

Η τεχνολογία της γονιδιακής μεταφοράς: Μη-ϊικοί φορείς

Αριστείδης Γιαννακόπουλος, Ελεάνα Φ. Σταύρου, Αγλαΐα Αθανασιάδου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ: Οι μη-ϊικοί φορείς γονιδιακής μεταφοράς είναι συνήθως πλασμίδια, η βασική δομή των οποίων περιλαμβάνει το προς μεταφορά γονίδιο ή διαγονίδιο με τον κατάλληλο υποκινητή, μια θέση έναρξης της αντιγραφής του DNA και συνήθως, ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό για την ανάπτυξη τους σε βακτήρια. Οι μη-ϊικοί φορείς δεν έχουν τη δυνατότητα μεταφοράς του DNA τους σε κύτταρα και έτσι απαιτείται η χρήση μεθόδων φυσικών ή χημικών προς τον σκοπό αυτό. Το κύριο πλεονέκτημα τους είναι η μη ενσωμάτωση τους στο ενδογενές γενετικό υλικό του κυττάρου και έτσι αποφεύγεται η πρόκληση ογκογένεσης και σχετικών προβλημάτων των ιικών φορέων. Απόρροια αυτού είναι και το κύριο μειονέκτημα των μη-ϊικών φορέων, καθότι η μη ενσωμάτωση στερεί από αυτούς τη δυνατότητα του πλήρους μιτωτικού διαχωρισμού που ακολουθούν τα χρωμοσώματα, με αποτέλεσμα το πλασμίδιο να μην βρίσκεται σε όλα τα θυγατρικά κύτταρα και να παρατηρείται το φαινόμενο της «απόλειας πλασμιδίων» σε αναπτυσσόμενους κυτταρικούς πληθυσμούς. Ως εκ τούτου, ένα μέρος της έρευνας με μη-ϊικούς φορείς εστιάζεται στον προσδιορισμό πρόσθετων στοιχείων, που είναι σε θέση να προσδώσουν στον φορέα τη δυνατότητα εγκατάστασης στον πυρήνα του κυττάρου για μακρύ χρονικό διάστημα ως μια αυτόνομη, αναπαραγόμενη μονάδα γενετικού υλικού. Οι κύριοι μη-ϊικοί φορείς είναι οι αναπαραγόμενοι επισωματικοί φορείς και τα παράγωγα τους. Οι πρώτοι παραμένουν στον πυρήνα του κυττάρου-ξενιστή ως αυτόνομες αναπαραγόμενες μονάδες και ο διπλασιασμός του DNA τους εξασφαλίζεται από ειδική θέση έναρξης της αντιγραφής, που προέρχεται από ένα ιό, οι πιο αναπτυγμένοι από τον ιό EBV και κυρίως τον SV40. Οι φορείς αυτοί έχουν γίνει ικανοί να εγκαθίστανται στον πυρήνα με την προσθήκη ενός τμήματος από το DNA του ανθρώπου που λέγεται Scaffold/Matrix Attachment Region - S/MAR. Τα S/MAR περιοχές πλούσιες σε TA, βρίσκονται διάσπαρτα στο γονιδίωμα και έχουν τον ρόλο του σχηματισμού 'συνόρου' (boundary element) μεταξύ των διαφόρων περιοχών χρωματίνης (chromatin loops) και της πρόσδεσης των χρωμοσωμάτων στη θεμέλια ουσία του πυρήνα ώστε να εξυπηρετείται η αρχιτεκτονική του κυττάρου και η μεταγραφή του διαγονιδίου του. Τέτοιοι φορείς έχει δείχθει ότι είναι λειτουργικοί σε πειράματα *in vitro* καθώς και *in vivo* με πειράματα σε οργανισμούς. Ιδιαίτερα, έχει δείχθει ότι είναι ικανοί για σταθερή διαμόλυνση αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων CD34+ και ότι υποστηρίζουν την έκφραση αιμοσφαιρικών γονιδίων. Παράγωγα των αναπαραγόμενων επισωματικών φορέων είναι δύο τύποι φορέων, που δεν φέρουν προκαρυωτικές αλληλουχίες DNA: (1) Ο φορέας pFAR (free of antibiotic resistance) που εκ κατασκευής, δεν περιέχει γονίδιο αντίστασης σε αντιβιοτικό. Ως εκ τούτου δεν είναι δυνατή η παραγωγή του σε κοινά βακτήρια, παρά μόνο σε ειδικό στέλεχος της E. Coli. (2) Ο φορέας τύπου minicircle, κυκλικός μη ιικός φορέας που περιέχει μόνο την ευκαρυωτική κασέτα που φέρει το διαγονίδιο και παράγεται μέσω ανασυνδυασμού *in vivo* από ένα αρχικό πλασμίδιο. Τέλος, στους μη-ϊικούς φορείς εντάσσεται και ο φορέας του συστήματος τρανσποζονίου/τρανσποζάσης SB100X, ο οποίος ενσωματώνεται στο γενετικό υλικό και συνδυάζει σταθερή και μακρά έκφραση του διαγονιδίου, ενώ η ενσωμάτωση του στο γονιδίωμα θεωρείται ασφαλέστερη από αυτή των ρετροϊών διότι είναι τυχαία, χωρίς προτίμηση σε εξόνια ή αλληλουχίες ρυθμιστικών περιοχών. Το σύστημα SB έχει χρησιμοποιηθεί σε προκλινικές και κλινικές δοκιμές.

