

## DNA İMMUNİZASYONU

## DNA IMMUNIZATION

Barış SAREYYÜPOĞLU\*

Müjgar İZGÜR\*

Kabul Tarihi: 16.11.1999

---

### Özet:

DNA immunizasyonu birçok infeksiyöz ve infeksiyöz olmayan hastalıklardan korunma ve bunların sağaltımları için yeni ve umut vadeden bir yaklaşım sunmaktadır. Bu derlemede DNA aşısı üretimi, aşılama teknikleri ve DNA aşılarının kullanım alanları gözden geçirildi. DNA aşılarının avantaj ve dezavantajları da değerlendirilerek konvansiyonel aşılarla karşılaştırılması yapıldı.

**Anahtar kelimeler:** DNA immunizasyonu, aşılar

### Summary:

DNA immunization represents a new and promising approach for the prevention and therapy of many infectious and non-infectious diseases. With this approach, vaccines made of DNA are being developed as a form of gene therapy that use the patient's own cellular machinery to make foreign proteins that stimulate an immune response. Direct inoculations of vaccine DNAs (which are produced by cloning DNA sequences encoding the protein or proteins to be used as immunogens into an eukaryotic expression vector, in other words, by the help of the recombinant technology) into animals generate antibody, cytotoxic T cell (CTL) and protective immune responses that have good longevity, with even single doses of DNA. Protective immune responses can be generated by skin and muscle inoculations of DNA. Immunizations can be accomplished by injecting DNA in saline, or by using a gene gun to propel DNA-coated gold beads into cells. In this paper DNA vaccine production, vaccination techniques, current and potential uses of DNA immunization were reviewed. A compari-

---

\* A.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Dışkapı, Ankara.

son between DNA-mediated and conventional vaccination by evaluating its advantages and disadvantages were also mentioned.

**Key words:** DNA immunization, vaccines

## GİRİŞ

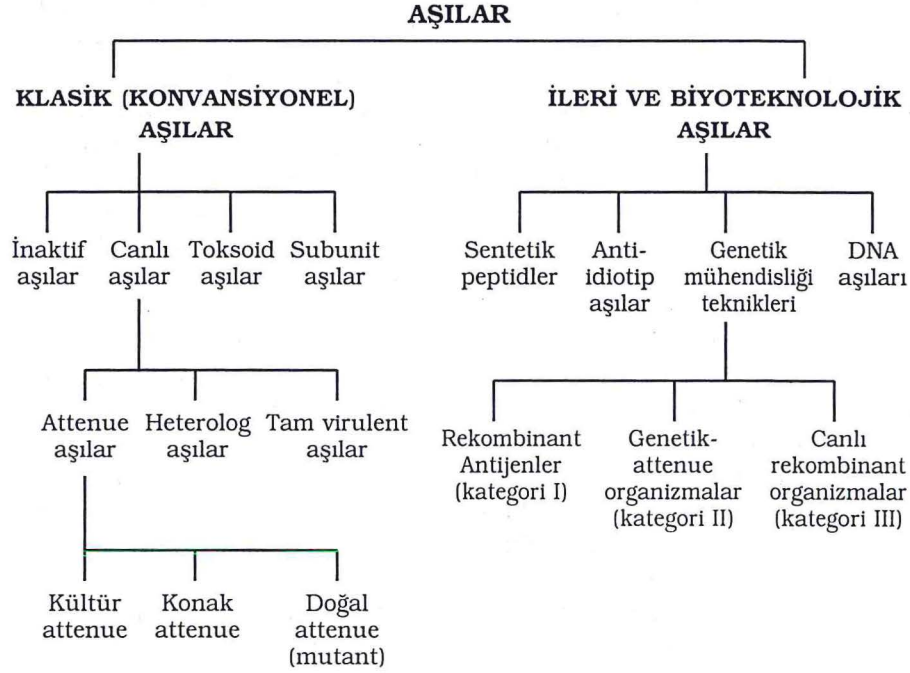
Jenner'in ilk kez aşığı tanımlamasının 200'üncü yıldönümünün yaşandığı, gelişmiş ülkelerin sağlık giderlerinin kontrol dışı katlanarak arttığı günümüzde, birçok hastalığın kontrolünde en ekonomik yöntemin aşılar olacağı kesindir. Jenner'in ve bundan bir asır sonra Pasteur'un şaşırtıcı buluşlarıyla, aşığı dünyası inaktive veya attenue aşılardan üretimine doğru sürüklenmiştir. Enders, virusları üretmek ve attenue etmek için doku kültürünü bulduğunda aşığı üretiminde bir artış olmuş ve 1970'li yılların sonlarına doğru gen manipulasyonlarının ortaya çıkmasına kadar, aşılardan gelişimi benzeri bir karakter izlemiştir. Rekombinant, subunit ve antiidiyotip aşılar geliştirilmiş ve bunların bir kısmı alanlarında değerli ve başarılı olmuşlardır. Aşılardan dünyasındaki en şaşırtıcı ve birçok araştırmacı için en beklenilmedik gelişmelerden birisi de, saf DNA'nın aşılama amacıyla kullanımıdır. Farelere saf olarak injekte edilen DNA'nın eksprese edilebileceği 1962'de gösterilmiştir (13). Ancak, 1990'da, Wolff ve arkadaşları saf plasmid DNA'sının intramuskuler olarak injeksiyonunu takiben uzun süreli protein ekspresyonu oluştuğunu gösterdiklerinde, DNA immunizasyonunun parlak geleceğini bilim dünyasına duyurmuşlardır (15, 26).

