

慢病毒载体转录“通读”改进研究进展

何佳平^{1,2,3}, 张敬之^{1,2,3}

1 上海市儿童医院, 上海 200040

2 上海交通大学附属儿童医院, 上海 200040

3 上海交通大学医学遗传研究所, 上海 200040

摘要: 自 2002 年以来, 在用 γ -逆转录病毒载体治疗 X 连锁重度复合性免疫缺陷病 (X-SCID) 的 10 例病人中已有 4 例因载体整合在原癌基因 *lmo2* 等附近而得了白血病。这一事件提高了人们对基因治疗载体安全性的关注。与 γ -逆转录病毒载体相比, 慢病毒载体因尚未发现有整合在 *lmo2* 附近的现象, 被认为是安全性较好的基因治疗载体。然而自灭活慢病毒载体与 γ -逆转录病毒载体一样存在着转录“通读”的现象。近些年来, 科学家们在改善自灭活慢病毒载体的通读率上做了一些工作并取得了一些积极成果。以下对慢病毒载体转录“通读”现象的发生机理和解决途径作了综合描述。

关键词: 基因治疗载体, 自灭活慢病毒载体, 转录通读, 长末端重复序列, 转录终止信号

Progress in improvement of lentiviral vectors' transcriptional read-through

Jiaping He^{1,2,3}, and Jingzhi Zhang^{1,2,3}

1 Shanghai Children's Hospital, Shanghai 200040, China

2 Shanghai Children's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200040, China

3 Shanghai Institute of Medical Genetics, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200040, China

Abstract: Four out of 10 patients of X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) were finally developed leukemia after receiving the treatment of gene therapy delivered by γ -retroviral vectors. This is due to the vector integrated to the proximity of *lmo2* etc proto-oncogene promoters, leading to the activation of onco-gene expression, which raises the concern of the bio-safety of gene therapy vectors. Lentiviral vectors, especially self-inactivating lentiviral vectors, are considered to be much safer than γ -retroviral vectors. However self-inactivating lentiviral vectors also have encountered with some unsafe factors and one of them is the problem of transcriptional “read-through”. During the past years, achievements have been made to reduce lentiviral vector transcriptional read-through, which are reviewed herein.

Keywords: gene therapy vectors, self-inactivating lentiviral vector, transcriptional read-through, long terminal repeat,

Received: March 21, 2011; Accepted: July 28, 2011

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2010CB945202).

Corresponding author: Jingzhi Zhang. Tel: +86-21-62472308; Fax: +86-21-62475476; E-mail: jzhang38@hotmail.com

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2010CB945202) 资助。

transcription termination signal

Hacein-Bey-Abina 等^[1]在 1999~2002 年间开展了到目前为止规模最大的单项遗传病基因治疗。他们使用携带 IL-2 受体 γ (*il2rg*) 基因的 γ -逆转录病毒载体 (γ -retroviral vectors, RVs, 由小鼠白血病病毒 MLV 改造而来) 修复了病人的 CD34⁺造血干细胞并回输到病人体内,治愈了 10 例中 9 例患有 X 连锁重度复合性免疫缺陷病 (X-SCID) 的病人。然而,在基因治疗后的 31~68 个月中,9 例治愈病人中的 4 例相继得了 T 细胞白血病,主要原因是基因治疗载体插入到了原癌基因 (*lmo2*, *bmi1* 或 *ccnd2*) 前面并激活了原癌基因的表达^[2-4]。RVs 载体的这种插入性突变归因于它的特性: 1) 倾向于整合到转录起始区域附近^[5], 整合热点集中在原癌基因、癌相关基因和生长控制基因附近^[6]; 2) RVs 5'长末端重复序列 (Long terminal repeat, LTR) 上的增强子元件能激活整合位点附近基因的启动子; 3) RVs 3'LTR 具有很高的转录“通读”活性,从而使整合位点下游基因转录表达^[7]。

