

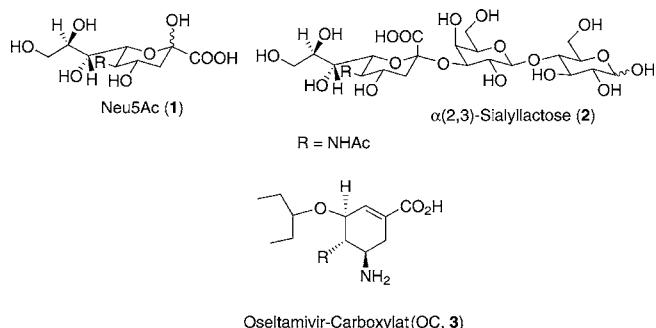
Influenzavirus-Neuraminidase und eine sekundäre Sialinsäure-Bindungsstelle – Fakt oder Fiktion?**

Jimmy C. C. Lai, Jean-Michel Garcia, Jeffrey C. Dyason, Raphael Böhm, Paul D. Madge, Faith J. Rose, John M. Nicholls, J. S. Malik Peiris, Thomas Haselhorst* und Mark von Itzstein*

Wir haben 2008 eine fortgeschrittene NMR-spektroskopische Methode vorgestellt, die die Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Zuckermolekülen wie *N*-Acetylneuraminsäure aus α (2,3)-Sialyllactose mit Hämagglyutinin-haltigen Influenzavirus-ähnlichen Partikeln (HA-IVP) ermöglicht.^[1] Der Gebrauch von virusähnlichen Partikeln hat den Vorteil, dass die beiden Oberflächenglycoproteine des Influenzavirus unabhängig voneinander in nahezu natürlicher Umgebung analysiert werden können. Zudem sind virusähnliche Partikel nicht infektiös und müssen daher auch nicht in biologischen Sicherheitslabors gehandhabt werden. Wir und andere konnten zeigen, dass Sättigungstransfer-Differenz(STD)-NMR-Spektroskopie^[2,3] eine ideale Methode ist, um die Wechselwirkung zwischen Viren und ihren Liganden zu analysieren. Die starke Linienverbreiterung der Viruspartikel ermöglicht eine Sättigung, ohne die NMR-Signale des Liganden zu beeinflussen.

In der hier vorgestellten Arbeit haben wir eine umfassende STD-NMR-spektroskopische Studie mit Influenzavirus-ähnlichen Neuraminidase(Sialidase)-Partikeln (NA-IVPs) durchgeführt, um die sekundäre (Sialolectin-)Bindungsstelle für *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac, **1**) im Zusammenhang mit der Neuraminidase des pandemischen Influenzavirus des Jahres 2009 (Schweinegrippe) zu erforschen. Weiterhin nutzen wir die Gelegenheit, im Rahmen dieser Studie die Biologie der Neuraminidasen vom früheren humanen saisonalen H1N1- und dem aviaren H5N1-Virus-

stamm zu vergleichen. Die biologische Bedeutung der mit der Influenzavirus-Neuraminidase verbundenen sekundären Lectin-Bindungsstelle konnte bis heute nicht vollständig geklärt werden. Es wurde unter anderem postuliert, dass diese sekundäre Bindungsstelle die katalytische Aktivität der Neuraminidase verstärken könnte.^[4]



Oseltamivir-Carboxylat(OC, **3**)

