

# VU Research Portal

## **Oncomodulatory properties of the human cytomegalovirus-encoded receptors US28 and UL33**

Langemeijer, E.V.

2012

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

Langemeijer, E. V. (2012). *Oncomodulatory properties of the human cytomegalovirus-encoded receptors US28 and UL33*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

# samenvatting

## Oncomodulatie door US28 en UL33; twee HCMV-gecodeerde G eiwit-gekoppelde receptoren

### *GPCR*

Recentelijk, in oktober 2012, is de Nobelprijs voor de chemie toegekend aan Robert Lefkowitz en Brian Kobilka. Zij beschreven als één van de eersten een G eiwit-gekoppelde receptor, oftewel GPCR. Met behulp van radioactieve stoffen, die aan hormonen gekoppeld werden, konden Lefkowitz en Kobilka in de jaren zeventig de receptoren opsporen en vervolgens verder karakteriseren [339]. Uit de DNA-code van de adrenalinereceptor ( $\beta_2$ -adrenerge receptor) konden de onderzoekers afleiden dat dit eiwit een vorm had met zeven lange hydrofobe spiralen ( $\alpha$ -helix structuren), die in de wand (het membraan) van de cel liggen. Lefkowitz en met name Kobilka hebben veel werk gedaan om uiteindelijk de 3D structuur van de GPCRs daadwerkelijk te ontrafelen waardoor we een goed inzicht hebben verkregen op welke wijze dit soort eiwitten functioneert. Alle verschillende GPCRs die mensen aanmaken, stammen af van één stuk DNA en lijken daarom op elkaar. Deze receptoren, waarvan ieder mens ongeveer 800 verschillende versies heeft, vormen de zintuigen van de cel. Ze vangen aan de buitenkant van cellen signaalstoffen op die worden omgezet in responsen van de cel via aan de receptor gekoppelde respons eiwitten (G-eiwit,  $\beta$ -Arrestin). Dergelijke communicatie tussen eiwitten wordt ook wel signaaltransductie genoemd. Ze zorgen er onder andere voor dat

je kunt ruiken, proeven en zien. In alle cellen van het menselijk lichaam speelt de communicatie door GPCRs een zeer belangrijke rol bij alledaagse processen (slaap, honger, hartritme, ons immuun systeem), maar ook bij ziektes. Ook niet onbelangrijk is, dat meer dan een kwart van alle medicijnen zijn werking dankt aan het feit dat ze aangrijpen op dit soort receptoren. Bekende voorbeelden hiervan zijn de geneesmiddelen die de bloeddruk kunnen reguleren en anti-histaminen tegen allergieën. Behalve voor de chemie, is de ontdekking van de GPCRs door Lefkowitz en Kobilka dus ook van ontzettend groot belang geweest voor de geneeskunde. In dit proefschrift staat onderzoek aan een bijzondere klasse van GPCRs beschreven, namelijk GPCRs die aangemaakt worden door een herpesvirus. Dit virus kan menselijke cellen infecteren, waarna de virale receptoren ook in het celmembraan terecht komen. Deze virale receptoren worden door het virus ingezet in hun voordeel, bijvoorbeeld door het immuunsysteem van de geïnfecteerde gastheer te omzeilen.

### *Herpesvirussen*

Een groot deel van de bevolking is geïnfecteerd met humane herpesvirussen (HHV). Meestal zijn deze virussen onschadelijk na de eerste infectie en symptomen. Naast de lytische fase, waarin het virus zich vermenigvuldigt, kunnen deze virussen echter ook latent (slappend, onschadelijk) aanwezig blijven in de geïnfecteerde gastheer. Reactivatie van de herpesvirussen kan gebeuren wanneer het immuunsysteem verzwakt is, zoals bijvoorbeeld bij orgaantransplantaties en HIV-patienten. In dergelijke gevallen kan de activiteit van de virussen resulteren in – of bijdragen aan – ziektes (pathologieën).

In Hoofdstuk 1 wordt een overzicht gegeven van drie verschillende herpesvirussen, te weten HHV5 (humaan cytomegalovirus; HCMV), HHV4 (Epstein-Barr virus; EBV) en HHV8 (Kaposi's sarcoma geassocieerd herpesvirus; KSHV) en hun rol in de pathologie. Het DNA (genoom) van deze virussen bevat genen die coderen voor één of meerdere virale GPCRs (vGPCRs). Bij het aflezen van het virus DNA worden ook deze vGPCRs eiwitten geproduceerd, die vervolgens worden opgenomen in de celwand en daarmee de cel-eigen GPCRs aanvullen. Deze vGPCRs lijken sterk op eiwitten die belangrijk zijn voor de functionaliteit van het immuunsysteem, de humane chemokines receptoren. Gedurende de evolutie zijn de vGPCRs waarschijnlijk vanuit het menselijk genoom overgenomen door het virusgenoom. Het virus gebruikt de aangepaste (gemuteerde) vGPCRs om het immuunsysteem van de geïnfecteerde gastheer om de tuin te leiden in het voordeel van het virus.

