

Gen tedavisinin temel ilkeleri ve son gelişmeler

The principles of gene therapy and recent advances

Rashnonejad A¹ Durmaz B³ Özkınay F³

¹Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

²Islamic Azad University, Young Researchers and Elites Club, North Tehran Branch, Tahran, İran

³Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Özet

Gen tedavisi, genel anlamda, bir hastalığı tedavi etmek ya da en azından bir hastanın klinik durumunu iyileştirmek amacıyla genetik materyalin hücrelere transferi olarak tanımlanır. Gen tedavisinin temel amacı, hedef hücrelere bir vektör aracılığı ile terapötik geni transfer etmektir. Gen tedavisinde en çok kullanılan vektörler, viral vektörlerdir. Adeno-assosiyasyon virüsü, retrovirüs, adenovirüs ve herpesvirüs vektörleri en sık uygulanan viral vektörlerdendir. Viral olmayan vektörler, viral vektörlerden daha az verimlidir, ancak düşük immünojenite ve büyük DNA parçalarını aktarabilmeleri onların avantajları olarak bilinir. Gen tedavisi hem somatik hem de eşey hücrelerinde uygulanabilir. İlk kez 1982 yılında denenmeye başlayan, bir klinik uygulama olarak kabul edilen gen tedavisi, beklenenden daha hızlı gelişme göstererek çoğu bilim insanını kendine çekmiştir. Bu alandaki gelişmeler, ilk gen tedavisi ilaçlarının üretilmesini sağlamıştır. Örnek olarak kanser tedavisinde ve lipoprotein lipaz eksikliğinin tedavisinde kullanılması onaylanan ilaçlardan söz edilebilir. Ayrıca, Leber'in konjenital amorozis (LCA) ve hemofili hastaları için üretilmiş gen tedavisi ilaçları şu anda faz III aşamasındadır. Bu derlemede, gen tedavisinin temel ilkeleri, tarihçesi ve günümüzdeki klinik uygulamaları son literatür verileri ışığında sunulmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Gen tedavisi, eşey hücresi, somatik hücre, vektör, viral vektör.

Summary

Gene therapy generally can be defined as the transfer of genetic material in cells with the aim of treating diseases or at least improving the patient's clinical status. The basic aim of gene therapy is to transfer the therapeutic gene into target cells using a vector. The most widely used gene therapy vectors are viral vectors, like adeno-associated virus, retrovirus, adenovirus and herpesvirus vectors. Gene therapy can be applied to both somatic and germline cells. The first gene therapy study, considered as a clinical application, was performed in 1982. Because of the extensive developments in gene therapy, it has attracted so many scientists to this field faster than expected. The advances in this field have provided the first gene therapy products, for example, approved gene therapy drugs for cancer and lipoprotein lipase deficiency treatment can be mentioned. In addition, gene therapy drugs for patients with Leber's congenital amaurosis (LCA) and hemophilia is currently in phase III study. In this review, the basic principles, history and current clinical applications of gene therapy are presented with up to date literature.

Key Words: Gene therapy, germ cells, somatic cells, vectors, viral vectors.

1. Gen Tedavisi Fikri ve Tarihçesi

Çok uzun zamandan beri bilim adamlarının hedefi olan genetik hastalıkların tedavisi ve bununla paralel gelişen gen tedavisi, genetik hastalıkların nükleotidler düzeyinde tedavi edilmesini sağlar. Ancak gen tedavisi fikri ilk kez 1970 yılında, retrovirüslerin RNA'ları üzerinde çalışan, Martine Cline tarafından ortaya konmuştur.

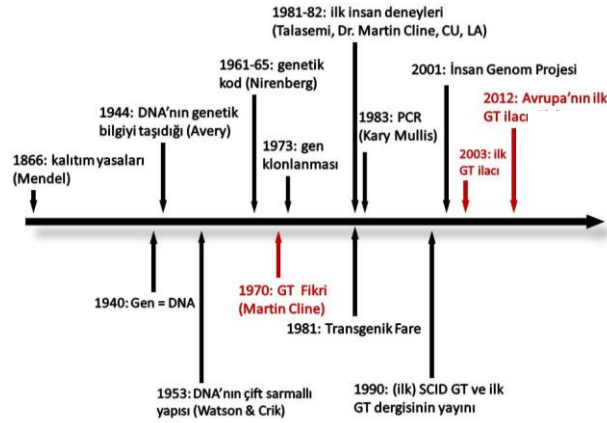
Martine Cline, virüslerin transformasyon mekanizmalarını incelediğinde, virüslerin genetik materyallerini konak hücre genomuna aktardığını keşfederek, hücrelere gen transfer işlemlerini gerçekleştirmek için bir araç olarak kullanılabileceklerini belirtmiştir (1). Rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesi ile genlerinin izolasyonu ve manipülasyonu mümkün olmuştur (2-4). Martin Cline, 1980'lerin başında retroviral tabanlı gen transferinin geliştirilmesine önemli katkıda bulunmuş ve genlerin *in vitro* ve *in vivo* olarak yüksek verimlilikle transfer edilebileceğini göstermiştir (5-7). Bu gelişmelere dayanarak 1982 yılında, ilk insan gen tedavisi, talasemi hastalığı için, aynı kişi tarafından gerçekleştirilmiştir (8).

Yazışma Adresi: Afrooz RASHNONEJAD

Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye

Makalenin Geliş Tarihi: 06.03.2014 Kabul Tarihi: 01.04.2014

Daha sonra 1990 yılında ciddi kombine immün yetmezlik (SCID) hastalığında Michael Blaese ve William French Anderson tarafından ADA geni taşıyan retrovirus vektörü ile yapılmış gen tedavisi uygulamaları sonucunda 2 çocuğun tam olarak tedavisi sağlanmıştır (9). Gen tedavisi ile ilgili gelişmeler tarih sırasına göre Şekil-1'de gösterilmiştir.



Şekil-1. Gen tedavisi (GT) yöntemi ile ilgili tarihsel gelişmeler.

2. Gen Tedavisi Nedir?

Eksik ya da hatalı protein üretimine neden olan, bozuk gen taşıyan hücreye normal geni yerleştirme yöntemine gen tedavisi denir. Gen tedavisi, hastalıkları nukleotid düzeyinde tedavi etmeyi amaçlar. Gen tedavisinin en yaygın biçimi, mutasyona uğramış bir genin fonksiyonunun düzenlenmesi için belirsiz bir genomik bölgeye fonksiyonel genlerin bir vektör aracılığıyla eklenmesidir. Çinko parmak veya homolog rekombinasyon yoluyla yapılan diğer gen tedavisi yaklaşımlarında ise doğrudan mutasyon düzeltilmesi yapılır. Bilim insanları, kistik fibrozis, hemofili, musküler distrofi ve orak hücreli anemi gibi tek gen hastalıklarına daha fazla odaklanmış durumdadır. İnsan gen tedavisinin biyolojisi çok karmaşıktır ve hala net olarak anlaşılammıştır. Gen tedavisinin başarısı genetik, bioinformatik, moleküler biyoloji tekniklerdeki gelişmelere bağlıdır (10). Gen tedavisi kliniklerde yaygınlaşmadan önce genetik hastalıkların mekanizması iyice incelenmeli, uygun ve güvenli gen aktarma teknikleri geliştirilmelidir.

