



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Recognition, immune evasion, and exploitation of DNA viruses

Landman, S.L.

Citation

Landman, S. L. (2025, June 25). *Recognition, immune evasion, and exploitation of DNA viruses*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4251120>

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/1887/4251120>

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

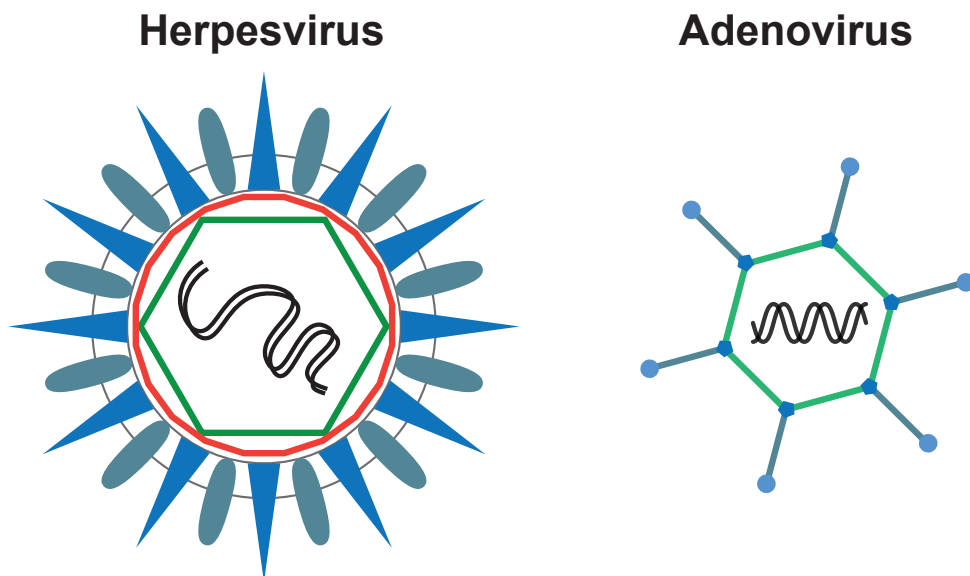
Addendum



Nederlandse samenvatting
Curriculum Vitae
List of publications
Dankwoord

Nederlandse samenvatting

Virussen zijn kleine infectieuze deeltjes die zich vermenigvuldigen in de levende cellen van een gastheer. Ze worden geclassificeerd in verschillende families op basis van morfologische eigenschappen, het type gastheer en de ziekten die ze veroorzaken. In dit proefschrift wordt er op twee virussen gefocust: herpesvirussen en adenovirussen. In figuur 1 is de structuur van beide virussen schematisch aangegeven. Virusdeeltjes bestaan uit een eiwitmantel (aangegeven in het groen) waarbinnen het genomische DNA wordt bewaard. Aan de buitenkant van de virusdeeltjes zitten eiwitten die o.a. betrokken zijn bij de binding aan het celoppervlak van de gastheer (blauw). Herpesvirussen bevatten daarnaast nog een envelop (grijs) bestaande uit lipiden, membraaneiwitten en een tegument (rood), met daarin eiwitten die het virus helpen bij de infectie. Leden van de herpes- en adenovirus families zijn in staat om zoogdieren, vogels, reptielen en vissen te infecteren, waarbij elk lid over het algemeen in staat is in één soort gastheer te leven. Er zijn tot nu toe acht soorten herpesvirussen ontdekt die mensen kunnen infecteren. Dit zijn de α -herpesvirussen herpes simplexvirus 1, 2, en Varicella Zoster virus, de β -herpesvirussen Human cytomegalovirus, Human Herpesvirus 6, en 7, en de γ -herpesvirussen Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus en Epstein-Barr virus (EBV). Een belangrijke eigenschap van herpesvirussen is de capaciteit om levenslang aanwezig te blijven in de geïnfekteerde gastheer, ook wel bekend als een latente infectie. Je zou de latente fase kunnen zien als een 'slapend' virus. Zo nu en dan ontwaakt een herpesvirus uit deze latente fase, met als gevolg de productie van nieuwe virusdeeltjes. Een voorbeeld hiervan is het sporadisch ontstaan van een koortslip, wat veroorzaakt wordt door een herpes simplexvirus in de actieve fase.



