



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Structural aspects of encapsidation signals in RNA viruses

Chen, S.C.

Citation

Chen, S. C. (2010, April 28). *Structural aspects of encapsidation signals in RNA viruses*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/15338>

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/1887/15338>

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

Samenvatting

In de late fase van de levenscyclus van een RNA virus, wanneer het genomisch RNA is gerepliceerd, wordt er begonnen met het inpakken van het genoom om infectieuze virusdeeltjes te vormen. Om er voor te zorgen dat alleen het virus-genoom wordt ingepakt en geen gastheer-RNAs, bevat het genoom specifieke signalen, inpak- of encapsidatie-signalen. Deze encapsidatie-signalen vouwen zich meestal op tot een bepaalde secundaire structuur die specifiek herkend wordt door de structurele eiwitten van het virus. In dit proefschrift worden de structurele aspecten van een aantal van deze encapsidatie-signalen beschreven. Door middel van sequentie-vergelijkingen en structuur-voorspellingen – hierna genoemd structuur-phylogenetische analyse - van alle varianten binnen een groep van gerelateerde virussen werden geconserveerde structuur-elementen geïdentificeerd. Vervolgens werden de voorspellingen getoetst door de RNA-structuur te bepalen en in sommige gevallen door het effect van mutaties in deze structuur op de groei van het virus te analyseren. Aan de hand van deze gegevens konden potentiële encapsidatie-signalen voor coronavirussen en een aantal plantenvirussen worden voorgesteld.

In Hoofdstuk 2 van dit proefschrift werden de tot nu toe bekende encapsidatie-signalen van virussen met een positieve-streng RNA genoom besproken. Een opvallend kenmerk van deze encapsidatie-signalen was hun repeterende karakter van sequentie of structurele motieven. Van dit kenmerk werd dankbaar gebruik gemaakt om nog niet geïdentificeerde encapsidatie-signalen in bijvoorbeeld coronavirussen te vinden zoals beschreven werden in Hoofdstuk 3 en 4.

In Hoofdstuk 3 werd een nieuw structuur-model voor het encapsidatie- of "packaging"-signaal van groep 2a coronavirussen beschreven. Het originele model zoals voorgesteld door de groep van Makino in 1992 bestond uit een RNA haarspeld van minimaal 69 nucleotiden maar voldeed niet voor andere groep 2a coronavirussen. We lieten aan de hand van een structuur-phylogenetische analyse zien dat een alternatieve haarspeld van 96 nucleotiden wel in alle leden van deze groep op dezelfde wijze gevouwen kon worden. Dit nieuwe model wordt gekenmerkt door een repeterend patroon van 5 base-paren afgewisseld door "bulges" van 2 nucleotiden, meestal adenosines. De structuur van deze haarspeld werd ondersteund door enzymatische en chemische analyse ("structuur-probing") van een stukje RNA uit het Mouse hepatitis virus (MHV). De mutatie-analyse uit 1992 bleek ook beter in overeenstemming te zijn met deze nieuwe structuur. Het repeterende karakter van AA-bulges werd voorgesteld als mogelijk relevant voor binding met het virale nucleocapside en/of andere structurele eiwitten die nodig zijn voor de packaging van het genomisch RNA.

In Hoofdstuk 4 werd de structuur-phylogenetische analyse toegepast op de 5' onvertaalde gebieden (5' UTRs) van coronavirus genomisch RNA. In dit

gebied van ongeveer 300 nucleotiden liggen signalen die belangrijk zijn voor replicatie, transcriptie en translatie van het virus, maar de structuur was nog niet eerder systematisch in kaart gebracht. Er werden vijf geconserveerde structuur-elementen gevonden en de organisatie daarvan bleek sterk gerelateerd aan de groepsindeling of afstamming van de coronavirussen. Een element, haarspeld 5, vertoonde interessante eigenschappen: in alle groep 1 en 2 virussen, met uitzondering van de eerder genoemde 2a virussen, was deze lange haarspeld uitgebreid met een of meerdere kleinere haarspelden die het geconserveerde UUYCGU motief in de lus vertoonden. Structuur-probing van het RNA van onder andere het SARS coronavirus was in overeenstemming met de voorgestelde structuur van deze haarspeldjes. Gezien het repeterende karakter van het UUYCGU motief stelden we voor dat deze haarspelden betrokken zijn bij de packaging van het genomisch RNA van groep 1 en 2 coronavirussen, uitgezonderd groep 2a. Interessant is dat het specifieke groep 2a packaging signaal, zoals beschreven in Hoofdstuk 3, niet te vormen is in groep 1 en 2 virussen. Sterker nog, deze groepen missen exact de 96 nucleotiden in het coderende gebied van het nsp15 eiwit. Dat het ontbreken van deze 32 aminozuren getolereerd wordt, komt waarschijnlijk doordat ze een flexibele linker vormen tussen twee eiwitdomeinen in nsp15. In plaats van deze linker hebben groep 1 en 2 virussen blijkbaar "gekozen" voor een packaging signaal in de 5' UTR (de UUYCGU haarspelden). Dat het packaging signaal voor deze virussen in de 5' UTR ligt, wordt ondersteund door de bevindingen van Escors *et al.* (2003), die aantoonde dat ten hoogste de eerste 649 nucleotiden van Transmissible gastroenteritis virus (TGEV) genomisch RNA, een groep 1 virus, nodig zijn voor packaging.

