

**Identifizierung und Charakterisierung von
Influenza-A-Virus Fusionsinhibitoren, die aus einem
Doppelmyxovirus Hochdurchsatz-Screen hervorgingen**

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der
Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von
Marco Weißhaar
aus Waiblingen

Hauptberichter: Prof. Dr. Dieter Wolf
1. Mitberichter: Prof. Dr. Richard Plemper

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2019

Institut für Biochemie und Technische Biochemie der
Universität Stuttgart

2019

Alle experimentellen Arbeiten dieser Dissertation wurden unter der Anleitung von Prof. Dr. Richard Karl Plemper in dessen Laboratorium am Institute for Biomedical Sciences des Center for Inflammation, Immunity and Infection an der Georgia State University in Atlanta, GA, USA, durchgeführt. Diese Arbeit wurde in Teilen von Zuschüssen des Public Health Service AI119196, AI011002 und HD079327 von der NIH/NIAID und NIH/NICHD an R.K.P. unterstützt.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Stellen der Arbeit, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen oder aus anderweitigen, fremden Äußerungen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Stuttgart, den 08.07.2019

Marco Weißhaar

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VIII
Zusammenfassung	X
Summary	XII
1 Einleitung	14
1.1 Influenzavirus	14
1.1.1 Influenza-A-Virus (IAV)	15
1.1.2 IAV-Infektion	17
1.1.3 Genom und Replikation	20
1.1.4 Hämagglutinin (HA)	25
1.1.4.1 Struktur	25
1.1.4.2 Expression und Spaltung	27
1.1.4.3 Rezeptorbindung	31
1.1.4.4 Membranfusion	33
1.1.4.5 N-Glykosylierung	37
1.1.5 Wirtstropismus	39
1.1.6 Pathogenität/Virulenz	42
1.1.7 Pandemiegefahr	47
1.2 Strategien zur Entdeckung neuer Medikamente	50
1.2.1 PDD in anti-IAV Hochdurchsatz-Screens	55
1.2.1.1 IAV Reportersysteme der ersten Generation	57
1.2.1.2 IAV-Reportersysteme der zweiten Generation	59
1.2.1.3 IAV-Reportersysteme der dritten Generation	60
1.2.1.4 Anforderungen an ein Hochdurchsatz-Screening- Protokoll zur Entdeckung von IAV-Inhibitoren	62
2 Motivation und Ziel dieser Arbeit	66

3	Ergebnisse und Diskussion	70
3.1	Assay zur Quantifizierung einer simultanen Infektion mit IAV und RSV.....	71
3.2	HT-Screen einer Substanzbibliothek mit 142.495 Verbindungen	85
3.2.1	Equipment, Software und Ablauf des HT-Screens.....	86
3.2.2	Analyse des Screens und Counterscreens	88
3.3	Evaluierung des Aktivitäts- und Zytotoxizitätsprofils der IAV-spezifischen Hit-Kandidaten	94
3.4	Mechanistische Charakterisierung der verifizierten Hits.....	107
3.4.1	Identifikation der viralen Zielstruktur.....	120
3.4.2	Virus-Adaptation an die antiviralen Hit-Verbindungen und Analyse des Resistenzprofils	128
3.4.3	Genauere Betrachtung des kooperativen Resistenzmechanismus	136
3.4.4	In-silico-Bindungsstudien	149
3.4.5	Vergleich der in-silico- und in-vivo-Aktivität verschiedener GRP-71271-Strukturanaloga	155
4	Abschließende Bemerkungen und Ausblick	166
5	Materialien und Methoden	172
6	Referenzen	184
7	Danksagung	233

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
BLI	Bio-Layer-Interferometrie
C-Terminal	carboxyterminal
CC ₅₀	mittlere zytotoxische Konzentration
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EGF	Enhanced-Green-Fluorescent-Protein
EGFR	Epidermal-growth-Faktor-Rezeptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	Fusionsprotein
GLuc	Gaussia-Luciferease
HA (H)	Hämagglutinin
HPAI	Highly Pathogenic Avian Influenza
HRP	Horseradish Peroxidase
HTS	High-Throughput-Screen
IAV	Influenza-A-Virus
IBV	Influenza-B-Virus
IFN	Interferon
ISG	Interferon-stimulierte Gene
KLS	Kern-Lokalisations-Signal
LOPAC	Library of Pharmacologically Active Compounds
M	Matrix-Protein
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MAVS	Mitochondrial antiviral-signaling protein
MDT	Magen-Darm-Trakt
MOA	Mechanism of Action
MOI	Multiplicity of Infection
N	Nukleoprotein
NA (N)	Neuraminidase

NA-2,6-Gal	N-Acetylneuraminsäure die 2,6-glykosidisch mit Galactose verknüpft ist
NA-2,3-Gal	N-Acetylneuraminsäure die 2,3-glykosidisch mit Galactose verknüpft ist
NanoLuc	Nano-Luciferase
NCR	Non-coding-Region
NS	Nichtstrukturprotein
ORF	Open-Reading-Frame
ORT	oberer Respirationstrakt
PA	Polymerase Acidic Protein
PB	Polymerase Basis Protein
PDB	Protein Database
PDD	Phenotypic-based Drug Discovery
Pol I	RNA-Polymerase I
PS	Packaging Signal
RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase-Komplex
RLU	Relative Light Unit
RNA	Ribonucleic acid
RNP	Ribonucleoprotein
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SSA	Super-Streptavidin
TDD	Target-based Drug Discovery/
vmRNA	virale messenger-RNA
VDAC1	Voltage dependent anion channel 1
VSV	Vesicular stomatitis Virus
WSN	Influenza-A/WSN/1933-Virus

Zusammenfassung

Das zur Familie der Orthomyxoviridae gehörenden Influenza-A-Virus (IAV) ist ein behülltes Virus mit einem segmentierten, einzelsträngigen RNA-Genom und einer negativen Polarität. IAV gilt als der häufigste virale Erreger akuter Atemwegserkrankungen. Seine hohe Mutationsrate und das segmentierte Genom ermöglichen IAV eine hohe genomische Plastizität, die mit einer sich ständig ändernden Antigenstruktur einhergeht und zu jährlich wiederkehrenden Epidemien oder Pandemien führt.

Die hohe Morbidität und Mortalität, mit der IAV-Infektionen vergesellschaftet sind, begründen den Bedarf an neuen, hochpotenten, antiviralen Chemotherapeutika. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Assay implementiert, der die simultane Quantifizierung der Replikation eines Influenza-A-Virus und eines Respiratorischen Syncytial-Virus (RSV) ermöglicht. Dieser Assay wurde in einem Hochdurchsatz-Screening (HTS)-Protokoll, zur Entdeckung neuer antimyxoviraler Moleküle, angewendet. Der Doppelmyxovirus-Infektionsassay basiert auf der Verwendung von vollständig replikationskompetenten Reporterviren und ermöglicht die Identifikation von IAV- bzw. RSV-spezifischen Substanzen, sowie von Verbindungen mit einem breiten, antimyxoviralen Wirkspektrum. Dieses Protokoll wurde angewandt, um eine chemisch diverse Substanzbibliothek mit über 142.000 Verbindungen auf deren anti-myxovirale Aktivität zu testen.

Diese Arbeit konzentrierte sich auf die Identifizierung und Charakterisierung der IAV-spezifischen Hit-Kandidaten und ergab eine Hit-Rate von 0,03%. Nach Zytotoxizitäts- und Counterscreening wurden drei chemisch unterschiedliche Strukturklassen mit einer IAV-inhibierenden Aktivität im nanomolaren Bereich und einem sehr guten Zytotoxizitätsprofil identifiziert. Durch Time-of-Addition- und Minigenom-Experimente sowie durch Studien zum Zelleintritt des Virus, konnte diese Arbeit zeigen, dass die drei Hit-Kandidaten die Hämagglutinin (HA)-vermittelte Membranfusion inhibieren. Die antivirale Aktivität der drei Verbindungen konnte auch gegen ein IAV-Isolat der Pandemie von 2009 und

bei einer der Verbindungen gegen ein weiteres Influenza-A-Virus der Gruppe 1 (H2N2) nachgewiesen werden. Eine direkte Interaktion zwischen HA als Zielprotein und den drei Hit-Kandidaten konnte unter anderem durch Bio-Layer-Interferometrie (BLI) bewiesen werden. Untersuchungen des induzierten viralen Resistenzmusters zeigten zwei unabhängige Resistenzmechanismen: Ein primärer Resistenzmechanismus, der auf einer Reduktion der Bindungsaffinität der Hit-Kandidaten zu HA basierte und einen sekundären Resistenzmechanismus, der keinen Einfluss auf die Molekül-Protein-Affinität hatte. Der bis dato unbekannt, sekundäre Resistenzmechanismus basiert auf zwei unterschiedlichen Paaren kooperativer Mutationen, von denen jeweils eine Mutation die Eliminierung des am proximalsten zur Membran gelegenen N-Glykans zur Folge hatte, und auf einer zweiten Mutation, die innerhalb einer weiter distal zur Membran gelegenen Domäne von HA1 bzw. HA2 lokalisiert ist. Durch die Synthese und Testung von strukturanalogen Verbindungen und die Anwendung von in-silico-Bindungsstudien, konnten wir eine mögliche Bindungstasche für die Hit-Kandidaten innerhalb von HA identifizieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue chemische Strukturen mit einer potenten, antiviralen Aktivität und einem hohen Entwicklungspotential identifiziert und deren molekularer Wirkmechanismus entschlüsselt. Diese Arbeit zeigte, dass IAV HA ein dominantes Ziel für die Wechselwirkung mit niedermolekularen Verbindungen darstellt und sich damit als Zielstruktur für Medikamente eignet. Es wurden unterschiedliche Resistenzmechanismen skizziert, die IAV unter dem Druck der HA-inhibierenden Chemotherapeutika entwickeln kann, um deren Wirkmechanismus zu entgehen. Außerdem wurde ein Weg zur strukturgestützten Entwicklung neuer Leitstrukturen etabliert.

Summary

Influenza A Virus (IAV) belonging to the Orthomyxoviridae family is an enveloped virus with a segmented, negative-sense, single-stranded RNA genome. IAV is considered the most common pathogen in acute respiratory disease. The high mutation rate and segmented genome enable IAV to achieve high genomic plasticity, which is associated with constantly changing antigen structure and leads to annually recurring epidemics or pandemics.

The high morbidity and mortality rates associated with IAV infections generate the urgent need for novel, highly potent antiviral chemotherapeutic agents. In the context of this work we implemented an assay that allows the simultaneous quantification of the replication of an influenza A Virus (IAV) and a respiratory syncytial virus (RSV). This dual myxovirus co-infection assay was applied in a high-throughput screen (HTS). The dual myxovirus high-throughput screening protocol combines a fully replication-competent IAV-WSN strain and a respiratory syncytial virus reporter strain for the simultaneous identification of IAV-specific, paramyxovirus-specific, and broad-spectrum inhibitors. This protocol was applied to screen a chemically diverse compound library with over 142,000 entries for their antimyxoviral potential.

This work focused on the identification and characterization of IAV-specific hits and resulted in a hit rate of 0.03%. After cytotoxicity and counterscreening we found three chemically distinct hit classes with nanomolar potency and favorable cytotoxicity profiles. Utilizing time-of-addition and minigenome experiments, and viral entry studies we demonstrated that these hit classes block hemagglutinin (HA)-mediated membrane fusion. Antiviral activity of the three compounds extends to an isolate from the 2009 pandemic and, in one case, another group 1 subtype.

A direct interaction between HA as target protein and the three hit compounds could be proven through bilayer interferometry (BLI). Investigations of the induced viral resistance pattern revealed two distinct escape mechanisms: primary resistance based on a reduced compound binding, and secondary resistance, associated with unaltered binding. The previously unknown

secondary escape mechanism was based on two different pairs of cooperative mutations, each combining a mutation eliminating the membrane-proximal stalk N-glycan with a second mutation located within a domain of HA1 or HA2 further distal to the membrane. By testing a chemical analog library combined with in-silico docking we were able to identify a possible binding pose for the hit classes within HA.

In this work, new chemical structures with potent antiviral activity and high developmental potential were identified and their molecular mechanism of action deciphered. This work showed that IAV HA acts as dominant target for interactions with inhibiting small molecules outlining its suitability as druggable protein. We outlined different resistance mechanisms that IAV can develop under the pressure of HA inhibiting small molecules to escape inhibition. In addition, we established a path toward structure-aided lead development.

1 Einleitung

1.1 Influenzavirus

Influenzaviren sind der Familie der Orthomyxoviridae zugeordnet und zeichnen sich durch ein segmentiertes, einzelsträngiges (ss) RNA-Genom in Negativstrangorientierung aus. Influenzaviren werden der Gattung A, B, C oder D zugeteilt (Hause et al., 2014). Die Unterteilung basiert auf serologischen und molekularen Eigenschaften sowie auf unterschiedlicher Genomsegmentierung. Die Gattungen Influenza-A-Viren (IAV) und Influenza-B-Viren (IBV) weisen acht Genomsegmente auf, die für zehn essentielle Proteine kodieren (McGeoch, Fellner, & Newton, 1976). Je nach Virusstamm kodiert das Genom für eine unterschiedliche Anzahl weiterer akzessorischer Proteine. Influenza-C-Viren (ICV) und Influenza-D-Viren (IDV) beherbergen nur sieben Segmente, da die beiden Segmente der Transmembran-Glykoproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) durch ein Segment, das die genetische Information für das Hämagglutinin-Esterase-Fusions-Protein enthält, ersetzt wurden. Da Influenza-A-Viren (IAV) hauptverantwortlich für die großen Influenzavirus Pandemien in den letzten 120 Jahren waren und sie auch an den jährlich wiederkehrenden Epidemien den größten Anteil tragen, ist diese Gattung die klinisch wichtigste (Rota et al., 1990). Auch IBV zirkuliert derzeit in der menschlichen Population und sorgt regelmäßig für symptombehafte Infektionen. Da IBV jedoch weitgehend auf den Wirt Mensch beschränkt ist, wird dessen pandemisches Potential als geringer eingestuft. Dennoch sind in den jährlich aktualisierten Influenza-Impfstoffen auch IBV Antigenstrukturen enthalten (Houser & Subbarao, 2015).

1.1.1 Influenza-A-Virus (IAV)

Influenza-A-Viren (IAV) zeichnen sich durch ein sehr breites Wirtsspektrum aus. Ausgehend von Wasservögeln der Ordnung Anseriformes und Charadriiformes, als ihrem natürlichen Reservoir, konnten sie sich in verschiedenen Landvogelarten und Säugetieren wie Schweine, Pferde, Robben und dem Menschen ausbreiten (Shope, 1931) (Sovinova, Tumova, Pouska, & Nemeč, 1958) (Geraci et al., 1982). Durch teilweise hohe Morbidität und Mortalität verursachen sie große, ökonomische Schäden in der Nutztierhaltung (Kilpatrick et al., 2006; C. J. Russell & Webster, 2005). In den Wasservögeln hingegen, die das natürliche Reservoir darstellen, kommt es meist zu symptomlosen Infektionen des Magen-Darm-Trakts, was auf eine Adaptation an jene Wirtsspezies hinweist (Webster, Bean, Gorman, Chambers, & Kawaoka, 1992) (Kimble, Nieto, & Perez, 2010). Influenza-A-Viren werden anhand unterschiedlicher Subtypen der beiden Transmembran-Glykoproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) unterschieden. Diese Subtypen werden auf der Basis ihrer Sequenz und ihrer unterschiedlichen Antigenreaktivität gegenüber Polyklonaler Sera getroffen ("A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum," 1980). Innerhalb ihres natürlichen Reservoirs konnten bisher 16 verschiedene HAs und 9 NAs unterschieden werden (S. W. Yoon, Webby, & Webster, 2014). Zusätzlich wurden zwei weitere HA-Subtypen und zwei NA-ähnliche Subtypen in Fledermäusen nachgewiesen (Ma, Garcia-Sastre, & Schwemmler, 2015; Tong et al., 2013). Die verschiedenen HA-Subtypen können, basierend auf ihren Sequenzen und Proteinstrukturen, zusätzlich in zwei Gruppen unterteilt werden (**Tabelle 1-1**) (R. J. Russell et al., 2004). Von allen in **Tabelle 1-1** enthaltenen HA-Subtypen und von den 9 NA-Subtypen sind bisher nur H1, H2, H3 und N1 und N2 in der Lage innerhalb der menschlichen Population zu persistieren und zu zirkulieren. Entsprechende IAVs konnten nach initialer, meist zoonotischer Übertragung eine effiziente Mensch-zu-Mensch-Transmission etablieren und zeichneten sich jeweils durch eine pandemische Ausbreitung mit hoher

Mortalität und Morbidität aus: H1N1 (1918), H2N2 (1957), H3N2 (1968), H1N1 (2009) (Morens, Taubenberger, & Fauci, 2009).

Tabelle 1–1: Einteilung der 16 HA-Subtypen basierend auf Sequenz- und Proteinstruktur in Gruppe 1 und 2. Die fettmarkierten zeichnen sich durch Zirkulation innerhalb der menschlichen Population aus. Bestimmte Viren, die die kursiven HAs trugen verursachten zoonotische Infektionen mit schweren Krankheitsverläufen in den letzten Jahren.

Gruppe 1	Gruppe 2
H1, H2 , <i>H5</i> , H6, H8, <i>H9</i> , H11, H12, H13, H16	H3 , H4, <i>H7</i> , H10, H14, H15

Nach ihrer pandemischen Ersterscheinung innerhalb der menschlichen Population, zirkulierten sie innerhalb dieser und sorgen bis heute für zahlreiche, jährlich wiederkehrende Infektionen mit oftmals epidemischem Ausmaß. Heute co-zirkulieren die beiden HA-Subtypen H1 (H1N1) und H3 (H3N2) und die beiden IBV-Stämme Victoria und Yamagata in der menschlichen Population (Rota et al., 1990). Während der Pandemien in den Jahren 1918, 1957, 1968, 2009, kamen mehrere Millionen Menschen durch die Folgen einer IAV-Infektion um ihr Leben. Vor allem die Pandemie von 1918, auch bekannt als die „Spanische Grippe“, gilt als die schlimmste Pandemie der jüngeren Geschichte, bei der geschätzt ein Drittel der damaligen Weltpopulation (500 Mio. Menschen) infiziert wurden und zwischen 50 und 100 Mio. Menschen an den Folgen der Infektion gestorben sind (Taubenberger & Morens, 2006) (N. P. Johnson & Mueller, 2002) (Patterson & Pyle, 1991). Zusätzlich verursachten verschiedene Subtypen (z.B. H5, H7 und H9) sporadische, zoonitische Infektionen mit sehr hoher Pathogenität jedoch ohne innerhalb der menschlichen Population zu persistieren (H. Wang et al., 2008). Diese zoonotischen Übertragungen stellen eine sehr große Gefahr für die Entstehung neuer, pandemischer IAV-Subtypen

dar, da sie sich nach Etablierung einer effizienten Mensch-zu-Mensch-Übertragung innerhalb einer Population ausbreiten könnten deren Immunsystem aufgrund unbekannter Antigenstrukturen kaum präexistierenden Schutz bieten würde (Morens & Fauci, 2007; Taubenberger & Morens, 2006).

1.1.2 IAV-Infektion

Humane Influenza-A-Viren infizieren vor allem den oberen Respirationstrakt. Entsprechend findet die Wirt-zu-Wirt-Übertragung vor allem durch virushaltige Aerosole und Mikrotröpfchen statt (Taubenberger & Morens, 2008). Eines dieser Mikrotröpfchen, verursacht durch Niesen oder Husten, kann bis zu 10.000 Viren beinhalten. Übertragungen durch kontaminierte Oberflächen sind ebenfalls möglich.

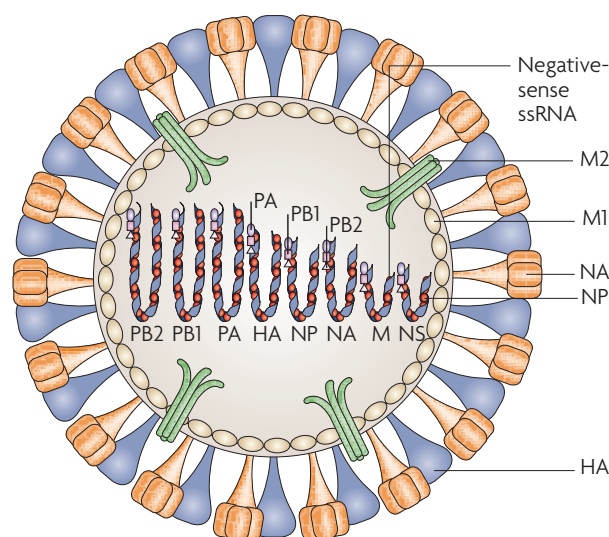


Abbildung 1–1: Schematische Darstellung der Struktur des Influenza-A-Virus. Im Inneren liegen die acht Genomsegmente, umgeben von einer Schicht aus M1-Proteinen, die eine Verknüpfung zwischen den Genomsegmenten und der Lipiddoppelschicht, die sich von der Wirtszelle ableitet, herstellen. In der viralen Membran sind die drei Glykoproteine NA, NP und M2 verankert. Das numerische Verhältnis zwischen HA und NA liegt bei ca. 4:1. Das virale (–)-RNA-Molekül eines jeden Segments, ist von

mehreren NP-Proteinen und einem viralen Polymerase-Komplex, bestehend aus PB1, PB2, und PA, komplexiert und bildet in dieser Gesamtheit ein virales Ribonukleoprotein (vRNP). Diese Abbildung wurde aus (Nelson & Holmes, 2007) übernommen.

Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass wirtszellmembranständige Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie der Epidermal-growth-Factor-Rezeptor (EGFR) an den initialen Mechanismen der IAV-Infektion beteiligt sind (Eierhoff, Hrinčius, Rescher, Ludwig, & Ehrhardt, 2010). Die viralen Nucleokapside (RNA+NP) befinden nach der Virusinternalisierung von zwei Membranen umgeben, der Virusmembran und der Endosomenmembran. Nach Senkung des pH-Werts im späten Endosom verschmilzt, vermittelt durch HA, die Virus- mit der Endosomenmembran und das virale RNA-Genom wird in das Zytoplasma der Wirtszelle freigesetzt. Als eine Besonderheit für ein RNA-Virus findet die Replikation des Genoms im Zellkern und nicht im Zytosol statt. Erst wenn eine ausreichende Anzahl viraler Proteine und Nucleokapside synthetisiert wurde, lagern sich alle acht Segmente an Bereiche der Wirtszellmembran an, an welche bereits eine größere Anzahl viraler Transmembranproteine (HA, NA, M2) inkorporiert wurden. Ein Teil der Wirtszellmembran umschließt diesen Protein- und Genom-Cluster was zur Abschnürung eines neuen Virions führt. Damit die neu gebildeten Viruspartikel nicht auf der Oberfläche bereits infizierter, sterbender Zellen aggregieren, werden die endständigen Sialinsäure-Reste durch das Transmembranprotein Neuraminidase (NA) abgespalten. NA beherbergt eine Sialidase-Funktion, um Sialinsäuren von zellulären Glykoproteinen bzw. Glykolipiden und von viralen Glykoproteinen, die in der Wirtszelle exprimiert und bereits in die Wirtszellmembran inkorporiert wurden, abzuspalten (Palese, Tobita, Ueda, & Compans, 1974)

1.1.3 Genom und Replikation

Als Orthomyxovirus trägt IAV ein segmentiertes, einzelsträngiges RNA-Genom in Negativstrangorientierung (Lamb & Choppin, 1983). Die Segmente sind nach der Anzahl ihrer Aminosäuren geordnet, beginnend mit dem längsten PB2 (**Abbildung 1–3**). Die Segmente 1, 4 und 5 kodieren jeweils für ein Protein (PB2, HA, NP). Die Proteine der Segmente 1-3 (PB2, PB1 und PA) bilden gemeinsam den RNA-abhängigen RNA-Polymerase-Komplex (RdRp) der sowohl die Transkription als auch die Replikation des viralen RNA-Genoms im Kern der Wirtszelle katalysiert.

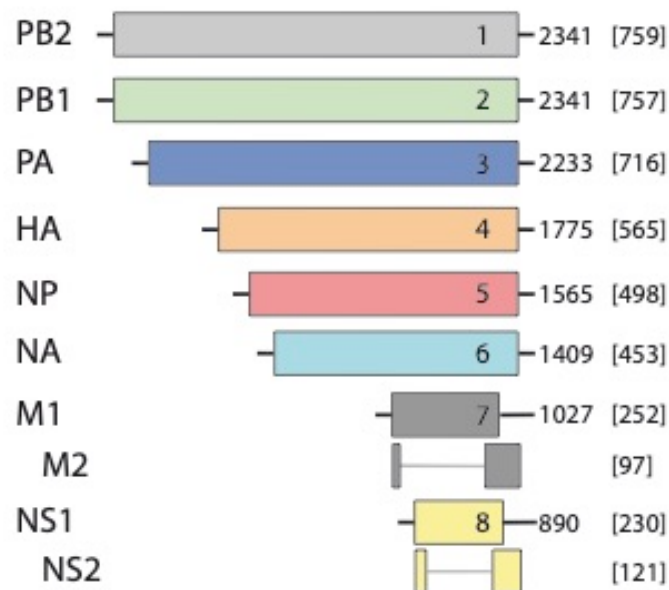


Abbildung 1–3: Schematische Darstellung der Genomorganisation des Influenza-A-Virus (A/WSN/1933(H1N1)). Links der Balken, die die viralen RNA-Segmente repräsentieren, sind die Abgekürzten Bezeichnungen der Proteine, für die das jeweilige Segment kodiert, angegeben. Die Zahlen in den Balken entsprechen der Segmentnummer. Die Zahlen rechts der Balken geben die Anzahl der Nukleotide des Segments an und die Zahlen in den eckigen Klammern entsprechen der Anzahl der Aminosäuren des entsprechenden Proteins.

Die genetische Information für die Proteine M1 und M2 liegt auf Segment 7. Das ungespleißte Transkript dient als Vorlage für die Synthese des M1 Proteins, während das gespleißte Transkript für den Ionenkanal M2 kodiert. Das kleinste Segment, Segment 8, kodiert für die beiden Nichtstrukturproteine NS1 und NS2. Das Spleißprodukt enthält die Nucleotidsequenz für das NS2 Protein, auch Nuclear-Export-Protein (NEP) genannt, und aus der Translation des ungespleißten Transkripts geht NS1 hervor. In den meisten IAV-Stämmen wird durch einen alternativen Leserahmen (+1) im Transkript des zweiten Genomsegments (PB1), das 87 Aminosäuren kurze, akzessorische PB1-F2-Protein synthetisiert (Zamarin, Garcia-Sastre, Xiao, Wang, & Palese, 2005). Auch Segment 3, welches die genetische Information des PA-Proteins enthält, kann durch einen veränderten Leserahmen für drei weitere akzessorische Proteine codieren, über deren genaue Funktionen noch wenig bekannt ist (PA-N182, PA-N155, PA-X) (Jagger et al., 2012; Shi et al., 2012). Jedes Segment besteht aus einem (-)-RNA-Molekül (vRNA), aus argininreichen Nukleoproteinen (NP), welche die vRNA auf ganzer Länge nichtkovalent binden (ca. ein NP pro 12 Nukleotide), und einem heterotrimeren RNA-abhängigen RNA-Polymerase-Komplex (RdRp), bestehend aus dem Polymerase Basic 1 (PB1) Protein, dem Polymerase Basic 2 (PB2) Protein und dem Polymerase Acidic (PA) Protein (Moeller, Kirchdoerfer, Potter, Carragher, & Wilson, 2012), und bilden in dieser Gesamtheit ein virales Ribonukleoprotein (vRNP) (Murti, Webster, & Jones, 1988).

Im Gegensatz zu anderen RNA-Viren replizieren Influenzaviren im Zellkern des Wirts und nicht im Zytoplasma. Nach HA-abhängiger Rezeptorbindung, Virusinternalisierung und Fusion der Virus- mit der Endosomenmembran, müssen die im Zytosol freigesetzten vRNPs in den Zellkern transportiert werden. Als basenreicher (NP-Proteine) Proteinkomplex nutzen vRNPs dabei den zellulären Importin- α -Importin- β -Kernimportweg, um in den Zellkern zu gelangen (Chou et al., 2013; Wu, Sun, & Pante, 2007). Dabei tragen die NP-Proteine die Kern-Lokalisations-Signale (KLS) und sind zur direkten Interaktion mit Importin- α befähigt (Cros, Garcia-Sastre, & Palese, 2005). Im Zellkern ist

der RdRp-Komplex für sowohl die Replikation als auch die Transkription des viralen Genoms zuständig. Bevor mittels Replikation das virale Genom vervielfältigt werden kann, müssen einige virale Proteine (vor allem NP, PB1, PB2 und PA) in ausreichender Menge in der Zelle bzw. dem Zellkern vorliegen. Die Transkription der viralen mRNA (vmRNA) geht von einem cis-aktiven Polymerase-Komplex, der Teil des vRNP ist aus. Der Polymerase-Komplex bindet an Primersequenzen am 3'- und 5'-Ende des vRNA-Moleküls. Diese 13 (5'-Ende) bzw. 12 (3'-Ende) Nukleotide langen RNA-Sequenzen sind in allen acht Genomsegmenten konserviert. Da Influenza-A-Viren für die Produktion ihrer Proteine auf die Translationsmaschinerie der Wirtszelle angewiesen sind müssen die vmRNAs alle Strukturen einer Wirts-RNA, wie 5'-Cap und Poly-A-Schwanz, aufweisen. Jedoch ist keines der Proteine des viralen Polymerase-Komplexes (PB1, PB2, PA) in der Lage, an das 5'-Ende über eine 5'-5'-Brücke einen 7-Methyl-Guanosyl-Rest anzuknüpfen. Möglicherweise um nicht für ein weiteres Protein kodieren zu müssen, welches in der Lage ist eine 5'-Cap aufzubauen, hat die evolutionäre Entwicklung der Influenzaviren den interessanten Mechanismus des sogenannten 5'-Cap-Stehlens (5'-Cap-Snatching) hervorgebracht. Dabei wird die Phosphodiesterbindung nach einem Adenin-Rest in den ersten zehn bis 13 Basen des 5'-Endes der zellulären mRNA inklusive der 5'-Cap, der mit einem Uridin-Rest am 3'-Ende der vRNA eine Basenpaarung eingeht, gespalten. Die freigewordene 3'-OH-Gruppe dient als Primer für die weitere vmRNA-Synthese. Die Initiation der vRNA Transkription erfordert eine direkte Interaktion zwischen dem viralen RdRp-Komplex und der zellulären RNA-Polymerase II (Pol II) (Chan et. al. Mark et. al.). Diese Pol II-abhängige Transkriptionsinitiation ist nötig um den 5'-Cap-RNA-Primer von zellulären prä-mRNAs zu „stehlen“. Dem PB2-Protein wird dabei die Aufgabe zuteil, das 3'-Ende des vRNPs zu binden und in enge Nachbarschaft zum 5'-Ende der zellulären mRNA zu bringen. Das PA-Protein enthält die Nukleaseaktivität, welche die Spaltung der zellulären mRNA katalysiert. Dieser Mechanismus ermöglicht es dem Virus einerseits, dass seine vmRNAs durch zelluläre Ribosomen in virale Proteine übersetzt werden können

und dass andererseits die Proteinsynthese der Wirtszelle entscheidend beeinträchtigt wird. Denn die zellulären mRNAs, denen die 5'-Cap gestohlen wurden, können nicht in ein funktionierendes Protein übersetzt werden. Somit wird der zelluläre Syntheseapparat mehr und mehr in den Dienst des Virus gestellt. Die Elongation der vmRNA wird durch PB1 katalysiert. Der RdRp-Komplex ist außerdem für die Polyadenylierung am 3'-Ende der vmRNAs verantwortlich. Dies geschieht durch wiederholte Dissoziation der Basenpaarungen, zurückgleiten der vRNA und erneuter Basenpaarung mit anschließender Kondensation weiterer ATPs am Poly-U-5'-Ende der vRNA (Poon, Pritlove, Fodor, & Brownlee, 1999; Robertson, Schubert, & Lazzarini, 1981). Da die Transkription der vRNA im Gegensatz zur Replikation primerabhängig verläuft, ist die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Transkriptionsinitiation deutlich höher, als bei der primerunabhängigen Initiation der Replikation. Dadurch wird sichergestellt, dass die viralen Proteine in ausreichender Menge vorliegen, um anschließend die Genomsegmente zu replizieren. Die synthetisierten vmRNAs werden in der Folge ins Zytoplasma geschleust, um in Proteine übersetzt zu werden. Die vmRNAs der membranständigen Proteine HA, NA und M2 werden am rauen ER übersetzt und auf ihrem Transportweg zur Zelloberfläche über das raue Endoplasmatische Retikulum, den Golgi-Apparat sowie das trans-Golgi-Netzwerk glykosyliert und zum Teil palmitoyliert (HA und M2). Die nicht-membranständigen Proteine PB1, PB2, PA, NS2, NS1 und M1 werden mithilfe bestimmter Signalsequenzen in den Zellkern transportiert, um dort die Replikation und Transkription zu orchestrieren (Cros et al., 2005; Huet et al., 2010).

Die Replikation der vRNA läuft in zwei Schritten ab: Zu Beginn des viralen Replikationszyklus dienen die einzelnen vRNAs (negativstrangorientiert) als Matrize, welche durch den viralen RdRp-Komplex vom 3'-Ende beginnend in antigenomische, komplementäre, positivstrangorientierte, virale RNA-Kopien (vcRNA) übersetzt werden (Synthese in 5'-3'-Richtung). Der Promotor der Transkription befindet sich am 3'-Ende der vRNA, upstream des

Transkriptionsstartpunktes und bildet mit dem 5'-Ende Basenpaarungen aus, die den einzelnen Segmenten eine pfannenstielähnliche Struktur verleihen. Anschließend werden die Antigenome (vcRNAs) als Vorlage zur Synthese neuer vRNAs verwendet. Das katalytische Zentrum für die Kondensationsreaktion der rNTPs ist im PB1-Protein des RdRp-Komplexes enthalten. Auch die neusynthetisierten vcRNAs assemblieren unter Bindung von NP-Proteinen und einem heterotrimeren Polymerase-Komplex zu cRNPs, sobald sie den Polymerase-Komplex verlassen. Anschließend erfolgt die Übersetzung der Antigenome (vcRNA) in virale Genome (vRNA), gefolgt von der Komplexierung der neuen RNA-Moleküle mit NP-Proteinen und einem Polymerase-Komplex unter Ausbildung von vRNPs. Die vRNPs werden anschließend von M1-Proteinen komplexiert und mithilfe von NS2- und zellulären Proteinen aus dem Zellkern geschleust (York & Fodor, 2013). Im weiteren Verlauf werden diese Komplexe an speziellen Mikrodomänen in der Lipiddoppelschicht der Wirtszelle (lipid-rafts) angereichert, an denen eine erhöhte Anzahl an viralen Transmembranproteinen (HA, NA, M2) vorliegt. Die vRNPs werden, vermittelt über M1-Proteine, mit den intrazellulären Domänen der Proteine HA, NA und M2 assoziiert. Ausgehend von diesen Strukturen werden dann die neuen Virionen von der Wirtszelle abgeschnürt (Budding) (Dou, Revol, Ostbye, Wang, & Daniels, 2018). Noch ist nicht geklärt wie die vRNPs zur Zytoplasmamembran gelangen. Experimente konnten zeigen, dass das zelluläre Protein Rab11 an PB2 bindet und am Durchschleusen der vRNPs zur Plasmamembran involviert ist. Außerdem gilt es noch zu klären, welche Mechanismen dafür verantwortlich sind, dass alle acht Segmente in das neue Virion eingebracht werden. Die acht vRNPs nehmen innerhalb der Virushülle, durch Wechselwirkungen mit M1 und untereinander, eine 7+1 Konformation ein (Noda et al., 2018). Es wird vorgeschlagen, dass diese 7+1 Konformation eine mechanistische Funktion hat, da auch IVC und IVD eine solche 7+1 Struktur aufweisen, obwohl deren Genom aus nur sieben Segmenten besteht (Nakatsu et al., 2018; Noda et al., 2018).

1.1.4 Hämagglutinin (HA)

1.1.4.1 Struktur

Wilson et. al. gelang es 1981 erstmals, die dreidimensionale Struktur der Ektodomäne des HA-Proteins, in der proteolytisch aktivierten Form (HA1-HA2), mittels Röntgenstrukturanalyse aufzuklären (Wilson, Skehel, & Wiley, 1981). Seither wurde dessen Struktur und Funktion ausgiebig untersucht und auch die Kristallstruktur der ungespaltenen Form (HA0) und der Postfusionskonformation sind inzwischen aufgeklärt.

HA ist ein trimeres Glykoprotein, das aus drei identischen Monomeren mit jeweils 560 Aminosäuren (HA0) besteht. Um seine fusogene Aktivität ausüben zu können, muss jedes der drei Monomere proteolytisch in HA1 und HA2 gespalten werden. Strukturell besteht HA aus einer Stamm-Region, aufgebaut aus drei α -Helices (je eine Helix pro Monomer), die eine Doppelwendel (coiled-coil) bilden, und einem globulären Kopf der die Rezeptorbindedomäne (RBD) am distalen Ende enthält (**Abbildung 1–4**).

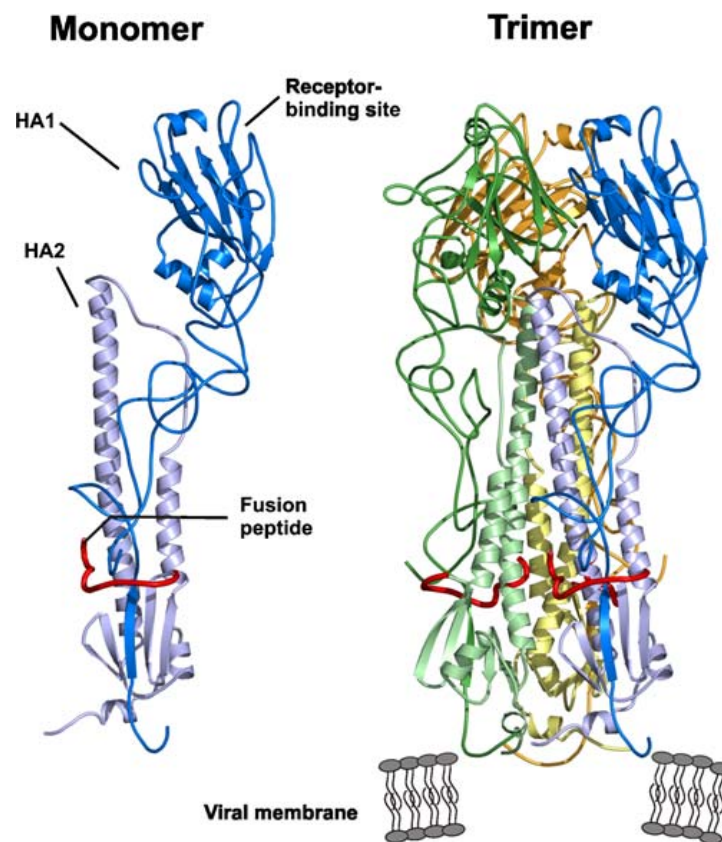


Abbildung 1–4: Schematische Darstellung der Struktur des IAV-HA in seiner proteolytisch aktivierten Form. Die Darstellung dieser dreidimensionalen Struktur basiert auf dem PDB Eintrag 3HMG. Die linke Seite zeigt das Monomer, die rechte Seite das Trimer. Die Orientierung bezogen auf die Virusmembran ist im Trimer angedeutet. In der Darstellung des Monomers ist die Rezeptorbindedomäne (RBD) angezeigt. Diese Abbildung wurde aus (Amorij, Huckriede, Wilschut, Frijlink, & Hinrichs, 2008) übernommen.

Am proximalen Ende der Stamm-Domäne bildet ein globulärer Abschnitt die Basis des Stamms. Die Stamm-Domäne ist aus Proteinsequenzen der HA2-Untereinheiten aufgebaut, die distale Kopfdomäne wird nur von der HA1-Untereinheit gebildet (Rosenthal et al., 1998). Die Stamm-Domäne ist wichtig für die Stabilität des Trimers und für eine feste Verankerung des Proteins in der Zellmembran und ist auch bei Fusionsproteinen anderer Viren, wie Ebola oder

HIV, ein wichtiges Strukturelement (Weissenhorn et al., 1996). Während die RBD ein Teil von HA1 ist enthält HA2 die Transmembrandomäne (TMD), eine Abfolge unpolarer Aminosäuren, die HA in der Virusmembran verankern, und das Fusionspeptid (FP). Das FP wird nach der proteolytischen Aktivierung am N-Terminus von HA2 freigelegt, umfasst eine Abfolge von etwa 20-25 Aminosäuren mit hydrophobem Charakter und ist in der Lage, die Endosomenmembran zu penetrieren, um die Fusion dieser mit der Virusmembran zu initiieren. Nach der proteolytischen Spaltung wird das Fusionspeptid in einer hydrophoben Tasche beherbergt. Diese Tasche wird durch ein leichtes Auseinanderdriften der α -Helices an den C-terminalen Enden der drei HA2-Untereinheiten gebildet. Ein weiteres wichtiges Strukturelement ist die sogenannte B-Schleife (B-Loop). Die B-Schleife stellt eine wichtige Verbindung zwischen der kleinen und der großen α -Helix innerhalb von HA2 dar. Während des Fusionsprozesses wandelt sich die B-Schleife in eine α -Helix und die kurze Helix in eine Schleife um. Diese beachtlichen strukturellen Umwandlungen gewähren, dass die beiden Membranen nah zueinander geführt werden (Wiley & Skehel, 1987).

