

**UITNODIGING
OPENBARE VERDEDIGING**
Taking Control
Alphaherpesvirus Manipulation of the Cytoskeleton and
the Epitranscriptome

Robert Jansens
08/02/2021

PROMOTOREN
Prof. dr. Herman Favoreel
Faculteit Diergeneeskunde, UGent

Curriculum Vitae

Robert Jansens werd geboren op 25 maart 1993. Hij behaalde het diploma Wetenschappen-Wiskunde aan het Atheneum Voskenslaan in Gent in 2011. Daarna studeerde hij bio-ingenieurswetenschappen aan de Universiteit Gent. Hij behaalde het diploma Master in de Bio-ingenieurswetenschappen in 2016 met een masterthesis over de eigenschappen van US3-geïnduceerde celuitlopers in het labo van prof. Favoreel. Dit vormde de basis voor een doctoraat in datzelfde labo over de rol van virale kinasen in de replicatie cyclus van alphaherpesvirussen.

Robert Jansens is auteur van verschillende wetenschappelijke publicaties in internationale tijdschriften en nam deel aan internationale congressen over virologie.

Waar?

De verdediging vindt plaats op:

Maandag 8 februari 2021 om 16 uur.

Door de huidige Covid-19 maatregelen zal de verdediging enkel live gestreamd worden.

Inschrijven

Indien u wenst deel te nemen aan de videoconferentie, gelieve voor 7 februari een e-mail te sturen naar robert.jansens@UGent.be om hiervoor een persoonlijke uitnodiging te ontvangen

Leden examencommissie

Prof. dr. F. Pasmans
Voorzitter van de examencommissie

Prof. dr. S. Jaffrey
Weill Cornell Medical College, Cornell University, USA

dr. A. Olarerin-George
Weill Cornell Medical College, Cornell University, USA

Prof. dr. H. Nauwynck
Faculteit Diergeneeskunde, UGent

Prof. dr. N. De Regge
Sciensano

Prof. dr. D. Lafontaine
Cancer Research Center, Université Libre de Bruxelles

Herpesvirussen zijn experts in het manipuleren van de gastheercel die ze infecteren. Over miljoenen jaren van co-evolutie met de gastheer hebben herpesvirussen talrijke strategieën ontwikkeld om de efficiëntie van hun replicatie te maximaliseren en om antivirale mechanismen van de gastheer te omzeilen. Alfaherpesvirussen coderen voor twee serine/threonine proteïne kinasen die verschillende functies uitoefenen tijdens infectie van de gastheer. Het doel van deze studie was het verkrijgen van nieuwe inzichten in de functies van deze virale kinasen. Hierbij werd gefocust op twee verschillende aspecten van de gastheercel die beïnvloed worden door de virale kinasen. Enerzijds werd het effect van het US3 kinase op het cytoskelet van de gastheercel onderzocht, waarbij de celuitlepers die geïnduceerd worden door expressie van het US3 eiwit beter werden gekarakteriseerd. Anderzijds werd het effect van virus infectie en de virale kinasen op mRNA methylatie onderzocht waarbij werd aangetoond dat alfaherpesvirus infectie van gastheercellen leidt tot de afbraak van m6A-bevattende transcripten en de inhibitie van methylatie van nieuwe mRNAs.

Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van de literatuur over de belangrijkste onderwerpen van deze thesis. De classificatie en de replicatie cyclus van alfaherpesvirussen wordt bondig beschreven, gevolgd door een overzicht van de gekende functies van het US3 en het UL13 proteïne kinase. Vervolgens worden de structurele eigenschappen van tunneling nanotubes (TNT) beschreven, samen met de mechanismen die leiden tot hun vorming. De belangrijkste functies van TNTs in ontwikkeling, immuun signalisatie en cellulaire stress worden kort besproken, gevolgd door een overzicht van de functies die TNTs uitoefenen bij verschillende ziektes. Vervolgens wordt de huidige kennis over het epitranscriptoom beschreven, waarbij vooral gefocust wordt op m6A en m6Am methylatie. De belangrijkste eiwitten betrokken in m6A en m6Am methylaties worden beschreven, samen met de technieken die momenteel beschikbaar zijn om RNA modificaties te bestuderen. Ten slotte worden de functies van RNA methylatie besproken, samen met wat gekend is in verband met hun rol in virale infecties.

De doelstellingen van deze thesis worden in hoofdstuk 2 beschreven.

Hoofdstuk 3 omvat een karakterisatie van de celuitlepers die gevormd worden wanneer het US3 kinase van het pseudorabies virus (PRV) tot expressie gebracht wordt. We toonden aan dat deze structuren als tunneling nanotubes geclassificeerd kunnen worden, gebaseerd op hun structurele eigenschappen en het feit dat ze intercellulair transport van moleculaire cargo's toelaten. We toonden ook aan dat viruspartikels in de TNTs aanwezig zijn in vesikels als mature viruspartikels met envelop. Daarnaast werd aangetoond dat de microtubuli die aanwezig zijn in US3-geïnduceerde TNTs post-translationele modificaties bevatten die geassocieerd zijn met verhoogde stabiliteit, wat een mogelijke verklaring geeft voor de lange levensduur van US3-geïnduceerde TNTs. Als bijkomende mogelijke factor in de uitzonderlijke stabiliteit van US3-geïnduceerde TNTs werd aangetoond dat de contactzone tussen US3-geïnduceerde TNTs en geconnecteerde cellen aangerijkt is aan componenten van adherens juncties, zoals beta-catenine en E-cadherine. Ten slotte bleken ook mitochondria aanwezig te zijn in US3-geïnduceerde TNTs in getransfecteerde en geïnfecteerde cellen en dat deze getransporteerd worden door deze TNTs.

