

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/29907> holds various files of this Leiden University dissertation

**Author:** Kasteren, Puck van

**Title:** Arterivirus PLP2 : an OTU deubiquitinase that counteracts innate immunity

**Issue Date:** 2014-12-03



## **Samenvatting**

## ARTERIVIRUS PLP2

### Een OTU deubiquitinase dat het aangeboren immuunsysteem onderdrukt

Ondanks hun geringe afmetingen kunnen virussen enorme schade berokkenen, zowel aan het individu als aan de samenleving. Dit gegeven wordt nog fascinerender wanneer men beseft dat een virusdeeltje in essentie levenloos is en slechts kan repliceren met behulp van een gastheer. Een goed begrip van de "levenscyclus" van een virus kan daarom alleen verkregen worden wanneer, naast het replicatiemechanisme van het virus zelf, ook de virus-gastheer interacties in kaart zijn gebracht.

In het geval van positiefstrengige (+) RNA virussen die zoogdieren infecteren kunnen proteases een belangrijke rol vervullen in het samenspel tussen virus en gastheer. Deze groep virussen produceert (een deel van) de virale eiwitten vaak in de vorm van een polyproteïne, dat vervolgens in functionele eenheden wordt gekliefd door proteases die deel uitmaken van dit polyproteïne. Deze proteases kunnen echter ook nog andere functies uitoefenen, door naast virale eiwitten ook gastheerfactoren te klieven. Het werk beschreven in dit proefschrift laat zien hoe een arterivirus protease (PLP2) aangrijpt op het cellulaire ubiquitine systeem en daarmee de aangeboren immuunrespons dwarsboomt.

De arterivirus familie omvat op dit moment formeel vier leden, waaronder het *equine arteritis virus* (EAV) en het *porcine respiratory and reproductive syndrome virus* (PRRSV). Met name de laatste veroorzaakt wereldwijd aanzienlijke schade in de varkenshouderij door het verlies van biggen en verminderde vruchtbaarheid van zeugen. Voor beide virussen zijn vaccins beschikbaar, hoewel de werking ervan niet optimaal is. Een mogelijke oorzaak hiervan is dat deze virussen in staat zijn het aangeboren immuunsysteem te onderdrukken en daarmee volledige activatie van het adaptieve immuunsysteem kunnen voorkomen.

De replicatie van arterivirussen begint met de productie van twee deels overlappende polyproteïnen die zijn opgebouwd uit de niet-structurele eiwitten (*nonstructural proteins*, nsps). Deze polyproteïnen worden tijdens en na translatie gekliefd door drie tot vijf interne proteases, waarna de nsps tezamen het virale replicatie- en transcriptiecomplex vormen. Dit complex is verantwoordelijk voor de replicatie van het genoom en de transcriptie van subgenome mRNAs. De proteolytische klieving van de polyproteïnen is een strikt gereguleerd proces en mutaties aan proteases en/of klievingssequenties worden over het algemeen slecht getolereerd. Eén van de proteases die een rol spelen in dit proces is PLP2 (*papain-like protease 2*), dat zich bevindt in nsp2 en verantwoordelijk is voor de klieving tussen nsp2 en nsp3.

De aangeboren immuunrespons vormt de eerste verdedigingslinie tegen binnen-dringende pathogenen en berust op de herkenning van pathogeen-gerelateerde moleculaire patronen door specifieke sensor-eiwitten. Activatie van de aangeboren immuunrespons leidt uiteindelijk tot de productie van type I interferon en andere pro-inflammatoire cytokinen. Tezamen zorgen deze voor een antivirale staat van zowel de geïnfecteerde als naburige cellen en de stimulatie van het adaptieve immuunsysteem.

De activatie van het aangeboren immuunsysteem is zeer strikt gereguleerd. Een van de regulatiemechanismes die hiervoor worden gebruikt is ubiquitynlatie, het proces waarbij het kleine eiwit ubiquitine aan andere eiwitten wordt geconjugeerd. Deze koppeling kan leiden tot afbraak van het geubiquityleerde substraat, maar kan ook bepaalde eiwit-eiwit interacties mogelijk maken. Ubiquitynlatie is zeer geschikt voor de regulatie van signaaltransductieroutes omdat het een reversibele modificatie is. De ubiquitine moleculen kunnen door deubiquitylerende enzymen (DUBs) weer verwijderd worden.

Uit sequentie-vergelijkingen uitgevoerd door Makarova *et al.* (2000) is gebleken dat arterivirus PLP2 overeenkomsten vertoont met proteases die behoren tot de OTU familie van DUBs. Frias-Staheli *et al.* (2007) hebben later aangetoond dat het tot expressie brengen van EAV of PRRSV PLP2 in celkweek leidt tot een afname van de hoeveelheid geubiquityleerde eiwitten. Gezien het belang van ubiquitynlatie in de activering van de aangeboren immuunrespons leek het aannemelijk dat de mogelijke DUB activiteit van arterivirus PLP2 een rol speelt bij het tegenwerken van deze respons. Bewijs hiervoor was echter tot nu toe moeilijk te verkrijgen omdat PLP2 vanwege zijn essentiële rol in de virusrelicatie niet simpelweg verwijderd of geïnactiveerd kon worden.

