

Diss ETH No 17040

**VIRUS RECEPTOR GLYCOSYLATION DEPENDENCE IN  
ARENAVIRUS INFECTION**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

Presented by  
MAURO IMPERIALI  
Dipl. Natw., ETHZ  
born July 13, 1977  
citizen of Lugano, Ticino

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. A. Oxenius, examiner  
Prof. Dr. M. Kopf, co-examiner

2007

## SUMMARY

Viruses are studied either because they cause significant human, animal or plant diseases or because they are useful materials for probing basic phenomena in biology.

Arenaviruses are highly interesting because they occupy both categories. They can cause several human diseases known primarily as hemorrhagic fevers. The arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) can infect humans worldwide, although the illness is most often less disabling and severe than those elicited by other arenaviruses. However, LCMV has proven to be an extremely useful model in unraveling numerous phenomena in virology and immunology.

The initial stage of any viral infection involves interactions of the virus with a host cells receptor(s). Identifying the cellular receptor(s) and defining interactions between receptor and virus can provide data on viral tropism and pathogenesis and can have potential therapeutic values.

The  $\alpha$ -DG molecule was found to be a receptor for LCMV, lassa fever virus (LFV) and clade C New World arenaviruses. LCMV viral strains showing a high binding affinity to the  $\alpha$ -DG molecule preferentially infect dendritic cells, and can lead to a generalized immunosuppression, including also the anti-LCMV CTL response required for terminating the infection. As a result, these viral strains cause persistent infections in the host. On the other hand, viral strains displaying low binding affinity to the  $\alpha$ -DG molecule cause an acute infection which is cleared within few days because they target less effectively antigen presenting cells and therefore the anti-LCMV CTL response is not impaired.

Initial work postulated that LCMV-DG interactions were protein-based. However, since the viral binding site is located within a region of the  $\alpha$ -DG which is subject to heavy glycosylation, an involvement of carbohydrates in viral binding was re-evaluated.

In the first chapter of this thesis we were able to prove for the first time that  $\alpha$ -DG glycosylation is an absolute prerequisite for LCMV receptor function. In particular we could show that a rare type of mammalian glycosylation, namely the *O*-mannosylation, is necessary for LCMV receptor function.

In the second chapter of this thesis we developed a system based on the small interfering RNA (siRNA) technology aimed to further characterize the involvement of *O*-mannosylation in LCMV receptor function. siRNAs were designed to promote the shut-down of an enzyme involved in the *O*-mannosylation pathway, the glycosyltransferase POMGnT1. However, POMGnT1 expression was only partially silenced by siRNA which was not sufficient to lead to altered DG glycosylation or LCMV infection susceptibility. Even if the siRNA was cloned into a lentiviral vector that should be integrated in the cell's genome, and thus allow long-term silencing, we failed to see any significant effects on DG glycosylation.

In the last results chapter, we analyzed the effect of defective  $\alpha$ -DG glycosylation on LCMV receptor function *in vivo*. We first infected, *in vitro*, cells isolated from mice harboring defects in the DG glycosylation pathway and we could further demonstrate that DG glycosylation is extremely important for LCMV receptor function in murine target cells. However, when the same mice were infected *in vivo*, only a small difference in the control of viral replication was observed.

Overall, the results presented here clearly show that LCMV receptor function is significantly impaired when the  $\alpha$ -DG molecule is hypoglycosylated, suggesting that carbohydrates play an important role in viral recognition, at least *in vitro*. When mice harboring a defect in the  $\alpha$ -DG glycosylation pathway were infected *in vivo*, the phenotype was not as strong as it was in the *in vitro* situation. Alternative receptors and entry pathways as well natural antibodies that enhance the viral uptake, could explain the milder phenotype that was observed *in vivo*.

## SOMMARIO

Lo studio dei virus si rivela molto interessante sia perché essi provocano malattie importanti all'uomo, agli animali o alle piante oppure perché costituiscono un materiale straordinario che consente di testare fenomeni biologici di base.

Gli arenavirus si rivelano particolarmente importanti, poiché rientrano in tutte e due le categorie. Questi virus sono in grado di causare diverse malattie all'uomo conosciute principalmente come febbri emorragiche. In particolare, il virus della coriomeningite linfocitaria (LCMV) è in grado di infettare soggetti a livello mondiale, anche se la prognosi relativa all'infezione che causa è certamente migliore rispetto ad altri virus della stessa famiglia che possono risultare anche fatali. Lo stesso virus si è rivelato, nel corso degli anni, anche essere un modello particolarmente prezioso per lo studio di processi fondamentali nel campo dell'immunologia e della virologia.

