

Βασικές αρχές των ιικών φορέων της γονιδιακής θεραπείας

Γιώργος Βασιλόπουλος^{1,2}, Εμμανουήλ Σημαντηράκης¹

ΠΕΡΙΛΗΨΗ Η τεχνολογία της γονιδιακής μεταφοράς στηρίχτηκε κυρίως στους ρετροϊούς, στους αδενο-εξαρτώμενους ιούς (AAV) και στους αδενοϊούς. Οι βασικές αρχές της ανάπτυξης ενός φορέα είναι η αναγνώριση των λειτουργιών που μπορούν να υποκατασταθούν *in trans* και των αλληλουχιών που χρειάζονται *in cis* για την παραγωγή των ιικών σωματιδίων (φορέων). Στα επόμενα τεχνολογικά βήματα δόθηκε βάρος στην επιλογή των υποκινητών για βέλτιστη έκφραση του διαγονιδίου και στην εφαρμογή μονωτών χρωματίνης για απομόνωση του φορέα από την περιρρέουσα χρωματίνη στη θέση ενσωμάτωσης. Αν και έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στα 30 χρόνια της ανάπτυξης του πεδίου εν τούτοις, η κλινική εφαρμογή παραμένει προβληματική λόγω κόστους και παρενεργειών από την ένθεση στο γονιδίωμα, γεγονός που έχει στρέψει την τεχνολογική δραστηριότητα στην ανάπτυξη φορέων με ικανότητα γενετικής επιδιόρθωσης (όπως οι AAV).

Haema 2016; 7(1): 57-71 Copyright EAE

Εισαγωγή

Η ιδέα της επιδιόρθωσης μιας γενετικής διαταραχής με την εισαγωγή του φυσιολογικού γονιδίου στο γονιδίωμα του ασθενούς συνελήφθη, όταν κατέστη αντιληπτό ότι πολλές γενετικές νόσοι προκαλούνται από μεταλλάξεις στη δομή των γονιδίων. Αρχικά, οι μονογονιδιακές διαταραχές ήταν οι πρώτοι στόχοι για εφαρμογή γονιδιακής θεραπείας, αλλά πλέον το φάσμα των διαταραχών που αποτελούν τους στόχους της γενετικής παρέμβασης έχει διευρυνθεί σημαντικά, διότι ένας μεγάλος αριθμός ασθενειών έχει αποδειχθεί ότι διαθέτουν γενετικό υπόβαθρο. Μία σημαντική πρόσφατη πρόοδος στο πεδίο είναι η ταυτοποίηση πολλών κληρονομικών ή σωματικών μεταλλαγών που προδιαθέτουν ή προκαλούν καρκίνο. Για το λόγο αυτό, ο καρκίνος έγινε ένας προφανής στόχος στο ερευνητικό πεδίο της γονιδιακής θεραπείας. Τέλος, λοιμώδεις νόσοι, όπως το AIDS και η ηπατίτιδα C που έχουν προσβάλλει εκατομμύρια ανθρώπους, έχουν γίνει στόχοι εντατικής έρευνας της γονιδιακής θεραπείας.

Υπάρχουν δύο κύριες προσεγγίσεις για τη μεταφορά θεραπευτικών γονιδίων στα κύτταρα στόχους και η επιλογή της εκάστοτε μεθόδου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την προσβασιμότητα του ιστού και τη φύση του ορ-

γάνου στόχου¹. Στην *ex vivo* προσέγγιση, κύτταρα από ένα συγκεκριμένο ιστό συλλέγονται, επιμολύνονται με τον ικό φορέα και στη συνέχεια επιστρέφονται στον οργανισμό. Η προσέγγιση αυτή χρησιμοποιείται συνήθως για τη γενετική τροποποίηση αιμοποιητικών κυττάρων. Οι δυσκολίες και οι κίνδυνοι που σχετίζονται με τον *ex vivo* χειρισμό και τη μεταμόσχευση αυτόλογων κυττάρων οδήγησε πολλούς ερευνητές στη διερεύνηση της *in vivo* προσέγγισης για τη μεταφορά ιικών φορέων. Σε αυτήν την προσέγγιση, ο θεραπευτικός φορέας μπορεί να μεταφερθεί είτε τοπικά σε ένα συγκεκριμένο ιστό είτε μέσω του κυκλοφορικού συστήματος. Κλασικά παραδείγματα συμπεριλαμβάνουν την *in situ* χορήγηση του θεραπευτικού φορέα εντός της μάζας του όγκου και τη χορήγηση μέσω της πυλαίας φλέβας, όταν το ήπαρ αποτελεί το όργανο στόχο. Παρόλο που οι *in vivo* οδοί χορήγησης είναι σε μεγάλο βαθμό επιθυμητές, αφού ελαχιστοποιούν τον *ex vivo* χειρισμό των κυττάρων και τους κινδύνους που σχετίζονται με αυτόν, υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί στη σύγχρονη τεχνολογία των ιικών φορέων, οι οποίοι παρεμποδίζουν την ευρεία εφαρμογή της *in vivo* μεταφοράς. Παραδείγματος χάριν, ένας από τους πιο ευρέως χρησιμοποιούμενους φορείς, ο ρετροϊός MLV, υδρολύεται από τον ανθρώπινο ορό· ενώ οι ίδιοι φορείς μπορούν να επιβιώσουν παρουσία εγκεφαλονωτιαίου υγρού (το οποίο περιέχει ένα κλάσμα του συμπληρώματος του ανθρώπινου ορού) καθιστώντας τους κατάλληλους για γονιδιακή μεταφορά στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Σκοπός

¹Εργαστήριο Γενετικής και Γονιδιακής Θεραπείας, ΠΒΕΑΑ, Αθήνα

²Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Ιατρική Σχολή

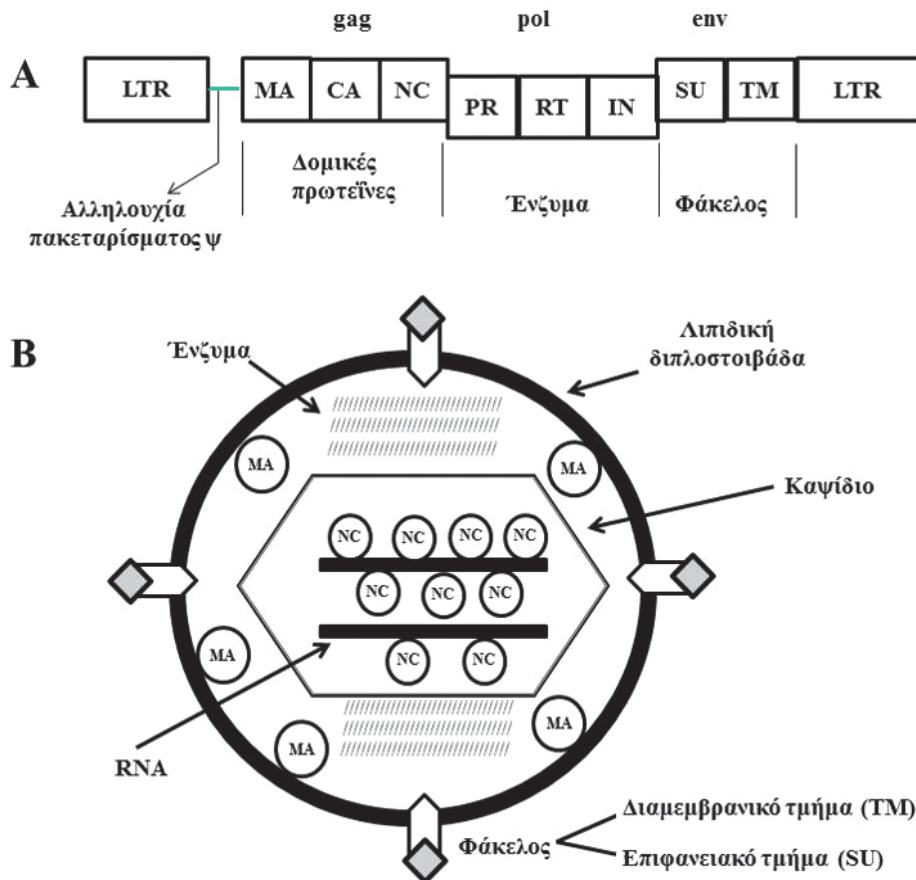
Συγγραφέας υπεύθυνος για επικοινωνία: Γιώργος Βασιλόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Εργαστήριο Γενετικής και Γονιδιακής Θεραπείας, ΠΒΕΑΑ, 11527 Αθήνα, e-mail: gvasilop@bioacademy.gr

της παρούσας ανασκόπησης είναι να παρέχει μια επισκόπηση των βασικών αρχών που διέπουν τη γονιδιακή θεραπεία μέσω ικών φορέων: την τύχη των φορέων αυτών στα κύτταρα στόχους και τις αρχές που διέπουν την έκφραση των ικών και των θεραπευτικών γονιδίων.

Ρετροϊκοί φορείς

Οι πρώτοι ιικοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στη γονιδιακή θεραπεία ήταν ογκο-ρετροϊκοί φορείς και συγκεκριμένα φορείς που προήλθαν από τον ιό της λευχαιμίας επίμυος (MLV)^{2,3}. Ο λόγος της άμεσης χρήσης, ήταν ότι υπήρχε διαθέσιμος ένας μεγάλος όγκος πληροφοριών για το κύκλο ζωής των ρετροϊών και ότι οι γενετικές διατα-

ραχές αποτελούσαν τους πρώτους στόχους της γονιδιακής θεραπείας. Εφόσον η διόρθωση της γενετικής βλάβης απαιτεί τη μόνιμη εισαγωγή του θεραπευτικού μορίου DNA, οι ρετροϊοί χρησιμοποιήθηκαν σαν φορείς, εφόσον διαθέτουν την ιδιότητα μόνιμης ενσωμάτωσης στο γονιδίωμα του ξενιστή. Υπάρχουν τρεις κατηγορίες ρετροϊών: οι ογκοϊοί όπως ο ιός της λευχαιμίας του επίμυος (MLV), οι λεντιοί όπως ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) και οι αφροϊοί (HFV)⁴. Η οργάνωση του γονιδιώματος και η δομή ενός απλού ρετροϊού απεικονίζονται στην Εικόνα 1. Δύο αλυσίδες RNA πακετάρονται μαζί με: 1) το ικρίωμα δομικών πρωτεϊνών (MA, CA, NC), προϊόντα του *gag*, 2) τα ένζυμα ιντεγκράση (IN) και αντίστροφη μεταγραφάση (RT), προϊόντα του



Εικόνα 1. Α) Η οργάνωση του γονιδιώματος ενός απλού ρετροϊού. Το ικό γονιδίωμα αποτελείται ένα μονόκλωνο μόριο RNA που εκατέρωθεν φέρει δύο επιμήκεις ακραίες επαναλήψεις (LTR) και οργανώνεται σε τρεις γονιδιακούς τύπους. Ο τύπος *gag* κωδικοποιεί τις κύριες δομικές πρωτεΐνες του ικρίωματος (MA), του καψιδίου (CA), του νουκλεοκαψιδίου (NC) και της ικκής πρωτεάσης (PR). Ο τύπος *pol* κωδικοποιεί τα ένζυμα αντίστροφη μεταγραφάση (RT) και ιντεγκράση (IN). Τέλος, ο τύπος *env* κωδικοποιεί τις επιφανειακές (SU) και διαμεμβρανικές (TM) πρωτεΐνες συστατικά του ικού φακέλου. Το μη μεταφραζόμενο σήμα πακεταρίσματος ψ απαιτείται για την οργάνωση/συναρμολόγηση του ικού RNA στο ιοσωμάτιο. **Β)** Σχηματική επιμήκης τομή ενός ρετροϊού. Η εξωτερική επιφάνεια φέρει μία λιπιδική διπλοστοιβάδα που αποκτάται κατά την εκβλάση του ιού από το κύτταρο ξενιστή. Τα συστατικά SU και TM του φακέλου εντίθενται μεταξύ της διπλοστοιβάδας. Στο πυρήνα του ιοσωματίου βρίσκονται οι δύο αλυσίδες RNA που καλύπτονται από τις πρωτεΐνες του νουκλεοκαψιδίου. Οι δομικές πρωτεΐνες του ικρίωματος και του καψιδίου σταθεροποιούν περαιτέρω το ικό σωματίο.