Eine Analyse der Aminosäuresequenzen hat ergeben, dass sich die Neuraminidase der meisten humanen H2N2-Viren, die während der Influenzavirus-Pandemie 1957 isoliert wurden, infolge von Aminosäure-Austauschprozessen innerhalb der „Lectin“-Hämadsorptions-Bindungsstelle deutlich vom vermeintlichen Vogelvorläufer unterscheidet.^[4] Die Röntgenkristallstruktur des Komplexes der Neuraminidase N9 des A/tern/Australia/G70C/75-Influenzavirus mit **1** (PDB-Code: 1MWE)^[5] hat gezeigt, dass die sekundäre Bindungsstelle aus einem konservierten Aminosäuremotiv besteht. Dieses Motiv, das in allen Vogelvirusstammen hochkonserviert zu sein scheint, besteht aus drei Serinen und einem Tryptophan.^[5] Schweinegrippevirusstämme haben einige dieser konservierten Aminosäuren verloren und damit auch theoretisch die Fähigkeit, **1** oder ein α -verknüpftes Konjugat innerhalb der vermeintlichen sekundären Bindungsstelle zu binden.^[5] Im Widerspruch dazu wurde kürzlich in einer Brownsche-Molekülbewegungs-Simulation^[6] von aviarem N1, humanem pandemischem N2 (1957) und N1 (2009) nachgewiesen, dass die sekundäre Sialinsäure-Bindungsstelle in Neuraminidasen von Schweinevirusstammen wie zuvor gezeigt *nicht* konserviert ist, dass aber gewisse wichtige Struktureigenschaften der sekundären Sialinsäure-Bindungsstelle bewahrt worden sind. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit ein 16-fach niedrigerer k_{on} -Wert für die Bindung der α -Form von **1** an die sekundäre Sialinsäure-Bindungsstelle des aktuellen Stammes der humanen Schweinegrippe-Pandemie als an die sekundäre Bindungsstelle einer aviaren Neuraminidase berechnet.

[*] J. C. C. Lai,^[†] Dr. J.-M. Garcia^[‡]

Hong Kong University-Pasteur Research Centre, SAR (China)

Prof. J. S. M. Peiris

Centre of Influenza Research, School of Public Health; HKU-Pasteur Research Centre, The University of Hong Kong SAR (China)

Dr. J. M. Nicholls

Department of Pathology, The University of Hong Kong SAR (China)

J. C. Dyason, R. Böhm, P. D. Madge, F. J. Rose, Dr. T. Haselhorst, Prof. M. von Itzstein

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

E-Mail: t.haselhorst@griffith.edu.au

m.vonitzstein@griffith.edu.au

Homepage: <http://www.griffith.edu.au/glycomics>

[†] Diese Autoren trugen zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit bei.

[‡‡] Wir danken dem Australian Research Council, dem National Health and Medical Research Council und dem Research Grants Council, Hong Kong (GRF774109 and AoE/M-12/06) für finanzielle Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (Details zu den Experimenten) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201108245> zu finden.

Unseres Wissens gibt es bisher keinen direkten experimentellen Beleg für das Vorhandensein einer sekundären Sialinsäure-Bindungsstelle im pandemischen Influenzavirus des Jahres 2009. Um diese Lücke zu schließen, haben wir Influenza-Neuraminidase tragende, virusähnliche Partikel vom hoch pathogenen aviaren H5N1- (A/Cambodia/JP52a/2005, av-N1), dem saisonalen humanen H1N1- (A/Gansu/Chenguan/1129/2007, seas-N1) und dem vom Schwein stammenden pandemischen H1N1-Influenzavirus (A/California/04/2009, pdm-N1) in einer Reihe von STD-NMR-Titrationsexperimenten miteinander verglichen.

Unsere Daten zeigen eine signifikante Restbindung von $\alpha(2,3)$ -Sialyllactose (**2**), nachdem das aktive Zentrum von aviaren N1-IVPs durch Oseltamivir-Carboxylat (OC, **3**) blockiert wurde. Dieser Befund belegt eindeutig, dass **2** spezifisch an eine sekundäre Bindungsstelle bindet, die unabhängig vom aktiven Zentrum existiert. Noch wichtiger ist die Beobachtung, dass verbleibende STD-NMR-Effekte für $\alpha(2,3)$ -Sialyllactose (**2**) in Gegenwart von hohen OC-Konzentrationen auch für pdm-N1 und seas-N1 detektiert werden können, wenn auch mit eindeutig verringriger Intensität. Unsere Befunde zeigen weiterhin, dass OC (**3**) **2** nicht nur aus dem aktiven Zentrum von av-N1 verdrängen kann, sondern auch aus der sekundären Sialolectin-Bindungsstelle. Dieser Effekt wurde weder für seas-N1 noch für pdm-N1 beobachtet. Unsere Studien liefern damit nicht nur den ersten strukturellen Beleg in wässriger Lösung, dass eine sekundäre Sialinsäure-Bindungsstelle in aviärer Influenzavirus-Neuraminidase vorhanden ist, sondern zeigen auch, dass es diese Bindungsstelle ebenfalls im pandemischen H1N1-Stamm (2009) und dem früheren saisonalen H1N1-Influenzavirus-Stamm gibt.

