



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus : infection, pathogenesis, evolution and adaptation

Kazem, S.

Citation

Kazem, S. (2015, June 17). *The trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus : infection, pathogenesis, evolution and adaptation*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/33437>

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/1887/33437>

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

Cover Page



Universiteit Leiden

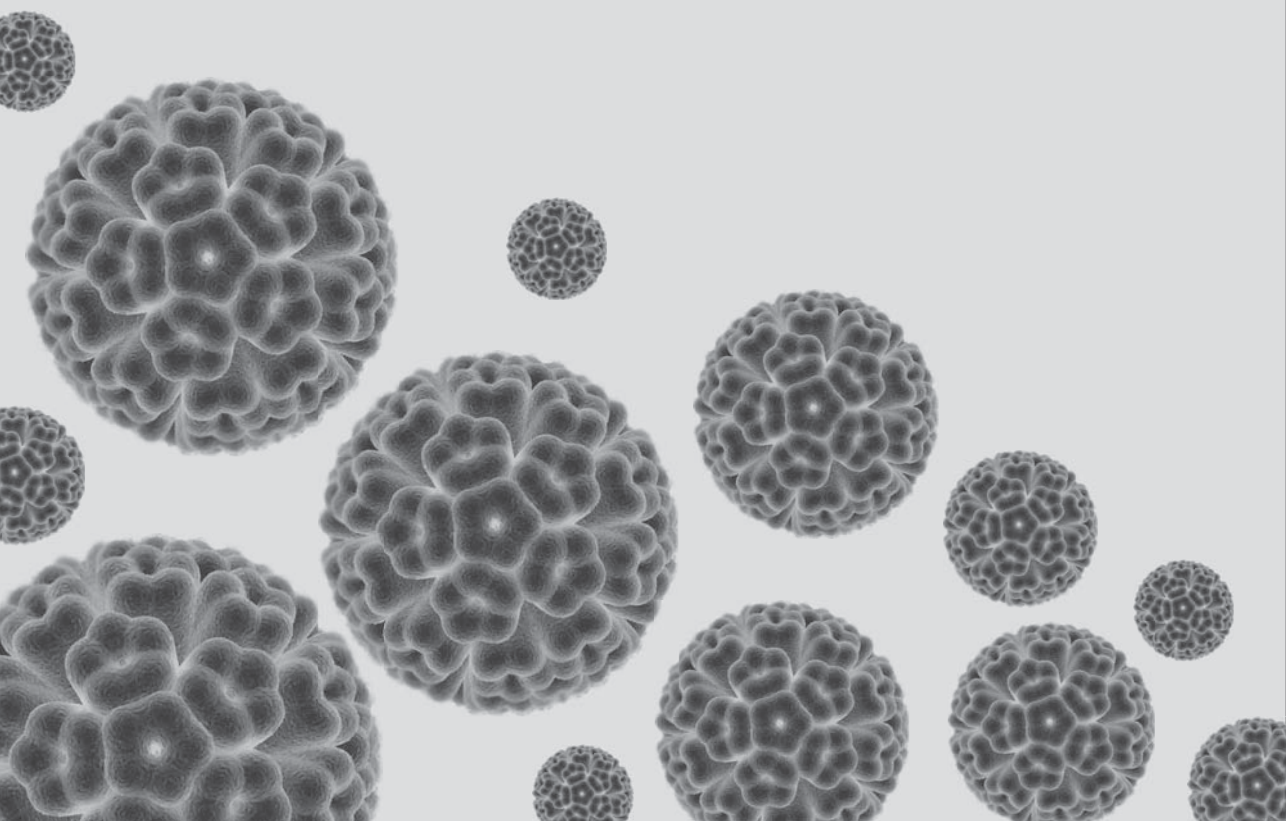


The handle <http://hdl.handle.net/1887/33437> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Kazem, Siamaque

Title: The trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus : infection, pathogenesis, evolution and adaptation

