

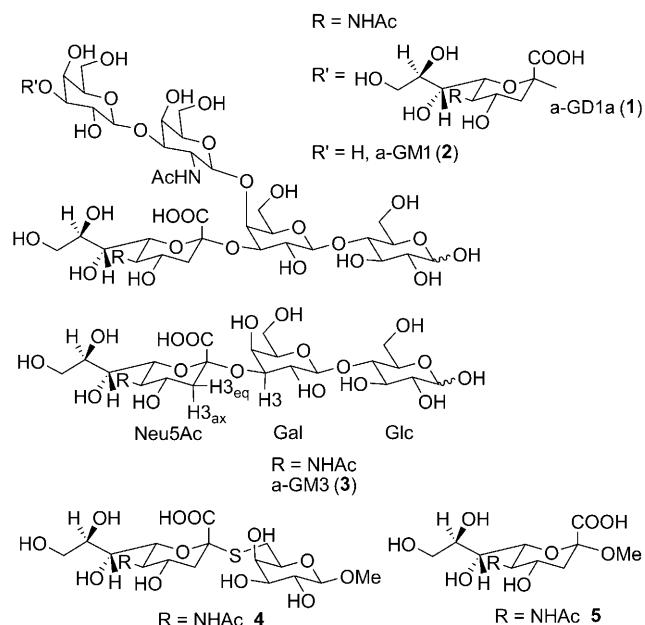
Rhesus-Rotaviren erkennen Glykane des GM3-Gangliosids**

Thomas Haselhorst, Timm Fiebig, Jeffrey C. Dyason, Fiona E. Fleming, Helen Blanchard, Barbara S. Coulson und Mark von Itzstein*

Rotaviren sind die Ursache schwerer Magen- und Darmentzündungen, sowohl bei Menschen als auch bei Tieren. Mit weltweit mehr als 650 000 Todesfällen pro Jahr stellen Kinder die größte Risikogruppe dar.^[1] Für die Entwicklung neuer Impfstoffe sowie Arzneimittel mit Breitbandwirkung ist es unerlässlich, Informationen über die Wechselwirkung der Viren mit den Glykanen auf der Oberfläche der Wirtzelle zu erhalten. Vor diesem Hintergrund haben wir kürzlich die erste NMR-basierte Strukturanalyse zur Wechselwirkung und Glykankartierung von GD1a- (**1**) und GM1-Gangliosiden (**2**) mit dem rotaviralen Oberflächenlektin VP8* beschrieben, das rekombinant aus zwei unterschiedlichen Rotavirusstämmen produziert wurde.^[2]

Wir konnten eindeutig zeigen, dass die Sialinsäure- und Galactoseeinheiten am nichtreduzierenden Ende der Glykanstruktur essenziell für die Zellerkennung der Rotaviren sind. Hier versuchen wir, unsere bisherige Arbeit zur Kartierung von Rotavirus-Glykan-Wechselwirkungen und zur allgemeinen Glykobiologie von Rotaviren zu komplettieren.^[3–5] Wir berichten über die Wechselwirkung intakter, infektiöser Rotaviruspartikel mit einem weiteren, (gleichermaßen) wichtigen Rotavirusrezeptor, dem GM3-Gangliosid. Weiterhin beabsichtigen wir die Fragen zu beantworten, ob eine höhere Proteinvalenz (mehrere VP8*-Kopien) sowie eine Aktivierung mit Trypsin einen Einfluss auf die Virus-Glykan-Erkennung haben.^[6,7] Ferner beschreiben wir Sättigungtransfer-Differenz(STD)-NMR-Experimente, die gemeinsam mit zellbasierten Experimenten neue strukturelle und funktionelle Erkenntnisse über die Erkennung der Glykanstruktur des GM3-Gangliosids (**3**, a-GM3, Neu5Ac_(2,3)Galβ(1,4)Glc) durch Rhesus-Rotaviruspartikel liefern.