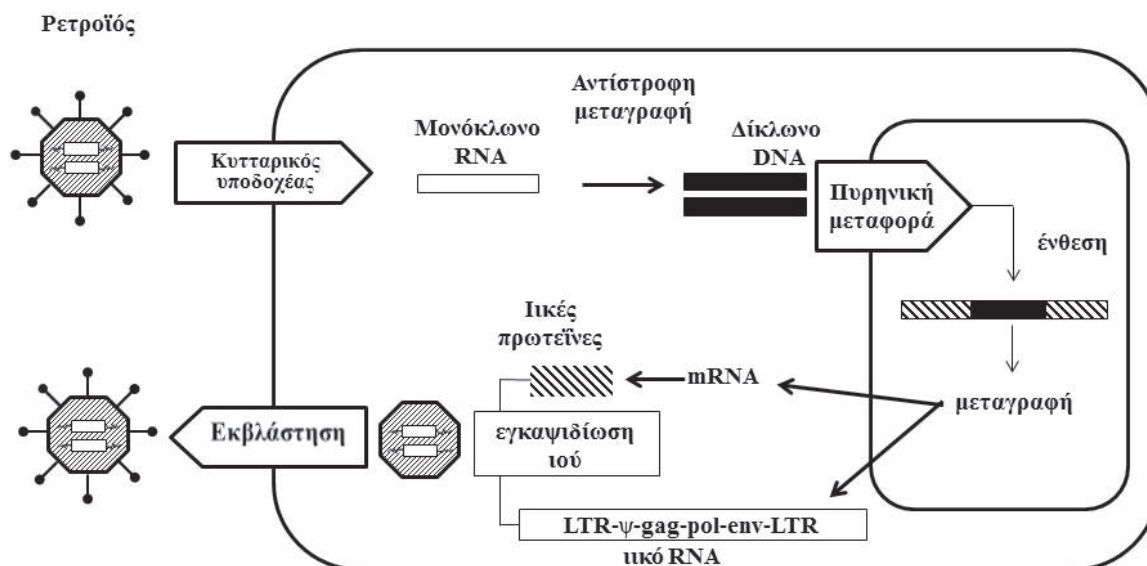
ροί και 3) μιας εξωτερικής επιφάνειας που αποτελείται από μια λιπιδική διπλοστοιβάδα (προερχόμενη από τη μεμβράνη του κυττάρου-ξενιστή) με εντοιχισμένη την πρωτεΐνη του φακέλου, παράγωγο του *env*. Ο φάκελος διαθέτει ένα διαμεμβρανικό και ένα επιφανειακό κομμάτι που λειτουργεί για την πρόσδεση του ιοσωματίου σε συγκεκριμένους υποδοχείς του κυττάρου ξενιστή, καθιστώντας το υπεύθυνο για τον τροπισμό του ιού. Τα ιικά γονίδια περιβάλλονται από 2 ακραίες επιμήκεις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (LTR) που εξυπηρετούν την ενσωμάτωση στο γονιδίωμα του ξενιστή ενώ λειτουργούν και σαν υποκινητές. Η 5' LTR ακολουθείται από ένα μη μεταφραζόμενο σήμα πακεταρίσματος το ψ , που είναι απαραίτητο για τη συναρμολόγηση του ιοσωματίου.

Όλοι οι ρετροϊοί ακολουθούν μια κοινή στρατηγική πολλαπλασιασμού όπως φαίνεται στην Εικόνα 2. Πρόκειται για RNA ιούς, που διαθέτουν μια DNA πολυμεράση, την αντίστροφη μεταγραφάση, η οποία χρησιμοποιεί το ιικό RNA ως εκμαγείο για να παράγει ένα αντίγραφο DNA που θα ενθεθεί στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή⁵. Η ένθεση αποτελεί εκ των ων ουκ άνευ του κύκλου της ζωής του ρετροϊού και αδυναμία πραγματοποίησής της εντός λίγων ωρών μετά τη μόλυνση, έχει σαν αποτέλεσμα την αποδόμηση του ιικού DNA και έναν άκαρπο

κύκλο μόλυνσης. Μόλις ενθεθεί στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή, ο ιός χρησιμοποιεί τον υποκινητή του, το στοιχείο LTR, για να παράγει ένα μόριο RNA που εξυπηρετεί δύο λειτουργίες α) στη ματισμένη του μορφή κατευθύνει την παραγωγή των ιικών πρωτεϊνών (ή πρωτεϊνών βοηθών) και β) στη μη ματισμένη μορφή του λειτουργεί ως το γενωμικό RNA του ιού με την αλληλουχία πακεταρίσματος ψ . Η σημασία αυτού του σήματος πακεταρίσματος έγκειται στην ικανότητά του να προσελκύει τις ιικές πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή να πακεταριστούν μόνο με το ιικό ψ μόριο RNA υπό τη μορφή ιικού σωματίου, το οποίο στη συνέχεια θα εκβλαστήσει από την κυτταρική μεμβράνη. Το « ψ », αναφέρεται σε παραφθορά των αρχικών γραμμάτων του packaging signal (ps, ψ).

Εισαγωγή του ιού στα κύτταρα

Η διαθεσιμότητα των ρετροϊικών υποδοχέων στους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους προσδιορίζει το εύρος των κυττάρων ξενιστών του κάθε ρετροϊού (τροπισμός του ιού). Πολλές πρωτεΐνες του φακέλου που προκύπτουν φυσικά χρησιμοποιούνται από τους ρετροϊούς (Πίνακας 1) και οι ρετροϊικοί φορείς μπορούν να πακεταριστούν με



Εικόνα 2. Ο κύκλος της ζωής του ρετροϊού. Όλοι οι ρετροϊοί εισέρχονται στα κύτταρα ξενιστές μέσω της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης του φακέλου με έναν συγκεκριμένο κυτταρικό υποδοχέα. Το μονόκλωνο μόριο RNA (ssRNA) μετατρέπεται σε δίκλωνο μόριο DNA (dsDNA) μέσω της δράσης της αντίστροφης μεταγραφάσης (προϊόν του γονιδίου *pol*). Το DNA συμπλεγμένο με τις ιικές πρωτεΐνες υπό τη μορφή ενός συμπλόκου προ-ένθεσης μεταφέρεται στον πυρήνα και εντίθεται στο DNA του κυττάρου. Η πρωτεΐνη ιντεγκράση (επίσης προϊόν του γονιδίου *pol*) καταλύει την αντίδραση αυτή. Μετά την ένθεση το 5' LTR εκκινεί την μεταγραφή ενός μορίου RNA πλήρους μήκους που εξυπηρετεί δύο λειτουργίες: στη ματισμένη του μορφή αποτελεί εκμαγείο για την παραγωγή των ιικών πρωτεϊνών, ενώ στη ματισμένη μορφή αποτελεί το μόριο RNA που προορίζεται για εγκαψιδίωση εντός ενός νέου ιικού σωματίου εφόσον φέρει την αλληλουχία ψ . Μετά την αυτό-οργάνωση του ρετροϊικού σωματίου στο κυτταρόπλασμα, ο ιός εκβλαστώνει μέσω της κυτταρικής μεμβράνης και περιβάλλεται μια λιπιδική διπλοστοιβάδα προερχόμενη από την κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή.

Πινάκας 1. Οι κυτταρικοί υποδοχείς που χρησιμοποιούνται από τους ρετροϊούς για να προσδεθούν στα κύτταρα ξενιστές

Ρετροϊός	Υποδοχέας	Λειτουργία
Ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV)	CD 4	Αναγνώριση του ανοσοποιητικού συστήματος
Ανοσοανεπάρκειας των πιθήκων (SIV)	CD 4	Αναγνώριση του ανοσοποιητικού συστήματος
Οικοτροφικός επίμυων	Rec 1	Μεταφορέας βασικών αμινοξέων
Αμφοτροπικός επίμυων	Ram 1	Μεταφορέας φωσφορικών
Λευχαιμίας του Γίββωνα	Glv1 1	Μεταφορέας φωσφορικών
RD114/ τύπος D	RDR	Μεταφορέας ουδέτερων αμινοξέων

διαφορετικά είδη πρωτεϊνών του φακέλου. Η διαδικασία είναι γνωστή με τον όρο ψευδοτύπωση (pseudotyping) και χρησιμεύει για να κατευθύνει κάθε φορέα σε διαφορετικά είδη κυττάρων στόχων. Οι συνήθεις φάκελοι που χρησιμοποιούνται είναι: 1) οι οικοτροφικοί που προσδένονται μόνο σε κύτταρα επίμυων και που έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε μελέτες γονιδιακής μεταφοράς σε αιμοποιητικά κύτταρα επίμυων, 2) οι αμφοτροπικοί που προσδένονται σε κύτταρα επίμυων καθώς και άλλων θηλαστικών και που έχουν χρησιμοποιηθεί στις περισσότερες μελέτες με ανθρώπινα κύτταρα και κύτταρα πρωτεύοντων, 3) ο φάκελος του ιού της λευχαιμίας του gibbon GALV που προσδένεται σε ανθρώπινα κύτταρα καθώς και σε κύτταρα άλλων πρωτεύοντων και 4) ο VSV-G για την τυποποίηση των Lenti. Οι αμφοτροπικοί και οι GALV φάκελοι χρησιμοποιούν ομόλογους αλλά διακριτούς φωσφορικούς μεταφορείς σαν κυτταρικούς υποδοχείς τους⁶. Αυτοί οι δύο υποδοχείς είναι συντηρημένοι στα θηλαστικά, και αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη ρετροϊικών φορέων με τους φακέλους αυτούς ως μέσον για γονιδιακή μεταφορά σε κύτταρα στόχους από άνθρωπο ή άλλα πρωτεύοντα^{7,8}. Η VSV-G προσδένεται σε ένα καθολικά εκφραζόμενο μεμβρανικό φωσφολιπίδιο και έχει επιτυχώς χρησιμοποιηθεί για να μεταβάλλει τον ιστικό τροπισμό φορέων που βασίζονται στον ιό HIV⁹. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα της χρήσης του φακέλου VSV-G, είναι ότι προσδίδει σημαντική δομική σταθερότητα στο ρετροϊικό σωματίο που επιτρέπει τη συγκέντρωση του ικού υπερκειμένου με υπερφυγοκέντρωση.

Η ιική ενσωμάτωση στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή

Μετά την εισαγωγή στο κύτταρο ξενιστή, οι ρετροϊοί χρησιμοποιούν το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (RT) για να δημιουργήσουν ένα δίκλωνο μόριο DNA από το ιικό RNA. Το ιικό RNA είναι προσδεμένο με πρωτεΐνες του ιού και του κυτταροπλάσματος, υπό τη μορφή ενός συμπλόκου προ-ένθεσης, το οποίο πρέπει να διέλθει από

τον πυρηνικό φάκελο προτού να μπορέσει να εντεθεί στο γονιδίωμα του κυττάρου. Η πυρηνική μεταφορά απαιτεί είτε την αποδόμηση του πυρηνικού φακέλου, ένα γεγονός που συμβαίνει κατά τη μίτωση, είτε ενεργητική μεταφορά μέσω των πυρηνικών πόρων σε ένα κύτταρο σε κατάσταση ηρεμίας (G0). Οι τρεις οικογένειες ρετροϊών δείχνουν διαφορετικό βαθμό εξάρτησης από τη φάση του κυτταρικού κύκλου για την ενσωμάτωσή τους στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή. Οι φορείς που βασίζονται στον ιό MLV είναι απολύτως εξαρτώμενοι από την αντιγραφή του κυττάρου ξενιστή, ενώ οι λεντικοί και οι FV φορείς είναι κατά 10 έως και 100 φορές πιο αποδοτικοί στην ένθεση του γονιδιώματος τους σε αδρανή κύτταρα σε σχέση με τους MLV φορείς¹⁰⁻¹². Ο λόγος αυτής της διαφοράς είναι η παρουσία σημάτων πυρηνικού εντοπισμού στις ικές πρωτεΐνες που διευκολύνουν τη μεταφορά του συμπλόκου προ-ενσωμάτωσης στον πυρήνα χωρίς την ανάγκη το κύτταρο να βρίσκεται στη μίτωση. Τέτοια σημεία ταυτοποιήθηκαν στις FV και στις λεντικές δομικές πρωτεΐνες και εμπλέκονται στην αύξηση του ποσοστού μεταγωγής που παρουσιάζουν οι φορείς αυτοί σε κύτταρα που βρίσκονται στη φάση G0 του κυτταρικού κύκλου^{13,14}.

