



BESTRIJDEN VAN KLEIN VENIJN

GUUS F. RIMMELZWAAN

BESTRIJDEN VAN KLEIN VENIJN

Oplage	800
Omslagfoto	Levien Willemse, Rotterdam
Ontwerp	Ontwerpwerk, Den Haag
Drukwerk	Océ-Nederland B.V., Rotterdam

ISBN 978-90-77906-76-7

© Guus F. Rimmelzwaan, oratiereeks Erasmus MC
1 oktober 2010

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd zonder voorafgaande toestemming van de auteur.

Voorzover het maken van kopieën uit deze uitgave is toegestaan op grond van art. 16h t/m 16m Auteurswet 1912 j°. Besluit van 27 november 2002, Stb. 575, dient men de daarvoor wettelijk verschuldigde vergoeding te voldoen aan de Stichting Reprerecht te Hoofddorp (Postbus 3060, 2130 KB).

BESTRIJDEN VAN KLEIN VENIJN

REDE

In verkorte vorm uitgesproken
ter gelegenheid van het aanvaarden
van het ambt van bijzonder hoogleraar
met als leeropdracht Immuno-virologie,
aan het Erasmus MC, faculteit van de
Erasmus Universiteit Rotterdam
op 1 oktober 2010

door

GUUS F. RIMMELZWAAN

*Mijnheer de Rector Magnificus
Leden van het college van Bestuur van de Erasmus Universiteit
Mijnheer de Decaan
Leden van het bestuur van het Erasmus MC
Leden van het bestuur van de vereniging Trustfonds
Beste collega's, familie, vrienden en andere aanwezigen,*

Het zal u allen duidelijk zijn dat ik de titel van deze rede: “Bestrijden van klein venijn” niet alleen gekozen heb omdat deze uitgesproken met een Amsterdamse tongval zo lekker in de oren klinkt. Met “klein venijn” bedoel ik virussen, micro-organismen die andere organismen zoals mensen, dieren, planten en zelfs bacteriën kunnen infecteren. Hoe klein zijn virussen dan?

Om u daar een voorstelling van te geven laat ik u een vergelijking zien van de afmeting van virussen met die van andere micro-organismen en cellen uit het lichaam. De kleinste virussen zijn ongeveer 20 nanometer en de grootste 400. Van een gemiddeld virus van 100 nm in diameter passen er dus 1000 miljard in een kubieke millimeter! Ze zijn voor het blote oog onzichtbaar en zelfs niet waarneembaar met een lichtmicroscop, waarmee bacteriën wel kunnen worden waargenomen.

De term “virus” dat in het Latijn letterlijk “vergif” of “venijn” betekent, werd voor het eerst gebruikt door Martinus Beijerinck die samen met Dimitri Ivanofsky aan het einde van de negentiende eeuw bewijs leverde dat er ziektekiemen bestonden kleiner dan bacteriën. Zij lieten zien dat het extract van planten geïnfecteerd met het bladmozaïekvirus infectieus was voor nieuwe planten. Bovendien kon het gebruik van filters die bacteriën tegen houden de besmettelijkheid van het plantenextract niet voorkomen. Omdat Beijerinck niet kon aantonen dat de ziektekiem een deeltje was noemde hij de ziektekiem “contagium vivum fluidum” wat in het Latijn betekent “een

besmettelijke levende vloeistof". Met hun baanbrekende werk worden zij beschouwd als de grondleggers van de huidige virologie.

Het eerste virus bij dieren werd door Loeffler gevonden en betrof het mond-en-klauwzeervirus. In tegenstelling tot Beijerinck was Loeffler er al van overtuigd dat virussen deeltjes waren en leverde ook bewijs daarvoor. Sindsdien zijn een enorm aantal virussen geïdentificeerd bij een veelheid aan verschillende gastheren.

Virussen hebben dus met elkaar gemeen dat ze klein zijn, maar ze zijn er in alle soorten en maten. En de verschillen worden ondermeer bepaald door hun structuur, de aard van hun genetisch materiaal en de gastheer en de cellen van de gastheer die ze kunnen infecteren.

Virusinfecties kunnen desastreuze gevolgen hebben voor individuele gastheren elk met hun eigen spectrum van klinische symptomen, van koortslip tot fatale hemorrhagische koortsen en van verkoudheid tot dodelijke immuun-deficiënties. Omdat het om besmettelijke infectieziekten gaat kunnen virusinfecties ook belangrijke gevolgen hebben voor de gastheerpopulatie. Dit geldt niet alleen voor dieren, we kennen allemaal de gevolgen van ziektes als vogelpest, varkenspest en mond-en-klauwzeer voor de veestapel, maar ook voor de humane bevolking. Ik noem twee voorbeelden.

Het eerste voorbeeld betreft de introductie van HIV-1, de veroorzaker van AIDS bij mensen. De verspreiding van HIV-1 sinds de mid-jaren tachtig heeft in een aantal Afrikaanse landen de gemiddelde levensverwachting met meer dan 20 jaar gereduceerd.

Het tweede voorbeeld betreft de gevolgen van de Spaanse griep in 1918. Deze infectieziekte veroorzaakte ondermeer in Amerika een piek in mortaliteit onder de bevolking die gepaard ging met een tijdelijk verlaging van de levensverwachting in dat land. Over griep of influenza kom ik later nog te spreken. De grote vraag die wetenschappers al eeuwen lang bezig houdt is natuurlijk hoe ziekten veroorzaakt door virale verwekkers voorkomen kunnen worden of wel hoe "klein venijn" effectief bestreden kan worden.

In het oude verre- en midden Oosten was het al opgevallen dat mensen die de pokken (Variola) hadden doorgemaakt het geen tweede keer kregen. Die waarneming was de basis voor een methode van immunisatie die niet ongevaarlijk was; mensen werden opzettelijk besmet met de etter of gedroogde korsten van de blaasjes van patiënten die pokken hadden, een methode die variolatie wordt genoemd. Gevaccineerde personen werden soms ernstig ziek en 2% overleed aan de immunisatie.

Een belangrijke verbetering van deze methode was het gebruik van koepokken (Vaccinia), dat relatief ongevaarlijk is voor de mens. Aan het einde van de achttiende eeuw was het bekend dat mensen die koepokken hadden gehad ongevoelig waren voor



Figuur 1: Geert Reinders (1737-1815), een Groningse boer die in 1774 een methode beschreef om runderen succesvol te vaccineren tegen runderpest, ruim 20 jaar voor Jenner het gebruik van vaccinia beschreef om te beschermen tegen de pokken.

pokken. In 1796 testte Jenner dit principe door de zoon van zijn tuinman met vaccinia te “vaccineren” om vervolgens te laten zien dat hij beschermd was tegen variolatie.

Hoewel het werk van Jenner baanbrekend was en wordt gezien als het begin van onderzoek naar immunologie en vaccinologie, zijn er toch een paar kanttekeningen te plaatsen. Jenner had kennis genomen van het werk van Geert Reinders (Zie figuur 1) die al 20 jaar eerder had laten zien dat runderen beschermd konden worden tegen runderpest door de kalveren te enten tegen de ziekte. Omdat de jonge dieren nog maternale antilichamen hadden tegen het virus waren deze gedeeltelijk beschermd en was de vaccinatie veilig. Reinders beschreef zijn bevindingen in een brief aan professor Petrus van Campen die een Engelse vertaling stuurde naar de Royal Society of Medicine in Londen (overigens zonder Reinders te vermelden) (Blijkbaar kwam “scoopen”, het stelen van een wetenschappelijke primeur, in de achttiende eeuw ook al voor).