Gen tedavisinde sağlıklı geni hücrelere vermek ve gen hasarlarını onarmak için bir kaç yöntem kullanılır. Bunlar;

a. İnseriyon: Genellikle viral vektörler aracılığıyla normal rastgele olarak hücre genomuna entegrasyonudur. Bu durumda gen parçaları rastgele olarak genoma girdiği için DNA hasarlarına sebep olabilir; örneğin diğer genler kesilerek onların ekspresyonu önlenir, ya da gen regülasyon dizilerine oturarak genlerin ekspresyonu azaltılır ya da artırılır. Diğer bir

örnek ise, insersiyon sonucunda tümör uyarıcı genlerin inhibisyonunu ortadan kaldırarak aktif hale geçebilir ve kansere sebep olabilir (11).

b. Yer değişimi (Gen cerrahisi): Normal genin homolog rekombinasyon ile istenen, belli bir lokusa yerleşmesini sağlar. Bu yöntemin gerçekleşme olasılığı çok az (10^5 hücre içinde 1) olmasına rağmen, gen parçası spesifik bir bölgeye yerleştiği için DNA hasarı en aza indirgenir (11).

c. Tamir: Anormal genin ters mutasyonla tedavisidir. Örneğin, $A>C \rightarrow C>A$. Bu yöntem genellikle nokta mutasyonları nedeni ile ortaya çıkan hastalıkların tedavisinde kullanılabilir. Bu durumda mutasyona uğramış gen, nukleazlar (çinko parmak, TALEN ve CRISPR/Cas) aracılığıyla hücrenin doğal tamir mekanizmaları tetiklenip ters bir mutasyonla düzeltilir (12).

d. Gen eklemesi (İntihar gen tedavisi): Normal durumlarda hücrede bulunmayan ve eksprese olmayan genin istenilen zaman ve istenilen hücrede ifadesini sağlamak için uygun hücreye transferi işlemidir (13).

Gen tedavisinde genellikle dışarıdan verilen terapötik genin uzun süreli eksprese olması için virüsler aracılığıyla DNA parçaları kromozom içine entegre olur. Ancak en son anlatılan yöntemde yani gen eklemesinde, genin geçici ekspresyonu, hastalığın tedavisi için yeterlidir. Bu amaçla üretilen plazmidler, kromozom dışında kalır ve terapötik proteinin kısa süreli ifadesini sağlar, bunlara "epizomal DNA" ya da "epizomal plasmid" denir. Epizomal DNA'lar bir süre sonra hücre bölünmesi nedeniyle kaybolur. Bu yöntem genellikle kanser tedavisinde kullanılır.

Gen tedavisi çalışmalarının çoğu, belli başlı ortak basamaklardan oluşur;

- Hastalığa neden olan genin belirlenmesi,
- Sağlam genin klonlanması,
- Uygun bir vektör seçimi veya gen kümesinin (gen kasetleri) düzenlenmesi,
- Genin hedeflenen hücrelere transferi ve protein ifadesinin sağlanması,
- İşlenmiş hücrenin seçimi ve hastaya nakli (*in vitro* gen tedavisi durumunda),
- Olası yan etkilerin belirlenmesi.

3. Gen Tedavisinin Ana Kategorileri

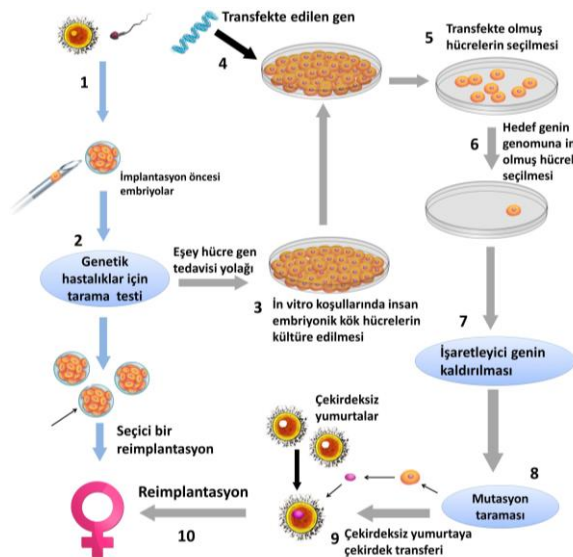
Uygulanacak hücre türüne göre farklı gen tedavisi yaklaşımları vardır. Bunlar;

a. Eşey Hücresi Gen Tedavisi

İnsan zigotunda, eşey hücrelerinde genetik modifikasyon teorik olarak mümkün olmaktadır. Hayvanlarda

uygulanan teknolojileri prensip olarak insanlara uygulanabilir. Ancak burada amaç, insan transgenozinden ziyade germline gen tedavisidir (14). Eşey hücre gen tedavisinin amacı tedavi edici geni hem vücut hem de eşey hücrelerine aktarmaktır. Sonuç olarak hem kişinin hastalığı ortadan kaldırılmış olacak hem de düzeltilmiş genotipe sahip gametler oluşturularak sağlıklı nesiller elde edilecektir. Eşey hücresi gen tedavisi yöntemi, vücudun tüm hücrelerini oluşturabilen erken dönem embriyo, gamet ve zigotta yapılan genetik değişikliklerle uygulandığı için bu değişiklikler gelecek nesillere aktarılabilir. Bu yüzden etik, bilimsel ve politik konularda önemli tartışmalara yol açabilir. Eşey hücresi gen tedavisi günümüzde insan deneylerinde uygulanamaz; ancak laboratuvar düzeyinde genetik hastalıklar için hayvan modelleri oluşturularak kullanılabilir (15).

Teoride bu yöntem genetik bozuklukların tedavisinde ve gelecek nesillere aktarılmasını önlemek için çok etkilidir, ancak genom düzeyinde ortaya çıkan değişiklikler geri dönüşümsüz olduğu için riskleri çok büyüktür ve oluşabilecek hatalar gelecek nesilleri etkileyecektir (15). Gelecek nesillerdeki olası riskler hakkında yeterince bilgi mevcut olmadığı ve riskleri somatik gen tedavisinden daha fazla olduğu gerekçeleriyle insan eşey hücre gen tedavisi uygulamaları etik açıdan sıkıntılı olabilir. ABD’de insan eşey hücre hattı veya somatik genetik modifikasyonların çalışılması ile ilgili federal bir yasa yoktur (16). Eşey hücre gen tedavisi protokolündeki basamaklar Şekil-2’de gösterilmiştir.



Şekil-2. Eşey hücre gen tedavisi protokolünde izlenen işlem basamakları (14).

