAF-A) is directly bound to chromosomal DNA in vivo: a chemical cross-linking study. *Biochemistry* 36:8276-8283.
91. Gohring,F. and F.O.Fackelmayer. 1997. The scaffold/matrix attachment region binding protein hnRNP-U (SAF-A) is directly bound to chromosomal DNA in vivo: a chemical cross-linking study. *Biochemistry* 36:8276-8283.
92. Renz,A. and F.O.Fackelmayer. 1996. Purification and molecular cloning of the scaffold attachment factor B (SAF-B), a novel human nuclear protein that specifically binds to S/MAR-DNA. *Nucleic Acids Res.* 24:843-849.
93. Sumer,H., R.Saffery, N.Wong, J.M.Craig, and K.H.Choo. 2004. Effects of scaffold/matrix alteration on centromeric function and gene expression. *J.Biol.Chem.* 279:37631-37639.
94. Bode,J., S.Winkelmann, S.Gotze, S.Spiker, K.Tsutsui, C.Bi, A K P, and C.Benham. 2006. Correlations between scaffold/matrix attachment region (S/MAR) binding activity and DNA duplex destabilization energy. *J.Mol.Biol.* 358:597-613.
95. Bode,J., C.Benham, A.Knopp, and C.Mielke. 2000. Transcriptional augmentation: modulation of gene expression by scaffold/matrix-attached regions (S/MAR elements). *Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr.* 10:73-90.
96. Rudd,S., M.Frisch, K.Grote, B.C.Meyers, K.Mayer, and T.Werner. 2004. Genome-wide in silico mapping of scaffold/matrix attachment regions in

- Arabidopsis suggests correlation of intragenic scaffold/matrix attachment regions with gene expression. *Plant Physiol* 135:715-722.
97. Sumer,H., J.M.Craig, M.Sibson, and K.H.Choo. 2003. A rapid method of genomic array analysis of scaffold/matrix attachment regions (S/MARs) identifies a 2.5-Mb region of enhanced scaffold/matrix attachment at a human neocentromere. *Genome Res.* 13:1737-1743.
 98. Liebich,I., J.Bode, M.Frisch, and E.Wingender. 2002. S/MARt DB: a database on scaffold/matrix attached regions. *Nucleic Acids Res.* 30:372-374.
 99. Benham,C., T.Kohwi-Shigematsu, and J.Bode. 1997. Stress-induced duplex DNA destabilization in scaffold/matrix attachment regions. *J.Mol.Biol.* 274:181-196.
 100. Dang,Q., J.Auten, and I.Plavec. 2000. Human beta interferon scaffold attachment region inhibits de novo methylation and confers long-term, copy number-dependent expression to a retroviral vector. *J.Virol.* 74:2671-2678.
 101. Bode,J. and K.Maass. 1988. Chromatin domain surrounding the human interferon-beta gene as defined by scaffold-attached regions. *Biochemistry* 27:4706-4711.
 102. Klehr,D., K.Maass, and J.Bode. 1991. Scaffold-attached regions from the human interferon beta domain can be used to enhance the stable expression of genes under the control of various promoters. *Biochemistry* 30:1264-1270.

103. Wang,H. and C.J.Benham. 2006. Promoter Prediction and Annotation of Microbial Genomes Based on DNA Sequence and Structural Responses to Superhelical Stress. *BMC.Bioinformatics*. 7:248.
104. Benham,C.J. and C.Bi. 2004. The analysis of stress-induced duplex destabilization in long genomic DNA sequences. *J.Comput.Biol*. 11:519-543.
105. Bi,C. and C.J.Benham. 2004. WebSIDD: server for predicting stress-induced duplex destabilized (SIDD) sites in superhelical DNA. *Bioinformatics*. 20:1477-1479.
106. Wang,H., M.Noordewier, and C.J.Benham. 2004. Stress-induced DNA duplex destabilization (SIDD) in the E. coli genome: SIDD sites are closely associated with promoters. *Genome Res*. 14:1575-1584.
107. Benham,C.J. 2001. Stress-induced DNA duplex destabilization in transcriptional initiation. *Pac.Symp.Biocomput*.103-114.
108. Benham,C.J. and C.Bi. 2004. The analysis of stress-induced duplex destabilization in long genomic DNA sequences. *J.Comput.Biol*. 11:519-543.
109. Wang,L., C.M.Lin, S.Brooks, D.Cimbora, M.Groudine, and M.I.Aladjem. 2004. The human beta-globin replication initiation region consists of two modular independent replicators. *Mol.Cell Biol*. 24:3373-3386.

110. Aladjem,M.I., L.W.Rodewald, J.L.Kolman, and G.M.Wahl. 1998. Genetic dissection of a mammalian replicator in the human beta-globin locus. *Science* 281:1005-1009.
111. Boulikas,T. 1996. Common structural features of replication origins in all life forms. *J.Cell Biochem.* 60:297-316.
112. Bi,C. and C.J.Benham. 2004. WebSIDD: server for predicting stress-induced duplex destabilized (SIDD) sites in superhelical DNA. *Bioinformatics.* 20:1477-1479.
113. Mackey,D. and B.Sugden. 1999. Applications of oriP plasmids and their mode of replication. *Methods Enzymol.* 306:308-328.
114. Norio,P., C.L.Schildkraut, and J.L.Yates. 2000. Initiation of DNA replication within oriP is dispensable for stable replication of the latent Epstein-Barr virus chromosome after infection of established cell lines. *J.Virol.* 74:8563-8574.
115. Schepers,A., M.Ritzi, K.Bousset, E.Kremmer, J.L.Yates, J.Harwood, J.F.Diffley, and W.Hammerschmidt. 2001. Human origin recognition complex binds to the region of the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *EMBO J.* 20:4588-4602.
116. Sugden,B. and N.Warren. 1989. A promoter of Epstein-Barr virus that can function during latent infection can be transactivated by EBNA-1, a viral protein required for viral DNA replication during latent infection. *J.Virol.* 63:2644-2649.

117. Jenke,A.C., I.M.Stehle, F.Herrmann, T.Eisenberger, A.Baiker, J.Bode, F.O.Fackelmayer, and H.J.Lipps. 2004. Nuclear scaffold/matrix attached region modules linked to a transcription unit are sufficient for replication and maintenance of a mammalian episome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:11322-11327.
118. Dang,Q., J.Auten, and I.Plavec. 2000. Human beta interferon scaffold attachment region inhibits de novo methylation and confers long-term, copy number-dependent expression to a retroviral vector. *J.Virol.* 74:2671-2678.
119. Baiker,A., C.Maercker, C.Piechaczek, S.B.Schmidt, J.Bode, C.Benham, and H.J.Lipps. 2000. Mitotic stability of an episomal vector containing a human scaffold/matrix-attached region is provided by association with nuclear matrix. *Nat.Cell Biol.* 2:182-184.
120. Benham,C., T.Kohwi-Shigematsu, and J.Bode. 1997. Stress-induced duplex DNA destabilization in scaffold/matrix attachment regions. *J.Mol.Biol.* 274:181-196.
121. Bode,J., S.Winkelmann, S.Gotze, S.Spiker, K.Tsutsui, C.Bi, A K P, and C.Benham. 2006. Correlations between scaffold/matrix attachment region (S/MAR) binding activity and DNA duplex destabilization energy. *J.Mol.Biol.* 358:597-613.
122. Benham,C., T.Kohwi-Shigematsu, and J.Bode. 1997. Stress-induced duplex DNA destabilization in scaffold/matrix attachment regions. *J.Mol.Biol.* 274:181-196.

123. Benham,C.J. 1996. Duplex destabilization in superhelical DNA is predicted to occur at specific transcriptional regulatory regions. *J.Mol.Biol.* 255:425-434.
124. Wang,H., M.Noordewier, and C.J.Benham. 2004. Stress-induced DNA duplex destabilization (SIDD) in the E. coli genome: SIDD sites are closely associated with promoters. *Genome Res.* 14:1575-1584.
125. Bi,C. and C.J.Benham. 2004. WebSIDD: server for predicting stress-induced duplex destabilized (SIDD) sites in superhelical DNA. *Bioinformatics.* 20:1477-1479.
126. Benham,C.J. 1981. Theoretical analysis of competitive conformational transitions in torsionally stressed DNA. *J.Mol.Biol.* 150:43-68.
127. Polonskaya,Z., C.J.Benham, and J.Hearing. 2004. Role for a region of helically unstable DNA within the Epstein-Barr virus latent cycle origin of DNA replication oriP in origin function. *Virology* 328:282-291.
128. Jenke,B.H., C.P.Fetzer, I.M.Stehle, F.Jonsson, F.O.Fackelmayer, H.Conradt, J.Bode, and H.J.Lipps. 2002. An episomally replicating vector binds to the nuclear matrix protein SAF-A in vivo. *EMBO Rep.* 3:349-354.
129. Schaarschmidt,D., J.Baltin, I.M.Stehle, H.J.Lipps, and R.Knippers. 2004. An episomal mammalian replicon: sequence-independent binding of the origin recognition complex. *EMBO J.* 23:191-201.

Κεφάλαιο 2

Εισαγωγή

1.1 Κλινικές δοκιμές στην γονιδιακή θεραπεία

Το επιφαινόμενο δυναμικό της γονιδιακής θεραπείας για την ίαση ασθενειών οι οποίες δεν μπορούν να αντιμετωπιστούν με τη συμβατική ιατρική, έχει προσελκύσει πολύ μεγάλο ενδιαφέρον στον ακαδημαϊκό χώρο καθώς και μεγάλες επενδύσεις. Εντούτοις οι μεγάλες αρχικές προσδοκίες, καθώς και κάποια γρήγορα βήματα στον τομέα της γονιδιακής θεραπείας οδήγησαν σε απογοητεύσεις που επισκίασαν την πραγματική πρόοδο που σημειώθηκε σε πολλές περιπτώσεις.

Στις αρχές της δεκαετίας του 90 έλαβαν χώρα οι πρώτες κλινικές δοκιμές γονιδιακής θεραπείας για την ασθένεια της βαριάς μикτής ανοσοανεπάρκειας που οφείλεται στην έλλειψη του ενζύμου απαμινάση της αδενοσίνης (SCID- ADA). Στις πρώτες μελέτες που είχαν γίνει, η απόδοση της γονιδιακής θεραπείας ήταν φτωχή αλλά μέσα σε μία δεκαετία τόσο η τεχνολογία της γονιδιακής μεταφοράς όσο και τα πρωτόκολλα του χειρισμού των κυττάρων οδήγησαν στην παραγωγή πραγματικού κλινικού οφέλους για τον ασθενή. Έτσι το 2000 ανακοινώθηκε η πρώτη επιτυχής κλινική μελέτη από τους Fischer A. και Cavazzana-Calvo στο Παρίσι σε εννέα από τα 11 παιδιά που έπασχαν από SCID-X1¹⁴³. Σήμερα οι 4 κλινικές δοκιμές που έχουν γίνει, βασίζονται στην χρήση ρετροϊών για την μεταφορά του φυσιολογικού γονιδίου και έχουν δείξει αναμφισβήτητο κλινικό όφελος τόσο για την X-συνδεδεμένη μορφή, όσο και για την ADA μορφή της βαριάς μикτής ανοσοανεπάρκειας (SCID)¹⁴⁴⁻¹⁴⁷.

Σ'όλες αυτές τις κλινικές μελέτες οι φορείς που χρησιμοποιήθηκαν βασίστηκαν στους gamma- ρετροϊούς και στους ογκο- ρετροϊούς του επίμυος όπως ο MMLV (Moloney murine leukemia virus). Οι ρετροϊικοί φορείς ενσωματώνονται στο γονιδίωμα του κυττάρου στόχου. Η ιδιότητα αυτή είναι ιδιαίτερα επιθυμητή στην περίπτωση των ασθενειών όπου το κύτταρο στόχος είναι το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο. Η ικανότητα αυτό- ανανέωσης και επαναπληθυσμοποίησης των κυττάρων αυτών οδηγεί στην δια βίου αποκατάσταση του φυσιολογικού φαινοτύπου του ασθενούς που έχει λάβει

διαμολυσμένα αργέγονα αιμοποιητικά κύτταρα από ρετροϊούς που μεταφέρουν το φυσιολογικό γονίδιο¹⁴⁸.

1.2 Ρετροϊοί - γενικά

Οι ρετροϊοί ανήκουν στην οικογένεια των RNA ιών και ονομάστηκαν έτσι από τον μοναδικό τρόπο με τον οποίον το γονιδίωμα τους αναπαράγεται μέσα στο κύτταρο-ξενιστή. Το γενετικό υλικό των ρετροϊών αποτελείται από δύο πανομοιότυπα αντίγραφα ενός μορίου RNA μήκους 7-11 kb που περιέχει τα γονίδια gag, pol και env. Το γονίδιο gag κωδικοποιεί δομικές πρωτεΐνες της πυρηνικής κάψας του ιού εξωτερικά της οποίας βρίσκεται ο φάκελος (envelope) προερχόμενος από την κυτταροπλασματική μεμβράνη του κυττάρου- ξενιστή. Ο φάκελος του ιού περιέχει γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες κωδικοποιούνται από το γονίδιο env και χρησιμεύουν για την προσκόλληση του ιού στα κύτταρα –στόχους αλληλεπιδρώντας με ειδικούς υποδοχείς. Το γονίδιο pol κωδικοποιεί πρωτεΐνες που διεκπεραιώνουν την αντίστροφη μεταγραφή του γονιδιώματος του ιού (reverse transcriptase) καθώς επίσης και την ενσωμάτωση αυτού (integrase) στο γονιδίωμα του κυττάρου- στόχου (Εικόνα 1) . Το ενσωματωμένο γονιδίωμα του ιού ονομάζεται προϊός και οριοθετείται από δύο όμοιες αλληλουχίες που ονομάζονται LTR (long terminal repeats) . Οι αλληλουχίες αυτές δημιουργούνται κατά την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής. Το κάθε LTR διαιρείται σε τρεις περιοχές, U3, R, U5. Το τμήμα U3 περιέχει αλληλουχίες υποκινητή (promoter) και ενισχυτή (enhancer) οι οποίες είναι ενεργές στο 5' LTR, ενώ στο όριο μεταξύ R και U5 του 3' LTR βρίσκεται η θέση πολυαδενυλίωσης¹⁴⁹⁻¹⁵¹.

Ο κύκλος ζωής του ρετροϊού ξεκινά με την προσκόλληση αυτού στο κύτταρο διά μέσου της αλληλεπίδρασης των γλυκοπρωτεϊνών με ειδικούς υποδοχείς του κυττάρου. Ακολουθούν μια σειρά από γεγονότα που οδηγούν τελικά στην σύντηξη του φακέλου του ιού με τη μεμβράνη του κυττάρου. Μετά την είσοδο του ρετροϊικού πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, το ιικό RNA μέσω της αντίστροφης μεταγραφής μετατρέπεται σε DNA διπλής έλικας όπου ενσωματώνεται με τη βοήθεια του ενζύμου ιντεγκράσης. Έτσι σε κάθε κυτταρικό κύκλο διαιρείται ως αναπόσπαστο τμήμα του γονιδιώματος του

κυττάρου και υπό την οδήγηση του υποκινητή του 5' LTR μεταγράφεται σε RNA, η μετάφραση του οποίου οδηγεί σε νέες ιϊκές πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές σχηματίζουν μαζί με το ιϊκό RNA νέα ιϊκά σωματίδια ικανά να μολύνουν και άλλα κύτταρα (εικόνα 2).

Εικόνα 1

Το γονιδίωμα ενός ρετροϊού αποτελείται από δύο πανομοιότυπα μόρια RNA. Το καθένα από αυτά έχει στα άκρα του δύο όμοιες αλληλουχίες. Η ύπαρξη των θέσεων SA (splice acceptor) και SD (splice donor) οδηγεί στην παραγωγή δύο μεταγραφημάτων, ένα για τις πρωτεΐνες gag και pol και ένα για την πρωτεΐνη env.

Εικόνα 2

Βασικά στάδια του κύκλου ζωής ενός ρετροϊού κατά τη μόλυνση του κυττάρου - στόχου.

1.3 Ρετροϊκοί φορείς

Οι ρετροϊκοί φορείς αναπτύχθηκαν μέσα από την τροποποίηση των ρετροϊών έτσι ώστε να διατηρούν την ικανότητα να διαμολύνουν τα κύτταρα και να μεταφέρουν μέσα σε αυτά γενετικό υλικό (εισαγωγή και ενσωμάτωση του ιϊκού γενετικού υλικού στο γονιδίωμα του κυττάρου- στόχου), χωρίς όμως να έχουν την ικανότητα να αναπαράγονται (δημιουργία νέων ιϊκών σωματιδίων). Αυτό επιτυγχάνεται κυρίως με την αφαίρεση γονιδίων του ιού που κωδικοποιούν τόσο δομικές πρωτεΐνες(ιϊκή κάψα) όσο και ένζυμα για την αναπαραγωγή του ιού. Διατηρούνται μόνο *in cis* οι αλληλουχίες LTR, ψ (psi, packaging signal), ppt (polypurine tract), pbs(primer binding sites), SD(splice donor) και SA (splice acceptor). Οι απαραίτητες ιϊκές πρωτεΐνες για την παραγωγή των σωματιδίων του ρετροϊκού φορέα παρέχονται *in trans* από σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές που έχουν δημιουργηθεί για το σκοπό αυτό. Στην εικόνα 3 απεικονίζεται σχηματικά η αρχή παραγωγής των ρετροϊκών φορέων. Το παραγωγό κύτταρο έχει σταθερά διαμολυνθεί από ένα πλασμίδιο που περιέχει όλα τα απαραίτητα γονίδια που κωδικοποιούν τις δομικές και λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού. Στη συνέχεια διαμολύνεται από το πλασμίδιο του φορέα που περιέχει το θεραπευτικό γονίδιο και τις απαραίτητες *in cis* αλληλουχίες. Το γονιδίωμα του φορέα που περιέχει την αλληλουχία ψ και το θεραπευτικό γονίδιο αποτελεί το γενετικό υλικό των σωματιδίων του ρετροϊκού φορέα που προκύπτουν από τη συνάθροιση αυτού με τις διάφορες δομικές πρωτεΐνες που παράγονται *in trans* από την κυτταρική σειρά – παραγωγός.

Εικόνα 3

Αρχή της παραγωγής των ρετροϊκών φορέων.

Για να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα παραγωγής ιικών σωματιδίων με ικανότητα αναπαραγωγής (Replication competent retrovirus – RCR) λόγω ανασυνδυασμού στην κυτταρική σειρά- παραγωγός, τα γονίδια που κωδικοποιούν τις ιϊκές πρωτεΐνες χωρίστηκαν σε δύο ή σε τρία πλασμίδια στις επόμενες για νέες κυτταρικών σειρών- παραγωγών.

1.4 Μηχανισμός της ενσωμάτωσης των ογκορετροϊκών φορέων

Η κατανόηση του φαινομένου της ενσωμάτωσης των ρετροϊών στο γονιδίωμα του κυττάρου- στόχου είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των ογκορετροϊκών φορέων στην γονιδιακή θεραπεία. Στην εικόνα 4 απεικονίζεται η ενσωμάτωση του ογκορετροϊκού φορέα σε μοριακό επίπεδο. Μετά τη σύνθεση του ιϊκού DNA, και ενώ όταν αυτό βρίσκεται ακόμα στο κυτταρόπλασμα, το ένζυμο ιντεγκράση απομακρύνει τα δύο τελευταία νουκλεοτίδια από τα 3' άκρα της διπλής έλικας αφήνοντας σε κάθε άκρο μια

ομάδα – OH^{152;153}. Έπειτα το ιϊκό νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο εισέρχεται στον πυρήνα κατά τη διάρκεια της μίτωσης (διάλυση της πυρηνικής μεμβράνης) όπου οι ομάδες – OH επιτίθενται στους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς της θέσης του DNA του γονιδιώματος του κυττάρου- στόχου σε μια αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο ιντεγκράση. Κατά την ενσωμάτωση, 4 έως 6 νουκλεοτίδια της θέσεως- στόχου διπλασιάζονται και περιβάλλουν δεξιά και αριστερά τα άκρα του ενσωματωμένου προ-ϊού¹⁵⁴⁻¹⁵⁷

1.5 Ανάλυση των θέσεων ενσωμάτωσης (integration site analysis)

Αρχικά η ανάλυση των θέσεων ενσωμάτωσης των ιών αναπτύχθηκε σαν εργαλείο για την μελέτη του μοντέλου της αιμοποίησης, σύμφωνα με το οποίο ένα αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο (HSC) μέσω της ικανότητας του να αυτο- ανανεώνεται και να διαφοροποιείται δίνει γένεση στα ώριμα κύτταρα όλων των αιμοποιητικών σειρών. Η θέση ενσωμάτωσης ενός ιϊκού φορέα σε ένα κύτταρο CD 34⁺ είναι μοναδική για το συγκεκριμένο κύτταρο και η παρακολούθηση της πορείας του συγκεκριμένου κλώνου μέσα στα διάφορα στάδια της διαφοροποίησης του μπορεί να γίνει με την ανίχνευση της θέσεις ενσωμάτωσης- δείκτη. Το γεγονός αυτό επέτρεψε την *in vivo* παρακολούθηση της τύχης των HSCs που σημαδεύτηκαν *ex vivo*. Η χρήση έπειτα των ρετροϊκών φορέων

στις κλινικές μελέτες ως οχημάτων γονιδιακής μεταφοράς και η ανεξέλεγκτη ενσωμάτωσή τους στο γονιδίωμα ανέδειξε την ανάλυση των θέσεων ενσωμάτωσης ως ένα απαραίτητο εργαλείο για την εκτίμηση της ασφάλειας της χρήσης των ρετροϊών φορέων. Η τελευταία μάλιστα αναφορά της λευχαιμιογένεσης σε ασθενείς στην κλινική μελέτη για την SCID-X1 που αποδόθηκε εν μέρει στην ενσωμάτωση του ρετροϊού έδωσε μεγάλη έμφαση στην έρευνα για την ανάπτυξη μεθόδων ευαίσθητων και αξιόπιστων για την ανάλυση των θέσεων ενσωμάτωσης.

