Arşiv Kaynak Tarama Dergisi
Archives Medical Review Journal

Herpesvirüs Saimiri'nin Alternatif Gen Terapi Vektörü Olarak Kullanımı

Application of Herpesvirus Saimiri as an Alternative Gene Therapy Vector

Tuna Toptan

University of Pittsburgh Cancer Institute, Cancer Virology Program, Pittsburgh, PA, USA

ABSTRACT

Herpesvirus saimiri is the prototype rhadinovirus and is closely related to human Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. Herpesvirus saimiri strains of subgroup C transduce a broad spectrum of cancer cells and primary cells including human T lymphocytes very efficiently and enable stable transgene expression. Herpesvirus saimiri as a gene therapy vector is favorable because of its large packaging capacity, extensive cell tropism, and long-termed persistence as non-integrating episomes and thus exhibits numerous advantages over commonly used viral vectors. In order to use Herpesvirus saimiri as a secure and versatile gene therapy vehicle, it should be easily manipulated and modified. The recent advances in molecular cloning of large genomic fragments such as virus genomes as bacterial artificial chromosomes facilitated the functional studies and manipulation of herpesviruses using the recombination system of bacteria. Among these, red-recombination based "en passant" mutagenesis method enables seamless genome modification such as deletion, insertion and point mutation very easily and efficiently.

Key words: Herpesvirus saimiri, viral vectors, gene therapy, recombination.

ÖZET

Herpesvirüs saimiri, gama herpesvirüs ailesine ait olan radinovirüslerin prototipidir ve insan Kaposi Sarkom-ilişkili herpesvirüs ile benzerlik gösterir. Herpesvirüs saimiri'nin C türü insan T lenfositleri olmak üzere birçok normal ve kanser hücre tipini yüksek verimlilikte transdükte etme ve bu hücrelerde sabit transgen ekspresyonu sağlamaktadır. Herpesvirüs saimiri, büyük transgen taşıma kapasitesi, geniş hücre tropizmi ve konak genomuna entegre olmadan epizomal olarak persiste olabilmesi özelliklerinden dolayı genterapisi için sıkça kullanılan viral vektörlere karşı üstünlük gösterir. Herpesvirüs saimiri'nin gen terapi vektörü olarak kullanımını sağlamak için güvenilir ve kolay bir

şekilde manipüle edilebilmesi gerekir. Son 20 yılda birçok herpesvirüs genomu bakteri yapay kromozomları olarak klonlanmıştır. Bu sayede viral genomlar, bakterilerin rekombinasyon sistemi kullanılarak modifiye edilebilmektedir. Bu yöntemlerden red-rekombinasyon temelli "*en passant*" mutagenez yöntemiyle herpesvirüslerde genomik delesyon, insersiyon ve nokta mutasyonlar geride hiçbir iz bırakmadan kolayca ve verimli bir şekilde yapılabilmektedir.
Anahtar kelimeler: Herpesvirüs saimiri, viral vektörler, gen terapi, rekombinasyon.

Giriş

Kaposi Sarkom-ilişkili herpesvirüs ile benzerlik gösteren Herpesvirus saimiri (HVS), radinovirüslerin prototipidir[1]. HVS'nin C türü başta insan T lenfositleri olmak üzere birçok hücre tipini transdükte ederek, bu hücrelerde sabit transgen ekspresyonu sağlamaktadır. HVS, büyük transgen taşıma kapasitesi, geniş hücre tropizmi ve konak genomuna entegre olmadan epizomal olarak persiste olabilmesi özelliklerinden dolayı gen terapisi için sıkça kullanılan viral vektörlere karşı üstünlük gösterir. Herpesvirüslerin gen terapi vektörü olarak kullanımını sağlamak için güvenilir ve kolay birşekilde manipüle edilebilmesi gerekir. Son 20 yılda birçok herpesvirüs genomu bakteri yapay kromozomları (BAC) olarak klonlanmıştır. Bu sayede BAC içindeki viral genomlar, bakterilerin rekombinasyon sistemi kullanılarak modifiye edilebilmektedir. Bu yöntemlerden red-rekombinasyon temelli "en passant" mutagenez yöntemiyle herpesvirüslerde genomik delesyon, insersiyon ve nokta mutasyonlar geride hiçbir iz bırakmadan kolayca ve verimli bir şekilde yapılabilmektedir. Ayrıca bu şekilde üretilen rekombinant virüsler, in vivo olarak viral genlerin foksiyonunu ve patogenez ile ilişkisini anlamamıza yardımcı olmaktadır[1].

