

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/42996> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Gram., A.M.

Title: Mechanisms of immune evasion in Epstein-Barr virus infection

Issue Date: 2016-09-08

Addendum

Nederlandse samenvatting

Virussen hebben een gastheer nodig om zich te kunnen vermenigvuldigen (repliceren). Om de gastheer tegen virale en andere microbiële infecties te beschermen heeft het een immuunsysteem, waarmee het lichaamsvreemde moleculen kan herkennen en daarop kan reageren. Er wordt tussen het aangeboren en het verworven afweersysteem onderscheden. Een deel van de lichaamsvreemde moleculen, vooral virale nucleïnezuren, kan snel door gespecialiseerde sensoren van het aangeboren immuunsysteem herkend worden, bij voorbeeld door Toll-like receptoren. Een virus-specifieke immuunrespons wordt door het verworven immuunsysteem aangemaakt. De immuunrespons kan geïnitieerd worden als geïnfecteerde cellen stukjes (peptiden) van lichaamsvreemde virale eiwitten in de antigeen-presenterende moleculen HLA klasse I (HLA I, ook MHC I) en HLA klasse II (HLA II, ook MHC II) op het celoppervlak presenteren. De vreemde peptiden in de antigeen-presenterende moleculen kunnen door specifieke CD8⁺ en CD4⁺ T-cellen worden herkend. Dit leidt tot activatie van de T cel, die de virus-geïnfecteerde cel direct kan doden of andere cellen kan activeren, die bij de immuunrespons betrokken zijn. Deze immuunrespons verwijderd de meeste virusinfecties en geeft langdurige immuniteit tegen dit virus.

Herpesvirussen zijn DNA-virussen, die de bijzondere eigenschap hebben dat zij een latente infectie in een gastheer kunnen bewerkstelligen, ook al worden ze door het immuunsysteem herkend en wordt er immuniteit ontwikkeld. Dit is mogelijk doordat herpesvirussen verschillende indrukwekkende manieren hebben ontwikkeld om aan herkenning door het immuunsysteem te ontsnappen. De levenscyclus van herpesvirussen bestaat uit twee verschillende fases, de latente en de lytische infectie. Tijdens de latente infectie van cellen worden er geen nieuwe virusdeeltjes geproduceerd. In een latent geïnfecteerde cel worden er geen of nauwelijks nieuwe virale eiwitten gemaakt en ook het genoom wordt slechts op een laag niveau geamplificeerd, enkel om ervoor te zorgen dat de delende cellen het virale genoom behouden. Verder hebben sommige latente virale eiwitten immuun-modificerende eigenschappen. Zo zorgen deze mechanismen ervoor dat de latente infectie niet goed “zichtbaar” is voor het immuunsysteem. In tegenstelling tot de latente fase, worden tijdens de lytische fase veel virale eiwitten geproduceerd, het genoom wordt vermenigvuldigd en nieuwe virusdeeltjes worden gemaakt. Om te voorkomen dat de virus-producerende cellen snel door het immuunsysteem herkend en opgeruimd worden, hebben herpesvirussen verschillende manieren gevonden om herkenning van de geïnfecteerde cellen te beïnvloeden (immuun-evasie).

In dit proefschrift staan de resultaten beschreven van ons onderzoek naar hoe het herpesvirus Epstein-Barr virus (EBV) de antigeen-presentatie op het celoppervlak van EBV-geïnfecteerde cellen kan verhinderen. In **hoofdstuk 1** is de achtergrond van dit onderzoek gedetailleerd beschreven. EBV hordt bij de herpesvirussen, specifiek de lymfocryptovirussen. Voorbeelden van andere herpesvirussen, die mensen als gastheer hebben, zijn herpes simplex

virus, de veroorzaker van koortslip, of het waterpokkenvirus. EBV kan de ziekte van Pfeiffer veroorzaken als de gastheer voor het eerst tijdens adolescentie in aanraking met EBV komt. EBV infectie is ook geassocieerd met verschillende vormen van kanker, zoals het Burkitt's lymfoom en Hodgkin's lymfoom. In de gastheer infecteert EBV B-cellen en epitheelcellen. In B-cellen kan EBV een latente infectie veroorzaken, maar ook lytisch repliceren. Tijdens de lytische fase zorgen verschillende EBV eiwitten ervoor dat er minder antigeen-presenterende moleculen op het celoppervlak terechtkomen, zodat minder EBV-afkomstige peptiden gepresenteerd kunnen worden. Drie verschillende EBV eiwitten met deze eigenschap zijn in de hoofdstukken 2, 3, en 4 behandeld.

In **hoofdstuk 2** wordt beschreven hoe de aanmaak van het EBV 'shutoff' eiwit BGLF5 middels een shRNA approach verminderd wordt in B-cellen, waarin EBV lytisch in replicateert, en welke invloed dit heeft op diverse celoppervlakte-eiwitten. Op deze manier zijn twee tot dusver onbekende doelwitten van BGLF5 geïdentificeerd, namelijk de transcripten die coderen voor CD1d en Toll-like receptor 2. Doordat BGLF5 deze transcripten afbreekt wordt de expressie van deze eiwitten op het celoppervlak verlaagd. De twee eiwitten zijn onderdeel van het aangeboren immuun system. TLR2 draagt bij aan de herkenning van pathogenen en CD1d is een antigeen-presenterend molecuul, dat lipiden in plaats van peptiden aan T-cellen presenteert.