1.1.4.2 Expression und Spaltung

Wie jedes andere Transmembranprotein wird auch das virale Glykoprotein HA (und auch NA und M2) über das Endoplasmatische Retikulum (ER) und das Golgi-Netzwerk zur Zellmembran der infizierten Zelle transportiert (Copeland, Doms, Bolzau, Webster, & Helenius, 1986) (Copeland et al., 1988). Bei der Synthese von HA0 wird, nachdem die wachsende Aminosäurekette ins ER transportiert wurde, das nahe am N-Terminus gelegene Signalpeptid abgespalten. Nach der Trimerisierung im Golgi-Apparat wird HA durch o-Glykosylierungen und Palmitoylierungen posttranslational modifiziert. Das Glykosylierungsmuster ist dabei unter anderem von der Enzymausstattung der infizierten Zelle und der Proteinsequenz von HA abhängig. Das Anfügen der

Palmitoyl-Reste erfolgt nahe des Fusionspeptids, am carboxyterminalen Ende der Peptidkette. Die unpolare, langkettige Struktur des Palmitoyl-Rests ist essentiell für eine feste Verankerung von HA in der Zellmembran. Auch der Ort der Inkorporation von HA in die Wirtszellmembran spielt eine Rolle für die spätere Fusion der viralen mit der endosomalen Membran. Nur wenn die Transmembrandomäne des HA in sogenannten Lipid-rafts verankert ist, ist die Protein-Membran-Verknüpfung stabil genug (Scheiffele, Roth, & Simons, 1997) (J. Zhang, Pekosz, & Lamb, 2000). Lipid-rafts sind Mikrodomänen in der Zellmembran, die eine spezielle Lipidzusammensetzung aufweisen und sich durch einen erhöhten Cholesterin- und Glykolipidgehalt auszeichnen. Dabei spielen die Lipid-Modifikationen an Cystein-Resten am C-Terminus von HA eine Rolle für die richtige Lokalisation von HA in der Zellmembran (Takeda, Leser, Russell, & Lamb, 2003; Zurcher, Luo, & Palese, 1994). Das HA-Protein liegt als typisches Fusionsprotein der Klasse I zunächst als inaktive Vorstufe (HA0) vor. Zur Aktivierung muss HA0 durch Trypsin-ähnliche Proteasen, die intra- und extrazellulär vorkommen können, in HA1 (N-terminal) und HA2 (C-terminal) unter Abspaltung eines Arginin-Restes vom C-terminalen Ende von HA1 gespalten werden (E. Bottcher et al., 2006) (Steinhauer, 1999) (Rott, 1992) (Fass, 2003).

Tabelle 1–2: Übersicht über unterschiedliche intra- und extrazelluläre Proteasen und deren Vorkommen, die in der Lage sind HA0 in HA1/HA2 zu aktivieren.

Protease	Vertreter	Vorkommen	Intra-/Extrazellulär
Subtilisin-ähnliche Proteasen	Furin-Protease PC 6	Golgi-Vesikel	intrazellulär
Trypsin-ähnliche Proteasen (Serin-Proteasen)	Mini-Plasmin Clara Serin-Protease-Typ II HAT TMPRSS2 Xa-ähnliche Proteasen	Lungenepithelzellen von Menschen und Vögel Golgi-Netzwerk GIT von Vögel	extrazellulär intrazellulär extrazellulär

Die Untereinheiten HA1 und HA2 bleiben über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Die Spaltung in HA1 und HA2 ist essentiell für die Funktionsfähigkeit des Proteins, und die Beschaffenheit der Spaltstelle stellt einen Pathogenitätsfaktor dar. Durch die Spaltung wird am N-terminalen Ende von HA2 eine Abfolge unpolarer, hydrophober Aminosäuren zugänglich die in der Lage ist, die Endosomenmembran zu penetrieren und so die Fusion der Virusmembran mit dieser zu initiieren (FP). In **Tabelle 1-2** sind verschiedene Endoproteasen, die in der Lage sind HA0 zu spalten, und ihr Vorkommen aufgelistet (J. Chen et al., 1998) (E. Bottcher et al., 2006). Welche Endoprotease die höchste Affinität für die Spaltstelle in HA0, hat ist abhängig von der Aminosäuresequenz im Bereich der Proteolysestelle. Die Aminosäuresequenz im Bereich der Proteolysestelle definiert folglich auch, ob HA0 intra- oder extrazellulär gespalten wird. Eine intrazelluläre Spaltung von HA0, z.B. im Golgi-Vesikel bedeutet, dass das neu abgeschnúrte Virion sofort infektiös ist. Ist die Affinität der intrazellulären Proteasen für die Spaltstelle nicht ausreichend, werden inaktive HA0-Proteine in die Virusmembran inkorporiert

und das Virion muss auf seinem Weg zur oder auf der Wirtszelle durch entsprechende Proteasen aktiviert werden. Eine Häufung basischer Aminosäuren mit der Sequenz Arginin-X-Arginin/Lysin-Arginin in der Spaltstelle (polybasiische Spaltstelle), bedeuten eine hohe Affinität der intrazellulären Furin-Proteasen und der Subtilisin-ähnlichen Proteasen. Folglich haben neu abgeschnürte Virionen mit jener Aminosäuresequenz ein funktionsfähiges, infektiöses HA, bestehend aus HA1 und HA2. Die polybasiische Spaltstelle konnte beispielsweise in den aviären Influenzastämmen H5 und H7, die sich durch eine hohe Pathogenität auszeichneten, nachgewiesen werden (Bosch, Garten, Klenk, & Rott, 1981) (Garten, Bosch, Linder, Rott, & Klenk, 1981) (J. Chen et al., 1998). Andererseits haben die humanpathogenen IAVs die H1, H2 oder H3 tragen eine monobasiische Spaltstelle (z.B. Glutamin/Glutaminsäure-X-Arginin). Viren die ein HA mit monobasiischer Spaltstelle tragen werden erst extrazellulär aktiviert (z.B. durch die Clara-Protease) und sind nicht sofort nach der Abschnürung von der Wirtszelle infektiös (Horimoto & Kawaoka, 2005) (Klenk, Rott, & Orlich, 1977) (Klenk, Rott, Orlich, & Blodorn, 1975). M2-Proteine, die in die Membran der Golgi-Vesikel integriert sind, verhindern durch Regulation der H⁺-Konzentrationen eine vorzeitige Änderung der Konformation bereits gespaltener HA-Proteine (Dou et al., 2018). Das zeigt, dass die Pathogenität nicht nur vom IAV-Subtyp, sondern auch von Eigenschaften des Wirts abhängt. Außerdem können bereits bestehende virale oder bakterielle Infektionen dazu führen, dass Enzyme wie Thrombin und Plasmin, die in der Lage sind HA zu spalten, verstärkt aktiv sind und die IAV-Pathogenität weiter steigern (Steinhauer, 1999).

1.1.4.3 Rezeptorbindung

Dem HA-Trimer wird die wichtige Aufgabe zuteil, den Erstkontakt zur Zielzelle herzustellen und darüber hinaus durch seine fusogene Aktivität, die Virushüllmembran mit der Endosomenmembran zu verschmelzen, um das Virusgenom samt Begleitproteine in die Wirtszelle zu schleusen. Während HA2 das Fusionspeptid enthält beherbergt HA1 eine globuläre Domäne, die an endständige N-Acetylneuraminsäure-Reste (Sialinsäuren) bindet, und so für die Virusadsorption an der Außenseite der Zielzelle sorgt. Wie die kristallografischen Analysen von Wilson et. al. zeigen konnten, besteht die globuläre Domäne aus acht antiparallelen β -Faltblätter (Wilson et al., 1981). Die Sialinsäure dient als Zuckermodifikation von Protein- bzw. Lipidresten auf der Außenseite von Zellmembranen. Die Qualität der Interaktion zwischen den Aminosäuren, die die globuläre Domäne in HA1 bilden, und des endständigen N-Acetylneuraminsäure-Rests ist abhängig von der Bindungsart zwischen der Sialinsäure und dem vorletzten Zucker (Galactose) dieser Glykosylseitenkette (**Abbildung 1–5**). Dieser Sachverhalt spielt eine entscheidende Rolle für den Wirtstropismus und eventuelle zoonotische Übertragungswege. Es wurde gezeigt, dass die Aminosäuren an Position 190, 226 und 228 eine besonders wichtige Rolle für die Rezeptorspezifität spielen (Connor, Kawaoka, Webster, & Paulson, 1994) (Nobusawa, Ishihara, Morishita, Sato, & Nakajima, 2000). Hämagglutinine, die an Aminoäureposition 226 ein Leucin- und an Position 228 ein Serin-Rest tragen, binden bevorzugt an Sialinsäure-Reste, die über eine α -2,6-glycosidische Bindung mit Galactose (SA-2,6-Gal) verknüpft sind. Wird jedoch Leucin durch Glutamin oder Serin durch Glycin ersetzt, wird die Bindung an N-Acetylneuraminsäure (NAc-NA), die α -2,3-glycosidisch an Galactose gebunden ist (SA-2,6-Gal), bevorzugt.

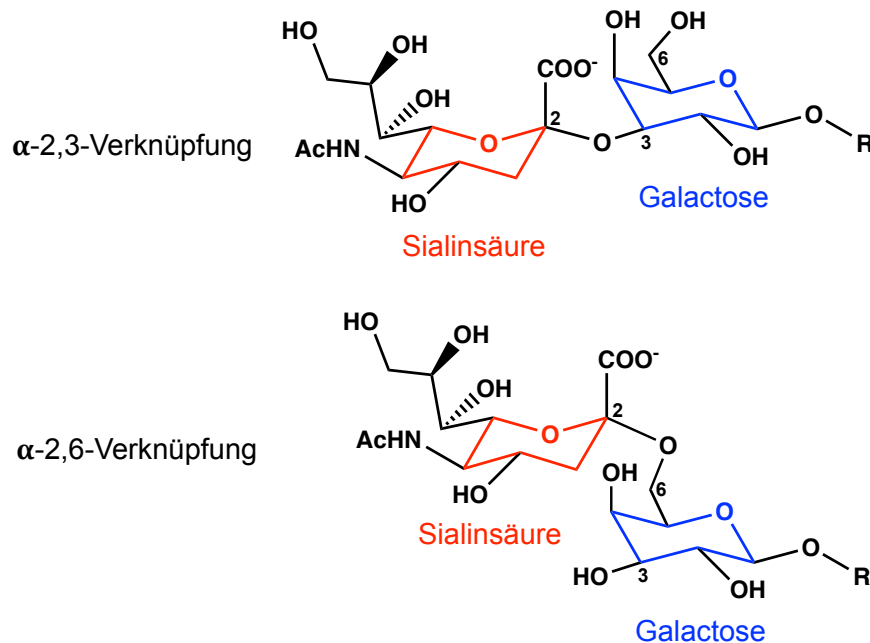


Abbildung 1–5: Darstellung der α -2,3- und α -2,6-glycosidischen Verknüpfung des N-Acetylsialyl-Rests mit dem Galactosyl-Rest.

Interessanterweise sind weder Aminosäure 226 noch 228 Teil der Bindungstasche in HA1, scheinen aber entscheidenden Einfluss auf die Konformation dieser zu nehmen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Bindungstasche für Antikörper unzugänglich ist, was bedeutet, dass die Bindungsstelle für den zellulären Rezeptor keinem Selektionsdruck durch Antikörper ausgesetzt ist. Die der Bindungstasche angrenzenden Proteinbereiche stellen allerdings B-Zell-Epitope dar (Krause et al., 2011; Wei et al., 2010). Die alleinige Bindung von HA an Sialinsäure-Rezeptoren scheint jedoch nicht ausreichend zu sein, um die nötigen Prozesse, die eine Virusinternalisierung ermöglichen, zu triggern. Experimente deuten auf die Beteiligung verschiedener Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) wie der Epidermal-growth-Factor-Rezeptor (EGFR) hin, die bei der Internalisierung des rezeptorgebundenen Virus eine Rolle spielen. RTKs kommen in Gangliosid M1 reichen lipid-rafts auf der Wirtszellmembran vor. Sowohl RTKs als auch

Gangliosid M1 tragen 2,3- oder 2,6-verknüpfte Sialinsäure-Reste (Cummings, Soderquist, & Carpenter, 1985) (H. Y. Yen et al., 2015). Durch Bindung mehrerer HAs eines IAV-Virions an mehrere RTKs kommt es zum Zusammenclustern mehrerer RTKs, was zur Aktivierung der intrinsischen Kinaseaktivität führt und schließlich die Signalkaskade für die Virusaufnahme durch Endozytose auslöst (Eierhoff et al., 2010). Allerdings gibt es auch Beispiele für IAV-Infektionen von Zellen die den entsprechenden Rezeptor nicht auf ihrer Oberfläche tragen (Glaser, Conenello, Paulson, & Palese, 2007) (Hsu, Barr, Hansbro, & Wark, 2011). Möglicherweise gibt es neben Sialinsäure-Resten weitere funktionelle Strukturen, die als Rezeptor für das HA-Protein des Influenza-A-Virus dienen können (Nunes-Correia, Eulalio, Nir, & Pedrosa de Lima, 2004) (Rapoport, Mochalova, Gabius, Romanova, & Bovin, 2006) (Mair, Ludwig, Herrmann, & Sieben, 2014).

1.1.4.4 Membranfusion

Neben der Rezeptorbindung ist HA dazu befähigt, durch enorme strukturelle Änderungen, die Fusion zweier Lipiddoppelmembranen zu katalysieren. Das spontane Vermischen zweier Phospholipiddoppelschichten ist zwar thermodynamisch begünstigt, jedoch durch eine hohe, kinetische Barriere gehindert. Fusionsproteine wie HA sind in der Lage, diese Aktivierungsenergie bereitzustellen. Der Fusionsvorgang verläuft über eine Zwischenstufe, in der erst nur die beiden äußeren Hälften je einer Doppelmembran, die sich direkt gegenüberstehen, miteinander vermischen (Hemifusion). Die für die Fusion benötigte freie Energie wird freigesetzt, wenn HA aus seiner energiereichen, metastabilen Präfusionskonformation in die thermodynamisch stabile, energiearme Postfusionskonformation übergeht (Harrison, 2008). Wieso HA bei seiner ribosomalen Synthese nicht sofort den thermodynamisch stabilen Postfusionszustand einnimmt, sondern als metastabiles Protein synthetisiert wird, ist noch immer ein Rätsel. Es gilt zu beachten, dass erst nach der

proteolytischen Spaltung von HA0 in HA1 und HA2 die metastabile Präfusionskonformation vorliegt. Als gesichert gilt, dass wie bei allen, in eukaryontischen Zellen synthetisierten Proteinen, zelluläre Chaperone an diesem Vorgang beteiligt sind (Copeland et al., 1986). Die HA vermittelte Membranfusion ist nur durch drastische strukturelle Veränderungen in HA1 und HA2 möglich. Dank der Arbeiten von Wiley, Wilson und Skehel sind die Kristallstrukturen von HA0 und HA1-HA2 (hier Prä- und Postfusionskonformation) seit langem bekannt. Die Veränderungen innerhalb des trimeren HA-Proteins und die Strukturen des Prä- und Postfusionszustands sind in **Abbildung 1–6** dargestellt. HA1 sitzt wie eine Klammer auf HA2 und verhindert durch spezielle, nichtkovalente Wechselwirkungen (vor allem ionische Wechselwirkungen und H-Brücken-Bindungen) innerhalb des Trimers und zwischen den Untereinheiten, dass es zu einer verfrühten Umstrukturierung innerhalb der HA2-Untereinheit kommt. Nach Absenkung des pH-Wertes auf Werte zwischen 5,0 und 6,0 im späten Endosom werden durch Protonierung bestimmter Aminosäure-Reste diese stabilisierenden Wechselwirkungen zwischen HA1 und HA2 gelöst und Wassermoleküle können mit Proteinsequenzen wechselwirken, die zuvor nicht zugänglich waren (C. Bottcher, Ludwig, Herrmann, van Heel, & Stark, 1999; Huang, Opitz, Knapp, & Herrmann, 2002) (Huang et al., 2003).

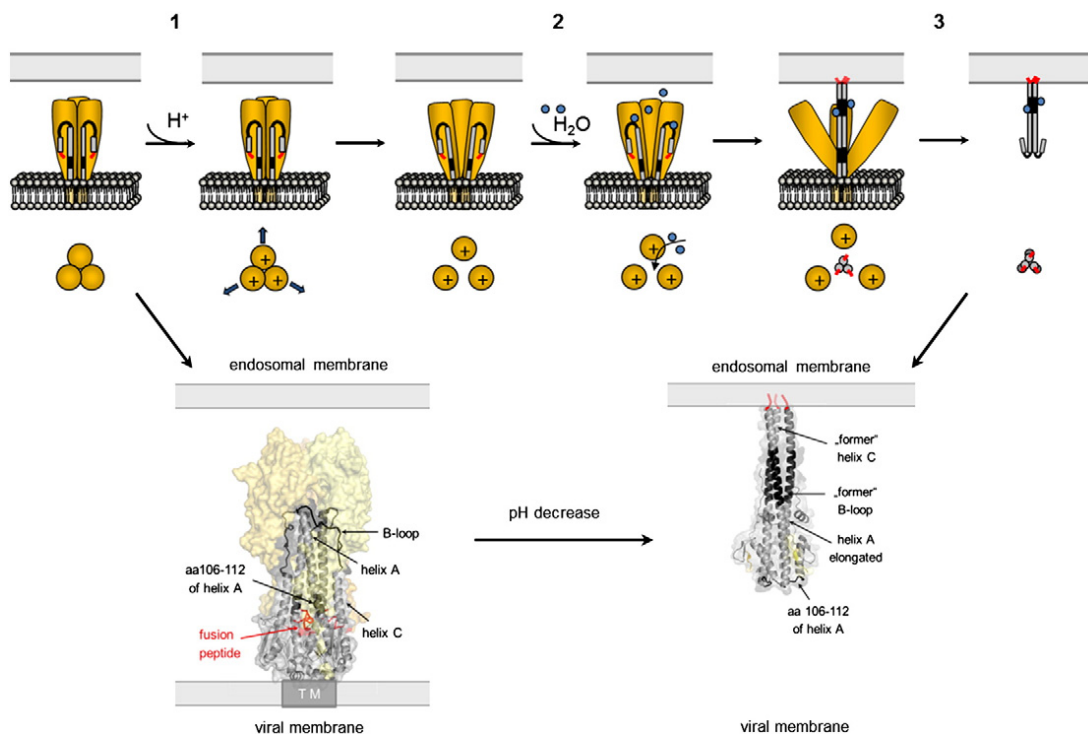


Abbildung 1–6: Die Abbildung zeigt die Konformationsänderungen innerhalb des IAV HA-Proteins, während der Membranfusion nach Erhöhung der Protonenkonzentration im Endosom. Im oberen Teil der Abbildung sind die Änderungen der Proteinstruktur innerhalb des HA-Trimers unter dem Einfluss der H^+ -Ionen, dargestellt (HA1 in gelb, HA2 in grau und schwarz sowie das Fusionspeptid in rot). Die H^+ -Ionen führen zu einer Veränderung der ionischen Struktur und folglich zu einer Dissoziation der HA1 Untereinheiten (1). Aufgrund der Dissoziation der HA1-Untereinheiten kommt es zur Anlagerung von Wassermolekülen an Proteindomänen, die zuvor nicht zugänglich waren, was zur Umwandlung der B-Schleife in eine α -Helix unter Freisetzung des Fusionspeptids führt. Das freigesetzte Fusionspeptid penetriert die Endosomenmembran (2). Im nächsten Schritt lagern sich die Aminosäure-Reste der Positionen 106-112, der Helix A zu einer Schleife um was die beiden Lipiddoppelschichten nah zueinander führt und die Fusion der beiden einleitet. Die Konformation, die HA am Ende dieser Umlagerung annimmt, wird auch Haarnadelkonformation genannt (3). Der untere Teil der Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der Struktur des IAV-HA in seiner proteolytisch aktivierten Form bei neutralem (links, PDB Eintrag 2YPG) und

erniedrigtem pH (rechts, PDB Eintrag 1HTM). TM steht für die Transmembranregion des HA-Proteins. Übernommen aus (Mair et al., 2014).

