



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Marvellous ubiquitin : avenging the MERS-coronavirus papain-like protease

Knaap, R.C.M.

Citation

Knaap, R. C. M. (2020, February 12). *Marvellous ubiquitin : avenging the MERS-coronavirus papain-like protease*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/85167>

Version: 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/1887/85167>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/85167> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Knaap, R.C.M.

Title: Marvellous ubiquitin : avenging the MERS-coronavirus papain-like protease

Issue Date: 2020-02-12

DUTCH SUMMARY

In de 17^e eeuw nam Antoni van Leeuwenhoek voor het eerst micro-organismen waar met zijn zelfgebouwde microscoop. Nu weten wij dat er naast bacteriën, die waren gezien door van Leeuwenhoek, vele andere micro-organismen bestaan die infectieziekten kunnen veroorzaken, zoals schimmels, parasieten en virussen. Dit soort infecties kan onopgemerkt blijven maar kan ook leiden tot ernstige gezondheidsproblemen in het geïnfecteerde individu.

Virussen behoren tot de kleinste micro-organismen die we kennen, en zij infecteren niet alleen mensen maar in principe ook elke andere levensvorm. Een van de pioniers in het virusonderzoek was Martinus Beijerinck, een Nederlandse microbioloog die aan het eind van de 19^e eeuw ontdekte dat de mozaïekziekte van tabaksplanten werd veroorzaakt door micro-organismen die zich vermenigvuldgden in de groeiende delen van de plant. Deze waarneming had een belangrijke implicatie, namelijk dat dit micro-organisme, dat later een virus bleek te zijn bestaande uit een complex van eiwit en nucleïnezuur, altijd een gastheer nodig heeft om zich daarin te kunnen repliceren. De interacties die zich voltrekken tussen het replicatieproces van het virus en de componenten en processen in de gastheer cel hebben daardoor veel invloed op de uitkomst van de infectie. Dit proefschrift richt zich op een voorbeeld van dergelijke virus-gastheer interacties.

Door klimaat- en ecosysteemveranderingen, toenemende internationale reizen en handel is de verspreiding van virussen onvoorspelbaarder en slechter beheersbaar geworden. Recent zijn er grote virusuitbraken geweest van bijvoorbeeld het Ebolavirus en het Zikavirus met elk aanzienlijke sociale en economische impact. Zo werd in 2012 ook een nieuw coronavirus geïsoleerd, uit een patiënt die overleden was aan een combinatie van een acute longontsteking en nierfalen. Het virus werd Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) genoemd en per september 2019 waren er 851 MERS-gerelateerde sterfgevallen geregistreerd. Op dit moment worden nog steeds met regelmaat nieuwe gevallen ontdekt, die waarschijnlijk ontstaan doordat het virus op de mens wordt overgedragen door dromedarissen, die de intermediaire gastheer zijn voor het oorspronkelijk uit vleermuizen afkomstige MERS-CoV.

Coronavirussen worden zo genoemd doordat het spike eiwit een trimeer vormt op de virale envelop waardoor een karakteristieke kroonvormige (kroon in het Latijn: corona) verschijning op het virusdeeltje te zien is als gebruik wordt gemaakt van een elektronenmicroscoop. Naast de virale structurele eiwitten bevat het virusdeeltje een RNA-genoom van positieve polariteit met een 5' cap structuur en 3' poly(A)-staart. Om een gastheer cel te infecteren bindt het spike eiwit aan de cellulaire receptor waarna, via fusie van cellulaire en virale membranen, het RNA-genoom in de cel vrijkomt. Ribosomen vertalen dan als eerste een deel van het genoom in twee, gedeeltelijk overlappende eiwitten. Deze virale polyproteïnen worden tot functionele niet-structurele eiwitten geknipt door proteasen die onderdeel uitmaken van deze zelfde polyproteïnen. De niet-structurele eiwitten zorgen voor de transcriptie en replicatie van virale RNAs, wat uiteindelijk leidt tot de vorming van nieuwe virusdeeltjes in de geïnfecteerde cel. Deze worden uitgescheiden,

waarna infectie van nieuwe cellen kan plaatsvinden. Op dit moment zijn er geen antivirale vaccins of geneesmiddelen beschikbaar om MERS-CoV infecties te voorkomen of te behandelen.

Gastheercellen zijn uitgerust met primaire aangeboren mechanismen om (delen van) virussen te herkennen, zodat er maatregelen kunnen worden genomen om de gevolgen van een infectie te beperken. Als onderdeel van het aangeboren immuunsysteem kan viraal RNA worden herkend in de geïnfecteerde cel, hetgeen leidt tot activatie van signaaltransductieroutes en de productie van type I interferon en cytokinen. Het vrijkomen van interferon kan naburige cellen waarschuwen en ervoor zorgen dat infectie van deze cellen wordt tegengewerkt door het activeren van interferon-gestimuleerde antivirale genen. Ook zorgt activatie van het aangeboren immuunsysteem voor het rekruteren en activeren van cellen die betrokken zijn bij de zogenaamde adaptieve immuunrespons, die bestaat uit cellulaire en humorale afweer.

