



# Samenvatting in het Nederlands

---

# Samenvatting in het Nederlands

---

## Epstein-Barr virus gecodeerd BARP1 eiwit: immunopathologische rol, transcriptionele regulatie en diagnostische toepassing in nasofaryngeaal carcinoom.

Het Epstein-Barr virus (EBV) is sterk en causaal geassocieerd met twee tumoren van epitheliale oorsprong, namelijk bijna 100% van de ongedifferentieerde nasofaryngeale carcinomen (NPC) en 10% van de maagcarcinomen (GC) wereldwijd. In deze tumoren vertoont EBV een latent genexpressieprofiel, waarbij slechts enkele EBV genen tot expressie komen die essentieel zijn voor tumorcelgroei en overleving, en voor virale persistentie. Eén van deze genen is het BamH-I rightward frame 1, bekend als BARP1 welke het onderwerp van dit proefschrift is. BARP1 is een viraal oncogen (kankergen) met diverse functies in zowel het stimuleren van celgroei en overleving, maar het heeft ook effecten op het immuunsysteem. Opvallend is dat BARP1 alleen tot expressie komt in EBV geassocieerde carcinomen en niet in de lymfomen die ook met het virus geassocieerd worden. Dit suggereert dat de functie en rol van het BARP1 gen kan variëren afhankelijk van het celtype. Meer inzicht in deze rol kan de ontwikkeling van geneesmiddelen voor de behandeling van EBV geassocieerde kanker ondersteunen. Naast het nut van BARP1 voor het virus en de tumor, heeft BARP1 specifieke eigenschappen die mogelijk gebruikt kunnen worden voor de diagnostiek van EBV geassocieerde tumoren, waarvan de belangrijkste is dat BARP1 een gesecreteerd eiwit is, wat het mogelijk zou maken om minder invasief patiëntenmateriaal te verkrijgen en screenings op te zetten.

Het doel van dit proefschrift was om de functie, regulatie en het diagnostisch gebruik van het BARP1 eiwit in EBV geassocieerde carcinomen verder te onderzoeken.

**Hoofdstuk 2** bevat een state-of-the-art overzicht van BARP1. Het ontcijferen van de rol van BARP1 in de biologie van het Epstein-Barr virus zal bijdragen tot nieuwe diagnostische en behandelingsopties voor EBV geassocieerde kankersoorten. Naast allereerst een beschrijving van de BARP1 eiwitstructuur en genexpressie in EBV geassocieerde tumoren, wordt het aspect van BARP1 als diagnostisch hulpmiddel ook kort besproken. Het oncogene vermogen en de immuunmodulerende eigenschappen van BARP1 worden in detail besproken met inbegrip van aspecten die nader onderzoek nodig hebben.

EBV-positieve nasofarynxcarcinoomcellen expresseren het virale BARP1 gen, dat codeert voor een gesecreteerd hexameric eiwit. Ons doel was om te analyseren of het serum van patiënten met NPC antilichamen tegen BARP1 eiwit bevat, opdat deze gebruikt kunnen worden voor een vroege diagnose van NPC.

**Hoofdstuk 3** beschrijft de ontwikkeling van een serologische test om antilichamen tegen het BARP1 eiwit aan te tonen. Eerder werk van onze groep (2001-2005; VUmc proefschrift J. van Beek) toonde aan dat korte peptiden uit voorspelde immunodominante domeinen van het

BARF1 eiwit en het recombinant eiwit gezuiverd uit niet-humane expressiesystemen geschikt zijn voor de analyse van immuunresponsen. Hoewel er, in zowel muizen als cavia's, antilichamen werden gegenereerd tegen deze peptiden en recombinante eiwitten welke gedenuatureerd BARF1 eiwit uit een menselijke expressiesysteem herkenden, werden humane antilichamen niet gedetecteerd met deze hulpmiddelen. Aangezien dit te wijten kon zijn aan de recentelijk gedefinieerde (2006) complexe hexamere structuur van BARF1, hebben wij van NPC afgeleid natief BARF1 tot expressie gebracht en geïsoleerd vanuit een humaan expressiesysteem waarin posttranslationale modificaties zoals glycosylering en vouwing gelijk zijn aan het gesecreteerde BARF1 eiwit *in vivo* (sBARF1). Met dit gezuiverd native hexameric sBARF1 eiwit konden wij aantonen dat patiënten met NPC een significant hogere antilichaamrespons tegen sBARF1 hebben vergeleken met gezonde vrijwilligers, maar dat de anti-BARF1 respons relatief zwak was in vergelijking met reacties op andere EBV eiwitten, zoals VCA-p18 en EBNA1. De aanwezigheid van antilichamen tegen natief BARF1 in patiënten met NPC toonde indirect aan dat BARF1 *in vivo* als hexameer eiwit circuleert, gesecreteerd door de tumorcellen van deze patiënten. Vanwege de beperkte immunogeniciteit van BARF1 is deze test niet geschikt als een diagnostische test voor de vroege opsporing van NPC.

