

University of Groningen

Membrane fusion of influenza and chikungunya viruses

Blijleven, Jelle

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:

2018

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

Citation for published version (APA):

Blijleven, J. (2018). *Membrane fusion of influenza and chikungunya viruses: Mechanisms inferred from single-particle experiments*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. Rijksuniversiteit 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.

Wetenschappelijke samenvatting

Membraanfusie van influenza- en chikungunyavirus

Mechanismen afgeleid uit enkeleeltjes-experimenten

Membraanfusie is een cruciale stap voor de toegang van membraan-omhulde virussen tot de cel, aangezien het leidt tot de introductie van de inhoud van het virus, waaronder het genoom, in de cel. Daarmee wordt de cel gekaapt voor de translatie van het virale genoom tot nieuwe virale eiwitten en de productie van nieuwe virusdeeltjes. Om de hoge kinetische barrières voor het fuseren van twee membranen te overwinnen, hebben membraanvirussen eiwitten aan de buitenkant die fusie katalyseren. Deze fusie-eiwitten zorgen ervoor dat het genoom op de juiste plek in de gastheercel wordt afgeleverd om nieuwe virusdeeltjes te produceren.

In dit proefschrift heb ik membraanfusie bestudeerd van eiwitten uit twee verschillende klassen: het hemagglutinine-eiwit uit klasse I, van het influenzavirus, en het E1-eiwit uit klasse II, van het chikungunyavirus. Hoewel de tussenstappen van de eiwit-gemedieerde fusie van influenza- en chikungunyavirus verschillend zijn (**Hoofdstuk 1**), is het mechanisme als geheel opvallend gelijkend. Dit lijkt op te gaan voor de fusie van alle membraanvirussen die tot zo ver bestudeerd zijn.

Het influenza hemagglutinine (HA) is een van de best bestudeerde virale fusie-eiwitten en als eerste brachten wij dan ook de literatuur over membraanfusie van influenzavirus in kaart (**Hoofdstuk 2**). Eerst maakten we een overzicht van de gerapporteerde waarden voor de hoogte van de kinetische barrières tussen de verschillende tussenstappen in membraanfusie. Vervolgens beschreven we de structuur van HA en de grote conformationele veranderingen die de katalyse van membraanfusie door HA mogelijk maken. De structuur en pre-naar-post-fusie conformationele veranderingen zijn grotendeels in verband gebracht met de verschillende functies van HA. Zo is er bijvoorbeeld een gebied in de pre-fusie structuur genaamd de B-lus dat zich onder zure omstandigheden uitvouwt en een alfahelix vormt, waardoor het de zogenoemde fusie-peptide naar het andere membraan brengt. Er zijn echter aanwijzingen dat een ander gebied, genaamd de globulaire onderkant, de kans op succesvolle insertie van de fusie-peptide beïnvloed. Als de globulaire onderkant te snel ontvouwt en weer opvouwt bereikt de fusie-peptide het andere membraan niet, waardoor de HA onproductief is voor membraanfusie. Het bestaan van zulke onproductieve hervouwing van HA is voorspeld in verschillende experimenten, waaronder ook experimenten die individuele virusdeeltjes observeren. Ten slotte presenteren we een overzicht van zulke experimenten en hun resultaten. Enkeldeeltjesexperimenten werden ontwikkeld gedurende het laatste decennium, en werden aangepast en gebruikt in dit proefschrift. Ze maken het mogelijk de fusie van individuele virusdeeltjes met een ander, kunstmatig membraan te volgen. De experimenten hebben een van onderop opgebouwde en gecontroleerde opzet. Door bijvoorbeeld het effect van fusie-remmers op het gedrag van fuserende virusdeeltjes te observeren, is meer duidelijk geworden over

het belang van samenwerking tussen de HAs en de onproductieve mechanismen van HA. Fusie van het influenzavirus, en virale fusie in het algemeen, wordt nu gezien als voortgebracht door de gezamenlijke actie van meerdere, stochastisch geactiveerde eiwitten om zo samen de membraanfusiebarrière te overwinnen.

