



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Targeting chikungunya virus replication : insights into chikungunya virus replication and the antiviral activity of suramin in vitro

Albulescu, I.C.

Citation

Albulescu, I. C. (2019, November 27). *Targeting chikungunya virus replication : insights into chikungunya virus replication and the antiviral activity of suramin in vitro*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/80955>

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/1887/80955>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/80955> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Albulescu, I.C.

Title: Targeting chikungunya virus replication : insights into chikungunya virus replication and the antiviral activity of suramin in vitro

Issue Date: 2019-11-27

Samenvatting

Titel: Het remmen van chikungunya-virus replicatie - Inzichten in de replicatie van het chikungunya-virus en de antivirale activiteit van suramin

Dit proefschrift is gericht op het beter begrijpen van de moleculaire biologie en replicatie van het chikungunya-virus (CHIKV), en het mechanisme waarmee suramine, een geneesmiddel met een breed spectrum, dit proces kan remmen.

Chikungunya-virus (CHIKV) is een lid van de *Togaviridae*-familie en kan op mensen worden overgedragen door de beet van geïnfecteerde muggen. Het virus is van Afrikaanse origine en heeft in het verleden grote epidemieën in Azië veroorzaakt, maar de meest recente uitbraak vond plaats in 2014-2015 in een nieuw gebied, Amerika, waar het meer dan 1 miljoen vermoedelijke en bevestigde gevallen veroorzaakte. De infectie manifesteert zich door acute gewrichts- en spierpijn (die jaren kan duren), koorts, en uitslag. Tot op heden is er geen goedgekeurd vaccin of behandeling voor CHIKV-infectie. Een meer uitgebreide inleiding met betrekking tot CHIKV en de virale genoomorganisatie, eiwitfuncties, replicatie, pathogenese en preventieve of therapeutische strategieën is te vinden in **hoofdstuk 1**, de algemene inleiding van het proefschrift. Kort nadat de CHIKV-epidemie voorbij was, begon een ander virus, ook door muggen overgebracht en afkomstig uit Afrika, ernstige gezondheidsproblemen te veroorzaken in Midden- en Zuid-Amerika. Dit was het Zika-virus (ZIKV), een lid van de *Flaviviridae*-familie. Hoewel ZIKV meestal slechts asymptomatische infecties of milde ziekte veroorzaakt, gekenmerkt door lage koorts, uitslag, conjunctivitis en malaise, hebben de epidemieën in Amerika ZIKV-infectie ook in verband gebracht met foetale misvormingen zoals microcefalie en met het Guillain-Barré-syndroom bij volwassenen. Daarnaast werden eerder niet-herkende routes van moeder op kind transmissie en seksuele overdracht ontdekt. Net als in het geval van CHIKV, is er voor ZIKV infectie geen preventieve of therapeutische strategie (vaccins of geneesmiddelen) op de markt. Het geneesmiddel suramine was eerder op de markt gebracht voor de behandeling van parasitaire infecties, maar in de afgelopen 40 jaar is ontdekt dat het ook antikanker en antivirale potentie heeft. Daarom hebben we getest of suramine de replicatie van CHIKV en ZIKV *in vitro* kan remmen.

In **hoofdstuk 2** wordt de ontwikkeling van een *in vitro* replicatie assay (IVRA) beschreven die was gebaseerd op CHIKV-replicatie/transcriptiecomplexen die werden geïsoleerd uit geïnfecteerde cellen. Deze test kan worden gebruikt om CHIKV-RNA-synthese te bestuderen, en ook om remmers van dit proces te identificeren en om hun werkingsmethoden te bestuderen. Tijdens het optimaliseren van de test werd een nieuwe RNA-soort geïdentificeerd die tijdens CHIKV-infectie wordt geproduceerd, naast het genomische en subgenome RNA dat nodig is voor de productie van specifieke eiwitten die betrokken zijn bij de virale replicatie en virusproductie, maar ook bij interacties met en manipulatie van de gastheercel. De nieuwe soort is RNAII genoemd, naar analogie van

een vergelijkbaar RNA dat in 1997 door Wielgosz en Huang werd geïdentificeerd voor het aan CHIKV-verwante Sindbis-virus (SINV). Er wordt vermoed dat dit RNA de replicatie/transcriptiecomplexen dirigeert om later in infectie hoofdzakelijk het subgenome RNA te produceren, wat is vereist voor de productie van de structurele eiwitten die worden gebruikt voor de assemblage van nieuwe virusdeeltjes.

Met behulp van de IVRA hebben we in **hoofdstuk 3** suramine geïdentificeerd als een krachtige remmer van CHIKV replicatie. Uit analyses van geïnfecteerde cellen bleek echter dat de werking van suramine afhankelijk is van de remming van een vroege stap van de virale cyclus, namelijk het binnenkomen van het virus in de gastheercel. Verder werden verschillende aan suramine gerelateerde verbindingen getest. Hoewel deze verbindingen niet effectiever waren, gaven ze wel inzicht in de structurele elementen (symmetrie van het molecuul en de aanwezigheid van negatieve ladingen) die belangrijk zijn voor de beide remmende activiteiten van suramine die zijn waargenomen *in vitro* en in celweek.

Het antivirale effect van suramin is zeer breed en in **hoofdstuk 4** laten we zien dat het ook de replicatie van het nieuw opkomende virus ZIKV kan remmen, door de opname van virus toegang en de biogenese van nieuwe virions te verstoren.

Vervolgens probeerden we te begrijpen hoe suramine de vroege fase van CHIKV infectie kan remmen. **Hoofdstuk 5** beschrijft de identificatie van het CHIKV E2 envelop glycoproteïne als het doelwit van suramine. Mechanistische studies suggereren dat suramine door de interactie met E2 de virushechting aan cellen blokkeert, en de daaropvolgende fusie van het virion met cellulaire membranen. CHIKV kan resistenter worden tegen suramine door mutaties in het E2-eiwit te verwerven. De relevante aminozuursubstituties die we vonden waren N5R en H18Q, waardoor het virus veel beter kon repliceren in de aanwezigheid van suramine, in vergelijking met het wildtype virus. Echter, een bekende CHIKV-mutant met een G82R substitutie in E2, die het virus beter geschikt maakt voor het infecteren van zoogdiercellen (door interactie met een molecuul op hun celoppervlak, heparaan sulfaat), bleek gevoeliger voor suramine.

Tenslotte vat **hoofdstuk 6** de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift samen. Hun implicaties in de context van de bredere literatuur worden gepresenteerd, gevolgd door een algemene discussie en conclusie.