Die STD-NMR-Spektroskopie^[8,9] ist eine sehr effiziente Methode zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen



Viren und ihren Liganden, da die starke Linienverbreiterung der Viruspartikel eine Sättigung ermöglicht, ohne die NMR-Signale des Liganden zu beeinflussen. Bis jetzt wurden nur wenige STD-NMR-spektroskopische Studien mit intakten Viruspartikeln veröffentlicht. Interessante Beispiele sind NMR-Studien vom humanen Schnupfenvirus,^[10] virusähnlichen Partikeln, die das H5-Hämagglytinin der Vogelgrippeviren enthalten,^[11] sowie von virusähnlichen Partikeln der hämorrhagischen Krankheit der Kaninchen.^[12] Ein besonderer Vorteil der Verwendung von intakten Viruspartikeln für Bindungsstudien liegt darin, dass der Einfluss der äußeren Virushülle bei der Zellerkennung nicht vernachlässigt wird. Daher stellt diese Methode eine aus biologischer Sicht attraktive Alternative dar, um Virus-Wirtzell-Wechselwirkungen zu analysieren.

Abbildung 1 a und b zeigen das ¹H-NMR-Spektrum von a-GM3 (**3**) sowie das entsprechende STD-NMR-Spektrum von **3** im Komplex mit Rotaviren, die nicht mit Trypsin behandelt worden sind. Das STD-NMR-Spektrum von **3** in Komplex mit trypsinaktivierten Rotaviren ist in Abbildung 1 c dargestellt. Eine genaue Betrachtung dieser Spektren zeigt, dass die Rotaviruspartikel die Verbindung **3** binden. Starke STD-NMR-Signale der *N*-Acetylgruppe (NHAc, $\delta = 1.95$ ppm) können sowohl für Komplexe mit trypsinbehandelten als auch für solche mit nichtaktivierten Viren beobachtet werden. Zusätzlich sind STD-NMR-Signale für die axialen ($H_{3\text{ax}}$) und äquatoriale Protonen ($H_{3\text{eq}}$) der Sialinsäure zu erkennen.

[*] Dr. T. Haselhorst, T. Fiebig, J. C. Dyason, Prof. H. Blanchard, Prof. M. von Itzstein

Institute for Glycomics, Gold Coast Campus
Griffith University, Queensland, 4222 (Australien)

Fax: (+61) 7-555-28098
E-Mail: m.vonitzstein@griffith.edu.au

F. E. Fleming, Prof. B. S. Coulson
Department of Microbiology and Immunology
The University of Melbourne

Royal Parade, Parkville, Victoria 3010 (Australien)

[**] M.V.I., H.B., T.H. und B.S.C. danken dem Australian Research Council und dem National Health and Medical Research Council für finanzielle Unterstützung. B.S.C. dankt dem National Health and Medical Research Council of Australia überdies für ein Senior Research Fellowship.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201004116> zu finden.