1998 年 Zufferey 等^[8]对基于 HIV-1 的慢病毒进行自灭活改进,研发出自灭活慢病毒载体 (Self-inactivating lentiviral vectors, SIN-LVs)。SIN-LVs 克服了 RVs 的许多缺陷,越来越多地被应用于基因治疗。慢病毒的整合位点均匀地分布于染色质转录活性区的各个位置,不具有对转录起始区的偏好性^[5]。此外,由于 HIV 病毒的 Vpr 和 Matrix (MA) 蛋白能与核转运体系相互作用促进 HIV 整合前复合体穿过核孔,慢病毒除了具有类似于 RVs 感染、整合到分裂细胞基因组的能力外,还具有感染、整合到不分裂细胞基因组的能力^[9]。然而,尽管 HIV-1 病毒的转录“通读”活性远低于 RVs,但其载体 SIN-LVs 的转录“通读”率却与 γ -逆转录病毒载体相似^[7]。

对于基因治疗来说,使用安全有效的基因载体是一个先决条件。因此,改善 SIN-LVs 的转录通读

活性,获得一个安全性好、滴度高、表达能力强的基因治疗载体的工作显得尤为重要。

1 自灭活慢病毒载体及其转录“通读”现象

1.1 自灭活慢病毒载体

慢病毒 (Lentivirus) 属于逆转录病毒科慢病毒属,以长孵化期为特征,包括 I 型人免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus 1, HIV-1)、猫免疫缺陷病毒 (Feline immunodeficiency virus, FLV)、猿免疫缺陷病毒 (Simian immunodeficiency virus, SIV) 和牛免疫缺陷病毒 (Bovine immunodeficiency virus, BIV) 等。慢病毒载体最初是在 HIV-1 病毒基因组骨架的基础上改造而来的。作为有效的基因转移工具,慢病毒已经广泛应用于生物学研究和基因治疗研究。因此,它的安全性越来越受到关注。慢病毒载体的生物安全性问题主要包括:插入性突变 (Insertional mutagenesis)、有复制能力慢病毒 (Replication competent lentiviruses, RCLs) 的产生及转录“通读”造成激活和表达下游基因^[10-11]。

1.2 自灭活慢病毒载体的“通读”现象

基因载体的转录“通读”现象是指载体携带的基因转录时没有在终止信号处正常终止,而是读过终止信号继续转录下游序列的现象。整合在基因组中的慢病毒载体和致癌逆转录病毒载体的终止信号都位于 3'末端长重复序列 LTR 的 R 中,转录“通读”会越过 3'R 继续转录导致载体插入位点下游基因的活化。如果下游基因是原癌基因,就会给细胞带来恶性转化的风险。

Yang 等^[12]的研究结果表明 SIN-LVs 的转录通读率比带有完整 LTR 的慢病毒载体的转录通读率高 10 倍以上。如此高的转录通读率使得用 SIN-LVs 进行基因治疗具有很大风险。

2 自灭活慢病毒载体转录“通读”现象产生的机制

2.1 真核细胞 mRNA 前体的转录终止

真核细胞中 mRNA 前体是由 RNA 聚合酶 II 转录而来的。整个转录过程包括转录起始、转录延伸和转录终止 3 个阶段。转录终止与 mRNA 3'端的加工形成(包括转录后切割与多聚腺苷酸化形成 Poly (A) 尾)是相偶联的。

转录终止涉及多个 RNA 序列信号和蛋白质因子的相互作用。哺乳动物 mRNA 的转录终止信号主要包括:多聚腺苷酸化信号 AAUAAA 基序、上游元件(Upstream sequence elements, USEs)和下游元件(Downstream elements, DSEs)。多聚腺苷酸化信号 AAUAAA 基序位于 mRNA 断裂位点上游 10~30 个核苷酸处,是一段高度保守的核苷酸序列,几乎存在于所有动物细胞多聚腺苷酸化的 mRNA 上。断裂位点 Poly (A) 位点附近的序列不具有保守性,断裂位置主要是由上游 AAUAAA 序列和 DSEs 间的距离决定的。USEs 位于 AAUAAA 元件上游,调节 3'端加工的效率。USEs 主要是在病毒基因组中发现的,通常富含核苷酸 U,但是不同病毒的 USEs 不具有序列上的同源性。DSEs 位于 Poly (A) 位点下游 30 个核苷酸左右处。DSEs 主要有两类:富含 U 元件和富含 GU 元件。DSEs 的作用是影响断裂位置和断裂效率^[13]。