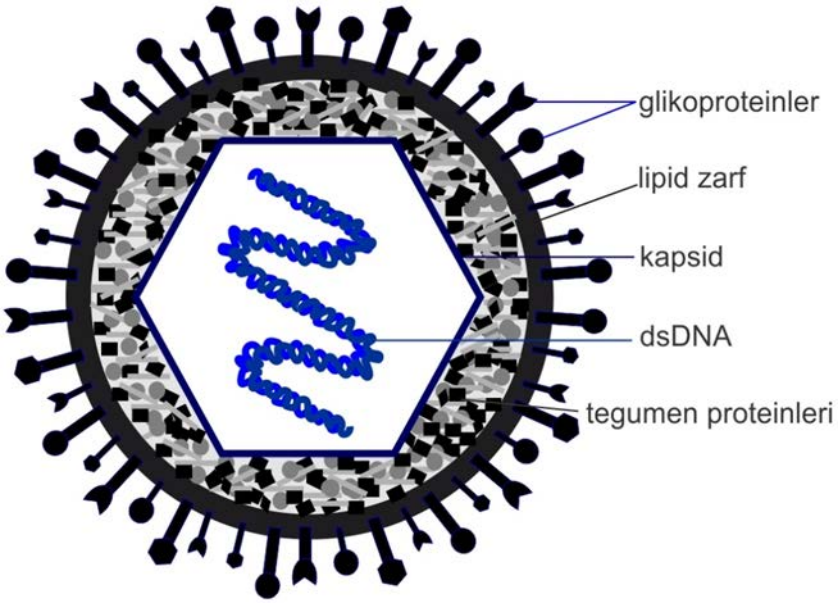
Bu derleme HVS'nin özelliklerini ve alternatif gen terapi aracı olarak sağlayabileceği avantajları özetlemektedir. Bu amaç doğrultusunda BAC olarak klonlanmış viral genomların en passant mutagenez yöntemi ile nasıl modifiye edileceği, HVS genomu örnek verilerek açıklanmıştır.

Herpesvirüs Saimiri'nin Özellikleri

Herpesviridae ailesi genom özelliklerine bağlı olarak alfa (α), beta (β) ve gama (γ) gruplarına ayrılır[1]. γ-herpesvirüs alt ailesi lenfositik hücre tropizmi gösteren lenfokriptovirüs ve radinovirüs türlerini kapsamaktadır. Bu iki türün insanlarda hastalık nedeni olan örnekleri sırasıyla Epstein-Barr Virüs (EBV veya HHV4) ve Kaposi Sarkom-ilişkili Herpesvirüs'dür (KSHV veya HHV8)[2].

Radinovirüsler diğer herpesvirüsler gibi, çift sarmallı DNA genomuna (dsDNA), onu çevreleyen hekson ve pentonlardan oluşan ikosahedral bir kapside ve tegümen matrikse sahiptirler (Şekil 1). En dıştaki lipid zarf, virüsün hücreye tutunmasını ve girişini sağlayan çeşitli glikoproteinler içerir. Lipid zarf ve kapsid arasındaki tegümen proteinleri, enfekte olan hücrede immun cevap ve interferon aktivasyonu gibi konak hücre aktivitelerini kontrol altına alarak virüsün çoğalmasına katkıda bulunurlar[3].

Radinovirüslerin insan etkeni olmayan prototipi Herpesvirus saimiri (HVS, Herpsevirüs 2 Saimirine), KSHV ile benzerlikler göstermektedir. HVS doğal konağı olan yeni dünya sincap maymunlarında (Saimiri sciureus) asemptomatik enfeksiyona neden olur[4,5]. HVS doğal konağında kanserojenik olmamasına rağmen, enfekte ettiği tamarin, marmosetler gibi diğer yeni dünya maymunlarında ve rhesus makaklar gibi eski dünya maymunlarında, T-hücreli lenfoma/lösemi gibi fatal lenfoprolifertatif hastalıklara neden olmaktadır[6,7].

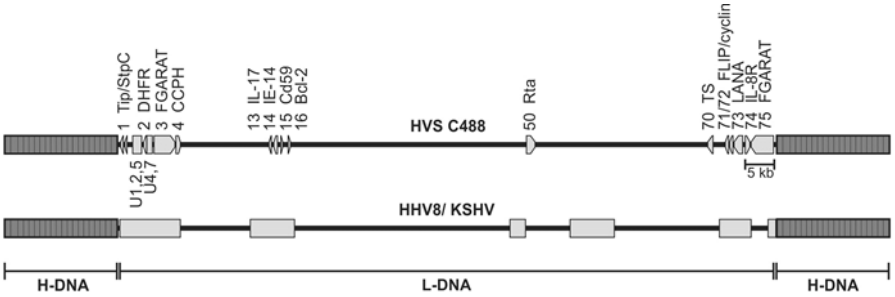


Şekil 1. Herpesvirüs diagramı.

