



Hemoglobinopatilerde Genetik Modifiye Hematopoetik Kök Hücre Tedavisi Gene-Modified Hematopoietic Stem Cell Therapy for Hemoglobinopathies

Atıl Bişgin¹, İbrahim Ethem Ay², Gülay Sezgin³

¹Çukurova Üniv. Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Adana, Turkey

²Akdeniz Üniv. Tıp Fakültesi, Antalya, Turkey

³Çukurova Üniv. Tıp Fakültesi, Hematoloji-Onkoloji Bilim Dalı, Adana, Turkey

ABSTRACT

Sickle cell disease and β -thalassemia represent the most common forms of hemoglobinopathies. Since the first successful bone marrow transplant in 1981, hematopoietic stem cell transplantation is the only treatment option for the patients. However, the current routine therapies for these conditions are limited by the availability of suitable donors and graft-vs-host disease. On the other hand, hemoglobinopathies were long considered amenable to the genetic correction by available gene transfer technologies. Therefore, gene therapy strategies aim at the globin gene transfer resulting hemoglobin function recovery. Here we review the studies and clinical applications of gene therapy for the hemoglobinopathies within the timeline of developed technologies, including the viral vectors, transposons, homolog recombination as a treatment modality together with generation of induced pluripotent stem cells and chimeraplasty. This brief review highlights the gene therapy strategies, current developments, challenges and future perspectives for hemoglobinopathies.

Key words: Hemoglobinopathy, gene therapy, stem cell therapy.

ÖZET

Orak hücreli anemi ve β -talasemi hemoglobinopatilerin en sık görülen formlarıdır. 1981'de başarıyla gerçekleştirilen kemik iliği naklinden bugüne kadar hastalar için halen tek tedavi yöntemi hematopoetik kök hücre naklidir. Ancak rutin uygulamadaki tedavi yöntemleri hem uygun donör bulmadaki zorluklar hem de graft-versus-host hastalığı sebebiyle yetersiz kalmaktadır. Öte yandan uzun süredir de hemoglobinopatiler, gen transfer teknolojilerinin kullanılması ile genetik olarak



düzeltililebilir hastalıklar arasında gösterilmektedir. Dolayısıyla, gen tedavi stratejileri ile globin gen transferi yapılarak hemoglobin fonksiyonunun düzeltilmesi hedeflenmektedir. Bu makalede de hemoglobinopatilere yönelik gen tedavileri için geliştirilen viral vektörleri, transpozonları, homolog rekombinasyon ile birlikte uyarılmış pluripotent kök hücre tedavilerini ve kimeroplastiyi de içeren teknolojiler üzerine yapılmış çalışmalar ve klinik uygulamalar derlenmiştir. Ana olarak hemoglobinopatiler için geliştirilen gen tedavi stratejileri, son gelişmeler, karşılaşılan sorunlar ve gelecekte olası uygulanabilecek yöntemler vurgulanmıştır.

Anahtar kelimeler: Hemoglobinopati, gen tedavisi, kök hücre tedavisi.

Giriş

Hemoglobinopatiler, hemoglobin protein ekspresyonunu kontrol eden genlerdeki bozukluklar sonucu ortaya çıkan hastalıklar grubudur. Orak hücreli anemi (SCA) ve talasemiler dünya genelinde en sık görülen hemoglobinopatiler olup özellikle Akdeniz havzasında olmak üzere Asya, Afrika ve Afro-Amerikan toplumlarında sıkça karşılaşırlar¹.

Globin gen ekspresyonundaki anormalliklerle sonuçlanan heterojen mutasyonlar sonucu oluşan talasemiler, mutasyonların α - veya β -globin geninde olmasına göre α - ve β -talasemi olarak sınıflandırılmaktadır²⁻⁴. α -talasemilerin büyük çoğunluğu α -globin gen ailesindeki delesyonlar sonucu oluşan fonksiyon kaybıyla ortaya çıkmakta, çok nadiren de delesyon dışı mutasyonlarla oluşmaktadır. β -talasemiler ise genellikle β -globin genindeki ya da hemen yakınındaki DNA dizisinde meydana gelen nokta mutasyonlar sonucu oluşur ve sınıflandırılmaları gen regülasyonunda etkiledikleri mekanizmaya göre yapılır (transkripsiyon, RNA işleme ve mRNA translasyonu). SCA ise hemoglobin molekülündeki yapısal defektlerle karakterize olup, tek nokta mutasyonları ile oluşur.