HA1 und HA2 eines jeden Monomers bleiben über eine Disulfidbrücke nahe des C-Terminus locker miteinander verbunden. Die B-Schleifen eines jeden Monomers gehen in eine α -helicale Konformation über und eine verlängerte Doppelwendel bildet sich aus (extended coiled-coil intermediate) (Huang et al., 2003). Anschließend kommt es zu einer Umstrukturierung der kurzen Helix in eine Schleife, das Fusionspeptid wird in Richtung Endosomenmembran getrieben und in dieser verankert. Im nächsten Schritt kollabiert diese lineare Struktur und bringt den N-terminalen Anteil des Doppelwendel von HA2 nah an den C-terminalen Teil dieser Doppelwendel unter Ausbildung eines Bündel, das aus sechs α -Helices besteht (6-Helix-Bündel), und in Folge dieser Strukturänderungen werden das Fusionspeptid und die Transmembrandomäne nah zueinander geführt. Bei der Ausbildung dieser haarnadelähnlichen Struktur werden die beiden Membranen so nah zueinander geführt, dass es unter Vermischung der beiden Lipidschichten zur Fusion kommt (Huang et al., 2002) (Huang, Korte, Rachakonda, Knapp, & Herrmann, 2009) (C. Bottcher et al., 1999; Harrison, 2008) (Fontana, Cardone, Heymann, Winkler, & Steven, 2012). Der Beitrag des HAs zur Pathogenität und Wirtsadaptation verschiedener IAV-Subtypen wird neben der Rezeptorpräferenz und der Beschaffenheit der Spaltstelle auch von dessen pH-Stabilität beeinflusst. Für eine erfolgreiche Infektion müssen mehrere Prozesse zwischen Virus und Wirt fein abgestimmt sein. Auch der Zeitpunkt der Freisetzung der vRNPs aus dem Endosom in das Zytosol ist mitentscheidend für eine erfolgreiche Replikation in der Wirtszelle. Eine zu frühe Freisetzung der vRNPs in das Zytosol birgt die Gefahr einer Erkennung der viralen Strukturen durch die Immunabwehr des Wirts, bevor das Virusgenom den Wirtszellkern erreicht. Findet die Fusion zu spät statt, droht der Abbau der viralen Strukturen im

Lysosom (Lozach, Huotari, & Helenius, 2011). Experimente zeigten, dass IAV-Mutanten, die ein pH-stabileres HA-Protein tragen, nur in Mäusen, aber nicht in Enten zur Replikation befähigt sind. Allgemein wurde beobachtet, dass HAs humanadaptierter IAVs eine höhere pH-Stabilität aufweisen als die HAs aviärer IAVs (Zaraket, Bridges, & Russell, 2013) (Reed et al., 2010) (Mair et al., 2014).

1.1.4.5 N-Glykosylierung

Ein weiterer, wichtiger Faktor, der unter anderem die Rezeptorinteraktion, die Antigenstruktur, die Interaktion mit Antikörpern und die korrekte dreidimensionale Faltung der viralen Glykoproteine HA und NA beeinflusst, ist deren N-Glykosylierungsmuster. Zusätzlich modulieren Zuckermodifikationen die HA-Aktivität und nehmen somit Einfluss auf die Virulenz des Influenza-A-Virus. Die viralen Proteine HA und NA werden auf ihrem Weg zur Zellmembran durch das raue ER und das trans-Golgi-Netzwerk durch Oligosaccharyl-Transferasen glykosyliert. Die N-Glykosylierung findet im ER statt. Nachdem Lipid-vermittelt Monosaccharide zu Glykanen synthetisiert wurden, werden diese durch Oligosaccharyl-Transferasen an Asparagin-Reste der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr (X kann jede Aminosäure außer Prolin sein) gebunden (Schwarz & Aebi, 2011). Die N-verknüpften Glykane sind wichtig für das korrekte Falten der dreidimensionalen Struktur der Proteine, da sie die Löslichkeit und die Rekrutierung von Lektin-Chaperonen wie Calnexin und Calretikulin beeinflussen (Hebert, Zhang, Chen, Foellmer, & Helenius, 1997) (Daniels, Kurowski, Johnson, & Hebert, 2003). Trotz bekannter Aminosäuresequenzen der Proteine ist eine genaue Vorhersage des jeweiligen N-Glykosylierungsmusters schwierig. Zum einen nimmt die wirtsspezifische Ausstattung an Oligosaccharyl-Transferasen Einfluss auf die Art der angehängten Zuckerketten, zum anderen gibt es noch nicht ganz aufgeklärte virusstamm- und wirtsspezifische Eigenschaften, die die Anzahl der N-Glykosylierungen beeinflussen. So werden oftmals nur bestimmte und nicht alle

möglichen Asn-X-Ser/Thr-Sequenzen N-glykosyliert (Wei et al., 2010),(Sun, Wang, Zhao, Chen, & Li, 2011),(Sun, Wang, Zhao, Chen, & Li, 2012). Experimente zeigten, dass die Glykosylierung aller fünf möglichen Asparagin-Reste im globulären Kopf des H1N1-IAV die virale Fitness signifikant senkte (Das et al., 2010) (Das et al., 2011). N-verknüpfte Oligosaccharidketten kommen sowohl am globulären Kopf als auch an der Stamm-Region von HA vor. Am globulären Kopf beeinflusst die Anzahl und Position der Zuckermodifikationen die Interaktion mit dem zellulären Rezeptor und mit Antikörpern des Wirtsimmunsystems (Wei et al., 2010) (C. C. Wang et al., 2009). HA hat nachweislich eine große Immunogenität, vor allem die globuläre Domäne von HA ist in der Lage eine Immunantwort auszulösen, die zur Produktion neutralisierender Antikörper mit langanhaltendem immunologischen Gedächtnis gegen diese spezifische Antigenstruktur führt (Gerhard, 2001). Die Proteinsequenz und Antigenstruktur der Stammregion von HA ist zwar weitaus konservierter als die des variablen, globulären Kopfes, jedoch ist der HA-Stamm deutlich weniger immunogen. Letztlich ist die Variation der Anzahl der N-verknüpften Glykane am globulären Kopf eine Möglichkeit des Virus die Affinität der anti-HA-Antikörper und im Allgemeinen die Variabilität der Antigenstruktur zu beeinflussen. Es ermöglicht dem Virus durch Senkung der Antikörperaffinität für seine Antigene der Wirtsimmunantwort zu entgehen (C. C. Wang et al., 2009; Wei et al., 2010) (O'Donnell et al., 2012) (Skehel et al., 1984). Zusätzlich adaptiert das Virus Zuckerstrukturen der Wirtszelle und präsentiert den Zellen des Immunsystems ihnen bekannte Strukturen, was einer Aktivierung dieser Immunzellen entgegenwirkt (Vigerust & Shepherd, 2007). Andererseits gibt es Arbeiten die den Verlust von Glykanen mit einer erhöhten Resistenz gegen Surfactant Protein-D und C-Typ Lektinen in Mäusen korreliert (Reading et al., 2009; Tate, Brooks, & Reading, 2011), was auf einen komplexen, multifaktoriellen Zusammenhang zwischen Pathogen und verschiedenen Immunfaktoren hindeutet, der einer sehr feinen Modulation bedarf.

Allein aus sterischen Gesichtspunkten ist es nachvollziehbar, dass das Anhängen großer Zuckermoleküle in der Nähe der RBT von HA Einfluss auf die Rezeptorbindung hat (Ohuchi, Ohuchi, Feldmann, & Klenk, 1997) (Das et al., 2011) (Schwarz & Aebi, 2011; Wagner, Wolff, Herwig, Pleschka, & Klenk, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass das Entfernen aller N-verknüpften Glykane an der HA Kopfreion eine Attenuierung des Virus zur Folge hatte, was durch ein Ungleichgewicht zwischen der HA und NA Aktivität und einer daraus resultierenden verminderten Virusfreisetzung erklärt wurde (Wagner et al., 2000). Durch die verbesserte Zugänglichkeit der RBT war die Rezeptor-HA-Bindung verstärkt. Des Weiteren scheint das Glykosylierungsmuster der Kopfdomäne die Rezeptorpräferenz und somit auch die Transmission beeinflussen zu können (Connor et al., 1994) (Y. Gao et al., 2009; W. Wang et al., 2010).

Zusammengefasst ist die örtliche und numerische Variabilität an N-verknüpften Zuckermodifikationen eine wichtige Möglichkeit des IAV, sich an diverse wirtsspezifische Anforderungen anzupassen. Im Vordergrund scheint die Balance zwischen einer Minderung der Antikörperbindung an die Kopfdomäne von HA, durch die Einführung von Glykanen und der verringerten viralen Fitness durch zu viele Glykane an jenem Strukturmotiv zu stehen (Krause et al., 2011) (J. I. Kim & Park, 2012).

1.1.5 Wirtstropismus

Der Wirtstropismus wird durch zahlreiche virale aber auch wirtszellspezifische Eigenschaften beeinflusst, von denen viele noch nicht ausreichend untersucht wurden. So spielen die intra- wie auch die extrazelluläre Proteinausstattung des Wirtsorganismus für sowohl die initiale Virus-Zell-Interaktion, für die Infektion, als auch für eine erfolgreiche Synthese viraler Proteine in der Wirtszelle und für die Assemblierung und Freisetzung neuer infektiöser Virionen eine große Rolle. Dabei hat das virale HA-Protein einen besonderen Einfluss auf den

Wirtstropismus, da dieses mit seiner RBT in der globulären Domäne von HA1 den initialen Virus-Zell-Kontakt an N-Acetylneuraminsäuren herstellt. Die Sialinsäurederivate sind meist entweder über α -2,3- oder α -2,6-glykosidische Bindung mit einem weiteren Zuckerrest (meist Galactose) verknüpft. Diese Unterschiede in der glykosidischen Verknüpfung sind von großer Bedeutung, da verschiedene HA-Subtypen meist einer dieser glykosidischen Verknüpfungen bevorzugt bindet.

Auch wenn es Arbeiten gibt die zeigen, dass manche HAs keine Affinitätsunterschiede zwischen SA-2,3-Gal und SA-2,6-Gal aufweisen, werden diese spezies- und zellspezifische Varianten in der Glycosylierungsarchitektur als entscheidend für den variierenden Tropismus zwischen verschiedenen IAV-Subtypen anerkannt. Muzine zum Beispiel stellen hochglykosylierte Proteine dar, die von Becherzellen und Epithelzellen im luftleitenden Abschnitt des menschlichen Respirationstrakts zum Schutz sezerniert werden. Die in den Muzinen enthaltenen, endständigen Sialinsäuren sind vorwiegend α -2,3-glykosidisch verknüpft. IAV-Subtypen, die an jene 2,3-verknüpften Sialinsäuren bevorzugt binden, bleiben deshalb im Schleim hängen und erreichen nicht, bzw. mit geringerer Wahrscheinlichkeit, die Zellen des Lungen- oder Bronchialepithels. Entsprechend findet man bei humanpathogenen Influenzaviren einen Selektionsdruck, der Subtypen mit HAs, die an 2,6-verknüpfte Sialylsäuren binden (H1, H2, H3) bevorteilt (Ito, Suzuki, Mitnaul, et al., 1997) (Ito, Suzuki, Takada, et al., 1997) (Ryan-Poirier et al., 1998). Infektionen von Menschen mit hochpathogenen aviären IAVs (HPAI) verursachten meist Infektionen des unteren Respirationstraktes. In diesem exprimieren die Zellen des Epithels bevorzugt SA-2,3-Gal, also jene Verknüpfung die von aviären HAs mit höherer Affinität gebunden werden (van Riel et al., 2006) (van Riel et al., 2007). Bei Vögeln ist der Sachverhalt genau umgekehrt. Die schützende Schleimschicht des Magen-Darm-Traktes der Vögel enthält vor allem SA-2,6-Gal Verknüpfungen an den endständigen Sialinsäuren, während die entsprechenden Epithelzellen SA-2,3-Gal aufweisen (Ito, Suzuki, Mitnaul, et al., 1997) (Ito, Suzuki, Takada, et al., 1997) (Ryan-Poirier et al.,

1998) (Baum & Paulson, 1990) (Rogers & Paulson, 1983). Dabei scheint die Aminosäure an Position 226 von HA eine entscheidende Rolle bei der Bindungsspezifität zu spielen. So bindet HA mit einem Leucin-Rest an Position 226 bevorzugt an die α -2,6-verknüpfte Sialinsäure, während eine Glutaminsäure an selbiger Position eine höhere Bindungsaffinität zu 2,3-verknüpften Sialinsäuren aufweist (Rogers & D'Souza, 1989) (Connor et al., 1994). Den pandemischen IAVs H1N1 (1918), H2N2 (1957), H3N2 (1968) und H1N1 (2009) konnten Mutationen in der RBT nachgewiesen werden, die die Wirtsaffinität an den Menschen anpassten und eine Mensch-zu-Mensch Übertragung ermöglichten (Tumpey et al., 2007) (M. Matrosovich et al., 2000). Entsprechende Mutationen fehlen in den aviären IAVs wie H5N1, H7N9, H9N2, die zoonotische Infektionen verursachten, jedoch nicht in der menschlichen Population persistierten. Allerdings wurde erst im Jahr 2013 eine Arbeit veröffentlicht, die ein H5N1 mit Mutationen in HA beschreibt, die eine Transmission im Tiermodell ermöglichen (Herfst et al., 2012).

Schweine bilden das Bindeglied zwischen den humanen und aviären IAV, da sie sowohl SA-2,3-Gal als auch SA-2,6-Gal in ihrem Respirationstrakt aufweisen, somit von aviären und humanen IAVs infiziert werden können und so ein Reservoir für gefährliche Reassortments zwischen humanen, aviären und in Schweinen zirkulierenden IAVs darstellen. Solche Reassortments können dann Ausgangspunkt einer neuen Pandemie sein (Ito et al., 1998) (Ito, Suzuki, Mitnaul, et al., 1997) (Suzuki, Matsunaga, & Matsumoto, 1985). Ein Beispiel ist die sogenannte Schweinegrippe-Pandemie aus dem Jahr 2009 (H1N1). (Shinde et al., 2009) (Trifonov, Khiabani, & Rabadan, 2009). Des Weiteren gibt es Arbeiten, die eine inverse zoonotische Infektion vom Menschen zum Schwein beschreiben. Nach Zirkulation im Schwein kann das Virus dann wieder auf den Menschen übertragen werden. Außerdem wurden Co-Infektionen mit verschiedenen IAV-Subtypen im Menschen beschrieben. So konnte ein H1N2 isoliert werden, das durch Reassortment zwischen einem H1N1 und H3N2 entstanden ist, jedoch keine Persistenz in der menschlichen Population erreicht hat (Gregory et al., 2002) (Falchi et al., 2008).

1.1.6 Pathogenität/Virulenz

Es gibt viele Faktoren und mehrere Gene, die die IAV Pathogenität beeinflussen. Neben der Proteinausstattung der Wirtszelle sind meist die viralen Proteine HA, NA, NS1, der Polymerase-Komplex und die akzessorischen Proteine PB1-F2 und PA-X als entscheidende Virulenzfaktoren aktiv. Der Einfluss von HA wurde bereits im vorangegangenen Abschnitt besprochen, die Rolle der anderen Proteine, bezüglich der IAV-Pathogenität und -Virulenz, soll im Folgenden kurz erläutert werden. Es gilt auch zu bedenken, dass viele Symptome einer IAV-Infektion nicht auf virale Mechanismen zurückzuführen sind, sondern durch Immunpathologien, wie zum Beispiel durch vermehrte Ausschüttung von Cytokinen, hervorgerufen werden (Liu, Zhou, & Yang, 2016) (Oslund & Baumgarth, 2011).

Nach anfänglicher Infektion des oberen Respirationstrakts breiten sich besonders schwere IAV-Infektion bis in den unteren Respirationstrakt aus. Dabei werden bevorzugt die den Atmungstrakt auskleidenden Epithelzellen infiziert. IAV ist ein zytolytisches Virus, bei dessen Infektion die Zellen zugrunde gehen und unter Initiierung einer Immunantwort absterben. Eine der Strategien des Virus, der Interferonantwort des angeborenen Immunsystems zu entgehen, liegt in seinem sehr kurzen Replikationszyklus, was zur Lyse der Wirtszelle führt und die Zerstörung der Integrität des Lungen- und Bronchialepithels bedeutet. Eine Konsequenz, die sich aus der Zerstörung der Epithelzellschicht des Respirationstrakts ergibt, ist die verminderte Barriere gegen opportunistische Bakterien und die eingeschränkte Funktion des Flimmerepithels. Sekundäre bakterielle Infektionen sind oft ursächlich für die mit IAV-assoziierten Lungenentzündungen (Taubenberger & Morens, 2008) (Morens, Taubenberger, & Fauci, 2008). Zusätzlich sind Bakterien wie *Staphylokokkus aureus* in der Lage, HA0 zu spalten und so die Infektiosität der Viren zusätzlich zu steigern. Der IAV Replikationszyklus dauert ca. 6 Stunden, also genau so lange wie es ungefähr dauert, bis die zelluläre Interferon-Antwort ihre volle Aktivität erreicht hat. Vorausgesetzt das Interferonsystem wird nicht durch virale Proteine

unterdrückt. Das Interferonsystem ist Teil der angeborenen Immunabwehr und ein wichtiges Verteidigungssystem gegen Viren. Ausgelöst wird es durch bestimmte Pathogenstrukturen, die eine Signalkaskade auslösen, welche zur Produktion von IFN- α und β (Typ-I-Interferone) sowie IFN- λ (Typ-III-Interferon) führt. Interferone wirken als parakrine und autokrine Cytokine, die angrenzenden Zellen signalisieren, dass eine Infektion durch ein Pathogen wahrscheinlich ist. Dadurch exprimieren die Zellen verschiedene Interferon-Stimulierte-Gene (ISG), deren Genprodukte die Zerstörung viraler Strukturen einleiten (Schneider, Chevillotte, & Rice, 2014). Des Weiteren gilt das Interferonsystem als Aktivator der adaptiven Immunabwehr.

NS1. Das wohl wichtigste IAV Protein zur Inhibition des Interferon-Systems ist das Nichtstrukturprotein 1 (NS1) (Isaacs & Lindenmann, 1957) (Isaacs, Lindenmann, & Valentine, 1957). Das NS1-Gen ist sehr kurz, was dazu führt, dass bereits am Anfang der Infektion viele Kopien dieses Gens in der Wirtszelle vorliegen (Hatada & Fukuda, 1992). NS1 ist mit seiner N-terminalen RNA-Bindungsdomäne in der Lage, an verschiedene RNA-Moleküle, wie vRNA, dsRNA, snRNA und polyA-Sequenzen, zu binden (Qiu & Krug, 1994) (Hatada & Fukuda, 1992). Durch Bindung des NS1 an virale RNA-Moleküle können diese vor Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR), wie TLR-3, maskiert werden. Des Weiteren ist NS1 in der Lage, an Retinoic acid inducible gene I (RIG-I), eine zytosolische RNA-Helicase, zu binden und somit die Signalkaskade zu unterbrechen, die ausgelöst wird, sobald RIG-I an 5'-Triphosphat-RNA bindet. NS1 ist also in der Lage, das Interferonsystem auf einer prätranskriptionalen Ebene zu blockieren. Die Effektor-domäne am C-terminalen Ende von NS1 kann mit Wirtszellproteinen interagieren und deren Funktion unterdrücken. NS1 verhindert unter anderem den Export polyadenylierter mRNA aus dem Zellkern, blockiert das Spleißen von prä-mRNA und die Polyadenylierung. Durch die Inhibition post-transkriptioneller Mechanismen unterdrückt NS1 also die zelluläre Genexpression. (Hatada & Fukuda, 1992) (Chien et al., 2004) (Qian, Chien, Lu, Montelione, & Krug, 1995) (Nemeroff, Barabino, Li, Keller, & Krug, 1998) (Noah, Twu, & Krug, 2003). Marazzi et. al. zeigten außerdem, dass das

carboxyterminale Ende von NS1 eines H3N2, eine Sequenz aus vier Aminosäuren (ARSK) enthält, welche chemisch analog zur Lysin 4 Sequenz von Histon 3 (H3K4) ist (Marazzi et al., 2012). Sie zeigten auch, dass NS1 in infizierten Zellen von histonmodifizierenden Enzymen methyliert und acetyliert werden kann. Weitere Experimente zeigten, dass NS1 von H3N2 in der Lage ist, über Bindung an die PAF1-Untereinheit des human RNA-polymerase II-associated factor 1 complex (PAF1C), in die Nähe von aktiven Genen der Wirt-DNA gebracht wird und so die Transkription des Wirts beeinflusst (Talon et al., 2000) (Mibayashi et al., 2007). Durch die NS1 induzierte Unterdrückung verschiedener Ebenen des Interferonsystems, wird dessen volle Funktionsfähigkeit erst nach zwei Tagen erreicht. Für ein schnell replizierendes Virus wie IAV ist diese Zeitspanne mehr als ausreichend, um nach erfolgreicher Vermehrung den nächsten Wirt zu infizieren.

