



Πανεπιστήμιο  
Ιωαννίνων

Διατμηματικό Πρόγραμμα  
Μεταπτυχιακών Σπουδών  
«Ιατρική Χημεία»



Δ.Π.Μ.Σ.  
«Ιατρική Χημεία»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

**«Διερεύνηση μικρών μορίων (small molecules) με  
σκοπό την επαγωγή της έκφρασης της εμβρυικής  
αιμοσφαιρίνης ως γονιδιακή θεραπεία των  
αιμοσφαιρινοπαθειών»**

Μπόλης Γεώργιος

AEM 316

Τριμελής επιτροπή:

Θεολόγος Μιχαηλίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής

Ευαγγελία Γιαννάκη, Καθηγήτρια

Παναγιώτης Κούκλης, Αναπληρωτής Καθηγητής

## Περιεχόμενα

|                                                                                             |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>Πρόλογος.....</i>                                                                        | <i>3</i>  |
| <i>Περίληψη .....</i>                                                                       | <i>4</i>  |
| <i>Abstract .....</i>                                                                       | <i>6</i>  |
| <i>Εισαγωγή.....</i>                                                                        | <i>7</i>  |
| <b>1. Αιμοποιητικό σύστημα.....</b>                                                         | <b>7</b>  |
| 1.1 Αρχέγονα Αιμοποιητικά Κύτταρα.....                                                      | 7         |
| 1.2 Αιμοποίηση .....                                                                        | 10        |
| 1.3 Ερυθροποίηση.....                                                                       | 11        |
| 1.4 Ερυθροκύτταρα .....                                                                     | 13        |
| 1.5 Αιμοσφαιρίνη.....                                                                       | 14        |
| <b>2. Γενετικό προφίλ σφαιρινών.....</b>                                                    | <b>16</b> |
| 2.1 Σύμπλεγμα α-σφαιρίνης .....                                                             | 16        |
| 2.2 Σύμπλεγμα β-σφαιρίνης .....                                                             | 18        |
| 2.3 Μεταστροφή σφαιρινών .....                                                              | 20        |
| <b>3. Διαταραχές της Αιμοσφαιρίνης.....</b>                                                 | <b>22</b> |
| 3.1 Αιμοσφαιρινοπάθειες.....                                                                | 22        |
| 3.2 Θαλασσαιμίες .....                                                                      | 22        |
| 3.3 Δρεπανοκυτταρική νόσος .....                                                            | 24        |
| 3.4 Σύνδρομο κληρονομικής παραμονής της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης (HPFH) .....                | 26        |
| <b>4. Θεραπευτικές προσεγγίσεις για SCD και TDT .....</b>                                   | <b>27</b> |
| 4.1 Αλλογενής Μεταμόσχευση HSCs .....                                                       | 27        |
| 4.2 Γονιδιακή Θεραπεία .....                                                                | 28        |
| 4.3 Μικρά μόρια εγκεκριμένα από τον FDA .....                                               | 30        |
| 4.4 Επιγονιδιωματική ρύθμιση από μικρά μόρια με σκοπό την ενεργοποίηση της γ-σφαιρίνης..... | 31        |
| <b>5. Ex vivo επαγωγή της έκπτυξης των HSCs με τη χρήση μικρών μορίων .....</b>             | <b>34</b> |
| 5.1 Εμπόδια στην επιτυχημένη μεταμόσχευση HSCs .....                                        | 34        |
| 5.2 Το «χρυσό» μικρό μόριο UM171 .....                                                      | 35        |
| <b>Σκοπός της εργασίας .....</b>                                                            | <b>40</b> |
| <b>Υλικά και μέθοδοι.....</b>                                                               | <b>41</b> |

|            |                                                                                                                                   |                  |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| <b>6.</b>  | <b><i>Πειραματικός σχεδιασμός.....</i></b>                                                                                        | <b><i>41</i></b> |
| 6.1        | Μελέτη της επίδρασης του UM171 στην ερυθροειδική διαφοροποίηση .....                                                              | 41               |
| 6.2        | Διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού δράσης του UM171 που στην επαγωγή της έκφρασης της γ-σφαιρίνης .....                           | 42               |
| <b>7.</b>  | <b><i>Χειρισμός των CD34+ αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSCs).....</i></b>                                                    | <b><i>44</i></b> |
| a.         | Απομόνωση CD34+ αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSCs) από μόσχευμα υγιούς δότη .....                                            | 45               |
| 7.2        | Απόψυξη των CD34+ αρχέγονων κυττάρων .....                                                                                        | 47               |
| 7.3        | Καλλιέργεια έκπτυξης των CD34+ κυττάρων .....                                                                                     | 47               |
| 7.4        | Καλλιέργεια ερυθροειδικής διαφοροποίησης των CD34+ κυττάρων.....                                                                  | 48               |
| <b>8.</b>  | <b><i>Κυτταρικές δοκιμασίες.....</i></b>                                                                                          | <b><i>50</i></b> |
| 8.1        | Έλεγχος ανοσοφαινοτύπου των HSCs.....                                                                                             | 50               |
| 8.2        | Λύση των κυττάρων και απομόνωση της ολικής πρωτεΐνης .....                                                                        | 51               |
| 8.3        | Western Blot.....                                                                                                                 | 52               |
| 8.3.1      | Παρασκευή των απαραίτητων διαλυμάτων .....                                                                                        | 52               |
| 8.3.2      | Ποσοτικοποίηση των δειγμάτων με μέθοδο Bradford .....                                                                             | 53               |
| 8.3.3      | Παρασκευή πηκτών SDS-PAGE.....                                                                                                    | 54               |
| 8.3.4      | Εξοπλισμός και διαδικασία για τη δημιουργία του blot.....                                                                         | 55               |
| 8.3.5      | Επώαση με αντισώματα και εμφάνιση του blot.....                                                                                   | 56               |
| <b>9.</b>  | <b><i>Διερεύνηση του μηχανισμού δράσης του UM171 .....</i></b>                                                                    | <b><i>57</i></b> |
| 9.1        | Σχεδιασμός πλασμιδιακών φορέων .....                                                                                              | 57               |
| 9.2        | Μετασχηματισμός βακτηρίων.....                                                                                                    | 60               |
| 9.3        | Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA με σκοπό τον έλεγχο του .....                                                          | 61               |
| 9.4        | Μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια βακτηρίων και απομόνωση πλασμιδιακού DNA...                                                          | 61               |
| 9.5        | Παραγωγή λεντι-ϊικών φορέων.....                                                                                                  | 61               |
|            | <b><i>Αποτελέσματα .....</i></b>                                                                                                  | <b><i>63</i></b> |
| <b>10.</b> | <b><i>Επίδραση του UM-171 στην ερυθροειδική καλλιέργεια CD34<sup>+</sup> κυττάρων... </i></b>                                     | <b><i>63</i></b> |
| 10.1       | Δοσο-εξαρτώμενη καθυστέρηση της ερυθροειδικής διαφοροποίησης.....                                                                 | 64               |
| 10.2       | Επαγωγή της πρωτεοσωμικής αποικοδόμησης της LSD1.....                                                                             | 67               |
| <b>11.</b> | <b><i>Κατασκευή και απομόνωση των απαραίτητων πλασμιδίων για την διερεύνηση του μηχανισμού επαγωγής της γ-σφαιρίνης .....</i></b> | <b><i>67</i></b> |
|            | <b><i>Συζήτηση .....</i></b>                                                                                                      | <b><i>70</i></b> |
|            | <b><i>Βιβλιογραφία .....</i></b>                                                                                                  | <b><i>73</i></b> |

## Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του διατμηματικού προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Ιατρική Χημεία» του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2023/2024, στο εργαστήριο της Μονάδας Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας (Μ.Γ.Κ.Θ) της Αιματολογικής Κλινικής-Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών του Γενικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης «Γεώργιος Παπανικολάου». Η εργασία εκπονήθηκε με ακαδημαϊκούς υπεύθυνους τον Θεολόγο Μιχαηλίδη, Αναπληρωτή Καθηγητή Μοριακής Γενετικής του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, τον Παναγιώτη Κούκλη, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιολογίας της Ιατρικής σχολής και συνεπιβλέπουσα την Ευαγγελία Γιαννάκη, Affiliate Professor στο Πανεπιστήμιο Ουάσιγκτον, Σιάτλ και Διευθύντρια Αιματολόγο, υπεύθυνη της Μονάδας Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας (ΜΓΚΘ).

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Γιαννάκη για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποτελέσω μέλος της ερευνητικής της ομάδας. Η συμμετοχή μου σε αυτή επέτρεψε την εκπαίδευση μου καθώς και την αλληλοεπίδραση μου με αξιόλογους επιστήμονες αλλά κυρίως ανθρώπους. Κατόπιν, τον κ. Μιχαηλίδη που άμεσα ανταποκρίθηκε στην πρόσκληση να αποτελέσει τον κύριο επιβλέποντα της εργασίας και με αυτόν τον τρόπο μου έδωσε τη δυνατότητα να φιλοξενηθώ στην ΜΓΚΘ. Η βοήθεια του συνεχίζει έως σήμερα και του είμαι ευγνώμων.

Η καθημερινότητα στο εργαστήριο ήταν πάντα δημιουργική και διαδραστική χάρη στη δυναμική ομάδα ανθρώπων που είχα την τύχη να συνεργαστώ και το σημαντικότερο να γνωρίσω. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθένα ξεχωριστά για την συμβολή του στις ευχάριστες αναμνήσεις από τις εργαστηριακές μέρες αλλά για να μην μακρηγορώ δεν θα αναφερθώ ονομαστικά. Παρόλα αυτά οφείλω να ξεχωρίσω την Ιωάννα Βαλλιάνου που αποτέλεσε την εργαστηριακή μου μέντορα και με καθοδήγησε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης. Το σημαντικότερο και ίσως πιο απαιτητικό επίτευγμα της ήταν ότι έδειξε υπομονή και ανεκτικότητα με τον ενθουσιασμό και την επιπολαιότητα του αρχάριου εαυτού μου. Γιατί όπως λένε "Κάθε αρχή και δύσκολη". Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς και

την Νικολέττα Ψαθά, Επίκουρη Καθηγήτρια του τμήματος Βιολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Παρότι στα χαρτιά δεν υπήρξε συνεπιβλέπουσα, στην πράξη ήταν πάντα εκεί, διαθέσιμη για εποικοδομητική συζήτηση και καθοδήγηση βοηθώντας ουσιαστικά στην πορεία μου.

Την εργασία μου την αφιερώνω στην μητέρα μου Αντιγόνη η οποία δεν έχει πειστεί ακόμα ότι θα την παραδώσω. Παρότι δεν είναι τελειοποιημένη, αποτελεί την αρχή της περιπέτειας μου στον κόσμο της έρευνας και γι' αυτό έχει ξεχωριστή θέση στην καρδιά μου. Για άλλη μια φορά σας ευχαριστώ όλους για την συνεισφορά σας στην αξέχαστη αυτή εμπειρία.

## Περίληψη

Οι αιμοσφαιρινοπάθειες, με κυριότερες τη δρεπανοκυτταρική αναιμία και τη β-θαλασσαιμία, αποτελούν τις πιο διαδεδομένες μονογονιδιακές ασθένειες παγκοσμίως. Τα τελευταία χρόνια απέτελεσαν ορόσημο για τις αιμοσφαιρινοπάθειες καθώς εγκρίθηκαν νέες, επαναστατικές γονιδιακές θεραπείες για την αντιμετώπισή τους δίνοντας νέες προοπτικές στη θεραπεία γενετικών διαταραχών. Παρότι παρέχουν την προοπτική της ίασης, κάτι που μέχρι πρότινος έμοιαζε αδύνατον, η πρόσβαση των ασθενών σε αυτές είναι ακόμα εξαιρετικά περιορισμένη. Σε αυτό συμβάλλει το υπέρογκο κόστος των θεραπειών αυτών καθώς και η έλλειψη τεχνογνωσίας και εγκαταστάσεων στις χώρες που εντοπίζεται η πλειοψηφία των ασθενών. Παράλληλα, οι συμβατικές προσεγγίσεις εξακολουθούν να περιορίζονται στη χρήση της υδροξυουρίας (στη δρεπανοκυτταρική αναιμία) που δεν καλύπτει πολλούς ασθενείς και στην ανακούφιση των συμπτωμάτων με μεταγγίσεις και θεραπείες αποσιδήρωσης (στη β-θαλασσαιμία). Είναι επομένως πολύ σημαντική η εύρεση εναλλακτικών θεραπειών που να μπορούν να εφαρμοστούν καθολικά και αποτελεσματικά στην κλινική πράξη.

Το μικρό μόριο UM-171 επάγει την έκπτυξη των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSCs), με τις έρευνες να προτείνουν ως μοριακό μηχανισμό δράσης την έμμεση αποικοδόμηση της απομεθυλάσης LSD1 με τη μεσολάβηση της πρωτεΐνης KBTBD4. Καθώς έχει δειχθεί ότι η φαρμακολογική αναστολή της LSD1 οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα έκφρασης της γ-σφαιρίνης, η ερευνητική μας ομάδα πραγματοποίησε πειράματα για να ελεγχθεί αν η προσθήκη του UM-171 μπορεί επίσης να επάγει την έκφραση της γ-σφαιρίνης. Με τα πρωταρχικά πειράματα να επιβεβαιώνουν την υπόθεση αυτή, κρίθηκε μεγάλου επιστημονικού ενδιαφέροντος η διερεύνηση του υποκείμενου μοριακού μηχανισμού για να εξακριβωθεί αν η πρωτεΐνη KBTBD4 υποκινεί την επαγωγή της γ-σφαιρίνης.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας χωρίζεται σε δύο μέρη. Το πρώτο ήταν η επιβεβαίωση των ήδη υπάρχοντων βιβλιογραφικών δεδομένων που αφορούν το μικρό μόριο UM-171. Το μέρος αυτό ολοκληρώθηκε επιτυχώς με την επιβεβαίωση τόσο της επαγωγής της έκπτυξης και της διατήρησης του αρχέγονου χαρακτήρα των HSCs όσο και της πρωτεοσωμικής αποικοδόμησης της LSD1. Επιπρόσθετα δείχθηκε ότι η επίδραση του UM-171 στις ερυθροειδικές καλλιέργειες των HSCs είναι δόσοεξαρτώμενη. Το δεύτερο μέρος περιλάμβανε την αξιοποίηση 2 λεντικών φορέων, έναν για την αποσιώπηση (shKBTBD4) και έναν για την εκτοπική υπερέκφραση (KBTBD4<sup>over</sup>) της KBTBD4 με σκοπό τη διαλεύκανση του ρόλου της στην επαγωγή της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης. Εξαιτίας της πολυπλοκότητας του σχεδιασμού καθώς και των υψηλών τεχνικών απαιτήσεων που συνοδεύουν την παραγωγή των φορέων αυτών, δεν ολοκληρώθηκε η παραγωγή τους εντός των χρονικών ορίων της παρούσας εργασίας. Παρόλα αυτά η παραγωγή και απομόνωση του πλασμιδίου που φέρει το διαγονίδιο για την αποσιώπηση της KBTBD4 ήταν επιτυχής, γεγονός που καθιστά εφικτή τη μελλοντική παραγωγή του αντίστοιχου λεντικού φορέα που μπορεί να αξιοποιηθεί για την εξακρίβωση της πιθανής εμπλοκής της KBTBD4.

## Abstract

Hemoglobinopathies, primarily sickle cell disease (SCD) and  $\beta$ -thalassemia, represent the most widespread monogenic disorders worldwide. The recent years have marked a milestone for hemoglobinopathies, as revolutionary gene therapies have been approved for their treatment, opening new perspectives in the management of genetic disorders. Although these therapies offer the potential for a cure, something previously considered unattainable, patient access remains severely limited. This limitation is largely due to the exorbitant cost of such therapies, as well as the lack of expertise and infrastructure in countries where the majority of the patients are located. At the same time, conventional approaches remain restricted to the use of hydroxyurea (in SCD), which is not effective for many patients, and to symptomatic relief through transfusions and iron chelation therapies (in  $\beta$ -thalassemia). It is therefore of paramount importance to identify alternative therapeutic strategies that can be applied universally and effectively in clinical practice.

The small molecule UM-171 induces the expansion of hematopoietic stem cells (HSCs), with studies suggesting the KBTBD4-mediated degradation of the demethylase LSD1 as the mechanism of action. Since pharmacological inhibition of LSD1 has been shown to increase  $\gamma$ -globin expression levels, our research group conducted experiments to determine whether UM-171 could therefore induce  $\gamma$ -globin expression. With preliminary experiments confirming this hypothesis, it became a matter of significant scientific interest to investigate the underlying molecular mechanism, specifically whether the protein KBTBD4 drives the induction of  $\gamma$ -globin.

The objective of the present work is divided into two parts. The first was to validate existing literature data concerning the small molecule's UM-171 capacity to expand HSCs without driving them into terminal differentiation. This part was successfully completed, confirming both the induction of expansion and maintenance of the primitive phenotype of HSCs, as well as the proteasomal degradation of LSD1. In addition, it was demonstrated that the effect of UM-171

on erythroid HSC cultures is dose-dependent. The second part involved the utilization of two lentiviral vectors: one for silencing (shKBTBD4) and one for ectopic overexpression (KBTBD4<sup>over</sup>) of KBTBD4, with the aim of elucidating its role in the induction of fetal hemoglobin. Due to the complexity of the design and the high technical requirements associated with the production of these vectors, their generation was not completed within the timeframe of the present study. Nevertheless, the production and isolation of the plasmid carrying the transgene for KBTBD4 silencing was successful, thus enabling the future production of the corresponding lentiviral vector, which may be employed to verify the potential involvement of KBTBD4.

## Εισαγωγή

### 1. Αιμοποιητικό σύστημα

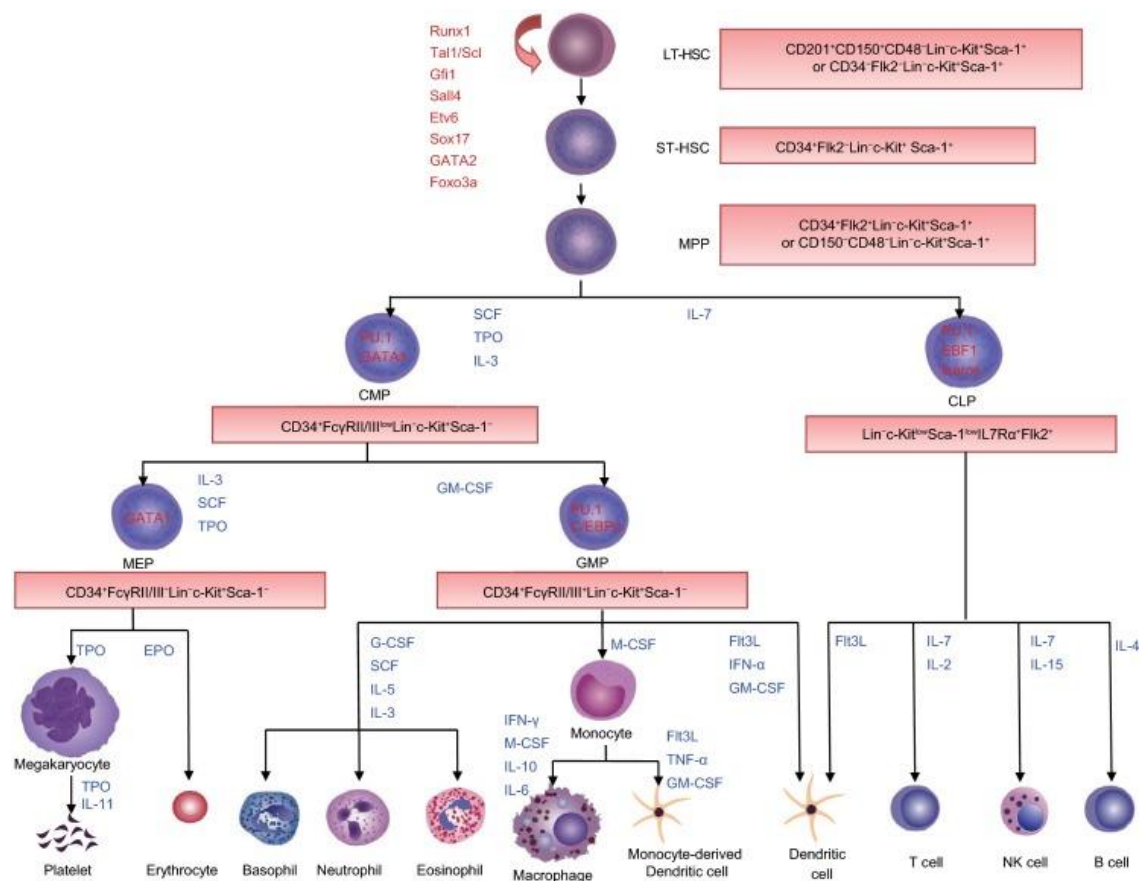
#### 1.1 Αρχέγονα Αιμοποιητικά Κύτταρα

Οι περισσότεροι ιστοί του ανθρώπινου οργανισμού αποτελούνται κυρίως από διαφοροποιημένα λειτουργικά κύτταρα ενώ ταυτόχρονα διατηρούν μικρούς πληθυσμούς πολυδύναμων προγονικών κυττάρων που έχουν τη δυνατότητα να αναπληρώνουν τα κύτταρα που χάνονται λόγω φυσιολογικής φθοράς, τραυματισμού ή ασθένειας. Πολυάριθμες έρευνες που πραγματοποιούνται την απομόνωση και τη μελέτη των κυττάρων αυτών από διαφορετικούς ιστούς και όργανα, έδειξαν ότι η αναγέννηση και η επιδιόρθωση βλαβών πραγματοποιείται με τη μεσολάβηση ιστοειδικών πολυδύναμων κυττάρων [6]. Όπως τα εμβρυϊκά πολυδύναμα κύτταρα, έτσι και τα ιστοειδικά έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται προς ώριμα κύτταρα τα οποία διατελούν τις λειτουργίες του εκάστοτε ιστού καθώς επίσης να διαιωνίζονται μέσα από μια διαδικασία γνωστή ως αυτό-ανανέωση [8]. Ο συνδυασμός των δύο αυτών ιδιοτήτων καθιστά τη

μελέτη τους ως το βασικότερο εργαλείο της αναγεννητικής ιατρικής, στη προσπάθεια εύρεσης νέων αποτελεσματικών θεραπειών ενάντια σε νεοπλασίες, νευροεκφυλιστικές ασθένειες καθώς και σε αυτοάνοσα νοσήματα.

Πριν από περισσότερο από 60 χρόνια οι James Till και Ernest McCulloch με μια σειρά πειραμάτων υπέδειξαν για πρώτη φορά μια μικρή υποομάδα κυττάρων του μυελού των οστών ως υπεύθυνη για τις ιδιότητες της διαφοροποίησης, της πολυδυναμίας και της αυτοανανέωσης στο αιμοποιητικό σύστημα [9]. Συγκεκριμένα παρατήρησαν ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα σχημάτιζαν αποικίες στο σπλήνα των ακτινοβολημένων πειραματόζων μετά τη μεταμόσχευση τους με αποτέλεσμα την επιβίωση των πειραματόζων. Για το λόγο αυτό τα κύτταρα ονομάστηκαν colony-forming unit spleen (CFU-S). Αν και αρχικά θεωρήθηκε ότι προέρχονταν από αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (HSCs), αργότερα έγινε γνωστό ότι πρόκειται για έναν μικτό πληθυσμό πρόδρομων κυττάρων που προέρχονται από δεσμευμένα πρόδρομα κύτταρα, φανερώνοντας έτσι την πολυπλοκότητα της ιεραρχίας των αρχέγονων κυττάρων. Τα πειράματα των Till και McCulloch ήταν κομβικής σημασίας για την επιστήμη καθώς πυροδότησαν ένα κύμα νέων ερευνών με στόχο την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό των HSCs [12].

Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (HSCs) αποτελούν τον εκτενέστερα μελετημένο πληθυσμό αρχέγονων κυττάρων στον άνθρωπο αλλά και σε πειραματικά μοντέλα όπως οι επίμυες. Το χαρακτηριστικό τους γνώρισμα και ταυτοχρόνως ο μόνος τρόπος να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη τους σε ένα μόσχευμα, είναι η ικανότητά ανασύστασης του αιμοποιητικού και λεμφικού συστήματος μετά από εμφύτευσή τους σε μυελοκατεσταλμένους λήπτες.



**Εικόνα 1** Σχηματική απεικόνιση των σταδίων διαφοροποίησης των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων [Cheng H et al. (2020)]

Η κυτταρική σύσταση του μυελού των οστών είναι εξαιρετικά ετερογενής και περιλαμβάνει διαφορετικούς πληθυσμούς κυττάρων τα οποία ταξινομούνται σύμφωνα με τη δυνατότητα αυτο-ανανέωσης και διαφοροποίησής τους [13]. Μια πολύ μικρή μερίδα κυττάρων με φαινότυπο CD34+ παρουσιάζουν δυναμικό long-term αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (LT-HSCs) και αποτελούν τους θεμελιώδεις πυλώνες της αιμοποίησης. Συγκεκριμένα η ικανότητά τους να αυτοανανεώνονται επ' άοριστον εγγυάται την συνεχή ανανέωση των κυττάρων του αίματος που αποτελεί προϋπόθεση για την επιβίωση του οργανισμού [10]. Το αντιγόνο CD34 (Cluster of Differentiation - CD) είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται στα ανθρώπινα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, στα ενδοθηλιακά πρόδρομα κύτταρα, στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες και σε ορισμένα κύτταρα του εμβρυϊκού και ενήλικου νευρικού ιστού. Η πρωτεΐνη αυτή φαίνεται να συμβάλλει στην

κυτταρική προσκόλληση, στην ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού καθώς και στη διαδικασία της διαφοροποίησης. Τα LT-HSCs, μετά από ορισμένο αριθμό αυτό-ανανεώσεων, διαφοροποιούνται προς κύτταρα με δυναμικό short-term HSCs (ST-HSCs), τα οποία με τη σειρά τους διαφοροποιούνται προς πολυδύναμα πρόδρομα κύτταρα (MMPs). Τα MMPs έχουν πολύ μικρό δυναμικό αυτό-ανανέωσης καθώς η κύρια λειτουργία τους είναι η διαφοροποίησή τους προς τους δύο βασικούς τύπους προγονικών κυττάρων, αυτόν της μυελικής σειράς CMP (Common Myeloid Progenitor) και αυτόν της λεμφικής CLP (Common Lymphoid Progenitor) όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1**. Ενώ ο CLP διαφοροποιείται μόνο προς κύτταρα της λεμφικής σειράς όπως είναι οι “φυσικοί φονείς” (Natural killer cells) και τα λεμφοκύτταρα (T- και B-), ο CMP δίνει δύο διαφορετικούς τύπους πρόδρομων κυττάρων τα οποία είναι διδύναμα. Συγκεκριμένα ο GMP (Granulocyte-Macrophage Progenitor) διαφοροποιείται προς κοκκιοκύτταρα και μακροφάγα ενώ ο MEP (Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitor) προς αιμοπετάλια και ερυθροκύτταρα [10][11].

## 1.2 Αιμοποίηση

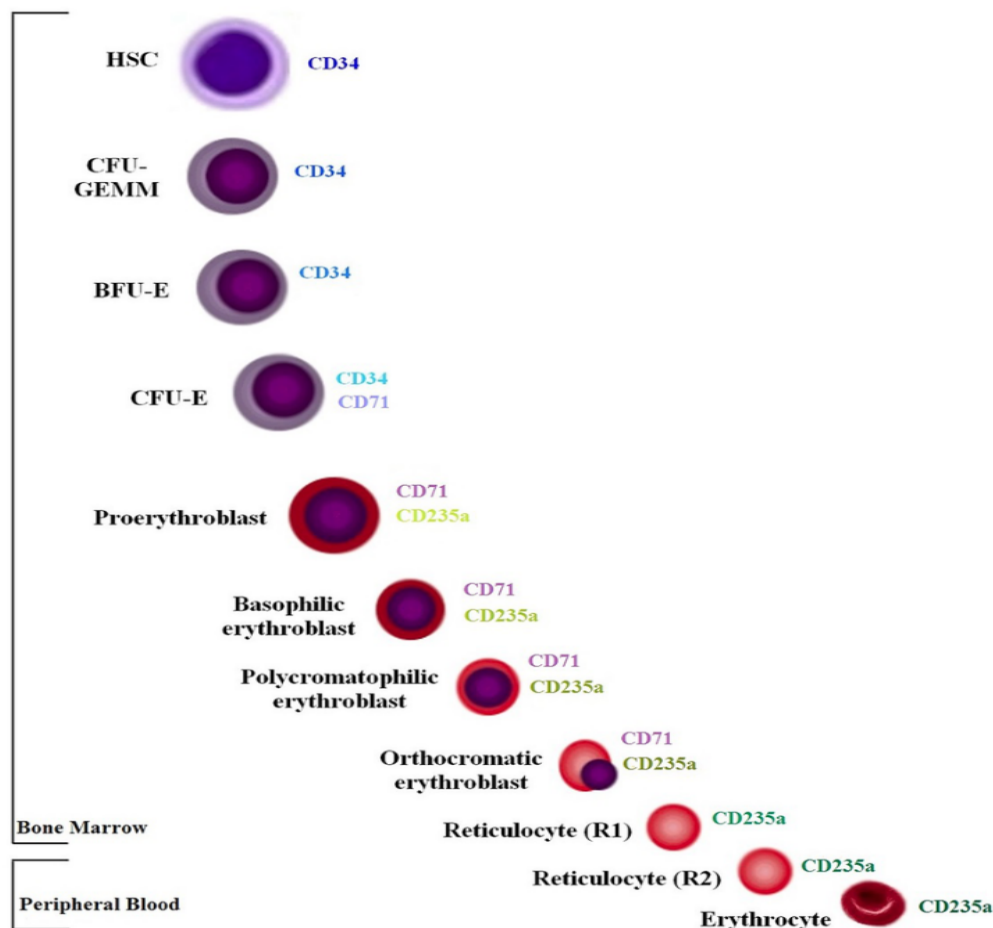
Μία από τις βασικότερες λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού είναι η διαδικασία της αιμοποίησης μέσω της οποίας παράγονται οι διαφορετικοί τύποι κυττάρων του αίματος από τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (HSCs). Πρόκειται για μια διαδικασία που πραγματοποιείται καθ’ όλη τη διάρκεια της ζωής ξεκινώντας αμέσως μετά την επιτυχή εμφύτευση του ζυγωτού. Συγκεκριμένα κατά τους πρώτους δύο μήνες της κύησης το έμβρυο βρίσκεται στην προ-ηπατική φάση και η αιμοποίηση πραγματοποιείται στις αιμοποιητικές νησίδες που σχηματίζονται από μεσεγχυματικά κύτταρα (αγγειοβλάστες) που προέρχονται από το μεσόδερμα [3]. Τα εξωτερικά κύτταρα αυτών των νησιδίων σχηματίζουν το ενδοθήλιο των πρώτων αγγείων ενώ τα εσωτερικά διαφοροποιούνται προς πρόδρομα κύτταρα του αίματος και ειδικότερα σε πρόδρομους ερυθροβλάστες. Κατά την 6<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης η διαδικασία της αιμοποίησης μετατοπίζεται κυρίως στο ήπαρ και σε μικρότερο βαθμό στο σπλήνα καθώς αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα εισέρχονται στο παρέγχυμα των

οργάνων αυτών. Κατά την ηπατοσπληνική φάση, όπως αποκαλείται, παρατηρείται σημαντική παραγωγή κοκκιοκυττάρων, αιμοπεταλίων, ερυθροβλαστών και ερυθροκυττάρων [3][5]. Παρότι η φάση αυτή διαρκεί μέχρι τη γέννηση του εμβρύου, λίγο πριν τον 3<sup>ο</sup> μήνα της κύησης δημιουργείται και η οριστική θέση αιμοποίησης, ο μυελός των οστών. Συγκεκριμένα κατά την μυελοειδή φάση ο χόνδρινος ιστός, αντικαθίσταται από οστίτη και έτσι σηματοδοτεί την έναρξη της μυελικής αιμοποίησης. Σταδιακά μέχρι τη γέννηση όλα τα οστά συμμετέχουν στην αιμοποίηση με την παραγωγή των αιμοπεταλίων να συμβαίνει κοντά στον 5<sup>ο</sup> μήνα της κύησης ενώ αυτή των ερυθροκυττάρων μετά την ολοκλήρωση του 6<sup>ου</sup>. Τέλος, μετά τη γέννηση τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα παράγονται πλέον κατά αποκλειστικότητα στον μυελό των οστών από όπου μεταναστεύουν φυσιολογικά στην κυκλοφορία του αίματος καθώς και στα αρμόδια όργανα που αποτελούν κέντρα παραγωγής λεμφοκυττάρων όπως είναι οι λεμφαδένες, ο θύμος αδένας και ο σπλήνας[2][1][4] και με αυτόν τον τρόπο πραγματοποιείται η παραγωγή όλων των κυτταρικών τύπων του αίματος όπως περιγράφηκε νωρίτερα.

