



**Universiteit
Leiden**
The Netherlands

From stem cells to functional lymphocytes: cell differentiation and gene therapy implementation for RAG-SCID

García Pérez, L.

Citation

García Pérez, L. (2021, October 6). *From stem cells to functional lymphocytes: cell differentiation and gene therapy implementation for RAG-SCID*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3214836>

Version: 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/1887/3214836>

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

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Het immuunsysteem is een complex, meerlagig verdedigingssysteem om infecties tegen te gaan en om homeostase te behouden. Het immuunsysteem is opgebouwd uit een interactief netwerk van lymfoïde organen, oplosbare componenten en verschillende gespecialiseerde celtypen zoals B en T-lymfocyten. Deze gespecialiseerde witte bloedcellen vormen de belangrijkste cellen van het specifieke immuunsysteem. Alle typen witte bloedcellen ontstaan uit bloedstamcellen in het beenmerg waar ze een aantal sterk gereguleerde, opeenvolgende ontwikkelingsstappen ondergaan. Binnen het immuunsysteem heeft elk type witte bloedcel zijn eigen specifieke rol en hun ontwikkelingstraject wordt gestuurd door verschillende transcriptiefactoren die de genexpressie van hun target genen reguleren en zorgen dat de cellen richting hun definitieve celtipe differentiëren.

In **Hoofdstuk 2** van dit proefschrift hebben we meer inzicht verkregen over de normale ontwikkeling van het immuunsysteem, in het specifiek over het transcriptie factor netwerk dat de ontwikkeling van T-cellen reguleert. Tcf1, het eerste T-cel specifieke eiwit dat in de thymus aangezet wordt, reguleert de expressie van twee belangrijke target genen, Gata3 en Bcl11b. Het ontbreken van Tcf1 zorgt voor een gedeeltelijke blokkade in T-cel ontwikkeling, verhoogde celdood en de ontwikkeling van andere afweercellen dan T-cellen in de thymus. Het fenotype van volledig T-cel gecommiteerde thymocieten met een Tcf1 deficiëntie wordt gekenmerkt door heterogene genexpressie, een afwijkend epigenetisch profiel en het feit dat ze terugvallen in hun ontwikkeling naar meer onrijpe stadia waarna ze zich tot andere afweercellen kunnen ontwikkelen. Expressie van Bcl11b in Tcf1-deficiente cellen herstelt de T-cel ontwikkeling maar zorgt niet voor sterke onderdrukking van de ontwikkeling tot een ander type afweercel. De expressie van Gata3 blokkeert, in tegenstelling tot Bcl11b, de ontwikkeling tot andere afweercellen maar herstelt T-cel ontwikkeling niet. Concluderend hebben deze bevindingen laten zien dat er voor een goed gereguleerd T-cel genexpressie programma een minimaal netwerk van transcriptie factoren nodig is: Notch signalering induceert Tcf1 expressie dat vervolgens Gata3 en Bcl11b activeert, waarbij Gata3 zorgt voor de onderdrukking van de ontwikkeling van andere afweercellen en Bcl11b de expressie van T-cel specifieke genen induceert.

Een verstoorde ontwikkeling van lymfocyten kan leiden tot ernstige ziektes zoals immuundeficiënties. Ernstige gecombineerde immuundeficiëntie of "severe combined immunodeficiency" (SCID) is een zeer ernstige afweerstoornis die voorkomt bij kinderen zonder een functioneel immuunsysteem waarbij de afwezigheid van T cellen kenmerkend is. Zonder een gepaste behandeling zullen kinderen met SCID overlijden voor hun eerste levensjaar. Behandelingen beperken zich tot beenmergtransplantatie en recentelijk ook tot stamcel-gentherapie.