*Constitutieve activiteit*

De virale GPCRs kunnen signalen doorgeven in de cel zonder een activerende stof (agonist of ligand) en geven dus continu een signaal af. Dit wordt constitutieve activiteit genoemd. Deze signalen kunnen de aanleiding zijn tot diverse pathologieën. Een voorbeeld hiervan is de constitutieve activiteit van de receptor ORF74, die wordt gecodeerd door het humane Kaposi's sarcoma geassocieerd herpesvirus (KSHV). Deze virale receptor ORF74 veroorzaakt Kaposi's sarcoma-gerelateerde lesies [5, 93]. Een ander voorbeeld is de EBV-gecodeerde receptor BILF1, die mogelijk betrokken is bij kanker (proliferatieve ziekten) van de lymfocyten, zoals Hodgkin- en Burkittlymfoom.

*HCMV*

Het virus waar in dit onderzoek aan is gewerkt, is het humane cytomegalovirus (HCMV). Recentelijk is gebleken dat dit virus mogelijk betrokken is bij de ontwikkeling van vasculaire ziektebeelden en verschillende soorten kankers [3]. Het HCMV genoom bevat maar liefst vier genen die coderen voor vGPCRs, te weten US27, US28, UL33 and UL78. Verschillende aspecten van de effecten die US28 en UL33 receptoren op de eiwitcommunicatie in cellen kunnen hebben staan in dit proefschrift beschreven. Van beide eiwitten was al bekend dat ze ook constitutief actief, dus zonder dat een activerende stof hoeft te binden aan het eiwit, signaaltransductie kunnen activeren.

*Doel van dit onderzoek*

Het doel van dit onderzoek is om de rol van de HCMV-gecodeerde receptoren US28 en UL33 beter te begrijpen. Met name de potentiële rol van deze constitutief actief signalerende vGPCRs in het verstoren van de communicatie tussen eiwitten in een cel (intracellulaire signaaltransductie) is onderzocht. Onze aanwijzingen hoe dit zou kunnen bijdragen aan het ontstaan van kanker staan beschreven in dit proefschrift.

*Literatuuronderzoek*

In de introductie (**Hoofdstuk 1**) is de algemene en huidige wetenschappelijke kennis van enkele van de bovengenoemde HHVs en hun vGPCRs beschreven. Belangrijke focus in dit hoofdstuk ligt op de HCMV gecodeerde vGPCRs US28 en UL33. Uit literatuuronderzoek blijkt dat er meerdere groepen wereldwijd onderzoek doen aan de verschillende aspecten van deze vGPCRs, en ook de link van het cytomegalovirus en kanker.

### US28

**Hoofdstuk 2, 3 en 5** richten zich speciaal op de HCMV gecodeerde chemokine receptor US28. In 2006 heeft onze groep het tumorvormende vermogen van US28 laten zien [6]. Muis cellen (NIH-3T3) met het US28 eiwit werden daarvoor geïnjecteerd in muizen. Dit resulteerde in versnelde celdeling door verhoogde expressie van het celcyclus-regulerende eiwit Cycline D1 en bloedvatvorming door expressie van de vasculaire endotheel groeifactor VEGF. Dit leidde tot tumorvorming in muizen (xenograft) met een geïnactiveerd immuunsysteem.

In **Hoofdstuk 2** tonen we aan dat er in aanwezigheid van US28, meer van het kanker-gerelateerde enzym cyclooxygenase 2 (COX-2) wordt geproduceerd in de cel. COX-2 leidt tot de expressie van VEGF. Met behulp van de COX-2-specifieke remmer Celecoxib konden we de VEGF secretie (*in vitro*) en de tumorvorming in de muizen (*in vivo*) remmen.

In 2010 heeft onze groep de aanwezigheid van de US28 receptor in hersentumormateriaal (glioblastoma) aangetoond [80]. Bovendien was er een negatieve correlatie tussen US28 expressie en de levensduurprognose van de patient met glioblastoma.

