



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Downregulation of MHC class I molecules by human cytomegalovirus-encoded US2 and US11

Barel, M.T.

Citation

Barel, M. T. (2005, October 27). *Downregulation of MHC class I molecules by human cytomegalovirus-encoded US2 and US11*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4294>

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/1887/4294>

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

Nederlandse samenvatting

Het menselijk lichaam wordt voortdurend blootgesteld aan allerlei virussen. Er bestaan meerdere afweermechanismen die bescherming kunnen bieden tegen ongewenste indringers. De eerste afweerlinie wordt gevormd door barrières als huid, slijmvliezen en een zure omgeving (zoals in de maag). Als virusdeeltjes de gastheer toch weten binnen te dringen, treden meer geavanceerde afweermechanismen in werking die de detectie en eliminatie van het virus proberen te bewerkstelligen.

Een virus kan zichzelf niet vermenigvuldigen en is afhankelijk van zijn gastheer voor de productie van nageslacht. Het zal een gastheer cel moeten binnendringen om daar nieuwe virusdeeltjes te laten maken. Voordat een virusdeeltje een cel heeft geïnfecteerd, kan het echter worden ontdekt door een specifieke tak van het immuunsysteem, namelijk B cellen. Deze B cellen produceren antilichamen die structuren aan de buitenkant van het virus kunnen herkennen. Door aan het virusdeeltje te binden kunnen antilichamen het virus markeren om te worden opgeruimd door het immuunsysteem. De antilichaamproducerende B cellen ontwikkelen ook een geheugen zodat ze bij een volgende ontmoeting met een zelfde virus sneller kunnen reageren.

Als een virusdeeltje toch een cel is binnengedrongen, komt een nieuwe tak van het immuunsysteem in werking, namelijk de T cellen. Deze afweercellen kunnen lichaamsvreemde structuren (antigenen) aan de buitenkant van een geïnfecteerde cel detecteren. Geïnfecteerde cellen dragen kleine fragmentjes van het virus op het celoppervlak. Deze antigenen liggen ingebed in moleculen die worden gecodeerd door het zogeheten Major Histocompatibility Complex (MHC).

MHC moleculen zijn onder te verdelen in twee klassen, die elk op verschillende celtypen voorkomen en ook gebruik maken van andere bronnen voor hun antigeen-fragmenten. MHC klasse I moleculen zijn op nagenoeg alle celtypen te vinden en presenteren over het algemeen fragmenten van eiwitten die in de eigen cel zijn gemaakt. MHC klasse II moleculen komen alleen voor op speciale antigeenpresenterende celtypen (B-cellen, macrofagen en dendritische cellen) en binden voornamelijk fragmenten die van buitenaf zijn opgenomen.

Cytotoxische T cellen kunnen de lichaamsvreemde virus fragmentjes ontdekken op MHC klasse I

moleculen van geïnfecteerde cellen en vervolgens overgaan tot de aanval om deze cellen te doden. Zij doen dit met hulp van een andere categorie T cellen, zogenaamde helper T cellen, die gespecialiseerd zijn in de herkenning van antigenen op MHC klasse II moleculen. Als de aanwezigheid van een virus op deze manier is gedetecteerd en de geïnfecteerde cellen zijn opgeruimd, wordt daarmee gelijk de productie van nieuwe virusdeeltjes stop gezet.

Het virus waarover dit proefschrift gaat, is het humane cytomegalovirus (HCMV). Een groot deel van de wereldbevolking is met dit virus geïnfecteerd. Het vormt geen bedreiging voor gezonde mensen, maar mensen met een onderontwikkeld of verzwakt immuunsysteem (oa. AIDS patiënten of mensen die een transplantatie hebben ondergaan en immuniteit-onderdrukkende middelen krijgen toegediend) kunnen er ernstig ziek van worden en er zelfs door overlijden. Het humaan cytomegalovirus kan ook aangeboren afwijkingen veroorzaken als een moeder tijdens de zwangerschap voor het eerst een infectie met het virus oploopt. Zelfs een goedwerkend immuunsysteem is niet in staat het virus te elimineren, waardoor de gastheer de rest van het leven drager blijft van dit virus. Het virus verkeert overigens het merendeel van de tijd slechts in een soort sluimertoestand (latente infectie) en wordt maar nu en dan actief.

