



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Immune evasion by varicelloviruses : the identification of a new family of TAP-inhibiting proteins

Koppers-Lalić, D.

Citation

Koppers-Lalić, D. (2007, September 11). *Immune evasion by varicelloviruses : the identification of a new family of TAP-inhibiting proteins*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12381>

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/1887/12381>

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

NEDERLANDSE SAMENVATTING

— |

| —

— |

| —

Nederlandse samenvatting

Vanaf de vroegste tijden van hun evolutie hebben multicellulaire organismen zich verdedigd tegen infectieuze agentia zoals nucleïnezuren, virussen, bacteriën, schimmels en parasieten. Constante selectiedruk heeft geresulteerd in de ontwikkeling van hoogontwikkelde immuunsystemen, welke in hun adaptieve vormen zowel een uitmuntende specificiteit als een geheugen voor antigenen van ziekteverwekkers hebben. Aan de andere kant hebben infectieuze agentia uitgekende strategieën ontwikkeld om de verdedigingsmechanismen van de gastheer tegen te werken of daaraan te ontsnappen. Virussen zijn voor hun vermenigvuldiging geheel afhankelijk van gastheercellen en zij hebben een indrukwekkend scala aan mechanismen ontwikkeld om zich te kunnen verbergen voor het immuunsysteem van de gastheer.

Het succes van de strategieën die de immuniteit ontregelen is gebaseerd op door het virus gecodeerde eiwitten, die óf specifieke componenten van het immuunsysteem van de gastheer nabootsen, óf zich richten op een verscheidenheid aan afweermechanismen van de gastheer. De bedrevenheid van deze virale eiwitten om te ontsnappen aan het immuunsysteem draagt uiteindelijk bij tot een levenslange infectie en tot de ziekteverwekkende eigenschappen van virussen.

Dit proefschrift beschrijft hoe bepaalde virussen 'stealth' technologie (stealth = stiekem) gebruiken om verstopperij te spelen met het immuunsysteem van hun gastheer. Leden van de familie van de *Herpesviridae* blokkeren een belangrijke stap die ervoor zorgt dat het immuunsysteem op de hoogte wordt gebracht van de aanwezigheid van virus in de cel: de presentatie van antigeen aan cytotoxische T-cellen door MHC klasse I moleculen (MHC = Major Histocompatibility Complex).

MHC klasse I moleculen zijn type I transmembraan glycoproteïnen, die in vertebraten op alle kerndragende cellen gevonden worden in associatie met de kleine subunit $\beta 2$ microglobuline ($\beta 2m$). Op het celoppervlak presenteren MHC klasse I moleculen voornamelijk peptiden van endogene proteïnen aan $CD8^+$ cytotoxische T-cellen die het uitgestalde peptidenrepertoire afschannen. De ontdekking van peptiden die niet van de gastheer afkomstig zijn of die van gemuteerde eiwitten zijn afgeleid, zal leiden tot de vernietiging van de antigeen presenterende cel. De meeste MHC klasse I moleculen krijgen hun peptidenlading in het endoplasmatisch reticulum (ER). De meeste van deze peptiden zijn afkomstig van eiwitten in het cytosol, die snel afgebroken worden via de ubiquitine-proteasoom route.

De meest gebruikelijke wijze van peptidentransport over het ER membraan is door middel van TAP-gemedieerd transport (TAP = Transporter associated with Antigen Processing). TAP is samengesteld uit twee subunits, TAP1 en TAP2. Beide subunits bevatten een domein dat vele malen door het ER membraan gaat en uiteindelijk de transporttunnel vormt. Dit domein omvat ook de peptidenbindingsplaats. Bovendien hebben TAP1 en TAP2 elk een hydrofiel nucleotide-bindend domein om ATP te binden. TAP heeft de energie die vrijkomt bij de hydrolyse van ATP nodig voor het transport van peptiden.

De effectiviteit van het laden van peptiden op MHC klasse I moleculen wordt bevorderd door tapasin, een eiwit dat zorgt voor de associatie van MHC klasse I moleculen met TAP. Deze 'multi-component' associatie resulteert in de vorming van het MHC klasse I peptide laadcomplex (PLC) dat de binding van antigene peptiden in de peptide-bindingsgroeve van het MHC klasse I molecuul vergemakkelijkt. Stabiele MHC klasse I/ $\beta 2m$ /peptide complexen worden gevormd en losgelaten van het laadcomplex om verder verplaatst te worden via het

Golgi-apparaat naar het celoppervlak, waar zij T-cellen kunnen ontmoeten.