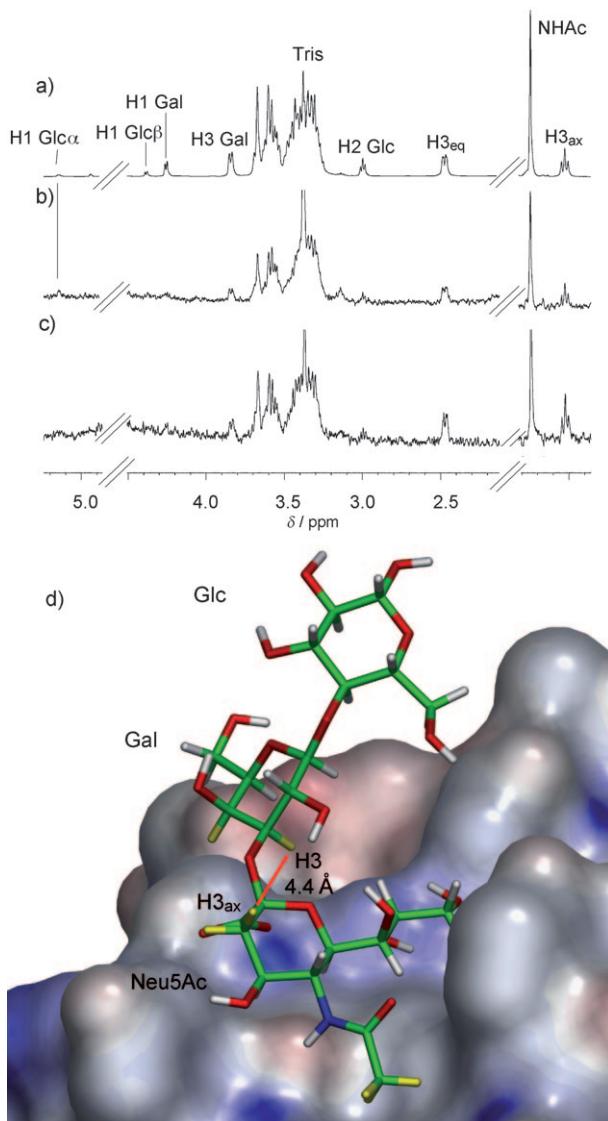


Abbildung 1. a) ^1H -NMR-Spektrum des a-GM3-Gangliosids (3), b) STD-NMR-Spektrum von 3 im Komplex mit RRV-Partikeln und c) STD-NMR-Spektrum von 3 im Komplex mit RRV-Partikeln, die vorher mit Trypsin behandelt wurden. Alle NMR-Spektren wurden bei einer Feldstärke von 600 MHz und einer Temperatur von 288 K aufgenommen. Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan. d) Verbindung 3 (Stabmodell) in der Bindungstasche des RRV-VP8*-Proteins in einer Konformation, bei welcher der Abstand zwischen dem H3-Proton der Galactoseeinheit und H3 $_{ax}$ der Sialinsäure 4.4 Å beträgt.

Ein detaillierter Vergleich der STD-NMR-Spektren aus Abbildung 1b und c zeigt, dass die Trypsinaktivierung der Viruspartikel das Bindungsepitop von 3 nicht verändert. Diese wichtige Beobachtung ist ein klarer Hinweis darauf, dass eine Aktivierung der RRV-Partikel mit Trypsin für die Liganzenbindung (Adhäsion) nicht essenziell ist, und stützt daher die Hypothese, dass eine Virusaktivierung durch Proteasen eine große Rolle beim Zelleintritt der Rotaviren spielt. Interessanterweise konnte auch ein STD-NMR-Signal von mittlerer Stärke für das H3-Proton der Galactoseeinheit ($\delta = 3.85$ ppm) detektiert werden. Diese Beobachtung bestätigt

die Ergebnisse unserer kürzlich veröffentlichten Studie, bei der komplexere Glykanstrukturen verwendet wurden,^[2] ist jedoch nicht mit der Annahme vereinbar, dass die Aglykonseinheit keine Rolle bei der Bindung von sialinsäurehaltigen Glykanen an das RRV-VP8*-Protein spielt.^[13]

In einer anderen Studie berichteten wir, dass die Sialinsäureeinheit des verwandten Thiasialosids 4 (Neu5Aca(2,6)-S-Gal β 1Me) im Komplex mit rekombinantem RRV-VP8*-Protein hauptsächlich an der Bindung beteiligt ist, wobei die Galactoseeinheit von 4 überwiegend dem Lösungsmittel zugewandt ist.^[3] Die unterschiedlichen Wechselwirkungen der Galactoseeinheiten von 3 und 4 können damit erklärt werden, dass das Glykan 4 α (2,6)-glykosidisch verknüpft ist, während das Glykan 3 eine α (2,3)-glykosidische Bindung aufweist. Der zusätzlich vorhandene ω -Torsionswinkel der α (2,6)-glykosidischen Bindung trägt außerdem zur größeren Flexibilität des Glykans bei. Diese ist verantwortlich für die Bildung eines Bindungsepitops, in dem das Protein stark mit der Sialinsäure wechselwirken kann, aber nur spärlich mit der Galactoseeinheit.^[3]

Verglichen mit dem rekombinant hergestellten VP8*-Protein mit einem Molekulargewicht von nur etwa 18 kDa stellt das ca. 100 nm große Viruspartikel (ca. 74 MDa) ein supramolekulares Konstrukt beträchtlicher Größe dar. Der Einfluss dieses Größenunterschieds auf den Sättigungstransfer sollte nicht außer Acht gelassen werden, da die Korrelationszeit größerer Viruspartikel automatisch in effizienterer Spindiffusion und folglich auch in einem stärkeren Sättigungstransfer resultiert. Um Aussagen über die Konformation von 3 im gebundenen Zustand zu treffen, wurden zusätzlich NOE- und trNOE-NMR-Spektren aufgenommen. Die Effizienz dieser Vorgehensweise wurde bereits für das humane Schnupfenvirus HRV2 beschrieben.^[10] Wir haben die biologisch aktive Konformation des Sia-Gal-Fragments von 3 sowohl im Komplex mit Rotaviren als auch mit rekombinantem VP8*-Protein bestimmt (siehe die Hintergrundinformationen). Die Verbindung 3 wurde zusätzlich mithilfe von Molekülberechnungen in die Struktur des VP8-Proteins^[5] eingepasst (siehe die Hintergrundinformationen).^[2] Diese Rechnungen zeigen eindeutig, dass sich sowohl die H3-Protonen (H3 $_{ax}$ und H3 $_{eq}$) und die Methylprotonen der N-Acetylgruppe an C5 der Sialinsäure als auch das H3-Proton der Galactoseeinheit in unmittelbarer Nähe zum Protein befinden müssen. Diese Beobachtung stimmt sehr gut mit der STD-NMR-Analyse überein.