### 1.3 Ερυθροποίηση

Τα ερυθροκύτταρα παράγονται από τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (HSCs) μέσω της διαδικασίας της ερυθροποίησης, δηλαδή μέσω διαδοχικών διαφοροποιήσεων των δεσμευμένων πρόδρομων κυττάρων που οδηγούν τελικά στα ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια. Αυτή η αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς ολόκληρου του οργανισμού. Όπως προαναφέρθηκε τα πρώτα στάδια της διαδικασίας της ερυθροποίησης περιλαμβάνουν τη διαφοροποίηση των HSCs προς προγονικά κύτταρα της μυελικής σειράς CMP που ονομάζονται επίσης και CFU-GEMM [14]. Αυτά με τη σειρά τους παράγουν τα προγονικά BFU-E και CFU-E τα οποία όπως φαίνεται και στην *Εικόνα 2* διατηρούν τον φαινότυπο CD34<sup>+</sup> ενώ ταυτοχρόνως αρχίζει η έκφραση του υποδοχέα της τρανσφερίνης TfR1 (CD71), χαρακτηριστικό γνώρισμα της ερυθροειδικής σειράς [18]. Η περαιτέρω διαφοροποίηση δίνει μεγάλο αριθμό πρόδρομων κυττάρων, όπως είναι οι

εμπύρηνοι ερυθροβλάστες, τα οποία πλέον έχουν απολέσει εντελώς τον αρχέγονο τους χαρακτήρα (CD34<sup>+</sup>) και επιπλέον εκφράζουν τη Γλυκοφορίνη Α (CD235a), χαρακτηριστικό δείκτη επιφανείας για τα πρόδρομα αλλά και τα ώριμα ερυθροκύτταρα [14].



*Εικόνα 2 : Σχηματική απεικόνιση της ερυθροποίησης και των χαρακτηριστικών δεικτών επιφανείας στα διάφορα στάδια της [Macrì S et al. (2015)]*

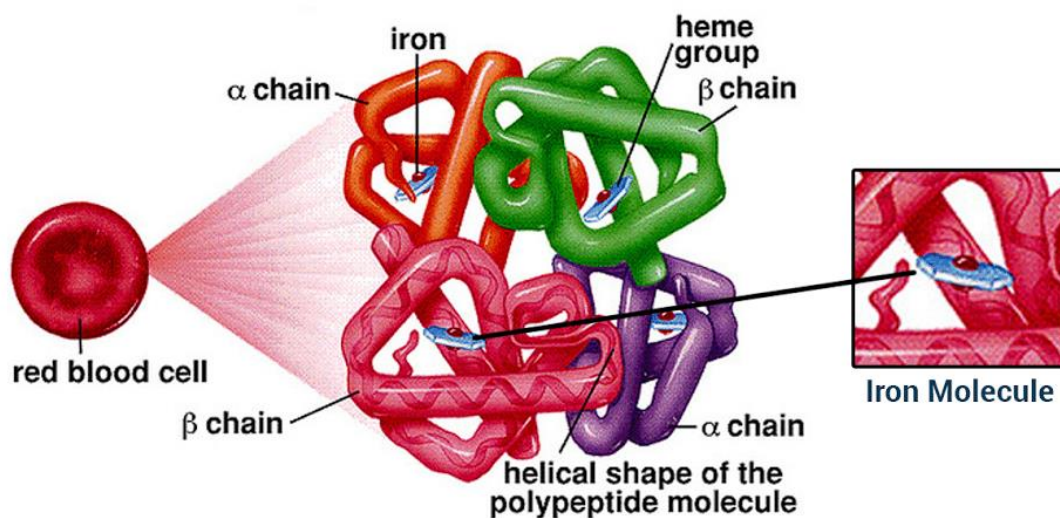
Καθώς οι ερυθροβλάστες ωριμάζουν, αποβάλλουν σταδιακά τον πυρήνα τους και μετατρέπονται σε δικτυοερυθροκύτταρα τα οποία εισέρχονται στην συστηματική κυκλοφορία. Δομικά τα δικτυοερυθροκύτταρα διαθέτουν mRNA και ριβοσώματα για την αποτελεσματική σύνθεση της αιμοσφαιρίνης ενώ φαινοτυπικά χάνουν τον δείκτη επιφανείας CD71 και εκφράζουν μόνο αυτόν της Γλυκοφορίνης Α (CD235a) [13][14]. Τέλος, η ωρίμανση των δικτυοερυθροκυττάρων

πραγματοποιείται αφού ολοκληρωθεί η σύνθεση της αιμοσφαιρίνης και έτσι προκύπτουν τα ώριμα ερυθροκύτταρα, ο πολυπληθέστερος τύπος κυττάρων του αίματος.

Η ερυθροποίηση υφίσταται πολυεπίπεδη ρύθμιση μέσω της δράσης διαφόρων κυτοκινών. Σημαντικότερη αυτών η ερυθροποιητίνη ή εποετίνη (EPO, Erythropoietin) [21]. Πρόκειται για μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία κατά την εμβρυική ηλικία παράγεται κατά κύριο λόγο στο ήπαρ ενώ λίγο πριν τη γέννηση η παραγωγή μεταφέρεται στους νεφρούς και με την παρουσία της ενισχύει την διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της ερυθράς σειράς [23].

#### 1.4 Ερυθροκύτταρα

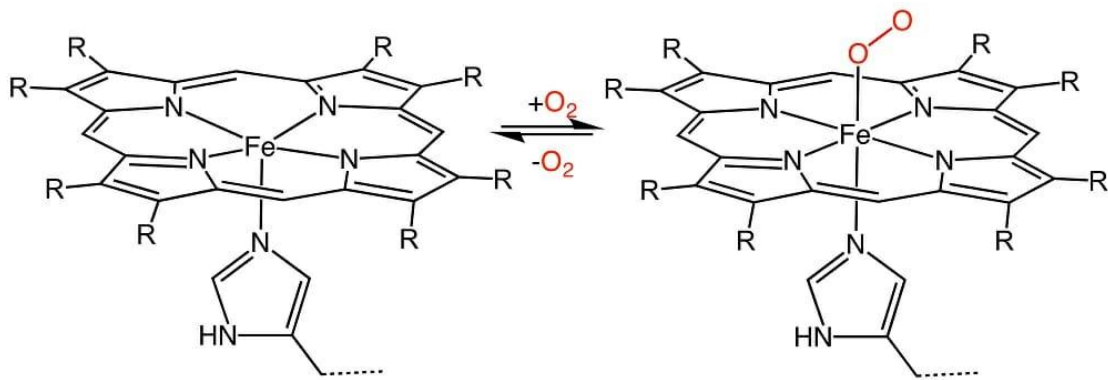
Η σημαντικότερη λειτουργία των ερυθροκυττάρων είναι η μεταφορά των αερίων της αναπνοής από τους πνεύμονες προς τους ιστούς και αντιστρόφως. Συγκεκριμένα μεταφέρουν οξυγόνο ( $O_2$ ) από τους πνεύμονες προς τους ιστούς όπου αξιοποιείται ως δότης ηλεκτρονίων για την παραγωγή τριφωσφορικών αδένινο-νουκλεοτιδίων (ATPs) στα μιτοχόνδρια. Επιπλέον, απομακρύνουν το διοξείδιο του άνθρακα ( $CO_2$ ) που παράγεται ως παραπροϊόν καταβολικών διεργασιών των κυττάρων, μεταφέροντας το στους πνεύμονες από όπου και αποβάλλεται μέσω της εκπνοής [20]. Έτσι εξασφαλίζεται η διατήρηση της οξεο-βασικής ισορροπίας του αίματος συνεπώς και των υπόλοιπων ιστών. Η έλλειψη των οργανιδίων και του πυρήνα παρέχει τη δυνατότητα μεταβολής της διαμόρφωσης τους έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η διέλευση τους ακόμα και στα τριχοειδή αγγεία με εξαιρετικά μικρή διάμετρο. Το ίδιο όμως χαρακτηριστικό συμβάλλει και στην μειωμένη διάρκεια ζωής τους καθώς η έλλειψη πυρήνα συνεπάγεται με μηδενική παραγωγή πρωτεϊνών που τα καθιστά ευάλωτα σε φθορά. Η πλειοψηφία των ώριμων ερυθροκυττάρων πεθαίνουν στον σπλήνα λόγω του στενού περιελισσόμενου τριχοειδικού δικτύου που τους ασκεί μεγάλη μηχανική πίεση[18].



*Εικόνα 3: Απεικόνιση της δομής ενός μορίου αιμοσφαιρίνης. Διακρίνονται τα δύο ζεύγη αλυσίδων α και β καθώς και οι τέσσερις θέσεις πρόσδεσης των μορίων της αίμης [https://askhematologist.com/abnormal-hemoglobins]*

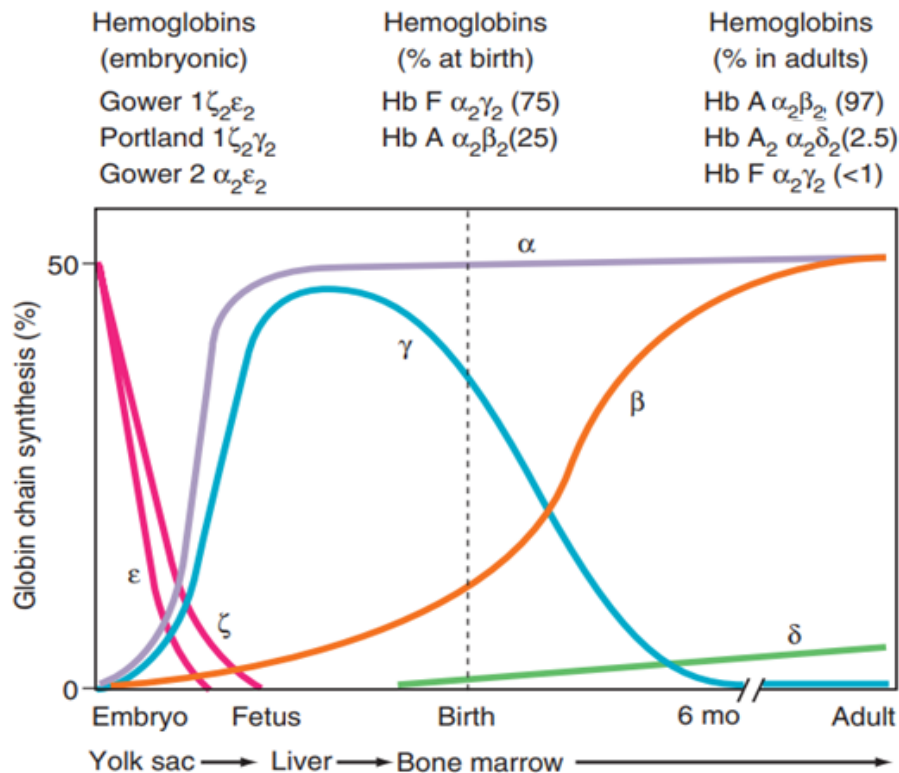
### 1.5 Αιμοσφαιρίνη

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω τα ώριμα ερυθροκύτταρα περιέχουν στο κυτταρόπλασμά τους άφθονες ποσότητες αιμοσφαιρίνης, μια πρωτεΐνη απαραίτητη για την ανταλλαγή των αερίων της αναπνοής. Κάθε μόριο αιμοσφαιρίνης αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες που είναι ανά δύο όμοιες και καθεμία συνδέεται ομοιοπολικά με ένα μόριο αίμης. [Εικόνα 3] Η δομή της αίμης περιλαμβάνει έναν δακτύλιο πορφυρίνης ο οποίος συνδέεται με ένα κεντρικό άτομο σιδήρου το οποίο με τη σειρά του δεσμεύει με αντιστρέψιμο τρόπο τα αέρια της αναπνοής [Εικόνα 4] [29].



**Εικόνα 4:** Σχηματική απεικόνιση της αναγμένης (αριστερά) και της οξειδωμένης (δεξιά) μορφής της αίμης [<https://biologydictionary.net/heme/>]

Στον άνθρωπο εντοπίζονται διάφοροι τύποι αιμοσφαιρίνης που κυρίως σχετίζονται με το στάδιο ανάπτυξης. Αυτό είναι αποτέλεσμα της αυστηρής ρύθμισης που υπόκεινται οι γενετικοί τόποι που ευθύνονται για την παραγωγή των αντίστοιχων σφαιρινών. Κατά την πρώιμη εμβρυική ηλικία και για περιορισμένο χρονικό διάστημα παρατηρούνται τρία διαφορετικά τετραμερή αιμοσφαιρίνης: Η αιμοσφαιρίνη Gower -1 με σύσταση ζ2ε2, η αιμοσφαιρίνη Gower -2 με σύσταση α2ε2 και η αιμοσφαιρίνη Portland με σύσταση ζ2γ2. Παρόλα αυτά για το μεγαλύτερο διάστημα της κύησης η κύρια αιμοσφαιρίνη είναι η εμβρυική αιμοσφαιρίνη (HbF) με σύσταση α2γ2 [31].) Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 5**, κατά την ενήλικη ζωή η συντριπτική πλειοψηφία των τετραμερών αιμοσφαιρίνης έχουν σύσταση α2β2 (HbA), ενώ σε πολύ χαμηλά ποσοστά ανιχνεύονται η HbA<sub>2</sub> μια εναλλακτική μορφή ενήλικης αιμοσφαιρίνης με σύσταση α2δ2 καθώς και η εμβρυική αιμοσφαιρίνη HbF. [32] Όπως θα αναλυθεί και στη συνέχεια το γονίδιο της ζ-σφαιρίνης βρίσκεται στον ίδιο γονιδιακό τόπο με το γονίδιο της α-σφαιρίνης και έχουν σημαντικό ποσοστό ομολογίας. Αντίστοιχα τα γονίδια των γ-, δ- και ε- σφαιρινών μοιράζονται τον ίδιο γενετικό τόπο με το γονίδιο της β-σφαιρίνης και θεωρούνται σφαιρίνες τύπου β. (β-like globins). Όλα τα τετραμερή σχηματίζονται από τον συνδυασμό ενός ζεύγους σφαιρινών τύπου α- και ενός τύπου β-.

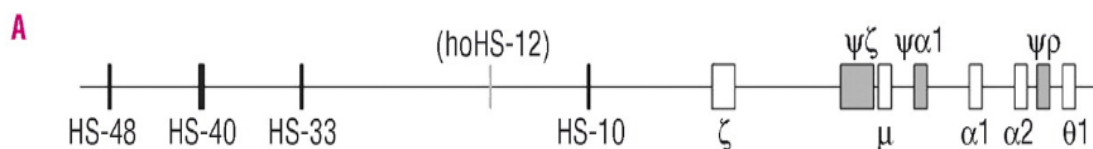


Εικόνα 5: Έκφραση των διάφορων μορφών σφαιρίνης στα διάφορα στάδια ανάπτυξης [Steinberg M. et al 2018]

## 2. Γενετικό προφίλ σφαιρινών

### 2.1 Σύμπλεγμα α-σφαιρίνης

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις αλυσίδες των αιμοσφαιρινών οργανώνονται σε δύο γονιδιακά συμπλέγματα (gene clusters). Το σύμπλεγμα της α-σφαιρίνης εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 16 και περιλαμβάνει 3 γονίδια που κωδικοποιούν αλυσίδες τύπου α ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , and  $\zeta_2$ ), 3 ψευδογονίδια τα οποία δεν εκφράζουν αλυσίδες λόγω μετάλλαξης σε προγονικό είδος, το γονίδιο HB $\theta$  που εκφράζει την αγνώστου λειτουργείας θ-σφαιρίνη καθώς και ρυθμιστικές περιοχές που ρυθμίζουν την έκφραση όλων αυτών [Εικόνα 7] [30].



**Εικόνα 7:** Απεικόνιση του γονιδιακού συμπλέγματος της  $\alpha$ -σφαιρίνης. Διακρίνονται τα γονίδια των σφαιρινών τύπου  $\alpha$  (άσπρο), τα ψευδογονίδια (γκρι) και οι ρυθμιστικές τους περιοχές (μαύρο) [Voon HP and Vadolas J (2008)]

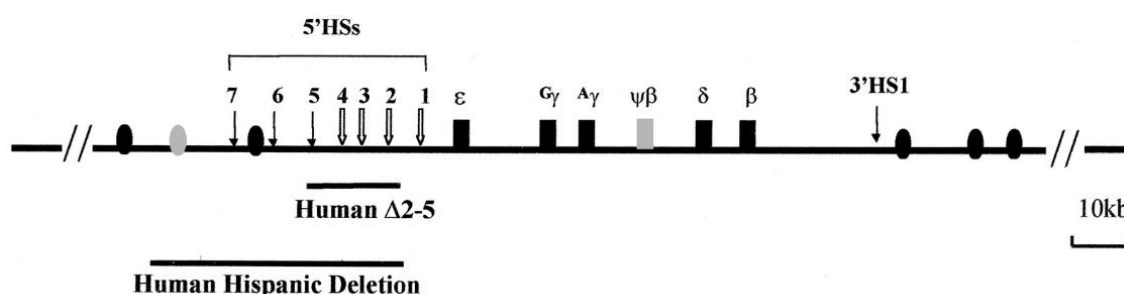
Στον άνθρωπο υπάρχουν δύο γονίδια που κωδικοποιούν την  $\alpha$ -αλυσίδα σε κάθε χρωμόσωμα (HBA1 και HBA2), τα οποία έχουν μήκος περίπου 4 kB το κάθε ένα. Τα εξώνια και το πρώτο εσώνιο των δύο αυτών γονιδίων είναι πανομοιότυπα, αλλά το δεύτερο ιντρόνιο του HBA1 είναι εννέα βάσεις μεγαλύτερο και διαφέρει κατά τρεις βάσεις από αυτό του γονιδίου HBA2. Παρά τον υψηλό βαθμό ομολογίας μεταξύ αυτών των δύο γονιδίων, οι ακολουθίες αποκλίνουν στις 3' αμετάφραστες περιοχές, 13 βάσεις μετά το κωδικόνιο λήξης TAA [32][38]. Λόγω αυτών των διαφορών στις αλληλουχίες των δύο γονιδίων, η έκφρασή τους διαφοροποιείται με το mRNA της  $\alpha_2$ -αλυσίδας να παράγεται δύο έως τρεις φορές περισσότερο από αυτό της  $\alpha_1$ -αλυσίδας τόσο στα ερυθροκύτταρα όσο και στο εμβρυϊκό ήπαρ και στο μυελό των οστών.

Όσον αφορά τη ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων του συμπλέγματος, υπάρχει ένας συνδυασμός ρυθμιστικών περιοχών που συμβάλλουν στην πολυδιάστατη αυτή διαδικασία. Συγκεκριμένα από 50kb έως 10kb ανοδικά του γονιδίου HBZ εντοπίζονται 4 περιοχές οι οποίες παρουσιάζουν υπερευαισθησία στη δράση της DNAase I και λειτουργούν ως ρυθμιστικά στοιχεία [36] **[Εικόνα 7]**. Η σημαντικότερη αυτών είναι η HS-40 καθώς έχει τη δυνατότητα να επάγει αποτελεσματικά την έκφραση της  $\alpha$ -σφαιρίνης ενώ έχειδειχθεί ότι η διαγραφή της μειώνει την έκφραση σε ποσοστό μεγαλύτερο του 95% [37]. Ο τρόπος με τον οποίο οι HS- περιοχές διεκπεραιώνουν την επαγωγή των γονιδίων του συμπλέγματος περιλαμβάνει την προσέλκυση ενός πενταμερούς συμπλόκου ερυθροειδικών μεταγραφικών παραγόντων που απαρτίζεται από τους GATA-1, SCL, E2A, LMO-2 και Ldb-1. Το πενταμερές αυτό σύμπλοκο σε συνεργασία με τον παράγοντα NF-E2 προσελκύουν την Pol II στη

γενετική περιοχή της α-σφαιρίνης η οποία αναγνωρίζει τον υποκινητή και μεταγράφει τα κατάλληλα γονίδια [38].

## 2.2 Σύμπλεγμα β-σφαιρίνης

Όπως προαναφέρθηκε όλες οι σφαιρίνες τύπου β εκφράζονται από γονίδια που βρίσκονται σε ακολουθία και διαχωρίζονται από μη κωδικές περιοχές. Η ευρύτερη αυτή περιοχή ονομάζεται γονιδιακό σύμπλεγμα της β-σφαιρίνης και εκτείνεται σε μια περιοχή 70kb στο χρωμόσωμα 11 [30]. **[Εικόνα 8]** Εξετάζοντας από το 5' άκρο το πρώτο γονίδιο που εντοπίζεται είναι το HBE το οποίο εκφράζει την εμβρυονική ε-σφαιρίνη. Η έκφραση του γονιδίου αυτού περιορίζεται από την 6<sup>η</sup> έως την 11<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης καθώς όπως αναφέρθηκε η ε-σφαιρίνη αποτελεί συστατικό των δύο τύπων εμβρυονικής αιμοσφαιρίνης Gower-1 και Gower-2 που ανιχνεύονται αντίστοιχα αποκλειστικά στην αρχή της κύησης [43].



*Εικόνα 8: Γονιδιακός χάρτης του συμπλέγματος της β-σφαιρίνης [Li Q et al. (2002)]*

Περίπου 15kb καθοδικά του HBE βρίσκονται τα δύο γονίδια που κωδικοποιούν τη γ-σφαιρίνη. Τα δύο αυτά γονίδια είναι σχεδόν πανομοιότυπα διαφέροντας αποκλειστικά στο 136<sup>ο</sup> κωδικόνιο όπου το γονίδιο που προηγείται κωδικοποιεί το γλουταμινικό οξύ ενώ αυτό που ακολουθεί την αλανίνη [30][32]. Σύμφωνα με το αρχικό γράμμα του διαφορετικού αμινοξέους τα δύο γονίδια διακρίνονται σε Gγ και Aγ (εναλλακτικά HBG2 και HBG1) και τα επίπεδα

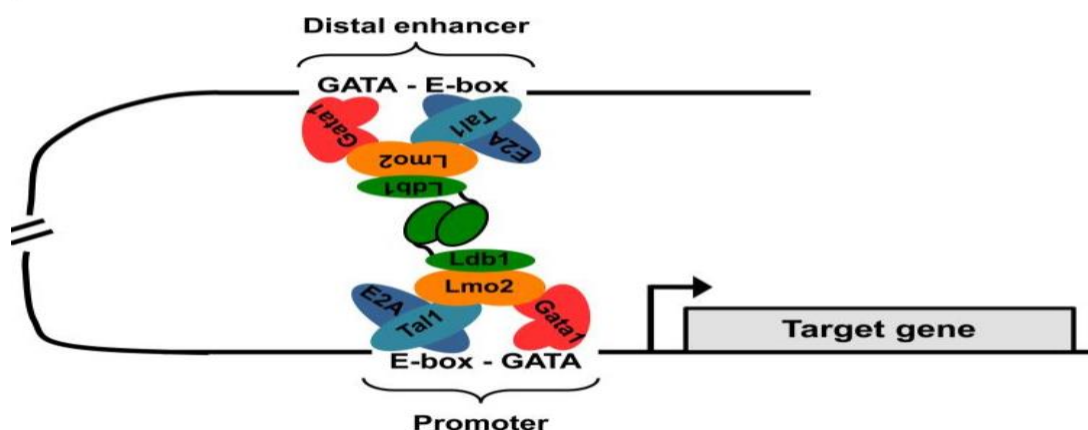
έκφρασης τους, παρότι διαφέρουν σημαντικά κατά την εμβρυική ηλικία, είναι συγκρίσιμα στην ενήλικη ζωή. Αυτή η διαφορά στη ρύθμιση τους, παρότι παρουσιάζει επιστημονικό ενδιαφέρον δεν προσφέρει κλινικά καθώς και οι δύο μορφές είναι λειτουργικά ισότιμες όταν συμμετέχουν σε τετραμερή αιμοσφαιρίνης [31].

Ακόμη πιο καθοδικά εντοπίζονται κατά σειρά το γονίδιο της δ-σφαιρίνης (HBD) και το γονίδιο της β-σφαιρίνης (HBB). Εικάζεται ότι τα γονίδια αυτά προήλθαν από το διπλασιασμό ενός γονιδίου πολλά εκατομμύρια χρόνια πίσω στον πρόγονο των σπονδυλωτών. Έκτοτε οι μεταλλάξεις που έχουν συμβεί στην αλληλουχίες των γονιδίων αυτών τα έχει διαφοροποιήσει σε τέτοιο βαθμό με αποτέλεσμα το HBB να έχει επικρατήσει στον άνθρωπο και η β-σφαιρίνη να αποτελεί την συντριπτική πλειοψηφία των σφαιρινών τύπου β στην ενήλικη ζωή [40].

Μια θεωρία για το γονίδιο της δ-σφαιρίνης είναι ότι μετά τη συσσώρευση μεταλλάξεων στο μέλλον θα απενεργοποιηθεί εντελώς και θα μετατραπεί σε ένα ακόμα ψευδογονίδιο το οποίο παρόλο που δεν θα έχει λειτουργική χρησιμότητα, θα συμβάλλει όπως και τα υπόλοιπα ψευδογονίδια στην εξιστόρηση της εξελικτικής πορείας των γονιδίων των σφαιρινών στον άνθρωπο [32].

Για την επίτευξη της εναρμονισμένης έκφρασης των απαραίτητων σφαιρινών σε κάθε στάδιο ανάπτυξης, το σύμπλεγμα της β-σφαιρίνης με τα 5 λειτουργικά του γονίδια υπόκειται σε πολυεπίπεδο γονιδιακό έλεγχο μέσω διάφορων ρυθμιστικών στοιχείων που εντοπίζονται στη περιοχή. Το σημαντικότερο από αυτά είναι το σύνολο 5 περιοχών που παρουσιάζουν υπερεισθησία στη δράση της DNaseI (HS 1-5) και μαζί ονομάζονται LCR (Locus Control Region) [31]. Η περιοχή LCR είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση του συμπλέγματος της β-σφαιρίνης με τους ερυθροειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες που ενορχηστρώνουν την έκφραση των γονιδίων του. Χαρακτηριστικό γνώρισμα της LCR περιοχής το οποίο τη διαφοροποιεί από τους τυπικούς ενισχυτές είναι οι θηλιές χρωματίνης που σχηματίζονται κατά την αλληλεπίδρασή της με τους εκάστοτε γονιδιακούς υποκινητές μετά τη μεσολάβηση των μεταγραφικών παραγόντων [45]. Όπως και στην περίπτωση του συμπλέγματος της α-σφαιρίνης έτσι και εδώ επιστρατεύονται πολυάριθμοι

μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι είτε επιδρούν απευθείας είτε σχηματίζουν σύμπλοκα τα οποία επιτρέπουν σε περιοχές που είναι απομακρυσμένες να αλληλοεπιδράσουν μεταξύ τους. Καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση του γονιδίου της β-σφαιρίνης διαδραματίζουν οι παράγοντες LDB1, LMO2, GATA-1 και TAL1 οι οποίοι απαρτίζουν ένα ρυθμιστικό σύμπλοκο που χάριν απλότητας ονομάζεται σύμπλοκο LDB1 [44].



**Εικόνα 9:** Απεικόνιση του σχηματισμού θηλιάς χρωματίνης μέσω της αλληλεπίδρασης δύο συμπλόκων Ldb1 η οποία οδηγεί στην αλληλεπίδραση του υποκινητή του γονιδίου με έναν απομακρυσμένο ενισχυτή. [Love PE et al. (2014)]

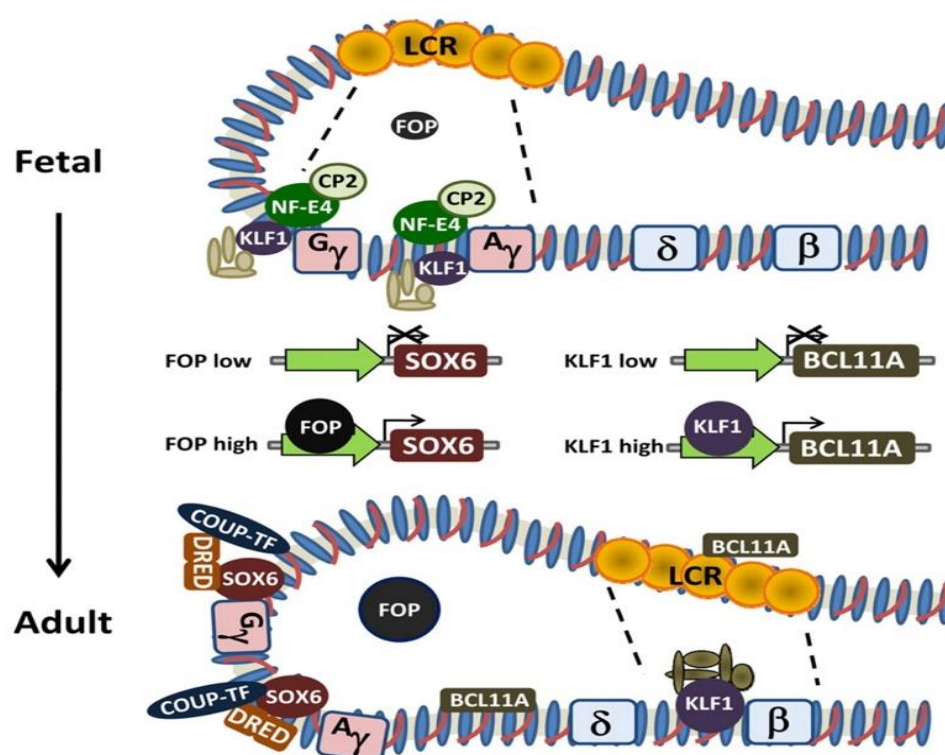
Το σύμπλοκο αυτό αναγνωρίζει την LCR και στη συνέχεια, αλληλεπιδρώντας με όμοια σύμπλοκα που προσδένονται σε περιοχές-ενισχυτές οδηγούν στην ισχυρή έκφραση της β-σφαιρίνης [46] **[Εικόνα 9]**.

