

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/18950> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Velthuis, Arend Jan Wouter te

Title: A biochemical portrait of the nidovirus RNA polymerases and helicase

Date: 2012-05-16

SAMENVATTING

RNA virussen zijn kleine ziekteverwekkers die zich razendsnel kunnen verspreiden en in korte tijd een epidemie of een pandemie kunnen veroorzaken. Ze zijn daardoor dus van grote invloed op het openbare leven, het zorgsysteem en de wereldeconomie. Een bekend voorbeeld hiervan is de uitbraak van SARS, welke in 2003 plaatsvond. Deze ziekte, veroorzaakt door het SARS-coronavirus, kostte binnen enkele maanden bijna duizend mensen het leven en maakte ons op niet mis te verstane wijze duidelijk hoe kwetsbaar we zijn voor dit soort RNA virusinfecties. Bovendien zorgden de neveneffecten van deze pandemie voor een economisch verlies dat volgens de Wereldbank ongeveer 0.5% van de totale wereldeconomie bedroeg.

Gelukkig kon SARS relatief snel en zonder antivirale middelen of vaccins tot staan worden gebracht. Het is echter de vraag of een combinatie van adembescherming en quarantaine van patiënten zoals gebruikt voor SARS in de toekomst zal voldoen om een vergelijkbaar of gevaarlijker virus uit de nidovirus orde onder controle te krijgen. Helaas moeten we constateren dat onze kennis van deze virussen 9 jaar later nog altijd zeer beperkt is en dat goedgekeurde antivirale middelen nog steeds niet voorhanden zijn. Met de resultaten die worden beschreven in dit proefschrift, hoop ik een stukje te hebben bijgedragen aan de karakterisering van deze virusfamilie en - uiteindelijk - tot de ontwikkeling van deze antivirale middelen.

De focus van de in dit proefschrift beschreven resultaten ligt op twee enzymtypen, die van cruciaal belang worden geacht voor de infectiecyclus van nidovirussen: het virale RNA polymerase¹ en het virale helicase² enzym. Deze eiwitten zijn het 'kloppend hart' van het grote eiwitcomplex van virale niet-structurele eiwitten (ook wel nsps genaamd), dat zorgt voor de replicatie en transcriptie³ van het virale genoom⁴. Aangezien er weinig tot niets bekend is over de precieze activiteit van deze enzymen, ligt het voor de hand dat het vergaren van meer kennis over deze enzymen zou kunnen bijdragen aan het beter begrijpen van de replicatiecyclus en evolutie van nidovirussen, en aan de ontwikkeling van antivirale middelen tegen deze pathogenen.

Met het oog op de uitbreiding van deze kennis wordt in **hoofdstuk 3** van dit proefschrift de isolatie en biochemische analyse beschreven van het SARS-coronavirus RNA polymerase enzym, nsp12. Deze analyse laat onder andere zien dat met name het

-
- 1 **RNA polymerase:** een enzym dat in staat is om genetisch materiaal te vermenigvuldigen.
 - 2 **RNA helicase:** een enzym dat in staat is om de structuur in het genetische materiaal te verminderen en zo o.a. de activiteit van het RNA polymerase enzym te bevorderen.
 - 3 **Transcriptie:** het proces om genetische informatie te 'vertalen' naar een informatie vorm (mRNA) die gebruikt kan worden om meer viraal eiwit te maken en daarmee nieuwe virusdeeltjes.
 - 4 **Genoom:** het genetische materiaal van een organisme of virus.

N-terminale aminozuur⁵ van dit eiwit cruciaal is voor de stabiliteit en activiteit van nsp12. Verder wordt er beschreven dat de activiteit van nsp12 sterk afhankelijk is van de sequentie van het template⁶ en dat het kopiëren van dit template niet kan plaatsvinden in afwezigheid van een primer⁷. Opmerkelijk genoeg kan, zoals wordt beschreven in **hoofdstuk 4**, deze activiteit volledig geremd worden door eenvoudigweg zink ionen aan de reactie toe te voegen. Biochemische proeven duiden er op dat deze ionen mogelijk werken door het polymerase enzym tot staan te brengen via het verlagen van de affiniteit van nsp12 voor het template.

In **hoofdstuk 5** van dit proefschrift wordt de isolatie beschreven van een tweede SARS-coronavirus enzym dat RNA polymerase activiteit vertoont, het eiwit nsp8, dat opmerkelijk genoeg vijf keer kleiner is dan nsp12. Net als voor nsp12 wordt beschreven dat onnatuurlijke aminozuren in de N-terminus van nsp8 van grote invloed zijn op de activiteit van dit eiwit. Een directe aanwijzing voor een effect op de stabiliteit van het eiwit is er echter niet. Wel zijn er aanwijzingen dat het N-terminale domein van nsp8 van groot belang is voor de complexvorming van nsp8 met nsp7, en dat de aanwezigheid van nsp7 de RNA bindingsaffiniteit en activiteit van nsp8 als RNA polymerase stimuleert.

