

# VU Research Portal

## Herpesvirus-Encoded G Protein-Coupled Receptors as Modulators of Cellular Signaling Pathways

Maussang Detaille, D.A.B.

2009

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

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

Maussang Detaille, D. A. B. (2009). *Herpesvirus-Encoded G Protein-Coupled Receptors as Modulators of Cellular Signaling Pathways*. [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)

## **Herpesvirus-gecodeerde G-eiwit-gekoppelde receptoren als modulators van cellulaire signalering**

Humane Herpesvirussen (HHV) zijn alomvertegenwoordigd in de bevolking. Meestal zijn ze onschadelijk na eerste infectie, maar ze hebben de capaciteit om latent aanwezig te blijven in de geïnfekteerde gastheer. Bij slecht functioneren of tijdelijke onderdrukking van het immuunsysteem van de gastheer worden herpesvirussen geheractiveerd, wat tot sterke pathologische omstandigheden kan leiden.

HHV-5, ook bekend als humaan cytomegalovirus (HCMV), is een belangrijke ziekteverwekker in transplantatiepatiënten waarbij het immuunsysteem is onderdrukt en lijkt betrokken te zijn bij de ontwikkeling van vasculaire en proliferatieve ziekten (Soderberg-Naucler 2006). Een ander veelonderzocht herpesvirus is HHV-4, vooral bekend onder de naam Epstein-Barr Virus (EBV), welke betrokken is bij proliferatieve ziekten van de lymfocyten zoals Hodgkin- en Burkittlymfoom (Kutok and Wang 2006).

Herpesvirussen hebben gedurende hun evolutie meerdere manieren ontwikkeld om het immuunsysteem van de gastheer te beïnvloeden, om zodoende stand te houden. Ze hebben genen van de gastheer geïntegreerd in hun genoom en deze aangepast in hun eigen voordeel. HHVs van de beta en gamma families bezitten genen die coderen voor virale G eiwit gekoppelde receptoren (vGPCRs). Deze stammen af van de menselijke chemokine receptoren. Bijvoorbeeld de genomen van HCMV en EBV bevatten respectievelijk vier (US27, US28, UL33, UL78) GPCRs en één (BILF1) GPCR (Rosenkilde, Smit et al. 2008). De karakteristieken van het grootste deel van deze vGPCRs zijn zodanig dat ze, in tegenstelling tot humane chemokine receptoren, op een constitutieve manier kunnen signaleren. Dit heeft de modulatie van de intracellulaire signaleringsroutes tot gevolg en leidt tot diepgaande effecten op de het biologische gedrag van de getroffen cel. Een opvallend voorbeeld van het fysiologische belang van vGPCRs is aangetoond met het ORF74 gen van HHV-8 (ook bekend onder de naam Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV). Talrijke *in vitro* en *in vivo* studies hebben aangetoond dat de expressie van deze virale chemokine receptor leidt tot cellulaire veranderingen (Bais, Santomaso et al. 1998) en de ontwikkeling van Kaposi's sarcoma-achtige laesies in ORF74 tot expressie brengende transgene muizen (Yang, Chen et al. 2000). Dit laat zien dat de expressie van één enkele vGPCR van cruciaal belang is in KCHV- gerelateerde ziekten.

Het doel van dit proefschrift is het begrijpen van de biologische relevantie van de HCMV-gecodeerde chemokine receptor US28 en van

de EBV-gecodeerde vGPCR BILF1, met andere woorden, zijn deze eiwitten betrokken bij de levenscyclus van het virus en/of virale ziektebeelden?

Hoofdstuk 1 en 2 zijn introductiehoofdstukken die uitgebreid de huidige wetenschappelijke kennis van vGPCRs beschrijven. Hoofdstuk 1 in het bijzonder beschrijft de algemene kennis van alle bekende HHVs van de beta en gamma subfamilies, door het geven van achtergrondinformatie over de structuur van deze virussen, viraliteit, virale routes, maar ook de ziektes waaraan ze gerelateerd zijn. Daarnaast beschrijft dit hoofdstuk alle vGPCRs van deze virussen en hun link met de pathologische processen en de geassocieerde virale ziekten. Hoofdstuk 2 richt zich op de verschillende technieken die gebruikt worden om deze vGPCRs te bestuderen. Uitgaande van de technieken die wij gebruiken in ons onderzoek, wordt een breed scala aan protocollen gegeven, variërend van moleculaire biologie naar celbiologie, virologie en oncologie.