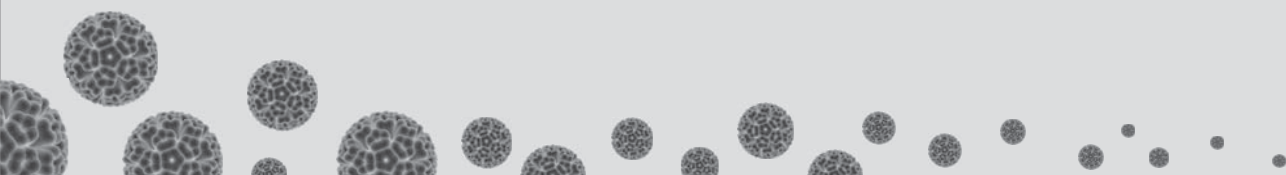
Issue Date: 2015-06-17



Chapter 8

Samenvatting (Dutch)

(Persian/Dari) مختصر



Leden van de *Polyomaviridae* familie, waarvan één ervan ten grondslag lag aan dit doctoraalonderzoek, behoren tot de kleinste virussen en zijn ongeveer 45 nanometer groot. Humane polyomavirussen komen wereldwijd voor. Sinds 2007 zijn er 11 nieuwe soorten ontdekt. Hun erfelijke materiaal bestaat uit DNA¹ dat ongeveer 5000 basenparen² omvat. Dit erfelijke materiaal codeert voor twee soorten eiwitten die te eniger tijd tijdens een infectie tot expressie kunnen komen. De eiwitten die vroeg tijdens een polyomavirus infectie worden aangemaakt, worden tumor (T)-eiwitten genoemd. Hier zijn er drie van: groot (LT), medium (MT) en kleine (ST). Deze eiwitten zijn noodzakelijk voor de levenscyclus van het virus. De eiwitten die later tijdens een infectie worden aangemaakt, zijn de “structurele” virale eiwitten (zoals VP1 en VP2) die de virale eiwitmantel vormen.

Polyomavirussen zijn over het algemeen goedaardige infectieuze virussen waar naar schatting 50-100% van de mensen mee geïnfecteerd is. De eerste twee humane polyomavirussen, die al in 1971 waren ontdekt, zijn JCPyV en BKPyV. Epidemiologische en klinische studies tonen aan dat infecties met deze twee virussen meestal vóór het 4^{de} levensjaar optreden. Hierna kunnen de virussen zich levenslang in het lichaam nestelen en voor aanhoudende infecties zorgen zonder dat er ziekte te constateren valt. Echter, bij transplantatiepatiënten (bij wie het afweersysteem bewust wordt verminderd om afstoting van het getransplanteerde orgaan te voorkomen), bij patiënten met AIDS (bij wie het afweersysteem verzwakt is door het HIV virus), of bij Multiple Sclerose patiënten die worden behandeld met Natalizumab (een afweermodulerend geneesmiddel), kan een reactivatie van BKPyV en JCPyV tot ernstige en soms levensbedreigende complicaties leiden. Dus een goed functionerend afweersysteem is een sterk wapen tegen polyomavirus reactivatie en het ontstaan van ziekte. Hierom worden de polyomavirussen ook wel opportunistisch genoemd.

De recente ontdekkingen van nieuwe humane polyomavirussen hebben ervoor gezorgd dat deze groep van DNA (tumor) virussen en hun potentiële bijdragen aan ziektes bij mensen, meer onder de aandacht is gekomen. In 2008, bijvoorbeeld, werd voor het eerst aangegeven dat MCPyV³ polyomavirus de oorzaak is van de meerderheid van Merkelcelcarcinomen. Merkelcelcarcinomen zijn agressieve huidtumoren die een stijgende incidentie⁴ vertonen als gevolg van bijvoorbeeld veroudering van mensen (bij wie het afweersysteem geleidelijk met de leeftijd is afgezwakt) of door de toegenomen frequentie aan orgaantransplantaties in de ontwikkelde landen. Het virus dat door ons werd ontdekt in 2010 binnen de groep van Dr. Feltkamp, was ook een polyomavirus dat betrekking had op een huidaandoening. Dit virus dat trichodysplasia spinulosa-geassocieerde polyomavirus (TSPyV) werd genoemd, gedraagt zich eveneens goedaardig bij een goed functionerend afweersysteem, maar kan ziekteverschijnselen veroorzaken bij patiënten met een ernstig verzwakt immu-

¹ Desoxyribonucleïnezuur, de blauwdruk voor virale eiwitten, ook wel erfelijk materiaal genoemd

² DNA bestaat uit een combinatie van vier verschillende nucleobasen: Adenine, Thymine, Guanine en Cytosine

³ Een polyomavirus dat kwaadaardige veranderingen van Merkel cellen teweeg brengt

⁴ Het aantal nieuwe gevallen per tijdseenheid, per aantal mensen binnen een bevolking

unsysteem. Deze aandoeningen veroorzaakt door deze twee nieuwe virussen zijn zeer zeldzaam.