Tijdens de actieve infectiefase gebruikt het virus een aantal mechanismen waarmee het tracht te ontkomen aan detectie door het immuunsysteem van zijn gastheer. Het zorgt er onder andere voor dat er in geïnfecteerde cellen virale eiwitten worden aangemaakt die verhinderen dat MHC klasse I moleculen virusfragmentjes naar het celoppervlak kunnen brengen. Tijdens hun inspectieronde zullen T cellen op deze manier niet door hebben dat er een virus in de cel aanwezig is en de cel met rust laten. Echter, cellen die helemaal geen MHC klasse I moleculen meer op hun celoppervlak hebben zijn ook verdacht. Zogeheten Natural Killer (NK) cellen kunnen zo'n cel alsnog doden.

Er zijn meerdere soorten MHC klasse I moleculen, waaronder HLA-A, -B, -C, -E, en -G. Van HLA-A, -B en -C kunnen vele varianten voorkomen in de populatie, terwijl HLA-G en -E moleculen in bijna ieder individu hetzelfde zijn. De HLA-A, -B, -C, -E, en -G subgroepen verschillen ook in de mate waarin, en het

celtype waarop ze voorkomen, evenals in hun vermogen om een (grote) variatie aan antigeen fragmentjes te presenteren. Met name de HLA-A en -B moleculen zijn belangrijk voor de presentatie van lichaamsvreemde antigenen aan T cellen. De andere HLA moleculen zijn tot op zekere hoogte ook in staat om antigenen te presenteren, maar spelen vermoedelijk een belangrijkere rol bij het in toom houden van de NK cellen.

Nagenoeg alle cellen hebben HLA-A, -B, -C, en -E moleculen op hun celoppervlak. HLA-G komt voornamelijk voor op cellen gelegen op het grensvlak tussen moeder en foetus, in de placenta. Op deze cellen bevinden zich naast HLA-G ook HLA-C en -E, maar geen HLA-A of -B moleculen. Aangezien de HLA-A en -B moleculen in de foetale cellen voor een deel anders zullen zijn dan die van de moeder, kan hun afwezigheid hier beschermen tegen eventuele aanvallen van maternale immuuncellen.

Voordat een MHC klasse I molecuul zich vanaf het celoppervlak kan presenteren aan immuuncellen, is er eerst nog een heel assemblage- en keuringsproces aan voorafgegaan. In de celvloeistof (het cytosol) ligt een netwerk van membranen, het endoplasmatisch reticulum (ER), dat betrokken is bij de bouw en het transport van eiwitten. Nieuwe MHC klasse I moleculen worden vanuit het cytosol in het ER aangeleverd in een soort bouw pakket bestaande uit drie losse onderdelen. Het grootste onderdeel (de zware keten, HLA- α) zit in het membraan verankerd, met een klein staartje in het cytosol en met een groter gedeelte in het ER. Aan dit ER-deel wordt allereerst een lichte keten (β_2m) bevestigd en vervolgens een antigeen fragment (peptide). Deze assemblage wordt ondersteund door verschillende chaperonne-eiwitten die ervoor zorgen dat de verschillende losse onderdelen de juiste conformatie kunnen aannemen en nauwkeurig in elkaar passen. Daarnaast vinden er ook kwaliteitscontroles plaats. Misvormde en ongeassembleerde MHC klasse I moleculen worden eruit gepikt en vernietigd in het cytosol. Alleen 'goedgekeurde' MHC klasse I moleculen worden uiteindelijk op transport gezet naar het celoppervlak.

De studies in dit proefschrift zijn gericht op de eiwitten US2 en US11, die tijdens een infectie met humaan cytomegalovirus worden gemaakt. Deze twee virus-eiwitten bevinden zich in het endoplasmatisch reticulum en binden daar aan nieuw aangemaakte MHC klasse I moleculen. US2 en US11 zorgen ervoor dat deze MHC moleculen voor vernietiging naar het cytosol worden gedirigeerd.

In **Hoofdstukken 2, 3 en 4** van dit proefschrift is beschreven welke typen HLA moleculen doelwit zijn van de acties van US2 en US11. Hiervoor is gekeken naar het effect van deze virale eiwitten op een aantal afzonderlijke MHC klasse I moleculen. De resultaten laten zien dat er veel minder HLA-A2, HLA-B27 en HLA-G moleculen op het celoppervlak voorkomen in US2-positieve cellen, terwijl het aantal HLA-B7, HLA-Cw3 en HLA-E moleculen gelijk blijft. In aanwezigheid van US11 daarentegen, is er geen effect te zien op HLA-G of HLA-E, maar worden er veel minder HLA-B moleculen (B7 en B27) en HLA-Cw3 en HLA-A2 moleculen op het celoppervlak gevonden. Deze studies geven aan dat US2 en US11 ieder een verschillend pakket van MHC klasse I moleculen als doelwit hebben. Ook is duidelijk geworden dat een deel van de MHC klasse I moleculen aan de acties van US2 en US11 kunnen ontsnappen. Dit laatste zou wel eens voordelig kunnen zijn voor het virus, omdat het hierdoor ook een aanval van Natural Killer cellen kan voorkomen.