## DNA İMMUNİZASYONU

### DNA İmmunizasyonunun Tanımı

Spesifik ve koruyucu immun yanıt oluşturmak amacıyla, bir insana veya hayvana kontrollü olarak , uygun doz ve yolla immunojen verilmesi işlemine **immunizasyon (bağışıklama)** veya Türkçe'de yaygın kullanılan terimi ile **aşılama** ve bu amaçla kullanılan biyolojik maddelere de aşığı denir. Şekil 1'de günümüzde kullanılan aşılar, hazırlanış şekilleri ve içeriklerine göre sınıflandırılmıştır.

**Şekil 1.** Hazırlama yöntemleri ve içeriklerine göre aşuların sınıflandırılması (1, 2, 8).



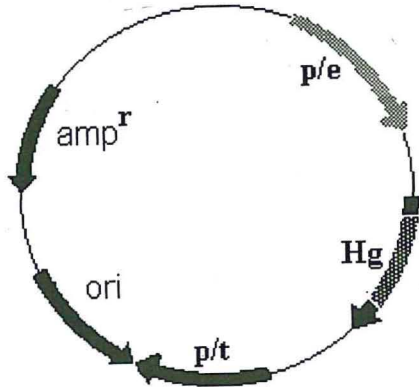
Vücuda tüm etkeni veya etkene ait bir antijenik komponenti vermek yerine, antijeni kodlayan DNA sekansını (geni) taşıyan plasmidin kontrollü koşullar, uygun yol, metodlar kullanılarak verilmesi ve plasmidi alan veya plasmidle transfekte edilen hücrelerde hedef (protektif) antijenin üretilmesi ve immun sisteme sunulmasıyla sağlanan bağışıklama tarzına **DNA İmmünizasyonu** denir. Bu immunizasyon, insan ve hayvanlarda, humoral, hücresele immun yanıtların ve protektif bağışıklığın oluşturulması amacıyla antijenlerin in vivo olarak üretimini esas alan yeni bir aşılama tekniğidir. Bu amaç için geliştirilen aşılara **DNA aşısı** (veya **nükleik asid aşısı, genetik aşular**) adı verilir. DNA aşısı, immun yanıtın uyarılmasında rol oynayan yabancı proteinlerin (immunolojik substansların) sentezlenmesinde konakçının kendi spesifik hücrelerini kullanır.