Figuur 1. Schematisch overzicht van een herpesvirus en een adenovirus.

In de adenovirus familie zijn er zeven soorten bekend die mensen kunnen infecteren. Deze worden geclassificeerd als humane adenovirussen A-G. Binnen deze soorten zijn er al meer dan 100 isolaten geïdentificeerd die elk een uniek genoomsequentie hebben. Een infectie met een adenovirus leidt doorgaans alleen tot milde ziekteverschijnselen. Adenovirussen binden een breed repertoire aan cellulaire receptoren die aanwezig zijn op het celoppervlak van de gastheer, waardoor ze een grote verscheidenheid aan cellen kunnen infecteren. Dit maakt deze virussen ideaal voor het bestuderen van virale infecties op een moleculair niveau. Daarnaast zijn deze virussen zeer geschikt als drager van een vaccin, zoals bijvoorbeeld het coronavaccin. Ook kunnen adenovirussen ingezet worden om gericht tumorcellen te vernietigen. Het gebruik van virussen voor het behandelen van kanker wordt in de kliniek oncolytische virotherapie genoemd.

Om ongecontroleerde virale infectie te voorkomen hebben cellen mechanismes ontwikkeld om virussen te herkennen en op te ruimen. Binnen deze afweermechanismen maken we onderscheid tussen het aangeboren en het adaptief immuunsysteem.

Het aangeboren immuunsysteem is de eerste afweerreactie van het lichaam tegen een infectie en bestaat uit de aanmaak en uitscheiding van kleine defensines, de activering van complementeiwitten en de productie van inflammatoire en antivirale cytokines. Deze eiwitten dragen bij aan het remmen van de infectie en het rekruteren van gespecialiseerde cellen van het immuunsysteem die de infectie verder kunnen opruimen. Een belangrijke familie van cytokines zijn de type I interferonen (IFN I). Deze hebben als rol het induceren van de aanmaak van IFN-gestimuleerde genen, die veelal een antimicrobiële rol vervullen, alsmede het activeren van adaptieve immuuncellen. De productie van IFN I wordt geïnitieerd wanneer een eiwit of het genoom van een pathogeen wordt herkend door patroonherkenningsreceptoren. Een chronische productie IFN I kan leiden tot het ontstaan van auto-immuunziekten. Daarom wordt de productie van IFN I in cellen uitgebreid gereguleerd met behulp van kleine modificaties die de activatie, locatie en signaaltransductie van eiwitten beïnvloeden.

Het adaptief immuunsysteem omvat de activatie van B en T-cellen en is essentieel voor de langdurige bescherming tegen infecties. B-cellen maken antistoffen aan die kunnen binden aan virale deeltjes waardoor deze makkelijker te herkennen zijn voor andere cellen van het immuunsysteem. Ook kunnen antistoffen een virusdeeltje neutraliseren waardoor deze niet langer een cel kan infecteren. T-cellen zijn juist op zoek naar cellen die al geïnfecteerd zijn door een virus. Dit doen ze door met hun T-cel receptor te speuren naar specifieke stukjes eiwit, ook wel peptiden genoemd, die gepresenteerd worden op het oppervlak van cellen via het major histocompatibility complex (MHC). Wanneer een T-cel receptor matcht met een peptide, zal de T-cel de geïnfecteerde cel aanvallen om zo te voorkomen dat het virus zich verder verspreidt.

Ondanks het bestaan van het aangeboren en adaptief immuunsysteem zijn virussen nog steeds in staat om zich te verspreiden. Enerzijds overleven virussen door zich zodanig aan te passen dat het adaptief immuunsysteem het virusdeeltje niet langer herkent. Anderzijds hebben virussen verschillende mechanismes ontwikkeld om zowel het aangeboren als het adaptief immuunsysteem te remmen, zodat het virus meer tijd heeft om zich te verspreiden. Het begrijpen van deze mechanismen kan het verschil maken in de strijd tegen gevaarlijke virusinfecties.

In dit proefschrift hebben we onderzocht:

1. Hoe activatie van IFN I wordt gereguleerd om auto-immuunziekten te voorkomen;
2. Hoe virussen immuunactivatie omzeilen door zelf regulerende eiwitten in te zetten;
3. Hoe we de efficiëntie van virussen om cellen te infecteren in kunnen zetten als therapie.