Έκφραση των εισηγμένων γονιδίων

Μετά την ενσωμάτωση ενός ρετροϊού στο γονιδίωμα του κυττάρου, ο ιός χρησιμοποιεί τον LTR υποκινητή του για να κατευθύνει την έκφραση των γονιδίων του. Παρόλα αυτά, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει προστατευτικούς μηχανισμούς ενάντια στην ανεξέλεγκτη έκφραση «ξένων» γονιδίων, οι οποίοι δρουν ώστε να αποσιωπήσουν την έκφραση του εξωγενούς DNA. Οι ακριβείς μηχανισμοί παραμένουν άγνωστοι αλλά κυρίως εμπλέκονται η μεθυλίωση του DNA και η αποακετυλίωση των ιστονών^{15,16}. Το φαινόμενο αποσιώπησης αποτελεί ένα μείζον εμπόδιο στην επίτευξη μακροχρόνιας έκφρασης των γονιδίων που μεταφέρονται με τους ρετροϊικούς φορείς. Αλληλουχίες που βρίσκονται στα στοιχεία LTR εμπλέκονται στην αποσιώπηση με την πρόσδεση παραγόντων που πα-

ρεμποδίζουν την εκκίνηση της μεταγραφής. Αναπτύχθηκαν δύο προσεγγίσεις για την επίλυση του προβλήματος αυτού. Η χρήση εναλλακτικών LTR¹⁷ και η ενσωμάτωση στοιχείων μονωτών στη ρετροϊκή γονιδιακή κατασκευή.

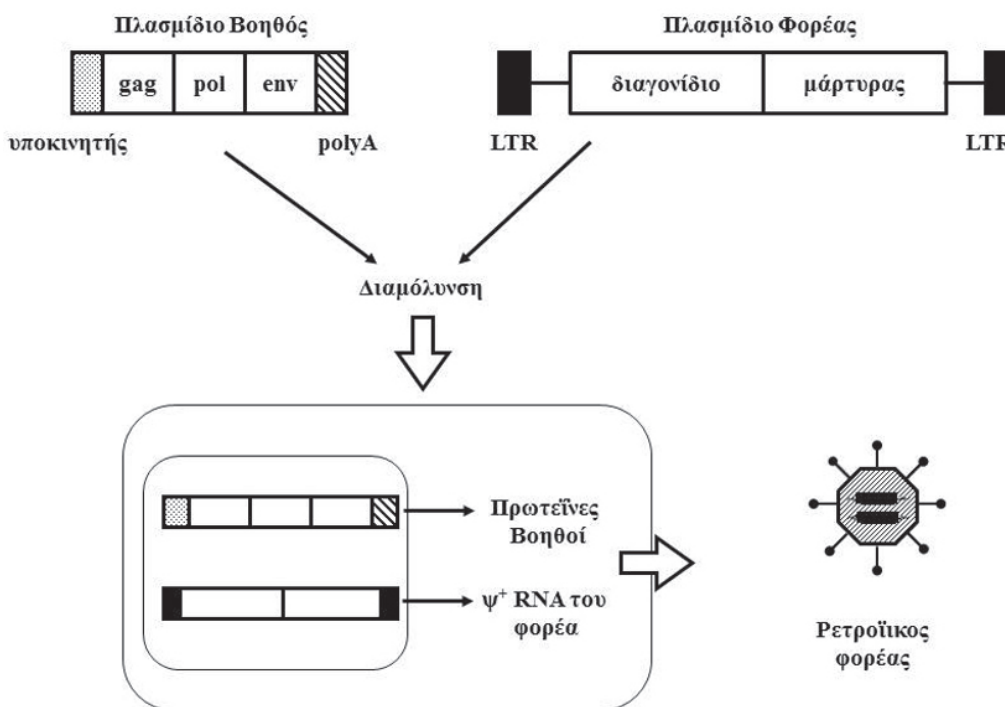
Παραγωγή θεραπευτικών ρετροϊκών φορέων

Οι φορείς που βασίζονταν στον ιό MLV ήταν οι πρώτοι που αναπτύχθηκαν ως μέσα για γονιδιακή μεταφορά. Το γεγονός που συνέβαλε στην ευρεία εξάπλωση των MLV φορέων ήταν η εις βάθος γνώση της στρατηγικής αντιγραφής του ιού. Το ικό γονιδίωμα μπορεί να διακριθεί σε δύο λειτουργικές οντότητες: αυτές που απαιτούνται *in cis* και αυτές που παρέχονται *in trans*. Οι *in cis* αλληλουχίες απαιτούνται για την εγκαθίδρυση, την αντιγραφή και την ένθεση του ρετροϊού, αλλά δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Στις *in cis* συμπεριλαμβάνονται α) τα ιικά LTR, β) οι θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών για την έναρξη της αντίστροφης μεταγραφής, γ) το σήμα πακεταρίσματος ψ και δ) και το τρινοκλεοτίδιο att που είναι παρόν στο άκρο των LTR τα οποία απαιτούνται για την ένθεση του ικού γονιδιώματος. Οι λειτουργίες που μπορούν να παρασχεθούν *in trans* περιλαμβάνουν τις ικές

πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τους γενετικούς τόπους *gag*, *pol* και *env*¹⁸.

Η παραγωγή του φορέα προκύπτει με τον διαχωρισμό του ρετροϊκού γονιδιώματος σε δύο διακριτά πλασμίδια έκφρασης που αντιστοιχούν στις δύο λειτουργικές οντότητες που προαναφέρθηκαν (Εικόνα 3). Το πλασμίδιο φορέας (ή πλασμίδιο μεταφοράς) διαθέτει όλες τις *in cis* δρώσες αλληλουχίες και το προς έκφραση γονίδιο κλωνοποιημένο μεταξύ των LTR. Τα βοηθητικά πλασμίδια (ή πλασμίδια πακεταρίσματος) παράγουν όλες τις ικές πρωτεΐνες. Όταν τα δύο πλασμίδια συν-διαμολώνουν ένα κύτταρο, ο πλασμιδιακός φορέας παράγει ένα μόριο RNA που φέρει την αλληλουχία εγκαθίδρυσης ψ. Αυτό το ψ+RNA μπορεί να επικαλυφθεί από τις ρετροϊκές πρωτεΐνες και να απελευθερωθεί από το κύτταρο ως ένα ρετροϊκό ιοσωμάτιο. Το ιοσωμάτιο είναι ικανό να μεταγει ένα άλλο κύτταρο, αλλά εφόσον δεν κωδικοποιεί στο γενετικό του υλικό κανένα άλλο δομικό ή λειτουργικό ικό γονίδιο, περιορίζεται σε ένα μόνο κύκλο μεταγωγής. Τα βοηθητικά πλασμίδια, όταν εντεθούν μόνιμα σε μία κυτταρική σειρά, αυτή πλέον ονομάζεται κυτταρική σειρά πακεταρίσματος.

Αφού η διαμόλυνση (μεταφορά πλασμιδίου) είναι μια



Εικόνα 3. Παραγωγή ενός ρετροϊκού φορέα. Το ικό γονιδίωμα χωρίζεται σε δύο πλασμίδια. Το πλασμίδιο φορέας περιέχει όλες τις ικές αλληλουχίες που δρουν *in cis*, το διαγονίδιο και ένα γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό· το πλασμίδιο βοηθός φέρει τα γονίδια που παράγουν τις ικές πρωτεΐνες. Μια κυτταρική σειρά διαμολύνεται και με τα δύο πλασμίδια και το μόριο RNA του φορέα που φέρει την αλληλουχία ψ που λειτουργεί ως σήμα πακεταρίσματος, καλύπτεται από τις ικές πρωτεΐνες για να σχηματίσει το ρετροϊκό σωματίο. Οι κυτταρικές σειρές που εκφράζουν συστατικά τα γονίδια *gag*, *pol* και *env* ονομάζονται κυτταρικές σειρές πακεταρίσματος.

σχετικώς μη αποδοτική οδός γονιδιακής μεταφοράς που συχνά οδηγεί σε ανασυνδυασμό του DNA, οι τίτλοι του ιού που προκύπτουν είναι χαμηλοί και χρειάζονται βελτιστοποίηση. Αυτό επιτυγχάνεται με ένα δεύτερο βήμα επιμόλυνσης (μεταφορά φορέα) που στοχεύει στην απομόνωση κλώνων που παράγουν υψηλό τίτλο ισσωματίων^{19,20}. Στο βήμα αυτό, οι φορείς που παράχθηκαν από το πρώτο κύκλο της διαμόλυνσης, χρησιμοποιούνται για να επιμολύνουν ξανά μία κυτταρική σειρά πακεταρίσματος. Τα επιμολυσμένα κύτταρα επιλέγονται με θετική επιλογή για την ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό (το γονίδιο ανθεκτικότητας κωδικοποιείται από τον ικό φορέα) και οι ανθεκτικοί κλώνοι στη συνέχεια ελέγχονται για την ακεραιότητα της αλληλουχίας του φορέα και για τον αριθμό των παραγόμενων ισσωματίων. Οι κλώνοι με υψηλή έκφραση και ακέραιους προίους επιλέγονται και καταψύχονται. Αυτοί οι κλώνοι παραγωγοί παρέχουν μια αστείρευτη πηγή κυττάρων παραγωγής ισσωματίων που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε επαναλαμβανόμενα πειράματα.

Χρησιμότητα και κίνδυνοι των ρετροϊκών φορέων

Η κύρια ιδιότητα των ρετροϊκών φορέων που τους καθιστά ένα ελκυστικό μέσον για πειράματα γονιδιακής μεταφοράς είναι η ικανότητά τους να ενσωματώνονται μόνιμα στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή. Η ιδιότητα αυτή οδήγησε στην ευρεία χρήση των φορέων αυτών για τη γονιδιακή μεταφορά σε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, όπου η σταθερή επιμόλυνση προκαλεί τη συνεχή έκφραση του γονιδίου στα διαφοροποιημένα κύτταρα. Επιπλέον, οι φορείς αυτοί δεν είναι παθογόνοι στον άνθρωπο και δεν προκαλούν ανοσολογική απόκριση. Ένας μείζων περιορισμός της χρήσης των ογκορετροϊών στη γονιδιακή θεραπεία είναι ότι μπορούν να μετάγουν μόνο κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε κύκλο¹⁰. Για να ξεπεραστεί το εμπόδιο αυτό, αναπτύχθηκαν φορείς από τους FV και τους Lentί που έχουν την ικανότητα να μετάγουν μη διαιρούμενα κύτταρα (φάση G0).