### 2.3 Μεταστροφή σφαιρινών

Η μεταστροφή των σφαιρινών αποτελεί ένα φυσιολογικό φαινόμενο που περιγράφει την μεταβολή της έκφραση των γονιδίων των σφαιρινών με σκοπό την κάλυψη των αναγκών του οργανισμού στα διάφορα στάδια ανάπτυξης του. Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα στον άνθρωπο πραγματοποιούνται δύο μεταστροφές, μία στην αρχή της εμβρυογένεσης όπου η εμβρυονική αιμοσφαιρίνη HbE (ζ2ε2) αντικαθίσταται ολοκληρωτικά από την εμβρυική (HbF,

$\alpha 2\gamma 2$ ) και μία μετά τη γέννηση όπου η HbF αντικαθίσταται σχεδόν εξολοκλήρου από την ενήλικη αιμοσφαιρίνη HbA ( $\alpha 2\beta 2$ ) [45]. [Εικόνα 5]

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ρύθμιση στο γονιδιακό σύμπλεγμα της  $\beta$ -σφαιρίνης όπου βρίσκονται τα πρωταγωνιστικά γονίδια HBE, HBG και HBB. Μετά τις πρώτες εβδομάδες της κύησης η έκφραση της  $\epsilon$ -σφαιρίνης απενεργοποιείται υπό την επίδραση του παράγοντα SOX6 [49] καθώς και των ορφανών πυρηνικών υποδοχέων TR2 και TR4 (DRED complex) [51], γεγονός που σηματοδοτεί τη μεταφορά του κέντρου αιμοποίησης από τον αμνιακό σάκο στο εμβρυικό ήπαρ. Η δεύτερη και σημαντικότερη μεταστροφή πραγματοποιείται μετά τη γέννηση και χαρακτηρίζεται από ταυτόχρονη αποσιώπηση της  $\gamma$ -σφαιρίνης και επαγωγή της  $\beta$ -σφαιρίνης. Έχει βρεθεί ότι οι σημαντικότεροι παράγοντες που επιτελούν αυτή τη μεταβολή στην έκφραση είναι ο καταστολέας BCL11A, ο παράγοντας KLF1 καθώς και ο παράγοντας LRF που κωδικοποιείται από το γονίδιο ZBTB7A [50]. Οι προαναφερθέντες παράγοντες SOX6 και TR2/TR4 επικουρούν και στην αποσιώπηση της  $\gamma$ -σφαιρίνης αναδεικνύοντας την εκλεκτική δράση των μεταγραφικών παραγόντων σύμφωνα με το αναπτυξιακό στάδιο του οργανισμού [51] [Εικόνα 10]



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση της μεταστροφής της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης με τους σημαντικότερους παράγοντες που συμμετέχουν στη ρυθμιστική αυτή διαδικασία [Wilber A et. Al (2011)]

### 3. Διαταραχές της Αιμοσφαιρίνης

#### 3.1 Αιμοσφαιρινοπάθειες

Οι αιμοσφαιρινοπάθειες αποτελούν την συχνότερη ομάδα μονογονιδιακών ασθενειών παγκοσμίως καθώς σύμφωνα με εκτιμήσεις περίπου το 7% του παγκόσμιου πληθυσμού φέρει μετάλλαξη στους γενετικούς τόπους των σφαιρινών. Επιπλέον περισσότερα από 300.000 βρέφη γεννιούνται κάθε χρόνο με παθολογικό φαινότυπο με τη συντριπτική πλειοψηφία αυτών να συμβαίνουν σε χώρες με χαμηλό κατά κεφαλήν εισόδημα [53]. Συνοδεύονται είτε από ελαττωματική παραγωγή αιμοσφαιρίνης (θαλασσαιμίες) είτε από παραγωγή αιμοσφαιρίνης με ελαττωματική δομή (δρεπανοκυτταρική νόσος) και με αυτόν τον τρόπο διακρίνονται σε ποσοτικές και τις ποιοτικές αντίστοιχα. Οι πλειονότητα αυτών είναι κληρονομούμενες ενώ σπανιότερα δημιουργούνται εξαιτίας αυτόματων μεταλλάξεων. Οι αιμοσφαιρινοπάθειες συνοδεύονται από ευρύ φάσμα κλινικών συμπτωμάτων κλιμακούμενης σοβαρότητας και εξαρτώνται κυρίως από τον τύπο και τη ζυγωτία (ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία) της μετάλλαξης, καθώς και τη συνύπαρξη άλλων γενετικών ανωμαλιών. [55] Παρότι παλιότερα περιορίζονταν γεωγραφικά στις μεσογειακές χώρες και σε μεγάλες περιοχές της Αφρικής και της Ασίας, πλέον έχουν εξαπλωθεί στη Βόρεια και Νότια Αμερική και στη Βόρεια Ευρώπη λόγω των διεθνών μεταναστεύσεων. [54]

#### 3.2 Θαλασσαιμίες

Οι θαλασσαιμίες είναι αιματολογικές διαταραχές οι οποίες κληρονομούνται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο. Εξαιτίας των διάφορων μεταλλάξεων που λαμβάνουν μέρος διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ των  $\alpha$  και  $\beta$  αλυσίδων, γεγονός που τελικά οδηγεί σε καταστροφή των ερυθροκυττάρων.

Ανάλογα με τη σφαιρίνη της οποίας η σύνθεση επηρεάζεται, ταξινομούνται σε α-θαλασσαιμίες και β-θαλασσαιμίες. [56]

Οι α-θαλασσαιμίες προκαλούνται ως επί το πλείστον από τμηματικές ( $\alpha^+$ ) ή ολικές ( $\alpha^0$ ) διαγραφές τουλάχιστον ενός εκ των τεσσάρων γονιδίων που κωδικοποιούν την α-σφαιρίνη. Σπανιότερα παρατηρούνται άλλες μεταλλάξεις που επίσης οδηγούν σε μείωση ή ολική απώλεια σύνθεσης της α-αλυσίδας [57][31]. Δεδομένου ότι οι α-αλυσίδες αποτελούν δομικές υπομονάδες τόσο της εμβρυϊκής ( $\alpha_2\gamma_2$ ) όσο και της ενήλικης ( $\alpha_2\beta_2$ ) αιμοσφαιρίνης, η ελαττωματική σύνθεση της α-αλυσίδας έχει αντίκτυπο και στις δύο αιμοσφαιρίνες και η σοβαρότητα της νόσου εξαρτάται από τον συνολικό αριθμό των επηρεαζόμενων HBA γονιδίων. Ανάλογα με τις κλινικές εκδηλώσεις και τη σοβαρότητα της νόσου ταξινομούνται σε τέσσερις ομάδες. Η πρώτη και ηπιότερη περιλαμβάνει περιπτώσεις όπου μόνο ένα γονίδιο έχει καταστεί μη λειτουργικό και οι φορείς του ονομάζονται σιωπηλοί. Η δεύτερη περιλαμβάνει τους τυπικούς φορείς όπου παρατηρείται μετάλλαξη σε δύο γονίδια είτε αυτά είναι στο ίδιο χρωμόσωμα είτε ένα σε κάθε χρωμόσωμα. [58][37] Η κλινικά σημαντικότερη μορφή είναι η μείζονα α-θαλασσαιμία γνωστή και ως νόσος αιμοσφαιρίνης H ( $HbH$ ). Χαρακτηρίζεται από την απώλεια τριών γονιδίων η οποία οδηγεί σε ανισορροπία μεταξύ των δύο αλυσίδων και συνεπώς στην δημιουργία των χαρακτηριστικών τετραμερών β-αλυσίδας που ονομάζεται αιμοσφαιρίνη H. Η μεταφορά του οξυγόνου από την  $HbH$  δεν είναι αποτελεσματική και οι ασθενείς συνήθως χρειάζονται μεταγγίσεις [59][55]. Τέλος η παντελής έλλειψη λειτουργικών γονιδίων α-σφαιρίνης προκαλεί το θανατηφόρο σύνδρομο του εμβρυϊκού ύδρωπα. Η έλλειψη α-αλυσίδων κατά την κύηση οδηγεί στη δημιουργία τετραμερών από γ-αλυσίδες που είναι γνωστά ως αιμοσφαιρίνη Bart's ( $Hb\ Bart's$ ). Η συγκεκριμένη είναι εξαιρετικά ασταθής με αποτέλεσμα την μη σωστή οξυγόνωση του εμβρύου. Η μόνη θεραπευτική επιλογή για την επιβίωση του εμβρύου περιλαμβάνει ενδομητρική μετάγγιση αίματος ως τη γέννηση και έπειτα μεταμόσχευση στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων από υγιή δότη [38][58].

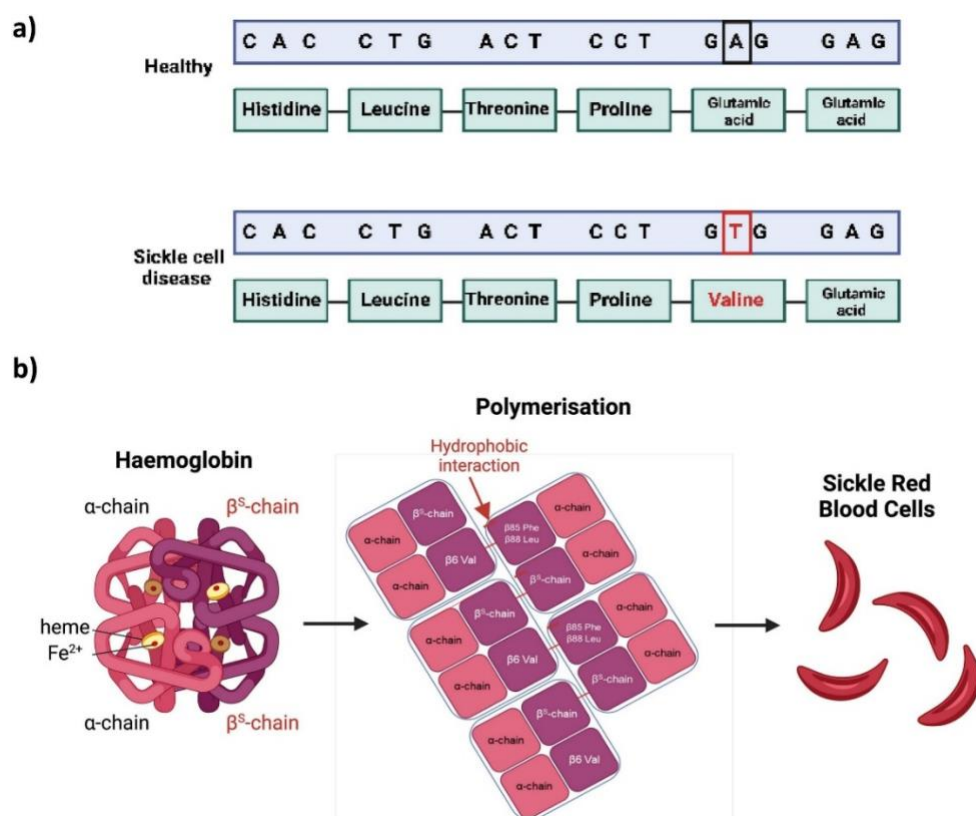
Στην αντίστοιχη περίπτωση των β-θαλασσαιμιών παρατηρείται μειωμένη ( $\beta^+$ -θαλασσαιμία) ή μηδενική ( $\beta^0$ -θαλασσαιμία) παραγωγή β-σφαιρίνης. Η ανισορροπία στη σύνθεση των α- και β-αλυσίδων γίνεται εμφανής στους

πολυχρωματικούς ερυθροβλάστες και οδηγεί σε καθίζηση των πλεοναζουσών α-αλυσίδων, προκαλώντας βλάβες στην κυτταρική μεμβράνη [62]. Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί περισσότερες από 300 σημειακές μεταλλάξεις, ενώ η διαγραφή ενός ή και των δύο HBB γονιδίων είναι σπάνια [58]. Δεδομένου ότι η β-αλυσίδα εκφράζεται σε σημαντικό βαθμό μετά τη γέννηση, τα κλινικά συμπτώματα γίνονται αντιληπτά στην ενήλικη ζωή [65]. Αναλόγως τον αριθμό των γονιδίων που επηρεάζονται καθώς και τον τύπο της μετάλλαξης που καθορίζει την τελική έκφραση της β-σφαιρίνης, διακρίνονται διαφορετικές μορφές β-θαλασσαιμίας. Η ηπιότερη μορφή περιλαμβάνει άτομα-φορείς της ασθένειας που γονοτυπικά φέρουν ένα φυσιολογικό γονίδιο και ένα με ελαττωματική ή μηδενική παραγωγή ( $\beta$ - $\beta^+$  ή  $\beta$ - $\beta^0$ ). Τα άτομα αυτά είναι γνωστά ως φορείς μεσογειακής αναιμίας και συνήθως δεν εμφανίζουν συμπτώματα πέραν ήπιας αναιμίας [60][66]. Στην περίπτωση όμως που και τα δύο γονίδια παρουσιάζουν μεταλλάξεις και συνεπώς μειωμένη έκφραση β-σφαιρίνης ( $\beta^+$ - $\beta^+$  ή  $\beta^+$ - $\beta^0$ ) ή στερούνται παντελώς παραγωγής β-σφαιρίνης ( $\beta^0$ - $\beta^0$ ) προκαλείται η ομόζυγη β-θαλασσαιμία (μείζων που απαιτεί μεταγγίσεις ή ενδιάμεση β-θαλασσαιμία που δεν απαιτεί ή μόνο περιστασιακά μεταγγίσεις αίματος) [61][63]. Η ασθένεια αυτή είναι γνωστή και ως αναιμία Cooley's και εξαιτίας του βαρέος φαινοτύπου, οι συχνές μεταγγίσεις αίματος είναι απαραίτητες για την επιβίωση των ασθενών [58][61].

### 3.3 Δρεπανοκυτταρική νόσος

Με τον ευρύτερο όρο “δρεπανοκυτταρική νόσος” περιγράφεται ένα σύνολο αιματολογικών φαινοτύπων όπου η παθολογική μορφή της β-σφαιρίνης  $\beta^S$  εντοπίζεται σε διαφορετικά τετραμερή αιμοσφαιρίνης [70][31]. Οι γνωστότερες αυτών είναι η φορεία της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας ( $\beta$ ,  $\beta^S$ ) όπου τα άτομα αποτελούν φορείς της ασθένειας και εκδηλώνουν συμπτώματα μόνο σε εξαιρετικά υποξικές συνθήκες καθώς και η ομόζυγη δρεπανοκυτταρική αναιμία ( $\beta^S$ ,  $\beta^S$ ) στην οποία παρουσιάζονται όλα τα χαρακτηριστικά συμπτώματα της ασθένειας [71][58]. Μια ιδιαίτερη παθολογική κατάσταση, που προσομοιάζει τον ομόζυγο φαινότυπο, συνδυάζει την έκφραση της  $\beta^S$  με μειωμένη ( $\beta^+$ ) ή ανεπαρκή έκφραση ( $\beta^0$ ) φυσιολογικής β-σφαιρίνης (μικροδρεπανοκυτταρική αναιμία). Η

διάκριση μεταξύ των δύο αυτών παθολογικών καταστάσεων μπορεί να γίνει εργαστηριακά καθώς μόνο τα ερυθροκύτταρα που εκφράζουν την παθολογική HbSβ<sup>+/0</sup> παρουσιάζουν μικροκυττάρωση [69][70]. Εκτιμάται ότι περίπου 300.000 βρέφη γεννιούνται κάθε χρόνο με δρεπανοκυτταρική αναιμία (ομοζυγωτία) με την πλειονότητα αυτών να εντοπίζονται σε Αφρική και δυτική Ασία. Η γεωγραφική αυτή συσχέτιση των ασθενών και των φορέων θεωρείται ότι οφείλεται στο εξελικτικό πλεονέκτημα που προσέδιδε η μετάλλαξη έναντι στη μόλυνση από το πλασμώδιο της ελονοσίας το οποίο ακμάζει στις περιοχές αυτές μέχρι και σήμερα [38][55].



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση της μετάλλαξης στη SCD και του μοντέλου πολυμερισμού των δρεπανοκυττάρων που έχει προταθεί [Dimitrievska M. et al (2024)]

Η δρεπανοκυτταρική νόσος αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα του πόσο κομβική για την ομοιόσταση μιας πρωτεΐνης και κατ' επέκταση ολόκληρου του οργανισμού μπορεί να είναι η αντικατάσταση μίας και μόνης νουκλεοτιδικής βάσης. Συγκεκριμένα η αντικατάσταση μιας αδενίνης από μια θυμίνη στο έκτο κωδικόνιο του γονιδίου της β-σφαιρίνης οδηγεί στην κωδικοποίηση του αμινοξέος βαλίνη αντί του γλουταμινικού οξέος και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την

παραγωγή της παθολογικής β<sup>s</sup>-σφαιρίνης [67][68] [**Εικόνα 11**]. Η παθολογική αυτή πρωτεΐνη, απουσία οξυγόνου, σχηματίζει υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις τόσο μεταξύ των τεραμερών που συμμετέχει όσο και με βιομόρια που υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα των ερυθροκυττάρων με αποτέλεσμα το σχηματισμό επιμήκων βιολογικών δομών οι οποίες μπορούν να επιφέρουν ζημιές στα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα καθώς και στην μεμβράνη των ερυθροκυττάρων. Αυτός είναι ο μηχανισμός πίσω από το χαρακτηριστικό δρεπανοειδές σχήμα που αποκτούν σε συνθήκες υποξίας τα ερυθροκύτταρα των ασθενών [58][70]. Εξαιτίας της παθολογικής αυτής δομής παρουσιάζουν σημαντικά μειωμένη ευκαμψία γεγονός που τα καθιστά ευάλωτα στην μηχανική καταπόνηση που δέχονται κατά τη διέλευση τους από αγγεία μικρής διαμέτρου όπως είναι τα τριχοειδή. Αυτό οδηγεί σε αιμόλυση και συνεπώς εμφάνιση συμπτωμάτων αναιμίας αλλά κυριότερα σε αυξημένο κίνδυνο απόφραξης των αγγείων αυτών που προκαλούν την εμφάνιση οξέων θωρακικών πόνων αλλά και ισχαιμικών επεισοδίων που είναι δυνητικά απειλητικά για τη ζωή [55][58][70][71].

### 3.4 Σύνδρομο κληρονομικής παραμονής της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης (HPFH)

Ένα καλόηθες σύνδρομο που ανήκει στις κατηγορία των αιμοσφαιρινοπαθειών και έχει σημαντική ερευνητική αξία είναι το σύνδρομο της κληρονομικής παραμονής της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης. Όπως προκύπτει και από την ονομασία του συνδρόμου, παρατηρείται συνέχιση της έκφρασης της γ-σφαιρίνης και στην ενήλικη ζωή με αποτέλεσμα το αυξημένο ποσοστό εμβρυικής αιμοσφαιρίνης (HbF) η οποία κατανέμεται με σχετικά ομοιόμορφο τρόπο στους ερυθροβλάστες και τα ερυθροκύτταρα [72]. Ενώ σε υγιή ενήλικα άτομα η HbF κυμαίνεται στο 1% της ολικής αιμοσφαιρίνης, τα άτομα με το σύνδρομο εμφανίζουν ποσοστά που αγγίζουν το 30% [58] Παρότι αυτή η διαφορά συνεπάγεται και μειωμένη ενήλικη αιμοσφαιρίνη (HbA), τα άτομα αυτά είναι εντελώς ασυμπτωματικά.

Ο λόγος που το συγκεκριμένο σύνδρομο έχει σημαντική κλινική αξία είναι ότι σε περίπτωση συνύπαρξης του με άλλο τύπο αιμοσφαιρινοπάθειας όπως η β-θαλασσαιμία ή η δρεπανοκυτταρική αναιμία αναιρεί τους παθολογικούς

φαινοτύπους που αναλύθηκαν παραπάνω [75][31]. Η πρώτη αναφορά της συνδυαστικής αυτής κατάστασης έγινε το μακρινό 1955 όταν οι Edington and Lehmann παρατήρησαν σε δρεπανοκυτταρικούς ασθενείς της Αφρική την “κάλυψη” του φαινότυπου όταν συνοδεύεται από υψηλά επίπεδα HbF [73], ενώ λίγο αργότερα το 1964 ο Δρ. Σταματογιαννόπουλος και η ομάδα του περιέγραψε ότι η συνύπαρξη του συνδρόμου HPFH με β-θαλασσαιμία, βελτίωσε σημαντικά την κλινική εικόνα του ασθενούς, καθώς η ελλιπής παραγωγή ενήλικης αιμοσφαιρίνης αντισταθμίστηκε μερικώς από την αυξημένη έκφραση της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης [74]. Οι γενετικές μεταλλάξεις που ευθύνονται για την εμφάνιση του συνδρόμου είναι εξαιρετικά ετερογενείς και σε κάποιο βαθμό εξαρτώνται από τη γεωγραφική περιοχή. Συγκεκριμένα στον ελληνικό πληθυσμό εντοπίζονται διάφορες σημειακές μεταλλάξεις που οδηγούν στην εμφάνιση του συνδρόμου [75], ενώ σε ανθρώπους με βρετανική καταγωγή αποδίδεται σε μεγάλο βαθμό σε σημειακή μετάλλαξη που επιτρέπει την επιστράτευση του KLF1 [76]. Η ιδιόμορφη και ευεργετική επίδραση της HPFH στις αιμοσφαιρινοπάθειες αποτελεί έως σήμερα αντικείμενο εντατικής μελέτης, με συμβατικές θεραπευτικές προσεγγίσεις αλλά και καινοτόμες γονιδιακές θεραπείες που στοχεύουν την επανενεργοποίηση της HbF [77].

## 4. Θεραπευτικές προσεγγίσεις για SCD και TDT

### 4.1 Αλλογενής Μεταμόσχευση HSCs

Όπως αναλύθηκε στην προηγούμενη ενότητα, οι αιμοσφαιρινοπάθειες αποτελούν κληρονομούμενες γονιδιακές ασθένειες επομένως η συμβατική θεραπεία που παρέχεται είναι υποστηρικτική και περιλαμβάνει την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων με συχνές μεταγγίσεις και θεραπείες αποσιδήρωσης. Ο μόνος τρόπος να επιτευχθεί ριζική θεραπεία είναι η πραγματοποίηση αλλογενούς μεταμόσχευσης στελεχιαίων αιμοποιητικών

κυττάρων (HSCs) [78], η οποία ωστόσο, περιορίζεται σημαντικά από τη μειωμένη διαθεσιμότητα συμβατών δοτών και τις ανοσολογικές επιπολκές[79] (Υποενότητα 5.1)

## 4.2 Γονιδιακή Θεραπεία

Η ανάγκη εύρεσης εναλλακτικής επιλογής για τις περιπτώσεις που δεν υπάρχει διαθέσιμος συμβατός δότης επικέντρωσε την έρευνα στην ανάπτυξη γονιδιακών θεραπειών η οποίες είτε διορθώνουν την υπαίτια μετάλλαξη είτε ενθέτουν αντίγραφα των φυσιολογικών γονιδίων της β- και γ-σφαιρίνης στο γονιδίωμα. Ειδικότερα τα τελευταία χρόνια, μεγάλο ενδιαφέρον συγκέντρωσε η στρατηγική άρσης της αποσιώπησης της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης HbF, που όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, δύναται να αντισταθμίσει σε ορισμένο βαθμό την ελλειμματική ή μειωμένη ενήλικη αιμοσφαιρίνης HbA. [80][81].

Η πρώτη γονιδιακή θεραπεία για αιμοσφαιρινοπάθειες εγκρίθηκε τον Αύγουστο του 2022 παρέχοντας εξαιρετικά αποτελέσματα στην θεραπευτική αντιμετώπιση της μείζονος θαλασσαιμίας (Cooley's). Το προϊόν Zyntelgo (Betibeglogene Autotemcel) της Bluebird Bio περιλαμβάνει έναν λεντικό φορέα που διαμολύνει και ενσωματώνει στα HSCs αντίγραφα του τροποποιημένου γονιδίου β<sup>T87Q</sup> της β-σφαιρίνης με αποτέλεσμα οι ασθενείς να παράγουν λειτουργική αιμοσφαιρίνη HbA<sup>T87Q</sup>. Τα κλινικά δεδομένα είναι πολύ ενθαρρυντικά με σχεδόν 9 στους 10 που έλαβαν τη θεραπεία να είναι ανεξάρτητοι μεταγγίσεων [84][85].

Λίγο πριν την άφιξη του 2024, ο FDA έδωσε έγκριση σε δύο νέες *ex vivo* γονιδιακές θεραπείες για την αντιμετώπιση της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας. Παρότι και τα δύο προϊόντα τροποποιούν γενετικά τα απομονωμένα HSCs του ασθενή, ο τύπος της τροποποίησης καθώς και η τεχνολογία που αξιοποιείται για να επιτευχθεί αυτή σε κάθε περίπτωση είναι διαφορετική. Το προϊόν Lyfgenia (Lontibeglogene Autotemcel), που επίσης κυκλοφόρησε από την Bluebird Bio αξιοποιεί πανομοιότυπο λεντικό φορέα για να ενσωματώσει το λειτουργικό

γονίδιο  $\beta^{T87Q}$ . Παρόλο που ο FDA θεωρεί ότι τα δύο προϊόντα της Bluebird Bio μοιράζονται το ίδιο “δραστικό συστατικό”, η εταιρεία κάνει λόγο για προϊόντα με διαφορετική σύσταση. Σύμφωνα με τα κλινικά δεδομένα τα ερυθροκύτταρα που παράγουν την  $HbA^{T87Q}$  παρουσιάζουν μειωμένη δρεπάνωση και συνεπώς μειωμένο κίνδυνο αγγειακής απόφραξης. [86][83][88]

Το προϊόν Casgevy (Exagamglogene Autotemcel) που κυκλοφόρησε από τις Vertex Pharmaceuticals και CRISPR Therapeutics, απετέλεσε ορόσημο της γονιδιακής θεραπείας καθώς είναι η πρώτη εφαρμογή της τεχνολογίας CRISPR/Cas που έλαβε έγκριση για τη δρεπανοκυτταρική νόσο και τη θαλασσαιμία. Για την επίτευξη της επιθυμητής γονιδιακής επεξεργασίας επιστρατεύεται ειδικό σύμπλοκο οδηγού RNA (gRNA) και ενδονουκλεάσης Cas9 που ονομάζεται ριβονουκλεοπρωτεΐνη (RNP) το οποίο μεταφέρεται στα κύτταρα του ασθενούς με τη βοήθεια ηλεκτροδιάτρησης. Όταν η RNP βρεθεί στον πυρήνα αναγνωρίζει εκλεκτικά την περιοχή-στόχο με τη βοήθεια του gRNA και προκαλεί θραύση της διπλής έλικας του DNA (DSB). Μετά από τέτοια θραύση συμβαίνει απαλοιφή ή προσθήκη μερικών βάσεων που θα μεταβάλλει το πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου και τελικά θα το καταστήσει ανενεργό. Στην περίπτωση του Casgevy το γονίδιο-στόχος κωδικοποιεί τον κύριο καταστολέα της γ-σφαιρίνης (Bcl11A), επομένως η επιτυχημένη εφαρμογή της θεραπείας θα οδηγήσει σε αυξημένα επίπεδα HbF που έχει δειχθεί ότι βελτιώνει σημαντικά τον φαινότυπο της δρεπανοκυτταρικής νόσου. Ένα μη αμελητέο πλεονέκτημα της συγκεκριμένης θεραπείας σε σχέση με τις υπάρχουσες είναι η απουσία κινδύνου εισχωρητικής μεταλλαξιγένεσης καθώς δεν αξιοποιεί τεχνολογία λεντικού φορέα [69][86][87].

Αυτή τη στιγμή πολυάριθμες γονιδιακές θεραπείες με διαφορετικές τεχνολογίες βρίσκονται σε στάδιο κλινικών δοκιμών. Συνοπτικά: Το προϊόν Dreparex μοιράζεται την ίδια φιλοσοφία με αυτή των προϊόντων της Bluebird Bio και αξιοποιεί τον λεντικό φορέα GLOBE για την εισαγωγή ενός διαφορετικού λειτουργικού γονιδίου β-σφαιρίνης [89]. Αντίθετα το προϊόν ARU-1801 περιλαμβάνει λεντικό φορέα που ενσωματώνει αντίγραφο του γονιδίου της γ-σφαιρίνης με σκοπό την ενίσχυση της παραγωγής της HbF [90]. Οι κλινικές δοκιμές RUBY και CEDAR εφαρμόζουν τεχνολογίες CRISPR/Cas12 και

CRISPR/Cas9 αντίστοιχα[69], ενώ η PRECIZN-1 αξιοποιεί το εναλλακτικό σύστημα ZFN/Fok1 για την επίτευξη της γονιδιακής τροποποίησης [92]. Τέλος στο Boston's Children's Hospital αξιοποιούν τον λεντικό φορέα BCH-BB694 που εκφράζει ειδικό shRNA για την ιστοειδική αποσιώπηση του BCL11A ενώ ταυτόχρονα αποσιωπάται και η έκφραση της παθολογικής β<sup>S</sup>-σφαιρίνης [91].

