



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Silencing of HIV-1 co-factors

Eekels, J.J.M.

Publication date
2011

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Eekels, J. J. M. (2011). *Silencing of HIV-1 co-factors*. [Thesis, fully internal, Universiteit van Amsterdam].

General rights

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

Samenvatting

HIV-1 en AIDS

Het humaan immuun deficiëntie virus type 1 (HIV-1) is bekend om het veroorzaken van de ziekte “acquired immune deficiency syndrome” ofwel AIDS. Eind 2009 waren wereldwijd 33 miljoen mensen geïnfecteerd en in dat jaar zijn er 2,5 miljoen nieuwe besmettingen bijgekomen. HIV-1 infecteert cellen van het immuunsysteem, wat ertoe leidt dat patiënten uiteindelijk geen werkend immuunsysteem meer hebben. Tegenwoordig bestaat er een effectieve combinatietherapie met meerdere soorten drugs waarmee de virusreproductie doeltreffend geremd kan worden. Helaas kleven er ook vele nadelen aan deze therapie; patiënten moeten dagelijks medicijnen slikken voor de rest van hun leven, chronisch gebruik kan tot toxiciteit leiden, de therapie is relatief duur en de medicijnen kunnen de ziekte niet genezen. Vanwege de hoge mutatiesnelheid van HIV-1 kunnen resistente virusvarianten ontstaan waardoor sommige virus remmers niet meer werken. Een vaccin is nog niet in beeld en het is daarom nodig om nieuwe therapeutische strategieën te ontwikkelen om HIV-1 te bestrijden.

DNA, RNA, eiwitten en RNA interferentie

Het menselijk lichaam bestaat, net zoals alles wat leeft, uit cellen. Deze cellen kunnen verschillende vormen en functies hebben, spiercellen doen heel wat anders dan T cellen, maar de bouw van alle cellen komt grotendeels overeen. De buitenkant wordt gevormd door een membraan, in de cel bevinden zich allerlei compartimenten die bijvoorbeeld de cel van energie voorzien. In de kern van elke cel bevindt zich de genetische blauwdruk; het DNA. DNA bestaat uit een lange ketting die uit twee strenggen bestaat en bevat alle informatie om eiwitten te kunnen produceren. Eiwitten zijn de bouwstenen van het leven, de werkpaarden die biologische processen uitvoeren. Om van DNA naar eiwit te kunnen gaan is een tussenstap nodig; dit is het messenger (boodschapper) RNA of mRNA. RNA lijkt op DNA, maar bestaat slechts uit één streng. Dit proces wordt het centrale dogma van de moleculaire biologie genoemd: DNA wordt vertaald in mRNA, mRNA in eiwit. Als HIV-1 een cel infecteert, dan wordt de virale genetische blauwdruk ingebouwd in het DNA genoom van de geïnfecteerde cel. Daarna vindt de productie van nieuwe HIV-1 eiwitten op dezelfde manier plaats als voor alle andere eiwitten in de cel; er wordt mRNA gemaakt en dat wordt vertaald in nieuwe HIV-1 eiwitten. De geïnfecteerde cel wordt zodanig gemanipuleerd dat er voornamelijk nieuwe HIV-1 deeltjes gemaakt gaan worden.

In dit proefschrift beschrijven we het gebruik van RNA interferentie als antivirale methode. De naam zegt het al; met deze techniek wordt de RNA stap verhinderd, om precies te zijn wordt het mRNA afgebroken zodat er geen eiwit meer gemaakt kan worden. Deze techniek is pas onlangs ontwikkeld, maar werd al snel een standaard techniek in de wetenschap. Het berust op sequentie-specifieke genregulatie door dubbelstrengs RNA, een wat vreemde vorm van RNA. Wanneer één streng van dit RNA precies past op een mRNA wordt dit molecuul in stukken geknipt, of de translatie naar eiwitten wordt geremd (Zie ook figuur 1.3). Zulk dubbelstrengs RNA kan in het lab in de cel gebracht worden via transfectie met small interfering RNAs (siRNAs). Deze kleine stukjes dubbelstrengs RNA worden in de cel herkend en in een eiwitcomplex geladen, de RISC

vernietiger. Als het geladen RISC een mRNA vindt met een sequentie complementair aan de siRNA, dan wordt het mRNA kapot geknipt en dit betekent geen eiwitproductie. We kunnen met deze techniek dus doelgericht de expressie van bepaalde eiwitten remmen.