Radinovirüsler genom yapısı, nükleotid ve aminoasit sekans homolojisi göz önünde bulundurularak oluşturulmuştur[2]. HVS ve KSHV protein sekansı yaklaşık %42'lik benzerlik göstermektedir. HVS genomu diğer herpesvirüslerde de bulunan korunmuş-ortak genlere,

konak hücre ile homolog genlere ve ayrıca türe özel genlere sahiptir (Şekil 2). Korunmuş gen bloklarının genomdaki pozisyonları, radinovirüsler arasında benzerlik göstermektedir[8]. HVS genomu, düşük oranda guanin ve sitozin bazına sahip olan L-DNA (light DNA fraction, L-DNA) ve onu kuşatan yüksek oranda guanin ve sitozin içeren H-DNA'dan (heavy DNA fraction, H-DNA) meydana gelir. L-DNA ~110 kilobaz çifti (kb) büyüklüğünde olup, yaklaşık 77 gen ürünü (ORFs, HVS U-RNA, mikro-RNA) kodlamaktadır. H-DNA ise herhangi bir kodlama niteliği olmayan 1.44 kb'lık tekrar ünitelerinden oluşmaktadır[4,6]. Tekrar ünite sayısı türler arasında değişkenlik gösterdiği için toplam HVS genomu 130-160 kb arasındadır[9].

HVS diğer herpesvirüsler gibi latent enfeksiyon döneminde hücre çekirdeğinde, konak kromozomlarına entegre olmadan, yani epizomal olarak persiste olur. Bu dönemde birçok viral gen histonlarla epigenetik modifikasyona maruz kaldığı için eksprese olmaz. HVS genomunun, konak kromatinlerine bağlı olması, epizomların hücre bölünmesi esnasında yavru hücreye aktarılmasını sağlamaktadır[8].



Şekil 2. HVS C488 ve KSHV genom yapısı karşılaştırması.

HVS L-DNA'sında 75 gen/ORF bulunmaktadır. L-DNA, H-DNA tekrar üniteleri ile çevrelenmektedir (koyu gri dikdörtgen). L-DNA hücre homoloğu kendine özel genler (açık gri) ve diğer radinovirüslerde de bulunan korunmuş genler (siyah) içermektedir. Tyrosine kinase-interacting protein (Tip), saimiri transformation-associated protein of subgroup C (StpC), u-RNAs (U) 1, 2, 4, 5 and 7, dihydrofolate reductase (DHFR), formylglycinamide ribotide amidotransferase (FGARAT), complement control protein homolog (CCPH, a C4b binding protein), IL-17, superantigen homolog (IE14), CD59, Bcl-2, transregulatory protein Rta, thymidylate synthase (TS), FADD-like interleukin 1-converting enzyme-like protease inhibitory protein (FLIP), cyclin D, IL-8 receptor (IL-8R).

Herpesvirus Saimiri'nin Gen Terapi Vektörü Olarak Kullanımı

Herpesvirus saimiri'nin A, B, and C olarak üç türü bulunmaktadır[10]. Deneysel olarak, HVS'nin C türü (C488 and C484) hematopoetik sistem hücreleri, lenfositler, fibroblast, miyeloid ve kanser hücreleri gibi birçok değişik tipteki insan hücresini enfekte edebilmektedir[11]. Örnek olarak, HVS ile enfekte insan birincil T lenfositleri çok az sayıda viral gen eksprese etmektedir[12].

Bunlar; tirozin kinazla ilişkili protein (tyrosine kinase-interacting protein (Tip)), Saimiri transformasyon ile ilişkili protein (saimiri transformation-associated protein of subgroup C (StpC)), ve viral süperantijen homoloğudur (IE14) (Şekil 2). Latent nükleer antijen LANA (latency-associated nuclear antigen *ORF73* (LANA)) T hücrelerinde sadece transkript düzeyinde tespit edilebilmektedir[4,5]. Latent enfeksiyon dönemindeki HVS genom modifikasyon paterni incelendiğinde H-DNA ve *stpC/tip* promotor bölgelerinde histon hiperasetilasyonu tespit edilmiştir. Bu gözlem HVS H-DNA'sının latent replikasyon orijini olarak görev yaptığı bulgusunu da desteklemektedir ve ayrıca KSHV terminal tekrar üniteleri de geçerlidir[13,14]. LANA proteini, H-DNA tekrar ünitleri ve konak kromatinleri arasında köprü görevi görerek enfekte hücrelerde çok kopyalı epizomal pesistansı sağlamaktadır[15]. *Tip* ve *StpC* genleri L-DNA'nın solunda ortak bir promotordan bisistronik mRNA olarak transkribe edilirler[16] (Şekil 2).