In **Hoofdstuk 1** van dit proefschrift, werden de ontwikkelingen in het kader van recentelijk geïdentificeerde humane polyomavirussen samengevat, hetgeen de start betekende voor dit promotieonderzoek naar TSPyV infecties, pathogenese⁵ en virusgastheer aanpassing en virusevolutie⁶. Vervolgens werd er in **Hoofdstuk 2** nader ingegaan op de klinische en virologische eigenschappen van TSPyV, waar ook epidemiologische, diagnostische en therapeutische aspecten van de infectie met TSPyV werden belicht. Kort samengevat, TSPyV is betrokken bij het ontstaan van een zeer zeldzame huidaandoening genaamd trichodysplasia spinulosa (TS). TS is een huidziekte van patiënten met een ernstig verzwakt afweersysteem, bij wie kenmerken van haarfollikel vergroting en harde keratotische huiduitstulpingen (vooral op het gezicht) waarneembaar zijn. Ongeveer 75% van de mensen zijn met TSPyV besmet op jonge leeftijd, maar slechts een heel klein percentage ervan vertoont de symptomen ervan na afweersysteem verzwakking.

In het onderzoek beschreven in **Hoofdstuk 3**, werd geprobeerd om de relatie tussen TSPyV infectie en de huidziekte TS uitvoeriger te beschrijven door een analyse van de aanwezigheid en de hoeveelheid van viraal DNA, en de precieze lokalisatie van TSPyV eiwitten in huidcellen van TS-patiënten. Daartoe is er gebruik gemaakt van gearchiveerde TS laesionale⁷ en niet-laesionale huidbiopten. De verkregen resultaten toonden aan dat het detecteren van viraal DNA een nauw verband laat zien met de ziekte TS, aangezien 100% van de aangedane- en maar 2% van de controle-monsters een positieve testuitkomst boden. Kwantificering van TSPyV DNA liet hoge virale aanwezigheid zien in de laesionale huidbiopten, met enkele miljoenen virale DNA kopieën per cel. Ook de virale deeltjes (geanalyseerd door elektronenmicroscopie⁸) en eiwitexpressie (geanalyseerd door immunofluorescentie⁹) werden slechts in de laesionale huidbiopten aangetroffen, welk beperkt bleven tot bepaalde soort haarfollikel cellen. Beslissend voor dit hoofdstuk is het feit dat de aanwezigheid van veel TSPyV DNA, en de overvloedige expressie van TSPyV eiwit in de getroffen haarfollikel cellen, aantonen dat er een sterke relatie bestaat tussen een actieve TSPyV infectie en het ontstaan van deze ontsierende TS huidziekte.

In voorafgaande onderzoeken door anderen werd gesuggereerd dat in TS laesies de haarfollikel cellen sterke proliferatie¹⁰ vertonen. Conform de mechanismen van andere polyomavirussen, zoals MCPyV die de veroorzaker is van Merkelcelcarcinomen, werd er in **Hoofdstuk 4** verondersteld dat ook TSPyV soortgelijke mechanismen hanteert om proliferatie te stimuleren.

