



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Unmasking the masters of evasion : TAP inhibition by varicellovirus UL49.5 proteins

Verweij, M.C.

Citation

Verweij, M. C. (2010, September 29). *Unmasking the masters of evasion : TAP inhibition by varicellovirus UL49.5 proteins*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/15995>

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/1887/15995>

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

Nederlandse samenvatting

List of publications

Curriculum vitae



Nederlandse samenvatting

Het grootste gedeelte van de wereldbevolking is besmet met één of meer herpesvirussen. In Nederland zijn waterpokken, gordelroos, de ziekte van Pfeiffer en de koortslip veel voorkomende herpesvirusgerelateerde aandoeningen. Herpesvirusinfecties zijn voor het leven: eenmaal besmet kom je er nooit meer vanaf. Dit is het resultaat van de intrigerende levenscyclus van deze virussen. Na infectie vermenigvuldigen herpesvirussen zich en verspreiden ze zich door het lichaam. Deze periode kan gepaard gaan met een duidelijk ziektebeeld, zoals waterpokken bij een varicella-zoster virus-infectie. Onder druk van het immuunsysteem van de gastheer zal het herpesvirus uiteindelijk een latente fase in gaan. In deze fase nestelt het herpesvirus zich in een cel zonder nieuwe virusdeeltjes te maken. Het virus zit als het ware verstopt voor het immuunsysteem. Als de weerstand van de gastheer verzwakt, bijvoorbeeld door stress of ziekte, kan een herpesvirus uit zijn latente fase ontwaken en opnieuw actief virusdeeltjes gaan produceren. Reactivatie van bijvoorbeeld het varicella-zoster virus kan dan gordelroos veroorzaken. Een voorbeeld van een regelmatig reacterend herpesvirus is het herpes simplex virus dat een koortslip kan veroorzaken, wanneer de gastheer een verminderde weerstand heeft.

De immunrespons van de gastheer die het virus in toom houdt wordt opgewekt door peptiden die gepresenteerd worden door zogenaamde MHC klasse I moleculen op het oppervlak van de geïnfecteerde cel. Deze moleculen zijn een soort boodschappers die de 'buitenwereld' informeren over wat er binnenin de cel gebeurt. Dit doen ze door stukjes van eiwitten (peptiden) te presenteren aan cytotoxische T-cellen. Als deze cellen iets vreemds ontdekken, bijvoorbeeld peptiden van virussen, dan initiëren zij een cascade die uiteindelijk leidt tot de dood van de geïnfecteerde cel, zodat de ontdekte indringer zich niet verder kan vermenigvuldigen.

Als antwoord hierop hebben herpesvirussen trucjes ontwikkeld om het immuunsysteem om de tuin te leiden. Tijdens de latente fase worden geen nieuwe virusdeeltjes geproduceerd, waardoor er vrijwel geen peptiden zijn die door de MHC klasse I moleculen gepresenteerd kunnen worden. Slecht één of enkele eiwitten die nodig zijn om de latentie in stand te houden worden in deze fase gemaakt, deze eiwitten beschikken echter over eigenschappen die ze onzichtbaar maken voor het immuunsysteem. T-cellen zullen dus de aanwezigheid van virussen in de geïnfecteerde cel niet kunnen opmerken. Echter, als een virus reactiveert zal het bouwstenen gaan maken voor nieuwe virusdeeltjes. Om presentatie van stukjes viruseiwit door MHC klasse I moleculen te voorkomen en daarmee ook activatie van het immuunsysteem, produceert het virus eiwitten die deze presentatie opzettelijk tegenwerken. Dit proefschrift gaat over één van deze zogenaamde immuunevasie-eiwitten, te weten UL49.5.

