



Annette Deichmann

Gentherapie - Wege zu einer sicheren Therapie

Vortrag auf der Plenartagung „Molekulare Netzwerke in Biologie und Medizin“ am 6. April 2017

Veröffentlicht: 15.06.2017

Die DNA, das genetische Material aller Lebewesen, enthält den Code für die Herstellung aller Bausteine unserer Zellen. Die Information für einzelne Proteine ist in bestimmten DNA-Abschnitten, den sogenannten Genen enthalten. Kommt es zu Veränderung einzelner Bausteine (Nukleotide) oder Abschnitte der DNA, kann dies zu Veränderungen der Proteinbausteine und damit zu Änderungen der Funktionen oder des Aufbaus der einzelnen Zellen, letztendlich aber auch zu Auswirkungen auf den gesamten Organismus kommen. Die Behandlung solch genetisch verursachter Erkrankungen ist sehr oft nicht möglich, da entsprechende therapeutische Maßnahmen fehlen. In manchen Fällen kann eine Substitutionstherapie, also der medikamentöse Ersatz des fehlenden Produkts eine Krankheit therapieren. Dies ist mitunter aber mit Nebenwirkungen verbunden.

Bei genetisch bedingten Erkrankungen des blutbildenden Systems ist der Einsatz von Zelltherapien, wie zum Beispiel die Knochenmarkspende, schon weit verbreitet. Man tauscht quasi genetisch auffällige gegen genetisch gesunde Zellen aus. Vorausgesetzt, es wird ein geeigneter Spender gefunden, sind die Erfolgchancen der Therapie sehr hoch. Allerdings ist die Suche nach geeigneten Spendern nicht immer erfolgreich, sodass oft auf haploidentische Spender zurückgegriffen werden muss, die genetisch nur bedingt mit dem Empfänger übereinstimmen. Dies lässt das Risiko von schweren, oft tödlichen Nebenwirkungen stark ansteigen. Für solche Fälle bietet die Gentherapie insbesondere für die Behandlung von monogenetischen Erkrankungen eine denkbare und oft bessere Alternative.

Welche Idee steckt hinter der Gentherapie? Im Falle einer monogenetischen Erkrankung wird durch eine oft sehr kleine genetische Veränderung in nur einem Gen eine Krankheit ausgelöst, die sogar lebensbedrohend sein kann. Ein Ersatz des defekten Gens durch ein intaktes Gen soll dafür sorgen, dass das korrekte Genprodukt wiederhergestellt wird und somit zu einer Heilung der Erkrankung führen. Am elegantesten wäre der genaue Ersatz des betroffenen DNA-Abschnitts in den betroffenen Zellen, also eine Genreparatur. Obwohl bereits der Einsatz spezialisierter Designer-Nukleasen zu ersten vielversprechenden experimentellen Ansätzen geführt hat, ist die Anwendung dieser Methode am Patienten noch sehr schwierig und wenig effizient. Die derzeit gängige Methode in der Gentherapie ist daher der zusätzliche Einbau eines intakten Gens an einer mehr oder weniger zufälligen Stelle im Genom.

Für die Übertragung des intakten Gens in die Zellen nutzt man einen hocheffizienten Mechanismus aus der Natur, die Viren. Viren sind infektiöse Partikel, die in Zellen eindringen und deren „Infrastruktur“ bei der Proteinproduktion nutzen müssen, um sich selbst zu vermehren. Hierbei haben Viren sehr effiziente Mechanismen entwickelt, um in verschiedene Zelltypen eindringen und diesen ihr genetisches Material einspritzen zu können. Viren besitzen außerdem ein sehr kleines Genom, da sie nur die wenigen Gene in die Zelle einbringen, die die Wirtszelle nicht zur Verfügung stellen kann. Da das Ziel der Gentherapie lediglich ist, das korrekte Gen in die Zelle zu bringen, werden diese viralen Gene nicht benötigt und können durch das intakte, therapeutische Gen ersetzt werden. Die so veränderten Viruspartikel werden virale Vektoren genannt. Es sind also gewissermaßen natürliche Injektionshilfen für genetisches Material.