PB1-F2. Ein weiteres Nichtstrukturprotein, das Einfluss auf die Mechanismen der Wirtszelle nimmt, ist PB1-F2 (W. Chen et al., 2001). PB1-F2 ist ein kleines Peptid, welches durch einen alternativen Leserahmen (+1) aus dem PB1-Genom translatiert wird (Zamarin et al., 2005). Seine Funktionen stehen in Zusammenhang mit einer gesteigerten Virulenz und für die Begünstigung sekundärer, bakterieller Infektionen. Dieses kleine Protein (87 Aminosäuren) besitzt eine Aminosäuresequenz, die es ihm ermöglicht mit Adenine nucleotide translocator 3 (ANT3) und dem voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1), zwei mitochondriale Transmembranproteine zu interagieren. Dies führt zur Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium, was folglich zur Apoptose der Wirtszelle führt. Die Aktivität von PB1-F2 wird über dessen Phosphorylierung reguliert. Diese zellspezifische Phosphorylierung scheint dessen pro-apoptotischen Effekt vor allem auf die Zellen des Immunsystems wie Makrophagen, Lymphozyten und Monozyten zu konzentrieren, was das Aufkommen sekundärer, bakterieller Infektionen begünstigt. Gleichzeitig ist PB1-F2 dazu in der Lage, durch direkte Interaktion mit dem MAVS-Protein (mitochondrial antiviral signaling), die RIG-I induzierte Interferon-Kaskade zu inhibieren (Yoshizumi et al., 2014). Conenello et. al.

fanden heraus, dass ein Serin-Rest an Position 66 zu einer Attenuierung von H5N1 und H1N1 (1918) im Mausmodell führte, während ein Asparagin-Rest an selbiger Position einen schwereren Krankheitsverlauf, höhere Viruslast in der Lunge und vermehrte Cytokinproduktion verursachte. PB1-F2 scheint vor allem für eine Anpassung an den aviären Wirt wichtig zu sein, da alle aviären IAVs PB1-F2 in voller Länge exprimieren, während human- und schweinadaptierte IAVs eine gekürzte Version synthetisieren (Conenello, Zamarin, Perrone, Tumpey, & Palese, 2007). Das zeigt, dass der Einfluss von PB1-F2 auf die Virulenz und Pathogenität vom Virusstamm und Wirt abhängt.

Polymerase-Komplex (PB2). Der Polymerase-Komplex konnte als entscheidender Virulenzfaktor identifiziert werden. Dabei wurde herausgefunden, dass die Mutation E627K (Glutaminsäure zu Lysin) in PB2 wichtig für die Anpassung aviärer IAVs an Säugetiere ist (E. K. Subbarao, London, & Murphy, 1993). Wie bereits erwähnt, befallen aviäre IAVs aufgrund der erhöhten Expression von SA-2,3-Gal den Magen-Darm-Trakt (MDT) verschiedener Vogelspezies. Humane IAVs jedoch infizieren meist den oberen Respirationstrakt (ORT). Während im MDT eine Temperatur von ca. 41°C herrscht, liegt die Temperatur im ORT bei ca. 33°C. Die Aminosäure an Position 627 scheint für den Erhalt einer effizienten Polymeraseaktivität, bei den unterschiedlichen Temperaturen, verantwortlich zu sein. Denn PB2 aviärer IAVs trägt die Aminosäure Glutaminsäure (E) an Position 627, während die meisten humanen Isolate ein Lysin-Rest (K) aufweisen. Außerdem wurde beobachtet, dass nach nur einem Replikationszyklus von aviären IAVs in Mäusen die E627K-Mutation aufkam (Li et al., 2005) (Mase et al., 2006) (Hatta et al., 2007). Auch in den zoonotisch aktiven, hochpathogenen aviären IAVs (HPVI) H5N1 und H7N7, die zum Teil aus infizierten Menschen isoliert wurden, konnte diese Mutation nachgewiesen werden (Smith et al., 2006) (Puthavathana et al., 2005). Außerdem wurde in einem H5N1-Virus, das keine E627K Mutation trug, eine D701N Mutation gefunden, die das Wirtsspektrum und die Virulenz ausweitete (Li et al., 2005) (M. D. de Jong et al., 2006) (Steel, Lowen,

Mubareka, & Palese, 2009). Trägt PB2 Asparigin (N) an Position 701, zeigte der Polymerase-Komplex in Säugerzellen, nicht aber in aviären Zellen, eine gesteigerte Replikationsrate und eine erhöhte Akkumulation von PB2 im Zellkern (Gabriel, Herwig, & Klenk, 2008). Es sollte jedoch erwähnt werden, dass bei keinem Isolat des pandemische H1N1 von 2009 eine E627K oder D701N Mutation gefunden wurde (Mehle & Doudna, 2009).

PA-X. Das Protein PA-X ist eine Ribonuklease, dessen N-Terminus das vom PA-Protein abgeleitete katalytisch aktive Zentrum enthält. Das PA-X-Gen wird durch einen alternativen Leserahmen des PA-Genoms codiert (Jagger et al., 2012). Es ist für den spezifischen Abbau zellulärer mRNAs verantwortlich. Die wirtsspezifische Ribonukleaseaktivität wird auf eine Substratpräferenz für intronreiche mRNA-Moleküle und auf Interaktionen mit zellulären Co-Faktoren zurückgeführt (Gaucherand et al., 2019). In verschiedenen Tiermodellen wurde bei Infektionen mit Viren ohne funktionierendes PA-X-Gen schwerwiegende Krankheitsverläufe beobachtet. Die fehlende Immunsuppression in Abwesenheit der PA-X-Ribonuklease führte zu einer schnelleren Immunantwort mit einer gesteigerten Entzündungsreaktion und entsprechenden Immunpathologien (Jagger et al., 2012) (Gong et al., 2017) (Hayashi, MacDonald, & Takimoto, 2015) (H. Gao et al., 2015) .

NA. NA ist mit seiner Sialidase-Aktivität dafür verantwortlich, den zellulären Rezeptor von bereits infizierten Zellen und viralen Glykoproteinen abzuspalten, um eine Virusaggregation zu verhindern (Wagner, Matrosovich, & Klenk, 2002). Jedoch scheint NA auch in frühen Schritten des IAV-Infektionszyklus, oder gar vor der Infektion, eine Rolle zu spielen. Studien zeigten, dass NA die potentiell inhibitorisch wirkenden Sialinsäure-Reste auf Muzinen im Schleim des Respirationstrakts abspaltet, um dem Virus das Schleimhautepithel zugänglicher zu machen (M. N. Matrosovich, Matrosovich, Gray, Roberts, & Klenk, 2004). Außerdem scheint NA eine Bedeutung für die Glykosylierungsstruktur von HA und somit für dessen Interaktion mit den Wirtsrezeptoren und für dessen Antigenstruktur zu haben (Wagner et al., 2000). Da NA den Rezeptor für HA abspaltet, ist es naheliegend, dass eine bestimmte

Ausgewogenheit zwischen den Aktivitäten dieser beiden Transmembranproteine gegeben sein muss, um eine ausreichende virale Replikation und Transmission zu gewähren (Wagner, Matrosovich, et al., 2002). In diesem Zusammenhang wurde eine Arbeit veröffentlicht, die zeigte, dass ein NA-Inhibitor (Zanamivir)-resistentes IAV, das eine Mutation in der Rezeptorbindungsdomäne von HA aufwies und dessen Affinität zu seinem Rezeptor senkte, sich nur in Gegenwart von Zanamivir effizient vermehren konnte. Die Autoren erklärten diesen Sachverhalt damit, dass ohne Zanamivir die NA-Aktivität zu groß war, um HA mit seiner geringeren Rezeptoraffinität eine ausreichende Adsorption zu ermöglichen. Blick et. al. untersuchten ein pandemisches H2N2-Isolat (1957) und fanden heraus, dass sich die anfänglich unterschiedlichen Rezeptorpräferenzen von HA (SA-2,6-Gal) und NA (SA-2,3-Gal) im Laufe der Zeit angleichen, indem NA eine erhöhte Affinität zu SA-2,6-Gal entwickelte. Dies sollte dem Virus eine effizientere Freisetzung der neuen Virionen von der Oberfläche der Wirtszelle ermöglichen (Blick et al., 1998) (Baum & Paulson, 1991).

Weitere Studien geben Hinweise darauf, dass eine ausgewogene NA/HA Funktionalität auch für die Transmission zwischen verschiedenen Spezies und die Virulenz von Bedeutung ist (H. L. Yen et al., 2011) (Diederich et al., 2015).

1.1.7 Pandemiegefahr

Wie bereits angesprochen ist die Pathogenität und Infektiosität von IAV auch von der Rezeptorpräferenz abhängig. Aufgrund der unterschiedlichen Bindungsaffinitäten von aviären und humanen HAs bezüglich 2,3- und 2,6-verknüpften Sialinsäure-Rezeptoren auf der Wirtszelloberfläche, scheinen hochpathogene aviären IAVs (HPAI), wie H5N1, an einer adäquaten Mensch-zu-Mensch-Übertragung gehindert zu sein. Studien konnten jedoch zeigen, dass nur wenige Mutationen in der globulären Domäne von HA nötig sind, um die Affinität des H5 für 2,6-verknüpfte Sialinsäuren zu erhöhen, ohne

Affinitätseinbußen bezüglich des 2,3-verknüpften Rezeptors (Imai et al., 2012). Ähnliche Arbeiten zeigten, dass durch wenige Mutationen in einem H5N1 Virus (drei Mutationen in HA und eine in PB2) eine adäquate Transmission über Aerosole in Frettchen möglich war (Herfst et al., 2012). Damit ein Virus eine Pandemie auslösen kann, sind zwei Eigenschaften erforderlich: Zum einen muss das Virus Antigene tragen, die dem menschlichen Immunsystem unbekannt sind, und zum anderen muss eine ausreichende Mensch-zu-Mensch-Übertragung möglich sein. Das Centers for Disease Control (CDC) beispielsweise nutzt die Übertragung via Tröpfcheninfektion in Tierexperimenten als Indiz für das pandemische Potential eines neu auftkommenden IAV. Aviäre IAVs mit H5, H7 und H9 gelten als die derzeit potentesten Kandidaten für eine pandemische Infektionswelle. In den letzten Jahren konnten wiederholt zoonotische Infektionen dieser hochpathogenen IAVs nachgewiesen werden. Einzig die limitierte Transmission zwischen Menschen verhinderte bisher das Aufkommen einer Pandemie mit H5, H7 und H9 tragenden IAVs. In den letzten Jahrzehnten kam es in Asien, Afrika und Teilen Europas immer wieder zu Übertragungen von H5N1 zwischen Geflügelnutztieren und Menschen (Sutton, 2018). Viele davon mit tödlichem Verlauf (J. C. de Jong, Claas, Osterhaus, Webster, & Lim, 1997). Trotz einiger weniger Mensch-zu-Mensch-Übertragungen konnte H5N1 bisher keine effiziente Übertragung zwischen Menschen etablieren (H. Wang et al., 2008). Dennoch ist die Gefahr einer Adaptation an den Wirt Mensch durch Mutationen oder Reassortment schwer abzuschätzen. Durch seine weite Verbreitung in verschiedenen Säugerspezies sowie Geflügelnutztieren und durch bereits aufgekommene Mutationen, die eine Adaptation dieses aviären Virus an verschiedene Säuger erleichtern, wird die von diesem Virus ausgehende, potenzielle Pandemiegefahr als hoch eingeschätzt (Nidom et al., 2010).

H7N9 und H9N2, ebenfalls aviäre IAVs, verursachten in den letzten Jahren bis Jahrzehnten über 100 Infektionen in Menschen mit schwerem, und nicht selten tödlichem, Verlauf in Asien und Eurasien (M. Peiris et al., 1999) (Guo et al., 2001). Ihre weite Verbreitung in Geflügelnutztieren sowie zum Teil auch in

Schweinen, und ihre nachgewiesenen, häufigen Reassortments mit anderen IAVs (H9N2) lässt deren Pandemiegefahr steigen (H. Yu et al., 2011). Zumal für manche H9N2-Isolate eine Rezeptorspezifität für Menschen oder für Menschen und Vögel nachgewiesen werden konnte (M. N. Matrosovich, Krauss, & Webster, 2001).

H2 tragende IAVs zirkulieren, seit sie 1968 vom pandemischen H3N2 abgelöst wurden, nicht mehr in der menschlichen Population. Das bedeutet, dass viele Menschen keine präexistierende Immunität haben und ein Wiederaufkommen von H2-IAV-Infektionen in Menschen eine potentielle Pandemiegefahr bedeutet. Vor allem da H2-IAVs noch immer in Schweinen und Vögeln zirkulieren (Krauss et al., 2007).

Das segmentierte Genom ermöglicht IAV eine hohe genomische Plastizität, da neben Mutationen, die durch den fehleranfälligen RNA-Polymerase-Komplex entstehen können (antigenic-drift), spontane Genom-Rekombinationen (Reassortierung) möglich sind (antigenic-shift). Diese Mechanismen ermöglichen es dem Virus, sich schnell neuen Bedingungen, Transmissionsvoraussetzungen und selektivem Druck, der unter dem Einfluss des Immunsystems sowie durch Impfstoffe und/oder Medikamente entsteht, anzupassen. Zusammenfassend ist die Gefahr einer neuen IAV-Pandemie schwer abzuschätzen und nicht auszuschließen (Morens & Fauci, 2007) (N. J. Cox & Subbarao, 2000) (Taubenberger & Morens, 2006). Unglücklicherweise sind wir heute noch nicht in der Lage, verlässliche Voraussagen darüber zu treffen, wann es zu einer Pandemie kommen wird, wo sie ausbrechen wird und um welchen IAV-Subtyp es sich handeln wird.

1.2 Strategien zur Entdeckung neuer Medikamente

Während der vergangenen 25-30 Jahren gab es einen Fokuswechsel bezüglich der Strategie zur Entdeckung neuer Medikamente für klinisch-medizinische Indikationen, die bis dato nicht behandelt werden konnten (First-in-Class Medikament). Dieser Wechsel war sowohl in der industriellen, als auch in der akademischen Forschung zu beobachten (Zheng, Thorne, & McKew, 2013). Die moderne Forschung verfolgt zur Entdeckung neuer, therapeutisch aktiver Leitstrukturen sowohl niedermolekularer Verbindungen als auch hochmolekularer Biopharmazeutika zwei Ansätze:

Zum einen gibt es das Phänotyp-basierte Screening (Phenotypic-Based Screening oder Phenotypic Based Drug Discovery, PDD) bei dem in einem Tiermodell oder zellbasierten Assay die Wirkstoffkandidaten auf das Unterdrücken oder Hervorrufen eines bestimmten Phänotyps getestet werden. Dieser empirische Ansatz erfordert keinerlei Vorkenntnisse über die Zielstruktur (z.B. Rezeptor oder Enzym), mit der der potentielle Wirkstoffkandidat wechselwirkt, um den gewünschten Effekt zu erzielen. Beim zweiten Ansatz handelt es sich um das Zielstruktur-basierte Screening (Target-Based Screen oder Target-Based Drug Discovery, TDD). Dieser nutzt die Informationen, die zuvor über die Zielstruktur gewonnen wurden, um in einem speziellen Assay zu testen, ob die potentiellen Wirkstoffkandidaten durch Interaktion mit der meist isolierten und speziell präparierten Zielstruktur den gewünschten Effekt auslösen, z.B. das Inhibieren einer enzymatischen Aktivität. Dieser hypothetische Ansatz erfordert spezielle Kenntnisse über die Krankheit und die biochemischen Prozesse, die in der Pathophysiologie involviert sind, als auch über geeignete Verfahren zur Gewinnung und Reinigung der Zielstruktur. Der empirische Ansatz geht zurück bis zu den Anfängen der Pharmakologie in der Antike, und zum Beginn der modernen wissenschaftlichen Pharmakologie und der zufälligen Entdeckung des Penicillins Anfang des 19. Jahrhunderts (Pina, Hussain, & Roque, 2009). In den letzten 25 Jahren allerdings wurde der

Zielstruktur-basierte Ansatz als erfolgversprechender eingeschätzt und folglich verstärkt eingesetzt sowohl in der Industrie als auch in der akademischen Forschung. Bedingt durch die Aufklärung des Genoms, des Proteoms und der Fortschritte in der Bioinformatik wurde die Target-Based Drug Discovery (TDD) vorangetrieben. So wurden beispielsweise alle in den USA zugelassenen Biopharmazeutika durch TDDs entdeckt (Swinney & Anthony, 2011). Trotz der offensichtlichen Vorteile des Zielstruktur-basierten Screenings, wie eine erleichterte chemische Optimierung der initialen Wirkstoff-Kandidaten, eine einfachere Charakterisierung des Zusammenhangs zwischen Struktur und Aktivität (Structure-Activity-Relationship, SAR) und die erleichterte Etablierung von klinisch relevanten Biomarkern, kam es in aktuelleren Einschätzungen zu einer relativierten Betrachtung der Leistungsfähigkeit dieser Screeningstrategie (Zheng et al., 2013). Vor allem, wenn dieses Screeningverfahren in der Frühphase der Medikamentenentwicklung angewandt wird und potente, entwicklungsfähige Wirkstoffkandidaten hervorbringen soll, die das biochemische Potential mitbringen auch in späteren Phasen einer klinischen Studien die entsprechenden Anforderungen zu erfüllen (Arrowsmith, 2011a, 2011b). Eine Analyse aller von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) zugelassenen, niedermolekularen First-in-Class-Medikamente im Zeitraum zwischen 1999 und 2008 hat gezeigt, dass 28 durch PDD und nur 17 durch TDD entdeckt wurden (Swinney, 2013b). Ein großer Nachteil der TDD und ein Erklärungsansatz für die oftmals geringe Wirksamkeit etwaiger Leitverbindungen in späten Phasen klinischer Studien, ist die unklare biologische Relevanz jener biochemischen Assays. Aufgrund der artifiziellen Natur eines Assays, der auf einer definierten Zielstruktur basiert, kann eine fehlende Krankheitsrelevanz der Zielstruktur nicht ausgeschlossen werden und wird meist erst spät im Entwicklungsprozess festgestellt. Durch Zielstruktur-basierte Screens sind pharmakodynamische Parameter wie Dosis-Wirkungs-Beziehung und Wirkprofil meist direkt messbar, pharmakokinetische Daten wie Absorption, Metabolismus, Verteilung und Ausscheidung sind jedoch nicht zugänglich. Außerdem wurde ein genereller Rückgang der in den USA

zugelassenen Medikamente seit der verstärkten Anwendung von Zielstruktur-basierten Screens dokumentiert (Zheng et al., 2013).

Diese Erkenntnisse verlagerten den Fokus wieder vermehrt auf den empirischen Ansatz. Phänotyp-basierte Screens sind in der Regel physiologisch relevanter, da sie auf realistischen Modellsystemen, wie intakten Zellen oder Tieren basieren. Aufgrund geringerer Kosten und einem höheren Durchsatz sind Zellen für das Testen von großen Wirkstoff-Bibliotheken besser geeignet als Tiermodelle. In solchen Modellsystemen ist es möglich Leitverbindungen (Lead Compounds) zu finden, deren Aktivität auf der Interaktion mit verschiedenen Zielstrukturen wie Enzymen, Transkriptionsfaktoren und Rezeptoren bzw. deren Signalkaskaden, und/oder auf Interaktionen mit anderen Faktoren beruhen. Das erleichtert auch eine rasche in-vivo Translation vielversprechender Leitstrukturen. Außerdem können Medikamente gegen Krankheiten, die selten sind, bzw. deren Pathophysiologie noch nicht ausreichend geklärt wurde, zugänglich gemacht werden, da die Zielstruktur nicht bekannt sein muss. In den 1970er Jahren wurden viele Medikamente für den Gebrauch am Menschen zugelassen, deren eigentliche Wirkungsweise unbekannt war und erst viel später aufgeklärt werden konnte. Als Beispiele können hier Aspirin und die den Influenza-A-Virus M2-Ionenkanal-Blocker (Adamantane) angeführt werden (Cady & Hong, 2008; Cady et al., 2010) (Vane & Botting, 2003). Auch wenn der molekulare Wirkmechanismus (Molecular Mechanism of Action, MMoA) für die Zulassung eines Wirkstoffs nicht bekannt sein muss, ist die Kenntnis des Wirkmechanismus wichtig für die Weiterentwicklung und Entdeckung besserer Wirkstoffe, also für die Entwicklung eines First-in-Class-Medikaments hin zu einem Best-in-Class-Medikament. Die zuvor erwähnte Analyse, der in den USA zugelassenen Medikamente zwischen 1999 und 2008, brachte neben der Tatsache, dass PDD eine größere Erfolgsrate bei der Entdeckung von First-in-Class-Medikamenten hatte auch hervor, dass TDDs bei der Entdeckung von Folgemedikamenten fünfmal erfolgreicher war, als bei der Entdeckung von First-in-Class-Medikamenten (**Abbildung 1–7**). Der First-in-

Class/Folgemedikament-Vergleich für PDD ergab hingegen keinen Unterschied (Swinney, 2013a, 2013b).