## DNA AŞILARI VE AŞILAMA TEKNİKLERİ

### DNA Aşısı Üretim Tekniği

Günümüzde DNA aşılarının üretiminde Rekombinant DNA teknolojilerinden ve buna ait başlıca uygulama yöntemlerinden olan gen klonlamasından faydalanılmaktadır. Gen klonlaması, en basit anlamıyla, bir genin identik kopyalarının elde edilmesi olarak tanımlanabilir. Biyoteknolojide bu tanım şu şekilde uygulamaya konulmaktadır; önemli bir ürünü (veya proteini) kodlayan genin ait olduğu hücre (prokaryotik veya ökaryotik) genomundan (veya kromozomundan) özel yöntemlerle (genellikle restriksiyon endonukleaz enzimleri ile) kesilerek çıkartılması, bunun bir taşıyıcı vektör DNA'sı ile birleştirilerek alıcı bir hücreye (prokaryotik veya ökaryotik) transfer edilmesi, bu alıcı hücrede genin ekspresyonunun sağlanmasıdır (1,2). DNA aşıları, genellikle, güçlü bir viral promotor / enhanser, antijeni kodlayan hedef gen ve poliadenilasyon / terminasyon sekansını içeren bakteriyel plasmidden oluşur (Şekil 2). Plasmid bakteri içinde (kısa sürede fazla sayıda üremesinden dolayı daha çok plasmid ve dolayısıyla hedef gen elde etmek amacıyla genellikle *E. coli* kullanılmaktadır) çoğaltılır, bakteriden çıkartılır, saflaştırılır, fizyolojik tuz solusyonunda süspanse edilir ve sonra konakçıya injekte edilir veya bu amaç için özel aletlerden yararlanır (gene gun). İnokule edilen konakçıdaki hücreler tarafından plasmid DNA'sının ekspresyonu (transkripsiyon, translasyon) immun yanıtı uyuracak olan proteinin (antijen) üretimini sağlar (21).

**Şekil-2** : DNA aşısı hazırlamada kullanılacak kuvvetli promotora sahip bir plasmid (21).



**p/e** : Güçlü bir ökaryotik promotor / enhanser (Örn. CMV, Cytomegalovirus promotörü)

**Hg** : Patojene ait (hedef / koruyucu) genin insersiyonu için bir klonlama bölgesi,

**p/t** : Bir poliadenilasyon / terminasyon sekansı,

**ori** : Replikasyon orijini,

**amp<sup>r</sup>** : Ampisilin-dirençlilik geni gibi seleksiyonu sağlayan bir marker.

### **Antijenlerin İşlenmesi ve İmmun Sisteme Sunulması**

Bir protein (veya antijen) hücre içinde sentezleniyorsa ve hücre sitoplazmasında serbest halde bulunuyorsa (viral bir gen tarafından kodlanan antijenik substansların hücre içinde sentezlenmesinde olduğu gibi), bu antijene **endojen antijen** denir. Endojen antijenler sitozolik yolla işlenerek MHC (Major Histocompatibility Complex) sınıf I molekülleriyle hücre yüzeyine taşınır ve burada sergilenirler. Kendilerini tanıyan CD8<sup>+</sup> T hücrelerini (Cytotoxic T Lymphocytes, CTL) aktive ederek hücreyel immun yanıtın oluşmasını sağlarlar. Diğer yandan, bir protein hücre dışında sentezlenip, hücreye fagositoz veya endositoz yoluyla alınıyorsa (inaktif aşı ve diğer protein antijenlerde olduğu gibi) bu çeşit antijene **ekzojen antijen** denir. Ekzojen antijenler hücre içinde endozomal yolla işlenerek, MHC sınıf II molekülleriyle hücre yüzeyine taşınır ve sergilenirler. Burada kendilerini tanıyan CD4<sup>+</sup> yardımcı T hücrelerini (Th) aktive ederek lenfokin sentezine yol açarlar ve bu yolla B hücrelerinin uyarılmasını dolayısıyla da humoral immun yanıtın oluşmasını sağlarlar (8,23).