Het gebruik van vaccinia virus om te beschermen tegen pokken is een succes verhaal gebleken. Door massale vaccinatiecampagnes is dit virus volledig uitgeroeid en komen Variola-patiënten niet meer voor.

Naast het koepokkenvaccin zijn een aantal andere levende en geïnactiveerde vaccins ontwikkeld waarmee met succes het optreden van bacteriële en virale infectieziekten kunnen worden voorkomen. Een aantal zijn opgenomen in het Rijksvaccinatie programma (Zie tabel 1). En mede door dit succesvolle programma zijn verschillende ziekten vrijwel volledig uit het straatbeeld verdwenen.

Bacteriële verwekkers

Ziekte	Veroorzaker
Difterie	Corynebacterium diphtheriae
Hib-ziekten	Haemophilus influenzae type b
Kinkhoest	Bordetella pertussis
Pneumokokken	Streptococcus pneumoniae
Tetanus	Clostridium tetani

Virale verwekkers

Ziekte	Veroorzaker
Bof	Bofvirus
Mazelen	Mazelenvirus
Rodehond	Rubellavirus
Poliomyelitis	Poliovirus
Baarmoederhalskanker	Humane papillomavirus (HPV)
Hepatitis B	Hepatitis B virus

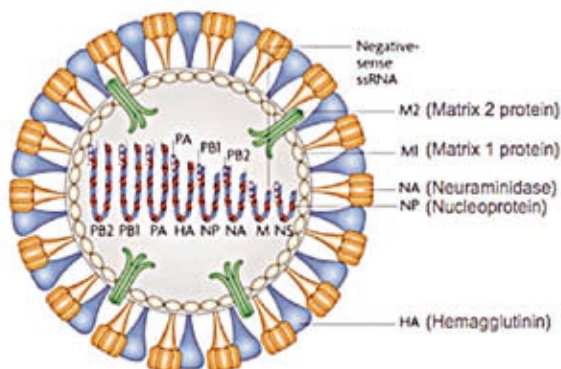
Tabel 1: Bacteriële en virale ziekteverwekkers opgenomen in het Rijksvaccinatieprogramma

Bron: <http://www.rivm.nl/rvp/>

Maar niet tegen alle virusziekten is het eenvoudig gebleken om effectieve vaccins te ontwikkelen. Ik noemde al HIV-1, waartegen na 25 jaar wetenschappelijk onderzoek nog steeds geen vaccin in zicht is.

Een andere uitdaging betreft influenzavirussen, waarover ik verder wil uitwijden omdat deze op dit moment mijn favoriete “klein venijn” zijn en een belangrijke bedreiging vormen voor de volksgezondheid.

Om het succes van influenzavirussen goed te kunnen begrijpen moet ik even stil staan bij een aantal eigenschappen van het virus (Zie figuur 2). Influenzavirussen hebben een envelop waarin we een aantal eiwitten aantreffen die allen belangrijk zijn voor de replicatie van het virus, waaronder het hemagglutinine (afgekort HA) en het neuraminidase (NA). Het hemagglutinine is verantwoordelijk voor binding van het virus aan receptoren van de gastheercel en het neuraminidase speelt een rol bij de verspreiding van nieuwe virussen die door de geïnfecteerde gastheercel zijn geproduceerd. Daarnaast spelen deze eiwitten een belangrijke rol bij de afweer tegen infecties met influenzavirussen omdat hiertegen antilichamen worden



Figuur 2: Schematische weergave van een influenzavirus. Aangepast uit Nature Reviews Genetics 2007, 8: 196-205.

gevormd die het virus kunnen neutraliseren. Bij influenza A virussen worden een groot aantal verschillende subtypen onderscheiden en het zijn het hemagglutinine en het neuraminidase die de subtypen van influenza A virussen bepalen. Inmiddels zijn 16 subtypen van het HA beschreven en 9 van het NA. Over het algemeen wordt verondersteld dat antilichamen gericht tegen een subtype niet in staat zijn om virussen van een ander subtype te herkennen. Wat verder van belang is, is dat het genetisch materiaal van negatief georiënteerd RNA uit acht losse segmenten bestaat. Dat betekent dat bij dubbelinfecties heel gemakkelijk genetisch materiaal kan worden uitgewisseld, een proces dat “genetische reassortering” wordt genoemd.

Het succes van influenzavirussen kan deels worden verklaard door hun vermogen om te ontsnappen aan immuniteit die in de gastheerpopulatie door eerdere infecties of door vaccinatie is opgebouwd. Influenzavirussen zijn genetisch instabiel en onder selectieve druk van antilichamen zullen varianten ontstaan die kunnen ontsnappen aan de neutraliserende werking van antilichamen.

Deze zgn. antigene drift kan worden aangetoond met serologische assays en mijn collega's Ron Fouchier en Derek Smith hebben methoden ontwikkeld waarmee antigene drift gevisualiseerd kan worden¹. Het zijn de driftvarianten die verantwoordelijk zijn voor de jaarlijks terugkerende uitbraken van influenza. Om er voor te zorgen dat na vaccinatie antilichamen worden opgewekt die de circulerende virusstammen kunnen herkennen en neutraliseren is het noodzakelijk dat de influenzavaccins regelmatig worden aangepast en het hemagglutinine bevatten van de meest recente varianten.

Het influenzavirus is dus geen “sitting duck” maar eerder een “moving target”, wat het moeilijk maakt om dit virus effectief te bestrijden.

Door de introductie van influenzavirussen met subtypen waaraan de gastheerpopulatie of een deel daarvan niet eerder heeft bloot gestaan en die dus niet gehinderd worden door antilichamen geïnduceerd door eerdere infecties kunnen grote influenza-uitbraken ontstaan, zgn. pandemieën.

Alle subtypen van influenza A virussen worden aangetroffen bij vogels en vooral watervogels vormen het reservoir van alle mogelijke influenza A virus subtypen. Voor de introductie van nieuwe subtypen bij de mens is het dus noodzakelijk dat deze virussen al dan niet na genetisch reassortering met humane influenzavirussen de species barrière oversteken.

In de twintigste eeuw is er sprake geweest van 3 grote pandemieën, te weten de Spaanse griep van 1918 veroorzaakt door influenzavirussen van het H1N1-subtype, de Aziatische griep van 1957 veroorzaakt door virussen van het H2N2-subtype en de Hong Kong griep van 1968 veroorzaakt door H3N2-virussen. Meer recentelijk en daar hebt u natuurlijk uitgebreid kennis van kunnen nemen werden we in 2009 verrast door de introductie van een varkensinfluenzavirus van het H1N1-subtype dat ook een aviaire oorsprong heeft en overeenkomsten vertoont met het 1918-virus.

Daarnaast hebben vogelinfluenzavirussen van andere subtypen met enige regelmaat infecties veroorzaakt bij mensen. Ik noem virussen van het subtype H9N2, het hoogpathogene H7N7-virus dat in 2003 in Nederland een zeer grote uitbraak van vogelpest onder pluimvee heeft veroorzaakt en waarbij ongeveer 90 personen betrokken bij het ruimen van besmette dieren een infectie hebben doorgemaakt en waarvan een kwam te overlijden.

