



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Functions and requirements of conserved RNA structures in the 3' untranslated region of Flaviviruses

Agostinho Gonçalves Costa da Silva, P.

Citation

Agostinho Gonçalves Costa da Silva, P. (2011, June 27). *Functions and requirements of conserved RNA structures in the 3' untranslated region of Flaviviruses*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/17775>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/17775>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

SAMENVATTING

Door de grote toename van onze mobiliteit en de toenemende verwevenheid van de verschillende samenlevingen zijn er tegenwoordig meer mogelijkheden voor de verspreiding van besmettelijke ziekten. Volgens de Wereldgezondheidsorganisatie (World Health Organization, WHO) is de snelheid waarmee infectieziekten zich momenteel verspreiden groter dan ooit. Met name RNA virussen zijn een belangrijke oorzaak van deze nieuwe, dan wel hernieuwde, en zich steeds verder verspreidende virusuitbraken. Flavivirussen vormen hierop geen uitzondering. Met name de verspreiding van dengue virus (DENV) en West Nile virus (WNV) is in het laatste decennium sterk toegenomen en daarmee ook het aantal geïnfecteerde individuen. Deze toenemende overlast door flavivirusinfecties is waarschijnlijk het gevolg van factoren als de groei van de wereldbevolking, toenemende verstedelijking, dieren- en goederentransport en het broeikaseffect met als gevolg een grotere verspreiding van geschikte vectoren. Flavivirussen zijn verantwoordelijk voor een aantal belangrijke ziekten, welke gepaard kunnen gaan met ernstige hemorrhagische koorts of encephalitis. Hoofdstuk 1 van dit proefschrift geeft een samenvatting van de biologie van flavivirussen. De moleculaire biologie en genexpressie-strategie, alsmede de onderlinge verwantschap van deze virussen en de transmissieroute van de verschillende flavivirussen wordt in dit hoofdstuk beschreven. De voor de mens belangrijkste flavivirussen zijn: gele koorts virus (YFV), knokkelkoorts (ook wel dengue virus genoemd; DENV), Japanse encefalitis virus (JEV), West Nile virus (WNV) en tickborne encefalitis virus (TBEV). Momenteel is bescherming tegen ziekten door vaccinatie alleen mogelijk voor YFV, JEV en TBEV. Om de invloed van flavivirusinfecties op de samenleving te voorkomen dan wel te beperken zijn vaccins en effectieve therapieën tegen andere flavivirussen, met name DENV, noodzakelijk. Om dit te bereiken is een uitgebreide kennis omtrent de fundamentele aspecten van de biologie van flavivirussen, inclusief de interacties tussen het virus, de gastheer en de vector, essentieel.

De sequentie en structuur van de 3' untranslated region (3' UTR) van het genoom van RNA virussen is van groot belang voor verschillende stappen in de virale levenscyclus en speelt een belangrijke rol bij de regulatie van de RNA synthese, translatie en de assemblage van nieuwe virusdeeltjes. De flavivirus 3' UTR kenmerkt zich door een aantal geconserveerde RNA sequenties en een complexe secundaire en tertiaire RNA structuur, die verschillende stem-loop structuren en een aantal RNA pseudoknots omvat. Aan sommige van deze sequentiemotieven en RNA structuren is op basis van experimenteel onderzoek een biologische functie toegeschreven, van andere RNA elementen is de functie nog onbekend. Het doel van het in dit proefschrift beschreven onderzoek was gericht op het vergroten van onze kennis van de functie van de verschillende RNA structuren in de flavivirus 3' UTR. De laatste 80 tot 90 nucleotiden van het 3' uiteinde van

