

PDF hosted at the Radboud Repository of the Radboud University Nijmegen

The following full text is a publisher's version.

For additional information about this publication click this link.

<http://hdl.handle.net/2066/18928>

Please be advised that this information was generated on 2019-11-20 and may be subject to change.

VIRUSSEN

&
de paradox van preventie



J.M.D. Galama

VIRUSSEN

&
de paradox van preventie

Rede

uitgesproken bij de aanvaarding van
het ambt van hoogleraar in de Virologie
aan de Faculteit der Medische Wetenschappen
van de Katholieke Universiteit Nijmegen
op vrijdag 2 februari 2001

door

dr. J.M.D. Galama



Katholieke *Universiteit* Nijmegen

“The most beautiful thing we can experience is the mysterious.
It is the source of all true art and science.”

Albert Einstein

©2001 J.M.D. Galama

Omslag: Egyptische priester Ruma (c.a. 1500 voor Chr.); een slachtoffer van poliomyelitis.

*Mijnheer de Rector Magnificus,
Zeer gewaardeerde toehoorders,*

IN HET JAAR 430 voor Chr. werd Athene getroffen door een plaag. Het was tijdens het hoogtepunt van haar macht binnen het klassieke Europa. De eerste doden vielen in Piraeus, de haven van Athene, maar al gauw verspreidde de ziekte zich onder de gehele bevolking. De ziekte was fataal voor ruim één derde van de inwoners en verdween weer even snel en mysterieus als zij kwam. De verwekker is nooit achterhaald. Door ziekte verzwakt, verloor Athene de strijd om de hegemonie en was niet meer in staat om de machtspositie te herstellen. Een cultuur verdween. Hans Zinsser was de eerste die schreef over de invloed van infectieziekten op de geschiedenis¹. Aan hem danken we ook de uitspraak dat Napoleon was verslagen door een luis. Deze bracht vlektyfus onder de Franse legers en bezorgde hen zo de nederlaag. Plagen maakten dus historie, maar de civilisatie heeft ook plagen voortgebracht. Over het verband tussen virussen en geschiedenis zal ik u uitvoerig onderhouden, maar eerst zal ik uitleggen wat virussen zijn en waarin ze verschillen van andere micro-organismen zoals bacteriën en schimmels. Vervolgens zal ik stilstaan bij de betekenis van virussen voor de evolutie van het immuunsysteem. Dit systeem heeft tot taak om ons tegen infecties te beschermen. Het is na de hersenen het meest complexe systeem dat de evolutie heeft voortgebracht. Vanouds waren het de virussen die dit systeem op de proef hebben gesteld. Daarbij vervulden ze door natuurlijke selectie een positieve rol. Echter, virussen kunnen ook een negatief effect hebben waarbij het immuunsysteem ontspoorde en een auto-immuunziekte ontstaat. Dit resulteert in een verhaal vol paradoxen maar mijn boodschap zal uiteindelijk zijn dat virussen, naast alle kwaad dat ze stichten, mogelijk ook ergens goed voor zijn. Twee virussen wil ik in deze rede centraal stellen: het mazelenvirus en het enterovirus. Naar beide virussen heb ik als viroloog onderzoek gedaan en beide spelen een rol in de paradox waarover ik u ga onderhouden. Maar nu eerst een antwoord op de vraag: wat is eigenlijk een virus?

Wat is een virus?

PETER MEDAWAR, immunoloog en Nobelprijswinnaar (1960) omschreef een virus als “*a piece of nucleic acid surrounded by bad news*”². Vrij vertaald komt het er op neer dat een virus dood is en slechts bestaat uit een erfelijke boodschap, een slecht nieuws bericht in een geadresseerde envelop. De cel die deze brief ontvangt en zo dom is om hem te openen, wordt gedwongen om de brief tot het bittere einde te lezen. De boodschap is eenvoudig. De cel krijgt de opdracht om nieuw virus te maken, een slavenarbeid waaraan ze doorgaans ten gronde gaat. Gaat de cel te snel dood, dan is er onvoldoende virus geproduceerd en is de infectie geen succes. Groeit het virus te langzaam, dan bestaat de kans dat de geïnfecteerde cel ontdekt wordt door het immuunsysteem en al is opgeruimd voordat er nieuwe virussen zijn. Het is vaak een race tegen de klok. Sommige virussen, waaronder het herpesvirus, kunnen de afweer op meesterlijke wijze om de tuin leiden en een chronische infectie veroorzaken. Andere virussen, zoals mazelenvirus en HIV verlammen de afweer waardoor ze tijd winnen. Ze doen dit door de cellen van het immuunsysteem te infecteren en uit te schakelen. Tenslotte bestaan er virussen die een cel infecteren maar geen schade toebrengen. Bij deze infecties zal niet het virus zelf, maar de afweer ziekte kunnen veroorzaken. Dat komt omdat het afweersysteem is toegerust met *killerzellen* die de geïnfecteerde cellen herkennen en opruimen. Simpel gesteld, ontstaat een virusziekte doordat plotseling veel cellen afsterven, hetzij als slachtoffer van het virus, hetzij als slachtoffer van de *killerzellen* die geen besmetting dulden. In de evolutie zijn deze *killerzellen* ontstaan als antwoord op virusinfecties omdat die zich geheel binnen de cel afspelen. Daartoe heeft het immuunsysteem het vermogen ontwikkeld om onderscheid te maken tussen gezonde cellen die wel worden aangeduid als lichaamseigen (*self*), en geïnfecteerde cellen die als lichaamsvreemd (*non-self*) worden herkend. Bij auto-immuunziekten is dit principe verstoord en richt de afweer zich tegen de eigen weefsels en organen, dus tegen het *self*.

Een virus heeft dus altijd een cel nodig waarin het wordt vermeerderd. Echter, niet iedere cel kan de brief ontvangen. Daarvoor moeten op het oppervlak van de cel specifieke moleculen aanwezig zijn waaraan het virus kan hechten. Ook zijn er cellen die de brief wel ontvangen maar vervolgens de opdracht negeren. Dit maakt dat slechts bepaalde cellen en

weefsels schade ondervinden. Om al deze redenen is de relatie van een virus met zijn gastheer zeer specifiek, zelfs zo specifiek dat een virus niet eenvoudig van de ene diersoort kan overstappen op een andere. Dat gebeurt maar zelden en lukt eigenlijk alleen wanneer de soorten verwant zijn, bijvoorbeeld bij mensen en mensapen. De meeste virussen zijn kwetsbaar en gaan buiten de gastheer snel dood, zodat ze vlug een nieuw slachtoffer moeten vinden. In elk van deze opzichten verschilt een virus van bacteriën en schimmels, die zich zelfstandig kunnen vermeerderen en waarvan de meeste vrij in de natuur voorkomen. Door de unieke relatie die virussen met hun gastheer onderhouden is ook hun evolutie gekoppeld. Men spreekt van co-evolutie. Zo speelt het gedrag van de gastheer een belangrijke rol bij de verspreiding van het virus. Derhalve is onze geschiedenis met haar sociale en culturele ontwikkeling belangrijk geweest voor het ontstaan van virusziekten.