In Hoofdstuk 5 werd de secundaire structuur van de 3' onvertaalde gebieden (3' UTRs) van het geslacht Ilarvirussen bestudeerd. Dit zijn plantenvirussen die verwant zijn aan het uitvoerig bestudeerde Alfalfa mosaic virus (AMV). Van de 3' UTR van het RNA van AMV was al bekend dat het twee conformaties kan aannemen: een "haarspeld"-conformatie die betrokken is bij translatie van het RNA en een "pseudoknoop" conformatie die nodig is voor replicatie van het RNA. Structuur-phylogenetische analyse van alle beschikbare ilarvirus RNAs toonde aan dat in ilarvirussen ook beide conformaties mogelijk zijn en dus ook hier een belangrijke rol in de levenscyclus moeten spelen. Ook hier werd gevonden dat de groepering van ilarvirussen, op basis van (aminozuur) sequenties, overeenkomt met de indeling op grond van de secundaire structuur van de 3' UTRs. Gezien de grote overeenkomsten in structuur van de 3' UTR van AMV en die van subgroep 3 en 4 ilarvirus ligt het voor de hand om AMV eigenlijk als ilarvirus te classificeren en niet als een apart alfamovirus-geslacht.

In Hoofdstuk 6 werd dieper ingegaan op de twee conformaties van de 3' UTR van AMV. Al eerder lieten experimenten zien dat ATP(CTP):tRNA-nucleotidyl transferase (CCase) het 3' uiteinde van AMV RNAs kon herkennen, hetgeen er op wees dat AMV RNAs een tRNA-achtig uiteinde bezitten, zoals bijvoorbeeld voor het verwante Brome mosaic virus (BMV) was

aangetoond. Door de thermodynamische stabiliteit van deze tRNA-achtige structuur te variëren werd nu aangetoond dat het CCase het uiteinde beter herkent naarmate meer moleculen deze conformatie aannemen. De herkenning door het virale replicase volgde dezelfde trend, hetgeen aantoonde dat de tRNA-achtige conformatie nodig is voor replicatie en niet de haarspeld-conformatie zoals door anderen werd gedacht. Het stabiliseren van de haarspeld-conformatie was dan ook zowel voor het CCase als het replicase funest. Beide enzymen werden ook tegengewerkt door toevoeging van het virale manteleiwit. Dit manteleiwit heeft juist de haarspeld-conformatie nodig om te binden en is in staat om het evenwicht tussen de twee conformaties volledig te verleggen ten gunste van de haarspeld-conformatie. Deze moleculaire schakelaar speelt een rol bij de translatie en later bij de encapsidatie van het RNA door binding van het manteleiwit aan repeterende AUGC sequenties. Verder werd aangetoond door gebruik te maken van het gist drie-hybriden systeem dat de binding tussen het AMV mantel-eiwit en de 3' UTR gehinderd wordt door de vorming van de pseudoknoop c.q. tRNA-achtige conformatie. In dit unieke *in vivo* systeem kan binding van het manteleiwit aan het RNA volledig losgekoppeld worden van translatie en replicatieprocessen, hetgeen normaliter niet mogelijk is.

In Hoofdstuk 7 werden geconserveerde structuur-elementen in de 5' UTR van Bamboe mosaïc virus (BaMV) en andere potexvirussen beschreven. Deze elementen spelen mogelijk een rol in translatie, replicatie en encapsidatie van het virus. Het structuur-element van BaMV werd geanalyseerd door middel van structuur-probing. Mutatie-analyse liet zien dat veranderingen in deze structuur desastreus waren voor de vermenigvuldiging van het virus in planten. Een saillante ontdekking was dat deze structuur ook aanwezig is in satelliet RNAs van BaMV. Mogelijk is dit de sleutel voor het begrijpen van het attenerende effect op BaMV-replicatie door een bepaalde klasse van satelliet-RNAs.

Tot slot werden de bevindingen uit dit proefschrift in Hoofdstuk 8 nog eens onder de loep genomen en konden we concluderen dat de structuur-phylogenetische analyse een vruchtbare methode is om geconserveerde RNA structuren in RNA virussen te identificeren. Karakteristieke kenmerken van deze structuren zijn vaak geconserveerd in verwante virussen en spelen mogelijk een rol in de interactie met virale of gastheer-eiwitten. Dergelijke elementen werden meestal gevonden in de niet-coderende 5' en 3' UTRs omdat daar geen interferentie met de eiwit-coderende sequenties kan optreden, en soms werden ze aangetroffen in gebieden die coderen voor niet-functionele of flexibele eiwitdomeinen. Met behulp van de vergaarde kennis en inzichten kunnen in de toekomst gerichte experimenten worden uitgevoerd om bijvoorbeeld het voorgestelde packaging-sig-naal van SARS-coronavirus in de context van het levende virus te testen.