转录终止相关的蛋白质因子包括:断裂/多聚腺苷酸化特异因子 CPSF、断裂刺激因子 CstF、断裂因子 CF I_m和 CF II_m、RNA 聚合酶 II (Pol II)、Poly (A) 聚合酶 (PAP)、Poly (A) 结合蛋白 II 等。CPSF 特异性识别 RNA 上的 AAUAAA 元件并与其结合,CstF 与 DSEs 结合加强 CPSF 的结合能力。在含 USE 的病毒(如 HIV-1 的 U3 区)中,CPSF 能交互结合 AAUAAA 序列和 USE 序列。Pol II 加入到复合物中形成初始复合物。初始复合物招募 CF II_m和 PAP 形成断裂复合物,在 Poly (A) 位点进行切割并加上 Poly (A) 尾。Poly (A) 结合蛋白 II 结合到 200 bp 左

右的 Poly (A) 尾上使其稳定^[14]。

2.2 慢病毒载体 LTR 的结构

LTR 是位于 HIV-1 原病毒基因组两端的长末端重复序列,分为 5'LTR 和 3'LTR。5'LTR 和 3'LTR 的序列完全相同而功能截然不同,5'LTR 负责病毒 mRNA 的转录,而 3'LTR 负责病毒 mRNA 的终止。然而,5'LTR 和 3'LTR 都是病毒基因组整合所必需的。如图 1A 所示,LTR 由 U3、R、U5 三部分组成^[15]。U3 区包括上游调节区、增强子和核心启动子元件。上游调节区含有 1 个 Sp 家族转录因子的结合位点,3 个 C/EBP 转录因子结合位点,2 个 AP-1 结合位点,1 个 NFAT (AP-3) 结合位点和 1 个 ATF/CREB 结合位点。增强子含有 2 个 NF-κB 转录因子结合位点。核心启动子包括 1 个 TATA 框和 3 个 Sp 结合位点。R 区域含有 1 个反式激活应答元件 Tar 和多聚腺苷酸化信号 AAUAAA。U5 区包含 2 个 ATF/CREB 结合位点,1 个 AP-1 结合位点和 1 个 NFAT (AP-3) 结合位点^[15-17]。

以 HIV-1 NL3-4 株为例,如图 1B 所示,SIN-LV 的 LTR 删除了 U3 区中的大部分核苷酸序列(从 -418 到 -18 之间的 400 bp 序列),仅留下 53 个核苷酸对,包括位于 *EcoR* V 位点上游用于维持整合酶识别效率的 35 bp 核苷酸序列和位于 *Pvu* II 位点下游用于调节多聚腺苷酸化的 18 bp 核苷酸序列^[9]。

2.3 自灭活慢病毒载体转录“通读”现象产生的机制

研究者普遍认为,SIN-LV 转录“通读”现象是由调控转录终止的序列缺失引起的。在 HIV-1 LTR 中已知的转录终止调控序列包括:位于 R 区的多聚腺苷酸化信号 AAUAAA 元件,AAUAAA 上游 59-76 nt、77-94 nt、141-176 nt 间的 3 个 USEs^[18-20],位于 U5 富含 GC 的 DSE^[21-22]和位于 R 和 U5 接界的 Poly (A) 位点^[23]。自 SIN-LVs 转录“通读”现象发现以来,许多研究人员都希望可以在 LTR U3 区 -418 到 -18 的删除序列中找到新转录终止调控序列。

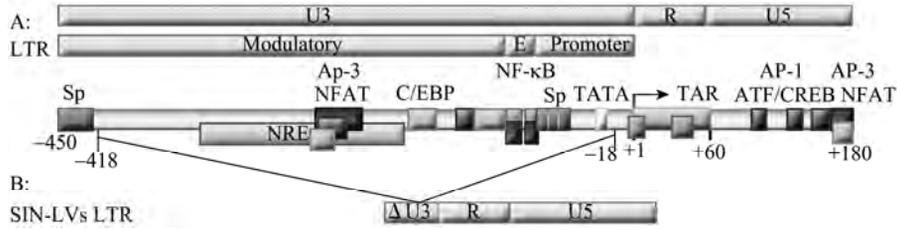


图1 慢病毒载体 LTR 结构示意图^[15]

Fig. 1 Structure of lentiviral LTRs^[15]. (A) Structure of lentiviral LTR, which contains U3, R, and U5 regions. U3 region is divided into Modulatory, Enhance (E), and Promoter regions. (B) Structure of SIN-LVs LTRs, which are deleted between position -418 and position -18.