Virus en cultuur: een kwestie van kansen

KENMERKEND VOOR DE relatief korte geschiedenis van de mensheid zijn de geleidelijke civilisatie en de verovering van continenten. Deze ontwikkeling ging gepaard met een frequente wisseling van leefomstandigheden waardoor kansen ontstonden voor nieuwe infectieziekten³. Zo leefden de prehistorische jagers als nomaden in kleine geïsoleerde gemeenschappen. Binnen een kleine gemeenschap kan een virus zich alleen handhaven als het een chronische infectie veroorzaakt die van generatie op generatie wordt overgedragen. Dat gebeurt bij intiem contact zoals speelt tussen moeder en kind. Voorbeelden zijn het cytomegalovirus dat via de moedermelk wordt overgedragen en het humaan papillomavirus dat wratten veroorzaakt. Virus en gastheer zijn goed aan elkaar aangepast zodat de infectie weinig ziekte veroorzaakt en geen belemmering vormt voor de strijd om het bestaan. Deze virussen behoren tot de oudste in onze geschiedenis. Enterovirussen, waartoe het poliovirus behoort, veroorzaken een acute, kortdurende, maagdarminfectie waarbij het nieuw gevormde virus massaal in de ontlasting terecht komt. Na enkele weken eindigt de virusuitscheiding en moet het virus een nieuw slachtoffer vinden, anders stopt de infectieketen. Enterovirussen zijn echter relatief stabiel en kunnen enige weken in water overleven. Komen ze in oppervlaktewater

terecht, dan kunnen ze kilometers verspreid worden voordat ze afsterven. Naarmate de wereldbevolking groeide en nederzettingen ontstonden rond de waterwegen, kregen deze virussen een kans om zich te verspreiden. Acute luchtweginfecties zoals de mazelen werden pas succesvol nadat de bevolkingsdichtheid zo was toegenomen dat een besmettingsketen kon ontstaan waarbij het virus van mens op mens wordt overgebracht. De keten kan alleen stand houden zolang er voldoende mensen ontvankelijk zijn voor de infectie. Deze infecties danken hun succes aan de opkomst van de steden en de handel die zorgde voor uitwisseling tussen de steden onderling. Infecties eisten een zo hoge tol dat een constante toestroom van volk noodzakelijk was om de stadsbevolking op peil te houden³. Deze situatie hield ook in Nederland stand tot in de 20^e eeuw⁴. Met de intrede van de industriële revolutie kwamen welvaart en wetenschap tot bloei. De microscoop werd krachtiger, de besmettingsleer aanvaard en er ontstond enig besef van hygiëne. Men trof maatregelen waardoor de sterfte aan infectieziekten, die eind 19^e eeuw nog ruim 40% van alle doodsoorzaken betrof, voor het eerst scherp ging dalen. Er werden rioeringen aangelegd en het drinkwater kwam voortaan uit een kraan. Hierdoor verdwenen ziekten als cholera en tyfus, maar onverwacht dook een nieuwe ziekte op: poliomyelitis of kinderverlamming. Daarbij viel op dat nu niet de arme drommel het slachtoffer was maar juist de hogere klasse, met president Franklin Roosevelt als prominent voorbeeld. Zodoende trok poliomyelitis veel publiciteit en werd ze een gevreesde ziekte onder de rijken. Poliomyelitis is evenals cholera een darminfectie, kortom een infectie uit het riool. Hoe kon nu kinderverlamming ontstaan op het moment dat de hygiëne sterk verbeterde? Het antwoord kwam nadat wetenschappers het virus hadden geïsoleerd en konden kweken. Uit hun onderzoek bleek dat onder de zeer onhygiënische toestanden die vóór het einde van de 19^e eeuw heersten, zuigelingen kort na de geboorte al met poliovirus besmet werden. Zo jong, bezit een baby nog antistoffen van de moeder welke hem tijdens de eerste 6 levensmaanden beschermen. Wordt een zuigeling in deze periode besmet, dan veroorzaakt polio alleen een darminfectie en kan het virus zich niet via de bloedbaan verspreiden en verlamming veroorzaken. Tijdens de darminfectie ontstaat immuniteit waardoor een tweede infectie onschadelijk is. Door de toegenomen hygiëne was de kans op besmetting weliswaar afgenomen, maar het poliovirus niet verdwenen. Nu de kans kleiner was werden kinderen ook op latere leeftijd geïnfecteerd.

teerd, nadat de antistoffen van de moeder waren verdwenen. Zo kon het virus alsnog de zenuwbanen bereiken. De vaccinatie tegen polio heeft uiteindelijk de oplossing geboden. Achteraf beschouwd, was poliomyelitis een oude ziekte die al bestond in de tijd van de farao's. Verlammingen kwamen ook toen voor, maar sporadisch en werden daarom niet herkend als het gevolg van een infectieziekte. De verbeterde hygiëne had dus een gunstig effect op het vóórkomen van darminfecties hoewel dat paradoxaal uitpakte voor polio. Deze vorm van hygiëne had echter geen effect op infecties die door de lucht worden verspreid, zoals de mazelen. Hun incidentie nam zelfs toe nu de steden dankzij de sanitaire verbetering begonnen te groeien. Ze raakten overbevolkt en je werd al van kindsbeen af geconfronteerd met infecties. De mazelen werden zo een kinderziekte waarbij de reputatie van dodelijke ziekte verdween. Op dit onderwerp zal ik nog uitgebreid terugkomen.

Dames en heren, deze korte vlucht door de tijd leert ons dat virusinfecties nauw zijn verbonden met onze beschaving en urbanisatie. Het zijn ware opportunisten die iedere verandering aangrijpen en ons daarbij voor verrassingen plaatsen zoals het paradoxale ontstaan van poliomyelitis als welvaartsziekte. Verliepen de ziekten dodelijk dan ontstond natuurlijke selectie die resulteerde in aanpassing van de populatie. Bij dit laatste wil ik uitvoerig stilstaan, omdat adaptatie aan ziekten uit het verleden ons nog steeds parten speelt bij huidige ziekten.

Het immuunsysteem en adaptatie

VERLOOPT EEN INFECTIE dodelijk waardoor de gastheer met uitsterven wordt bedreigd, dan komt ook het virus in gevaar. Dan dreigt immers de infectieketen te breken. In die situatie is adaptatie de enige uitweg. Dat geldt zowel voor de gastheer als voor het virus.