In dit proefschrift hebben we ons gericht op het ontwikkelen van een efficiënte en veilige lentivirale gentherapie om genetische defecten te kunnen corrigeren die worden veroorzaakt door zowel Recombinase Activating Gene 1 als 2 (RAG1 en RAG2) deficiëntie. In **Hoofdstuk 3** worden de preklinische ontwikkeling, veiligheid en regulatorische stappen beschreven die genomen moeten worden om een succesvolle gentherapie voor immuundeficiënties naar de kliniek te brengen. Autologe stamcelgentherapie gebaseerd

op lentivirale vectoren wordt beschreven in **Hoofdstukken 4 en 5** als een efficiënte en veilige methode om RAG-SCID deficiëntie te corrigeren. In Rag1^{-/-} en Rag2^{-/-} muizenmodellen zagen we een volledig functioneel herstel van het immuunsysteem na het toedienen van onze MND-c.o.RAG1 en PGK-c.o.RAG2 lentivirale vector in stamcellen van de muizen. In het beenmerg en de thymus konden we B- en T cel ontwikkeling zien samen met een herstel van antistof productie, hoge mate van diversiteit in herschikkingen van T-cel receptor genen en een effectieve immuunrespons. Daarnaast zagen we ook een verbeterde ontwikkeling van B- en T-cellen vanuit stamcellen afkomstig van patiëntenmateriaal na transductie met onze klinische RAG1 vector en daaropvolgende transplantatie in NSG muizen.

Succesvolle preklinische ontwikkeling samen met bewezen veiligheid vormen een stevige basis voor de start van de eerste wereldwijde klinische fase I/II studie voor RAG1-SCID gentherapie. Parallel hieraan werd bij Rag2^{-/-} muizenmodellen functionele immuun reconstitutie bewerkstelligd met behulp van een veilige klinische PGK-c.o.RAG2 lentivirale vector, wat in **Hoofdstuk 5** besproken wordt. Hierin worden ook de uitdagingen van RAG2 ten opzichte van RAG1 gentherapie besproken, zoals de noodzaak voor het bereiken van optimale RAG2 expressie niveaus.

Ook hebben we bestaande protocollen geoptimaliseerd door het ontwikkelen van nieuwe toepassingen en conditioneringsmethoden met als doel de uitkomsten van allogene en autologe transplantatie voor gentherapie te verbeteren. Een nieuwe methode om op single-cel niveau transductie efficiëntie en transgene expressie in het gentherapie product te kunnen meten wordt geïntroduceerd in **Hoofdstuk 6**. De zogenoemde “branched DNA” techniek laat een hoge mate van specificiteit, gevoeligheid, reproduceerbaarheid en veelzijdigheid zien. Met deze methode kan de heterogeniteit binnen gentherapie producten in kaart gebracht worden, waardoor de daadwerkelijke hoeveelheid van potentiële therapeutische cellen wellicht opnieuw overwogen zou moeten worden; mede door de onderschatting van het aantal kopieën van het transgen per cel.

Als laatste hebben we een alternatieve conditionerings behandeling getest waarin het gebruik van chemotherapie kan worden teruggebracht, met als doel het beperken van korte- en lange termijn bijwerkingen en het behouden van voldoende nesteling van stamcellen en herstel van het afweersysteem. In **Hoofdstuk 7** beschrijven we hoe we een behandeling ontwikkelen waarin het gebruik van chemotherapie (busulfan) verminderd kan worden door het te combineren met klinisch toegepaste mobilisatie middelen (G-CSF en Plerixafor). Deze middelen worden gebruikt om stamcellen te laten verhuizen van het beenmerg naar het perifere bloed. Bij het gebruik van deze nieuwe combinaties inclusief G-CSF of Plerixafor werd in het beenmerg een interessante afname van het stamcel compartiment waargenomen, terwijl in het NSG-muizenmodel geen verschil werd bereikt in de transplantatie resultaten. Recente veelbelovende ontwikkelingen op het gebied van conditionering op basis van antilichamen zijn zeer interessant voor het veld, omdat deze methodes in het ideale geval donor chimerisme oplevert zonder het gebruik van toxische chemotherapeutische middelen.

Samengevat beschrijft het werk in dit proefschrift de route naar de regulering van een behandeling voor immuundeficiënties op basis van gentherapie, waarbij potentiële

mijlpalen voor de algehele procedure zoals screening bij pasgeborenen, cel isolatie en transductie, pre-conditionering, het standaardiseren van protocollen en het monitoren van patiënten allemaal zijn geoptimaliseerd.