De grootste dreiging gaat toch uit van hoog pathogene aviaire influenza virussen van het H5N1-subtype, waarvan is vastgesteld dat zij sinds 1997 tenminste 500 gevallen van infecties bij mensen hebben veroorzaakt met een mortaliteit van ongeveer 60%. In bijna alle gevallen betrof het patiënten die direct hadden blootgestaan aan besmet pluimvee en die ernstige longontstekingen kregen na besmetting met deze virussen. Efficiënte transmissie van mens-op-mens is echter nog niet waargenomen.

Wat kunnen we tegen deze virussen doen of hoe kunnen we dit “klein venijn” effectief bestrijden?

Naast het nemen van hygiënische en quarantaine maatregelen zijn er slechts een beperkt aantal mogelijkheden. De eerste is het gebruik van antivirale middelen waarop ik later nog terug kom.

De belangrijkste preventieve maatregel die kan worden getroffen is het profylactisch vaccineren tegen deze infectieziekten. Al vijftig jaar is vaccinatie de methode om individuen te beschermen tegen de gevolgen van een infectie met influenzavirussen. In het bijzonder personen met een hoog risico op complicaties als gevolg van infectie hebben voordeel van preventieve vaccinatie en daarom wordt dit aanbevolen voor deze hoogrisico groep, waaronder ouderen vallen en mensen met chronische luchtweg

aandoeningen, hart en vaat aandoeningen en immuungecompromiteerde patiënten. De vaccins tegen de jaarlijks terugkerende griep zijn effectief en veilig gebleken en kunnen veel problemen voorkomen, mits de samenstelling goed overeenkomt met de circulerende epidemische virusstammen.

Nadat influenzavirussen van het H5N1-subtype zich bleven verspreiden onder pluimvee en wilde vogels en er voortdurend nieuwe humane gevallen werden gerapporteerd is er veel aandacht besteed aan de ontwikkeling van vaccins tegen deze virussen om eventueel voorbereid te zijn op een pandemische uitbraak. H5N1-vaccins die werden bereid volgens het recept van de vaccins tegen de jaarlijks terugkerende griep bleken echter niet voldoende werkzaam en alleen door de vaccindosis te verhogen en door het gebruik van adjuvantia bleek het mogelijk om beschermende antilichaamresponsen op te wekken. Het verhogen van vaccindosis was destijds echter geen optie omdat de vaccinproductiecapaciteit al beperkt was en dus niet voldoende vaccins zouden kunnen worden bereid voor grote vaccinatiecampagnes. Het gebruik van adjuvantia (dat zijn de hulpstoffen die de werkzaamheid van vaccins verbeteren) had als bijkomend voordeel dat ook lagere vaccindoses konden worden gebruikt en zodoende ook meer mensen gevaccineerd konden worden (zgn. dose-sparing).

Om deze redenen heeft het Europese agentschap voor medische producten na de uitbraak van de pandemie in 2009 geadviseerd om geadjuveerde vaccins te gebruiken en tweemaal te vaccineren om de inductie van beschermende antilichaamtiter te garanderen.

Over de pandemie van afgelopen jaar wil ik een paar dingen zeggen. Het begon eind maart toen vanuit Mexico berichten kwamen dat er mensen ernstig ziek werden en besmet waren met een varkensinfluenzavirus van het H1N1-subtype vaak met dodelijke afloop²⁻⁵. Daaraan ontleent de pandemie ook zijn naam er wordt vaak gesproken van de Mexicaanse griep of de varkensgriep.

Het virus bleek genetisch materiaal te bevatten afkomstig van vier verschillende bekende varkensinfluenzavirussen wat opnieuw aantoonde dat in deze diersoort genetische reassortering tussen verschillende influenzavirussen regelmatig plaatsvindt.

Al snel bleek dat het virus niet alleen van varkens naar mensen werd overgedragen maar dat ook efficiënte mens-op-mens transmissie plaatsvond⁶⁻⁸. Binnen een paar maanden had het virus zich over de gehele wereld verspreid en op 11 juni 2009 werd de uitbraak door de Wereldgezondheidsorganisatie uitgeroepen tot een pandemie.

Achteraf wordt de pandemie van 2009 wel als mild bestempeld omdat er minder dodelijke slachtoffers vielen dan in eerdere pandemieën. Desondanks is het goed om te realiseren dat in korte tijd toch tienduizenden patiënten zijn overleden en dat itt vorige pandemieën de grootste mortaliteit gezien werd bij kinderen en jong volwassenen. Het aantal levensjaren dat verloren is gegaan is daardoor toch hoog en vergelijkbaar met die van eerdere pandemieën.

Ook in Nederland was de incidentie van ziekenhuisopnames het hoogste bij kinderen van 0-4 jaar oud. In dat licht was de beslissing om vaccinatie ook aan te bevelen voor deze leeftijdsgroep een juiste geweest.

Naast de werkzaamheid en de veiligheid van influenzavaccins is ook de snelle beschikbaarheid van voldoende pandemische vaccins zeer gewenst. De pandemie van 2009 heeft dat weer aangetoond. Eind september kwamen de eerste vaccins beschikbaar, ruim een half jaar na het begin van de eerste uitbraken in Mexico en ná de piek van de pandemie.

Voor de productie van influenzavaccins worden al decennia lang bebroede kippeneieren gebruikt, wat logistieke problemen veroorzaakt wanneer plotseling schaalvergroting van de productie noodzakelijk is. Om goede opbrengsten te verkrijgen wordt gebruik gemaakt van gereassorteerde vaccinstammen. De bereiding van deze vaccinstammen vraagt vaak veel tijd. Als alternatief voor het gebruik van bebroede kippeneieren is er de laatste tien jaar hard gewerkt aan de ontwikkeling van celkweeksystemen voor de productie van influenza vaccins.

Toch bestaat er nog behoefte aan meer flexibele productiesystemen, die onafhankelijk zijn van de beschikbaarheid van gereassorteerde vaccinstammen en die snelle vaccinproductie mogelijk maken.

Wij hebben in samenwerking met Prof. Gerd Sutter van de Universiteit van München belangstelling voor een veelbelovend vaccinproductiesysteem gebaseerd op het gebruik van replicatie-deficiënte koepokken, Modified vaccinia virus Ankara of “MVA”. Dit virus is veilig gebleken in diermodellen en mensen⁹. Waar wildtype vaccinia virus nog laesies geeft na toediening blijven deze na toediening van MVA achterwege.

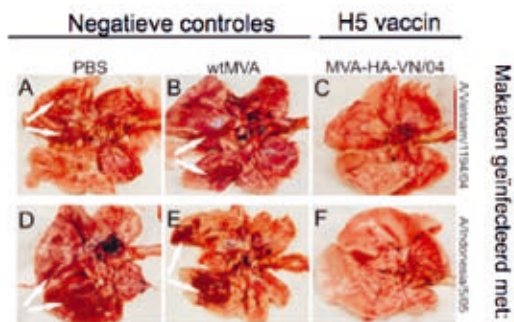
Wij hebben een recombinant MVA vervaardigd dat na toediening, het hemagglutinin van een H5N1 influenzavirus tot expressie brengt en waartegen vervolgens een immuunrespons zal worden opgewekt.

Omdat er van H5N1-virussen een aantal varianten circuleren hebben we de proefdieren na vaccinatie geïnfecteerd met verschillende H5N1-virussen om de werkzaamheid tegen deze influenzavirussen vast te stellen.

