

Norovirus Inhibition durch Humane Milch-Oligosaccharide

Stefan Weichert¹, Anna Koromyslova^{2,3}, Vasily Morozov^{1,2}, Satoko Hansman^{1,2}, Stefan Jennewein⁴, Horst Schrotten¹, Grant S. Hansman^{2,3}

¹Pädiatrische Infektiologie, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Mannheim, Universität Heidelberg

²Schaller Research Group, Universität Heidelberg und DKFZ, Heidelberg

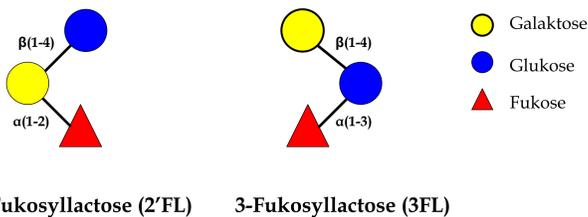
³Department für Infektiologie, Virologie, Universität Heidelberg, Heidelberg

⁴Jennewein Biotechnologie GmbH, Rheinbreitbach

1. Einleitung

Humanpathogene Noroviren (huNoV) sind weltweit eine der häufigsten Ursachen nicht-bakterieller akuter Gastroenteritiden. Trotz dieser hohen Krankheitsbelastung, sind weiterhin keine antiviralen Therapeutika oder Impfungen gegenüber huNoV verfügbar.

HuNoV interagieren mit Histo-Blutgruppen Antigenen (HBGAs), welches Bedeutung für die eigentliche Infektion mit huNoV hat [1]. HBGAs kommen beispielsweise als lösliche Antigene im Speichel vor, finden sich aber ebenso in Oberflächenstrukturen epithelialer Zellen. HBGAs weisen ein ähnliches Monosaccharid-Grundgerüst wie humane Milch-Oligosaccharide (HMOs) auf, wobei unterschiedliche HbGA-Typen mit huNoV interagieren [2]. HMOs fungieren vermutlich als Rezeptor-Analoga für bestimmte Pathogene, da HMOs und HBGAs ein strukturelles Mimikri aufweisen. Bisher ist jedoch wenig bekannt, wie HMOs huNoV blocken bzw. Infektionen verhindern können. In dieser Studie haben wir untersucht, in wieweit die HMOs 2'-Fukosyllactose (2'FL) und 3-Fukosyllactose (3FL) in der Lage sind, GII.10 Norovirus Virus-like particles (VLPs) an der Bindung zu HBGAs zu hindern.



2. Material und Methoden

2.1 VLP Produktion Das Kapsidgen der Norovirus GII.10 P-Domäne wurde in einem Baculovirus Expressionsystem geklont [3]. Fünf Tage nach Infektion wurde die entsprechenden VLPs gewonnen. Überstände wurden über einen 15 - 45% Sukrose-Phosphat-Puffer Gradienten für 2 Stunden bei 4°C ultrazentrifugiert. Eine (Qualitäts-)Kontrolle erfolgte mittels Elektronenmikroskopie.

2.2 ELISA Das Bindungsverhalten von VLPs an HBGA-Strukturen (Schweinemagen-Muzin, PGM; Speichelproben) wurde mittels ELISA untersucht. Hierzu wurden 96-well Platten mit PGM oder Speichelproben beschichtet. Nachfolgend wurden die Platten schrittweise inkubiert (1. VLP-Verdünnungsreihen, 2. GII.10 rabbit polyklonaler Antikörper, 3. HRP-konjugierter goat-α-rabbit Antikörper). Anschließend folgten die Entwicklung der Platten über 30 Min. im Dunkeln, das Stoppen der Reaktion und die abschließende Absorptionsmessung bei 490 nm. Analog hierzu, wurden in den Inhibitionsversuchen VLPs und HMOs in Verdünnungsreihen koinkubiert.

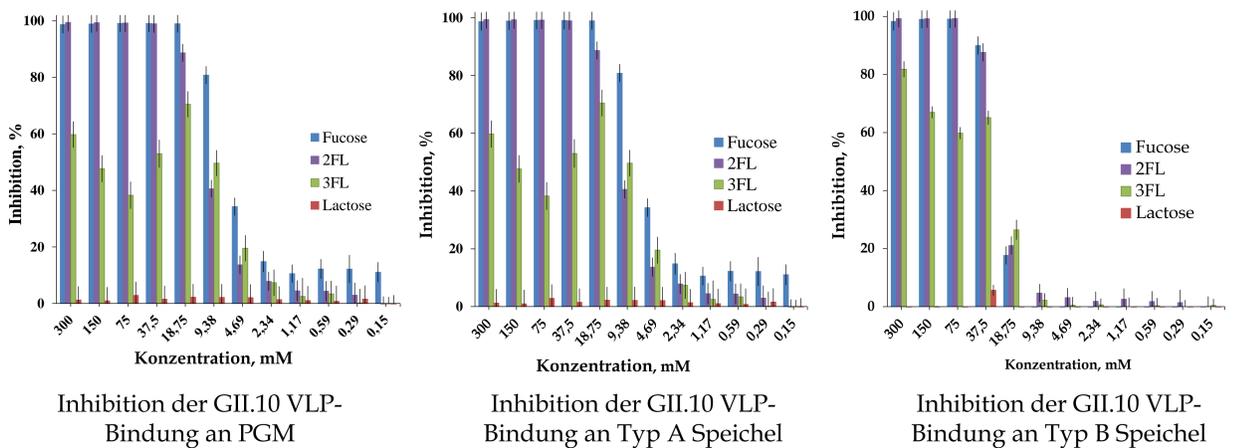
2.3 Röntgenkristallographie Die GII.10 P Domäne wurde entsprechend präpariert (4), so dass die P Domäne und die HMOs co-kristallisiert werden konnten (1:1:1 Mix Protein (~2 mg/ml): Nährlösung [0.2 M sodium nitrate, 0.1 M bis-tris propane (pH 7.5) und 20% (w/v) PEG3350]: 30-60 molarer Überschuss an HMOs). Die Datengenerierung erfolgte an der European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) in Grenoble, Frankreich (refinement, model building etc.).