Er bestaat een indrukwekkend voorbeeld van adaptatie onder extreme omstandigheden dat ik u niet wil onthouden. Het betreft de introductie van myxomatose onder konijnen in Australië. Het Europese konijn was in 1859 uitgezet. Dit bleek geen slimme zet want het dier trof op dit continent geen natuurlijke ziekten of vijanden. Binnen 20 jaar was een rampzalige konijnenplaag ontstaan. Men overwoog om deze met een ziekte te bestrijden. Louis Pasteur had zich er in 1888 al mee bemoeid, maar men vond geen geschikte ziekteverwekker die alleen de konijnen zou treffen.

Het myxomatosevirus dat in 1919 bij toeval in Brazilië was ontdekt, bleek echter geschikt. Het virus veroorzaakte een dodelijke ziekte onder Europese konijnen en werd door muskieten overgebracht, wat gunstig leek voor de verspreiding. Het experiment werd pas in 1950 uitgevoerd. De infectie bleek zich met ongekende snelheid te verspreiden. Bij aanvang van de epidemie stierf ruim 99% van de konijnen zodat het dier in grote gebieden was uitgeroeid. Twee jaar later bleek echter dat het virus zich had aangepast en minder dodelijk (virulent) was geworden. Nu stierf niet meer dan 80% van de oorspronkelijke konijnenpopulatie en nog maar 50% van de konijnen die de infectie al gedurende enkele generaties hadden doorstaan. Door natuurlijke selectie was hun weerstand toegenomen. Na 7 generaties ontstond een zeker evenwicht. Het virus had zich niet verder aangepast, maar van de wilde konijnen stierf nog maar 20% aan myxomatose. Na 15 jaar was de konijnenpopulatie stabiel gereduceerd tot ongeveer een vijfde van het oorspronkelijke aantal. De direct door myxomatose veroorzaakte sterfte was slechts gering. Alleen waren de dieren tijdens de ziekte een gemakkelijke prooi geworden voor roofdieren⁵. Hoewel een reductie met 80% een zware prijs is, mag men toch spreken van een succesvolle aanpassing. Het alternatief was uitsterven. Vanwege het succes is myxomatose later ook in Europa geïntroduceerd.

Dit experiment illustreert hoe nieuwe infectieziekten kunnen ontstaan en hoe groot het adaptatievermogen is van mens en dier. Het extreme bestond uit de combinatie van de nieuwe ziekte en de samenstelling van de populatie die afstamde van enkele Europese voorouders en zonder voorafgaande ziekten weinig diversiteit had ontwikkeld. Ernstige infectieziekten hebben zodoende een sterke invloed op de evolutie van de populatie wat bovenal merkbaar zal zijn in het immuunsysteem. Of dit extreme selectieproces voor de konijnen ook nadelen had is niet goed bekend. Kenmerkend voor selectiedruk zijn de volgende factoren: (1) het gaat om een ernstige ziekte die een fors aantal doden veroorzaakt; (2) de ziekte is zo besmettelijk dat maar weinigen ontkomen en alleen de sterken overleven; (3) de infectie kan zich handhaven waardoor elke generatie opnieuw wordt besmet en het selectieproces vele generaties omvat. Individuen met zwakke genen verdwijnen totaal uit de populatie en de gunstige eigenschappen worden definitief in het genoom verankerd. Al deze kenmerken vinden we terug bij de mazelen, de ziekte die ik graag met u zal bespreken omdat ik daaraan mijn fascinatie voor de virologie heb te danken.

De mazelen

DE MAZELEN HEBBEN eveneens tot een sterke natuurlijke selectie geleid met een drastische aanpassing van ons afweersysteem. Om dit te staven zal ik u eerst iets vertellen over de ernst van de ziekte.

De ziekte werd rond de 1^e eeuw na Chr. via de zijderoute naar Europa gebracht. Het was toen een zeer ernstige ziekte. Daarom denkt men dat het destijds voor de mens een nieuwe ziekte was. De ernst roept misschien verbazing op. Uit het recente verleden kent U de ziekte immers als een relatief milde kinderziekte. Dit beeld is onjuist en maakt dat de invloed van mazelen wel eens wordt onderschat. Of de ziekte mild is hangt af van gunstige omstandigheden die niet overal aanwezig zijn en al helemaal niet in het verleden. Niet voor niets werd de mazelen in één adem genoemd met de pokken. Wanneer je was *gepokt en gemazeld*, en dat had doorstaan, dan kon je de wereld aan en was alleen de duvel nog in staat je te halen. Onder een bevolking die nooit eerder met dit virus in contact was geweest richtte de ziekte een ware slachting aan met sterftcijfers tot 50%. In de allervroegste tijden moet de sterfte zelfs hoger geweest zijn, vergelijkbaar met die van het gevreesde Ebolavirus. Omdat mazelen een van de meest besmettelijke ziekten is die we kennen, veel infectieuzer dan de pokken of de pest, werd niemand ontzien. Dit weten we niet alleen uit oude kronieken, maar ook van recentere epidemieën op de Fiji eilanden (1875) en op Groenland (1951), waarbij 99% van de bevolking ziek werd en 40% stierf⁶. De grote besmettelijkheid tezamen met een hoge sterfte, zorgden er voor dat mazelen een sterke natuurlijke selectie veroorzaakte. Dit heeft ongetwijfeld tot enige aanpassing geleid, maar die is nog verre van volmaakt. Bij volwassenen is het beloop nog steeds niet onschuldig en bij kinderen tussen de 3 en 8 jaar relatief mild. Het is niet geheel duidelijk waarom dit zo is. In ieder geval veranderde het karakter van de mazelen doordat het een kinderziekte werd. Dit laatste kwam hoofdzakelijk doordat de steden begonnen te groeien en de infectiedruk toenam. Bovendien werd de ziekte door de urbanisatie endemisch. Het mazelenvirus kan zich al handhaven in een gemeenschap van niet meer dan 250.000 zielen, ongeveer de bevolking van Nijmegen en omgeving. Zijn de omstandigheden echter ongunstig, zoals dat nog veel het geval is in arme landen met ondervoeding en tal van andere infecties, dan is mazelen als vanouds een killer. Ondanks uitgebreide vaccinatie, die inmiddels ook in ontwikkelingslanden

wordt toegepast, behoort mazelen mondiaal nog steeds tot de top-tien van dodelijke infectieziekten, vergelijkbaar met malaria.