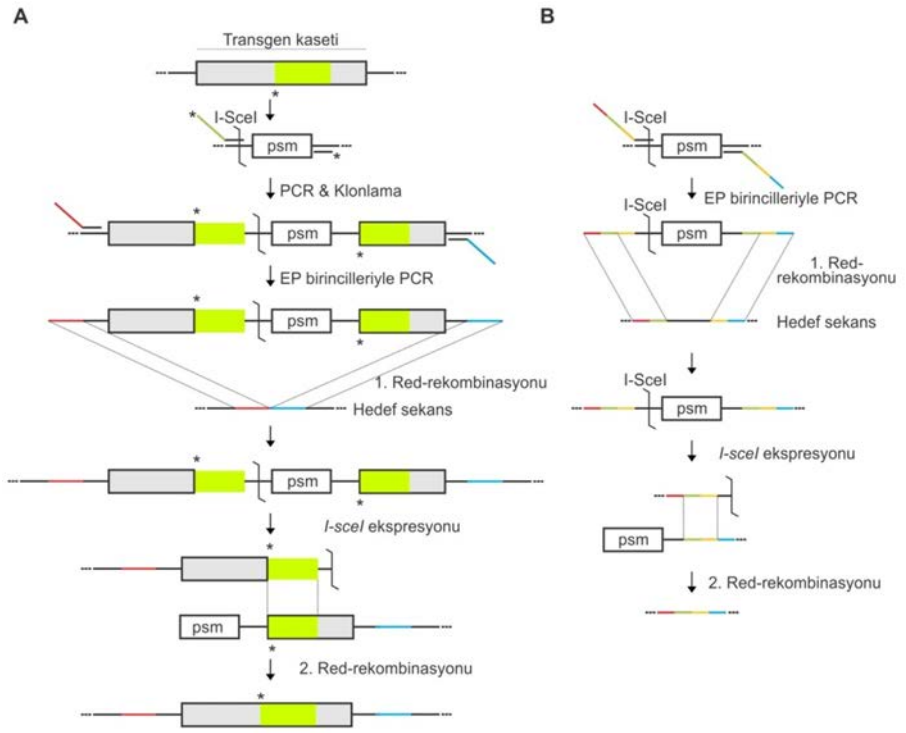
Bu iki protein her ne kadar virüs replikasyonu için gerekli değilse de, hücre transformasyonu için kaçınılmazdır[4]. HVS ile enfekte insan T lenfositlerinde, virüs üretimi, kromozomal instabilite ve tümorojenik değişiklik saptanmamıştır. Bunun yanısıra T hücreleri parental özelliklerini, CD3, CD4 ve CD8 gibi yüzey ve hücre aktivasyon belirteçlerini, karyotiplerini, MHC'ye bağımlı antijen tanıma ve IL-2'ye bağımlı büyüme özelliklerini korumaktadırlar. Bu nedenle HVS insan T hücrelerinde heterojen gen ekspresyonu sağlayabilir ve gen terapi vektörü olarak kullanılabilir[4,17-19].

Klinikte kanser başta olmak üzere birçok hastalık grubu için kullanılan gen terapi vektörlerinden başlıcaları; retroviral, lentiviral, adenoviral, vaksinya ve herpesviral vektörlerdir[20,21]. Bunlardan retroviral vektörler hücre genomuna entegre olduklarından mutasyona, hücresel onkogen aktivasyonuna ve transgen ekspresyon kaybına neden olabilirler[22-24]. Adenoviral vektörler bölünebilen ve bölünemeyen birçok hücre tipi için uygun olsa da transgen taşıyabilme kapasitesi sınırlıdır. Herpes simplex virus heterolog ve büyük transgen barındırma özelliği gösterir ancak sitotoksik etkilerden dolayı kullanımı sınırlıdır[25,26]. Bu nedenlerden dolayı alternatif gen terapi vektörlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Herpesvirus saimiri vektörleri insan T lenfesitleri dışında birçok hücre türünü enfekte ederek, yüksek kapasitede heterolog transgen ekspresyonu sağlayabildiği için farklı enfeksiyon, kanser hastalıklarında, romatoid artrit ve akut karaciğer hastalıklarının adoptif immünoterapisinde kullanılabilme potansiyeli göstermiştir[27-33].