#### 4.3 Μικρά μόρια εγκεκριμένα από τον FDA

Παρά την πληθώρα ερευνών και την επακόλουθη αφθονία πληροφοριών σχετικά με τους γενετικούς και παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς που διέπουν τις αιμοσφαιρινοπάθειες, δεν έχει βρεθεί κάποιο μικρό φαρμακολογικό μόριο που να χρησιμοποιείται καθολικά για τη θεραπεία των αιμοσφαινοπαθειών. Η μόνη επιλογή που προσφέρεται σήμερα είναι η φαρμακευτική αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας με υδροξυουρία (HU). [55][98]

Η υδροξυουρία ή εναλλακτικά υδροξυκαρβαμίδη αποτελεί την πρώτη από του στόματος (per os) εγκεκριμένη θεραπεία (1998) για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων των αιμοσφαιρινοπαθειών. Παρά τις πολυάριθμες έρευνες, ο μηχανισμός δράσης της δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως με τους ειδικούς να προτείνουν έναν συνδυασμό δράσεων [69]. Ο κύριος μηχανισμός που θεωρείται υπεύθυνος για την ευεργετική δράση της HU είναι η αναστολή της ριβονουκλεοτιδικής αναγωγής, ένα ένζυμο απαραίτητο για την σύνθεση του DNA. Με τον τρόπο αυτό οδηγεί σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου και συνεπώς κυτταρικό θάνατο, γεγονός που προκαλεί μια μικρής κλίμακας κυτταροτοξικότητα για τα κύτταρα της ερυθράς σειράς. Ως απάντηση στην απώλεια αυτή ο οργανισμός επιστρατεύει προγονικά κύτταρα τα οποία φέρουν αυξημένα ποσοστά εμβρυικής αιμοσφαιρίνης [94]. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι τα ερυθροκύτταρα υφίστανται δομικές μεταβολές μετά την επίδραση της υδροξυουρίας που τα αποτρέπει από το να αποκτήσουν το παθολογικό δρεπανοειδές σχήμα. Με τον τρόπο αυτό ενισχύεται η φυσιολογική κυκλοφορία του αίματος και μειώνονται οι χαρακτηριστικοί πόνοι λόγω εμβολικών κρίσεων (VOCs) [93]. Τέλος έχει αναφερθεί ότι μειώνει την φλεγμονή καταστέλλοντας την

παραγωγή των ουδετερόφιλων, δράση που θεωρείται ιδιαίτερα ευεργετική για την γενικότερη κλινική εικόνα δρεπανοκυτταρικών ασθενών [94]. Παρά το ικανοποιητικό προφίλ ασφάλειας που αναδεικνύει σε ενήλικους και παιδιά, παρουσιάζει εξαιρετικά ετερογενή δράση μεταξύ ασθενών χωρίς να μπορεί να εξακριβωθεί η αιτία που αυτό συμβαίνει [95].

Ένα άλλο μικρό μόριο που χορηγείται per os και πρόσφατα έλαβε εσπευσμένη έγκριση από τον FDA είναι το Voxelotor. Ανήκει στην κατηγορία των αλλοστερικών τροποποιητών της αιμοσφαιρίνης. Ο μηχανισμός δράσης περιλαμβάνει την πρόσδεση του στις α-αλυσίδες που οδηγεί σε άυξηση της συγγένειας του τετραμερούς αιμοσφαιρίνης με το οξυγόνο και γενικότερα σταθεροποίηση της μορφής της οξυ-αιμοσφαιρίνης [96]. Με αυτόν τον τρόπο μειώνει τον πολυμερισμό των δρεπανοκυττάρων καθώς αυτός συμβαίνει στην μη οξυγονωμένη κατάσταση της αιμοσφαιρίνης, γεγονός που συμβάλλει στην διατήρηση των επιπέδων αιμοσφαιρίνης σε ικανοποιητικά επίπεδα ενώ παράλληλα μειώνονται τα περιστατικά VOC [97].

Δυο σκευάσματα που αρχικά είχαν πάρει έγκριση από τον FDA ανακλήθηκαν μετά την κυκλοφορία τους καθώς, παρότι ήταν ασφαλή για χρήση, δεν παρουσίαζαν σημαντικά οφέλη στην αντιμετώπιση των κύριων συμπτωμάτων της SCD. Πρόκειται για το μονοκλωνικό αντίσωμα της P-σελεκτίνης Crizanlizumab και το συμπλήρωμα διατροφής L-γλουταμίνη [69][98].

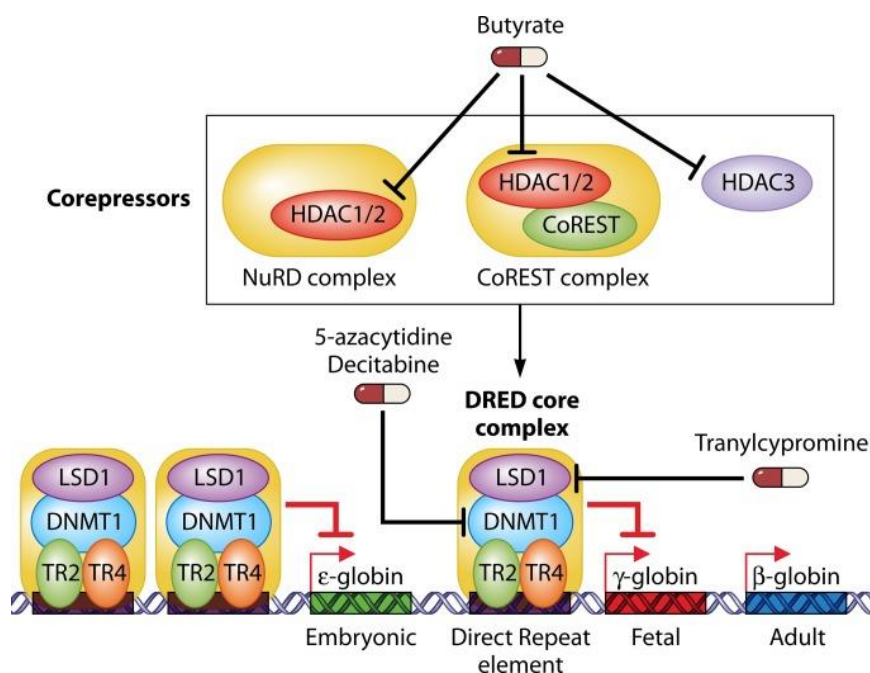
#### 4.4 Επιγονιδιωματική ρύθμιση από μικρά μόρια με σκοπό την ενεργοποίηση της γ-σφαιρίνης

Όπως αναφέρθηκε και στην Ενότητα 3, η μεταστροφή των σφαιρινών πραγματοποιείται με τη βοήθεια πολλών παραγόντων και συμπλόκων που τροποποιούν την μορφή και την αναδίπλωση (θηλιές) της χρωματίνης. Στην περίπτωση της αποσιώπησης της γ-σφαιρίνης τα κυριότερα ένζυμα που συμβάλλουν στην χημική τροποποίηση των βάσεων και των ιστονών του DNA είναι οι DNMT1, LSD1 και HDAC1/2. *Εικόνα*. Η συνδυαστική δράση αυτών οδηγεί στην καταστολή της έκφρασης μέσω της διατήρησης [100][102]:

- α) των υψηλών επιπέδων μεθυλίωσης των νουκλεοτιδικών βάσεων,
- β) των χαμηλών επιπέδων ακετυλίωσης των ιστονών,
- γ) των χαμηλών επιπέδων μεθυλίωσης του υπολοίπου λυσίνης 4 της ιστόνης 3 (H3K4) και
- δ) των υψηλών επιπέδων μεθυλίωσης του υπολοίπου λυσίνης 9 της ιστόνης 3.

Έτσι ήταν αναμενόμενο τα μικρά μόρια που αλληλοεπιδρούν με τους παράγοντες αυτούς να αποτελέσουν κέντρο μελέτης με στόχο την ενεργοποίηση της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης [99].

Το σύμπλοκο DRED δρα ως καταστολέας και απαρτίζεται από τέσσερα μέλη, μεταξύ αυτών οι δύο ορφανοί υποδοχείς TR2/TR4 που αναγνωρίζουν και προσδένονται στις περιοχές DRE που εντοπίζονται στους υποκινητές των ε- και γ- σφαιρινών αλλά όχι της β-σφαιρίνης [51]. Το σύμπλοκο συμπληρώνουν η DNA μέθυλοτρανσφεράση 1 (DNMT1) και η απομεθυλάση των υπολοίπων λυσίνης των ιστονών (LSD1) [99] **Εικόνα 12**.



**Εικόνα 12:** Σχηματική απεικόνιση των δημοφιλέστερων ενζυμικών συμπλόκων που αποτελούν στόχο φαρμακευτικών μορίων για την επαγωγή της γ-σφαιρίνης [Suzuki M. et al (2014)]

Η DNMT1 αποτελεί στόχο για δύο τυπικά υπομεθυλιωτικά φάρμακα που έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν ως χημειοθεραπευτικά, την 5-αζακυτιδίνη (5-AZA) και την δεσιταμπίνη (DAC). Παρότι τα φάρμακα αυτά μπορούν επάγουν σε σημαντικό βαθμό την έκφραση της γ-σφαιρίνης, η μελλοντική χρήση τους και ειδικότερα της 5-AZA περιορίζεται σημαντικά από τις παρενέργειες που τα συνοδεύουν (θρομβοπενία, ουδετεροπενία) [100][101]

Αντίστοιχα η LSD1 μπορεί να ανασταλεί από την τρανσυλκυπρομίνη (TCP) και παράγωγες ενώσεις όπως οι RN-1 και GSK-1. Η TCP είναι ένα εγκεκριμένο αντικαταθλιπτικό φάρμακο που δρα ως αναστολέας του ενζύμου μονοάμινο-οξειδάση (MAO). Η αναστολή της LSD1 από αναστολείς της MAO μπορεί να εξηγηθεί καθώς η ίδια προσομοιάζει την MAO τόσο δομικά όσο και λειτουργικά όπου απομεθυλώνει την H3K4 οξειδώνοντας την μέθυλο-ομάδα. [102][103]. Η συνδυαστική θεραπεία του παραγώγου RN-1 με τον απομεθυλιωτικό παράγοντα DAC καθώς και με την HU έδειξαν υποσχόμενα αποτελέσματα *in vivo* με σημαντικά περιορισμένη κυτταροτοξικότητα συγκριτικά με την εκάστοτε μονοθεραπεία [100][104].

Τόσο το σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης νουκλεοσωμάτων (NuRD) όσο και το σύμπλοκο CoREST περιλαμβάνουν στα δομικά τους μέλη τις αποακετυλάσες HDAC1/2 που είναι υπεύθυνες για τα χαμηλά επίπεδα ακετυλιωμένων ιστονών. Έρευνες έδειξαν ότι και τα δύο αυτά σύμπλοκα αλληλεπιδρούν με το σύμπλοκο DRED και φέρονται ως συνκαταστολείς της έκφρασης της γ-σφαιρίνης [99]. **Εικόνα 12** Η χρήση γνωστών αναστολέων των HDAC όπως το Vorinostat και το διμέθυλο-βουτυρικό οξύ βρίσκονται σε κλινική δοκιμή με τα αποτελέσματα μέχρι στιγμής να μην είναι τα αναμενόμενα (~2% επαγωγή) [101]. Επιπλέον, η πλειοτροπική δράση των HDAC καθιστά αναπόφευκτη την αποφυγή τοξικότητας ακόμα και αν επιτευχθεί “on-target” δράση, γεγονός που μειώνει την θεραπευτική τους αξία [102].

Το σύμπλοκο CoREST (αναφέρεται και ως LHC [107]) εκτός της HDAC2 περιλαμβάνει και την προαναφερθείσα LSD1 τις οποίες γεφυρώνει η συνδετική πρωτεΐνη RCOR1 (εναλλακτικά COREST1) [106]. Παρότι αρχικά είχε θεωρηθεί ότι οι δράσεις τους είναι ανεξάρτητες πλέον είναι γνωστό ότι υπάρχει συνεχής ανατροφοδότηση ανάμεσά τους και η φαρμακολογική αναστολή ενός εκ των δύο

μπορεί να επηρεάσει την λειτουργία και των δύο ενεργών συστατικών του συμπλόκου [105]. Όσον αφορά την αποσιώπηση της γ-σφαιρίνης φαίνεται ότι το σύμπλοκο συνεισφέρει με παραπάνω από ένα μηχανισμούς καθώς πέραν της διπλής καταλυτικής του δράσης, έχει δειχθεί ότι επιπλέον αλληλοεπιδρά με τον BCL11A που όπως αναφέρθηκε αποτελεί κομβικό καταστολέα της έκφρασης της HbF [108][107]. Αυτή του η ιδιαιτερότητα το καθιστά ελκυστικό θεραπευτικό στόχο με την LSD1 να έχει πρωταγωνιστικό ρόλο.

## 5. Ex vivo επαγωγή της έκπτυξης των HSCs με τη χρήση μικρών μορίων

### 5.1 Εμπόδια στην επιτυχημένη μεταμόσχευση HSCs

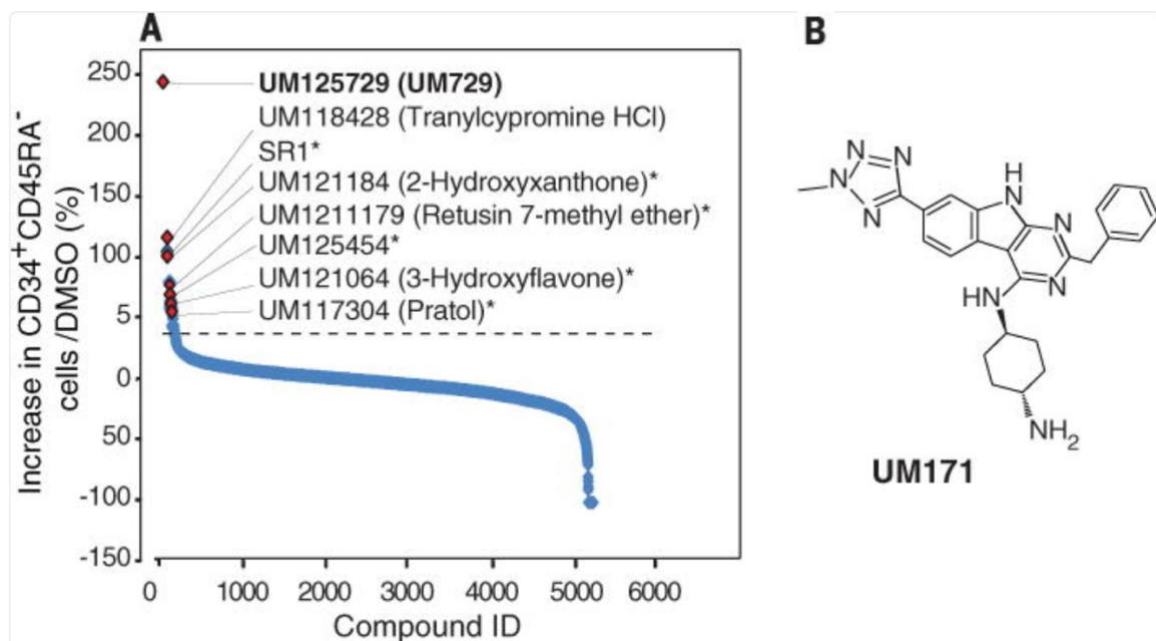
Η αλλογενής μεταμόσχευση HSC είναι η μόνη θεραπευτική επιλογή για την εκρίζωση αιματολογικών νεοπλασιών ενώ όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως βρίσκει εφαρμογή και στην θεραπεία μη-κακοήθων αιματολογικών ασθενειών όπως η δρεπανοκυτταρική νόσος. Δυστυχώς, ένας στους τρεις ασθενείς δεν θα έχουν HLA-συμβατό δότη και θα αποκλειστούν από τη θεραπεία [109]. Η αξιοποίηση μοσχευμάτων ομφάλιο-πλακουντιακού αίματος (ΟΠΑ) αντί αυτών από κινητοποιημένο περιφερικό αίμα προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα. Πρώτον υπάρχει σημαντικά μειωμένη ανάγκη για HLA-συμβατότητα και με αυτόν τον τρόπο γίνεται εφικτή η διαδικασία της μεταμόσχευσης σε όλους σχεδόν τους ασθενείς. Δεύτερον μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης χρόνιας νόσου μοσχεύματος κατά ξενιστή (GvHD), μια παθολογική κατάσταση ιδιαίτερα κρίσιμη για τη μακροπρόθεσμη ποιότητα ζωής των μεταμοσχευμένων ασθενών. Το κύριο μειονέκτημα των μοσχευμάτων ΟΠΑ είναι ότι γενικά χαρακτηρίζονται από περιορισμένο αριθμό αρχέγονων κυττάρων ικανών για αυτό-ανανέωση, γεγονός

που οδηγεί σε καθυστερημένη αποίκιση του μυελού (εμφύτευση) και συνεπώς αυξημένη θνητότητα που σχετίζεται με την μεταμόσχευση [110][113].

Για την αντιμετώπιση της μειωμένης εμφύτευσης μοσχευμάτων που προέρχονται είτε από ΟΠΑ είτε από κινητοποιημένο περιφερικό αίμα (mPBMCs), έχουν γίνει εκτεταμένες μελέτες για την εύρεση κατάλληλων επαγωγέων της έκπτυξης των αρχέγονων και των προγονικών κυττάρων [111][112]. Η συγκριτική έρευνα των διαδεδομένων επαγωγικών μικρών μορίων (SR1, Ly, UM171) από τους Psatha et al. 2017 αναδεικνύει τα οφέλη της χρήσης συνδυασμού μικρών μορίων τόσο για την αποτελεσματική *ex vivo* έκπτυξη όσο και για την επιτυχημένη εμφύτευση του μοσχεύματος *in vivo* [114]

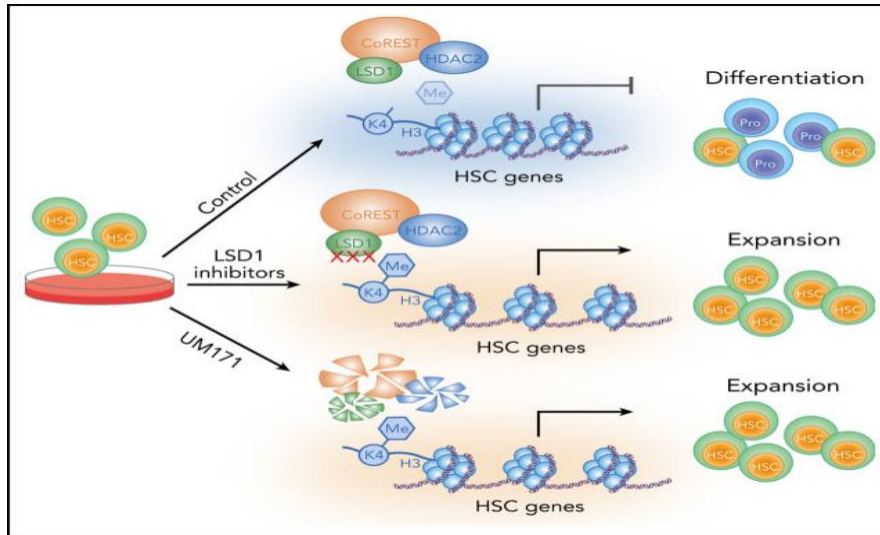
## 5.2 Το «χρυσό» μικρό μόριο UM171

Το 2014 η επιστημονική ομάδα του Guy Sauvageau πραγματοποίησε ένα εκτεταμένο “drug screening” (5280 ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους) με σκοπό την εύρεση μικρών φαρμακευτικών μορίων που θα μπορούν να επάγουν αποτελεσματικά την έκπτυξη αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSCs) σε μόσχευμα κινητοποιημένου περιφερικού αίματος (mPB) το οποίο έχει προηγουμένως εμπλουτιστεί με τα πιο πρώιμα LT-HSCs με φαινότυπο CD34<sup>+</sup>/CD45RA<sup>-</sup>. Το μικρό μόριο που ξεχώρισε από το εντυπωσιακό αυτό εγχείρημα ήταν η πρόδρομη ένωση UM729 που μετά από βελτιστοποίηση της δομής της προέκυψε το μικρό μόριο UM171 του οποίου η δομή φαίνεται στην **Εικόνα 13** [109]. Επιπλέον εκτός από το δεύτερο δραστικότερο μόριο που ήταν η αναφερθείσα τρανυλκυπρομίνη, τα υπόλοιπα 5 μόρια ήταν φαρμακολογικοί αναστολείς του υποδοχέα των ιμινών Arh (εναλλακτικά αρυλο-υδρογονανθρακικός υποδοχέας) που μέχρι πρότινος ήταν η μόνη γνωστή ομάδα φαρμάκων που επάγει την αυτό-ανανέωση των HSCs [117].



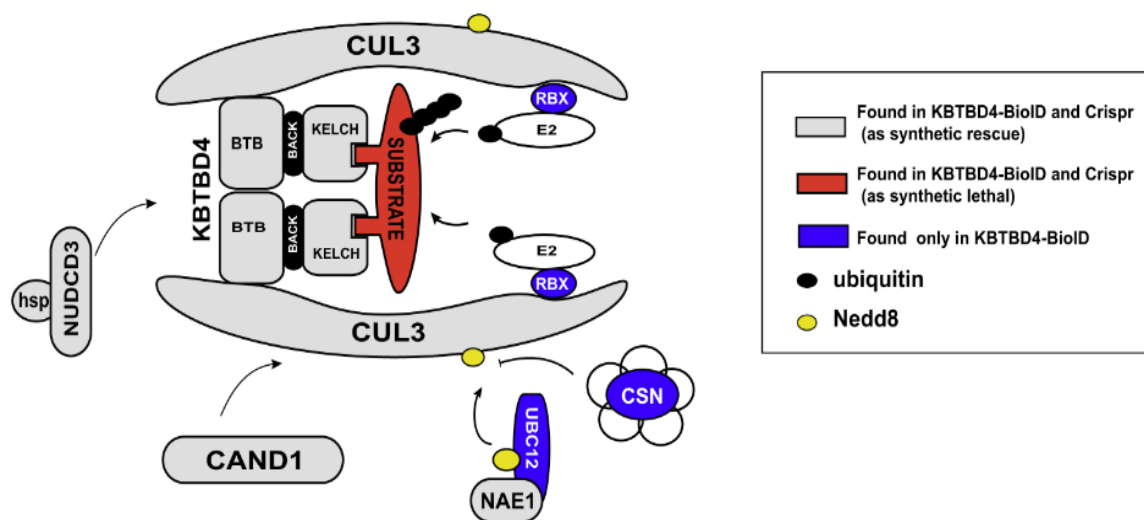
**Εικόνα 13:** Α. Τα αποτελέσματα του screening αναδεικνύουν την υπεροχή της UM729 (πρόδρομης ένωσης του UM171) σε σχέση με τους υπόλοιπους επαγωγείς της έκπτυξης που ελέγχθηκαν. Β. Η δομή του UM171 με τη χαρακτηριστική λειτουργική ομάδα της πυρίμιδο-ινδόλης [Fares I. et al (2014)]

Έρευνα της ίδιας ερευνητικής ομάδας απέδωσε τις ευεργετικές ιδιότητες του UM171 στην εξουδετέρωση δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) και περιορισμό του οξειδωτικού στρες, καθώς και στην εξισορρόπηση των αντίρροπων μηχανισμών που ρυθμίζουν τα επίπεδα φλεγμονής στα αρχέγονα και προγονικά κύτταρα [115]. Παρόλα αυτά ο ακριβής μοριακός μηχανισμός δράσης δεν είχε ανακαλυφθεί μέχρι το 2020 όταν μια άλλη ομάδα επιστημόνων από το πανεπιστήμιο του Lund υπό την εποπτεία του Jonas Larsson απέδειξαν ότι το UM171 προκαλεί την πολύ-ουβικιτινυλίωση και συνεπώς την πρωτεοσωμική αποικοδόμηση του συμπλόκου CoREST (LHC) [**Εικόνα 14**] [116]. Μάλιστα αναφέρουν ότι οι HDAC2 και LSD1 που συμμετέχουν και σε άλλα σύμπλοκα πέραν του CoREST, έδειξαν μειωμένη συνολική αποικοδόμηση γεγονός που υποδεικνύει ως πιθανότερο στόχο την συνδετική πρωτεΐνη του συμπλόκου, RCOR1. Παρότι αυτή δεν έχει καταλυτική δράση, η αποικοδόμηση της προκαλεί την αποσταθεροποίηση και τελικά την αποσύνθεση ολόκληρου του CoREST [116].



**Εικόνα 14:** Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης που έχουν στα HSCs οι αναστολείς της LSD1 και το UM171 σε σχέση με τις καλλιέργειες ελέγχου [Subramaniam A. et al (2020)]

Τον λεπτομερή μοριακό μηχανισμό μέσω του οποίου το UM171 πραγματοποιεί την πολύ-ουβικτινυλίωση των στόχων του, αποκάλυψε η ομάδα του Sauvageau το 2021 μετά από μια σειρά πειραμάτων. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι το UM171 αυξάνει την συγγένεια των πρωτεϊνών-στόχων (RCOR1, LSD1) με το σύμπλοκο CLR3-KBTBD4 το οποίο με ένα σύνολο ενζυμικών διεργασιών, τελικά καταλύει την πολύ-ουβικτινυλίωση των πρωτεϊνών. Επιπλέον το knockout της πρωτεΐνης-αντάπτορα KBTBD4 ανέστρεψε πλήρως τη δράση του UM171 υπογραμμίζοντας την αναγκαιότητα του συμπλόκου στον μηχανισμό [Εικόνα 15] [118].



**Εικόνα 15:** Σχηματική απεικόνιση του συμπλόκου CLR3-KBTBD4 με όλους τους συναρμοτές και συνένζυμα που συμβάλλουν στην ανατροφοδότηση της διαδικασίας της πολύ-ουβικιτινθλίωσης [Chagraoui J. et al (2021)]

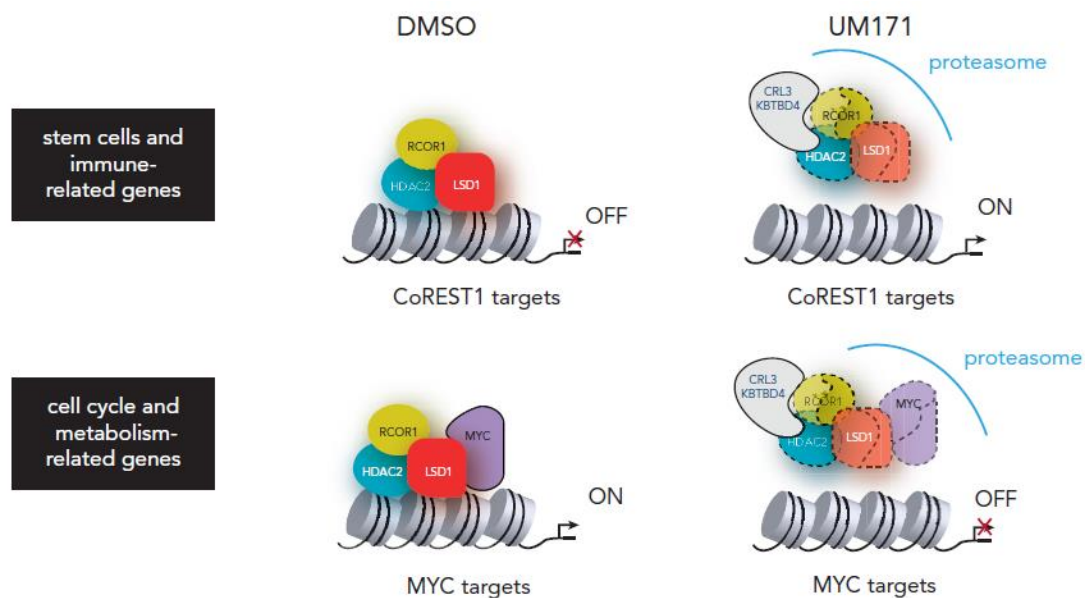
Λίγο αργότερα η ίδια ερευνητική ομάδα απέδειξε ότι στόχος του UM171 και του συμπλόκου CLR3-KBTBD4 είναι επίσης και η ρυθμιστική πρωτεΐνη MYC η οποία βρέθηκε ότι σε αρκετές περιπτώσεις αλληλεπιδρά με το CoREST. Η MYC ρυθμίζει ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών λειτουργιών όπως είναι ο μεταβολισμός των πρωτεϊνών. Στην συγκεκριμένη περίπτωση κομβικής σημασίας είναι η καταστολή της έκφρασης του υποδοχέα της τρανσφερίνης (CD71) που όπως αναφέρθηκε στην Υποενότητα 3.1 χαρακτηρίζει δεσμευμένα προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς που στερούνται πολυδυναμίας [122]. Τέλος, πολύ πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η χρήση του UM171 σε εφαρμογές *ex vivo* γονιδιακής θεραπείας οδηγεί σε βελτιωμένη εμφύτευση *in vivo* βελτιστοποιώντας την φυσική κατάσταση των HSCs του μοσχεύματος [123] Ανακεφαλαιώνοντας, η επίδραση του UM171 σε *ex vivo* εφαρμογές είναι τριπλή: **[Εικόνα 16] [Εικόνα 17]**

A) Αρχικά η αποικοδόμηση του συμπλόκου CoREST διατηρεί τις επιγενετικές τροποποιήσεις των ιστονών H3K4me2 και H3K27ac που υπό φυσιολογικές συνθήκες *ex vivo* καλλιέργειας θα είχαν απωλεσθεί, και με αυτόν τον τρόπο διατηρεί την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την διατήρηση της πολυδυναμίας και της αυτό-ανανέωσης [116][118].

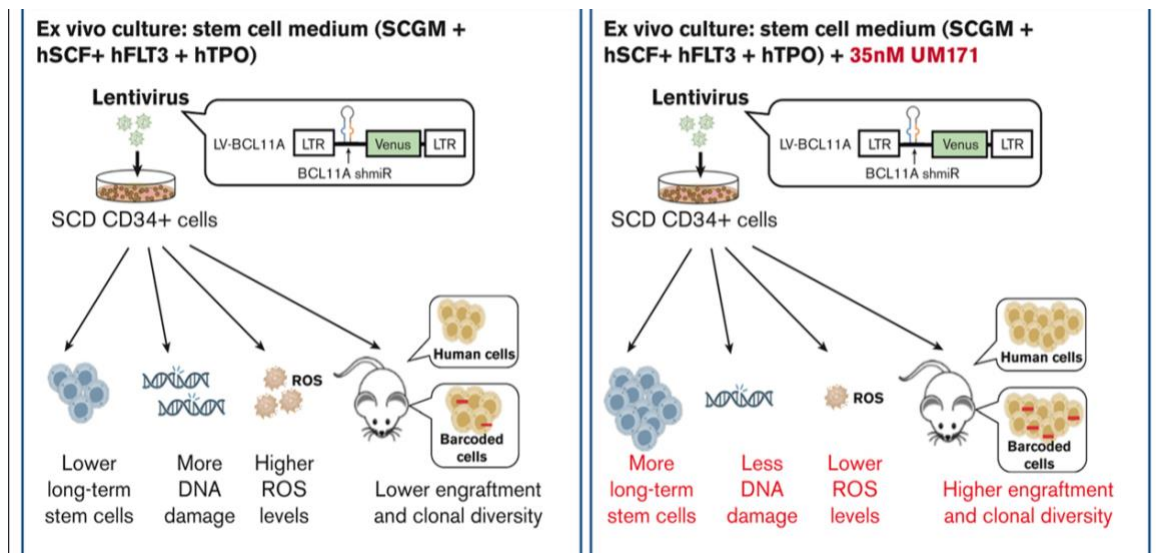
B) Επιπλέον η αποικοδόμηση της MYC συνοδεύεται από μείωση των επιπέδων παραγωγής πρωτεΐνης γεγονός που βοηθάει τα HSCs να διατηρήσουν τη

μεταβολική τους ισορροπία και συνεπώς την ποιότητα του πρωτεόματός τους. Έχει βρεθεί ότι οι συνθήκες αυτές είναι ιδανικές για την διατήρηση του αρχέγονου χαρακτήρα και της ικανότητας ανασύστασης του μυελού [121][122].