Wat maakt nu van mazelen een killer? De infectie wordt vaak gecompliceerd door een pneumonie. Deze wordt echter zelden door het virus veroorzaakt, maar meestal door een bacterie. Zo brak vroeger na een mazelenepidemie vaak tuberculose uit. Dit was al geruime tijd bekend toen Von Pirquet in 1908 een bevinding deed die uiteindelijk zou leiden tot een beter begrip van de ziekte. Von Pirquet had ontdekt dat de immunologische weerstand tegen tuberculose die gemeten werd met een tuberculine reactie van de huid, tijdens een mazeleninfectie verdween⁷. Hiermee werd voor het eerst duidelijk dat mazelen de afweer onderdrukt. Dit was aanleiding voor nader onderzoek naar het effect van mazelenvirus op de afweer.

Mazelenvirus en het immuunsysteem

IN 1974 BEGON ik een promotieonderzoek naar het effect van mazelenvirus op witte bloedcellen (lymfocyten). Dit onderzoek voerde ik uit op het Centraal Laboratorium voor de Bloedtransfusiedienst in Amsterdam, in de wandelgangen het CLB genoemd. Het onderzoek werd samen met Professor Kees Lucas uitgevoerd, die in dezelfde periode op mazelen is gepromoveerd. Onze promotor was Professor J.J. van Loghem, een bijzondere man met visie en Amsterdamse lef. Hij had het CLB lang voor het fenomeen onderzoekschool ontstond, weten uit te bouwen tot een “*Center of Excellence*”. Je was trots om daar te mogen werken. Op het CLB is mijn passie ontstaan voor de combinatie van virussen en de immunologie.

De destijds recente ontdekking dat mazelen een sluipende maar dodelijke infectie van de hersenen, een subacute encefalitis (SSPE), kon veroorzaken was aanleiding voor ons onderzoek. Deze zeldzame encefalitis stond model voor een veel belangrijker ziekte waarvan werd vermoed dat mazelen er eveneens voor verantwoordelijk was, namelijk multiple sclerose, een auto-immuunziekte. Wij hadden ons tot doel gesteld om de cellulaire afweer tegen het mazelenvirus te bestuderen, wat in die tijd actueel was omdat net was ontdekt dat bepaalde lymfocyten, de *killerzellen*, in staat zijn om geïnfecteerde cellen in het

lichaam specifiek te herkennen en op te ruimen. Voor deze vorm van cellulaire afweer waren de in de thymus (T) gerijpte zogeheten T lymfocyten verantwoordelijk. Om T lymfocyten aan te zetten tot celdeling, wat een maat is voor hun activering, voegden we virus toe. Maar, in plaats van activering zagen we complete remming van de celdeling⁸. Waren de lymfocyten al geactiveerd en bijvoorbeeld in staat om andere cellen te ‘killen’, dan had het virus geen effect en werd de functie niet verstoord⁹. Remming trad evenmin op wanneer eerst mazelenantistoffen waren toegevoegd en zo bleek dat de remming berustte op een infectie van de lymfocyten. Ook vonden we dat het virus in rustende, dus niet-geactiveerde lymfocyten niet groeide maar wel een sluimerende infectie veroorzaakte. Werden de cellen geactiveerd, dan sloeg het virus alsnog toe en begon te groeien. Daarbij gingen de lymfocyten dood¹⁰. Jaren later bleek dat HIV hetzelfde doet, alleen langzamer. De overeenkomst met HIV maakt duidelijk waarom mazelen een grote killer is. Een belangrijk verschil met HIV schuilt in de besmettelijkheid die bij mazelen vele malen groter is, en die bepalend is voor de selectiedruk. Tegen besmetting valt bij mazelen weinig uit te richten. Veilig vrijen helpt niet, alleen vaccinatie helpt. Onze proeven maakten voor het eerst duidelijk hoe mazelen de afweer onderdrukt waardoor andere infecties zoals tuberculose een kans krijgen. Ook werd enigszins begrijpelijk waarom mazelen bij kinderen onder goede hygiënische omstandigheden minder ernstig verloopt. Jonge kinderen dragen nog weinig andere ziektekiemen bij zich.

Het is beangstigend maar tegelijk ook fascinerend om te beseffen dat de eerste mensen die mazelen doormaakten helemaal niet aangepast waren. De infectie moet een zware wissel hebben getrokken op hun bestaan en een sterke selectie hebben veroorzaakt. Welke de gevolgen daarvan zijn geweest voor ons immuunsysteem, is niet met zekerheid aan te geven. Het virus verlamt het specifieke systeem van de T- en B-lymfocyten, waaronder de eerder genoemde *killer cellen*. De laatsten zijn echter uiteindelijk verantwoordelijk voor het herstel¹¹. Waarschijnlijk moest de mens om te overleven tijdelijk terugvallen op oude afweer principes zoals de aanmaak van interferonen en cytokinen, stoffen die de virusgroei remmen en niet alleen worden gemaakt door de cellen van het immuunsysteem. Ik kan me voorstellen dat deze archaische vorm van afweer een positieve selectie heeft ondergaan, maar weten doen we

het niet. Het repertoire aan genen dat voor de adaptatie verantwoordelijk is ligt inmiddels in het genoom verankerd, hoewel hun aanwezigheid door de vaccinatie niet meer opportuun is. Recent is gebleken dat de uitkomst van deze selectie ook nadelen kent. Zodra de mazelen niet meer vóórkomen, lijken immunologische ziekten zoals allergie en hooikoorts toe te nemen, een paradoxaal effect waarop ik aan het slot zal terugkomen.

Enterovirus

SINDS 1990 VERRICHTEN we in Nijmegen onderzoek naar enterovirus. Het gaat hierbij niet om één enkel virus maar om 64 zeer verwante virussen waarvan u het poliovirus reeds kent. De andere hebben namen als Coxsackievirus, ECHOvirus of gewoon enterovirus. Met uitzondering van het poliovirus, zijn het geen spectaculaire virussen. Ze veroorzaken een darminfectie zonder veel klachten. Het meest aansprekend zijn de complicaties die soms kunnen ontstaan, zoals verlamming, meningitis, encefalitis en myocarditis. Dit laatste is een infectie van de hartspier. Waarom dan dit onderzoek? Het interessante aan deze virussen is dat ze een rol spelen bij het ontstaan van chronische ziekten waarbij verdenking bestaat op een immunologische oorzaak. Dus na mazelenvirus dat als een schoolmeester de afweer in het gareel houdt, dan nu enterovirus, dat als het enfant terrible het systeem in de war schopt. Naar dat enfant terrible doen wij dus onderzoek.

Enterovirussen behoren tot de kleinste onder de RNA virussen de *picornaviridae*, wat letterlijk betekent: “kleine (pico) RNA-virussen”. Het virus bestaat slechts uit een eiwitkapseltje met daarin een RNA molecule, dat het ‘*bad news*’ bevat. Het eiwitkapseltje is stabiel en zorgt dat het RNA wordt beschermd tijdens de weg door de maag zodat het virus ongeschonden de darm bereikt. In darmcellen wordt het enterovirus zeer snel vermenigvuldigd. Binnen 8 tot 16 uur is een cel volledig uitgeput, barst open en levert tienduizenden nieuwe virussen af. Enterovirussen veroorzaken een acute infectie die na 1 tot 2 weken over is. Wat er na de acute fase gebeurt, daarover verschillen de inzichten. Een aantal onderzoekers meent dat de infectie chronisch kan worden. Men noemt dit viruspersistentie.