Haema 2016; 7(1): 72-80 Copyright EAE

Εισαγωγή

Οι μη ιικοί φορείς γονιδιακής μεταφοράς αποτελούνται γενικά από ένα “γυμνό” μόριο νουκλεϊκού οξέος χωρίς πρωτεΐνες (“naked DNA”), το οποίο συνήθως είναι πλασμιδιακό DNA. Το πλασμίδιο αυτό φέρει το διαγονιδίο, η έκφραση του οποίου ελέγχεται από κατάλληλο υποκινητή, ίσως και άλλα ρυθμιστικά στοιχεία, μια αρχή της αντιγραφής του DNA καθώς και γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό για την επιλογή των διαμολυσμένων κυττάρων (προκαρυωτικών ή/και ευκαρυωτικών). Οι πλασμιδιακοί φορείς έχουν εξελιχθεί αρκετά ώστε να επιτυγχάνεται αποδοτική μεταφορά και μακρόχρονη έκφραση γονιδίων σε κύτταρα διαφόρων ιστών, με απώτερο σκοπό τη γονιδιακή θεραπεία. Περίπου το 25% των κλινικών πρωτοκόλλων γονιδιακής θεραπείας που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα βασίζονται σε πλασμιδιακούς φορείς¹. Πολλές ερευνητικές ομάδες, έχουν εξελίξει τους πλασμιδιακούς φορείς σε βαθμό τέτοιο ώστε να επιτυγχάνεται αποδοτική μεταφορά και μακρόχρονη έκφραση γονιδίων σε κύτταρα διαφόρων ιστών με σκοπό τη γονιδιακή θεραπεία.

Θα παρουσιαστούν τα κύρια πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των μη-ϊικών φορέων καθώς και οι τρόποι μεταφοράς τους σε κύτταρα ή οργανισμούς. Περαιτέρω θα παρουσιαστούν οι πλέον αναπτυγμένοι τύποι μη-ϊικών φορέων, οι οποίοι είναι οι επισωματικοί φορείς, τα πλασμίδια pFAR και minicircle, και το τρανσποζόνιο Sleeping Beauty.

Κύρια πλεονεκτήματα των ιικών φορέων γονιδιακής μεταφοράς

Τα μη ιικά συστήματα, θεωρητικά, μπορούν να γίνουν πιο εύκολα αποδεκτά στην κλινική πράξη ως μοντέλο γονιδιακής θεραπείας, από ότι τα ιικά συστήματα γονιδιακής μεταφοράς. Και αυτό γιατί εμφανίζουν μερικά βασικά πλεονεκτήματα όπως:

1) Έχουν πολύ μικρή έως μηδαμινή πιθανότητα να δημιουργήσουν κάποιο αυτό-αναπαραγόμενο σύστημα επικίνδυνο για τον οργανισμό κατά τα στάδια παραγωγής τους όπως μπορεί να γίνει με τα ιικά συστήματα. Παρόλο που η ασφάλεια των ιικών φορέων έχει εξελιχθεί σε πολύ μεγάλο βαθμό η θεωρητική πιθανότητα κάποιου πιθανού ανασυνδυαστικού γεγονότος δεν είναι μηδενική^{2,3}.

2) Τα μη ενσωματούμενα μη ιικά συστήματα έχουν πολύ μικρότερη πιθανότητα πρόκλησης διαταραχών στο γονιδίωμα από ενσωμάτωση, ένα υπαρκτό πρόβλημα των ιικών συστημάτων⁴ και με δραματικές συνέπειες σε προηγούμενες κλινικές δοκιμές γονιδιακής θεραπείας^{5,6}.

3) Δυνητικά μπορεί να έχουν μικρότερη τοξικότητα και ανοσογονικότητα για το κύτταρο λόγω απουσίας προκαρυωτικών αλληλουχιών.

4) Η παραγωγή τους σε μεγάλη κλίμακα για κλινικές δοκιμές είναι αρκετά πιο εύκολη από αυτή των ιικών συστημάτων και λιγότερο πολύπλοκη καθ' όσον, (α) δεν περιλαμβάνει κυτταρικούς βιο-αντιδραστήρες όπως απαιτείται για την παραγωγή ιικών σωματιδίων και (β) δεν επιβάλλεται συνεχής παρακολούθηση και έλεγχος όπως στα ιικά συστήματα, για την αποφυγή φαινομένων ανασυνδυασμού κατά τη διάρκεια της παραγωγής τους^{7,8}.

5) Δεν έχουν τους περιορισμούς που προκύπτουν από τον τροπισμό των ιικών συστημάτων και επομένως έχουν τη δυνατότητα να μεταφέρουν γονίδια και να υποστηρίξουν την έκφραση τους σε οποιοδήποτε ιστό, εφόσον φέρουν τον κατάλληλο ιστό-ειδικό υποκινητή.

6) Έχουν τη δυνατότητα μεταφοράς μεγάλων τμημάτων DNA, γεγονός που δίνει τη δυνατότητα μεταφοράς και ρυθμιστικών αλληλουχιών μαζί με το γονίδιο.

Κύρια μειονεκτήματα των μη ιικών φορέων

- Σχετικά χαμηλή και παροδική διαμόλυνση που επιτυγχάνουν⁹
- Αυξημένη πιθανότητα απώλειας του πλασμιδίου κατά τη μιτωτική διαίρεση του κυττάρου
- Πιθανή αποσιώπηση της έκφρασης του διαγονιδίου που φέρει το πλασμίδιο
- Πιθανή τοξικότητα των χημικών κυρίως μέσω γονιδιακής μεταφοράς (όπως τα λιποσώματα) χωρίς ωστόσο να υπάρχουν βάσιμα ανησυχητικά δεδομένα.

