

Was ein Virus wirklich braucht

Viren interagieren vielfältig mit einer Zelle, wenn sie diese infizieren. Mithilfe der Massenspektrometrie untersucht Prof. Andreas Pichlmair solche Wechselwirkungen auf Proteinebene. Die gewonnenen Daten werden anschließend gezielt für Netzwerkanalysen verwendet. Der Virologe möchte verstehen, welche zellulären Bestandteile und Signalwege für die Vermehrung der Viren notwendig sind, um diese für die Entwicklung von Medikamenten zu nutzen.

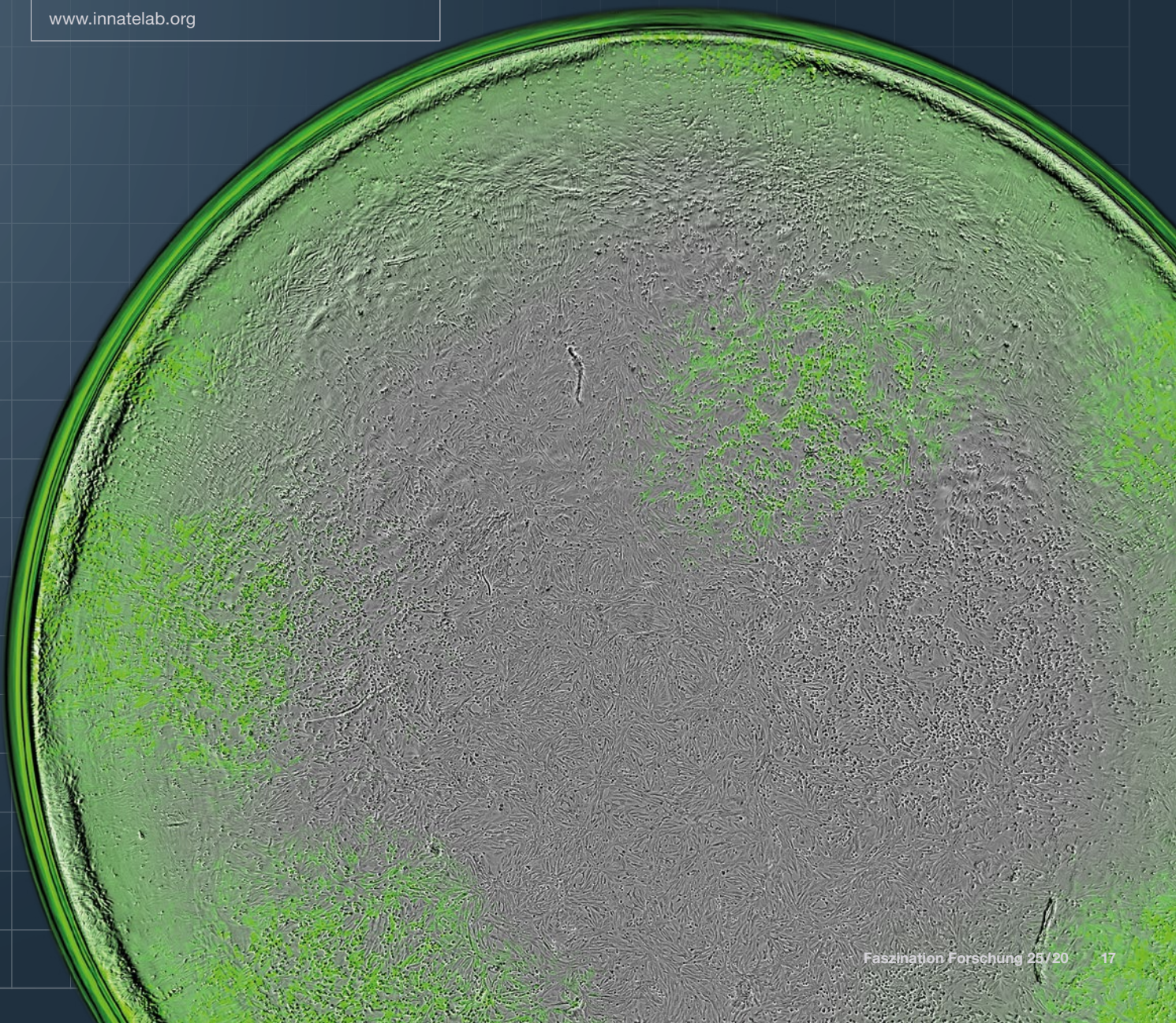
What a Virus really Needs

Viruses infect host cells and take advantage of its molecular machinery for their own reproductive purposes. This requires numerous interactions between the virus and the proteins of the host cell. Prof. Andreas Pichlmair, a virologist at TU Munich, is using mass spectrometry to detect the proteins involved. These proteins could provide a starting point from which to develop therapies – including for the novel coronavirus (SARS-CoV-2). Mass spectrometry is a technique that measures the mass of molecules. Each molecule has a unique mass, which allows the researchers to attribute each measurement reading to the molecule name by referring to a database. This technique