Enterovirus en chronische ziekten

V OOR DE RELATIE met chronische ziekten worden in de literatuur twee verklaringen genoemd: de ene is de zojuist genoemde viruspersistentie en de ander is dat het virus auto-immuniteit kan veroorzaken. De drie belangrijkste ziekten waarmee enterovirus in verband wordt gebracht zijn: *hartfalen*, een ziekte van de hartspier die het gevolg kan zijn van een myocarditis; het *chronisch vermoeidheid syndroom*, ook wel *Post Viral Fatigue Syndrome* genoemd; *type 1 diabetes mellitus*, een auto-immuunziekte. Bij hartfalen werd het virus in de hartspier gevonden, bij het chronisch vermoeidheid syndroom in de ontlasting, en bij diabetes in het bloed. Type 1 diabetes is echter een auto-immuunziekte waarbij de afweer zich richt tegen de insuline producerende β -cellen in de eilandjes van Langerhans. Bij hartfalen en chronisch vermoeidheid syndroom wordt wel verondersteld dat auto-immuniteit een rol speelt, maar een hard bewijs ontbreekt. Voor deze ziekten gold dat een persisterende enterovirus infectie was gevonden en dat er mogelijk of met zekerheid sprake was van een auto-immuunziekte.

Geen persistentie

D AT ENTEROVIRUS KON persisteren was op het moment dat ik naar Nijmegen kwam een geheel nieuw concept, dus een uitdaging voor nader onderzoek! Voor dat onderzoek bleken de omstandigheden in Nijmegen bijzonder gunstig. Een klein jaar voor mijn komst was Professor Jos van der Meer benoemd tot hoofd van de Afdeling Algemeen Interne Geneeskunde. Hij is een inspirerend onderzoeker waarvan ik wist dat hij grote belangstelling heeft voor de relatie tussen moeheid en infectieziekten. Samen met dr. Gijs Bleijenberg die medisch psycholoog is, vormden wij een multidisciplinair team dat onder de bezielende leiding van Jos begon aan een onderzoek dat weldra was uitgegroeid tot het succesvolle *Nijmeegse Onderzoek naar het Chronisch Vermoeidheid Syndroom*. Daarnaast startte ik vanuit de Virologie onderzoek naar viruspersistentie bij andere ziekten, waaronder het hartfalen. Dit laatste onderzoek werd uitgevoerd in samenwerking met Professor Dirk Ruiter van de Afdeling Pathologie. Inmiddels was de Virologie versterkt met dr. Willem

Melchers, een moleculair bioloog. De moleculaire biologie heeft het vakgebied van de virologie groot gemaakt en met de PCR-techniek een methode voortgebracht waarmee de persistentie van enterovirus was ontdekt. Onder de krachtige leiding van Willem werd de moleculaire diagnostiek voor enterovirus opgezet. De resultaten van ons onderzoek naar viruspersistentie kunnen kort worden samengevat: geen van de studies heeft ook maar enige aanwijzing opgeleverd voor persistentie van enterovirus¹²⁻¹⁴. Daarmee had één mogelijke verklaring afgedaan maar bleef de optie van auto-immuniteit. Zodoende werd de aandacht verlegd naar type 1 diabetes, de ziekte die onbetwistbaar een auto-immuunziekte is.

Enterovirus en diabetes

UIT TWEELINGONDERZOEK IS gebleken dat voor het ontstaan van diabetes naast een erfelijke aanleg ook omgevingsfactoren van belang zijn. Daarbij wordt voornamelijk gedacht aan virussen en voeding. Op epidemiologische gronden is de groep van de enterovirussen als belangrijkste virale factor aangemerkt. Hoe deze virussen een rol spelen, is nog onduidelijk. De epidemiologische relatie suggereert dat ze auto-immuniteit veroorzaken. Het kan echter zijn dat ze alleen maar een co-factor vormen die het proces gaande houdt of versterkt. Diverse mechanismen zijn geopperd waarnaar wij onderzoek doen. Zo kunnen de virussen acuut diabetes veroorzaken wanneer de eilandjes van Langerhans geïnfecteerd raken en vernietigd worden. Hierbij speelt auto-immuniteit echter geen rol¹⁵. Uit prospectieve studies is gebleken dat er ook een relatie bestaat met het ontstaan van auto-immuniteit¹⁶. De mogelijke verklaringen hiervoor zijn nogal complex en zal ik u besparen. Voor ingewijden noem ik het mechanisme van *molecular mimicry*, een kruisreactie tussen virus en β -cellen, waarvoor wij een aanwijzing hebben gevonden¹⁷. Verder kan een niet-specifieke verstoring van het immuunsysteem optreden, *bystander effect* genoemd. Hierdoor kan het immuunsysteem de controle verliezen over reacties tegen het *self*, die in ieder van ons latent aanwezig zijn. Ook naar dit mechanisme doen wij onderzoek.

Als chronische ziekte vormt diabetes een aanzienlijk gezondheidsprobleem. Het is daarom verontrustend dat de incidentie wereldwijd toeneemt zonder dat we begrijpen waarom. Het is onwaarschijnlijk dat dit

zou komen door een toename van het aantal enterovirusinfecties, temeer daar diabetes het meest voorkomt in Zweden en Finland, landen met de hoogste hygiënische standaard. Je kunt je afvragen of niet het omgekeerde speelt, of niet een verband bestaat met de preventie en hygiëne, waarbij enterovirus een kans krijgt om in staat wordt gesteld om het enfant terrible te zijn.

