



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Development of stealth transgenes for gene therapy : evaluation of cis-acting inhibitors of antigen presentation

Raamsman-Ossevoort, M.

Citation

Raamsman-Ossevoort, M. (2006, February 12). *Development of stealth transgenes for gene therapy : evaluation of cis-acting inhibitors of antigen presentation*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4365>

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/1887/4365>

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

Chapter 7

Summary & Samenvatting

Summary & Samenvatting

Summary

Gene therapy is a potentially powerful form of molecular medicine and potentially broadly applicable. It would provide treatments for a large number of inherited and acquired diseases. Ideally, the affected gene should be replaced, but most protocols aim at adding a correct copy of the afflicted gene. Often viruses are used to get the gene transferred into the cells. This can lead to an immune response against the vehicle, i.e. the virus. Expression of a “new” gene may also lead to synthesis of proteins foreign to the immune system. Cells producing these proteins will therefore be recognized as infected or aberrant and targeted for destruction. This is of course an unwanted effect in those applications where a life-long repair of the defect is desired.

In **Chapter 1**, an overview is given of both immune responses against one of the most frequently used viral vectors, the adenovirus, and immune responses against transgene products. For better understanding this issue is discussed in the context of the current state of cancer- and gene therapy. In addition, a brief description is provided on how the immune system recognizes the presented peptides as well as viral mechanisms to evade the system.

In **Chapter 2**, we use one of the known immune evasion mechanisms to “stealth” transgenes products. Here, we fuse the codons for the Gly-Ala repeats (GAR) of the Epstein-Barr Virus (EBV) nuclear antigen 1 (EBNA-1) with three different transgenes, i.e. *E.coli* LacZ, firefly Luciferase and herpes simplex virus 1 (HSV1) thymidine kinase (TK). We show that fusion of the GAR does not lead to significant reductions in the activities of these proteins. Interestingly and to our surprise, the GAR-LacZ fusion protein is capable of inducing CTLs. However, when we tested cells infected with GAR-LacZ for recognition by LacZ specific CTLs, these cells were protected against lysis. This apparent paradox can be explained by cross-priming. We showed that in the absence of the correct MHC class I molecules, CTLs can be primed, indicating that cross-priming does occur. Moreover, we showed in animal experiments that GAR-LacZ-expressing cells resided longer in the body than the non-modified LacZ expressing cells. From these data we concluded that the EBV GAR system could well be used in gene therapy settings to prevent the immune system of reacting on transgenes.

Upon closer examination of the EBNA-1 open reading frame (ORF), we found a nested (frame-shifted) ORF. This alternative ORF would yield a strongly acidic protein with a calculated molecular weight of 40.7 kDa. This protein would contain a 238 amino-acids long glycine, glutamine, and glutamic acid-rich repeat. The polypeptide tract rich in Gly and Glx residues was named GZ-repeat (GZr) region. In **Chapter 3**, we fused this nested ORF (GZr) with the LacZ gene and were able to show β -galactosidase activity upon transfer of the fusion gene into cultured cells. We set out to test this new repeat next to the original GAR, two mini constructs consisting of one third of the normal GAR or GZr and a construct lacking all repeats. All constructs were equally active for β -galactosidase and tested for recognition by LacZ specific CTLs. This showed that, in contrast to the repeat deleted construct, all the

constructs bearing repeats were at least partially protected for recognition by LacZ specific CTLs. Interestingly, the mini repeats, both miniGAR and miniGZr, were better in protecting the cells against recognition. Since the repeat-deleted construct and the normal LacZ-expressing cells were recognized, we were able to show that this is a repeat-dependent mechanism. This shows that the GZ repeats might be another candidate to shield transgenes for the immune system.

One of the examples of a transgene where an immune response was mounted against, is the herpes simplex virus 1 (HSV1) thymidine kinase (TK). In **Chapter 4**, TK was fused to the GAR to try to blunt the immune response against it. Since the EBNA-1 protein resides in the nucleus, it contains a nuclear localization signal (nls). Although there are no clues that a nuclear localization of TK is detrimental to the activity, we did remove the nls. This indeed restored the TK localization to normal and the GAR alone did not influence the localization. We introduced also some mutations in the TK to obtain a more sensitive and unsplicable TK. In our cell system the mutations did not have any effect on the activity. To evaluate the protective effect of the GAR, we introduced a marker CTL epitope in the constructs. Insertion of the ovalbumin (OVA) epitope did not alter the activity of TK as well. When cells expressing TK harboring the OVA epitope and GAR-TK with the OVA epitope, were cocultured with B3Z cells, capable of recognizing the OVA epitope, it was clear that the GAR could shield OVA for these cells. We therefore suggest that GAR-TK might be a good candidate to use in bone marrow transplantation protocols.