1.6 Μεταλλαξιγένεση μέσω ενσωμάτωσης

Το κύριο μειονέκτημα χρήσης των ρετροϊών είναι το φαινόμενο της μεταλλαξιγένεσης μέσω ενσωμάτωσης λόγω της τυχαιότητας που υπάρχει στο φαινόμενο της ενσωμάτωσης του ρετροϊικού φορέα σε διάφορες θέσεις στο γονιδίωμα του κυττάρου- ξενιστή. Κακοήθης εξαλλαγή του κυττάρου μπορεί θεωρητικά να προκληθεί από την ενσωμάτωση του ιού κοντά ή μέσα στην περιοχή των πρωτο- ογκογονιδίων αυξάνοντας κατά συνέπεια τη μεταγραφή τους, ή από την απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων λόγω διαταραχής της ρύθμισής τους από την ενσωμάτωση του ιού¹⁵⁸.

Η εντατική έρευνα επάνω στη μελέτη ενσωμάτωσης των ρετροϊών έδειξε ότι ευνοούνται περισσότερο περιοχές ενεργού μεταγραφής καθώς επίσης και ότι διαφορετικά είδη της οικογένειας των ρετροϊών παρουσιάζουν διαφορετική προτίμηση ως προς την ενσωμάτωσή τους. Ένα μεγάλο μέρος της έρευνας αφορά στην μελέτη των θέσεων ενσωμάτωσης των ρετροϊικών φορέων στο γονιδίωμα του κυττάρου και πιο συγκεκριμένα την κατανόηση των διαφορετικών προφίλ ενσωμάτωσης που παρουσιάζει ο κάθε φορέας. Έχει βρεθεί ότι οι περισσότερες αλληλουχίες του DNA μπορούν να αποτελέσουν θέσεις ενσωμάτωσης ρετροϊικών φορέων τόσο από *in vitro* όσο και από *in vivo* μελέτες και ότι η επιλογή των θέσεων αυτών δεν εξαρτάται κυρίως από την πρωτογενή αλληλουχία του DNA^{159;160}. Με την ολοκλήρωση του διάβασματος του γενετικού κώδικα πολλών οργανισμών δόθηκε η δυνατότητα της μελέτης θέσεων ενσωμάτωσης σε μεγάλη κλίμακα και η στατιστική ανάλυση αυτών ως προς την

προτίμηση συγκεκριμένων περιοχών. Σε ανθρώπινα κύτταρα HeLa, όπου μελετήθηκαν 903 θέσεις ενσωμάτωσης του ογκορετροϊού MLV σε σύγκριση με δεδομένα από την ανάλυση θέσεων ενσωμάτωσης για τον ρετροϊό HIV, διαπιστώθηκε ότι ενώ γενικά η ενσωμάτωση αφορούσε θέσεις διάσπαρτες σε όλο το γονιδίωμα το 20% αυτών βρίσκονταν κοντά στο 5' άκρο μεταγραφικών μονάδων σε αντίθεση με τον HIV όπου οι θέσεις ενσωμάτωσης παρουσιάζονται πιο συγκεντρωμένες και βρίσκονται κυρίως μέσα σε γονίδια μεταγραφικώς ενεργά¹⁶¹⁻¹⁶³. Επίσης ο MLV δείχνει σαφή προτίμηση ενσωμάτωσης στα νησίδια CpG. Ανάλογα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν και σε μεταγενέστερες εργασίες ανάλυσης του προφίλ ενσωμάτωσης του ογκορετροϊού MLV σε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα^{164,165}. Έτσι φορείς βασιζόμενοι στον ιό MMLV ενσωματώνονται κύριως πλησίον των θέσεων έναρξης της μεταγραφής, ενώ φορείς που βασίζονται στον HIV-1 ενσωματώνονται κατά προτίμηση εντός μεταγραφικών μονάδων¹⁶⁶⁻¹⁷⁰. Αντίθετα ο ιός ASLV (Avian sarcoma leukosis virus), ο οποίος ακόμα δεν έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως φορέας γονιδιακής μεταφοράς έχει βρεθεί ότι δείχνει μόνο μια ελαφρά προτίμηση για ενσωμάτωση μέσα ή κοντά σε γονίδια¹⁷¹. Επίσης ο ανθρώπινος FV (foamy vector), ένας άλλος φορέας ο οποίος βρίσκεται υπό ανάπτυξη για εφαρμογές γονιδιακής θεραπείας, έχει επίσης αναφερθεί ότι δεν παρουσιάζει προτίμηση για ενσωμάτωση μέσα σε μεταγραφικές μονάδες¹⁷². Τα δεδομένα αυτά είναι σημαντικά για την εκτίμηση των πιθανών κινδύνων από την χρήση των ρετροϊών ως φορέων στην γονιδιακή θεραπεία και για την ανάπτυξη νέων φορέων με όσο το δυνατόν πιο ελαχιστοποιημένη την παρενέργεια της μεταλλαξιγένεσης μέσω ενσωμάτωσης.

Στους δύο ασθενείς οι οποίοι ανέπτυξαν λευχαιμία μετά από την γονιδιακή θεραπεία για την ασθένεια X-SCID βρέθηκε ότι στα νεοπλασματικά κύτταρα ο φορέας είχε ενσωματωθεί κοντά στον εκκινητή LMO-2, είτε μέσα στο γονίδιο, είτε ακριβώς πριν από αυτό¹⁷³. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί ένα μόριο γέφυρα (Rhombotin-2) που συμμετέχει στον σχηματισμό συμπλόκων μεταξύ μεταγραφικών παραγόντων και άλλων πρωτεϊνών που τροποποιούν το DNA και την χρωματίνη¹⁷⁴. Είναι ένα γνωστό πρωτο-ογκογονίδιο που έχει βρεθεί ενεργοποιημένο μέσω μετάθεσης (translocation) σε ασθενείς με T λεμφοκυτταρική λευχαιμία¹⁷⁵. Θεωρητικά η ενσωμάτωση του ογκορετροϊικού φορέα μπορεί να αλλάξει την έκφραση του γονιδίου LMO-2 με τους εξής μηχανισμούς:

A) ο εκκινητής που βρίσκεται στην περιοχή LTR του προ-ιού μπορεί να παράγει μετάγραφα τα οποία προχωρούν πέρα από την αλληλουχία του προ-ιού γιατί οι θέσεις πολυαδενυλίωσης που θα σηματοδοτούσαν το τέλος της μεταγραφής μέσα στην περιοχή R του LTR είναι ασθενείς και έτσι μπορούν να παραχθούν χιμαιρικά μετάγραφα από την αλληλουχία του προ-ιού και την αλληλουχία του παρευρισκόμενου γονιδίου (LMO-2).

B) Η περιοχή LTR του προ-ιού περιέχει ενισχυτές που μπορούν να δράσουν σε κοντινούς εκκινητές και να οδηγήσουν σε αυξημένη έκφραση του γονιδίου LMO-2. Ο μηχανισμός αυτός είναι υπεύθυνος για την αύξηση της έκφρασης του LMO-2 στον έναν από τους δύο ασθενείς.

Γ) Μείωση της έκφρασης του γονιδίου μπορεί να παρατηρηθεί από την ενσωμάτωση του προ-ιού μέσα στην αλληλουχία του γονιδίου είτε από την πρόωμη πολυαδενυλίωση (ύπαρξη θέσεως πολυαδενυλίωσης στο ιικό γονιδίωμα) είτε από την παραγωγή ελαττωματικών πρωτεϊνών λόγω ύπαρξης θέσεων εναλλακτικού splicing.

Μέχρι πρόσφατα η ενσωμάτωση των ογκορετροϊκών φορέων εθεωρείτο τυχαία με την πιθανότητα της ενεργοποίησης κάποιου γονιδίου λόγω ενσωμάτωσης να κυμαίνεται μεταξύ 1 σε 10^5 και 1 σε 10^7 ενσωματώσεις¹⁷⁶. Ανάγοντας τον παραπάνω υπολογισμό στην περίπτωση των ασθενών στην κλινική μελέτη για την γονιδιακή θεραπεία της ασθένειας X-SCID κάθε ασθενής θα έπρεπε να έχει 1 με 10 LMO-2 στοχευμένα κύτταρα δεδομένου ότι τα CD 34+ κύτταρα που μεταφέρονται είναι 10^6 ¹⁷⁷. Εντούτοις νέα δεδομένα δείχνουν ότι η ενσωμάτωση των ρετροϊών δεν είναι τυχαία¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Συγκεκριμένα 20-25% των ενσωματώσεων των ογκορετροϊκών φορέων συμβαίνει σε μια περιοχή 10 kb γύρω από τους εκκινητές¹⁸¹. Επίσης υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν την αύξηση της δυνατότητας εγκατάστασης και επιβίωσης των κυττάρων που φέρουν θέσεις ενσωμάτωσης κοντά ή μέσα σε γονίδια τα οποία ενέχονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αυτο-ανανέωση ή αντι-αποπτωτική λειτουργία¹⁸². Σε μοντέλα που έχουν αναπτυχθεί στα ζώα έχειδειχθεί ότι η ενσωμάτωση των ογκορετροϊκών φορέων κοντά ή μέσα σε γονίδια μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να οδηγήσει στην υπεροχή των κλώνων που περιέχουν αυτήν την ενσωμάτωση. Οι παράγοντες που φαίνεται ότι παίζουν ρόλο είναι ο τύπος του φορέα που χρησιμοποιείται, τα ρυθμιστικά στοιχεία που υπάρχουν στο γονιδίωμα του φορέα, το επίπεδο της έκφρασης του γονιδίου του κυττάρου που επηρεάζεται από την ενσωμάτωση του φορέα

και τέλος ο αριθμός και ο τύπος των κυττάρων στόχων της γονιδιακής θεραπείας. Στην περίπτωση αυτή κύτταρα CD 34+ ή αρχέγονα κύτταρα του λεμφικού σκέλους που φέρουν ενσωμάτωση φορέα στο γονίδιο LMO-2 μπορούν να αποκτήσουν αυξημένο δυναμικό πολλαπλασιασμού και εγκατάστασης, ιδιότητες που αυξάνουν την επιρρέπεια των κυττάρων προς την νεοπλασία με την πιθανή δράση και άλλων ογκογόνων μεταλλάξεων.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύγκριση μεταξύ των δύο κλινικών δοκιμών, της Γαλλίας και της Αγγλίας για την γονιδιακή θεραπεία της ανοσοανεπάρκειας X-SCID. Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω στη γαλλική κλινική δοκιμή τρεις στους δέκα ασθενείς τους οποίους υπήρξε επιτυχής αποκατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος ανέπτυξαν λεμφουπερπλασία ενώ στην κλινική δοκιμή της Αγγλίας κανένας από τους έξι ασθενείς δεν παρουσίασε νεοπλασία. Αν και το follow-up της αγγλικής κλινικής δοκιμής είναι μικρότερο από αυτήν της γαλλικής, δεδομένου ότι οι νεοπλασίες παρουσιάστηκαν 34 μήνες μετά την θεραπεία, εντούτοις είναι πιθανόν η διαφορά αυτή να οφείλεται τόσο στις συνθήκες διαμόλυνσης όσο και στους φορείς που χρησιμοποιήθηκαν. Και στις δύο κλινικές δοκιμές ο στόχος των διαμολυσμένων κυττάρων ήταν τα CD 34+ κύτταρα τα οποία είχαν υποστεί προδιέγερση πριν από την έκθεση τους σε τρεις δόσεις ιικών σωματιδίων. Στην γαλλική κλινική μελέτη το μέσο διαμόλυνσης περιείχε υψηλότερη συγκέντρωση της ιντερλευκίνης 3 (60 ng/ml αντί για 20 ng/ml της αγγλικής) ενώ επίσης περιείχε και θειική πρωταμίνη. Έχει διατυπωθεί ότι οι συνθήκες αυτές συντελούν στο υψηλότερο ποσοστό διαμόλυνσης των λεμφικών προγονικών κυττάρων¹⁸³. Μια άλλη σημαντική διαφορά όσον αφορά τους φορείς ήταν ότι στην γαλλική μελέτη τα ειδικά σωματίδια έφεραν στον φάκελό τους την αμφοτροφική (amphotropic) πρωτεΐνη¹⁸⁴ ενώ στην αγγλική κλινική μελέτη το pseudotyping είχε γίνει με την πρωτεΐνη του φακέλου του ιού GALV (gibbon ape leukemia virus)¹⁸⁵. Εκτός από τον φάκελο οι φορείς είχαν ακριβώς την ίδια δομή στην κατασκευή τους εκτός από μια σημειακή μετάλλαξη στο σημείο πρόσδεσης του εκκινητή (primer binding site) που ονομάζεται B2 και έχει συσχετισθεί με την αναστολή της αποσιώπησης του φορέα στα ποντίκια^{186;187}. Μετά την γονιδιακή θεραπεία τα T λεμφοκύτταρα των ασθενών της γαλλικής κλινικής μελέτης άρχισαν να αυξάνονται και έφτασαν σε ένα πλατό τέσσερις με έξι μήνες μετά ενώ στους δύο ασθενείς οι οποίοι ανέπτυξαν τη λευχαιμία το πλατό διαπιστώθηκε στους τρεις με

τέσσερις μήνες¹⁸⁸. Αντίθετα στην αγγλική κλινική μελέτη τα επίπεδα των λεμφοκυττάρων έδειχναν ανοδικές τάσεις ακόμα και δέκα μήνες μετά την θεραπεία. Το γεγονός αυτό μπορεί ίσως να υποδηλώνει ότι η γρήγορη ανάπτυξη των λεμφοκυττάρων στη γαλλική μελέτη αποτελεί έναν παράγοντα επιρρέπειας των κυττάρων αυτών σε δευτερογενή γεγονότα (συσσώρευση νέων μεταλλάξεων) που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε νεοπλασία.

Εικόνα 4

Δομή του γονιδίου LMO-2 και ενσωμάτωση του ρετροϊού που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης του γονιδίου. Βρέθηκαν 2 ενσωματώσεις η πρώτη στην περιοχή του υποκινητή και η δεύτερη στο πρώτο ιντρόνιο.

1.7 Τροποποιήσεις στους φορείς για την αύξηση της ασφάλειας τους

Διάφορες προσεγγίσεις βρίσκονται υπό έρευνα για την εξάλειψη του φαινομένου μεταλλαξιγένεσης μέσω ενσωμάτωσης. Μία από αυτές είναι η ένθεση στο γονιδίωμα του φορέα αλληλουχιών «μονωτών» (insulators) οι οποίες δρουν ως ασπίδες μη επιτρέποντας τη δράση του ιϊκού υποκινητή στα γονίδια που βρίσκονται πέρα από τα όρια τους¹⁸⁹⁻¹⁹¹. Επίσης η τελευταία γενιά των ρετροϊκών φορέων ανήκει στους λεγόμενους SIN (self inactivated) φορείς οι οποίοι κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του γονιδιώματος τους χάνουν ένα μεγάλο μέρος του 3' LTR το οποίο περιλαμβάνει το

τμήμα με ισχυρή δράση υποκινητού. Στους φορείς αυτούς η μεταγραφή του μεταφερόμενου γονιδίου οδηγείται μόνο από έναν εσωτερικό εκκινητή¹⁹². Η χρήση ενός κυτταρικού εκκινητή, ο οποίος μάλιστα να είναι και κυτταρο- ειδικός, που σημαίνει ότι έχει ελάχιστη έκφραση στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα φαίνεται ότι μπορεί να είναι πολύ πιο ασφαλής από την χρήση των δυνατών ιϊκών εκκινητών. Ένα άλλο σημείο παρέμβασης είναι η θέση του σήματος πολυαδενυλίωσης του 3' LTR. Στους συμβατικούς ρετροϊικούς φορείς η συνέχιση της μεταγραφής πέρα από το σημείο της πολυαδενυλίωσης που βρίσκεται στην R περιοχή του 5' LTR είναι απαραίτητη για τη γένεση του προ-ιού. Στους SIN όμως φορείς όπου το 5' LTR δεν είναι απαραίτητο για την έκφραση του διαγονιδίου η θέση πολυαδενυλίωσης στο 3' LTR μπορεί να αντικατασταθεί από ένα ισχυρό σήμα πολυαδενυλίωσης το οποίο δεν θα επέτρεπε συνέχιση της μεταγραφής σε γειτονικά κυτταρικά γονίδια. Για την περαιτέρω αύξηση της ασφάλειας έχει επίσης θεωρηθεί η ενσωμάτωση ενός «γονιδίου αυτοκτονίας» στον φορέα όπως αυτό της κινάσης της θυμιδίνης του ανθρώπινου ερπητοϊού (HSV-tk) το οποίο προσδίδει τη δυνατότητα εκλεκτικής καταστροφής των κυττάρων που έχουν υποστεί κακοήγη εξαλλαγή¹⁹³. Βέβαια κάτι τέτοιο θα περιόριζε ακόμη περισσότερο την χωρητικότητα των ογκορετροϊών η οποία κυμαίνεται από 5-9 kb.

1.8 Υπάρχουσες τεχνικές για την ανάλυση των θέσεων ενσωμάτωσής των ιϊκών φορέων

Ο κύριος στόχος όλων των τεχνικών ανάλυσης των θέσεων ενσωμάτωσης είναι η ανίχνευση της συμβολής του ενσωματωμένου ιϊκού φορέα με το γονιδίωμα του κυττάρου- ξενιστή (proviral genomic junction). Η συμβολή αυτή αποτελείται από το τελικό τμήμα της αλληλουχίας LTR του ιϊκού φορέα και το άμεσα γειτονικό DNA του κυττάρου στόχου. Οι τεχνικές που υπάρχουν για την ανάλυση των θέσεων ενσωμάτωσης βασίζονται κυρίως στην αντίδραση PCR και είναι η ανάστροφη PCR, η LM-PCR (ligation mediated PCR) καθώς και η πιο πρόσφατη LAM-PCR (linear amplification reaction –mediated PCR). Στο σχήμα 1 περιγράφεται διαγραμματικά η μέθοδος LAM-PCR. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει μια γραμμική αντίδραση πολυμερισμού καθώς

χρησιμοποιείται μόνο ένας εκκινητής (βιοτινυλιωμένος στο 5' άκρο του). Ακολουθεί η απομόνωση των βιοτινυλιωμένων μονών αλυσίδων DNA με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων και η σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων με το ένζυμο Klenow πολυμεράση χρησιμοποιώντας τυχαία εξανουκλεοτίδια. Έπειτα τα μόρια DNA διπλής έλικας τέμνονται με περιοριστικά ένζυμα ώστε να δημιουργηθούν γνωστά άκρα. Ακολουθεί η πρόσδεση συμβατού linker με τη χρήση του ενζύμου της λιγάσης. Με τον τρόπο αυτόν δημιουργούνται μόρια DNA των οποίων και τα δύο άκρα έχουν γνωστή αλληλουχία. Το τελικό στάδιο είναι η ενίσχυση των τμημάτων αυτών με αντιδράσεις πολυμεράσης εκθετικού τύπου (PCR). Τα τμήματα αυτά περιέχουν τις αλληλουχίες που ανήκουν στις συμβολές προ- ιού - γονιδιώματος του κυττάρου. Δεδομένου ότι ο βιοτινυλιωμένος εκκινητής (όπως φαίνεται και στο σχήμα 1) προσδένεται τόσο στην U3 περιοχή του 5' LTR όσο και στην U3 περιοχή του 3' LTR τα τελικά μόρια DNA που παράγονται ανήκουν σε δύο πληθυσμούς: α) Τμήματα DNA τα οποία περιέχουν τις αλληλουχίες των συμβολών προ-ιού γονιδιώματος του κυττάρου (πολυμερισμός από την U3 περιοχή του 5' LTR προς το κυτταρικό DNA) και β) τμήματα DNA τα οποία αποτελούν προϊόντα πολυμερισμού από την U3 περιοχή προς το διαγονίδιο εσωτερικά του προ-ιού και περιέχουν εσωτερικές αλληλουχίες του ιού (internal standard). Το γεγονός αυτό είναι αναπόφευκτο δεδομένου ότι τα LTR των ιών περιέχουν τις ίδιες αλληλουχίες (U3,R,U5).