Bakteriyel Yapay Kromozom Olarak Klonlanan HVS Genomunun "*En Passant*" Mutagenez Yöntemiyle Manipülasyonu

Moleküler klonlama yöntemlerinin gelişmesiyle birlikte, herpesvirüsler gibi büyük viral genomların klonlaması ve manipülasyonu kolaylaşmıştır. Bu amaçla kosmid veya bakteri yapay kromozomları (BAC) kullanılmaktadır. BAC sistemi fertilite (F) faktörüne dayalı, 300 kb kadar heterolog DNA parçası içerebilen vektörlerdir[34]. F faktörüne dayalı replikon ünitesi tek yönlü replikasyonu sağlayan *oriS* ve *repE* genleri ile düşük kopya sayısını sağlayan *parA* and *parB* genlerini içermektedir. Ayrıca, E.coli bakterilerinde rekombinasyondan sorumlu *recA*, *recET* veya *red* genleri uyarılabilir promotorlar aracılığı ile koşullu olarak eksprese edilebilir. Bu sayede BAC' lar, E.coli bakterilerinde sabit olarak, en fazla iki kopya şekilde bulundurulur. Koşullu rekombinasyon sistemi sayesinde gen delesyonu, transgen insersiyonu veya nokta mutasyonu gibi genetik değişiklikler, bakteri hücresi içinde gerçekleştirilir. Sonuç olarak, bu bakterilerden elde edilen rekombinant viral DNA kolayca izole ve analiz edilebilir. Bugüne kadar birçok DNA ve RNA virus genomu BAC olarak klonlanmıştır[35-37].

Bakteriyofaj lambda'nın (λ) *Red* rekombinasyona dayalı klonlama sisteminde, dairesel DNA molekülü, seçim belirteci ve hedef ile homolog sekanslar taşıyan lineer DNA fragmanı kullanılarak manipüle edilebilir[37,38]. Rekombinasyondan sorumlu bakterifaj lambda *red* proteinleri *exo*, *beta* ve *gam*'dır. *Exo* gen ürünü 5'→3' ekzonükleaz, *beta* tek iplikli DNA'ya bağlanabilen protein ve *gam* recBCD nükleaz aktivitesini baskılayan ve bu sayede lineer DNA yıkımını engelleyen proteindir. Bu genlerin ekspresyonu, bakteride ısıya duyarlı bir represörün kontrolünde bulunan λ *pL* promotoru ile regüle edilir. Represör 32°C'de, *pL* promotorunu bloke eder. Isı 42°C'ye yükseltildiğinde repressor inaktive olarak, *exo*, *beta,* and *gam* genlerinin koordineli bir sekilde ekspresyonunu sağlar. Bu yöntem sayesinde, en az 50 baz çiftli homolog sekanslar ile sınırlanmış, seçim belirteci içeren transgen fragmanları rekombinasyon için kullanılabilir. Homolog rekombinasyon ile hedeflenen DNA modifikasyonu sağlandıktan sonra gerekli olmayan bakteri kaynaklı belirteçler çeşitli yöntemler ile uzaklaştırılabilir. Buna örnek olarak, *Frt* veya *loxP* sekansları ile sınırlı seçim belirteçleri, sırasıyla Flip veya Cre rekombinazlarının koşullu ekspresyonu ile modifiye edilmiş olan genomdan, intergenomik rekombinasyon ile uzaklaştırılabilir[37,38]. Ancak bu işlem geride kısa da olsa tek bir *Frt* veya *loxP* sekansı bıraktığı için aynı yöntemin genetik manipülasyon için tekrar kullanımını kısıtlar.



Şekil 3. En passant mutagenezi.

A) Büyük DNA fragmanlarının hedef genoma insersiyonu. Pozitif seçim belirteci (psm) ve I-SceI endonükleaz sekansı, 50 baz çiftlik transgen ile aynı (dublike, yeşil) sekans içeren oligolar kullanılarak PCR ile çoğaltılır. Bu esnada klonlama için gerekli olan restriksyon enzim sekansı da eklenir (*). PCR ürünü ve transgeni içeren aracı vektör, tek restriksyon enzimi (*) ile kesilir ve PCR ürünü transgen içerisine eklenir. Transfer kaseti, 50 baz çiftlik hedef bölgeye homolog uzantılar taşıyan (kırmızı ve mavi) özel *en passant* (EP) birincilleri ile çoğaltılır. Birinci Red-rekombinasyon adımında, PCR ürünü hedef bölgeye homolog rekombinasyon aracılığı ile sokulur (intramoleküler). Ikinci adımda *I-sceI* and *red* genlerinin ekspresyonu tetiklendikten sonra, psm transgen içindeki homolog sekanslar arasında gerçeklesen rekombinasyon sayesinde iz bırakmadan kesilir (intermoleküler). **B) Genomik delesyon.** psm-I-SceI kaseti delesyonu hedeflenen bölge ile homolog sekanslar içeren PCR birincilleri kullanılarak çoğaltılır (kırmızı, yeşil, sarı, mavi). Birinci rekombinasyon adımında hedef bölge silinir. PCR amplifikasyonu esnasında ilave edilmiş internal homolog sekanslar arasında (yeşil ve sarı) gerçekleşen ikinci rekombinasyon adımında ise psm kaseti iz bırakmadan kesilir[43].