Şekil-2’de gösterilen basamaklar;

- 1- Totipotent embriyonik hücre izolasyonu,
- 2- Embriyonun genetik yapısının belirlenmesi,

- 3- Embriyonik kök hücrelerin kültüre edilmesi,
- 4- Embriyonik hücrelere genetik materyalin transferi,
- 5- Stabil bir şekilde transfekte edilmiş geni alan hücrelerin seçimi,
- 6- Hedef geni genomunda integre olmuş hücrelerin seçilmesi: Bu adım bozuk DNA dizisinin, fonsiyonel normal bir sekansla değiştirilmesini kapsar.
- 7- İşaretleyici kaldırılması: Genellikle transfekte olmuş hücreleri seçmek için normal genin yanında antibiyotik direnç genleri gibi işaretleyici genler de kullanılır. Bu genler, kromozomda yanlarındaki genlerin ifadesinde değişimlere yol açar ve gelecek nesillere aktarılabilir (17). Bu yüzden onların kaldırılması gerekir. Bu işaretli genler, genellikle bir antibiyotik direnç genidir. Bu şekilde, bu genler çıkartılarak, hedeflenmiş sekans değişikliği dışında genom değiştirilmeden bırakılabilir (18). Bunun için hücrelerin yeniden kültüre edilmesi ve başka bir ilaç seçimi yapılması gerekmektedir.
- 8- Genomik bütünlüğü teyit etmek: Genetik mutasyonlar uzun süreli kültür sırasında oluşabilir ve homolog rekombinasyon ile tedavi edilmiş bölgelerde sıklıkla hafif mutasyonların olduğuna dair bazı kanıtlar vardır (19). Bu nedenle genom, istenmeyen başka bir mutasyon için kontrol edilmeli.
- 9- Nükleus transferi;
- 10- Anneye reimplantasyon: Embriyo kaybı yaklaşık %98’dir ve *in vitro* olarak insan fertilizasyonu için sınırlayıcı bir faktördür. Sadece *in vitro* fertilizasyon, tedavi gören çiftlerin yaklaşık %15’inde başarılı bir gebelik sağlamıştır (20). Başarı şansını artırmak için, birden fazla embriyo aynı anda reimplante edilebilir ve eğer 9. adımda elde edilen embriyoların birden fazlası rahime tutunur ve gelişimini tamamlarsa tek yumurta ikizi ya da üçüzlerine neden olacaktır. (15).

b. Somatik Hücre Gen Tedavisi

Somatik hücre gen tedavisi uygulamasında, tedavi edici gen somatik hücrelere transfer edilir. Hastanın kemik iliği, kan ve deri hücrelerine gen transferi, vücut hücresi gen tedavisi kategorisinde yer alır. Sonuçta genler düzeyinde yapılan değişiklikleri ve gen tedavisinin farklı etkileri sadece vücut hücreleri düzeyinde kalır; eşey hücrelerine ve ardından gelecek nesillere aktarılmaz (10).

4. Vektörler

Hedef hücrelere tedavi edici geni sunmak için kullanılan taşıyıcılara vektör denmektedir (11). Gen tedavisi başarısı büyük ölçüde gen parçasını aktarabilen vektöre bağlıdır. Uygun bir vektör, DNA parçasını seçimli ve verimli bir şekilde, en az toksisite ile hedef hücrelere sunabilmelidir. Virüsler hücre transdüklenmesi açısından

verimlidir; ancak insanlarda virüsün kullanımı ile ilgili güvenlik endişeleri viral olmayan taşıyıcı sistemleri alternatif hale gelmiştir. Viral olmayan vektörlerin bazı avantajları vardır; örneğin, kullanım basitliği, büyük ölçekli üretim kolaylığı ve spesifik immün yanıt eksikliği (21). Son zamanlarda, hedef hücrelere gen aktarılması için çıplak DNA kullanılmaktadır (22), bunun nedeni ise basit ve güvenli bir yöntem olmasıdır. Çıplak DNA tekniği ile çeşitli fiziksel teknikleri birleştirerek verimliliği ve hücre spesifitesi artırılmıştır. Buna örnek olarak elektroporasyon, gen tabancası, ultrason, hidrodinamik basınç ve lipozom teknikleri verilebilir (21).

a. İdeal Vektörün Özellikleri

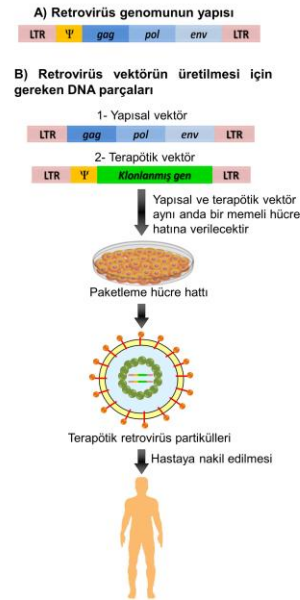
- DNA parçalarını aktarabilmesi için yeterli kapasiteye sahip olmalı,
- Kolaylıkla yüksek konsantrasyona ulaşabilmeli,
- Hedef dokuya spesifik olmalı,
- Stabil olmalı,
- İmmün yanıt oluşturmamalı, toksik olmamalı,
- Etkinliği yüksek olmalı,
- Uzun süreli gen ifadesi sağlamalı.

Şu ana kadar, bu özelliklerin tümüne sahip olan mükemmel bir vektör bulunmamıştır. Hasta doku özellikleri ve bozuk genin büyüklüğüne göre her hastalık için özel bir vektör tasarlamak gerekir. Çünkü her vektör, belli ölçülerde, dışardan verilen DNA parçasını taşıyabilir. Genlerin büyüklüğü de vektör seçimi için önemlidir. Öte yandan her vektör özel bir hücre tipine girebilir örneğin adeno-assosiyasyon virüsü (AAV) vektörler bölünmeyen hücrelere girerken, HSV vektörü bölünen hücreleri transfekte eder.

5. Transfeksiyon Yöntemleri

Dışarıdan verilen tedavi edici gen parçacıkları çeşitli yöntemler ile tedavi edilecek hücrelere aktarılabilir. Bu stratejiler 2 ana kategoride yer alır; fizikokimyasal yöntemler ve biyolojik yöntemler. Fizikokimyasal yöntemler, DNA'nın doğrudan hücreye enjeksiyonudur. Örneğin elektroporasyon, gen tabancası (balistik gen enjeksiyonu), sonoporasyon gibi fiziksel yöntemler ya da lipozom ve dendrimerler gibi kimyasal yapılar kullanılır. Bu yöntemlerde fizikokimyasal kurallar kullanılarak DNA parçaları hücre içine sokulur. Örneğin gen tabancası yönteminde ilk DNA parçaları altın ya da tungstenden oluşan 1-3 mikron boyutunda mikroparçacıklar ile örtülür, daha sonra bu DNA/nanopartikül parçaları güç üreten bir cihaza yüklenir. Parçacıkların hız kazandırılarak, hücre zarını delip, sitoplazmaya girmesi sağlanır. Sitoplazma içinde nanopartiküller DNA'dan ayrılıp DNA nükleusa girer ve görevini yapar. Fiziksel yöntemlerin avantajı basit bir yöntem olmasıdır. Ancak düşük verimlilik ve *in vivo* olarak kullanım zorluğu dezavantajlarıdır (11).