LAM PCR (linear amplification mediated PCR)

1. Γραμμική αντίδραση PCR με χρήση βιοτινυλιωμένου εκκινητή

2. Απομόνωση των βιοτινυλιωμένων τμημάτων DNA με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων

3. Σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων με τη χρήση τυχαίων εξανουκλεοτιδίων

4. Κατάτμηση των DNA αλυσίδων με περιοριστικό ένζυμο και πρόσδεση του κατάλληλου linker

5. Εκθετικές αντιδράσεις PCR

Σχήμα 1

Διαγραμματική απεικόνιση των σταδίων της μεθόδου LAM-PCR

Η κύρια διαφορά της LAM-PCR έναντι των άλλων μεθόδων είναι η προσθήκη του πρώτου σταδίου της γραμμικής PCR η οποία οδηγεί στον εμπλουτισμό του δείγματος DNA από αλληλουχίες οι οποίες περιέχουν την συμβολή μεταξύ του προ- ιού και του γονιδιώματος του κυττάρου. Το στάδιο αυτό έχει δείχθει ότι αυξάνει την ευαισθησία της μεθόδου δεδομένου ότι μπορεί να ανιχνεύσει θέσεις ενσωμάτωσης οι οποίες βρίσκονται στο δείγμα σε μικρό αριθμό αντιγράφων (<1000 αντίγραφα). Επίσης μέχρι τώρα έχει θεωρηθεί ως η μοναδική τεχνική η οποία ανιχνεύει παράλληλα την ύπαρξη πολλαπλών θέσεων ενσωμάτωσης στο δείγμα DNA. Η LAM-PCR χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των θέσεων ενσωμάτωσης στις κλινικές δοκιμές της γονιδιακής θεραπείας για τις ασθένειες SCID-X1 και SCID-ADA. Παρόλα αυτά τόσο η LAM-PCR όσο και οι προγενέστερες τεχνικές παρουσιάζουν τα εξής μειονεκτήματα:

- Περιλαμβάνουν αρκετά στάδια χειρισμού του DNA (κατάτμηση με περιοριστικά ένζυμα, πρόσδεση κατάλληλου linker) κατά τα οποία χάνονται πολύτιμες ποσότητες

DNA, γεγονός το οποίο αποκτά πολύ μεγαλύτερη σημασία στην ανάλυση του αίματος παιδιατρικών ασθενών που το διαθέσιμο DNA μπορεί να είναι και μικρότερο από 100 νάνο –γραμμάρια.

- η πρόσδεση του linker με την χρήση του ενζύμου της λιγάσης είναι μια αντίδραση με μικρή απόδοση και γενικώς αποτελεί ένα περιοριστικό στάδιο ως προς την ευαισθησία της μεθόδου.
- η χρήση ενός περιοριστικού ενζύμου για τη δημιουργία συμβατών άκρων για την πρόσδεση του linker δημιουργεί φαινόμενα επιλεκτικότητας για ορισμένες περιοχές του γονιδιώματος (π.χ. η χρήση ενός περιοριστικού ενζύμου που αναγνωρίζει κυρίως τις βάσεις GC έχει ως αποτέλεσμα την δράση του ενζύμου κυρίως στις περιοχές που είναι πλούσιες σε GC, παράγοντας κύρια τμήματα αλληλουχιών DNA που περιέχουν θέσεις ενσωμάτωσης που έχουν συμβεί στις περιοχές πλούσιες σε GC.)
- Η διαφορετική απόσταση της θέσης δράσης του περιοριστικού ενζύμου από την συμβολή κάθε θέσεως ενσωμάτωσης οδηγεί στην παραγωγή τμημάτων DNA που έχουν διαφορετικό μέγεθος. Τα μικρότερου μεγέθους τμήματα πολλαπλασιάζονται πιο εύκολα στην αντίδραση PCR. Επιπρόσθετα τα τμήματα αυτά υποκλωνοποιούνται πιο αποδοτικά στο πλασμίδιο για να διαβαστούν έπειτα οι αλληλουχίες. Το γεγονός αυτό εισάγει μια νέα απόκλιση που αφορά την προτίμηση της ανίχνευσης θέσεων ενσωμάτωσης των οποίων τα παραγόμενα DNA τμήματα είναι μικρότερου μεγέθους.

Λόγω των παραπάνω μειονεκτημάτων τα δεδομένα που παράγονται από την LAM-PCR δεν είναι πλήρως αντιπροσωπευτικά του προφίλ των θέσεων ενσωμάτωσης του φορέα. Σε μια μελέτη ανάλυσης θέσεων ενσωμάτωσης με τη χρήση της μεθόδου LM-PCR σε κυτταρικές σειρές οι Wu και συνεργάτες ανέφεραν την ανίχνευση 903 γνήσιων θέσεων ενσωμάτωσης στις 2304 αλληλουχίες που διαβάστηκαν¹⁹⁴, γεγονός που δείχνει ότι η ευαισθησία της μεθόδου είναι περιορισμένη.

1.9 Γονιδιακή θεραπεία για την βαριά μикτή ανοσοανεπάρκεια που οφείλεται στην έλλειψη απαμινάσης της αδενοσίνης (ADA-SCID)

Η βαριά μикτή ανοσοανεπάρκεια που οφείλεται στην ανεπάρκεια της απαμινάσης της αδενοσίνης (ADA-SCID) οδηγεί στην διαταραχή της ανάπτυξης των T, B και NK λεμφοκυττάρων. Οι ασθενείς με ADA-SCID πάσχουν από βαριά λεμφοπενία ($< 500/\text{mm}^3$), υποθρεψία, υποτροπιάζουσες σοβαρές λοιμώξεις, ενώ η νόσος είναι συνήθως θανατηφόρος μέσα στο πρώτο έτος της ζωής. Η μοριακή διαταραχή στο επίπεδο του DNA αφορά διάφορες σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο της απαμινάσης της αδενοσίνης στο χρωμόσωμα 20q13. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση της αδενοσίνης και των μεταβολιτών αυτής, 2'-δεοξαδενοσίνης και 2'-O- μεθυλαδενοσίνης που οδηγούν άμεσα ή εμμέσως στην απόπτωση των T λεμφοκυττάρων. Η αλλογενής μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων είναι η θεραπεία εκλογής με επιβίωση $>85\%$ με καλή διόρθωση τόσο της βιοχημικής διαταραχής όσο της ανοσολογικής απάντησης αλλά μόνο στην περίπτωση HLA- συμβατού δότη¹⁹⁵. Όταν δεν υπάρχει συμβατός δότης υπάρχει η επιλογή της ενζυμικής υποκατάστασης με PEG-ADA, όπου αν και η γενική πρόγνωση είναι καλή¹⁹⁶, η λειτουργική αποκατάσταση του ανοσοποιητικού είναι ποικίλη και η θεραπεία με PEG-ADA οδηγεί σε σημαντική λεμφοπενία, ποικίλες διαταραχές στην λειτουργία των T λεμφοκυττάρων συμπεριλαμβανομένης της μειωμένης παραγωγής T λεμφοκυττάρων από τον θύμο αδένα και επιρρέπεια στις ιογενείς λοιμώξεις¹⁹⁷⁻¹⁹⁹. Οι πρώτες κλινικές δοκιμές γονιδιακής θεραπείας της ADA-SCID με την χρήση ογκορετροϊκών φορέων έδειξαν ικανοποιητική διαμόλυνση των αιμοποιητικών αρχέγονων κυττάρων^{200;201} και παρατεταμένη έκφραση του γονιδίου ADA στα διά μολυσμένα T λεμφοκύτταρα^{202;203}. Παρά ταύτα η αποκατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος επιτεύχθηκε σε πολύ μικρό βαθμό, πράγμα στο οποίο πιθανόν συνέβαλε και η παράλληλη χρήση του PEG-ADA το οποίο ανέστειλε το δυναμικό της επιλεκτικής ανάπτυξης των γονιδιακά διορθωμένων κυττάρων²⁰⁴. Η επιτυχία της γονιδιακής θεραπείας για την ADA-SCID έχει προσφάτως δειχθεί σε ασθενείς οι οποίοι δεν είχαν αρχίσει θεραπεία υποκατάστασης με PEG-ADA και στους οποίους δεν χορηγήθηκε μυελοαφανιστικό σχήμα²⁰⁵. Φαίνεται ότι η έλλειψη του PEG-ADA επιτρέπει την επιλεκτική ανάπτυξη των δια μολυσμένων, με το

φυσιολογικό γονίδιο ADA, λεμφοκυττάρων και ότι η χημειοθεραπεία επιτρέπει την καλύτερη την εγκατάσταση των διαμολυσμένων αρχέγονων κυττάρων.

Ο ασθενής μας διαγνώστηκε σε ηλικία 2 μηνών και λόγω μη ύπαρξης συμβατού δότη ετέθη σε αγωγή υπό PEG-ADA. Παρότι παρουσίασε καλή μεταβολική διόρθωση, η αποκατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος ήταν πτωχή με σημαντική T λεμφοπενία, μικρή παραγωγή ανοσοσφαιρινών και εξαιρετικά μειωμένη λειτουργία του θύμου αδένος όπως διαπιστώθηκε από την εξαφάνιση των πρόδρομων T κυττάρων και των TRECs (T cell receptor excision circles). Σε ηλικία 3,2 ετών και τρία χρόνια μετά την έναρξη του PEG-ADA εισήχθη στην κλινική δοκιμή με γονιδιακή θεραπεία. Το πρωτόκολλο αυτό εγκρίθηκε από τις επιτροπές UK Gene Therapy Advisory Committee, Medicines Control Agency και Local Institutional Research Ethics Committee. Τα κριτήρια εισαγωγής στη μελέτη αυτή ήταν η επιβεβαίωση της ασθένειας ADA-SCID με ταυτοποίηση του γονιδιακού ελαττώματος (στην περίπτωση αυτή υπήρχε το γονιδιακό ελάττωμα Q3X ενώ η βιοχημική ανάλυση έδειξε επίπεδα dATP > 1531 μmol/l), η απουσία HLA συμβατού δότη η δότη ομφαλίου λώρου και αποτυχία της θεραπείας με PEG-ADA (οριζόμενη από αριθμό λεμφοκυττάρων < 1.5×10^9 κύτταρα/l και υπογαμμασφαιριναιμία η οποία χρειάζεται Ig υποκατάσταση). Επίσης υπήρξε έγγραφη συγκατάθεση των γονέων.

Η αγωγή με PEG-ADA σταμάτησε ένα μήνα πριν από τη θεραπεία. Αυτόλογα CD 34+ κύτταρα απομονώθηκαν από τον μυελό των οστών και η διαμόλυνση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα υλικά και μέθοδοι. Η απόδοση της διαμόλυνσης ήταν 25 με 30% προσδιορισμένη με κυτταρομετρία ροής της ενδοκυτταρικής έκφρασης της πρωτεΐνης ADA. Την ημέρα -2 ο ασθενής έλαβε μια δόση μελφαλάνης (140mg/m²). Ο ολικός αριθμός των CD 34+ ADA+ κυττάρων που εγχύθηκαν στον ασθενή ήταν 1.4×10^6 /kg. Ο ασθενής δεν παρουσίασε κυτταροπενία λόγω της μελφαλάνης και ανεξαρτοποιήθηκε από μεταγγίσεις τρεις εβδομάδες μετά.

Μετά από 15 εβδομάδες παρουσιάστηκε σημαντική αύξηση όλων των λεμφοκυττάρων όπως φαίνεται και στο σχήμα 2. Όσον αφορά τα T λεμφοκύτταρα ο ολικός αριθμός αυτών αυξήθηκε από 100×10^9 κύτταρα/l σε 400×10^9 κύτταρα/l με τους υποτύπους CD4+ και CD8+ να αυξάνονται από 60×10^9 κύτταρα/l σε 190×10^9 κύτταρα/l και από 30×10^9 κύτταρα/l σε 170×10^9 κύτταρα/l αντίστοιχα.

Σχήμα 2

Καμπύλες αποκατάστασης του αριθμού των T λεμφοκυττάρων και υποτύπων αυτών μετά την γονιδιακή θεραπεία

Η αποκατάσταση του T λεμφοκυτταρικού πληθυσμού συνοδεύεται με φυσιολογική απάντηση των κυττάρων στη διέγερση με CD3 και PHA (Σχήμα 3). Όσον αφορά τα B λεμφοκύτταρα ο αριθμός τους κυμάνθηκε γύρω στα 50×10^9 κύτταρα/l. Η καμπύλη παραγωγής των ανοσοσφαιρινών ήταν ανοδική μετά την γονιδιακή θεραπεία αν και τα επίπεδα της ενδογενούς παραγωγής των IgM και IgA ήταν κάτω από τα κανονικά. Τα λεμφοκύτταρα NK στις 96 εβδομάδες μετά τη γονιδιακή θεραπεία ήταν 30 κύτταρα/mm^3 .

Σχήμα 3

Διέγερση των T
λεμφοκυττάρων
με CD3 ή PHA

Πριν από την γονιδιακή θεραπεία υπήρχε σταδιακή μείωση των πληθυσμών CD27+CD45RO- T λεμφοκυττάρων ενώ δεν ανιχνεύονταν TRECs (T cell receptor excision circles) τόσο σε CD4+ όσο και σε CD8+ κύτταρα υποδηλώνοντας σοβαρή διαταραχή της λειτουργίας του θύμου αδένος. Μετά την γονιδιακή θεραπεία υπήρξε σταδιακή επανεμφάνιση των πληθυσμών CD27+CD45RO- συνοδευόμενη από εμμένουσα δραστηριότητα TREC στους πληθυσμούς CD4+ και CD8+ υποδηλώνοντας επανέναρξη της θυμικής λειτουργίας. Ο ασθενής σήμερα αναπτύσσεται κανονικά, βρίσκεται υπό αγωγή με IVIG, είναι ελεύθερος λοιμώξεων και παρακολουθεί τα μαθήματα του σχολείου.

Χαμηλά επίπεδα dATP (<100μmol/l) διατηρήθηκαν καθόλη τη διάρκεια της παρακολούθησης χωρίς την χορήγηση εξωγενούς PEG-ADA (σχήμα 4). Ένα μέρος ανίχνευσης δραστηριότητας της ADA είναι το ερυθροκύτταρο. Πριν από την γονιδιακή θεραπεία δεν υπήρχε ADA δραστηριότητα στα ερυθροκύτταρα του ασθενούς λόγω της μετάλλαξης ενώ η εξωγενής χορήγηση PEG-ADA δεν επηρεάζει τη δραστηριότητα αυτή αφού δεν διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη. Μετά τη θεραπεία παρατηρείται μια απότομη αύξηση της δραστηριότητας ADA λόγω των εξωγενών ερυθροκυττάρων που λαμβάνει ο ασθενής κατά τη διάρκεια της περιόδου κυτταροπενίας. Εντούτοις ένα χρόνο περίπου μετά από την γονιδιακή θεραπεία ανιχνεύεται μια δραστηριότητα της ADA στο ερυθροκύτταρο γύρω στο 10% των κανονικών επιπέδων (3-5 nmol/mgHb/hr). Το

γεγονός αυτό υποδηλώνει την ύπαρξη διαμολυσμένων προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς που οδηγεί στην παραγωγή ερυθροκυττάρων με ADA (σχήμα 4).

Σχήμα 4

Επίπεδα ADA και δραστηριότητα ADA στα ερυθροκύτταρα πριν και μετά την γονιδιακή θεραπεία (GT : χρονικό σημείο εφαρμογής γονιδιακής θεραπείας)

Ο προσδιορισμός του αριθμού των αντιγράφων του προ-ιού σε, διαχωρισμένους με κυτταρομετρία ροής, πληθυσμούς λεμφοκυττάρων έδειξε ότι τα T και NK κύτταρα περιείχαν > 0,5 αντίγραφα / κύτταρο 16 εβδομάδες μετά την έναρξη της γονιδιακής θεραπείας. Σε σύγκριση η αναλογία των B λεμφοκυττάρων που περιείχαν διαγονίδιο ήταν περίπου 10% (αριθμός αντιγράφων= 0,1) ενώ στα μυελοκύτταρα το ποσοστό του διαγονιδίου έπεσε στο 0,1% κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης. Απομονώσαμε επίσης και αναπτύξαμε μονούς T λεμφοκυτταρικούς κλώνους. Ανάλυση 5 ανεξάρτητων διαμολυσμένων κλώνων έδειξε ότι ο αριθμός των αντιγράφων του προιού σε κάθε κλώνο ήταν 1.

Σχήμα 5

Αριθμός αντιγράφων του προ-ιού / κύτταρο στα T,B,NK και G (κοκκιοκύτταρα) μετά την γονιδιακή θεραπεία

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας είναι η ανάπτυξη μιας υψηλά πληροφοριακής και αξιόπιστης μεθόδου για την ανάλυση των θέσεων ενσωμάτωσης των ρετροϊκών φορέων στο γονιδίωμα των κυττάρων ασθενών που έχουν υποβληθεί σε γονιδιακή θεραπεία. Στόχος της ανάλυσης αυτής είναι τόσο ο προσδιορισμός των αλληλουχιών των θέσεων ενσωμάτωσης όσο και η παρακολούθηση της συμμετοχής των διαφόρων κλώνων κυττάρων στην αποκατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος στην πάροδο του χρόνου, δεδομένου ότι κάθε κλώνος χαρακτηρίζεται από την θέση ενσωμάτωσης που περιέχει.

Υλικά και μέθοδοι

Κατασκευή, παραγωγή και έλεγχος του ρετροϊκού φορέα

Ο γαμμα- ρετροϊκός φορέας SFada/W περιέχει το ανθρώπινο ADA cDNA η μεταγραφή του οποίου οδηγείται από τον εκκινητή SFFV-LTR (spleen focus forming virus – long terminal repeat) και ένα μετα- μεταγραφικό ρυθμιστικό στοιχείο (WPRE –woodchuck hepatitis post transcriptional regulatory element) το οποίο περιέχει μεταλλάξεις τόσο στον εκκινητή όσο και στο κωδώνιο έναρξης ώστε να υπάρχει αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης ADA (βλέπε σχήμα)

**Φορέας SFada/W που
που χρησιμοποιήθηκε
για την γονιδιακή
θεραπεία της ασθένειας
ADA-SCID**

Τα ιικά σωματίδια παρήχθησαν από την κυτταρική σειρά PG13. Ο φορέας σε κλινική κλίμακα παρήχθη από την EUFETS (Idar-Oberstein, Germany). Ο τίτλος του φορέα ήταν 5×10^5 units/ml.

Κυτταρομετρία ροής

Ολικό αίμα σημάνθηκε με διάφορους συνδυασμούς μονοκλωνικών αντισωμάτων συζευγμένα με ισοθιοκυανική φλουρεσκεΐνη (FITC), φυκοερυθρίνη (PE), και είτε peridinin chlorophyll protein (PerCP), cychrome (CY) or Tricolour (TC). (BD Biosciences: CD3 FITC, CD45RO FITC, CD27 FITC, CD19 PE, CD27 PE, CD4 PE,

CD8 PE, CD45 PerCP, CD4 PERCP, CD8 CY, CD45RO C, CD16+CD56 FITC PE Simultest. Caltag: IgM FITC, IgD FITC, CD19 TC). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τον κυτταρομετρητή ροής Epics XL (Beckman Coulter, High Wycombe, UK). Τα κύτταρα διαχωρίστηκαν χρησιμοποιώντας το Beckman Coulter Epics Ultra με λογισμικό το Expo32.

Παρασκευή των δειγμάτων DNA ασθενών και πλασμιδιακού τμήματος DNA

Μονοπύρηννα κύτταρα περιφερειακού αίματος διαχωρίστηκαν με φυγοκέντρωση 5 ml αίματος (400 g για 30 min) στο διαχωριστικό μέσο Ficoll-Hypaque (Sigma, St. Louis, Mo.) και τα κύτταρα από τις διάφορες κυτταρικές σειρές (T λεμφοκύτταρα, B λεμφοκύτταρα, NK λεμφοκύτταρα κ.α) διαχωρίστηκαν με κυτταρομετρία ροής (FACS) (Becton Dickinson FACS-Vantage Flow Cytometer Cell Sorter) χρησιμοποιώντας αντισώματα από τον ίδιο κατασκευαστή. Ολικό DNA απομονώθηκε χρησιμοποιώντας το QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Το τμήμα DNA για τον έλεγχο της λειτουργίας του DSH εκκινήθηκε από το πλασμίδιο SFada/W μετά από κατάτμηση αυτού με τα ένζυμα περιορισμού AscI-HindIII και απομόνωση της ζώνης μεγέθους 1138 βάσεων από πήκτωμα αгарόζης χρησιμοποιώντας το Gel Extraction Kit (Qiagen).

Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές στις αντιδράσεις πολυμεράσης

Bio-SLR1: 5'-TGGCCCAACGTTAGCTATTTTCATGTA-3'

Bio-MF1: 5'-AACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCG-3'

SLR1: 5'-TGGCCCAACGTTAGCTATTTTCATGTA-3'

SLR2: 5'-CTATAGGGCACGCGTG-3'

DSHP+: 5'-TAGGGCACTATAGGGCACGCGTGNNNNNN-3'

DSHP- : 5'-CACGCGTGCCCTATAGTGCCCTA-3'

DS1: 5'-TAGGGCACTATAGGGCACGC-3'

DS2: 5'-CTATAGGGCACGCGTG-3'

MF1: 5'-AACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCG-3'

MF2: 5'-TCCCCGAGCTCAATAAAAGA-3'

M13F: 5'-TCCCAGTCACGACGTCGT-3'

M13R: 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'

T3: 5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3'

Όλα τα ολιγονουκλεοτίδια παρήχθησαν από την εταιρεία Invitrogen

Δημιουργία εκκινητή DSH

Ο εκκινητής DSH δημιουργήθηκε από τα ολιγονουκλεοτίδια DSHP+ και DSHP-. Αυτά διαλύθηκαν σε 10mM Tris, pH 7.5 - 8.0, 50mM NaCl, 1mM EDTA και ενώθηκαν μεταξύ τους θερμαίνοντας το διάλυμα στους 95 °C για 2 min και ψύχοντας το έπειτα μέχρι τους 25 °C σε διάρκεια 45 min χρησιμοποιώντας το Mastercycler® ep (Eppendorf, Germany).