Die Infektion der betroffenen Zellen mit viralen Vektoren kann entweder direkt im Patienten, also *in vivo* erfolgen, oder *ex vivo* an vorher entnommenen patienteneigenen Zellen (z.B. Blutzellen), die nach der Aufnahme der viralen DNA, der Transduktion, wieder in den Patienten zurückgegeben werden.

Bei der Verwendung von retroviralen Vektoren wird die transduzierte DNA direkt ins Genom der Patientenzelle eingebaut und kann damit an die nachfolgenden Zellgenerationen weitergegeben werden und so einen dauerhaften Therapieerfolg gewährleisten. Eine wichtige Frage hat die Arbeitsgruppe von Prof. Christof von Kalle, der auch ich angehöre, seit fast 20 Jahren beschäftigt. Wo genau integrieren die viralen Vektoren und welche Auswirkungen kann dies auf den Erfolg, aber auch das Risiko dieser neuen Therapie beim Menschen haben?

Um die genauen Integrationsstellen, die nichts anderes als eine Fusionssequenz aus einer bekannten und einer unbekanntem DNA-Sequenz darstellen, auch in minimalen Gewebemengen mit einer großen klonalen Diversität oder niedrigen Kopienzahlen eines Zellklons zu bestimmen, haben Christof von Kalle und Manfred Schmidt eine besondere Form der PCR, die sogenannte lineare amplifikationsmedierte PCR (LAM-PCR) entwickelt. Vorteil dieser Methode ist, dass durch die initiale lineare PCR der unbekannte Teil der Fusionssequenz zunächst vervielfältigt werden kann, ehe die anschließende exponentielle Vervielfältigung erfolgt. Durch diese Anreicherung im ersten Schritt erhöht man die Sensitivität der Methode deutlich und gleicht Materialverluste bei Zwischenschritten aus. Diese Methode ist so sensitiv, dass auch einzelne Zellklone untersucht werden können (Schmidt 2007).

Da die Integration eines viralen Vektors ins Genom nicht an einer definierten Stelle, sondern vielmehr zufällig verteilt erfolgt, erhält die betreffende Zelle durch die einzigartige Fusionssequenz eine individuelle Markierung, die eine Bestimmung der Anzahl und klonalen Beteiligung einzelner genomodifizierter Zellen erlaubt. Die LAM-PCR Methode wurde zunächst an Genmarkierungsstudien getestet, mit der die Blutbildung an einem nicht-humanen Primatenmodell nach Stammzelltransplantation untersucht werden sollte. Es konnte gezeigt werden, dass die Blutbildung polyklonal ist und von langzeitaktiven Zellklonen getrieben wird. Es konnte auch nachgewiesen werden, dass initial primitive Progenitor- oder Stammzellen transduziert wurden (Schmidt 2002). Langzeit-Untersuchungen ergaben aber auch Hinweise, dass die klonale Aktivität *in vivo* durch die virale Integrationsstelle beeinflusst werden kann (Schmidt 2002, Hematti 2004, Calmels 2005).

In Don Kohns erster klinischer Gentherapiestudie zur Behandlung der Adenosin-Desaminase-Defizienz (ADA-SCID, eine schwere Immundefizienz-Störung) konnte mit Hilfe der LAM-PCR nachgewiesen werden, dass die Regeneration der lymphopoetischen Zellen zwar stabil blieb, aber ein monobis oligoklonales Muster zeigte (Kohn 1995). Im Gegensatz zu späteren Studien kam es nicht zu einem malignen monoklonalen Zellwachstum. Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die LAM-PCR Methode auch bei der Untersuchung von humanen Leukozyten des peripheren Bluts angewendet werden kann.