Τρόποι μεταφοράς γενετικού υλικού στα κύτταρα ή οργανισμό

Οι μη ιικοί -πλασμιδιακοί - φορείς, αντίθετα με τους ιικούς φορείς-- δε έχουν ίδια ικανότητα εισόδου στα κύτταρα και χρειάζεται να συνδυαστούν με μια μέθοδο γονιδιακής μεταφοράς, φυσική ή χημική. Η διαδικασία μεταφοράς ενός εξωγενούς γενετικού υλικού στα ευκαρυωτικά κύτταρα ονομάζεται *διαμόλυνση*. Γενικά, το προς μεταφορά μόριο DNA (ή RNA) έρχεται σε επαφή με την κυτταρική μεμβράνη και εισέρχεται στο κύτταρο με κάποια φυσική ή χημική μέθοδο. Η ανάπτυξη διαφόρων μεθόδων οφείλεται στην ανάγκη για γονιδιακή μεταφορά σε διαφορετικούς ιστούς ανάλογα με το είδος της γονιδιακής θεραπείας. Οι κύριες τεχνικές οι οποίες έχουν αναπτυχθεί είναι οι εξής:

1) Διαμόλυνση με χρήση λιποσωμάτων (*lipofection*)

Τα επονομαζόμενα λιποσώματα ή λιποσυμπλέγματα, δηλαδή μικκύλια θετικά φορτισμένων λιπιδίων που περιτοιχίζουν το μόριο DNA μπορούν να εισέλθουν στο

κύτταρο και να απελευθερώσουν το DNA στο κυτταρόπλασμα^{10,11}. Επίσης τα κατιονικά λιπίδια μπορούν να στοχεύσουν ακόμα και ειδικούς τύπους κυττάρων με τη χρήση κατάλληλων συνδετών στη δομή τους προσφέροντας ιστο-ειδικότητα.

2) Ηλεκτρομεταφορά ή ηλεκτροδιάτρηση (electroporation)

Η εφαρμογή μικρών σε χρονική διάρκεια ηλεκτρικών παλμών οδηγεί στη δημιουργία πόρων στην κυτταρική μεμβράνη. Έτσι τμήματα ή κυκλικά μόρια DNA όπως πλασμίδια μπορούν να εισέλθουν στο κυτταρόπλασμα¹².

3) Μεταφορά στον πυρήνα ή πυρηνοδιάτρηση (Nucleofection)

Αποτελεί μια ηλεκτροχημική διαδικασία που είναι συνδυασμός των δύο ανωτέρω μεθόδων. Εμφανίζει το πλεονέκτημα ότι ευνοεί την εισαγωγή του DNA απευθείας μέσα στον πυρήνα μέσω επαγόμενων πόρων στην πυρηνική μεμβράνη. Είναι η τεχνική που έχει επικρατήσει τα τελευταία χρόνια λόγω της υψηλής της απόδοσης για τη διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με διάφορους πλασμιδιακούς φορείς και όχι μόνο¹³.

4) Ένεση με εφαρμογή υδροδυναμικής πίεσης

Η γρήγορη ενδοφλέβια ένεση ικανού όγκου υγρού που περιέχει το μεταφερόμενο γενετικό υλικό σε πειραματόζωα δημιουργεί ροή τέτοια ώστε το DNA να εισάγεται κυρίως στα ηπατικά κύτταρα μέσω της πυλαίας φλέβας. Το μεταφερόμενο DNA μπορεί να ανιχνευθεί και σε άλλα όργανα¹⁴.

5) Αερολυματοποίηση του DNA

Η δημιουργία αερολύματος διαφόρων συμπλεγμάτων-DNA και η εισπνοή αυτού είναι χρήσιμη για τη μεταφορά γενετικού υλικού στον πνεύμονα και την προσπάθεια θεραπείας κυρίως της κυστικής ίνωσης¹⁵. Λόγω της συχότητας και της βαρύτητας της νόσου η μέθοδος αυτή μελετηθεί και εξελιχθεί σε πολύ μεγάλο βαθμό.

6) Μεταφορά γενετικού υλικού με τη χρήση υπερήχων

Η εφαρμογή παλμών υπερηχητικών κυμάτων έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πόρων και την εισαγωγή του DNA στα κύτταρα. Έχει χρησιμοποιηθεί σε γονιδιακή μεταφορά τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*¹⁶.

7) Γονιδιακή μεταφορά με βομβαρδισμό σφαιριδίων

Στην περίπτωση αυτή το DNA καθιλώνεται επάνω σε νάνο-σφαιρίδια που συνήθως είναι από χρυσό. Τα επικαλυμμένα με DNA σφαιρίδια τα προωθούνται με ταχύτητα στο δέρμα με τη βοήθεια ρεύματος αερίου. Η μέθοδος αυτή αποδοτική στη μεταφορά DNA στην επιδερμίδα¹⁷.