Μέθοδος DSHP-PCR για την ανάλυση των θέσεων ενσωμάτωσης του φορέα SFada/W

Η ποσότητα DNA που χρησιμοποιήθηκε για κάθε δείγμα ήταν 20-40 ng και αποτέλεσε υπόστρωμα για 100 κύκλους γραμμικής αντίδρασης πολυμεράσης (linear extension) χρησιμοποιώντας ως εκκινητή το ολιγονουκλεοτίδιο Bio-SLR1 που είναι βιοτινυλιωμένο στο 5' άκρο του (πρόγραμμα : 94°C for 1 min, 65 for 30 sec, 72 for 30 sec). Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Pfx® Polymerase (Invitrogen, USA) στο Mastercycler® ep (Eppendorf, Germany). Μετά την αντίδραση τα δείγματα καθαρίστηκαν και συγκεντρώθηκαν σε τελικό όγκο 10 µl με την χρήση των στηλών Microcon® YM-50 (Eppendorf, Germany). Στη συνέχεια μαγνητικά σφαιρίδια

(Dynalbeads® Streptavidin MyOne™ C1, Dynal, Norway) χρησιμοποιήθηκαν (10 µl για κάθε δείγμα) για την πρόσδεση των νεο-παραχθέντων βιοτινυλιωμένων μονών αλυσών DNA. Τα σφαιρίδια επώστηκαν με το δείγμα σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες σε shaker και ακολούθησαν 2 ξεπλύματα με το διάλυμα 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 2.0 M NaCl και ένα ξέπλυμα με αποστειρωμένο ddH₂O. Τελικά οι απομονωθείσες μονές αλυσίδες DNA επαναδιαλύθηκαν σε 10 µl ddH₂O. Ακολουθεί θέρμανση των αλυσίδων στους 85 βαθμούς Κελσίου για τρία λεπτά και άμεση τοποθέτηση στον πάγο για να αποφευχθεί η περιέλιξη αυτών. Στη συνέχεια ο DSH εκκινητής προστίθεται στο μείγμα σε συγκέντρωση 100 µM μαζί με το ρυθμιστικό διάλυμα 10x Klenow και αφήνεται για 5 λεπτά στον πάγο και για 25 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί ξέπλυμα με ddH₂O κατά το οποίο απομακρύνονται το πλήθος των μορίων του DSH εκκινητή και τα δείγματα επαναδιαλύονται σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x Klenow που περιέχει 40 µM dNTPs και μία μονάδα Klenow πολυμεράσης (Invitrogen, USA). Η αντίδραση αφέθηκε να συνεχίσει στους 37 βαθμούς για 60 λεπτά. Στο τέλος τα δείγματα ξεπλύθηκαν μια φορά με ddH₂O και επαναδιαλύθηκαν στο μείγμα PCR. Η αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε (πρόγραμμα: 94°C for 1 min, 65 °C for 30 sec, 72 °C for 30 sec, 29 κύκλοι) με τη χρήση των εκκινητών DS1 και SLR1. Δύο μικρόλιτρα από κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκε σε μια νέα αντίδραση PCR με εκκινητές τους SLR2 και DS2. Το ένζυμο Taq πολυμεράση από την εταιρία Invitrogen χρησιμοποιήθηκε και στις δύο αντιδράσεις.

Το τελικό προϊόν της PCR καθαρίστηκε χρησιμοποιώντας το PCR purification kit της εταιρίας Qiagen και έπειτα κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο TOPO® PCR4 (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι αποικίες ελέγχθηκαν για υποκλωνοποιημένα προϊόντα PCR με αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιώντας τους εκκινητές M13 (forward και reverse). Το πλασμιδιακό DNA απομονώθηκε από τις θετικές αποικίες με το MiniPrep Kit (Qiagen) και οι αλληλουχίες των ενθέτων διαβάστηκαν (sequenced) με τον εκκινητή T3 universal. Η ανάλυση των δειγμάτων φορέα MFG έγινε με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω χρησιμοποιώντας τους ειδικούς εκκινητές για τον φορέα αυτόν (Bio-MF1, [MF1-DS1 (Tm=60 °C)], [MF2-DS2 (Tm=60 °C)]).

Χρήση της μεθόδου DSCP-PCR για τη δημιουργία του προφίλ συμμετοχής κλώνων

Ολικό DNA ποσότητας 20- 40 ng υποβλήθηκε σε κατάτμηση με το ένζυμο περιορισμού Tsp509I (New England Biolabs, USA) που είναι ένα ένζυμο 4bp-cutter. Το DNA καθαρίστηκε χρησιμοποιώντας το Clean-up reaction kit (Qiagen) και έπειτα υποβλήθηκε στην ίδια διαδικασία όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο. Στην περίπτωση αυτή τα προϊόντα της δεύτερης αντίδρασης πολυμεράσης αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση με το σύστημα υψηλής ανάλυσης Spreadex[®] (Elchrom Scientific, Switzerland).

Ανάλυση των αλληλουχιών των θέσεων ενσωμάτωσης με τη χρήση λογισμικού

Όλες οι αλληλουχίες οι οποίες παρήχθησαν με τη μέθοδο DSCP-PCR αναλύθηκαν με λογισμικό το οποίο αναπτύχθηκε από το κέντρο βιοπληροφορικής Bloomsbury (University College London) σε συνεργασία με το δικό μας εργαστήριο. Μόνο αλληλουχίες οι οποίες ήταν υψηλής ποιότητας χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα εισαγωγής στο λογισμικό. Το λογισμικό αυτό περιέχει φίλτρα τα οποία εγκρίνουν την εισαγωγή των αλληλουχιών μόνον αν αυτές πληρούν κάποια κριτήρια τα οποία είναι: 1) η αλληλουχία πρέπει να περιέχει την περιοχή DNA που ξεκινά από τη θέση πρόσδεσης του εκκινητή της τελευταίας αντίδρασης πολυμεράσης μέχρι το τέλος του στοιχείου LTR (TGAAAGA), 2) η περιοχή του γονιδιώματος του κυττάρου που βρίσκεται δίπλα στον ενσωματωμένο προ-ϊό πρέπει να ξεκινά αμέσως μετά το τέλος του προ-ϊού (TGAAAGA), 3) η αλληλουχία της περιοχής του γονιδιώματος που διαβάζεται (sequenced) πρέπει να παρουσιάζει 95% ή μεγαλύτερη ομοιότητα στην θεωρητικά ανευρισκόμενη χαρτογραφημένη περιοχή. Όταν μια αλληλουχία πληρεί τα παραπάνω κριτήρια υπόκειται σε περαιτέρω ανάλυση. Το λογισμικό τέμνει την αλληλουχία LTR και κρατά μόνο την αλληλουχία του γονιδιώματος με την οποία πραγματοποιεί blast χρησιμοποιώντας την βάση δεδομένων του ανθρώπινου γονιδιώματος NCBI. Η έξοδος του λογισμικού αποτελείται από ένα πίνακα ο οποίος περιέχει το χρωμόσωμα, την αρχή και το τέλος της ενσωμάτωσης πάνω στο χρωμόσωμα, το μήκος της ενσωματωμένης αλληλουχίας και το ποσοστό ομοιότητας με τη συγκεκριμένη χρωμοσωμική περιοχή.

Αποτελέσματα

1 Μηχανισμός της DSHP-PCR για την ανάλυση των θέσεων ενσωμάτωσης με ταυτοποίηση της αλληλουχίας τους

Καταρχάς ολικό DNA που απομονώνεται από τα κύτταρα, υποβάλλεται σε αντίδραση γραμμικής PCR χρησιμοποιώντας έναν εκκινητή ο οποίος έχει στο 5' άκρο του ένα μόριο βιοτίνης. Ο εκκινητής αυτός προσδένεται στην U3 περιοχή του 5' LTR του προ-ιού και οδηγεί την αντίδραση πολυμερισμού προς το σημείο ένωσης μεταξύ προ-ιού και γονιδιώματος. Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται για να εμπλουτισθεί το δείγμα με τμήματα DNA που περιέχουν τις αλληλουχίες των συμβολών μεταξύ προ-ιού και γονιδιώματος (θέσεις ενσωμάτωσης). Οι νέες μόνες αλυσίδες DNA που παράγονται είναι βιοτινολιωμένες στο 5' άκρο τους και απομονώνονται από το ολικό DNA με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων τα οποία έχουν στην επιφάνεια τους στρεπταβιδίνη και προσδένουν τα μόρια βιοτίνης. Στις νέες αυτές αλυσίδες DNA προστίθεται ένας εκκινητής του οποίου το μόριο αποτελείται από ένα τμήμα διπλής έλικας DNA και από μια ουρά μονής έλικας DNA (partially double stranded sterically hindered primer – DSH). Ο ειδικά αυτός σχεδιασμένος εκκινητής προσδένεται στο άκρο της μονής αλυσίδας και οδηγεί την σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA η οποία γίνεται με τη βοήθεια του ενζύμου Klenow πολυμεράσης I. Η ουρά του εκκινητή DSH είναι εκφυλισμένη αποτελούμενη από έξι τυχαία νουκλεοτίδια (N_6). Η δομή αυτή του εκκινητή DSH έχει ως αποτέλεσμα την προαγωγή της σύνθεσης της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA μόνο αν ο εκκινητής προσδεθεί στο άκρο της μονής αλυσίδας. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί είτε με την ανικανότητα του εκκινητή DSH να προστεθεί εσωτερικά της μονής αλυσίδας λόγω της ύπαρξης στεριτικού φαινομένου από την δομή του εκκινητή, είτε από την δομική ασυμβατότητα του συμπλόκου εκκινητή- μόνη αλυσίδα DNA με κέντρο κατάλυσης του ενζύμου Klenow πολυμεράσης I²⁰⁶⁻²⁰⁸. Η συμπληρωματική αλυσίδα DNA που παράγεται χρησιμεύει ως υπόστρωμα για δύο διαδοχικές αντιδράσεις PCR, από τις οποίες η δεύτερη γίνεται με εσωτερικούς εκκινητές. Τα προϊόντα της PCR υποκλωνοποιούνται σε έναν φορέα που χρησιμεύει για τον προσδιορισμό των αλληλουχιών αυτών.

Εικόνα 1

Ο εκκινητής DSH προσδένεται στο άκρο της μόνης αλυσίδας DNA (1α) και οδηγεί την σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας που γίνεται από το ένζυμο Klenow πολυμεράσης I (1β). Η νεο-παραχθείσα αλυσίδα αποτελεί το υπόστρωμα για τις αντιδράσεις PCR. Η σύνδεση της συμπληρωματικής αλυσίδας συμβαίνει μόνο όταν ο εκκινητής DSH προσδεθεί στο άκρο της μόνης αλυσίδας και όχι εσωτερικά. Αυτό μπορεί να συμβαίνει είτε λόγω αδυναμίας πρόσδεσης του DSH εσωτερικά εξαιτίας της δομής του (στερητικό φαινόμενο)(1γ), είτε λόγω δομικής ασυμβατότητας του συμπλόκου DSH- μόνη αλυσίδα DNA, με το κέντρο κατάλυσης πολυμερισμού του ενζύμου (1δ).

2 Ιδιότητες πρόσδεσης του εκκινητή DSH

Για να εκτιμήσουμε την συμπεριφορά του μορίου του εκκινητή DSH ως προς την οδήγηση της σύνθεσης της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA συγκρίναμε τις ιδιότητες πρόσδεσης του εκκινητή DSH με αυτές ενός εκκινητή ίδιας αλληλουχίας χωρίς όμως την ύπαρξη του τμήματος διπλής έλικας (μόνη έλικα- N_6 -). Η σύγκριση της πρόσδεσης έγινε σε ένα υπόστρωμα τμήματος DNA που περιέχει μια και μοναδική αλληλουχία συμβολής ιού- πλασμιδίου προερχόμενη από τον φορέα SFada/W. Το πλασμίδιο SFada/W κατατμήθηκε με τα ένζυμα περιορισμού AscI-HindIII και ένα τμήμα 1138 βάσεων που

περιείχε την ένωση ανάμεσα στο 5' LTR- πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε για πρόσδεση των δύο εκκινητών (Εικόνα 2). Στην περίπτωση του εκκινητή DSH η ενίσχυση με PCR του προϊόντος της αντίδρασης σύνθεσης της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA έδωσε μια ζώνη μεγέθους 820 βάσεων. Το μέγεθος αυτό αναμένεται όταν ο εκκινητής προσδένεται στο άκρο της μονής αλυσίδας DNA. Αντιθέτως στην περίπτωση του εκκινητή μονής αλυσίδας η ενίσχυση με PCR έδωσε διάφορες ζώνες DNA με μεγέθη μικρότερα από 820 βάσεις. Αυτό δείχνει ότι ο εκκινητής μονής αλυσίδας προσδένεται σε διάφορες τυχαίες θέσεις του υποστρώματος- μονής αλυσίδας DNA.

Εικόνα 2

Σύγκριση του τρόπου πρόσδεσης του εκκινητή DSH και του αντίστοιχου εκκινητή μονής αλυσίδας DNA πάνω σε τμήμα DNA που περιέχει ένα LTR.

Μονή θέση πρόσδεσης για τον εκκινητή DSH (προϊόν 820 βάσεων) πάνω στο τμήμα AscI-HindIII (1138 bp) του πλασμιδίου SFFV-ADA που περιέχει την ένωση μεταξύ 3'LTR και υπολοίπου πλασμιδίου (σειρά A) σε αντίθεση με τον μονής αλυσίδας εκκινητή ο οποίος προσδένεται σε διάφορες εσωτερικά του υποστρώματος DNA και παράγει αρκετές ζώνες με μεγέθη < 820 βάσεις στο ίδιο υπόστρωμα (σειρά B). Στο διπλανό σχήμα απεικονίζεται ο τρόπος πρόσδεσης του εκκινητή DSH (α) και του εκκινητή μονής αλυσίδας (β).

3 Ανάλυση του προφίλ συμμετοχής κλώνων με την χρήση της DSCP-PCR

Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει ένα πρόσθετο πρώτο βήμα κατάτμησης του ολικού DNA με ένα ένζυμο περιορισμού έτσι ώστε να δημιουργηθούν διαφορετικού μεγέθους τμήματα DNA που περιέχουν διαφορετικές αλληλουχίες συμβολών μεταξύ ιού και γονιδιώματος (θέσεις ενσωμάτωσης) . Η κατάτμηση με ένα ένζυμο περιορισμού κοντά στο σημείο ένωσης ιού και γονιδιώματος παράγει ένα τμήμα DNA μοναδικού μεγέθους που χαρακτηρίζει την αυτή θέση ενσωμάτωσης. Η μοναδική αυτή συσχέτιση μεταξύ ταυτότητας θέσεως ενσωμάτωσης και μεγέθους DNA οδηγεί στη δημιουργία ενός προφίλ θέσεων ενσωμάτωσης που χαρακτηρίζουν τους κλώνους στους οποίους ανήκουν οι θέσεις αυτές. Το προφίλ αυτό παράγεται κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της DSCP-PCR. Τα ένζυμα περιορισμού που μπορεί να χρησιμοποιηθούν είναι πολλά αρκεί να μην τέμνουν στην περιοχή ανάμεσα στο σημείο πρόσδεσης του LTR εκκινητή της και στο τέλος του LTR. Δεν θεωρήσαμε απαραίτητο να δημιουργήσουμε έναν ειδικό DSH εκκινητή για την αλληλουχία κατάτμησης κάθε ενζύμου περιορισμού καθώς ο DSH εκκινητής μπορεί να προσδεθεί εξίσου αποτελεσματικά τόσο σε γνωστή αλληλουχία όσο και σε άγνωστη. Η εικόνα 3α δείχνει το προφίλ των κλώνων, χαρακτηρισμένοι από τις θέσεις ενσωμάτωσής του φορέα, σε διάφορες κυτταρικές σειρές του ανοσοποιητικού συστήματος του ασθενή μετά από την γονιδιακή θεραπεία με τον ρετροϊκό φορέα SFada/W. Η DSCP-PCR πραγματοποιήθηκε σε ολικό DNA που απομονώθηκε και έπειτα κατατμήθηκε με το ένζυμο Tsp509I. Η πολυκλωνικότητα της T λεμφοκυτταρικής σειράς έχει επιβεβαιωθεί και με πειράματα μελέτης των υποδοχέων TCR. Στην ίδια εικόνα παραθέτουμε επίσης την ανάλυση κλώνων από τέσσερα δείγματα κυττάρων επίμυ που έχουν διαμολυνθεί από έναν διαφορετικό ρετροϊκό φορέα (MFG), όπου χρησιμοποιήθηκαν οι ειδικοί για τον φορέα αυτών εκκινητές. Στην περίπτωση αυτή το ολικό DNA απομονώθηκε από κύτταρα που προέρχονται από έναν αρχικά διαμολυσμένο

κλώνο. Κάθε ζώνη στις σειρές 1-4 αντίστοιχη σε μια γνήσια θέση ενσωμάτωσης όπως αποδείχτηκε από την ταυτοποίηση των αλληλουχιών.

Εικόνα 3

A) Προφίλ διαμολυσμένων κλώνων που συνθέτουν την T λεμφοκυτταρική σειρά (1), την B λεμφοκυτταρική σειρά(2), την μονοκυτταρική σειρά(3) και την κοκκιοκυτταρική σειρά(4) στον ασθενή με ADA-SCID μετά από γονιδιακή θεραπεία με τον φορέα SFada/W . Οι ζώνες που αντιστοιχούν στο εσωτερικό τμήμα του φορέα (internal standard), το οποίο παράγεται από την ενίσχυση της αλληλουχίας DNA από το 3' LTR προς το γονίδιο ADA έχει μέγεθος 90 βάσεων.

B) Προφίλ διαμολυσμένων κλώνων επίμυος από τον φορέα MFG (εσωτερικό τμήμα 168 βάσεις). M : δείκτης μεγέθους 100-1000 βάσεις

4 Ευαισθησία και ειδικότητα της DSCP-PCR

Ολικό DNA απομονώθηκε από κύτταρα CD 34 + και από κύτταρα 293T τα οποία διαμολύνθηκαν με τον ρετροϊκό φορέα SFada/W με δείκτη λοιμογόνου δράσης 1 (Multiplicity of infection –MOI=1). Τα κύτταρα συνελέγησαν 36 ώρες μετά από την διαμόλυνση. Ο αριθμός των ιϊκών αντιγράφων ήταν ένα ανά κύτταρο όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της ποσοτικής PCR. Μη διαμολυσμένα CD 34+ κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν σαν αρνητικός μάρτυρας. Στην εικόνα 4 φαίνεται το πολυκλωνικό προφίλ και των δύο κυτταρικών σειρών, ενώ η κυτταρική σειρά μάρτυρας δεν έχει ζώνες. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η μέθοδος είναι ικανή να ανιχνεύσει ένα μεγάλο φάσμα θέσεων ενσωμάτωσης οι οποίες αντιπροσωπεύονται σε πολύ χαμηλό αριθμό αντιγράφων. Για να διερευνήσουμε την ειδικότητα και αξιοπιστία της DSCP-PCR πραγματοποιήσαμε το ίδιο πείραμα δύο φορές χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ολικό DNA από τον ασθενή με ADA-SCID μετά από θεραπεία με τον φορέα SFada/W. Όπως διαπιστώνεται από την εικόνα 5 οι σειρές που αντιστοιχούν στην ίδια κυτταρική σειρά περιέχουν ζώνες ίδιου μεγέθους υποδηλώνοντας την ειδική πρόσδεση του εκκινητή DSH και στα δύο πειράματα. Η ένταση των ζωνών από την σύγκριση των δύο πειραμάτων φαίνεται να είναι σταθερή μόνο στα υψηλά επίπεδα αυτής, ενώ στα πιο χαμηλά δεν φαίνεται να υπάρχει αναπαραγωγιμότητα μεταξύ των δύο πειραμάτων.