Door Joost Kreijtz in onze groep is aangetoond dat het gebruik van dit kandidaatvaccin muizen en apen kon beschermen tegen een letale infectie met deze verschillende H5N1-virussen¹⁰⁻¹². Vaccinatie voorkwam het optreden van schade aan de longen veroorzaakt door infectie van die dieren. Figuur 3 laat hier een voorbeeld van zien. Ook histologisch werd aan getoond dat longschade kon worden voorkomen.

Ook met een kandidaat Mexicaanse griepvaccin gebaseerd op dezelfde technologie werden goede resultaten behaald in een frettenmodel¹³.

Deze bemoedigende resultaten rechtvaardigen verder onderzoek naar en de ontwikkeling van MVA-gebaseerde influenzavaccins. Dit type onderzoek zal mogelijk leiden tot nieuwe generaties veilige en effectieve influenzavaccins die snel beschikbaar



Figuur 3: Recombinant MVA-H5 vaccin beschermt makaken tegen infectie met verschillende A/H5N1-virussen.
Bron: Kreijtz et al. *J. Inf. Dis.* 2009, 199:405-13 (Referentie 11)

kunnen komen wanneer dat gewenst is bijvoorbeeld na nieuwe pandemische uitbraken. Om de beschikbaarheid van pandemische influenzavaccins nog verder te bespoedigen zou een bank kunnen worden aangelegd van MVA recombinanten die de HA genen van influenzavirussen met subtypen die mogelijk in de toekomst een pandemie zouden kunnen veroorzaken, H1, H2, H3, H5, H7 en H9. Daarnaast zouden recombinant MVA vaccins die meer geconserveerde eiwitten tot expressie brengen gebruikt kunnen worden om kruis-reagerende T cel responsen te induceren, waarover later meer.

Met zoveel verschillende verschijningsvormen van influenza zal het u niet verbazen dat er interesse bestaat in de ontwikkeling van vaccins die bredere bescherming bieden en die zouden kunnen beschermen tegen driftvarianten van de subtypen die de jaarlijkse epidemieën veroorzaken of die zelfs bescherming bieden tegen influenzavirussen van verschillende subtypen.

Nu is het al langer bekend dat infectie met influenzavirussen een zekere mate van beschermende immuniteit opwekt tegen virussen van een ander subtype. Dit soort immuniteit wordt ook wel heterosubtypische immuniteit genoemd. Ik laat hier een voorbeeld zien van dit soort bescherming in muizen die na een infectie met een humaan influenza A virus van het H3N2-subtype, beschermd blijken tegen een tweede, anders dodelijke infectie met een hoog pathogeen influenzavirus van het H5N1-subtype.

Gedetailleerde kennis over de mechanismen van dit soort immuniteit zou kunnen helpen bij de ontwikkeling van universele influenzavaccins.

Het zou te ver gaan om nu een verhandeling te houden over alle componenten van het immuunsysteem. Daarom geef ik u een overzicht met voor virusinfecties de meest relevante armen van het immuunsysteem die kunnen bijdragen aan bescherming tegen infectie of de ontwikkeling van ziekte.

Op de eerste plaats is er aangeboren immuniteit. Dit zijn snelle afweerreacties die tot doel hebben om de eerste replicatie van virus te reduceren. Bij een herhaalde blootstelling aan het zelfde virus zal deze reactie op dezelfde manier plaats vinden en er is dus geen sprake van geheugenontwikkeling. Dat laatste is wel een eigenschap van verkregen immuniteit dat ook de basis vormt van vaccinatie. Door het verkrijgen van geheugen tegen pathogene micro-organismen zal bij een herhaalde blootstelling sneller een afweer respons worden geïnduceerd die bovendien heviger zal zijn dan bij de eerste blootstelling met het specifieke micro-organisme. Verschillende celtypen dragen bij aan de specifieke afweer tegen virusinfecties. Op de eerste plaats de zgn. B cellen die verantwoordelijk zijn voor de productie van antilichamen die het virus kunnen herkennen en neutraliseren maar die ook via andere mechanismen een remmend effect kunnen hebben op de virusreplicatie (ADCC)¹⁴. Het andere type cellen betreft T cellen die weer in verschillende subpopulaties onderverdeeld worden. Van belang bij virusinfecties zijn de T helper cellen die gekenmerkt worden door de expressie van de differentiatiemarker CD4 en die letterlijk help verschaffen aan antilichamen. Het andere subtype T cellen zijn de zgn. CD8 positieve cytotoxische T lymphocyten, afgekort CTL. De functie van CD8 positieve CTL is het herkennen en elimineren van virus geïnfecteerde cellen waardoor de productie van nieuwe viruspartikels geremd wordt.

Van het laatste type T cellen wordt verondersteld dat zij een bijdrage leveren aan heterosubtypische immuniteit omdat het grootste aantal van deze T cellen de meer geconserveerde eiwitten van influenzavirussen herkennen zoals het nucleoproteïne en het matrix eiwit. Inderdaad is het zo dat de respons van CTL tegen humane influenzavirussen prima in staat zijn om het nucleoproteïne te herkennen van bijvoorbeeld vogel influenzavirussen van het H5N1-subtype wat door Joost Kreijtz in onze groep en anderen werd aangetoond^{15,16}.

Bovendien liet hij zien dat heterosubtypische immuniteit tegen H5N1-virussen en controle van virus replicatie en bescherming tegen longschade bij muizen correleerde met anamnestiche kruisreagerende CTL responsen^{17,18}.

Al in 1983 werd door McMichael en collega's aangetoond dat ook bij mensen CTL activiteit kan bijdragen aan heterosubtypische immuniteit. In de afwezigheid van virus-specifieke antilichamen correleerde CTL activiteit met bescherming tegen experimentele infecties met een H1N1-virus¹⁹.

Om deze redenen heeft de influenzavirus specifieke CTL immuniteit al lange tijd onze speciale aandacht en hebben wij geprobeerd om deze gedetailleerd in kaart te brengen.

Een van de bevindingen van ons onderzoek die het idee bevestigen dat virus-specifieke CTL bijdragen aan remming van virusproductie en aan bescherming was het aantonen van virussen die mutaties bevatten in epitopen die door CTL worden herkend. Virussen kunnen ontsnappen aan de herkenning van deze peptiden (kleine stukjes van het virale eiwit) door aminozuursubstituties op de zgn. anchor

HLA-B27 epitope	Amino acid sequence
HIV-1 gag (263-272)	KRWILLGLNK
HIV-1 gag mutant 1	K <u>K</u> WILLGLNK
HIV-1 gag mutant 2	K <u>G</u> WILLGLNK
Influenza NP (383-391)	SRYWAI R TR
Influenza NP mutant 1	S <u>K</u> YWAI R TR
Influenza NP mutant 2	S <u>G</u> YWAI R TR

Tabel 2: Influenza virussen kunnen net als HIV-1 ontsnappen aan herkenning door virus-specifieke CD8+ T lymphocyten door aminozuursubstituties op het Anchor residue (vet en onderstreept) van epitopen in het nucleoproteïne. Uit: Voeten et al. 2000, J. Virol. 74:6800-6807 (referentie 20)

residues waardoor de peptiden niet langer kunnen binden aan hun corresponderende MHC klasse I molecuul wat weer tot gevolg heeft dat het specifiek peptide MHC complex niet beschikbaar is voor herkenning door specifieke CTL. Anderzijds kunnen aminozuursubstituties optreden in de zgn. T cel receptor contact residuen. Hierbij kan het gemuteerde peptide nog wel binden aan het MHC molecuul maar is het niet langer herkenbaar voor T cellen die tegen het oorspronkelijke peptide waren gericht.