Hoofdstukken 3 tot en met 5 richten zich op de HCMV gecodeerde chemokine receptor US28. In hoofdstuk 3 laten we het tumorvormende vermogen van US28 zien. Wanneer US28 stabiel tot expressie wordt gebracht in NIH-3T3 cellen, kunnen we laten zien dat deze receptor op een constitutieve manier cellulaire proliferatie en de secretie van de angiogenese factor VEGF (vasculaire endotheliale groeifactor) kan induceren. Studies gebruik makend van transiente transfecties wijzen kinases en transcriptie factoren aan die de expressie van VEGF reguleren in US28 tot overexpressie brengende COS-7 cellen. Ten slotte leidt xenograft implantatie van NIH-3T3 cellen die US28 tot expressie brengen tot de vorming van tumoren in naakte muizen. Om te onderzoeken welke oncogenese factoren verantwoordelijk zijn voor de capaciteit van US28 om cellen te veranderen, gebruikten we een microarray-aanpak in hoofdstuk 4 en tonen we aan dat het kankergerelateerde enzym cyclooxygenase 2 (COX-2) een belangrijke factor in US28-gemedieerde transformatie is. Met behulp van een COX-2 specifieke remmer, Celecoxib, kunnen we *in vitro* de uitscheiding van VEGF en *in vivo* de vorming van tumoren remmen. In hoofdstuk 5 gebruikten we een andere aanpak om te onderzoeken welke factoren US28 tot expressie brengende NIH-3T3 cellen uitscheiden. We laten zien dat US28 naast VEGF ook interleukine (IL-)6 laat vrijkomen. Gelijk aan wat eerder is waargenomen in verscheidene vormen van kanker, tonen we aan dat US28 een positieve terugkoppeling tussen de IL-6 secretie en de activering van STAT3 (signaal transducer en activator van transcript 3) induceert. De activering van de IL-6/STAT3 as via de NF- $\kappa$ B transcriptie factor is van belang voor de waargenomen proliferatie van de US28 tot expressie brengende NIH-3T3 cellen. Zeer interessant is dat

experimenten in hoofdstuk 3 tot en met 5 ook laten zien dat met het verwijderen van het US28-gen uit het HCMV genoom de constitutieve activering van signaleringstrajecten in de besmette cellen vermindert. Cellen geïnfecteerd met deze HCMV US28 deletie mutant laten een verminderde activering van STAT3 en de promotorgenen van VEGF en COX-2 zien. De constitutieve activiteit van US28 in HCMV-geïnfecteerde humane glioblastoma cellen lijkt daarom een belangrijke rol te spelen in de virale activering van kanker-gerelateerde signaleringsroutes.

De rol van de door EBV-gecodeerde vGPCR BILF1 werd onderzocht in transgene muizen die dit eiwit tot expressie brengen in B-cellen. B-lymfocyten-specifieke expressie werd gekozen op basis van de tropisme van het virus voor deze cellulaire subpopulatie. Transgene muizen ontwikkelen verrassend genoeg een ernstige B cel lymfopenie, gekenmerkt door een afname in het totale aantal B-cellen in verschillende organen zoals beenmerg, milt en lymfeklieren. Deze B-cel-lymfopenie leidt tot een algemene daling van de titers van immunoglobulinen, hetgeen aanduidt dat deze muizen een slechter immuunsysteem hebben. Verder is het vermogen van transgene muizen om te reageren op antigenen gedaald in vergelijking met wild-type muizen. De B-cel lymfopenie blijkt te wijten te zijn aan een uitgebreide apoptose van de B-cellen, zoals aangetoond door middel van Annexine V kleuring.

Samenvattend laat dit proefschrift zien dat de constitutieve activiteit van de HCMV-gecodeerde vGPCR US28 verantwoordelijk is voor de ongecontroleerde proliferatie van cellen en een rol kan spelen in proliferatieve virale ziekten. Dit in tegenstelling tot de EBV vGPCR BILF1 die *in vivo* constitutief cellulaire apoptose lijkt te induceren en daarmee een functie kan hebben tijdens de lytische replicatie van het virus.