In **Hoofdstuk 2** beschrijven we hoe de productie van IFN I wordt gereguleerd op het niveau van het signaalmolecuul genaamd stimulator of interferon genes (STING). STING wordt geactiveerd wanneer de patroonherkenningsreceptor cGAS dubbelstrengs DNA tegenkomt in een cel. Dit kan zowel DNA zijn van een virus als een stukje eigen DNA. De activatie van STING leidt via een cascade van signaaltransducties tot de productie van IFN I. In de menselijke bevolking komen kleine variaties in het STING eiwit voor die grote invloed kunnen hebben op de activiteit van STING. Sommige mutaties leiden zelfs tot een ongecontroleerde overproductie van IFN I, wat het ontstaan van auto-inflammatoire en auto-immuunziekten als gevolg kan hebben. Dit laat zien hoe belangrijk het is dat de activiteit van STING strikt wordt gecontroleerd. We vatten in dit hoofdstuk samen hoe kleine modificaties de activiteit van STING reguleren in de cel en hoe virussen vergelijkbare modificaties gebruiken om de activatie van het immuunsysteem te onderdrukken.

In sommige cellen is STING helemaal niet functioneel. In **Hoofdstuk 3** laten we zien dat dit het geval is voor onze B-cellen. In primaire, niet-geïnfecteerde B-cellen is het STING eiwit zelfs helemaal niet aanwezig. We speculeren dat EBV, dat voornamelijk primaire B-cellen infecteert, profiteert van de afwezigheid van STING om deze cellen levenslang te infecteren. Interessant genoeg is er juist een grote hoeveelheid STING eiwit aanwezig in de eerste latente fase van EBV-geïnfecteerde B-cellen. Desondanks reageren ook deze cellen niet op de aanwezigheid van intracellulair dubbelstrengs DNA.

Een mogelijke oorzaak voor het gebrek aan een reactie in de EBV-geïnfecteerde B-cellen uit **Hoofdstuk 3** wordt omschreven in **Hoofdstuk 4**. In dit hoofdstuk hebben we uitgezocht of er latente eiwitten zijn van EBV die een negatieve invloed hebben op de immuunactivatie van cellen. We ontdekten dat een van de eiwitten genaamd Epstein-Barr virus Nuclear Antigen (EBNA) 3A de activatie van het IFN I gen sterk onderdrukt na activatie van patroonherkenningsreceptor RIG-I. Zoals de naam al suggereert, bevindt EBNA3A zich in de celkern van geïnfecteerde cellen. We hebben vervolgens het werkingsmechanisme van EBNA3A in de context van immuunsuppressie opgehelderd. EBNA3A bindt aan de transcriptiefactor IRF3 en voorkomt op deze manier dat IRF3 het IFN I gen kan activeren. Omdat peptiden van EBNA3A efficiënt door T-cellen worden herkend, kan het eiwit niet lange tijd door het virus ingezet worden. Het is daarom aannemelijk dat een combinatie van EBNA3A met andere latente eiwitten ervoor zorgt dat er gedurende de hele latente fase onderdrukking plaatsvindt van het immuunsysteem.

In de laatste drie hoofdstukken verleggen we de focus van EBV naar adenovirussen. Met behulp van genetische modificaties kunnen adenovirussen zodanig aangepast worden dat ze specifiek tumorcellen doodmaken. Deze vorm van oncolytische virotherapie heeft de afgelopen dertig jaar veel vooruitgang geboekt. Een groot obstakel is de bestaande

immunitet tegen adenovirussen wat ertoe leidt dat het oncolytische virus wordt opgeruimd voordat het voldoende effectief kan zijn. Om dit probleem te omzeilen zijn we op zoek gegaan naar adenovirussen waar nog geen (grote) neutraliserende immunitet tegen bestaat. In **Hoofdstuk 5** beschrijven we de identificatie van een nieuw adenovirus isolaat afkomstig uit een gorilla die in een dierentuin wordt gehouden. Het virus, dat we AdV-lumc014 hebben genoemd, komt grotendeels overeen met de structuur van humane adenovirussen B en E. Desondanks wijkt AdV-lumc014 zodanig af van bestaande humane en NHP soorten dat het om een nieuw soort adenovirus lijkt te gaan. We vonden geen bestaande neutraliserende immunitet in de menselijke bevolking terug voor AdV-lumc014, waardoor het potentieel geschikt is als oncolytisch virus.