Günümüzde, hastaların beklenen yaşam sürelerindeki iyileşmelere rağmen hemoglobinopatilere bağlı mortalite ve morbidite oranları özellikle genç yaşlarda hala yüksek olarak seyretmektedir. Hemoglobinopatilerin sağaltımında da prenatal tanı, transfüzyon tedavisi ve hematopoetik kök hücre (HSC) nakli halen günümüzün en güncel yöntemleri olarak kabul görmektedirler.

HSC nakli ilk olarak 1981 yılında genç talasemik hastaların tedavisi için başlamış olup, geçen uzun yıllar süresince dünya genelinde kabul gören bir yöntem haline gelmiştir^{5, 6}. Türkiye'de kök hücre naklinin ilk uygulandığı hastanelerden biri olan Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi

Balcalı Hastanesi de dahil olmak üzere dünya genelinde bir çok nakil merkezi başarılı sonuçlarını bildirmeye devam etmektedir. Ancak geliştirilen tüm protokollere rağmen nakil ilişkili mortalite ve kronik graft-versus-host hastalığı, allojenik HSC nakli uygulamalarında karşılaşılabilen komplikasyonlar olarak önemli bir tehlike oluşturmaya devam etmektedirler⁷. Bu komplikasyonların da ötesinde allojenik kemik iliği transplantasyonundaki temel problemlerin başında ise uygun verici bulmadaki güçlük gelmektedir. Myeloablatif HSC nakli yapılan vakalarda da % 5-10 arasında mortalite görülmekte, erişkinlerde iyi tolere edilememesi ve graft-versus-host hastalığı gibi riskler taşımaktadır⁸⁻¹¹.

Kırk yıldan uzun süredir kullanılan mevcut tedavi yöntemlerindeki tüm bu sınırlamalar araştırmacıları gen tedavisi gibi yeni yöntemler geliştirmeye itmiştir. Bu noktada da HSC naklinin standart tedavi protokolü olarak uygulandığı ölümcül bir hastalık olan ağır kombine immün yetmezlik hastalığı çalışmalar için başlangıç noktası olmuş ve gen tedavisi klinik denemeleri ilk olarak bu hastalık grubunda yapılmıştır¹²⁻¹⁷.

Son 10 yıldaki çalışmalar ışığında gen tedavisi artık sadece laboratuvar tabanlı çalışmalar olmaktan çıkmış rutin klinik uygulamalara girmiştir. Özellikle genetik kan hastalıklarının gen tedavisiyle iyileştirilmesi düşüncesi, genetik olarak modifiye edilmiş otolog HSC'lerin tıpkı allojenik HSC naklindeki gibi ve daha da ötesinde immunolojik reaksiyonlara, komplikasyonlara yol açmaksızın hastalara nakledilebilmesi temel fikrinden doğmuştur. Özellikle ağır β -talasemi ve SCA olan hastalar bu yeni hücresel gen tedavi yöntemlerinden fayda görececek grubu oluşturmaktadır.

Hemoglobinopatilerde gen tedavisinin ana amacı, sağlıklı ve fonksiyonel hematopoetik kök hücrelerin sayılarını artırmaktır. Bu yöntemi myeloablatif seçenle beraber uygulamak mümkün olduğu gibi; hastalarda kimerik bir durum oluşturulması da mümkündür ve transgen ekspresyon düzeyi %25'in üstünde sağlanabildiği takdirde hastalarda klinik tablo düzelmektedir^{18,19}.

İşte bu bakış açısıyla ilerleyen bölümlerde gen ve hücre tedavilerinin nasıl bir bütün haline geldiği, zaman içerisindeki değişik uygulamaların ne şekilde sonuçlandığı ve özellikle hemoglobinopatiler için çalışmaların hangi noktalara geldiği özetlenmiştir.