Son yıllarda homolog rekombinasyon sonrasında istenmeyen veya gerek duyulmayan DNA fragmanlarını herhangi bir iz bırakmadan uzaklaştırmayı sağlayan BAC manipülasyon yöntemleri geliştirilmiştir[40-45]. Bunların arasında, *en passant* mutagenez yöntemi iki basamaklı, *Red*-rekombinasyonu içermektedir[42] (Şekil 3). Bu yöntemde, ilk adımdaki homolog

rekombinasyon için gerekli olan *Red* genleri ve ikinci adımdaki intramoleküler rekombinasyonu sağlamak için gerekli olan I-*Sce*I özgül endonükleazı koşullu olarak eksprese edilir. I-SceI Saccharomyces *cerevisiae* mitokondria intronundan kodlanan bir megaendonükleazdır[46]. Bu yöntem kullanılarak virüs genomuna transgen insersiyonu için, pozitif seçim belirteci (psm), I-SceI endonükleazı ve 50 baz çiftlik transgen ile homolog sekans PCR aracılığıyla çoğaltılır ve aracı bir vektöre restriksyon endonükleaz kesimi ile transfer kasetine eklenir (Şekil 3A). Sonraki adımda, transfer kaseti insersiyon için hedeflenen sekans ile 50 baz çiftlik homolojisi olan özel PCR birincilleri kullanılarak çoğaltılır ve ilk *Red*-rekombinasyon (intermoleküler) adımı için kullanılır. Mutant klonlar seçim belirteçleri sayesinde uygun besi ortamında seçilir ve çoğaltılır. Mutant bakterilerden izole edilen DNA restriksyon endonükleaz kesimi ve sekanslama yöntemi ile analiz edilir. İkinci adımda psm kasetinin iz bırakmadan kesilmesi için, I-SceI sekansını tanıyacak olan endonüklaz ve *Red* genleri eksprese edilir. DNA dizisinin tek bir yerinde meydana gelen kesilme psm'ı çevreleyen homolog sekanslar arasında ikinci red rekombinasyonun (intramoleküler) gerçekleşmesini sağlar. Benzer şekilde genomda gen delesyonları ve nokta mutasyonları, rekombinasyon sonrasında iz bırakmadan gerçekleştirilebilir (Şekil 3B). Bu yöntem sayesinde rekombinant viral vektör genomları kısa zamanda modifiye edilerek gen ve adoptif immünoterapi için kullanılabilir. Ayrıca bu şekilde üretilen mutant virüsler, *in vivo* olarak viral genlerin foksiyonunu ve patogenez ile ilişkisini anlamamıza yardımcı olmaktadır.

Sonuç

Herpesvirus saimiri, büyük transgen taşıma kapasitesi, geniş hücre tropizmi ve konak genomuna entegre olmadan epizomal olarak persiste olabilmesi özelliklerinden dolayı gen terapisi için sıkça kullanılan viral vektörlere karşı üstünlük göstermektedir. Rekombinant virus olarak klonlanmış BAC'ların homolog rekombinasyon ile modifikasyonu sonrasında gerek duyulmayan DNA fragmanlarını iz bırakmadan uzaklaştırmayı sağlayan *en passant* mutagenez yöntemi, rekombinant HVS'lerin yapımını ve gen terapi vektörü olarak kullanımını kolaylaştırmıştır.

Kaynaklar

1. Davison AJ. Overview of Classification. In Human Herpesviruses (Eds A Arvin, G Campadelli-Fiume, E Mocarski, PS Moore, B Roizman, R Whitley, K Yamanishi):3-9. Cambridge University Press, 2007.
2. Longnecker R, Neipel F. Introduction of the human gammaherpesviruses. In Human Herpesviruses (Eds A Arvin, G Campadelli-Fiume, E Mocarski, PS Moore, B Roizman, R Whitley, K Yamanishi):341-59. Cambridge University Press, 2007.