Γ) Τέλος η προστατευτική δράση που ασκείται μέσω της εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών (ROS) μειώνει τις βλάβες στο DNA και την εκτεταμένη απόπτωση των κυττάρων με αποτέλεσμα την διατήρηση της φυσικής κατάστασης του μοσχεύματος που οδηγεί σε υψηλότερα ποσοστά εμφύτευσης [123][115].



**Εικόνα 16:** Σχηματική απεικόνιση της διπλής στόχευσης του UM-171 όπου έμμεσα προκαλεί την αποικοδόμηση τόσο του CoREST όσο και του MYC [Chagraoui J. et al (2024)]



**Εικόνα 17:** Απεικόνιση της προστατευτικής δράσης του UM-171 που τελικά οδηγεί σε καλύτερη έκβαση της εμφύτευσης των HSCs in vivo [Liu B. et al (2024)]

Η χρήση του UM171 για την έκπτυξη μονάδων ΟΠΑ που προορίζονται για αλλογενή μεταμόσχευση σε περιπτώσεις λευχαιμίας ([NCT04103879](#)) και πολλαπλού μυελώματος ([NCT03441958](#)), έχει περάσει σε κλινικές δοκιμές σε ΗΠΑ και Καναδά με τα αποτελέσματα έως τώρα να είναι υποσχόμενα [119][120].

## Σκοπός της εργασίας

Παρά τις ραγδαίες εξελίξεις στις αιμοσφαιρινοπάθειες με τις δύο νέες γονιδιακές θεραπείες να λαμβάνουν έγκριση από τον FDA, το πρόβλημα εξακολουθεί να υπάρχει σχεδόν αμετάβλητο. Και αυτό γιατί η συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών αλλά και αυτών που θα γεννηθούν στο άμεσο μέλλον ζουν σε αναπτυσσόμενες χώρες με χαμηλό κατά κεφαλήν εισόδημα και υποτυπώδες σύστημα υγείας [125]. Σύμφωνα με έρευνες, πολλοί ασθενείς στη Δυτική Αφρική δεν έχουν καν πρόσβαση στην υδροξυουρία (HU) παρά το πολύ χαμηλό κόστος της αγωγής [124], γεγονός που καθιστά τις γονιδιακές θεραπείες μη ρεαλιστική λύση για τη συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών. Είναι λοιπόν

επιτακτική η εύρεση νέων αποτελεσματικών αλλά ταυτοχρόνως και προσιτών θεραπειών που να μπορούν να απευθυνθούν σε μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών.

Στο πλαίσιο αυτό υπήρξε η ιδέα για τον φαρμακολογικό αναπροσδιορισμό “drug repurposing” του μικρού μορίου UM171: από αποδεδειγμένο επαγωγέα της έκπτυξης των HSCs σε πιθανό επαγωγέα της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης. Πρόσφατες μελέτες στο εργαστήριο μας έχουν δείξει ότι το UM171 επάγει την έκφραση της γ-σφαιρίνης τόσο σε κύτταρα υγιούς δότη όσο και σε κύτταρα θαλασσαιμικού ασθενούς.

Σκοπός της εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης του UM171 στην ερυθροειδική διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων όσο και στην πρωτεοσωμική αποικοδόμηση της LSD1 καθώς και η διαλεύκανση του μοριακού μηχανισμού που οδηγεί στην αύξηση της HbF.

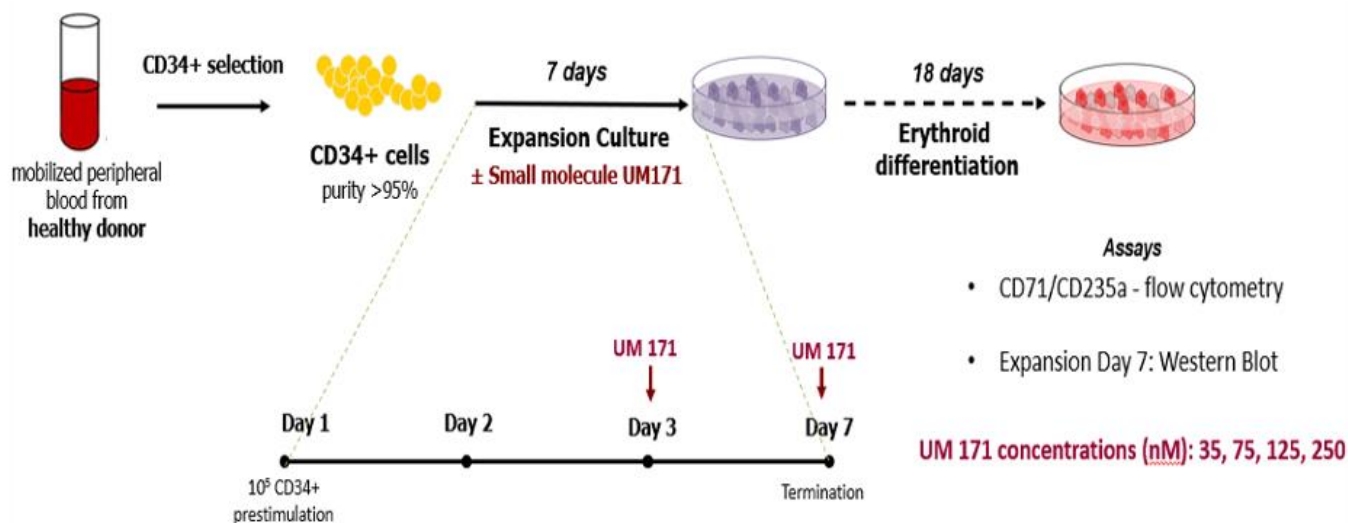
## Υλικά και μέθοδοι

### 6. Πειραματικός σχεδιασμός

#### 6.1 Μελέτη της επίδρασης του UM171 στην ερυθροειδική διαφοροποίηση

Αρχικά με στόχο το χαμηλότερο κόστος των πειραμάτων και τον ευκολότερο χειρισμό των καλλιιεργειών, σχεδιάστηκε μια σειρά πειραμάτων όπου αξιοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HUDEP-2. Τα πειράματα αυτά εγκαταλείφθηκαν σχετικά γρήγορα καθώς τα αποτελέσματα δεν παρουσίαζαν συνοχή και δεν υπήρχε τρόπος να αξιοποιηθούν. Μια πιθανή εξήγηση που μπορεί να δοθεί σε αυτό είναι ότι η δράση του UM-171 λαμβάνει χώρα κυρίως στα αρχέγονα και λιγότερο στα προγονικά κύτταρα, επομένως δεδομένου ότι τα HUDEP-2 αποτελούν δεσμευμένα προγονικά κύτταρα που διαφοροποιούνται γρήγορα

προς πρόδρομα και ερυθρά, η επίδραση του δεν ήταν ξεκάθαρη. Για το λόγο αυτό αποφασίστηκε να μελετηθεί η επίδραση του UM-171 απευθείας σε CD34+ κύτταρα που απομονώνονται από κινητοποιημένο περιφερικό αίμα (mPB) υγιούς δότη. Στα πειράματα αυτά δοκιμάστηκαν 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις (35, 75, 125, 250nM) του μικρού μορίου με μικρότερη την 35nM που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μοριακή συγκέντρωση. Αρχικά τα κύτταρα απομονώνονται από το μόσχευμα του δότη (Υποενότητα 7.1) και στη συνέχεια είτε ψύχονται για μελλοντική χρήση είτε μπαίνουν απευθείας σε καλλιέργεια. Όπως περιγράφεται στην Υποενότητα 7.3 τα κύτταρα καλλιεργούνται για 7 ημέρες με σκοπό την έκπτυξη τους και στη συνέχεια καλλιεργούνται σε μέσο ερυθροειδικής διαφοροποίησης για επιπλέον 18 ημέρες. (Υποενότητα 7.4) Τέλος αξιοποιούνται διάφορες τεχνικές για την αξιολόγηση της επίδρασης του UM-171 στην ερυθροειδική διαφοροποίηση των κυττάρων και στην αποικοδόμηση της LSD1. (Ενότητα 8) **[Εικόνα 18]**



**Εικόνα 18** Συνοπτική απεικόνιση της πειραματικής πορείας για τον έλεγχο της επίδρασης του UM-171 στην διαφοροποίηση των CD34+ κυττάρων.

## 6.2 Διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού δράσης του UM171 που στην επαγωγή της έκφρασης της γ-σφαιρίνης

Σύμφωνα με τα ως τότε δεδομένα, το UM-171 οδηγούσε σε αποικοδόμηση του συμπλόκου CoREST συνεπώς και της LSD1 [116]. Για το λόγο αυτό και με την ευκαιρία που παρουσιάστηκε για προμήθεια έτοιμων πλασμιδιακών φορέων με τα επιθυμητά διαγονίδια, αποφασίστηκε η παραγωγή δύο λεντιικών φορέων, με τον έναν να εκφράζει ένα (short-hairpin RNA) shRNA για την ειδική αποσιώπηση της έκφρασης της LSD1 και τον άλλον φέρει το γονίδιο της LSD1 υπό την δράση ενός ισχυρού υποκινητή έτσι ώστε να επιτευχθεί εκτοπική υπερέκφραση της LSD1. Θεωρητικά μέσω της διαμόλυνσης των κυττάρων με τον πρώτο λεντιο (shLSD1) θα μπορούσε να παρατηρηθεί ισχυρότερη επαγωγή της HbF εξαιτίας της συνεργιστικής δράσης της αποσιώπησης της LSD1 και της προσθήκης UM-171 στην καλλιέργεια. Αντίθετα μετά από διαμόλυνση των κυττάρων με τον λεντιό για την υπερέκφραση της LSD1 (LSD1over) η αριθμητική υπεροχή της LSD1 σε σχέση με το UM-171 θα μπορούσε να οδηγήσει σε αναστροφή της δράσης του UM-171. Παρότι το εγχείρημα αυτό προχώρησε ως την παραγωγή των δύο λεντιικών φορέων (και ενός που εκφράζει ένα non-target shRNA), προβλήματα σχετικά με τα προμηθευθέντα πλασμίδια κατέστησαν αδύνατη την τιτλοδότηση και συνεπώς την μετέπειτα διαμόλυνση των CD34+ κυττάρων.

Για την αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού ήταν απαραίτητη η τροποποίηση των πλασμιδίων αυτών με τεχνικές γενετικής μηχανικής. Δεδομένου ότι τα πλασμίδια αυτά λόγω κατασκευής είχαν περιορισμένη προοπτική τροποποίησης καθώς και ότι το εργαστήριο μας διέθετε αξιοποιήσιμα πλασμίδια (ερυθροειδικοί υποκινητές, κατάλληλες θέσεις κοπής) που με τον κατάλληλο ανασυνδυασμό θα μπορούσαν να δώσουν τα ζητούμενα πλασμίδια, αποφασίστηκε να γίνει εκ νέου σχεδιασμός και παραγωγή των πλασμιδίων που θα φέρουν τα διαγονίδια. Η συγκυρία αυτή συνέπεσε με την έρευνα που περιγράφει τον κομβικό ρόλο του συμπλόκου CRL3-KBTBD4 και συγκεκριμένα της πρωτεΐνης-αντάπτορα KBTBD4 στον μοριακό μηχανισμό δράσης του UM171 [118]. Η εξέταση του μηχανισμού επαγωγής της HbF υπό την οπτική της KBTBD4, εκτός του να συμβαδίσουμε με την επικαιρότητα, μας προσέφερε και ένα πιο πειστικό και ακριβές μοντέλο επιβεβαίωσης του μηχανισμού. Για το λόγο αυτό προχωρήσαμε στον σχεδιασμό δύο νέων πλασμιδιακών φορέων, ένα που φέρει shRNA που αποσιωπεί την έκφραση της KBTBD4 (#shKBTBD4) και ένα που φέρει το γονίδιο της πρωτεΐνης με σκοπό την εκτοπική της υπερέκφραση

(#KBTBD4over). Παρόλες τις προσπάθειες κατασκευής του πλασμιδίου #KBTBD4over μέσω ανασυνδυασμού, το τελικό προϊόν δεν μπόρεσε ποτέ να επιβεβαιωθεί μέσω πέψης και ηλεκτροφόρησης. Αντίθετα η διαδικασία παραγωγής και επαλήθευσης ολοκληρώθηκε επιτυχώς για το #shKBTBD4 που αποτελεί και το σημαντικότερο φορέα για την επιβεβαίωση του μηχανισμού δράσης που έχει προταθεί για το UM-171. Το χρονικό πλαίσιο δεν επέτρεψε την παραγωγή λεντικού φορέα που να εκφράζει το shKBTBD4, παρόλα αυτά η διαδικασία κρίνεται απαραίτητη για την συνέχιση ή και ολοκλήρωση της παρούσας ερευνητικής προσπάθειας. Και τα δύο ενδεχόμενα ενός τέτοιου πειράματος αναμένονται εξαιρετικού ενδιαφέροντος. Συγκεκριμένα:

- Επιβεβαίωση προτεινόμενου μηχανισμού:

Στην περίπτωση που τα διαμολυσμένα κύτταρα παρουσιάζουν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα γ-σφαιρίνης από τα μη-διαμολυσμένα μετά την προσθήκη του UM-171 στις καλλιέργειες, τότε η KBTBD4 κρίνεται αναγκαία για την επαγωγή της HbF, επιβεβαιώνοντας το μοριακό μηχανισμό που έχει προταθεί και για την επαγωγή της έκπτυξης των HSCs.

- Απόρριψη προτεινόμενου μηχανισμού:

Στην περίπτωση που τα επίπεδα της HbF στα διαμολυσμένα κύτταρα είναι συγκρίσιμα ή και υψηλότερα από αυτά στα μη-διαμολυσμένα κύτταρα μετά την προσθήκη UM-171, τότε η KBTBD4 δεν εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της γ-σφαιρίνης υποδεικνύοντας την ύπαρξη ενός διαφορετικού μοριακού μηχανισμού δράσης.

## 7. Χειρισμός των CD34+ αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSCs)

a. Απομόνωση CD34+ αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSCs)  
από μόσχευμα υγιούς δότη

Όπως αναφέρθηκε και στην Υποενότητα 1.1 ο δείκτης επιφανείας CD34+ χαρακτηρίζει τα αρχέγονα κύτταρα και αποτελεί κλασσικό δείκτη για την απομόνωση του πληθυσμού των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSCs) από το κινητοποιημένο περιφερικό αίμα. Η απομόνωση των CD34+ στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε με ανοσομαγνητικό διαχωρισμό από κινητοποιημένο περιφερικό αίμα υγιούς δότη, έπειτα από κινητοποίηση που διεξήχθη στη Μονάδα Μεταμόσχευσης Αιμοποιητικών Κυττάρων (Γ.Ν.Θ. «Γ. Παπανικολάου»). Για τον ανοσομαγνητικό διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε το CD34 MicroBead Kit (human) της Miltenyi Biotec και ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:

1. Παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος MACS Buffer με διήθηση από φίλτρο με πόρους 0,22  $\mu\text{m}$  (filter unit 0,22  $\mu\text{m}$ , PES Membrane, Corning) του διαλύματος MACS BSA Stock Solution (PBS, pH 7,2 , 0,5% bovine serum albumin (BSA) και 2mM EDTA, Miltenyi Biotec) και του διαλύματος autoMACS® Rinsing Solution (Miltenyi Biotec) σε αναλογία 1:20.
2. Προσθήκη 40ml MACS Buffer στο δείγμα του κινητοποιημένου περιφερικού αίματος και φυγοκέντρωση για 10min στα 300g στους 4oC.
3. Αφαίρεση του υπερκειμένου και επαναφυγοκέντρωσή του για 10min στα 300g στους 4oC.
4. Ανασύσταση και ένωση των ιζημάτων των δύο φυγοκεντρήσεων σε τελικό όγκο 35ml MACS Buffer.
5. μέτρηση των κυττάρων με χρωστική Turks
6. Φυγοκέντρωση του δείγματος για 10min στα 300g στους 4oC.
7. Αφαίρεση του υπερκειμένου και ανασύσταση του ιζήματος σε 300ul MACS Buffer (όγκος για έως  $10^8$  κύτταρα).
8. Προσθήκη 100ul FcR Blocking Reagent και 100ul CD34 MicroBeads (όγκοι για έως  $10^8$  κύτταρα).
9. Καλή ανάδευση και επώαση για 30min στους 2-8oC.

10. Ξέπλυμα των κυττάρων με προσθήκη 40ml MACS Buffer και φυγοκέντρηση για 10min στα 300g στους 4oC.
11. Αφαίρεση του υπερκειμένου και ανασύσταση του ιζήματος σε 500ul MACS Buffer (όγκος για έως  $10^8$  κύτταρα).
12. Προετοιμασία του μαγνήτη και τοποθέτηση στηλών LS (Miltenyi Biotec).
13. Πλύση της στήλης με 3ml MACS Buffer και τοποθέτηση νέου σωληναρίου συλλογής.
14. Προσθήκη στην στήλη των κυττάρων.
15. Πλύση της στήλης τρεις φορές με 3ml MACS Buffer. Στο σωληνάριο συλλογής εκλούνται τα CD34<sup>+</sup> κύτταρα.
16. Αφαίρεση της στήλης από τον μαγνήτη και τοποθέτησή της πάνω από ένα νέο σωληνάριο συλλογής.
17. Έκλουση των μαγνητικά επισημασμένων κυττάρων με προσθήκη 5ml MACS Buffer στην στήλη και πιέζοντας σταθερά το έμβολο μέσα στην στήλη.
18. Επανάληψη του προηγούμενου βήματος.
19. Φυγοκέντρηση του θετικού κλάσματος για 10min στα 300g στους 4oC
20. Για να αυξηθεί η καθαρότητα των CD34<sup>+</sup> κυττάρων, το εκλουόμενο κλάσμα μπορεί να εμπλουτιστεί σε μια δεύτερη στήλη LS με επανάληψη των βημάτων 11 έως 19 χρησιμοποιώντας μια νέα στήλη.
21. Ανασύσταση του ιζήματος σε 2ml MACS Buffer και μέτρηση των κυττάρων με Trypan Blue.
22. Έλεγχος με κυτταρομετρία ροής του ανοσοφαινοτύπου των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων μετά από επώαση των κυττάρων με τα αντισώματα Anti-CD34, APC (BD, Biosciences) και Anti-CD45, PerCP (BD, Biosciences) για 15min στους 4oC και πλύση με PBS (Gibco) για την απομάκρυνση της περίσσειας του αντισώματος.
  - Anti-CD34, APC (BD, Biosciences): αναγνωρίζει και προσδένεται με την διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη CD34 που εκφράζεται στα στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα.
  - Anti-CD45, PerCP (BD, Biosciences): αναγνωρίζει και προσδένεται με την διαμεμβρανική πρωτεΐνη φωσφατάση τυ ροσίνης CD45 που εκφράζεται

σε όλα τα στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα, με εξαίρεση τα ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια.

Για τον έλεγχο του ανοσοφαινοτύπου χρησιμοποιήθηκε το κυτταρόμετρο BriCyte E6 (Mindray) και το λογισμικό MRFlow. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα είχαν καθαρότητα σε CD34+ κύτταρα >95%

## 7.2 Απόψυξη των CD34+ αρχέγονων κυττάρων

Τα CD34+ αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα που απομονώθηκαν από υγιείς δότες όπως περιεγράφηκε παραπάνω καταψύχονται και αποθηκεύονται έως ότου έρθει η στιγμή να καλλιεργηθούν. Το ίδιο συμβαίνει και με τα κύτταρα των θαλασσαιμικών ασθενών τα οποία απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια προηγούμενων κλινικών μελετών κινητοποίησης που είχαν διεξαχθεί στη Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας/Μονάδα Μεταμόσχευσης Αιμοποιητικών Κυττάρων.

Το μέσο απόψυξης (thawing medium) που χρησιμοποιήθηκε για τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα έχει την ακόλουθη σύσταση:

- X-Vivo 10 (Lonza)
- 4% Human Serum Albumin (CSL Behring)
- 300U/mL Heparin (Φαρμακείο Γ.Ν.Θ. «Γ. Παπανικολάου»)

Το κρυοφιαλίδιο θερμαίνεται σε υδατόλουτρο στους 37°C και πριν γίνει η ολική απόψυξη των κυττάρων μεταφέρονται στο μέσο απόψυξης σε αναλογία 1:4. Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρωση (300G, 10min) και η πελέτα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε νέο μέσο καλλιέργειας με σκοπό την έκπτυξή τους.

## 7.3 Καλλιέργεια έκπτυξης των CD34+ κυττάρων

Συγκεκριμένα τα κύτταρα καλλιεργούνται σε μέσο έκπτυξης (expansion medium) για 7 ημέρες σε συγκέντρωση  $0.3 \times 10^5$ - $0.8 \times 10^5$  κύτταρα/mL

➤ Expansion medium

- CD34+ Expansion Supplement (StemSpan™ #02691)
  - Serum-Free Expansion Medium (SFEM) (StemSpan™ #09600)
- 
- Την 3η και την 5η ημέρα της καλλιέργειας έκπτυξης προστίθεται το μικρό μόριο UM-171 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (35, ...250nM) καθώς και DMSO στα κύτταρα ελέγχου (controls). Το DMSO αποτελεί διαλύτη πολλών φαρμακευτικών μορίων και στην περίπτωση μας του UM-171. Είναι ανεκτό από τα κύτταρα μόνο όταν βρίσκεται σε περιεκτικότητα μικρότερη του 1-2% v/v επομένως χρησιμοποιείται στα κύτταρα ελέγχου για να αποκλειστεί η πιθανότητα να ευθύνεται αυτό για την εκάστοτε επίδραση που παρατηρείται.
  - Την 7η ημέρα συλλέγεται ένα μέρος κυττάρων από κάθε συνθήκη για την απομονώση της ολικής πρωτεΐνης με σκοπό την πραγματοποίηση Western Blot.

#### 7.4 Καλλιέργεια ερυθροειδικής διαφοροποίησης των CD34+ κυττάρων

Κατά την 7η ημέρα της καλλιέργειας έκπτυξης πραγματοποιείται αλλαγή του μέσου καλλιέργειας με σκοπό την ερυθροειδική διαφοροποίηση των κυττάρων. Η διαφοροποίηση αυτή διαρκεί 18 ημέρες και περιλαμβάνει τρία κύρια στάδια. Η σύσταση του μέσου ερυθροειδικής διαφοροποίησης διαμορφώνεται ανάλογα με το στάδιο και στηρίζεται στο βασικό μέσο (basal medium) το οποίο περιλαμβάνει

➤ Basal Medium

- IMDM+Glutamax (Gibco™)
- 1% Penicillin/Streptomycin (pen/strep, Gibco™)
- 1% Glutamine (L-glutamine, Gibco™)
- 5% AB plasma (AB Human Serum)
- 10μg/mL Insulin (Φαρμακείο Γ.Ν.Θ. «Γ. Παπανικολάου»)
- 2IU/mL Heparin (Φαρμακείο Γ.Ν.Θ. «Γ. Παπανικολάου»)
- 330μg/mL Holo-Transferrin (Sigma-Aldrich, Germany)

Το πρώτο στάδιο της καλλιέργειας στοχεύει στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και διαρκεί από την Ημέρα 1 έως την Ημέρα 7. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε συγκέντρωση 30.000 κύτταρα/ml σε θρεπτικό με σύσταση:

➤ Στάδιο 1 (Ημέρα 1η- Ημέρα 7η)

- Basal Medium
- 1 μM Υδροκορτιζόνη (Φαρμακείο Γ.Ν.Θ. «Γ. Παπανικολάου»)
- 100 ng/ml hSCF(human Stem Cell Factor, R&DSystems)
- 5ng/ml Ιντερλευκίνη-3 (IL-3, R&DSystems)
- 3U/ml Ερυθροποιητίνη (EPO, Φαρμακείο Γ.Ν.Θ. «Γ. Παπανικολάου»)

Το δεύτερο στάδιο της ερυθροειδικής διαφοροποίησης στοχεύει στην διαφοροποίηση των κυττάρων της καλλιέργειας και διαρκεί από την Ημέρα 8 έως την Ημέρα 11. Τα κύτταρα ανα-καλλιεργούνται σε συγκέντρωση 150.000/ml σε θρεπτικό με σύσταση:

➤ Στάδιο 2 (Ημέρα 8η- Ημέρα 11η)

- Basal Medium

- 100 ng/ml hSCF (human Stem Cell Factor, R&DSYSTEMS)
- 3U/ml Ερυθροποιητίνη (Φαρμακείο Γ.Ν.Θ. «Γ. Παπανικολάου»)

Το τρίτο στάδιο της ερυθροειδικής καλλιέργειας στοχεύει στην ωρίμανση των κυττάρων και διαρκεί από την Ημέρα 11 έως την Ημέρα 18. Τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται σε συγκέντρωση 1.000.000 κύτταρα/ml την Ημέρα 11 και στη συνέχεια σε συγκέντρωση 2.000.000 κύτταρα/ml την Ημέρα 14. Το θρεπτικό έχει την ακόλουθη σύσταση

➤ Στάδιο 3 (Ημέρα 11η- Ημέρα 18η)

- Basal Medium
- 3U/ml Ερυθροποιητίνη (EPO, Φαρμακείο Γ.Ν.Θ. «Γ. Παπανικολάου»)

Σε κάθε στάδιο ελέγχεται με κυτταρομετρία ροής ο ανοσοφαινότυπος των κυττάρων (χρώση με αντισώματα anti-CD235A PE και anti-CD71 APC), ώστε να επαληθευτεί η επίδραση του UM171 στην ενίσχυση της έκπτυξης και την καθυστέρηση της διαφοροποίησης.

## 8. Κυτταρικές δοκιμασίες

### 8.1 Έλεγχος ανοσοφαινοτύπου των HSCs

Ο έλεγχος του ανοσοφαινοτύπου των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων κατά την διαδικασία διαφοροποίησής τους γίνεται με κυτταρομετρία ροής. Στόχος είναι ο έλεγχος της επίδρασης των διαφορετικών συγκεντρώσεων του UM171 στην διατήρηση του αρχέγονου χαρακτήρα των κυττάρων και την

καθυστέρηση της διαφοροποίησης. Οι δείκτες επιφανείας που εξετάζονται στην περίπτωση αυτή είναι οι CD235a και CD71, που όπως αναφέρθηκε και στην υποενότητα 1.2, χαρακτηρίζουν πληθυσμούς προγονικών, πρόδρομων καθώς και ώριμων ερυθροκυττάρων. **[Εικόνα 2]** Η διαδικασία περιλαμβάνει την επώαση των κυττάρων με το εκάστοτε αντίσωμα, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή για 15 λεπτά στους 4°C και πλύση με PBS (Gibco) για την απομάκρυνση της περίσσειας του αντισώματος. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα:

- Anti-Hu CD235a PE (exbio antibodies, #1A-235): αναγνωρίζει και προσδένεται σε μια σιαλογλυκοπρωτεΐνη που υπάρχει στα ώριμα ερυθροκύτταρα καθώς και στα πρόδρομα κύτταρα των ερυθρών
- Anti-Hu CD71 APC (exbio antibodies, #1P-784): αναγνωρίζει και προσδένεται στον υποδοχέα της τρανσφερίνης που εντοπίζεται στα πρόδρομα κύτταρα των ερυθρών

Για τον έλεγχο του ανοσοφαινοτύπου χρησιμοποιήθηκε το κυτταρόμετρο BriCyte E6 (Mindray) και το λογισμικό MRFlow.

## 8.2 Λύση των κυττάρων και απομόνωση της ολικής πρωτεΐνης

Με σκοπό την επιβεβαίωση της πρωτεοσωμικής αποικοδόμησης της LSD1 μετά από επίδραση με UM171 σε καλλιέργεια αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων μέσω επώασης σε λυτικό διάλυμα (Lysis Buffer) με την ακόλουθη σύσταση.

### ➤ Lysis Buffer

- 50μM imidazole (pH 7,4)
- 250mM NaCl
- 2mM EGTA
- 1mM EDTA

- 5μM DTT
- 50μM Leupeptine
- 0,25% Brij 97 (σε EtOH)

Αρχικά τα κύτταρα από κάθε συνθήκη συλλέγονται ως πελέτα με φυγοκέντρηση και έπειτα πραγματοποιείται ανασύσταση τους σε 100μL Lysis Buffer. Επώάζονται για 30min στους 37°C και στη συνέχεια φυγοκεντρούνται για 10min στις 12.000RPM στους 4°C. Τέλος το υπερκείμενο διάλυμα (πρωτεΐνη) συλλέγεται και αποθηκεύεται στους -20 °C με σκοπό τη μετέπειτα χρήση του.

### 8.3 Western Blot

#### 8.3.1 Παρασκευή των απαραίτητων διαλυμάτων

Η διαδικασία του Western Blot απαιτεί αριθμό διαλυμάτων που πρέπει να παρασκευαστούν με ακρίβεια και υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Συγκεκριμένα το διάλυμα για το “τρέξιμο” της ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) χρησιμοποιείται για την επίτευξη διαχωρισμού των πρωτεϊνών ενώ το διάλυμα για τη μεταφορά (Transfer Buffer) μεσολαβεί στην μεταφορά των ηλεκτροφορημένων δειγμάτων από την πηκτή στο blot. Τέλος το αναγωγικό διάλυμα που χρησιμοποιείται για το φόρτωμα των δειγμάτων (Reducing Loading Buffer) διασφαλίζει την αναγωγή των πρωτεϊνών σε α-ταγή δομή καθώς και τον ευκολότερο χειρισμό των όγκων των δειγμάτων κατά το φόρτωμα στην πηκτή. Η ακριβής σύσταση των διαλυμάτων αυτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πειραματική διαδικασία είναι η εξής:

#### ➤ Running Buffer 5X

- 15 g/L Tris base
- 72,2 g/L Glycine

- 5 g/L SDS

➤ Transfer Buffer 10X

- 30,3 g/L Tris base
- 144 g/L Glycine
- Για την παρασκευή Transfer Buffer 1X γίνεται μίξη των Transfer Buffer 10X: MetOH: H<sub>2</sub>O με αναλογία 1:2:7.