位于删除区的序列确实会影响转录产物多聚腺苷酸化效率。Valsamakis 等^[18-20]发现 AAUAAA 上游 77~94 位核苷酸序列 (未被删除) 发生突变对多聚腺苷酸化影响非常大, 而 AAUAAA 上游 141 到 176 位核苷酸 (相当于 -67 到 -102 区域, 位于删除区内) 的突变对多聚腺苷酸化也有一定的影响。AAUAAA 上游 141-176 nt USE 的缺失显然增加了 SIN-LVs 的转录通读率。

Yang 等^[12]的研究表明 SIN-LVs U3 区中删除的增强子元件 NF-κB 结合位点、转录因子 Sp1 结合位点和核心启动子元件 TATA 框也有助于转录终止。删除 NF-κB 结合位点, 或 Sp1 结合位点, 或 TATA 框都将提高载体的转录通读率, 其中删除 NF-κB 结合位点将显著提高转录通读率。NF-κB-knockdown 实验表明转录因子 NF-κB 与其结合位点相互作用有助于转录终止。这表明慢病毒载体 LTR 中的启动子/增强子和转录终止信号是重叠的^[12]。

3 改善 SIN-LVs 转录通读率的探索

LTR 结构和功能的复杂性增加了改善 SIN-LVs 转录通读率的难度。LTR 不仅含有重叠的转录起始元件和转录终止元件, 在包装细胞中参与假病毒基因组的转录, 而且在宿主细胞中参与逆转录和整合过程。因此, 对 LTR 的改造设计必须考虑到以上各个环节, 这给改善通读率的研究增加了难度。

Yang 等^[12]在 SIN-LVs 的 LTR 中分别插入人白血病病毒 1 的腺苷酸化信号, 人生长激素基因 3'端的

小内含子 (可能促进 RNA 聚合酶 II 转录终止) 和一个突变的 tRNA 基序 (形成立体交叉结构, 可能有助于转录终止) 试图改善转录“通读”, 结果却发现所有的这些插入不仅没有恢复 SIN-LVs 的转录终止, 反而增加了载体的转录“通读”活性。

可喜的是, 科学家们还是在改善 SIN-LVs 通读率方面取得了一些积极的进展。

3.1 插入隔离子元件

隔离子是一类具有保护基因免受周围染色质环境影响的 DNA 元件。根据功能的差异把隔离子分为两类: 一类是增强子阻断隔离子, 出现在增强子和启动子之间时能阻止增强子激活启动子; 另一类是屏障隔离子 (Barrier insulators), 具有阻断异染色质化使基因沉默的作用^[24]。

已知的脊椎动物隔离子中几乎都有 CCCTC 结合因子 (CTCF) 参与。人 CTCF 由 727 个氨基酸残基组成, 是一个具有 11 个保守的锌指结构的转录因子。在隔离子中 CTCF 的功能非常复杂, 包括招募乙酰基转移酶阻断异染色质化的延伸, 防止启动子元件甲基化抑制基因表达, 阻断 RNA 聚合酶 II 的移动等功能^[25-28]。最早报道的脊椎动物隔离子是鸡 β-珠蛋白基因座上的 DNase I 超敏感位点 (5'-HS4), 全长 1.2 kb, 核心序列 250 bp^[29]。此外, 鸡 β-珠蛋白基因座下游还有 1 个隔离子 3'-HS。两个隔离子通过 CTCF 依赖途径, 结合在核基质上, 产生一个环作为独立的转录单位。5'-HS4 同时具有阻断增强子和异染色质化的作用, 3'-HS 只具有阻断增强子的作用^[28]。其他一些脊椎动物隔离子及其特点如表 1 所示^[30]。