Genetik Olarak Modifiye Hematopoetik Kök Hücre Nakli

Gen tedavisi son 10-15 yıldır bir çok araştırmacının ana çalışma alanı olmuş ve özellikle de β -talasemi ve SCA ile ilgili sayısız çalışma yapılmıştır. Ancak yine de gen tedavisinin önünde bazı temel sorunlar mevcut olup, güvenli ve etkin bir gen transferi için oluşturulması gereken temel koşullar;

1. HSC'lerin efektif bir şekilde hedeflenebilmesi,
2. Yüksek verimlilikte ve stabil bir transdüksiyonun sağlanması,
3. Kontrollü bir transgen ekspresyonunun sürekliliği,
4. Genomik toksisitenin engellenmesi ve
5. Hastalığın klinik iyileşmeyi sağlayacak kadar tedavi edilmesi ve hastalık fenotipinin düzeltilmesidir²⁰⁻²².

Tüm bu hedefler doğrultusunda hemoglobinopatiler üzerine yapılan çalışmalar günümüzde artık klinik uygulamalar aşamasındadır. Özellikle β -talasemide tespit edilmiş 300 civarında farklı mutasyonun varlığı, β -talasemi grubunu genetik olarak heterojen bir grup yapmakta ve gen tedavisi uygulamasındaki zorlukları da beraberinde getirmektedir. Günümüze kadar hemoglobinopatilere yönelik araştırmaların ve uygulamaların yapıldığı farklı gen tedavi yöntemleri şöyledir:

Onkoretroviral Vektörler ile Gen Tedavisi

Retroviral vektörlerin gen tedavisinde kullanımı ilk etapta özellikle monogenik hastalıklar için ön plana çıkmış ve birçok hastalık modelinde başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Hemoglobinopatiler için yapılan ilk çalışmalarda da Retroviridae familyasından onkovirüsler seçilmiştir. Rekombinant onkoretrovirüsler, HSC'lere herhangi bir viral geni (gag-pol ve env genleri) transfer etmeksizin sadece β -globin genini aktarmada başarılı olmuş ancak yüksek miktarda ve stabil bir ekspresyonu sağlayamamışlardır. Bu çalışmalarda doku-spesifitesi sağlanmış ancak %2 gibi düşük bir normal β -globin kimerizmi elde edilmiştir²³⁻²⁷. Zamanla β -globin ekspresyonunu artırmak için kilit rol alan β -globin lokus kontrol bölgeleri (LCR) onkoretroviral vektörlerin dizaynına eklenmiş, ancak yine de terapötik β -globin düzeyleri elde edilememiştir²⁸⁻³¹. Son olarak yeniden düzenlenmelere yol açarak ekspresyon miktarının azalmasına yol açan LCR gen dizilerindeki kesim bölgelerinin aktivasyonunu bloklayan denemeler ve LCR'ler yerine α lokusu HS40 regülatör bölgesinin, ankyrin gibi eritroid-spesifik

transkripsiyonel promotör bölgesinin ya da fetal hemoglobin promotörlerinin kullanımı gündeme gelmiştir. Ancak bu yaklaşımlarla bile kimerizm oranı en fazla %8' e kadar artırılabilmiştir³²⁻³⁶.

Lentiviral Vektörler ile Gen Tedavisi

HIV virusunun patojenik elemanlarından ayıklanıp vektör olarak kullanılabilirliğinin gösterilmesi ile lentiviral vektörler gen tedavisi çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır. Globin geninin transferi için onkoviral vektörlere alternatif olarak ilk olarak kullanılmaya başlanan HIV-1 virus olup, onkoviral vektörlerin aksine sadece bölünebilen hücreleri değil replike olmayan hücreleri de transfekte etme kabiliyetine sahip olmaları, bu vektörlere büyük bir avantaj sağlar^{37,38}.