İkinci grup ise biyolojik yöntemlerin kullanımınıdır. Biyolojik gen aktarılması için genellikle virüsler veya plazmidler kullanılır. En yaygın kullanılan biyolojik vektörler viral vektörlerdir. Virüslerin hastalığa yol açan gen parçalarının yerine, hastaları iyileştirme amacıyla rekombinant genler yerleştirir. Adeno-assosiyasyon virüsü, retrovirüs, adenovirüs ve herpesvirüs vektörleri en sık kullanılan viral vektörlerdendir. Bu virüslerin kendi genomunu konakçı hücreye veren doğal stratejilerden yararlanır. Ancak ilk basamakta virüslerin patojen genleri çıkartılıp zararsız haline getirmesi gerekir. Şekil-3'te retrovirüs viral vektörünün elde edilmesi gösterilmiştir (13).



Şekil-3. Retrovirüs genomunun yapısı (A) ve retrovirüs vektörünün üretilmesindeki basamaklar (B) (LTR: Uzun terminal tekrarları) (13).

Daha sonra terapötik DNA parçaları *in vitro* koşullarında endonükleaz ve ligaz enzimlerin yardımıyla virüs genomunda entegre olup, paketleyici memeli hücre hatlarında virüs kapsitler içinde paketlenip terapötik virüs partikülleri oluşturur. Paketleyici memeli hücreler santrifüj ile çöktürüp, çeşitli yöntemler ile parçalanıp ve virüs partiküller izole edilecektir.

Retrovirüs aracılı gen terapisi için iki virüs yapısının kullanılması gerekir. Bunlardan biri tedavi edici vektördür ve klonlanmış sağlam geni ve paketleme sinyalini taşır; diğeri ise uzun terminal tekrarları (LTRs) ile çevrelenmiş retrovirüsün üç yapısal genini taşıyan virüs RNA'sıdır ve paketleme sinyali içermez. Yapısal vektör kapsid proteinlerinin üretilmesi ve virüsün montajı için gereklidir; *gag*, *pol* ve *env* genlerini taşır. (GAG: matris proteini, POL: revers transkriptaz enzimi, ENV: envelope proteinini kodlar). Vektör, paketleme sinyali içermediği için üretilen virüs partiküllere giremez ve hastayı enfekte

edemez. Her iki virüs yapısı aynı anda mevcut olduğunda, klonlanmış geni içeren tedavi edici vektör, kapsit içine paketlenir. Tedavi edici vektörün kapsit içine paketlenmesi, uygun bir hücre kültürü kullanılarak gerçekleştirir; bu hücre hattına "paketleme hücre hattı" denir. Gag, env ve pol genlerinin delesyonu vektör replikasyonunu defektli hale getirir ve bu yüzden paketleme hücre hattı kullanılır (13).

Viral vektörlerin bazı dezavantajları vardır; örneğin retrovirüs bölünmeyen hücreleri enfekte edemez, adenovirüs olumsuz immünolojik yanıt gösterir, herpesvirüsün sitotoksik etkisi vardır ve adeno-assosiyatif virüs kısıtlı yabancı genetik materyal taşıyabilme kapasitesine sahiptir. Tüm virüslerin ortak dezavantajı genin yanlış bir yere yerleşme tehlikesidir. Bunun nedeni

de virüslerin rastgele olarak genoma entegre olmasıdır. Bu şekilde konakçı hücrenin diğer genlerini keserek kansere ya da başka bozukluklara yol açabilir. Birden fazla hücre çeşidini enfekte edebilme özelliği ve eşey hücrelerine girme ihtimali, onların diğer dezavantajları olarak bilinir. Ancak günümüzde bu dezavantajları ortadan kaldırmak için çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Virüse ait kapsit proteinlerini değiştirip spesifik bir dokuya, örneğin karaciğer hepatosit hücrelerine girebilme özelliği kazandıran viral vektörlerin elde edilmesi gibi çalışmalar yapılmaktadır (23). Çalışmalarda en sık kullanılan viral vektörler ve özellikleri Tablo-1'de özetlenmiştir.

Tablo-1. En Sık Kullanılan Viral Vektörler ve Özellikleri (24).

Aile	Adenovirüs	AAV	Retrovirüs / Lentivirüs	Herpesvirüs
Genom	dsDNA	ssDNA	ssRNA ⁺	dsDNA
Enfeksiyon / tropizm	Bölünen ve bölünmeyen hücreler	Bölünen ve bölünmeyen hücreler	Bölünen hücreler	Bölünen ve bölünmeyen hücreler
Konakçı genomu ile etkileşimi	Entegre olmaz	Entegre olmaz	Entegre olur	Entegre olmaz
Transgen ifadesi	Geçici	Potansiyel uzun ömürlü	Uzun ömürlü	Potansiyel uzun ömürlü
Paketleme kapasitesi	7.5 kb	4.5 kb	8 kb	>30 kb

AAV: Adeno-assosiyatif virüs, +: Pozitif iplikçikteki RNA, dsDNA: Çift zincirli DNA, ssDNA: Tek zincirli DNA

6. Kanser Gen Tedavisi

Kanser tedavisinde kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi gibi geleneksel tedavi yöntemlerinin son derece gelişmesine rağmen, kanser hastalığı hala morbidite ve mortaliteye neden olan hastalıkların başında gelir (25). Bu nedenle kanser hücrelerini öldürmek için gen tedavisi gibi daha spesifik tedaviler ortaya çıkmıştır. Kanser gen tedavisinin amacı, sağlıklı hücreleri zarar vermeden kanser hücreleri vücuttan yok etmektir.

a. Mutasyona Uğramış Genlerin Düzeltilmesi

Çeşitli transfeksiyon yöntemleri kullanılarak sağlıklı genin kanser hücrelerine aktarılması teorik olarak uygulanabilir görünürken, kanserin genetik ve epigenetiki çok karmaşık olduğu için uygulanması çok zordur. Bu konuda en çok araştırılmış yöntem, *P53* geni aktarılmasıdır. *p53* hücre genomunun koruyucusudur (26). DNA hasarı, hipoksi ya da onkogenlerin anormal ifadesi ile *P53* aktiveleşir ve böylece hücre döngüsü kontrol noktaları, DNA onarımı, hücre yaşlanmaya ve apoptozuna yol açar. *P53*'ün tümör baskılayıcı olduğu ispatlanmış, ancak onun mekanizması hala tam olarak bilinmemektedir. *P53* DNA'ya bağlanıp transkripsiyonu aktiveleştirerek kanseri durdurur. Ancak hangi genlere bağlandığı ve nasıl kanseri durdurabildiği hala açıklanamamıştır (27). Hücrede *P53* geninin mutasyona uğramasıyla tümör oluşumu gerçekleşir. *P53*, DNA

hasarı, hipoksi ya da hücre döngüsü kontrol noktalarını teşvik etmek için anormal onkogen ifadesi, DNA onarımı, hücre yaşlanma ve apoptoz ile aktive edilebilir. *P53*, apoptozda yer alan Bcl-2 protein ailesinin ekspresyonunu artırır (28). *P53*'ün apoptozu sebep olması tümör hücrelerinin ortadan kaldırması için önemlidir. Kanser tedavisinde sağlıklı *P53* geni tümör hücrelerine girdiğinde kanserli hücre apoptozu uğrar (29, 30). *P53* geni taşıyan adenovirüs vektör tabanlı gen tedavisi ilacı, HNSCC (baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom) hastalığının tedavisinde 2003 yılında Çin'de üretilmiştir (31).

