



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Sensing and sensibility: the role of non-coding RNAs in autoinflammation and viral infection

Stok, J.E.

Citation

Stok, J. E. (2025, May 8). *Sensing and sensibility: the role of non-coding RNAs in autoinflammation and viral infection*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4245503>

Version: 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/1887/4245503>

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

Nederlandse samenvatting

Ons lichaam is opgebouwd uit miljarden cellen, en in elke cel zit DNA, de blauwdruk van het leven. DNA bevat instructies om alles in ons lichaam te bouwen en te laten werken. Deze instructies worden overgeschreven naar RNA, een tijdelijke kopie, die meestal wordt gebruikt om eiwitten te maken. Eiwitten zijn de werkpaarden van de cel. Ze voeren bijna alle taken uit, van het afbreken van voedsel tot het bouwen van spieren.

Niet al het RNA in ons lichaam wordt echter gebruikt om eiwitten te maken. Er is ook “niet-coderend RNA” (non-coding RNA). Deze RNA's lijken op het eerste gezicht misschien onbelangrijk omdat ze geen eiwitten maken, maar ze spelen vaak een sleutelrol als regelaar in de cel. Ze helpen processen aansturen, controleren of alles soepel verloopt en kunnen zelfs invloed hebben op hoe het immuunsysteem reageert op virussen of andere bedreigingen.

Het onderzoek in dit proefschrift focust zich op de vraag hoe niet-coderend RNA invloed uitoefent op het ziekteproces van auto-inflammatoire ziekten en virale infecties. Ons immuunsysteem heeft sensoren die indringers zoals virussen herkennen. Veel virussen gebruiken RNA om hun genetische informatie te verspreiden. Daarom let een gespecialiseerde groep sensoren vooral op RNA-moleculen in de cel. In dit proefschrift ligt de focus voornamelijk op de RIG-I-like-receptoren (RLRs), bestaande uit RIG-I, MDA5, en LGP2. Deze sensoren kunnen onderscheid maken tussen welke RNA's van een virus zijn, en welke van de cel zelf. Dat gebeurt op basis van een aantal chemische modificaties die een cel aan het eigen RNA kan meegeven. RNAs die deze modificaties niet bevatten, zullen dus als van een virus afkomstig worden aangezien. Wanneer een RNA-sensor viraal RNA herkent, wordt er een signaalcascade in de cel gestart die leidt tot de productie van type I interferonen (IFN). De geïnfecteerde cel scheidt deze IFN uit, die vervolgens zichzelf of naburige cellen kunnen activeren. Deze activatie leidt tot een alarm: interferon-geïnduceerde genen komen tot expressie in de geïnfecteerde en naburige cellen, en zorgen voor de eerste lijn van antivirale afweer. Tegelijkertijd trekt de secretie van type I IFN ook witte bloedcellen aan, die de adaptieve tak van de afweer vormen. Door witte bloedcellen te rekruteren, kunnen er uiteindelijk effectieve immuunresponsen tegen het binnengedrongen virus worden opgezet. De kernconcepten die hieraan ten grondslag liggen, worden besproken in **Hoofdstuk 1**.

Hoewel RLRs voornamelijk viraal RNA kunnen onderscheiden van cellulair RNA, blijkt dat deze RLRs wel degelijk interacteren met cellulair, niet-coderend RNA. Deze interacties kunnen de functie van deze receptoren beïnvloeden. In **Hoofdstuk 2** bespreken we dit concept. We bekijken welke cellulaire RNAs een interactie aangaan met RLRs in auto-inflammatoire ziekten, kanker en tijdens virale infectie, en hoe deze RNAs de functie van RLRs beïnvloeden. Zo kunnen bepaalde RNAs tijdens een virale infectie tot expressie komen en ervoor zorgen dat de cel alsnog een type I IFN respons opwekt. Anderzijds kunnen bepaalde RNAs ook de functie van RLRs inhiberen.