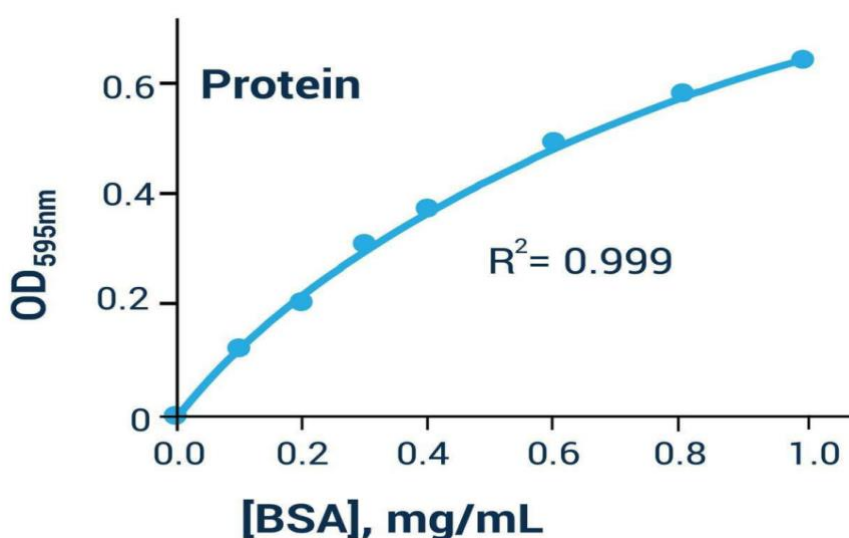
➤ Reducing Loading Buffer

- 12,5% v/v Tris-HCl 0,5M pH 6,8
- 0,8mL Glycerol
- 1,6mL SDS 10% w/v
- 0,4mL 2-mercaptoethanol
- 0,4mL bromophenol blue

### 8.3.2 Ποσοτικοποίηση των δειγμάτων με μέθοδο Bradford

Το πρώτο βήμα της διαδικασίας του Western Blot αποτελεί η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων (ολική πρωτεΐνη) σε πηκτή SDS-PAGE. Προκειμένου να εξασφαλιστεί το ισόποσο φόρτωμα των δειγμάτων, πραγματοποιείται χρωμομετρική ποσοτικοποίηση τους με τη μέθοδο Bradford και τη χρήση του NanoDrop (Απορρόφηση στα 595 nm). Για τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται η ειδική χρωστική Bio-Rad Protein Assay Dye (Coomassie brilliant blue G-250) η οποία προσδένεται σε πρωτοταγή αρωματικά αμινοξέα όπως η αργινίνη. Αρχικά κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη με τη βοήθεια πρότυπου διαλύματος BSA (Bovine Serum Albumin) [**Εικόνα 19**]. Συγκεκριμένα πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις του stock διαλύματος με στόχο την

δημιουργία 5 πρότυπων διαλυμάτων με εύρος συγκεντρώσεων που να προσεγγίζει τη θεωρητική συγκέντρωση των δειγμάτων που πρόκειται να φωτομετρηθούν. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται πρότυπη καμπύλη όπου ο άξονας X αποτυπώνει την απορρόφηση στα 595nm, ενώ ο Y την συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Επομένως η συγκέντρωσή των δειγμάτων υπολογίζεται βάσει των απορροφήσεων τους με την επίλυση της εξίσωσης της πρότυπης καμπύλης.



Εικόνα 19 Πρότυπη καμπύλη με τη χρήση πρότυπων διαλυμάτων BSA

### 8.3.3 Παρασκευή πηκτών SDS-PAGE

Γνωρίζοντας ότι το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης-στόχου LSD1 είναι 110KDa αποφασίστηκε η περιεκτικότητα των πηκτών διαχωρισμού σε ακρυλαμίδιο να είναι 10%. Η ακριβής σύσταση που χρησιμοποιήθηκε είναι:

#### ➤ Πηκτή Διαχωρισμού (Separating gel)

- 375 mM Tris-HCl (pH 8.8)
- 0.1 % w/v SDS

- 9.9 % w/v Acrylamide
- 0.1 % w/v APS
- 0.075 % v/v TEMED

Αφού πήξουν οι πηκτές διαχωρισμού, προετοιμάζονται οι πηκτές επίστρωσης (stacking gels) οι οποίες περιέχουν ακρυλαμίδιο σε τελική συγκέντρωση 4% και επιτρέπουν το ομαλό φόρτωμα και “τρέξιμο” των δειγμάτων. Η σύσταση των πηκτών αυτών είναι:

➤ Πηκτή Επίστρωσης (Stacking gel)

- 125 mM Tris-HCl (pH 6.8)
- 0.1% w/v SDS
- 4% w/v Acrylamide
- 0.05% w/v APS
- 0.1% v/v TEMED

#### 8.3.4 Εξοπλισμός και διαδικασία για τη δημιουργία του blot

Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των πηκτών καθώς και για την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE περιλαμβάνεται στο Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad) ενώ για τη διαδικασία της υγρής μεταφοράς (wet transfer) χρησιμοποιήθηκε το Mini Trans-Blot Module (Bio-Rad).

Όπως αναφέρθηκε το πρώτο βήμα της διαδικασίας περιλαμβάνει την διαδοχική παρασκευή των Separating και Stacking πηκτών. Έως ότου να πήξουν οι πηκτές τα δείγματα μεταφέρονται σε Reducing Loading Buffer και επωάζονται σε θερμοκρασία βρασμού για 20min. Στη συνέχεια οι πηκτές μεταφέρονται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και πραγματοποιείται πλήρωση της δεξαμενής με Running Buffer 1X. Έπειτα τα αναγμένα δείγματα καθώς και ο πρωτεϊνικός

μάρτυρας (ladder) Color Protein Broad Range (NEB) φορτώνονται με τη χρήση συρίγγων Hamilton. Η διαφορά δυναμικού που εφαρμόζεται είναι 50V μέχρι τα δείγματα να διασχίσουν το stacking gel και 150V μέχρι να χαθούν από τη πηκτή οι χρωστικές. Απαιτείται προσοχή και τακτικός έλεγχος της προόδου της ηλεκτροφόρησης για να μη χαθούν τα δείγματα. Τα σφουγγάρια, τα φύλλα Whatmann και το SDS-PAGE gel επωάζονται για 15min σε Transfer buffer 1X ώστε να εξισορροπήσουν πριν τη χρήση τους για τη διαδικασία του Transfer. Η μεμβράνη Immobilon®-P (PVDF) (Sigma Aldrich) που χρησιμοποιείται ως blot ενεργοποιείται και εξισορροπείται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Στη συνέχεια σχηματίζεται “sandwich” που αποτελείται κατά σειρά από: Σφουγγάρι-Whatmann-Gel-PVDF-Whatmann-Σφουγγάρι το οποίο τοποθετείται στη κασέτα μεταφοράς (Transfer Module) η οποία με τη σειρά της τοποθετείται στη δεξαμενή. Για την υγρή μεταφορά των δειγμάτων από το gel στην μεμβράνη PVDF, προστίθεται Transfer Buffer 1X στη δεξαμενή και έπειτα εφαρμόζεται ρεύμα σταθερής έντασης 350mA για 1h. Μετά την λήξη της μεταφοράς, η μεμβράνη επωάζεται σε MetOH για 5min και έπειτα αποθηκεύεται σε διηθητικό χαρτί.

#### 8.3.5 Επώαση με αντισώματα και εμφάνιση του blot

Η μεμβράνη Immobilon®-P (PVDF) (Sigma Aldrich) ενεργοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και έπειτα επωάζεται υπό ανάδευση σε Blocking Buffer για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Η σύσταση του διαλύματος αυτού είναι:

##### ➤ Blocking Buffer

- PBS
- 0,1% Tween 20
- 5% non-fat dry milk
- 0,5% BSA Fraction V (Lipid free)

Το πρωταρχικό αντίσωμα (primary antibody) Anti-LSD1 (στην περίπτωση του control είναι Anti-Actin) αραιώνεται 500 φορές σε Blocking Buffer και σε αυτό το διάλυμα η μεμβράνη επωάζεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1h. Ακολουθούν τρεις διαδοχικές πλύσεις με PBS-Tween 20 0,1% και έπειτα η επώαση της μεμβράνης με αραιωμένο διάλυμα (10.000 φορές σε Blocking Buffer) δευτερεύοντος Anti-Rabbit αντισώματος (secondary antibody). Επαναλαμβάνονται οι τρεις διαδοχικές πλύσεις όπως και στο προηγούμενο βήμα και επιπλέον μια ανάδευση σε PBS για 10min.

Τέλος για την εμφάνιση του blot πραγματοποιείται η μέθοδος της χημειοφωταύγειας. Η μεμβράνη επωάζεται με το Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo Scientific), το οποίο χρησιμοποιεί το ένζυμο Horseradish Peroxidase (HRP) για την καταλυτική παραγωγή ενδιάμεσων εστερικών ενώσεων που εκπέμπουν φωταύγεια. Με αυτόν τον τρόπο το σήμα του blot ανιχνεύεται με το σύστημα απεικόνισης Invitrogen™ iBright™ Imager.

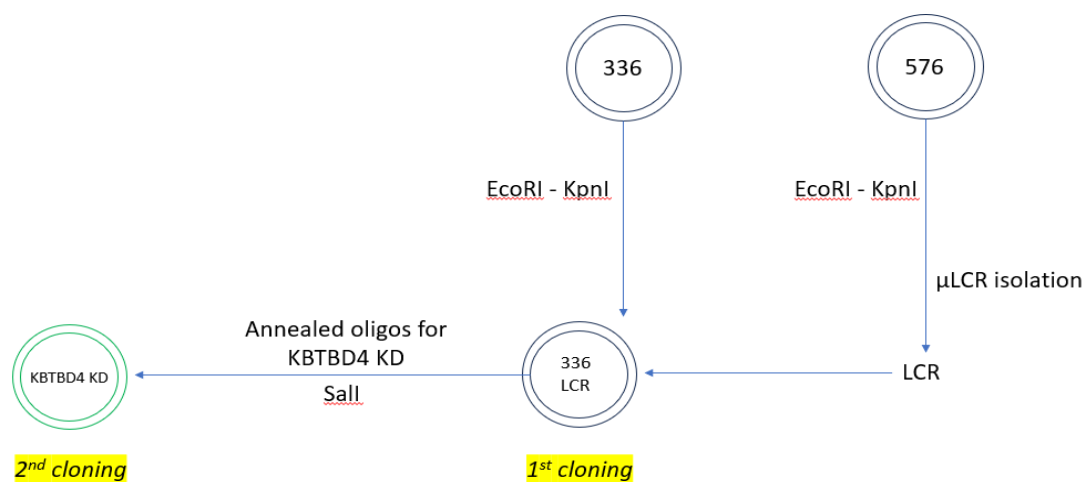
## 9. Διερεύνηση του μηχανισμού δράσης του UM171

### 9.1 Σχεδιασμός πλασμιδιακών φορέων

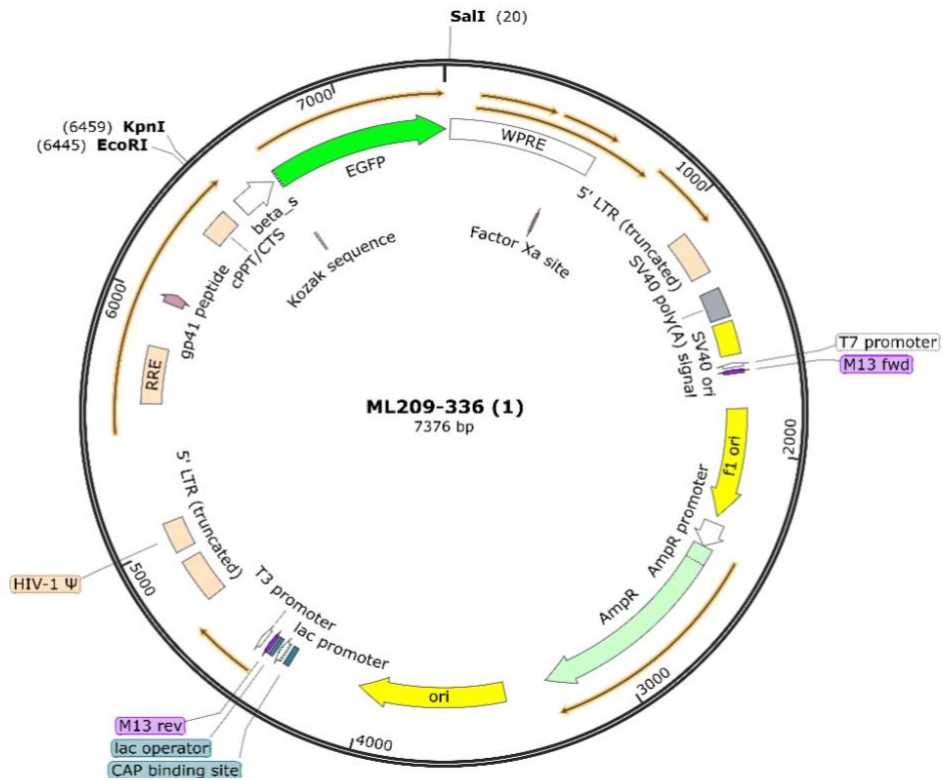
Για την παραγωγή των κατάλληλων πλασμιδιακών φορέων που θα αξιοποιηθούν για την διαλεύκανση του μοριακού μηχανισμού δράσης που οδηγεί στην επαγωγή της HbF, χρησιμοποιήθηκαν πλασμιδιακοί φορείς της ερευνητικής μας ομάδας οι οποίοι ανασυνδυάστηκαν κατάλληλα με τη χρήση τεχνικών γενετικής μηχανικής (Plasmid Cloning). Όλα τα αντιδραστήρια και kit που χρησιμοποιήθηκαν στις διαδικασίες αυτές ήταν της New England BioLabs (NEB).

Για την παραγωγή του πλασμιδίου το οποίο εκφράζει το shRNA που στοχεύει την KBTBD4 (#shKBTBD4) στόχος ήταν ο συνδυασμός αλληλουχιών που προέρχονται από τα πλασμίδια #ML-209-336 (336) και #ML-209-576 (576)

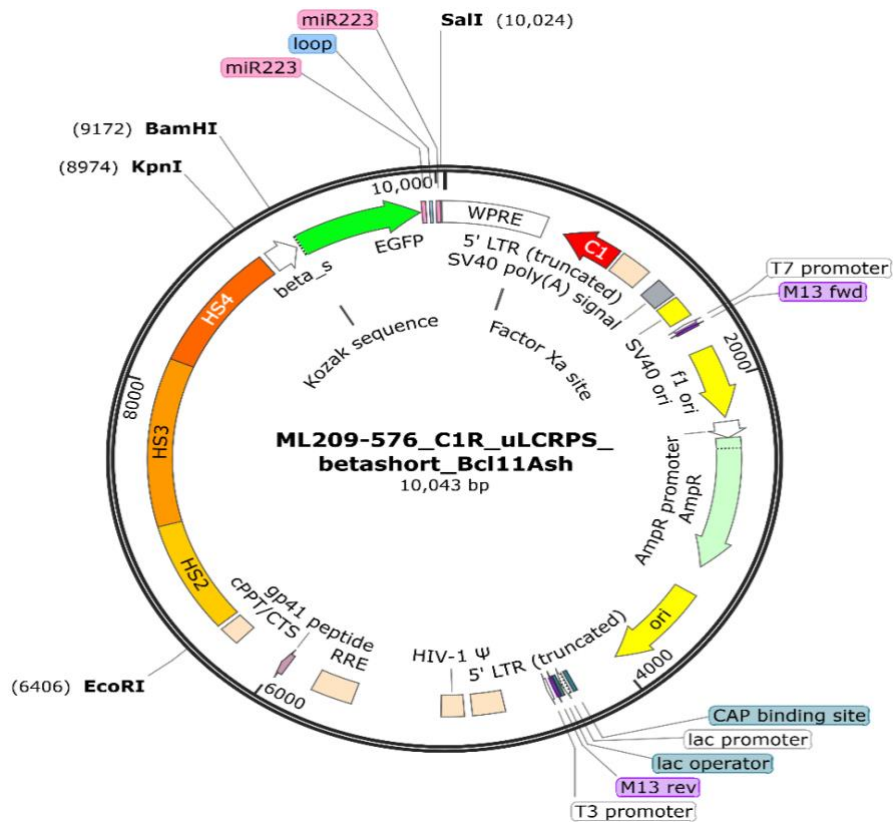
των οποίων οι χάρτες φαίνονται παρακάτω [Εικόνα 21] [Εικόνα 22]. Συγκεκριμένα απομονώθηκε η ρυθμιστική περιοχή  $\mu$ LCR από το πλασμίδιο 576 και έπειτα αξιοποιώντας τα συμβατά κολλώδη άκρα ενσωματώθηκε στο πλασμίδιο 336. Στη συνέχεια, η αλληλουχία DNA που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία οδηγεί σε αποσιώπηση της έκφρασης της KBTBD4 σχεδιάστηκε και παραγγέλθηκε με τα κατάλληλα κολλώδη άκρα ώστε να μπορεί να ενσωματωθεί στην κατάλληλη θέση ακριβώς μετά τον υποκινητή. Η σχηματική απεικόνιση του σχεδιασμού του πλασμιδίου για την αποσιώπηση της KBTBD4 αποτυπώνεται στην [Εικόνα 20]



Εικόνα 20: Σχηματική επεξήγηση των βημάτων που ακολουθήθηκαν κατά την κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα που φέρει το *shKBTBD4*



**Εικόνα 21:** Χάρτης του πλασμιδίου 336. Μεταξύ των χαρακτηριστικών στοιχείων διακρίνονται οι αλληλουχίες αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών που χρησιμοποιήθηκαν για τον ανασυνδυασμό



**Εικόνα 22:** Χάρτης του πλασμιδίου 576. Μεταξύ των χαρακτηριστικών στοιχείων διακρίνονται οι αλληλουχίες αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών που χρησιμοποιήθηκαν για τον ανασυνδυασμό

Η διαδικασία παραγωγής του πλασμιδιακού φορέα για την υπερέκφραση της KBTBD4 (KBTBD4<sup>over</sup>) δεν ολοκληρώθηκε ποτέ με επιτυχία παρότι δοκιμάστηκαν διαφορετικές προσεγγίσεις. Χάριν απλότητας δεν θα αναλυθούν οι πειραματικές διαδικασίες που πραγματοποιήθηκαν

## 9.2 Μετασχηματισμός βακτηρίων

Για το σχηματισμό των λεντι-ικών φορέων απαιτείται αρχικά η ανάπτυξη και η παραγωγή των απαραίτητων πλασμιδίων σε μεγάλη κλίμακα εισάγοντάς τα σε βακτήρια *E.coli*. Αυτό επιτυγχάνεται υποβάλλοντας τα βακτήρια του στελέχους TOP10 της *E. coli* (One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli*, Invitrogen™) σε θερμικό πλήγμα (σοκ). Έτσι, το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων καθίσταται παροδικά διαπερατό και επιτυγχάνεται η εισαγωγή του πλασμιδίου στο εσωτερικό τους. Το πρώτο βήμα αυτής της διαδικασίας είναι η προσθήκη 100ng πλασμιδίου σε 50  $\mu$ L βακτηρίου και επώαση στον πάγο για 30 λεπτά. Ακολουθεί έκθεση των βακτηρίων σε θερμικό σοκ στους 42°C (Block heater) για 30 δευτερόλεπτα και άμεση μεταφορά στον πάγο για 5 λεπτά. Για να επιτευχθεί η μέγιστη μετασχηματική τους ικανότητα, προστίθενται στα βακτήρια 950  $\mu$ L LB (Luria-Bertani Medium) και μεταφέρονται για 1 ώρα σε στρεφόμενο επωαστικό κλίβανο (37°C, 230 rpm), ώστε να εκφραστεί το γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό. Μετά από την επώαση, ακολουθεί επίστρωση 100  $\mu$ L βακτηρίων *E. coli* σε τρυβλία Petri, τα οποία περιέχουν θρεπτικό υπόστρωμα LB (Luria-Bertani Medium) και άγαρ (10 g/L τρυπτόνη, 5 g/L εκχύλισμα ζύμης, 10 g/L NaCl, 15 g/L άγαρ), εμπλουτισμένο με αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 100 ng/mL. Η παρουσία του αντιβιοτικού αποσκοπεί στην ανάπτυξη μόνο των μετασχηματισμένων βακτηρίων, καθώς τα πλασμίδια φέρουν γονίδιο που τους προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη. Μετά από ολονύχτια επώαση στους 37°C επιλέγονται από τη στερεή καλλιέργεια μονήρεις αποικίες, οι οποίες καλλιεργούνται ξεχωριστά για 18 ώρες σε μικρής κλίμακας υγρή καλλιέργεια LB που περιέχει αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100 ng/mL.

### 9.3 Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA με σκοπό τον έλεγχο του

Ακολουθεί η απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα από τα βακτηριακά κύτταρα με το πρωτόκολλο Plasmid Mini (PureLink HiPure Plasmid Miniprep Kit, Invitrogen™). Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο περιλαμβάνει μια σειρά από στάδια για την ταχεία απομόνωση υψηλής ποιότητας πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιώντας τις στήλες PureLink spin. Ο επιτυχής γενετικός ανασυνδυασμός των πλασμιδίων, ο μετασχηματισμός των βακτηρίων με το εκάστοτε πλασμίδιο καθώς και η αποτελεσματική απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, διασφαλίζονται μέσω της πέψης των DNA με τα κατάλληλα για το κάθε πλασμίδιο ένζυμα περιορισμού και της ακόλουθης ηλεκτροφόρησής των προϊόντων της πέψης σε πηκτή αγαρόζης 0,8-1%. Η εφαρμογή αυτής της τεχνικής αποσκοπεί στην διασφάλιση της απουσίας επιπρόσθετων ζωνών DNA, που μπορεί να προέρχονται από επιμόλυνση με γενωμικό DNA ή στην περίπτωση του ανασυνδυασμού πλασμιδιακών φορέων από λανθασμένη ή αποτυχημένη ένθεση αλληλουχίας.

### 9.4 Μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια βακτηρίων και απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Οι βακτηριακές καλλιέργειες από τις οποίες προέρχονται τα πλασμίδια που φέρουν το σωστό πρότυπο ζωνών μεταφέρονται εκ νέου σε υγρή καλλιέργεια LB μεγάλης κλίμακας και επωάζονται για 16-18 ώρες σε στρεφόμενο επωαστικό κλίβανο (37°C, 230 rpm). Στη συνέχεια πραγματοποιείται απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα με το Plasmid Maxiprep Kit (PureLinkRHiPure Plasmid Maxiprep Kit Invitrogen™) σύμφωνα με το πρωτόκολλο που προτείνεται από τον κατασκευαστή.

### 9.5 Παραγωγή λεντι-ικών φορέων

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται σε όλη τη διάρκεια παραγωγής του υικού φορέα περιέχει DMEM (Gibco) εμπλουτισμένο με 10% FBS, 100U/mL πενικιλίνη, 100μg /mL στρεπτομυκίνη, 2mM L-γλουταμίνη και διηθείται από φίλτρο με πόρους 0,22 μm (filter unit 0,22 μm, PES Membrane, Corning).

Ημέρα 0: πραγματοποιείται επίστρωση τριβλίων των 100 mm tissue culture treated, Corning). Ακολουθεί επίστρωση  $3 \times 10^6$  κυττάρων ανά τρυβλίο σε 10 mL θρεπτικού μέσου και επώαση στον κλίβανο στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub> για 24 ώρες, προκειμένου τα κύτταρα να καλύψουν το 70% περίπου της επιφάνειας του τρυβλίου.

Ημέρα 1: πραγματοποιείται αλλαγή θρεπτικού στα τρυβλία 16 ώρες μετά την επίστρωση και τουλάχιστον τέσσερις ώρες πριν τη διαμόλυνση (9 ml τελικό όγκο /τρυβλίο). Η διαμόλυνση πραγματοποιείται με τη μέθοδο της κατακρήμνισης του φωσφορικού-ασβεστίου. Αρχικά, υπολογίζονται οι ποσότητες των βοηθητικών πλασμιδίων pML3, pMDZ.6 καθώς και των πλασμιδίων που φέρουν το εκάστοτε διαγονίδιο (shLSD1, LSD1over, scramble controls) που θα προστεθούν σε κάθε τρυβλίο. Ανεξάρτητα από το πλασμίδιο που φέρει το διαγονίδιο οι ποσότητες που προστίθενται κάθε φορά είναι 7,5μg pML3, 2,5μg pMDZ.6 και 10μg διαγονιδίου ανά τρυβλίο. Έπειτα, ετοιμάζεται ένα διάλυμα σε σωλήνα τύπου falcon στο οποίο προστίθενται 250mM CaCl<sub>2</sub>, τα πλασμίδια στις παραπάνω συγκεντρώσεις και τέλος ddH<sub>2</sub>O, έτσι ώστε ο τελικός όγκος του διαλύματος να αντιστοιχεί σε 500 μL /τρυβλίο. Ακολουθεί η προσθήκη 500 μL HBS για κάθε τρυβλίο (28 mM NaCl, 100 mM Hepes Saline, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,12) στον σωλήνα σταγόνα-σταγόνα υπό συνεχή ανάδευση του σωλήνα σε vortex. Στη συνέχεια, μεταφέρεται 1 ml από το διάλυμά που περιέχει τα πλασμίδια σε κάθε τρυβλίο που περιέχει τα 293FT κύτταρα σταγόνα-σταγόνα και ακολουθεί επώαση στον κλίβανο στους 37°C για 16-18h. Η διαμόλυνση (transfection), δηλαδή η είσοδος του πλασμιδιακού DNA στα 293FT κύτταρα, είναι αποτέλεσμα της αντίδρασης μεταξύ των κρυστάλλων του φωσφορικού ασβεστίου που δημιουργούνται και του διαλύματος HBS που προστίθεται διαδοχικά μαζί με τα τρία πλασμίδια. Οι κρύσταλλοι ασβεστίου «παρασύρουν» τα πλασμίδια, με αποτέλεσμα να κατακρημνίζονται και τελικά να εισέρχονται στα 293FT κύτταρα.

Ημέρα 2: 16h-18h μετά τη διαμόλυνση, απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο από τα τρυβλία ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια των πλασμιδίων που δεν ενσωματώθηκαν αλλά και των κρυστάλλων φωσφορικού ασβεστίου που πιθανόν να καταστήσουν τοξικό το θρεπτικό για τα κύτταρα και προστίθεται νέο θρεπτικό (10ml/τρυβλίο). Επώαση των τρυβλίων στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub> για 24 ώρες.

Ημέρα 3: πραγματοποιείται η πρώτη συγκομιδή του παρασκευασμένου υικού φορέα (Harvest 1). Το υπερκείμενο, όπου περιέχονται τα ιικά σωματίδια, συλλέγεται από τα τρυβλία, διηθείται από φίλτρο με πόρους 0.22 µm (filter unit 0.22 µm, PES Membrane, Corning) και φυλάσσεται στους 4°C. Στα τρυβλία προστίθενται 10 mL φρέσκου, θρεπτικού μέσου και επωάζονται στον κλίβανο στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub> για 24 ώρες.

Ημέρα 4: πραγματοποιείται η δεύτερη συλλογή του υπερκειμένου από τα τρυβλία (Harvest 2) και η διήθησή του όπως προηγουμένως. Ακολουθεί η ανάμειξη των δύο harvest του ιού και η τοποθέτηση τους σε δοχεία φυγοκέντρησης (falcon), τα οποία φυγοκεντρούνται στα 5000 rpm για 14 ώρες στους 4°C ώστε να συμπυκνωθούν. Αφού ολοκληρωθεί η φυγοκέντρηση απομακρύνεται το υπερκείμενο και γίνεται ανασύσταση του ιικού ιζήματος με το θρεπτικό μέσο DMEM με συμπύκνωση του ιού ~1000 φορές, το οποίο μοιράζεται ανά 20, 50 και 100 µL σε κρυοφιαλίδια (cryogenic vials, Corning) και φυλάσσεται στους -80°C.

## Αποτελέσματα

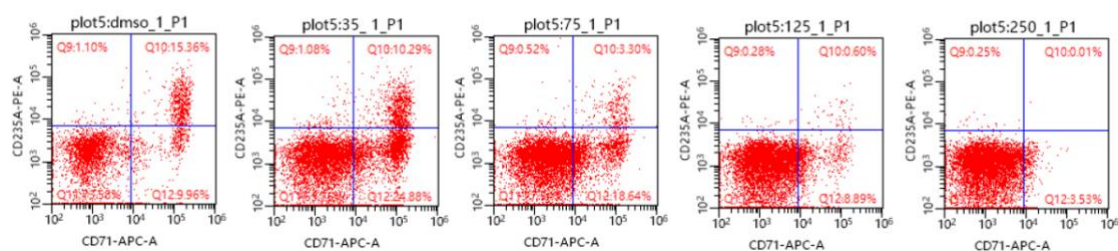
### 10. Επίδραση του UM-171 στην ερυθροειδική καλλιέργεια CD34<sup>+</sup> κυττάρων

### 10.1 Δοσο-εξαρτώμενη καθυστέρηση της ερυθροειδικής διαφοροποίησης

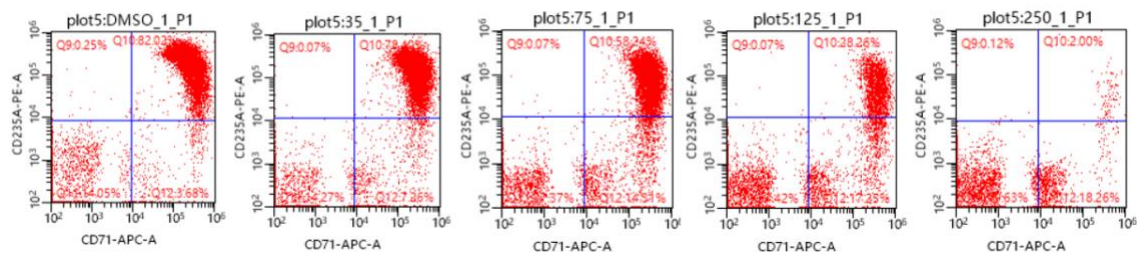
Μετά την ολοκλήρωση της καλλιέργειας έκπτυξης παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του UM-171, τα CD34<sup>+</sup> κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε μέσο ερυθροειδικής διαφοροποίησης παρουσία ερυθροποιητίνης. Μελετήθηκε η επίδραση του UM-171 στα επίπεδα έκφρασης των ερυθροειδικών δεικτών CD235a και CD71 στις ημέρες 4, 7, 11, 15 και 18 της ερυθροειδικής καλλιέργειας. Ο δείκτης επιφανείας CD235a εκφράζεται στα όψιμα στάδια της ερυθροποίησης και ο CD71 εκφράζεται σε πιο πρώιμα στάδια με τα επίπεδα έκφρασής του να ελαττώνονται σταδιακά με το πέρασ της ερυθροειδικής διαφοροποίησης. Στην **Εικόνα 23** απεικονίζονται ενδεικτικά στικτογράμματα (dot plots) της πορείας έκφρασης των ερυθροειδικών δεικτών υπό την επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων του UM-171. Έτσι προκύπτει ότι το UM-171 καθυστερεί την ερυθροειδική διαφοροποίηση με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο με την καθυστέρηση να είναι προφανής κυρίως στα αρχικά στάδια της ερυθροειδικής διαφοροποίησης. Σημαντικό εύρημα είναι ότι παρατηρείται καθυστέρηση και όχι πλήρης αναστολή της διαφοροποίησης. Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 23** την ημέρα τερματισμού (ημέρα 18) τα ποσοστά των 235a<sup>+</sup> κυττάρων επανέρχονται στα ίδια επίπεδα με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου (DMSO).