Für die Untersuchung der Bindung von $\alpha(2,3)$ -Sialyllactose (**2**) an die sekundäre Bindungsstelle von av-N1-IVPs wurden STD-NMR-Effekte von **2** bei niedrigen Temperaturen (279 K) und bei pH 8.4 gemessen, um eine Hydrolyse der Sialinsäure während der Akquisition zu verhindern (siehe auch Hintergrundinformationen). **3** wurde zum Komplex av-N1:**2** gegeben, und STD-NMR-Spektren wurden aufgenommen. Abbildung 1 zeigt die absoluten STD-NMR-Signale der Methylprotonen der *N*-Acetamidogruppe von **2** bei steigenden Konzentrationen von **3**. Auffallend ist, dass die Intensität des STD-NMR-Signals von **2** bei einer **2/3**-Konzentration von 200 nm : 4 nm um 50% abgenommen hat. Dies entspricht genau der minimalen Konzentration von **3** (4 nm), die notwendig ist, um die Enzymaktivität komplett zu inhibieren. Dieser Befund zeigt, dass **3** der vorherrschende Bindungspartner ist und **2** vollständig aus dem aktiven Zentrum des Enzyms verdrängen kann. Dennoch ist die Bindung von **2** bei diesen Konzentrationen von **3** weiterhin deutlich erkennbar, und dies kann nur bedeuten, dass **2** an eine andere Bindungsstelle binden muss.

Dies ist der erste strukturelle Nachweis in wässriger Lösung, dass eine sekundäre Bindungsstelle in aviären H5N1-Virusstämmen vorhanden ist, in hervorragender Übereinstimmung mit einer zuvor veröffentlichten Röntgenkristallstruktur^[5] und einer Molekülsimulationsstudie.^[6] Eine weitere Erhöhung der Konzentration von **3** führt nur noch zu einer geringen Abnahme des STD-NMR-Signals von **2**.

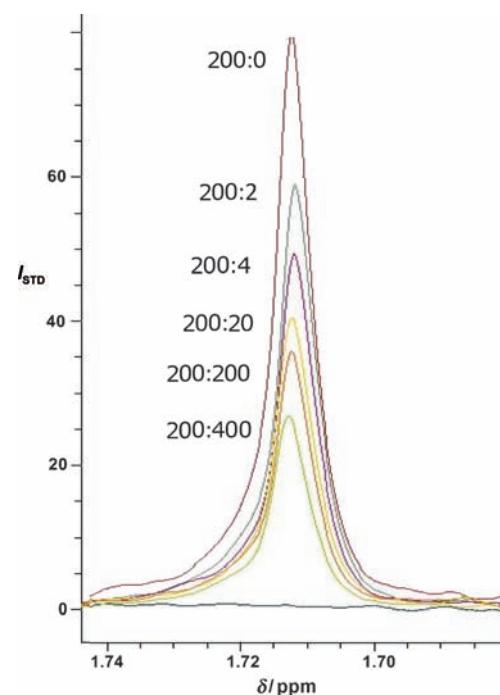


Abbildung 1. Absolute STD-NMR-Signale der Methylprotonen der *N*-Acetamidogruppe von **2** für den (H5)N1:2:3-Komplex. Die Konzentration von **2** wurde bei 200 nm konstant gehalten, während die Konzentration von **3** stufenweise von 0 auf 400 nm erhöht wurde. Die Spektrometerfrequenz für Protonen (^1H) betrug 600.13 MHz und die Temperatur 279 K.