Enterovirus: de moleculen spreken

AL SNEL NADAT de PCR was ontwikkeld verschoof de interesse van dr. Willem Melchers in de richting van basaal moleculair onderzoek. Hij startte onderzoek naar de replicatie van enterovirus, waardoor de onderzoekslijn van de Virologie een geheel eigen gezicht kreeg. Het moleculaire onderzoek houdt geen direct verband met de immunologie, maar leert ons hoe een klein virus, dat uit enkele eiwitten en een RNA molecuule bestaat, de leiding kan overnemen in een zo complex systeem als een cel. De uitkomst is bekend; productie van nieuw virus en de dood van de cel. Het onderzoek begon met een speurtocht naar het mechanisme van de celdood, waardoor immers persistentie wordt voorkómen. Het richtte zich al snel op een klein viraal eiwit, *p2B* geheten, waarvan de functie nage-noeg onbekend was. In samenwerking met dr. Peter Willems van de Afdeling Biochemie van de Medische Faculteit heeft onze groep aange-toond dat *p2B* in staat is om alle membranen van een geïnfecteerde cel lek te maken¹⁸. De schade aan membranen bleek niet alleen verantwoordelijk voor de celdood, maar ook voor het vrijkomen van nieuw virus. Opheldering van de eiwitstructuur van *p2B* leverde een mogelijke verklaring voor de activiteit. Het eiwit zou zich in membranen nestelen en daarin kanaaltjes of poriën vormen waardoor de inhoud naar buiten kan¹⁸. Vreemd genoeg is de celschade niet nadelig maar juist nodig voor replicatie van het virus. De verandering van de membranen blijkt een functie te vervullen bij de vorming van het zogeheten replicatiecomplex waarbin-nen RNA moleculen voor nieuw virus worden gesynthetiseerd. Het huidige onderzoek heeft betrekking op dit proces. De volgende stap in de virus-replicatie is de synthese van nieuw RNA. Dit proces start met de vorming van een “negatieve” RNA streng die complementair is aan het “positieve” RNA dat het genoom vormt (het “*bad news*”). Men veronderstelde dat de ruimtelijke structuur van het RNA zelf een rol speelt maar verder was ook

hiervan weinig bekend. Recent heeft onze groep de drie-dimensionale structuur van het 3' uiteinde van het RNA genoom opgehelderd¹⁹. Essentieel voor de vorming van de complexe RNA structuur bleek het bestaan van een interactie tussen twee RNA lussen die “*Kissing Interaction*” werd gedoopt. De *kissing interaction* is bepalend voor de terti re structuur van het RNA. Deze structuur heeft een specifieke biologische functie welke nu wordt onderzocht.

Wat is nu zo belangrijk aan dit moleculaire onderzoek? Het levert inzicht in de pathogenese van virusinfecties, waaronder het ontstaan van celdood. Ook biedt het perspectieven voor toekomstige therapie. Wat ons uiteindelijk het meest fascineert, is het inzicht dat er door ontstaat in de werking van de cel. Het is uiteindelijk niet het virus dat reliceert, ook al spreken we gemakshalve zo, maar de cel die virus maakt. Bij dat proces worden cellulaire mechanismen geëxploiteerd die allang bestaan maar vaak nog onbekend zijn. Door de sterk reductionistische aanpak van virusonderzoek kunnen dergelijke onbekende processen aan het licht komen. Een bekend voorbeeld is de ontdekking van de *oncogenen* door de bestudering van kanker verwekkende virussen. Zo staan de virussen model voor het moderne celbiologisch onderzoek binnen de *Molecular Life Sciences*, het wetenschapsgebied dat door onze Universiteit op unieke wijze is gestimuleerd met de bouw van de prestigieuze research toren waarin het *Nijmegen Centre for Molecular Life Sciences* (NCMLC) is ondergebracht. Voor dit voor ons zo belangrijke initiatief wil ik hier graag mijn grote waardering uitspreken. Daarmee wil ik voor even het pad van het moleculaire werk verlaten en de draad oppakken van virussen en het immuunsysteem.

De paradox van preventie

IN ONZE STRIJD tegen de virussen is het immuunsysteem uiteindelijk de trouwste bondgenoot. Immers, de vaccinaties zijn er op gebaseerd. De ontwikkeling van vaccins die al voorzichtig was ingezet door Jenner (1798) en Pasteur (1885), maakt sinds de tweede helft van de vorige eeuw een ware bloei door. Het Rijksvaccinatie programma kwam op gang met een reeks inenting, eerst tegen de pokken en tegen polio en later ook tegen de bof, de mazelen en de rode hond (BMR). Inenting bleek zo effectief,

dat inmiddels het pokvirus is verdwenen, het poliovirus binnenkort is uitgeroeid en het mazelenvirus de volgende kandidaat is voor uitroeiing. Met deze ontwikkeling en de aandacht voor hygiëne raken we verlost van de meest schadelijke ziekten. Zo krijgt ons immuunsysteem ook minder om handen en rijst de vraag of daaraan geen nadelen zijn verbonden. Per slot van rekening heeft het immuunsysteem zich eeuwenlang aangepast aan infecties die in enkele decennia zijn verdwenen. Inderdaad zijn er tekenen dat de preventie een prijs vraagt, een fantoompijn van een immuunsysteem dat zonder werk zit. Zo is gebleken dat onder kinderen die op natuurlijke wijze mazelen doormaken minder allergie of hooikoorts voorkomt dan onder gevaccineerde kinderen²⁰. Ook tuberculose, een ziekte met vergelijkbare effecten op het immuunsysteem, lijkt ‘bescherming’ te bieden tegen allergische aandoeningen²¹. Al eerder was gebleken dat hooikoorts minder voorkomt in grote gezinnen die doorgaans minder zindelijk zijn dan de kleine²². Verder was in muizen gebleken dat diabetes kan worden voorkomen door ze jong met een virus te besmetten²³. Algemeen heerst de veronderstelling dat de toename van allergie en auto-immuunziekten te wijten is aan de vervuiling van het milieu. Na de val van de Berlijnse muur werd dit in het sterk vervuilde Oost Duitsland onderzocht. Tot ieders verrassing heerste er veel minder astma of allergie dan in het Westen. Daarnaast bleek dat er meer infecties voorkwamen. Er heersten nog volop kinderziekten en andere infecties die de kinderen in crèches opliepen waar ze al vroeg naar toegebracht werden zodat de moeder kon werken. Ook dit onderzoek wijst op een effect van de westerse levensstijl, waarbij primair de hygiëne en preventie verdacht zijn, méér dan het verontreinigde milieu. Zo ontstaat een beeld van het immuunsysteem dat, ontdaan van essentiële prikkels, op zoek gaat naar een uitdaging en die vindt in zinloze acties tegen zich zelf. Dit fenomeen staat te boek als de “Hygiëne Hypothese”²⁴. Het is een hypothese, dus nog geen vaststaand feit. Met de westerse levensstijl zijn immers vele veranderingen gemoeid, zodat men niet te snel conclusies mag trekken. Chronische ziekten vormen echter een zware last, wat rechtvaardigt om de hypothese grondig te onderzoeken.

Welke antwoorden kan de wetenschap bieden? Natuurlijk moet het verband bevestigd en beter begrepen worden. Er is geopperd dat de balans is verstoord tussen enerzijds de vorming van cytokinen (*IL-12*) en interferonen (*IFN γ*) die van belang zijn bij virusinfecties (*Th-1-response*) en anderzijds de cytokinen (*IL4*, *IL10*) die allergie stimuleren (*Th-2-response*)²⁴.

