



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Improvements in adenovirus technology : aiming at replication specificity and vector integration

Rademaker, H.J.

Citation

Rademaker, H. J. (2007, April 26). *Improvements in adenovirus technology : aiming at replication specificity and vector integration*. Printpartners Ipskamp, Enschede. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12039>

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/1887/12039>

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

Samenvatting

Samenvatting

Dit proefschrift beschrijft experimenten die tot doel hebben het verbeteren van Adenovirale genoverdracht vectoren voor genterapie. Met genterapie wordt bedoeld het behandelen van patiënten door middel van DNA overdracht in somatische cellen van de patiënt. In de meeste gevallen zal dit DNA een gen zijn dat codeert voor een 'gezond' eiwit om zo de functie van een 'defect' eiwit over te nemen. Zo zijn er al jongetjes behandeld die een defect in het eiwit γ hebben waardoor bepaalde afweercellen niet meer kunnen functioneren. Deze jongens hebben een niet-normaal functionerend immuunsysteem en kunnen overlijden aan infecties die in gezonde personen niet eens zouden worden opgemerkt. Bij deze studies zijn de voorlopercellen van deze afweercellen behandeld met DNA dat codeert voor een gezond γ eiwit. Doordat deze voorlopercellen zich nu wel kunnen delen en het γ eiwit maken, kunnen ze uitgroeien tot de afweercellen die de patiëntjes missen. De behandeling van deze patiëntjes resulteerde in eerste instantie tot een volledig herstel van het immuunsysteem. Echter, na drie jaar bleek dat bij sommige jongens de herstelde afweercellen sneller deelden dan normaal, het geen uiteindelijk resulteerde in leukemie. Dit voorbeeld geeft aan dat genterapie de potentie bezit om bepaalde erfelijke ziekten te behandelen, maar het geeft ook aan dat er nog veel moet worden geleerd over deze toepassing.

Bij genterapie wordt het gezonde DNA in een cel gebracht zodat deze cel hiervan het gezonde eiwit kan maken. Nu zijn er verschillende manieren om dit DNA in de cel te brengen. De meest efficiënte manier is die met behulp van virussen. Organismen hebben geavanceerde afweersystemen ontwikkeld om infecties door deze virussen zo veel mogelijk te voorkomen. Virussen die zich aan deze afweer weten aan te passen zijn in staat om zich te verspreiden.

Door dit selectieproces is er een grote variatie aan virussen ontstaan die, elk met een verschillende efficiëntie, in staat zijn hun erfelijke informatie over te dragen aan cellen. Normale virussen zullen vervolgens vermenigvuldigen om zich weer verder binnen de gastheer en naar andere organismen te verspreiden. Een van de virussen die in het genterapie vakgebied wordt gebruikt is het Adenovirus. Dit virus, dat normaal een milde verkoudheid veroorzaakt, wordt gebruikt omdat het van nature nauwelijks schadelijk is in gezonde patiënten, een grote variëteit aan celtypen efficiënt kan infecteren en relatief grote DNA-fragmenten kan overdragen. Omdat het uiteraard niet is toegestaan om een ziekteverwekker bij patiënten toe te passen is het virus zo veranderd dat het alleen nog maar in het laboratorium vermenigvuldigd kan worden. Dit is gedaan door één gen te verwijderen (het *E1* gen) dat er normaal voor zorgt dat er virale eiwitten worden gemaakt en één gen dat niet meer nodig is doordat de productie ervan in het laboratorium plaatsvindt (het *E3* gen). Deze virussen zonder het *E1* en *E3* gen worden vectoren genoemd. Doordat de *E1* en *E3* genen uit het virus zijn verwijderd ($\Delta E1/\Delta E3$) ontstaat er ruimte om DNA aan het virus toe te voegen dat tot genezing van de patiënt moet leiden. Deze vector ziet er aan de buitenkant net zo uit als de ziekteverwekkende variant (wild type virus) en kan daardoor net zo efficiënt het DNA afleveren in cellen van patiënten. Echter, doordat een deel van het virale DNA is vervangen door therapeutisch DNA, kan de vector zich in de patiënt niet meer vermenigvuldigen maar, zorgt het er wel voor dat de geïnfecteerde cel het 'gezonde' eiwit gaat maken.