also allows researchers to determine the quantity in which each molecule is present. Pichlmair and his team are examining how the protein composition of cells changes at set intervals after a viral infection. The researchers account for the changes they observe on the basis of data generated in network analyses. This allows them to identify the cellular signaling pathways essential to viruses' survival. In parallel with this, researchers are seeking to discover whether these signaling pathways might also play a role in other diseases for which medications are already available. If so, it could significantly accelerate the development of new agents. □

Link

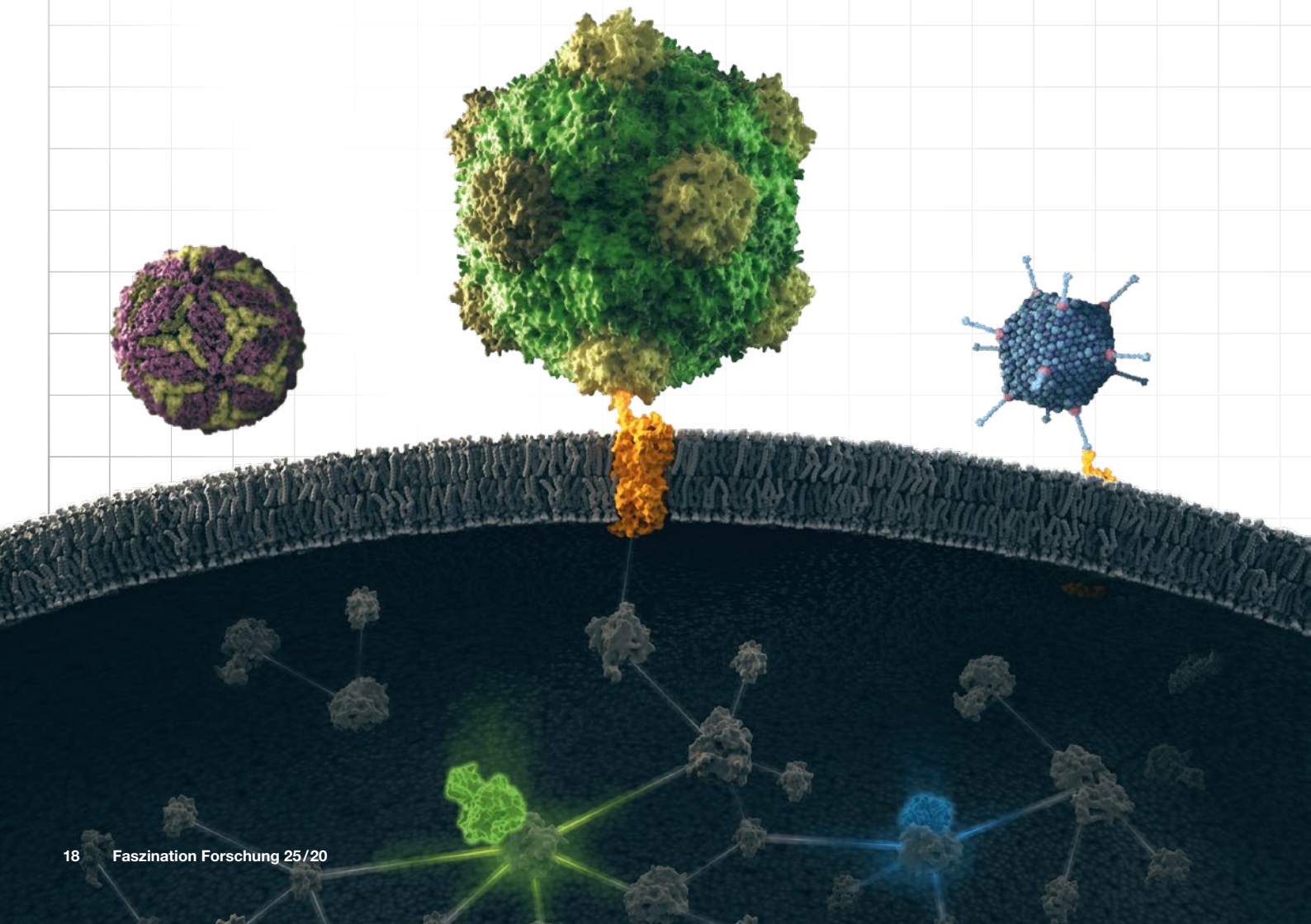
www.innatelab.org



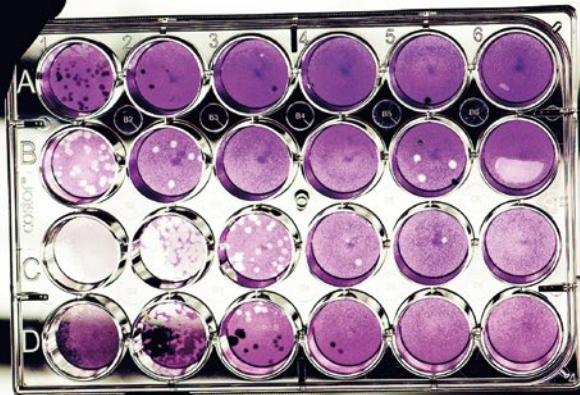
Viren sind von fremden Zellen abhängig, in denen sie sich vermehren können. Selbst sind sie dazu nicht in der Lage. Sie nisten sich in eine Wirtszelle ein und bedienen sich der molekularen Maschinerie der Zelle für ihre eigene Vervielfältigung. Zunächst aber müssen sie den Immunzellen des Wirts entkommen. Entweder indem sie sich tarnen, um nicht erkannt zu werden, oder indem sie die Signalwege manipulieren, mit denen das Immunsystem des Wirts sonst Alarm schlägt. Für all diese Schritte sind Interaktionen des Virus mit zellulären Faktoren notwendig. Prof. Andreas Pichlmair interessiert sich für die beteiligten Eiweiße (Proteine): Diejenigen, die das Virus in der Wirtszelle gezielt abschaltet, etwa um nicht enttarnt zu werden, und diejenigen, die das Virus für seine Vervielfältigung nutzt. „Denn diese Proteine eignen sich potenziell als Ausgangspunkt für die Entwicklung von Therapien“, so der Virologe der TUM. Etwa gegen das neuartige Coronavirus SARS-CoV-2.

Viren steuern die Proteinproduktion der Zelle

