



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Cellular cryo-tomography of nidovirus replication organelles

Wolff, G.

Citation

Wolff, G. (2022, June 29). *Cellular cryo-tomography of nidovirus replication organelles*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3421526>

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/1887/3421526>

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

APPENDIX &

Nederlandse samenvatting

In dit proefschrift wordt de macromoleculaire organisatie van nidovirus-replicatie-organellen (RO's) onderzocht en door middel van elektronen-cryotomografie (cryo-ET) in 3D en met nm-resolutie gevisualiseerd. De *Nidovirales* is een grote virusorde die onder meer arteri- en coronavirussen omvat, waarbij de laatste beruchte menselijke pathogenen bevat, zoals de severe acute respiratory syndrome-coronavirussen (SARS-CoV's). Zoals bij alle positiefstrengige RNA (+RNA)-virussen het geval is, wordt aangenomen dat de replicatie organellen (RO's) die worden geïnduceerd als gevolg van nidovirus-infectie, de virale RNA-replicatie compartimenteren. Deze compartimentering leidt tot een specifiek milieu waarin virale en gastheerfactoren worden geconcentreerd die relevant zijn voor efficiënte RNA-synthese. Bovendien wordt op deze wijze het proces afgeschermd van de sensoren van het aangeboren immuunsysteem van de gastheercel. Door nidovirus geïnduceerde RO's bestaan voornamelijk uit een groot netwerk van blaasjes met een dubbele membraan ('double-membrane vesicles' or DMV's) dat DMV's en het endoplasmatisch reticulum (ER) met elkaar verbindt.

Hoewel de DMV-bevattende RO's geïnduceerd door nidovirussen een aparte groep lijkt te zijn, zijn er ook andere +RNA-virussen die de vorming van DMV's induceren. Ons begrip van deze DMV's is de afgelopen 15 jaar geëvolueerd dankzij de spectaculaire vooruitgang in beeldvormingstechnieken met elektronenmicroscopie en door de inzet van moderne moleculair-biologische hulpmiddelen. **Hoofdstuk 2** van dit proefschrift focuseert op de structurele en functionele aspecten van DMVs en daarmee gerelateerde RO-structuren die een rol spelen in de replicatie van +RNA-virussen in het algemeen. Naast de centrale rol van DMV's in virale RNA-synthese wordt er op de verschillende (potentiële) manieren van DMV-biogenese, de betrokkenheid van virale factoren, evenals gastheer-eiwitten en lipiden in gegaan. In het specifieke geval van nidovirussen zijn de DMV's in eerdere studies gekarakteriseerd als zijnde afgesloten compartimenten waardoor het transport van virale RNA's van het DMV-lumen naar het cytoplasma onmogelijk leek.

Dit topologische probleem leidde tot verschillende hypothesen, waaronder de mogelijkheid dat er moleculaire kanalen aanwezig zouden kunnen zijn ter overspanning van de DMV-membranen. Het bestaan van dergelijke moleculaire complexen is zeer wel mogelijk niet zichtbaar geweest in beelden verkregen bij eerdere elektronenmicroscopie (EM) onderzoeken, omdat daar gebruik gemaakt werd van met zware metalen gekleurde, in hars ingebedde en in coupes gesneden celmateriaal. Om cellulaire structuren op moleculaire schaal af te beelden is de recent ontwikkelde methode van cellulaire cryo-elektronentomografie (cryoET) zeer geschikt. In de praktijk is de implementatie van deze methode is complex met een aantal technische hindernissen, die gedeeltelijk worden beschreven in **Hoofdstuk 3**. De cellulaire cryo-ET-workflow vereist de productie van fragiele cryo-lamellen in een speciale microscoop met een gefocuste ionenbundel (FIB). Deze cryo-lamellen worden gegenereerd door met de ionenbundel overtollig biologisch materiaal weg te frezen uit bevroren gehydrateerde cellen, waardoor alleen dunne plakjes intracellulair materiaal overblijven. Deze plakjes kunnen vervolgens worden bestudeerd met cryo-ET om zo hun macromoleculaire inhoud in een bijna-natieve staat te onthullen. Helaas buigen en breken cryo-lamellen vaak tijdens cryo-FIB-frezen, waardoor ze onbruikbaar worden voor daaropvolgende cryo-ET-beeldvorming. Er is daarom eerst een verbeterd protocol ontworpen om de kans op het breken van cryo-lamellen te verminderen en daarmee de snelheid van deze methode te verhogen wanneer deze wordt toegepast op snel-ingevroren (geïnfecteerde) eukaryote cellen.