Nu is dit een sterk vereenvoudigde uiteenzetting en is in de afgelopen decennia gebleken dat het niet eenvoudig is om patiënten te genezen met behulp van genterapie. Wel hebben alle tegenslagen er

toe geleid dat we meer zijn gaan begrijpen over de afweer tegen virussen, celdeling en welke beperkingen er zijn om een geïnfecteerde cel langdurig een 'gezond' eiwit te laten maken.

In dit proefschrift is gewerk om verbeteringen in de vector aan te brengen voor twee van deze problemen. Ten eerste het maken van nog veiliger en efficiëntere Adenovirale vectoren. Ten tweede, het verbeteren van langdurige gen-expressie door het therapeutische DNA te laten integreren in het genoom van de gastheer.

In hoofdstuk 2 van dit proefschrift laten we een belangrijke tekortkoming zien van de standaard *E1/E3*-gedeleeteerde humane Adenovirus Type 5 (HAdV-5) vector. Deze $\Delta E1/\Delta E3$ vector kan en mag, in het belang van de patiënt, niet meer autonoom repliceren. Wij hebben laten zien dat in aanwezigheid van een wild type (wt) virus het *E1/E3* defect in de vector wordt verholpen waardoor de vectoren weer kan repliceren. Dit wordt mobilisatie van de vector door het wt virus genoemd. Dit was verwacht voor wt HAdV-5 omdat de vector afgeleid is dit wt virus. Wat we niet hadden verwacht is dat alle geteste wt Adenovirussen in staat waren om HAdV-5 vectoren efficiënt te mobiliseren. Dit heeft gevolgen voor het gebruik van deze vectoren in de kliniek. Omdat het niet is toegestaan om vectoren aan patiënten toe te dienen die ongecontroleerd kunnen verspreiden ontstaat er een probleem als deze patiënten tegelijkertijd met wt Ads zijn geïnfecteerd.

Het probleem van mobilisatie treedt ook op bij een meer recente vectorontwikkeling. Hoewel een $\Delta E1/\Delta E3$ vector niet meer autonoom repliceert vindt er toch op een laag niveau productie van virale eiwitten plaats. Dit is weliswaar onvoldoende om virale replicatie te krijgen maar voldoende om het immuunsysteem van de patiënt te activeren. Het gevolg is dat binnen korte tijd de cellen die nu het gezonde eiwit zijn gaan maken vernietigd worden door het immuunsysteem omdat deze de cel nu ziet als geïnfecteerde

cel. Bij de nieuwste vectoren zijn niet alleen de *E1/E3* genen verwijderd maar al het virale DNA dat codeert voor eiwit. Deze zogenoemde 'gutless-vectoren' kunnen geen viraal eiwit maken en in de praktijk blijkt dan ook dat deze veel minder efficiënt door het immuunsysteem van de patiënt worden herkend. De cellen geïnfecteerd met de gutless-vector kunnen dus veel langer het gezonde eiwit maken. Omdat er meer viraal DNA is verwijderd kan er ook meer therapeutisch DNA gebruikt worden wat een bijkomend voordeel van de gutless-vector is. Dit is dus een belangrijke verbetering ten opzichte van de $\Delta E1/\Delta E3$ vectoren. Om deze vectoren te maken is een tweede virus (helper-virus) nodig. Dit helper-virus zorgt ervoor dat alle virale eiwitten worden gemaakt maar mag zichzelf niet meer verspreiden. Om verspreiding te voorkomen wordt tijdens de productie van dit helper-virus het 'packaging-sigitaal' verwijderd. Het packaging-sigitaal is een stukje DNA dat door een leeg virusdeeltje wordt herkend en er voor zorgt dat het viraal DNA in het virus deeltje wordt opgenomen. Het helper-virus maakt dus lege virus deeltjes en zorgt ervoor dat het gutless-virus DNA wordt gerepliceerd waarna het in het lege virusdeeltje wordt ingebouwd. Het verwijderen van het packaging-sigitaal is echter onvolledig waardoor er onbedoeld een beetje helper-virus tussen het gutless - virus aanwezig zal zijn.