⁵ Bestuderen van ontstaan, ontwikkelen en verloop van een aandoening of ziekte

⁶ De geleidelijke verandering van een soort of populatie door genetische overerving

⁷ Weefsels die kenmerken van ziekte vertonen

⁸ Een vorm van microscopie waarbij tot aan nanometer grootte gevisualiseerd kan worden

⁹ Een methode waarbij virale eiwitten gevisualiseerd kunnen worden met kleurgekoppelde antilichamen

¹⁰ Vermenigvuldiging of deling van cellen

eratie van haarfollikel cellen te induceren. Daarom hebben we TS laesies op verschillende cellulaire markers (zoals Ki-67), die een indicatie kunnen geven van celproliferatie, met behulp van immunofluorescentie onderzocht. Daarnaast hebben we naar de betrokkenheid van het (vermoedelijk) celtransformerende LT eiwit van TSPyV in dit proces gekeken. We toonden aan dat het expressie van TSPyV LT eiwit inderdaad samenkomt met de toegenomen proliferatie markers in haarfollikel cellen, ondanks de toegenomen cellulaire defensie eiwitten die dit proces van proliferatie juist tegen horen te gaan. Kortom, de verkregen resultaten uit dit hoofdstuk suggereren dat er een scenario mogelijk is waarbij TSPyV LT eiwit proliferatie induceert, mogelijk om een populatie van delende cellen te creëren die de vermenigvuldiging van het viraal DNA kan ondersteunen. Door het ontregelen van dit cellulaire proces door dit virus voor zijn eigen belang, ontstaan er bij TS patiënten de vaak waargenomen symptomen.

Een ander doel van dit promotieonderzoek was om meer inzicht te krijgen in virus-gastheer aanpassing en virusevolutie van dit snel groeiende *Polyomaviridae* familie. Daar toe hebben we in **Hoofdstuk 5** het genoom van alle polyomavirussen bij elkaar genomen en deze softwarematig geanalyseerd. Uit ons onderzoek bleek, wat tot dusver onbekend was voor de meeste polyomavirussen, dat het genoom van een grote groep polyomavirussen een extra coderend stuk bevat dat de aanmaak van MT¹¹ (of ALTO) eiwit verzorgt. Expressie van dit eiwit was tot nu toe alleen bekend bij twee knaagdier polyomavirussen. Nu blijkt dus dat dit coderende stuk geconserveerd is in het genoom van tweeëntwintig van de totaal vijfenvijftig polyomavirussen, waaronder twee humane soorten. Uit een modelberekening komt tot uiting dat een deel van dit eiwit hoogstwaarschijnlijk een belangrijke rol speelt (of heeft gespeeld) bij de aanpassing van het virus tot zijn gastheer. Dit nieuwe mechanisme genaamd COCO-VA, zoals beschreven in dit hoofdstuk, zou de aanpassing van deze polyomavirussen tot hun gastheren bevorderen en zou dus een belangrijke rol kunnen spelen in de evolutie van polyomavirussen.

In **Hoofdstuk 6** is er vervolgens onderzoek verricht naar de evolutie van TSPyV. Hier werden de door ons dertien nieuw verkregen TSPyV genomen uit **Hoofdstuk 3** geanalyseerd die afkomstig waren van TS patiënten over de hele wereld en die ongeveer 40% van alle gerapporteerde TS gevallen vertegenwoordigen. Uit onderlinge genoomvergelijkingen bleek dat deze TSPyV genomen een beperkte variatie vertonen. Toch konden we door die minieme variaties het geheel van TSPyV genomen fylogenetisch¹² in drie aparte groepen verdelen. Genoom variaties in eiwitcoderende stukken die voor eiwit veranderingen zouden kunnen zorgen, waren voornamelijk gesitueerd in het gedeelte dat codeert voor MT eiwit. Zoals uit het onderzoek in **Hoofdstuk 5** naar voren kwam, bleek ook in **Hoofdstuk 6** dat het MT eiwit van TSPyV betrokken is bij virusgastheer aanpassing en dat het een belangrijke rol

¹¹ Een eiwit dat tumoren indiceert door bijvoorbeeld groei factoren na te bootsen in experimentele muizen

¹² Een schema dat de evolutionaire geschiedenis of biologische verwantschap weergeeft

zou kunnen spelen in de evolutie van dit virus. Gecombineerde resultaten van beide studies tonen aan dat de evolutie van een groep polyomavirussen, inclusief TSPyV, hoogstwaarschijnlijk het beste te traceren valt via hun MT eiwit.