DNA immunizasyonunda aşı materyali (plasmidler) başta intradermal (gen silahı) ve intramuskuler (injeksiyon) olmak üzere, diğer yollarla (intravenöz, mukozal, intratracheal, vb.) uygulanmaktadır. Koruyucu immun yanıt DNA'nın deri içi, kas içi ve intravenöz inokulasyonlarıyla oluşturulabilmiştir (22). Musküler inokulasyonların sonunda antijen ekspresyonlarının çoğu iskelet kas hücrelerinde gerçekleştirilmektedir. Deri inokulasyonlarında ise ekspresyon, çoğunlukla keratinositlerde oluşmaktadır (11).

### **DNA Aşısı Uygulama Teknikleri**

Şimdiye kadar uygulanan birçok teknik arasında en uygunu olan iki tanesi aşağıda açıklanmıştır.

**1. Gen silahı ile aşılama (İntradermal plasmid DNA inokulasyonu):** Yabancı bir proteine karşı immun yanıt oluşturulması için öncelikle o proteinin saflaştırılması daha sonra bir hayvana injekte edilmesi (subunit aşılar ve rekombinant proteinlerde olduğu gibi) gerekmektedir. Yeterli saf proteinin izolasyonu zaman alıcı ve bazen zor olmaktadır. Bu çeşit bir yanıt, proteini kodlayan genin farelerin derisine direkt olarak uygulanmasıyla da oluşturulabilmektedir. Böylelikle gen ürünü canlı içinde sentezlenerek kontamine olması engellenmektedir. Bu işlem DNA ile kaplı altın taneciklerinin (mikropartikül-

lerinin) canlı bir hayvanın hücreleri içine direkt olarak transferini sağlayan manuel bir sistem ile gerçekleştirilebilmektedir. Bu sistemin kullanıldığı tekniğe **gen silahı aşılması** denir. Genetik immunizasyon bu şekilde, antikor üretmede emek ve zamandan tasarruf sağlayan, aşılama için uygun bir yöntem olabilmektedir (24).

Plasmid DNA deri içine gen silahı ile uygulandığında, buradaki APC'lerden olan dendritik hücreler, Langerhans hücreleri, vs. direkt olarak transfekte olurlar (5). Bu hücreler (özellikle de dendritik hücreler), yüzeylerinde MHC molekülleri ve ek uyarıcı ligandlar taşıdıklarından hem MHC sınıf I (sitotoksik T lenfosit yanıtı) hem de MHC sınıf II yanıtı (T helper yanıtı) oluşturmaktadır (6,7). İntradermal gen aşılama sırasında, makrofaj aktivitesine sahip hücrelerde, keratinosit ve dermal fibroblastlarda gen ürünü oluşumu gösterilmiştir (20).

**2. Plasmid DNA aşılması (İntramuskuler plasmid DNA injeksiyonu):** Bu teknikte, daha önce de bahsedildiği üzere, immun yanıtı uyuracak olan antijeni kodlayan geni taşıyan ve kullanım amacıyla uygun olarak hazırlanan plasmidlerden yararlanır. Bu aşılar, hayvanlara, genellikle, kas içi şırınga edilirler.