8) Ένεση γυμνού DNA με βελόνη

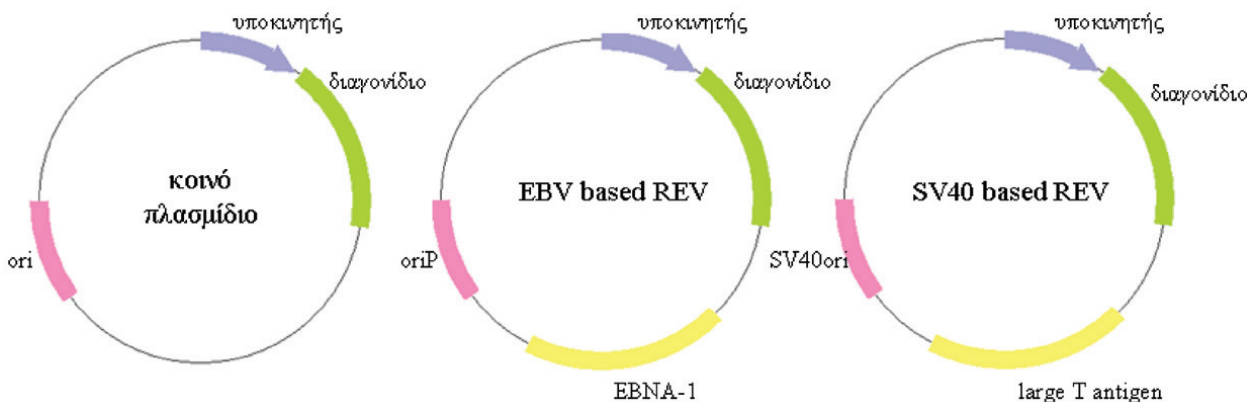
Έχει εφαρμοστεί κυρίως για τη διαμόλυνση μυϊκών ινών από γυμνό DNA¹⁸.

Οι αναπαραγόμενοι επισωματικοί φορείς

Οι αναπαραγόμενοι επισωματικοί φορείς (replicating episomal vectors, REVs) είναι μη-ϊικοί φορείς που έχουν την ιδιότητα να παραμένουν στον πυρήνα του κυττάρου-ξενιστή ως επισώματα, αυτόνομες αναπαραγόμενες μονάδες γενετικού υλικού, συνήθως χωρίς ενσωμάτωση στα χρωμοσώματα του κυττάρου. Ως εκ τούτου, εμφανίζουν το μεγάλο πλεονέκτημα να μην αλληλεπιδρούν με το γονιδίωμα και να μην διαταράσσουν τα μεταγραφικά προγράμματα του κυττάρου-ξενιστή^{19,20}. Ο διπλασιασμός του DNA σε αυτά τα πλασμίδια εξασφαλίζεται με την παρουσία ειδικών περιοχών “Εναρξης της Αντιγραφής”, που προέρχεται από ένα ιό (Εικόνα 1).

Τα επισώματα αυτά φέρουν γονίδια για τις πρωτεΐνες, τις EBNA-1 και Large T-Antigen, οι οποίες είναι τοξικές για τα κύτταρα. Τα πλασμίδια που περιέχει την αρχή διπλασιασμού DNA του ιού SV40 αποτέλεσε τη βάση ανάπτυξης επισωματικών φορέων που δεν περιέχουν το γονίδιο Large T-Antigen και ως εκ τούτου βρίσκονται σε λίγα αντίγραφα στα κύτταρα.

Ένα βασικό πρόβλημα των επισωματικών φορέων είναι το ότι χάνονται σιγά-σιγά καθώς αυξάνονται οι κυτταρικές διαιρέσεις, εκτός αν είναι σε θέση να εγκατασταθούν στον πυρήνα του κυττάρου ως αυτόνομα επισώματα, ικανά να διαχωριστούν σωστά κατά τη μίτωση. Η διατήρηση της επισωματικής κατάστασης των φορέων αυτών είναι δυνατόν να επιτευχθεί με την προσθήκη ενός στοιχείου S/MAR (Scaffold/Matrix Attachment Region). Τα στοιχεία S/MAR ανήκουν στα “boundary elements” χρωματίνης, καθότι συμβάλλουν στην οργάνωση των αγκύλων της χρωματίνης που καθορίζουν τα όρια ανεξάρτητων περιοχών της μέσω αλληλεπίδρασης με την πυρηνική θεμέλια ουσία^{21,22}. Η ανακάλυψη του ρόλου των S/MARs στη διαμεσολάβηση της επισωματικής διατήρησης γενετικών στοιχείων *in cis* επέτρεψε την ανάπτυξη του πρότυπου μικρού κυκλικού φορέα, του rEPI-1, που περιέχει το S/MAR προερχόμενο από την 5’ περιοχή του ανθρώπινου γονιδίου της ιντερφερόνης β και έχει την ιδιότητα

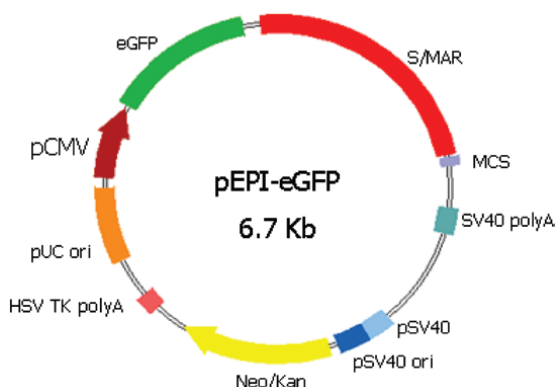


Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση ενός κοινού πλασμιδιακού φορέα έκφρασης, ενός επισωματικού φορέα βασιζόμενου στον ιό EBV και ενός επισωματικού φορέα βασιζόμενου στον ιό SV40.