Lentiviral vektörlerin bir diğer üstünlüğü de, vektör genomundaki aksesuar Rev proteinin Rev-response element (RRE) ile interaksyonu proviral mRNA genom stabilizasyonunu sağlamakta, böylece herhangi bir yeniden düzenlenme olmaksızın onkoviral vektörlere kıyasla çok daha büyük transgen taşıma kapasitesine ulaşabilmeleridir. Bütün bu üstünlükleri sebebiyle de lentiviral vektörler, özellikle kök hücre gen tedavisinde stabil bir vektör olarak önemli yer edinmiştir.

α -talasemide lentiviral vektör aracılı in-utero gen tedavisi denemeleri yapılmış, doğum sonrası 7. aya kadar % 20 civarlarında seyreden α -globin transgen ekspresyonu gözlenmiş ancak 7. aydan sonra bu kimerizm oranı düşmeye başlamıştır³⁹. Bunun sebebi olarak da in-utero olarak eritroid hücrelere gen aktarımı sağlanabildiği ancak sürekli gen ekspresyonunu korumak için hematopoetik kök hücrelerin dönüştürülemediği gösterilmiştir. Benzer sonuçlar β -talasemi intermedia/major ve SCA ile yapılan mürin ve primat çalışmalarında da elde edilmiştir⁴⁰⁻⁴².

Son yıllarda özellikle lentiviral vektörlerle yapılan çalışmalar hız kazanmış olsa da lentiviral vektör aracılı gen tedavisinin hastalara rutin uygulamaya girebilmesi için farklı genotiplerde, klinik fenotipte düzelmeyi sağlamak için farklı yaklaşımların uygulanması, lentiviral aracılı transgen aktarımında non-onkojenik bölgelerin hedeflenmesi ve aktarımın daha etkili olması için çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Transpozonlar

Viral vektör aracılı gen tedavisinin yanı sıra, daha güvenilir olan non-viral vektörler aracılığıyla hücrelerin modifikasyonuna yönelik hem daha stabil genomik entegrasyonu hem de uzun süreli transgen ekspresyonunu sağlayan transpozonlar geliştirilmiştir^{43,44}. Uyuyan güzel transpozon sistemi özellikle son 10 yıldaki gen tedavisi alanında önemli bir buluş olup her geçen gün daha fazla çalışmada kullanılmaktadır. Primer CD34+ hücreleri modifiye etmede kullanılan SB100X transpozonunun da geliştirilmesiyle, transpozonlar aracılı genetik modifikasyon yapılabilecek klinik uygulama alanları artmıştır^{45,46}. Son gelinen noktada, SCA hastalarında β -globin geni ve SB100X transpozon sistemi kombinasyonu başarıyla kullanılmaya başlanmış, klinik denemeleri devam etmektedir⁴⁷.

Uyarılmış Pluripotent Hücreler Aracılı Genetik Modifikasyon

Son yapılan çalışmalar β -talasemili hastalara ait cilt fibroblast hücrelerinden, amniyotik sıvıdaki hücrelerden ya da koryonik villus hücrelerinden uyarılmış pluripotent hücreler (iPS) elde edildiğini göstermiştir⁴⁸⁻⁵¹. İzole edilen bu iPS'ler, daha sonra hemogloblin sentezleyebilecek hematopoetik hücrelere diferansiye edilebilmektedirler. Yapılan fare deneylerinde de SCA modelinde bu strateji ile başarıyla tedavi sağlanmıştır. Ancak iPS hücrelerinin tümöre dönüşme potansiyellerinin olması ve mevcut transkripsiyon faktörlerine ihtiyaç kalmadıktan sonra sistemden eliminasyonunun henüz sağlanamıyor olması, hemogloblinopatilere yönelik rutin klinik uygulamada kullanımı için engel teşkil eder.

Homolog Rekombinasyon

Homolog rekombinasyon (HR), çift zincirli DNA'da kendiliğinden görülen ya da çeşitli klastojenik ajanlarla meydana gelen kırıkların, DNA'nın homoloji gösteren bölgeleri arasında oluşan parça hareketleri ile düzeltilmesi işlemidir. HR aracılı gen modifikasyonu da hücrelere hedef gen bölgelerine komplementer DNA ya da RNA segmentlerinin sunumu ile HR'a benzer şekilde mutasyonun düzeltilmesi işlemidir. Ancak, bu şekilde bir olayın kendiliğinden gerçekleşmesi çok nadir olabilecek bir olay olduğundan hemogloblinopatilerin HSC aracılı tedavilerinde terapötik amaçlı kullanımı henüz mümkün gözükmemektedir⁵⁰.