In sommige auto-inflammatoire ziekten zien RLRs per ongeluk het RNA van onze eigen cellen als een dreiging. Dit gebeurt bijvoorbeeld in het syndroom van Aicardi-Goutières (AGS). Deze ziekte wordt veroorzaakt door een defect in het enzym ADAR1, dat cruciaal is in het modificeren van cellulair dubbelstrengs (ds)RNA. Dubbelstrengs RNA is één van de belangrijkste kenmerken van virale infecties, en treedt op wanneer een RNA perfect kan baseparen met een reverse complementair RNA, of interne complementariteit heeft en intern kan baseparen. In afwezigheid van ADAR1 kunnen cellulaire RNAs dsRNA vormen, wat de RLR MDA5 activeert. Dit leidt tot een voortdurende type I IFN respons. Dit leidt in patiënten onder andere tot zware neurologische pathologie, groeidefecten en ontstekingen in de huid.

In **Hoofdstuk 3** bespreken we de rol van LGP2, de derde RLR die niet veel wordt bestudeerd, in deze ziekte. We vinden dat LGP2 essentieel is in het opwekken van de type I IFN response in combinatie met MDA5. De rol van LGP2 als RNA-receptor is hierin cruciaal. Als LGP2 afwezig is, start er geen constitutieve type I IFN respons. Dit is niet alleen een belangrijke bevinding voor AGS, maar ook voor het onderzoek naar effectieve behandelingen tegen kanker. Eerder onderzoek wijst namelijk uit dat sommige tumoren beter door het immuunsysteem kunnen worden opgeruimd als ADAR1 in deze cellen wordt uitgeschakeld. ADAR1 vormt daarom een interessant doelwit in de immuno-oncologie. Wij laten zien dat dat inderdaad een veelbelovende therapeutische optie is, maar dat het succes hiervan afhangt van de expressie van LGP2. Ook combinaties van ADAR1-depletie met epigenetische therapieën, die als doel hebben om endogene retrovirussen en transponeerbare elementen te activeren om als zodanig de RLRs te activeren, zijn afhankelijk van LGP2. In **Hoofdstuk 3** dragen we dus bij aan ons begrip van de onderliggend ziekteproces wanneer ADAR1 afwezig is. Voor patiënten met AGS zou onderzoek naar het (tijdelijk) uitschakelen van LGP2 interessant zijn, omdat dit het ontstaan van de type I IFN respons volledig zou kunnen voorkomen. Aan de andere kant zou het ook kunnen bijdragen aan een beter begrip van behandelingen tegen kanker die zich op het inhiberen van ADAR1 richten.

In **Hoofdstuk 4** behandelen we een vervolgvraag van **Hoofdstuk 3**. Het is namelijk nog onbekend welke RNA-moleculen LGP2 en MDA5 activeren als ADAR1 defect is. In dit hoofdstuk maken we gebruik van de sleutelpositie van LGP2. Door gebruik te maken van de techniek iCLIP (individual nucleotide crosslinking and immunoprecipitation), kunnen we precies bepalen welke RNA-moleculen er op een gegeven moment met LGP2 interacteren. Deze techniek berust zich op UV-licht-gemedieerde crosslinking, waarmee RNA-moleculen aan eiwitten kunnen worden gekoppeld. Door dit te doen in afwezigheid van ADAR1, zouden we dus de identiteit van de ongemodificeerde RNA's kunnen achterhalen die de type I IFN respons induceren. De resultaten van de LGP2-iCLIP tonen aan dat LGP2 in zowel wildtype als ADAR1-deficiënte cellen voornamelijk interacteert met transfer (t)RNA en ribosomaal (r) RNA. In ADAR1-deficiënte cellen blijkt LGP2 daarnaast te binden aan mRNA's van interferon-geïnduceerde genen (ISGs). Dit kon niet volledig verklaard worden door de aanwezigheid van de type I IFN-respons, wat suggereert dat er een inherente eigenschap van deze ISG-mRNA's is die hun interactie met LGP2 bevordert. Het onderzoek werd echter beperkt door een lage sequencing-diepte, waardoor niet alle mogelijke LGP2-interacties volledig konden worden vastgelegd. In de discussie bespreken we daarom verbeteringen aan de iCLIP-techniek om de identificatie van LGP2-activerende RNA's verder te verfijnen en zo de moleculaire mechanismen achter de immuunrespons bij ADAR1-deficiëntie beter te begrijpen.