Gelingt es Viren, ihr Erbgut in die Wirtszelle einzuschleusen, übernehmen sie die Kontrolle der zellulären Fabrikanlagen. Sie drosseln beispielsweise die Produktion von Proteinen, die das Immunsystem der Wirtszelle für die Abwehr benötigt. Gleichzeitig lassen sie die Produktion von Proteinen, die sie für ihre eigene Fortpflanzung benötigen, hochfahren. Zellen, aber auch Viren, bestehen zum großen Teil aus Proteinen. Diese bilden Strukturen und ermöglichen als Enzyme chemische Reaktionen. Rund 20.000 Gene, welche für Eiweißmoleküle codieren, gibt es in einer Zelle. Manche Eiweiße werden nicht oder nur in wenigen Kopien erzeugt, andere kommen millionenfach vor. Um zu untersuchen, für welche Eiweiße sich die Viren interessieren, nutzen Pichlmair und sein Team die Massenspektrometrie. Dieses Verfahren misst die Masse von Molekülen wie etwa Proteinen. Weil jedes Molekül eine einzigartige Masse besitzt, können die Forscher aus den



Viren verursachen zytopathische Effekte in den infizierten Zellen. Die Zellen werden fixiert und mit Kristallviolett eingefärbt. Wo das Virus sich vermehrt, zerstört es die Zellschicht, sodass in den jeweiligen Schalen Löcher im violetten Zellrasen entstehen.



Daten das Repertoire und die Menge der einzelnen Proteine in einer Probe ermitteln. Die Forscher vergleichen die Proteine in gesunden Zellen mit denen in infizierten. Dabei beobachten sie, wie sich die Proteinzusammensetzung in bestimmten Zeitintervallen nach dem Vireneinfekt verändert.

Was die Forscher am Ende der Messungen in den Händen halten, ist eine Liste von mehreren tausend Proteinen und ihre jeweiligen Mengen.

Die Proteinfunktion als Ansatz für mögliche Medikamente

Bestimmte Proteine verändern sich bei fast allen Infektionen: Beispielsweise diejenigen, die für den Energiestoffwechsel notwendig sind. Andere Proteine verändern sich aber nur bei einem bestimmten Virus. Alle Proteine, deren Mengen sich durch den Infekt verändern, sind vermutlich für das Virus wichtig. Die Funktion vieler dieser Proteine ist unbekannt. Für sie interessiert sich Pichlmair. Er möchte verstehen, wieso das Virus sie benötigt. Denn dann ließen sich gezielt und schnell neue Medikamente entwickeln. Dabei hilft den Forschern die sogenannte Netzwerkanalyse. Sie basiert auf der Analyse von komplexen Abläufen im Inneren von Zellen. So lösen unter-