να λειτουργεί ως επίσωμα, ανεξάρτητα από πρωτεΐνες ιϊκής προέλευσης^{23,24}. Η λειτουργία του σταθερού επισώματος, θεωρείται ότι βασίζεται στο ότι το S/MAR έχει την ικανότητα να στρατολογεί παράγοντες του κυττάρου οι οποίοι διαμεσολαβούν τόσο τη μιτωτική του σταθερότητα όσο και την επισωματική του αντιγραφή. Προϋπόθεση για την επισωματική διατήρηση των φορέων αυτών είναι η ενεργός μεταγραφή εντός της αλληλουχίας S/MAR²⁵.

Ο φορέας pEPI-1 όσο και παράγωγα του, όπως ο πρότυπος φορέας pEPI-eGFP (Εικόνα 2) που φέρει το γονίδιο αναφοράς eGFP, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε ερευνητικά πρωτόκολλα γονιδιακής μεταφοράς σε κυτταρικές σειρές και *in vivo*.

Ο φορέας pEPI-eGFP έχει δείξει ότι λειτουργεί ως επίσωμα *in vitro* σε καθιερωμένες κυτταρικές σειρές και σε πρωταρχικές καλλιέργειες κυττάρων^{26,27}, καθώς



Εικόνα 2. Ο φορέας pEPI-eGFP. Μικρό κυκλικό μόριο DNA που περιέχει την αλληλουχία S/MAR, το γονίδιο αναφοράς eGFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή του μεγακαρυοϊού (CMV), την αφητηρία έναρξης της αντιγραφής του DNA από τον ιό SV40 και τα γονίδια αντίστασης στα αντιβιοτικά νεομυκίνη και καμυκίνη (Neo/Kan). MCS: multiple cloning sites.

επίσης και *in vivo*, στο ήπαρ ποντικού²⁷. Επί πλέον έχει χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία γενετικά τροποποιημένου χοίρου²⁸.

Σημαντικές τροποποιήσεις του φορέα pEPI-eGFP είναι ο φορέας pEPito²⁹ από τον οποίο έχουν αφαιρεθεί μοτίβα CpG, που αποτελούν τη βάση μεθυλίωσης του DNA και αποσιώπησης του διαγονιδίου. Πρόσφατα, ένας πολλά υποσχόμενος υβριδικός φορέας δημιουργήθηκε - HCAdV-pEPito- με βάση τον αδενοϊό και τον φορέα pEPito, που συνδυάζει υψηλή ικανότητα μεταφοράς του φορέα με την επισωματική κατάσταση σε *in vitro* σε *in vivo* συστήματα³⁰.

Ο πρότυπος φορέας pEPI- eGFP διαμολύνει επαρκώς κύτταρα CD34+ από ομφάλιο λώρο και υποστηρίζει την παροδική έκφραση του διαγονιδίου⁹. Ένα άλλος επισωματικός φορέας ο οποίος, εκτός του S/MAR περιέχει και το χρωμοσωμικό στοιχείο IR (Initiation of Replication), που φυσιολογικά εδράζεται στο γενετικό τόπο του συμπλέγματος της β-σφαιρίνης, παρουσιάζει αυξημένη επάρκεια διατήρησης του επισώματος στο πυρήνα του κυττάρου εκ μεταφοράς³¹. Ο συνδυασμός των στοιχείων S/MAR και IR σε ένα άλλο φορέα επιτρέπει την έκφραση του γονιδίου αναφοράς σε διαφοροποιημένα κύτταρα, προερχόμενα από ημι-στερεές καλλιέργειες διαμολυσμένων κυττάρων CD34+ (Stavrou et al (a) submitted). Επίσης, έχει γίνει εφικτή η ενεργοποίηση του γ-σφαιρινικού γονιδίου σε CD34+ με επισωματικό φορέα που φέρει ένα πεπτίδιο δακτύλων ψευδαργύρου, ικανού να προσδεθεί στον υποκινητή του γΑ-σφαιρινικού γονιδίου (Stavrou et al (β) in preparation). Επί πλέον, επισωματικοί φορείς με βάση τον φορέα pEPI- eGFP υποστηρίζουν την παραγωγή φυσιολογικών επιπέδων β-σφαιρίνης σε κυτταρική σειρά³². Οι εργασίες αυτές, προοδευτικά, ενισχύουν την άποψη ότι μπορεί να είναι εφικτή στο μέλλον η χρήση επισωματικών φορέων για τη γονιδιακή θεραπεία των αιμοσφαιρινοπαθειών.

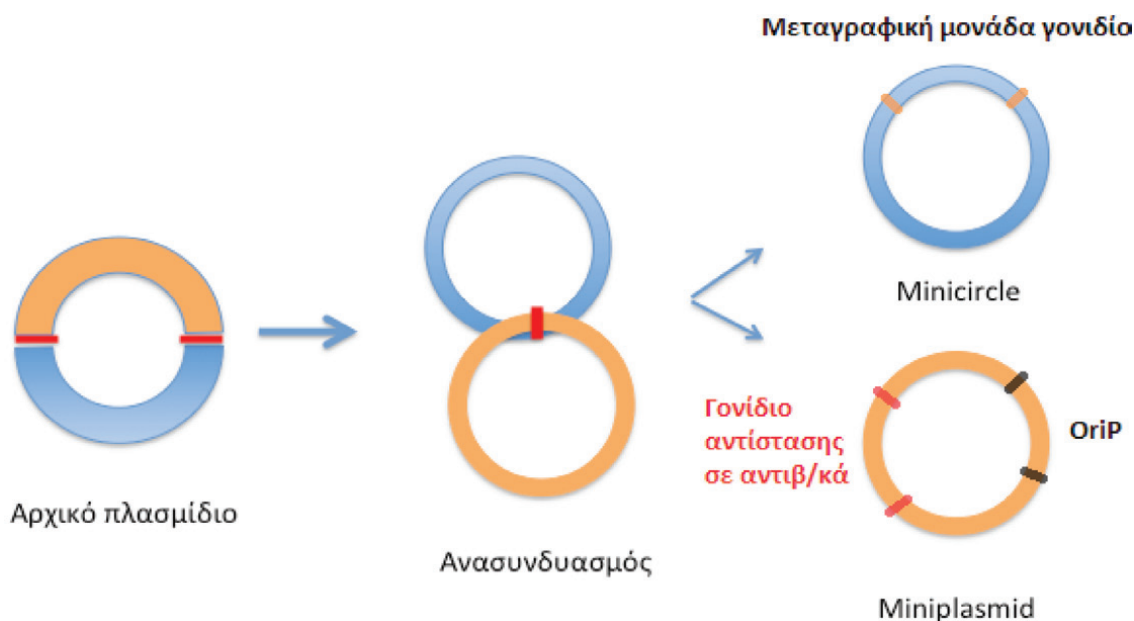
Μη-ϊικοί φορείς χωρίς βακτηριακά γονίδια