Εικόνα 4

Ανάλυση Ολικού DNA κυττάρων CD 34+ (σειρά B) και κυττάρων 293T (σειρά Γ) που έχουν διαμολυνθεί με τον φορέα SFada/W. Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση υψηλής ανάλυσης (Spreadex®). Οι σειρές B και Γ εμφανίζουν πολλαπλές ζώνες που αντιστοιχούν στους πολλαπλούς κλώνους σε κάθε πληθυσμό. Στη σειρά A το υπόστρωμα που ήταν ολικό DNA από μη διαμολυσμένη κυτταρική σειρά CD 34+

Εικόνα 5

Ανάλυση Κλώνων τεσσάρων διαφορετικών κυτταρικών σειρών :
 1α,2α : κοκκιοκύτταρα
 1β,2β : B λεμφοκύτταρα
 1γ,2γ: T λεμφοκύτταρα
 1δ,2δ: Μονοκύτταρα
 συγκρίνοντας τις σειρές 1α με 2α, 1β με 2β, 1γ με 2γ, 1δ με 2δ, διακρίνουμε ζώνες ίδιου μεγέθους .
 M δείκτης μεγέθους 100-1000 βάσεις

5 Δημιουργία βιβλιοθήκης θέσεων ενσωμάτωσης με τη μέθοδο DSCP-PCR

Ολικό DNA απομονωμένο από T λεμφοκυτταρική σειρά και κοκκιοκυτταρική σειρά από ADA-SCID ασθενή έπειτα από γονιδιακή θεραπεία με τον φορέα SFada/W υποβλήθηκε σε ανάλυση των θέσεων ενσωμάτωσης το φορέα με τη μέθοδο DSCP-PCR. Ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων της δεύτερης αντίδρασης PCR και υποκλωνοποίηση αυτών στο πλασμίδιο TOPO[®] PCR4 για την ταυτοποίηση των αλληλουχιών που περιέχουν τις θέσεις ενσωμάτωσης. Οι βακτηριδιακές αποικίες που αναπτύχθηκαν ελέγχθηκαν με αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές M13 για την ύπαρξη ενθέτων και για την εκτίμηση των μεγεθών αυτών. Στην εικόνα 6 απεικονίζονται μερικά από τα αποτελέσματα αυτά, όπου ζώνες όμοιων μεγεθών εμφανίζονται στις σειρές των κλώνων που εξετάστηκαν. Από κάθε κυτταρική σειρά εξετάστηκαν οι αλληλουχίες 30 θέσεων ενσωμάτωσης. Από αυτές 28 που προέρχονταν από τα κοκκιοκύτταρα και 27 από τα T λεμφοκύτταρα προσδιορίστηκαν επακριβώς με υψηλή ποιότητα. Από τις προσδιορισμένες αλληλουχίες 12 από τα κοκκιοκύτταρα και 15 από τα T λεμφοκύτταρα αποτελούσαν προϊόντα PCR του εσωτερικού τμήματος του προιού όπως ήταν αναμενόμενο. Από τις υπόλοιπες 16 αλληλουχίες από τα κοκκιοκύτταρα

οι 14 αποτέλεσαν γνήσιες θέσεις ενσωμάτωσης ενώ οι δύο ήταν μη ειδικές (δεν κάλυψαν τα κριτήρια που περιγράφονται στα υλικά και μέθοδοι). Στις 14 ειδικές θέσεις ενσωμάτωσης υπήρχαν 13 διαφορετικές μεταξύ τους και μια διπλή. Όσον αφορά τα T λεμφοκύτταρα από τις 13 αλληλουχίες που διαβάστηκαν, οι 11 αποτέλεσαν γνήσιες θέσεις ενσωμάτωσης, ενώ οι δύο ήταν μη ειδικές. Ωστόσο η διαφορετικότητα μεταξύ των θέσεων ενσωμάτωσης ήταν πολύ μικρότερη (ανιχνεύτηκαν 4 που αφορούσαν έναν κλώνο, τρεις που αφορούσαν έναν άλλο κλώνο) (πίνακας 1). Η διαφορετικότητα των θέσεων ενσωμάτωσης που ανιχνεύονται στην κοκκιοκυτταρική σειρά δείχνει την πολυκλωνική σύνθεση των προϊόντων της PCR αντίδρασης ενός πολυκλωνικού DNA υποστρώματος και υποστηρίζει την υψηλή πληροφοριακή δυναμική της βιβλιοθήκης που παράγει η μέθοδος DSCP-PCR. Η αρκετά μικρότερη διαφορετικότητα των θέσεων ενσωμάτωσης που παρατηρείται στα T λεμφοκύτταρα εξηγείται από το αναπτυξιακό πλεονέκτημα που έχουν τα διορθωμένα T λεμφοκύτταρα με το εξωγενές φυσιολογικό ADA διαγονίδιο.

Εικόνα 6

Ανίχνευση με PCR των ενθέτων που έχουν υποκλωνοποιηθεί στον φορέα TOPO PCR4 για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας τους . Οι επάνω σειρές (1-12) περιέχουν ένθετα από κοκκιοκυτταρικούς κλώνους ενώ οι κάτω σειρές περιέχουν ένθετα από T λεμφοκυτταρικούς κλώνους. Οπως μπορεί να διαπιστωθεί τα μεγέθη των ζωνών βρίσκονται στο φάσμα μεταξύ 250 και 350 βάσεων.

M : δείκτης μεγέθους 100-1000 βάσεις

Τ λεμφοκύτταρα

Κλώνος	Χρωμόσωμα	Αρχή	Τέλος	Μήκος	Ομοιότητα%
1	7	30426162	30426332	170	96.15
2	3	79588293	79588531	238	98.32
3	13	110608023	110608275	252	97.40
4	8	114162259	114162539	280	96.30
5	2	156194677	156194900	223	97.86
6	7	30426162	30426332	170	96.15
7	15	70317281	70317405	124	99.04
8	4	68863613	68863852	240	98.20
9	8	86434626	86434985	360	96.10
10	3	87524375	87524572	220	98.54
11	1	65101865	65102077	213	98.03
12	4	2851620	2851908	289	98.96
13	8	79117061	79117303	242	96.63
14	15	70317281	70317405	124	99.04

Κοκκιοκύτταρα

Κλώνος	Χρωμόσωμα	Αρχή	Τέλος	Μήκος	Ομοιότητα%
1	4	2851620	2851908	289	98.96
2	19	45913230	45913462	232	97.35
3	15	70317281	70317405	124	99.04
4	4	2851620	2851908	289	98.96
5	15	70317281	70317405	124	99.04
6	4	2851620	2851908	289	98.96
7	13	110608023	110608275	252	97.40
8	2	58242145	58242363	218	98.27
9	4	2851620	2851908	289	98.96
10	1	25221647	25221952	305	97.77
11	15	70317281	70317405	124	99.04

Πίνακας 1

Δεδομένα από την ανάλυση των θέσεων ενσωμάτωσης του ρετροϊκού φορέα SFada/W στο γονιδίωμα κοκκιοκυτταρικών και Τ λεμφοκυτταρικών κλώνων στον ADA-SCID ασθενή μετά την γονιδιακή θεραπεία. Η ανάλυση των αλληλουχιών έγινε με το λογισμικό που αναπτύχθηκε σε συνεργασία με το Bloomsbury Bioinformatics Center (University College London).

6 Ανάλυση του προφίλ της συνθέσεως των κλώνων των θέσεων ενσωμάτωσης του φορέα SFada/W με την χρήση της μεθόδου DSCP-PCR στον ADA-SCID ασθενή μετά την από τη γονιδιακή θεραπεία

Στην εικόνα 7 φαίνεται το προφίλ της συνθέσεως των κλώνων (clonal composition profile) το οποίο καθορίζεται από την διαφορετική θέση ενσωμάτωσης του φορέα SFada/W σε κάθε κλώνο. Κύριο χαρακτηριστικό σε όλες της κυτταρικές σειρές που αναλύθηκαν αποτελεί η πολυκλωνικότητα, δεδομένο το οποίο υποστηρίζει το γεγονός ότι πολλοί από τους αρχικά διαμολυσμένους κλώνους αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων διαφοροποιήθηκαν και έδωσαν γένεση στις κυτταρικές σειρές τόσο του λεμφικού όσο και του μυελικού σκέλους της αιμοποίησης.

Εικόνα 7 Προφίλ συμμετοχής κλώνων σε διαφορετικά χρονικά σημεία μετά τη γονιδιακή θεραπεία στις κυτταρικές σειρές του ασθενούς:

T : T λεμφοκύτταρα

B : B λεμφοκύτταρα

NK : NK κύτταρα

M : μονοκύτταρα

L : δείκτης μεγέθους DNA 1 kb

Με την χρήση της παραπάνω μεθόδου αναλύθηκαν επίσης πολλές αλληλουχίες από τον ADA-SCID ασθενή τόσο στην κυτταρική σειρά των Τ λεμφοκυττάρων όσο και στην κυτταρική σειρά των κοκκιοκυττάρων. Το σημαντικό δεδομένο που προκύπτει από την ανάλυση αυτή είναι η ανεύρεση κλώνων που παρουσιάζουν την ίδια θέση ενσωμάτωσης του ρετροϊκού φορέα στα Τ λεμφοκύτταρα και στα κοκκιοκύτταρα. Σύμφωνα με το ιεραρχικό μοντέλο της αιμοποίησης το Τ λεμφοκύτταρο προκύπτει από το αρχέγονο λεμφοκύτταρο (common lymphoid progenitor- CLP) ενώ το κοκκιοκύτταρο από το αρχέγονο μυελοκύτταρο (common myeloid progenitor- CMP). Τα δύο αυτά είδη αρχέγονων κυττάρων αποτελούν το πρώτο στάδιο διαφοροποίησης του αρχέγονου πολυδύναμου αιμοποιητικού κυττάρου και δίνουν γένεση το πρώτο (CLP) στο λεμφικό σκέλος και το δεύτερο (CMP) στο μυελικό σκέλος της αιμοποίησης. Η παρουσία κοινών θέσεων ενσωμάτωσης στα δύο διαφορετικά σκέλη της αιμοποίησης αποδεικνύει το κύτταρο το οποίο έχει αρχικά διαμολυνθεί είναι το αρχέγονο πολυδύναμο αιμοποιητικό κύτταρο. Παρακάτω παρατίθενται οι αλληλουχίες που προκύπτουν από την συμβολή του προϋού με το γονίδιο του κυττάρου κατά την ενσωμάτωση του ρετροϊκού φορέα , ενώ στην εικόνα 8 τα αποτελέσματα της αναλύσεως ως προς τη θέση της ενσωμάτωσης (αν βρίσκεται μέσα σε γονίδιο ή όχι, η πόσο κοντά βρίσκεται σε κάποιον υποκινητή).

Χρωμόσωμα 4

5' —
CCTTGATCTGAACTTCTCTATTCTTTGGTTTGGTATTTTTCCATGCCTTGCAAAATGGCGTTAC
TGCAGCTAGCTTGCCAAACCTACAGGTGGGGTCTTTCACAGCTGTCTGCTCTTCCTTTTCG
 GTTCCCTTGTTCCTTCCTGTTCCCAGAATCTTTCTCTGTTAACATAATCAAAACCAAAATT
 CTCCCGTAAAGGCCAGTAACCAGCTATGCCAGAGAAGCACTGCTGGCCAGGGGCAGGG
 TGGCCCAGCCTGGGCTCTGCGAGCACAGCCCCAGCCCGGCAGTCCCTGAGGTCCCTGCG
 GGTCTCCACATTGCAGGTTTCAGAGCATGGCACTCCCCAGGTGGGCAGCAGGGACCTTG
 TACAGCTCTCTCCGTTACCCCC - 3'

Χρωμόσωμα 15

5' —
TGCCTTGCAAAATGGCGTTATTGCAGCTAGCTTGCCAAACCTACAGGTGGGGTCTTTCAAA
 ATAGCCATCTACTCTGTACCCAGAACTAATGAAGAAAATAGTTCTTTTCCTGACCCTAGTC
 CTAACCAAGCATGTCTAGGTCTATGAAGTGAGACTGCTTGAGCCCAGGACTACATGAAAA
 - 3'

Χρωμόσωμα 4

Query	%ID	Length	Chr	Hit Start	Hit End	in gene?	5' gene			5' exon	3' exon	Map View	Hit Seq	Hit+ flank seq	Query
							Name	5'gene dist							
shared	99.0	288/678	4	2851620	2851907	YES	ENSG00000087266	19661		ENSE00001433703	ENSE00001338971	Map View	Hit Seq	Hit + 500bp Flanking Seq	shared

Χρωμόσωμα 15

Query	%ID	Length	Chr	Hit Start	Hit End	in gene?	5' gene		3' gene		5' exon	3' exon	Map View	Hit Seq	Hit+ flank seq	Query
							Name	5'gene dist	Name	3'gene dist						
shared2	100.0	124/201	15	70317281	70317404	NO	ENSG00000067225	6543	ENSG00000137817	3173			Map View	Hit Seq	Hit + 500bp Flanking Seq	shared2

Εικόνα 8 Σχηματική Απεικόνιση της συμβολής μεταξύ του LTR του ιού και του γονιδιώματος του κυττάρου. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται το τελικό τμήμα του LTR του ιού που συναντάται πάντα στη συμβολή της ενσωμάτωσης. στους πίνακες που ακολουθούν περιγράφεται η ταυτότητα της ενσωμάτωσης όπως προκύπτει από την ανάλυση με λογισμικό που έχει αναπτυχθεί για το σκοπό αυτό.

Συζήτηση

Στο πλαίσιο των κλινικών δοκιμών της γονιδιακής θεραπείας με ρετροϊκούς φορείς η παρακολούθηση των θέσεων ενσωμάτωσης των φορέων αυτών στα κύτταρα του ασθενούς είναι πολύ σημαντική. Τόσο η ταυτοποίηση των θέσεων ενσωμάτωσης (ο προσδιορισμός της αλληλουχίας τους) όσο και η ανάλυση του προφίλ των κυττάρων-κλώνων που φέρουν διάφορες θέσεις ενσωμάτωσης μας παρέχουν πολύ χρήσιμα δεδομένα για την αξιολόγηση της ασφάλειας του ρετροϊκού φορέα. Η αποδοτικότητα και η αξιοπιστία της μεθόδου ανάλυσης είναι απαραίτητες για την επίτευξη ενός αντιπροσωπευτικού προφίλ ασφαλείας. Στην παρούσα διατριβή παρουσιάζουμε μια νέα μέθοδο η οποία βασίζεται στην αντίδραση πολυμεράσης σχεδιασμένη κυρίως για την ανάλυση των κλινικών δειγμάτων. Η DSCP-PCR παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι δεν περιέχει το στάδιο της πρόσδεσης του linker και έτσι μπορεί να εφαρμοστεί σε αρχικό υπόστρωμα DNA πολύ μικρής ποσότητας (<30 νανο- γραμμάρια) σε αντίθεση με τις μεθόδους που εξαρτώνται στην αντίδραση λιγάσης και χρειάζονται αρκετά περισσότερη ποσότητα DNA. Η δυνατότητα αυτή είναι πολύ χρήσιμη ειδικά σε παιδιατρικούς ασθενείς όπου για το διαθέσιμο DNA είναι πάρα πολύ περιορισμένο. Επίσης η DSCP-PCR έχει την δυνατότητα να ανιχνεύει θέσεις ενσωμάτωσης οι οποίες αντιπροσωπεύονται από πολύ μικρό αριθμό αντιγράφων σε έναν πολυκλωνικά διαμολυσμένο πληθυσμό κυττάρων. Στην περίπτωση που το DNA προέρχεται από ανάπτυξη μονοκλωνικών πληθυσμών κυττάρων σε πειράματα *in-vitro* , όπου είναι πιθανόν να υπάρχουν μόνο 1-2 θέσεις ενσωμάτωσης η DSCP-PCR έχει πολύ υψηλότερες πιθανότητες ανίχνευσης αυτών, αφού δεν παρουσιάζει τις γνωστές αποκλίσεις (biases) των προηγούμενων μεθόδων και είναι θεωρητικά ικανή να ανιχνεύσει οποιαδήποτε θέση ενσωμάτωσης.

Ο πρώτος στόχος στην ανάπτυξη στην DSCP-PCR ήταν η παραγωγή μιας υψηλής ποιότητας βιβλιοθήκης αλληλουχιών που περιέχουν διάφορες θέσεις ενσωμάτωσης. Για την επίτευξη του στόχου αυτού είναι απαραίτητη η γένεση amplicons τα οποία να έχουν παρόμοιο μέγεθος γεγονός που συνεπάγεται την ίδια δυνατότητα υποκλωνοποίησης στο πλασμίδιο για την ταυτοποίηση των αλληλουχιών. Το φάσμα των μεγεθών των τμημάτων που περιέχουν την συμβολή προ-ιού -γονιδιώματος του κυττάρου στην μέθοδο DSCP-PCR καθορίζεται από τον χρόνο του πρώτου σταδίου της γραμμικής αντίδρασης

πολυμεράσης. Με την χρήση μικρών χρονικών διαστημάτων (<30 δευτερόλεπτα) σε αυτό το στάδιο των εκατό κύκλων μπορούν να επιτευχθούν τμήματα DNA με μέγεθος μεταξύ 200-350 βάσεων. Η δυνατότητα υποκλωνοποίησης τμημάτων αυτών είναι παρόμοια και επομένως η απόδοση της ανίχνευσης κανονικοποιείται ανάμεσα σε διαφορετικές θέσεις ενσωμάτωσης. Πειραματικά δεδομένα που ενισχύουν το γεγονός αυτό παρουσιάζονται στην εικόνα 6 των αποτελεσμάτων όπου παρατηρούμε ότι τα προϊόντα της ηλεκτροφόρησης που ανήκουν σε διαφορετικές θέσεις ενσωμάτωσης παρουσιάζουν παρόμοιο μέγεθος. Με τον τρόπο αυτόν μπορούν να παραχθούν δεδομένα αλληλουχιών από έναν διαμολυσμένο πολυκλωνικό πληθυσμό κυττάρων με υψηλή απόδοση. Στις μεθόδους όπως η LAM-PCR και η LM-PCR το στάδιο αυτό δεν μπορεί να ελεγχθεί λόγω της απρόβλεπτης απόστασης δράσης του περιοριστικού ενζύμου από την συμβολή προ-ιού – γονιδιώματος κυττάρου της θέσεως ενσωμάτωσης.

Όσον αφορά την ευαισθησία της DSCP-PCR, αυτή είναι αυξημένη λόγω της ανεξάρτητης της μεθόδου από το στάδιο της πρόσδεσης του linker με την αντίδραση λιάσης η οποία όπως είναι γνωστό είναι μη αποδοτική και περιορίζει την όλη διαδικασία. Η ανίχνευση θέσεων ενσωμάτωσης από DNA κυττάρων CD 34+ που έχουν διαμολυνθεί με φορείς με χαμηλό MOI όπως φαίνεται στην εικόνα 4 υποδεικνύει υψηλή ευαισθησία δεδομένου ότι με τις προηγούμενες μεθόδους δεν υπήρχε για ανίχνευση σε αυτό το επίπεδο. Εξίσου σημαντικό είναι το γεγονός της ειδικότητας της μεθόδου το οποίο αποδεικνύεται από από τον υψηλό λόγο ειδικών / μη ειδικών προϊόντων όπως προκύπτει μετά την ταυτοποίηση των αλληλουχιών.

Ο δεύτερος στόχος της ανάλυσης των θέσεων ενσωμάτωσης στο πλαίσιο των κλινικών δοκιμών είναι η παρακολούθηση στο χρόνο του προφίλ των κυττάρων κλώνων που υπερισχύουν μετά την γονιδιακή θεραπεία. Κάθε κλώνος προκύπτει από την διαίρεση του αρχικά διαμολυσμένου αρχέγονου κυττάρου και ταυτοποιείται από την ύπαρξη της μοναδικής θέσης ενσωμάτωσης του φορέα. Η αξία της παρακολούθησης του προφίλ συμμετοχής των κλώνων με βάση τις θέσεις ενσωμάτωσης του φορέα που περιέχουν δεν είναι γνωστή προς το παρόν αλλά έχει δειχθεί ότι διαφορετικοί κλώνοι συμβάλλουν στα αρχικά και στα τελικά στάδια της αιμοποίησης στον άνθρωπο^{209;210}. Οι Schmidt και συν. σε μια μελέτη ανάλυσης των θέσεων ενσωμάτωσης σε ADA-SCID νεογνά μετά από γονιδιακή θεραπεία ανέφεραν την υπεροχή ενός T λεμφοκυτταρικού

κλώνου από τους 9 μέχρι τους 24 μήνες μετά την διαμόλυνση αλλά όχι και μέσα στους πρώτους 9 μήνες²¹¹. Η χρήση σε συστήματος ηλεκτροφόρησης υψηλής ανάλυσης για το διαχωρισμό των προϊόντων της DSCP-PCR επιτρέπει την οπτική σύγκριση των προφίλ της συμμετοχής των κλώνων διαφορετικών κυτταρικών σειρών του ασθενούς. Η οπτική αυτή μελέτη και σύγκριση ενισχύεται από την χρήση ενός ενζύμου περιορισμού για την κατάτμηση του DNA στο πρώτο στάδιο της μεθόδου. Η κατάτμηση αυτή δημιουργεί τμήματα DNA των οποίων το μέγεθος καθορίζεται από τη θέση κατάτμησης του ενζύμου ως προς τη θέση της συμβολής. Η εφαρμογή της μεθόδου DSCP-PCR χωρίς το πρώτο στάδιο της κατάτμησης με περιοριστικό ένζυμο θα οδηγούσε σε τελικά προϊόντα παρόμοιου μεγέθους τα οποία δεν θα μπορούσαν να διαχωριστούν στην τελική ανάλυση με ηλεκτροφόρηση υψηλής ανάλυσης. Όσον αφορά την περαιτέρω εκτίμηση των δεδομένων που προκύπτουν από την ανάλυση με ηλεκτροφόρηση μπορούμε να πούμε ότι ενώ υπάρχει υψηλός συσχετισμός μεταξύ του μεγέθους της ζώνης και της ταυτότητας της θέσεως ενσωμάτωσης, δεν υπάρχει αντίστροφος συσχετισμός μεταξύ της έντασης της ζώνης και της επικράτησης ή υπεροχής ενός κλώνου. Όπως φαίνεται στην εικόνα 5 η ένταση των ζωνών δεν έχει την ίδια επανάληψιμότητα όταν συγκρίνουμε σειρές ιδίων δειγμάτων σε δύο διαφορετικά πειράματα. Οι διαφορές στην ένταση μιας ζώνης ίδιου δείγματος σε δύο διαφορετικά πειράματα είναι πιο έντονες όταν η ένταση βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα. Στις εντάσεις υψηλότερων επιπέδων το φαινόμενο αυτό αμβλύνεται. Το γεγονός αυτό πιθανώς μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι οι ζώνες χαμηλής έντασης αντιπροσωπεύουν κλώνους οι οποίοι έχουν πολύ χαμηλή εκπροσώπηση στον κυτταρικό πληθυσμό και τα προϊόντα από την αντίδραση πολυμεράσης που παράγονται από το DNA των κλώνων αυτών είναι πιο επιρρεπή σε στοχαστικά φαινόμενα εγγενή της αντίδρασης PCR αυτής καθ' αυτής. Στο φαινόμενο αυτό πιθανώς επίσης να συμβάλει και η αρχική πολύ χαμηλή συγκέντρωση του DNA από τα δείγματα του ασθενούς.