Wir konnten kürzlich zeigen, dass verwandte CRW-8-Rotaviren nur GD1a, aber nicht das Gangliosid GM1 erkennen. Aus diesen Ergebnissen haben wir gefolgert, dass die Sialinsäureeinheit am nichtreduzierenden Ende des a-GD1a(1)-Gangliosids für die Bindung der CRW-8-Rotaviren an die Wirtzelle zwingend erforderlich ist. Es lässt sich daher spekulieren, dass die interne Sialinsäureeinheit von 1 in einer zweiten Bindungstasche koordiniert werden muss.^[2] In dieser Arbeit konnten wir zudem zeigen, dass das Bindungsepitop des Sia-Gal-Fragments auf beiden Zuckerstrukturen der Ganglioside 1 und 3 identisch ist. Wir stellen daher folgende Hypothese auf: Das Sia-Gal-Fragment des a-GM3-Gangliosids (3) wechselwirkt ausschließlich mit der Sialinsäure-Bindungstasche der höchsten Affinität^[2] und imitiert damit das

Sia-Gal-Fragment am nichtreduzierenden Ende des a-GD1a-Gangliosids (**1**).

Unter Berücksichtigung dieser und anderer veröffentlichter Daten^[2,3,13,14] schlagen wir weiterhin vor, dass die Liganden mit großer Bindungsaffinität, insbesondere die Ganglioside GM3, GM1 und GD1a, sehr wahrscheinlich multivalente α (2,3)-Sialinsäure-Glykokonjugate sind, obwohl eine Reihe von Sialinsäuren mit unterschiedlichen glykosidischen Verknüpfungen vom VP8*-Protein der Rotaviren erkannt werden. Diese Hypothese stimmt hervorragend mit der Tatsache überein, dass sich hochkomplexe Ganglioside auf der Oberfläche von Darmzellen befinden.^[15] Um die NMR-Daten zu bestätigen, wurden zusätzlich RRV-Infektionstiter^[16] in Gegenwart des Anti-GM3-Antikörpers GMR6^[17] bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass dieser GM3-Antikörper signifikant die Infektion durch Rhesus-Rotaviren mit durchschnittlich $(30 \pm 5)\%$ bei einer Konzentration von $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p < 0.0001$) und $(37 \pm 3)\%$ bei einer Konzentration von $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p < 0.0001$) inhibiert. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass Rotaviren und GMR6-Antikörper simultan um Rezeptoren konkurrieren, die einer GM3-Struktur ähneln (Abbildung 2a). Interessanterweise wurde eben-

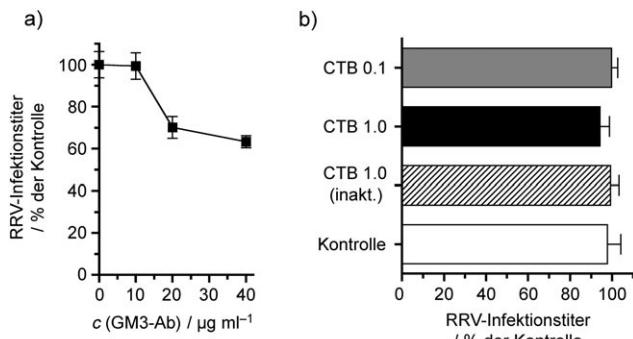


Abbildung 2. a) Inhibition der RRV-Rotavirus-Infektion durch die Zugabe des Anti-GM3-Antikörpers (Ab) GMR6. b) Dieser Antikörper zeigte aber weder Wirkung in Gegenwart des GM1-Liganden noch bei der Zugabe von Choleratoxin B (CTB). Als weitere Negativkontrolle wurde der Infektionstiter auch in Gegenwart von $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ hitzeinaktiviertem CTB bestimmt (CTB 1.0 (inakt.)). Fehlerbalken veranschaulichen die Standardabweichung.