3. Kieff ED, Rickenson A. Epstein-Barr virus and its replication. In: Fields Virology, 5th ed (Eds BN Fileds, DM Knipe, PM Howley): 2603-54. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2007.
4. Fickenscher H, Fleckenstein B. Herpesvirus saimiri. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2001;356:545-67.
5. Fleckenstein B, Ensser A. Gammaherpesviruses of New World primates. In Human Herpesviruses (Eds A Arvin, G Campadelli-Fiume, E Mocarski, PS Moore, B Roizman, R Whitley, K Yamanishi):1076-92. Cambridge University Press, 2007.
6. Melendez LV, Hunt RD, Daniel MD, Garcia FG, Fraser CE. Herpesvirus saimiri. Experimentally induced malignant lymphoma in primates. Lab Anim Care. 1969;19:378-86.
7. Wright J, Falk LA, Collins D, Deinhardt F. Mononuclear cell fraction carrying herpesvirus saimiri in persistently infected squirrel monkeys. J Natl Cancer Inst. 1976;57:959-62.
8. Ensser A, Fleckenstein B. T-cell transformation and oncogenesis by gamma2-herpesviruses. Adv Cancer Res. 2005;93:91-128.
9. Ensser A, Thurau M, Wittmann S, Fickenscher H. The genome of herpes-virus saimiri C488 which is capable of transforming human T cells. Virology. 2003;314: 471-87.
10. Desrosiers RC, Falk LA. Herpesvirus saimiri strain variability. J Virol. 1982;43:352-6.
11. Simmer B, Alt M, Buckreus I, Berthold S, Fleckenstein B, Platzer E et al. Persistence of selectable herpesvirus saimiri in various human haematopoietic and epithelial cell lines. J Gen Virol. 1991;72: 1953-8.
12. Biesinger B, Müller-Fleckenstein I, Simmer B, Lang G, Wittmann S, Platzer E, et al. Stable growth transformation of human T lymphocytes by herpesvirus saimiri. Proc Natl Acad Sci USA. 1992; 89: 3116-9.
13. Alberter B, Ensser A. Histone modification pattern of the T-cellular herpesvirus saimiri genome in latency. J Virol. 2007;81:2524-30.
14. Stedman W, Deng Z, Lu F, Lieberman PM. ORC, MCM, and histone hyper-acetylation at the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent replication origin. J Virol. 2004;78:12566-75.
15. Verma SC, Robertson ES. ORF73 of herpesvirus saimiri strain C488 tethers the viral genome to metaphase chromosomes and binds to cis-acting DNA sequences in the terminal repeats. J Virol. 2003; 77:12494-506.
16. Fickenscher H, Biesinger B, Knappe A, Wittmann S, Fleckenstein B. Regulation of the herpesvirus saimiri oncogene stpC, similar to that of T-cell activation genes, in growth-transformed human T lymphocytes. J Virol. 1996;70:6012-9.
17. Frolova-Jones EA, Ensser A, Stevenson AJ, Kinsey SE, Meredith DM. Stable marker gene transfer into human bone marrow stromal cells and their progenitors using novel herpesvirus saimiri-based vectors. J Hematother. Stem Cell Res. 2000;9:573-81.
18. Hiller C, Tamgüney G, Stolte N, Mätz-Rensing K, Lorenzen D, Hör S et al. Herpesvirus saimiri pathogenicity enhanced by thymidine kinase of herpes simplex virus. Virology. 2000;278: 445-55.