Η κύρια διαφορά ανάμεσα στην DSCP-PCR και στις υπάρχουσες μεθόδους βρίσκεται ουσιαστικά στο μηχανισμό συνθέσεως της συμπληρωματικής αλυσίδας. Η δραστηριότητα πολυμεράσης του ενζύμου Klenow συνθέτει την συμπληρωματική αλυσίδα χρησιμοποιώντας ως μήτρα την βιοτινυλιωμένη μόνη αλυσίδα (εικόνα 1β). Η νεο- σχηματισμένη αλυσίδα είναι η μόνη απαραίτητη για τον πρώτο κύκλο της ενίσχυσης με PCR καθώς υπάρχει πρόσδεση μόνο του εκκινητή LTR. Αντιθέτως οι επόμενοι

κύκλοι της αντίδρασης είναι εκθετικού τύπου με απαραίτητους και τους δύο εκκινητές LTR και DS1. Μετά από n κύκλους αντίδρασης ο αριθμός των παραγόμενων μορίων DNA είναι $2\exp(n-1)$. Αυτό συμβαίνει διότι το μόριο DNA που παράγεται κατά τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας περιέχει ένα σπάσιμο (nick) στην περίπτωση που ο DSH εκκινητής προσδένεται και μετά έξι νουκλεοτίδια αυτού στην μονή αλυσίδα ή ένα χάσμα (gap) στην περίπτωση που ο DSH εκκινητής προσδένεται με λιγότερα από έξι νουκλεοτίδια. Επίσης υπάρχει η δυνατότητα δράσης και ενός αλλού μηχανισμού. Το ένζυμο Klenow πολυμεράση έχει την ικανότητα να απομακρύνει το ολιγονουκλεοτίδιο που ανήκει στο τμήμα διπλής αλυσίδας του DSH εκκινητή και να προσθέσει τα νουκλεοτίδια της βιοτινυλιωμένης αλυσίδας που λείπουν²¹². Το αποτέλεσμα είναι τελικά η δημιουργία ενός άθικτου μορίου DNA διπλής έλικας που αποτελεί υπόστρωμα για τις PCR αντιδράσεις. Στην περίπτωση αυτή στον πρώτο κύκλο της αντίδρασης PCR προσδένονται και οι δύο εκκινητές LTR και DS1 και συνεπώς όλοι οι κύκλοι (n) είναι εκθετικοί με αριθμό παραγόμενων μορίων $2\exp(n)$.

Η μέθοδος DSCP-PCR μπορεί να προσαρμοσθεί πολύ εύκολα για την ανάλυση διαφορετικών τύπων φορέων αυτό χρειάζεται μόνο το σχεδιασμό 3 εκκινητών (τον βιοτινυλιωμένο του πρώτου σταδίου της γραμμικής ενίσχυσης και δύο για τις επόμενες αντιδράσεις πολυμεράσης). Η μέθοδος αποδείχθηκε εξίσου αποδοτική κατά την ανάλυση δειγμάτων DNA κυττάρων επίμυων που είχαν διαμολυνθεί με τον ρετροϊκό φορέα MFG. Ο εκφυλισμός του DSH εκκινητή δίνει τη δυνατότητα χρήσης οποιουδήποτε ενζύμου περιορισμού κατά την δημιουργία του προφίλ συμμετοχής κλώνων. Η ειδικότητα της μεθόδου ως προς τον φορέα εξαρτάται μόνο από τις αντιδράσεις πολυμεράσης σε όλη τη διαδικασία και συνεπώς μπορεί να βελτιστοποιηθεί σε μικρό χρόνο.

Συμπερασματικά η μέθοδος DSCP-PCR μπορεί να συμβάλει σε γρήγορη και υψηλής ποιότητας ανάλυση κλινικών δειγμάτων στην γονιδιακή θεραπεία για την παρακολούθηση του προφίλ ασφαλείας των φορέων που χρησιμοποιούνται στις τρέχουσες κλινικές δοκιμές.

Βιβλιογραφία

Βιβλιογραφία

1. Verma, I.M. and M.D. Weitzman. 2005. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu. Rev. Biochem.* 74:711-738.
2. Somia, N. and I.M. Verma. 2000. Gene therapy: trials and tribulations. *Nat. Rev. Genet.* 1:91-99.
3. Verma, I.M. and R.K. Naviaux. 1991. Human gene therapy. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1:54-59.
4. Bank, A., R. Dorazio, and P. Leboulch. 2005. A Phase I/II Clinical Trial of {beta}-Globin Gene Therapy for {beta}-Thalassemia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1054:308-316.
5. Sadelain, M., L. Lisowski, S. Samakoglu, S. Rivella, C. May, and I. Riviere. 2005. Progress Toward the Genetic Treatment of the {beta}-Thalassemias. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1054:78-91.
6. Malik, P. and P.I. Arumugam. 2005. Gene Therapy for {beta}-Thalassemia. *Hematology. (Am. Soc. Hematol. Educ. Program.)* 45-50.
7. Schrier, S. 2004. New treatment options for thalassemia. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* 2:783-784.
8. Deng, W.P., C.C. Wu, C.C. Lee, W.K. Yang, H.E. Wang, R.S. Liu, H.J. Wei, J.G. Gelovani, J.J. Hwang, D.M. Yang, Y.K. Fu, and C.W. Wu. 2006. Serial in vivo imaging of the lung metastases model and gene therapy using HSV1-tk and ganciclovir. *J. Nucl. Med.* 47:877-884.

9. Ossevoort,M., A.Zaldumbide, S.J.Cramer, E.I.van der Voort, R.E.Toes, and R.C.Hoeben. 2006. Characterization of an immuno 'stealth' derivative of the herpes simplex virus thymidine-kinase gene. *Cancer Gene Ther.* 13:584-591.
10. Young,M., N.Overlid, K.Konopka, and N.Duzgunes. 2005. Gene therapy for oral cancer: efficient delivery of a 'suicide gene' to murine oral cancer cells in physiological milieu. *J.Calif.Dent.Assoc.* 33:967-971.
11. Yang,S.H., T.K.Oh, and S.T.Kim. 2005. Increased anti-tumor effect by a combination of HSV thymidine kinase suicide gene therapy and interferon-gamma/GM-CSF cytokine gene therapy in CT26 tumor model. *J.Korean Med.Sci.* 20:932-937.
12. Rondinone,C.M. 2006. Therapeutic potential of RNAi in metabolic diseases. *Biotechniques* Suppl:31-36.
13. Gaur,R.K. 2006. RNA interference: a potential therapeutic tool for silencing splice isoforms linked to human diseases. *Biotechniques* Suppl:15-22.
14. Lage,H. 2005. Potential applications of RNA interference technology in the treatment of cancer. *Future.Oncol.* 1:103-113.
15. Bertoni,C., G.E.Morris, and T.A.Rando. 2005. Strand bias in oligonucleotide-mediated dystrophin gene editing. *Hum.Mol.Genet.* 14:221-233.

16. Gruenert,D.C., E.Bruscia, G.Novelli, A.Colosimo, B.Dallapiccola, F.Sangiuolo, and K.K.Goncz. 2003. Sequence-specific modification of genomic DNA by small DNA fragments. *J.Clin.Invest* 112:637-641.
17. Durai,S., M.Mani, K.Kandavelou, J.Wu, M.H.Porteus, and S.Chandrasegaran. 2005. Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 33:5978-5990.
18. Barquinero,J., H.Eixarch, and M.Perez-Melgosa. 2004. Retroviral vectors: new applications for an old tool. *Gene Ther.* 11 Suppl 1:S3-S9.
19. Anderson,J.L. and T.J.Hope. 2005. Intracellular trafficking of retroviral vectors: obstacles and advances. *Gene Ther.* 12:1667-1678.
20. Lever,A.M., P.M.Strappe, and J.Zhao. 2004. Lentiviral vectors. *J.Biomed.Sci.* 11:439-449.
21. Naldini,L. and I.M.Verma. 2000. Lentiviral vectors. *Adv.Virus Res.* 55:599-609.
22. Kafri,T., H.van Praag, F.H.Gage, and I.M.Verma. 2000. Lentiviral vectors: regulated gene expression. *Mol.Ther.* 1:516-521.
23. Dropulic,B. 2005. Genetic modification of hematopoietic cells using retroviral and lentiviral vectors: safety considerations for vector design and delivery into target cells. *Curr.Hematol.Rep.* 4:300-304.

24. Ralph,G.S., K.Binley, L.F.Wong, M.Azzouz, and N.D.Mazarakis. 2006. Gene therapy for neurodegenerative and ocular diseases using lentiviral vectors. *Clin.Sci.(Lond)* 110:37-46.
25. Manilla,P., T.Rebello, C.Afable, X.Lu, V.Slepushkin, L.M.Humeau, K.Schonely, Y.Ni, G.K.Binder, B.L.Levine, R.R.MacGregor, C.H.June, and B.Dropulic. 2005. Regulatory considerations for novel gene therapy products: a review of the process leading to the first clinical lentiviral vector. *Hum.Gene Ther.* 16:17-25.
26. Teschemacher,A.G., S.Wang, T.Lonergan, H.Duale, H.Waki, J.F.Paton, and S.Kasparov. 2005. Targeting specific neuronal populations using adeno- and lentiviral vectors: applications for imaging and studies of cell function. *Exp.Physiol* 90:61-69.
27. Malik,P., P.I.Arumugam, J.K.Yee, and G.Puthenveetil. 2005. Successful Correction of the Human Cooley's Anemia {beta}-Thalassemia Major Phenotype Using a Lentiviral Vector Flanked by the Chicken Hypersensitive Site 4 Chromatin Insulator. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1054:238-249.
28. Bangari,D.S. and S.K.Mittal. 2006. Development of nonhuman adenoviruses as vaccine vectors. *Vaccine* 24:849-862.
29. Maeda,M., K.Namikawa, I.Kobayashi, N.Ohba, Y.Takahara, C.Kadono, A.Tanaka, and H.Kiyama. 2006. Targeted gene therapy toward astrocytoma using a Cre/loxP-based adenovirus system. *Brain Res.* 1081:34-43.

30. Mathis,J.M., M.A.Stoff-Khalili, and D.T.Curiel. 2005. Oncolytic adenoviruses - selective retargeting to tumor cells. *Oncogene* 24:7775-7791.
31. Ko,D., L.Hawkins, and D.C.Yu. 2005. Development of transcriptionally regulated oncolytic adenoviruses. *Oncogene* 24:7763-7774.
32. Mizuguchi,H. and T.Hayakawa. 2004. Targeted adenovirus vectors. *Hum.Gene Ther.* 15:1034-1044.
33. McConnell,M.J. and M.J.Imperiale. 2004. Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Hum.Gene Ther.* 15:1022-1033.
34. Verma,I. 1999. Potential of adenovirus as a vector for sustained gene expression. *J.Gene Med.* 1:64-66.
35. Roth,J.A. 2006. Adenovirus p53 gene therapy. *Expert.Opin.Biol.Ther.* 6:55-61.
36. Kaplan,J.M. 2005. Adenovirus-based cancer gene therapy. *Curr.Gene Ther.* 5:595-605.
37. Kanerva,A. and A.Hemminki. 2004. Modified adenoviruses for cancer gene therapy. *Int.J.Cancer* 110:475-480.
38. Verma,I. 1999. Potential of adenovirus as a vector for sustained gene expression. *J.Gene Med.* 1:64-66.
39. Nazir,S.A. and J.P.Metcalf. 2005. Innate immune response to adenovirus. *J.Investig.Med.* 53:292-304.

40. Alba,R., A.Bosch, and M.Chillon. 2005. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther.* 12 Suppl 1:S18-S27.
41. Gentry,B.G., P.D.Boucher, and D.S.Shewach. 2006. Hydroxyurea induces bystander cytotoxicity in cocultures of herpes simplex virus thymidine kinase-expressing and nonexpressing HeLa cells incubated with ganciclovir. *Cancer Res.* 66:3845-3851.
42. Latchman,D.S. 2005. Herpes simplex virus-based vectors for the treatment of cancer and neurodegenerative disease. *Curr.Opin.Mol.Ther.* 7:415-418.
43. Argnani,R., M.Lufino, M.Manservigi, and R.Manservigi. 2005. Replication-competent herpes simplex vectors: design and applications. *Gene Ther.* 12 Suppl 1:S170-S177.
44. Senior,S.L. and R.Wade-Martins. 2005. Herpes simplex virus type 1 amplicon vectors for the infectious delivery and expression of genomic DNA loci. *Curr.Opin.Mol.Ther.* 7:337-345.
45. Glorioso,J.C. and D.J.Fink. 2004. Herpes vector-mediated gene transfer in treatment of diseases of the nervous system. *Annu.Rev.Microbiol.* 58:253-271.
46. Oehmig,A., C.Fraefel, and X.O.Breakefield. 2004. Update on herpesvirus amplicon vectors. *Mol.Ther.* 10:630-643.

47. Calderwood,M.A., R.E.White, and A.Whitehouse. 2004. Development of herpesvirus-based episomally maintained gene delivery vectors. *Expert.Opin.Biol.Ther.* 4:493-505.
48. Gentry,B.G., P.D.Boucher, and D.S.Shewach. 2006. Hydroxyurea induces bystander cytotoxicity in cocultures of herpes simplex virus thymidine kinase-expressing and nonexpressing HeLa cells incubated with ganciclovir. *Cancer Res.* 66:3845-3851.
49. Epstein,A.L. and R.Manservigi. 2004. Herpesvirus/retrovirus chimeric vectors. *Curr.Gene Ther.* 4:409-416.
50. Oehmig,A., C.Fraefel, X.O.Breakefield, and M.Ackermann. 2004. Herpes simplex virus type 1 amplicons and their hybrid virus partners, EBV, AAV, and retrovirus. *Curr.Gene Ther.* 4:385-408.
51. Nishikawa,M., Y.Takakura, and M.Hashida. 2005. Pharmacokinetics of plasmid DNA-based non-viral gene medicine. *Adv.Genet.* 53:47-68.
52. Conwell,C.C. and L.Huang. 2005. Recent advances in non-viral gene delivery. *Adv.Genet.* 53:3-18.
53. Chen,W.C. and L.Huang. 2005. Non-viral vector as vaccine carrier. *Adv.Genet.* 54:315-337.
54. Miao,C.H. 2005. A novel gene expression system: non-viral gene transfer for hemophilia as model systems. *Adv.Genet.* 54:143-177.

55. Medina-Kauwe,L.K., J.Xie, and S.Hamm-Alvarez. 2005. Intracellular trafficking of nonviral vectors. *Gene Ther.* 12:1734-1751.
56. Dean,D.A., D.D.Strong, and W.E.Zimmer. 2005. Nuclear entry of nonviral vectors. *Gene Ther.* 12:881-890.
57. Alton,E.W. 2004. Use of nonviral vectors for cystic fibrosis gene therapy. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 1:296-301.
58. Montier,T., P.Delepine, C.Pichon, C.Ferec, D.J.Porteous, and P.Midoux. 2004. Non-viral vectors in cystic fibrosis gene therapy: progress and challenges. *Trends Biotechnol.* 22:586-592.
59. Rodriguez,E.G. 2004. Nonviral DNA vectors for immunization and therapy: design and methods for their obtention. *J.Mol.Med.* 82:500-509.
60. Kostarelos,K. and A.D.Miller. 2005. Synthetic, self-assembly ABCD nanoparticles; a structural paradigm for viable synthetic non-viral vectors. *Chem.Soc.Rev.* 34:970-994.
61. Lungwitz,U., M.Breunig, T.Blunk, and A.Gopferich. 2005. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *Eur.J.Pharm.Biopharm.* 60:247-266.
62. Wang,X.P., K.Yazawa, N.S.Templeton, J.Yang, S.Liu, Z.Li, M.Li, Q.Yao, C.Chen, and F.C.Brunicardi. 2005. Intravenous delivery of liposome-mediated nonviral DNA is less toxic than intraperitoneal delivery in mice. *World J.Surg.* 29:339-343.

63. Aris,A. and A.Villaverde. 2004. Modular protein engineering for non-viral gene therapy. *Trends Biotechnol.* 22:371-377.
64. Conese,M., C.Auriche, and F.Ascenzioni. 2004. Gene therapy progress and prospects: episomally maintained self-replicating systems. *Gene Ther.* 11:1735-1741.
65. Yoo,H.S., O.Mazda, H.Y.Lee, J.C.Kim, S.M.Kwon, J.E.Lee, I.C.Kwon, H.Jeong, Y.S.Jeong, and S.Y.Jeong. 2006. In vivo gene therapy of type I diabetic mellitus using a cationic emulsion containing an Epstein Barr Virus (EBV) based plasmid vector. *J.Control Release* 112:139-144.
66. Mazda,O. 2002. Improvement of nonviral gene therapy by Epstein-Barr virus (EBV)-based plasmid vectors. *Curr.Gene Ther.* 2:379-392.
67. Cui,F.D., T.Kishida, S.Ohashi, H.Asada, K.Yasutomi, E.Satoh, T.Kubo, S.Fushiki, J.Imanishi, and O.Mazda. 2001. Highly efficient gene transfer into murine liver achieved by intravenous administration of naked Epstein-Barr virus (EBV)-based plasmid vectors. *Gene Ther.* 8:1508-1513.
68. Franken,M., A.Estabrooks, L.Cavacini, B.Sherburne, F.Wang, and D.T.Scadden. 1996. Epstein-Barr virus-driven gene therapy for EBV-related lymphomas. *Nat.Med.* 2:1379-1382.
69. He,J. and Z.Q.Zhang. 2005. [Progress of EBNA1/oriP-based plasmid applied in gene therapy]. *Sheng Wu Gong.Cheng Xue.Bao.* 21:507-510.

70. Bashaw,J.M. and J.L.Yates. 2001. Replication from oriP of Epstein-Barr virus requires exact spacing of two bound dimers of EBNA1 which bend DNA. *J.Virol.* 75:10603-10611.
71. Hsieh,D.J., S.M.Camiolo, and J.L.Yates. 1993. Constitutive binding of EBNA1 protein to the Epstein-Barr virus replication origin, oriP, with distortion of DNA structure during latent infection. *EMBO J.* 12:4933-4944.
72. He,J. and Z.Q.Zhang. 2005. [Progress of EBNA1/oriP-based plasmid applied in gene therapy]. *Sheng Wu Gong.Cheng Xue.Bao.* 21:507-510.
73. Bashaw,J.M. and J.L.Yates. 2001. Replication from oriP of Epstein-Barr virus requires exact spacing of two bound dimers of EBNA1 which bend DNA. *J.Virol.* 75:10603-10611.
74. Leight,E.R. and B.Sugden. 2000. EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. *Rev.Med.Virol.* 10:83-100.
75. He,J. and Z.Q.Zhang. 2005. [Progress of EBNA1/oriP-based plasmid applied in gene therapy]. *Sheng Wu Gong.Cheng Xue.Bao.* 21:507-510.
76. Humme,S., G.Reisbach, R.Feederle, H.J.Delecluse, K.Bousset, W.Hammerschmidt, and A.Schepers. 2003. The EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) enhances B cell immortalization several thousandfold. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:10989-10994.

77. Chuang,T.C., Y.J.Lee, J.Y.Liu, Y.S.Lin, J.W.Li, V.Wang, S.L.Law, and M.C.Kao. 2003. EBNA1 may prolong G(2)/M phase and sensitize HER2/neu-overexpressing ovarian cancer cells to both topoisomerase II-targeting and paclitaxel drugs. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 307:653-659.
78. Black,J. and J.M.Vos. 2002. Establishment of an oriP/EBNA1-based episomal vector transcribing human genomic beta-globin in cultured murine fibroblasts. *Gene Ther.* 9:1447-1454.
79. Bashaw,J.M. and J.L.Yates. 2001. Replication from oriP of Epstein-Barr virus requires exact spacing of two bound dimers of EBNA1 which bend DNA. *J.Virol.* 75:10603-10611.
80. Leight,E.R. and B.Sugden. 2000. EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. *Rev.Med.Virol.* 10:83-100.
81. Lee,M.A., M.E.Diamond, and J.L.Yates. 1999. Genetic evidence that EBNA-1 is needed for efficient, stable latent infection by Epstein-Barr virus. *J.Virol.* 73:2974-2982.
82. Kim,A.L., M.Maher, J.B.Hayman, J.Ozer, D.Zerby, J.L.Yates, and P.M.Lieberman. 1997. An imperfect correlation between DNA replication activity of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) and binding to the nuclear import receptor, Rch1/importin alpha. *Virology* 239:340-351.

83. Yates,J.L., S.M.Camiolo, S.Ali, and A.Ying. 1996. Comparison of the EBNA1 proteins of Epstein-Barr virus and herpesvirus papio in sequence and function. *Virology* 222:1-13.
84. Shah,W.A., R.F.Ambinder, G.S.Hayward, and S.D.Hayward. 1992. Binding of EBNA-1 to DNA creates a protease-resistant domain that encompasses the DNA recognition and dimerization functions. *J.Virol.* 66:3355-3362.
85. Ambinder,R.F., M.A.Mullen, Y.N.Chang, G.S.Hayward, and S.D.Hayward. 1991. Functional domains of Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1. *J.Virol.* 65:1466-1478.
86. Hsieh,D.J., S.M.Camiolo, and J.L.Yates. 1993. Constitutive binding of EBNA1 protein to the Epstein-Barr virus replication origin, oriP, with distortion of DNA structure during latent infection. *EMBO J.* 12:4933-4944.
87. Ambinder,R.F., M.A.Mullen, Y.N.Chang, G.S.Hayward, and S.D.Hayward. 1991. Functional domains of Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1. *J.Virol.* 65:1466-1478.
88. Leight,E.R. and B.Sugden. 2000. EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. *Rev.Med.Virol.* 10:83-100.
89. Ambinder,R.F., M.A.Mullen, Y.N.Chang, G.S.Hayward, and S.D.Hayward. 1991. Functional domains of Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1. *J.Virol.* 65:1466-1478.