The Kaposi sarcoma herpes virus (KSHV) / human herpes virus 8 (HHV-8) has a protein that is, like EBNA-1, involved in maintenance of the episome and therefore also in establishing latency. This protein, latency-associated nuclear antigen-1 (LANA-1), has a long acidic repeat where the last part is similar to the newly found GZ repeat. In **Chapter 5** we investigated LANA-1's capabilities in immune evasion. When tested *in-trans* with a GFPOva fusion, both the EBNA-1 and LANA-1 failed to protect OVA for recognition. Then, a fusion was made of LANA-1 and GFPOva and similarly a GARGFPOva fusion protein. Both were expressed equally and localization studies confirmed that also LANA-1 has an nls. When the constructs then were tested for recognition by B3Z cells, LANAGFPOva showed clear reduction in recognition compared to GFPOva. In this setting however, the GARGFPOva fusion was not as efficient as we have previously seen. The repeat units in LANA-1 are also responsible for the protective effect like the GAR and GZr in EBNA-1. This was shown using a repeat-deleted construct, LANA Δ rGFPOva, which showed similar characteristics as the GFPOva. In conclusion, this study describes for the first time an immune evasion effect of another herpes virus than EBV. Like EBNA-1 it also depends on repeats, but the mechanism by which it inhibits presentation of linked antigens remains to be established.

Samenvatting

Gentherapie is een potentieel effectieve vorm van moleculaire geneeskunde en potentieel wijd inzetbaar. Het zou een oplossing kunnen bieden voor zowel erfelijke en andere ziekten. In het gunstigste geval zou het beschadigde gen moeten worden vervangen door een gezond gen, maar de meeste gentherapie protocollen richten zich op het toevoegen van een correct gen. Voor het toevoegen van het gen in de zieke cellen wordt een vector gebruikt. Die vector, vaak een virus, kan ervoor zorgen dat er een immuun respons ontstaat tegen de drager. Ook de expressie van op deze manier toegevoegde correcte genen kan leiden tot het synthetiseren van eiwitten die onbekend zijn voor het immuunsysteem. De cellen die deze eiwitten produceren zullen daarom als geïnfecteerd of afwijkend worden beschouwd en worden opgeruimd door het immuunsysteem. Dit is natuurlijk een ongewild effect in de toepassing van gentherapie waar een levenslange reparatie van het defecte gen is gewenst.

In **Hoofdstuk 1** wordt een overzicht gegeven van de immuun respons tegen zowel een van de meest gebruikte virale vectoren, het adenovirus, als de gebruikte transgenen en hun transgenproducten. Dit is ter wille van de duidelijkheid geplaatst in een context van de huidige stand van zaken bij kanker- en gentherapie. Daarbij is een korte beschrijving gegeven hoe het immuunsysteem antigene peptiden herkent en presenteert. Ook worden virale mechanismen beschreven om dit systeem te vermijden.

In **Hoofdstuk 2** gebruiken we een bestaand immuunsysteem ontwijkend mechanisme om transgen producten onzichtbaar te maken (te “stealthen”). Hier fuseren we de codons van de Gly-Ala repeats (GAR) van het Epstein-Barr Virus (EBV) nucleair antigen (EBNA-1) met drie verschillende transgenen. We gebruiken het LacZ gen van de darmbacterie *E. coli*, het Luciferase gen van vuurvliegjes en het thymidine kinase (TK) gen van het herpes simplex virus 1 (HSV1). We laten zien dat fusie van deze GAR aan deze transgenen niet leidt tot een reductie in de activiteiten van deze eiwitten. Interessant genoeg en tot onze verbazing is het fusie-eiwit GAR-LacZ wel in staat om CTLs te induceren. Maar als we testen of GAR-LacZ geïnfecteerde cellen worden herkend door LacZ specifieke CTLs, zien we dat ze worden beschermd tegen lysis. Deze ogenschijnlijke paradox kan worden verklaard door het mechanisme van cross-priming. We laten zien dat zelfs in afwezigheid van de correcte MHC class I molecules CTLs kunnen worden geïnduceerd, wat er op wijst dat cross-priming inderdaad gebeurt. We laten in dier-experimenten ook nog zien dat cellen die GAR-LacZ tot expressie brengen langer in het lichaam blijven dan cellen die het ongemodificeerde LacZ tot expressie brengen. Uit deze data hebben wij de conclusie getrokken dat het EBV-GAR-systeem inderdaad kan worden gebruikt om een immuun respons tegen de gebruikte transgenproducten te voorkomen in gentherapeutische protocollen.

Toen we het EBNA-1 open reading frame (ORF) beter bekeken, konden we ook een intern (frame-shifted) ORF vinden. Dit alternative ORF zou een eiwit tot expressie brengen dat sterk zuur was en een berekend moleculair gewicht heeft van 40.7 kDa. Dit eiwit zou een