Οι πιθανοί κίνδυνοι από τη χρήση αυτού του συστήματος φορέων σχετίζονται με το δυναμικό της ένθεσης τους. Παρόλο που η ικανότητα ένθεσης είναι ένα επιθυμητό χαρακτηριστικό των φορέων, μπορεί εν τούτοις να προκαλέσει προβλήματα α) όταν ο φορέας εντεθεί εντός ενός γονιδίου προκαλώντας σωματική μετάλλαξη (μεταλλαξιγένεση λόγω ένθεσης) και β) όταν τα γονίδια που εδράζονται κοντά στη θέση ένθεσης του ικού φορέα αρχίσουν να εκφράζονται ανεξέλεγκτα λόγω των υποκινητών LTR του ιού. Αυτά τα γεγονότα έχουν καταγραφεί σε κλινικές μελέτες και έχουν αποτελέσει την αιτία επανασχεδιασμού των διαδικασιών²¹. Ο κίνδυνος παραγωγής ενός ιού ικανού για πολλαπλασιασμό που μπορεί να μεταδοθεί (replication competent), είναι ανύπαρκτος με τα

διαθέσιμα συστήματα πακεταρίσματος που έχουν διανείμει τα βοηθητικά πλασμίδια σε 4 διαφορετικούς φορείς.

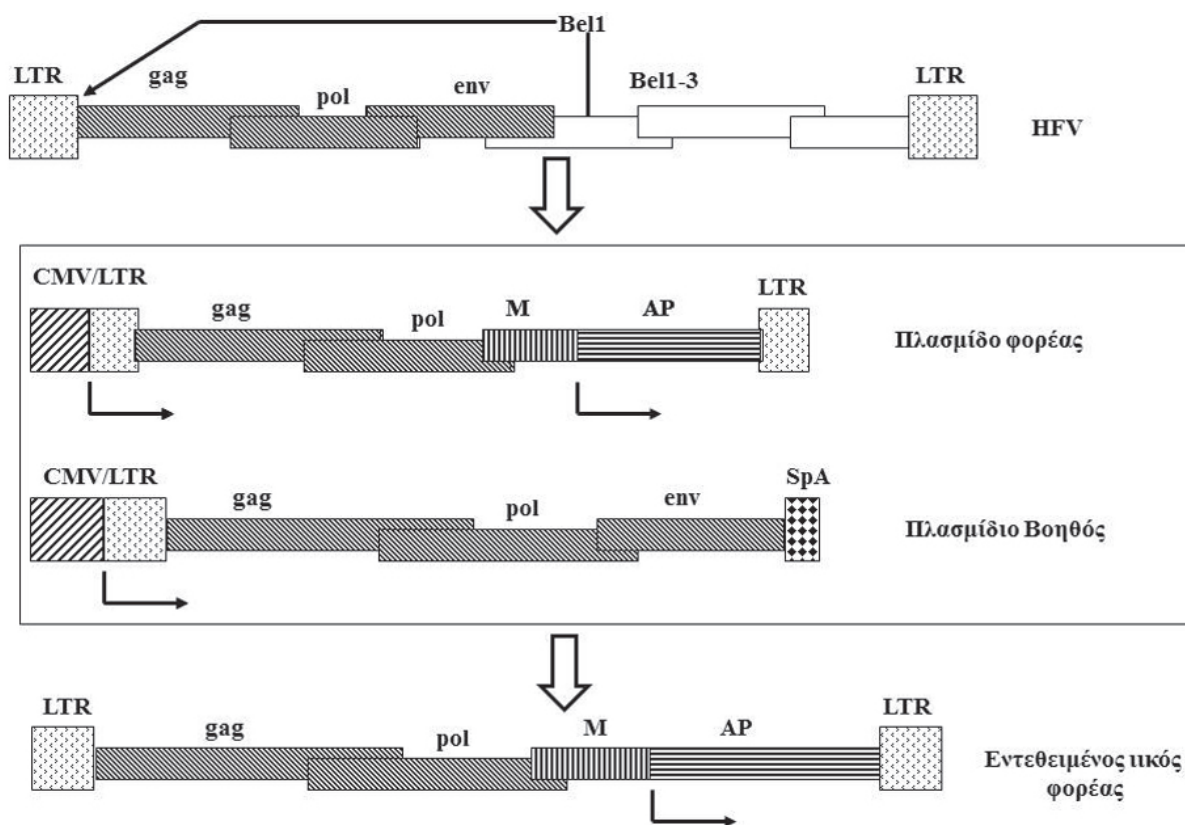
Οι FV ιικοί φορείς

Οι FV ιοί είναι μη παθογόνοι για τον άνθρωπο και είναι ικανοί να μολύνουν ένα ευρύ φάσμα κυττάρων διαφορετικών ειδών θηλαστικών, πιθανά λόγω της καθολικής έκφρασης του κυτταρικού υποδοχέα του ιού. Ο ανθρώπινος FV (HFV) απομονώθηκε από καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα, αλλά πιο πρόσφατα στοιχεία έδειξαν ότι πρόκειται για μία παραλλαγή του FV του χιμπατζή. Το γονιδίωμα του FV περιέχει τους κλασσικούς γονιδιακούς τόπους gag, pol και env που είναι κοινοί όλων των ρετροϊών καθώς και τρία επιπλέον γονίδια που εντοπίζονται μεταξύ του γενετικού τύπου env και του 3'LTR (Εικόνα 4). Το προϊόν ενός εξ αυτών (Bel-1) είναι trans-ενεργοποιητής του 5'LTR και είναι απολύτως απαραίτητο για την παραγωγή του ιού²². Για χρήση σε γονιδιακή μεταφορά, έχουν αναπτυχθεί φορείς ανεξάρτητοι από τον trans-ενεργοποιητή με αντικατάσταση του 5'LTR από τον υποκινητή του CMV²³ (Εικόνα 4). Εφόσον κυτταρικές σειρές πακεταρίσματος δεν είναι προς το παρόν διαθέσιμες, η παραγωγή του φορέα επιτυγχάνεται με διαμόλυνση με 4 πλασμίδια (πλασμίδιο φορέα και 3 πλασμίδια πακεταρίσματος). Ένα ελκυστικό χαρακτηριστικό του FV συστήματος αυτού είναι ότι στον εντεθειμένο φορέα, τα LTR είναι αποσιωπημένα λόγω της έλλειψης της πρωτεΐνης Bel-1 και της απάλειψης του υποκινητή U3 (Δ FV) από τον 3'LTR²⁴, γεγονός που ελαχιστοποιεί την πιθανότητα ακούσιας ενεργοποίησης οποιουδήποτε γονιδίου εντοπίζεται καθοδικά από το σημείο ένθεσης του ιού.

Οι Δ FV φορείς έχουν χρησιμοποιηθεί για την επιμόλυνση αιμοποιητικών κυττάρων επίμυος με μακροπρόθεσμη ικανότητα εποίκισμού σε πείραμα μεταμόσχευσης. Η έκφραση του διαγονιδίου διατηρήθηκε για πάνω από 6 μήνες και σε όλα τα είδη των αιμοποιητικών κυττάρων, γεγονός που δηλώνει διαμόλυνση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων²⁵. Αυτά τα πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα επαναλήφθηκαν με ανθρώπινα CD34⁺ που μεταμοσχεύθηκαν σε NOD-SCID επίμυες καθιστώντας τον φορέα αυτό μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική αντί των MLV φορέων²⁶.

Λεντιϊκοί φορείς

Η ικανότητα του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) να επιμολύνει κύτταρα στη φάση G0 του κυτταρικού κύκλου τροφοδότησε το ενδιαφέρον για να γίνει ο HIV ένα μέσο γονιδιακής μεταφοράς για κύτταρα που βρίσκονται εκτός κυτταρικού κύκλου. Η δομή του HIV-1, του λεντιού που χρησιμοποιείται συχνότερα για την ανάπτυξη λεντιϊκών φορέων φαίνεται στην Εικόνα 5. Εκτός

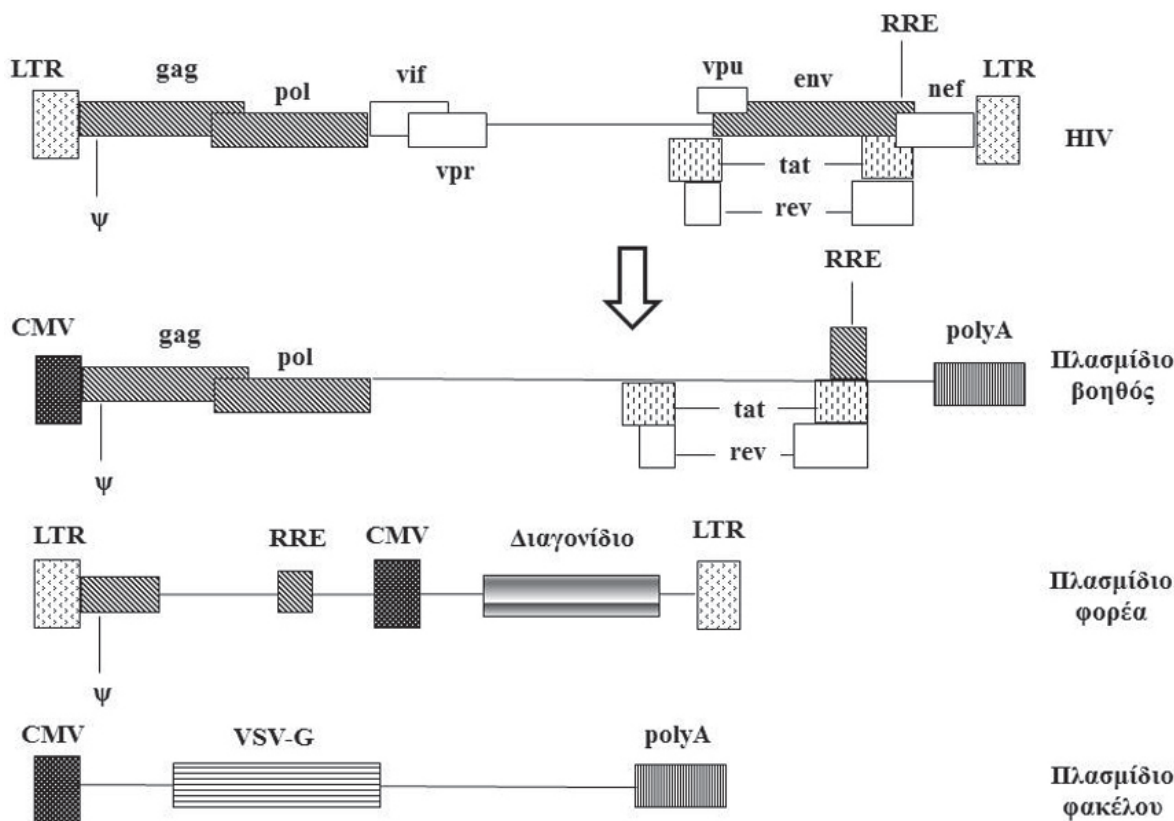


Εικόνα 4. Το σύστημα του φορέα του ανθρώπινου FV. Ο αγρίου τύπου ανθρώπινος FV φαίνεται στην κορυφή της εικόνας. Ο ιός διαθέτει τα τυπικά γονίδια gag, pol και env των ρετροϊών και τρία επιπλέον γονίδια που εδράζονται μεταξύ του γονιδίου env και του LTR (Bel1-3). Το προϊόν του γονιδίου Bel-1 αποτελεί τρανς-ενεργοποιητή του 5' LTR· ένας ασθενής υποκινητής, οποίος είναι παρόν στο άκρο του γονιδιακού τόπου env ελέγχει την παραγωγή της πρωτεΐνης Bel-1 που απαιτείται για την έναρξη της μεταγραφής από τον ισχυρό υποκινητή του LTR. Για να παραχθεί ένα σύστημα φορέα ανεξάρτητο από την Bel-1, το 5' LTR απαλείφεται μερικώς και συντήκεται με τον υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού (CMV) σχηματίζοντας ένα συντηγμένο υποκινητή CMV/LTR. Στο πλασμίδιο φορέα ο υποκινητής αυτός ελέγχει τη μεταγραφή των γονιδίων gag και pol, ενώ ένας εσωτερικά τοποθετημένος υποκινητής (M) ελέγχει την έκφραση ενός γονιδίου μάρτυρα (εν προκειμένω του γονιδίου της αλκαλικής φωσφατάσης (AP)). Στο πλασμίδιο βοηθό, ο συντηγμένος υποκινητής ελέγχει την έκφραση των γονιδίων gag, pol και env, ενώ ένα σήμα 3' πολυαδενυλίωσης εξασφαλίζει την μετάφραση του ιικού RNA και την παραγωγή των πρωτεϊνών βοηθών. Μετά τη διαμόλυνση μιας κυτταρικής σειράς και την αντίστροφη μεταγραφή, το 5' LTR του πλασμιδίου φορέα «αναγεννιέται» από το άθικτο 3' LTR καταλήγοντας σε μια εντεθειμένη δομή όπως φαίνεται στο κάτω μέρος της εικόνας· εφόσον το Bel-1 είναι απόν, το LTR του FV είναι αποσιωπημένο και ο μόνος ενεργός υποκινητής είναι ο εσωτερικός (M) που ελέγχει την έκφραση του γονιδίου AP.