Κλασικά οι μη-ϊικοί φορείς αποτελούνται από πλασμιδιακό DNA που περιλαμβάνει, μεταξύ άλλων, γονίδιο αντίστασης σε αντιβιοτικό για την επιλογή του σε βακτήρια, απαραίτητο για την παραγωγή του πλασμιδίου-φορέα σε βακτήρια, πριν τη χρήση του σε εφαρμογές γονιδιακής θεραπείας. Όλες όμως οι αλληλουχίες βακτηριακής προέλευσης έχουν αρνητική επίδραση αφού μπορεί να προκαλέσουν απρόσμενες ανοσολογικές απαντήσεις και επίσης να οδηγήσουν σε αποσιώπηση του διαγονιδίου. Στο πλαίσιο της έρευνας για την αποφυγή του παραπάνω προβλήματος αναπτύχθηκαν 2 στρατηγικές:

1) Δημιουργία του φορέα pFAR (free of antibiotic resistance) που, εκ κατασκευής, δεν περιέχει γονίδιο αντίστασης σε αντιβιοτικό και άρα δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε βακτηριακή καλλιέργεια. Αυτό έγινε εφικτό χάρις σε μια γενετική τροποποίηση στελέχους της *E. Coli*. Στο βακτήριο αυτό έχει εισαχθεί μια μετάλλαξη στο γονίδιο *thyA*, που είναι απαραίτητο για τον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου. Το πλασμίδιο pFAR κωδικοποιεί ένα κατασταλτικό tRNA (suppressor tRNA) που οδηγεί στην παράκαμψη της μετάλλαξης και στην παραγωγή της συνθετάσης της θυμιδίνης με αποτέλεσμα το βακτήριο να μπορεί να πολλαπλασιαστεί μόνο παρουσία του πλασμιδίου. Δεδομένα από μεταφορά pFAR φορέων σε μύες, δέρμα καθώς και σε όγκους έδειξαν υψηλότερα επίπεδα και μεγαλύτερη διάρκεια έκφρασης του διαγονιδίου³³.

2) Δημιουργία των minicircles, κυκλικών μη-ϊικοί φορέων που περιέχουν μόνο την ευκαρυωτική κασέτα που

φέρει το διαγονίδιο. Τα minicircles παράγονται με τη δράση του ανασυνδυασμού *in vivo*, από ένα αρχικό πλασμίδιο. Το πλασμίδιο αυτό έχει την ευκαρυωτική κασέτα που οριοθετείται εκατέρωθεν από 2 αλληλουχίες στις οποίες προσδέεται η πρωτεΐνη ανασυνδυασμού, έναν παράγοντα επιλογής για τον πολλαπλασιασμό μέσα σε βακτήρια και το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ανασυνδυασμού οδηγούμενο από έναν επαγόμενο υποκινητή. Τα ένζυμα που έχουν χρησιμοποιηθεί για να επιτευχθεί αυτός ο ενδομοριακός ανασυνδυασμός ανήκουν σε 2 κύριες οικογένειες α) tyrosine recombinases όπως η ιντεγκράση του βακτηριοφάγου λάμδα, η Cre recombinase του βακτηριοφάγου P1 και η FLP recombinase του σακχαρομύκητα και β) serine recombinases όπως η ιντεγκράση του βακτηριοφάγου PhiC31 ή η ParA resolvase³⁴⁻³⁶. Μετά την παραγωγή του αρχικού πλασμιδίου σε μεγάλη ποσότητα σε καλλιέργειες *E. Coli* επάγεται η λειτουργία της recombinase και από το αρχικό πλασμίδιο δημιουργούνται 2 πλασμίδια το minicircle και ένα miniplasmid που έχει όλα τα υπόλοιπα στοιχεία (εικόνα 3). Ο καθαρισμός τους επιτυγχάνεται με χρωματογραφία. Τα minicircles επιτυγχάνουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου, καλύτερα επίπεδα διαμόλυνσης λόγω του μικρού του μεγέθους και γενικά αποφεύγονται όλα τα αρνητικά τα οποία προέρχονται από την εισαγωγή βακτηριακών αλληλουχιών σε ευκαρυωτικά κύτταρα (π.χ. ανοσογονικότητα, φαινόμενα γονιδιακής αποσιώπησης)²¹. Τελευταίως τα minicircles έχουν χρησιμοποιηθεί ως φορείς του συστήματος τρανσποζονίου-τρανσποζύσης με επιτυχία³⁷.