In **Hoofdstuk 4** werd cellulaire cryo-ET toegepast op met coronavirus geïnfecteerde cellen en verschaftte het de eerste inzichten in de natuurlijke structuur van door coronavirus geïnduceerde RO's. Dit leidde tot de ontdekking van een tot nu toe onbekende en unieke moleculaire porie die de twee membranen overspant van de DMV's die worden geïnduceerd in cellen die zijn geïnfecteerd met ofwel het muizenhepatitisvirus (MHV), een model muizencoronavirus of SARS-CoV-2. Dit hexamere complex bevat een centraal kanaal dat breed genoeg is om de doorvoer van RNA-strengen mogelijk te maken en suggereert dus een route voor viraal RNA dat van het DMV-lumen naar het cytosol zou gaan. Verder werd gevonden dat de kern van het poriecomplex wordt gevormd door zes kopieën van coronavirus niet-structureel eiwit 3 (nsp3), een zeer grote replicase-subeenheid van ongeveer 2000 aminozuren. Deze resultaten ondersteunden een model waarin RNA transport door het DMV-poriecomplex virale RNA-synthese in het DMV lumen kan koppelen aan RNA encapsidatie aan de cytosolische zijde van het transportkanaal.

In **Hoofdstuk 5** onthult het gebruik van cellulaire cryo-ET voor arterivirus-geïnduceerde RO's dat het bestaan van DMV poriën ook elders in de orde *Nidovirales* voorkomt, wat de geconserveerde aard en het (veronderstelde) functionele belang van deze eiwitcomplexen benadrukt. De significant kleinere poriecomplexen die zijn gedetecteerd in DMVs geïnduceerd door het porcine respiratoir en reproductief syndroomvirus (PRRSV) en paardenarteritisvirus (EAV) vertonen associaties met verschillende nucleocapsidestructuren die vergelijkbaar zijn met de in complete virusdeeltjes gevonden nucleocapsiden, wat aanvullend bewijs oplevert voor het bestaan van een RNA transportroute die het virale genoom aflevert op de plek waar encapsidatie plaatsvindt. EAV-geïnduceerde moleculaire poriën in DMV's bleken zich ook buiten de context van de geïnfecteerde cel te assembleren, wat aantoont dat de aanwezigheid van viraal RNA, replicasecomponenten of structurele eiwitten niet vereist is voor hun vorming. Tenslotte werd aangetoond dat slechts twee EAV transmembraan nsps (nsp2 en nsp3) nodig zijn voor de vorming van poriën.

De recente technologische ontwikkelingen op het gebied van EM hebben niet alleen bijgedragen aan ons begrip van door nidovirus geïnduceerde RO's, maar ook aan onze kennis van andere, morfologisch verschillende, RO's die worden geïnduceerd door +RNA-virussen. In het bijzonder zijn moleculaire complexen die vergelijkbare functies lijken te hebben als de nidovirale moleculaire porie beschreven in RO's van het membraaninvaginatietype, die worden gevormd bij infectie met bijvoorbeeld noda- of alphavirussen. **Hoofdstuk 6** bespreekt technische ontwikkelingen in EM die hebben bijgedragen aan ons verbeterde begrip van +RNA virus-geïnduceerde RO's. Een breed spectrum van EM-technieken dat is toegepast op +RNA-virus-geïnfecteerde cellen en de resulterende inzichten worden besproken. Het hoofdstuk wordt afgesloten met een beschrijving van de duidelijke verschillen en opvallende overeenkomsten tussen de eiwitcomplexen die gevonden worden in de twee morfologisch verschillende +RNA virale RO-types, namelijk DMV's en membraaninvaginaties.

In **Hoofdstuk 7** wordt de bredere context van porie-achtige complexen in virale RO's en daarbuiten besproken op basis van de voorgaande hoofdstukken en recente literatuur. Er wordt aandacht besteed aan de vele nieuwe vragen die de ontdekking van moleculaire poriën in nidovirus-geïnduceerde RO's opwerpt, zoals hun samenstelling en manier van functioneren. Recente ontwikkelingen met betrekking tot ons begrip van de moleculaire organisatie van RO's van nidovirussen en andere +RNA virussen worden samengevat en overeenkomsten en verschillen worden besproken. Tenslotte wordt geschetst hoe nieuwe EM-tools de verdere karakterisering van virale RO's en moleculaire complexen zoals de poriën in het bijzonder kunnen vergemakkelijken.