In **Hoofdstuk 3** beschrijf ik het effect van de substitutie van een enkel aminozuur in de globulaire onderkant van HA op membraanfusie. *In silico* simulaties van moleculaire dynamica met alle atomen hadden eerder residuen geïdentificeerd die een waterstofbruggennetwerk vormen in de globulaire onderkant van HA. Het muteren van deze residuen om waterstofbrugvorming te voorkomen leidde tot gereduceerde tijden van ontvouwing van HA als er met kracht aan getrokken werd, wat aangaf dat de gemuteerde HAs gedestabiliseerd waren. We gebruikten fluorescentiemicroscopie op individuele deeltjes om de fusie-eigenschappen van een selectie van zulke HA-mutante virussen te observeren. We vonden dat de fusie-efficiënties correleerden met de mate van destabilisatie van HA *in silico*. Vervolgens gebruikte we fusie-remmende Fab antilichaamfragmenten die eerder waren gekarakteriseerd. Door deze Fabs in te titreren op de beschikbare HA-epitopen konden we op gecontroleerde wijze een deel van de HAs uitschakelen. Door het aantal inhibitoren per virusdeeltje te tellen en dit met de fusie-efficiëntie te correleren, vonden we dat de gedestabiliseerde mutanten ook vatbaarder waren voor neutralisatie door de inhibitor. We bepaalden dat de gedestabiliseerde mutanten kleinere aantallen HA per virusdeeltje bevatten, wat we in het bestaande model van influenzafusie konden plaatsen door aan te nemen dat er minder HA in contact met het doelmembraan waren. Met behulp van het fusiemodel zoals beschouwd in **Hoofdstuk 2** konden we de observaties semi-kwantitatief verklaren. Het grootste effect van de destabiliserende mutaties in de globulaire onderkant bleek dus een reductie in incorporatie van HA te zijn, wat zich manifesteerde als gereduceerde virale fusogeniciteit.

In de daaropvolgende Hoofdstukken focus ik op het mechanisme van fusie van chikungunyavirus (CHIKV). Dit virus is recent in voorkomen sterk uitgebreid, terwijl er geen vaccin of specifieke behandeling van infectie voorhanden is. In **Hoofdstuk 4** bepaalden we de pH- en lipidenafhankelijkheid van fusie van CHIKV in zowel een liposoomfusie- als enkeledeeltjes-experiment. We vonden een steile pH-afhankelijkheid van fusie, waarbij een verschil van 0.1 in pH gepaard ging met een verdubbeling in de fusie-efficiëntie. De gecombineerde data van fusie-efficiëntie en fusiesnelheid suggereerde dat er een beperkte tijd is waarbinnen de zuur-geactiveerde eiwitten membraanfusie kunnen mediëren, omdat ze anders inactiveren. De inactivatie van volledige CHIKV-deeltjes in de afwezigheid van andere membranen was snel, in de orde van een minuut, maar was ook deels omkeerbaar bij neutrale pH. Vervolgens onderzochten we het effect van twee lipiden op fusie: sphingomyeline en cholesterol. De aanwezigheid van beide lipiden was noodzakelijk voor fusie en leidde tot een grotere fusie-efficiëntie bij grotere concentraties, maar voor sphingomyeline gold dit tot een bepaalde drempelwaarde. Echter, beide

lipiden hadden geen consistente invloed op de fusiesnelheid. Analyse van de fusietijdverdelingen van individuele deeltjes toonde aan dat er tenminste twee snelheidsbepalende stappen zitten in het CHIKV fusieproces.

We wilden de mate van coöperativiteit van CHIKV-fusie verder uitzoeken in **Hoofdstuk 5** door fusie-remmende antilichamen te gebruiken. Antilichaam CHK-152 bindt het E2-eiwit op het virusoppervlak en is een effectief middel om infectie tegen te gaan, zo hadden eerdere studies aangetoond. We lieten eerst zien dat CHK-152 de virusdeeltjes sterk afschermt van membraaninteractie, zowel bij neutrale als bij lage pH. Daarna gebruikten we fluorescentiemicroscopie op individuele virusdeeltjes om het neutralisatiemechanisme van CHK-152 uit te zoeken. Bij sub-stoichiometrische bindingsaantallen van CHK-152 per virusdeeltje vonden we een fusie-inhibitie die afhing van de pH: bij pH 6.1 werd fusie sterk geremd, terwijl dit effect minder was bij lagere pH. We observeerden dat CHK-152 dissocieerde bij lage pH. Door dit effect in te calculeren en het aantal ongebonden virale eiwitten te bepalen konden we afleiden dat CHIKV een coöperatief fusiemechanisme heeft waarbij drie tot vijf naburige E1-trimeren nodig zijn om fusie te bewerkstelligen.

Als geheel gezien was dit proefschrift erop gericht de moleculaire mechanismen van fusie van influenza- en chikungunyavirus te bepalen. Hierbij maakte de samenwerking tussen wetenschappers de bevindingen over de samenwerking tussen de eiwitten mogelijk. We hebben laten zien dat het nu mogelijk is de lengteschalen te overbruggen tussen experiment en computermodel: het bepalen van het effect van een enkele aminozuurmutatie op de functie in de context van het hele virusdeeltje, en het in-titreren van fusieremmers om de coöperativiteit op het niveau van de eiwitten te bepalen. Door de moleculaire mechanismen van virale fusie uit te zoeken draagt dit proefschrift bij aan het bespoedigen van het uitvinden van antivirale middelen met als doel virale infecties te voorkomen of uit te roeien.