Diese Beobachtung stützt weiter die Annahme, dass das beobachtete STD-NMR-Signal von **2** eine direkte Folge der Wechselwirkung mit der sekundären Bindungsstelle und nicht mit jener des aktiven Zentrums ist. Die genaue biologische Rolle dieser sekundären Bindungsstelle bleibt weiterhin unklar. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass eine Mutation innerhalb der aktiven Sialinsäure-Bindungsstelle von H2N2(A/Singapur/1/57)-Neuraminidase (Ser370Leu) zu einer 30-prozentigen Abnahme der Sialinsäureabspaltung von multivalenteren Sialoglycanen wie Fetuin und humanen Atemwegsmucinen führt.^[4] Die Autoren folgerten, dass das Vorhandensein einer weiteren Sialolectin-Bindungsstelle eine effizientere Sialinsäureabspaltung ermöglicht und damit auch eine erhöhte Virustransmission zur Folge hat. Dieser Effekt konnte nicht für monovalente Sialoglycane wie $\alpha(2,3)$ -Sialyllactose (**2**) beobachtet werden. Interessanterweise wird die Bindung von **2** bei höheren Konzentrationen von **3** (200–400 nm) nicht vollständig aufgehoben (Abbildung 1); lediglich eine geringe Abnahme der STD-NMR-Signalintensität von **2** (50–35%; Abbildung 2a, blauer Graph) konnte bei diesen hohen Konzentrationen beobachtet werden. Dies lässt sich dadurch erklären, dass **3** möglicherweise Bindungsaffinität zur sekundären Sialinsäure-Bindungsstelle aufweist und so **2** daraus teilweise verdrängen kann. Dies stimmt hervorragend mit einer Molekülsimulationsstudie überein,^[6] die darauf schließen lässt, dass **3** von der sekundären Bindungsstelle erkannt wird. Es wurde spekuliert, dass es sich bei dieser unerwarteten Bindung um einen möglichen Wirkstoffresistenz-Mechanismus handelt.^[7] Das Modell spricht

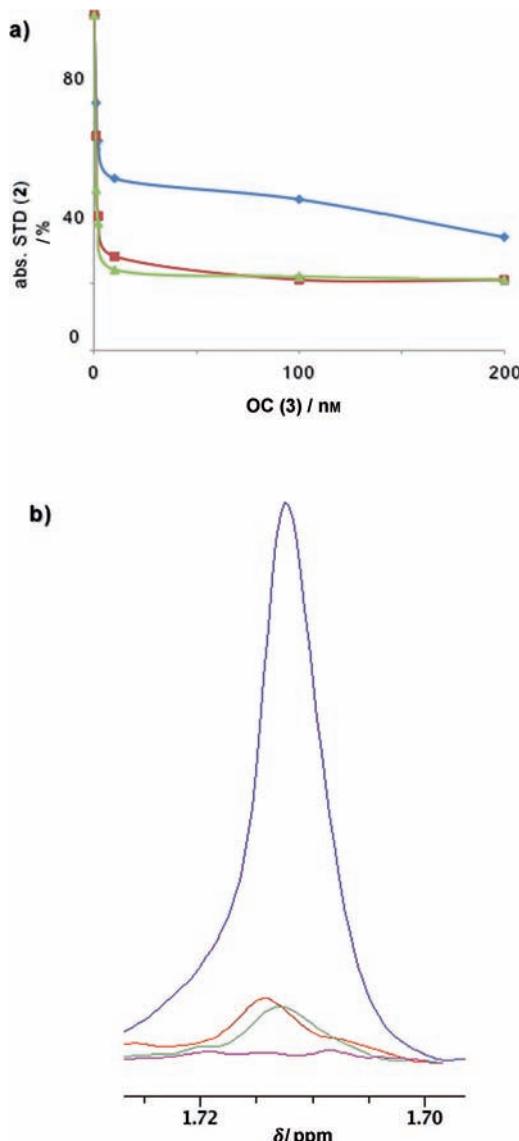


Abbildung 2. a) Die absoluten STD-NMR-Signale der Methylprotonen der *N*-Acetamidogruppe von **2** (in %) sind gegen eine steigende Konzentration von **3** aufgetragen. b) Absolute STD-NMR-Signale der Methylprotonen der *N*-Acetamidogruppe von **2** für aviare (H5)N1- (blau), humane saisonale (H1)N1- (rot) und humane pandemische (H1)N1-IVPs (grün) bei äquimolaren Konzentrationen von **2** und **3** (200 nM). 2 in der Gegenwart von hitzebehandelten (H1)N1-IVPs (5 min bei 70°C) ist in Violett dargestellt.