Kas dokusunda profesyonel APC'ler (antijen prezente edici hücreler) az miktarda bulunmaktadır. Bu hücrelerin bir kısmının buraya injeksiyondan kaynaklanan lokal iritasyon sonucu toplandığı açıklanmıştır (3,6,12,18). İntramuskuler plasmid DNA injeksiyonundan sonra bir CTL yanıtı başlatmak için, miyositler veya profesyonel APC olarak da kabul edilen miyeloid hücreler tarafından eksprese edilen MHC sınıf I moleküllerinden sağlanan spesifik sinyale ihtiyaç vardır. Miyositler MHC sınıf I molekülleri taşımakta ve sitotoksik T lenfosit yanıtı oluşturmak için endojen olarak sentezlenmiş viral peptidleri CD8+ hücrelere sunabilmektedirler. Ancak, bu miyositler profesyonel antijen sunan ve işleyen hücreler olmadığı için oldukça yetersiz kalmaktadır. Örneğin miyositler B7-1 yardımcı uyarıcı molekülüne sahip değildirler. CTL yanıtı, kan ve lenf dolaşımı yoluyla lenf nodülleri ve dalağa giden (injekte edilmiş) DNA'ların, buradaki APC'ler tarafından hücre içine alınıp işlenerek peptidler şeklinde CD8+ hücrelerine sunulmasıyla da oluşturulabilmektedir. Ekzojen olarak sentezlenmiş peptidler (örneğin travmatize hücrelerden sağlanan), MHC sınıf II yüzey moleküllerine sahip APC'ler tarafından CD4+ hücrelerine sunulurak bu hücreler aktive edilir. Böylelikle hem hücresel hem de humoral immun yanıt oluşmaktadır (16).

## **DNA AŞILARININ KONVANSİYONEL AŞILARLA KARŞILAŞTIRILMASI**

DNA immunizasyonu; günümüzde uygulanmakta olan aşılarla oranla belirli potansiyel avantajlara ve bazı dezavantajlara sahiptir. En önemli avantajları; Plasmid DNA' nın saflığı, üretiminin kolaylığı ve fiziko-kimyasal stabilitesi olarak görünmektedir.

Bu özellikler çeşitli immunojen kombinasyonlarının tek bir doz içinde kullanımına da izin veren yeni aşıların hızlı ve geniş oranda üretimini kolaylaştıracaktır. Antijenler ise, ya farklı patojenlerden, ya da aynı patojenin farklı suşlarından (HIV, Human İmmunodeficiency Virus veya influenza virusu gibi) veya hatta, bir organizmanın değişik yaşam siklusu bölümlerinden (örn. Parazitlerden) üretilebilecektir. DNA aşıları; subunit formülasyonları ve rekombinant proteinler gibi yeni alternatiflerine göre, aşının üretim ve dağıtımını açısından, daha ucuz olmaktadır.

DNA ile sağlanan aktarım, aşı antijenlerinin doğal formlarında ekspresyonunu sağlamakta, bu da sözkonusu antijenlerin immun sisteme sunulmasını ve immun sistem tarafından işlenmesini optimize etmektedir. Bunun yanında, DNA aşılarıyla hem CD4+ yardımcı T hücre (Th) yanıtı ve hem de CD8+ CTL (sitotoksik T lenfositleri) etkin bir şekilde üretilmektedir ve bunların uzun süreli humoral ve hücre-sel immun yanıt oluşturma kapasiteleri kapsamlı ve iyi bir şekilde açıklanmıştır (22,25).

DNA aşı teknolojisinin bu büyük potansiyel avantajlarına karşın, yaygın klinik uygulamalarından önce dikkat edilmesi gereken konular bulunmaktadır. Bu yaklaşımın fark edilen dezavantajları ise antijenlerin protein karakterde olma zorunluluğu ve antijenlerin glikozilasyonunun sağlanmasındaki benzeri zorluklar veya ihtiyaç duyulduğunda glikozilasyonun gerçekleştirilememesi olmaktadır. Örneğin, DNA tarafından kodlanan viral antijenler doğru bir şekilde glikozile edilirken, ne yazık ki bu non-viral intrasellüler patojenlerden sağlanan antijenler için uygun olmamakta, bu da yanlış spesifitede anti-kor oluşumuna neden olmaktadır. Daha önem arzeden noktalar ise şu olasılıklardır:

- (i) plasmid DNA'nın konakçı genomuna integre olarak insersiyonel mutasyonlara ve olası tümör formasyonlarına yol açması.

