



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Rational and random approaches to adenoviral vector engineering

Uil, T.G.

### Citation

Uil, T. G. (2011, January 28). *Rational and random approaches to adenoviral vector engineering*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/17743>

Version: Corrected Publisher's Version

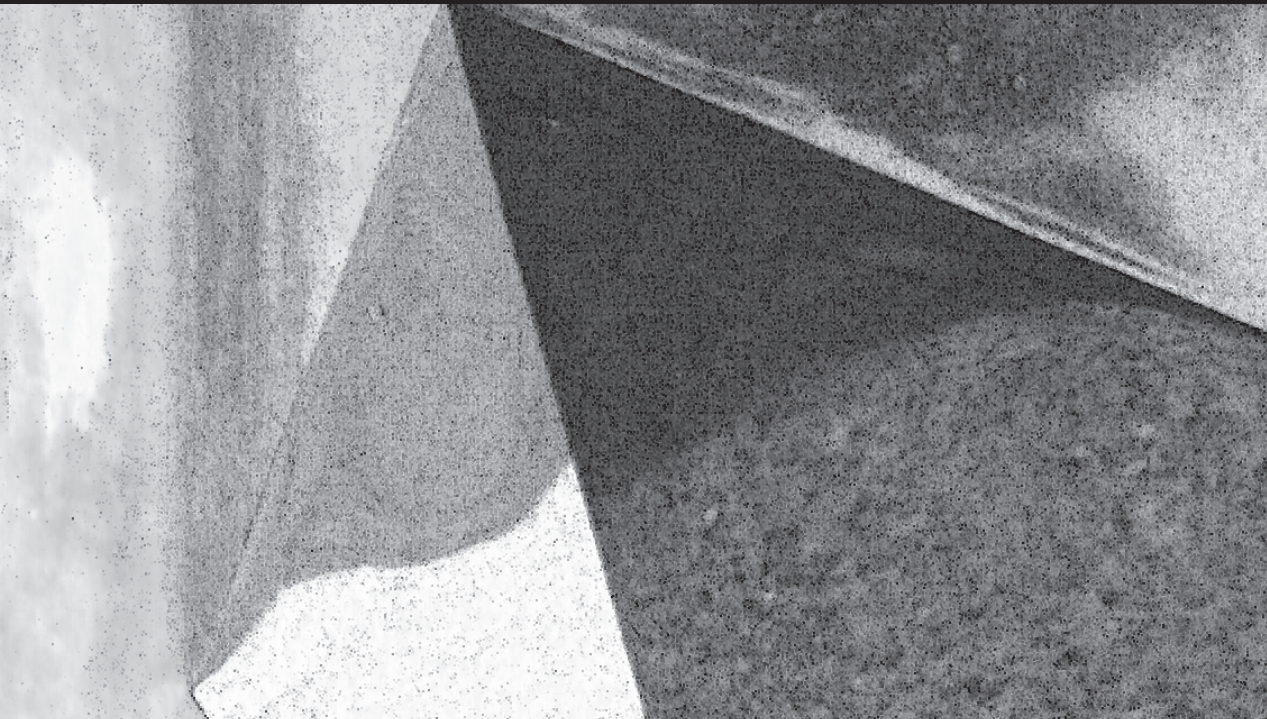
License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)


Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/17743>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).



**&**



The image features a complex, abstract geometric composition. It consists of several overlapping, semi-transparent planes in various shades of gray, creating a sense of depth and three-dimensional space. A prominent feature is a solid black horizontal band that runs across the center of the image. Within this black band, the title is printed in white, uppercase, sans-serif font. The overall aesthetic is minimalist and architectural.

**NEDERLANDSE SAMENVATTING  
LIST OF PUBLICATIONS  
CURRICULUM VITAE**



## NEDERLANDSE SAMENVATTING

Het doel van het werk dat beschreven is in dit proefschrift is het verbeteren van de selectiviteit en effectiviteit van oncolytische adenovirusvectoren. Twee benaderingen zijn genomen om dit doel te bereiken: (i) genetische modificatie van virale capsid-eiwitten om het infectieprofiel (op celtransductieniveau) van het virus te verbeteren (hoofdstukken 2 t/m 4), en (ii) artificiële evolutie om de cytolytische potentie van adenovirus te verhogen (hoofdstuk 5).

