

University of Groningen

Computational studies of influenza hemagglutinin

Boonstra, Sander

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2017

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Boonstra, S. (2017). *Computational studies of influenza hemagglutinin: How does it mediate membrane fusion?* [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting

Ieder jaar wordt ongeveer een tiende deel van de wereldbevolking besmet door een influenzavirus, beter bekend als de griep. Infectie leidt in het algemeen tot milde maar soms zware symptomen die, vooral bij mensen die extra kwetsbaar zijn, kunnen leiden tot de dood. Het virus heeft de antivirale medicijnen die tot nu toe zijn ontwikkeld steeds overleefd door genetische mutaties. Deze mutaties veranderen het biochemische uiterlijk van het virus zonder de infectiviteit ervan te beïnvloeden, waardoor er nieuwe virusstammen kunnen ontstaan. Er zou zelfs een zeer infectieve virusstam kunnen opduiken die een pandemie kan veroorzaken. Dit kan alleen voorkomen worden door een universeel vaccin tegen het influenzavirus te ontwikkelen. Een dergelijk vaccin zou dus effectief moeten zijn tegen alle mogelijke virusstammen, om op die manier het hele influenzavirus onschadelijk te maken. Kennis van moleculaire details van de replicatiecyclus van het virus kan bijdragen aan het rationeel ontwerp van zo'n vaccin. Dit proefschrift richt zich vooral op het moleculaire werkingsmechanisme van influenza hemagglutinine voor het bewerkstelligen van membraanfusie, hetgeen een cruciale stap is in deze replicatiecyclus.

Hemagglutinine (HA) is het meest voorkomende eiwit aan de buitenkant van het influenzavirus en is verantwoordelijk voor het binden van het virus aan een te infecteren cel en voor membraanfusie tijdens het binnendringen van de cel. Dit maakt het een logisch doel voor het immuunsysteem en antivirale medicijnen. HA zit in het membraan dat om het virus heen zit en bestaat uit een bolvormige kap (HA1), die zorgt voor het binden van het virus aan de cel, en een fusie-actieve kern (HA2). Tijdens de infectie hechten receptorbindende domeinen in HA1 het virus aan gastheer-specifieke receptoren aan de buitenkant van de cel. Vervolgens wordt het virus in de cel opgenomen door middel van endocytose en in een endosoom naar de celkern getransporteerd. Verzuring van dit intracellulaire compartiment triggert een reeks conformatieveranderingen in het eiwit die uiteindelijk leiden tot fusie van het virale en endosomale membraan. Hierdoor kan het virale genoom de celkern binnentreden om de productie van nieuwe virusdeeltjes te induceren. Deze nieuwe deeltjes worden daarna uitgestoten om andere cellen te infecteren, waarmee de replicatiecyclus is voltooid.

Biologische membranen, bestaande uit twee lipide monolagen, hebben een hydrofiel oppervlak en een hydrofobe kern. Het samensmelten van twee van deze membranen vereist energie omdat het membraan hierbij moet uitrekken en buigen, er afstotende hydratatiekrachten tussen de lipide kopgroepen ontstaan en vanwege de afstoting tussen hydrofobe lipide staarten en water gedurende het proces. HA werkt als een katalysator voor membraanfusie door de benodigde energie te verschaffen. Het vergelijken van de moleculaire structuren van HA bij zowel neutrale als lage pH heeft geleid tot een algemeen geaccepteerde hypothese over de aard en de volgorde van conformationele veranderingen in HA die membraanfusie bewerkstelligen. Na verlaging van de pH dissocieert HA1 en laat een amfipathische fusiepeptide aan de N-terminus van HA2 los. Deze fusiepeptide wordt

door de transformatie van een ongestructureerd deel van HA2 naar een helische structuur over een afstand van ongeveer 10 nm verplaatst richting het celmembraan, waaraan het zich hecht. De zo ontstane ‘extended intermediate’ verbindt de twee membranen. Het eiwit vouwt zich vervolgens andersom weer op, waardoor de membranen bij elkaar worden getrokken om te fuseren. (Gereviewd in Hoofdstuk 2)

In dit proefschrift wordt een aantal onbeantwoorde vragen over de moleculaire details van door HA gemedieerde membraanfusie behandeld. Om de conformationele veranderingen van HA te bestuderen hebben we moleculaire dynamica (MD) simulaties gebruikt. In MD worden de posities en snelheden van individuele atomen berekend over een tijdspanne van een femtoseconde, via de momentane interatomaire krachten op basis van een vooraf gedefinieerd krachtveld. Vanwege verschillen in parametrisatie-omstandigheden zijn sommige krachtvelden geschikter voor specifieke systemen dan andere. Ons uitgangspunt is dat, in het geval van de conformationele veranderingen van HA, het krachtveld de juiste balans tussen helische en ongestructureerde conformaties moet produceren, omdat de transformaties hiertussen zo’n centrale rol spelen. We laten zien dat het CHARMM36-krachtveld voor kleine peptiden de bij kamertemperatuur gemeten conformationele balans kan reproduceren, mits het juiste watermodel wordt gebruikt. (Hoofdstuk 3)

Recente experimentele bevindingen wijzen erop dat er meerdere naburige HA’s nodig zijn om gezamenlijk de energiebarrière naar membraanfusie te overwinnen. Het is ook gebleken dat meer dan de helft van de beschikbare HA’s onproductief is, waarschijnlijk omdat de fusiepeptiden tijdens het fusieproces zich niet aan het celmembraan hechten. Het exacte moleculaire mechanisme dat deze onproductiviteit veroorzaakt is echter vooralsnog onbekend. In dit proefschrift onderzoeken we de stabiliteit van de onderkant van HA2 tegen mechanisch ontvouwen. We betogen dat een voortijdig ontvouwen van de onderkant kan leiden tot onproductiviteit, omdat de ‘extended intermediate’ daardoor zou terugvouwen voordat de fusiepeptiden zich aan het doelmembraan hebben gehecht. Met behulp van MD simulaties, waarbij een externe kracht wordt toegevoegd, stellen we vast dat de stabiliteit van de onderkant wordt bepaald door een netwerk van zoutbruggen. Op basis van deze constatering stellen we een aantal mutaties voor die de productiviteit van HA zouden kunnen verminderen. (Hoofdstuk 4)

Een andere vraag die hardnekkig open blijft staan in het onderzoeksveld is hoeveel productieve HA’s er nodig zijn voor membraanfusie. Deze vraag houdt rechtstreeks verband met de hoeveelheid energie die één HA aan het fusieproces kan leveren. We beschouwen deze hoeveelheid als de conformationele vrije energie die vrijkomt tijdens de overgang van de ‘extended intermediate’ naar de postfusiestructuur en we hebben deze energie berekend met behulp van de ‘confinement free energy’ methode. Deze methode vermijdt het samplen van de enorme conformationele ruimte van dit relatief grote eiwit over de hele transitie. In plaats daarvan worden alleen de begin- en eindtoestanden geleidelijk beperkt tot het equivalent van een systeem van harmonische oscillatoren, waarvan de vrije energie analytisch berekend kan worden. Ondanks dat deze methode nog steeds veel rekenkracht

vereist, kunnen we aantonen dat de resultaten convergeren. De berekende $34.2 \pm 3.4 k_B T$ aan vrije energie die per HA beschikbaar is, komt overeen met een model waarin drie naburige HA's nodig zijn voor membraanfusie. (Hoofdstuk 5)