από τα τυπικά στοιχεία των ρετροϊών LTR, gag, pol και env, ο ιός κωδικοποιεί στο γονιδιώμα του δύο επιπλέον ρυθμιστικές πρωτεΐνες (Tat και Rev) και τέσσερις βοηθητικές πρωτεΐνες (Vpr, Vif, Vpru και Nef). Η ικανότητα επιμόλυνσης μη διαιρούμενων κυττάρων αποδίδεται στα σήματα πυρηνικού εντοπισμού των πρωτεϊνών της μήτρας, της ιντεγκράσης, καθώς και της βοηθητικής πρωτεΐνης Vpr^{27,28}. Τα σήματα είναι υπεύθυνα για τη «διακίνηση» του συμπλόκου προ-ένθεσης στο πυρήνα, χωρίς να είναι απαραίτητη η αποδόμηση του πυρηνικού φακέλου.

Η ανάπτυξη των λεντικών φορέων (Εικόνα 5) απαιτούσε αρχικά αλλαγή στον τροπισμό του ιού από τον φυσικό του υποδοχέα (CD4 μόριο) και επετεύχθη με την

ψευδοτύπωση του φορέα με τον φάκελο του ιού της φλυκταινώδους στοματίτιδας (VSV-G). Στη συνέχεια, απαλείφθηκαν οι ικές πρωτεΐνες - βοηθοί αφού είχε αποδειχθεί ότι δεν ήταν απαραίτητες για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό του ιού. Οι γονιδιακοί τόποι tat και rev διατηρήθηκαν αφού αποδείχτηκε ότι διευκόλυναν την αποδοτική κυτταροπλασματική εξαγωγή και μετάφραση του RNA του φορέα. Ο 5' LTR υποκινητής υποκαταστάθηκε από έναν ισχυρό υποκινητή (CMV), ο οποίος είναι ιδιαίτερος ενεργός στην κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται για την παραγωγή του φορέα. Η παραγωγή του λεντικού φορέα προϋποθέτει τη συν-διαμόλυνση με πλασμίδιο πακεταρίσματος και με το πλασμίδιο του φορέα ενώ



Εικόνα 5. Διάγραμμα του ιού HIV και του συστήματος φορέα τριών πλασμιδίων. Η πολύπλοκη γονιδιακή οργάνωση του αγρίου τύπου του ιού HIV απεικονίζεται στην κορυφή της εικόνας: ένα σύνολο 15 πρωτεϊνών εκφράζονται από αλληλεπικαλυπτόμενα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (απεικονίζονται από αλληλεπικαλυπτόμενα ορθογώνια παραλληλόγραμμα). Στο πλασμίδιο βοηθό, η έκφραση των γονιδιακών τόπων που κωδικοποιούν τα gag, pol, rev και tat ελέγχεται από τον υποκινητή CMV. Το σήμα πακεταρίσματος ψ και ο γονιδιακός τόπος env έχουν απαλειφθεί: το στοιχείο που αποκρίνεται στο rev (RRE) στο άκρο του γονιδιακού τόπου env έχει διατηρηθεί. Στο πλασμίδιο φορέα, όλες οι *in cis* δρώσες αλληλουχίες (LTR, RRE και ψ) έχουν διατηρηθεί: Η έκφραση του διαγονιδίου ελέγχεται από έναν ισχυρό υποκινητή (όπως ο υποκινητής CMV). Το πλασμίδιο του φακέλου παρέχει τον ιικό φάκελο του ιού της φλυκταινώδους στοματίτιδας (VSV-G). Οι ιικοί φορείς παράγονται μέσω παροδικής διαμόλυνσης και με τα τρία πλασμίδια στην κυτταρική σειρά 293T, μια κυτταρική σειρά από ανθρώπινο εμβρυϊκό νεφρό.

η συλλογή των ισοσωμάτων πραγματοποιείται 48 έως 72 ώρες αργότερα¹¹. Οι λεντικοί φορείς έχουν χρησιμοποιηθεί για να επιμολύνουν έναν αριθμό διαφορετικών κυτταρικών τύπων συμπεριλαμβανομένων κυττάρων του επιθηλίου των αεραγωγών, των φωτοϋποδοχέων του αμφιβληστροειδούς, νευρώνων, της γλοίας, του ήπατος, του ενδοθηλίου, καρδιακών μυοκυττάρων και αιμοποιητικών κυττάρων. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι λεντικοί φορείς που έχουν υποστεί ψευδοτύπωση με τον φάκελο VSV-G είναι ικανοί να επιμολύνουν ανθρώπινα CD34+ κύτταρα απουσία κυτταροκινών²⁹. Παρόλα αυτά το θέμα της εξάρτησης από το στάδιο του κυτταρικού κύκλου για την επιτυχή λεντική επιμόλυνση δεν έχει ακόμα επιλυθεί και είναι πιθανόν να είναι ιστο-ειδική. Πρόσφατα στοιχεία υποδηλώνουν επιμόλυνση ηπατικών κυττάρων συμβαίνει μόνο μετά από διέγερση του κυτταρικού κύκλου³⁰. Η σύγχρονη άποψη είναι ότι οι λεντικοί φορείς

μπορούν να εισέλθουν στον πυρήνα όπου είναι πολύ σταθεροί υπό μια επισωματική μορφή αλλά η αντίστροφη μεταγραφή και η ένθεση δεν συμβαίνουν μέχρις ότου το κύτταρο να μπει τουλάχιστον στη φάση G1b του κυτταρικού κύκλου³¹.

Αδενο-σχετιζόμενοι ιικοί φορείς (AAV)

Ο AAV είναι ένας μη παθογόνος παρβοϊός με ένα γονιδίωμα DNA μήκους 4.7kb, το οποίο περιέχει 2 πλαίσια ανάγνωσης, το *cap* και το *rep*, που κωδικοποιούν τις δομικές και μη δομικές πρωτεΐνες του ιού αντίστοιχα³². Υπάρχουν 8 ορότυποι AAV με διαφορετική ιστο-τροπισμό. Η κωδικοποιούσα αλληλουχία βρίσκεται εκατέρωθεν δύο αναστραμμένων ακραίων αλληλουχιών (ITR) σε κάθε πλευρά, οι οποίες είναι οι μόνες αλληλουχίες *in cis* που απαιτούνται για τη συναρμολόγηση του ισοσωμα-

τίου και την αντιγραφή (Εικόνα 6). Ο ιός προσδένεται στα κύτταρα μέσω της πρωτεογλυκάνης θειικής επαράνη, του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGF-R) και της ιντεγκρίνης $\alpha\text{V}\beta 5^{33,34}$. Μετά την εισαγωγή του ισοωματίου στο κύτταρο, ο ιός μεταφέρεται στον πυρήνα, το ικό γονιδίωμα απελευθερώνεται και συντίθεται η συμπληρωματική αλυσίδα του DNA. Προς το παρόν είναι ασαφείς οι παράγοντες που καθορίζουν την τύχη του γονιδιώματος του AAV. Τόσο η επισωματική όσο και η εντεθειμένη μορφή έχουν καταγραφεί και έχει αποδειχτεί ότι η α ένθεση ενισχύεται κατά την επιδιόρθωση του DNA στη διάρκεια της φάσης S του κυτταρικού κύκλου³⁵. Μία ενδιαφέρουσα ιδιότητα του ιού, είναι ότι εντίθεται κατά προτίμηση σε μία θέση του χρωμοσώματος 19, ένα χαρακτηριστικό που αποδίδεται στην παρουσία μιας θέσης δέσμησης της πρωτεΐνης Rep στο χρωμόσωμα αυτό³⁶. Η ένθεση των AAV που δεν διαθέτουν το γονίδιο της Rep, γίνεται τυχαία στο γονιδίωμα³⁷.

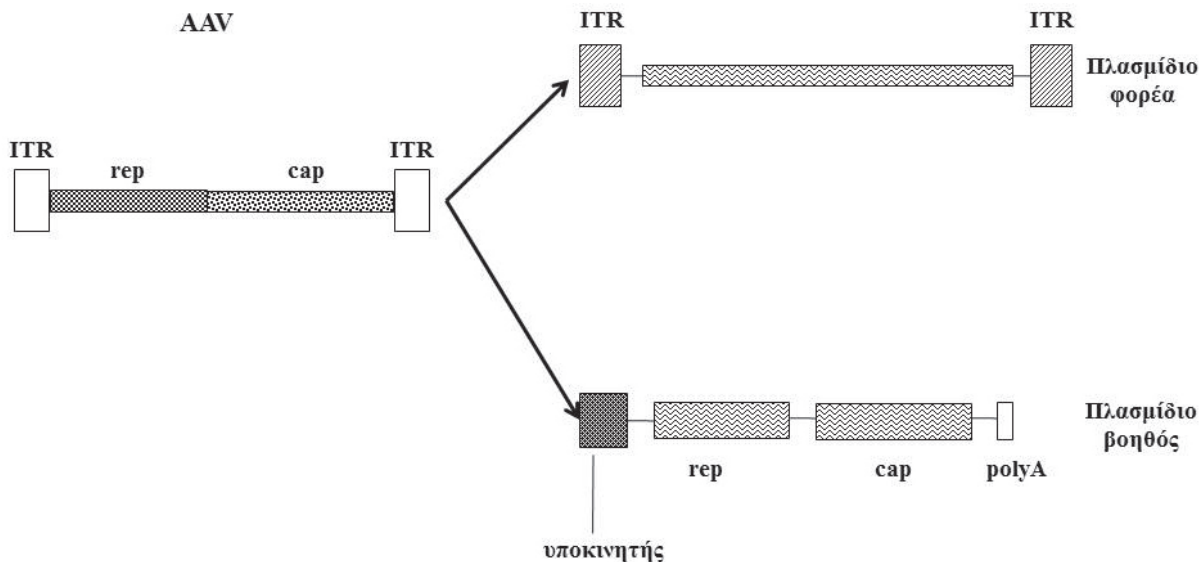
Παραγωγή των AAV φορέων

Η βασική αρχή που διέπει την παραγωγή των ρετροϊικών φορέων με τις *cis* και *trans* λειτουργίες υφίσταται επίσης και στην ανάπτυξη των φορέων AAV. Η παραγωγή

του φορέα προϋποθέτει τη συνδιαμόλυνση με τον πλασμιδιακό φορέα και με ένα βοηθητικό πλασμίδιο, που κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες Rep και Cap, παρουσία αδενοϊού. Σε ένα τυπικό πλασμιδιακό AAV φορέα έχουν διατηρηθεί μόνο οι αλληλουχίες ITR, ενώ όλο το γονιδίωμα του AAV έχει υποκατασταθεί από το διαγονίδιο και τον υποκινητή του (Εικόνα 6). Τα κύτταρα λύνονται 2 με 3 μέρες αργότερα και ο ικός φορέας συγκεντρώνεται μετά από φυγοκέντρωση διαβάθμισης πυκνότητας χλωριούχου καισίου (CsCl). Ο υπολειμματικός αδενοϊός που μπορεί να παραμένει στο συγκεντρωμένο φορέα αδρανοποιείται μετά από θερμική επεξεργασία.