Vele van de tot nu toe bestudeerde herpesvirussen coderen eiwitten die zich specifiek richten op de MHC klasse I antigeenpresentatie. Het lijkt erop dat deze eiwitten in staat zijn om praktisch iedere stap van de MHC klasse I presentatie te dwarsbomen: van de peptidevorming door proteasomen, de synthese van MHC klasse I moleculen en hun eerste assemblagestappen in het ER, tot het transport van MHC klasse I moleculen naar het celoppervlak. Verschillende herpesvirussen hebben TAP als doel uitgekozen en blokkeren het transport van peptiden door TAP.

Onder de virussen die zich specifiek richten op de MHC klasse I antigeenpresentatie, bevinden zich varicella-zoster virus (VZV), bovine herpesvirus 1 (BHV-1), pseudorabiës virus (PRV) en equine herpesvirus 1 en 4 (EHV-1 en 4). Deze virussen behoren tot het geslacht *Varicellovirus* en het zijn belangrijke ziekteverwekkers voor mensen (VZV veroorzaakt waterpokken) en landbouwhuisdieren (BHV-1 infecteert runderen; PRV varkens en EHV-1 en -4 paarden). De door BHV-1, PRV en EHV-1-bewerkstelligde negatieve beïnvloeding van de celoppervlakte-expressie van MHC klasse I moleculen is het gevolg van virus-specifieke remming van het peptidentransport door TAP. Echter, de virale eiwitten die verantwoordelijk zijn voor deze TAP-remming waren nog onbekend. Het doel van dit promotieonderzoek was om de door BHV-1, PRV en EHV-1-gecodeerde eiwitten die specifiek interfereren met de TAP functie te identificeren en hun werkingsmechanisme op te helderen.

Aan het begin van deze studie was het niet duidelijk of de verminderde MHC klasse I celoppervlakte-expressie die na infectie door BHV-1 wordt waargenomen, het gevolg is van een algemeen dan wel een specifiek mechanisme. Het vhs eiwit, gecodeerd door het UL41 gen dat aanwezig is in alle alphaherpesvirussen die tot nu toe zijn gesequenced, is een tegument eiwit dat de gastheercel binnenkomt als component van een infectieus virion. Na binnenkomst versnelt het vhs eiwit (dat deels van het virion afkomstig is, maar dat ook gedurende de vroege fase van infectie wordt aangemaakt) de afbraak van mRNA, hetgeen bijdraagt tot een algemene vermindering van de eiwitsynthese van de gastheer. Het is aangetoond dat ook gedurende de vroege fasen van een BHV-1 infectie de synthese van gastheereiwitten, waaronder de MHC klasse I moleculen, sterk is verminderd. Deze bevindingen geven aan dat het BHV-1 vhs eiwit een rol speelt bij de negatieve beïnvloeding van de MHC klasse I expressie (**hoofdstuk 2**). Vervolgens is een BHV-1 vhs deletiemutant geconstrueerd en is onderzocht of BHV-1 de MHC klasse I expressie ook op een meer specifieke manier negatief kan beïnvloeden dan alleen door de aanmaak van deze eiwitten te treffen. De resultaten die in dit proefschrift zijn beschreven laten zien dat het vhs eiwit inderdaad verantwoordelijk is voor een deel van het negatieve effect op de MHC klasse I celoppervlakte-expressie. Aan de andere kant vormden de MHC klasse I moleculen die accumuleerden in het ER na infectie met een BHV-1 vhs deletiemutant zich niet tot stabiele MHC klasse I/β2m/peptide complexen. Deze waarneming leidde tot de hypothese dat BHV-1 tevens specifiek het peptidentransport door TAP zou kunnen remmen. Later kon worden aangetoond dat dit inderdaad het geval is en werd het eiwit dat voor dit effect verantwoordelijk is geïdentificeerd.

De studies gericht op de identificatie van een BHV-1 gecodeerde TAP-remmer werden belemmerd door het gebrek aan runderspecifieke immunologische reagentia. Daarom zijn er experimenten uitgevoerd om na te gaan of BHV-1 ook menselijke cellen kan infecteren en kan interfereren met de functie van menselijk TAP. Het is belangwekkend dat een menselijke melanoomcellijn permissief blijkt te zijn voor een BHV-1 infectie. BHV-1 bewerkstelligt de remming van menselijk TAP en heeft een negatief effect op de celoppervlakte-expressie van MHC klasse I moleculen (**hoofdstuk 3**).