dafür, dass **3** in N1-Enzymen mit der sekundären Bindungsstelle doppelt so oft einen Komplex bildet wie mit dem aktiven Zentrum. Dieser Komplex wird sich siebenmal sooft bilden wie im Fall humaner N2-Enzyme.^[6]

Im Anschluss an diesen Nachweis einer sekundären Bindungsstelle in aviaren Neuraminidasen wollten wir untersuchen, ob es auch eine sekundäre Bindungsstelle im pandemischen humanen H1N1-Stamm (2009; Schweinegrippe) und im saisonalen humanen H1N1-Influenzavirusstamm gibt. Abbildung 2b zeigt die absoluten STD-NMR-Signale der Methylprotonen der *N*-Acetamidogruppe von α(2,3)-Sialyl-lactose (**2**) von av-N1-, seas-N1- und pdm-N1-IVPs in den

N1:2:3-Komplexen bei äquimolaren Konzentrationen von 200 nM (blau, rot bzw. grün). Dieses Experiment zeigt eindeutig, dass beide humanen Virusstämme (pdm-N1 und seas-N1) **2** sogar bei sehr hohen Konzentrationen von **3** binden können, wenn auch mit signifikant geringerer STD-NMR-Intensität. Um STD-NMR-Artefakte auszuschließen und um sicher zu gehen, dass die übrigbleibende Bindung authentisch ist, wurde ein weiteres STD-NMR-Experiment als Kontrolle durchgeführt. Dazu wurden die N1-IVPs fünf Minuten bei 70°C inkubiert, und nach Zugabe einer äquimolaren Menge an **2** wurde ein STD-NMR-Experiment unter identischen Bedingungen durchgeführt. Das STD-NMR-Signal der *N*-Acetamidogruppe von **2** ist in Abbildung 2b in Violett dargestellt und offenbar absolut keine restliche STD-NMR-Signalintensität für **2** (siehe auch Hintergrundinformationen). Dieses Experiment liefert einen direkten Nachweis, dass die beobachtete Restbindung von **2** an die humanen seas-N1- und die pdm-N1-IVPs bei hohen Anteilen von **3** auf die sekundäre Bindungsstelle zurückzuführen sein muss.

Abbildung 2a enthüllt weiterhin, dass die STD-NMR-Signalintensitäten von **2** im Komplex mit N1 vom humanen saisonalen und pandemischen N1-Enzym bei sehr hohen Konzentrationen von **3** nicht weiter abnehmen (Abbildung 2a, roter bzw. grüner Graph). Dieses steht im Gegensatz zum Befund für die aviare Neuraminidase (Abbildung 2a, blauer Graph). Unsere NMR-spektroskopischen Resultate zeigen eindeutig, dass OC (**3**) **2** aus der sekundären Bindungsstelle in aviaren Influenzavirus-N1-Enzymen verdrängen kann. Allerdings kann dieser Effekt selbst bei sehr hohen Konzentrationen von **3** nicht für den humanen pandemischen Schweinegrippestamm aus dem Jahr 2009 und den saisonalen H1N1-Virusstamm festgestellt werden. Dieser Befund lässt darauf schließen, dass die Affinität der Bindung von **3** an die aviare sekundäre Sialinsäure-Bindungsstelle hoch ist, aber für Influenzavirusstämme, die vom Schwein oder Menschen abstammen, nur gering oder sogar vollständig verloren gegangen ist. Dieses Ergebnis ist hervorragend in Einklang mit dem theoretischen Modell, das einen nahezu 2-fachen Unterschied im k_{on} -Wert zwischen der Bindung von **3** an die sekundäre Sialinsäure-Bindungsstelle und an das aktive Zentrum der Sialidase vorhergesagt hat, während ein fast 7-facher Unterschied für die humanen Influenzavirus-N2-Enzyme ermittelt werden konnte.^[6]