schiedliche Reize innerhalb von Zellen verschiedenste Interaktionen von Molekülen aus. Manche solcher Moleküle aktivieren oder deaktivieren sich gegenseitig. Andere schalten die Produktion von Proteinen an oder ab. Manche solcher Interaktionen im Inneren von Zellen sind bekannt, andere beginnt man erst zu verstehen. Oft spielt die Produktion von Proteinen dabei eine Rolle. Solche Interaktionen im Zellinneren werden auch Signalkaskaden oder Signalwege genannt, weil eine Reaktion wie ein Signal viele weitere auslöst und dabei oft verstärkt. Die Signalkaskaden wechselwirken miteinander, sodass die Zelle mit einer Vielzahl an Möglichkeiten auf das Pathogen reagieren kann. Für die Forscher wird es dadurch schwieriger, die beteiligten Prozesse zu verstehen.

Netzwerkanalysen liefern Hinweise

Eine Vielzahl solcher Kaskaden sind bereits bekannt und in Datenbanken hinterlegt. Mit diesen Datenbanken analysiert Pichlmair die Liste der Proteine aus der Massenspektrometrie. Das Ergebnis nutzt er, um zu interpretieren, was in der Zelle nach einer Infektion passiert. Welche Reaktionen im Inneren der Zelle ablaufen und welche Signalwege aktiviert werden, wenn ein Virus die Zelle befallt. „Je mehr solcher komplexen Daten vorliegen, ►

umso präziser wird das Bild“, sagt Pichlmair. Und je bekannter der jeweilige Signalweg, umso eindeutiger lässt sich erkennen, ob ein Virus diesen benötigt. Aber Pichlmair schränkt ein: „Es gibt viele Messwerte, die wir noch nicht interpretieren können, weil die Netzwerkdaten dazu noch zu dürftig sind oder ganz fehlen.“

Coronavirus: Suche nach Parallelen zu anderen Krankheiten

Das Coronavirus SARS-CoV-2 ist aus etwa 27 Proteinen aufgebaut. Von einigen sind die Funktionen bekannt, von anderen noch nicht. „Was wir aufgrund der Massenspektrometrie sehen, ist dass es wie bei anderen Viren auch ganz bestimmte Proteine des Virus, aber auch der Wirtszelle gibt, die für das Virus wichtig sind“, sagt Pichlmair. Ziel des Teams um Pichlmair ist es, Signalkaskaden zu identifizieren, die bei einem Infekt mit dem Coronavirus aktiviert werden. Parallel dazu versucht das Team herauszufinden, ob diese Kaskaden auch bei anderen Erkrankungen eine Rolle spielen, für die es bereits Medikamente gibt. Denn so ließen sich neue therapeutische Wirkstoffe, die gegen SARS-CoV-2 wirken könnten, deutlich schneller ermitteln. Für dieses sogenannte Arzneimittel-Repurposing kommen Medikamente in Betracht, die schon für andere Erkrankungen zugelassen oder zumindest weitgehend erprobt sind. Medikamente, die in Signalkaskaden eingreifen, sind vor allem aus der Behandlung von Krebserkrankungen bekannt. ▶

≈ 20.000

DE: Proteine können theoretisch mit dem Virus interagieren

29

Proteine exprimiert das Virus

1.000

Proteine sind an virale Proteine gebunden



Die Zellen werden in Stickstoff gelagert.