Van HLA-G en HLA-E zijn heel weinig varianten te vinden in de populatie, van HLA-C redelijk veel en van HLA-A en HLA-B nog veel meer. Een ander doel van de experimenten was erop gericht een indruk te krijgen hoe representatief de geteste HLA moleculen nu eigenlijk zijn voor hun subgroep. Om voorspellingen te kunnen doen over de gevoeligheid van andere HLA moleculen voor US2 en US11, is het belangrijk om meer te weten over de interactie van deze virale eiwitten met hun doelwit. Daarom is er gekeken welke domeinen van MHC klasse I moleculen precies betrokken zijn bij herkenning door US2 en US11. Voor dit doel is een hele serie MHC klasse I moleculen gemaakt waarin telkens een ander domein is uitgewisseld tussen US2 of US11-gevoelige en ongevoelige MHC klasse I moleculen. Naast deze zogenaamde MHC klasse I chimereën zijn er nog een aantal mutanten gemaakt waarin slechts enkele bouwstenen (aminozuurresiduen) zijn veranderd.

De resultaten beschreven in **Hoofdstuk 2 en 4** laten duidelijk zien dat de cytoplasmatische staart van MHC klasse I bepalend kan zijn voor de gevoeligheid voor US11. Veranderingen in de staarten van de ongevoelige HLA-G en HLA-E moleculen zijn genoeg om ze volledig gevoelig te maken voor US11. De aanwezigheid of afwezigheid van een paar specifieke bouwstenen maakt hier een enorm verschil. Bij andere HLA-subgroepen levert dit een minder duidelijk beeld op. Zo blijkt uit proeven met HLA-A2-mutanten dat de samenstelling van de staart wel effect heeft op de

mate waarin de mutanten gevoelig zijn voor US11, maar dat dit niet de enige bepalende factor is voor deze gevoeligheid. Afhankelijk van de bouwsteen-samenstelling kunnen de in het ER gelegen domeinen van de zware ketens ook interacties met US11 aangaan. Welke individuele bouwstenen hierbij betrokken zijn moet nog nader worden bepaald.

Van US2 is er een kristalstructuur bekend, die in belangrijke mate laat zien hoe US2 een interactie aangaat met HLA-A2. Voor deze kristalstructuur is echter gebruik gemaakt van onvolledige versies van US2 en HLA-A2, die geen informatie bieden over eventuele interacties tussen de membraan-verankerde, of in het cytosol gelegen onderdelen van deze eiwitten. Om een goede indruk te krijgen welke domeinen in de zware ketens van klasse I moleculen bepalend zijn voor de effectiviteit van US2, is onderzocht of de staart- en membraandomeinen ook een bijdrage leveren.

Van HLA-G bestaat een variant waarin de transmembraan- en cytoplasmatische domeinen ontbreken. Deze oplosbare vorm van HLA-G wordt uiteindelijk door de cellen uitgescheiden. De resultaten in **Hoofdstuk 3** laten zien dat US2 deze HLA-G variant, in tegenstelling tot de membraan-gebonden vorm van HLA-G, niet kan afbreken. Naast de in het ER gelegen delen van de zware keten zijn er dus duidelijk ook andere domeinen essentieel voor een US2-gemedieerde afbraak. Maar zijn deze domeinen dan ook verantwoordelijk voor onderlinge verschillen in de mate waarin US2 de migratie van zware ketens naar het celoppervlak kan verhinderen? De studies in **Hoofdstuk 3 en 4** met verschillende MHC klasse I chimereën duiden erop dat dit niet het geval is: alleen de bouwsteensamenstelling van de in het ER gelegen delen van de zware ketens zijn uiteindelijk bepalend voor de mate waarin hun expressie op het celoppervlak door US2 wordt verhinderd.

De volgende stap was om te kijken of de gebieden die in HLA-A2 belangrijk zijn voor de interactie met US2, ook een rol spelen bij de selectie van andere HLA-typen die onder invloed van US2 kunnen worden afgebroken. Als de aminozuursequenties van diverse klasse I moleculen naast elkaar worden gelegd valt op dat er inderdaad verschillende residuen op deze posities kunnen voorkomen. Door precies deze aminozuren te veranderen in de US2-ongevoelige HLA-B7 en HLA-E moleculen, kon er met het in **Hoofdstuk 4** beschreven onderzoek worden aan-

getoond, dat een verandering van slechts 1-4 residuen al een enorme invloed heeft op de oppervlakte-expressie van deze HLA moleculen in US2-positieve cellen. Op basis van gegevens uit een databank met MHC klasse I sequenties (bouwtekeningen) kan er zo voor een groot deel van hen voorspeld worden of ze gevoelig zullen zijn voor US2.