Homolog Rekombinasyon İle Düzeltilmiş Otolog iPS Nakli

Tek başlarına uygulandıklarında yetersiz olan iPS'lerin HR ile genetik modifikasyonunun konvansiyonel gen tedavisi uygulamalarına karşı bazı üstünlükler taşıdığı görülmüş; hem insersiyonel mutagenез riskini taşımamaları hem de β -globin ekspresyonunu sürekli olarak koruyabilmeleri sebebiyle çalışmalar bu yönde hızlandırılmıştır. Henüz sadece in vitro olsa da yapılan son çalışmalarda da hem SCA hem de β -talasemi'de ortama otolog iPS'den elde edilen hematopoetik hücrelerin nakli ile mutasyonların düzeltilebildiği gösterilmiştir⁵²⁻⁵⁴.

Kimeroplasti

Yeni tedavi seçenekleri arasında yer alan kimeroplasti, RNA ve DNA'dan oluşmuş kimerik bir molekül aracılı, nokta mutasyonların hücrenin doğal tamir mekanizması aracılığıyla düzeltilmesi üzerine dayalı bir yöntemdir. Non-viral, immün yanıt oluşturmeyen diğer viral olmayan gen tedavisi yöntemlerine göre taşınması ve nükleer lokalizasyonu daha kolay olan ve tekrarlayan uygulamalar gerektiren diğer gen tedavi prosedürlerinin aksine yalnızca tek bir seferlik aktarımla başarı sağlanabilecek bir yöntem olması nedeniyle de, diğer yöntemlere karşı bir üstünlüğe sahiptir. Kimeroplastinin yalnızca tek gen hastalıklarına sebep olan nokta mutasyonlarında kullanılabilir olması hemoglobinopatiler de uygulama açısından bir dezavantaj teşkil etmemektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar Von Villebrand ve SCA üzerine olup yapılan denemelerde, ilgili genin aktarıldığı hücrede %40'a yakın bir kimerizm oranı gözlenmiştir^{55,56}. İşte bu sebeple de bugün için hemoglobinopatilere yönelik uygulanabilir gen tedavi yöntemlerinden en etkini olarak karşımıza kimeroplasti çıkmaktadır.

Sonuç

Günümüzde hemoglobinopatiler için allojenik HSC nakli halen tek küratif tedavi yöntemidir. Fakat uygun donör bulmanın zor olması, nakil sonrası hastada immün yanıt oluşması ve graft versus host hastalığı gibi komplikasyonların görülmesi ve hastaların nakil sonrası ağır bir immünsüpresyon tedavisine alınması nedeniyle, HSC naklinden istenilen başarı elde edilememektedir. Tekrarlayan kan transfüzyonları gibi palyatif seçenekler ise; 20'li yaşlarda ağır kalp yetmezliği, splenomegali, karaciğer kistleri, hepatosellüler karsinoma, hemakromatozis ve benzeri ağır sonuçlar doğurmakla birlikte, hastalığın çözümüne yönelik bir katkı sağlamayan, sadece hastanın yaşam kalitesini düşürmeyi göze alarak zaman kazanmayı hedefleyen yöntemlerdir. Bu yüzden günümüzde alternatif tedavi seçenekleri

önem kazanmakta, özellikle de gen tedavisi uygulamaları pek çok ülkede hız kazanarak artmakta ve gelecek için önemli bir tedavi seçeneği olarak ümit vermektedir.

Gen tedavisi alanındaki çalışmalar hızlı bir gelişme göstermekte, teknolojinin ilerlemesi, yeni jenerasyon vektörlerin geliştirilmesi ile her geçen gün yeni bir hastalıkta klinik denemeler başlamaktadır. Dolayısıyla, hemoglobinopatiler açısından da etkinliği ve güvenilirliği yüksek bir gen tedavi yönteminin uygulamaya girmesi ile hem otolog hem de allojenik HSC nakilleri büyük başarı ile komplikasyon riski olmaksızın uygulanabilir hale gelecektir.