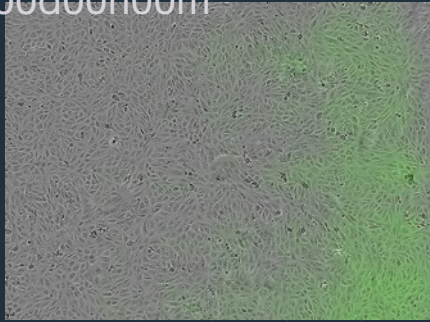


Bildquellen: Magdalena Jooss

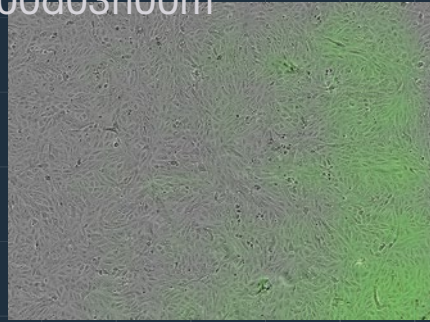
Prof. Andreas Pichlmair

Andreas Pichlmair studierte an der Veterinärmedizinischen Universität in Wien. Für seine Doktorarbeit wechselte er an die Universität Freiburg/Breisgau. Danach promovierte er in London am Cancer Research UK (heute: Francis Crick Institute) und verbrachte drei Jahre als Post-Doc am Center for Molecular Medicine der Österreichischen Akademie der Wissenschaften in Wien. Von 2011 bis 2017 etablierte er als Forschungsgruppenleiter sein eigenes Labor am Max-Planck-Institut für Biochemie in München. 2017 erhielt er einen Ruf als Associate Professor an die TUM. Sein Forschungsgebiet ist die Interaktion von viralen Proteinen und ihren Wirtsorganismen. Er nutzt vor allem die Massenspektrometrie und kombiniert diese beispielsweise mit Netzwerkanalysen oder anderen Systemanalysen. Der Virologe möchte verstehen, welche zellulären Bestandteile und Signalwege für Viren überlebensnotwendig sind und sich deshalb für die Entwicklung von Medikamenten eignen.