Lentivirussen en RNAi tegen HIV-1

Het is ook mogelijk om een continuë productie van dubbelstrengs RNA in de cel tot stand te brengen. Daarvoor worden lentivirus vectoren gebruikt, welke zijn afgeleid van HIV-1. Een bruikbare eigenschap van HIV-1 is dat het zijn genetisch materiaal in het genoom van de gastheercel kan inbouwen. Virussen worden zo gemodificeerd dat ze deze eigenschap behouden, maar zich niet meer kunnen vermenigvuldigen en ziekte veroorzaken. Via zo'n gentherapie kan genetisch materiaal nodig voor het maken van dubbelstrengs RNA in de cel gebracht worden, waarna de cel continue dubbelstrengs RNA gaat produceren die shRNAs (short hairpin RNA) worden genoemd. shRNAs werken bijna hetzelfde als siRNAs. shRNAs zijn met succes in het laboratorium tegen HIV-1 gebruikt; menselijke T cellen werden behandeld met lentivirussen, de cellen produceerden continue shRNAs tegen HIV-1 mRNA waardoor de cellen niet meer bevattelijk zijn voor HIV-1. Echter, de hoge mutatiesnelheid van HIV-1 zorgt ervoor dat het virus resistentie kon ontwikkelen, vooral als er maar één shRNA remmer wordt gebruikt. Eén enkele mutatie in het HIV-1 mRNA was genoeg om de RNAi remming te omzeilen.

Een antwoord hierop zou kunnen zijn om niet het virus aan te vallen, maar de RNAi methode te gebruiken tegen bepaalde eiwitten van de gastheercel. HIV-1 is een klein virus en maakt zelf maar 15 eiwitten. Dit betekent dat het veel eiwitten uit de gastheercel gebruikt om zicht te kunnen vermenigvuldigen en al deze eiwitten zijn een potentieel therapeutisch doelwit. De hypothese is dat het moeilijker voor HIV-1 zal zijn om hier resistentie tegen te ontwikkelen, aangezien het virus zich in dat geval zou moeten aanpassen aan een ander gastheereiwit. Het beste voorbeeld is het CCR5-eiwit, een receptor aan de buitenkant van T-cellen waaraan HIV-1 moet binden om de cel binnen te komen. Wanneer we de expressie van CCR5 kunnen remmen, blokkeren we ook het vermogen van HIV-1 om de T-cel te kunnen infecteren. Eén van de grootste zorgen bij deze aanpak is de mogelijke toxiciteit, aangezien componenten van de gastheercel aangevallen worden. In het geval van CCR5 weten we dat mensen zonder dit eiwit gezond zijn, want een deel van de bevolking bezit een inactief CCR5-gen. Deze mensen zijn praktisch immuun voor HIV-1 varianten die CCR5 gebruiken. Er zij wellicht nog meer eiwitten in de cel die heel belangrijk zijn voor de HIV-1 infectie, maar waarvan uitschakeling geen grote bijwerkingen veroorzaakt.

Onderzoek beschreven in dit proefschrift

In dit proefschrift beschrijven we het gebruik van RNAi tegen dertig verschillende cellulaire eiwitten (Hoofdstuk 3). Ook hier werden de menselijke T-cellen behandeld met lentivirale vectoren die zorgen voor de aanmaak van shRNA-remmers van cellulaire eiwitten. Allereerst werd geanalyseerd of de cellen deze ingreep wel tolereren. Daartoe hebben we de groeisnelheid van de cellen gemeten. In elf van de dertig gevallen bleek het zeer nadelig om dat specifieke eiwit uit te schakelen; de cellen deelden niet meer of gingen dood. Uiteraard werden deze shRNA remmers uitgesloten van verder onderzoek. De behandelde cellen waar geen effect of slechts een klein effect op de groeisnelheid

werd gemeten werden vervolgens geïnfecteerd met HIV-1. Als controle dienden cellen behandeld met een lege vector of een vector die een controle-shRNA maakt. In deze controlecellen meten we na ongeveer 8 dagen de piek van HIV-1 productie. In sommige shRNA-cellen maten we maar weinig of geen HIV-1 productie en dat betekent dat HIV-1 geremd werd in zijn vermenigvuldiging. Het lijkt dus mogelijk om RNAi tegen cellulaire eiwitten te gebruiken om HIV-1 te remmen.

Omdat RNAi tegen cellulaire co-factoren veel bijwerkingen kan hebben, is er een nauwkeurige methode nodig om kleine effecten op de groeisnelheid van cellen te kunnen meten. De methodes die momenteel beschikbaar zijn, zoals het elke dag tellen van het aantal cellen en daar de groeisnelheid mee berekenen zijn erg omslachtig en niet nauwkeurig. Wij hebben daarom een nieuwe methode ontwikkeld die berust op competitie in een kweek tussen behandelde en onbehandelde cellen (Hoofdstuk 4). Wanneer cellen behandeld worden met het shRNA-lentivirus dan wordt er ook een selectiemarker ingebouwd. In veel gevallen is dat het GFP-eiwit, ofwel het Green Fluorescent protein, dat ervoor zorgt dat behandelde cellen groen oplichten in UV-licht. Na behandeling heeft men dus een mengsel van twee soorten cellen: behandelde shRNA-cellen die groen zijn en de onbehandelde controle cellen. Als de behandelde cellen langzamer groeien dan onbehandelde cellen, bijvoorbeeld omdat de shRNA toxisch is, dan zal de verhouding van groene versus gewone cellen gestaag afnemen in de tijd en dit is erg gemakkelijk te meten. Hoe sneller het percentage groene cellen afneemt, hoe groter het negatieve effect van de shRNA is. We hebben laten zien dat deze methode gevoeliger is dan de gebruikelijke methode en deze methode is dan ook toegepast in alle verdere hoofdstukken.