lange zure repeat hebben van 238 aminozuren bestaande uit glycine (Gly), glutamine (Gln) en glutamine zuur (Glu). Deze repeat noemden we de GZ-repeat (GZr), omdat die bestaat uit alleen Gly (G) en Glx (Z) aminozuren. In **Hoofdstuk 3** fuseren we deze nieuwe repeat (GZr) uit het nested ORF met het gen voor LacZ. Wanneer we dit fusie gen tot expressie brachten in cellen konden we duidelijke β -galactosidase activiteit aantonen. We testten deze nieuwe repeat samen met de eerder gebruikte GAR, twee mini repeat constructen die maar 1/3 van de normale GAR en GZr bevatten en een construct waar we alle repeats hebben uitgehaald. Al deze constructen lieten gelijke niveaus van β -galactosidase activiteit zien. Daarna testten we ze voor herkenning van het intracellulaire LacZ door LacZ specifiek CTLs. Alle constructen die repeats hadden, waren tenminste gedeeltelijk beschermd tegen herkenning door LacZ specifieke CTLs. De mini repeats, zowel miniGAR als miniGZr, waren beter in het beschermen tegen herkenning. De cellen die normaal LacZ of het repeatloze LacZ tot expressie brachten, werden wel herkend door LacZ specifieke CTLs. Hierdoor kunnen we concluderen dat het mechanisme van het beschermen van de cellen berust op het hebben van repeats. Bovendien kan de GZr ook gebruikt worden voor het beschermen van transgenen tegen het immuunsysteem.

Een van de voorbeelden waarbij een transgen wordt herkend en opgeruimd door het immuun systeem is het herpes simplex virus 1 (HSV1) thymidine kinase (TK). In **Hoofdstuk 4** hebben we TK aan de GAR gefuseerd om de immuun respons te stoppen. Omdat het EBNA-1 eiwit normaal in de kern aanwezig is, bezit het een nuclear localization signal (nls). Hoewel we geen aanwijzingen hebben dat TK in de celkern minder goed functioneert, hebben we toch de nls uit het construct verwijderd. Die verwijdering zorgde er inderdaad voor dat het fusie eiwit niet meer in de celkern tot expressie kwam. Een fusie van GAR alleen met TK (zonder nls) had geen enkel effect op de localisatie. We hebben mutaties aangebracht in het TK om het gevoeliger te maken voor de pro-drug ganciclovir (GCV). Ook hebben we mutaties aangebracht om ervoor te zorgen dat het actieve deel van TK er niet meer kan worden uitgehaald door middel van splicing. Deze mutaties hadden geen effect op de activiteit van TK. Om beter te kunnen beoordelen wat het beschermende effect van GAR is, hebben we een bekend CTL epitoom van ovalbumine (OVA) als marker ingebouwd in het TK. Het inbouwen van dit OVA epitoom zorgde ook niet voor een verminderde activiteit van TK. We hebben cellen die het GAR-TK met OVA epitoom of normaal TK met OVA epitoom tot expressie brengen samen gekweekt met B3Z cellen. Deze B3Z cellen kunnen het OVA epitoom herkennen waarna ze β -galactosidase tot expressie brengen. In onze experimenten konden we na het samen kweken duidelijk zien dat wanneer het OVA epitoom is ingebouwd in GAR-TK er geen herkenning was door de B3Z cellen. Daaruit konden we concluderen dat GAR het TK kan beschermen en zouden wij het GAR gemodificeerde TK aanbevelen om te gebruiken in beenmerg-transplantatie protocollen.

Het Kaposi sarcoma hepes virus (KSHV)/humaan herpes virus 8 (HHV-8) heeft ook een eiwit dat net als EBNA-1 is betrokken bij het handhaving van het episoom en daarom ook

in het vestigen van latentie. Dit eiwit, latency-associated nuclear antigen-1 (LANA-1), heeft een lange zure repeat waarvan het laatste deel lijkt op de nieuw gevonden GZ repeat. In **Hoofdstuk 5** hebben we LANA-1 getest in het vermijden van de immuun respons. Wanneer we EBNA-1 en LANA-1 *in trans* testten met een GFPOva fusie eiwit, zagen we dat beide eiwitten faalden in het beschermen van OVA. Daarna hebben we een fusie gemaakt van LANA-1 en GFPOva en op dezelfde manier GAR en GFPOva. Beiden kwamen tot hetzelfde expressie niveau en lokalisatie studies toonden aan dat LANA-1 ook een nls heeft. Wanneer de cellen werden getest voor herkenning door B3Z cellen liet LANAGFPOva een duidelijke reductie zien in herkenning ten opzichte van GFPOva. Hier was alleen het beschermende effect van GARGFPOva minder groot dan we eerder hebben laten zien. Ook in LANA-1 zijn de repeats verantwoordelijk voor het beschermende effect net zoals in het geval van de GAR en GZr in ENBA-1. Dit werd duidelijk nadat we konden aantonen dat een construct waar de repeats waren uitgehaald, LANAA Δ rGFPOva, hetzelfde reageerde dan normaal GFPOva. Dit leidt tot de conclusie dat we voor het eerst hebben kunnen aantonen dat er een immuunsysteem vermijdend effect is van een ander herpes virus dan het EBV. Net zoals in EBNA-1 zijn repeats hiervoor verantwoordelijk. Het mechanisme van de bescherming voor de antigenen die eraan gekoppeld zijn, is nog niet ontrafeld.

Summary & Samenvatting