

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

Deutsche Zusammenfassung

Viren sind kleine infektiöse Partikel, die aus einem viralen Genom, das die Erbinformation beinhaltet, und Eiweißen (Proteinen) bestehen. Im Gegensatz zu Bakterien können Viren nicht eigenständig replizieren (sich vermehren). Viren benötigen eine Wirtszelle, die sie infizieren, „kapern“ und dazu benutzen können, um zu replizieren. Das Immunsystem des Menschen sorgt dafür, dass virale und andere Infektionen erkannt und beseitigt werden. Man unterscheidet zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem. Das angeborene Immunsystem erkennt körperfremde Moleküle (z.B. das virale Genom) durch zelluläre Sensoren in und auf Körper- und Immunzellen. Ein Beispiel für solche Sensoren sind die Toll-like-Rezeptoren. Die Erkennung von körperfremden Molekülen führt zur Aktivierung der Sensoren, die andere zelluläre Eiweiße hinzuziehen und damit eine Signalkaskade auslösen, um so eine schnelle, aber unspezifische Immunantwort auszulösen. Diese angeborene Immunantwort stimuliert die Entwicklung der Erreger-spezifischen (erworbenen) Immunantwort. Die erworbene Immunantwort besteht einerseits aus der Antikörper-basierten humoralen Immunität, und andererseits aus der zellulären Immunität. Hauptbestandteil der zellulären Immunität sind bestimmte Blutzellen, die sogenannten T-Zellen, die kleine Stückchen (Peptide) von körperfremden Eiweißen (Antigenen) erkennen können. Die Peptide werden auf der Zelloberfläche durch antigen-präsentierende Moleküle, die sogenannten MHC-Moleküle (die im Menschen auch HLA-Moleküle genannt werden) präsentiert. Es gibt HLA-Moleküle der Klasse I und II. T-Zellen erkennen diese HLA-Moleküle zusammen mit den präsentierten Peptiden und werden dadurch aktiviert. Aktivierte T-Zellen können entweder (Virus-infizierte) Zellen, die die fremden Peptide auf der Zelloberfläche präsentieren, direkt töten oder anderen Zellen, die an einer Immunantwort beteiligt sind, helfen, aktiv zu werden. Die erworbene Immunantwort sorgt normalerweise dafür, dass Infektionsherde entfernt werden und eine langanhaltende Immunität gegen den spezifischen Erreger etabliert wird.

Die Familie der Herpesviren umfasst behüllte Viren mit einem DNA-Genom. Es gibt mehrere humane Herpesviren, die Erkrankungen wie Lippenherpes (Herpes simplex Virus 1), Genitalherpes (Herpes simplex 2), Windpocken (und bei Reaktivierung Gürtelrose) (Varicella-Zoster Virus) oder Pfeiffersches Drüsenfieber (Epstein-Barr-Virus) verursachen können. Herpesviren haben die Besonderheit, dass sie eine latente Infektion verursachen, d.h. das Virengenom verbleibt nach einer Infektion im Körper, obwohl das Immunsystem die Viren erkannt und Immunität entwickelt hat. Herpesviren haben verschiedene beeindruckende Strategien entwickelt, um die Immunantwort zu umgehen oder ins Leere laufen zu lassen. Der Lebenszyklus von Herpesviren besteht aus zwei Phasen, der latenten und der lytischen Infektion. Während der latenten Phase werden keine neuen Viruspartikel produziert. Auch werden keine oder kaum virale Proteine generiert, und das virale Genom wird nur auf einem niedrigen Niveau vervielfältigt, was nur dazu dient, dass das virale Genom auch in den Tochterzellen der sich teilenden und infizierten Zelle vorhanden bleibt.

Durch die wenigen viralen Proteine (und somit präsentierten Peptide) und die niedrige Genomvervielfältigungsrate sind die latent infizierten Zellen für das Immunsystem fast gänzlich „unsichtbar“. Zusätzlich haben einige der viralen Proteine, die in der latenten Phase produziert werden, immunmodifizierende Eigenschaften, die dafür sorgen, dass die Immunerkennung und –aktivierung reduziert wird. Im Gegensatz zur latenten Phase werden in der lytischen Phase neue virale Eiweiße produziert, das virale Genom stark vervielfältigt und neue Viruspartikel generiert. Um zu verhindern, dass infizierte Zellen, die sich in der lytischen Phase befinden, vom Immunsystem - aus viraler Sicht - zu schnell entdeckt und zerstört werden, haben Herpesviren eine Reihe von Strategien entwickelt, um die Erkennung der infizierten Zelle zu verspäten und somit mehr Zeit zur Produktion von noch mehr Viruspartikeln zu haben.