Het probleem van $\Delta E1/\Delta E3$ mobilisatie door wt Ads en de contaminatie van gutless-Ads met helper-Ads is mogelijk te voorkomen door het replicatiemechanisme van $\Delta E1/\Delta E3$ Ads en helper-Ads zo te veranderen dat ze niet meer kunnen worden herkend door wt Ads. Hiervoor hebben twee Kippenadenovirus isolaten met elkaar vergeleken (FAdV-1 OTE en FAdV-1 PHELPS). Dit staat beschreven in hoofdstuk 3. De genomen van OTE en PHELPS lijken erg op elkaar, maar hebben toch een heel belangrijk verschil. Het genoom van PHELPS begint met een G-nucleotide terwijl OTE, net zo

als alle andere Adenovirussen, met een C-nucleotide begint. Dit is interessant omdat tijdens de replicatie van het virus het eerste nucleotide altijd wordt gebonden door een viraal eiwit, het 'pre-terminal protein' (pTP). Dit pTP dient tijdens de replicatie van het virus als startplaats. Hierbij wordt door het polymerase enzym (Pol) het eerste nucleotide van het virale genoom aan pTP gekoppeld. In het geval van OTE is dat een C, maar in het geval van PHELPS moet dat dus een G zijn. We hebben nu bepaald hoe de eiwitsequentie van PHELPS pTP zich vergelijkt met de eiwitsequentie van OTE pTP. Als daar immers grote verschillen in zitten, dan zou dat kunnen verklaren waarom de ene C's en de andere G's bindt. We hebben zowel in pTP als in Pol geen grote verschillen gevonden die het verschil tussen C en G binding kunnen verklaren. Het lijkt er op dat zowel OTE als PHELPS de replicatie kan starten met zowel C's als G's. Dit hebben we verder getest door in cellen verkleinde versies van het OTE genoom (miniOTE) te transfecteren en te co-infecteren met OTE. Dit miniOTE genoom hebben we in twee versies gemaakt, één die begint met C's en één die begint met G's. We zagen dat zowel miniOTE-C als miniOTE-G wordt gerepliceerd door het OTE virus. Dit zelfde hebben we gedaan met PHELPS. Ook PHELPS bleek in staat om zowel het minigenoom dat begint met een G als met minigenoom dat begint met een C te laten repliceren. Hiermee hebben we aangetoond dat zowel OTE als PHELPS in staat is om de replicatie te starten van FAdV-1 genomen die met C's of G's begint.

Dit lijkt heel anders te zijn dan voor humaan Adenovirus. Voor HAdV-5 heeft men al aangetoond dat in een reageerbuis virale eiwitten alleen genomen die beginnen met een C kan laten repliceren. Om te controleren of dat ook zo is in cellen hebben de uiteinden van $\Delta E1/\Delta E3$ virus veranderd zodat ze niet meer met een C maar met een G beginnen. Dit staat beschreven in hoofdstuk 4. Het pTP en Pol dat op dit virusgenoom ligt