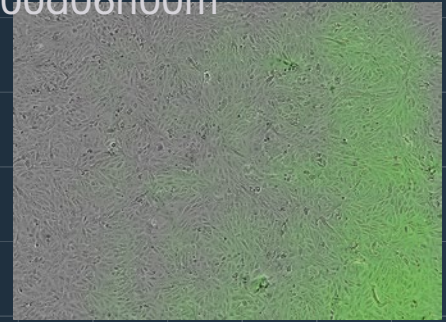
00d00h00m



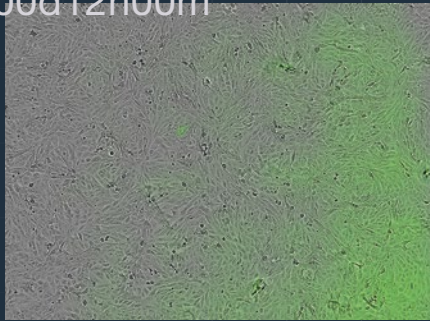
00d03h00m



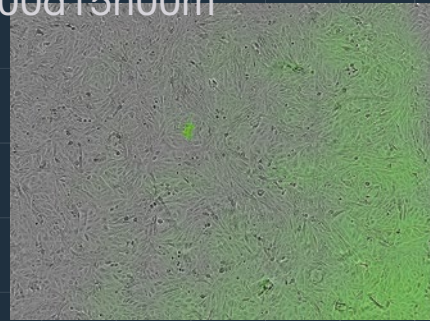
00d06h00m



00d12h00m



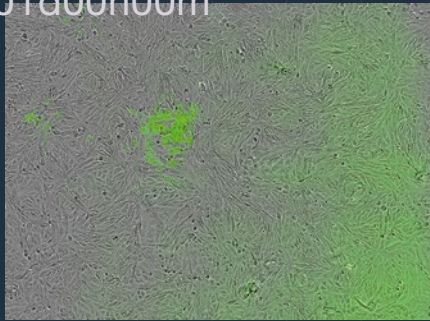
00d15h00m



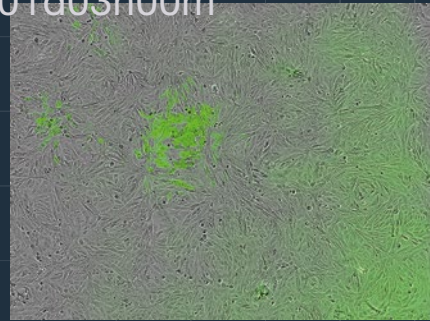
00d18h00m



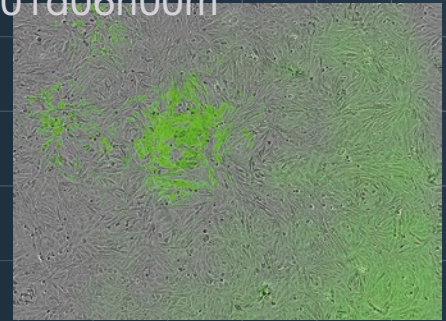
01d00h00m



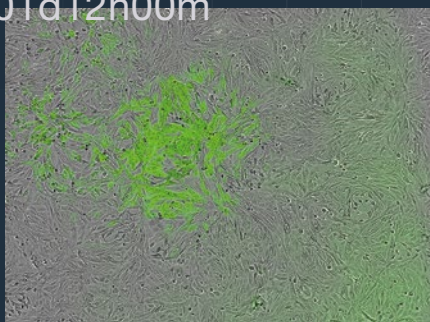
01d03h00m



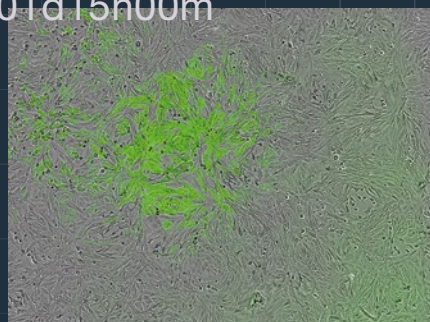
01d06h00m



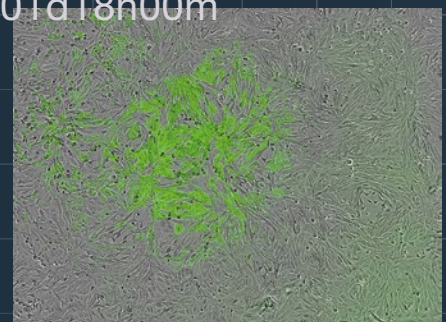
01d12h00m



01d15h00m

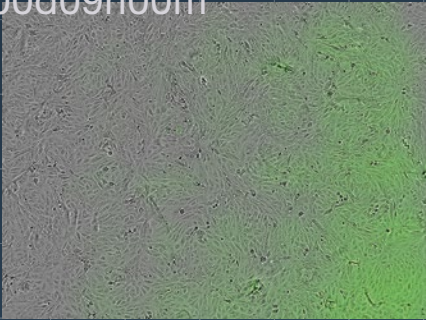


01d18h00m



Eine Zellkultur wird mit SARS-CoV-2, welches mit grün fluoreszierendem Farbstoff markiert ist, in Kontakt gebracht. Um die Replikation des Virus zu verfolgen, wird mit dem Screening-Mikroskop (rechts) dieselbe Messung alle 3 Stunden durchgeführt. So lässt sich die zeitliche Entwicklung und Ausbreitung des Virus beobachten.