In dieser Arbeit werden die Ergebnisse unserer Forschung zu der Frage, wie das Epstein-Barr-Virus (EBV) die Antigenpräsentation auf der Zelloberfläche von EBV-infizierten Zellen verhindern kann, vorgestellt. In **Kapitel 1** sind die Hintergründe unserer Forschungsarbeit detailliert beschrieben. EBV gehört zur Familie der Herpesviren und zur Unterfamilie der Lymphocryptoviren. Mehr als 90% der erwachsenen Weltbevölkerung sind mit EBV infiziert. EBV kann das Pfeiffersche Drüsenfieber verursachen, welches bei erstmaliger EBV-Infektion vor allem, aber nicht ausschließlich, im Jugend- oder Erwachsenenalter auftritt. Die Infektion mit EBV spielt auch bei verschiedenen Formen von Krebs, zum Beispiel dem Burkittslymphom oder dem Hodgkinslymphom, eine Rolle. EBV infiziert B-Zellen (die Antikörper-produzierenden Zellen des Immunsystems) und Epithelzellen. EBV kann B-Zellen latent infizieren, aber auch in ihnen lytisch replizieren. Während der lytischen Phase sorgen verschiedene EBV-Proteine dafür, dass weniger Antigen-präsentierende Moleküle auf die Zelloberfläche kommen und somit weniger Peptide von EBV-Eiweißen präsentiert werden. Drei verschiedene EBV-Eiweiße mit dieser Eigenschaft sind Gegenstand der Kapitel 2, 3 und 4.

Das EBV-Protein BGLF5 ist Gegenstand von **Kapitel 2**. BGLF5 sorgt während der lytischen Phase von EBV dafür, dass die Produktion von Wirtsproteinen, unter anderem HLA-Moleküle, zu Gunsten von viralen Eiweißen massiv abnimmt. In Kapitel 2 ist beschrieben wie die Menge an BGLF5 in lytisch infizierten B-Zellen unter Zuhilfenahme von shRNAs reduziert werden kann. In den Zellen mit verringerter Anzahl BGLF5-Molekülen wurde die Menge von verschiedenen Zelloberflächenmolekülen bestimmt und mit Zellen, die die normale BGLF5 Menge haben, verglichen. Auf diese Art und Weise konnten wir das Eiweiß CD1d als Ziele identifizieren, dessen kodierende mRNA von BGLF5 abgebaut wird. Dies resultiert in einer geringeren Produktion von CD1d und einer reduzierten Menge dieser Eiweiße auf der Zelloberfläche. In Zellen, in denen das BGLF5-Gen zur Expression gebracht wurde, konnte auch TLR2 als Ziel festgestellt werden. Die zwei Proteine CD1d und TLR2 sind Teil des angeborenen Immunsystems. TLR2 trägt zur Erkennung von Erregern bei. CD1d ist

ein nicht-klassisches Antigen-präsentierendes Molekül, das Lipide statt Peptide an T-Zellen präsentiert. Die beschriebene Methode erlaubt somit, neue Zieleiweiße zu identifizieren.

In **Kapitel 3** wird dargestellt, wie EBV die Antigenpräsentation durch HLA I, II und CD1d während der späten lytischen Phase verringert. Das EBV-Eiweiß gp150, das die Zelloberfläche erreicht, trägt dazu bei, dass die Erkennung aller drei Antigen-präsentierender Moleküle durch T-Zellen abnimmt. Die Funktion von EBV gp150 war zuvor unbekannt. Des Weiteren haben wir den molekularen Wirkmechanismus studiert. EBV gp150 sorgt nicht dafür, dass die Zieleiweiße schneller als gewöhnlich abgebaut werden, sondern kann die Eiweiße auf der Zelloberfläche maskieren, sodass sie nicht mehr für T-Zellen erkennbar sind. Dies wird dem relativ kleinen EBV-Protein gp150 durch seine ungewöhnlich vielen Zuckermodifikationen ermöglicht. Diese Vermeidungsstrategie ist bisher einzigartig für Herpesviren, und ein vergleichbarer Mechanismus ist nur für ein anderes virales zucker-modifiziertes Eiweiß, das des Ebolavirus, bekannt. In der Abwesenheit von gp150 in der lytischen Infektionsphase sind mehr Zelloberflächen-HLA und -CD1d-Moleküle in B-Zellen detektierbar als in Abwesenheit von gp150. Das heißt, es ist denkbar, dass auch in EBV-infizierten und lytisch-replizierenden B-Zellen das Eiweiß gp150 zur Abnahme von T-Zellerkennung beiträgt.