- (ii) Anti-DNA antikorlarını da içeren otoimmün yanıtların oluşumu
- (iii) Tolerans oluşumu veya yoğun antijen ekspresyonuna bağlı self proteinlere karşı var olan toleransın kesilmesi

Şu da belirtilmelidir ki, DNA'nın insanlarda kullanılacağından çok daha fazla dozlarda hayvanlarda kullanılmasına rağmen, şu ana kadar, injekte edilen DNA'nın kromozomal integrasyonu ile ilgili hiçbir kanıt bulunamamıştır (17). Bu bakımdan, gen silahı uygulaması ile şekillenen immunizasyon, DNA'nın etkili bir şekilde inokule edilmesine olanak sağlamaktadır; Çünkü bu yolla aktarılan DNA (1 µg'dan daha az) diğer yollarla aktarılandan 2 veya 3 kat daha az olmaktadır. Bakteriyel DNA'nın immunojenik olmasına ve anti-DNA antikorları oluşumunu indükleyebilmesine rağmen, günümüzde DNA immunizasyonunu takiben otoimmün hastalık oluşumu veya patolojik oluşumlar şekillendiğine dair bir çalışma henüz yapılmamıştır (19).

**Avantajları:** DNA aşılarının diğer aşılara göre avantajları aşağıda belirtildiği şekilde özetlenebilir.

- Plasmid DNA, oldukça sağlam ve kalıcı, kolay uygulanabilen ve fazla miktarlarda üretimi açısından ucuz olarak nitelenebilen bir aşı şeklidir.
- Herhangi bir DNA sekansı, uzun zincirler içerenler dahi, plasmid içine yerleştirilebilir.
- Fazla miktarlarda yapılandırılıp üretilip purifiye edildiklerinde, plasmidler oda sıcaklığında uzun süre saklanabilmek için liofilize edilebilirler ve bu çeşit aşuların transportu kolay ve ucuzdur.
- Protein komponentlerinin olmayışı (veya eksikliği) plasmid vektörleri açısından avantaj olarak nitelenebilmektedir; çünkü bu onları önceden şekillenen bir immün yanıtı karşı koruyucu kılar, bundan etkilenmezler. Bu özellik maternal antikor içeren yavruların başarılı bir şekilde bağışık kılınmaları açısından önemli bir avantaj olarak nitelendirilebilir.
- DNA aşularıyla sağlanan uzun süreli antijen ekspresyonu, uzun süreli T hücre yanıtının geleneksel immunolojik hafızayla birlikte şekilleneceği anlamına gelmektedir.
- DNA aşuları, Ebola virusu gibi zararlı ajanlara karşı immunojen hazırlanmasında en güvenilir yolu temsil edebilir.



- Çok sayıda epitopu kodlayan DNA aşuları doğrudan doğruya korumayla ilgisi olan bir T hücre yanıtını doğurabilirler. (15).

**Dezavantajları:** DNA aşularının dezavantajları aşağıda belirtildiği şekilde özetlenebilir.

- Şimdiye kadar üretilen hiçbir DNA aşısı, şu anda var olan aşılara karşı tam olarak üstün görünmemektedir; Ancak bu durum DNA aşuları konusu tam olarak araştırıldığı zaman değişebilir.

- Başka bir potansiyel engel de, DNA aşularının güvenlik konusudur (özellikle de uzun bir yaşam süresine sahip insanlarda, aşıda bulunan DNA sekanslarının hücre kromozomuna integrasyonu oluşturabileceği muhtemel mutasyonlar ve tümorigenezis açısından önem taşıyabilir).