In **hoofdstuk 6 en 7** wordt vervolgens een zijstap gemaakt naar single-molecule studies⁸ met een magnetisch pincet⁹, met als doel een uiterst nauwkeurige meting en beschrijving van de activiteit van het helicase enzym te verkrijgen. Een beperkende factor in de nauwkeurigheid van deze metingen komt voort uit de Browniaanse bewegingen van het paramagnetisch kogeltje dat nodig is om de helicase activiteit meetbaar te maken. Deze Browniaanse bewegingen ontstaan spontaan, doordat snel bewegende watermoleculen tegen het kogeltje botsen, en kunnen met name een rol gaan spelen wanneer grote magnetische krachten nodig zijn om 'handmatig' de structuur van het RNA of DNA in de opstelling te beïnvloeden. Bij dergelijke krachten kunnen de bewegingen van het kogeltje namelijk zo snel worden, dat ze niet meer met de camera te volgen zijn. Om de grens waarbij deze problemen optreden te bepalen en het effect van meetcondities te kunnen voorspellen wordt in **hoofdstuk 6** een simulatie van deze bewegingen beschreven.

Aansluitend wordt deze kennis in **hoofdstuk 7** toegepast om de activiteit van een nidovirus helicase tijdens de ontwinding van een DNA haarspeld structuur te meten. Opmerkelijk genoeg vinden we dat de helicase activiteit sterk afhankelijk is van de

5 **N-terminale aminozuur:** het eerste aminozuur van een eiwit.

6 **Template:** de aangeboden genetische informatie, die in een *in vitro* experiment gekopieerd kan worden.

7 **Primer:** een van tevoren geproduceerd "startmolecuul" voor de te maken nucleïnezuur kopie.

8 **Single-molecule analyse:** de analyse van de activiteit van individuele enzymen.

9 **Magnetisch pincet:** een instrument dat er voor is ontwikkeld om enkele RNA of DNA moleculen te 'vangen' tussen een glazen oppervlak en een klein paramagnetisch kogeltje, en de veranderingen in dit RNA of DNA te volgen met een camera.

nucleotidenvolgorde in het template en het nucleoside trifosfaat molecuul¹⁰ dat het helicase enzym gebruikt om energie te generen voor het ontwinden van de haarspeld. Deze bevindingen suggereren dat de activiteit van dit helicase enzym *in vivo* veel dynamischer zou kunnen zijn dan tot op heden werd aangenomen.

In **hoofdstuk 8** wordt terug gegaan naar de activiteit van nsp8 en wordt beschreven dat dit enzym in staat is om twee RNA nucleotiden aan elkaar te koppelen in afwezigheid van een template. Opmerkelijk genoeg lijkt nsp8 daarbij een voorkeur te hebben voor een product dat complementair is aan het uiteinde van het te kopiëren genetische materiaal van het SARS-coronavirus. Daarnaast worden aanwijzingen beschreven waaruit blijkt dat nsp8 het 3'-uiteinde van het virale genoom kan verlengen met adenosine residuen en dat GTP - de nucleotide die complementair is aan het 3'-uiteinde van het genoom - de herkenning en verlenging van het 3'-uiteinde van het genoom kan stimuleren.

Om de hypothese te onderzoeken dat de primer-afhankelijke nsp12 en het *de novo* initiërende nsp8 eventueel met elkaar kunnen samenwerken om een SARS-coronavirus genoom te kopiëren worden in hoofdstuk 8 ook proeven beschreven die deze enzymen samenbrengen in één *in vitro* reactie. Opmerkelijk genoeg worden geen directe aanwijzingen voor een samenwerking van de twee enzymen gevonden. Wel zijn er aanwijzingen dat ze elkaars activiteit juist negatief beïnvloeden. Hieruit zou vervolgens geconcludeerd kunnen worden dat er nog minstens een ander eiwit nodig is om de twee enzymen te reguleren, zodra ze in elkaars aanwezigheid verkeren.

In **hoofdstuk 9** worden tenslotte aanwijzingen beschreven die er op duiden dat nsp12 ook een exonuclease¹¹ activiteit bevat. Met deze activiteit zou nsp12 bijvoorbeeld fouten uit het zojuist gesynthetiseerde RNA keten kunnen verwijderen om die vervolgens te corrigeren. Inderdaad blijkt uit andere proeven dat de exonuclease activiteit van nsp12 gestimuleerd kan worden door de aanwezigheid van ribavirine, een mutatie-inducerende nucleotide analoog, en een van te voren aangebrachte mutatie in de aangeboden primer. Toekomstige experimenten zullen hopelijk bijdragen aan een verdere ontrafeling van de beschreven eigenschappen en leiden tot het ontdekken van bruikbare remmers voor nidovirus infecties.

10 **Nucleoside trifosfaat:** een molecuul dat gebruikt kan worden om nieuw RNA te synthetiseren of energie te leveren voor enzymatische reacties.

11 **Exonuclease:** een enzymactiviteit die er voor zorgt dat het nucleotide dat zich aan het uiteinde van een RNA of DNA molecuul bevindt wordt verwijderd.