Naast AdV-lumc014 hebben we nog meer NHP adenovirussen geïsoleerd. Voor een paar virussen die afkomstig waren uit een gorilla en behoren tot de NHP adenovirus soort B vonden we geen bestaande immunitet, maar wel een hoge oncolytische activiteit. Een van deze virussen hebben we gemodificeerd zodat het tumor-specifiek is en GoraVir genoemd. In **Hoofdstuk 6** laten we zien dat GoraVir in staat is om alvleesklierkankercellen te doden. Een ideaal oncolytisch virus activeert daarnaast het immuunsysteem door de tumorcellen op een immunogene manier dood te laten gaan, zodat het aangeboren en adaptief immuunsysteem gezamenlijk de tumor verder kunnen opruimen. We laten zien dat infectie GoraVir leidt tot immunogene celdood van de alvleesklierkankercellen en dat dit effect onafhankelijk is van de aanwezigheid van het STING eiwit. Omdat veel tumorcellen expressie van STING onderdrukken, is GoraVir een ideale kandidaat voor het gebruik als oncolytische virus voor de behandeling van een breed scala aan kankersoorten.

Niet alleen het immuunsysteem wordt gereguleerd met behulp van kleine modificaties zoals beschreven in **Hoofdstuk 2**, ook andere cellulaire processen worden via modificaties gecontroleerd. Eén van deze modificaties is de koppeling van een eiwit genaamd ubiquitine (UB). Niet alleen kunnen UBs vastgemaakt worden aan eiwitten, ze kunnen ook verwijderd worden door deubiquitinerende eiwitten (DUBs). Eén van deze DUBs genaamd USP32 is betrokken bij het transport van moleculen in de cel via kleine afgesloten membranen, ook wel bekend als endosomen. Adenovirussen maken gebruik van endosomen om zich te verplaatsen door een cel om hier vervolgens weer uit te ontsnappen. In **Hoofdstuk 7** kijken we naar de invloed van USP32 op de transductie van adenovirussen. Een virale transductie is succesvol wanneer het genetische materiaal van het virus in de celkern van de gastheer is afgeleverd. Het uitschakelen van USP32 leidde tot een verlaagde transductie efficiëntie van adenovirussen. De receptoren die gebruikt worden door adenovirussen om te binden aan het celoppervlak van de gastheer waren na uitschakeling van USP32 in dezelfde mate aanwezig. Het is daarom aannemelijk dat USP32 geen invloed heeft op het binnendringen van het virus, maar wel op het ontsnappen van virusdeeltjes uit de endosomen. We hebben naast USP32 een ander DUB genaamd USP54 uitgeschakeld, maar dit had geen invloed op de transductie van adenovirussen. Hoewel er mechanistisch nog veel uitgezocht moet worden, vormen deze bevindingen de basis voor nieuwe inzichten in het transductiemechanisme van adenovirussen.

In **Hoofdstuk 8** vatten we de informatie van hoofdstuk 2-7 samen en plaatsen we de bevindingen in een bredere context.

Samengevat laten we in dit proefschrift zien hoe virussen en het immuunsysteem met elkaar interacteren en hoe deze interacties door beide partijen beïnvloed worden. Enerzijds wordt het immuunsysteem strikt gereguleerd om het ontstaan van auto-immuunziekten te voorkomen. Anderzijds proberen virussen het immuunsysteem ook te ontregelen om zelf niet ontdekt te worden. Door te begrijpen hoe virussen ons afweersysteem weten te omzeilen kunnen we doelgerichte medicijnen ontwikkelen tegen schadelijke virussen zoals EBV. Het bestuderen van de infectiemechanismes van adenovirussen kunnen ons juist weer helpen bij het vinden van de optimale modificaties voor het maken van oncolytische virussen. Al met al helpt zal de complete opheldering van de complexe interacties tussen virus en gastheer ons leiden naar verbeterde behandelingen voor kanker en infectieziekten.