Η δοσο-εξαρτώμενη δράση του UM-171 και η επαναφορά της διαφοροποίησης στο τέλος της ερυθροειδικής καλλιέργειας απεικονίζονται και στα διαγράμματα (bar plots) των δύο πειραμάτων [**Εικόνα 24**] [**Εικόνα 25**] και του μέσου όρου αυτών [**Εικόνα 26**]

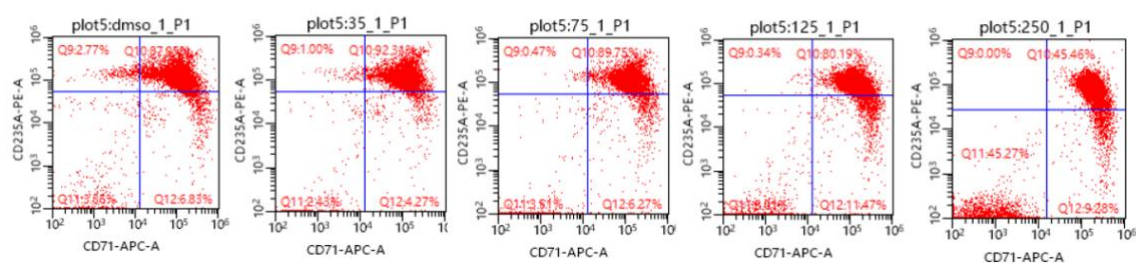
### EC Day 4



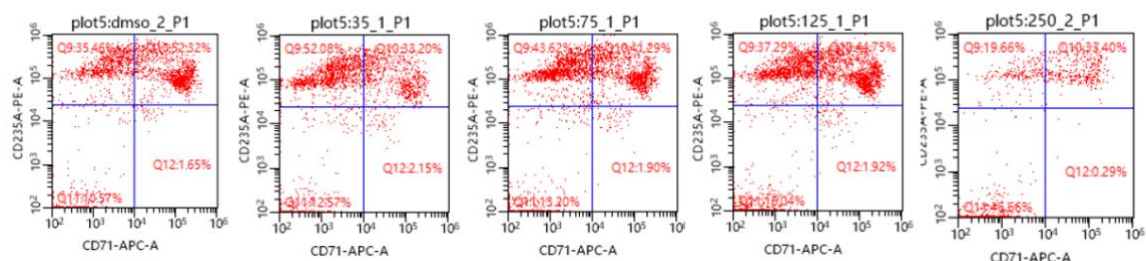
### EC Day 7



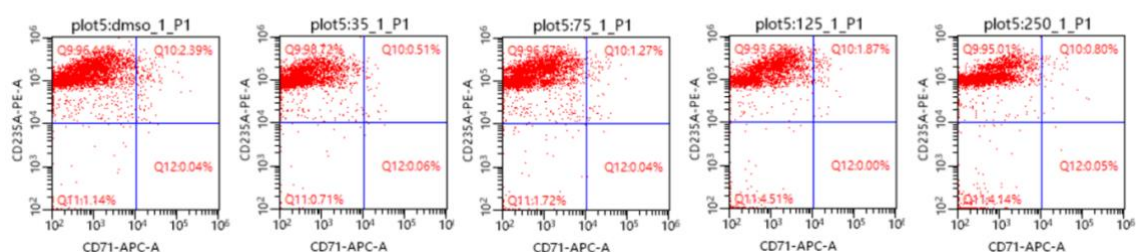
### EC Day 11



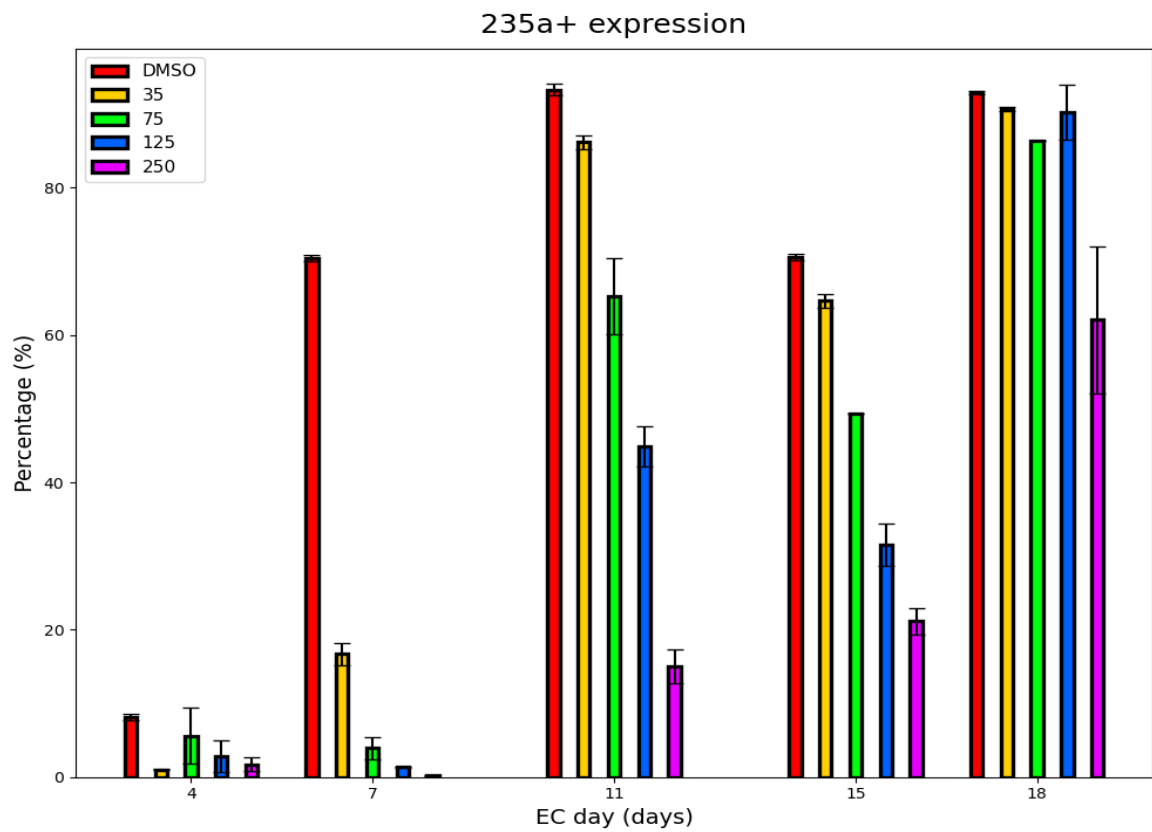
### EC Day 15



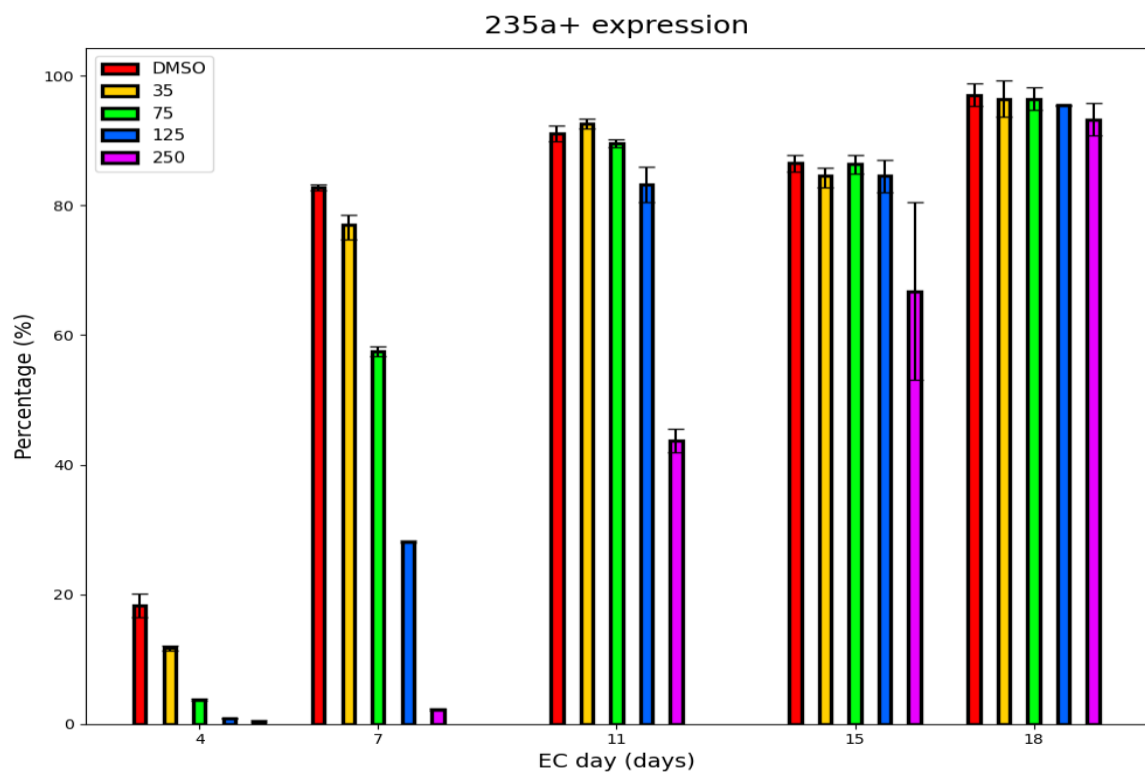
### EC Day 18



Εικόνα 23: Εκφραση των δεικτών CD235a και CD71 κατά την ερυθροειδική διαφοροποίηση υπό την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του UM171 (35, 75, 125 και 250nM) (dot plots)



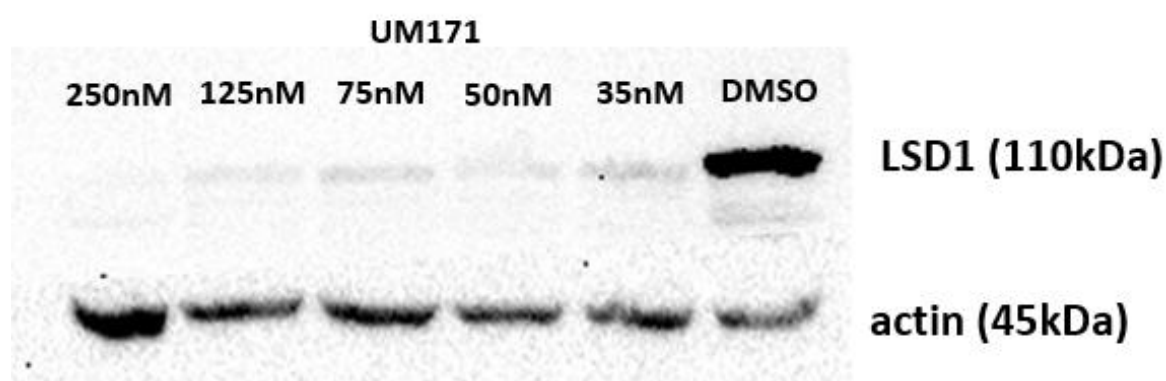
Εικόνα 24 Πείραμα 1: Σύγκριση του ποσοστού 235a+ κυττάρων σε κάθε συνθήκη ανά ημέρα καλλιέργειας



Εικόνα 25 Πείραμα 2: Σύγκριση του ποσοστού 235a+ κυττάρων σε κάθε συνθήκη ανά ημέρα καλλιέργειας

## 10.2 Επαγωγή της πρωτεοσωμικής αποικοδόμησης της LSD1

Μετά το τέλος της καλλιέργειας έκπτυξης (Ημέρα έκπτυξης 7) και πριν την εκκίνηση της ερυθροειδικής καλλιέργειας (Ημέρα 0), κύτταρα από κάθε συνθήκη συλλέχθηκαν και πραγματοποιήθηκε απομόνωση της ολικής πρωτεΐνης με σκοπό την ανάλυση της έκφρασης της LSD1 με τη διαδικασία της Western Blot. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι το UM-171 επάγει την πρωτεοσωμική αποικοδόμηση της LSD1 [**Εικόνα 27**]. Ως μάρτυρας του ισόποσου φορτώματος ολικής πρωτεΐνης (50μg) χρησιμοποιήθηκε η ακτίνη, μια πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού που εκφράζεται καθολικά σε όλους τους τύπους ευκαρυωτικών κυττάρων.

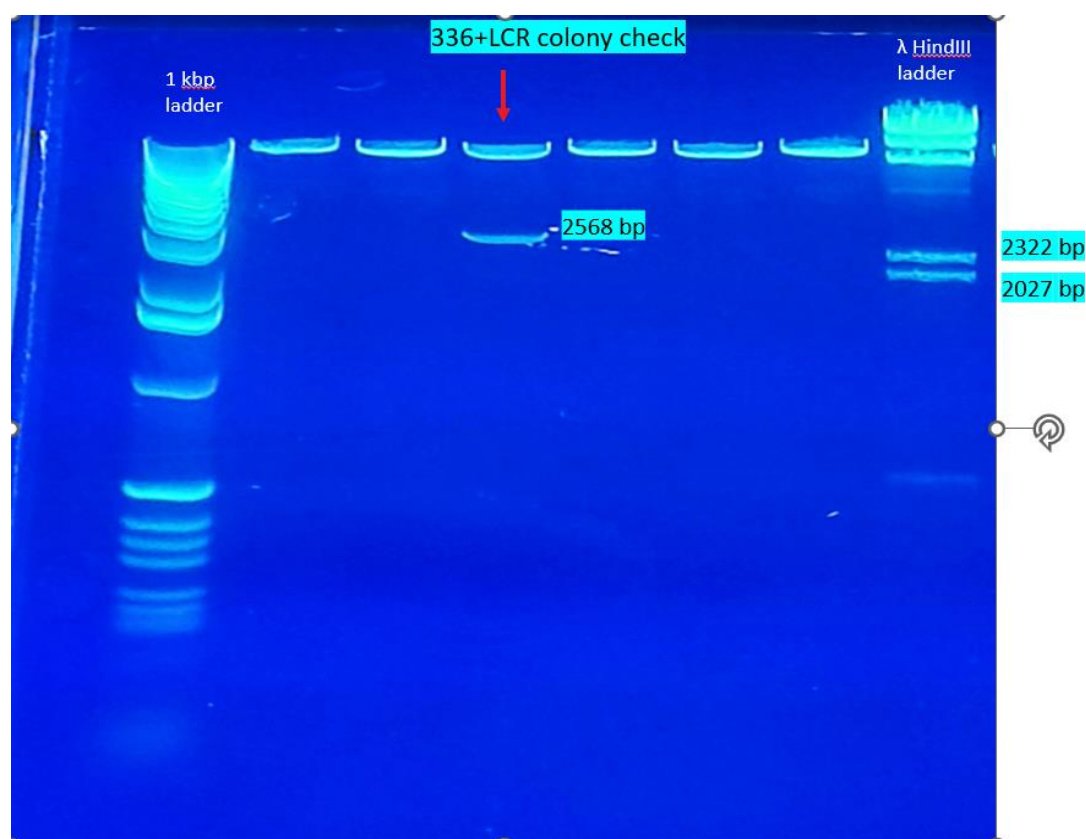


*Εικόνα 27: Επιβεβαίωση της πρωτεοσωμικής αποικοδόμησης της LSD1 μέσω Western blot*

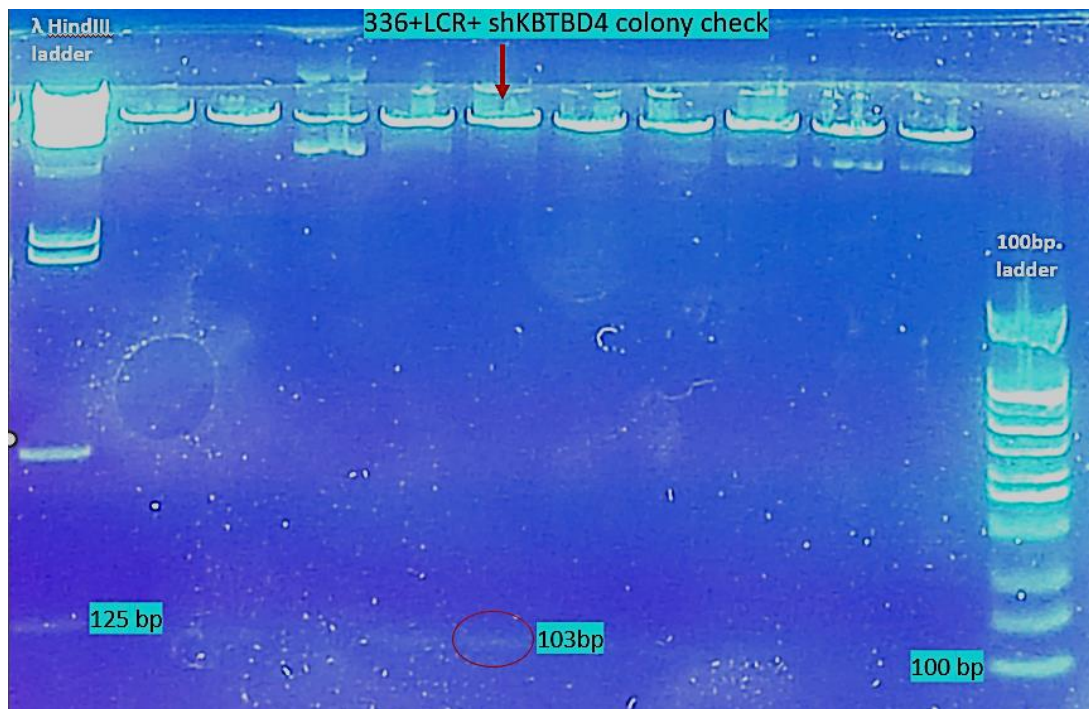
11. Κατασκευή και απομόνωση των απαραίτητων πλασμιδίων για την διερεύνηση του μηχανισμού επαγωγής της γ-σφαιρίνης

Σύμφωνα με την **Εικόνα 20** το πρώτο βήμα για την κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα για την αποσιώπηση της KBTBD4 είναι η ένθεση της αλληλουχίας του  $\mu$ LCR στο πλασμίδιο 336 [**Εικόνα 21**]. Για το λόγω αυτό πραγματοποιήθηκε έλεγχος με πέψη και ηλεκτροφόρηση όλων των προϊόντων ανασυνδυασμού που έδωσαν αποικίες. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 28** η σωστή αποικία ήταν η τρίτη κατά σειρά καθώς μετά την πέψη παρατηρείται ο  $\mu$ LCR.

Στη συνέχεια το πλασμίδιο (336+  $\mu$ LCR) που απομονώθηκε από τη σωστή αποικία, κόπηκε ενζυμικά σε νέα θέση με σκοπό την ένθεση της ολιγονουκλεοτιδικής αλληλουχίας shKBTBD4. Για την εύρεση της σωστής αποικίας πραγματοποιήθηκε εκ νέου πέψη και ηλεκτροφόρηση. Όπως φαίνεται από το αποτέλεσμα η πέμπτη κατά σειρά αποικία περιείχε το σωστό πλασμίδιο.



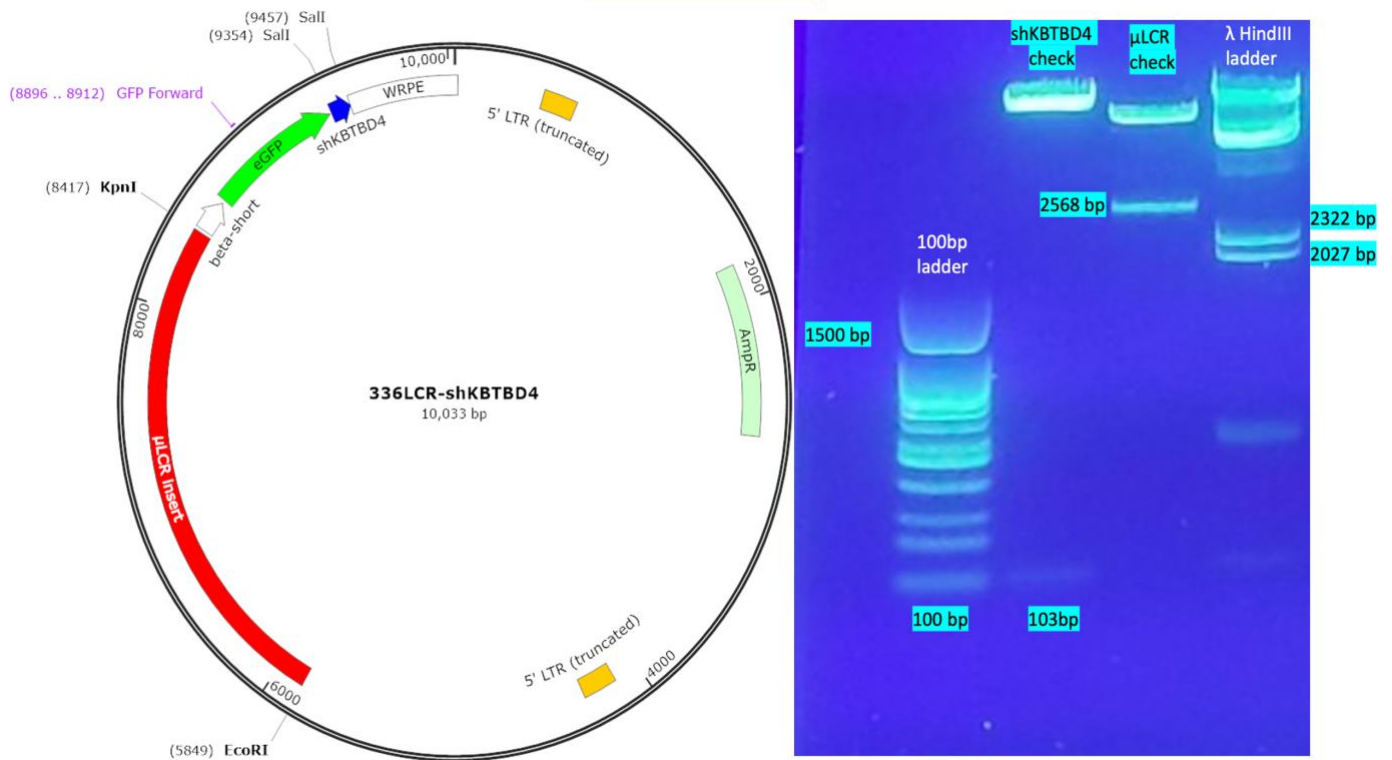
**Εικόνα 28:** Ηλεκτροφόρηση του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA με σκοπό την εύρεση αποικίας που περιλαμβάνει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο 336+LCR



*Εικόνα 29: Ηλεκτροφόρηση του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA με σκοπό την εύρεση αποικίας που περιλαμβάνει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο 336+LCR+shKBTBD4*

Τέλος, με στόχο τη μελλοντική του χρήση για την παραγωγή λεντικού φορέα που να προκαλεί την ιστοειδική αποσιώπηση της KBTBD4, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδίου σε μεγάλη κλίμακα. Ο έλεγχος του με διπλή πέψη και ηλεκτροφόρηση επιβεβαίωσε τη σωστή αλληλουχία του αναδεικνύοντας τον επιτυχή ανασυνδυασμό του.

### KBTBD4 KD maxi check



Εικόνα 24: Αριστερά: Χάρτης του τελικού πλασμιδιακού φορέα για την αποσιώπηση της KBTBD4 μετά τις δύο διαδοχικές κλωνοποιήσεις. Δεξιά: Ηλεκτροφόρηση του pDNA του φορέα μετά από κατάλληλες πέψεις που επιβεβαιώνουν την επιτυχή ένθεση των επιθυμητών αλληλουχιών (LCR-κόκκινο και shKBTBD4-μπλε)

## Συζήτηση

Οι αιμοσφαιρινοπάθειες αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα πεδία μελέτης της αιματολογίας, αντιπροσωπεύοντας την πιο συχνή ομάδα μονογονιδιακών διαταραχών. Παρότι η έγκριση των νέων γονιδιακών θεραπειών την τελευταία διετία σηματοδότησε μια πραγματική επανάσταση στην αντιμετώπιση των νοσημάτων αυτών, οι θεραπείες συνοδεύονται από περιορισμούς που σχετίζονται με το υψηλό κόστος, τις τεχνικές απαιτήσεις και τη

διαθεσιμότητα εξειδικευμένων κέντρων ιδιαίτερα στις χώρες της Αφρικής και Δυτικής Ασίας που αντιπροσωπεύουν την συντριπτική πλειονότητα των ασθενών παγκοσμίως. Ως εκ τούτου, παραμένει ζωτικής σημασίας η ανάπτυξη εναλλακτικών ή συμπληρωματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων, ικανών να εφαρμοστούν σε παγκόσμιο επίπεδο.

Το μικρό μόριο UM-171 και οι πιθανές εφαρμογές του αποτελούν πεδίο εντατικής έρευνας. Μέσα σε μια δεκαετία έχει αναδειχθεί πολύτιμο εργαλείο της ερευνητικής αιματολογίας χάρη στην πολλαπλή ευεργετική του δράση στις *ex vivo* καλλιέργειες αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSCs). Συγκεκριμένα μέσω της επιγενετικής του δράσης, την συνεισφορά του στην μεταβολική ισορροπία των κυττάρων και τον περιορισμό της παραγωγής ριζών υπεροξειδίου (ROS) βελτιώνει καθοριστικά την φυσική κατάσταση των κυττάρων και συμβάλλει στην διατήρηση του αρχέγονου χαρακτήρα τους, ευνοώντας τελικά την αυτό-ανανέωση. Ο συνδυασμός των πλεονεκτημάτων που προσφέρει αυξάνει σημαντικά τις πιθανότητες επιτυχούς εμφύτευσης του μοσχεύματος σε περιπτώσεις αλλογενών μεταμοσχεύσεων ή γονιδιακών παρεμβάσεων. Πρόσφατες μελέτες γύρω από τον μοριακό του μηχανισμό αποκάλυψαν ότι το UM-171 δρα ως «μοριακή κόλλα» που διευκολύνει την αλληλεπίδραση της KBTBD4 με το σύμπλοκο LSD1/RCOR1/HDAC1/2, οδηγώντας στην πρωτεοσωμική αποικοδόμηση της LSD1. Η αναστολή της LSD1 παρουσιάζει φαρμακολογικό ενδιαφέρον καθώς έχει αποδειχθεί ότι αντιστρέφει την καταστολή της έκφρασης της γ-σφαιρίνης, γεγονός που μπορεί να αμβλύνει σημαντικά τον κλινικό φαινότυπο των αιμοσφαιρινοπαθειών. Επομένως εύλογα προκύπτει το ερώτημα: Μπορεί το UM-171 να οδηγήσει σε αντίστοιχη ή μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων γ-σφαιρίνης μέσω της έμμεσης αποικοδόμησης της LSD1; Αποτελέσματα του εργαστηρίου μας επιβεβαιώνουν την υπόθεση.

Στην παρούσα εργασία έγιναν προσπάθειες προσέγγισης του μοριακού μηχανισμού αύξησης της HbF. Για τον σκοπό αυτόν σχεδιάστηκε πειραματικό πλαίσιο για την εξακρίβωση της εμπλοκής της KBTBD4 στον μηχανισμό. Η αξιοποίηση λεντικών φορέων για την αποσιώπηση (shKBTBD4) και την υπερέκφραση (KBTBD4*over*) της πρωτεΐνης-αντάπτορα κρίθηκε απαραίτητη για την επίτευξη του στόχου αλλά η παραγωγή τους δεν ολοκληρώθηκε εντός του

χρονικού πλαισίου. Παρόλα αυτά επιτεύχθηκε επιτυχής ανασυνδυασμός και απομόνωση των πλασμιδίων που φέρουν τα διαγονίδια για την υπερέκφραση ή αποσιώπηση της KBTBD4 και θα μπορέσουν να αποτελέσουν τα μοριακά εργαλεία για την παραγωγή των λεντικών φορέων προκειμένου να υπερεκφραστεί ή αποσιωπηθεί η KBTBD4 στα CD34, ώστε να διελευκανθεί αν μείωση της HbF πραγματοποιείται μέσω της KBTBD4. Η ολοκλήρωση αυτού του σκέλους θα μπορούσε να απαντήσει στο κρίσιμο ερώτημα αν η δράση του UM-171 στην επαγωγή της HbF πραγματοποιείται μέσω της KBTBD4 ή αν υπάρχουν και άλλα παράλληλα μονοπάτια.

Παράλληλα μελετήθηκε η επίδραση του UM171 στην ερυθροειδική διαφοροποίηση και βρέθηκε ότι το UM171 καθυστερεί την διαφοροποίηση προς την ερυθρά σειρά στα αρχικά στάδια της ερυθροειδικής καλλιέργειας (ημέρα 4) με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Ωστόσο, την ημέρα τερματισμού της καλλιέργειας τα επίπεδα έκφρασης του ερυθροειδικού δείκτη CD234α δεν διαφέρουν σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρα. Η γνώση της σχέσης μεταξύ της δόσης και της δράσης του μορίου επιτρέπει την μελλοντική βελτιστοποίηση του θεραπευτικού αποτελέσματος που προσφέρει με μικρότερες πιθανότητες εμφάνισης τοξικότητας.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η μεταφραστική προοπτική του UM-171 έγινε πρόσφατα πραγματικότητα. Το σκεύασμα Zemcelpro® είναι μια κυτταρική θεραπεία που αποτελείται από αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα τα οποία έχουν εκπτυχθεί με τη χρήση του UM-171 και προορίζεται για ενήλικες ασθενείς που πάσχουν από αιματολογικές νεοπλασίες όπου απαιτείται αλλογενή μεταμόσχευση και δεν υπάρχει συμβατός δότης. Τον Αύγουστο του 2025 έλαβε έγκριση από τον EMA θεμελιώνοντας το UM-171 στην κλινική πράξη. Να σημειωθεί ότι πολυάριθμες εφαρμογές του βρίσκονται αυτήν τη στιγμή σε προχωρημένα στάδια κλινικών μελετών με υποσχόμενα αποτελέσματα [126].

Συνολικά, η παρούσα εργασία συμβάλλει στην ενίσχυση της γνώσης γύρω από το UM-171 και στηρίζει την άποψη ότι το μόριο αυτό έχει τη δυναμική να αποτελέσει σημαντικό εργαλείο στη θεραπεία των αιμοσφαιρινοπαθειών. Χάρη στον δυνητικά διπλό ευεργετικό του ρόλο μπορεί να αποτελέσει ορόσημο στην συνδυαστική θεραπεία των αιμοσφαιρινοπαθειών. Συγκεκριμένα η χρήση σε συνδυασμό με τις διαθέσιμες ή και μελλοντικές γονιδιακές θεραπείες θα

μπορούσε να βελτιώσει το κλινικό αποτέλεσμα και μέσω του αυξημένου engraftment και λόγω της επιγενετικής ενεργοποίησης της γ-σφαιρίνης.