Theo Voeten in onze groep heeft laten zien dat er influenzavirussen zijn gaan circuleren met een aminozuursubstitutie in het Anchor residue van een HLA-B*2705 epitooop identiek als beschreven voor HIV-1 varianten die wisten te ontsnappen aan de herkenning door specifieke CTL^[20]. Dit wijst erop dat ook influenzavirussen onder selectieve druk staan van specifieke CTL en daar in sommige gevallen aan kunnen ontsnappen (Zie tabel 2).

Jacco Boon in onze groep heeft vervolgens laten zien dat er ook influenza T cel epitopen bestaan met aminozuursubstituties in T cel receptor contact residuen die correleerden met het ontsnappen aan T cel herkenning^[21].

Dit epitooop uit het nucleoproteïne is recentelijk nog eens onder de loep genomen door collega's van de universiteit van Melbourne. Zij hebben de kristalstructuur van het desbetreffende HLA peptide complex opgehelderd en onze resultaten bevestigd. Bovendien lieten zij zien dat de structuur van het MHC peptide complex in het 2009 H1N1 virus nauwe overeenkomsten vertoonde met dat van het 1918 virus en dat tussentijds het epitooop aan verandering onderhevig is geweest^[22]. Het is interessant om de evolutie van dit epitooop in komende jaren te volgen om te zien of de selectieve druk op het nieuwe virus opnieuw zal resulteren in aminozuursubstituties en ontsnapping. Zoals eerdere gezegd zijn veel CTL epitopen echter geconserveerd, en we vermoeden

dat dit te maken heeft met zgn. functionele beperkingen. Het influenzavirus kan in sommige CTL epitopen geen variatie toestaan zonder verlies van fitness, het vermogen om te repliceren, zoals aangetoond door Femke Berkhoff²³⁻²⁵.

Dus de inductie van T cel immuniteit tegen geconserveerde eiwitten als het nucleoproteïne zou een manier zijn om meer brede bescherming te bieden tegen influenzavirussen van andere subtypen.

Andere mechanismen die mogelijk een bijdrage leveren aan dit type immuniteit zijn de vorming van antilichamen tegen het geconserveerde M2 eiwit, het neuraminidase of de stamregio van het HA molecuul¹⁴. Onderzoek naar de bijdrage van de verschillende armen van het immuunsysteem en hun virale doelwitten is dus een hot topic en zou mogelijk kunnen leiden tot meer universele influenza vaccins, die ook ten tijde van een pandemie, veroorzaakt door een influenzavirus van een nog onbekend subtype, werkzaam zou kunnen zijn.

Wat het vaccin van de toekomst ook moge zijn, vaccins moeten verstandig worden gebruikt en voor iedere risicopopulatie is het mogelijk dat verschillende vaccinatiestrategieën noodzakelijk zijn. In dit opzicht hebben jonge kinderen mijn speciale aandacht. Zoals ik eerder aangaf, induceren infecties met influenzavirussen heterosubtypische immuniteit. In sommige landen wordt geadviseerd om alle jonge kinderen vanaf zes maanden oud te vaccineren tegen influenza, dus niet alleen kinderen uit de bekende risicogroepen. Daar worden voornamelijk geïnactiveerde vaccins voor gebruikt, waarvan bekend is dat zij in zeer beperkte mate cytotoxische T cellen induceren en kruisbescherming bieden tegen virussen van andere subtypen. Hypothetisch zou het kunnen dat door vaccinatie natuurlijke infecties worden voorkomen en dus ook de ontwikkeling van heterosubtypische immuniteit²⁶. Deze hypothese werd door Rogier Bodewes uit onze groep getest in een muismodel^{27,28}. De belangrijkste groepen in dat experiment waren dieren die eerst een infectie doormaakten met een humaan H3N2-virus en vervolgens werden geïnfecteerd met een lethaal influenza H5N1-virus. De tweede waren muizen die vóór de infectie met het A/H3N2-virus daartegen werden gevaccineerd. Vervolgens werd de uitkomst van de H5N1-infectie tussen deze twee groepen met elkaar vergeleken.

Zoals verwacht waren de dieren uit de eerste groep weer beschermd en herstelden van de H5N1-infectie. De gevaccineerde dieren die dus geen productieve infectie doormaakten met het H3N2-virus waren niet langer beschermd tegen de H5N1-infectie. In deze dieren was de CD8+ T cel respons aanzienlijk lager, wat correleerde met hun onvermogen om replicatie van het H5N1-virus in de longen te controleren.

Wat kunnen we leren van deze experimenten?

Het uiteindelijke doel van dit soort studies is dat optimale vaccinatiestrategieën worden toegepast bij bijvoorbeeld jonge kinderen die nog geen infecties hebben doorgemaakt en immunologisch naïef zijn voor influenzavirussen. In deze leeftijdsgroep

zouden bij voorkeur levend verzwakte vaccins worden gebruikt of andere vaccintypen die naast virus-specifieke antilichamen ook virus-specifieke CD8+ T cel responsen induceren. Dit zou bescherming kunnen bieden tegen de normale influenzavirussen maar mogelijk ook tegen potentieel pandemische virussen van andere subtypen. De hypothese dient ook te worden getest in kinderen en studies zijn nu gaande om het effect in kinderen te testen van jaarlijks vaccineren op de ontwikkeling van antilichamen en cellulaire immuniteit. Het betreft hier een samenwerking tussen de kindergeneeskunde en de afdeling virologie en Dr. Pieter Fraaij speelt hierin een belangrijke rol.

Antivirale middelen

Een andere methode van het bestrijden van klein venijn betreft het gebruik van antivirale middelen. Er zijn slechts een beperkt aantal geneesmiddelen beschikbaar die werkzaam zijn tegen influenzavirussen. Het betreft remmers van het M2 eiwit en de neuraminidase remmers die meer recentelijk zijn ontwikkeld. Zowel het neuraminidase als het M2 eiwit zijn belangrijk voor de replicatie van influenzavirussen. Hoewel deze geneesmiddelen werkzaam zijn wordt hun toepasbaarheid bedreigd door de ontwikkeling van resistentie ertegen. Zo bleek in het seizoen 2007/08 het grootste deel van de H1N1-virussen resistent tegen Tamiflu. De ontwikkeling van resistentie is vooral een probleem bij de behandeling van immuungecompromiteerde patiënten. Er bestaat dus behoefte aan nieuwe middelen die het arsenaal van antivirale middelen zouden kunnen aanvullen. In samenwerking met collega's van de Rijksuniversiteit van Utrecht onderzoeken we of het mogelijk is om bepaalde moleculen van het aangeboren immuunsysteem, zgn. collectines, te kunnen gebruiken als antiviraal middel tegen influenzavirusinfecties.