Kaynaklar

1. Modell B, Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bull World Health Organ.* 2008; 86:480-7.
2. Cappellini MD. The Thalassemias. In *Goldman's Cecil Medicine, 24th ed.* (Eds. L Goldman, El Schafer):1060-6. Philadelphia, Elsevier, 2011.
3. Steinberg MH. Sickle cell disease and other hemoglobinopathies. *Goldman's Cecil medicine, 24th ed.* (Eds. L Goldman, El Schafer):1966-75. Philadelphia, Elsevier, 2011.
4. Ginzburg Y, Rivella S. Beta-thalassemia: a model for elucidating the dynamic regulation of ineffective erythropoiesis and iron metabolism. *Blood.* 2011; 118:4321-30.
5. Thomas ED, Buckner CD, Sanders JE, Papayannopoulou T, Borgna-Pignatti C, Di Stefano P et al. Marrow transplantation for thalassemia. *Lancet.* 1982; 320:227-9.
6. Lucarelli G, Izzi T, Polchi P, Manna A, Agostinelli F, Delfini C et al. Bone marrow transplantation in thalassemia. *J Exp Clin Cancer Res.* 1983; 3:313-5.
7. Lucarelli G, Gaziev J. Advances in the allogeneic transplantation for thalassemia. *Blood Rev.* 2008; 22:53-63.
8. La Nasa G, Giardini C, Argioli F, Locatelli F, Arras M, De Stefano P et al. Unrelated donor bone marrow transplantation for thalassemia: the effect of extended haplotypes. *Blood.* 2002; 99:4350-6.
9. Sodani P, Isgro A, Gaziev J, Polchi P, Paciaroni K, Marziali M et al. Purified T-depleted, CD34+peripheral blood and bone marrow cell transplantation from haploidentical mother to child with thalassemia. *Blood.* 2010; 115:1296-302.
10. Walters MC, Sullivan KM. Stem-cell transplantation for sickle cell disease. *N Engl J Med.* 2010; 362: 955-6.
11. Hsieh MM, Kang EM, Fitzhugh CD, Link MB, Bolan CD, Kurlander R et al. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for sickle cell disease. *N Engl J Med.* 2009; 361:2309-17.

12. Buckley RH. Transplantation of hematopoietic stem cells in human severe combined immunodeficiency: long-term outcomes. *Immunol Res.* 2011; 49:25-43.
13. Hassan A, Booth C, Brightwell A, Allwood Z, Veys P, Rao K et al. Outcome of hematopoietic stem cell transplantation for adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency. *Blood.* 2012; 120:3615-24.
14. Fernandes JF, Rocha V, Labopin M, Neven B, Moshous D, Gennery AR et al. Eurocord and Inborn Errors Working Party of European Group for Blood and Marrow Transplantation. Transplantation in patients with SCID: mismatched related stem cells or unrelated cord blood? *Blood.* 2012; 119:2949-55.
15. Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, Ferrari G, Casorati G, Panina P et al. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-immunodeficient patients. *Science.* 1995; 270:470-5.
16. Hoogerbrugge PM, van Beusechem VW, Fischer A, Debree M, le Deist F, Perignon JL et al. Bone marrow gene transfer in three patients with adenosine deaminase deficiency. *Gene Ther.* 1996; 3:179-83.
17. Bisgin A, Sanlioglu S. Efficacy of clinical gene and cell therapy in ADA SCID patients. *Clin Genet.* 2010; 78(Suppl 1):128.
18. Andreani M, Nesci S, Lucarelli G, Tonucci P, Rapa S, Angelucci E et al. Long-term survival of ex-thalassemic patients with persistent mixed chimerism after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 25:401-4.
19. Sadelain M, Riviere I, Wang X, Boulad F, Prockop S, Giardina P et al. Strategy for a multicenter phase I clinical trial to evaluate globin gene transfer in β -thalassemia. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1202:52-8.
20. Case SS, Price MA, Jordan CT, Yu XJ, Wang L, Bauer G et al. Stable transduction of quiescent CD34(+) CD38(-) human hematopoietic cells by HIV-1-based lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96:2988-93.
21. Lisowski L, Sadelain M. Locus control region elements HS1 and HS4 enhance the therapeutic efficacy of globin gene transfer in β -thalassemic mice. *Blood.* 2007; 110:4175-8.
22. Hargrove PW, Kepes S, Hanawa H, Obenauer JC, Pei D, Cheng C et al. Globin lentiviral vector insertions can perturb the expression of endogenous genes in β -thalassemic hematopoietic cells. *Mol Ther.* 2008; 16:525-33.
23. Bender MA, Gelinis RE, Miller AD. A majority of mice show long-term expression of a human β -globin gene after retrovirus transfer into hematopoietic stem cells. *Mol Cell Biol.* 1989; 9:1426-34.