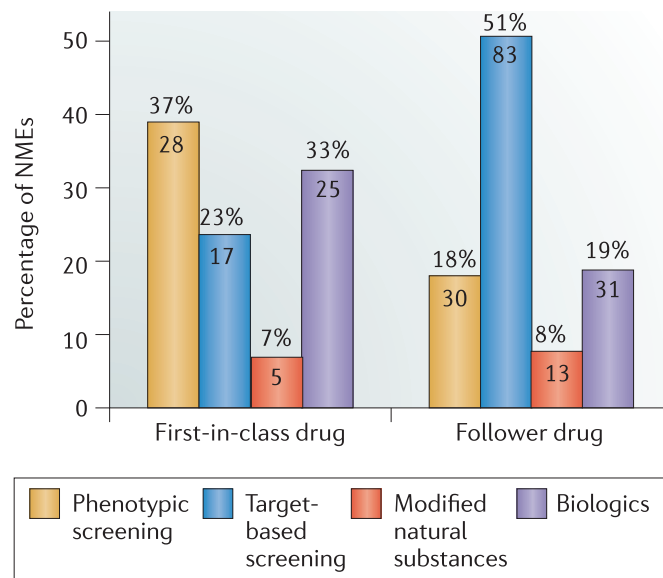


Abbildung 1–7: Übersicht der im Zeitraum zwischen 1999 und 2008 entdeckten, neuen Medikamenten in Abhängigkeit der Screeningstrategie. NME steht für New Molecular Entity. Bei der Entdeckung neuer First-in-Class Medikamente war der Phänotyp-basierte Screen (PDD) am erfolgreichsten. Der PDD-Ansatz war bei der Entwicklung von optimierten Folgemedikamenten ähnlich erfolgreich wie bei der Entwicklung von First-in-Class Medikamenten. Der TDD-Ansatz hatte eine fünffach höhere Produktivität bei der Entwicklung von Folgemedikamenten und war in dieser Kategorie am effektivsten. Die Abbildung wurde aus (Swinney, 2013b) übernommen.

Basierend auf diesen Erkenntnissen sollte ein modernes Screening-Protokoll drei Schritte beinhalten: Für die Entdeckung potenter First-in-Class-Medikamente ist ein Phänotyp-basierter Screen mit biologischer und physiologischer Relevanz in einem entsprechenden Modellsystem am besten geeignet. Zu diesem Zeitpunkt sind Kenntnisse über die Zielstruktur nicht

zwingend erforderlich. Basierend auf den Ergebnissen des initialen PDD werden dann die Zielstruktur und der Wirkmechanismus der Leitstrukturen identifiziert. Das gewonnene Wissen über den Wirkmechanismus und die Zielstruktur können anschließend genutzt werden, um einen Assay für einen Zielstruktur-basierten Screen zu etablieren, der zur Optimierung der First-in-Class-Medikamenten zu Best-in-Class-Medikamenten führt (**Abbildung 1–8**).

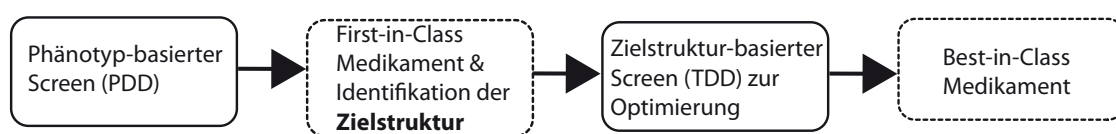


Abbildung 1–8: Vereinfachte Darstellung des optimalen Einsatzes von Phänotyp-basierten Screens (PDD) und Zielstruktur-basierten Screens (TDD) in der Entwicklung von First-in-Class und Best-in-Class Medikamenten. Übernommen und modifiziert aus (Swinney, 2013a).

Für eine erfolgreiche Entwicklung neuer Medikamente für bisher unbehandelbare Erkrankungen ist ein geeigneter Phänotyp-basierter Screen mit hoher biologischer und physiologischer Relevanz am Anfang der Unternehmung von großer Bedeutung. Auf diese Weise ist die Entdeckung verschiedener Leitstrukturen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen, deren Wirkungen in einem artifiziellen TDD nicht zugänglich wären, möglich.

Für die Entdeckung neuer First-in-Class anti-Influenza-Medikamente verfolgten wir diesen Ansatz und wandten einen Phänotyp-basierten Screen in einem zellbasierten Modellsystem mit Krankheitsrelevanz an.

1.2.1 PDD in anti-IAV Hochdurchsatz-Screens

Influenza-A-Viren kodieren für zehn essentielle Proteine und je nach Subtyp für einige akzessorische Proteine (McGeoch et al., 1976). Diese limitierte Anzahl an möglichen Zielstrukturen für potentielle Wirkstoffe ist eine der Herausforderungen bei der Entwicklung von Grippemedikamenten. Potentielle Wirkstoffe müssen in der Lage sein, an virale Proteine, die obligat für die Replikationsfähigkeit und Transmission des Virus sind, zu binden und deren Funktion zu inhibieren. Lange Zeit waren in den USA und Europa nur zwei IAV-spezifische Wirkstoffklassen zugelassen. Die M2-Ionenkanal-Inhibitoren der Adamantane, Amantadin und Rimantadin, sowie die Neuraminidase Blocker Zanamivir und Oseltamivir (Hay, Wolstenholme, Skehel, & Smith, 1985; C. U. Kim et al., 1997). Seit Anfang 2014 ist in Japan außerdem Favipiravir (T-705), ein RdRp-Blocker, der gegen verschiedene RNA-Viren wirksam ist, für die Therapie von Influenzavirus Infektionen zugelassen. Favipiravir erlangte außerdem durch seine Verwendung während der Ebola-Epidemie 2014, ohne Zulassung für den Gebrauch an Menschen, Bekanntheit (Furuta et al., 2005; Sangawa et al., 2013). Im Oktober 2018 erlangte der Wirkstoff Baloxavir marboxil von der amerikanischen Behörde für Lebens- und Arzneimittel (FDA) die Zulassung zur Behandlung unkomplizierter Grippeinfektionen in Patienten ab 12 Jahren. Baloxavir inhibiert die Cap-abhängige Endonukleaseaktivität und stört somit die virale mRNA-Synthese (Hayden et al., 2018). Auch auf dem Gebiet der Entwicklung von anti-Influenzavirus-Pharmaka wurden Versuche unternommen Zielstruktur-basierte Screenings zu etablieren. Karlas et. al. suchten mittels RNA-Interferenz (RNAi) Screening des Wirtsgenoms nach möglichen Zielstrukturen im Wirtsorganismus, die für den Lebenszyklus des Virus obligat sind und für die Implementierung eines Zielstruktur-basierten Assays dienen könnten (Karlas et al., 2010). Das Ziel dieses Ansatzes ist es, bestimmte Interaktionen zwischen Virus und Wirt, die für einen produktiven, viralen Lebenszyklus entscheidend sind, zu identifizieren und zu inhibieren. Mögliche potentielle Wirtsproteine, die für den Lebenszyklus des Virus

unerlässlich sind, könnten beispielsweise Ribosomen, Spleißosomen, Proteasen, Golgi-Vesikel oder Kernporen darstellen. Die Vorteile die man sich von antiviralen Pharmaka, die auf Wirtsstrukturen abzielen, erhofft ist, dass es dem Virus schwerer fällt, durch Mutationen der Wirkweise des Medikaments zu entgehen (Prussia, Thepchatri, Snyder, & Plemper, 2011; Salerno et al., 2007) und dass etwaige Wirkstoffe ein breiteres Wirkspektrum ohne Virusstamm- und -subtyp spezifische Limitierungen im Vergleich zu pathogenfokussierten Pharmaka aufweisen. Vor allem Viren die derselben phylogenetischen Familie angehören sind oftmals auf dieselben Wirtsfaktoren und biochemischen Reaktionswege angewiesen (Schwegmann & Brombacher, 2008; Tan, Ganji, Paeper, Proll, & Katze, 2007). Neben der Suche nach geeigneten Wirtzielstrukturen mittels RNAi gibt es einige wenige Zielstruktur-basierte Assays, die auf dem Wissen von bereits bekannten Wirtsfaktoren entwickelt wurden. Beispielsweise wurden der MEK-Kinase-Inhibitor U0126, der zur Blockierung der Raf/MEK/ERK-Kaskade befähigt ist, und der CDC-ähnliche Kinase-1-Inhibitor TG003 als IAV-Inhibitoren verwendet (Droebner, Pleschka, Ludwig, & Planz, 2011) (Zu et al., 2015). Das in Phase II einer klinischen Studie getestete (Moss et al., 2012) Sialidase-Fusions-Protein DAS181 ist in der Lage, den Influenzavirus-Rezeptor SA-2,6-Gal bzw. SA-2,3-Gal von der Zelloberfläche abzuspalten und auf diese Weise antiviral zu wirken (Belser et al., 2007; Malakhov et al., 2006). Unser Labor war ebenfalls erfolgreich darin eine niedermolekulare Verbindung zu identifizieren, die durch die Aktivierung des Systems interferonstimulierter Gene (ISG), eine Pathogen-unabhängige, antivirale Aktivität zeigt (Yan et al., 2013).

Allerdings lieferten Zielstruktur-basierte Ansätze aufgrund der eingeschränkten Anzahl bekannter Wirtzielstrukturen, durch die schwache Reproduzierbarkeit verschiedener RNAi-Screens und wegen Fehleinschätzungen bezüglich der Medikamentierbarkeit der Wirtzielstrukturen, nicht die erhofften Ergebnisse. Folglich setzte auch auf dem Gebiet der Entdeckung neuer Pharmaka mit IAV-inhibierenden Eigenschaften ein Umdenken bezüglich der Screening-Strategie ein. Die Vorteile eines Phänotyp-basierten anti-IAV Screens sind die Erfassung

aller Phasen des viralen Lebenszyklus, die Möglichkeit auch Wirtsfaktoren, die für den viralen Lebenszyklus wichtig sind, zugänglich zu machen und die Möglichkeit zur Entdeckung neuer, bisher unbekannter, viraler Strukturen, die durch niedermolekulare Verbindungen inhibiert werden können. Parallel zu oder aufbauend auf den Ergebnissen einer PDD gibt es die Möglichkeit, spezielle TDDs zu etablieren, um die Optimierung der primären Leistrukturen voranzutreiben. Ist die Kristallstruktur eines viralen Proteins bekannt, ist es beispielsweise möglich, durch in-silico-Studien chemische Eigenschaften zu evaluieren, die einen verstärkenden Effekt auf die Bindungsaffinität des Moleküls zu seinem viralen Zielprotein haben. Um möglichst zeit- und ressourceneffizient eine sehr große Anzahl niedermolekularer Verbindungen auf ihre IAV-inhibierende Wirkung, unter Berücksichtigung aller Phasen des viralen Lebenszyklus, testen zu können (Hochdurchsatz-Screening), ist ein zellbasierter Screen am besten geeignet.

Die wohl wichtigste Voraussetzung eines zellbasierten Hochdurchsatz-Protokolls zur Entdeckung neuer antiviraler Verbindungen ist eine verlässliche und schnelle Methode zur Quantifizierung der viralen Replikation und Infektion. Wurde anfangs die IAV-Replikation noch mittels zeit- und kostenintensiven biochemischen und immunologischen Nachweiserfahren für viraler Antigene detektiert (Beylveld, White, Ayllon, & Shaw, 2013), konnte allmählich der Einsatz von lumineszenten und fluoreszenten Reporter genen zum Infektions- und Replikationsmonitoring etabliert werden. Inzwischen sind drei verschiedene Generationen an IAV-Reportersystemen bekannt.

1.2.1.1 IAV Reportersysteme der ersten Generation

Die erste Generation ist abhängig von sogenannten IAV-aktivierten Reporter genen. Diese Reporter gene bestehen aus beispielsweise einem Firefly-Luciferase-Gen, das als revers-komplementäre DNA-Sequenz zwischen

die 5'- und 3'-nichtkodierende Region (Non-coding Region, NCR) eines der acht Genomsegmente geklont wird. Diese DNA-Kassette wird dann in ein Plasmid zwischen einen RNA-Polymerase I (Pol I)-Promotor und einer Pol I Terminatorsequenz eingebaut. Werden Zellen mit diesem Plasmid transfiziert, transkribiert die zelluläre RNA-Polymerase I einen an den Enden unmodifizierten, negativstrangorientierten RNA-Abschnitt, der die viralen 5'- und 3'-NCRs enthält, und in dieser Form ein virales (-)-RNA-Molekül imitiert. Anschließend werden die Zellen mit IAV infiziert und der dabei gebildete virale RNA-abhängige RNA-Polymerase-Komplex (RdRp) erkennt den RNA-Abschnitt als virale RNA (vRNA) und transkribiert und repliziert diesen in vmRNA bzw. cRNA. Die vmRNA wird von zellulären Ribosomen in das entsprechende Firefly-Luciferase-Reporterprotein übersetzt und kann detektiert werden. Das Signal des Reporterproteins kann anschließend mit einem Luminometer aus dem Zellüberstand quantifiziert werden. Die Nachteile dieses IAV-Reportersystems liegen einerseits in der Tatsache, dass für ein stabiles Signal viele aktive Virionen, also eine hohe Multiplizität der Infektion (MOI), gebraucht wird, was gleichzeitig bedeutet, dass nur ein einziger Infektionszyklus möglich ist und potentielle antivirale Wirkstoffe, die in der späten Phase des viralen Lebenszyklus aktiv sind, nicht erkannt werden. Ein weiterer Nachteil ist, dass ein möglicher zweiter Infektionszyklus gar nicht detektiert werden könnte, da die während des ersten Infektionszyklus gebildeten Viren das Reporter Plasmid nicht inkorporiert haben. Dieses oder ähnliche Systeme fanden in einigen siRNA-Screens Anwendung (J. Zhang, Liu, et al., 2012) (H. H. Hoffmann, Kunz, Simon, Palese, & Shaw, 2011) (Karlas et al., 2010). Neben den schon genannten Nachteilen ist dieses System aufgrund der hohen Kosten und des hohen Arbeitsaufwands, die durch die Transfektion der Zellen entstehen, sowie der Limitierung auf bestimmte Zelllinien für ein HTS-Protokoll zur Entdeckung neuer niedermolekularer Verbindungen nicht geeignet.

1.2.1.2 IAV-Reportersysteme der zweiten Generation

Die zweite Generation von IAV-Reportersystemen konnte etabliert werden, nachdem die Rolle spezieller Verpackungssignale (engl. Packaging Signal, PS) an den jeweiligen 3'- und 5'-Enden der Genomsegmente für die Inkorporierung aller acht Segmente in ein Tochtervirion aufgeklärt wurde (Watanabe, Watanabe, Noda, Fujii, & Kawaoka, 2003) (Marsh, Hatami, & Palese, 2007). Nun konnten entsprechende Reporter in die Virionen inkorporiert werden, um ein stabileres und sensitiveres Signal zu erhalten. Dieser Reporter wird nach einem abgeschlossenen Infektionszyklus wieder in das Tochtervirion eingebaut, da die nötigen Signalsequenzen an den 5'- und 3'-Enden des RNA-Moleküls enthalten sind. Das entsprechende negativstrangorientierte Reportergen wird dabei von den 3'- und 5'-NCRs eines der acht Segmente flankiert. Jedoch konkurriert dieses Reportergen beim Einbau in ein neues Tochtervirion mit dem viralen Gen, dessen NCRs das Reportergen trägt. Da das Virus nur mit allen acht Segmenten replikations- und infektiös-fähig ist, musste dieses System weiter modifiziert werden, um nicht auf einen einzigen Replikationszyklus beschränkt zu bleiben (König et al., 2010). Bottini et al. bildeten ein rekombinantes Influenza-A-Virus, in welchem das HA-Gen durch einen Renilla-Luciferase-Reporter unter Erhalt der Signalsequenzen an den 5'- und 3'-Enden ersetzt wurde (Bottini et al., 2012). Um einen mehrfachen Infektionszyklus zu ermöglichen, wurden Zellen, die in der Lage sind das dem Virus fehlende HA stabil zu exprimieren, mit diesem Virus infiziert. Somit sind auch die IAV-Reporterviren der zweiten Generation auf entweder einen einzigen Replikationszyklus oder auf bestimmte Zelllinien, die eben das fehlende Gen in trans bereitstellen limitiert. Die Eignung eines solchen Systems für ein HTS-Protokoll ist nur bedingt gegeben. Die Gruppe um Bottini nutzte dieses System in einem Mediumdurchsatz-Screen, um eine 14.000 Verbindungen umfassende Substanzbibliothek auf ihre anti-A/WSN/1933 (WSN) Aktivität in einem 96-Well Format zu testen. Aus diesem Screen sind

zwei strukturell abhängige Verbindungen mit anti-WSN Aktivität im mittleren nanomolaren Bereich hervorgegangen (Bottini et al., 2012).

1.2.1.3 IAV-Reportersysteme der dritten Generation

Die dritte Generation der IAV-Reportersysteme zeichnet sich durch replikationskompetente IAV-Reporterviren aus. Reporterviren der dritten Generation enthalten das Reportergen in einem ihrer Genomsegmente als zusätzlichen, offenen Leserahmen (engl. open reading frame, ORF) und sind daher unabhängig von Zelllinien, die ein fehlendes virales Protein in trans exprimieren. Der offene Leserahmen (ORF) eines Green-Fluorescent-Protein (GFP) wurde in das Segment 8 so eingebaut, dass GFP zusammen mit den viralen Proteinen NS1 und NS2 (NEP) ohne entscheidende Attenuierung des Virus exprimiert wird. Das Transkript von Segment 8 kodiert in ungespleißter Form für das NS1-Protein und das gespleißte Transkript kodiert für NS2. Um alle drei Proteine in einem Verhältnis zu exprimieren, welches die Virusvitalität nicht beeinträchtigt, wurde nach Mutation der Spleißakzeptorstelle der offene Leserahmen des GFP an den C-Terminus des NS1-Gens gekoppelt. An den offenen Leserahmen des GFP-Gens wurde die NS2-ORF angefügt. Zusätzlich wurde die Sequenz des selbstspaltenden Peptids P2A (PTV), das sich vom Porzinen Theschovirus 1 ableitet, zwischen GFP und NS2 eingebaut. Dieses 19 Aminosäuren kurze Peptid enthält ein cis-aktives Hydrolase-Element (CHYSEL), das in der Lage ist, durch Inhibition der ribosomalen Peptidyltransferase, die bereits gebildete Aminosäurekette vom Ribosom freizusetzen und beginnend an der nicht transferierten Aminosäure, die Synthese einer neuen Peptidkette zu initiieren (**Abbildung 1–9**). Diese spezielle Aminosäuresequenz besteht aus einer nicht konservierten Sequenz, die eine α -helicale Struktur aufweist, auf die eine konservierte Sequenz mit der Aminosäureabfolge –D(V/I)EXNP G– folgt (X kann jede Aminosäure sein). Die eigentliche Spaltung der Peptidkette erfolgt zwischen Prolin (P) und Glycin (G)

(Doronina et al., 2008; Luke et al., 2008). Auf diese Weise entsteht durch Transkription eine vmRNA, die für NS1-GFP-P2A-NS2 kodiert. Co-translational wird nach Aktivierung der 2A-Peptidasefunktion das NS2-Protein vom NS1-GFP Protein abgespalten. Die Funktionsfähigkeit dieses rekombinanten Virus und des chimären NS1-GFP-Proteins wurde im IAV-A/Puerto Rico/8/1934 H1N1 evaluiert (Manicassamy et al., 2010). Dieses Virus eignet sich auch zur in-vivo Infektion von Mäusen mit anschließender Fluoreszenzvisualisierung.