表 1 一些脊椎动物隔离子^[30]Table 1 Some insulators in vertebrates^[30]

Insulation mode	Locus or taxon	Insulator
DNA looping or pairing	b-globin (mouse)	5'-HS1-5'-HS6, 5'-HS60/62.5, 5'-HS85 3'-HS1
	Apolipoprotein (human)	AC2, AR1, AC3
	<i>c-myc</i> (human)	MINE (upstream CTCF element) Promoter-proximal CTCF element
	<i>Igf2/H19</i> (mouse)	ICR (CTCF element)
	MHC- II (human)	XL9
	Interferon gamma (human, mouse)	CTCF element
	X-inactivation	CTCF, Oct-4, or SATB1 elements
	Antagonist equilibrium	b-globin (chicken)
Paused RNA polymerase II	<i>c-myc</i> (human)	
Convergent RNA polII and pol III	Growth hormone (mouse)	SINE B2
Barrier to DNA methylation	Tumor suppressor genes (human)	CTCF elements
Interference with transcription	DM1 (human)	(CTG) _n repeat
	Chromosome 4q35 (human)	(D4Z4) _n repeat
	Lysozyme/LPS induction (chicken)	CTCF element
	DXZ4 and X-inactivation (human)	CTCF element
Attachment to a nuclear structure	Human	CTCF elements

将脊椎动物隔离子插入到载体两端的 LTR 中, 不仅可以阻断 LTR 中的增强子对靶细胞基因的激活作用, 还可以降低载体插入位点的染色质环境对载体基因表达的影响。研究表明隔离也能降低 SIN-LVs 的转录“通读”活性。

Ramezani 等^[31]在 SIN-LVs 中插入人 β 干扰素附着区 IFN-SAR 和鸡 β -Globin 5'DNase I 超敏感位点 4 (5'HS4) 隔离子, 以降低对整合位点旁侧序列的影响。IFN-SAR/5'HS4 的插入还可以维持活性染色质结构, 使转基因高水平表达。此后, 一些研究者开始使用隔离子来改善逆转录载体和慢病毒载体的安全性^[30-35]。

由于在 SIN-LVs LTR 中插入 1.2 kb 的鸡 β -Globin 5'HS4 隔离子会影响病毒滴度, Hanawa 等^[35]只选取隔离子的 0.25 kb 核心元件插入到载

体中, 结果发现病毒滴度和转录“通读”活性都得到改善。而且反向插入该元件更有利于转录“通读”活性的改善^[36]。

2008 年, Ramezani 等^[31]又有新的贡献, 他们选取人 T 细胞 α/δ BEAD-1 隔离子和 5'HS4 隔离子的部分序列, 组合得到一个只有 77 bp 的 FB 元件。FB 元件在增强子阻断功能上与 1.2 kb 完整 5'HS4 隔离子同样有效。包含 FB 元件的 SIN γ -逆转录病毒载体和 SIN 慢病毒载体都表现出显著降低的转化风险。

3.2 插入 WPRE 元件

美洲旱獭肝炎病毒转录后调控元件 (Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element, WPRE) 是一段顺式作用 RNA 元件, 放在多聚腺苷酸化信号之前将大大提高各种

病毒载体的基因表达水平和病毒滴度^[37]。

Higashimoto 等^[38]把一段 721 bp 的 WPRE 元件插入到 SIN-LVs 3'LTR 上游,发现载体的转录通读率降低了 50%,载体基因的表达水平和滴度也都有所增加。Schambach 等^[39]在 SIN-LVs 中插入 600 bp 的 WPRE,结果转录通读率从 20%降低到 8%,同时提高了滴度和基因表达量。

3.3 补充 USEs 元件

Yang 等^[12]在 SIN-LVs 的删除区重复插入一个已存在的 HIV-1 USE (多聚腺苷酸化信号上游 77-94 nt),转录通读率降低 20%。

Schambach 等^[39]选择了 7 种来自病毒或细胞基因的上游多聚腺苷酸化增强元件 (或上游序列元件, USEs) 分别插入到 SIN-LVs 的 U3 中以改善载体的安全性。结果发现 3'LTR 中插入 2 个来自类人猿病毒 SV40 的 USE (2×SV USE, 长 100 bp),转录通读率降低到 3%,滴度增加 2.8 倍,基因表达增加 1.6~2.2 倍;而同时插入 WPRE 和 2×SV USE,转录通读率降低到 1.5% 以下。