In hoofdstuk 1, deel II wordt kort de biologie van de adenovirussen geïntroduceerd en wordt beschreven hoe van deze virussen vectoren kunnen worden gemaakt. Vervolgens wordt in hoofdstuk 1, deel III een overzicht gegeven van de verschillende artificiële evolutiemethoden die gebruikt zijn om virale vectoren te genereren en te verbeteren.

De hoofdstukken 2 en 3 richten zich op modificatie van het adenovirus capsid-eiwit 'IX' (pIX). Doel hiervan is door de incorporatie van 'targeting' liganden een veranderde receptorspecificiteit te bewerkstelligen. Het pIX is aanwezig op het oppervlak van het icosahedrische adenoviruscapsid, waar het functioneert als 'cement' tussen de veel grotere hexoneiwitten. Eerder is gebleken dat de C-terminus van pIX gebruikt kan worden als anker om peptideliganden (en andersoortige polypeptiden) genetisch in het adenovirale capsid te bouwen. In hoofdstuk 2 wordt een nieuw 'pseudotyping' systeem beschreven waarmee het mogelijk wordt om op snelle wijze nieuwe pIX-ligand combinaties te testen op functionaliteit. Hierbij worden lentivirale vectoren gebruikt om celpopulaties te maken die stabiel de nieuwe pIX-varianten tot expressie brengen. Door zulke celpopulaties met een pIX-gedeleteerd adenovirus te infecteren kunnen virussen gemaakt worden die fenotypisch gepseudotypeerd zijn met de betreffende pIX fusies. Dit systeem maakt het mogelijk om nieuwe pIX varianten te testen zonder dat daarvoor het adenovirale genoom hoeft te worden gemodificeerd.

In hoofdstuk 3 wordt het bovengenoemde pIX-pseudotyperingssysteem toegepast voor de analyse van een nieuw pIX fusie-eiwit. Dit eiwit bevat een enkele-keten T-cel receptor (scTCR) als 'targeting' ligand. De gebruikte scTCR is gericht tegen het intracellulaire 'cancer-testis' (CT) antigeen 'melanoma-associated antigen-A1'. Het chimère pIX molecuul bleek efficiënt te worden geïncorporeerd in het adenovirale capsid. Bovendien gaven virustransductiestudies aan dat het capsid-gekoppelde scTCR een zekere mate van doelceltransductie kon bewerkstelligen via specifieke interactie met het corresponderende peptide-MHC complex.

Volgens dezelfde methode is een fenotypisch pseudotyperingssysteem opgezet voor modificatie van de 'fiber' van het adenovirus (hoofdstuk 4). De adenovirale fiber bestaat als een homotrimere staafvormige structuur die verankerd is aan de 'penton-base'. Deze bevindt zich op elk van de twaalf hoekpunten van het icosahedrische adenovirale capsid. Het naar



buiten gerichte C-terminale 'knob' domein van de fiber is verantwoordelijk voor binding met de primaire receptor van het adenovirus, de 'Coxsackie and adenovirus receptor' (CAR). Met zijn natuurlijke rol in de binding van celoppervlakkenreceptoren in het achterhoofd, ligt het voor de hand de adenovirus fiber te modificeren in strategieën die beogen het infectieprofiel van adenovirus te veranderen. Om het versneld testen van nieuwe fibervarianten mogelijk te maken werd een op lentivirale vector-gebaseerde, adenovirus fiber-pseudotyperingssysteem opgezet en gevalideerd. Dit systeem werd gebruikt om een nieuwe chimère fiber te testen. De betreffende fiber bevatte als 'targeting' ligand een enkele-keten antilichaam (scFv) gericht tegen het tumor-geassocieerde antigeen Her2/neu. De fiber-scFv fusie was in staat stabiele trimere te vormen en bleek bovendien een zekere mate van specifieke binding met de corresponderende receptor te bewerkstelligen. Echter, de nieuwe fiber vertoonde problemen met betrekking tot capsid incorporatie-efficiëntie, Her2/neu-bindingsfunctionaliteit in de context van het capsid, en de vouwing van het scFv-gedeelte. De betreffende nieuwe fibervariant bleek daardoor niet geschikt voor adenovirus 'targeting'. Bovendien wezen de resultaten op een algemene biosynthetische incompatibiliteit tussen adenovirale capsid-eiwitten en immunoglobuline-achtige 'targeting' liganden.