Hoofdstuk 4 focust op de signalisatie wegen die gemoduleerd worden door het US3 kinase. Hiertoe werd een fosfoproteoom studie uitgevoerd waarbij bepaald werd welke eiwitten differentieel tot expressie komen of differentieel gefosforyleerd zijn in cellen die getransfecteerd zijn met intact versus kinase inactief US3. Slechts enkele cellulaire eiwitten bleken differentieel tot expressie te komen in cellen getransfecteerd met intact US3 kinase, maar meer dan 70 cellulaire eiwitten bleken differentieel gefosforyleerd. Eén van de differentieel gefosforyleerde eiwitten (S404 LMNA) werd gevalideerd met behulp van een fosfo-specifieke antistof, waarbij werd bevestigd dat deze site gefosforyleerd wordt in zowel US3-getransfecteerde als PRV-geïnfecteerde cellen. *Gene ontology enrichment* analyse toonde aan dat een aanzienlijk deel van de differentieel gefosforyleerde eiwitten een functie hebben in mRNA verwerking, wat op een mogelijke nieuwe functie van het US3 eiwit wijst.

In hoofdstuk 5 wordt het effect van alfaherpesvirus infecties onderzocht op m6A-bevattende transcripten. We toonden aan dat m6A niveaus in mRNA sterk dalen tijdens infectie met PRV en dat er in deze PRV-geïnfecteerde cellen een specifieke afbraak gebeurt van m6A-bevattende transcripten. De afbraak van m6A-bevattende transcripten bleek afhankelijk van de YTHDF m6A reader eiwitten en correleerde met een toegenomen lokalisatie van de YTHDF eiwitten in *P-bodies* die betrokken zijn bij mRNA afbraak. Afbraak van m6A-bevattende transcripten bleek niet essentieel te zijn voor virus replicatie in celcultuur, maar YTHDF knockdown leidde wel tot de vorming van grote syncytia bij PRV infectie. Ten slotte toonden we aan de hand van verschillende datasets uit de literatuur aan dat afbraak van m6A-bevattende transcripten in geïnfecteerde cellen geconserveerd is bij diverse alfaherpesvirussen, maar niet bij beta- of gammaherpesvirussen of andere virussen.

Hoofdstuk 6 onderzoekt het effect van PRV infectie op het m6A methyltransferase complex. Literatuurdata en onze eigen experimentele data toonden aan dat PRV infectie een inactivatie lijkt te veroorzaken van het m6A methyltransferase complex, wat leidt tot een bijna volledige afwezigheid van m6A in mRNA in geïnfecteerde cellen. Beide virale kinasen, US3 en UL13, bleken betrokken te zijn bij de modulatie van het methyltransferase complex via de fosforylatie van de WTAP component van dit complex. Fosforylatie van WTAP door UL13 leidde tot een substantiële *upshift* in schijnbaar moleculair gewicht van WTAP op Western blot, terwijl fosforylatie door US3 een beperkte *upshift* van ditzelfde WTAP veroorzaakte. Door gebruik te maken van getrunceerde WTAP constructen toonden we aan dat fosforylatie door beide kinasen vermoedelijk gebeurt in de C-terminale regio van WTAP. Door gebruik te maken van co-immunoprecipitatie experimenten, wordt aangetoond dat het m6A

writer complex grotendeels intact lijkt te blijven tijdens PRV infectie. Fractionatie experimenten toonden echter aan dat het complex tijdens PRV infectie dissocieert van de chromatine-gebonden fractie, wat de inactiviteit van het complex kan verklaren en dus ook kan verklaren waarom het complex niet langer in staat is om nieuwgevormd mRNA te methyleren. Het US3 eiwit bleek cruciaal voor de chromatine dissociatie en inactivatie van het methyltransferase complex.

In hoofdstuk 7 wordt het effect van PRV infectie op m6A(m) demethylasen onderzocht. Via Western blotting werd een sterke toename van FTO signaal waargenomen tijdens PRV infectie. Deze toename van het signaal bleek echter niet te wijten aan een toegenomen expressie van het eiwit, maar wel aan fosforylatie van FTO. Expressie van het virale UL13 kinase was noodzakelijk en voldoende voor FTO fosforylatie. Door gebruik te maken van FTO knockdown en knockout cellen werd aangetoond dat FTO niet essentieel is voor PRV replicatie in celcultuur.

Hoofdstuk 8 bevat een algemene discussie van de resultaten van deze thesis in de context van de literatuur. De implicaties van de data voor zowel de biologie van alfa herpesvirussen als algemene celbiologie worden besproken, samen met mogelijke toepassingen.