b. İmmünoterapi

Tümör nekrozis faktörü (TNF) proteini güçlü bir antitümör sitokindir. Bu protein, hem doğrudan tümör hücrelerini öldürebilir hem de tümör vasküliyzasyonunu arttırarak anti kanser ilaçların tümörün içine girmesini kolaylaştırır; böylece TNF proteinini alan kanser hücreleri kemoterapiye daha duyarlı olurlar (32). TNF proteinini eksprese eden beyaz kan hücreleri tümör filtre edici lenfositler (TILs) olarak tanımlanır. TIL'ler, normalde tümör içine sızıp TNF proteinini salgılayarak birçok küçük kanserin ortadan kaldırılmasında oldukça etkilidir. İmmün sistem, baskılanamayan büyük kanser tümörlerine saldırmak için TNF üretimini arttırmalıdır (33-38). Tedavide, laboratuvar ortamında, bakteri hücrelerinde,

TNF geni klonlanmalıdır. Daha sonra hastanın beyaz kan hücreleri alınıp kültüre edilmelidir. TNF geninin birden fazla kopyası beyaz kan hücrelerinin içine aktarıldığında beyaz kan hücreleri hastaya tekrar geri nakil edilecektir (39, 40). Bu şekilde kanserli hücreye doğrudan saldırı ve bu hücrelerin ortadan kaldırılması gerçekleşecektir.

Diğer stratejide, en güçlü anti-tümör sitokini olan IL12'yi kullanmaktır. Bu sitokin, yardımcı T hücreleri-1 yanıtını indükler, doğal öldürücü hücreler (NK hücreleri) ve sitotoksik T lenfositleri etkinleştirir, tümöral neoangiogenezi inhibe eder, endotelial hücrelerin üzerindeki adezin moleküllerinin ifadesini artırır, lenfositleri tümöre çeker (41). IL12 proteini doğrudan verilirse, vücuttaki konsantrasyonu arttığında toksik olabilir (41); bu nedenle tümör bölgesinde lokal konsantrasyonunun artması için gen tedavisi teknikleri kullanılabilir. IL12 genini taşıyan adenovirüsler, çeşitli kanserli deney hayvanlarına aktarıldığında tümörün tamamen yok edilmesi ve hayvanın yaşam süresinin uzatılması sağlanmıştır (42).

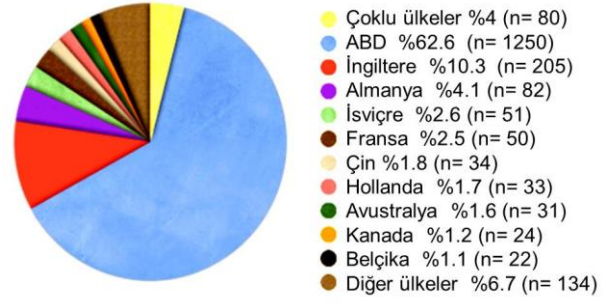
c. İntihar Gen Terapisi: Anti-kanser İlaç + Gen Tedavisi

Bu tedavi yönteminde, hücrelerde zararsız olan bir ön-ilaç hastaya verilecektir. Daha sonra ön-ilaç aktifleşen ve normalde insanlarda bulunmayan bir enzim kanserli hücrelere verilecektir. Bu enzimin ifadesini ön-ilaç aktifleşir ve toksik ilaç kanser hücrelerinin içinde üretilecektir. Sonuçta kanserli hücre ölecektir. Bu nedenle bu yönteme intihar gen tedavisi denir.

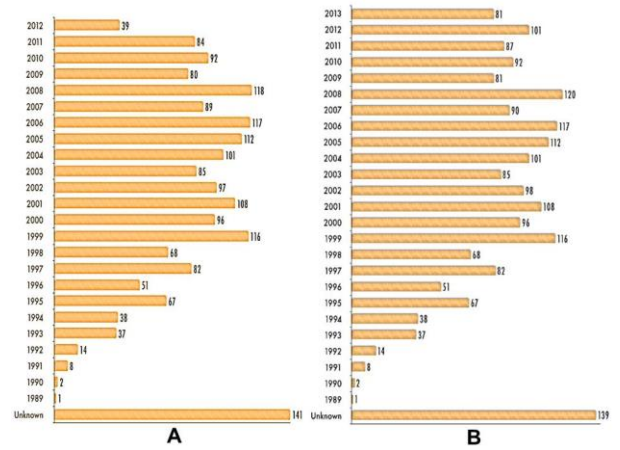
İntihar gen tedavisinde en yaygın kullanılan gen, herpes simpleks virüslerinde bulunan timidin kinaz (HSV-tk) enzimini kodlayan gendir. Bu enzim, insan hücreleri için toksik olmayan gansikloviri (GCV), gansiklovir monofosfat şekline dönüştürür. Daha sonra, kanser hücresinde de bulunan normal hücresel enzimler, gansiklovir monofosfatı gansiklovir trifosfata dönüştürür (GCV-TP). S fazı ve G2 fazında bir gecikme indüklenen HSV-tk/GCV-TP sistemi, kanserli hücreyi apoptoza sokar. Sadece kanser hücrelerinin içinde timidin kinaz enzimi üretilmesi nedeniyle, kanserli olmayan hücreler bu ilaçtan etkilenmez. Timidin kinaz geni aktarılması için değişik vektör sistemleri kullanılabilir, ancak tümör hücrelere spesifik olarak transfekte edilen onkogenik virüsler tercih edilir. İntihar gen tedavisinde kanser hücreleri spesifik olarak hedeflenmek için bu hücreler üzerinde bulunan çeşitli reseptörler kullanılır (43).

7. Gen Tedavisi Alanındaki Son Gelişmeler

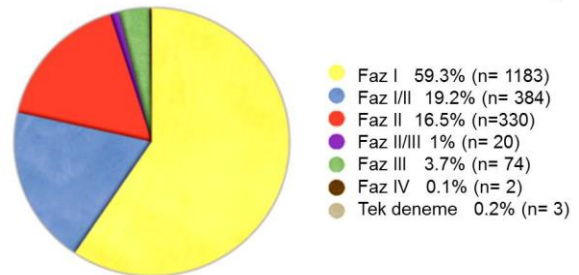
Gen tedavisi klinik uygulamalarına sayı olarak baktığımızda en çok çalışmanın Amerika Birleşik Devletleri tarafından yapıldığını görmekteyiz. Ülkelere göre gen tedavisi uygulama sayıları ve yıllara göre dağılımları Şekil-4 ve 5'te gösterilmiştir (44).