Επιμόλυνση από AAV φορείς

Ανάλυση της δομής των AAV φορέων που είχαν επιμολύνει κυτταρικές σειρές σε πειράματα *in vitro* έδειξαν ότι ο φορέας AAV εντίθεται ως ένα μόνο αντίγραφο ανά γονιδίωμα³⁸. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν διαφορετικό σε σχέση με τα *in vivo* πειράματα όπου τα μικρά γονιδιώματα του AAV βρέθηκαν να σχηματίζουν μακρομοριακές δομές με μεγάλο μοριακό βάρος (γνωστές ως concatamers)³⁹. Η διαδικασία της μετατροπής αυτής μελετήθηκε στο ήπαρ και αποδείχθηκε ότι χρειάζονται τουλάχιστον 5 εβδομά-



Εικόνα 6. Η γονιδιακή οργάνωση των AAV και των φορέων που προέρχονται από τους AAV. Ο αγρίου τύπου AAV διαθέτει ένα μονόκλωνο μόριο DNA ως γονιδίωμα με μήκος περίπου 4,7 kb το οποίο φέρει δύο ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης, τα rep και cap, που κωδικοποιούν 4 πρωτεΐνες πολλαπλασιασμού και 3 καψιδιακές πρωτεΐνες. Το γονιδίωμα παισιώνεται από δύο αναστραμμένες ακραίες επαναλήψεις (ITR), οι οποίες αποτελούν τις μόνες απαραίτητες δομές *in cis* για την ιική αντιγραφή και συναρμολόγηση του ισοωματίου. Αυτές οι αλληλουχίες διατηρούνται στο πλασμίδιο φορέα, ενώ το υπόλοιπο ικό γονιδίωμα υποκαθίσταται από τις αλληλουχίες του διαγονιδίου. Το πλασμίδιο βοηθός εκφράζει τις βοηθητικές πρωτεΐνες από τα γονίδια rep και cap και η έκφραση βρίσκεται υπό τον έλεγχο ενός ισχυρού υποκινητή. Για την παραγωγή του AAV φορέα, τα πλασμίδια φορέα και βοηθός συν-διαμολύνουν μια κυτταρική σειρά παρουσία αδενοϊού, ο οποίος παρέχει άλλες απαραίτητες πρωτεΐνες για την παραγωγή του AAV ιικού φορέα. Μετά από 2-3 ημέρες τα κύτταρα λύνονται και ο AAV ικός φορέας απομονώνεται με φυγοκέντρωση διαβάθμισης πυκνότητας επί στρώματος CsCl, ενώ ο υπολειμματικός αδενοϊός απομακρύνεται μέσω αδρανοποίησης με θερμότητα.

δες για να πάψουν να υφίστανται οι μορφές με το χαμηλό μοριακό βάρος και να εμφανιστούν τα concatamers⁴⁰. Η έκφραση από τα concatamers μπορεί να προκύψει είτε από την επισωματική είτε την εντεθειμένη μορφή, γεγονός που καθιστά τους φορείς AAV κατάλληλους για εφαρμογές γονιδιακής μεταφοράς και σε αδρανή αλλά και σε διαιρούμενα κύτταρα.

Χρησιμότητα των φορέων AAV

Πολλοί τύποι ιστών έχουν επιμολυνθεί επιτυχώς από φορείς AAV μετά από χορήγηση *in vivo* (μυς, αμφιβληστροειδής, πνεύμων, ΚΝΣ και ήπαρ)³⁹⁻⁴⁴. Η χρήση των AAV ως μέσον γονιδιακής μεταφοράς διερευνήθηκε για αρκετούς λόγους. Είναι μη παθογόνοι, διαθέτουν υψηλό δυναμικό ένθεσης, ικανοποιητική χωρητικότητα κλωνοποίησης και ένα σχετικά απλό από άποψη δομής γονιδίωμα και απλό κύκλο ζωής. Μεταφορά φορέων AAV σε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα δεν έχει επιτευχθεί⁴⁵. Οι φορείς AAV έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για να επιμολύνουν μυϊκά και ηπατικά κύτταρα με σκοπό τη θεραπεία της Αιμορροφιλίας Β. Δύο ζωικά μοντέλα της Αιμορροφιλίας Β έχουν χρησιμοποιηθεί ως τώρα σε προκλινικές μελέτες. Και στα δύο μοντέλα θεραπευτικά επίπεδα έκφρασης του F9 της πήξης επιτεύχθηκαν μετά από χορήγηση ισωματιών AAV μέσω έγχυσης στην πυλαία φλέβα ή μετά από ενδομυϊκή χορήγηση^{46,47}. Τα σημαντικά προ-κλινικά δεδομένα των φορέων AAV για την *in vivo* επιδιόρθωση της ανεπάρκειας του F9 στα μοντέλα της ασθένειας έδωσαν το πλαίσιο πάνω στο οποίο στηρίχτηκε η επιτυχημένη κλινική εφαρμογή της τεχνολογίας⁴⁸. Ένα ακόμα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό των φορέων AAV που μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο μελλοντικά στη θεραπεία γενετικών διαταραχών, αποτελεί η ικανότητά τους να στοχεύουν αποδοτικά ομόλογες αλληλουχίες DNA στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή και να επιφέρουν συγκεκριμένες τροποποιήσεις στο DNA⁴⁹.

Περιορισμοί των φορέων AAV

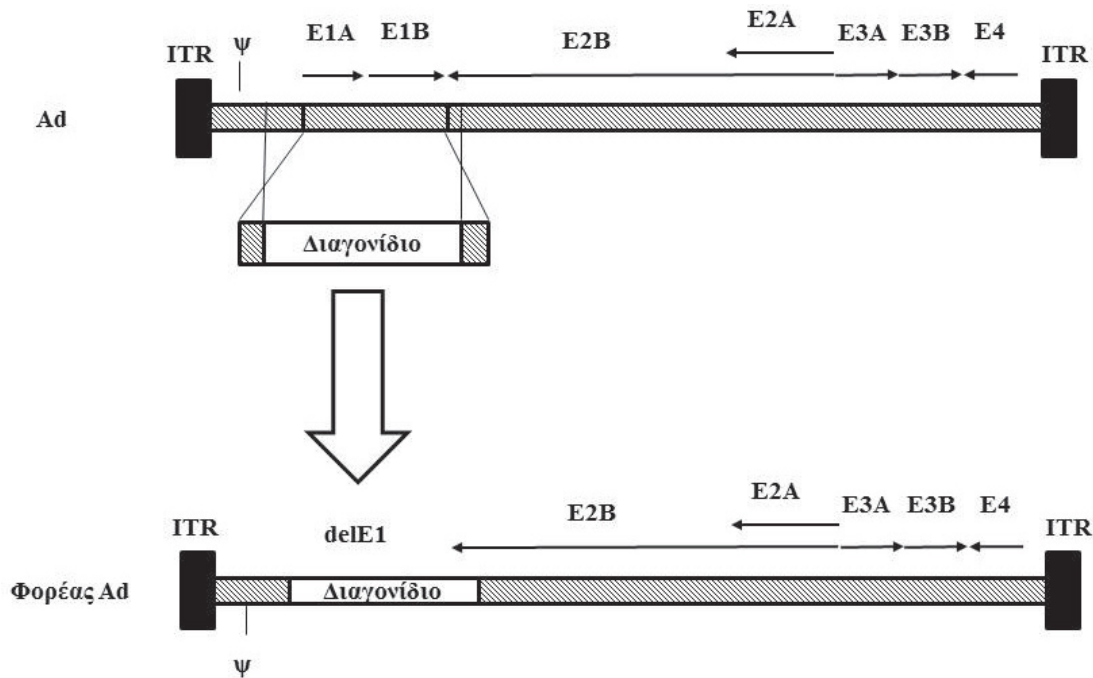
Το μόνο μείζον πρόβλημα των φορέων AAV είναι η χωρητικότητα κλωνοποίησής τους. Με τους διαθέσιμους φορείς αυτή περιορίζεται σε 4kb, γεγονός που τους αποκλείει από τη μεταφορά μεγάλων γονιδίων. Άλλα προβλήματα περιλαμβάνουν τη μεγάλη μεταβλητότητα της απόδοσης επιμόλυνσης ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, χαμηλά ποσοστά επιμόλυνσης *in vivo* μετά από επαναχορήγηση του φορέα, και η παρουσία αδρανοποιητικών αντισωμάτων ενάντια στον AAV στο 60% του ανθρώπινου πληθυσμού⁵⁰. Παρόλο που η βιολογική σημασία των αντισωμάτων αυτών δεν έχει αξιολογηθεί με *in vivo* μελέτες, είναι αναμενόμενο ότι θα περιορίζουν την απόδοση της επιμόλυνσης των AAV φορέων *in vivo*.

Αδενοϊκοί φορείς

Οι αδενοϊκοί αποτελούν ιούς με δίκλωνο DNA, με μέγεθος 36kb, που περιβάλλονται από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο. Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί 49 διαφορετικοί ορότυποι του ανθρώπινου αδενοϊκού που μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες του αναπνευστικού, επιπεφυκίτιδα, και εντερίτιδα⁵¹. Ο ιός καλύπτεται από πρωτεϊνικό καψίδιο που έχει τη μορφή εικοσάεδρου με 12 μακριές ράβδους να προεξέχουν από τις ακμές του. Το μεγαλύτερο μέρος της μάζας του καψιδίου αποτελείται από την πρωτεΐνη εξόνη, ενώ τα άλλα δύο συστατικά του (η βάση πεντόνης και η ράβδος) σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα σε κάθε μία από τις 12 ακμές που προεξέχουν του ισωματίου. Ο ιός προσκολλάται στα κύτταρα μέσω της αλληλεπίδρασης της πρωτεϊνικής ράβδου με τον υποδοχέα του αδενοϊκού Coxsackie (CAR, δέσμευση υψηλής συγγένειας) και μέσω της αλληλεπίδρασης της βάσης πεντόνης με την ιντεγκρίνη αV (χαμηλής συγγένειας δέσμευση)^{52,53}. Μετά την προσκόλληση και την ενδοκυττάρωση, ο ιός μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου ξεκινά η μεταγραφή και η αντιγραφή του γονιδιώματός του, περίπου 6-8 ώρες περίπου μετά τη μόλυνση. Το πολύπλοκο γονιδίωμα του αδενοϊκού συνοψίζεται στην Εικόνα 7. Οργανώνεται σε 4 κωδικοποιούσες περιοχές (ονομαζόμενες E1 έως E4), οι οποίες συνορεύουν πλευρικά με δύο ακραίες πλευρικές επαναλήψεις (ITR) με μήκος 103 bp και φέρουν ένα σήμα πακεταρίσματος δίπλα στο 5' ITR. Η περιοχή E1 κωδικοποιεί αποπτωτικές πρωτεΐνες που επάγουν τον κυτταρικό θάνατο του κυττάρου ξενιστή και η δράση τους εξισορροπείται από μία ομάδα πρωτεϊνών, που κωδικοποιούνται από την περιοχή E2. Η περιοχή E3 κωδικοποιεί πρωτεΐνες που τροποποιούν την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή και η E4 πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την όψιμη γονιδιακή έκφραση.