19. Hiller C, Wittmann S, Slavin S, Fickenscher H. Functional long-term thymidine kinase suicide gene expression in human T cells using a herpesvirus saimiri vector. Gene Ther. 2000;7:664-74.
20. Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. Nat Med. 2001;7:33–40.
21. Salem ML, Gadalla KE, Fielding BC, Thorne SH. Gene therapy and virus-based cancer vaccine. In Cancer Immunology, Edition: Bench to Bedside Immunotherapy of Cancers, Chapter: Gene Therapy and Virus-Based Cancer Vaccines, (Ed N Resaei):131-50. Springer Berlin Heidelberg, 2014.
22. Kaiser J. Gene therapy. Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial. Science. 2003;299:495.
23. Kohn DB, Sadelain M, Glorioso JC. Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID. Nat Rev Cancer. 2003;3:477–88.
24. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. N Engl J Med. 2003; 348:255–6.
25. Lee YB, Glover CP, Cosgrave AS, Bienemann A, Uney JB. Optimizing regulatable gene expression using adenoviral vectors. Exp Physiol. 2005; 90: 33-7.
26. Schmeisser F, Weir JP. Cloning of replication-incompetent herpes simplex viruses as bacterial artificial chromosomes to facilitate development of vectors for gene deli-very into differentiated neurons. Hum Gene Ther. 2006;17:93-104.
27. Toptan T, Ensser A, Fickenscher H. Rhadinovirus vector-derived human telomerase reverse transcriptase expression in primary T cells. Gene Ther. 2010;17:653–61.
28. Stevenson AJ, Clarke D, Meredith DM, Kinsey SE, Whitehouse A, Bonifer C. Herpesvirus saimiri-based gene delivery vectors maintain heterologous expression throughout mouse embryonic stem cell differentiation in vitro. Gene Ther. 2000;7:464-71.
29. Smith PG, Coletta PL, Markham AF, Whitehouse A. In vivo episomal maintenance of a herpesvirus saimiri-based gene delivery vector. Gene Ther. 2001;8:1762–9.
30. Smith PG, Oakley F, Fernandez M, Mann DA, Lemoine NR, Whitehouse A. Herpesvirus saimiri-based vector biodistribution using noninvasive optical imaging. Gene Ther. 2005;12:1465–76.
31. Wieser C, Stumpf D, Grillhosl C, Lengenfelder D, Gay S, Fleckenstein B, et al. Regulated and constitutive expression of anti-inflammatory cytokines by nontransforming herpesvirus saimiri vectors. Gene Ther. 2005;12:395–406.
32. Turrell SJ, Macnab SA, Rose A, Melcher AA, Whitehouse A. A herpesvirus saimiri-based vector expressing TRAIL induces cell death in human carcinoma cell lines and multicellular spheroid cultures. Int J Oncol. 2012; 40:2081–9.
33. Brown HF, Unger C, Whitehouse A. Potential of herpesvirus saimiri-based vectors to reprogram a somatic Ewing's sarcoma family tumor cell line. J Virol. 2013;87:7127–39.

34. Wagner M, Ruzsics Z, Koszinowski UH. Herpesvirus genetics has come of age. Trends Microbiol. 2002;10:318-24.
35. Almazan F, Gonzalez JM, Penzes Z, Izeta A, Calvo E, Plana-Duran J et al. Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 7:5516-21.
36. Domi A, Moss B. Cloning the vaccinia virus genome as a bacterial artificial chromosome in Escherichia coli and recovery of infectious virus in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99:12415-420.
37. Adler H, Messerle M, Koszinowski UH. Cloning of herpesviral genomes as bacterial artificial chromosomes. Rev Med Virol. 2003;13:111-21.
38. Zhang Y, Buchholz F, Muyrers JP, Stewart AF. A new logic for DNA engineering using recombination in Escherichia coli. Nat Genet. 1998; 20:123-128.
39. Court D, Sawitzke JA, Thomason LC. Genetic engineering using homolo-gous recombination. Annu Rev Genet. 2002; 36:361-88.
40. Sharan SK, Thomason LC, Kuznetsov SG, Court DL. Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering. Nat Protoc. 2009;4:206-23.
41. Sawitzke JA, Thomason LC, Costantino N, Bubunenko M, Datta S, Court DL. Recombineering: in vivo genetic engineering in E. coli, S. enterica, and beyond. Methods Enzymol. 2007;421:171-99.
42. Tischer BK, von Einem J, Kaufer B, Osterrieder N. Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in Escherichia coli. Biotechniques. 2006;40:191-7.
43. Tischer BK, Smith GA, Osterrieder N. En passant mutagenesis: a two step markerless red recombination system. Methods Mol Biol. 2010;634:421–30.
44. Warming S, Costantino N, Court DL, Jenkins NA, Copeland NG. Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. Nucleic Acids Res. 2005; 33:e36.
45. Wussow F, Spieckermann T, Brunnemann A, Hüske L, Toptan T, Fickenscher H. Bacterial genetics of large mammalian DNA viruses: bacterial artificial chromosomes as a prerequisite for efficiently studying virus DNA replication and functions. In DNA replication: current advances (Ed H Seligmann):669-94. Intech, Rijeka, Croatia.
46. Colleaux L, D'Auriol L, Galibert F, Dujon B. Recognition and cleavage site of the intron-encoded omega transposase. Proc Natl Acad Sci USA. 1988;85:6022-6.

Correspondence Address / Yazışma Adresi
Tuna Toptan
University of Pittsburgh Cancer Institute
Cancer Virology Program
Pittsburgh, PA, USA
e-mail: tut3@pitt.edu

Geliş tarihi/ Received: 11.05.2015
Kabul tarihi/Accepted: 02.06.2015