90. Wysokenski,D.A. and J.L.Yates. 1989. Multiple EBNA1-binding sites are required to form an EBNA1-dependent enhancer and to activate a minimal replicative origin within oriP of Epstein-Barr virus. *J.Virol.* 63:2657-2666.
91. Ossevoort,M., B.M.Visser, D.J.van den Wollenberg, E.I.van der Voort, R.Offringa, C.J.Melief, R.E.Toes, and R.C.Hoebe. 2003. Creation of immune 'stealth' genes for gene therapy through fusion with the Gly-Ala repeat of EBNA-1. *Gene Ther.* 10:2020-2028.
92. Heng,H.H., S.Goetze, C.J.Ye, G.Liu, J.B.Stevens, S.W.Bremer, S.M.Wykes, J.Bode, and S.A.Krawetz. 2004. Chromatin loops are selectively anchored using scaffold/matrix-attachment regions. *J.Cell Sci.* 117:999-1008.
93. Sumer,H., R.Saffery, N.Wong, J.M.Craig, and K.H.Choo. 2004. Effects of scaffold/matrix alteration on centromeric function and gene expression. *J.Biol.Chem.* 279:37631-37639.
94. Liebich,I., J.Bode, I.Reuter, and E.Wingender. 2002. Evaluation of sequence motifs found in scaffold/matrix-attached regions (S/MARs). *Nucleic Acids Res.* 30:3433-3442.
95. Bode,J., T.Schlake, M.Rios-Ramirez, C.Mielke, M.Stengert, V.Kay, and D.Klehr-Wirth. 1995. Scaffold/matrix-attached regions: structural properties creating transcriptionally active loci. *Int.Rev.Cytol.* 162A:389-454.

96. Gohring,F. and F.O.Fackelmayer. 1997. The scaffold/matrix attachment region binding protein hnRNP-U (SAF-A) is directly bound to chromosomal DNA in vivo: a chemical cross-linking study. *Biochemistry* 36:8276-8283.
97. Gohring,F. and F.O.Fackelmayer. 1997. The scaffold/matrix attachment region binding protein hnRNP-U (SAF-A) is directly bound to chromosomal DNA in vivo: a chemical cross-linking study. *Biochemistry* 36:8276-8283.
98. Renz,A. and F.O.Fackelmayer. 1996. Purification and molecular cloning of the scaffold attachment factor B (SAF-B), a novel human nuclear protein that specifically binds to S/MAR-DNA. *Nucleic Acids Res.* 24:843-849.
99. Sumer,H., R.Saffery, N.Wong, J.M.Craig, and K.H.Choo. 2004. Effects of scaffold/matrix alteration on centromeric function and gene expression. *J.Biol.Chem.* 279:37631-37639.
100. Bode,J., S.Winkelmann, S.Gotze, S.Spiker, K.Tsutsui, C.Bi, A K P, and C.Benham. 2006. Correlations between scaffold/matrix attachment region (S/MAR) binding activity and DNA duplex destabilization energy. *J.Mol.Biol.* 358:597-613.
101. Bode,J., C.Benham, A.Knopp, and C.Mielke. 2000. Transcriptional augmentation: modulation of gene expression by scaffold/matrix-attached regions (S/MAR elements). *Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr.* 10:73-90.
102. Rudd,S., M.Frisch, K.Grote, B.C.Meyers, K.Mayer, and T.Werner. 2004. Genome-wide in silico mapping of scaffold/matrix attachment regions in

- Arabidopsis suggests correlation of intragenic scaffold/matrix attachment regions with gene expression. *Plant Physiol* 135:715-722.
103. Sumer,H., J.M.Craig, M.Sibson, and K.H.Choo. 2003. A rapid method of genomic array analysis of scaffold/matrix attachment regions (S/MARs) identifies a 2.5-Mb region of enhanced scaffold/matrix attachment at a human neocentromere. *Genome Res.* 13:1737-1743.
 104. Liebich,I., J.Bode, M.Frisch, and E.Wingender. 2002. S/MARt DB: a database on scaffold/matrix attached regions. *Nucleic Acids Res.* 30:372-374.
 105. Benham,C., T.Kohwi-Shigematsu, and J.Bode. 1997. Stress-induced duplex DNA destabilization in scaffold/matrix attachment regions. *J.Mol.Biol.* 274:181-196.
 106. Dang,Q., J.Auten, and I.Plavec. 2000. Human beta interferon scaffold attachment region inhibits de novo methylation and confers long-term, copy number-dependent expression to a retroviral vector. *J.Virol.* 74:2671-2678.
 107. Bode,J. and K.Maass. 1988. Chromatin domain surrounding the human interferon-beta gene as defined by scaffold-attached regions. *Biochemistry* 27:4706-4711.
 108. Klehr,D., K.Maass, and J.Bode. 1991. Scaffold-attached regions from the human interferon beta domain can be used to enhance the stable expression of genes under the control of various promoters. *Biochemistry* 30:1264-1270.

109. Wang,H. and C.J.Benham. 2006. Promoter Prediction and Annotation of Microbial Genomes Based on DNA Sequence and Structural Responses to Superhelical Stress. *BMC.Bioinformatics*. 7:248.
110. Wang,H. and C.J.Benham. 2006. Promoter Prediction and Annotation of Microbial Genomes Based on DNA Sequence and Structural Responses to Superhelical Stress. *BMC.Bioinformatics*. 7:248.
111. Benham,C.J. and C.Bi. 2004. The analysis of stress-induced duplex destabilization in long genomic DNA sequences. *J.Comput.Biol.* 11:519-543.
112. Bi,C. and C.J.Benham. 2004. WebSIDD: server for predicting stress-induced duplex destabilized (SIDD) sites in superhelical DNA. *Bioinformatics*. 20:1477-1479.
113. Wang,H., M.Noordewier, and C.J.Benham. 2004. Stress-induced DNA duplex destabilization (SIDD) in the E. coli genome: SIDD sites are closely associated with promoters. *Genome Res.* 14:1575-1584.
114. Benham,C.J. 2001. Stress-induced DNA duplex destabilization in transcriptional initiation. *Pac.Symp.Biocomput.* 103-114.
115. Benham,C.J. and C.Bi. 2004. The analysis of stress-induced duplex destabilization in long genomic DNA sequences. *J.Comput.Biol.* 11:519-543.

116. Wang,L., C.M.Lin, S.Brooks, D.Cimbora, M.Groudine, and M.I.Aladjem. 2004. The human beta-globin replication initiation region consists of two modular independent replicators. *Mol.Cell Biol.* 24:3373-3386.
117. Aladjem,M.I., L.W.Rodewald, J.L.Kolman, and G.M.Wahl. 1998. Genetic dissection of a mammalian replicator in the human beta-globin locus. *Science* 281:1005-1009.
118. Boulikas,T. 1996. Common structural features of replication origins in all life forms. *J.Cell Biochem.* 60:297-316.
119. Bi,C. and C.J.Benham. 2004. WebSIDD: server for predicting stress-induced duplex destabilized (SIDD) sites in superhelical DNA. *Bioinformatics.* 20:1477-1479.
120. Wang,H., M.Noordewier, and C.J.Benham. 2004. Stress-induced DNA duplex destabilization (SIDD) in the E. coli genome: SIDD sites are closely associated with promoters. *Genome Res.* 14:1575-1584.
121. Bi,C. and C.J.Benham. 2004. WebSIDD: server for predicting stress-induced duplex destabilized (SIDD) sites in superhelical DNA. *Bioinformatics.* 20:1477-1479.
122. Mackey,D. and B.Sugden. 1999. Applications of oriP plasmids and their mode of replication. *Methods Enzymol.* 306:308-328.

123. Norio,P., C.L.Schildkraut, and J.L.Yates. 2000. Initiation of DNA replication within oriP is dispensable for stable replication of the latent Epstein-Barr virus chromosome after infection of established cell lines. *J.Virol.* 74:8563-8574.
124. Schepers,A., M.Ritzi, K.Bousset, E.Kremmer, J.L.Yates, J.Harwood, J.F.Diffley, and W.Hammerschmidt. 2001. Human origin recognition complex binds to the region of the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *EMBO J.* 20:4588-4602.
125. Sugden,B. and N.Warren. 1989. A promoter of Epstein-Barr virus that can function during latent infection can be transactivated by EBNA-1, a viral protein required for viral DNA replication during latent infection. *J.Virol.* 63:2644-2649.
126. Jenke,A.C., I.M.Stehle, F.Herrmann, T.Eisenberger, A.Baiker, J.Bode, F.O.Fackelmayer, and H.J.Lipps. 2004. Nuclear scaffold/matrix attached region modules linked to a transcription unit are sufficient for replication and maintenance of a mammalian episome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:11322-11327.
127. Dang,Q., J.Auten, and I.Plavec. 2000. Human beta interferon scaffold attachment region inhibits de novo methylation and confers long-term, copy number-dependent expression to a retroviral vector. *J.Virol.* 74:2671-2678.
128. Baiker,A., C.Maercker, C.Piechaczek, S.B.Schmidt, J.Bode, C.Benham, and H.J.Lipps. 2000. Mitotic stability of an episomal vector containing a human

- scaffold/matrix-attached region is provided by association with nuclear matrix.
Nat. Cell Biol. 2:182-184.
129. Wang,H., M.Noordewier, and C.J.Benham. 2004. Stress-induced DNA duplex destabilization (SIDD) in the E. coli genome: SIDD sites are closely associated with promoters. *Genome Res.* 14:1575-1584.
 130. Benham,C., T.Kohwi-Shigematsu, and J.Bode. 1997. Stress-induced duplex DNA destabilization in scaffold/matrix attachment regions. *J.Mol.Biol.* 274:181-196.
 131. Bode,J., S.Winkelmann, S.Gotze, S.Spiker, K.Tsutsui, C.Bi, A K P, and C.Benham. 2006. Correlations between scaffold/matrix attachment region (S/MAR) binding activity and DNA duplex destabilization energy. *J.Mol.Biol.* 358:597-613.
 132. Bode,J., S.Winkelmann, S.Gotze, S.Spiker, K.Tsutsui, C.Bi, A K P, and C.Benham. 2006. Correlations between scaffold/matrix attachment region (S/MAR) binding activity and DNA duplex destabilization energy. *J.Mol.Biol.* 358:597-613.
 133. Benham,C., T.Kohwi-Shigematsu, and J.Bode. 1997. Stress-induced duplex DNA destabilization in scaffold/matrix attachment regions. *J.Mol.Biol.* 274:181-196.
 134. Benham,C.J. 1996. Duplex destabilization in superhelical DNA is predicted to occur at specific transcriptional regulatory regions. *J.Mol.Biol.* 255:425-434.

135. Wang,H., M.Noordewier, and C.J.Benham. 2004. Stress-induced DNA duplex destabilization (SIDD) in the E. coli genome: SIDD sites are closely associated with promoters. *Genome Res.* 14:1575-1584.
136. Bi,C. and C.J.Benham. 2004. WebSIDD: server for predicting stress-induced duplex destabilized (SIDD) sites in superhelical DNA. *Bioinformatics.* 20:1477-1479.
137. Benham,C.J. 1981. Theoretical analysis of competitive conformational transitions in torsionally stressed DNA. *J.Mol.Biol.* 150:43-68.
138. Polonskaya,Z., C.J.Benham, and J.Hearing. 2004. Role for a region of helically unstable DNA within the Epstein-Barr virus latent cycle origin of DNA replication oriP in origin function. *Virology* 328:282-291.
139. Jenke,B.H., C.P.Fetzer, I.M.Stehle, F.Jonsson, F.O.Fackelmayer, H.Conradt, J.Bode, and H.J.Lipps. 2002. An episomally replicating vector binds to the nuclear matrix protein SAF-A in vivo. *EMBO Rep.* 3:349-354.
140. Schaarschmidt,D., J.Baltin, I.M.Stehle, H.J.Lipps, and R.Knippers. 2004. An episomal mammalian replicon: sequence-independent binding of the origin recognition complex. *EMBO J.* 23:191-201.
141. Schaarschmidt,D., J.Baltin, I.M.Stehle, H.J.Lipps, and R.Knippers. 2004. An episomal mammalian replicon: sequence-independent binding of the origin recognition complex. *EMBO J.* 23:191-201.

142. Schaarschmidt,D., J.Baltin, I.M.Stehle, H.J.Lipps, and R.Knippers. 2004. An episomal mammalian replicon: sequence-independent binding of the origin recognition complex. *EMBO J.* 23:191-201.
143. Cavazzana-Calvo,M., S.Hacein-Bey, B.G.de Saint, F.Gross, E.Yvon, P.Nusbaum, F.Selz, C.Hue, S.Certain, J.L.Casanova, P.Bousso, F.L.Deist, and A.Fischer. 2000. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288:669-672.
144. Aiuti,A. 2004. Gene therapy for adenosine-deaminase-deficient severe combined immunodeficiency. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* 17:505-516.
145. Cavazzana-Calvo,M., S.Hacein-Bey-Abina, and A.Fischer. 2002. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. *Curr.Opin.Allergy Clin.Immunol.* 2:507-509.
146. Gaspar,H.B., K.L.Parsley, S.Howe, D.King, K.C.Gilmour, J.Sinclair, G.Brouns, M.Schmidt, C.Von Kalle, T.Barington, M.A.Jakobsen, H.O.Christensen, A.Al Ghonaïum, H.N.White, J.L.Smith, R.J.Levinsky, R.R.Ali, C.Kinnon, and A.J.Thrasher. 2004. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet* 364:2181-2187.
147. Ginn,S.L., J.A.Curtin, B.Kramer, C.M.Smyth, M.Wong, A.Kakakios, G.B.McCowage, D.Watson, S.I.Alexander, M.Latham, S.C.Cunningham, M.Zheng, L.Hobson, P.B.Rowe, A.Fischer, M.Cavazzana-Calvo, S.Hacein-Bey-

- Abina, and I.E.Alexander. 2005. Treatment of an infant with X-linked severe combined immunodeficiency (SCID-X1) by gene therapy in Australia. *Med.J.Aust.* 182:458-463.
148. Dunbar,C.E., A.W.Nienhuis, F.M.Stewart, P.Quesenberry, J.O'Shaughnessy, K.Cowan, M.Cottler-Fox, S.Leitman, S.Goodman, B.P.Sorrentino, and . 1993. Amendment to clinical research projects. Genetic marking with retroviral vectors to study the feasibility of stem cell gene transfer and the biology of hematopoietic reconstitution after autologous transplantation in multiple myeloma, chronic myelogenous leukemia, or metastatic breast cancer. *Hum.Gene Ther.* 4:205-222.
 149. Anson,D.S. 2004. The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery. *Genet.Vaccines.Ther.* 2:9.
 150. Barsov,E.V. and S.H.Hughes. 1996. Gene transfer into mammalian cells by a Rous sarcoma virus-based retroviral vector with the host range of the amphotropic murine leukemia virus. *J.Virol.* 70:3922-3929.
 151. Boris-Lawrie,K. and H.M.Temin. 1994. The retroviral vector. Replication cycle and safety considerations for retrovirus-mediated gene therapy. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 716:59-70.
 152. Shoemaker,C., J.Hoffman, S.P.Goff, and D.Baltimore. 1981. Intramolecular integration within Moloney murine leukemia virus DNA. *J.Virol.* 40:164-172.

153. Shoemaker,C., S.Goff, E.Gilboa, M.Paskind, S.W.Mitra, and D.Baltimore. 1980. Structure of a cloned circular Moloney murine leukemia virus DNA molecule containing an inverted segment: implications for retrovirus integration. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 77:3932-3936.
154. Dhar,S.K., K.Tadakuma, and K.Mori. 2000. Distinct variation pattern in the env of macrophage-tropic simian immunodeficiency virus in vivo demonstrated by denaturing gradient gel electrophoresis. *J.Virol.Methods* 89:49-60.
155. Dhar,R., W.L.McClements, L.W.Enquist, and G.F.Vande Woude. 1980. Nucleotide sequences of integrated Moloney sarcoma provirus long terminal repeats and their host and viral junctions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 77:3937-3941.
156. Shoemaker,C., J.Hoffman, S.P.Goff, and D.Baltimore. 1981. Intramolecular integration within Moloney murine leukemia virus DNA. *J.Virol.* 40:164-172.
157. Shoemaker,C., S.Goff, E.Gilboa, M.Paskind, S.W.Mitra, and D.Baltimore. 1981. Structure of cloned retroviral circular DNAs: implications for virus integration. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 45 Pt 2:711-717.
158. Anson,D.S. 2004. The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery. *Genet.Vaccines.Ther.* 2:9.

159. Carteau,S., C.Hoffmann, and F.Bushman. 1998. Chromosome structure and human immunodeficiency virus type 1 cDNA integration: centromeric alphoid repeats are a disfavored target. *J.Virol.* 72:4005-4014.
160. Stevens,S.W. and J.D.Griffith. 1996. Sequence analysis of the human DNA flanking sites of human immunodeficiency virus type 1 integration. *J.Virol.* 70:6459-6462.
161. Wu,X., Y.Li, B.Crise, and S.M.Burgess. 2003. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* 300:1749-1751.
162. Mitchell,R.S., B.F.Beitzel, A.R.Schroder, P.Shinn, H.Chen, C.C.Berry, J.R.Ecker, and F.D.Bushman. 2004. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS.Biol.* 2:E234.
163. Schroder,A.R., P.Shinn, H.Chen, C.Berry, J.R.Ecker, and F.Bushman. 2002. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110:521-529.
164. Laufs,S., K.Z.Nagy, F.A.Giordano, A.Hotz-Wagenblatt, W.J.Zeller, and S.Fruehauf. 2004. Insertion of retroviral vectors in NOD/SCID repopulating human peripheral blood progenitor cells occurs preferentially in the vicinity of transcription start regions and in introns. *Mol.Ther.* 10:874-881.
165. Laufs,S., B.Gentner, K.Z.Nagy, A.Jauch, A.Benner, S.Naundorf, K.Kuehlcke, B.Schiedlmeier, A.D.Ho, W.J.Zeller, and S.Fruehauf. 2003. Retroviral vector

- integration occurs in preferred genomic targets of human bone marrow-repopulating cells. *Blood* 101:2191-2198.
166. Dvir-Ginzberg, M., A. Konson, S. Cohen, and R. Agbaria. 2006. Entrapment of retroviral vector producer cells in three-dimensional alginate scaffolds for potential use in cancer gene therapy. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*
 167. Su, S., A. Watanabe, M. Yamamoto, E. Nakajima, K. Miyake, and T. Shimada. 2006. Mutations in p53 cDNA sequence introduced by retroviral vector. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340:567-572.
 168. Kustikova, O.S., A. Wahlers, K. Kuhlcke, B. Stahle, A.R. Zander, C. Baum, and B. Fehse. 2003. Dose finding with retroviral vectors: correlation of retroviral vector copy numbers in single cells with gene transfer efficiency in a cell population. *Blood* 102:3934-3937.
 169. Broeke, A.V. and A. Burny. 2003. Retroviral Vector Biosafety: Lessons from Sheep. *J. Biomed. Biotechnol.* 2003:9-12.
 170. Laufs, S., B. Gentner, K.Z. Nagy, A. Jauch, A. Benner, S. Naundorf, K. Kuehlcke, B. Schiedlmeier, A.D. Ho, W.J. Zeller, and S. Fruehauf. 2003. Retroviral vector integration occurs in preferred genomic targets of human bone marrow-repopulating cells. *Blood* 101:2191-2198.
 171. Mitchell, R.S., B.F. Beitzel, A.R. Schroder, P. Shinn, H. Chen, C.C. Berry, J.R. Ecker, and F.D. Bushman. 2004. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biol.* 2:E234.

172. Trobridge, G.D., D.G. Miller, M.A. Jacobs, J.M. Allen, H.P. Kiem, R. Kaul, and D.W. Russell. 2006. Foamy virus vector integration sites in normal human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103:1498-1503.
173. Hacein-Bey-Abina, S., C. Von Kalle, M. Schmidt, M.P. McCormack, N. Wulffraat, P. Leboulch, A. Lim, C.S. Osborne, R. Pawliuk, E. Morillon, R. Sorensen, A. Forster, P. Fraser, J.I. Cohen, B.G. de Saint, I. Alexander, U. Wintergerst, T. Frebourg, A. Aurias, D. Stoppa-Lyonnet, S. Romana, I. Radford-Weiss, F. Gross, F. Valensi, E. Delabesse, E. Macintyre, F. Sigaux, J. Soulier, L.E. Leiva, M. Wissler, C. Prinz, T.H. Rabbitts, F. Le Deist, A. Fischer, and M. Cavazzana-Calvo. 2003. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302:415-419.
174. Rabbitts, T.H., K. Bucher, G. Chung, G. Grutz, A. Warren, and Y. Yamada. 1999. The effect of chromosomal translocations in acute leukemias: the LMO2 paradigm in transcription and development. *Cancer Res.* 59:1794s-1798s.
175. Royer-Pokora, B., U. Loos, and W.D. Ludwig. 1991. TTG-2, a new gene encoding a cysteine-rich protein with the LIM motif, is overexpressed in acute T-cell leukaemia with the t(11;14)(p13;q11). *Oncogene* 6:1887-1893.
176. Bushman, F., M. Lewinski, A. Ciuffi, S. Barr, J. Leipzig, S. Hannenhalli, and C. Hoffmann. 2005. Genome-wide analysis of retroviral DNA integration. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:848-858.

