



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Chikungunya virus nonstructural protein 1 as an antiviral target

Kovacikova, K.

Citation

Kovacikova, K. (2021, April 20). *Chikungunya virus nonstructural protein 1 as an antiviral target*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3157039>

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/1887/3157039>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/3157039> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Kovacikova, K.

Title: Chikungunya virus nonstructural protein 1 as an antiviral target

Issue date: 2021-04-20

Nederlandse samenvatting

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek is gericht op de ontwikkeling van nieuwe antivirale middelen tegen Chikungunya virus (CHIKV). CHIKV is een terugkerend probleem dat door muggen wordt overgedragen, en in mensen een op artritis lijkende ziekte veroorzaakt die gekenmerkt wordt door plotselinge koorts, algehele malaise en spier- en gewrichtspijn. De negatieve invloed op de menselijke gezondheid en de hoge morbiditeit geassocieerd met 'Chikungunya koorts', onderstrepen het belang van de ontwikkeling en het ter beschikking komen van effectieve antivirale therapieën en andere inperkingsmaatregelen. Dit proefschrift beschrijft een aantal experimentele studies gericht op het identificeren van nieuwe kleine moleculen die CHIKV replicatie remmen en het ontrafelen van de onderliggende moleculaire mechanismen. Een belangrijke conclusie is dat het niet-structurele eiwit 1 (nsP1) van CHIKV een geschikt doelwit is voor de ontwikkeling van antivirale middelen. Het CHIKV nsP1 is een eiwit met meerdere enzymatische activiteiten dat betrokken is bij CHIKV 'RNA capping' en het aanhechten van het replicatiecomplex aan intracellulaire compartimenten waar de RNA synthese plaatsvindt, de zogeheten 'spherules'. De structuur van de cap is belangrijk voor verschillende aspecten van de CHIKV replicatiecyclus. De cap zorgt ervoor dat het virale RNA niet wordt herkend door de aangeboren immuunrespons van de gastheer, en dat het RNA beschermd is tegen degradatie door exonucleasen van de gastheer. Bovendien is de cap essentieel voor de efficiënte translatie van virale mRNAs door gastheer ribosomen.

De introductie van dit proefschrift (**hoofdstuk 1**) geeft een algemeen overzicht van de biologie, de replicatiecyclus en de pathogenese van CHIKV. Dit hoofdstuk beschrijft bovendien de evolutie en verspreiding van CHIKV, de transmissie door muggenvectoren en de acute- en chronische complicaties na manifestatie van de door CHIKV veroorzaakte ziekte. Dit hoofdstuk sluit af met een overzicht van belangrijke mogelijke inperkingsmaatregelen, zoals het beperken van de muggenpopulaties, de ontwikkeling van vaccins en de behandeling van patiënten met antivirale geneesmiddelen en monoclonale antilichamen. **Hoofdstuk 2** biedt inzichten in de ontwikkeling van kleine moleculen die CHIKV replicatie remmen, waarbij de nadruk wordt gelegd op het doelwit van deze moleculen, hun werkingswijze en hoe deze invloed hebben op de ontwikkeling van resistentie tegen antivirale geneesmiddelen. Onderwerpen van belang voor het ontdekken van antivirale middelen tegen CHIKV, waaronder de keuze van cellijnen en diermodellen, worden tevens in dit hoofdstuk

beschreven. De **hoofdstukken 3-6** van dit proefschrift presenteren uitgebreid de experimentele bevindingen met betrekking tot de identificatie en werkwijze van verschillende antivirale middelen die nsP1 als doelwit hebben. In het bijzonder beschrijft **hoofdstuk 3** het rationele ontwerp, de selectie en de validatie van 6'- β -fluoro-homoaristeromycin en 6'-fluoro-homoneplanocin A (FHNA) analogen als remmer van CHIKV. De identificatie en werkwijze van deze twee adenosine analogen worden beschreven in **hoofdstuk 4**. Bovendien beschrijft dit hoofdstuk de identificatie van CHIKV nsP1 als doelwit voor deze antivirale middelen op basis van selectie van compound-resistente varianten, en productie van recombinante virusmutanten door middel van 'reverse genetics'. Het antivirale effect en de specificiteit van FHNA worden in dit hoofdstuk aangetoond door middel van enzymatische proeven die gebruik maken van opgezuiverd wildtype en mutant Semliki Forest virus (SFV) nsP1. **Hoofdstuk 5** beschrijft een onderzoek naar andere moleculen, behorende tot de CHVB series, die effectief de replicatie van CHIKV remmen. Deze remmers behoren tot een groep nieuwe chemische verbindingen en remmen de replicatie van CHIKV sterk in een vroeg stadium van infectie. Hun werkwijze lijkt veel op die van de eerder gepubliceerde MADTP serie. Door de selectie van resistent geworden mutanten (escape mutants) en reverse genetics is aangetoond dat nsP1 het virale doelwit van CHVB is. Het antivirale effect van CHVB werd ook onderbouwd door middel van enzymatische proeven met gezuiverd nsP1 van Venezoluan Equine Encephalitis virus en SFV. In **hoofdstuk 6** worden de resultaten van een unieke moleculaire 'docking' studie beschreven, die gebruik maakt van de cryo-EM structuur van CHIKV nsP1 en CHIKV nsP1 remmers. Dit onderzoek toont aan dat de verschillende moleculen in verschillende functionele klassen kunnen worden ingedeeld op basis van hun werkwijze. Door gebruik te maken van de oligomere cryo-EM structuur van CHIKV nsP1 wordt voorspeld dat de CHVB en MADTP compounds aan het katalytische centrum van het nsP1 capping domein binden, terwijl FHNA compounds voorspeld worden te binden aan een secundaire binding 'pocket' in de domeinen die betrokken zijn bij membraanbinding en oligomerizatie. Deze resultaten bieden de basis voor verder onderzoek naar de exacte binding die plaatsvindt en de manier waarop deze moleculen de CHIKV replicatie in geïnfecteerde cellen remmen. Tot slot plaatst **hoofdstuk 7** de resultaten van deze verschillende studies in de context van de gepubliceerde literatuur en bediscussieert daarbij de meest recente ontwikkelingen in het veld, alsook een aantal onverwachte bevindingen die gedaan zijn bij het onderzoek uitgevoerd gedurende dit promotietraject.

Samenvattend beschrijft dit proefschrift de potentie om een combinatietherapie te ontwikkelen om infecties met CHIKV te voorkomen en te behandelen, waarbij kleine moleculen die verschillende virale doelwitten hebben worden gecombineerd. Aangezien het snelle ontstaan van resistentie de ontwikkeling van effectieve antivirale therapieën kan bemoeilijken, zou een dergelijke combinatietherapie bovendien een extra barrière kunnen vormen voor dit soort complicaties. Arbovirussen als CHIKV zullen vanwege hun onvoorspelbare epidemiologie in de toekomst blijven opleven, wat de noodzaak voor de ontwikkeling van antivirale behandelingen naast effectieve vaccins onderstreept.