Cellen die geïnfecteerd zijn met varicellovirussen, een subgroep binnen de herpesvirussen, laten allemaal een reductie in de MHC klasse I expressie op het

celoppervlak zien. Het onderzoek naar de oorzaak van deze verminderde expressie is begonnen in het koeienherpesvirus genaamd boviene herpesvirus 1. Er is gekozen voor dit virus als model voor varicellovirussen omdat het gemakkelijk te kweken is en het erg efficiënt cellen infecteert. In cellen geïnfecteerd met boviene herpesvirus 1 zijn inderdaad aanzienlijk minder MHC klasse I moleculen aanwezig op het celoppervlak. MHC klasse I moleculen worden normaliter met peptiden beladen in een speciaal cellichaampje, het endoplasmatisch reticulum, waarna ze naar het celoppervlak worden vervoerd. Het beladen van MHC klasse I moleculen wordt bewerkstelligd door een eiwitcomplex met onder andere de transporter geassocieerd met antigeen presentatie (TAP) en tapasin. TAP bestaat uit twee bijna identieke eiwitten die samen een porie vormen waardoor de virale peptiden het endoplasmatisch reticulum in getransporteerd worden. Vervolgens begeleiden TAP en tapasin het laden van deze peptiden op de wachtende MHC klasse I moleculen. In boviene herpesvirus 1-geïnfecteerde cellen wordt dit proces geremd door UL49.5. Dit eiwit blokkeert conformatieveranderingen van TAP die nodig zijn voor het transporteren van peptiden. Daarnaast wordt het TAP complex versneld afgebroken in aanwezigheid van UL49.5.

Naast UL49.5 zijn er nog drie andere TAP-blokkers van herpesvirussen bekend: ICP47 (herpes simplex virus type 1 en 2), US6 (cytomegalovirus van de mens en de rhesusaap) en BNLF2a (Epstein-Barr virus). De kenmerken van UL49.5 en de andere TAP-blokkers worden besproken in de inleiding van dit proefschrift (**hoofdstuk 1**).

Een opmerkelijke eigenschap van het boviene herpesvirus 1 UL49.5 eiwit is dat het niet alleen in koeiencellen de TAP-functie blokkeert, maar ook in mensen-, ratten-, muizen-, varkens- en paardencellen. Van deze eigenschap hebben we dankbaar gebruik gemaakt: bijna alle experimenten naar UL49.5 zijn uitgevoerd in humane cellen. In de eerste hoofdstukken van dit proefschrift wordt dieper ingegaan op de interactie tussen UL49.5 en TAP. In **hoofdstuk 2** wordt onderzocht welke van de eiwitten die betrokken zijn bij het beladen van MHC klasse I moleculen in het endoplasmatisch reticulum essentieel zijn voor TAP remming door UL49.5. Door cellijnen te gebruiken die bepaalde componenten van deze route missen konden we concluderen dat UL49.5 een direct effect heeft op TAP. Verder wordt er in dit hoofdstuk onderzocht welke delen van de TAP transporter belangrijk zijn voor de werking van UL49.5. De eiwitten TAP1 en TAP2 bestaan uit 10 (TAP1) of 9 (TAP2) transmembraandomeinen en een cytoplasmatische staart. Met deze transmembraandomeinen zitten de eiwitten verankerd in het membraan van het endoplasmatisch reticulum. De porie waardoor peptiden door TAP het endoplasmatisch reticulum in getransporteerd worden, wordt gevormd door de laatste 6 transmembraandomeinen van TAP1 en de laatste 6 transmembraandomeinen van TAP2, die samen het '6+6 transmembraankerndomein' van TAP worden genoemd. De overige transmembraandomeinen van de TAP subeenheden zijn o.a. betrokken bij de verbinding

tussen TAP en tapasin. Door UL49.5 te bestuderen in cellijnen die alleen TAP1 of TAP2 tot expressie brengen konden we concluderen dat UL49.5 beide subeenheden van TAP nodig heeft om te functioneren. Proeven met gemuteerde varianten van TAP1 en TAP2 lieten zien dat UL49.5 alleen het '6+6 transmembraankerndomein' van de transporter nodig heeft.