Εικόνα 3. Τα minicircles παράγονται από ένα αρχικό πλασμίδιο, Με τη δράση του *in vivo* ενδομοριακού ανασυνδυασμού. Έτσι δημιουργούνται 2 πλασμίδια: το minicircle που φέρει το διαγονίδιο και ένα miniplasmid ως παραπροϊόν που έχει όλα τα υπόλοιπα στοιχεία.

Ενσωματούμενο μη-ϊικό σύστημα γονιδιακής μεταφοράς

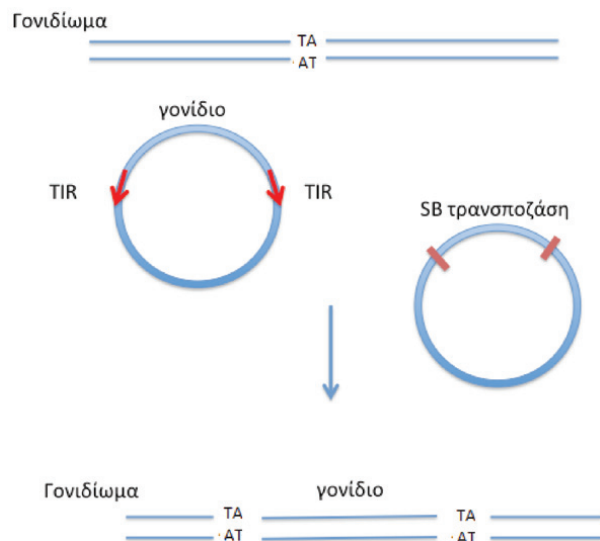
Τέτοιο σύστημα είναι το του τραπεζοζονίου που δι-αμεσολαβείται από την τραπεζοζάση και βρίσκεται σε συνεχή ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια. Βασική προϋ-πόθεση είναι η παρουσία ενός πλασμιδίου δότη που φέ-ρει το θεραπευτικό γονίδιο (τραπεζοζόνιο) και η δράση μιας εξωγενούς πρωτεΐνης (της τραπεζοζάσης) που κω-δικοποιείται από γονίδιο ενός άλλου πλασμιδιακού φο-ρέα. Η εισαγωγή των ανωτέρω πλασμιδίων στο κύτταρο ξενιστή γίνεται συγχρόνως και τεχνητά ή με ηλεκτροδι-άτρηση (electroporation) ή με τη βοήθεια λιπο-συμπλεγ-μάτων (lipofection) ή τέλος με απευθείας μεταφορά στον κυτταρικό πυρήνα (nucleofection). Υπάρχουν 2 βασικά μειονεκτήματα σύστημα αυτό: η μεταλλαξιγένεση από ενσωμάτωση που μπορεί να οδηγήσει σε ογκογένεση (αναμένεται σπάνια) όπως έχει παρατηρηθεί και στα ιικά συστήματα⁴ και η πιθανή τοξικότητα από την έκφραση μιας εξωγενούς πρωτεΐνης (τραπεζοζάσης)³⁸.

Τα τραπεζοζόνια είναι κινητά στοιχεία του γονιδιώμα-τος τα οποία υπάρχουν στη φύση και έχουν τη δυνατότητα της αποκοπής από την αρχική θέση τους στην αλληλουχία του DNA και της ενσωμάτωσής τους σε άλλη θέση στο γονιδίωμα³⁹. Υπάρχουν 2 τάξεις τραπεζοζονίων, τα DNA τραπεζοζόνια και τα ρέτρο-τραπεζοζόνια με RNA⁴⁰. Τα συστήματα που έχουν αναπτυχθεί για τη έρευνα στη γο-νιδιακή θεραπεία βασίζονται στα DNA τραπεζοζόνια⁴¹. Η μεγαλύτερη οικογένεια DNA τραπεζοζονίων ονομάζε-ται Tc1/mariner και περιλαμβάνει το σύστημα Sleeping Beauty (SB)⁴². Το τελευταίο αναπτύχθηκε από τη σύγκρι-ση πολλών ανενεργών τραπεζοζονίων που ανήκουν στο γονιδίωμα ψαριών μέσα από τη δημιουργία συναινετικών (consensus) αλληλουχιών. Το σύστημα SB αποτελείται από 2 στοιχεία: το τραπεζοζόνιο και την τραπεζοζάση. Το τραπεζοζόνιο είναι ένα τμήμα DNA που φέρει το με-ταφερόμενο γονίδιο και στα 2 άκρα του βρίσκονται τα λεγόμενα terminal inverted repeats (TIR). Η πρωτεΐνη τραπεζοζάση, που εκφράζεται από ένα δεύτερο πλασμί-διο, προσδένεται στα άκρα TIR και επάγει την αποκοπή και ενσωμάτωση του γονιδίου σε (τυχαίες) θέσεις του γο-νιδιώματος σε TA (αδενίνη - θυμίνη)⁴³.

Ο μηχανισμός της διαμετάθεσης⁴⁴ περιλαμβάνει τρία στάδια (Σχήμα 4) α) πρόσδεση 4 μορίων της τραπεζο-ζάσης στα άκρα του τραπεζοζονίου για το σχηματισμό συμπλόκου πρωτεΐνης-τραπεζοζονίου, β) αποκοπή του τραπεζοζονίου που γίνεται με σύγχρονη διάσπαση σε 3 τρία σημεία δημιουργώντας GTC προεξοχές στα άκρα του τραπεζοζονίου και TA προεξοχές στο γονιδίωμα του ξε-νιστή και γ) Επικόλλησή του τραπεζοζονίου στη νέα του θέση στο γονιδίωμα του ξενιστή με τη βοήθεια κυτταρι-κών ενζύμων (Nonhomologous end joining) (Σχήμα 4).