Tot slot, middels in dit proefschrift beschreven promotieonderzoek, hebben we veel inzichten kunnen verkrijgen met betrekking tot de prevalentie, pathogenese en evolutie van het polyomavirus TSPyV. Eventueel gecombineerd met toekomstige onderzoeken aan dit virus, draagt deze informatie substantieel bij aan ons kennis en begrip over deze ziekteverwekker. Ontdekkingen van nieuwe aanknopingspunten betreffend virusmechanismen die betrekking hebben tot ziekteprocessen, zullen ons in staat stellen om klinische aspecten beter te kunnen begrijpen. Deze aanknopingspunten zouden in latere studies ook gebruikt kunnen worden om antivirale middelen te ontwikkelen ter voorkoming of genezing van polyomavirus geassocieerde ziektes bij mensen.

¹³ Aantal infectiegevallen op een specifiek moment in een specifiek populatie

مختصر تیز دکترا برای مطالعه خوانندگان غیر علوم طبی

اعضای فامیل پولیوماویریدی (*Polyomaviridae*), که یکی از آنها در بنا و اساس این تحقیق تیز دکترا بوده, و عبارت از کوچکترین ویروسها هستند که اندازه آنها 45 نانومتر (nanometer) میباشد. ویروس های پولیوما در سراسر جهان موجود است و از آغاز سال 2007 به بعد 11 نوع آنان کشف گردیده اند. مواد ژنتیک این ویروسها DNA است که در حدود 5000 جوره اسیدی میباشد. این مواد ژنتیک دو نوع پروتئین را تدوین میکند که ممکن است در هر زمان بعد از ابتلا توضیح گردد. پروتئین های که بعد از ابتلا اولی بوجود میآیند, عبارت اند از تومور کوچک (ST), تومور متوسط (MT) و تومور بزرگ (LT) که مجموع این پروتئین ها در دوام زندگی این ویروس ضروری هستند. در زمان بعدی ابتلا, پروتئین های بوجود میآیند که پوش ساختاری ویروس را تشکیل خواهند داد و عبارت اند از VP1, VP2 و VP3.

ویروسهای پولیوما به طور کلی ویروسهای عفونی سلیم هستند و در زمان مطالعه سیرولوژیک در 75% تا 100% افراد ابتلای آن دیده میشوند. دو پولیوما ویروسهای انسانی, که در سال 1971 کشف گردیدند, عبارت اند از BKPyV و JCPyV. مطالعات بالینی اپیدمیولوژیک نشان میدهد که ابتلا با این دو ویروس معمولاً قبل از سن چهار سالگی رخ میدهد. بعد از ابتلا, این ویروسها میتوانند در تمام عمر خود را در بدن انسان نگهدارند و باعث ابتلای مداوم شوند, بدون آنکه مستقیماً باعث بیماری گردند. با این حال, در بیماران ترانسپلانت شده عضوی (که سیستم معافیت بدن آنان به منظور جلوگیری از رد ترانسپلانت شده عضوی کاهش می یابد), در بیماران مبتلا به AIDS (که در آنها سیستم معافیت بدن توسط ویروس HIV ضعیف گردیده), و یا در بیماران مولتیپل اسکلروزیس تحت تداوی با دوی Natalizumab (که این یک دوا برای تضعیف سیستم معافیت بدن است), فعال شدن مجدد BKPyV یا JCPyV ویروسها می توانند باعث عوارض جدی و گاهی تهدید کننده حیات شوند. بنابراین درستی عملکرد سیستم معافیت بدن یک سلاح قوی در برابر فعال شدن مجدد این ویروسها است که پیشگیری از شروع بیماری میکنند.

اکتشافات اخیر از ویروسهای پولیوما انسانی نشان داده شد که این گروه از ویروسهای توموری و توانایی های بالقوه آنان به منظور بیماری در انسان, باز هم مورد توجه تحقیقی بیشتر قرار گیرند. به طور مثال, در سال 2008 برای اولین بار نشان داده شد که ویروس پولیوما به نام MCPyV علت اکثر سرطانهای Merkel-cell-carcinoma است. این سرطانهای تهاجمی باعث بیماریهای جلدی هستند که به طور مثال بنا به پیشرفت سن انسانها (در انهای که سیستم معافیتی بدن شان ضعیف شده),

و یا به دلیل ترانسپلانت شده عضوی که باز هم سیستم معافیتی بدن ضعیف میشود. یک ویروس پولیومای دیگر که در سال 2010 کشف گردیده است در تحقیقات گروه مان بود (گروه دکتر Feltkamp) که ارتباط آن با یک بیماری جلدی دیگر میباشد. این ویروس که TSPyV نامیده میشود، نیز خاصیت عفونی سلیم دارد. چنانچه سیستم معافیتی بدن انسان به شدت ضعیف گردد، که باعث نشانه بیماری میشود. به هر حال، این بیماری های ناشی از این دو ویروس تازه کشف شده در تمام جهان بسیار نادر هستند.