Sequentievariatie in het EBV genoom kan de ontwikkeling en progressie van ziekte beïnvloeden, en veranderingen in de interacties tussen het virus en het immuunsysteem van de gastheer veroorzaken. Dit is eerder aangetoond voor verschillende belangrijke EBV genen zoals EBNA1, LMP1 en het lytische schakelaar eiwit Z. In **Hoofdstuk 4** werd de sequentievariatie van het BARF1 gen onderzocht in relatie tot het EBV genotype, de virale load en serologische markers. Het BARF1 gen uit Indonesische donoren toont kleine nucleotide variaties op de prototype EBV B95.8 sequentie, maar de meeste mutaties resulteerden niet in aminozuursubstituties op eiwitniveau. De drie meest frequent aangetroffen aminozuursubstituties (V29A, W72G, H130R) leiden waarschijnlijk niet tot grote effecten op de tertiaire structuur, gebaseerd op de BARF1 kristalstructuur. De evolutionair goed geconserveerde sequentie impliceert dat BARF1 functionele relevantie heeft in EBV biologie. Met behulp van de serologische test uit hoofdstuk 3 hebben we vastgesteld dat de aanwezigheid van aminozuursubstituties in het BARF1 eiwit in patiënten met NPC de detectie van antilichaamreacties tegen BARF1 niet heeft beïnvloed.

EBV persisteert in een dynamisch evenwicht met het menselijke immuunsysteem en heeft, net als vele andere hardnekkige herpesvirussen, talloze mechanismen verworven voor het ondermijnen of ontwijken van het immuunsysteem. In **Hoofdstuk 5** werd de rol van gesecreteerd BARF1 eiwit als een immuunmodulator bestudeerd. De BARF1 eiwitsequentie komt gedeeltelijk overeen met een geconserveerd structureel domein in verschillende groeifactorreceptoren, waaronder de receptor voor macrofaag colony stimulating factor (M-CSF receptor). Gebruikmakend van ons gezuiverd natief sBARF1 uit hoofdstuk 2, werden polyklonale antilichamen ontwikkeld die werden gebruikt om M-CSF samen met sBARF1 te immunoprecipiteren, waaruit blijkt dat sBARF1 M-CSF bindt. De cytokine afhankelijke humane myeloïde MUTZ3 cellijn werd ingezet om aan te tonen dat sBARF1 binding aan M-

CSF functioneel interfereert met de celproliferatie. Antilichamen tegen hexameer natief sBARF1 waren in staat dit effect te blokkeren. Uit de hoeveelheid BARF1 eiwit die nodig is om M-CSF functioneel te blokkeren konden we vaststellen dat één sBARF1 hexameer drie M-CSF dimeren bindt. Plaatsgerichte mutatie van de voorspelde sBARF1/M-CSF interactieplaats onthulde dat sBARF1 M-CSF met drie "pincet"-achtige lussen aan de buitenzijde van de ringen bindt. Het effect van sBARF1 op M-CSF gedreven differentiatie van mononucleaire fagocyten werd functioneel geëvalueerd, waaruit bleek dat blootstelling aan sBARF1 tijdens de differentiatie een negatief effect heeft op de mogelijkheid om apoptotische cellen te fagocyteren, de productie van zuurstofradicalen, en functionele oppervlakte merkers zoals de Fc-receptor CD16. We concluderen dat sBARF1 eiwit een krachtige lokreceptor is voor M-CSF, en zo de functie en differentiatie van mononucleaire fagocyten belemmert. BARF1 onderdrukt de differentiatie van M2 macrofagen, die de eerste lijn van antivirale verdediging zijn. We veronderstellen dat remming van mononucleaire fagocyten door sBARF1 de antivirale verdediging tijdens lytische replicatie vermindert, en zo de macrofagen in staat stelt om voor de overdracht van geïnternaliseerde virussen te zorgen, in plaats van inactivatie van het virus. In EBV-geassocieerde maligniteiten zou immunomodulatie van mononucleaire fagocyten door BARF1 een mogelijk mechanisme vormen waardoor de macrofaag gemedieerde anti-tumor immuniteit wordt ontdoken.

De transcriptionele regulatie van het BARF1 gen is tot nu toe een onontgonnen terrein. Hoewel BARF1 mRNA kan worden gedetecteerd in alle celtypen tijdens lytische replicatie, wordt het gen in latentie alleen tot expressie gebracht in tumoren met een epitheliale achtergrond, wat aangeeft dat de activering van de BARF1 promotor celtype specifiek is. In **Hoofdstuk 6** en **7** gaan we op onderzoek uit naar de transcriptionele regulatie van BARF1. EBV regelt veel van zijn genen door promotormethylering. Een bisulfiet sequencing analyse toonde aan dat het BARF1 controlegebied sterk gemethyleerd is in meerdere celtypes en in C15 en C17 muis xenograft NPC tumormateriaal.