Η αρχική απομονωθείσα SB τραπεζοζάση είχε ονομα-σθεί “SB10” και το τραπεζοζόνιο “pT”. Αυτό το σύστημα ήταν ικανό να κάνει μετάθεση στο 0,3% των κυττάρων⁴³. Το SB100X αποτελεί το τελευταίο σύστημα τραπεζοζά-σης/τραπεζοζονίου που έχει δράση 100 φορές μεγαλύτερη από το προηγούμενο και μπορεί να μεταφέρει διαγονίδιο μερικών χιλιάδων βάσεων. Γενικά ισχύει ότι όσο μεγαλύ-τερο το μέγεθος του διαγονιδίου τόσο μικρότερη η δυνα-τότητα διαμετάθεσης αυτού στο γονιδίωμα.

Το σύστημα γονιδιακής μεταφοράς με SB τραπεζοζό-νιο αποτελεί μια εναλλακτική λύση στα συστήματα που βασίζονται σε ιούς. Συνδυάζουν σταθερή και μακρά έκ-φραση του διαγονιδίου που μεταφέρουν, ενώ το προφίλ της ενσωμάτωσης στο γονιδίωμα είναι πιθανώς ασφαλέ-στερο από αυτό των ρετροϊών δεδομένου ότι αυτό είναι τυχαίο χωρίς να φαίνεται ότι υπάρχει κάποια προτίμηση ενσωμάτωσης σε εξόνια ή αλληλουχίες ρυθμιστικών πε-ριοχών της γονιδιακής έκφρασης⁴⁶. Το σύστημα SB έχει χρησιμοποιηθεί σε προκλινικές και κλινικές δοκιμές^{47,48}.



Σχήμα 4. Ο μηχανισμός της διαμετάθεσης περιλαμβάνει την πρόσδεση 4 μορίων τραπεζοζάσης στα άκρα του τραπεζοζονίου για το σχηματισμό συμπλόκου πρωτεΐνης-τραπεζοζονίου, την αποκοπή του τραπεζοζονίου και την επικόλλησή του στη νέα θέση στο γονιδίωμα του ξενιστή με τη βοήθεια κυτταρικών ενζύμων.

Συμπερασματικά, υπάρχει μια συνεχώς αυξανόμε-νη ανάπτυξη μη ιικών φορέων γονιδιακής μεταφοράς με στόχο την επάρκεια αλλά και κυρίως την ασφάλεια της διαδικασίας για τη γονιδιακή θεραπεία σε σύγκριση με εκείνη των ιικών συστημάτων.

Technology of gene transfer: non-viral vectors

by Aristidis Giannakopoulos, Eleana F. Stavrou, Aglaia Athanassiadou

Laboratory of General Biology, Medical School, University of Patras, Patras, Greece

ABSTRACT: Non viral Vectors of gene transfer are usually plasmids, whose basic structure involves the transgene under the control of an efficient promoter, an origin of DNA replication and a gene for antibiotic resistance. Non viral vectors cannot transmit their DNA into cells, and therefore physical or chemical methods have been developed for this purpose. Their main advantage is that they do not intergrate into the endogenous genetic material and therefore they circumvent insertional mutagenesis, an inherent problem of viral vectors. However, as a consequence of this, they tend to follow an erratic mitotic segregation that results in plasmid loss during culture. A major part of research on non viral vectors focuses on the development of structures that will give the plasmid the possibility of long term establishment in the cell nucleus, as an autonomously replicating unit. Replicating episomal vectors (REVs) and their derivatives are currently the main type of non viral vectors. REVs are maintained into the cell nucleus as autonomously replicating units and specific origins of replication, deriving from viral genomes (EBV and SV40), ensure their DNA replication. Most of the currently used REVs carry a Scaffold/Matrix Attachment Region - S/MAR that is rendering the plasmid capable for long term establishment in the cell nucleus. S/MARs are TA rich areas of DNA that belong to the 'boundary elements' of the genome, by defining chromatin loops and they are tethering chromatin to the nuclear matrix, for the maintenance of nuclear architecture and transcription of the transgene. These type of vectors have been shown to be functional in *in vitro* experiments with established cell lines and with primary cell cultures as well as *in vivo* experiments with whole organisms. Among other, it has been shown to have the capacity for stable transfection of the haematopoietic progenitor cells CD34+. Two types of derivative vectors that are devoid of prokaryotic DNA sequences, and therefore safer, are under development: (1) Vector pFAR (free of antibiotic resistance), which is constructed to be without a gene for antibiotic resistance. This vector needs a specially devised strain of E.Coli for culture. (2) Vector type minicircle, circular non viral vectors that are produced by *in vivo* recombination of the original plasmid, to contain only the eukaryotic transcription cassette. Finally, the transposon/transposase system SB1000X is a non viral vector, which, however, is integrated into the genome. This occurs quite randomly and no preference for the exonic or actively transcribed sequences is shown, and therefore the SB100X system is considered to be safer than the retroviral system. This system has been used in pre-clinical studies as well as in clinical trials.

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.
11. 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 U S A. 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 EA, 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 U S A. 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 U S A. 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 U S A*. 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 U S A*. 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 U S A*. 1996; 93:603-608.
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 U S A*. 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 U S A*. 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, Gauldie 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 U S A*. 2000; 97:9150-9155.