zou dan niet meer in staat moeten zijn om de replicatie van dit virus op te starten. Als controle hebben we een vergelijkbaar virus genomen dat wel met C's begint. Als we dit controlevirus-DNA transfecteren naar cellen waarmee Adenovirus geproduceerd wordt (911 cellen) dan zien we na een aantal dagen een duidelijke amplificatie van het virus. Het mutantvirus dat met G begint (we noemen dit mdAd-virus) transfecteert net zo goed naar 911-cellen, maar levert geen amplificatie van virus op. Hieruit blijkt dat in cellen de amplificatie van HAdV-5 heel specifiek is voor genomen die beginnen met C's. Om mdAd-virus te produceren hebben we veranderingen nodig in pTP die ervoor zorgen dat er een G gebonden kan worden. We hebben alle bekende pTP's, inclusief die van HAdV-5 en de door ons bepaalde sequenties van PHELPS en OTE (hoofdstuk 3) met elkaar vergeleken en gekeken naar de voorspelde structuur rond het nucleotidebindend domein. Het blijkt dat het aminozuur dat de C of G bindt geflankeerd wordt door twee helices. De grootte van de ruimte tussen de helices verschilt tussen OTE en PHELPS enerzijds en het HAdV-5 virus anderzijds. In HAdV-5 pTP is deze ruimte kleiner dan bij PHELPS en OTE pTP. De grootte van deze ruimte zou dus wel eens belangrijk kunnen zijn voor de binding van C- of het grotere G-nucleotide. Vervolgens hebben we in het DNA van HAdV-5 pTP de kleinere ruimte tussen de helices uitgewisseld met de grotere ruimte van PHELPS pTP. Dit nieuwe eiwit hebben we H2pTP genoemd. De 911-cellijn hebben we zo veranderd dat deze nu het H2pTP eiwit maakt en hem 911-H2pTP genoemd. Als we nu mdAd DNA transfecteren naar deze 911-H2pTP cellijn, dan vind er na een aantal dagen wel amplificatie van mdAd virus plaats, terwijl dit in afwezigheid van H2pTP niet gebeurt. Door de uiteinden van HAdV-5 te veranderen naar G's kunnen we dus de amplificatie blokkeren. Het uitwisselen van het domein in pTP rond het nucleotidebindend domein zorgt ervoor

dat dit mdAd nu wel geamplificeerd kan worden.

Het mdAd-virus dat is geproduceerd in 911-H2pTP cellen zou niet meer mogen repliceren op 911 cellen omdat het H2pTP dat nodig is voor de replicatie van genomen met een G, afwezig is in 911-cellen. We hebben het mdAd-virus uit 911-H2pTP cellen geïsoleerd en geïnfecteerd op 911 cellen. In tegenstelling tot onze verwachting bleek het virus nu wel op 911 cellen te repliceren. Een mogelijke verklaring hiervoor zou kunnen zijn dat genen die erg op elkaar lijken, soms uitgewisseld worden (homologe recombinatie). Om uit te sluiten dat pTP uit het virus homoloog gerecombineerd heeft met H2pTP uit de 911-H2pTP cellijn, hebben de sequentie van pTP uit mdAd-virus bepaald. Dit bleek nog het normale HAdV-5 pTP te zijn en kan dus niet verklaren waarom het virus wel replicateert op 911 cellen. Vervolgens hebben we gekeken naar de uiteinden van het virus zelf. Deze zouden moeten beginnen met een G. We hebben gecontroleerd dat het uitgangsconstruct inderdaad begint met een G. Echter, het virus dat replicateert op 911 cellen blijkt weer met een C te beginnen. Dit terwijl er even verderop in het genoom een voor mdAd-unieke ClaI sequentie nog steeds aanwezig is. Dus, het virus genoom dat met een G begon tijdens de transfectie 911-H2pTP heeft tijdens de amplificatie op 911-H2pTP cellen of op 911 cellen zijn G's omgewisseld voor C's. Het is nog niet duidelijk wanneer en hoe dit precies is gebeurd.

Het andere probleem waaraan is gewerkt is de kortstondige duur van expressie van het gezonde eiwit doordat de virus vector met het gen dat codeert voor dit eiwit weer verloren gaat in snel-delend weefsel. Als een cel wordt geïnfecteerd met een niet-integrerend vector dat het gen voor dit eiwit bezit, dan kan deze cel het 'gezonde' eiwit gaan maken. Als de cel zich nu gaat delen, zoals in het geval van de voorlopercellen die γ c eiwit moeten maken, dan verliest één van de twee