Im Jahr 2000 wurde die erste erfolgreiche Gentherapiestudie zur Behandlung des schweren kombinierten Immundefekts SCID-X1 von Marina Cavazzana-Calvo und Alain Fischer am Hôpital Necker in Paris durchgeführt (Cavazzana-Calvo 2000). Kurze Zeit später gelang dieser Erfolg auch Adrian Thrasher und Bobby Gaspar vom University College London (Gaspar 2004). Mit Hilfe von Integrationsstellenanalysen konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass gen-korrigierte Zellen sowohl das Potential zur lymphomyeloiden Zelldifferenzierung als auch eine Selbsterneuerungskapazität besitzen und somit die Blutbildung aufrecht erhalten können (Schmidt 2005). Unglücklicherweise entwickelten einige der Patienten eine T-Zell Leukämie (Hacein-Bey-Abina 2003b). Als Vektor wurde in diesen Studien ein gamma-retroviraler MLV-Vektor verwendet, der vollständige Long-Terminal-Repeats (LTR) enthält. Diese viralen DNA-Fragmente enthalten einen starken Promoter (Initiator der Genablesung) und Enhancer (Verstärker der Genablesung), der in der Lage war, das benachbarte Proto-Onkogen LMO2 zu aktivieren (Hacein-Bey-Abina 2003b). Die Aktivierung eines Protoonkogens durch einen gammaretroviralen Vektor mit vollständigen LTR-Regionen, wurde auch in der Londoner SCID-X1 Studie (Howe 2008), in einer Studie zur Behandlung der Chronischen Granulomatose (Ott 2006, Stein 2010) und des Wiskott-Aldrich-Syndroms (Braun 2014) beobachtet.

Andere Gentherapiestudien nutzten lentivirale Vektoren für den Gentransfer. Erfolgreich wurde ein solcher Vektor für die Behandlung der X-Adrenoleukodystrophie eingesetzt (Cartier 2009). Die Identifizierung von identischen Integrationsstellen in myeloiden und lymphoiden Blutzellen konnte beweisen, dass frühe Progenitorzellen initial transduziert wurden. Unsere funktionellen Analysen,

der Vergleich von Proben vor und nach der Transplantation und die Bestimmung der bevorzugten Integrationsorte, ließen erfreulicherweise keine Zeichen potentieller vektorinduzierter Nebenwirkungen erkennen.

Um die Sicherheit weiter zu erhöhen, wurden neue selbst-inaktivierende (SIN) Vektoren konstruiert. Diesen Vektoren fehlt die starke Enhancer Region in den LTRs, stattdessen enthalten diese Vektoren einen internen schwachen Promotor, der das Ablesen des Transgens gewährleistet (Aiuti 2013, Biffi 2013). Lentivirale, aber auch retrovirale SIN-Vektoren werden mittlerweile in einer Vielzahl von Studien eingesetzt und zeigen bisher ein deutlich sichereres Integrationsverhalten als die erste Generation der gammaretroviralen Vektoren.

Das Monitoring von Vektorintegrationen wurde auch auf andere nicht-integrierende Vektorsysteme wie Adeno-Assoziierte-Vektoren (AAV) ausgeweitet. Wir haben diese Analysen für eine klinische Studie zur Behandlung der Lipoprotein-Lipase-Defizienz (LPLD) durchgeführt. Diese klinische Studie führte zur ersten Markt-Zulassung eines gentherapeutischen Vektors (Glybera®) in der westlichen Welt durch die Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA). Wie erwartet liegt die überwiegende Anzahl der Vektoren in Form episomaler Konkatemere vor und man findet große Deletionen in den endständigen Repeats des Vektors (ITRs) (Nowrouzi 2012). In einer von 10-20.000 Zellen integriert allerdings der Vektor auch ins Genom. Im Gegensatz zu den integrierenden retroviralen Vektoren waren die beobachteten Integrationen des AAV-Vektors gleichmäßig im Wirtsgenom verteilt und zeigten keine speziellen Präferenzen für Genregionen oder andere regulatorische Bereiche. Nach intramuskulärer Applikation des Gentherapievektors, jedoch nicht nach intravenöser Gabe, konnten wir allerdings eine gehäufte Integration in der mitochondrialen DNA nachweisen (Kaepfel 2013). Diese Beobachtung kann eventuell für die Behandlung von Erkrankungen, die auf mitochondrialen DNA-Veränderungen basieren, genutzt werden (Yu 2012).