24. Dzierzak EA, Papayannopoulou T, Mulligan RC. Lineage-specific expression of a human β -globin gene in murine bone marrow transplant recipients reconstituted with retrovirus-transduced stem cells. *Nature*. 1988; 331:35-41.
25. Karlsson S, Bodine DM, Perry L, Papayannopoulou T, Nienhuis AW. Expression of the human β -globin gene following retroviral-mediated transfer into multipotential hematopoietic progenitors of mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85: 6062-6.
26. Lung HY, Meeus IS, Weinberg RS, Atweh GF. In vivo silencing of the human gamma-globin gene in murine erythroid cells following retroviral transduction. *Blood Cells Mol Dis*. 2000; 26:613-9.
27. Fragkos M, Anagnou NP, Tubb J, Emery DW. Use of the hereditary persistence of fetal hemoglobin 2 enhancer to increase the expression of oncoretrovirus vectors for human gamma-globin. *Gene Ther*. 2005; 12:1591-600.
28. Nishino T, Tubb J, Emery DW. Partial correction of murine β -thalassemia with a gammaretrovirus vector for human gamma-globin. *Blood Cells Mol Dis*. 2006; 37:1-7.
29. Ren S, Wong BY, Li J, Luo XN, Wong PM, Atweh GF. Production of genetically stable high-titer retroviral vectors that carry a human gamma-globin gene under the control of the alpha-globin locus control region. *Blood*. 1996; 87:2518-24.
30. Gardenghi S, Marongiu MF, Ramos P, Guy E, Breda L, Chadburn A et al. Ineffective erythropoiesis in β -thalassemia is characterized by increased iron absorption mediated by down-regulation of hepcidin and up-regulation of ferroportin. *Blood*. 2007; 109:5027-35.
31. Gerson SL. Drug resistance gene transfer: stem cell protection and therapeutic efficacy. *Exp Hematol*. 2000; 28:1315-24.
32. Sabatino DE, Wong C, Cline AP, Pyle L, Garrett LJ, Gallagher PG et al. A minimal ankyrin promoter linked to a human gamma-globin gene demonstrates erythroid specific copy number dependent expression with minimal position or enhancer dependence in transgenic mice. *J Biol Chem*. 2000; 275:28549-554.
33. Sabatino DE, Seidel NE, Aviles-Mendoza GJ, Cline AP, Anderson SM, Gallagher PG et al. Long-term expression of gamma-globin mRNA in mouse erythrocytes from retrovirus vectors containing the human gamma-globin gene fused to the ankyrin-1 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97:13294-99.
34. Raja JV, Rachchh MA, Gokani RH. Recent advances in gene therapy for thalassemia *J Pharm Bioallied Sci*. 2012; 4:194-201.
35. Katsantoni EZ, Langeveld A, Wai AW, Drabek D, Grosveld F, Anagnou NP et al. Persistent gamma-globin expression in adult transgenic mice is mediated by HPFH-2, HPFH-3, and HPFH-6 breakpoint sequences. *Blood*. 2003; 102:3412-19.