Wir wollten auch die Wechselwirkung von **3** mit der Sialolectin-Bindungsstelle des aviaren N1-Enzyms besser verstehen. Aus diesem Grund führten wir eine Docking-Studie mithilfe des Programms AutoDock Vina (siehe Hintergrundinformationen) durch und positionierten **3** in die sekundäre Sialinsäure-Bindungsstelle der aviaren Neuraminidase (PDB-Code: 2HTY). Die Docking-Studie zeigte, dass **3** eine Orientierung annimmt, die der von Neu5Ac (**1**) in der Röntgenkristallstruktur der Neuraminidase N9 des A/tern/Australia/G70C/75-Influenzavirus (PDB-Code: 1MWE) sehr ähnlich ist.

Wie aus Abbildung 3 ersichtlich, ist die *N*-Acetamido-gruppe von **1** und **3** an starken hydrophoben Wechselwirkungen mit Trp403 beteiligt, während die Carboxygruppe von **1** eine Wasserstoffbrücke mit der konservierten Aminosäure Ser367 eingeht. Auch andere Sialolectine wie das Rotavirus

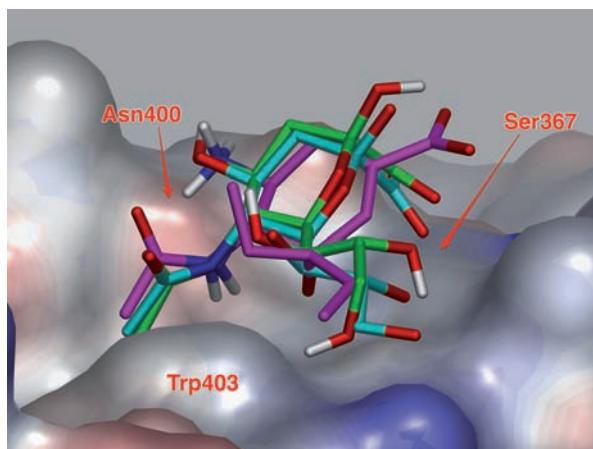


Abbildung 3. Sekundäre Sialinsäure-Bindungsstelle der Vogelgrippe-Influenza-Neuraminidase (H5N1, PDB-Code: 2HTY) im Komplex mit α -konfiguriertem Neu5Ac (**1**) und OC (**3**). Die Proteinoberfläche wurde durch elektrostatische Potentiale eingefärbt. Die Struktur des α -konfigurierten Neu5Ac (**1**) stammt aus der N9-Röntgenkristallstruktur (PDB-Code: 1 MWE); sie wurde mit der 2HTY-Struktur überlagert und ist in türkis eingefärbten Kohlenstoffatomen dargestellt. Zu sehen sind ebenfalls die von AutoDock Vina berechneten Strukturen von α -konfiguriertem Neu5Ac (**1**) und OC (**3**). Die gemäß dem Vina-Docking-Experiment an erster Stelle stehende Hauptorientierung von **1** in der sekundären Sialinsäure-Bindungsstelle von 2HTY (Energie = $-4.6 \text{ kcal mol}^{-1}$) ist durch grün eingefärbte Kohlenstoffatome hervorgehoben, während die energieärmste Orientierung von **3** in der sekundären 2HTY-Sialinsäure-Bindungsstelle in violettblau eingefärbten Kohlenstoffatomen dargestellt ist ($E = -4.4 \text{ kcal mol}^{-1}$).