Παραγωγή του αδενοϊκού φορέα

Οι διαθέσιμοι αδενοϊκοί φορείς (Ad) έχουν προέλθει από τους αδενοϊκούς που ανήκουν στους ορότυπους 2 και 5. Αυτοί οι ορότυποι επελέγησαν γιατί έχουν υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού και είναι μη ογκογόνοι στα ζωικά μοντέλα⁵⁴. Η βασική αρχή που διέπει την ανάπτυξη των Ad φορέων είναι παρόμοια με εκείνη των ρετροϊών. Οι αλληλουχίες που είναι απαραίτητες *in cis* διατηρούνται στη γονιδιακή κατασκευή του πλασμιδίου φορέα, ενώ η γονιδιακή κατασκευή του πλασμιδίου βοηθού παρέχει τις πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τη συναρμολόγηση του ιικού φορέα. Ad φορείς ανίκανοι πολλαπλασιασμού, παρήχθησαν αρχικά με απαλοιφή της περιοχής E1 και αντικατάστασής της από το διαγονίδιο. Οι απαλοιφές προκαλούνται μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού μεταξύ 2 στοιχείων ενός πλήρους Ad γονιδιώματος και ενός πλασμιδίου που φέρει ένα διαγονίδιο που περιβάλλεται από



Εικόνα 7. Διαγραμματική αναπαράσταση της παραγωγής του απαλειμένου E1 αδενοϊκού φορέα. Το μήκους 36 kb γονιδίωμα του αδενοϊού απεικονίζεται στο επάνω μέρος της εικόνας. Το γονιδίωμα οργανώνεται σε τέσσερις λειτουργικές επικράτειες (E1 έως 4) που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με ποικίλες λειτουργίες. Οι κωδικοποιούσες περιοχές πλαισιώνονται από δύο αναστραμμένες ακραίες επαναλήψεις (ITR), ενώ το σήμα πακεταρίσματος Ψ βρίσκεται δίπλα στο 5' ITR. Τα βέλη υποδεικνύουν την κατεύθυνση των πρώιμων μεταγράφων. Η παραγωγή του E1 απαλειμένου Ad φορέα εξαρτάται από την επιτυχή ανασυνδυασμό μεταξύ του Ad γονιδιώματος και ενός πλασμιδίου που φέρει το διαγονίδιο. Το διαγονίδιο πλαισιώνεται από αλληλουχίες DNA που εδράζονται ανοδικά και καθοδικά της περιοχής E. Μετά από διαμόλυνση μιας κυτταρικής σειράς και με τα δύο πλασμίδια, ο ανασυνδυασμός μεταξύ των ομόλογων περιοχών έχει ως αποτέλεσμα την εκτομή της περιοχής E1 και την εισαγωγή του διαγονιδίου στο γονιδίωμα του Ad. Μια παρόμοια στρατηγική μπορεί να εφαρμοστεί για να παραχθούν Ad φορείς με απαλοιφές σε άλλες περιοχές του γονιδιώματος τους.

αλληλουχίες ομόλογες με τις περιοχές όπου πρόκειται να πραγματοποιηθεί η ένθεση (Εικόνα 7)⁵⁵. Οι ιικοί φορείς παράγονται στην κυτταρική σειρά 293T, η οποία περιέχει τις E1 πρωτεΐνες. Αυτό το σύστημα είναι εξαιρετικά αποδοτικό και μπορεί να παράγει συνήθως 10^{11} ιοσωμάτια/ml. Παρόλα αυτά οι φορείς με απαλοιφή της περιοχής E1 έχουν περιορισμένη κλωνοποιητική χωρητικότητα (περίπου 7kb) και διατηρούν ένα βαθμό κυτταροτοξικότητας αφού το 80% του ιικού γονιδιώματος διατηρείται. Οι προσπάθειες επίλυσης του προβλήματος αυτού έχουν επικεντρωθεί στην ανάπτυξη φορέων με μεγαλύτερες απαλοιφές, όπως απαλοιφή E1/E2 και E3/E4⁵⁶. Μακροχρόνια έκφραση του διαγονιδίου με αυτούς τους ιικούς φορείς που φέρουν τις απαλοιφές έχει περιγραφεί *in vivo* αλλά η ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης από τις Ad πρωτεΐνες διέγειρε την έρευνα για την ανάπτυξη φορέων χωρίς αδενοϊκά γονίδια (επονομαζόμενοι και gutless)⁵⁷⁻⁵⁹. Μείζον πλεονέκτημά τους είναι η μειωμένη κυτταροτοξικότητα και η χωρητικότητα που ξεπερνά τα 30kb αλλά επιδεικνύουν αστάθεια του γονιδιώματός ενώ αποδίδουν χαμηλούς ιικούς τίτλους.

Χρησιμότητα Ad φορέων

Οι φορείς αυτοί είναι κατάλληλοι για χορήγηση *in vivo* αφού δεν αδρανοποιούνται από το ανθρώπινο σύμπληρωμα. Μπορούν να παραχθούν με υψηλούς τίτλους και να επιμολύνουν ένα μεγάλο εύρος διαιρούμενων και αδρανών κυττάρων μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται τα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών, τα ηπατοκύτταρα⁶⁰ καθώς και ένα σημαντικό αριθμό νεοπλασμάτων.

Περιορισμοί των Ad φορέων

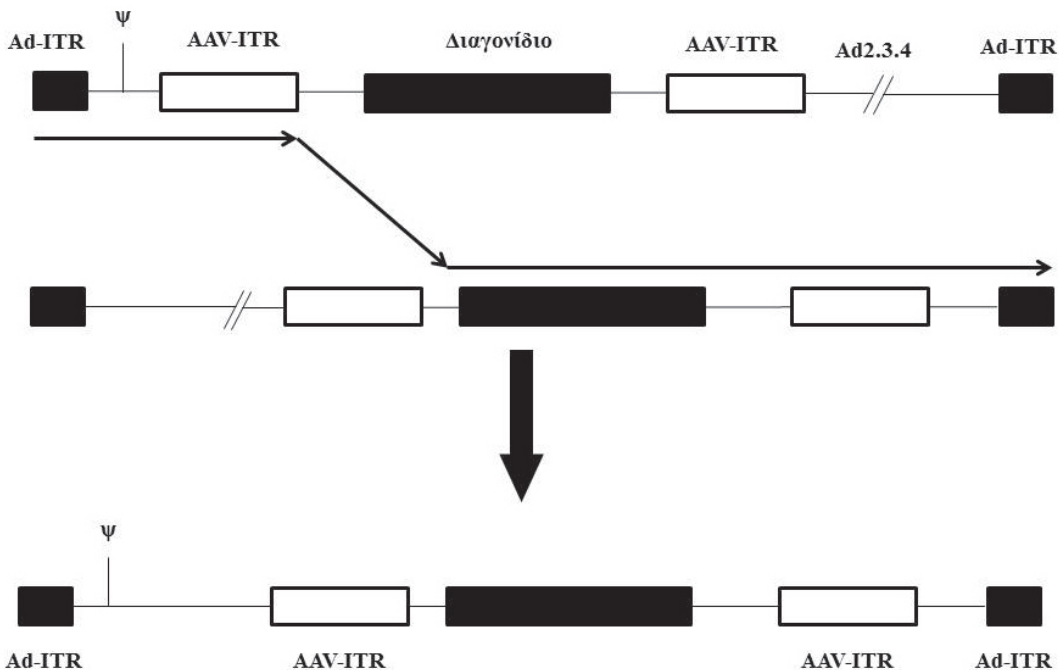
Το κύριο εμπόδιο στο πεδίο ανάπτυξης των φορέων Ad είναι ότι ο ιός είναι ανοσογονικός και αδρανοποιείται ταχέως μετά από επαναχορήγηση. Για την επίλυση του προβλήματος της ανοσογονικότητας έχουν γίνει προσπάθειες να αφαιρεθούν από το φορέα όλες οι περιοχές που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του ιού. Παρόλα αυτά, έχει αποδειχτεί ότι ακόμα και πλήρως αδρανοποιημένοι ιοί μπορούν να εγείρουν ανοσολογικές αποκρίσεις, οι οποίες πιθανά προκαλούνται από τα πρωτεϊνικά συστατικά του καμινιδίου.

ου του ιοσωματίου⁶¹. Οι ερευνητικές προσπάθειες για την επίλυση του προβλήματος αυτού επικεντρώνονται στην τροποποίηση της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή στο διάστημα της χορήγησης (παρεμπόδιση της δράσης του TNF-α ή του προσδέτη CD40)⁶². Ένας άλλος περιορισμός με τους Ad ιικούς φορείς είναι ότι ο ανθρώπινος πληθυσμός διαθέτει ήδη αντισώματα για τον ορότυπο 5, γεγονός το οποίο θα περιορίζει τη βιοδιαθεσιμότητα των ικών φορέων σε *in vivo* χορήγηση. Η λύση σ' αυτό επιχειρείται να δοθεί με την παραγωγή ενός Ad ικού φορέα με χημικτικές πρωτεΐνες καψιδίου που θα διαφεύγουν της εκκαθάρισης/του ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος. Παρόλα αυτά η παρουσία αντισωμάτων δεν επηρεάζει την *in situ* χορήγηση του ικού φορέα (παραδείγματος χάριν έγχυση εντός της μάζας του στερεού όγκου)⁶³. Τέλος οι Ad φορείς δεν είναι κατάλληλοι για μόνιμη διόρθωση γονιδιακών νόσων αφού δεν ενσωματώνονται στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή.

Υβριδικοί Άδενο-AAV (AdAAV) φορείς

Η ιδέα πίσω από την ανάπτυξη των φορέων αυτών

είναι η παραγωγή ενός συστήματος γονιδιακής μεταφοράς που θα κατείχε τα επιθυμητά χαρακτηριστικά καθενός εκ των αρχικών ιών. Οι φορείς AdAAV συνδυάζουν την υψηλή απόδοση παραγωγής και τον ευρύ τροπισμό των Ad ικών φορέων με την ικανότητα των AAV ικών φορέων να εντίθενται στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή. Στην ουσία, αυτοί οι Ad ικοί φορείς χρησιμοποιούν το γονιδίωμα ενός AAV φορέα, πλήρες με τα ITR, το οποίο έχει κλωνοποιηθεί στον γονιδιακό τόπο E1 του αδενοϊού (Εικόνα 8). Κατά τη διάρκεια της παραγωγής του ικού φορέα σε μία κυτταρική σειρά πακεταρίσματος, η αναδιάταξη του DNA οδηγεί στο σχηματισμό ενός γονιδιώματος εντός των αδενοϊκών ITR, που περιλαμβάνει το σήμα πακεταρίσματος του αδενοϊού και το τμήμα του AAV γονιδιώματος του ικού φορέα. Αυτό το ικό γονιδίωμα μπορεί να πακεταριστεί με το καψίδιο του αδενοϊού και να χρησιμοποιηθεί ώστε να επιμολύνει τα κύτταρα στόχους, ενώ μπορεί επίσης να εντεθεί στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή μέσω των AAV ITR που διαθέτει⁶⁴. Τέτοιοι φορείς μπορούν να παραχθούν σε υψηλούς σε υψηλούς τίτλους, ενώ η ανοσογονικότητά τους αναμένεται να είναι σημαντικά μειωμένη αφού δεν περιέχουν καμία από τις αδενοϊκές πρωτεΐνες.



Εικόνα 8. Διαγραμματική απεικόνιση ενός υβριδικού Άδενο-AAV ικού φορέα. Ο γονικός Ad ικός φορέας στην κορυφή της εικόνας διαθέτει ένα AAV φορέα κλωνοποιημένο στη θέση της Ad περιοχής E1. Μετά τη διαμόλυνση σε ένα κύτταρο παραγωγό, οι ομόλογες περιοχές των γονιδιωμάτων των Ad φορέων ανασυνδυάζονται και η DNA πολυμεράση μπορεί να αλλάξει εκμαγεία (όπως υποδηλώνεται και από τα βέλη): το καθαρό αποτέλεσμα είναι η εκτομή του υπόλοιπου Ad γονιδιώματος και η παραγωγή ενός μικρού μεγέθους φορέα DNA. Αυτός ο μικρός φορέας υβρίδιο διατηρεί τα σήματα πακεταρίσματος του Ad και μπορεί να πακεταριστεί ως ένα αδενοϊκό σωματίο. Επιπλέον, η παρουσία των AAV-ITR επιτρέπει την αποδοτική ένθεση του ιού στο κύτταρο ξενιστή.