DNA'nın uzun periyodlar boyunca var olacağı göz önüne alındığında ve daha genomik DNA'ya integrasyonun şekillenmesi (henüz kesin bir kanıtın olmamasına rağmen,) olasılığı bulunmaktadır. İntegrasyonun yokluğunda dahi, plasmid DNA'nın uzun süreli kalıcılığı otoreaktif olan bir anti-DNA yanıtını uzun süre devam ettirebilir (15).

### **DNA İMMUNİZASYONUNUN KULLANIM ALANLARI**

Birçok sayıdaki viral, bakteriyel ve paraziter hastalık daha şimdiden DNA aşularının hedefi olmuştur ve bu konudaki diğer yaklaşımlar da literatürlerde yer almaktadır. Bunun yanında, bu teknolojinin potansiyelini en iyi şekilde artırmak için DNA aşı gelişiminin uygulanabilir olduğu hastalıklara öncelik verilmesi gerekmektedir. Şu noktalar özellikle göz önünde tutulmalıdır:

(i) Bazı önemli hastalıklara karşı, mevcut aşı yokluğu veya var olan aşuların yetersizliği (örn.HIV, hepatitis C, influenza, kızamık, papilloma virusu, cytomegalovirus, rotavirus, respiratory syncytial virus, tüberküloz, leishmaniosis, schistosomiosis ve sıtma),

(ii) Günümüzdeki aşılama stratejilerinin maliyetlerinin engelleyici boyutlara ulaştığı durumlar,

(iii) Yeni doğanlarda immünite oluşumu ihtiyacı.

Son zamanlarda DNA aşılamalarıyla elde edilen umut verici sonuçlar aşağıda belirtilen bazı konulardan elde edilmiştir.

(i) Malarya (sıtmaya)'ya karşı multi-gen aşılması yapılan, farklı genetik altyapılara sahip farelerde CTL'ye dayalı koruma oluşumu (10),

(ii) İnfluenza virusu gibi antijenik değişkenliğe sahip etkenlere karşı oluşan yüksek koruma raporları, ve DNA aşılarının immun yanıt oluşturma düzeyi yönünden lisanslı inaktif aşılarla karşı olan üstünlüğü (9),

(iii) Şempanzelerde HIV' nin heterolog suşuyla şekillenen infeksiyona karşı koruyucu immunité oluşumu (4),

(iv) Etkene maruz bırakılma sonrası yapılan (post-exposure) aşılama ile farelerde süregelen mikoplazmal pneumoninin temizlenmesi (14,19).

## SONUÇ

DNA immunizasyonunun hızlı gelişimi, günümüzde önemli sa-  
yadaki patojene karşı koruyucu aşı çalışmalarına öncülük etmektedir.  
İnfeksiyöz ve infeksiyöz olmayan bir çok hastalığın immunterapisi  
için yüksek oranda umut vadeci çalışmalara başlanmıştır. DNA aşı-  
larının işleyiş mekanizmasıyla ilgili son bilgilerimiz, koruyucu anti-  
jenlerin identifikasyonu, etkin hedefleme ve immun uyarım için akta-  
rım stratejilerinin optimize edilmesi amacıyla, bu teknolojinin potan-  
siyelinin artırılması, hastalıkların sağaltımı ve infeksiyonlardan ko-  
runma için, bizleri yeni bir çağa giden yolun başlangıcına götürmek-  
tedir.