falls gefunden, dass das Choleratoxin B (CTB) bei einer Konzentration von 0.1 oder $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($0.3 < p < 0.5$; Abbildung 2b) die Zellinfektion durch Rhesus-Rotaviren nicht signifikant inhibiert. Daraus folgt, dass Rhesus-Rotaviren keine GM1-ähnlichen Rezeptoren zur Zellbindung und -invasion benötigen. Auch dieses Resultat ist in sehr guter Übereinstimmung mit unserer kürzlich veröffentlichten Studie, die gezeigt hat, dass verwandte CRW-8 Rotaviren eine Sialinsäureeinheit an dem nichtreduzierenden Ende des GD1a-Gangliosids für eine effektive Infektion und Zellinvasion benötigen.^[2]

Um den Einfluss der Galactoseeinheit von **3** zu untersuchen, wurde das Bindungsepitop von Methyl- α -D-N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac α 2Me, **5**) im Komplex mit RRV-Partikeln untersucht. Abbildung 3a zeigt das ^1H -NMR-Spektrum von **5** im Komplex mit Viruspartikeln, die zuvor mit

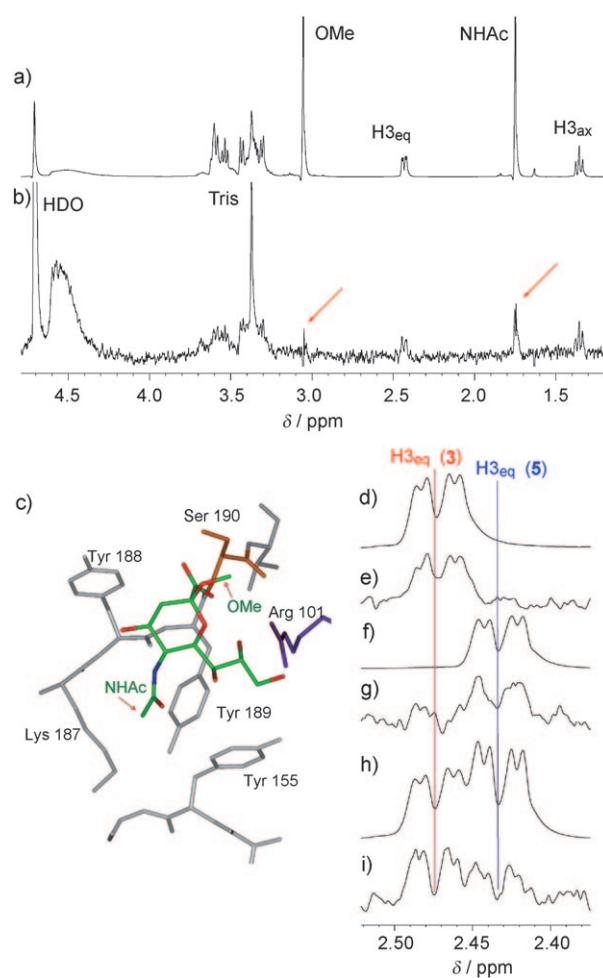


Abbildung 3. a) ^1H -NMR- und b) STD-NMR-Spektrum von **5** im Komplex mit trypsinbehandelten RRV-Partikel bei einer Feldstärke von 600 MHz und einer Temperatur von 288 K . c) Die Röntgen-Strukturanalyse von **5**, komplexiert mit RRV-VP8*-Protein, zeigt den Einfluss der Methylprotonen der N-Acetamidgruppe sowie die dem Lösungsmittel zugewandte Methylgruppe des Aglykonrests. d-i) Ausschnitte von ^1H -NMR- und STD-NMR-Spektren im Bereich der chemischen Verschiebung der $\text{H}_{3\text{eq}}$ -Protonen: trypsinaktivierter RRV-Partikel komplexiert mit **3** (d und e), **5** (f und g) und einer 0.8:1.0-Mischung von **3** und **5** (h und i).