het genoom van ieder flavivirus vormen een geconserveerde haarspeld structuur (3' SL). Met uitzondering van de pentanucleotide sequentie (PN) "CACAG" in een uitstulping aan de top van de 3' SL structuur en het dinucleotide "CU" aan het uiteinde van het virale genoom, is de primaire sequentie van de 3' SL structuur niet geconserveerd. Uit onderzoek aan de PN sequentie van WNV is gebleken dat, met uitzondering van de nucleotiden op de 2^e en 4^e positie, alle overige nucleotiden van het PN motief noodzakelijk zijn voor efficiënte replicatie van het virale RNA. Hoofdstuk 2 van dit proefschrift beschrijft een gedetailleerde analyse van de PN sequentie in de 3' SL structuur van YFV-17D. Uit onze resultaten blijkt dat conservering van het PN motief in YFV minder noodzakelijk lijkt dan voor WNV. Niet alleen puntmutaties van de nucleotiden op de 2^e en 4^e positie, maar ook op de 3^e positie van het PN motief blijken toegestaan. Alleen het "G" residu op positie 5 en baseparing van de nucleotide op de 1^{ste} positie zijn strikt noodzakelijk voor efficiënte replicatie. Ondanks dat de mutaties op de 2^e, 3^e en 4^e positie van de PN sequentie in celkweek geen significant effect lijken te hebben op virale RNA synthese en virusproductie, blijkt uit competitie-experimenten dat het wildtype (wt) virus toch beter replicateert dan de virussen met een mutatie in het PN motief. Bij herhaald passeren worden de mutante virussen door het niet gemuteerde gele koorts virus verdrongen uit de viruspopulatie.

In de afgelopen jaren is uit verschillende studies met door muggen en teken overgebrachte flavivirussen gebleken dat, zowel in celkweek als in geïnfecteerde muizen, naast het positief- en negatief-strengige genoom RNA ook een klein positief-strengig subgenoom RNA maken. Dit "small flavivirus" (sf) RNA heeft een lengte van 0,3 tot 0,5 kb en is co-lineair met het distale gedeelte van de virale 3' UTR. Onlangs is aangetoond dat dit sfRNA ontstaat als gevolg van onvolledige afbraak van het virale genoom RNA door het 5'-3' exoribonuclease XRN1 van de gastheer. Productie van het sfRNA blijkt een belangrijke determinant voor de pathogeniciteit van het virus. In hoofdstuk 3 worden de karakteristieken van de YFV sfRNAs in detail beschreven. In tegenstelling tot de andere arthropod-borne flavivirussen worden in YFV-17D geïnfecteerde cellen niet één, maar twee sfRNAs geproduceerd, die hetzelfde 5' uiteinde hebben. De positie van dit 5' uiteinde op het virale genoom werd bepaald en bleek juist stroomopwaarts van een eerder voorspelde RNA pseudoknot (PSK3) te liggen. Uit de resultaten van biochemische experimenten en mutagenese studies kan worden geconcludeerd dat deze voorspelde RNA pseudoknot daadwerkelijk wordt gevormd en functioneert als een signaal om XRN1 te blokkeren. Een belangrijk gevolg van deze en andere resultaten met betrekking tot sfRNA productie en -functie is dat eerder gepubliceerde artikelen, waarin de effecten van mutaties in het distale gedeelte van de 3' UTR binnen de context van het virale genoom worden beschreven, kritisch tegen het licht moeten worden gehouden. Het is nu immers onduidelijk of de gerapporteerde effecten gerelateerd zijn aan effecten op de functie van de bestudeerde RNA structuren op het virale genoom dan wel op de functie van het bijbehorende sfRNA. Ook noemenswaardig is de waarneming dat

flavivirussen die niet langer een sRNA maken een geattenuëerd fenotype hebben. Dit opent interessante mogelijkheden voor de constructie van nieuwe of verbeterde flavivirus vaccins.