Allereerst hadden wij daarom tot doel de DUB activiteit van arterivirus PLP2 te bevestigen en de mogelijke rol van dit enzym in het remmen van de aangeboren immuunrespons verder te karakteriseren. In **Hoofdstuk 2** hebben wij met behulp van *in vitro* klievingsexperimenten aangetoond dat EAV PLP2 inderdaad een DUB is en door middel van transfectie-experimenten konden wij aantonen dat deze activiteit waarschijnlijk binnen de gehele arterivirus familie geconserveerd is. Vervolgens hebben we laten zien dat expressie van arterivirus PLP2 leidt tot een afname van de expressie van een luciferase-reporter gen dat onder controle staat van de interferon-beta promoter. Het sensor-eiwit RIG-I is een belangrijke, door ubiquitine gereguleerde factor in de aangeboren immuunrespons. Door middel van een transfectie-experiment hebben wij kunnen aantonen dat arterivirus PLP2 de ubiquitynlatie van RIG-I kan verminderen in celkweek. Deze data ondersteunt de hypothese dat de DUB activiteit

van arterivirus PLP2 een rol speelt in de onderdrukking van de activatie van het aangeboren immuunsysteem.

Vanwege de essentiële rol die proteases spelen in de replicatie van +RNA virussen zijn zij goede doelwitten voor het ontwikkelen van antivirale middelen. Aangezien naast arterivirussen nog een aantal andere virussen beschikken over proteases met DUB activiteit, onderzochten wij of deze activiteit gebruikt kon worden voor het identificeren van potentiële antivirale verbindingen. **Hoofdstuk 3** toont het resultaat van een op fluorescentie polarisatie gebaseerde *in vitro* screeningsmethode, waarmee in een bibliotheek van 335 kandidaten een vijftal verbindingen zijn geïdentificeerd die de DUB activiteit van EAV PLP2 remmen. Van deze moleculen bleken er twee ook een noemenswaardig effect op de replicatie van een EAV GFP-reporter virus in celkweek te hebben. Het lijkt dus inderdaad mogelijk te zijn om antivirale verbindingen te identificeren door middel van een op DUB activiteit gebaseerde selectiemethode, maar aanvullend onderzoek blijft noodzakelijk.

Om aan te kunnen tonen dat de DUB activiteit van arterivirus PLP2 daadwerkelijk van belang is voor het remmen van de aangeboren immunrespons tijdens een infectie was het noodzakelijk deze activiteit te scheiden van de essentiële rol van PLP2 in de klieving van de virale replicase polyproteïnen. Om dit te kunnen realiseren hebben wij in **Hoofdstuk 4** in samenwerking met Canadese structuurbiologen de kristalstructuur van EAV PLP2 in complex met ubiquitine opgehelderd. Uit deze structuur bleek dat PLP2 inderdaad behoort tot de OTU familie en dat de binding van ubiquitine mede afhankelijk is van een PLP2 oppervlak dat enigzins verwijderd is van het katalytisch centrum van het protease. Dit maakte het mogelijk mutaties aan te brengen die de interactie met ubiquitine verstoren zonder de maturatie van de polyproteïnen te verhinderen. Met behulp van deze mutaties konden wij aantonen dat de DUB activiteit van arterivirus PLP2 inderdaad van belang is voor het remmen van de aangeboren immunrespons tijdens een infectie.

**Hoofdstuk 5** omvat een kleinschalig vaccinatie experiment in paarden waarmee werd onderzocht of een EAV vaccin waarin de DUB activiteit van PLP2 door middel van mutaties is uitgeschakeld (DUB-) beter beschermt tegen infectie met een heteroloog EAV isolaat dan een vaccin waarin de DUB activiteit van PLP2 nog intact is (DUB+). De resultaten van dit experiment lieten zien dat beide vaccinvirussen replicatie-competent zijn, maar dat er geen duidelijk aantoonbaar verschil was in de mate van bescherming die zij konden bieden. Het feit dat het DUB+ vaccin al een zeer hoge mate van bescherming bood in dit experiment heeft er mogelijk voor gezorgd dat een eventuele verbetering niet goed kon worden gedetecteerd. Toekomstig onder-

zoek moet dan ook uitwijzen of het uitschakelen van de DUB activiteit in een andere experimentele opzet wellicht een beter aantoonbaar effect heeft.

Naast arterivirussen beschikken ook nairovirussen (-RNA) en tymovirussen (+RNA) over OTU DUBs. **Hoofdstuk 6** biedt een beknopte structurele en functionele vergelijking tussen deze enzymen. Terwijl zowel arteri- als nairovirus DUBs een rol lijken te spelen in het onderdrukken van de aangeboren immuunrespons, lijken tymovirus DUBs verantwoordelijk voor het verhinderen van proteosomale afbraak van het virale replicase. Het meest opvallende structurele verschil tussen de besproken enzymen is het feit dat het katalytische centrum van het tymovirus DUB incompleet lijkt te zijn in vergelijking met dat van arteri- en nairovirussen.

Het werk beschreven in dit proefschrift verschaft nieuwe inzichten in de structurele en (multi)functionele eigenschappen van arterivirus PLP2. Voor het eerst is de rol van een viraal DUB in het onderdrukken van de aangeboren immuunrespons tijdens infectie aangetoond. De verworven kennis kan nu worden aangewend voor het ontwerpen van verbeterde vaccins tegen arterivirussen en voor studies aan andere virale DUBs, zoals die van de zoönotische coronavirussen die *severe acute respiratory syndrome* (SARS) en *Middle East respiratory syndrome* (MERS) veroorzaken.