

Moritz Hacke  
Dr. med.

## **Protein-Lipid Interactions of Filoviral Envelope Proteins**

Fach/Einrichtung: Biochemie  
Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Felix T. Wieland

Der Ebola-Ausbruch in West Afrika im Jahr 2014 war bisher der größte und schwerwiegendste in der Geschichte des Virus. Zehntausende Menschen in Guinea, Liberia, Sierra Leone und Nigeria waren von Erkrankung und Tod bedroht. Mit einer Mortalitätsrate von bis zu 90% in vergangenen Ausbrüchen hat das Virus vor allem langanhaltende Folgen für strukturell benachteiligte Regionen der Erde. Trotz zahlreicher Bemühungen in den letzten, fast 40 Jahren, sind die aktuellen Behandlungsoptionen sehr begrenzt und viele aktuelle Ansätze sind noch experimentell.

Unter anderem wird die zelltoxische Wirkung des Ebolavirus seinem einzigen integralen Membranprotein, dem Glykoprotein GP zugeschrieben. Durch Proteinexpression von GP in infizierten Endothelzellen wird vermutlich ein Pathomechanismus in Gang gesetzt, der zu einer undichten Gefäß-Barriere führt. In der Folge entwickelt sich ein hämorrhagisches Fieber, welches entscheidend zur sehr hohen Sterblichkeit bei Ebolainfektionen beiträgt. Bisher ist wenig über Ablauf und Voraussetzungen von GP-vermittelter Zytotoxizität bekannt. Mögliche therapeutische Ansätze zur Stabilisierung und zum Erhalt der Endothelzellbarriere sind bisher ebenfalls unbekannt.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Ebola Glykoproteinuntereinheit GP<sub>2</sub> mit ihrer Transmembrandomäne ausreichend ist, um das Ablösen der Zellen aus ihrem Verband zu initiieren. Genauer wird gezeigt, dass GP<sub>2</sub> über seine Transmembrandomäne mit Cholesterin interagiert und so, GP-vermittelte Effekte durch den Einsatz von cholesterinsenkenden Reagenzien unterdrückt werden können.

Zunächst wurde per *in silico* Analyse die Transmembran-Architektur des Ebola Glykoproteins dargestellt und ein zentral in der alpha-Helix liegendes GXXXA-Motiv aufgedeckt, welches entscheidend zu Transmembrandomäne-Transmembrandomäne oder Transmembrandomäne-Lipid Interaktionen innerhalb des Lipid Bilayers beitragen könnte. Zur weiteren Analyse der GP- vermittelten Effekte auf menschliche Zellen wurde ein Zell-Monolayer-basiertes Modell etabliert, welches die Quantifizierung von adhärenen und abgelösten Zellen mit dem Durchflusszytometer erlaubt. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass einerseits die Expression der Glykoproteinuntereinheit GP<sub>2</sub> alleine ausreichend ist, um Zellablösung zu initiieren und andererseits die weit größere Glykoproteinuntereinheit GP<sub>1</sub> tatsächlich wenig zur Zytotoxizität beiträgt. Das GXXXA Motiv in der Transmembrandomäne von GP konnte darüber hinaus als Voraussetzung für GP-Oligomerisierung und GP-Funktion – gezeigt am Beispiel der Zellablösung – in Verbindung gebracht werden. Durch einzelne Punktmutationen innerhalb des Motivs (G660L, A664L) konnte das Ausmaß der Zellablösung nach GP-Transfektion drastisch reduziert werden. Durch einen 'lipid-binding assay' konnte zudem gezeigt werden, dass GP über sein GXXXA Motiv selektiv Cholesterin bindet. Desweiteren wurde der Einfluss von cholesterinsenkenden Reagenzien auf GP-vermittelte Zelleffekte getestet. Sowohl das zyklische Oligosaccharid MBCD als auch der HMG-CoA Reduktasehemmer Simvastatin konnten GP-vermittelte Zellablösung signifikant senken.