Het TAP-remmend eiwit dat wordt gecodeerd door BHV-1 is in dit promotieonderzoek geïdentificeerd en wordt gecodeerd door UL49.5. De karakterisatie van UL49.5 werd mogelijk gemaakt door het feit dat de ontduiking van het immuunsysteem door BHV-1 in menselijke cellen bestudeerd kon worden. De resultaten waarvan verslag wordt gedaan in dit proefschrift tonen een nieuwe ontsnappingsstrategie aan die uiteindelijk leidt tot de inactivatie van TAP. Het UL49.5 eiwit blokkeert TAP door een mechanisme dat zich onderscheidt van mechanismen die door andere virale remmers gebruikt worden. Het effect van BHV-1 UL49.5 op het TAP-complex is opvallend en berust op twee gebeurtenissen: de remming van het peptidentransport door het TAP-complex in een translocatie-ongeschikte staat te fixeren en de destabilisatie van beide TAP subunits door proteasoom-afhankelijke afbraak (**hoofdstuk 4**).

Een interessante bevinding is, dat niet slechts het BHV-1 UL49.5 eiwit, maar ook het UL49.5 genproduct van verscheidene andere varicellovirussen als sterke remmers van TAP fungeren. PRV en EHV-1-gecodeerde UL49.5 homologen zijn eveneens in staat de functie van de TAP te blokkeren. De UL49.5 eiwitten van BHV-1, PRV en EHV-1 zijn relatief homoloog, uitgaande van de overeenkomsten in hun aminozuursequenties en hun structurele organisatie. Het is opmerkelijk dat experimentele gegevens aantonen dat er door deze UL49.5 homologen schijnbaar diverse mechanismen worden gebruikt om TAP te blokkeren. De resultaten beschreven in dit proefschrift classificeren aldus een aantal van de varicellovirus-gecodeerde UL49.5 homologen als leden van een nieuwe familie van TAP-remmende eiwitten (**hoofdstuk 5**).

BHV-1 UL49.5, een type I transmembraan eiwit van slechts 9 kDa, wordt zowel in geïnfecteerde cellen als in virion-enveloppen gevonden, als een monomeer, als een homodimeer en als een heterodimeer geassocieerd met het virale glycoproteïne M (gM). Het is opmerkelijk dat gedurende een natuurlijke infectie met BHV-1, UL49.5 de interacties met gM en het TAP-complex kan combineren. Hoewel de UL49.5/gM associatie in een geïsoleerd systeem kan interfereren met de remming van TAP, is er tijdens een natuurlijke BHV-1 infectie een hoeveelheid van niet aan gM gebonden UL49.5 eiwit aanwezig die voldoende is om deze interferentie te boven te komen. BHV-1UL49.5 remt TAP ondanks de complexvorming met glycoproteïne gM (**hoofdstuk 6**).

Uit de hierboven vermelde resultaten blijkt dat het BHV-1 UL49.5 en de andere door varicellovirussen gecodeerde homologen krachtige immuun-onderdrukkende agentia vertegenwoordigen die in mensen gebruikt zouden kunnen worden om ongewenste reacties van het afweersysteem te onderdrukken. UL49.5 heeft een negatief effect op de menselijke MHC klasse I (HLA klasse I) expressie en remt de activatie van afweercellen via "minor" en "major histocompatibility antigens". UL49.5 blijkt de afweerreactie efficiënter te remmen dan twee andere bekende TAP-remmers, US6 en ICP47. UL49.5 vermindert ook de allo-HLA-activiteit, en beïnvloedt hierbij zowel de peptide-afhankelijke als de peptide-onafhankelijke antigeenpresentatie (**hoofdstuk 7**).

Aan de oppervlakte van cellen die UL49.5 tot expressie brengen verschijnen 'lege' MHC klasse I moleculen die niet met peptiden zijn beladen. Deze kunnen geladen worden met peptiden die van buitenaf aan de cellen worden toegevoegd. De resulterende MHC klasse I-peptide complexen zijn stabiel en kunnen dienen om T cellen met een gewenste specificiteit te activeren.

De remming van TAP door UL49.5 blijkt in tumorcellen de presentatie te bevorderen van een nieuwe categorie van peptiden: T-cel epitopen geassocieerd met verminderde peptide processing (TEIPP). UL49.5 kan worden gebruikt om TEIPP- specifieke T lymfocyten te

induceren die tegen tumorcellen gericht zijn (**hoofdstuk 8**). Hierdoor ontstaat een nieuwe mogelijkheid voor immuuntherapie van kanker. UL49.5 voorziet aldus in een nieuw en krachtig middel om fundamentele aspecten van antigeen-presentatie te bestuderen. UL49.5 biedt ook de mogelijkheid om het peptidenrepertoire dat door MHC klasse I moleculen wordt gepresenteerd te beïnvloeden. De toepassing hiervan bij de behandeling kanker, maar ook bij het voorkomen van afstotingsreacties wordt thans onderzocht.