Eine faszinierende Möglichkeit der Gentherapie ist eine gezielte Veränderung des betroffenen DNA-Bereichs durch Designer-Nukleasen wie Zink-Finger Nukleasen, TALENs (transcription activator-like effector nucleases) oder das CRISPR/Cas9 System. Durch Schneiden des DNA-Doppelstrangs mit Hilfe der Designer-Nukleasen und anschließende Reparatur durch die zelleigenen Reparaturmechanismen können einzelne Nukleotide ersetzt oder verändert oder Fragmente ausgetauscht werden. Um die Sicherheit dieser neuen molekularen Werkzeuge näher zu untersuchen, muss auch die nicht gezielte Aktivität dieser Nukleasen, die sogenannte off-target Aktivität näher untersucht werden. Hierfür haben wir mit der Gruppe von Luigi Naldini zum ersten Mal eine Methode entwickelt, mit der nicht nur die on-, sondern auch die off-target Aktivität von Zinkfinger-Nukleasen bestimmt werden kann (Gabriel 2011). Die Sensitivität und Spezifität der Bestimmung solcher off-target Integrationsereignisse ist für die weitere Entwicklung der gezielten genetischen Veränderung sehr wichtig.

In den letzten Jahren wurde die Genauigkeit und Effizienz der Integrationsstellenanalyse stetig weiterentwickelt und man fand eine Korrelation zwischen Vektorintegrationen und transkriptioneller Aktivität (Mitchell 2005, Deichmann 2007, Schwarzwälder 2007). Es wurden auch andere Faktoren gefunden, die die Integration fördern, z.B. die Integration in „common fragile sites“ (Bester 2006), in aktiv transkribierte Genregionen (Ciuffi 2005) oder in Bereiche für posttranslationale Histonmodifikationen (Wang 2010).

Die Bestimmung der Integrationsstellen mit Hilfe der LAM-PCR hat einen großen Nachteil: Durch die Verwendung von Restriktionsenzymen können während des Anreicherungsprozesses auch sehr kleine oder sehr große Fragmente entstehen, die nicht in ausreichender Anzahl amplifiziert oder korrekt identifiziert werden können. Um diese Schwachstelle zu beheben wurden zunächst die geeignetsten Kombinationen verschiedener Restriktionsenzyme ermittelt, um die Identifizierung möglichst vieler Integrationsstellen im Genom zu ermöglichen. Zusätzlich wurde eine abgewandelte LAM-PCR entwickelt, die zwar nicht die Sensitivität erreicht, dafür aber auf eine Behandlung der DNA mit Restriktionsenzymen komplett verzichtet, die sogenannte nicht-restriktive (nr) LAM-PCR (Gabriel 2009, Paruzynski 2010). Eine Kombination dieser Methoden wird derzeit routinemäßig für eine Vielzahl klinischer Studien eingesetzt. Eine andere Weiterentwicklung wurde möglich durch die immense Effizienz und Kostensenkung der Hoch-Durchsatz Sequenzierertechnologie. Hierbei erfolgt die Anrei-

cherung der viralen Vektorsequenzen mit Hilfe kleiner DNA oder RNA-Fragmente durch Hybridisierung und magnetische Extraktion, danach schließt sich eine Direktsequenzierung an. Dieses Verfahren des „Target Enrichment Sequencing“ (TES) umgeht Restriktion und Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments und umgeht damit die bekannten Schwachstellen der Integrationsstellenanalyse.

Mit dem stetigen Anstieg der Menge an Sequenzdaten, die man pro Experiment erhält, wurden auch schnelle und aussagekräftige bioinformatische Analysewerkzeuge notwendig, die unter anderem von uns entwickelt wurden, z.B. HISAP (Arens 2012) und QuickMap (Appelt 2009). Mit der fortschreitenden Entwicklung der Sequenzierstrategien und der damit immer größer werdenden Anzahl an zu analysierenden Sequenzen, mussten auch diese Programme immer wieder angepasst oder neu entwickelt werden. Das von uns entwickelte und in diesem Jahr veröffentlichte Analyseprogramm GeneIS (Afzal 2017) erlaubt eine äußerst schnelle und präzise Bestimmung der Integrationsstellen sowohl bei paired-end als auch bei single-end Sequenzierungen und kann sowohl für die LAM- und nrLAM-PCR als auch für die TES-Strategie eingesetzt werden. Die Analyse Pipeline ermöglicht unter anderem das automatische Trimming der Sequenzen, das Zusammenfassen zugehöriger Sequenzen, die Bestimmung der Anteile der Sequenzen innerhalb einer Probe, den Vergleich mit einem Referenzgenom sowie die Bestimmung des genauen Integrationsorts und benachbarter Gene.