Şekil-4. Toplam 1970 kinik uygulamanın ülkelere göre dağılımı (44).



Şekil-5. Gen tedavisi klinik uygulamalarının yıllara göre dağılımı; A-2012 yılına kadar (45) ve B-2013 (44).



Şekil-6. 2013 yılı verilerine göre, gen tedavisi ile ilgili yürütülen faz çalışmaları ve bunların sayıları (44).



Şekil-7. Gen tedavisi uygulanması için hedeflenen hastalıklar (44).

Şekil-5'te A ve B şekillerindeki verilerde 2012 ve 2013 gen tedavisi sayıları görülmektedir. A şeklinde 2012 yılına ait gen tedavisi sayısı 39, B şeklinde bu sayı 100 olarak verilmiştir. Bazı araştırmacılar sonuçlarını geç yayınladığı için ve her sene yarısında güncellemeler yapıldığı için B şeklindeki 2012 sayıları artış göstermektedir. Aynı nedenlerden, 2013 yılı gen tedavisi çalışmalarının sayısının bir sonraki güncellemede artmasını bekleyebiliriz. Gen tedavisi konusunda yapılmakta olan bilimsel araştırmaların klinik kullanıma geçmeden önce izlediği yollar ve durumlarına bakacak olursak, bu klinik çalışmaların 3/4'ü faz I veya faz I/II'dedir (%78.5). Diğerleri ise faz II, II/III ya da III'tedir (%21.2) (Şekil-6). Faz II ve III çalışmaları önceki senelere göre artış göstermektedir; bu da yeni gen tedavisi ilaçlarının umut vaad ettiği ve yakın zamanda piyasaya çıkacağı şeklinde yorumlanabilir (44).

Günümüze kadar çeşitli hastalıklar için gen tedavisi uygulanmıştır ve bunlardan birkaçı başarıya ulaşmıştır. Bu klinik uygulamaların büyük çoğunluğunu kanser hastalıkları üzerine denenmektedir (Şekil-7). Daha sonra sırasıyla tek gen hastalıkları, enfeksiyon hastalıkları ve kardiyovasküler hastalıklar gelmektedir (Şekil-7). Klinik gen tedavisi denemesi yapılan hastalıklar detaylı olarak Tablo-2'de verilmiştir.

Gen tedavisinin yeni başarılarından, HNSCC (baş ve boyun skuamöz hücreli karsinoma) (31) ve LPL (47) hastalıkları için gen tedavisi ilaçlarının piyasaya verilmesi örnek olarak verilebilir. Bunlardan ilki, 2003 yılında HNSCC kanseri için geliştirilen P53 proteini eksprese eden rekombinant adenovirüs gen tedavisi ilacıdır (rAd-P53). Bu ilaç üzerinde 5 yıldan daha fazla klinik çalışmalar yapılmıştır ve yan etki olarak kendi kendini sınırlayan ateş bildirilmiştir. Bu ilaç Çin'de Devlet Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanmıştır (31).

Sağlıklı LPL geni taşıyan rekombine adeno-assosiyasyon virüs vektörü (rAAV1-LPL), 2012 yılında Avrupa onayını alan dünyadaki ikinci gen tedavisi ürünü ve batı dünyasının ilk gen tedavi ilacı olarak bilinir. Bu çalışmanın fikirleri, 26 sene önce Dr. Michael Hayden tarafından hipertrigliseridemi hastalığı ve LPL geni üzerinde çalıştığı zaman ortaya atılmıştır ve uzun süre denemeler ve klinik çalışmalar yapılmıştır (46). Günümüzde araştırmacılar, genetik hastalıkların tedavisinde yeni gen tedavisi ilaçlarını bulmaya yönelik çok yoğun araştırmalar yapmaktadırlar. Örnek olarak 2013 yılında Leber'in konjenital amorozisi (LCA) hastalığının gen tedavisinde çok büyük başarılar elde edilmiştir. Yaşamın ilk yıllarında körlükle sonuçlanan nadir retina distrofisi olan LCA hastalığı, RPE65 genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu hastalığın gen tedavisinde kullanılan rekombinant AAV vektörler, direk retinaya enjekte edilir.

Tablo-2. Klinik Gen Tedavisi Denenen Başlıca Hastalıklar (45).

Tek Gen Hastalıkları	Maligniteler
Adrenolökodistrofi α-1 antitripsin eksikliği Becker musküler distrofisi Beta-talasemi Canavan hastalığı Kronik granüloamatöz hastalık Kistik fibrozis Duchenne Musküler Distrofisi Fabry hastalığı Ailesel hiperkolesterolemi Ailesel adenomatöz polipozis Fankoni anemisi Galaktozalıdozis Gaucher hastalığı Gyrate atrofi Hemofili A ve B Hurler sendromu Hunter sendromu Huntington koresi Jonksiyonel epidermolizis bülloza Geç infantil nöronal lipofusinozis Lökosit yapışma eksikliği Limb-girdle musküler distrofisi Lipoprotein lipaz eksikliği Metakromatik lökodistrofi Mukopolisakkaridoz tip VII Ornitin transkarbamilaz eksikliği Pompe hastalığı Pürin nükleozid fosforilaz eksikliği Resesif distrofik epidermolizis bülloza Orak hücre hastalığı Ciddi kombine immün yetmezliği (SCID) Tay-Sachs hastalığı Wiskott-Aldrich sendromu	Jinekolojik: Meme, uterus, serviks Sinir sistemi: Glioblastoma, leptomeningeal karsinomatozis, glioma, astrositoma, nöroblastoma, retinoblastoma Gastrointestinal: Kolon, kolorektal, karaciğer metastazları, post-hepatik, karaciğer kanseri, pankreas, safra kesesi Genitoüriner: Prostat, böbrek, mesane, ano-genital neoplazi Cilt: Melanom (malign / metastatik) Baş ve boyun: Nazofarenks karsinomu, skuamöz karsinom, özofageal kanser Akciger: Adenokarsinom, küçük hücreli / küçük hücreli olmayan, mezotelyoma. Hematolojik: Lösemi, lenfoma, multipl myelom, sarkom, germ hücre tümörleri, Li-Fraumeni sendromu, tiroid neoplazmları
Kardiyovasküler Hastalıklar Kronik böbrek hastalığı anemisi Anjina pektoris (kararlı, kararsız, refrakter) Koroner arter darlığı Koroner kalp hastalığı Kritik ekstremitte iskemisi Kalp yetmezliği Aralıklı klodikasyon Miyokardiyal iskemi Periferik arter hastalığı Pulmoner hipertansiyonu Venöz ülserleri Diyabetin vasküler komplikasyonları	Nörolojik Hastalıklar Alzheimer hastalığı Amyotrofik lateral skleroz Karpal tünel sendromu Kübital tünel sendromu Diyabetik nöropati Epilepsi Multipl skleroz Myastenia gravis Parkinson hastalığı Periferik nöropati Ağrı Göz Hastalıkları Yaşa bağlı maküla dejenerasyonu Diyabetik maküla ödemi Glokom Retinitis pigmentosa Yüzeysel nefelyon Koroideremi Leber'in konjenital amorozisi Enflamatuvar hastalıklar Artrit (romatizmal, iltihabi, dejeneratif) Dejeneratif eklem hastalıkları Ülseratif kolit Rektumun inflamatuvar hastalığı Diğer Hastalıklar Kronik böbrek hastalığı Eretil disfonksiyon Detrusör aşırı aktivitesi İnflamatuvar bağırsak hastalığı Romatoid artrit Kırıklar Mitokondrial hastalıklar Oral mukozit Parotis hipofonksiyonu
Enfeksiyon Hastalıkları Adenovirüs enfeksiyonu Sitomegalovirüs (CMV) enfeksiyonu Epstein-Barr virüs Hepatit B ve C HIV/AIDS Grip hastalığı Japon ensefaliti Malarya Tüberküloz	