36. Hargrove PW, Kepes S, Hanawa H, Obenauer JC, Pei D, Cheng C et al. Globin lentiviral vector insertions can perturb the expression of endogenous genes in beta-thalassemic hematopoietic cells. *Mol Ther*. 2008; 16:525-33.
37. Naldini L, Blomer U, Galloway P, Ory D, Mulligan R, Gage FH et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*. 1996; 272:263-7.
38. Lewis P, Hensel M, Emerman M. Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *Embo J*. 1992; 11:3053-8.
39. Han XD, Lin C, Chang J, Sadelain M, Kan YW. Fetal gene therapy of alpha-thalassemia in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:9007-11.
40. Rivella S, May C, Chadburn A, Riviere I, Sadelain M. A novel murine model of Cooley anemia and its rescue by lentiviral-mediated human β -globin gene transfer. *Blood*. 2003; 101:2932-9.
41. Persons DA, Hargrove PW, Allay ER, Hanawa H, Nienhuis AW. The degree of phenotypic correction of murine β -thalassemia intermedia following lentiviral-mediated transfer of a human gamma-globin gene is influenced by chromosomal position effects and vector copy number. *Blood*. 2003; 101:2175-83.
42. Hanawa H, Hargrove PW, Kepes S, Srivastava DK, Nienhuis AW, Persons DA. Extended β -globin locus control region elements promote consistent therapeutic expression of a gamma-globin lentiviral vector in murine β -thalassemia. *Blood*. 2004; 104:2281-90.
43. Hackett PB, Largaespada DA, Cooper LJ. A transposon and transposase system for human application. *Mol Ther*. 2010; 18:674-83.
44. Dalsgaard T, Moldt B, Sharma N, Wolf G, Schmitz A, Pedersen FS et al. Shielding of sleeping beauty DNA transposon-delivered transgene cassettes by heterologous insulators in early embryonal cells. *Mol Ther*. 2009; 17:121-30.
45. Mates L, Chuah MK, Belay E, Jerchow B, Manoj N, Acosta-Sanchez A et al. Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat Genet*. 2009; 41:753-61.
46. Xue X, Huang X, Nodland SE, Mátés L, Ma L, Izsvák Z et al. Stable gene transfer and expression in cord blood-derived CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells by a hyperactive Sleeping Beauty transposon system. *Blood*. 2009; 114:1319-30.
47. Sjeklocha LM, Park CW, Wong PY, Roney MJ, Belcher JD, Kaufman DS et al. Erythroid-specific expression of β -globin from Sleeping Beauty-transduced human hematopoietic progenitor cells. *PLoS One*. 2011; 6: e29110.
48. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; 131: 861-72.
49. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126:663-76.

50. Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*. 2007; 448:318-24.
51. Ye L, Chang JC, Lin C, Sun X, Yu J, Kan YW. Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in prenatal diagnosis in genetic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106:9826-30.
52. Wu LC, Sun CW, Ryan TM, Pawlik KM, Ren J, Townes TM. Correction of sickle cell disease by homologous recombination in embryonic stem cells. *Blood*. 2006; 108:1183-8.
53. Chang JC, Ye L, Kan YW. Correction of the sickle cell mutation in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103:1036-40.
54. Zou J, Mali P, Huang X, Doney SN, Cheng L. Site-specific gene correction of a point mutation in human iPS cells derived from an adult patient with sickle cell disease. *Blood*. 2011; 118:4599-608.
55. Li ZH, Liu DP, Yin WX, Guo ZC, Liang CC. Targeted correction of the point mutations of beta-thalassemia and targeted mutagenesis of the nucleotide associated with HPFH by RNA/DNA oligonucleotides: Potential for beta-thalassemia gene therapy. *Blood Cells Mol Dis*. 2001; 27:530-8.
56. Graham IR, Dickson G. Gene repair and mutagenesis mediated by chimeric RNA-DNA oligonucleotides: chimeraplasty for gene therapy and conversion of single nucleotide polymorphisms (SNPs). *Biochimica et Biophysica Acta*. 2002; 1587:1- 6.

Correspondence Address / Yazışma Adresi

Atıl Bişgin
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Adana, Turkey
e-mail: atilbisgin@yahoo.co.uk