Hoofdstuk 5 beschrijft de ontwikkeling en validatie van een nieuwe op evolutie gebaseerde methode ter verbetering van adenovirale vectoren. Tot op heden zijn de meeste adenovirale vectoren gegenereerd door gerichte genetische modificatie. Hoewel deze rationele manier van virale vector ontwikkeling goede resultaten heeft geboekt, wordt ze vaak gehinderd door onze beperkte kennis van alle complexe virale structuur-functie relaties. Daarom kunnen strategieën gebaseerd op mutatie en selectie (zie hoofdstuk 1, deel III) een nuttig alternatief en/of aanvullende aanpak vormen voor het verbeteren van virale vectoren. Het is bijvoorbeeld al veelvuldig aangetoond dat de hoge mutatiesnelheden van RNA-virussen eenvoudig gebruikt kunnen worden om in evolutie-experimenten specifieke vectorologische doelen te bereiken. Daarom werd in Hoofdstuk 5 onderzocht of een artificiële evolutieprocedure gebaseerd op 'mutator' versies van het adenovirus polymerase gebruikt kon worden voor het genereren van verbeterde adenovirale vectoren. Om een dergelijk systeem te ontwikkelen, werd getracht de intrinsieke mutatie snelheid van adenovirus replicatie te verhogen door gerichte modificatie van het door adenovirus-gecodeerde DNA-polymerase. Dit werd gedaan door mutatie van residuen in de gebieden die geïmpliceerd zijn in nucleotideselectie en 'proofreading'. Sneller muterende polymerase mutanten konden vervolgens geïdentificeerd worden dankzij een mutatie-accumulatie en 'deep-sequencing' strategie. Tenslotte werd de mutator polymerase-gebaseerde artificiële evolutiemethode gevalideerd door een evolutie-experiment gericht op het verhogen van de oncolytische potentie van

adenovirus. Dit leverde virale mutanten op met een verhoogde en vervroegde expressie van het Adenovirus Death Protein (ADP), een adenovirus eiwit dat betrokken is bij gastheercellulys en virale spreiding







## LIST OF PUBLICATIONS

van den Hengel, S.K., de Vrij, J., **Uil, T.G.**, Lamfers, M.L., Sillevius Smitt, P.A., & Hoeben, R.C. Truncating the i-leader open reading frame enhances release of human adenovirus type 5 in glioma cells. *Virology* 410, 192-200 (2011).

**Uil, T.G.**, Vellinga, J., de Vrij, J., van den Hengel, S.K., Rabelink, M.J., Cramer, S.J., Eekels, J.J., Ariyurek, Y., van Galen, M., & Hoeben, R.C. Directed adenovirus evolution using engineered mutator viral polymerases. *Nucleic Acids Res.* 39, e30 (2011).

de Vrij, J., van den Hengel, S.K., **Uil, T.G.**, Koppers-Lalic, D., Dautzenberg, I.J., Stassen, O.M., Barcena, M., Yamamoto, M., de Ridder, C.M., Kraaij, R., Kwappenberg, K.M., Schilham, M.W., & Hoeben, R.C. Enhanced transduction of CAR-negative cells by protein IX-gene deleted adenovirus 5 vectors. *Virology* 410, 192-200 (2011).

**Uil, T.G.**, de Vrij, J., Vellinga, J., Rabelink, M.J., Cramer, S.J., Chan, O.Y., Pugnali, M., Magnusson, M., Lindholm, L., Boulanger, P., & Hoeben, R.C. A lentiviral vector-based adenovirus fiber-pseudotyping approach for expedited functional assessment of candidate retargeted fibers. *J. Gene Med.* 11, 990-1004 (2009).

de Vrij, J., **Uil, T.G.**, van den Hengel, S.K., Cramer, S.J., Koppers-Lalic, D., Verweij, M.C., Wiertz, E.J., Vellinga, J., Willemsen, R.A., & Hoeben, R.C. Adenovirus targeting to HLA-A1/MAGE-A1-positive tumor cells by fusing a single-chain T-cell receptor with minor capsid protein IX. *Gene Ther.* (2008).

Magnusson, M.K., Henning, P., Myhre, S., Wikman, M., **Uil, T.G.**, Friedman, M., Andersson, K.M., Hong, S.S., Hoeben, R.C., Habib, N.A., Stahl, S., Boulanger, P., & Lindholm, L. Adenovirus 5 vector genetically re-targeted by an Affibody molecule with specificity for tumor antigen HER2/neu. *Cancer Gene Ther.* 14, 468-479 (2007).