در **فصل 1** این پایان نامه، اکتشاف مختصر در زمینه ویروسهای پولیومای تازه کشف شده انسانی بود که، آغاز این تحقیق دکتر در مورد عفونت، اسبب شناسی، سازگاری و تکامل ویروسی TSPyV گردید. پس از آن فصل، در **فصل 2** بحث در مورد ویژگی های کلینیک و ویروسی در مورد TSPyV و همچنین اپیدمیولوژی، تشخیص و تداوی عفونت این ویروس تعیین گردید. به طور مختصر از این دو فصل، TSPyV در تشکل یک بیماری بسیار نادر جلدی به نام Trichodysplasia-spinulosa (TS) به دست می آید. مانند یاد داشت قبل، TS یک بیماری جلدی افراد که سیستم معافیت بدن آنان به شدت تضعیف گردیده است، که آنها ویژگی های بزرگ شدن فولیکول و تفرن سخت مو (خصوصاً در صورت) را دارد. هنگامیکه DNA این ویروس مشاهده و اندازه گردید، معلوم شد که این ویروس در افراد سالم بسیار نادر است. اما زمانی که سرولوژی مورد بررسی قرار گرفت، معلوم شد که حدود 75٪ مردم از سن طفولیت به این ویروس مبتلا بوده اند.

در مطالعه که شرح داده شد در **فصل 3** این پایان نامه، تلاش گردید که رابطه عفونت با TSPyV و بیماری های جلدی TS توصیف گردد. این توصیف از طریق تجزیه و تحلیل موجودیت و مقدار DNA و محل دقیق پروتئین ویروسی در سلولهای جلدی ماوف TS بود. نتایجی به دست آمده این تحلیل نشان داد که تشخیص DNA ویروسی در 100٪ از نمونه مریضی TS و 2٪ از نمونه شاهد سالم، نتیجه مثبت داشتند. اندازه گیری مقدار موجودیت DNA این ویروس در نمونه مریضی TS نتیجتاً نشان داد که DNA ویروسی با چند میلیون دفعه در هر سلول یافت میشوند. همچنین، اعداد ویروسی (که توسط میکروسکوپ الکترونیک تحلیل و شناخته شده) و توصیف پروتئین ویروسی (که توسط تکنیک فلورسانس تحلیل و شناخته شده) تنها در بیوپسی جلدی TS دیده شدند که محدود به گونه های خاص سلولهای فولیکول مو بودند. برای **فصل 3** این واقعیتها قطعی استند که رابطه بسیار قوی بین عفونت به TSPyV و شروع این بیماری TS به شکل جلدی وجود دارد.

در مطالعات قبلی توسط بعضی ها پیشنهاد شد که در بیوپسی جلدی TS سلولهای فولیکولی مو تکثر قوی را نشان دهند. بنابراین به عنوان مکانیسم پولیوما ویروسهای دیگر، و به عنوان MCPyV

که علت است به Merkel-cell-carcinoma, همچنین در فصل 4 این پایان نامه در نظر گرفته شد که TSPyV با استفاده از مکانیسم مشابه، تکثیر سلولهای فولیکول مو تسریع میابد. به این دلیل ما بیوپسی جلدی TS را در شناخت پروتئینهای مختلف سلولی (مانند Ki-67) که ممکن است معلومات از تکثیر سلولها دهند. علاوه براین، ما باید دخالت پروتئین LT از TSPyV را در دوام این نقیصه سلولی تحلیل نمایم. ما توصیفاً یادآور شدیم که تعبیر این پروتئین LT در واقع افزایش یافته است و محلی با توصیف پروتئینهای مختلف سلولی در سلولهای فولیکول مو بود. این دوام را افزایش پروتئینی دفاع سلولی نمیتواند جلوگیری کند. به طور خلاصه، نتایج به دست آمده از این فصل نشان میدهد که ممکن است یک سناریوی که در آن موجودیت پروتئین LT از TSPyV باعث تکثیر سلولی میشود، که مجموعه این سلولها امکانات را برای تکثیر DNA ویروسی قادر بسازند. پس از ایجاد اختلال در دورنمای سلولی توسط این ویروس برای منافع خود، علائم TS در بیماران مشاهده میشوند.