dochtercellen het virale DNA waardoor deze cel de nieuw verworven eigenschap weer heeft verloren. Dit probleem is op te lossen door het therapeutische DNA te laten integreren in het genoom van de patiënt. Doordat het geïntegreerde gen met de celdeling meedeelt zullen beide dochtercellen het gen behouden waarmee de expressie van het 'gezonde' eiwit wordt verhoogd en verlengd. Een aantal virussen heeft de eigenschap om te integreren maar het Adenovirus is een niet-integrerend virus en kan zijn DNA dus niet overdragen naar het genoom van de patiënt. In hoofdstuk 5 en 6 beschrijven we de resultaten die we hebben gekregen door twee verschillende integratie-mechanismen te bestuderen. In hoofdstuk 5 is gekeken of het integratie-mechanisme van bacteriofaag Mu in staat is om DNA te laten integreren in gekweekte humane cellen. Bacteriofaag Mu infecteert normaal *Escherichia coli* (*E.coli*) bacteriën en geen humane cellen. Het is bekend dat in een regeerbuis het integratiesysteem van Mu gewoon werkzaam is. Hierbij zijn twee Mu-eiwitten betrokken: MuA en MuB. MuA en MuB zijn samen in staat om DNA dat geflankeerd is door zogenaamde 'Attachment sites' te laten integreren op een willekeurige plaats in donor DNA. Normaal heeft bacteriofaag Mu daar wel *E.coli* eiwitten voor nodig. Omdat humane cellen deze *E.coli* eiwitten niet bevatten is het dus ook niet zeker dat het systeem werkt in humane cellen. Wel is bekend dat humane cellen een aantal eiwitten bevatten die sterk op deze *E.coli* eiwitten lijkt. We vermoeden dat deze eiwitten de functie van de *E.coli* eiwitten over kunnen nemen. Normaal zijn MuA en MuB werkzaam in bacteriën maar omdat ze nu werkzaam moeten zijn in de kern van humane cellen, hebben we een kern-localisatie-signaal aan MuA en MuB gefuseerd. Eiwitten die dit signaal bevatten worden naar de celkern getransporteerd waar zich het genomisch DNA bevindt. Om uit te sluiten dat het kern-localisatie-signaal de werking van MuA en MuB verstoort, hebben

we in *E.coli* laten zien beide gemodificeerde eiwitten nog steeds functioneel zijn. Door humane cellen te transfecteren met MuA, MuB en het te integreren miniMu plasmide, konden we laten zien dat MuA en MuB de integratiefrequentie met meer dan 2,5x verhoogt. Nadat de plaats van integratie in een aantal van deze integratiecellijnen was bepaald bleek echter dat dit geen bonafide Mu integraties waren. We concluderen daarom dat MuA en MuB de integratie van miniMu verhoogt, maar doet dit niet volgens het Mu integratiemechanisme.

In hoofdstuk 6 bestuderen we het integratiemechanisme van *Agrobacterium tumefaciens* (*A.tum.*). Deze bacterie komt voor in de grond en infecteert planten waar de bacterie tumoren kan veroorzaken. Deze tumoren zijn een gevolg van de overdracht van een stuk DNA (T-DNA) vanuit de bacterie naar de plantencel. Dit T-DNA wordt naar de kern van de plantencel getransporteerd en integreert daar in het genoom. Bij celdeling wordt het genoom uit de plantencel gedupliceerd en verdeeld over de twee dochtercellen. Omdat het T-DNA is geïntegreerd zal deze ook over de twee dochtercellen worden verdeeld. Op het geïntegreerde T-DNA liggen genen die celdeling stimuleren. Omdat na celdeling de dochtercellen ook het T-DNA bevatten, zullen deze ook weer versneld delen. Uiteindelijk resulteert dit bij de plant in de vorming van een tumor. Genen op dit T-DNA zorgen er daarnaast voor dat de plantencellen koolstofverbindingen gaan uitscheiden. Deze verbindingen worden door de bacteriën weer als voedingsstoffen opgenomen. Het interessante van het *A.tum.* systeem is dat het zijn T-DNA onder laboratorium omstandigheden ook over kan dragen naar andere planten, bacteriën, schimmels en gisten. Er is zelf één publicatie waarin men laat zien dat *A.tum.* zijn DNA kan overdragen naar humane cellen. Dit hebben wij echter niet kunnen reproduceren. Het lijkt er dus op dat het integratiemechanisme weinig

gastheerspecifiek is. Dit maakt het mogelijk makkelijker om het aan humane cellen aan te passen dan het Mu integratiesysteem.