3.4 非整合慢病毒载体

非整合慢病毒载体 (Non-integrating lentiviral vectors, NILVs) 又称整合缺陷慢病毒载体 (Integration-deficient lentiviral vectors, IDLVs) 不具有整合到细胞染色体基因组的能力而游离在细胞核基质中。NILVs 的这一特点大大减少了插入性突变带来的风险和 RCLs 的发生率。当前报道的 NILVs 采用的非整合策略是使用类型 1 突变整合酶 (²⁶²RRK 基序被 AAH 取代) 引起病毒载体整合能力缺陷^[40-43]。

NILVs 和其他慢病毒载体一样可以高效转染细胞,并在不分裂细胞中稳定高效表达。研究发现细胞分裂阻断时, NILVs 与正常整合的慢病毒载体一样可以通过内部启动子高表达携带基因^[43]。NILVs 能高效转染分裂的细胞和不分裂的神经原代培养细胞,携带的外源基因能在不分裂的细胞中长期表达^[40]。Apolonia 等^[42]在体内实验中发现 NILVs 可以

在肌肉中高效转染并表达。Negri 等^[44]使用 NILVs 表达 HIV-1 外壳蛋白使大鼠成功获得免疫。Bayer 等^[41]第一次发现 NILVs 携带基因能在小鼠肝脏中强有力持续性的表达。

鉴于 NILVs 的上述特点以及它相对与整合慢病毒载体安全性上的优势, NILVs 在临床基因治疗中具有很大的应用前景,尤其是用于治疗神经细胞、肌肉细胞等不分裂细胞相关的疾病。虽然 NILVs 在非分裂细胞中的稳定性优于质粒等非整合载体,却远不如整合慢病毒载体。此外 NILVs 在分裂细胞中的不稳定性同样限制了这类载体的运用。

在各种改善 SIN LVs 通读率的方法中,插入 WPRE 元件的做法已经运用于慢病毒载体 (如 FUGW 载体) 中,虽然使用 WPRE 的最初原因在于它能有效提高载体基因表达。补充 USEs 元件和隔离子元件改善通读率的原理各异,前者主要是加强转录终止信号 Poly (A) 的转录终止作用,后者能阻止转录复合物通过。我们认为这几种改进方法的原理各不相同,在改造载体的操作技术上也不存在冲突,因此尝试了几种元件的叠加使用。我们以含有 WPRE 元件的慢病毒载体 FUGW 为基本骨架,分别插入 USEs 序列、隔离子序列,或两种元件的组合,结果发现插入两种元件的组合时,载体具有最低的转录通读活性,大约降低 25%。

4 展望

目前有关转录“通读”现象的研究报告不是很多,我们还应该去探索改善自灭活慢病毒载体转录通读率的新方法和新途径。

近年来,随着 Chip-on-Chip 等技术在全基因组范围内寻找新的隔离子中的运用,研究人员发现了大量新的脊椎动物隔离子^[45]。因此,通过筛选新的已报道的小的隔离子运用到降低慢病毒载体的转录通读率,将不失为一个好的策略。

另一方面,慢病毒转录终止的机制仍未完全阐

明, 尤其是 LTR 两种功能 (转录起始和转录终止) 间的角色转换机制。目前这方面的研究主要集中在 LTR 的一级结构上, 然而近年来 HIV-1 全基因组的二级结构已经逐渐得到解析^[17]。基于 LTR 的二级结构和高级结构的功能研究将有助于改善慢病毒安全性的研究。