Die Forschungen und Entwicklungen im Bereich Integrationsstellenanalysen, Sequenziertechnologien und bioinformatischer Analysetools haben dazu geführt, dass wir für die verschiedenen Fragestellungen im Bereich Gen- und Immuntherapie standardisierte Analysestrategien entwickeln konnten, die routinemäßig in präklinischen und klinischen Studien eingesetzt werden können. Damit können wir erheblich zur Überwachung und Sicherheit gentherapeutischer Maßnahmen beitragen.

Im Jahr 2014 wurden diese Routine-Dienstleistungen in ein Spin-off des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) ausgegründet. Die Start-up Firma heißt GeneWerk GmbH und hat ihren Sitz im Technologiepark Heidelberg. Die eigene Infrastruktur und geschultes Personal können jetzt noch besser eine gleichbleibende Qualität der Untersuchungen gewährleisten und helfen, Industriestandards zu etablieren. Das Portfolio der GeneWerk GmbH beschränkt sich nicht nur auf Integrationsstellenanalysen für die verschiedensten Gentherapievektoren, sondern umfasst auch Analysen aus dem Bereich der Immuntherapie, Entwicklung neuer bioinformatischer Analysetools und Beratungsleistungen.

Literatur:

- AFZAL S, WILKENING S, VON KALLE C, SCHMIDT M, *et al.* (2017). GENE-IS: Time-Efficient and Accurate Analysis of Viral Integration Events in Large-Scale Gene Therapy Data. *Mol Ther Nucleic Acids* 6, 133-139.
- AIUTI A, BIASCO L, SCARAMUZZA S, FERRUA F, *et al.* (2013). Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science* 341, 1233151.
- APPELT JU, GIORDANO FA, ECKER M, ROEDER I, *et al.* (2009). QuickMap: a public tool for large-scale gene therapy vector insertion site mapping and analysis. *Gene Ther* 16, 885-893.
- ARENS A, APPELT JU, BARTHOLOMAE C, GABRIEL R, *et al.* (2012). Bioinformatical Clonality Analysis of Next Generation Sequencing Derived Viral Vector Integration Sites. *Hum Gene Ther Methods* 23(2), 111-118.
- BESTER AC, SCHWARTZ M, SCHMIDT M, GARRIGUE A, *et al.* (2006). Fragile sites are preferential targets for integrations of MLV vectors in gene therapy. *Gene Ther* 13, 1057-1059.
- BIFFI A, MONTINI E, LORIOLI L, CESANI M, *et al.* (2013). Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science* 341, 1233158.
- BRAUN CJ, BOZTUG K, PARUZYSKI A, WITZEL M, *et al.* (2014). Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome--long-term efficacy and genotoxicity. *Sci Transl Med* 6, 227ra33.