In **Hoofdstuk 5** bestuderen we een ander proces in de cel. Dit hoofdstuk draait om een familie van vier kleine, niet-coderende RNA's, genaamd "vault (vt)RNA's". Deze RNA's zijn ooit ontdekt als structurele componenten van de vault, een groot complex in de cel waarvan de functie nog onbekend is. Ook van vtRNAs is de functie nog redelijk onbekend. Wij laten zien dat tijdens bepaalde infecties met RNA-virussen, zoals picorna-, alfa- en bèta-coronavirussen, de expressie van vtRNAs sterk stijgt. Dit kan betekenen dat vtRNAs een rol spelen in de antivirale afweer, of dat het virus deze vtRNAs kaapt om de eigen replicatie te bevorderen. Om dit te onderzoeken, maken we gebruik van CRISPR-Cas9-gemodificeerde cellen die drie van de vier vtRNA's (vtRNA1's) niet meer tot expressie brengen. We hebben deze cellen met twee virussen geïnfecteerd: Sindbisvirus (SINV), een alfavirus, en EMCV, een picornavirus. Beide virussen replicateerden slechter in afwezigheid van vtRNA1's, wat suggereert dat ze een provirale functie hebben. Om te onderzoeken hoe vtRNAs een

proviraal effect kunnen hebben, hebben we door middel van massaspectrometrie bepaald dat vtRNAs onder andere met twee cellulaire eiwitten, ELAVL1 en hnRNP C, interacteren. Deze eiwitten bevinden zich doorgaans in de nucleus van de cel, en worden tijdens SINV- en EMCV-infectie naar het cytoplasma getransporteerd. Daar worden ze gekaapt om virale replicatie te bevorderen. Onze resultaten laten zien dat vtRNAs de export van deze eiwitten van nucleus naar cytoplasma faciliteert, waar ze kunnen interacteren met viraal RNA om virusreplicatie te ondersteunen. De bevindingen van **Hoofdstuk 5** tonen aan dat niet-coderende vtRNA's een cruciale rol spelen in de interactie tussen de gastheercel en het virus door virale replicatie te ondersteunen. Dit opent nieuwe mogelijkheden voor antivirale therapieën die zich richten op de regulatie van vtRNA's of hun interactie met RNA-bindende eiwitten.

Als laatste worden de bevindingen van deze thesis in **Hoofdstuk 6** in de context van de huidige wetenschappelijke kennis over niet-coderend RNA en hun rol in auto-inflammatoire en infectieziekten geplaatst. Onder andere de verdere rol van LGP2 wordt besproken. Wat kunnen we leren uit **Hoofdstuk 3** en **4** over de samenwerking tussen LGP2 en MDA5? Hoe herkent LGP2 lichaamsvreemde RNA's precies? En is het mogelijk dat LGP2 een cruciale receptor is in andere auto-inflammatoire ziekten? Ook de bevindingen in **Hoofdstuk 5** worden tegen het licht gehouden. Hoe kan het dat virussen de expressie van vtRNA's bevorderen? Wat is de functie van vtRNA's tijdens homeostase? En zouden vtRNAs een target kunnen vormen voor toekomstige antivirale therapieën?

Het onderzoek dat is gepresenteerd in deze thesis belicht nieuwe aspecten van de rol die niet-coderend RNA speelt in cellen. Met de voortschrijdende inzichten van dit werk en dat van vele anderen zullen waarschijnlijk nieuwe functies, interacties en regulatiemechanismen van niet-coderend RNA worden ontrafeld. Dit zal ons niet alleen dichterbij het begrijpen van fundamentele cellulaire processen brengen, maar ook nieuwe inzichten bieden voor de ontwikkeling van therapieën die zich richten op of gebruikmaken van niet-coderende RNA's.