UL49.5 is een relatief klein eiwit dat ruwweg opgedeeld kan worden in drie domeinen: het domein dat in het endoplasmatisch reticulum voorkomt (het N-terminale domein), een transmembraandomein, en een cytoplasmatisch domein (het C-terminale domein). In **hoofdstukken 3 en 4** hebben we een aantal mutanten en chimere van UL49.5 gemaakt om de functionele domeinen van het eiwit te identificeren. Uit de experimenten met de verschillende varianten van UL49.5 hebben de volgende conclusies kunnen trekken: het endoplasmatische domein van UL49.5 zorgt voor gedeeltelijke remming van TAP, maar het transmembraandomein is nodig voor een stabiele interactie met TAP. De aminozuren die verantwoordelijk zijn voor deze remming hebben we nog niet kunnen identificeren. De cytoplasmatische staart van UL49.5 zorgt voor de afbraak van TAP, maar alleen in de aanwezigheid van het endoplasmatische domein en het transmembraandomein. De afbraak van TAP wordt gemedieerd door het arginine-glycine-arginine-glycine motief in het cytoplasmatische domein van UL49.5. Echter, hoe dit domein precies de afbraak van een groot eiwitcomplex als TAP initieert is nog onbekend. Naast de afbraak van TAP zorgt de cytoplasmatische staart van UL49.5 ook voor gedeeltelijke remming van de functie van TAP. Het is nog niet duidelijk welke aminozuren hiervoor verantwoordelijk zijn.

Alle herpesvirussen hebben een UL49.5 eiwit dat erg lijkt op boviene herpesvirus 1 UL49.5, maar slechts enkele van al deze UL49.5 moleculen kunnen TAP blokkeren. De virussen die een TAP-blokker tot expressie brengen behoren allemaal tot de varicellovirussen. Het pseudorabiës virus (van varkens), het equiene herpesvirus 1 en het equiene herpesvirus 4 coderen voor een UL49.5 eiwit dat de TAP-functie blokkeert in de natuurlijke gastheer en in menselijke cellen. In **hoofdstuk 5** laten we zien dat deze verwante eiwitten ('homologen') allemaal bepaalde conformatieveranderingen van TAP blokkeren die essentieel zijn voor het transport van peptiden. In tegenstelling tot boviene herpesvirus 1 UL49.5 zorgen deze homologen niet voor de afbraak van TAP. De equiene herpesvirus 1 en equiene herpesvirus 4 UL49.5 moleculen hebben de opvallende eigenschap dat ze, naast de conformationele remming, ook ATP-binding aan TAP blokkeren. Zonder de energie, die normaal door ATP geleverd wordt, vindt er geen peptidetransport plaats. Hoewel deze UL49.5 eiwitten dus allemaal TAP blokkeren, hebben we opvallende verschillen gevonden in het mechanisme waarmee deze homologen hun werking uitoefenen.

In **hoofdstuk 6** hebben we UL49.5 moleculen van andere varicellovirussen getest op TAP-remming. De experimenten die hier beschreven worden laten zien dat de UL49.5 moleculen van boviene herpesvirus 5, buffel herpesvirus 1, en edelhert herpesvirus 1 een

sterke remming van TAP veroorzaken, gepaard gaande met de afbraak van TAP. Dit mechanisme is dus gelijk aan dat van boviene herpesvirus 1 UL49.5. Het UL49.5 eiwit van feliene herpesvirus 1 voorkomt ook peptide transport door TAP, maar veroorzaakt geen afbraak van TAP, noch remming van ATP binding.

Niet alle varicellovirussen beschikken over een UL49.5 eiwit TAP blokkeert. Ondanks dat UL49.5 van het varicella zoster virus wel een interactie aangaat met TAP heeft deze homoloog opmerkelijk genoeg geen effect op TAP-functie. De UL49.5 eiwitten van simian varicellavirus (van apen) en het caniene varicellavirus hebben slechts een minimaal effect op de functie van TAP, wat waarschijnlijk niet genoeg is om herkenning door het immuunsysteem te voorkomen.