In **Hoofdstuk 6** werd een BARF1 promotor luciferase construct gemaakt en gebruikt om de transactiverende activiteit van de immediate-early eiwitten R en Z te evalueren. Door middel van methylering van het construct konden we onderzoeken hoe methylatie het vermogen van promoteractivatie beïnvloedt. We vonden dat de EBV gecodeerde transcriptionele activator R, maar niet Z, een 50- tot 250-voudige verhoging van luciferaseactiviteit tot gevolg had. Chromatine immuunprecipitatie (ChIP), elektroforetische mobiliteit verplaatsingstest (EMSA) en mutagenese van de R-reagerende elementen (RREs) toonden directe binding van het R eiwit met RREs tussen -554 en -327 nucleotiden ten opzichte van de transcriptionele BARF1 ATG startplaats. Met behulp van kwantitatieve reverse transcriptase-polymerase kettingreactie (RT-PCR) toonden we aan dat R in staat is de BARF1 promoter in de context van het virale genoom te transactiveren, binnen 6 uur na transfectie met een R expressievector.

In **Hoofdstuk 7** bleek uit een analyse van de transcriptiefactor bindingsplaats van het BARF1 promotorgebied dat dit potentiële bindingsplaatsen bevat voor de p53-familie van transcriptiefactoren. Eén lid van deze p53-familie van transcriptiefactoren is de  $\Delta Np63\alpha$

isovorm van p63, die sterk tot expressie komt in ongedifferentieerd NPC en wordt beschouwd als een marker voor epitheliale differentiatie. Reporter testen, die uitgevoerd werden met het BAF1 promotor luciferase construct toonden aan dat specifiek de  $\Delta Np63\alpha$  isoform, en geen van de andere p53-familieleden, de BAF1 promoter kan transactiveren. Daarnaast concludeerden wij dat, hoewel  $\Delta Np63\alpha$  het BAF1 promotorreporter construct kan transactiveren, additionele factoren nodig zijn om het BAF1 te transactiveren in de context van het virale genoom. Onze conclusie was dat in EBV-positieve NPC en GC, BAF1 expressie mogelijk wordt geïnduceerd door de epitheliale differentiatiemarker  $\Delta Np63\alpha$ . Hoewel BAF1 mRNA frequent wordt gedetecteerd in EBV geassocieerde carcinomen zoals nasofaryngeale- en maagcarcinomen, is het bewijs dat het eiwit daadwerkelijk vertaald wordt *in vivo* beperkt. In **Hoofdstuk 8** hebben wij verschillende werkwijzen voor de detectie van BAF1 eiwit geëvalueerd. Nieuwe monoklonale en polyklonale antilichamen werden ontwikkeld die in staat waren om hexameer natief sBAF1 eiwit te herkennen en te binden. Deze antilichamen werden gebruikt voor het opzetten van een antigeen-bindings ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) test voor de detectie van sBAF1 in sera van patiënten met NPC. Dezelfde antilichamen werden ook beoordeeld voor het gebruik in immunofluorescentie- (IF) en immunohistochemie (IHC)-kleuringen in cellen en weefsels. BAF1 werd ook geëvalueerd voor zijn potentieel als een serum biomarker met een Mass-Spec MicroSequencing (MS/MS) proteomics benadering, dat een hoofd-identificatiepeptide opleverde die geschikt is voor een gerichte proteomics analyse. We concludeerden dat de antigeen-bindings ELISA in zijn huidige vorm sBAF1 niveaus kan detecteren boven de 10 ng/ml, wat niet gevoelig genoeg bleek om met zekerheid stellen dat sBAF1 niveaus in NPC patiëntensera boven die van gezonde EBV dragers liggen. De MS/MS proteomics aanpak in het huidige formaat voor ons beschikbaar bij VUmc bleek minder gevoelig dan de antigeen-bindings ELISA. We toonden verder aan dat antilichamen, die wel geschikt zijn voor het detecteren van BAF1 eiwit in getransfecteerde cellen met behulp van immunohistochemie, de BAF1 eiwitexpressie niet konden aantonen in BAF1 mRNA-positief NPC en GC weefsel. Onze hypothese is dat BAF1 snel en volledig wordt gesecreteerd uit tumorcellen en rechtstreeks bindt aan M-CSF of andere nog onbekende factoren om complexen te vormen. Deze complexen worden ofwel snel afgebroken door lokale myeloïde cellen, of maskeren de BAF1 epitopen, met als gevolg dat BAF1 eiwit niet meer traceerbaar is of onzichtbaar is voor antilichamen. Wij stellen voor dat toekomstig onderzoek geconcentreerd zou moeten worden op een gerichte proteomics aanpak.