5. Support

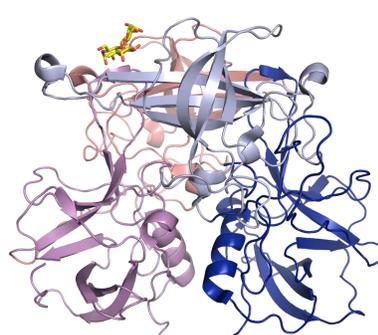
Funding: CHS foundation, the Helmholtz-Chinese Academy of Sciences (HCJRG-202), BMBF (Federal Ministry of Education and Research; PTJ-BIO2; BIO-428-066).

3. Ergebnisse

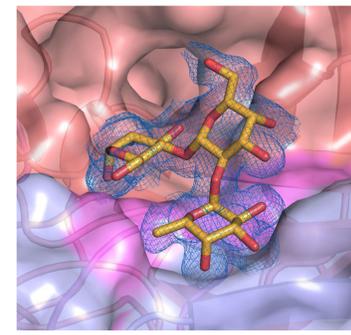
Inhibition der Norovirus VLP - HBGA Interaktion durch HMOs



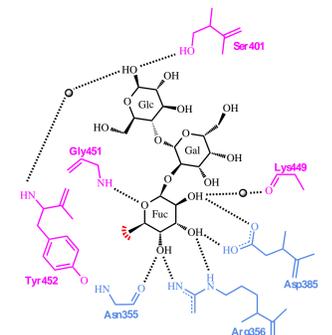
Strukturelle Basis der Norovirus-Inhibition durch HMOs



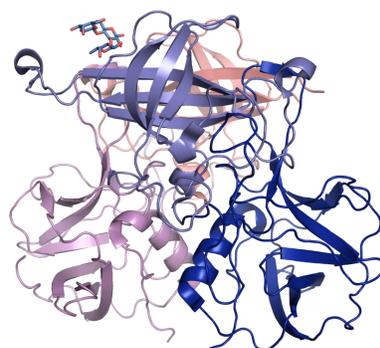
Röntgen-kristallographische Struktur des Komplexes aus GII.10 P Domäne (Dimer) und 2'FL



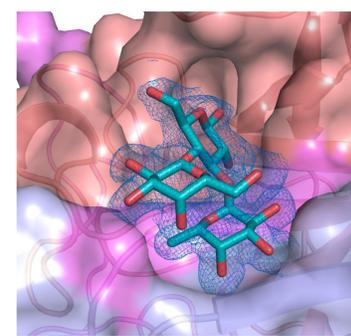
Struktur des GII.10 und 2'FL (orange) Komplexes



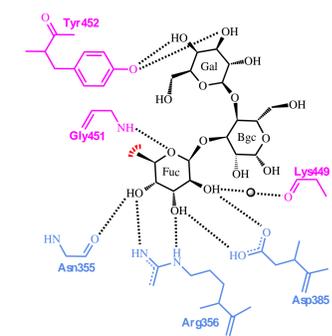
Schwarze Linien: Hydrogenbindungen; Rote Linien: hydrophobe Interaktion



Röntgen-kristallographische Struktur des Komplexes aus GII.10 P Domäne (Dimer) und 3FL



Struktur des GII.10 und 3FL (blau) Komplexes



Schwarze Linien: Hydrogenbindungen; Rote Linien: hydrophobe Interaktion

4. Zusammenfassung

- 2'FL und 3FL blocken erfolgreich die Interaktion von GII.10 Norovirus VLP und HBGA-Strukturen (PGM und Speichelproben)
- Strukturanalysen zeigen, dass 2'FL und 3FL die HBGA-Bindungsstelle auf der Norovirus-Oberflächenstruktur blocken können
- Weitere (klinische) Studien mit 2'FL, 3FL, aber auch mit komplexeren HMO-Strukturen sind wünschenswert

6. Literatur

1. Rockx BH, Vennema H, Hoebé CJ, Duizer E, Koopmans MP. 2005. J Infect Dis 191:749-754.
2. Tan M, Jiang X. 2011. Trends Microbiol 19:382-388
3. Huhti L, Blazevic V, Nurminen K, Butcher SJ et al. 2012 J Virol Methods 179:1-7.
4. Koromyslova AD, Hansman GS. 2015. J Virol 89:2718-2730.