In **Kapitel 4** werden die Ergebnisse unserer weiterführenden Studie über EBV BILF1 dargelegt. BILF1 ist ein EBV-Protein, das während der frühen lytischen Phase produziert wird und dafür sorgt, dass weniger HLA I-Moleküle auf der Zelloberfläche anwesend sind. Wir beschreiben die Erkenntnisse über die molekularen Details der BILF1-abhängige Abnahme von HLA I-Eiweißen auf der Zelloberfläche. Dazu wurden verschiedene BILF1 und HLA I-Mutanten von uns generiert und studiert. BILF1 benötigt seinen cytoplasmatischen Teil um die Menge an Zelloberflächen-HLA I zu verringern. Des Weiteren kann BILF1 das Erreichen der Zelloberfläche des HLA I-Eiweißes nur verhindern, wenn HLA I seinen cytoplasmatischen Teil besitzt. Überdies können wir zeigen, dass nicht alle HLA I-Proteine, die durch die verschiedenen HLA-Allele kodiert werden, durch BILF1 beeinflusst werden. Die Menge der HLA-C-Zelloberflächenmoleküle wird nämlich kaum oder gar nicht verringert. Die dafür verantwortlichen Aminosäuren konnten im cytoplasmatischen Teil von HLA-C ausfindig gemacht werden. Wenn diese Aminosäuren an den entsprechenden Positionen in einem BILF1-sensitiven HLA I-Protein eingefügt werden, wird das HLA I-Eiweiß resistent gegen BILF1. Mehrere verwandte Lymphocryptoviren (LCV), unter anderem EBV, Rhesus-LCV und Marmosetten-LCV kodieren BILF1. Es war unbekannt, ob BILF1 von diesen drei LCVs über die Eigenschaft verfügt MHC-Moleküle am Erreichen der Zelloberfläche zu hindern. BILF1 von EBV und Rhesus-LCV können humanes MHC I auf der Zelloberfläche verringern, während Marmosetten-LCV BILF1 dies nicht kann. Auch Marmosetten-MHC I-Eiweiße kann Marmosetten-LCV BILF1 nicht vermindern, d.h. es verfügt nicht über die Eigenschaft, die Menge an Zelloberflächen-MHC I zu verringern. Dies könnte bedeuten, dass evolutionär gesehen BILF1 über die Eigenschaft der Verminderungsstrategie erst relativ kurz

verfügt.

Im Gegensatz zum erworbenen Immunsystem ist über die Erkennung von EBV durch das angeborene Immunsystem weniger bekannt. B-Zellen verfügen über verschiedene Sensoren wie Toll-like-Rezeptoren, aber ob B-Zellen cytoplasmatische und Zellkern-ständige DNA-Sensoren haben, war weitestgehend unbekannt. Das DNA-Genom von EBV könnte von dieser Sorte Sensoren erkannt werden. In **Kapitel 5** ist beschrieben, dass B-Zellen cytoplasmatische DNA-Sensoren haben, aber das Adaptereiweiß STING in den meisten primären B-Zellen und B-Zelllinien abwesend ist. Das Protein STING ist für den cytoplasmatischen DNA-Erkennungssignalweg essentiell und ohne dieses Eiweiß kann das Erkennungssignal nicht weitergegeben werden. Somit verfügen die meisten der getesteten B-Zellen nicht über einen vollständigen Signalkaskadenweg für die Erkennung von DNA. Interessanterweise reagieren B-Zellen, die anscheinend alle Eiweiße der DNA-Erkennungs- und Signalkaskade haben, nicht auf cytoplasmatische DNA. Daraus ziehen wir die Schlussfolgerung, dass die Signalkaskade in B-Zellen nicht funktionstüchtig ist. Es ist interessant zu spekulieren, ob die Abwesenheit von dem DNA-Erkennungsweg B-Zellen zu attraktiven Wirtszellen für EBV und andere DNA-Viren macht.

Das letzte Kapitel, **Kapitel 6**, fasst die Ergebnisse aus den anderen Kapiteln dieser Arbeit zusammen und beinhaltet eine Diskussion dieser im Kontext relevanten Fachliteratur. Des Weiteren werden die möglichen zukünftigen Entwicklungen in der EBV- und Herpesvirenforschung und deren klinische Anwendbarkeit diskutiert. Die in den ersten vier Kapiteln dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Umgehung der Antigenpräsentation der HLA II-, CD1d- und vor allem HLA I-Eiweiße eine wichtige Rolle spielen muss, weil EBV so viele verschiedene Strategien dafür entwickelt hat, die in verschiedenen Phasen der lytischen Replikationsphase aktiv sind. Die hier besprochenen EBV-Proteine BGLF5, BILF1 und gp150 können gemeinsam mit anderen EBV-Eiweißen, wie zum Beispiel BNLF2a und gp42, die Erkennung durch T-Zellen stören. Es ist wichtig, die molekularen Arbeitsweisen dieser Eiweiße zu verstehen, weil dies die Grundlage für die Entwicklung von anti-viralen Therapien, zum Beispiel gegen das Pfeiffersche Drüsenfieber, bilden kann. Außerdem ist es interessant darüber nachzudenken, inwiefern (modifizierte) virale Eiweiße, die die Antigenpräsentation verringern, therapeutisch genutzt werden können, um zum Beispiel transplantierte oder eigene Organe vor ungewollten T-Zell-Attacken zu bewahren, wie dies der Fall in Organabstoßungsreaktionen nach Transplantationen oder Diabetes Typ I der Fall ist.