Trypsin behandelt wurden, das entsprechende STD-NMR-Spektrum ist in Abbildung 3b zu sehen. Interessanterweise zeigen die Spektren, dass das Bindungsepitop von **5** dem Epitop ähnelt, das für einen Komplex von RRV-VP8* mit **5** bestimmt wurde.^[3] Das stärkste Signal für beide Komplexe konnte für die Methylprotonen der N-Acetylgruppe (NHAc , $\delta = 1.85 \text{ ppm}$) beobachtet werden. Die Signale der Methylprotonen am Aglykon (OMe , $\delta = 3.15 \text{ ppm}$) weisen dagegen nur eine schwache Intensität auf, was auf eine geringe Beteiligung an der Bindung zum Protein schließen lässt. Die Ergebnisse zeigen, dass intakte Rhesus-Rotaviruspartikel und rekombinant hergestelltes RRV-VP8*-Protein die Sialinsäure **5** in einer identischen Art und Weise binden. Diese wichtige Erkenntnis stützt die Theorie, dass der erste Kontakt zwischen Virus und Wirtzelle durch eine Wechselwirkung von VP8* und Sialinsäure stattfinden muss. Eine Reihe von

Röntgen-Strukturanalysen für **5** im Komplex mit RRV-VP8*-Protein ist bereits veröffentlicht worden.^[5,18] Abbildung 3c zeigt das Ergebnis einer dieser Studien.^[5] Starke hydrophobe Wechselwirkungen der N-Acetylgruppe mit Tyr189 sind zu erkennen, die zu starken STD-NMR-Effekten führen können. Die Struktur zeigt weiterhin eindeutig, dass die Methylprotonen des Aglykonrests von **5** komplett dem Lösungsmittel zugewandt sind und keinen direkten Kontakt mit dem Protein aufweisen. Dies liefert eine direkte Erklärung dafür, dass keine STD-NMR-Signale für diese Protonengruppe zu detektieren waren.

Wir haben auch STD-NMR-Verdrängungsexperimente durchgeführt, in denen **3** zu einem Komplex aus trypsinaktiviertem RRV und **5** gegeben wurde. ¹H- und STD-NMR-Spektren wurden aufgenommen (Abbildung 3h bzw. 3i). Das STD-NMR-Spektrum des RRV-**3**-**5**-Komplexes (Abbildung 3i) weist darauf hin, dass **3** das Monosaccharid **5** nicht komplett aus der Bindungstasche der RRV-Partikel verdrängen kann. Diese geringfügige Verdrängung kann mit der zusätzlichen Galactoseeinheit von **3** erklärt werden, die einen Einfluss auf die Bindung mit der Sialinsäure-Bindungstasche haben muss. Zum Vergleich sind auch die ¹H- und STD-NMR-Spektren des RRV-**3**-Komplexes dargestellt (Abbildung 3f und g). Die oben beschriebene Interpretation der Daten ist in sehr guter Übereinstimmung mit einer bereits veröffentlichten Studie,^[13] in der mit NMR-spektroskopischen Methoden K_d -Werte bestimmt wurden. Dort konnte eindeutig gezeigt werden, dass Verbindung **3** mit einer größeren Affinität bindet als Verbindung **5**.

Zusammenfassend kann noch gesagt werden, dass neben der Sialinsäureeinheit von **3**, die maßgeblich an der Bindung des Gangliosids beteiligt ist, auch die Galactoseeinheit zu einem gewissen Anteil zur Proteinwechselwirkung beiträgt. Erwartungsgemäß ist die Glucoseeinheit am reduzierenden Ende des Gangliosids **3** an keinerlei Wechselwirkungen mit dem Protein beteiligt. NOE/trNOE-NMR-Spektren, die aufgenommen wurden, um die biologisch aktive Konformation des Sia-Gal-Fragments von **3** zu bestimmen, zeigen in Verbindung mit Molekülberechnungen, dass die gebundene Konformation nicht diejenige ist, die hauptsächlich in Lösung vorliegt. Basierend auf den STD-NMR-Ergebnissen stellen wir die Hypothese auf, dass das Sia-Gal-Fragment des a-GM3-Gangliosids die Sia-Gal-Disaccharid-Einheit am nicht-reduzierenden Ende des GD1a-Gangliosids imitiert, da wir kürzlich zeigen konnten, dass GD1a der Bindungsrezeptor der verwandten CRW-8-Rotaviren ist.^[2] Zusätzlich konnten wir nachweisen, dass mit Trypsin vorbehandelte Viruspartikel die Verbindung **3** komplett identisch binden wie nicht mit Trypsin behandelte Viruspartikel.

Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, dass die Aktivierung der Rotaviruspartikel mit Trypsin nicht essenziell für die Glykanbindung auf der Zelloberfläche ist (Adhäsion). Unsere Daten sprechen daher klar für die allgemein akzeptierte Hypothese, dass ausschließlich der Zelleintritt von Rotaviren und nicht die Zelladhäsion durch Trypsin aktiviert wird.^[6,7,19]

STD-NMR-Studien an **5** im Komplex mit intakten Rhesus-Rotaviruspartikeln lieferten außerdem Hinweise darauf, dass das Bindungsepitop für **5** in diesem Komplex identisch ist mit demjenigen an rekombinant exprimiertem VP8*-Protein.^[3] Dieses Ergebnis kann als direkter Beweis dafür angesehen werden, dass der anfängliche Kontakt zwischen einem Rotaviruspartikel und der Wirtzelle im Wesentlichen auf einer Bindung von Sialinsäuren an das virale VP8*-Protein beruht.

Eingegangen am 6. Juli 2010,
veränderte Fassung am 22. September 2010
Online veröffentlicht am 14. Januar 2011

Stichwörter: Ganglioside · Rotaviren · Sialinsäure · STD-NMR-Spektroskopie

- [1] P. Isa, C. F. Arias, S. Lopez, *Glycoconjugate J.* **2006**, *23*, 27.
- [2] T. Haselhorst, F. E. Fleming, J. C. Dyason, R. D. Hartnell, X. Yu, G. Holloway, K. Santegoets, M. J. Kiefel, H. Blanchard, B. S. Coulson, M. von Itzstein, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 91.
- [3] T. Haselhorst, H. Blanchard, M. Frank, M. J. Kraschnefski, M. J. Kiefel, A. J. Szczyzew, J. C. Dyason, F. E. Fleming, G. Holloway, B. S. Coulson, M. von Itzstein, *Glycobiology* **2007**, *17*, 68.
- [4] H. Blanchard, X. Yu, B. S. Coulson, M. von Itzstein, *J. Mol. Biol.* **2007**, *367*, 1215.
- [5] M. J. Kraschnefski, A. Bugarcic, F. E. Fleming, X. Yu, M. von Itzstein, B. S. Coulson, H. Blanchard, *Glycobiology* **2009**, *19*, 194.
- [6] K. L. Graham, P. Halasz, Y. Tan, M. J. Hewish, Y. Takada, E. R. Mackow, M. K. Robinson, B. S. Coulson, *J. Virol.* **2003**, *77*, 9969.
- [7] L. Fiore, H. B. Greenberg, E. R. Mackow, *Virology* **1991**, *181*, 553.
- [8] M. Mayer, B. Meyer, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1902; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1784.
- [9] Siehe die Hintergrundinformationen und T. Haselhorst, A. C. Lamerz, M. von Itzstein, *Methods Mol. Biol.* **2009**, *534*, 1.
- [10] A. J. Benie, R. Moser, E. Baeuml, D. Blaas, T. Peters, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14.
- [11] T. Haselhorst, J. M. Garcia, T. Islam, J. C. Lai, F. J. Rose, J. M. Nicholls, J. S. M. Peiris, M. von Itzstein, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1936; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1910.
- [12] C. Rademacher, N. R. Krishna, M. Palcic, F. Parra, T. Peters, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3669.
- [13] P. R. Dormitzer, Z.-Y. J. Sun, O. Blixt, J. C. Paulson, G. Wagner, S. C. Harrison, *J. Virol.* **2002**, *76*, 10512.
- [14] M. J. Kiefel, B. Beisner, S. Bennett, I. D. Holmes, M. von Itzstein, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1314.
- [15] K. Schnabl, L. C. Field, M. T. Clandinin, *Br. J. Nutr.* **2009**, *101*, 694.
- [16] Siehe die Hintergrundinformationen und M. J. Hewish, Y. Takada, B. S. Coulson, *J. Virol.* **2000**, *74*, 228.
- [17] M. Sorice, I. Parolini, T. Sansolini, T. Garofalo, V. Dolo, M. Sargiacomo, T. Tai, C. Peschle, M. R. Torrisi, A. Pavan, *J. Lipid Res.* **1997**, *38*, 969.
- [18] P. R. Dormitzer, Z.-Y. J. Sun, G. Wagner, S. C. Harrison, *EMBO J.* **2002**, *21*, 885.
- [19] P. R. Dormitzer, E. B. Nason, B. V. Prasad, S. C. Harrison, *Nature* **2004**, *430*, 1053.