- CALMELS B, FERGUSON C, LAUKKANEN MO, ADLER R, *et al.* (2005). Recurrent retroviral vector integration at the Mds1/Evi1 locus in nonhuman primate hematopoietic cells. *Blood* 106, 2530-5323.
- CARTIER N, HACEIN-BEY-ABINA S, BARTHOLOMAE CC, VERES G, *et al.* (2009). Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy with a Lentiviral Vector in X-Linked Adrenoleukodystrophy. *Science* 326, 818-823.
- CAVAZZANA-CALVO M, HACEIN-BEY S, DE SAINT BASILE G, GROSS F, *et al.* (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288, 669-672.
- CIUFFI A, LLANO M, POESCHLA E, HOFFMANN C, *et al.* (2005). A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration. *Nat Med* 11, 1287-1289.
- DEICHMANN A, HACEIN-BEY-ABINA S, SCHMIDT M, GARRIGUE A, *et al.* (2007). Vector integration is nonrandom and clustered and influences the fate of lymphopoiesis in SCID-X1 gene therapy. *J Clin Invest* 117, 2225-2232.
- GABRIEL R, ECKENBERG R, PARUZYNSKI A, BARTHOLOMAE CC, *et al.* (2009). Comprehensive genomic access to vector integration in clinical gene therapy. *Nat Med* 15, 1431-1436.
- GABRIEL R, LOMBARDO A, ARENS A, MILLER JC, *et al.* (2011). An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. *Nat Biotechnol* 29, 816-823.
- GASPAR HB, PARSLEY KL, HOWE S, KING D, *et al.* (2004). Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet* 364:2181-2187.
- HACEIN-BEY-ABINA S, VON KALLE C, SCHMIDT M, LE DEIST F, *et al.* (2003a). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 348, 255-256.
- HACEIN-BEY-ABINA S, VON KALLE C, SCHMIDT M, MCCORMACK MP, *et al.* (2003b). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415-419.
- HEMATTI P, HONG BK, FERGUSON C, ADLER R, *et al.* (2004). Distinct genomic integration of MLV and SIV vectors in primate hematopoietic stem and progenitor cells. *PLoS Biol* 2, e423.
- HOWE SJ, MANSOUR MR, SCHWARZWAELDER K, BARTHOLOMAE C, *et al.* (2008). Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest* 118, 3143-3150.
- KAEPPPEL C, BEATTIE SG, FRONZA R, VAN LOGTENSTEIN R, *et al.* (2013). A largely random AAV integration profile after LPLD gene therapy. *Nat Med* 19, 889-891.
- KOHN DB, WEINBERG KI, NOLTA JA, HEISS LN, *et al.* (1995). Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. *Nat Med* 1(10), 1017-23.
- MITCHELL RS, BEITZEL BF, SCHRODER AR, SHINN P, *et al.* (2004). Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biol* 2, E234.
- NOWROUZI A, PENAUD-BUDLOO M, KAEPPPEL C, APPELT U, *et al.* (2012). Integration frequency and intermolecular recombination of rAAV vectors in non-human primate skeletal muscle and liver. *Mol Ther* 20, 1177-1186.
- OTT MG, SCHMIDT M, SCHWARZWAELDER K, STEIN S, *et al.* (2006). Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med* 12, 401-409.
- PARUZYNSKI A, ARENS A, GABRIEL R, BARTHOLOMAE CC, *et al.* (2010). Genome-wide high-throughput integrase analyses by nrLAM-PCR and next-generation sequencing. *Nat Protoc* 5, 1379-1395.
- SCHMIDT M, HACEIN-BEY-ABINA S, WISSLER M, CARLIER F, *et al.* (2005). Clonal evidence for the transduction of CD34+ cells with lymphomyeloid differentiation potential and self-renewal capacity in the SCID-X1 gene therapy trial. *Blood* 105, 2699-2706.
- SCHMIDT M, SCHWARZWAELDER K, BARTHOLOMAE C, ZAOUKI K, *et al.* (2007). High-resolution insertion-site analysis by linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR). *Nat Methods* 4, 1051-1057.

- SCHMIDT M, ZICKLER P, HOFFMANN G, HAAS S, *et al.* (2002). Polyclonal long-term repopulating stem cell clones in a primate model. *Blood* 100, 2737-2743.
- SCHWARZWAELDER K, HOWE SJ, SCHMIDT M, BRUGMAN MH, *et al.* (2007). Gammaretrovirus-mediated correction of SCID-X1 is associated with skewed vector integration site distribution in vivo. *J Clin Invest* 117, 2241-2249.
- STEIN S, OTT MG, SCHULTZE-STRASSER S, JAUCH A, *et al.* (2010). Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat Med* 16, 198-204.
- WANG GP, BERRY CC, MALANI N, LEBOULCH P, *et al.* (2010). Dynamics of gene-modified progenitor cells analyzed by tracking retroviral integration sites in a human SCID-X1 gene therapy trial. *Blood* 115, 4356-4366.
- YU H, KOILKONDA RD, CHOU TH, PORCIATTI V, *et al.* (2012). Gene delivery to mitochondria by targeting modified adenoassociated virus suppresses Leber's hereditary optic neuropathy in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E1238-1247.

Adresse der Verfasserin: Annette.Deichmann@NCT-Heidelberg.de