Συμπεράσματα

Το πρώτο πείραμα γονιδιακής μεταφοράς με ρετροϊκό φορέα σε κύτταρα θηλαστικού πραγματοποιήθηκε πριν από 30 χρόνια περίπου, ενώ η πρώτη κλινική μελέτη σε ανθρώπους για την έλλειψη της ADA συμπληρώνει πλέον τα 24 έτη και θεωρείται επιτυχημένη. Αποδοτική γονιδιακή μεταφορά σε πολλούς ιστούς στόχους επετεύχθη και *in vitro* και *in vivo*, αλλά υπάρχουν πολλά σημεία που χρήζουν βελτίωσης προτού η γονιδιακή θεραπεία να μπορεί να αποδώσει το πλήρες φάσμα των δυνατοτήτων της. Τα πεδία όπου αναμένονται μελλοντικές βελτιώσεις είναι α) η ειδική και αποδοτική ως προς τον κυτταρικό τύπο γονιδιακή μεταφορά, μέσω ιών που έχει τροποποι-

ηθεί ο φάκελός τους, β) η ρύθμιση της έκφρασης ενός γονιδιακού προϊόντος από στοιχεία που αποκρίνονται σε φαρμακευτικές ουσίες και τα οποία εμπεριέχονται στον θεραπευτικό ιικό φορέα, γ) η εντοπισμένη ένθεση του θεραπευτικού φορέα σε συγκεκριμένο σημείο του γονιδιώματος και η *in situ* επιδιόρθωση μονογονιδιακών διαταραχών και δ) η μακροχρόνια έκφραση από τους ιικούς φορείς, οι οποίοι είναι κατάλληλα μονωμένοι από την περιβάλλουσα χρωματίνη⁶⁵. Εφόσον τα περισσότερα από τα παραπάνω ζητήματα επιλυθούν, η γονιδιακή θεραπεία θα μπορούσε να παρέχει λύσεις σε έναν αριθμό προβλημάτων όπου η παραδοσιακή φαρμακολογία είναι κάθε άλλο παρά επιτυχημένη.

Basic principles of viral gene therapy vectors

by George Vassilopoulos^{1,2}, Manolis Simantirakis¹

¹Affiliate Investigator Cell and Gene Therapy Laboratory, BRFAA, Athens, ²Division of Hematology, Larisa University Hospital, University of Thessaly, Greece

ABSTRACT Gene transfer technology has been developed based on retroviruses, AAV and adeno-viruses. The basic principle for every vector development is based on the delineation of the regulatory *in cis* sequences and the helper *in trans* functions. Next technological steps have focused on the choice of proper promoters and chromatin insulators. Although vector improvements over the last 30 years are substantial and have led to clinical trials, the technology is still costly and has significant side effects from insertional mutagenesis. This has resulted in a shift towards gene editing technology and the use of vectors that can mediate genetic correction *in situ* (such as AAV).

Βιβλιογραφία

- Mulligan RC. The basic science of gene therapy. *Science*. 1993; 260:926-932.
- Miller AD, Eckner RJ, Jolly DJ et al. Expression of a retrovirus encoding human HPRT in mice. *Science*. 1984; 225:630-632.
- Williams DA, Lemischka IR, Nathan DG, Mulligan RC. Introduction of new genetic material into pluripotent haematopoietic stem cells of the mouse. *Nature*. 1984; 310:476-480.
- Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE. *Retroviruses*: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; 1997.
- Miller AD. Cell-surface receptors for retroviruses and implications for gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93:11407-11413.
- Kavanaugh MP, Miller DG, Zhang W, et al. Cell surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91:7071-7075.
- Kiem HP, Heyward S, Winkler A, et al. Gene transfer into marrow repopulating cells: comparison between amphotropic and gibbon ape leukemia virus pseudotyped retroviral vectors in a competitive repopulation assay in baboons. *Blood*. 1997; 90:4638-4645.
- Kiem HP, Andrews RG, Morris J et al. Improved gene transfer into baboon marrow repopulating cells using recombinant human fibronectin fragment CH-296 in combination with interleukin-6, stem cell factor, FLT-3 ligand, and megakaryocyte growth and development factor. *Blood*. 1998; 92:1878-1886.
- Burns JC, Friedmann T, Driever W et al. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells [see comments]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:8033-8037.
- Miller DG, Adam MA, Miller AD. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection [published erratum appears in *Mol Cell Biol*. 1992; 12:433]. *Mol Cell Biol*. 1990; 10: 4239-4242.
- Naldini L, Blomer U, Gallay P, et al. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector [see comments]. *Science*. 1996; 272:263-267.

12. Russell DW, Miller AD. Foamy virus vectors. *J Virol.* 1996; 70:217-222.
13. Schliephake AW, Rethwilm A. Nuclear localization of foamy virus Gag precursor protein. *J Virol.* 1994; 68:4946-4954.
14. Bukrinsky MI, Haggerty S, Dempsey MP, et al. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells [see comments]. *Nature.* 1993; 365:666-669.
15. Chen WY, Bailey EC, McCune SL, et al. Reactivation of silenced, virally transduced genes by inhibitors of histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94:5798-5803.
16. Challita PM, Kohn DB. Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91:2567-2571.
17. Robbins PB, Skelton DC, Yu XJ, et al. Consistent, persistent expression from modified retroviral vectors in murine hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:10182-10187.
18. Miller AD, Miller DG, Garcia JV, Lynch CM. Use of retroviral vectors for gene transfer and expression. *Methods Enzymol.* 1993; 217:581-599.
19. Miller AD. Retroviral vectors. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1992; 158:1-24.
20. Miller AD, Buttimore C. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol Cell Biol.* 1986; 6:2895-2902.
21. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest.* 2008; 118:3132-3142.
22. Lochelt M, Muranyi W, Flügel RM. Human foamy virus genome possesses an internal, Bel-1-dependent and functional promoter. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90:7317-7321.
23. Trobridge GD, Russell DW. Helper-free foamy virus vectors. *Hum Gene Ther.* 1998; 9:2517-2525.
24. Chatziandreou I, Siapati EK, Vassilopoulos G. Genetic correction of X-linked chronic granulomatous disease with novel foamy virus vectors. *Exp Hematol.* 2011; 39:643-652.
25. Vassilopoulos G, Trobridge G, Josephson NC, Russell DW. Gene transfer into murine hematopoietic stem cells with helper-free foamy virus vectors. *Blood.* 2001; 98:604-609.
26. Josephson NC, Vassilopoulos G, Trobridge GD, et al. Transduction of human NOD/SCID-repopulating cells with both lymphoid and myeloid potential by foamy virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99:8295-8300.
27. Gallay P, Hope T, Chin D, Trono D. HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94:9825-9830.
28. Gallay P, Stitt V, Mundy C, et al. Role of the karyopherin pathway in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *J Virol.* 1996; 70:1027-1032.
29. Miyoshi H, Smith ÉÁ, Mosier DE, et al. Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science.* 1999; 283: 682-686
30. Park F, Ohashi K, Chiu W, et al. Efficient lentiviral transduction of liver requires cell cycling in vivo. *Nat Genet.* 2000; 24:49-52.
31. Korin YD, Zack JA. Progression to the G1b phase of the cell cycle is required for completion of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription in T cells. *J Virol.* 1998; 72:3161-3168
32. Muzyczka N. Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1992; 158:97-129.
33. Summerford C, Samulski RJ. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol.* 1998; 72:1438-1445.
34. Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ. AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection [see comments]. *Nat Med.* 1999; 5:78-82.
35. Russell DW, Alexander IE, Miller AD. DNA synthesis and topoisomerase inhibitors increase transduction by adeno-associated virus vectors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92:5719-5723.
36. Weitzman MD, Kyostio SR, Kotin RM, Owens RA. Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91:5808-5812.
37. Rutledge EA, Russell DW. Adeno-associated virus vector integration junctions. *J Virol.* 1997; 71:8429-8436.
38. Yang CC, Xiao X, Zhu X, et al. Cellular recombination pathways and viral terminal repeat hairpin structures are sufficient for adeno-associated virus integration in vivo and in vitro. *J Virol.* 1997; 71:9231-9247.
39. Fisher KJ, Jooss K, Alston J, et al. Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy. *Nat Med.* 1997; 3:306-312.
40. Miao CH, Snyder RO, Schowalter DB, et al. The kinetics of rAAV integration in the liver [letter]. *Nat Genet.* 1998; 19:13-15.
41. Koeberl DD, Alexander IE, Haibert CL, et al. Persistent expression of human clotting factor IX from mouse liver after intravenous injection of adeno-associated virus vectors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94:1426-1431.
42. Kaplitt MG, Leone P, Samulski RJ, et al. Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nat Genet.* 1994; 8:148-154.
43. Flotte TR, Afione SA, Conrad C, et al. Stable in vivo expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno-associated virus vector. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90:10613-10617.
44. Hargrove PW, Vanin EF, Kurtzman GJ, Nienhuis AW. High-level globin gene expression mediated by a recombinant adeno-associated virus genome that contains the 3' gamma globin gene regulatory element and integrates as tandem copies in erythroid cells. *Blood.* 1997; 89:2167-2175.
45. Russell DW, Kay MA. Adeno-associated virus vectors and hematology. *Blood.* 1999; 94:864-874.
46. Herzog RW, Hagstrom JN, Kung SH, et al. Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94:5804-5809.

47. Snyder RO, Miao C, Meuse L, et al. Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors [see comments]. *Nat Med.* 1999; 5:64-70.
48. Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med.* 2011; 365:2357-2365.
49. Russell DW, Hirata RK. Human gene targeting by viral vectors [see comments]. *Nat Genet.* 1998; 18:325-330.
50. Haibert CL, Standaert TA, Wilson CB, Miller AD. Successful readministration of adeno-associated virus vectors to the mouse lung requires transient immunosuppression during the initial exposure. *J Virol.* 1998; 72:9795-9805.
51. Yeh P, Perricaudet M. Advances in adenoviral vectors: from genetic engineering to their biology. *Faseb J.* 1997; 11:615-623.
52. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, et al. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science.* 1997; 275:1320-1323.
53. Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, Nemerow GR. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 1993; 73:309-319.
54. Hitt MM, Addison CL, Graham FL. Human adenovirus vectors for gene transfer into mammalian cells. *Adv Pharmacol.* 1997; 40:137-206.
55. Crouzet J, Naudin L, Orsini C, et al. Recombinational construction in *Escherichia coli* of infectious adenoviral genomes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94:1414-1419.
56. Lusky M, Christ M, Rittner K, et al. In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. *J Virol.* 1998; 72:2022-2032.
57. Gao GP, Yang Y, Wilson JM. Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy. *J Virol.* 1996; 70:8934-8943.
58. Clemens PR, Kochanek S, Sunada Y, et al. In vivo muscle gene transfer of full-length dystrophin with an adenoviral vector that lacks all viral genes. *Gene Ther.* 1996; 3:965-972.
59. Kochanek S, Clemens PR, Mitani K, et al. A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and betagalactosidase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93:93:933-938.
60. Morsy MA, Gu M, Motzel S, et al. An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:7866-7871.
61. Kafri T, Morgan D, Krahl T, et al. Cellular immune response to adenoviral vector infected cells does not require de novo viral gene expression: implications for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:11377-11382.
62. Yang Y, Su Q, Grewal IS, et al. Transient subversion of CD40 ligand function diminishes immune responses to adenovirus vectors in mouse liver and lung tissues. *J Virol.* 1996; 70:6370-6377.
63. Bramson JL, Hitt M, Gaudie J, Graham FL. Preexisting immunity to adenovirus does not prevent tumor regression following intratumoral administration of a vector expressing IL-12 but inhibits virus dissemination. *Gene Ther.* 1997; 4:1069-1076.
64. Lieber A, Steinwaerder DS, Carlson CA, Kay MA. Integrating adenovirus-adenovirus hybrid vectors devoid of all viral genes. *J Virol.* 1999; 73:9314-9324.
65. Emery DW, Yannaki E, Tubb J, Stamatoyannopoulos G. A chromatin insulator protects retrovirus vectors from chromosomal position effects. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97:9150-9155.