Ondanks de sterke gelijkenis tussen de UL49.5 eiwitten van varicellovirussen hebben ze duidelijk niet allemaal dezelfde functie. Dit zou kunnen betekenen dat bepaalde virussen geen TAP remming nodig hebben voor hun overleving of dat ze een andere TAP-blokker dan UL49.5 tot expressie brengen. Het feit dat het varicella-zoster virus UL49.5 aan TAP bindt en dat de homologen van simian varicellavirus en caniene varicellavirus wel enig effect op TAP hebben kan betekenen dat deze UL49.5 eiwitten ooit sterkere TAP-blokkers geweest zijn, maar dat ze hun functie gaandeweg de evolutie hebben verloren. Aan de andere kant kan het ook zijn dat ze nooit een sterkere TAP remming ontwikkeld hebben, omdat het simpelweg niet nodig was. Het zou interessant zijn om de UL49.5 eiwitten van alle bekende varicellovirussen te testen voor TAP remming. Misschien dat we met die informatie een patroon kunnen ontdekken in de ontwikkeling van TAP remming door UL49.5.

In **hoofdstuk 9** wordt een TAP-blokker in een niet-herpesvirus beschreven, namelijk het CPXV12 eiwit van het koepokken virus. Uit de ontdekking van een TAP-blokker buiten de herpesviruswereld blijkt dat TAP een veelgebruikt doelwit voor immuunevasie is. Dit illustreert ook hoe belangrijk TAP voor de immuunrespons tegen virussen is.

In **hoofdstuk 7** hebben we de capaciteit van verschillende TAP-blokkers in muizencellen vergeleken. Dat is van belang, omdat er behoefte is aan een effectieve remming van TAP-functie in verschillende muizenmodellen. De functie van muizen-TAP werd geremd door US6 en UL49.5, onafhankelijk van de muizenstam waar de cellen van afkomstig waren. ICP47 en BNLF2a bleken niet functioneel in muizencellen.

Het feit dat boviene herpesvirus 1 UL49.5 muizen TAP blokkeert werd al eerder toegepast om een immuunrespons tegen tumorcellen zonder TAP op te wekken. Tumorcellen worden herkend door het immuunsysteem doordat MHC klasse I moleculen tumorgerelateerde peptiden aan de buitenwereld presenteren. Hierdoor kunnen T-cellen opgewekt worden die de tumorcellen uiteindelijk zullen aanvallen en doden. Net als herpesvirussen proberen tumoren dit te voorkomen door o.a. de activiteit van TAP te remmen. Zonder TAP-functie worden de MHC klasse I moleculen in het endoplasmatisch

reticulum niet meer met tumorpeptiden beladen. Echter, de leegte in de MHC klasse I moleculen wordt opgevuld door zogenaamde T cel epitopen die geassocieerd zijn met geremde peptide transport oftewel TEIPP peptiden. De presentatie van TEIPP peptiden is voor het immuunsysteem een signaal dat er wat mis is in de cel, met het gevolg dat de cel alsnog geëlimineerd zal worden. Door UL49.5 tot expressie te brengen in dikkedarmkankercellen van een muis, en dus bewust TAP-functie uit te schakelen in deze cellen, is het gelukt om een TEIPP-specifieke immuunrespons op te wekken. In **hoofdstuk 8** van dit proefschrift beschrijven we de totstandkoming van drie TEIPP-specifieke menselijke T-cellijnen, die opgewekt zijn tegen cellen waar TAP met behulp van boviene herpesvirus 1 UL49.5 uitgeschakeld was. Niet alleen bij dikkedarmkanker, maar ook bij veel andere tumoren functioneert TAP niet meer. De TEIPP-specifieke T-cellen zouden in deze tumoren als therapie gebruikt kunnen worden. Bovendien laat dit onderzoek zien dat cellen die UL49.5 tot expressie brengen gebruikt zouden kunnen worden als een vaccin om een immuunrespons tegen TAP-negatieve tumoren op te wekken.