Eén van de beste antivirale shRNAs uit hoofdstuk 3 had als doelwit een eiwit dat deel uitmaakt van de autofagie proces. Autofagie is een cellulair mechanisme dat ervoor zorgt dat de cel kan overleven als er een tijdelijk gebrek aan voedingsstoffen is door componenten af te breken en de stoffen die daarbij vrijkomen te hergebruiken. In dit proces worden membraanstructuren in de cel gevormd en die structuren worden door sommige virussen gebruikt tijdens hun replicatie. Het was al bekend dat autofagie ook een rol speelt tijdens HIV-1 infectie, maar nadere details ontbreken. We hebben in Hoofdstuk 5 verschillende autofagie-eiwitten getest via dezelfde shRNA-methode als in Hoofdstuk 3. Het bleek dat meerdere autofagie-eiwitten belangrijk zijn voor HIV-1 en wellicht dat stoffen die autofagie remmen gebruikt kunnen worden om HIV-1 te behandelen. Om de HIV-1 remming te verbeteren hebben we ook cellen behandeld met twee shRNAs tegen verschillende autofagie-eiwitten.

Dat cellulaire cofactoren een complexe rol kunnen spelen tijdens de HIV-1 replicatie blijkt in Hoofdstuk 6. Eerder was een studie uitgevoerd naar veranderingen in het expressieniveau van eiwitten in HIV-1 geïnfecteerde cellen. Sommige eiwitten worden na infectie verhoogd tot expressie gebracht, bijvoorbeeld omdat ze een antivirale werking hebben (een respons van de cel) of omdat het virus meer van dat bepaalde eiwit nodig heeft (een respons van HIV-1). Veel van deze interessante eiwitten zijn in Hoofdstuk 6 nader geanalyseerd via shRNA-remming en HIV-1 replicatie testen. Al snel is de aandacht verlegd naar het eiwit Cyclophilin B. De expressie van dit eiwit gaat omhoog als HIV-1 de cel infecteert, maar als we dit eiwit remmen gaat HIV-1 juist beter repliceren. Dit suggereert dat Cyclophilin B een antivirale functie heeft. Interessant is dat een naast familielid, namelijk Cyclophilin A, precies een tegenovergestelde werking heeft. HIV-1

heeft Cyclophilin A juist nodig om zich te kunnen vermenigvuldigen. Beide eiwitten binden aan een onderdeel van een HIV-1 virusdeeltje en doen dat op precies dezelfde plaats. We veronderstellen dat het virus Cyclophilin A heeft leren te gebruiken om de antivirale werking van Cyclophilin B te verhinderen.

In Hoofdstuk 7 hebben we de functie van het DDX3-eiwit tijdens de HIV-1 replicatie geanalyseerd. Van DDX3 was al langer bekend dat het ervoor zorgt dat HIV-1 RNA moleculen uit de celkern getransporteerd worden. In andere cellen is ook aangetoond dat DDX3 ook een invloed kan hebben op het proces van genexpressie. Wij tonen aan dat DDX3 ook invloed heeft op HIV-1 genexpressie. DDX3 gaat een interactie aan met het virale Tat eiwit en we meten verhoogde HIV-1 genexpressie dan ook alleen als zowel DDX3 en Tat tot overexpressie worden gebracht. Dit maakt DDX3 een aantrekkelijk aangrijpingspunt voor de ontwikkeling van nieuwe medicatie, omdat het meerdere functies vervult in de HIV-1 replicatiecyclus.

In Hoofdstuk 8 beschrijven we verschillende RNAi studies die zijn verricht om te bepalen welke cellulaire eiwitten belangrijk zijn voor verschillende virussen. Zo zijn er zes studies uitgevoerd om te bepalen welke cellulaire eiwitten het griepvirus gebruikt. Vele kandidaat-eiwitten zijn gerapporteerd, maar de overlap tussen de verschillende studies is gering. Dit toont aan dat het nodig is om resultaten van deze studies nauwkeurig te valideren in vervolgonderzoek. Een ander interessant punt is dat virussen die vaak samen gezien worden in dezelfde patiënt, zoals hepatitis C virus en HIV-1, soms dezelfde cellulaire eiwitten gebruiken. Het zou mogelijk zijn om met één medicijn daardoor meerdere virusinfecties tegelijkertijd te behandelen. Wel is voorzichtigheid geboden, bijvoorbeeld bij de bestrijding van tuberculose en HIV-1 in dezelfde patiënt. Voor de behandeling van tuberculose is gesuggereerd om het autofagiemechanisme te activeren, maar het tegenovergestelde is nodig om HIV-1 te remmen (Hoofdstuk 5). Cellulaire eiwitten als aangrijpingspunt voor de ontwikkeling van antivirale medicatie blijft een reële optie, maar men moet bedacht zijn op dit soort complicaties.