In **Hoofdstuk 3** laten we het effect van US28 op de kanker-gerelateerde  $\beta$ -catenin signaaltransductieroute zien. Hiervoor is gebruik gemaakt van een specifieke reporter gen assay (Tcf-Lef Luciferase). De  $\beta$ -catenin signaleringsroute wordt geactiveerd door US28 via het G eiwit. Dit is aangetoond met de mutant US28-R<sup>129</sup>A, die geen G-eiwit meer kan koppelen. Met de mutant US28-R<sup>129</sup>A was geen Tcf-Lef activatie te zien. Het mechanisme van signaaltransductie activatie blijkt echter niet via de klassieke (Wnt) signaaltransductie route te gaan, maar via een alternatieve route. Met behulp van studies met remmers (inhibitors) en virus experimenten, is deze alternatieve route voor een deel in kaart gebracht. Via de eiwitten Rho en Rock wordt  $\beta$ -catenin geactiveerd, hetgeen gepaard gaat met translocatie van  $\beta$ -catenin (translocatie) naar de celkern (nucleus) en verhoogde expressie van het Tcf-Lef reporter gen. Dit mechanisme zou verantwoordelijk kunnen zijn voor het ontstaan of verder ontwikkelen van kanker. Bovendien biedt dit mechanisme perspectief voor nieuwe medicijnen tegen hersentumoren, door ofwel direct de US28 receptor als aangrijppingspunt te gebruiken, of de door US28 geactiveerde eiwitten.

In **Hoofdstuk 5** is gekeken naar een ander niveau van regulatie van signaaltransductie in cellen die de US28 receptor tot expressie brengen. Dit met behulp van epigenetisch onderzoek. Bij epigenetisch onderzoek wordt gekeken naar de veranderde mogelijkheden genexpressie te bewerkstelligen ten gevolge van aanpassingen op het DNA. We tonen aan in **Hoofdstuk 5** dat onder invloed van de US28 receptor een dergelijke verandering plaatsvindt op de promotor van het Cycline D1 gen. Op de cytosines van een specifiek stuk van dit DNA, voor de

transcriptie-startplaats van Cycline D1, is in de aanwezigheid van US28 een verminderde hypomethylatie (minder CH<sub>3</sub>-groepen aan het DNA) waargenomen. Hierdoor vindt er meer aanmaak van RNA plaats. Ook het cycline D1 eiwit is meer aanwezig in de US28-bevattende cellen. Zoals eerder beschreven, leidt verhoogde expressie van dit eiwit tot versnelde celdeling.

### UL33

Het effect van US28 dat de ontwikkeling van tumoren bevordert is ook gevonden voor UL33, een andere virale G-eiwit gekoppelde receptor die door HCMV wordt gecodeerd. In **Hoofdstuk 4** beschrijven we de verschillende signaaltransductieroutes, die door UL33 kunnen worden geactiveerd in cellen. Deze omvatten, net zoals beschreven voor US28, ook de NFAT, STAT3, VEGF, COX-2 en Tcf-Lef ( $\beta$ -catenin) signaleringsroutes. Vervolgens laten we ook UL33-gestimuleerde tumor-groei zien in muizen met een geïnactiveerd immuunsysteem. Bovendien zien we dat er in hersentumormateriaal (glioblastoma) ook de UL33 receptor aanwezig is. De aanwezigheid van de lichaamsvreemde receptor UL33, maar ook US28, in tumorcellen, zouden tot een effectievere (want specifiekere/doelgerichtere) behandeling van dit soort hersentumoren kunnen leiden.

### Discussie

In de discussie (**Hoofdstuk 6**) worden hypothesen gegeven over eventuele gevolgen van de aanwezigheid van de vGPCRs US28 en UL33 receptoren in tumoren. Bij gelijktijdige aanwezigheid van deze receptoren in een cel kan dit gevolgen hebben voor de activatie van één of beide receptoren [89]. Behalve in glioblastoma [310], wordt HCMV misschien ook nog wel van groter belang in andere typen hersentumoren, zoals medulloblastoma, speekselklierkanker en darmkanker, etc. Welke andere virale en cellulaire factoren bij deze tumoren mogelijk nog betrokken zijn is nog nader te bepalen door vervolgonderzoek.

Samenvattend laat dit proefschrift zien dat de HCMV-gecodeerde vGPCR US28 verschillende kanker-gerelateerde signaaltransductieroutes in cellen kan activeren. Deze kunnen mogelijk verantwoordelijk zijn voor de ongecontroleerde celdeling van cellen en zouden dus een rol kunnen spelen bij HCMV-gerelateerde kanker. Ook veranderingen op het DNA niveau in cellen (epigenetische modificaties) kunnen daarbij een rol spelen. Aangezien expressie van de UL33 receptor ook kanker-gerelateerd (proliferatief) gedrag laat zien, lijkt meer onderzoek naar deze virus-gecodeerde receptoren, hun invloed op de signaaltransductie in de geïnfecteerde cellen en de cellen daar omheen, nodig. Ook de ontwikkeling van mogelijke remmende stoffen (inverse agonisten) voor US28 en/of UL33 zou van grote waarde kunnen zijn voor patiënten met hersentumoren of andere HCMV-gerelateerde ziekten.