Influenzasurveillance

Zowel voor het volgen van de ontwikkeling van resistentie tegen antivirale middelen en het optreden van antigene drift, is een goede surveillance van influenzavirussen absoluut noodzakelijk. Het vaststellen van de gevoeligheid van influenzavirussen voor antivirale middelen is natuurlijk van direct belang voor het gebruik van deze geneesmiddelen en patiëntenzorg. Het volgen van antigene drift is al decennia lang de methode om er voor te zorgen dat influenzavaccins jaarlijks worden aangepast en effectief blijven tegen driftvarianten die verantwoordelijk zijn voor de jaarlijkse uitbraken van influenza. De influenzasurveillance activiteiten zijn de verantwoordelijkheid van het Nationaal influenza Centrum. In Nederland worden de taken van het Nationaal influenza centrum uitgevoerd door de afdeling virologie van het Erasmus MC in Rotterdam en het RIVM in Bilthoven. Ook het NIVEL speelt een belangrijke rol in de surveillance door het aantal patiënten bij te houden dat zich met een influenza-achtig ziektebeeld bij de huisarts meldt. Bovendien wordt van een deel van deze patiënten een keelwat afgenomen die worden onderzocht op

de aanwezigheid van influenzavirussen. Een andere bron van virussen die kunnen worden onderzocht zijn patiënten die met griep in ziekenhuizen worden opgenomen. Ook daarvan ontvangt het Nationaal Influenza Centrum elke jaar een groot aantal virusisolaten die zonder uitzondering worden onderzocht op hun gelijkenis met de vaccinreferentiestammen. De vergaarde informatie over in Nederland circulerende influenzavirussen wordt gerapporteerd aan de Wereld Gezondheidsorganisatie. Op basis van deze informatie en de virussen die de WHO ontvangt kan zij een aanbeveling doen over de vaccinsamenstelling en dus de effectiviteit van het influenzavaccin. Op indirecte wijze dragen we dus een steentje bij aan patiëntenzorg.

Onderwijs

Naast onderzoek en patiëntenzorg is binnen een academische instelling als het Erasmus MC kennis overdracht en opleiding van nieuwe wetenschappers en artsen een van de speerpunten.

Onder auspiciën van de onderzoeksschool “Molecular Medicine” wordt sinds 2002 om het jaar de “Course in Virology” georganiseerd voor AIO’s en PostDocs werkzaam op het gebied van de virologie en Medische Microbiologen al dan niet opleiding. Ook in de toekomst zal ik deze cursus blijven organiseren thans in samenwerking met Stella Koppel. Hiermee kunnen we niet alleen de doelgroep laten kennis nemen van het virologieveld maar ook de afdeling virologie en het Erasmus MC profileren als kenniscentrum op dit vakgebied.

Een andere cursus die om het jaar op de agenda zal staan is de internationaal erkende, door de ESWI gefinancierde “Influenza practical training course”. Met deze cursus, waaraan een groot aantal mensen van de afdeling virologie een bijdrage levert, worden personen die binnen Europa werkzaam zijn op het gebied van de influenzasurveillance de kneepjes van het vak bijgebracht. Ook met deze cursus weet de afdeling virologie en het Erasmus MC zich te profileren als kenniscentrum. Naast onderwijsstaken in het kader van het curriculum voor geneeskundestudenten, zal ik een bijdrage leveren aan het onderwijsprogramma van de recentelijk geaccrediteerde research Master opleiding “Infection and Immunity”. Tevens zal studenten de mogelijkheid geboden worden om in het kader van hun studie stage te lopen binnen mijn onderzoeksgroep. Het begeleiden en opleiden van AIO’s zal een speciaal aandachtspunt zijn en een belangrijke manier van kennisoverdracht waardoor nieuw generaties van wetenschappers de kans krijgen om zich verder te ontplooiën en te ontwikkelen.

Dankwoord

Op de eerste plaats dank ik de Rector magnificus, de decaan, de raad van bestuur van het Erasmus MC en de vereniging Trustfonds voor het realiseren van deze bijzondere leerstoel Immunovirologie en het in mij gestelde vertrouwen.

In het bijzonder wil ik Professor Ab Osterhaus bedanken, die aan de wieg van mijn ontwikkeling als viroloog heeft gestaan. Inmiddels is het 25 jaar geleden dat ik mij in een situatie bevond waarin ik moest kiezen tussen twee verschillende posities voor een promotie-onderzoek. Door tussenkomst van Eric Claassen en Rob Meloen, die destijds Ab Osterhaus en Fons UytdeHaag kwalificeerden als “het dynamische duo” binnen het RIVM, viel de keus op onderzoek naar de “Bestrijding van klein venijn”, toen het Canine parvovirus. Nooit heb ik van die beslissing spijt gehad en ik ben zeer dankbaar dat ik de gelegenheid heb gekregen om mij onder leiding van Ab Osterhaus in de immunovirologie te bewamen. In het dankwoord van mijn proefschrift schreef ik in 1990 “Beste Ab, de inzet, enthousiasme en energie waarmee jij je op je werk stort zullen me lang bijblijven en altijd een voorbeeld zijn”. Deze woorden hebben niets van hun betekenis verloren. Nog steeds is Ab Osterhaus een voorbeeld voor velen en ik hoop dat hij zich zo lang mogelijk verdienstelijk kan blijven maken voor de afdeling virologie, het Erasmus MC en het mag wel eend gezegd worden: de volksgezondheid in Nederland. Het was dan ook niet verwonderlijk dat ik na een dienstverband bij het AMC in Amsterdam, waar ik met veel enthousiasme heb gewerkt aan de ontwikkeling van AIDS vaccins met Prof. Jaap Goudsmit en Dr. Peter Nara, de gelegenheid opnieuw aangreep om in Rotterdam op “het Lab van Ab” te werken aan influenzavirussen. De afdeling virologie van het Erasmus MC had toen al een traditie op het gebied van onderzoek naar influenza, wat mij in korte tijd in staat stelde om veel te leren. Collega's van het eerste uur, Marianne Baars, Ruud van Beek en Eric Claas dank ik voor hun bijdrage in die tijd.

De influenzagroep werd in korte tijd uitgebreid en ik was zeer verheugd met de komst van Prof. Ron Fouchier, een excellente moleculair viroloog en Prof. Thijs Kuiken, een excellente veterinaire patholoog. Samenwerken met de groepen van Ron en Thijs en het uitwisselen van expertise van de disciplines immunologie, pathologie en moleculaire virologie heeft ons geen windeieren gelegd en kan als voorbeeld dienen voor anderen. Ik ben dankbaar voor de mogelijkheden die onze samenwerking heeft geboden en nog steeds biedt.

Het uitvoeren van onze taak als Nationaal Influenza Centrum zou niet mogelijk geweest zijn zonder de encyclopedische kennis van influenza van Dr. Jan de Jong en de inspanningen van Ruud van Beek, al jaren de rots in de branding van de influenzasurveillance in Nederland en sinds kort bijgestaan door Heidi de Gruyter.

Zonder de toegewijde inzet van de eigen influenza immunologie groep had ik hier nu niet gestaan. Met een relatief kleine onderzoeksgroep zijn we in staat geweest om een heel mooie output te genereren. Nella Nieuwkoop, Joyce Verburgh, Stella van Trierum, Gerrie de Mutsert, Tiny Geelhoed-Mieras, Marine Hillaire, Rogier Bodewes, en Joost Kreijtz, ik ben trots op jullie. Ook de AIO's die inmiddels het lab hebben verlaten wil ik bedanken voor hun inspanningen die zij tijdens hun promotietraject hebben verricht. Theo Voeten, Jacco Boon, Femke Berkhoff, Willem Huisman en Corine Geurts van Kessel.

Ook wil ik al mijn andere collega's van de research unit en de diagnostiek unit van de afdeling virologie bedanken voor de prettige samenwerking en de uitstekende sfeer. De borrels en feesten zijn niet te evenaren (met dank aan de feestcommissies!).