In aanwezigheid van US2 of US11 worden MHC klasse I moleculen uit het ER membraan verwijderd en in het cytosol afgebroken. Het is nog steeds onduidelijk hoe dit proces verloopt. Het is wel bekend dat eiwitten die afgebroken dienen te worden eerst een soort etiket (ubiquitine) opgeplakt krijgen. Eiwitten die met een keten van deze ubiquitine moleculen zijn uitgerust worden vervolgens herkend door de eiwit-afbraakmachinerie in de cel, het proteasoom. In **Hoofdstuk 5** is beschreven in welke mate ubiquitineren een rol speelt bij het naar het cytosol transporteren van MHC klasse I moleculen in cellen waarin US11 actief is. De resultaten laten zien dat er in cellen met een defect 'etiketterapparaat' geen transport van MHC klasse I moleculen uit het ER naar het cytosol plaats vindt. Ubiquitineren is dus erg belangrijk voor een goed verloop van het door US11 gemedieerde afbraakproces van MHC klasse I moleculen.

Het is onwaarschijnlijk dat US2 en US11 volledig zelfstandig te werk gaan; het is aannemelijker dat ze voor een belangrijk deel gebruik maken van bestaande cellulaire systemen. Zoals eerder vermeld worden MHC klasse I moleculen die niet aan de kwaliteitseisen voldoen ook de afbraakroute ingestuurd (bijvoorbeeld omdat de assemblage met de lichte keten of antigeen fragmenten niet goed verloopt). Vernietiging van de MHC moleculen vindt in dit geval pas na een half uur tot een uur plaats, terwijl dit in cellen met US2 of US11 al binnen enkele minuten gebeurt.

Het is bekend welke chaperonne eiwitten de specifieke stappen van het assemblage proces van MHC klasse I faciliteren en het lijkt erop dat sommige van hen ook betrokken zijn bij de afbraak van deze moleculen. Om meer inzicht te krijgen in de manier waarop US2 en US11 te werk gaan, is onderzocht op welk moment US2 en US11 precies aangrijpen in dit assemblageproces. Voor dit in **Hoofdstuk 6** beschreven onderzoek is gebruik gemaakt van een cellijn waarin de lichte keten ontbreekt. Zonder deze lichte keten stopt het assemblage proces al in een vroeg stadium. De resultaten laten zien dat de virale eiwitten de zware ketens zowel in aan- als afwezigheid van de lichte keten prima kunnen laten

afbreken. De virale eiwitten kunnen dus in een heel vroeg stadium van het assemblage proces aangrijpen, op een moment waarop de chaperonne-eiwitten BiP, calnexin en Erp57 nog bij het assemblageproces zijn betrokken.

Een interessante bevinding werd gedaan toen de proeven werden uitgevoerd in aanwezigheid van een stof die het proteasoom (de al eerder genoemde afbraakmachine in het cytosol) blokkeert. Onder deze omstandigheden slaagt US11 er nauwelijks meer in om de zware ketens naar het cytosol te krijgen in de cellen zonder lichte ketens. Er is echter geen probleem als de lichte ketens normaal aanwezig zijn. US2 heeft onder geen van deze omstandigheden problemen om de afbraak van MHC klasse I moleculen in gang te zetten.

De transportroute naar het cytosol wordt ook geremd als de proteasomen geblokkeerd worden in de cellen waarin de vrije zware ketens op US2 / US11-onafhankelijke wijze worden afgebroken, bijvoorbeeld omdat zij niet aan de kwaliteitseisen voldoen doordat de lichte keten ontbreekt. Deze resultaten geven aan dat de zware ketens in US2- en US11-positieve cellen op verschillende manieren naar de proteasomen worden gevoerd. Tevens lijkt er een overlap te bestaan in de route die gewoonlijk doorlopen wordt door afgekeurde MHC klasse I ketens en de route die door US11 in gang wordt gezet.

Al met al hebben de studies in dit proefschrift bijgedragen tot een beter inzicht in het type HLA moleculen dat onder invloed van US2 en US11 worden afgebroken, wat belangrijk is voor een juiste interpretatie van de effecten op de functie van T cellen en NK cellen. Daarnaast hebben de studies meer informatie verschaft over de mechanismen die door US2 en US11 gebruikt worden om klasse I moleculen vanuit het ER naar het cytosol te dirigeren, waar zij vervolgens worden afgebroken.