Ogni infezione virale è scatenata dalla specifica interazione dei virus coi rispettivi recettori espressi sulla superficie della cellula ospite. L'identificazione dei suddetti recettori e delle rispettive interazioni virus-recettore, è di fondamentale importanza ai fini sia della caratterizzazione del tropismo cellulare e dei meccanismi patogenetici legati all'infezione virale, sia della definizione di strategie terapeutiche virus-specifiche.

La molecola  $\alpha$ -DG, è stata identificata come un recettore dei virus della coriomeningite linfocitaria e della febbre di Lassa. Ceppi virali di LCMV che mostrano un'elevata affinità di legame al recettore  $\alpha$ -DG infettano, preferibilmente, cellule dendritiche (importanti nell'induzione di una risposta immunitaria adeguata) causando un'immunosoppressione generale che comporta l'assenza di risposta citotossica specifica contro il virus, necessaria per terminare l'infezione. Di conseguenza, viene causata un'infezione virale persistente nell'ospite. Per contro, ceppi virali con ridotta affinità di legame del recettore provocano nell'ospite un'infezione acuta, che è risolta in pochi giorni. Infatti, questi virus non infettano le cellule dendritiche, che conservano la capacità di iniziare un'appropriata risposta immunitaria contro questi agenti patogeni.

Inizialmente è stato postulato che la natura delle interazioni tra LCMV e  $\alpha$ -DG fosse di origine puramente proteica. Dal momento però che il sito di interazione

recettoriale è localizzato in una zona dell' $\alpha$ -DG che è altamente glicosilata abbiamo ipotizzato un possibile coinvolgimento della composizione di carboidrati nel determinare le interazioni di legame virale.

Nel primo capitolo di questa tesi abbiamo potuto dimostrare, per la prima volta, l'importanza dei carboidrati nel determinare la funzionalità dell' $\alpha$ -DG quale recettore virale. In particolare, abbiamo potuto scoprire che un particolare tipo di glicosilazione, la *O*-mannosilazione, estremamente rara nei mammiferi, è essenziale per il corretto funzionamento dell' $\alpha$ -DG come recettore per il virus della coriomeningite linfocitaria.

Nel secondo capitolo viene descritto un sistema da noi sviluppato, basato sulla tecnologia degli small interfering RNA (siRNA), al fine di comprovare la necessità di una corretta glicosilazione dell' $\alpha$ -DG per fungere da recettore virale. In particolare, abbiamo sviluppato degli siRNA che inibiscono selettivamente una glicosiltransferasi (POMGnT1) responsabile della *O*-mannosilazione dell' $\alpha$ -DG. Purtroppo però, il grado di inibizione della POMGnT1 mediato dagli siRNA non è stato sufficiente a ridurre il grado della glicosilazione del recettore con conseguente diminuzione dell'infezione virale. Inoltre, il clonaggio delle sequenze degli siRNA in vettore lentivirale, che si integra nel genoma, non è servito ad aumentare l'effetto mediato dagli stessi.

Nell'ultimo capitolo dei risultati, abbiamo analizzato l'effetto che una glicosilazione alterata esercita sul funzionamento dell' $\alpha$ -DG come recettore virale *in vivo*. Cellule murine isolate da animali con distrofia muscolare (quindi con una forma di  $\alpha$ -DG ipoglicosilato) hanno mostrato resistenza all'infezione virale con LCMV *in vitro*, sottolineando l'importanza di una corretta glicosilazione dell' $\alpha$ -DG ai fini di una sua funzione recettoriale. Quando gli stessi animali sono stati infettati *in vivo*, però, solo una differenza marginale nel controllo dell'infezione virale è stata osservata rispetto al gruppo di controllo.

I nostri risultati dimostrano il ruolo cardine che una corretta glicosilazione della molecola di  $\alpha$ -DG svolge nel determinare l'infezione virale *in vitro*. L'assenza di un fenotipo di resistenza all'infezione *in vivo*, suggerisce la presenza di recettori o di vie alternative, quali per esempio la produzione di anticorpi naturali che possono aumentare l'endocitosi virale e quindi l'infezione.