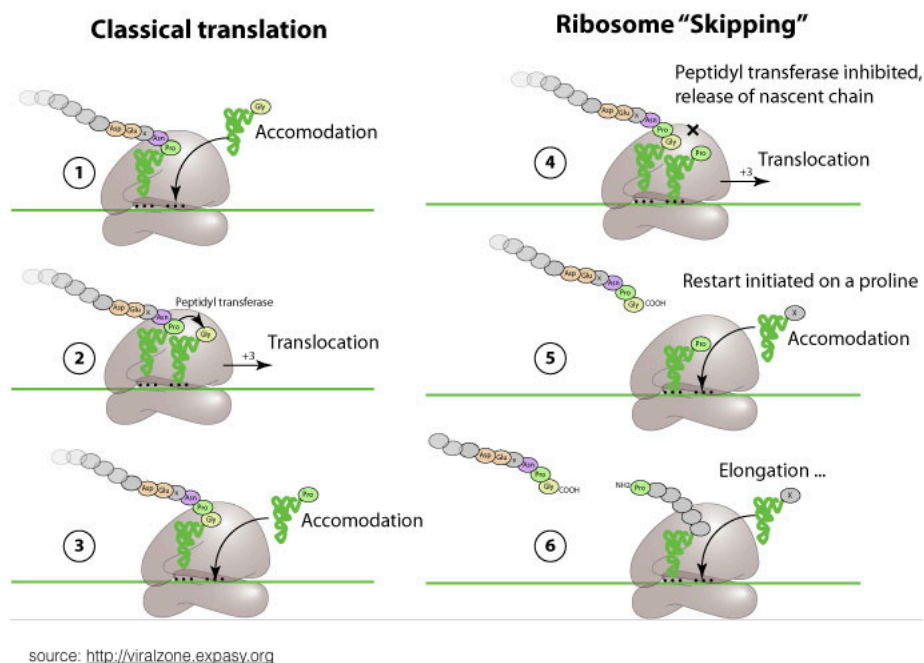


Abbildung 1–9: Darstellung der Funktionsweise des Peptids 2A, das sich vom Porcinen Teschovirus (PTV) ableitet. Das Peptid 2A inhibiert die ribosomale Peptidyltransferase, was zur Freisetzung der anwachsenden Peptidkette führt. Anschließend wird die Translation desselben mRNA-Moleküls fortgesetzt. Übernommen aus viralzone.expasy.org

In einem weiteren Ansatz wurde eine Gaussia-Luciferase (GLuc) in das PB2-Segment (Segment 1) integriert. Dazu wurde das Verpackungssignal am 3'-

Ende des offenen Leserahmens von PB2 mutiert und die Gaussia-Luciferase-ORF samt funktionsfähigem PB2 3'-Verpackungssignal angehängt. Um die PB2-Aktivität zu erhalten, wurde eine F2A-Peptidase (foot-and-mouth disease virus)-Sequenz zwischen die offenen Leserahmen von PB2 und GLuc integriert. Das Transkript PB2-F2A-GLuc wird anschließend cotranslational in die Proteine PB2 und GLuc gepalten. Da Gaussia-Luciferase ein sekretorisches Protein ist und es in manchen Anwendungen nachteilig wäre, das Reporterprotein nur im Zellüberstand nachweisen zu können, wurde zusätzlich eine KDEL-Sequenz, zur Retention von GLuc im Endoplasmatischen Retikulum in den GLuc C-Terminus geklont. Nach dem Lysieren der Zellen kann das GLuc-Signal quantifiziert werden. Dieses rekombinante Virus konnte seine Eignung zur Detektion viraler Replikation in mehreren Replikationszyklen in Zellen und Mäusen nachweisen (Heaton, Leyva-Grado, et al., 2013). Unsere Forschungsgruppe war die erste, die Reporterviren der dritten Generation in einem HTS-Protokoll zur Anwendung brachte.

1.2.1.4 Anforderungen an ein Hochdurchsatz-Screening-Protokoll zur Entdeckung von IAV-Inhibitoren

Ein Hochdurchsatz-Screening-Protokoll zur Entdeckung neuer, niedermolekularer, antiviraler Wirkstoffe muss bestimmte allgemeine und virusspezifische Anforderungen erfüllen. Zu den virusspezifischen Anforderungen gehören die Verwendung eines replikationsfähigen IAV-Reportervirus, das in verschiedenen krankheitsrelevanten Zelllinien verwendet werden kann. Außerdem muss das Reportervirus mit einer niedrigen MOI eingesetzt werden können, damit im Rahmen mehrerer Infektionszyklen (multizyklische Replikation) potentielle Wirkstoffkandidaten mit virusinhibierender Aktivität, in allen Phasen des viralen Lebenszyklus detektiert werden können. Ein weiterer, wichtiger Faktor liegt in einem stabilen und sensitiven Signal zur schnellen und reproduzierbaren Quantifizierung der

Ergebnisse. Die Signalstabilität muss auch auf sehr kleine Maßstäbe im μL -Bereich übertragbar sein, um unter Zuhilfenahme von Robotertechnik einen hohen Durchsatz erreichen zu können. Es sollte mindestens eine Miniaturisierung auf Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten (engl. well; 96-Well Format) erreicht werden, besser wäre ein 384-Well-Format. Die heutige Robotertechnik lässt sogar ein 1536-Well Format zu, was oftmals sehr hohe experimentelle Anforderung mit sich bringt. Die Zellzahl in einem solchen Format ist so gering, dass nur mit einigen wenigen Virionen infiziert werden darf, um eine niedrige MOI von beispielsweise 0,1 (d.h. es werden 10% aller Zellen des Wells infiziert) zu erreichen.

Allgemeine Voraussetzungen, die das Screening-Protokoll erfüllen muss, sind eine zufriedenstellende Reproduzierbarkeit des Assays unter Verwendung geeigneter positiver und negativer Kontrollen sowie eine gleichmäßige Signaldistribution auf der gesamten Testplatte ohne Randeffekte. Diese können jedoch leicht durch Evaporation der überstehenden Nährlösung in den randständigen Wells entstehen. Dieser Effekt wird verständlicherweise umso größer, je kleiner das Anfangsvolumen, d.h. je kleiner das Format ist. Als positive Kontrolle eignen sich Verbindungen am besten, die eine bekannte antivirale Wirkung aufweisen und deren virusinhibierender Effekt nicht alleine auf einer zytotoxischen Wirkung beruht. Ein entscheidender Parameter des Screens, der vom Experimentator selbst bestimmt wird, ist die sogenannte Hit-Grenze. Als Hit wird eine im jeweiligen Assay aktive Verbindung bezeichnet. Die Hit-Grenze definiert, ab welchem Wert eine getestete Verbindung als aktiv bewertet wird und wird meist in Standardabweichungen entfernt vom Mittelwert aller getesteten Verbindungen angegeben. Für einen robusten Screen wählt man meist eine Hit-Grenze von dreimal der Standardabweichung über dem Mittelwert ($M+3SD$). Je höher man die Hit-Grenze wählt, desto geringer wird die Anzahl an möglichen falsch-positiven Verbindungen, jedoch erhöht sich gleichzeitig die Anzahl an falsch-negativen Ergebnissen. Folglich spielt auch der Abstand der ausgewählten, möglicherweise aktiven oder nicht

ausgewählten Substanzen von der Hit-Grenze eine Rolle. Eine Verbindung, die im primären Screen als Hit ausgewählt wurde und genau auf der Hit-Grenze liegt, hat eine 50:50 Chance in einem weiteren Test, der die Aktivität der Verbindung bestätigen soll, erneut als aktiv oder als falsch-positiv bewertet zu werden. Eine Verbindung deren Aktivitätswert im primären Screen drei Standardabweichungen über der Hit-Grenze liegt hat hingegen eine fast 100%ige Chance darauf, auch im zweiten Experiment als positiv getestet zu werden. Das bedeutet, dass vor allem Verbindungen, die nah an der Hit-Grenze liegen, ein hohes Potential haben, entweder falsch-positiv oder falsch-negativ zu sein. Die Hit-Grenze ist also ohne Aussagekraft bezüglich der Güte des Screens an sich, spielt aber für die Wahrscheinlichkeit, dass eine als Hit deklarierte Verbindung tatsächlich die gewünschte Aktivität besitzt eine Rolle.

Um die statistische Robustheit, Aussagekraft und schließlich Qualität des Assays abschätzen zu können, kommt es vor allem auf das Verhältnis der Standardabweichungen zu den Mittelwerten der positiven und negativen Kontrollen an. Dieser Zusammenhang wird im sogenannten Z'-Faktor, einer dimensionslosen Größe, ausgedrückt (J. H. Zhang, Chung, & Oldenburg, 1999).

$$Z' = 1 - \frac{(3 \times SD_{pos} - 3 \times SD_{neg})}{(M_{pos} - M_{neg})} \quad (1)$$

mit SD=Standardabweichung und M=Mittelwert.

Der Z'-Faktor berücksichtigt einerseits die Streuung der Messwerte und gleichzeitig den dynamischen Bereich, also die Qualität des Signals, das gemessen wird. Der Z'-Faktor kann Werte zwischen minus unendlich und 1 annehmen. Je größer der Z'-Wert desto robuster ist der Screen und desto höher ist die Qualität der Daten, die man aus dem Screen gewinnen kann. Das Optimum liegt bei einem Z'-Wert von 1. Dieser, in der Praxis kaum zu erreichende Idealfall liegt vor, wenn entweder keine Abweichung zwischen den Werten vorliegt, also die Standardabweichung 0 beträgt (SD = 0) oder der Abstand zwischen den Mittelwerten der positiven und negativen Kontrollen

(auch als dynamischer Bereich bezeichnet) gegen unendlich geht. Ein Screen sollte einen Z'-Faktor von mindestens 0 aufweisen, um Daten mit brauchbarer Qualität liefern zu können. Vergleicht man anstatt der positiven und negativen Kontrolle die Standardabweichungen und Mittelwerte der Kontrollverbindungen mit denen der zu untersuchenden Verbindungen, erhält man den Z-Faktor. Dieser ermöglicht Rückschlüsse auf die Qualität der Substanzbibliothek bzw. kann zur Optimierung der Substanzkonzentrationen, mit der getestet werden soll, dienen.

2 Motivation und Ziel dieser Arbeit

In Kapitel 2.1 dieser Arbeit wurde unter anderem bereits auf die Pathogenität von Influenza-A-Viren und auf mögliche Bedrohungen durch neue IAV-Pandemien eingegangen. Dabei werden die jährlich wiederkehrenden, hohen Zahlen an Influenza-assoziierten Morbidität und Mortalität durch zwei Faktoren entscheidend bedingt: Erstens ist die mittlere Effektivität der jährlichen Impfungen unzureichend. Dies gilt insbesondere für die Risikogruppen der älteren Menschen, Kleinkinder und immunsupprimierten Personen (Kunisaki & Janoff, 2009) (Taubenberger & Morens, 2008). Zum Zweiten bieten die zugelassenen, antiviralen Medikamente durch unzureichende Effektivität und/oder durch schon existierende oder aufkommende Resistenzen, in zirkulierenden Influenza-Strängen, keinen adäquaten Schutz. Zusätzlich sehen wir uns aufgrund der sich jährlich ändernden Antigenstruktur der Influenzaviren und der geringen Immunogenität der Impfstoffe, der Tatsache ausgesetzt, dass die durchschnittliche Effektivität der Grippeimpfstoffe in den letzten 14 Jahren bei lediglich 40,9% lag (<http://www.cdc.gov>). In Jahren, in denen sich der Impfstoff in noch größerem Maß von den Antigenstrukturen der zirkulierenden Virus-Stämmen unterschied, war die Effektivität deutlich unter dem Durchschnittswert geblieben. Ein weiteres Problem, das vor allem neu auftretende pandemische Influenzaviren betrifft, ist die Bereitstellung einer ausreichenden Impfstoffmenge innerhalb kurzer Zeit. Die gängige Methode der Impfstoffgewinnung durch Antigenanreicherung in Hühnereiern erreicht in solch einem Fall rasch seine Grenzen, was dazu führt, dass durch Impfstoffknappheit die Herdenimmunitätsschwelle nicht erreicht werden kann und das Virus in seiner Ausbreitung nicht ausreichend gehindert wird (Chamberlain et al., 2012). In diesem Zusammenhang soll auch erwähnt werden, dass aufgrund unterschiedlicher immunologischer Effekte eine Diskrepanz zwischen tatsächlich durchlebter Infektion und Impfung auftritt und daher keine rein impfgestützte Herdenimmunität für Influenza-A-Viren erzielt werden kann.

Derzeit sind zwei Arten von Influenzavirus-spezifischen, antiviralen Wirkstoffen zugelassen. Das sind zum einen die Neuraminidase-Inhibitoren und zum anderen die M2 Ionenkanal-Blocker. In Japan ist seit 2014 zusätzlich der RNA-Polymerase-Inhibitor Favipiravir für den Fall, dass andere Wirkstoffe versagen als anti-Influenza Medikament zugelassen (Furuta et al., 2005). Dieses fluoridierte Pyrazincarboxamid-Derivat hat ein breites Wirkungsspektrum und inhibiert eine Vielzahl von RNA-Viren. Die Neuraminidase-Inhibitoren Oseltamivir und Zanamivir verhindern die Freisetzung neu gebildeter Virionen von der Oberfläche der Wirtszelle, aus der sie entstanden sind (von Itzstein et al., 1993). Adamantan-Derivate hingegen verhindern durch Blockieren des M2-Ionenkanals die Freisetzung der viralen Nucleokapside in der Wirtszelle. Dabei sind Amantadin und Rimantadin nicht wirksam gegen IBV und ICV. Allerdings ist die Effektivität von sowohl den Neuraminidase- als auch den M2-Inhibitoren, durch aufkommende und bereits existierende Resistenzen, beeinträchtigt (Hussain, Galvin, Haw, Nutsford, & Husain, 2017). Das war vor allem während der Winterpandemie von 2009 festzustellen. Ein Großteil der isolierten H1N1 Viren zeigte Mutationen, die eine Resistenz gegen Neuraminidase-Inhibitoren zur Folge hatten (van der Vries, Stelma, & Boucher, 2010) (Carr et al., 2002) (Herlocher et al., 2002) (Kiso et al., 2004).

Zwar stellen Influenza-A-Viren aus der Familie der Orthomyxoviridae die weltweite Hauptursache für virale Erkrankungen des Respirationstrakts dar (Beigel & Bray, 2008; Thompson et al., 2004), dennoch gibt es weitere Vertreter unter den Myxoviren, die wiederkehrend Infektionen mit schwerwiegenden respiratorischen Erkrankungen innerhalb der menschlichen Population verursachen. Zu diesen gehören das Respiratorische Synzytial-Virus (RSV), das Mumpsvirus (MuV), das Masernvirus (MeV) und das Humane Parainfluenzavirus (HPIV) die allesamt der Familie der Paramyxoviridae angehören (Bjornson & Johnson, 2008; D. Johnson, 2009; MacDonald, Hatchette, Elkout, & Sarwal, 2011). Aus der Gruppe der Paramyxoviren stellt vor allem RSV eine große Gefahr dar, da es weder einen geeigneten Impfstoff

noch effektive niedermolekulare Pharmaka für die Behandlung einer Infektion mit RSV gibt. Das derzeit einzige zur Behandlung einer RSV Infektion zugelassene Medikament ist Ribavirin, dessen therapeutischer Wert jedoch durch suboptimale Effektivität und Toxizität limitiert ist (Anderson, Parker, & Strikas, 1990; Groothuis et al., 1993; S. Johnson et al., 1997). Zur prophylaktischen Anwendung bei Hochrisikopatienten wird der enorm kostspielige, neutralisierende Antikörper Palivizumab eingesetzt (Weiner, Masaquel, Polak, & Mahadevia, 2012). Infektionen mit RSV sind besonders häufig und schwerwiegend bei Kleinkindern und Frühgeborenen, als auch bei Säuglingen mit angeborenen Herzfehlern und Dysplasien der Atemwege (Mahadevia, Masaquel, Polak, & Weiner, 2012). In den USA ist RSV sogar für die meisten Todesfälle durch virale Infektion bei Kleinkindern, die das erste Lebensjahr noch nicht vollendet haben, verantwortlich (Thompson et al., 2003). Da sich keine anhaltende Immunität nach durchlaufener Infektion entwickelt, kann ein Individuum wiederkehrend RSV-assoziierte Erkrankungen des Respirationstrakts erleiden, die im Alter oder bei geschwächtem Immunsystem einen lebensbedrohlichen Verlauf nehmen können (Elliot & Fleming, 2008). Es konnten einige strukturell unabhängige Verbindungen identifiziert werden, die in der Lage sind, durch Wechselwirkung mit dem RSV-Fusionsprotein (F) die Infektion und Transmission des Virus zu unterdrücken (Wyde, Chetty, Timmerman, Gilbert, & Andries, 2003) (Wyde et al., 1998) (McKimm-Breschkin, 2000) (Razinkov, Gazumyan, Nikitenko, Ellestad, & Krishnamurthy, 2001) (Andries et al., 2003) (Douglas et al., 2003) (K. L. Yu et al., 2003) (Cianci et al., 2004). Unsere Arbeitsgruppe identifizierte GPAR-3710 als potenten Inhibitor der RSV-F Fusion mit der Wirtszelle (Yan et al., 2014). Aus selbiger Studie ging jedoch hervor, dass das Virus durch Mutationen innerhalb zwei spezieller Mikrodomänen im F-Protein eine breite Resistenz gegen alle strukturell unabhängigen RSV-F-Inhibitoren erlangte. Wir schlagen einen Resistenzmechanismus vor, der auf einer beschleunigten Fusionskinetik beruht und folglich unabhängig von der Struktur und somit von der Natur der Wechselwirkungen zwischen RSV F sowie entsprechenden niedermolekularen

Verbindungen ist. Dieser Sachverhalt und die sich daraus ergebenden Konsequenzen wurden von uns zusammengefasst (**Weisshaar, Cox, & Plemper, 2015**).

Betrachtet man die klinische und ökonomische Relevanz, die Assoziation mit schwerwiegenden Erkrankungen und den ungedeckten sowie dringenden Bedarf an effektiven, antiviralen Pharmaka, stellen die Myxoviren IAV und RSV ein ideales Ziel für innovative Screeningverfahren dar, die zur Entdeckung niedermolekularer Verbindungen, die auf den Erreger oder Wirtsfaktoren abzielen, geeignet sind.

Das Ziel dieser Arbeit war zum einen die Implementierung eines Doppelmyxovirus Hochdurchsatz-Screening-Protokolls (DMV-HTS) unter Verwendung von voll replikationsfähigen RSV- und IAV-Reporterviren. Dieses spezielle Screening-Protokoll sollte die gleichzeitige Detektion antiviraler Chemotherapeutika mit inhibitorischer Aktivität gegen entweder IAV oder RSV oder gegen RSV und IAV ermöglichen und zum Screening einer Wirkstoffbibliothek mit über 140.000 chemisch diversen, niedermolekularen Verbindungen eingesetzt werden. Anschließend bestand das Ziel darin, die daraus hervorgehenden, IAV-inhibierenden Wirkstoffe auf deren Potenz und Toxizität zu untersuchen und deren molekularen Wirkmechanismus und eventuelle Inhibitor-induzierte Resistenzmuster zu charakterisieren. Des Weiteren sollte, auf der Grundlage der initialen Ergebnisse, eine Struktur-Aktivitäts-Analyse der potentesten Verbindungen durchgeführt werden, um deren Potenz und pharmakologischen Parameter weiter zu optimieren. Das langfristige Ziel bestand darin, die potentesten Verbindungen strukturell weiter zu entwickeln und die Translation von zellkulturbasierten Experimenten hin zur Aktivitätsüberprüfung im Tiermodell zu vollziehen.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse wurden veröffentlicht in:

Journal of Virology, 2016; 90(16): Seite 7368-7387 (doi: 10.1128/jvi.00898-16)

Identification and Characterization of Influenza Virus Entry Inhibitors through Dual Myxovirus High-Throughput Screening.

Weisshaar M, Cox R, Morehouse Z, Kumar Kyasa S, Yan D, Oberacker P, Mao S, Golden JE, Lowen AC, Natchus MG, Plemper RK.

und

Biochemistry, 2015; 54(36): Seite 5589-5604 (doi: 10.1021/biochem.5b00623)

Replication-Competent Influenza Virus and Respiratory Syncytial Virus Luciferase Reporter Strains Engineered for Co-Infections Identify Antiviral Compounds in Combination Screens.

Yan D, **Weisshaar M**, Lamb K, Chung HK, Lin MZ, Plemper RK.

Institute for Biomedical Sciences, Georgia State University, Atlanta, GA, USA.

3.1 Assay zur Quantifizierung einer simultanen Infektion mit IAV und RSV

Unsere Forschungsgruppe entwickelte einen auf phänotypischen Beobachtungen basierenden Assay, der eine gleichzeitige Quantifizierung der multizyklischen Infektionsausbreitung von Influenza-A-Viren (IAV) und Respiratorischen Synzytial-Viren (RSV) ermöglicht. Dieser Assay beruht auf dem Einsatz vollständig replikationskompetenter IAV- und RSV-Reporterviren, deren Replikation und Infektion mittels unterschiedlichen Luciferasen individuell quantifizierbar ist. Die einzelnen Schritte dieses Assays sind schematisch in **Abbildung 3–1** dargestellt.