İlk insan deneyleri 2007 yılında İngiltere'de Prof. Dr. Robin Ali tarafından yapılmıştır. Bu tedavide hiç bir yan etkileri gözlenmemiş ve 23 yaşındaki Robert Johnson'ın LCA hastalığından tamamen iyileştiği ve görme yeteneğini kazandığı bildirilmiştir (47). Daha sonra 2009-2010 yılında Prof. Dr. Jean Bennett tarafından, Pennsylvania Üniversitesi'nde, 12 hasta üzerinde yapılan bir araştırmada 6 kişi yeterince görme yeteneği kazanmışlardır (48). Bu tedavilerin 3 yıllık takiplerinde, görsel iyileşmenin, tedavinin 6. ayından sonra en yüksek seviyeye ulaştığı ve son izleme kadar stabil olduğu bildirilmiştir (49). LCA gen tedavisi araştırmaları şu anda faz III aşamasında olup, yakın zamanda bu ilaçların piyasaya çıkması beklenmektedir.

Bilinen herhangi bir tedavisi olmayan, *IFT88* geninin mutasyonu nedeniyle ortaya çıkan bir siliyopati hastalığı genini taşıyan fareler, koku yeteneği kaybı nedeniyle yemek yemediklerinden dolayı ölmektedirler. Bu model üzerinde yapılan çalışmada, adenovirus aracılığıyla sağlıklı *IFT88* geni farelere aktarılmış, *IFT88* geninin, hasta farenin siliyer yapılarının düzenlenmesi ve koku fonksiyonunun kazanılması için yeterli olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma memelilerde siliyopatinin ilk gen tedavisi olarak kabul edilmektedir (50). Hemofili A hastalığı pıhtılaşma faktör VIII (FVIII) eksikliğinden ortaya çıkan kanama riskini artıran bir hastalıktır. Ağır Hemofili A hastalarının ciddi kanamasını önlemek için rekombinant faktör VIII intravenöz enjeksiyon yoluyla verilir. 2013 yılında yapılan bir çalışmada iki hemofili A hastalığına sahip köpeğin gen tedavisinden sonra tamamen iyileştikleri belirtilmiştir. Bu çalışmada, kemik iliğinin hematopoetik kök hücreleri izole edilip, FVIII geni taşıyan lentivirüs vektörler ile transfekte edilmiştir. Daha sonra transfekte olmuş hematopoetik kök hücreler aynı köpeğe nakil edilmiştir. Lentivirüs vektör ile insan trombositlerinde FVIII genin ifadesini sağlayan, özgün *ITGA2B* gen promoteri kullanıldığı için FVIII proteini sadece trombositlerde eksprese olur. Trombosit kaynaklı FVIII için inhibitör antikorları yoktur. Bu yüzden bu yaklaşım, faktör VIII tedavisini reddeden hastalarda yararı olabilir. Böylece, trombosit faktör VIII ile hemofili A hastalarında kanamanın etkili bir şekilde ve uzun vadeli kontrolü sağlanabilir (51).

Gen tedavisinin klinik uygulamalarına geçmeden önce, tedavinin yan etkileri iyice incelenmelidir. Vektörün toksik

etkisi nedeniyle, 1999 yılında 18 yaşındaki Jesse Gelsingen gen tedavisi uygulaması sonrasında hayatını kaybetmiştir. Bu hastada, azot metabolizmasının bozukluğu olan ornitin transkarbamilaz eksikliği tedavi edilmeye çalışılmıştır. Gen tedavisinden sonra adenovirüs vektöre karşı ağır inflamatuvar yanıtlar oluşması nedeniyle karaciğer, akciğer ve diğer organların yetmezliği ortaya çıkmış ve hasta hayatını kaybetmiştir (24). Bu başarısız örnek göz önünde alarak, gen tedavisi ürünlerinin klinik çalışmalara girmeden önce hayvan modelleri üzerinde yeterince denenmesi gerektiği ortaya çıkmaktadır. Bunun yanı sıra immün yanıtları uyarmadan, spesifik dokuya girebilen ve DNA parçalarının taşınması için yeterli kapasiteye sahip olan uygun vektörler bulmaya yönelik araştırmalar devam etmektedir. Örnek olarak, günümüzde araştırmacılar, laboratuvar düzeyinde virüse ait kapsit proteinlerini değiştirip spesifik bir dokuya girebilme özelliği kazanan viral vektörler elde edilmesi üzerinde çalışmaktadırlar (23).

Bazı araştırmacılar gen parçalarını hücreye verebilmek için yeni yöntemleri denemektedir. Uterus içinde uygulanan fetal gen tedavisi bu yöntemlerden birisidir. Uterus içinde tedaviler geliştirildiğinde, hastalığın semptomları ortaya çıkmadan hastalığın tedavisi mümkün olabilecektir. Fetüsün en önemli özelliği, olgunlaşmamış bir immün sisteme sahip olmasıdır. Böylece dışardan verilen vektör ve genlere karşı immün yanıtlar gelişmemektedir ve daha uzun süreli gen ifadesi sağlanabilmektedir. Ayrıca, fetal dönemde kök hücre sayısı çok yüksektir. Bu hücrelerin hızlı genişlemesi, gen tedavisi için büyük bir avantaj olarak bilinmektedir. Böylece transfekte olmuş hücrelerin sayısı daha rahat bir şekilde artar (52). Bu yöntemler, hayvan modelleri üzerinde başarılar elde etmesine rağmen insan klinik uygulamaları öncesinde, etik de dahil olmak üzere birçok sorunu beraberinde getirmektedir.

Sonuç olarak, birçok kanser türü, tek gen hastalıkları, enfeksiyonlar, kardiovasküler hastalıklar gibi çeşitli klinik durumlar için umut vaat eden gen tedavisi, klinik uygulamalarından önce, yan etkileri bakımından iyice araştırılmalı, uygun vektörler tasarlanmalı ve güvenli gen tedavisi yaklaşımları yapılmalıdır.