In **hoofdstuk 3** wordt immuun-evasie van HLA I, II, en CD1d door EBV tijdens de late lytische fase beschreven. Een EBV-eiwit, gp150, draagt eraan bij dat de detectie van alle drie de antigeen-presenterende moleculen op het celoppervlak van EBV-negatieve cellen verlaagd wordt. De functie van het EBV-eiwit gp150 was niet eerder bekend. Verder hebben we het moleculaire werkingsmechanisme van gp150 opgehelderd. EBV gp150 draagt niet bij aan een versnelde afbraak van de bestudeerde eiwitten, maar de moleculen blijven op het celoppervlak aanwezig. Het zwaar geglycosyleerde eiwit gp150 dekt middels zijn suikers (glycanen) moleculen op het celoppervlak af, wat de herkenning door CD8⁺ en CD4⁺ T-cellen vermindert. Voor herpesvirussen is dit een unieke manier van evasie, en er is een soortgelijke mechanisme slechts voor een ander viraal eiwit beschreven, namelijk het Ebola glycoeiwit. In afwezigheid van gp150 in lytisch replicerende EBV-geïnfecteerde B-cellen komt een groter aantal HLA en CD1d moleculen op het celoppervlak terecht dan wanneer gp150 ook tot expressie komt. Dit geeft aan dat tijdens de productieve EBV-infectie van B-cellen gp150 ook een bijdrage levert aan de verminderde herkenning van antigeen-presenterende moleculen op het celoppervlak en dus ontsnapping aan T-celherkenning.

In **hoofdstuk 4** zijn de moleculaire details beschreven van BILF1-afhankelijke verlagings van HLA I moleculen op het celoppervlak. Voor interferentie met HLA I zijn de cytoplasmatische staart van zowel BILF1 als het HLA I molecuul noodzakelijk. Verder wordt aangetoond dat niet alle HLA allelen gevoelig zijn voor BILF1. De celoppervlakte-niveaus

van HLA-C moleculen worden namelijk niet of nauwelijks door BILF1 verlaagd. We hebben de verantwoordelijke aminozuren in de cytoplasmatische staart van HLA-C moleculen geïdentificeerd en introductie van deze aminozuren in een BILF1-gevoelig HLA molecuul maakt het resistent. BILF1 wordt door meerdere relateerde lymfocryptovirussen (LCV), waaronder EBV, rhesus LCV, en marmoset LCV gecodeerd. Of de BILF1 eiwitten van deze drie LCVs allemaal de immuunevasie-eigenschap hebben was onbekend. BILF1 van EBV en van rhesus LCV kunnen de celoppervlakte-expressie van humaan MHC I verlagen, maar marmoset BILF1 kan dit niet. Ook kan marmoset BILF1 niet de oppervlakte expressie van marmoset MHC I beïnvloeden. Dit zou kunnen betekenen dat BILF1 evolutionair gezien pas recent zijn evasie-eigenschap heeft ontwikkeld.

Over de herkenning van EBV door het aangeboren immuunsysteem is minder bekend. B-cellen hebben verschillende sensoren zoals Toll-like receptoren, maar over de aanwezigheid van cytosolische en nucleaire DNA-sensoren in B-cellen was vrijwel weinig bekend. Het DNA-genoom van EBV zou door dit soort sensoren herkend kunnen worden. In **hoofdstuk 5** is beschreven dat hoewel B-cellen wel cytoplasmatische DNA-sensoren tot expressie brengen, het essentiële adaptereiwit STING afwezig was in de meerderheid van de bestudeerde primaire B-cellen en cellijnen. B-cellen, die wel de eiwitten van de volledige signaleringcascade leken te hebben, reageerden ook niet op geïntroduceerd DNA, waaruit we concluderen dat de cascade in B-cellen niet functioneel is. Het is interessant om te speculeren of dit B-cellen tot attractieve gastheercellen voor EBV en andere DNA-virussen maakt.

Het laatste hoofdstuk, **hoofdstuk 6**, geeft een samenvatting van de bevindingen uit alle eerdere hoofdstukken van dit proefschrift alsmede een discussie in de context van de gerelateerde vak literatuur. Verder worden de ontwikkelingen en mogelijkheden van het EBV- en herpesvirusonderzoek en implicaties daarvan voor de kliniek besproken. Uit de eerste drie hoofdstukken blijkt dat evasie van HLA II, CD1d, en vooral HLA I een belangrijke rol in de levenscyclus van EBV moet spelen, omdat EBV hier zoveel verschillende manieren voor ontwikkeld heeft, die in verschillende fasen van de lytische replicatie actief zijn. De hier besproken eiwitten BGLF5, gp150, en BILF1 kunnen samen met andere EBV-eiwitten, zoals BNLF2a en gp42, de herkenning door CD8⁺ en CD4⁺ T-cellen verstoren. Het is belangrijk om de werkwijze van deze evasieeiwitten te begrijpen, want dit zou de grondlaag voor de ontwikkeling van anti-virale therapieën, bij voorbeeld van de ziekte van Pfeiffer, kunnen zijn. Verder is het interessant om er over na te denken, of (gemodificeerde) virale evasieeiwitten, die de antigen-presentatie verminderen, kunnen gebruikt worden om getransplanteerde of eigen organen (bi voorbeeld de pancreas, het insuline producerend orgaan) tegen ongewilde aanval door T cellen te voorkomen zo als in een orgaanafstoting-reactie of type I diabetes.