De afkortingen zijn voor de verstaander, voor mijn betoog zijn ze niet essentieel. De genetici zullen tegenwerpen dat ook zij afwijkingen hebben gevonden, maar daarop is mijn antwoord dat de genetische selectie juist heeft plaatsgevonden door de plagen die nu zijn bestreden, bovenal de ernstige ziekten zoals de mazelen en tuberculose. Ik ben me bewust dat ik alles simpeler heb voorgesteld dan in werkelijkheid en dat geldt ook voor de te volgen strategie. Infectieziekten terughalen is ondenkbaar en mijns inziens onnodig. Waarschijnlijk zijn we in de nabije toekomst in staat om het immuunsysteem te genezen, het te leren om zich weer te gedragen als in de tijd van de grote pestilentiën. Hoe zou dat kunnen? Interferon en cytokinen kun je toedienen, bijvoorbeeld via een vector. Een vector bestaat uit erfelijk materiaal dat in weefsels (cellen) kan repliceren en ter plekke wordt vertaald in eiwit en dat is nu juist wat virussen doen. In feite zijn het vectoren met de verkeerde boodschap, namelijk een ziekte. Door een virus genetisch te manipuleren kan het getransformeerd worden in een vector die bijvoorbeeld een cytokine gaat maken. Zo heeft onze groep in de afgelopen jaren van het poliovirus met succes een vector gemaakt voor vaccinatie tegen het humaan papillomavirus²⁵. De uitdaging voor de toekomst zal zijn om vectoren te maken die de cytokinen produceren welke wij door preventie zo nodig zijn gaan missen. Daarmee kunnen allergie en auto-immuniteit worden tegengegaan en wordt de fantoompijn uiteindelijk met een virus bestreden. Hiermee is de cirkel rond. Het kwaad wordt met de kiem gesmoord!

Dankwoord

MIJNHEER DE RECTOR, DAMES EN HEREN, graag wil ik deze rede besluiten met enkele persoonlijke woorden van dank. Het College van Bestuur en de Commissie van Advies en Toezicht van de Universiteit, alsmede de Raad van Bestuur van het Universitair Medisch Centrum St Radboud dank ik voor mijn benoeming en het in mij gestelde vertrouwen. Ik weet dat de Afdeling Medische Microbiologie vaak uw aandacht heeft gevraagd en niet altijd in positieve zin. Met mijn benoeming hebt U echter impliciet ook uw vertrouwen uitgesproken in de toekomst van onze Afdeling die op weg is naar nieuw elan. Hiervoor ben ik U zeer erkentelijk.

DAMES EN HEREN MEDEWERKERS VAN DE AFDELING MEDISCHE MICROBIOLOGIE. In de afgelopen jaren heeft het een en ander op de afdeling gespeeld. Desondanks heeft U zich onverminderd ingezet en bent daarbij werk blijven leveren van een hoge kwaliteit. Een bijzonder woord van waardering daarvoor is hier op zijn plaats. Ik bewonder de moed en het enthousiasme waarmee u de veranderingen tegemoet treedt. Met uw aller inzet zal de Afdeling haar elan snel hervinden.

LEDEN VAN DE VOORMALIGE STAF VIROLOGIE, beste Caroline, Yvonne, Frans, Jos en Willem. Een reorganisatie zoals deze zal altijd maken dat het verleden met een andere bril wordt bekeken. Dat levert een fase van onrust en zoeken naar nieuwe verbanden. Deze fase is voor niemand van ons eenvoudig. Ik vertrouw er op dat ze van tijdelijke aard is en dat alles een plek krijgt. Ik betreur niet dat onze Staf in het kader van de reorganisatie van samenstelling is veranderd, wel dat Caroline ons gaat verlaten. Ik vergun mij om nog eens door de oude bril te kijken en jullie te bedanken voor de inzet die jullie altijd hebben getoond en die onze Staf tot een hechte groep maakte.

LEDEN VAN DE STAF MEDISCHE MICROBIOLOGIE, Het is een genoegen om u toe te spreken in uw nieuwe samenstelling als één ondeelbare STAF van de Afdeling Medische Microbiologie. Na een onrustige fase komt dankzij uw inzet nu die van het schip op koers. Ik wil graag met u allen deze koers varen en spreek de wens en verwachting uit dat wie nu meevaart ook voor langere tijd aan boord zal blijven. Uw capaciteit als stuurman die de koers voor de toekomst bepalen acht ik hoog.

ZEERGELEERDE MELCHERS, beste Willem. Een bijzonder woord van dank wil ik tot jou richten. Jij bent het eerste staflid geweest dat na mijn komst werd aangetrokken. Je aanwezigheid in de Afdeling kan niemand ontgaan zijn, een aanwezigheid die in de loop van de jaren alleen maar prominenter is geworden. Met je humor en daadkracht heb je een onderzoeksteam gesmeed dat een positie in de Researchtoren heeft verworven. Jouw inbreng is daarbij essentieel geweest. Daarnaast heb je de moleculaire diagnostiek laten uitgroeien tot een speerpunt van de afdeling. Wat ik bijzonder in je waardeert is de manier waarop wij van mening kunnen verschillen

en dat vervolgens uitpraten. Die openheid heeft tot een bijzondere samenwerking geleid en ik spreek de wens uit dat het nog lang zo mag blijven.

HOOGGELEERDE VAN DER MEER, beste Jos, Als geen ander ben jij de stimulator geweest bij het tot stand komen van ons onderzoek, voor mij de belangrijkste drijfveer om in deze *Alma Mater* te werken. Samen met dr. Gijs Bleijenberg en de leden van *onze* CVS groep hebben we schitterende tijden gekend met het Wereldcongres in Brussel (1995) waar wij zo prominent aanwezig waren, als hoogtepunt. De Virologie houdt zich op dit moment wat minder op met de moeheid, maar dat is tijdelijk. Er liggen nog vele plannen. De onderzoeksactiviteiten van de Virologie zijn nu deels verlegd naar diabetes. Ook daarbij wordt vruchtbaar met jouw groep samengewerkt. In het bijzonder wil ik je hier bedanken voor de keren dat ik je om raad vroeg in lastige zaken. Raad gaf je altijd op een opbouwende wijze en de *support* die er vanuit ging is voor mij van onschatbare waarde geweest.

HOOGGELEERDE MEUWISSEN, beste Joep. Jij hebt mij naar Nijmegen gehaald, een daad waarvan in ieder geval ikzelf geen spijt heb gekregen. Je was toen net tot interim-Hoofd benoemd en gestart om er één afdeling van te smeden. Dat deed je met de voor jou kenmerkende gedrevenheid waarvoor zelfs het Malaria onderzoek even moest wijken. Voor mij is de samenwerking met jou heel belangrijk geweest. Je stimuleerde nieuwe ontwikkelingen met een creatieve boekhouding. Zo mocht ik een moleculair bioloog aantrekken. Beste Joep, jij was de pleitbezorger van deze leerstoel, maar ook de initiatiefnemer voor gezamenlijk onderzoek dat virologie en parasitologie bijeenbracht. Van jou heb ik geleerd dat gezamenlijk belang een weg baant naar eenheid.