Kaynaklar

1. Baltimore D. Viral RNA-dependent DNA polymerase: RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 1970;226(5252):1209-11.
2. Jackson D, Symons R, Berg P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972;69(10):2904-9.
3. Lobban P, Kaiser A. Enzymatic end-to end joining of DNA molecules. *J Mol Biol* 1973;78(3):453-71.

4. Cohen S, Chang A, Boyer H, Helling R. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973;70(11):3240-4.
5. Williamson B. Gene therapy. *Nature* 1982;298(5873):416-8.
6. Watson JD. Gene therapy: How ripe the time? *Lancet* 1981;317(8213):196-7.
7. Wolff JA, Lederberg J. An early history of gene transfer and therapy. *Hum Gene Ther* 1994;5(4):469-80.
8. Wade N. Gene therapy caught in more entanglements. *Science* 1981;212(4490): 21-4.
9. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, et al. T Lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: Initial trial results after 4 years. *Science* 1995;270(5235):475-80.
10. Haritha PN, Devi SKU, Nagaratna DP, Chaitanya PSK, Gunasekharan V. Gene therapy-a review. *Int J Biopharmaceutics* 2012;3(1):55-64.
11. Patil PM, Chaudhari PD, Megha S, Duragkar NJ. Review article on gene therapy. *Int J Genet* 2012;4(1):74-9.
12. Gaj T, Gersbach CA, Barbas III CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* 2013;31(7):397-405.
13. Clark DP, Pazdernik NJ. *Biotechnology*. 1st Edition. Academic Cell Update; 2012:477-97.
14. Smith KR. Gene therapy: The potential applicability of gene transfer technology to the human germline. *Int J Med Sci* 2004;1(2):76-91.
15. Nielsen TO. Human germline gene therapy. *MJM* 1997;3(2):126-32.
16. Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics*. 3rd Edition. Garland Publishing; 2004:616.
17. Fletcher JC, Anderson WF. Germ-line gene therapy: A new stage of debate. *Law Med Health Care* 1992;20(1-2):26-39.
18. De Wachter MA. Ethical aspects of human germ-line gene therapy. *Bioethics* 1993;7(2-3):166-77.
19. Berger EM, Gert BM. Genetic disorders and the ethical status of germ-line gene therapy. *J Med Philos* 1991;16(6):667-83.
20. Anderson WF. Human gene therapy: Why draw a line? *J Med Philos* 1989;14(6):681-93.
21. Li S, Huang L. Nonviral gene therapy: Promises and challenges. *Gene Ther* 2000;7(1):31-4.
22. Li SD, Huang L. Gene therapy progress and prospects: Non-viral gene therapy by systemic delivery. *Gene Ther* 2006;13(18):1313-9.
23. Aslanidi GV, Rivers AE, Ortiz L, et al. Optimization of the capsid of recombinant adeno-associated Virus 2 (AAV2) vectors: The final threshold? *PLoS One* 2013;8(3):1-12.
24. Sheridan C. Gene therapy finds its niche. *Nat Biotechnol* 2011;29(2):121-8.
25. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2013;63: 11–30.
26. Read AP, Strachan T. *Human molecular genetics*. 4th ed. New York: Wiley; 2010:551.
27. Mellert H, Espinosa JM. Tumor suppression by p53: Is Apoptosis important or not? *Cell Rep* 2013;3(5):1335-6.
28. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 2003;22(56):9030-40.
29. Slack RS, Belliveau DJ, Rosenberg M, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of the tumor suppressor, p53, induces apoptosis in postmitotic neurons. *J Cell Biol* 1996;135(4):1085-96.
30. Lane DP, Cheek CF, Lain S. p53-based cancer therapy. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2(9):1-24.
31. Pearson S, Jia H, Kandachi K. China approves first gene therapy. *Nat Biotechnol* 2004;22(1):3-4.
32. Su B, Cengizeroglu A, Farkasova K, et al. Systemic TNF α gene therapy synergizes with liposomal doxorubicin in the treatment of metastatic cancer. *Mol Ther* 2013;21(2):300-8.
33. Boon T, Coulie PG, Van den Eynde B. Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol Today* 1997;18(6):267-8.
34. Baxevanis CN, Dedoussis GV, Papadopoulos NG, Missitzis I, Stathopoulos GP, Papamichail M. Tumor specific cytolysis by tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Cancer* 1994;74(4):1275-82.
35. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 1991;254(5038):1643–7.
36. Suzuki H, Chikazawa N, Tasaka T, et al. Intratumoral CD8 (+) T/FOXP3 (+) cell ratio is a predictive marker for survival in patients with colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2010;59(5):653-61.
37. Noshio K, Baba Y, Tanaka N, et al. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: Cohort study and literature review. *J Pathol* 2010;22(4):350-66.
38. Pagès F, Berger A, Camus M, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005;353(25):2654-66.
39. Kircheis R, Ostermann E, Wolschek MF, et al. Tumor-targeted gene delivery of tumor necrosis factor-alpha induces tumor necrosis and tumor regression without systemic toxicity. *Cancer Gene Ther* 2002;9(8):673-80.
40. Horie S, Watanabe Y, Ono M, Mori S, Kodama T. Evaluation of antitumor effects following tumor necrosis factor-a gene delivery using nanobubbles and ultrasound. *Cancer Sci* 2011;102(11):2082-9.
41. Trinchieri G. Interleukin-12: A cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv Immunol* 1998;70(1):83-243.
42. Qian C, Liu XY, Prieto J. Therapy of cancer by cytokines mediated by gene therapy approach, *Cell Res* 2006;16(2):182-8.
43. Zarogoulidis P, Darwiche K, Sakkas A, et al. Suicide gene therapy for cancer – current strategies. *J Genet Syndr Gene Ther* 2013;4(1):1-39.
44. Gene therapy clinical trials worldwide, the journal of gene medicine.
(Available from: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>)
45. Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – an update. *J Gene Med* 2013;15(2):65-77.
46. Kastelein JJ, Ross CJ, Hayden MR. From mutation identification to therapy: Discovery and origins of the first approved gene therapy in the Western world. *Hum Gene Ther* 2013;24(5):472-8.
47. Bainbridge JWB, Smith AJ, Barker SS, et al. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2008;358(21):2231-9.

48. Maguire A M, High KA, Auricchio A, et al. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: A phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 2009;374(9701):1597-605.
49. Testa F, Maguire AM, Rossi S, et al. Three-year follow-up after unilateral subretinal delivery of adeno-associated virus in patients with Leber congenital amaurosis type 2. *Ophtha* 2013;120(6):1283-91.
50. McIntyre JC, Davis EE, Joiner A, et al. Gene therapy rescues cilia defects and restores olfactory function in a mammalian ciliopathy model. *Nat Med* 2012;18(9):1423-8.
51. Du LM, Nurden P, Nurden AT, et al. Platelet-targeted gene therapy with human factor VIII establishes haemostasis in dogs with haemophilia A. *Nat Commun* 2013;4(2773):1-11.
52. David AL, Peebles D. gene therapy for the fetus: Is there a future? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2008;22(1):203-18.