De balans tussen de immuunrespons van de gastheer en immuunevasie door de herpesvirussen is het resultaat van een jarenlange co-evolutie. Voor sommige herpesvirussen lijken TAP-blokkers essentieel voor hun overleving in de gastheer; andere herpesvirussen daarentegen zijn ook erg succesvol zonder TAP-blokker. Zij beschikken waarschijnlijk over andere strategieën om het immuunsysteem te misleiden. Miljoenen jaren na de ontwikkeling van deze immuunevasiemoleculen komen de onderzoekers in beeld. We proberen de gangen van het virus na te gaan, we pakken de trucendoos uit en we ontleden de eiwitten totdat we precies weten welk aminozuur waarvoor verantwoordelijk is. Dit is van belang om vaccins te kunnen ontwikkelen waarmee we een krachtige immuunrespons willen opwekken tegen kankercellen, zoals toegelicht voor TEIPP. Het is ook belangrijk voor de toepassing van UL49.5 in transplantatiemodellen, door de TAP-functie te blokkeren kunnen we ongewenste afweerreacties misschien voorkomen. Het onderzoek naar immuunevasie laat zien hoe efficiënt virussen het immuunsysteem kunnen misleiden en het is belangrijk dat we hun kracht om te overleven proberen toe te passen in het klinisch onderzoek.

List of Publications

Increased intraarticular interleukin-7 in rheumatoid arthritis patients stimulates cell contact-dependent activation of CD4(+) T cells and macrophages.

J.A. Van Roon, M.C. Verweij, M.W. Wijk, K.M. Jacobs, J.W. Bijlsma, and F.P. Lafeber.

Arthritis Rheum 2005, 52(6): 1700-10.

Signaling of a varicelloviral factor across the endoplasmic reticulum membrane induces destruction of the peptide-loading complex and immune evasion.

S. Loch, F. Klauschies, C. Schöhl, M.C. Verweij, E.J. Wiertz, J. Koch, and R. Tampé.

J Biol Chem 2008, 283(19): 13428-36.

Adenovirus targeting to HLA-A1/MAGE-A1-positive tumor cells by fusing a single-chain T-cell receptor with minor capsid protein IX.

J. De Vrij, T.G. Uil, S.K. van den Hengel, S.J. Cramer, D. Koppers-Lalic, M.C. Verweij, E.J. Wiertz, J. Vellinga, R.A. Willemsen, and R.C. Hoeben.

Gene Ther 2008, 15(13): 978-89.

Varicellovirus UL 49.5 proteins differentially affect the function of the transporter associated with antigen processing, TAP.

M.C. Verweij, D. Koppers-Lalic*, A.D. Lipińska, Y. Wang, E. Quinten, E.A. Reits, J. Koch, S. Loch, M. Marcondes Rezende, F. Daus, K. Bieńkowska-Szewczyk, N. Osterrieder, T.C. Mettenleiter, M.H. Heemskerck, R. Tampé, J.J. Neefjes, S.I. Chowdhury, M.E. Rensing, F.A. Rijsewijk, and E.J. Wiertz.*

PLoS Pathog 2008, 4(5): e1000080.

The varicellovirus UL49.5 protein blocks the transporter associated with antigen processing (TAP) by inhibiting essential conformational transitions in the 6+6 transmembrane TAP core complex.

M.C. Verweij, D. Koppers-Lalic, S. Loch, F. Klauschies, H. de la Salle, E. Quinten, P.J. Lehner, A. Mulder, M.R. Knittler, R. Tampé, J. Koch, M.E. Rensing, and E.J. Wiertz.

J Immunol 2008, 181(7): 4894-4907.

Herpesviruses and immunity: the art of evasion.

B.D. Griffin, M.C. Verweij, and E.J. Wiertz.

Vet Microbiol 2010, 143(1): 89-100.

Two mechanistically distinct immune evasion proteins of cowpox virus combine to avoid antiviral CD8 T cells.

M. Byun, M.C. Verweij, D.J. Pickup, E.J. Wiertz, T.H. Hansen, and W.M. Yokoyama.

Cell Host Microbe 2009, 6(5): 422-432

Herpesvirus-encoded immune evasion molecules cross species barriers to inhibit mouse MHC-restricted antigen presentation.