Geert van Amerongen wil ik bedanken voor zijn hulp bij het uitvoeren van de proefdiereperimenten gedurende de afgelopen 15 jaar. Pieter Fraaij dank ik voor zijn inzet bij het uitvoeren van onderzoek naar influenza-specifieke immuniteit bij kinderen.

Alle sprekers van de "Course in virology" wil ik bedanken voor hun belangeloze bijdrage aan deze cursus.

I also thank Prof. Derek Smith of the University of Cambridge for his expertise as a computer scientist and his contribution to a number of papers. Making antigenic maps of T cell recognition data on Istanbul airport I will not forget easily. We almost missed our flights. Prof. Gerd Sutter I thank for his expertise in the field of pox virology, which has been instrumental for the design and construction of novel candidate influenza vaccines based on the MVA pox virus vector. I am looking forward to continue our fruitful collaboration in the future.

Binnen de afdeling virologie nemen de spin-off bedrijven geleid door Prof. Eric Claassen, Dr. James Simon en Dr. Hans Bunschoten een bijzondere plaats in. Op professionele wijze nemen zij verantwoordelijkheid voor contract research en andere commerciële activiteiten en genereren daarmee revenuen en geven ondersteuning aan research activiteiten van de afdeling virologie. Het doet mij deugd dat ik daar een kleine bijdrage aan mag leveren.

Gedurende de afgelopen jaren heb ik met zeer veel mensen binnen het Erasmus MC en, in het kader van nationale en internationale samenwerkingsverbanden, buiten het Erasmus MC mogen samen werken, te veel om allemaal afzonderlijk te bedanken. Zij het op een onpersoonlijke manier, wil ik al deze mensen bedanken.

Mijn ouders wil ik bedanken voor alle vrijheid en mogelijkheden die ik heb gehad om mij te ontwikkelen en het in mij gestelde vertrouwen. Frans, het doet mij geweldig veel deugd dat je deze dag in goede gezondheid mee kan maken.

Tot slot wil ik het thuisfront bedanken, Jeanette, Pascale en Meryl. Ik heb een heel leuke baan en ga met veel plezier en met een glimlach op mijn gezicht naar mijn werk. Maar wetend dat thuis drie prachtige vrouwen op mij wachten, rijd ik schaterlachend weer terug naar huis.

Tot mijn dochters wil ik nog dit zeggen, en ik denk dat de dames en heren met de toga's aan dit zullen beamen: Pascale en Meryl wees niet bang, niet alle professoren zijn "Nerds" en ik zal er alles aan doen om er niet een te worden...

Ik heb gezegd

Referenties

- ¹ Smith, D. J., A. S. Lapedes, J. C. de Jong, T. M. Bestebroer, G. F. Rimmelzwaan, A. D. Osterhaus, and R. A. Fouchier. 2004. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science* 305:371-376.
- ² Jain, S., L. Kamimoto, A. M. Bramley, A. M. Schmitz, S. R. Benoit, J. Louie, D. E. Sugerman, J. K. Druckenmiller, K. A. Ritger, R. Chugh, S. Jasuja, M. Deutscher, S. Chen, J. D. Walker, J. S. Duchin, S. Lett, S. Soliva, E. V. Wells, D. Swerdlow, T. M. Uyeki, A. E. Fiore, S. J. Olsen, A. M. Fry, C. B. Bridges, L. Finelli, and A. V. H. I. T. Pandemic Influenza. 2009. Hospitalized patients with 2009 H1N1 influenza in the United States, April-June 2009. *N Engl J Med* 361:1935-1944.
- ³ Perez-Padilla, R., D. de la Rosa-Zamboni, S. Ponce de Leon, M. Hernandez, F. Quinones-Falconi, E. Bautista, A. Ramirez-Venegas, J. Rojas-Serrano, C. E. Ormsby, A. Corrales, A. Higuera, E. Mondragon, J. A. Cordova-Villalobos, and I. W. G. o. Influenza. 2009. Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico. *N Engl J Med* 361:680-689.
- ⁴ Garten, R. J., C. T. Davis, C. A. Russell, B. Shu, S. Lindstrom, A. Balish, W. M. Sessions, X. Xu, E. Skepner, V. Deyde, M. Okomo-Adhiambo, L. Gubareva, J. Barnes, C. B. Smith, S. L. Emery, M. J. Hillman, P. Rivailier, J. Smagala, M. de Graaf, D. F. Burke, R. A. Fouchier, C. Pappas, C. M. Alpuche-Aranda, H. Lopez-Gatell, H. Olivera, I. Lopez, C. A. Myers, D. Faix, P. J. Blair, C. Yu, K. M. Keene, P. D. Dotson, Jr., D. Boxrud, A. R. Sambol, S. H. Abid, K. St George, T. Bannerman, A. L. Moore, D. J. Stringer, P. Blevins, G. J. Demmler-Harrison, M. Ginsberg, P. Kriner, S. Waterman, S. Smole, H. F. Guevara, E. A. Belongia, P. A. Clark, S. T. Beatrice, R. Donis, J. Katz, L. Finelli, C. B. Bridges, M. Shaw, D. B. Jernigan, T. M. Uyeki, D. J. Smith, A. I. Klimov, and N. J. Cox. 2009. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 325:197-201.
- ⁵ Writing Committee of the, W. H. O. C. o. C. A. o. P. I., E. Bautista, T. Chotpitayasunondh, Z. Gao, S. A. Harper, M. Shaw, T. M. Uyeki, S. R. Zaki, F. G. Hayden, D. S. Hui, J. D. Kettner, A. Kumar, M. Lim, N. Shindo, C. Penn, and K. G. Nicholson. 2010. Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection. *N Engl J Med* 362:1708-1719.
- ⁶ Fraser, C., C. A. Donnelly, S. Cauchemez, W. P. Hanage, M. D. Van Kerkhove, T. D. Hollingsworth, J. Griffin, R. F. Baggaley, H. E. Jenkins, E. J. Lyons, T. Jombart, W. R. Hinsley, N. C. Grassly, F. Balloux, A. C. Ghani, N. M. Ferguson, A. Rambaut, O. G. Pybus, H. Lopez-Gatell, C. M. Alpuche-Aranda, I. B. Chapela, E. P. Zavala, D. M. Guevara, F. Checchi, E. Garcia, S. Hugonnet, C. Roth, and W. H. O. R. P. A. Collaboration. 2009. Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings. *Science* 324:1557-1561.
- ⁷ Maines, T. R., A. Jayaraman, J. A. Belser, D. A. Wadford, C. Pappas, H. Zeng, K. M. Gustin, M. B. Pearce, K. Viswanathan, Z. H. Shriver, R. Raman, N. J. Cox, R. Sasisekharan, J. M. Katz, and T. M. Tumpey. 2009. Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses in ferrets and mice. *Science* 325:484-487.
- ⁸ Munster, V. J., E. de Wit, J. M. van den Brand, S. Herfst, E. J. Schrauwen, T. M. Bestebroer, D. van de Vijver, C. A. Boucher, M. Koopmans, G. F. Rimmelzwaan, T. Kuiken, A. D. Osterhaus, and R. A. Fouchier. 2009. Pathogenesis and transmission of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza virus in ferrets. *Science* 325:481-483.
- ⁹ Rimmelzwaan, G. F., and G. Sutter. 2009. Candidate influenza vaccines based on recombinant modified vaccinia virus Ankara. *Expert Rev Vaccines* 8:447-454.
- ¹⁰ Kreijtz, J. H., Y. Suezzer, G. de Mutsert, G. van Amerongen, A. Schwantes, J. M. van den Brand, R. A. Fouchier, J. Lower, A. D. Osterhaus, G. Sutter, and G. F. Rimmelzwaan. 2009. MVA-based H5N1 vaccine affords cross-clade protection in mice against influenza A/H5N1 viruses at low doses and after single immunization. *PLoS One* 4:e7790.
- ¹¹ Kreijtz, J. H., Y. Suezzer, G. de Mutsert, J. M. van den Brand, G. van Amerongen, B. S. Schnierle, T. Kuiken, R. A. Fouchier, J. Lower, A. D. Osterhaus, G. Sutter, and G. F. Rimmelzwaan. 2009. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing the hemagglutinin gene confers protection against homologous and heterologous H5N1 influenza virus infections in macaques. *J Infect Dis* 199:405-413.
- ¹² Kreijtz, J. H., Y. Suezzer, G. van Amerongen, G. de Mutsert, B. S. Schnierle, J. M. Wood, T. Kuiken, R. A. Fouchier, J. Lower, A. D. Osterhaus, G. Sutter, and G. F. Rimmelzwaan. 2007. Recombinant modified vaccinia virus Ankara-based vaccine induces protective immunity in mice against infection with influenza virus H5N1. *J Infect Dis* 195:1598-1606.

