



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Endomembrane mutiny: how picornaviruses hijack host organelles to support their replication

Melia, C.E.

Citation

Melia, C. E. (2019, May 21). *Endomembrane mutiny: how picornaviruses hijack host organelles to support their replication*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/73640>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/73640>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/73640> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Melia, C.E.

Title: Endomembrane mutiny: how picornaviruses hijack host organelles to support their replication

Issue Date: 2019-05-21

NEDERLANDSE SAMENVATTING

In dit proefschrift worden verschillende aspecten van replicatie organellen (RO's), die tijdens een picornavirus infectie in de cel ontstaan, onderzocht. **Hoofdstuk 1** bevat een inleiding over de rol en het belang van deze picornavirus RO's. Ook komen er belangrijke vraagstukken die nog opgehelderd moeten worden aan bod, zoals wat de oorsprong van RO's is, wat de vereisten zijn voor het ontstaan ervan, en welke functies de RO's hebben. De verschillende methodes die worden gebruikt om deze vragen te beantwoorden worden tevens uitgelegd, met name de voordelen van "Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy" (SFB-SEM). Deze techniek maakt het mogelijk om, in tegenstelling tot conventionele Electronen Microscopie (EM), gehele cellen te bestuderen, hetgeen ongekende contextuele informatie oplevert. De technieken en methoden die tijdens dit werk zijn ontwikkeld en gebruikt bieden nieuwe mogelijkheden voor vervolgstudies naar vorm en functie van RO's.

In **Hoofdstuk 2** wordt de constructie en toepassing besproken van een enterovirus dat een zogeheten split-GFP-tag draagt in zijn genoom. Deze kleine split-GFP-tag wordt geïntroduceerd in het RO-geassocieerde 3A eiwit en zal ervoor zorgen dat de enterovirus RO's groen zullen oplichten tijdens infectie. De implementatie en validatie van dit split-GFP virus komen achtereenvolgens aan bod. Als eerste wordt aangetoond dat de introductie van de split-GFP-tag in het enterovirale 3A eiwit geen nadelige gevolgen heeft voor de bekende functies van dit eiwit. Vervolgens wordt met Correlatieve Licht en Electronen Microscopie (CLEM) bewezen dat de RO's geïnduceerd door het split-GFP virus inderdaad groen oplichten en een morfologie hebben die karakteristiek is voor enterovirus RO's. Tot slot wordt in levende cellen onderzocht wat de ruimtelijke en chronologische relatie is tussen de vorming van enterovirus RO's en het uiteenvallen van het Golgi apparaat. Dit split-GFP virus omzeilt de beperkingen van het gebruik van grote fluorescerende eiwitten, die niet worden getolereerd in het enterovirale genoom, en is een elegant antwoord op het ontbreken van de mogelijkheid om enterovirale RO's in levende, geïnfecteerde cellen te bestuderen.

De split-GFP methodologie die gepresenteerd is in **Hoofdstuk 2** wordt in **Hoofdstuk 3** gebruikt om de rol van PI4P lipides tijdens enterovirus infectie te bestuderen. Dit maal wordt de split-GFP-tag geïntroduceerd in het 3A eiwit van een mutant enterovirus. Dit mutante enterovirus is in staat om zichzelf te vermenvuldigen wanneer de activiteit van PI4KB, een kinase dat PI4P lipides synthetiseert, wordt geremd. Hiermee zijn de effecten van lage PI4P concentraties op de vorming van enterovirus RO's bestudeerd. Eerst wordt met Transmissie Electronen Microscopie (TEM) aangetoond dat er geen RO's aanwezig zijn in cellen die geïnfecteerd zijn met het mutante virus in aanwezigheid van de PI4KB remmer. Dit resultaat is het eerste bewijs dat langdurige replicatie van het enterovirale genome kan plaatsvinden in afwezigheid van RO's of andere modificaties van de intracellulaire membranen. Met CLEM is gevonden dat de genoom replicatie onder deze condities daarentegen plaatsvindt op een schijnbaar intact Golgi apparaat. Deze bevinding wordt bevestigd met autoradiografie studies, die direct bewijs leveren voor viraal genoom synthese op het Golgi laat in infectie. Deze resultaten samen suggereren dat PI4P lipides een belangrijke rol spelen in het uiteenvallen van het Golgi apparaat en vervolgens tijdens de vorming van enterovirus RO's. Om dit verder te onderzoeken is een replicatie-onafhankelijk systeem opgezet, waarmee wordt bevestigd