Een van de regulatiemechanismen die het aangeboren immuunsysteem aanstuurt is ubiquitinering, waarbij een klein eiwit genaamd ubiquitine, of ketens van meerdere ubiquitine moleculen, worden geconjugeerd aan andere eiwitten, bijvoorbeeld factoren betrokken bij de aangeboren immuunreacties. Deze koppeling van ubiquitine kan onder meer zorgen voor de specifieke activatie of afbraak van het betreffende eiwit. Ubiquitinering is een reversibele modificatie en er zijn deubiquitinerende enzymen (DUBs), proteasen, die ubiquitine kunnen verwijderen van eiwitten en daarmee het signaal opheffen.

Als evolutionaire reactie op het aangeboren immuunsysteem brengen coronavirussen, net als vele andere virussen, eiwitten tot expressie met activiteiten die het aangeboren immuunsysteem onderdrukken, om zo onder de radar van dit systeem te kunnen blijven en zich desondanks goed te kunnen vermenigvuldigen. Het werk beschreven in dit proefschrift betreft de interactie tussen het MERS-CoV papaine-achtige protease (papain-like protease; PL^{pro}) en de door ubiquitine-gereguleerde aangeboren immuniteit. Het PL^{pro} is onderdeel van MERS-CoV niet-structureel eiwit 3 (nsp3) en primair betrokken bij het knippen van de virale polyproteïnen waardoor de drie N-terminaal gelegen niet-structurele eiwitten vrijkomen. Daarnaast is PL^{pro} in staat om ubiquitine en interferon-gestimuleerd gen 15, een klein eiwit dat een ubiquitine-achtige vouwing heeft, te binden en los te knippen van substraten. Onze hypothese was dat deze DUB-activiteit door het virus gebruikt wordt om de activatie van het aangeboren immuunsysteem te onderdrukken. Om dit te kunnen bewijzen is het belangrijk om eerst een aangepast virus te genereren dat nog wel in staat is om de polyproteïnen te knippen, zodat het virus kan blijven repliceren, maar niet meer in staat is om ubiquitine te deconjugeren. Met behulp van een dergelijke virusmutant kan de functie van de DUB-activiteit worden bestudeerd. Om dit te kunnen realiseren zijn de kristalstructuren van MERS-CoV PL^{pro} opgehelderd, zowel zonder als met gebonden ubiquitine, zodat precies duidelijk werd welke aminozuren van PL^{pro} interacteren met ubiquitine (Hoofdstuk 2). Enkele van deze posities die op afstand liggen van het katalytische centrum van het protease werden vervolgens gemuteerd om zo de interactie met ubiquitine te verstoren. Vervolgens zijn

in cellijnen de activiteiten van het gemuteerde protease bestudeerd. Allereerst werd gekeken of het aangepaste protease nog in staat is om de herkenningsequentie tussen niet-structureel eiwit 3 en 4 te knippen. Daarnaast werd de DUB-activiteit vergeleken met die van het oorspronkelijke protease. Met name de V1691R aminozuurverandering zorgde ervoor dat het protease geen ubiquitine meer kon deconjugeren, terwijl het onverminderd het virale polyproteïne kon knippen. Ook was dit gemuteerde protease niet meer in staat om activatie van de interferon- β promotor te onderdrukken wanneer het aangeboren immuunsysteem werd gestimuleerd, iets wat het oorspronkelijke protease wel deed. Dit toonde aan dat specifiek de DUB-activiteit van MERS-CoV PL^{pro} inderdaad immuunsysteem onderdrukkende werking heeft.