177. Hacein-Bey-Abina, S., C. Von Kalle, M. Schmidt, M. P. McCormack, N. Wulffraat, P. Leboulch, A. Lim, C. S. Osborne, R. Pawliuk, E. Morillon, R. Sorensen, A. Forster, P. Fraser, J. I. Cohen, B. G. de Saint, I. Alexander, U. Wintergerst, T. Frebourg, A. Aurias, D. Stoppa-Lyonnet, S. Romana, I. Radford-Weiss, F. Gross, F. Valensi, E. Delabesse, E. Macintyre, F. Sigaux, J. Soulier, L. E. Leiva, M. Wissler, C. Prinz, T. H. Rabbitts, F. Le Deist, A. Fischer, and M. Cavazzana-Calvo. 2003. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302:415-419.
178. Laufs, S., K. Z. Nagy, F. A. Giordano, A. Hotz-Wagenblatt, W. J. Zeller, and S. Fruehauf. 2004. Insertion of retroviral vectors in NOD/SCID repopulating human peripheral blood progenitor cells occurs preferentially in the vicinity of transcription start regions and in introns. *Mol. Ther.* 10:874-881.
179. Wu, X., Y. Li, B. Crise, and S. M. Burgess. 2003. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* 300:1749-1751.
180. Schroder, A. R., P. Shinn, H. Chen, C. Berry, J. R. Ecker, and F. Bushman. 2002. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110:521-529.
181. Wu, X., Y. Li, B. Crise, and S. M. Burgess. 2003. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* 300:1749-1751.
182. Kustikova, O., B. Fehse, U. Modlich, M. Yang, J. Dullmann, K. Kamino, N. von Neuhoff, B. Schlegelberger, Z. Li, and C. Baum. 2005. Clonal dominance of

- hematopoietic stem cells triggered by retroviral gene marking. *Science* 308:1171-1174.
183. Ficara,F., D.B.Superchi, R.J.Hernandez, C.Mocchetti, N.Carballido-Perrig, G.Andolfi, S.Deola, A.Colombo, C.Bordignon, J.M.Carballido, M.G.Roncarolo, and A.Aiuti. 2004. IL-3 or IL-7 increases ex vivo gene transfer efficiency in ADA-SCID BM CD34+ cells while maintaining in vivo lymphoid potential. *Mol.Ther.* 10:1096-1108.
 184. Cavazzana-Calvo,M., S.Hacein-Bey, B.G.de Saint, F.Gross, E.Yvon, P.Nusbaum, F.Selz, C.Hue, S.Certain, J.L.Casanova, P.Bousso, F.L.Deist, and A.Fischer. 2000. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288:669-672.
 185. Gaspar,H.B., K.L.Parsley, S.Howe, D.King, K.C.Gilmour, J.Sinclair, G.Brouns, M.Schmidt, C.Von Kalle, T.Barington, M.A.Jakobsen, H.O.Christensen, A.Al Ghonaum, H.N.White, J.L.Smith, R.J.Levinsky, R.R.Ali, C.Kinnon, and A.J.Thrasher. 2004. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet* 364:2181-2187.
 186. Kempler,G., B.Freitag, B.Berwin, O.Nanassy, and E.Barklis. 1993. Characterization of the Moloney murine leukemia virus stem cell-specific repressor binding site. *Virology* 193:690-699.

187. Modin,C., A.H.Lund, A.Schmitz, M.Duch, and F.S.Pedersen. 2000. Alleviation of murine leukemia virus repression in embryonic carcinoma cells by genetically engineered primer binding sites and artificial tRNA primers. *Virology* 278:368-379.
188. Hacein-Bey-Abina,S., C.Von Kalle, M.Schmidt, M.P.McCormack, N.Wulffraat, P.Leboulch, A.Lim, C.S.Osborne, R.Pawliuk, E.Morillon, R.Sorensen, A.Forster, P.Fraser, J.I.Cohen, B.G.de Saint, I.Alexander, U.Wintergerst, T.Frebourg, A.Aurias, D.Stoppa-Lyonnet, S.Romana, I.Radford-Weiss, F.Gross, F.Valensi, E.Delabesse, E.Macintyre, F.Sigaux, J.Soulier, L.E.Leiva, M.Wissler, C.Prinz, T.H.Rabbitts, F.Le Deist, A.Fischer, and M.Cavazzana-Calvo. 2003. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302:415-419.
189. Felsenfeld,G., B.Burgess-Beusse, C.Farrell, M.Gaszner, R.Ghirlando, S.Huang, C.Jin, M.Litt, F.Magdinier, V.Mutskov, Y.Nakatani, H.Tagami, A.West, and T.Yusufzai. 2004. Chromatin boundaries and chromatin domains. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 69:245-250.
190. Recillas-Targa,F., M.J.Pikaart, B.Burgess-Beusse, A.C.Bell, M.D.Litt, A.G.West, M.Gaszner, and G.Felsenfeld. 2002. Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken beta-globin insulator are separable activities. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:6883-6888.
191. West,A.G., M.Gaszner, and G.Felsenfeld. 2002. Insulators: many functions, many mechanisms. *Genes Dev.* 16:271-288.

192. Yu,S.F., T.von Ruden, P.W.Kantoff, C.Garber, M.Seiberg, U.Ruther, W.F.Anderson, E.F.Wagner, and E.Gilboa. 1986. Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83:3194-3198.
193. Spencer,D.M. 2000. Developments in suicide genes for preclinical and clinical applications. *Curr.Opin.Mol.Ther.* 2:433-440.
194. Wu,X., Y.Li, B.Crise, and S.M.Burgess. 2003. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* 300:1749-1751.
195. Antoine,C., S.Muller, A.Cant, M.Cavazzana-Calvo, P.Veys, J.Vossen, A.Fasth, C.Heilmann, N.Wulffraat, R.Seger, S.Blanche, W.Friedrich, M.Abinun, G.Davies, R.Bredius, A.Schulz, P.Landais, and A.Fischer. 2003. Long-term survival and transplantation of haemopoietic stem cells for immunodeficiencies: report of the European experience 1968-99. *Lancet* 361:553-560.
196. Hershfield,M.S. 1995. PEG-ADA: an alternative to haploidentical bone marrow transplantation and an adjunct to gene therapy for adenosine deaminase deficiency. *Hum.Mutat.* 5:107-112.
197. Chan,B., D.Wara, J.Bastian, M.S.Hershfield, J.Bohnsack, C.G.Azen, R.Parkman, K.Weinberg, and D.B.Kohn. 2005. Long-term efficacy of enzyme replacement therapy for adenosine deaminase (ADA)-deficient severe combined immunodeficiency (SCID). *Clin.Immunol.* 117:133-143.

198. Kaufman,D.A., M.S.Hershfield, J.A.Bocchini, I.J.Moissidis, M.Jeroudi, and S.L.Bahna. 2005. Cerebral lymphoma in an adenosine deaminase-deficient patient with severe combined immunodeficiency receiving polyethylene glycol-conjugated adenosine deaminase. *Pediatrics* 116:e876-e879.
199. Malacarne,F., T.Benicchi, L.D.Notarangelo, L.Mori, S.Parolini, L.Caimi, M.Hershfield, L.D.Notarangelo, and L.Imberti. 2005. Reduced thymic output, increased spontaneous apoptosis and oligoclonal B cells in polyethylene glycol-adenosine deaminase-treated patients. *Eur.J.Immunol.* 35:3376-3386.
200. Bordignon,C., L.D.Notarangelo, N.Nobili, G.Ferrari, G.Casorati, P.Panina, E.Mazzolari, D.Maggioni, C.Rossi, P.Servida, A.G.Ugazio, and F.Mavilio. 1995. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-immunodeficient patients. *Science* 270:470-475.
201. Kohn,D.B., K.I.Weinberg, J.A.Nolta, L.N.Heiss, C.Lenarsky, G.M.Crooks, M.E.Hanley, G.Annett, J.S.Brooks, A.el Khoureiy, and . 1995. Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. *Nat.Med.* 1:1017-1023.
202. Schmidt,M., D.A.Carbonaro, C.Speckmann, M.Wissler, J.Bohnsack, M.Elder, B.J.Aronow, J.A.Nolta, D.B.Kohn, and C.von Kalle. 2003. Clonality analysis after retroviral-mediated gene transfer to CD34+ cells from the cord blood of ADA-deficient SCID neonates. *Nat.Med.* 9:463-468.

203. Muul, L.M., L.M. Tuschong, S.L. Soenen, G.J. Jagadeesh, W.J. Ramsey, Z. Long, C.S. Carter, E.K. Garabedian, M. Alleyne, M. Brown, W. Bernstein, S.H. Schurman, T.A. Fleisher, S.F. Leitman, C.E. Dunbar, R.M. Blaese, and F. Candotti. 2003. Persistence and expression of the adenosine deaminase gene for 12 years and immune reaction to gene transfer components: long-term results of the first clinical gene therapy trial. *Blood* 101:2563-2569.
204. Aiuti, A., S. Vai, A. Mortellaro, G. Casorati, F. Ficara, G. Andolfi, G. Ferrari, A. Tabucchi, F. Carlucci, H.D. Ochs, L.D. Notarangelo, M.G. Roncarolo, and C. Bordignon. 2002. Immune reconstitution in ADA-SCID after PBL gene therapy and discontinuation of enzyme replacement. *Nat. Med.* 8:423-425.
205. Aiuti, A., S. Slavin, M. Aker, F. Ficara, S. Deola, A. Mortellaro, S. Morecki, G. Andolfi, A. Tabucchi, F. Carlucci, E. Marinello, F. Cattaneo, S. Vai, P. Servida, R. Miniero, M.G. Roncarolo, and C. Bordignon. 2002. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* 296:2410-2413.
206. Datta, K., A.J. Wowor, A.J. Richard, and V.J. LiCata. 2006. Temperature dependence and thermodynamics of Klenow polymerase binding to primed-template DNA. *Biophys. J.* 90:1739-1751.
207. Khare, V. and K.A. Eckert. 2002. The proofreading 3'→5' exonuclease activity of DNA polymerases: a kinetic barrier to translesion DNA synthesis. *Mutat. Res.* 510:45-54.

208. Ren, Y.G., J. Martinez, L.A. Kirsebom, and A. Virtanen. 2002. Inhibition of Klenow DNA polymerase and poly(A)-specific ribonuclease by aminoglycosides. *RNA*. 8:1393-1400.
209. Nagy, K.Z., S. Laufs, B. Gentner, S. Naundorf, K. Kuehlcke, J. Topaly, E.C. Buss, W.J. Zeller, and S. Fruehauf. 2004. Clonal analysis of individual marrow-repopulating cells after experimental peripheral blood progenitor cell transplantation. *Stem Cells* 22:570-579.
210. Schmidt, M., D.A. Carbonaro, C. Speckmann, M. Wissler, J. Bohnsack, M. Elder, B.J. Aronow, J.A. Nolte, D.B. Kohn, and C. von Kalle. 2003. Clonality analysis after retroviral-mediated gene transfer to CD34⁺ cells from the cord blood of ADA-deficient SCID neonates. *Nat. Med.* 9:463-468.
211. Schmidt, M., D.A. Carbonaro, C. Speckmann, M. Wissler, J. Bohnsack, M. Elder, B.J. Aronow, J.A. Nolte, D.B. Kohn, and C. von Kalle. 2003. Clonality analysis after retroviral-mediated gene transfer to CD34⁺ cells from the cord blood of ADA-deficient SCID neonates. *Nat. Med.* 9:463-468.
212. Datta, K., A.J. Wowor, A.J. Richard, and V.J. LiCata. 2006. Temperature dependence and thermodynamics of Klenow polymerase binding to primed-template DNA. *Biophys. J.* 90:1739-1751.

Περίληψεις

Η επισωματική κατάσταση των φορέων που αναπαράγονται έξω – χρωμοσωμικά εξαρτάται από τον ενεργειακό ανταγωνισμό μεταξύ του στοιχείου S/MAR και αλληλουχιών έναρξης της αντιγραφής του DNA του φορέα.

Οι επισωματικοί φορείς αποτελούν την εναλλακτική επιλογή για την μεταφορά γονιδίων σε εφαρμογές γονιδιακής θεραπείας. Διπλασιάζονται αυτόνομα χωρίς να ενσωματώνονται στα χρωμοσώματα του κυττάρου και έτσι στερούνται της σοβαρής παρενέργειας του φαινομένου της μεταλλαξιγένεσης μέσω ενσωμάτωσης. Το ενδιαφέρον ως προς την ανάπτυξη επισωματικών φορέων για την γονιδιακή μεταφορά αυξήθηκε κατακόρυφα τα τελευταία χρόνια μετά την ανάπτυξη του φορέα pEPI-1, ο οποίος περιείχε το στοιχείο S/MAR του γονιδίου της ανθρώπινης βήτα- ιντερφερόνης. Ο φορέας αυτός είχε την ιδιότητα να διατηρείται επισωματικά χωρίς την ανάγκη μεταγραφής κάποιου ιϊκού γονιδίου. Τα στοιχεία S/MAR αποτελούν ετερογενείς περιοχές DNA οι οποίες συνδέονται στην θεμέλια ουσία του πυρήνα, συμμετέχοντας στην οργάνωση του ευκαρυωτικού γονιδιώματος, στην αντιγραφή του DNA και στην ρύθμιση της μεταγραφής. Αποφασίσαμε στην μελετήσουμε την δράση του S/MAR στοιχείου σε ένα διαφορετικό περιβάλλον DNA. Ξεκινώντας από τον φορέα pCEP4 που βασίζεται στα στοιχεία OriP και EBNA-1 του ιού η EBV κατασκευάσαμε τα εξής πλασμίδια: 1) pEBS/eGFP με το S/MAR να είναι κλωνοποιημένο μετά το γονίδιο της eGFP όπως στο pEPI-1. 2) pESdER / eGFP προερχόμενο από το pEBS/eGFP με διαγραφή του γονιδίου EBNA-1 και 3) pCEP4 / eGFP (πλασμίδιο μάρτυρας). Σε αντίθεση με τις προσδοκίες μας μόνο το πλασμίδιο pCEP4 / eGFP ήταν ικανό να εγκαταστήσει σταθερές κυτταρικές σειρές Jurkat. Ο υπολογισμός της αποσταθεροποίησης υπό τάση των παραπάνω πλασμιδίων απέδειξε μια υψηλή ουδό για την αποσταθεροποίηση της περιοχής του OriP, σε αντίθεση με το μητρικό φορέα pCEP4, γεγονός που οφείλεται στον ενεργειακό ανταγωνισμό μεταξύ του OriP και της υψηλά αποσταθεροποιημένης περιοχής του S/MAR. Η αντικατάσταση του OriP στο πλασμίδιο pESdER / eGFP από την περιοχή έναρξης της αντιγραφής το γονίδιο της β-σφαιρίνης (IR) (pESdER-IR/eGFP) έχει ως αποτέλεσμα την αποκατάσταση της επισωματικής κατάστασης, προσδίδοντας επιπλέον και υψηλή μιτωτική σταθερότητα χωρίς την ανάγκη ύπαρξης πίεσης επιλογής σε καλλιέργειες για χρονικό διάστημα τριών μηνών.

Συμπεράνουμε ότι το δυναμικό πολλαπλασιασμού ενός επισωματικού συστήματος που περιέχει ένα στοιχείο S/MAR εξαρτάται από την ύπαρξη μιας δεύτερης υψηλά αποσταθεροποιημένης έννοιας περιοχής ικανής να ξεπεράσει την σταθεροποιητική δράση της αλληλουχίας S/MAR. Το γεγονός αυτό προσδίδει μια νέα διάσταση στη σχεδίαση αυτόνομων επισωματικών φορέων, που περιέχει τον υπολογισμό της αποσταθεροποίησης της διπλής έλικας DNA υπό τάση.

Μέθοδος DSCP-PCR για την ανάλυση των θέσεων ενσωμάτωσης ρετρο-ϊικών φορέων σε κλινικές δοκιμές γονιδιακής θεραπείας.

Η ευρεία χρήση των ρετρο-ϊικών φορέων ως συστήματα γονιδιακής μεταφοράς σε κλινικές δοκιμές γονιδιακής θεραπείας έφερε στην επιφάνεια την ανάγκη για μια ακριβή εκτίμηση της ασφάλειας των δοκιμών αυτών όσον αφορά το φαινόμενο της μεταλλαξιγένεσης μέσω ενσωμάτωσης. Στην εργασία αυτή αναφέρεται μια νέα μέθοδος για την ανίχνευση των θέσεων ενσωμάτωσης των ρετρο-ϊικών φορέων που έχει κλινικό προσανατολισμό και ονομάζεται DSCP-PCR (partially Double stranded, Sterically Hindered Primer – PCR). Η μέθοδος αυτή έχει αυξημένη ευαισθησία και ειδικότητα, δεδομένου ότι δεν εξαρτάται από στάδια κατάτμησης με ένζυμα περιορισμού και αντιδράσεις λιγάσης που αποτελούν μέρος των υπαρχόντων μεθόδων (όπως η LAM-PCR). Η μείζονα διαφορά ανάμεσα στην DSCP-PCR και στις προηγούμενες PCR μεθόδους συνιστάται στο στάδιο της σύνδεσης της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA όπου χρησιμοποιείται ένας εκκινητής που το ένα άκρο του είναι εκφυλισμένο ενώ το άλλο αποτελείται από διπλή έλικα DNA. Η σχεδίαση αυτή τον καθιστά ικανό να προσδένεται μόνο στο άκρο οποιασδήποτε μονής αλυσίδας. Η μέθοδος αυτή παράγει ένα υψηλά πληροφοριακό σύνολο δεδομένων για τον χαρακτηρισμό των θέσεων ενσωμάτωσης των φορέων. Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση του προφίλ των κλώνων που συμμετέχουν στην αιμοποίηση σε κάποια χρονική περίοδο. Η παρακολούθηση το προφίλ αυτού μέσα στον χρόνο δίνει ενδείξεις για την κινητική της αιμοποίησης και κατά συνέπεια της εμφάνιση νέων κλώνων.

Summaries

Episomal status of extrachromosomal vectors is defined by the energy competition between S/MAR and sequences of initiation of DNA replication.

Episomal vectors have been considered valid alternatives to viral vectors for gene therapy applications, as they are replicating extrachromosomally and are devoid of the adverse effect of insertional mutagenesis. Interest in the episomal systems was boosted by the development of the pEPI-1 vector, containing the scaffold matrix attachment region (S/MAR) element of the human beta-interferon gene, which confers to it stable episomal status, without the need for transcription of any viral element. S/MARs are heterogeneous DNA regions that attach to the nuclear matrix, participating in the organization of the eukaryotic genome, initiation of DNA replication and regulation of transcription. We decided to study the performance of the S/MAR element in a completely different vector DNA context. Starting from vector pCEP4 (Invitrogen) based on OriP EBV and EBNA-1 latent retention system, we constructed plasmids: (1) pEBS/eGFP with SMAR element cloned after eGFP gene as in pEPI-1. (2) pESdER/eGFP derived from pEBS/eGFP by deletion of EBNA-1 gene and (3) pCEP4/eGFP as reporter plasmid. Contrary to expectations, only plasmid (3) was able to establish stable Jurkat cell line cultures. Calculation of stress-induced duplex destabilization of the above plasmids demonstrated a high threshold for the destabilization of the OriP region, unlike the parental vector pCEP4, caused by the energy competition of OriP with the highly destabilized S/MAR region. Substitution of OriP in plasmid (2) with the β -globin initiation region (IR) (pESdER-IR/eGFP) results in the restoration of episomal status, providing high mitotic stability without selection pressure for up to 3 months of culture. We deduce that the replication potential of an episomal system carrying an S/MAR element depends on the existence of highly destabilized vector sequences, sufficient to counteract the S/MAR effect of stabilization on vector's DNA backbone molecule and maintain the plasmid's accessibility to the cellular replication machinery. Thus emerges the concept of including the calculation of stress-induced duplex destabilization in the design of self-replicative extrachromosomal units.

DSHP-PCR for the analysis of retroviral integration sites in stem cell transplantation based gene therapy.

The widespread use of retroviral-based vectors as gene transfer systems in the context of gene therapy clinical trials has emerged the need for accurately assessing their safety profile in order to identify the potential risks of insertional mutagenesis. Here we report a new PCR - based method, DSHP-PCR (partially Double stranded, Sterically Hindered Primer – PCR), a clinically orientated method for analysing the integration sites with high sensitivity and reliability, devoid of the restriction digestion and cloning bias present in the existing methods. The difference between DSHP-PCR and previous PCR-based methods (such as LAM-PCR) consists in the step of second strand synthesis where the use of a partially double stranded –degenerated primer that binds at the end of the DNA single strands bypasses the need for the restriction digestion step that inserts a bias in integration site detection and for the cassette ligation step that renders the whole procedure inefficient. This method generates a highly informative integration site library used for the sequencing of the human genomic – retroviral junctions, by creating a PCR product pool that contains a high percentage of specific fragments of similar length that can be subcloned with the same efficiency in a sequencing vector. It can also be used for the creation of the clonal composition profile of patient's each cell lineage in time allowing the monitoring of clonal kinetics of the haematopoietic or immune system by detecting the emergence of new clones that contribute to haematopoiesis.