Ergänzend wurde die Expression von GP<sub>2</sub> in verschiedenen Zelllinien mikroskopisch beobachtet. Interessanterweise führte GP<sub>2</sub> zu fadenförmigen Filamenten an der Zelloberfläche, welche man auch als Virus-ähnliche Filamente bezeichnen könnte. Dieser drastische Phänotyp

deutete auf eine Beteiligung der Untereinheit GP<sub>2</sub> bei Virusbudding und Virusrelease hin. Auch zur Entwicklung von "Virus-like filaments" benötigte GP das GXXXA TMD-Motiv, sowie Cholesterol. Durch Perturbation beider Komponenten konnte die Filamentbildung an der Zelloberfläche unterdrückt werden.

Mit der Hilfe von live cell Mikroskopie konnte der Mechanismus für die Ablösung als auch den Zell-Phänotyp anschaulich dargestellt werden. Diese Morphologie entsteht vermutlich durch ein Kollabieren der Zellmembran über ein membranahes Aktin-Skelett und führt schließlich zu verringerter Haftung und der Ablösung der Zelle.

Ergänzende Untersuchungen zeigten auch, dass zwei TMD-nahe Cysteine (Cys670 und Cys672) post-translational palmitoyliert werden. Sowohl in radioaktiven Labeling-, als auch Click- Chemie-basierten Experimenten konnte die Palmitoylierung am C-terminus von Ebola GP bestätigt werden. Durch mikroskopische Analyse von unpalmitoyliertem GP<sub>2</sub>, konnte auf eine Beteiligung beider Cysteine in der Produktion von verzweigten Virus-ähnlichen Filamenten geschlossen werden.

Zur Klärung eines möglicherweise generellen Pathomechanismus in der Familie der Filoviren, wurden GPs der beiden weiteren Vertreter, Marburgvirus und Cuevavirus analysiert. Es zeigte sich, dass das relativ neuentdeckte Lloviuvirus GP über eine ähnliche TMD-Architektur mit einem unidirektional orientierten GXXXA verfügt. Folglich konnte in Zellkulturexperimenten Zellablösung, sowie Filamentbildung an der Zelloberfläche für das Lloviuvirus gezeigt werden, während dies für das Marburgvirus GP nicht möglich war. Auch eine Inhibition von TMD-vermittelten Effekten konnte durch Cholesterolreduktion für das Lloviuvirus erreicht werden, nicht jedoch für das Marburgvirus.

Diese Ergebnisse erweitern das Verständnis von Ebolavirus-Pathogenese in Zellbiologie und Biochemie, mit besonderem Fokus auf Lipid-Protein Interaktion. Zum ersten Mal wurde die Rolle der Glykoproteinuntereinheit GP<sub>2</sub> in Pathogenese und Virulenz untersucht und filovirale Interaktion mit dem Wirts-Lipidmilieu bewiesen. Darüber hinaus wurde die Transmembrandomäne als ein wichtiger Bestandteil der viralen Pathogenese eingeführt.

Die hohe Abhängigkeit von GP zu Plasmamembran-Cholesterin und der Transmembrandomäne, legt folglich den Einsatz von cholesterinreduzierenden Medikamenten im Kampf gegen das Ebolavirus nahe. Vor allem empfiehlt sich der Einsatz von Statinen, da diese Medikamenten- klasse bereits weitläufig im Einsatz, kostengünstig, sowie nebenwirkungsarm ist. Außerdem erfordern Statine in tropischen Bedingungen weder Kühlung, noch aufwendige Applikation.

Zusätzliche Untersuchungen mit lebenden Ebolaviren in S4-Bedingungen, sowie die Durchführung klinischer Studien könnten den Einsatz von Statinen als kausale oder unterstützende Therapie des hämorrhagischen Ebolafiebers weiter voranbringen.