REFERENCES

- [1] Hacein-Bey-Abina S, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. *Int J Hematol*, 2002, 76(4): 295–298.
- [2] Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, 2003, 302(17): 415–419.
- [3] Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest*, 2008, 118(9): 3132–3142.
- [4] Hacein-Bey-Abina S, Hauer J, Lim A, et al. Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*, 2010, 363(4): 355–364.
- [5] Wu XL, Li Y, Crise B, et al. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science*, 2003, 300(5626): 1670–1671.
- [6] Cattoglio C, Facchini G, Sartori D, et al. Hot spots of retroviral integration in human CD34⁺ hematopoietic cells. *Blood*, 2007, 110(6): 1704–1708.
- [7] Zaiss AK, Son S, Chang LJ. RNA 3' readthrough of oncoretrovirus and lentivirus: implications for vector safety and efficacy. *J Virol*, 2002, 76(14): 7209–7219.
- [8] Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, et al. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient *in vivo* gene delivery. *J Virol*, 1998, 72(12): 9873–9880.
- [9] Naldini L, Blömer U, Gallay P, et al. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 1996, 272(5259): 263–268.
- [10] Pauwels K, Gijssbers R, Toelen J, et al. State-of-the-art lentiviral vectors for research use: risk assessment and biosafety recommendations. *Curr Gene Ther*, 2009, 9(6): 459–474.
- [11] Bokhoven M, Stephen SL, Knight S, et al. Insertional gene activation by lentiviral and gammaretroviral vectors. *J Virol*, 2009, 83(1): 283–294.
- [12] Yang Q, Lucas A, Son S, et al. Overlapping enhancer/promoter and transcriptional termination signals in the lentiviral long terminal repeat. *Retrovirology*, 2007, 4: 4.
- [13] Zhao J, Hyman L, Moore C. Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999, 63(2): 405–445.
- [14] Lykke-Andersen S, Jensen TH. Overlapping pathways dictate termination of RNA polymerase II transcription. *Biochimie*, 2007, 89(10): 1177–1182.
- [15] Kilaeski EM, Shah S, Nonnemacher MR, et al. Regulation of HIV-1 transcription in cells of the monocyte-macrophage lineage. *Retrovirology*, 2009, 6(1): 118.
- [16] Shen T, Zhang XY, Shao YM. Research progress: the role of HIV-1 LTR in transcription. *Foreign Med Sci: Sect Virol*, 2003, 10(5): 158–160.
沈弢, 张晓燕, 邵一鸣. HIV-1 LTR 区转录功能研究进展. *国外医学: 病毒学分册*, 2003, 10(5): 158–160.
- [17] Watts JM, Dang KK, Gorelick RJ, et al. Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature*, 2009, 460(7256): 711–716.
- [18] Valsamakis A, Zeichner S, Carswell S, et al. The human immunodeficiency virus type 1 polyadenylation signal: A 3' long terminal repeat element upstream of the AAUAAA necessary for efficient polyadenylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(6): 2108–2112.
- [19] Gilmartin GM, Fleming ES, Oetjen J. Activation of HIV-1 pre-mRNA 3' processing *in vitro* requires both an upstream element and TAR. *EMBO J*, 1992, 11(12): 4419–4428.
- [20] Valsamakis A, Schek N, Alwine JC. Elements upstream of the AAUAAA within the human immunodeficiency virus polyadenylation signal are required for efficient polyadenylation *in vitro*. *Mol Cell Biol*, 1992, 12(9): 3699–3705.
- [21] Böhnlein S, Hauber J, Cullen BR. Identification of a U5-specific sequence required for efficient polyadenylation within the human immunodeficiency virus long terminal repeat. *J Virol*, 1989, 63(1): 421–424.
- [22] Brown PH, Tiley LS, Cullen BR. Effect of RNA secondary