dat de aanwezigheid van PI4P lipides het ontstaan van RO's versnelt, maar niet strikt noodzakelijk is voor RO vorming. Deze rol van PI4P lipides blijkt niet verweven te zijn met de rol tijdens de proteolytische digestie van het enterovirale "polyproteïne". De intrigerende eigenschap van dit mutante enterovirus om zichzelf te vermenigvuldigen in de afwezigheid van RO's is vervolgens benut om de functies van RO's verder te onderzoeken. Replicatie in afwezigheid van RO's blijkt geen zichtbare effecten te hebben op interferon beta levels, hetgeen vraagtekens zet bij de notie dat RO's een cruciale rol spelen in het ontwijken van de aangeboren afweer tegen virale infecties.

In **Hoofdstuk 4** worden de donor organellen die gekaapt worden voor de vorming van enterovirus RO's opgehelderd. Dit is bewerkstelligd door het vastleggen van het moment van ontstaan van RO's uit het donor organel met behulp van het split-GFP virus, dat in **Hoofdstuk 2** is beschreven, en de SBF-SEM techniek. Hiervoor zijn levende, geïnfecteerde cellen gemonitord en gefixeerd op het moment dat de eerste groene RO's verschijnen. Deze gefixeerde cellen zijn onderworpen aan SBF-SEM om zo CLEM informatie van de gehele cel te verkrijgen. Verrassend genoeg is gevonden dat de eerste RO's ontstaan uit het endoplasmatisch reticulum en wat later in infectie uit het trans-Golgi netwerk. Dit suggereert dat beide organellen het ontstaan van enterovirus RO's ondersteunen, waardoor schijnbaar conflicterende hypothesen over de oorsprong van RO's worden verenigd. Daarnaast zijn in deze data fysieke connecties tussen RO's en "lipid droplets" gedetecteerd, die mogelijk wijzen op een route voor lipide uitwisseling tussen beide die belangrijk is voor replicatie van het enterovirale genoom. Deze rijke dataset illustreert de voordelen van de SBF-SEM techniek gecombineerd met fluorescentie, waarmee contextuele informatie van de gehele cel kan worden vastgesteld.

In **Hoofdstuk 5** worden de RO's van een ander picornavirus bestudeerd, te weten een cardiovirus. Electronen Tomografie wordt toegepast om de driedimensionale morfologie van de cardiovirus RO's op verschillende tijdstippen van infectie op te helderen. Deze studie toont aan dat sferische cardiovirus RO's met een enkelvoudig membraan ontspringen uit het endoplasmatisch reticulum en vervolgens transformeren in blaasjes met een dubbelvoudige membraan naarmate de infectie vordert. Daarnaast wordt aangetoond met een cardiovirus mutant, die zichzelf kan vermenigvuldigen bij lage concentraties van PI4P lipides, dat PI4P lipides een belangrijke rol spelen bij de vorming van cardiovirus RO's. Deze overeenkomsten en de verschillen met enterovirussen wordt besproken in de context van de gelijkenissen tussen verschillende picornavirussen.

Hoofdstuk 6 bevat een algemene discussie van de verschillende hoofdstukken, waarbij de belangrijkste bevindingen worden gebruikt om nieuwe thema's in het onderzoek naar positief-strengs RNA virussen uit te lichten. De belangrijke rol van PI4P lipides voor verschillende aspecten van picornavirus replicatie wordt besproken. Mogelijke functies van picornavirus RO's, in het bijzonder die van de blaasjes met een dubbelvoudige membraan die later in infectie ontstaan, worden bediscussieerd. Het zichtbare gemak waarmee sommige picornavirussen verschillende organellen en intracellulaire membranen kunnen benutten voor de vorming van RO's benadrukt dat niet zozeer de oorsprong of morfologie van RO's, maar juist de specifieke functionele vereisten van het replicatie membraan cruciaal zijn voor picornavirus replicatie.