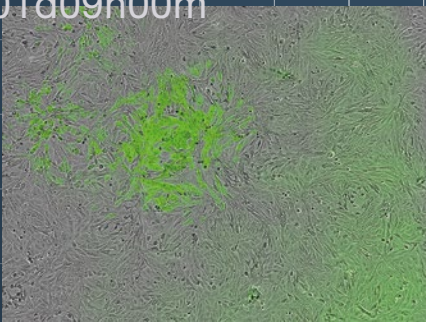
00d09h00m



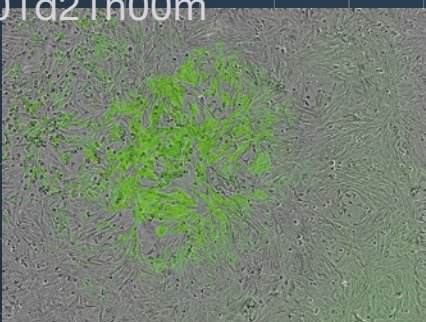
00d21h00m

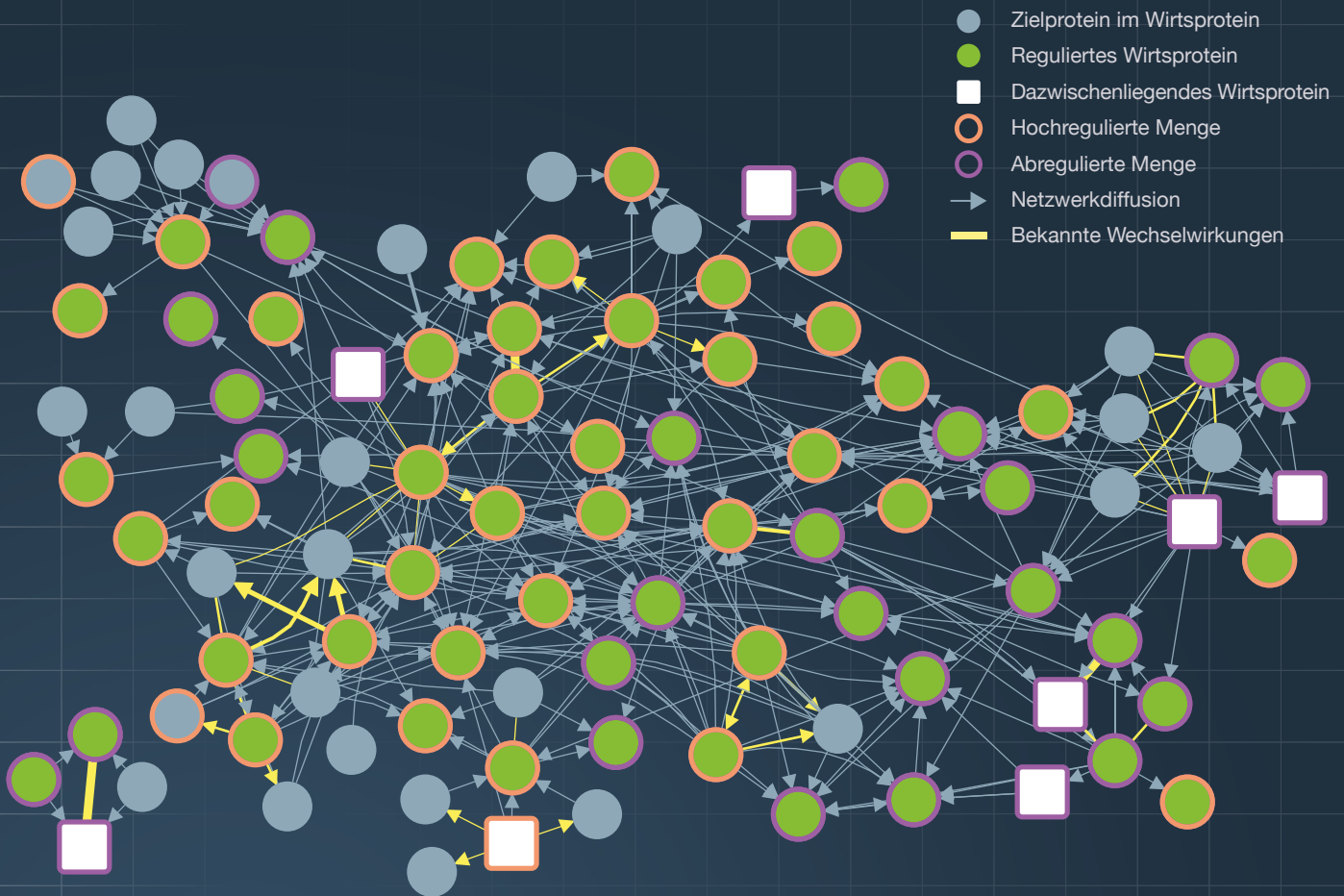


01d09h00m

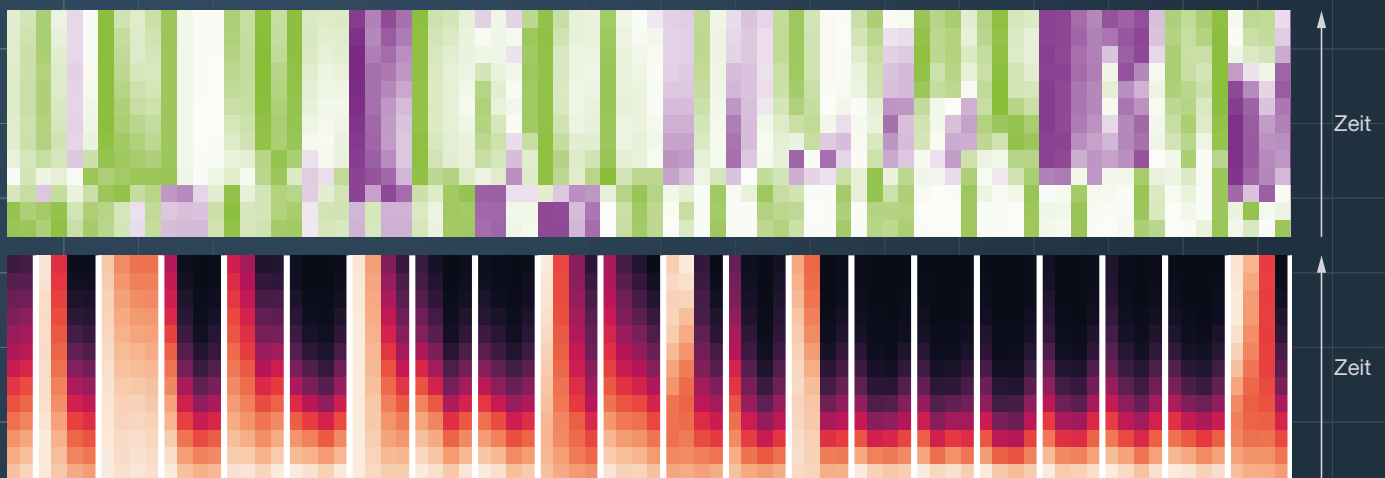


01d21h00m





Das Netzwerk in diesem Bild zeigt was passiert, nachdem das SARS-CoV-2 ORF7 Protein in einer Zelle exprimiert wurde. Jeder Netzwerkknoten steht für ein bestimmtes Protein. Graue Knoten zeigen Proteine, an die das Virus bindet. Grüne Knoten zeigen nachgelagerte Veränderungen in der Protein-Expression des Wirts. Orange Umrandungen stehen für einen Anstieg der Menge, lila Ränder für eine Verringerung. Diese Proteine sind Ziele für das Virusprotein, denn es verändert ihre Produktionsmenge. Die gelben Linien zeigen aktuell bekannte molekulare Wechselwirkungen in der Zelle. So hilft die Netzwerkanalyse, ein tieferes molekulares Verständnis für die Aktivitäten des Virusproteins in der Zelle zu bekommen.