- ¹³ Kreijtz, J. H., Y. Suezter, R. Bodewes, A. Schwantes, G. van Amerongen, J. van den Brand, S. E. van Trierum, T. Kuiken, R. A. Fouchier, A. D. Osterhaus, G. Sutter, and G. F. Rimmelzwaan. 2010. Evaluation of an MVA-based candidate pandemic influenza A/H1N1 vaccine in the ferret model. *J Gen Virol*.
- ¹⁴ Bodewes, R., A. D. M. E. Osterhaus, and G. F. Rimmelzwaan. 2010. Targets for the Induction of Protective Immunity Against Influenza A Viruses. *Viruses* 2:166-188.
- ¹⁵ Kreijtz, J. H., G. de Mutsert, C. A. van Baalen, R. A. Fouchier, A. D. Osterhaus, and G. F. Rimmelzwaan. 2008. Cross-recognition of avian H5N1 influenza virus by human cytotoxic T-lymphocyte populations directed to human influenza A virus. *J Virol* 82:5161-5166.
- ¹⁶ Lee, L. Y., L. A. Ha do, C. Simmons, M. D. de Jong, N. V. Chau, R. Schumacher, Y. C. Peng, A. J. McMichael, J. J. Farrar, G. L. Smith, A. R. Townsend, B. A. Askonas, S. Rowland-Jones, and T. Dong. 2008. Memory T cells established by seasonal human influenza A infection cross-react with avian influenza A (H5N1) in healthy individuals. *J Clin Invest* 118:3478-3490.
- ¹⁷ Kreijtz, J. H., R. Bodewes, G. van Amerongen, T. Kuiken, R. A. Fouchier, A. D. Osterhaus, and G. F. Rimmelzwaan. 2007. Primary influenza A virus infection induces cross-protective immunity against a lethal infection with a heterosubtypic virus strain in mice. *Vaccine* 25:612-620.
- ¹⁸ Kreijtz, J. H., R. Bodewes, J. M. van den Brand, G. de Mutsert, C. Baas, G. van Amerongen, R. A. Fouchier, A. D. Osterhaus, and G. F. Rimmelzwaan. 2009. Infection of mice with a human influenza A/H3N2 virus induces protective immunity against lethal infection with influenza A/H5N1 virus. *Vaccine* 27:4983-4989.
- ¹⁹ McMichael, A. J., F. M. Gotch, G. R. Noble, and P. A. Beare. 1983. Cytotoxic T-cell immunity to influenza. *N Engl J Med* 309:13-17.
- ²⁰ Voeten, J. T., T. M. Bestebroer, N. J. Nieuwkoop, R. A. Fouchier, A. D. Osterhaus, and G. F. Rimmelzwaan. 2000. Antigenic drift in the influenza A virus (H3N2) nucleoprotein and escape from recognition by cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 74:6800-6807.
- ²¹ Boon, A. C., G. de Mutsert, Y. M. Graus, R. A. Fouchier, K. Sintnicolaas, A. D. Osterhaus, and G. F. Rimmelzwaan. 2002. Sequence variation in a newly identified HLA-B35-restricted epitope in the influenza A virus nucleoprotein associated with escape from cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 76:2567-2572.
- ²² Gras, S., L. Kedzierski, S. A. Valkenburg, K. Laurie, Y. C. Liu, J. T. Denholm, M. J. Richards, G. F. Rimmelzwaan, A. Kelso, P. C. Doherty, S. J. Turner, J. Rossjohn, and K. Kedzierska. 2010. Cross-reactive CD8+ T-cell immunity between the pandemic H1N1-2009 and H1N1-1918 influenza A viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:12599-12604.
- ²³ Berkhoff, E. G., E. de Wit, M. M. Geelhoed-Mieras, A. C. Boon, J. Symons, R. A. Fouchier, A. D. Osterhaus, and G. F. Rimmelzwaan. 2005. Functional constraints of influenza A virus epitopes limit escape from cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 79:11239-11246.
- ²⁴ Rimmelzwaan, G. F., E. G. Berkhoff, N. J. Nieuwkoop, R. A. Fouchier, and A. D. Osterhaus. 2004. Functional compensation of a detrimental amino acid substitution in a cytotoxic-T-lymphocyte epitope of influenza A viruses by comutations. *J Virol* 78:8946-8949.
- ²⁵ Rimmelzwaan, G. F., E. G. Berkhoff, N. J. Nieuwkoop, D. J. Smith, R. A. Fouchier, and A. D. Osterhaus. 2005. Full restoration of viral fitness by multiple compensatory co-mutations in the nucleoprotein of influenza A virus cytotoxic T-lymphocyte escape mutants. *J Gen Virol* 86:1801-1805.
- ²⁶ Bodewes, R., J. H. Kreijtz, and G. F. Rimmelzwaan. 2009. Yearly influenza vaccinations: a double-edged sword? *Lancet Infect Dis* 9:784-788.

- ²⁷ Bodewes, R., J. H. Kreijtz, C. Baas, M. M. Geelhoed-Mieras, G. de Mutsert, G. van Amerongen, J. M. van den Brand, R. A. Fouchier, A. D. Osterhaus, and G. F. Rimmelzwaan. 2009. Vaccination against human influenza A/H3N2 virus prevents the induction of heterosubtypic immunity against lethal infection with avian influenza A/H5N1 virus. *PLoS One* 4:e5538.
- ²⁸ Bodewes, R., J. H. Kreijtz, M. L. Hillaire, M. M. Geelhoed-Mieras, R. A. Fouchier, A. D. Osterhaus, and G. F. Rimmelzwaan. 2010. Vaccination with whole inactivated virus vaccine affects the induction of heterosubtypic immunity against influenza virus A/H5N1 and immunodominance of virus-specific CD8+ T-cell responses in mice. *J Gen Virol* 91:1743-1753.

*Deze publicatie betreft een oratie aan
de Erasmus Universiteit Rotterdam*

ISBN 978-90-77906-76-7

