

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/33614> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Lehmann, Kathleen Corina

Title: Biochemistry and function of nidovirus replicase proteins

Issue Date: 2015-06-23

1 SAMENVATTING

2

3 De orde Nidovirales omvat een monofyletische groep van virussen met positiefstrengige
4 RNA genomen, die geclassificeerd zijn in de families *Arteriviridae*, *Coronaviridae*, *Meso-*
5 *niviridae* en *Roniviridae*. Deze groepen delen een geconserveerde genomorganisatie
6 en een karakteristieke set van cruciale replicatie-eiwitten. Alhoewel dit, in principe, een
7 geconserveerd replicatiemechanisme suggereert, is het op dit moment onduidelijk in
8 hoeverre deze gelijkenis op een gedetailleerder niveau stand houdt. Dit komt voorna-
9 melijk door ons beperkte begrip van de rol van het gros van de virale eiwitten in de
10 replicatiecyclus. Bovendien, het grootste deel van de beschikbare kennis is afkomstig
11 van studies van slechts enkele coronavirussen, de nidovirus subgroep met het langste
12 bekende RNA genoom die daarom vermoedelijk gebruik maakt van de meest complexe
13 replicatiestrategie. In tegenstelling hiermee is tot nu toe slechts beperkt aandacht be-
14 steed aan de RNA-replicerende en -modificerende enzymen van arterivirussen en geen
15 enkele aandacht aan die van de mesoni- en ronivirussen, die (veel) kleinere genomen
16 hebben dan coronavirussen. Gegeven deze ongelijkheid, kan het voorbarig zijn om aan
17 te nemen dat de essentiële stappen van de virale replicatiecyclus, zoals bijvoorbeeld
18 RNA synthese en modificatie van het 5' uiteinde van mRNA's, in deze uiteenlopende
19 groep van verwante virussen strikt dezelfde mechanistische routes volgen.

20

21 Het werk beschreven in dit proefschrift betreft enkele slecht of niet gekarakteriseerde
22 (domeinen van) niet-structurele proteïnen (nsp) die waarschijnlijk betrokken zijn bij één
23 of meerdere stappen tijdens RNA replicatie en/of transcriptie van het prototype arterivi-
24 rus, equine arteritis virus (EAV). Na een korte inleiding over de nidovirus replicatiecyclus
25 en onze kennis van de moleculaire details van hun ongewone transcriptie- en mRNA
26 modificatiemechanisme (hoofdstuk 1), wordt in hoofdstuk 2 de kristalstructuur van het
27 enzymatisch actieve EAV helicase nsp10 gepresenteerd, die verkregen en geanalyseerd
28 is in nauwe samenwerking met Chinese collega's. Interessant genoeg, werd een sterke
29 gelijkenis duidelijk tussen dit virale eiwit en het geconserveerde cellulaire helicase Upf1,
30 vooral wat betreft het N-terminale zink-bindende domein. Aangezien dit cellulaire heli-
31 case verondersteld wordt betrokken te zijn in een aantal eukaryote mechanismen voor
32 posttranscriptionele kwaliteitscontrole, wordt voor nsp10 (en homologen in andere
33 nidovirussen) een rol in genoomexpansie voorgesteld. Deze en andere mogelijke func-
34 ties van nidovirus helicases in RNA replicatie, transcriptie en translatie, evenals virion
35 biogenese, worden verder besproken in hoofdstuk 3, dat een overzicht presenteert van
36 onze huidige kennis over nidovirus helicases. Bijzondere aandacht wordt daarbij ge-
37 geven aan de resterende lacunes in onze kennis, feiten die minder eenvoudig overeen
38 lijken te stemmen met ons huidige begrip van de nidovirus replicatiemechanismen en
39 vragen die in de toekomst aangepakt dienen te worden.

1 Hoofdstukken 4 en 5 richten zich op één van de centrale arterivirus replicatie-eiwitten,
2 nsp9, dat een RNA-afhankelijke RNA polymerase (RdRp) domein herbergt. Hoofdstuk 4
3 beschrijft een zorgvuldig uitgevoerde studie naar de verschillende polymerase-activi-
4 teiten die nsp9 zou kunnen hebben, inclusief een eerder beschreven primer-onafhan-
5 kelijke RdRp-activiteit. Ondanks aanzienlijke inspanningen, waaronder experimenten
6 met verschillende preparaten van nsp9 en proeven uitgevoerd in aanwezigheid van
7 mogelijke polymerase-cofactoren, werd geen *in vitro* activiteit gevonden die duidelijk
8 toegewezen zou kunnen worden aan dit eiwit. Er werd ook indirect bewijs verkregen
9 dat suggereert dat de eerder beschreven activiteit wellicht te danken was aan een
10 contaminatie van het recombinant nsp9 met het T7 RNA polymerase dat was gebruikt
11 om het eiwit in *E. coli* tot expressie te brengen. In arterivirussen, is het RdRp domein
12 gelokaliseerd in het C-terminale twee-derde van nsp9. In hoofdstuk 5 wordt voor het
13 eerst beschreven dat het RdRp-domein N-terminaal geflankeerd wordt door een ander
14 domein dat is geconserveerd in alle nidovirussen. In tegenstelling tot het RdRp-domein,
15 zijn van dit domein geen homologen gevonden in andere RNA virussen. Daarom wordt
16 voorgesteld dat dit domein een tweede universeel kenmerk voor de *Nidovirales* orde is,
17 naast het N-terminale zink-bindende domein van de helicase subunit. Aminozuren die
18 onderdeel zijn van drie geconserveerde sequentiemotieven werden zonder uitzonde-
19 ring geassocieerd met een nieuw ontdekte nucleotidyleringsactiviteit van recombinant
20 nsp9. Deze activiteit speelt mogelijk een rol in de modificatie van het 5' einde van virale
21 RNAs middels ofwel RNA ligatie, eiwit priming van RNA synthese of guanylyl overdracht
22 tijdens RNA capping. Nader onderzoek is vereist om nsp9 definitief met één van deze
23 mogelijkheden in verband te brengen. Niettemin was alanine-substitutie van ieder van
24 deze geconserveerde residuen ofwel letaal voor EAV en het severe acute respiratory syn-
25 drome coronavirus (SARS-CoV) of het beperkte deze virussen ernstig in hun replicatie,
26 wat uiteindelijk resulteerde in reversie van de mutatie. Deze resultaten demonstreren
27 dus de essentiële aard van dit domein voor virusreplicatie, ongeacht wat de exacte
28 functie zal blijken te zijn.