هدف دیگر این تحقیق دکترا به دست آوردن دانش بیشتر در مورد تطابق تکامل اعضای فامیل پولیوماویریدی با انسان و حیوانات بود. برای این منظور، در فصل 5، ما مجموعه تمام ژنوم پولیوما ویروسها را توسط کامپیوتر تجزیه و تحلیل کردیم. چیزی که ناشناخته بود برای اکثر پولیوما ویروسها، در تحقیقات ما نشان داده شد که ژنوم یک گروه بزرگی از این ویروسها یک ژن زیادتر دارند که پروتئین MT یا ALTO را تدوین میکند. موجودیت پروتئین MT تا کنون تنها به دو ویروس حیوانات چونده شناخته شده بود. در حال حاضر، از تحقیق ما بر می آید که این ژن MT از مجموع 55 پولیوما ویروسها در ژنوم 22 آنها و از جمله در دو ویروس انسانی حفظ شده است. ضمن محاسبه طراحی کامپیوتری درک شد که یک بخشی این پروتئین MT بسیار احتمال دارد که در توافق ویروس با انسان یا حیوان نقش مهمی بازی کند. این مکانیزم جدید را که ما کشف کرده ایم به نام CoCo-VA یاد میکنیم. در نهایت، این مکانیسم میتواند در ترویج تکاملی پولیوما ویروس نقش مهمی را بازی کند.

در فصل 6 این پایان نامه، تحقیقات تنها در مورد مطالعه تکامل ویروس TSPyV بود. در این فصل، ما سیزده ژنومی جدید را به دست آوردیم که تجزیه و تحلیل شدند، و آینده به 40٪ از تمام موارد گزارش شده بیماران مبتلا به TS خواهند بود که از سراسر جهان میباشند. مقایسه متقابل نشان داد که ژنوم این TSPyV ویروس تنوع محدود را نشان می دهند. در عین حال، ما توانستیم که توسط این تغییرات حداقل تمامیت مواد ژنتیک TSPyV را به سه گروه تکامل نژادی مجزا تقسیم کنیم. تنوع ژنوم در مناطق تدوین گذاری پروتئین که به تغییراتی پروتئینی بتوانند نتیجه بدهند، به طور عمده در بخش پروتئین MT یا ALTO بودند. همانطور که در مطالعه فصل 5 درک شد، همچنین در مطالعه

فصل 6 به این نتیجه رسیدیم که MT از TSPyV مربوط به انطباق ویروس با انسان میباشد و بنابراین نقش مهمی در تکامل این ویروس دارد. نتایج ترکیبی از هر دو مطالعه نشان میدهند که تکامل گروه ویروسهای پولیوما، از جمله TSPyV، احتمالاً از طریق پروتئین MT ردیابی شوند.

نهایتاً، از طریق تیز دکترا که در این پایان نامه شرح داده شد، ما توانستیم در مورد شیوع، آسیب شناسی و تکاملی ژنتیک ویروس TSPyV بینش زیاد به دست آوریم. همراه با مطالعات آینده در مورد این ویروس، این اطلاعات قابل ملاحظه باعث درک ما در باره این پتوزن میشود. اکتشافات نوآوری جدید در نقاط وصل مکانیسم ویروسی که مربوط به دورنما های بیماری هستند، ما را قادر به درک جنبه های کلینیکی بهتر خواهد ساخت. این نقاط وصل مکانیک ویروسی، همچنان میتوانند در تحقیقات علمی آینده مورد استفاده قرار گیرند که به منظور توسعه ادویه ضد ویروسهای پولیوما برای وقایه یا درمان بیماری باشند.