## KAYNAKLAR

1. **Arda M** (1995): Biyoteknoloji (Bazı Temel İlkeler). Kükem Derneği Bilimsel Yayınlar No: 3, Ankara.
2. **Arda M** (1997): Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayınevi, Ankara.
3. **Austyn JM, Hankins DF, Larsen CP, et al** (1994): Isolation and characterization of dendritic cells from mouse heart and kidney. In: Plasmid DNA vaccination: mechanism of antigen presentation. Springer Semin Immunopathol (1997) 19: 139-145
4. **Boyer JD, Ugen KE, Wang B, et al** (1997): Protection of chimpanzees from high dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination. In: DNA immunization. Immunol Cell Biol (1997) 75: 360-363
5. **Condon C, Watkins SC, Celluzi CM, et al** (1996): DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. In: Plasmid DNA vaccination: mechanism of antigen presentation. Springer Semin Immunopathol (1997) 19: 139-145
6. **Corr M, Lee JD, Carson AD, Tighe H** (1996): Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. J Exp Med, 184: 1555-1560
7. **Corr M, Tighe H** (1997): Plasmid DNA vaccination: mechanism of antigen presentation. Springer Semin Immunopathol 19:139-145
8. **Diker KS** (1998): İmmunoloji. Medisan Yayınları Serisi : 37, Ankara.
9. **Donnelly JJ, Friedman A, Martinez D, et al** (1995): Preclinical efficacy of a prototype DNA vaccine: Enhanced protection against drift in influenza virus. In: DNA immunization. Immunol Cell Biol (1997) 75: 360-363
10. **Doolan DL, Sedegah M, Hedstrom RC, et al** (1996): Circumventing genetic restriction of protection against malaria with multigene DNA immunization: CD8+ T cell-, interferon- $\gamma$ -, and nitric oxide-dependent immunity. In: DNA immunization. Immunol Cell Biol (1997) 75: 360-363
11. **Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, et al** (1993): DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal and gene-gun

inoculations. In: Nucleic acid vaccines: an overview. Vaccine (1997) 15: 785-787.

**12. Hohlfeld R, Engel AG** (1994): The immunobiology of muscle. In: Plasmid DNA vaccination: mechanism of antigen presentation. Springer Semin Immunopathol (1997) 19: 139-145

**13. Ito YA** (1960): A tumor-producing factor extracted by phenol from papillomatous tissue (Shope) of cottontail rabbits. In: DNA immunization. Immunol Cell Biol (1997) 75: 360-363

**14. Lai WC, Pakes SP, Ren K, et al** (1997): Therapeutic effect of DNA immunization of genetically susceptible mice infected with virulent Mycoplasma pulmonis. J Immunol 158: 2513-2516

**15. Manickan E, Karem KL, Rouse BT** (1997): DNA vaccines-a modern gimmick or a boon to vaccinology. Crit Rev Immunol 17: 139-154

**16. Mölling K** (1997): Naked DNA for vaccine or therapy. J Mol Med 75: 242-246

**17. Nichols WW, Ledwith BJ, Manam SV, Troilo PJ** (1995): Potential DNA vaccine integration into host genome. In: DNA immunization. Immunol Cell Biol (1997) 75: 360-363

**18. Pardoll DM, Beckerleg AM** (1995): Exposing the immunology of naked DNA vaccines. In: DNA immunization. Immunol Cell Biol (1997) 75: 360-363

**19. Ramsay AJ, Ramshaw IA, Ada GL** (1997): DNA immunization. Immunol Cell Biol 75: 360-363

**20. Raz E, Carson DA, Parker SE, et al** (1994): Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. In: Plasmid DNA vaccination: mechanism of antigen presentation. Springer Semin Immunopathol (1997) 19: 139-145

**21. Robinson HL** (1997): Nucleic acid vaccines: an overview. Vaccine 15: 785-787

**22. Sanford JC, Smith FD, Russel JA** (1993): Optimizing the biolistic process for different biological applications. In: DNA immunization. Immunol Cell Biol (1997) 75: 360-363

**23. Simmonds RS, Shearer MH, Kennedy RC** (1997): DNA vaccines-from principle to practise. Parasitol Today 13: 328-331

**24. Tang D, DeVit M, Johnston SA** (1992): Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356: 152-154

**25. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, et al** (1993): Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259: 1745-1749

**26. Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al** (1990): Direct gene transfer in vivo. *Science* 247: 1465-1468