Bij het maken van T-DNA zijn minimaal twee *A.tum.* eiwitten betrokken: VirD1 en VirD2. Deze eiwitten herkennen samen één specifieke sequentie (border) die twee keer in *A.tum* voorkomt. Het T-DNA is tussen deze twee borders gelokaliseerd. VirD1 en VirD2 herkennen samen de border sequenties en zorgen ervoor dat het T-DNA wordt gemaakt waarna het integreert in het genoom van de gastheer. Om het integratiemechanisme van *A.tum.* geschikt te maken voor Adenovirus, hebben we een virale vector nodig dat het gen voor het VirD1 bevat, één virale vector dat het gen voor VirD2 bevat en een derde vector dat het T-DNA met borders bevat. Wanneer deze drie virale vectoren één humane cel infecteren, dan zal de cel VirD1- en VirD2-eiwit maken. VirD1 en VirD2 zorgen vervolgens voor de productie van T-DNA waarna het T-DNA integreert in het genoom van de humane cel. Door op dit T-DNA nu een gen voor een 'gezond' eiwit te plaatsen kunnen we ervoor zorgen dat na celdeling beide dochtercellen het gezonde eiwit blijven maken.

We hebben deze virale vectoren gemaakt en hebben laten zien dat de VirD1- en VirD2-eiwitten beide op de juiste plaats in de cel, de celkern, tot expressie komen. Op het T-DNA hebben we een gen geplaatst dat er voor zorgt dat de geïnfecteerde humane cel resistent wordt tegen een stofje dat normaal dodelijk is. Als het T-DNA integreert en we voegen dit stofje aan alle cellen toe, dan zullen alleen de cellen met de integratie overleven. Omdat de cellen delen zullen er kolonies ontstaan. De hoeveelheid kolonies die gevormd wordt is dan een maat voor de integratiefrequentie. Wanneer we humane cellen alleen infecteren met de T-DNA vector, dan kunnen we bepalen wat de spontane integratiefrequentie in deze cellen is. In onze proeven kwam dat overeen met al eerder gepubliceerde frequenties. Wanneer we humane cellen infecteerden met

zowel de T-DNA vector als de vector met VirD2, zagen we een 12-voudige verhoging van de integratie frequentie. VirD2 is het actieve enzym dat essentieel is voor het maken van T-DNA, maar kan dat normaal gesproken alleen doen samen met VirD1. Het was dus verrassend dat VirD2 zonder VirD1 al een verhoging van de integratiefrequentie gaf. Als mogelijke verklaring daarvoor dragen we aan dat Adenovirus in bepaalde tumorcellen al een beetje kan repliceren waardoor er enkelstrengs virale genomen kunnen ontstaan. Op enkelstrengs DNA kan VirD2 zonder hulp van VirD1 zijn werk doen. Wanneer we cellen infecteerden met de T-DNA vector en met de VirD1- en VirD2-vectoren, zagen we een 62-voudige toename van integratiefrequentie. Hieruit concluderen we dat VirD2 in staat is de integratiefrequentie van DNA te verhogen, in het bijzonder in aanwezigheid van VirD1. Verder hebben we ook laten zien dat het geïntegreerde DNA stabiel is en dat de expressie van genen op het geïntegreerde DNA niet uitgeschakeld wordt. We hebben alleen nog niet laten zien dat het

geïntegreerde DNA ook daadwerkelijk het T-DNA is. Toen we hier naar keken bleek dat sequenties flankerend aan het T-DNA ook mee zijn geïntegreerd. Er is dus geen sprake is van integratie van alleen T-DNA maar van grotere stukken DNA. Het is belangrijk om te weten via welk mechanisme deze integraties hebben plaatsgevonden, maar daarvan hebben we nog geen resultaten.

Het integreren van DNA in het genoom van een patiënt heeft naast de eerder genoemde voordelen van verlenging van de expressieduur ook nadelen. Aangezien de plaats in het genoom waar het DNA integreert voornamelijk willekeurig is, is het bijvoorbeeld mogelijk dat de integratie een gen dat verantwoordelijk is voor de regulatie van celdeling verstoort. Dit kan een eerste stap zijn in de ontwikkeling van een tumor en wordt transformatie genoemd. In hoofdstuk 7 zetten we de voor- en de nadelen van integrerende vectoren naast elkaar en bekijken we het risico op transformatie aan de hand van data die in de loop van de jaren over integrerende virussen is verzameld.