In eerdere studies is de productie van een sRNA aangetoond voor flavivirussen die door muggen en teken worden verspreid. Er is echter nog een derde groep van zgn. no known vector (NKV) flavivirussen waarbij voor virusoverdracht geen vector nodig lijkt te zijn. In hoofdstuk 4 wordt het onderzoek naar mogelijke sRNA productie in cellen die geïnfecteerd zijn met NKV flavivirussen beschreven. Deze studie omvat ook het cell fusing agent virus (CFAV), dat alleen in insectencellen groeit en vermoedelijk ook tot de flavivirussen behoort. Uit de verkregen resultaten kan worden geconcludeerd dat sRNA productie een karakteristieke eigenschap is voor alle flavivirussen. De geanalyseerde NKV flavivirussen en ook CFAV produceren allen sRNAs. Een analyse van de moleculaire mechanismen van de sRNA productie van met NKV flavivirus of CFAV geïnfecteerde cellen wordt bemoeilijkt door het ontbreken van een infectieuze cDNA kloon voor deze virussen. Uit de analyse van de *in vitro* experimenten met gezuiverd XRN1 en *in vitro* vervaardigde RNA transcripten als substraat kan echter worden geconcludeerd dat XRN1 ook verantwoordelijk is voor de sRNA productie van de NKV flavivirussen en CFAV. Door gebruik te maken van een op het Sindbis virus gebaseerd expressiesysteem is vervolgens de RNA structuur in het gebied net stroomafwaarts van de plaats waar XRN1 vastloopt bij de productie van de sRNAs van de NKV virussen en CFAV onderzocht. Deze experimenten, gecombineerd met een voorspelling van de plaatselijke RNA structuur, suggereren dat ook bij deze virussen een RNA pseudoknot verantwoordelijk is voor het blokkeren van XRN1. Uit de verkregen resultaten kan geconcludeerd worden dat de productie van een sRNA een uniek kenmerk is voor alle flavivirussen en dat het als zodanig gebruikt kan worden om virussen met een gelijksoortige genomorganisatie aan het genus *Flavivirus* toe te wijzen. Uit deze studie blijkt ook dat het mechanisme voor de productie van flavivirus sRNAs geconserveerd is. Dit wil echter niet zeggen dat de geproduceerde sRNAs een zelfde functie hebben in de verschillende gastheren.

Volledige cDNA klonen van flavivirussen worden vaak geplaagd door genetische instabiliteit in prokaryote gastheren. Al naar gelang het virus kan het daarom zeer lastig zijn om een dergelijke kloon te maken. In hoofdstuk 5 wordt de succesvolle constructie en karakterisatie van de eerste infectieuze cDNA kloon van een NKV virus beschreven. Door gebruik te maken van het low-copy number plasmide pACNR1180, dat al eerder is gebruikt om stabiele, volledige YFV cDNA klonen te ontwikkelen, is het gelukt om een stabiel, infectieus cDNA te maken van Modoc virus (MODV). *In vitro* vervaardigde RNA transcripten van deze MODV cDNA blijken na transfectie in een geschikte gastheercel lijn infectieus en de getransfecteerde cellen produceren MODV met overeenkomstige karakteristieken als het oorspronkelijke virus. Deze infectieuze cDNA kloon is een belangrijk hulpmiddel voor een gedetailleerde vergelijking van de replicatie signalen en

virus-gastheer interacties tussen de tot zoogdieren beperkte NKV flavivirussen en de minder gastheer gelimiteerde arthropod-borne flavivirussen.

Hoofdstuk 6 bevat een uitgebreid literatuuroverzicht van gepubliceerde data over de structurele- en functionele karakterisatie van de verschillende RNA elementen die geïdentificeerd zijn in de 3' UTR van de arthropod-borne - en NKV flavivirussen. De nadruk in dit overzichtsartikel ligt op de RNA sequenties en structuren, waarvan bekend is dat ze een effect hebben op de replicatie en translatie van het virale RNA of op de pathogeniciteit van deze virussen.

Het laatste hoofdstuk van dit proefschrift is een epiloog, waarin de in hoofdstuk 2 t/m 5 beschreven resultaten worden bediscussieerd in de context van recent gepubliceerde data en waarin suggesties worden gedaan met betrekking tot toekomstig onderzoek aan de geconserveerde sequenties en structuren in de 3' UTR van flavivirussen.