Σχεδιάζοντας το επόμενο βήμα της ερευνητικής αυτής προσπάθειας, είναι προφανές ότι υπάρχει ανάγκη για πλήρη χαρακτηρισμό και αποσαφήνιση της ενδιαφέρουσας επαγωγής της γ-σφαιρίνης μετά από επίδραση με UM-171. Αυτό συνεπάγεται την διαλεύκανση του μηχανισμού που διέπει την επαγωγή αυτή καθώς και τη βελτιστοποίηση της δοσολογίας για την επίτευξη του καλύτερου δυνατού θεραπευτικού αποτελέσματος. Στην περίπτωση που ο μηχανισμός είναι ανεξάρτητος της KBTBD4, η περαιτέρω μελέτη του θα είναι επιτακτική. Μακροπρόθεσμα, in vivo πειράματα σε κατάλληλο ζωικό μοντέλο (π.χ. επίμυες) με σκοπό την επιβεβαίωση της επίδρασης και των μηχανισμών σε επίπεδο οργανισμού θα μπορούσαν να προσφέρουν μεγαλύτερη μεταφραστική αξία.

## Βιβλιογραφία

1. Fanni D, Angotzi F, Lai F, et al. Four stages of hepatic hematopoiesis in human embryos and fetuses. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2018;31(6):701-707. doi:10.1080/14767058.2017.1297400
2. Higgs, D. R., Engel, J. D. & Stamatoyannopoulos, G. Thalassaemia. *The Lancet* 379, 373–383 (2012).
3. Moore, Keith L., Persaud, T.V.N.. *The Developing Human Clinically Oriented Embryology*. Ed. 8 Philadelphia: Elsevier Saunders, 77-79 (2013)
4. Pahal GS, Jauniaux E, Kinnon C, Thrasher AJ, Rodeck CH. Normal development of human fetal hematopoiesis between eight and seventeen weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;183(4):1029-1034. doi:10.1067/mob.2000.106976
5. Lewis, K, Yoshimoto, M. & Takebe, T. Fetal liver hematopoiesis: from development to delivery. *Stem Cell Res Ther* **12**, 139 (2021). [doi:10.1186/s13287-021-02189-w](https://doi.org/10.1186/s13287-021-02189-w)

6. Rossi L, Challen GA, Sirin O, Lin KK, Goodell MA. Hematopoietic stem cell characterization and isolation. *Methods Mol Biol.* 2011;750:47-59. doi:10.1007/978-1-61779-145-1\_3
7. Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E: Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell* 2004, 118:635– 648
8. Bryder, D., Rossi, D. J., & Weissman, I. L. (2006). *Hematopoietic Stem Cells. The American Journal of Pathology*, 169(2), 338–346. doi:10.2353/ajpath.2006.060312
9. Till JE, McCulloch EA: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961, 14:213–222
10. Cheng H, Zheng Z, Cheng T. New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. *Protein Cell.* 2020;11(1):34-44. doi:10.1007/s13238-019-0633-0
11. Seita J, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2010;2(6):640-653. doi:10.1002/wsbm.86
12. Hawley RG, Ramezani A, Hawley TS. Hematopoietic stem cells. *Methods Enzymol.* 2006;419:149-179. doi:10.1016/S0076-6879(06)19007-2
13. Bhoopalan SV, Huang LJ, Weiss MJ. Erythropoietin regulation of red blood cell production: from bench to bedside and back. (2020)
14. Macrì S, Pavesi E, Crescitelli R, Aspesi A, Vizziello C, et al. (2015) Immunophenotypic Profiling of Erythroid Progenitor-Derived Extracellular Vesicles in Diamond-Blackfan Anaemia: A New Diagnostic Strategy. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138200>
15. Amer Wahed, Amitava Dasgupta, Chapter 4 - Hemoglobinopathies and Thalassemias, Editor(s): Amer Wahed, Amitava Dasgupta, Hematology and Coagulation, Elsevier, 2015, Pages 55-80, ISBN 9780128002414, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800241-4.00004-8>.
16. Seda Ekizoglu, Genetic Basis and Molecular Diagnosis of Hemoglobinopathies, Reference Module in Biomedical Sciences, Elsevier, 2024, ISBN 9780128012383, <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15717-2.00024-X>.

17. Palis J. Ontogeny of erythropoiesis. *Curr Opin Hematol.* 2008;15(3):155-161. doi:10.1097/MOH.0b013e3282f97ae1
18. Dong HY, Wilkes S, Yang H. CD71 is selectively and ubiquitously expressed at high levels in erythroid precursors of all maturation stages: a comparative immunochemical study with glycophorin A and hemoglobin A. *Am J Surg Pathol.* 2011;35(5):723-732. doi:10.1097/PAS.0b013e31821247a8
19. Thiagarajan P, Parker CJ, Prchal JT. How Do Red Blood Cells Die?. *Front Physiol.* 2021;12:655393. Published 2021 Mar 15. doi:10.3389/fphys.2021.655393
20. Kuhn V, Diederich L, Keller TCS 4th, et al. Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. *Antioxid Redox Signal.* 2017;26(13):718-742. doi:10.1089/ars.2016.6954
21. Bunn HF. Erythropoietin. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(3):a011619. Published 2013 Mar 1. doi:10.1101/cshperspect.a011619
22. Shih HM, Wu CJ, Lin SL. Physiology and pathophysiology of renal erythropoietin-producing cells. *J Formos Med Assoc.* 2018;117(11):955-963. doi:10.1016/j.jfma.2018.03.017
23. Kapitsinou PP, Liu Q, Unger TL, et al. Hepatic HIF-2 regulates erythropoietic responses to hypoxia in renal anemia. *Blood.* 2010;116(16):3039-3048. doi:10.1182/blood-2010-02-270322
24. Weiss MJ. New insights into erythropoietin and epoetin alfa: mechanisms of action, target tissues, and clinical applications. *Oncologist.* 2003;8 Suppl 3:18-29. doi:10.1634/theoncologist.8-suppl\_3-18
25. Scortegagna M, Ding K, Zhang Q, et al. HIF-2alpha regulates murine hematopoietic development in an erythropoietin-dependent manner. *Blood.* 2005;105(8):3133-3140. doi:10.1182/blood-2004-05-1695
26. Semenza GL, Neifelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(13):5680-5684. doi:10.1073/pnas.88.13.5680

27. Lappin TR, Lee FS. Update on mutations in the HIF: EPO pathway and their role in erythrocytosis. *Blood Rev.* 2019;37:100590. doi:10.1016/j.blre.2019.100590
28. Denison MS, Faber SC. And Now for Something Completely Different: Diversity in Ligand-Dependent Activation of Ah Receptor Responses. *Curr Opin Toxicol.* 2017;2:124-131. doi:10.1016/j.cotox.2017.01.006
29. Berg, J. M. *Biochemistry*. (W.H. Freeman, 2012).
30. Hardison RC. Evolution of hemoglobin and its genes. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(12):a011627. Published 2012 Dec 1. doi:10.1101/cshperspect.a011627
31. Steinberg, M. H., Benz, E. J., Adewoye, A. H., & Ebert, B. L. (2018). *Pathobiology of the Human Erythrocyte and Its Hemoglobins. Hematology*, 447–457. doi:10.1016/b978-0-323-35762-3.00033-0
32. Ohls KR. Developmental erythropoiesis. In: Polin RA, Fox WW, Abmen SH, eds. *Fetal and neonatal physiology*. 3rd ed. Philadelphia, PA: W B Saunders company; 2004:1397–421 [doi:10.1016/B978-0-7216-9654-6.50149-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-7216-9654-6.50149-1)
33. Chen, H., Wang, Z., Yu, S. *et al.* 3,3',5-Triiodothyroacetic acid (TRIAC) induces embryonic  $\zeta$ -globin expression via thyroid hormone receptor  $\alpha$ . *J Hematol Oncol* **14**, 99 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01108-z>
34. Sung-Ho Goh, Y. Terry Lee, Natarajan V. Bhanu, Margaret C. Cam, Richard Desper, Brian M. Martin, Ramy Moharram, Robert B. Gherman, Jeffery L. Miller; A newly discovered human  $\alpha$ -globin gene. *Blood* 2005; 106 (4): 1466–1472. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-0948>
35. Tufarelli C, Hardison R, Miller W, et al. Comparative analysis of the alpha-like globin clusters in mouse, rat, and human chromosomes indicates a mechanism underlying breaks in conserved synteny. *Genome Res.* 2004;14(4):623-630. doi:10.1101/gr.2143604
36. De Gobbi M, Anguita E, Hughes J, et al. Tissue-specific histone modification and transcription factor binding in alpha globin gene expression [published correction appears in *Blood*. 2008 Feb 15;111(4):1773]. *Blood*. 2007;110(13):4503-4510. doi:10.1182/blood-2007-06-097964

37. Viprakasit V, Harteveld CL, Ayyub H, et al. A novel deletion causing alpha thalassemia clarifies the importance of the major human alpha globin regulatory element. *Blood*. 2006;107(9):3811-3812. doi:10.1182/blood-2005-12-4834
38. Voon HP, Vadolas J. Controlling alpha-globin: a review of alpha-globin expression and its impact on beta-thalassemia. *Haematologica*. 2008;93(12):1868-1876. doi:10.3324/haematol.13490
39. Nienhuis AW, Persons DA. Development of gene therapy for thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(11):a011833. Published 2012 Nov 1. doi:10.1101/cshperspect.a011833
40. Li Q, Peterson KR, Fang X, Stamatoyannopoulos G. Locus control regions. *Blood*. 2002;100(9):3077-3086. doi:10.1182/blood-2002-04-1104
41. Krivega I, Byrnes C, de Vasconcellos JF, et al. Inhibition of G9a methyltransferase stimulates fetal hemoglobin production by facilitating LCR/ $\gamma$ -globin looping. *Blood*. 2015;126(5):665-672. doi:10.1182/blood-2015-02-629972
42. Brand M. Pharmacologic control of chromatin looping. *Blood*. 2015;126(5):569-570. doi:10.1182/blood-2015-06-646695
43. Wang Y, Rank G, Li Z, et al.  $\epsilon$ -globin expression is regulated by SUV4-20h1. *Haematologica*. 2016;101(5):e168-e172. doi:10.3324/haematol.2015.139980
44. Love PE, Warzecha C, Li L. Ldb1 complexes: the new master regulators of erythroid gene transcription. *Trends Genet*. 2014;30(1):1-9. doi:10.1016/j.tig.2013.10.001
45. Levings PP, Bungert J. The human beta-globin locus control region. *Eur J Biochem*. 2002;269(6):1589-1599. doi:10.1046/j.1432-1327.2002.02797.x
46. Deng W, Lee J, Wang H, et al. Controlling long-range genomic interactions at a native locus by targeted tethering of a looping factor. *Cell*. 2012;149(6):1233-1244. doi:10.1016/j.cell.2012.03.051

47. Liu, N., Xu, S., Yao, Q. *et al.* Transcription factor competition at the  $\gamma$ -globin promoters controls hemoglobin switching. *Nat Genet* **53**, 511–520 (2021). [doi:10.1038/s41588-021-00798-y](https://doi.org/10.1038/s41588-021-00798-y)
48. Wilber A, Nienhuis AW, Persons DA. Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching: new therapeutic opportunities. *Blood*. 2011;117(15):3945-3953. doi:10.1182/blood-2010-11-316893
49. Yi Z, Cohen-Barak O, Hagiwara N, et al. Sox6 directly silences epsilon globin expression in definitive erythropoiesis. *PLoS Genet*. 2006;2(2):e14. doi:10.1371/journal.pgen.0020014
50. Masuda T, Wang X, Maeda M, et al. Transcription factors LRF and BCL11A independently repress expression of fetal hemoglobin. *Science*. 2016;351(6270):285-289. doi:10.1126/science.aad3312
51. Tanabe O, McPhee D, Kobayashi S, et al. Embryonic and fetal beta-globin gene repression by the orphan nuclear receptors, TR2 and TR4. *EMBO J*. 2007;26(9):2295-2306. doi:10.1038/sj.emboj.7601676
52. Swenson SA, Moore CM, Marcero JR, Medlock AE, Reddi AR, Khalimonchuk O. From Synthesis to Utilization: The Ins and Outs of Mitochondrial Heme. *Cells*. 2020;9(3):579. doi:10.3390/cells9030579
53. Harteveld CL, Achour A, Arkesteijn SJG, et al. The hemoglobinopathies, molecular disease mechanisms and diagnostics. *Int J Lab Hematol*. 2022;44 Suppl 1(Suppl 1):28-36. doi:10.1111/ijlh.13885
54. Piel FB, Patil AP, Howes RE, et al. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nat Commun*. 2010;1:104. Published 2010 Nov 2. doi:10.1038/ncomms1104
55. Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ. Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, and clinical management. Cambridge University Press; 2009 Aug 17.
56. Old J, Angastiniotis M, Eleftheriou A, Galanello R, et al., eds. *Prevention of Thalassaemias and Other Haemoglobin Disorders: Volume 1: Principles*. 2nd ed. Nicosia (Cyprus): Thalassaemia International Federation; 2013.
57. Daniel E. Sabath, Molecular Diagnosis of Thalassemias and Hemoglobinopathies: An ACLPS Critical Review, *American Journal of*

- Clinical Pathology*, Volume 148, Issue 1, July 2017, Pages 6–15, <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqx047>
58. Ekizoglu S. *Genetic Basis and Molecular Diagnosis of Hemoglobinopathies, Comprehensive Hematology and Stem Cell Research (First Edition)*. Elsevier 2024, Pages 147-161, ISBN:9780443157189, <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15717-2.00024-X>.
  59. Faulkner LB, Uderzo C, Masera G. International cooperation for the cure and prevention of severe hemoglobinopathies. *J Pediatr Hematol Oncol* 2013;35:41923.
  60. Mettananda S, Gibbons RJ, Higgs DR.  $\alpha$ -Globin as a molecular target in the treatment of  $\beta$ -thalassemia. *Blood*. 2015;125(24):3694-3701. doi:10.1182/blood-2015-03-633594
  61. Mario Cazzola; Ineffective erythropoiesis and its treatment. *Blood* 2022; 139 (16): 2460–2470. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.2021011045>
  62. Mathias LA, Fisher TC, Zeng L, et al. Ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia major is due to apoptosis at the polychromatophilic normoblast stage. *Exp Hematol*. 2000;28(12):1343-1353. doi:10.1016/s0301-472x(00)00555-5
  63. Taher AT, Musallam KM, Cappellini MD.  $\beta$ -Thalassemias. *N Engl J Med*. 2021;384(8):727-743. doi:10.1056/NEJMra2021838
  64. Kihm AJ, Kong Y, Hong W, et al. An abundant erythroid protein that stabilizes free alpha-haemoglobin. *Nature*. 2002;417(6890):758-763. doi:10.1038/nature00803
  65. Higgs, D. R., Engel, J. D., & Stamatoyannopoulos, G. (2012). Thalassaemia. *The Lancet*, 379(9813), 373–383. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60283-3
  66. Galanello, R., & Origa, R. (2010). Beta-thalassemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2010 5:1, 5(1), 1–15. doi: 10.1186/1750-1172-5-11
  67. Williams, T. N., & Thein, S. L. (2018). Sickle Cell Anemia and Its Phenotypes. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 19(1). doi:10.1146/annurev-genom-083117-021320
  68. Sundd, P., Gladwin, M. T., & Novelli, E. M. (2018). *Pathophysiology of Sickle Cell Disease. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 14(1). doi:10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012838

69. Marija Dimitrievska, Dravie Bansal, Marta Vitale, John Strouboulis, Annarita Miccio, Kypros H. Nicolaides, Sara El Hoss, Panicos Shangaris, Joanna Jacków-Malinowska, *Revolutionising healing: Gene Editing's breakthrough against sickle cell disease*, *Blood Reviews*, Volume 65, 2024, 101185, ISSN:0268-960X, <https://doi.org/10.1016/j.blre.2024.101185>.
70. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *The Lancet*. 2010 Dec 11;376(9757):2018-31. DOI: [10.1016/S0140-6736\(10\)61029-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61029-X)
71. da Guarda CC, Yahouédéhou SCMA, Santiago RP, Neres JSdS, Fernandes CFdL, et al. (2020) Sickle cell disease: A distinction of two most frequent genotypes (HbSS and HbSC). *PLOS ONE* 15(1): e0228399. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228399>
72. Sharma DC, Singhal S, Woike P, Rai S, Yadav M, Gaur R. Hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Asian J Transfus Sci*. 2020;14(2):185-186. doi:10.4103/ajts.AJTS\_71\_16
73. EDINGTON GM, LEHMANN H. Expression of the sickle-cell gene in Africa. *Br Med J*. 1955;1(4925):1308-1311. doi:10.1136/bmj.1.4925.1308
74. Fessas P. & Stamatoyannopoulos G. (1964). HEREDITARY PERSISTENCE OF FETAL HEMOGLOBIN IN GREECE. A STUDY AND A COMPARISON. *Blood*, 24(3), 223–240. doi: 10.1182/blood.v24.3.223.223
75. Berry M, Grosveld F, Dillon N. A single point mutation is the cause of the Greek form of hereditary persistence of fetal haemoglobin. *Nature*. 1992;358(6386):499-502. doi:10.1038/358499a0
76. Wienert B, Martyn GE, Kurita R, Nakamura Y, Quinlan KGR, Crossley M. KLF1 drives the expression of fetal hemoglobin in British HPFH. *Blood*. 2017;130(6):803-807. doi:10.1182/blood-2017-02-767400
77. Wienert B, Funnell AP, Norton LJ, et al. Editing the genome to introduce a beneficial naturally occurring mutation associated with increased fetal globin. *Nat Commun*. 2015;6:7085. Published 2015 May 14. doi:10.1038/ncomms8085
78. Stenger EO, Shenoy S, Krishnamurti L. How I treat sickle cell disease with hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2019;134(25):2249-2260. doi:10.1182/blood.2019000821

79. Krishnamurti L, Neuberg DS, Sullivan KM, et al. Bone marrow transplantation for adolescents and young adults with sickle cell disease: Results of a prospective multicenter pilot study. *Am J Hematol*. 2019;94(4):446-454. doi:10.1002/ajh.25401
80. Psatha N, Papayanni PG, Yannaki E. A New Era for Hemoglobinopathies: More Than One Curative Option. *Curr Gene Ther*. 2017;17(5):364-378. doi:10.2174/1566523218666180119123655
81. Karamperis, K. et al. Genome-based therapeutic interventions for  $\beta$ -type hemoglobinopathies. *Hum Genomics* 15, 32 (2021).
82. Beeke Wienert, Gabriella E. Martyn, Alister P.W. Funnell, Kate G.R. Quinlan, Merlin Crossley, *Wake-up Sleepy Gene: Reactivating Fetal Globin for  $\beta$ -Hemoglobinopathies*, *Trends in Genetics*, Volume 34, Issue 12, 2018, 927-940, ISSN 0168-9525 <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.09.004>.
83. Magrin E, Miccio A, Cavazzana M. Lentiviral and genome-editing strategies for the treatment of  $\beta$ -hemoglobinopathies. *Blood*. 2019;134(15):1203-1213. doi:10.1182/blood.2019000949
84. Locatelli F, Thompson AA, Kwiatkowski JL, et al. Betibeglogene Autotemcel Gene Therapy for Non- $\beta^0/\beta^0$  Genotype  $\beta$ -Thalassemia. *N Engl J Med*. 2022;386(5):415-427. doi:10.1056/NEJMoa2113206
85. Schuessler-Lenz M, Enzmann H, Vamvakas S. Regulators' Advice Can Make a Difference: European Medicines Agency Approval of Zynteglo for Beta Thalassemia. *Clin Pharmacol Ther*. 2020;107(3):492-494. doi:10.1002/cpt.1639
86. FDA announcement for approval of SCD gene therapies <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-gene-therapies-treat-patients-sickle-cell-disease#:~:text=FDA%20Approves%20First%20Gene%20Therapies%20to%20Treat%20Patients%20with%20Sickle%20Cell%20Disease,-Share&text=Today%2C%20the%20U.S.%20Food%20and,patients%2012%20years%20and%20older.>
87. Sheridan C. The world's first CRISPR therapy is approved: who will receive it?. *Nature biotechnology*. 2024 Jan;42(1):3-4.

88. A. Liu UPDATED: Bluebird's Sickle Cell Gene Therapy Comes With Safety Warning and Higher Price. Can lyfgenia Overcome CRISPR's halo? <https://www.fiercepharma.com/pharma/fda-approves-bluebird-sickle-cell-disease-gene-therapy-can-lyfgenia-overcome-crisprs-halo> (2023)
89. Magrin E, Magnani A, Semeraro M, Hebert N, Joseph L, Leblanc O, Gabrion A, Roudaut C, Maulet A, Chalumeau A, Kiger L. Clinical results of the Drepaglobe trial for sickle cell disease patients. *Blood*. 2021 Nov 23;138:1854.
90. Grimley M, Asnani M, Shrestha A, Felker S, Lutzko C, Arumugam PI, Witting S, Knight-Madden J, Niss O, Quinn CT, Lo C. Safety and efficacy of Aru-1801 in patients with sickle cell disease: early results from the phase 1/2 momentum study of a modified gamma globin gene therapy and reduced intensity conditioning. *Blood*. 2021 Nov 23;138:3970.
91. Brendel C, Negre O, Rothe M, Guda S, Parsons G, Harris C, McGuinness M, Abriss D, Tsytsykova A, Klatt D, Bentler M. Preclinical evaluation of a novel lentiviral vector driving lineage-specific BCL11A knockdown for sickle cell gene therapy. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*. 2020 Jun 12;17:589-600.
92. Lessard S, Rimmelé P, Ling H, et al. Zinc finger nuclease-mediated gene editing in hematopoietic stem cells results in reactivation of fetal hemoglobin in sickle cell disease. *Sci Rep*. 2024;14(1):24298. Published 2024 Oct 16. doi:10.1038/s41598-024-74716-7
93. Agrawal, R.K., Patel, R.K., shah, V. *et al*. Hydroxyurea in Sickle Cell Disease: Drug Review. *Indian J Hematol Blood Transfus* **30**, 91–96 (2014). <https://doi.org/10.1007/s12288-013-0261-4>
94. Brawley OW, Cornelius LJ, Edwards LR, et al. National Institutes of Health Consensus Development Conference statement: hydroxyurea treatment for sickle cell disease. *Ann Intern Med*. 2008;148(12):932-938. doi:10.7326/0003-4819-148-12-200806170-00220
95. Arati Rani Chand, Hongyan Xu, Leigh G Wells, Betsy Clair, Cindy Neunert, Alison E Spellman, Leila Jerome Clay, Kavita Natrajan, Abdullah Kutlar; Are There True Non-Responders to Hydroxyurea in Sickle Cell

- Disease? a Multiparameter Analysis. *Blood* 2014; 124 (21): 4073. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V124.21.4073.4073>
96. Howard J, Hemmaway CJ, Telfer P, et al. A phase 1/2 ascending dose study and open-label extension study of voxelotor in patients with sickle cell disease. *Blood*. 2019;133(17):1865-1875. doi:10.1182/blood-2018-08-868893
  97. Vichinsky E, Hoppe CC, Ataga KI, Ware RE, Nduba V, El-Beshlawy A, Hassab H, Achebe MM, Alkindi S, Brown RC, Diuguid DL. A phase 3 randomized trial of voxelotor in sickle cell disease. *New England Journal of Medicine*. 2019 Aug 8;381(6):509-19.
  98. Rai P, Ataga KI. Drug Therapies for the Management of Sickle Cell Disease. *F1000Res*. 2020;9:F1000 Faculty Rev-592. Published 2020 Jun 11. doi:10.12688/f1000research.22433.1
  99. Suzuki M, Yamamoto M, Engel JD. Fetal globin gene repressors as drug targets for molecular therapies to treat the  $\beta$ -globinopathies. *Mol Cell Biol*. 2014;34(19):3560-3569. doi:10.1128/MCB.00714-14
  100. Vinzon Ibanez, Kestis Vaitkus, Xu Zhang, Jagadeesh Ramasamy, Angela E. Rivers, Yogen Sauntharajah, Robert Molokie, Donald Lavelle; Combinatorial targeting of epigenome-modifying enzymes with decitabine and RN-1 synergistically increases HbF. *Blood Adv* 2023; 7 (15): 3891–3902. doi: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022009558>
  101. Lavelle D, Engel JD, Sauntharajah Y. Fetal Hemoglobin Induction by Epigenetic Drugs. *Semin Hematol*. 2018;55(2):60-67. doi:10.1053/j.seminhematol.2018.04.008
  102. Yu L, Myers G, Engel JD. Small molecule therapeutics to treat the  $\beta$ -globinopathies. *Curr Opin Hematol*. 2020;27(3):129-140. doi:10.1097/MOH.0000000000000579
  103. Shi L, Cui S, Engel JD, Tanabe O. Lysine-specific demethylase 1 is a therapeutic target for fetal hemoglobin induction. *Nat Med*. 2013;19(3):291-294. doi:10.1038/nm.3101
  104. Ramasamy Jagadeeswaran, Yash Agarwal, Vinzon Ibanez, Maria Armila Ruiz, Kestis Vaitkus, Joseph DeSimone, Donald Lavelle, Angela Rivers; Investigation of Two Combination HbF Induction Regimens, RN-1

- and Hydroxyurea Versus RN-1 and Decitabine, in a Humanized Sick Cell Mouse Model. *Blood* 2015; 126 (23): 3386. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V126.23.3386.3386>
105. Song Y, Dagil L, Fairall L, et al. Mechanism of Crosstalk between the LSD1 Demethylase and HDAC1 Deacetylase in the CoREST Complex. *Cell Rep.* 2020;30(8):2699-2711.e8. doi:10.1016/j.celrep.2020.01.091
  106. Kim SA, Zhu J, Yennawar N, Eek P, Tan S. Crystal Structure of the LSD1/CoREST Histone Demethylase Bound to Its Nucleosome Substrate. *Mol Cell.* 2020;78(5):903-914.e4. doi:10.1016/j.molcel.2020.04.019
  107. Wu M, Hayward D, Kalin JH, Song Y, Schwabe JW, Cole PA. Lysine-14 acetylation of histone H3 in chromatin confers resistance to the deacetylase and demethylase activities of an epigenetic silencing complex. *Elife.* 2018;7:e37231. Published 2018 Jun 5. doi:10.7554/eLife.37231
  108. Xu J, Bauer DE, Kerenyi MA, et al. Corepressor-dependent silencing of fetal hemoglobin expression by BCL11A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(16):6518-6523. doi:10.1073/pnas.1303976110
  109. Fares I, Chagraoui J, Gareau Y, et al. Cord blood expansion. Pyrimidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal. *Science.* 2014;345(6203):1509-1512. doi:10.1126/science.1256337
  110. Brunstein CG, Gutman JA, Weisdorf DJ, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy: relative risks and benefits of double umbilical cord blood. *Blood.* 2010;116(22):4693-4699. doi:10.1182/blood-2010-05-285304
  111. Miller PH, Knapp DJ, Eaves CJ. Heterogeneity in hematopoietic stem cell populations: implications for transplantation. *Curr Opin Hematol.* 2013;20(4):257-264. doi:10.1097/MOH.0b013e328360aaf6
  112. Bari S, Chong P, Hwang WYK. Expansion of Haematopoietic Stem and Progenitor Cells: Paving the Way for Next-Generation Haematopoietic Stem Cell Transplantation. *Blood Cell Ther.* 2019;2(4):58-67. Published 2019 Nov 25. doi:10.31547/bct-2019-004

113. Mellet J, Hendricks CL, Stivaktas V, Durandt C, Ambele MA, Pepper MS. Extensive immunophenotypic sub-population analysis of StemRegenin1 expanded haematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cell Res Ther.* 2024;15(1):317. Published 2024 Sep 20. doi:10.1186/s13287-024-03895-x
114. Psatha N, Georgolopoulos G, Phelps S, Papayannopoulou T. Brief Report: A Differential Transcriptomic Profile of Ex Vivo Expanded Adult Human Hematopoietic Stem Cells Empowers Them for Engraftment Better than Their Surface Phenotype. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(10):1852-1858. doi:10.1002/sctm.17-0048
115. Chagraoui J, Lehnertz B, Girard S, et al. UM171 induces a homeostatic inflammatory-detoxification response supporting human HSC self-renewal. *PLoS One.* 2019;14(11):e0224900. Published 2019 Nov 8. doi:10.1371/journal.pone.0224900
116. Subramaniam A, Žemaitis K, Talkhoncheh MS, et al. Lysine-specific demethylase 1A restricts ex vivo propagation of human HSCs and is a target of UM171. *Blood.* 2020;136(19):2151-2161. doi:10.1182/blood.2020005827
117. Boitano AE, Wang J, Romeo R, et al. Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells [published correction appears in *Science.* 2011 May 6;332(6030):664]. *Science.* 2010;329(5997):1345-1348. doi:10.1126/science.1191536
118. Chagraoui J, Girard S, Spinella JF, et al. UM171 Preserves Epigenetic Marks that Are Reduced in Ex Vivo Culture of Human HSCs via Potentiation of the CLR3-KBTBD4 Complex. *Cell Stem Cell.* 2021;28(1):48-62.e6. doi:10.1016/j.stem.2020.12.002
119. Zimran E, Papa L, Hoffman R. Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells: Finally transitioning from the lab to the clinic. *Blood Rev.* 2021;50:100853. doi:10.1016/j.blre.2021.100853
120. Cohen S, Roy J, Lachance S, et al. Hematopoietic stem cell transplantation using single UM171-expanded cord blood: a single-arm,

- phase 1-2 safety and feasibility study. *Lancet Haematol.* 2020;7(2):e134-e145. doi:10.1016/S2352-3026(19)30202-9
121. Fujino T, Asada S, Goyama S, Kitamura T. Mechanisms involved in hematopoietic stem cell aging. *Cell Mol Life Sci.* 2022;79(9):473. Published 2022 Aug 8. doi:10.1007/s00018-022-04356-5
  122. Chagraoui J, Girard S, Mallinger L, Mayotte N, Tellechea MF, Sauvageau G. KBTBD4-mediated reduction of MYC is critical for hematopoietic stem cell expansion upon UM171 treatment. *Blood.* 2024;143(10):882-894. doi:10.1182/blood.2023021342
  123. Liu B, Klatt D, Zhou Y, et al. UM171 enhances fitness and engraftment of gene-modified hematopoietic stem cells from patients with sickle cell disease. *Blood Adv.* 2024;8(22):5885-5895. doi:10.1182/bloodadvances.2024013932
  124. Okocha EC, Gyamfi J, Ryan N, et al. Barriers to Therapeutic Use of Hydroxyurea for Sickle Cell Disease in Nigeria: A Cross-Sectional Survey. *Front Genet.* 2022;12:765958. Published 2022 Jan 19. doi:10.3389/fgene.2021.765958
  125. Sheridan C. The world's first CRISPR therapy is approved: who will receive it?. *Nat Biotechnol.* 2024;42(1):3-4. doi:10.1038/d41587-023-00016-6
  126. <https://excellthera.com/news/zemcelpro-um171-cell-therapy-receives-ec-authorization-as-the-first-and-only-cell-therapy-for-blood-cancer-patients-without-access-to-suitable-donor-cells/>