Om deze observaties in de context van een volledige virusinfectie te kunnen bevestigen werden enkele veranderingen in PL^{pro}, waaronder de V1691R mutatie, in het MERS-CoV genoom geïntroduceerd (Hoofdstuk 3). Deze gemuteerde virussen werden gekarakteriseerd in twee verschillende humane cellijnen, waarbij geen verschil in de productie van nieuwe virusdeeltjes meetbaar was in vergelijking met het wild-type virus. Wel was er in MRC5 cellen die geïnfecteerd waren met het mutante virus sprake van een verhoging van de mRNA niveaus van interferon- β en enkele interferon-gestimuleerde genen ten opzichte van met wild-type virus-geïnfecteerde cellen. Vervolgens is het virus met de V1691R mutatie gebruikt voor de infectie van muizen die de cellulaire MERS-CoV receptor tot expressie brengen, zodat ze vatbaar zijn voor het virus. De meerderheid van de muizen die het gemuteerde, DUB-negatieve virus kregen overleefde de infectie, terwijl het wild-type virus lethaal was voor deze muizen. Opvallend was dat de mRNA niveaus van interferonen, cytokinen en interferon-gestimuleerde genen sneller stegen in muizen die geïnfecteerd waren met het DUB-negatieve virus dan in muizen met een wild-type virusinfectie. Ook was deze respons beter gecontroleerd dan in de wild-type virus-geïnfecteerde muizen, waarin een vertraagde en daarna excessieve respons optrad. Daarnaast daalde de virus titers in de DUB-negatieve virus-geïnfecteerde muizen sneller dan in muizen die geïnfecteerd waren met het wild-type virus. Deze resultaten lieten voor het eerst zien dat de DUB-activiteit van MERS-CoV PL^{pro} een rol heeft in het ontwijken van het aangeboren immuunsysteem, en dat deze functie belangrijk bijdraagt aan de virale pathogenese. Het uitschakelen van de DUB-activiteit van een coronavirus PL^{pro} kan dus een manier zijn om het virus op een gecontroleerde manier te verzwakken, waarbij tegelijkertijd een sterkere aangeboren immunreactie kan worden opgewekt. Deze aanpak kan daarom een basis vormen voor toekomstige vaccinontwikkeling.

Virale proteasen zijn essentiële enzymen in de replicatiecyclus van virussen en daardoor zijn ze vaak een aantrekkelijk doelwit voor de ontwikkeling van antivirale geneesmiddelen. Dit wordt in het geval van MERS-CoV PL^{pro} echter bemoeilijkt doordat deze virale DUB structurele overeenkomsten heeft met humane DUBs, voornamelijk in het katalytische centrum, waartegen de meeste middelen gericht zijn. In Hoofdstuk 4 wordt de selectie en analyse van een nieuw soort antivirale eiwitten beschreven, als alternatief voor het meer klassieke gebruik van kleine chemische moleculen als antiviraal middel. Uit onderzoek was bekend dat de binding van ubi-

quitine en ubiquitine-achtige eiwitten met DUBs vaak kortdurend is en dat ze interacteren met niet-geconserveerde aminozuren van de DUB. Dit maakte het mogelijk om te onderzoeken of een ubiquitine sequentie variant (Ub variant) krachtiger zou kunnen binden aan PL^{pro}. Daarnaast zou, indien deze Ub variant bindt aan niet-geconserveerde aminozuren van de DUB, dit ook kruisreactie met cellulaire componenten kunnen voorkomen. Uit een bibliotheek met meer dan 10 miljard Ub varianten werden de beste vier varianten, de sterkste binders van het MERS-CoV PL^{pro}, geselecteerd. Op eenzelfde manier werden ook Ub varianten geïdentificeerd die aan de DUB van Krim-Congo hemorrhagische koorts virus bonden. *In vitro* bonden deze Ub varianten specifiek en met hoge affiniteit aan de virale DUBs en remden ze hun activiteit. Co-kristallisatie van de virale DUBs met de Ub varianten bracht de veranderingen ten opzichte van gewoon ubiquitine in kaart. Dit maakte duidelijk dat de sterke binding van de Ub varianten voortkwam uit verbeterde hydrofobe interacties en waterstofbrugnetwerken. Expressie van Ub varianten in cellen remde de activiteit van MERS-CoV PL^{pro} en tijdens een infectie ook de replicatie en productie van nieuwe virusdeeltjes, waardoor de antivirale kracht van de Ub varianten duidelijk werd.

De Ub varianten die binden aan MERS-CoV PL^{pro} werden verder gekarakteriseerd door de mutaties ten opzichte van wild-type ubiquitine te onderzoeken, zoals beschreven in Hoofdstuk 5. Met modificaties van specifieke posities in de Ub varianten is geprobeerd om de affiniteit verder te verhogen, helaas zonder aanzienlijk succes. Dit onderzoek toonde wel aan dat de sterkste binder aan PL^{pro}, ME.4, instabiel was. Dit probleem werd opgelost door de sequentie van het N-terminale gebied van ME.4 (aminozuren 1-14) te optimaliseren, zonder dat dit invloed had op de binding aan PL^{pro} dan wel het remmen van de activiteit van PL^{pro}. Het resultaat was dat inderdaad hogere expressieniveaus van de gestabiliseerde Ub variant werden gevonden. Dit biedt een goede uitgangspositie om in vervolgstudies het beschermingsniveau vast te stellen dat Ub varianten kunnen bieden in een diermodel voor MERS-CoV infectie.

Naast MERS-CoV PL^{pro} en de DUB van Krim-Congo hemorrhagische koorts virus zijn er meer virale DUBs ontdekt die virussen met een RNA-genoom tot expressie brengen. In Hoofdstuk 6 is een overzicht gemaakt van deze DUBs en is gefocust op de structuurbiologie van deze enzymen en hun functie tijdens infectie, voornamelijk toegelegd op de interactie met het aangeboren immuunsysteem.