29

30 Twee methyltransferase-activiteiten, vereist voor mRNA capping, werden eerder ge-
31 identificeerd in twee ORF1b-gecodeerde coronaviruseiwitten, nsp14 en nsp16. Terwijl
32 de eerste geen tegenhanger heeft onder de niet-structurele eiwitten van arterivirussen,
33 bezetten de laatstgenoemde en het C-terminale subunit van arterivirussen, nsp12,
34 vergelijkbare posities in het ORF1b-gecodeerde gedeelte van de replicase, hoewel
35 de twee eiwitten geen detecteerbare sequentiegelijkenis delen. Het is een langdurig
36 openstaande vraag hoe arterivirussen de modificatie van het 5' einde van hun mRNAs
37 katalyseren, en in dat kader hebben we een eerste karakterisering van het nog ongeka-
38 rakteriseerde nsp12 van EAV uitgevoerd (hoofdstuk 6). Gebaseerd op de genomische
39 positie van de coderende sequentie, de sequentievergelijking en voorspelling van de

1 secundaire structuur werd verondersteld dat nsp12 mogelijk een unieke arterivirus
2 methyltransferase zou zijn, dat zich afgesplitst heeft van nidovirus homologen waar-
3 door noemenswaardige gelijkens ontbreekt. Om deze hypothese te toetsen werd
4 recombinant nsp12 tot expressie gebracht in en gezuiverd uit *E. coli*, en zowel alleen
5 als in combinatie met potentiële cofactoren getest op N7- en 2'-O-methyltransferase
6 activiteit. Hoewel de positieve controles, de beide SARS-CoV methyltransferases (nsp14
7 en het nsp10:nsp16 complex), de functionaliteit van het experiment demonstreerden,
8 werd geen activiteit voor EAV nsp12 gedetecteerd. Op basis van de sequentievergelij-
9 king werd een uitgebreide set van EAV mutanten gegenereerd en gekarakteriseerd op
10 plauefenotypen en de geproduceerde virus titer, evenals op eiwitexpressie. Deze re-
11 verse genetics experimenten onthulden een aantal fenotypen, variërend van nagenoeg
12 wild-type via niet-verspreidend tot replicatie-incompetent, wat aangeeft dat nsp12
13 essentieel is voor virale replicatie.

14

15 De bovenstaande hoofdstukken die de biochemische eigenschappen van bepaalde
16 eiwitten beschrijven kunnen uiteindelijk een bijdrage leveren tot de identificatie van
17 drug targets voor de bestrijding van nidovirus infecties. In hoofdstuk 7 worden de rand-
18 voorwaarden geanalyseerd die bepalen of de marketing van een dergelijke antivirale
19 drug economisch levensvatbaar zou kunnen zijn. Dit project werd gerealiseerd onder
20 de begeleiding van verscheidene specialisten van Janssen Infectious Diseases, één van
21 de industriële partners van het EUVIRNA consortium, de Marie Curie Initial Training
22 Network waartoe dit onderzoeksproject behoorde. Deze studie wees uit dat, op dit
23 moment, geen van de circulerende nidovirussen een voldoende grote markt vormt om
24 de aanzienlijke investeringen die nodig zijn voor drugontwikkeling te rechtvaardigen.
25 De situatie kan anders zijn als een nieuw, hoog-pathogeen nidovirus zou opduiken,
26 zoals geïllustreerd in 2002 door SARS-CoV en in 2012 door MERS-CoV. Met het oog op
27 zulke bedreigingen, zou het pre-pandemisch aanleggen van drugvoorraden overwogen
28 kunnen worden. Echter, ook onder die omstandigheden lijkt het waarschijnlijk dat de
29 inherente financiële risico's een onafhankelijk privaat initiatief uitsluiten, hoewel markt-
30 parameters en goedkeuringsprocedures gunstig lijken te zijn.

31

32 Tenslotte wordt in hoofdstuk 8 de samenhang beschreven tussen eerder beschreven
33 data en enkele van de voornaamste bevindingen in dit proefschrift. Vooral de poten-
34 tiële verschillen tussen kleine en grote nidovirussen op het niveau van de moleculaire
35 mechanismen van de initiatie van RNA synthese en mRNA capping worden besproken.
36 Voor dit doel worden ook alternatieve mechanismen in beschouwing genomen die con-
37 sistent zouden zijn met de arterivirus data gepresenteerd in dit proefschrift en elders.
38 Bovendien worden de potentiële rollen van cellulaire helicases in nidovirusreplicatie en
39 de immuunrespons van de gastheer tegen nidovirussen bediscussieerd.