HOOGGELEERDE VAN DER NOORDAA, beste Jan. Ik ben je dankbaar voor de wijze waarop je me het vak hebt bijgebracht. Zonder jou als opleider was ik niet de viroloog die ik nu ben. Jij was je tijd vooruit en hebt mij belangstelling voor de moleculen bijgebracht. Jouw lab pionierde in de moleculaire biologie in een tijd dat anderen nog traditionele technieken hanteerden. Dat was ook de tijd waarin moleculair onderzoek kunst was. Niets was te koop, alles moest zelf gemaakt worden. Het was als fotografie met de glasplaat, nog zonder belichtingsmeter.

WELEDELGELEERDE WIJSEN, LIEVE RIEK, In Maastricht, jouw moederstad, heb ik je beloofd dat het de moeite waard was om naar Nijmegen te verhuizen. Je hebt er zelf een bijzondere invulling aangegeven. Met intervisies en wijs advies ben je niet alleen een partner in leven, maar ook in werk. Zonder jou en je WELEDELE Dorus & dito Berb, maar ook mijn GELEERDE EN ZEER GELEERDE, Jochem en Titus, loonde het niet om hier nu te staan.

Ik heb gezegd.

1. Zinsser H. *Rats Lice and History*. 1934. Macmillan. ISBN 0-333-39567-0.
2. McNeill WH. *Plagues and Peoples*. 1976. Anchor Books. ISBN 0-385-12122-9.
3. Medawar PB and JS Medawar. *Aristotle to Zoos*. 1983, Cambridge University Press.
4. Mak G. *De eeuw van mijn vader*. 1999, Atlas. ISBN 90-450-0127-6.
5. Fenner F, Ratcliffe FN. *Myxomatosis*. 1965, Cambridge University Press.
6. Oldstone MBA *Viruses Plagues and History*. 1998. Oxford University Press. ISBN 0-19-511723-9.
7. Von Pirquet CE. *Das Verhalten der kutanen Tuberkulinreaction während der Masern*. Deutsches Med Wochenschr, 1908; 34: 1297-30.
8. Lucas CJ, JMD Galama, José Ubels-Postma. *Measles virus-induced suppression of lymphocyte reactivity in vitro*. Cell Immunol, 1977; 32: 70-85.
9. Galama JMD, José Ubels-Postma, Annemieke Vos, CJ Lucas *Measles virus inhibits acquisition of lymphocyte functions but not established effector functions*. Cell Immunol, 1980; 50: 405-415.
10. Lucas CJ, José Ubels-Postma, Anna Rezee, JMD Galama, *Activation of measles virus from silently infected human lymphocytes*. J Exp Med, 1978; 148: 940-52.
11. Galama JMD. *Cell-mediated resistance to measles virus: A study on virus-induced immunosuppression and on the destruction of virus-infected cells*. Thesis, 1979 RODOPI, Amsterdam.
12. Swanink CMA, WJG Melchers, JWM van der Meer, JHHM Vercoulen G Bleijenberg, JFM Fennis, JMD Galama. *Enteroviruses and the chronic fatigue syndrome*. Clin Infect Dis, 1994; 19: 860-4.
13. Melchers WJG, M de Visser, PJ Jongen, AM van Loon, P Oostvogel, D Willemse JMD Galama. *The post-polio syndrome: No evidence for poliovirus persistence*. Ann Neurol, 1992; 32: 728-32.
14. Leeuw N de, WJG Melchers, AHMM Balk, N de Jonge JMD Galama. *No evidence for persistent enteroviral infection in patients with end-stage idiopathic dilated cardiomyopathy*. J Infect Dis, 1998; 178: 256-9.
15. Vreugdenhil GR, NC Schloot, A Hoorens, C Rongen, DG Pipeleers, WJG Melchers BO Roep, JMD Galama. *Acute onset of type 1 diabetes mellitus after severe Echovirus 9 infection: putative pathogenic pathways*. Clin Infect Dis, 2000; 31: 1025-31.
16. Lönnrot M, K Korpela, M Knip, et al. *Enterovirus infection as a risk factor for (-cell autoimmunity in a prospectively observed birth cohort*. Diabetes, 2000; 49: 1314-8.

17. Vreugdenhil GR, A Geluk, THM Ottenhof, WJG Melchers, BO Roep JMD Galama. *Molecular mimicry in diabetes mellitus: the homologous domain in Coxsackie B virus protein 2C and islet autoantigen GAD65 is highly conserved in the Coxsackie B-like enteroviruses and binds to the diabetes associated HLA-DR3 molecule.* Diabetologia, 1998; 41: 40-6.
18. Kuppeveld FJM van, J Hoenderop, R Smeets, P Willems, H Dijkman, JMD Galama, WJG Melchers. *Coxsackievirus protein 2B is a viroporin that mobilizes Ca²⁺ from the endoplasmatic reticulum and facilitates virus release.* EMBO J, 1997; 16: 3519-32.
19. Melchers WJG, J Hoenderop, H Bruins-Slot, C Pleij, E Pilipenko, V Agol JMD Galama. *Kissing of the two predominant hairpin-loops in the Coxsackie B virus 3'UTR is the essential structural feature of the origin of replication required for (-) strand RNA synthesis.* J Virol, 1997; 71: 686-96.
20. Shaheen SO, P Aaby, AJ Hall, DJP Barker, CB Heyes, AW Shiell, A Goudiaby. *Measles and atopy in Guinea-Bissau.* The Lancet, 1996; 347: 1792-6.
21. Shirakawa T, T Enomoto, S Shimazu JM Hopkin. *The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder.* Science, 1997; 275: 77-9.
22. Strachan DP. *Hay fever, hygiene, and household size.* Br Med J, 1989; 299: 1259-60.
23. Oldstone MBA. *Prevention of type 1 diabetes in nonobese diabetic mice by virus infection.* Science, 1988; 239: 500-2.
24. Rook GAW, JL Stanford. *Give us this day our daily germs.* Immunol Today, 1998; 19: 113-6.
25. Kuppeveld FJM, A de Jong, HB Dijkman, JMD Galama, H Guthöhrlein L Gissmann R Andino WJG Melchers. *Prospects for a prophylactic HPV vaccine: Poliovirus vaccine vector expressing HPV 16 virus-like particles elicit a humoral immune response in mice.* Submitted.



ISBN 90-9014569-9