- structure on polyadenylation site selection. *Genes Dev*, 1991, 5(7): 1277–1284.
- [23] Dezazzo JD, Kilpatrick JE, Imperiale MJ. Involvement of long terminal repeat U3 sequences overlapping the transcription control region in human immunodeficiency virus type 1 mRNA 3' end formation. *Mol Cell Biol*, 1991, 11(3): 1624–1630.
- [24] Bushey AM, Dorman ER, Corces VG. Chromatin insulators: regulatory mechanisms and epigenetic inheritance. *Mol Cell*, 2008, 32(1): 1–9.
- [25] Wallace JA, Felsenfeld G. We gather together: insulators and genome organization. *Curr Opin Genet Dev*, 2007, 17(5): 400–407.
- [26] Moltó E, Fernández A, Montoliu L. Boundaries in vertebrate genomes: different solutions to adequately insulate gene expression domains. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2009, 8(4): 283–296.
- [27] Phillips JE, Corces VG. CTCF: master weaver of the genome. *Cell*, 2009, 137(7): 1194–1211.
- [28] Amouyal M. Gene insulation. Part II: natural strategies in vertebrates. *Biochem Cell Biol*, 2010, 88(6): 885–898.
- [29] Chung JH, Whiteley M, Felsenfeld G. A 5' element of the chicken β -globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell*, 1993, 74(3): 505–514.
- [30] Ramezani A, Hawley TS, Hawley RG. Combinatorial incorporation of enhancer-blocking components of the chicken β -globin 5'HS4 and human T-cell receptor α/δ BEAD-1 insulators in self-inactivating retroviral vectors reduces their genotoxic potential. *Stem Cells*, 2008, 26(12): 3257–3266.
- [31] Ramezani A, Hawley TS, Hawley RG. Performance-and safety-enhanced lentiviral vectors containing the human interferon- β scaffold attachment region and the chicken β -globin insulator. *Blood*, 2003, 101(12): 4717–4724.
- [32] Li CL, Xiong D, Stamatoyannopoulos G, et al. Genomic and functional assays demonstrate reduced gammaretroviral vector genotoxicity associated with use of the cHS4 chromatin insulator. *Mol Ther*, 2009, 17(4): 716–724.
- [33] Arumugam PI, Higashimoto T, Urbinati F, et al. Genotoxic potential of lineage-specific lentivirus vectors carrying the β -globin locus control region. *Mol Ther*, 2009, 17(11): 1929–1937.
- [34] Ramezani A, Hawley TS, Hawley RG. Reducing the genotoxic potential of retroviral vectors. *Methods Mol Biol*, 2008, 434: 183–203.
- [35] Hanawa H, Yamamoto M, Zhao HF, et al. Optimized lentiviral vector design improves titer and transgene expression of vectors containing the chicken β -globin locus HS4 insulator element. *Mol Ther*, 2009, 17(4): 667–674.
- [36] Recillas-Targa F, Pikaart MJ, Burgess-Beusse B, et al. Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken β -globin insulator are separable activities. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(10): 6883–6888.
- [37] Donello JE, Loeb JE, Hope TJ. Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Virol*, 1998, 72(6): 5085–5092.
- [38] Higashimoto T, Urbinati F, Perumbeti A, et al. The woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element reduces readthrough transcription from retroviral vectors. *Gene Ther*, 2007, 14(17): 1298–1304.
- [39] Schambach A, Galla M, Maetzig T, et al. Improving transcriptional termination of self-inactivating gamma-retroviral and lentiviral vectors. *Mol Ther*, 2007, 15(6): 1167–1173.
- [40] Philippe S, Sarkis C, Barkats M, et al. Lentiviral vectors with a defective integrase allow efficient and sustained transgene expression *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(47): 17684–17689.
- [41] Bayer M, Kantor B, Cockrell A, et al. A large U3 deletion causes increased *in vivo* expression from a nonintegrating lentiviral vector. *Mol Ther*, 2008, 16(12): 1968–1976.
- [42] Apolonia L, Waddington SN, Fernandes C, et al. Stable gene transfer to muscle using non-integrating lentiviral vectors. *Mol Ther*, 2007, 15(11): 1947–1954.
- [43] Saenz DT, Loewen N, Peretz M, et al. Unintegrated lentivirus DNA persistence and accessibility to expression in nondividing cells: analysis with class I integrase mutants. *J Virol*, 2004, 78(6): 2906–2920.
- [44] Negri DR, Michelini Z, Baroncelli S, et al. Successful immunization with a single injection of non-integrating lentiviral vector. *Mol Ther*, 2007, 15(9): 1716–1723.
- [45] Kim TH, Abdullaev ZK, Smith AD, et al. Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. *Cell*, 2007, 128(6): 1231–1245.