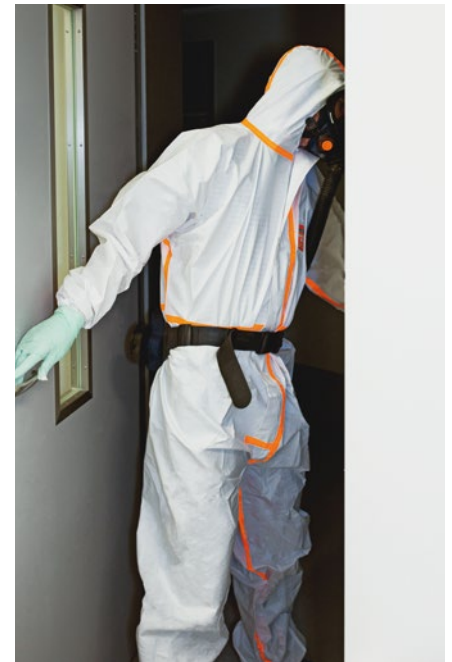
Das Ergebnis eines Screenings wie es auf der vorhergehenden Seite gezeigt ist. Oben: Signal des grün fluoreszierenden Proteins. Weniger grün/mehr lila zeigt weniger Virus an. Unten: Zellwachstum. Dunklere Farben stehen für höhere Zelldichten. Jede Spalte repräsentiert einen Test mit einer anderen Substanz, jedes Quadrat innerhalb einer Spalte steht für eine Messung. Dunkelrote/lila Farben zeigen an, dass die jeweilige Substanz wirksam gegen das Virus zu sein scheint.

Während einige seiner Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter weiter Daten sammeln und analysieren, testen andere bereits die Wirkung von identifizierten Substanzklassen. Erlauben sie die Virenvermehrung oder wirken sie hemmend? Die Forscher nutzen dazu Zellkulturen und Coronaviren, die mit einem fluoreszierenden grünen Farbstoff markiert wurden. Infizierte Zellen, in denen sich das Virus vermehrt, leuchten grün. In Ansätzen mit den erfolgreichen Wirkstoffen erlischt die grüne Farbe oder sie leuchtet erst gar nicht. Ein Screening-Mikroskop ermöglicht einen hohen Durchsatz von Proben. Das Gerät wurde vom Karl Max von Bauernfeind-Verein, einem langjährigen Partner der TUM, mitfinanziert. Wie bei allen Untersuchungen, bei denen das Virus direkt zum Einsatz kommt, befindet es sich im S3 Labor. Labore der Schutzstufe drei (S3) sind gegenüber der Außenwelt abgeschlossene, isolierte Räumlichkeiten, die so angelegt sind, dass Erreger nicht unbeabsichtigt aus ihnen entweichen können. 574 unabhängige Messungen können Pichlmair und sein Team mithilfe des modernen Mikroskops alle drei bis vier Tage durchführen.

Ein wirklich interdisziplinäres Team

„Das Besondere an unserer Arbeit ist, dass wir Massenspektrometrie, bioinformatische Analysen, Virologie und Zellbiologie miteinander verbinden“, sagt Pichlmair. Der Ansatz erfordert viel Erfahrung aus ganz verschiedenen Bereichen. Pichlmairs Team ist multidisziplinär und besteht aus Virologen, Zellbiologen, Ingenieuren und Bioinformatikern. Seine 18 Mitarbeiter arbeiten Hand in Hand und fügen jeder als Spezialist seinen oder ihren Teil bei, um das Puzzle zusammenzusetzen. Wieder andere überprüfen, dass keine Artefakte gemessen werden. Gemeinsam arbeitet das Team daran, zu verstehen, was genau Viren für ihre Vermehrung benötigen. „Die Herausforderung ist, nicht einfach blinde Tests zu machen, bei denen man nicht versteht, was passiert, sondern die interessanten Substanzklassen zu identifizieren, die uns erlauben, mithilfe unseres Wissens zukunftsorientierte Therapien zu entwickeln“, sagt Pichlmair.

Karoline Stürmer



Viele Experimente werden in Laboren mit der Biologischen Schutzstufe 3 (BSL-3) durchgeführt. BSL-3 Labore sind abgedichtet und baulich von der Umgebung abgetrennt. Sie sind so ausgelegt, dass Erreger nicht unbeabsichtigt entweichen können. Spezielle Bekleidungsrichtlinien und HEPA-gefilterte Belüftung schützt die Wissenschaftler davor, sich zu infizieren.