VP8*^[8] und das Influenzavirus Hämagglutinin^[9] bilden eine Wasserstoffbrücke mit der Carboxygruppe von **1** über Serine, was eine gemeinsame Eigenschaft von Sialinsäure bindenden Lectinen sein könnte. Diese wichtige Wasserstoffbrücke geht im Fall einer Bindung mit OC (**3**) verloren, da die Carboxygruppe von **3** dem Lösungsmittel zugewandt ist. Die Docking-Energien von **1** und **3** sind nur unwesentlich verschieden ($E = -4.6$ bzw. $-4.4 \text{ kcal mol}^{-1}$). Dies kann damit begründet werden, dass **3** eine weitere Wasserstoffbrücke zwischen der Aminogruppe an C4 und Asp400 bildet, die den Verlust der Wasserstoffbrücke zwischen dem konservierten Ser367 und der Carboxygruppe von **1** ausgleicht. Ein Docking-Kontrollexperiment, das **1** in die Sialolectin-Bindungsstelle positioniert, wurde ebenfalls durchgeführt, und es konnte gezeigt werden, dass AutoDock Vina fähig ist, die Röntgenkristallstruktur von **1** genau zu reproduzieren.

Wir haben damit den direkten experimentellen Nachweis erbracht, dass aviare, saisonale humane und pandemische humane Influenzavirus-N1-Neuraminidasen (2009) eine unabhängige sekundäre Sialinsäure-Bindungsstelle (Sialolectin-Bindungsstelle) aufweisen, die $\alpha(2,3)$ -Sialyllectose (**2**) bindet. Die Bindung an die aviare N1 ist dabei sehr viel stärker als die an die beiden anderen Neuraminidasen. Diese sekundäre Bindungsstelle ist für das pandemische humane N1-Influenzavirus vorhergesagt worden,^[6] da einige wichtige Eigenchaften der sekundären Sialinsäure-Bindungsstelle in der Tat beibehalten sind. Weiterhin haben wir gezeigt, dass Oseltamivir-Carboxylat (**3**) und Neu5Ac (**1**) an die Sialolectin-Bindungsstelle der aviaren N1-Neuraminidase in einer insgesamt ähnlichen Orientierung binden. Die hier präsentierten Daten lassen vermuten, dass die sekundäre Bindungsstelle im aviaren Influenzavirus-N1-Enzym eine höhere Affinität für $\alpha(2,3)$ -Sialyllectose (**2**) aufweist als diejenige in den humanen Influenzavirus-N1-Neuraminidasen. Dies könnte darauf schließen lassen, dass die sekundäre Bindungsstelle zur Virulenz beiträgt.

Eingegangen am 23. November 2011
Online veröffentlicht am 26. Januar 2012

Stichwörter: Neuraminidasen · NMR-Spektroskopie · Influenza · Sialinsäuren · Viren

- [1] T. Haselhorst, J. M. Garcia, T. Islam, J. C. Lai, J. F. Rose, J. M. Nicholls, J. S. M. Peiris, M. von Itzstein, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1936; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1910.
- [2] A. J. Benie, R. Moser, E. Bäuml, D. Blaas, T. Peters, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14.
- [3] T. Haselhorst, T. Fiebig, J. C. Dyason, F. E. Fleming, H. Blanchard, B. S. Coulson, M. von Itzstein, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1087; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1055.
- [4] J. Uhlendorff, T. Matrosovich, H.-D. Klenk, M. Matrosovich, *Arch. Virol.* **2009**, *154*, 945.
- [5] J. N. Varghese, P. M. Colman, A. van Donkelaar, T. J. Blick, A. Sahasrabudhe, J. L. McKimm-Breschkin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 11808.
- [6] J. C. Sung, A. W. van Wynsberghe, R. E. Amaro, W. W. Li, J. A. McCammon, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2883.
- [7] M. R. Landon, R. E. Amaro, R. Baron, C. H. Ngan, D. Ozonoff, J. A. McCammon, S. Vajda, *Chem. Biol. Drug Des.* **2008**, *71*, 106.
- [8] P. R. Dormitzer, Z.-Y. J. Sun, G. Wagner, S. C. Harrison, *EMBO J.* **2002**, *21*, 885.
- [9] J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 531.