M.C. Verweij, M.E. Rensing, C.W. Knetsch, E. Quinten, A. Halenius, N. van Bel, H. Hengel, J.W. van Drijfhout, T. van Hall, and E.J. Wiertz*.*

Submitted

Exploitation of herpesvirus immune evasion strategies to generate non-immunogenic human mesenchymal stem cells for use in regenerative medicine.

S. Knaan-Shanzer, A.S. de la Garza-Rodea, M.C. Verweij, H. Boersma, I. van der Velde-van Dijke, A.A.F. de Vries, R. Hoeben, D.W. van Bekkum, and E.J. Wiertz.

Submitted

CD8⁺ T cell responses against TAP-deficient cells are readily detected in the human population.

M.H. Lampen, M.C. Verweij, B.J. Querido, S.H. van der Burg, E.J. Wiertz, and T. van Hall.

Submitted

Structural and functional analysis of the TAP-inhibiting UL49.5 proteins of varicelloviruses.

M.C. Verweij, A.D. Lipińska*, D. Koppers-Lalic, E. Quinten, J. Funke, H.C. van Leeuwen, K. Bieńkowska-Szewczyk, J. Koch, M.E. Rensing, and E.J. Wiertz.*

Submitted

The capacity of UL49.5 proteins to inhibit TAP is widely distributed amongst members of the genus *Varicellovirus*.

M.C. Verweij, A.D. Lipińska, D. Koppers-Lalic, W.F. van Leeuwen, J.I. Cohen, P.R. Kinchington, K. Bieńkowska-Szewczyk, M.E. Rensing, F.A.M. Rijsewijk, and E.J. Wiertz.

Submitted

Viral inhibition of the transporter associated with antigen processing (TAP): A striking example of convergent evolution.

M.C. Verweij, D. Horst*, B.D. Griffin, A.J. Davison, M.E. Rensing, and E.J. Wiertz.*

Submitted

**These authors contributed equally to the work.*

Curriculum Vitae

Marieke Verweij was born on January 17, 1982 in Heerjansdam, The Netherlands. After obtaining her Atheneum diploma at the Vincent van Gogh Scholengemeenschap in Assen in 2000, she moved to Utrecht to study Biomedical Sciences at the Utrecht University. During her master Immunity and Infection she did a lab rotation under supervision of Dr. J. van Roon and Prof. Dr. F. Lafeber at the department of Rheumatology and Clinical Immunology at the University Medical Center Utrecht. The project focused on the proinflammatory role of IL-7 in rheumatoid arthritis. The second lab rotation on the processing and presentation of EBV-encoded EBNA1 protein by human dendritic cells was performed under supervision of Dr. T. Lauterslager and Prof. Dr. J.M. Middeldorp at the Pathology department at the Vrije Universiteit Medical Center in Amsterdam. In 2005, Marieke went to London for an extracurricular training period on the sumoylation of Stat5a and Stat5b at the Peter Gorer Department of Immunobiology, King's College London, under supervision of Dr. S. John. She received the Master of Science degree in August 2005. In October that year, she started as a PhD student at the department of Medical Microbiology of the Leiden University Medical Center under the supervision of Prof. Dr. E.J.H.J. Wiertz. The research was concluded in February 2010, and the results are described in this thesis. Currently, Marieke is studying immune evasion by simian varicella virus and varicella zoster virus as a postdoctoral fellow in the lab of Klaus Früh at the Vaccine and Gene Therapy Institute of the Oregon Health and Science University in Portland, Oregon, United States. She was awarded a Long-Term Fellowship by the European Molecular Biology Organization for this project.

*Een knuffeltje hier
en een knuffeltje daar.
Op je wang, op je oor,
in je nek, in je haar.
Nee, wacht nog eens even,
ik ben nog niet klaar.
Ik vind je zo lief,
op je neus ook een paar.*

Nannie Kuiper