Vellinga, J., de Vrij, J., Myhre, S., **Uil, T.**, Martineau, P., Lindholm, L., & Hoeben, R.C. Efficient incorporation of a functional hyper-stable single-chain antibody fragment protein-IX fusion in the adenovirus capsid. *Gene Ther.* 14, 664-670 (2007).

Vellinga, J., **Uil, T.G.**, de Vrij, J., Rabelink, M.J., Lindholm, L., & Hoeben, R.C. A system for efficient generation of adenovirus protein IX-producing helper cell lines. *J. Gene Med.* 8, 147-154 (2006).

Rivera, A.A., Wang, M., Suzuki, K., **Uil, T.G.**, Krasnykh, V., Curiel, D.T., & Nettelbeck, D.M. Mode of transgene expression after fusion to early or late viral genes of a conditionally replicating adenovirus via an optimized internal ribosome entry site *in vitro* and *in vivo*. *Virology* 320, 121-134 (2004).

&

**Uil, T.G.**, Haisma, H.J., & Rots, M.G. Therapeutic modulation of endogenous gene function by agents with designed DNA-sequence specificities. *Nucleic Acids Res.* 31, 6064-6078 (2003).

Kanerva, A., Zinn, K.R., Chaudhuri, T.R., Lam, J.T., Suzuki, K., **Uil, T.G.**, Hakkarainen, T., Bauerschmitz, G.J., Wang, M., Liu, B., Cao, Z., Alvarez, R.D., Curiel, D.T., & Hemminki, A. Enhanced therapeutic efficacy for ovarian cancer with a serotype 3 receptor-targeted oncolytic adenovirus. *Mol. Ther.* 8, 449-458 (2003).

**Uil, T.G.**, Seki, T., Dmitriev, I., Kashentseva, E., Douglas, J.T., Rots, M.G., Middeldorp, J.M., & Curiel, D.T. Generation of an adenoviral vector containing an addition of a heterologous ligand to the serotype 3 fiber knob. *Cancer Gene Ther.* 10, 121-124 (2003).

Wu, H., Seki, T., Dmitriev, I., **Uil, T.**, Kashentseva, E., Han, T., & Curiel, D.T. Double modification of adenovirus fiber with RGD and polylysine motifs improves coxsackievirus-adenovirus receptor-independent gene transfer efficiency. *Hum. Gene Ther.* 13, 1647-1653 (2002).

Seki, T., Dmitriev, I., Suzuki, K., Kashentseva, E., Takayama, K., Rots, M., **Uil, T.**, Wu, H., Wang, M., & Curiel, D.T. Fiber shaft extension in combination with HI loop ligands augments infectivity for CAR-negative tumor targets but does not enhance hepatotropism *in vivo*. *Gene Ther.* 9, 1101-1108 (2002).

&

## CURRICULUM VITAE

De auteur van dit proefschrift werd op 23 juni 1977 geboren in Delft. Na het behalen van het VWO diploma aan de scholengemeenschap Vincent van Gogh te Assen, werd in 1996 begonnen met de studie Medische Biologie aan de Vrije Universiteit (VU) in Amsterdam. Tijdens de doctoraal fase werd een stage gedaan op de afdeling Pathologie van het VU Medisch Centrum te Amsterdam onder supervisie van prof. dr. J.M. Middeldorp en ing. M.B.H.J. Vervoort. Hierna werd stage gelopen bij het Gene Therapy Center aan de University of Alabama at Birmingham (UAB) in de Verenigde Staten onder supervisie van prof. dr. D.T. Curiel en dr. T. Seki. Vervolgens werd een scriptie geschreven bij de afdeling Therapeutische Genmodulatie aan de Universiteit van Groningen onder leiding van prof. dr. H.J. Haisma en prof. dr. M.G. Rots. Na het behalen van het doctoraal examen in 2002 werd in datzelfde jaar begonnen met het promotie onderzoek op de afdeling Moleculaire Celbiologie van de Universiteit Leiden en het Leids Universitair Medisch Centrum onder leiding van prof. dr. R.C. Hoeben. In 2010 begon de auteur als onderzoeker in de afdeling Vaccine Research van Crucell Holland B.V. te Leiden.