Die unabhängige Quantifizierbarkeit einer simultanen Infektion der beiden Myxoviren mit hoher klinischer Bedeutung, ermöglicht einerseits die Detektion von niedermolekularen Verbindungen, die eine gegen entweder das Influenza-A-Virus oder das Respiratorische Synzytial-Virus (RSV) gerichtete spezifische Wirkung haben, als auch von Substanzen, die gegen beide Myxoviren gleichzeitig antiviral wirksam sind (Yan et al., 2015). Außerdem ermöglicht der Einsatz dieses Assay in einem replikationshemmenden Screening-Protokoll eine unmittelbare Einschätzung des zytotoxischen Potentials möglicher Hit-Kandidaten. Für Verbindungen, die in ihrer antiviralen Wirkung virusspezifisch sind, ist die Wahrscheinlichkeit, dass die gemessene Replikationshemmung auf zytotoxischen Effekten beruht, geringer als für Verbindungen, die eine unspezifische antivirale Aktivität aufweisen.

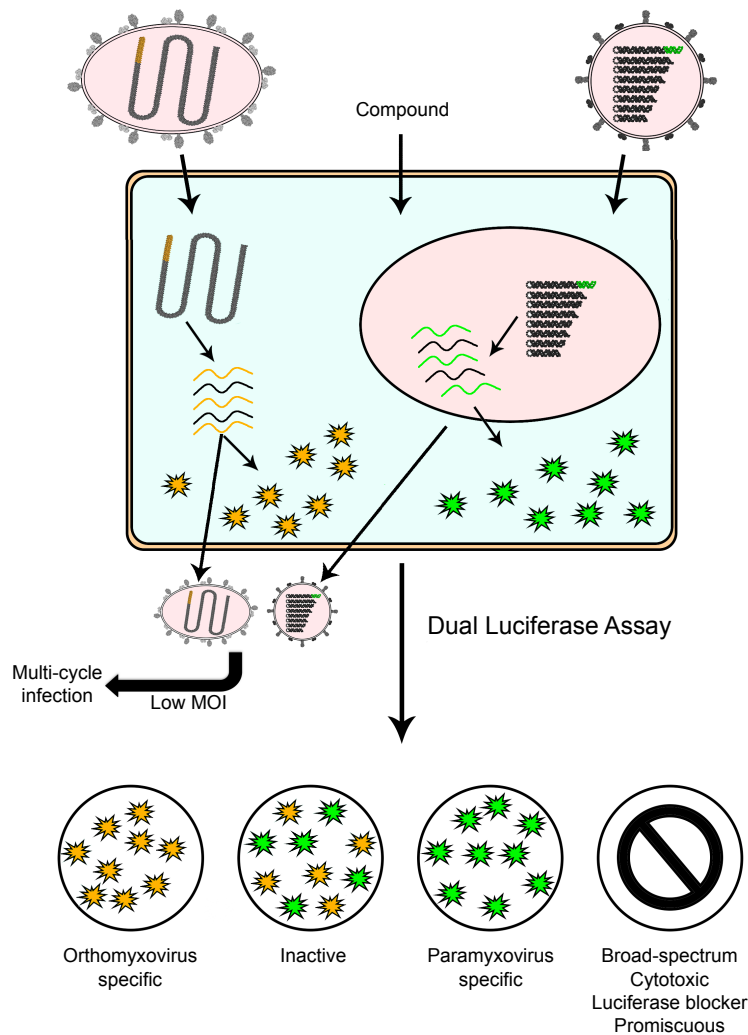


Abbildung 3–1: Schematische Darstellung der Doppelinfektion einer Zelle mit RSV- und IAV-Reporterviren im Rahmen des Doppelmyxovirus-Infektions-Assays zur gleichzeitigen Detektion von IAV-spezifischen, RSV-spezifischen und Breitspektrum-Chemotherapeutika. Das Virus auf der linken Seite repräsentiert rRSV-L19FD489E-FireflySMASh, das Virus auf der rechten Seite repräsentiert IAV-WSN-NanoLuc. Die Abbildung wurde erstellt von Robert Cox.

Für die Implementierung eines Assays, der auf der gleichzeitigen Infektion derselben Zelle mit zwei unterschiedlichen Viren beruht, sind zwei Faktoren von besonderer Wichtigkeit: Zum einen müssen die beiden Viren ein kompatibles

Replikationsprofil aufweisen, um eine synchronisierte Infektion und Replikation zu ermöglichen. Zum anderen darf es zu keiner gegenseitigen Beeinflussung der beiden Viren während ihrer individuellen Infektion und Genomexpression kommen. Während die zweite Voraussetzung dadurch erreicht wurde, dass IAV als Orthomyxovirus im Zellkern und RSV als Paramyxovirus im Zytosol repliziert, mussten für die Angleichung der Reaktionskinetik von IAV und RSV einige Optimierungen vorgenommen werden. Eine nahezu identische Replikationskinetik ist nötig, damit die Reportersignale beider Viren zum Zeitpunkt der gemeinsamen Detektion aussagekräftig sind, denn zum Auslesen des Signals müssen die Zellen lysiert werden, um die intrazellulären Luciferasen mit dem chemischen Substrat zur Reaktion zu bringen. Ausgehend von IAV-PR8 mit einem offenen Leserahmen für eine Gaussia-Luciferase im Genomsegment von PB2 (Heaton, Leyva-Grado, et al., 2013), wurde ein optimiertes IAV-Reportervirus gebildet. Da die meisten Influenza-A-Viren, die im Laboralltag genutzt werden (WSN), eine monobasische Spaltstelle in ihrem HA0 tragen, muss zur Aktivierung des IAV-HA-Fusionsproteins exogen Trypsin zugegeben werden. Für einen Trypsin-unabhängigen Assay wurde der gleiche PB2-Gaussia-Luciferase-Reporter in das IAV-WSN-Virus geklont (IAV-WSN-GLuc). Das HA0-Protein des IAV-WSN-Stamms kann ohne die exogene Zufuhr von Trypsin in den meisten Zelllinien ausreichend proteolytisch aktiviert werden (Appleyard & Maber, 1974). IAV-WSN-GLuc zeigte zwar eine adäquate Replikation und eine stabile Expression des Gaussia-Luciferase-Gens, jedoch war der dynamische Bereich des Gaussia-Signals, also der Abstand zwischen den Mittelwerten der positiven und der negativen Kontrollen, nicht optimal. Deshalb wurde die Gaussia durch eine Nano-Luciferase (NanoLuc) ersetzt. Die Nano-Luciferase hat den Vorteil, dass sie eine kleine Proteingröße und eine hohe Signalintensität zu vereinen vermag und auf derselben Substratchemie basiert, wie die Renilla- und Gaussia-Luciferasen.



Abbildung 3–2: Schematische Darstellung des IAV-WSN-NanoLuc PB2-Genomsegments. PS* steht für das durch eine Punktmutation inaktivierte Verpackungssignal, 2A steht für die vom PTV abgeleitete Spaltstelle, die in Kapitel 1.2.1.3 näher beschrieben wurde, KDEL entspricht dem ER Retentionssignal, NanoLuc steht für Nano-Luciferase und PS für das eingefügte Verpackungssignal. Der Leserahmen endet nach der KDEL-Sequenz. Die Größenrelationen der einzelnen Segmente entsprechen nicht der Realität.

Unter Verwendung von WSN-NanoLuc konnte die Signalintensität deutlich gesteigert werden, was in einem Z'-Faktor von 0,91 und einem Signal-Rausch-Verhältnis von 47,8 Ausdruck fand (Yan et al., 2015).

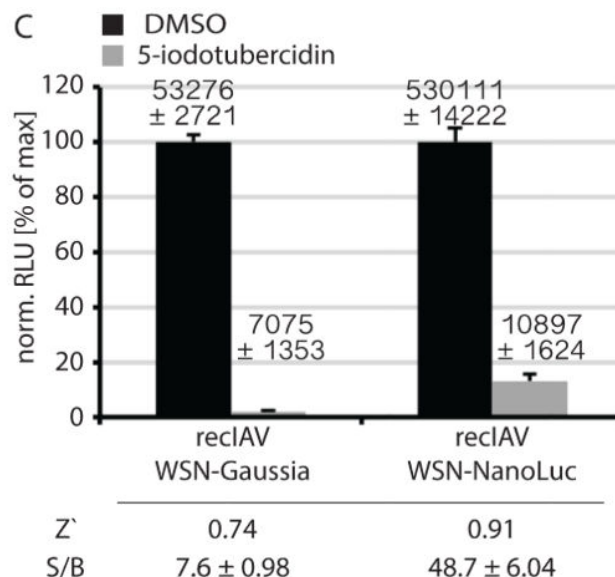


Abbildung 3–3: Bestimmung des dynamischen Bereichs der beiden IAV-WNS-Reporterviren unter Verwendung der Gaussia- bzw. der Nano-Luciferase. Während der

Infektion wurden A549 Zellen mit 10 μ M 5-Iodotubercidin (Fox et al., 1998) bzw. einem äquimolarem Volumen DMSO versetzt. Die Reportsignale (engl. relative light unit; RLU) wurden 48 Stunden nach der Infektion bestimmt. Die Werte wurden auf die DMSO Kontrolle normalisiert (N=3, Mittelwert \pm SD sind angegeben). Übernommen aus (Yan et al., 2015)

Um ein RSV-Reportervirus mit einer zu IAV-WSN-NanoLuc kompatiblen Replikationskinetik zu generieren, mussten einige Modifikationen am rekombinanten RSV-L19F-Renilla-Reportervirus (Yan et al., 2013) vorgenommen werden. Zum einen zeigte RSV-L19F-Renilla eine verzögerte Replikationskinetik im Vergleich zu IAV-WSN-NanoLuc. IAV ist mit einer Replikationszeit von ca. acht Stunden pro Zyklus ein sehr schnell replizierendes Virus. In einem früher durch unsere Forschungsgruppe erstellten Doppelmyxovirus-Screen konnte gezeigt werden, dass unter der Verwendung eines IAV-Firefly-Reportervirus der ersten Generation und eines rekombinanten Masernvirus mit einer Renilla-Luciferase (MeV-renilla) (Yan et al., 2013), die Replikationskinetik von MeV und IAV synchronisierbar ist. Die Hypothese war, dass RSV eine ähnliche Kinetik wie MeV erreichen könnte, wenn dessen Fusogenität gesteigert wird.

Unsere Forschungsgruppe identifizierte eine Mutation im RSV-F-Protein an Position 489 (D489E), die eine deutliche Steigerung der fusogenen Aktivität des Virus zur Folge hatte (Yan et al., 2014). Die Einführung dieser Mutation in das rekombinante RSV-L19F (rRSV-L19F_{D489E})-Virus führte zu einer gesteigerten Expressionskinetik des Reporters, die der des WSN-NLuc Virus entsprach. Ein weiterer Vorteil der Einführung der D489E Mutation in RSV-F liegt in der Tatsache, dass dieses Reportervirus seine Anfälligkeit für niedermolekulare Fusionsinhibitoren verlor. Etwaige Substanzen, die als RSV-Fusionsinhibitoren wirksam sind, hätten aufgrund des bereits erwähnten Resistenzmechanismus (Weisshaar et al., 2015; Yan et al., 2014) eine eingeschränkte medizinische

Relevanz. Zusätzlich wurde im RSV-Reportervirus die Renilla-Luciferase durch eine Firefly-Luciferase ersetzt (rRSV-L19F_{D489E}-Firefly), um eine individuelle Quantifizierung der Replikation der beiden Viren zu ermöglichen, da sich die beiden Luciferasen einer unterschiedlichen Substratchemie bedienen.



Abbildung 3–4: Schematische Darstellung des rRSV-L19F_{D489E}-Firefly-Genoms. Übernommen und modifiziert aus (Yan et al., 2014).

Zwar konnte die Kinetik der Reporterexpression von WSN-NanoLuc und rRSV-L19F_{D489E}-Firefly in einem zufriedenstellenden Maß angeglichen werden, jedoch gelang es nicht, die Kontaminationen durch das Firefly-Protein im produzierten und eingelagerten Viruskonzentrat durch Aufreinigung mittels Gradienten Ultrazentrifugation oder Hochleistungsdünnschichtchromatographie ausreichend zu entfernen. Eine mögliche Erklärung dieses Sachverhalts ist, dass die Renilla-Luciferase Proteine entweder effizient an RSV-Virionen adsorbieren oder in die Tochervirionen inkorporiert werden, was eine Trennung der Reporterproteine von den Virionen verhindern würde. Durch die Kontaminationen durch das Firefly Reporterprotein, war der dynamische Bereich nicht ausreichend, um dieses System in einem Hochdurchsatz-Protokoll im μL -Maßstab anwenden zu können. Um die Expression von kontaminierenden Firefly-Proteinen während der Produktion großer Mengen an isolierten Viren, die als Vorrat gelagert werden, zu verhindern, wurde eine von unserer Arbeitsgruppe entwickelte SMASh (small-molecule-assisted shut-off)-Technologie verwendet (Chung et al., 2015). Dieses System basiert auf einer Sequenz, bestehend aus einer NS3-Protease, die sich vom Hepatitis-C-Virus ableitet, gefolgt von einer Degron-Domäne, welche den Abbau des gesamten

Proteins im Proteasom induziert. Diese Sequenz wird an den C-Terminus des Proteins, dessen Expression bei Bedarf verhindert werden soll, angehängt. Die vom Hepatitis-C-Virus abstammende NS3-Protease spaltet die NS3-Degron-Sequenz durch Autoproteolyse nach der Translation ab und das Zielprotein liegt anschließend funktionsfähig vor. Durch Zugabe von NS3-Inhibitoren wie Asunaprevir (BMS-650032) (Scola et al., 2014), das zur Behandlung von Hepatitis-C-Virusinfektionen zugelassen ist, verhindert die autoproteolytische Aktivität von NS3 und somit die Abspaltung der NS3-Degron-Sequenz vom Zielprotein, was zum proteasomalen Abbau des Zielproteins führt. Mit diesem System konnte durch Replikation des rRSV-L19F_{D489E}-FireflySMASH in Gegenwart von Asunaprevir und anschließender Reinigung mittels Gradienten Ultrazentrifugation ein dynamischer Bereich des Firefly-Signals erreicht werden, der zur Anwendung in einem HTS-Protokoll geeignet ist (**Abbildung 3–5**).

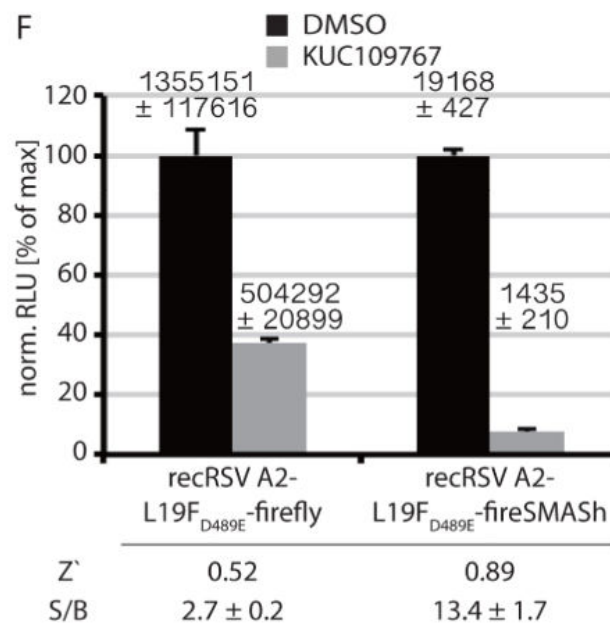


Abbildung 3–5: Bestimmung des dynamischen Bereichs der beiden RSV-Reporterviren rRSV-L19F_{D489E}-FireflySMASH und rRSV-L19F_{D489E}-Firefly. Während der Infektion wurden A549-Zellen mit 10 µM KUC109767 bzw. einem äquivalentem Volumen

DMSO versetzt. Die Reportsignale (engl. relative light unit; RLU) wurden 48 Stunden nach der Infektion bestimmt. Die Werte wurden auf die DMSO-Kontrolle normalisiert (N=3, Mittelwert \pm SD sind angegeben). Übernommen aus (Yan et al., 2015).

Das SMASH-Konstrukt war auch nach mehreren viralen Replikationszyklen im Genom des rRSV-L19F_{D489E}-FireflySMASH nachweisbar, was dessen genomische Stabilität bestätigte. Nach der Optimierung der beiden Viren WSN-NLuc und rRSV-L19F_{D489E}-FireflySMASH für einen Doppelinfektions-Assay, wurden verschiedene Zelllinien mit Krankheitsrelevanz, die humanen respiratorische Zelllinien BEAS-2B, HEp2 und A549, individuell mit verschiedenen MOIs mit den beiden Viren infiziert. Es zeigte sich, dass für eine hohe Assaystabilität die Zelllinie BEAS-2B am besten für die Anwendung in einem HTS-Protokoll geeignet ist (**Abbildung 3–6**).

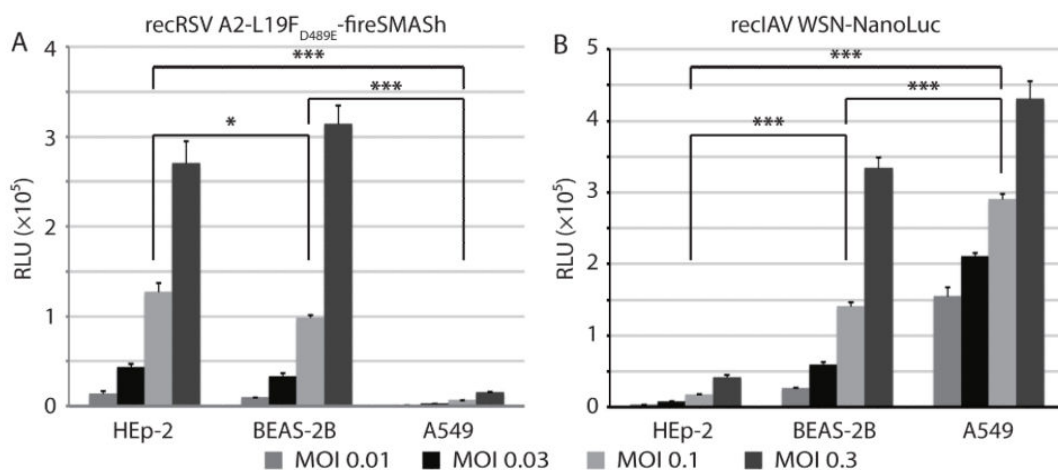


Abbildung 3–6: Luciferase-Aktivitäten des rRSV-L19F_{D489E}-FireflySMASH und IAV-WSN-NanoLuc Reportervirus 44 Stunden nach der Infektion, auf unterschiedlichen humanen, respiratorischen Zelllinien bei unterschiedlicher Multiplizität der Infektion (MOI). Übernommen aus (Yan et al., 2015).

Des Weiteren wurde auf dieser Zelllinie eine optimale MOI von 0,1 für RSV und 0,02 für IAV und ein optimaler Detektionszeitpunkt für die Quantifizierung der Replikation der beiden Viren zwischen 38 und 42 Stunden nach der Infektion evaluiert.

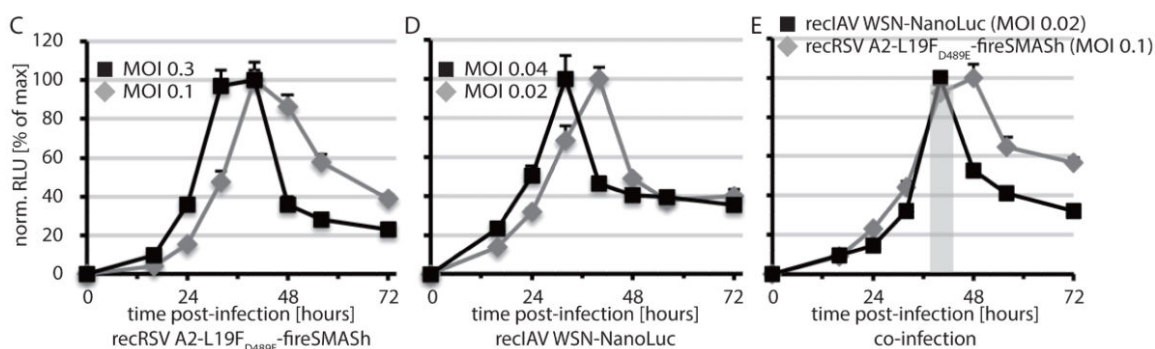


Abbildung 3–7: Reporteraktivitätsprofile nach der Infektion mit rRSV-L19F_{D489E}-FireflySMASH (C) oder IAV-WSN-NanoLuc (D) und nach Co-Infektion mit beiden Reporterviren bei einer MOI von 0,1 (RSV) bzw. 0,02 (IAV) (E). Die Werte repräsentieren zellassozierte Luciferase-Aktivitäten und wurden auf das höchste Signal eines jeweiligen Panels normalisiert (N=3; Mittelwert ± SD sind angegeben). Der grau schattierte Bereich in (E) zeigt den Zeitraum nach der Infektion in dem die Signalintensitäten beider Luciferase-Reporter ≥80% des Maximums erreichten. Übernommen aus (Yan et al., 2015).

Nach erfolgreicher Optimierung des Assays wurde dieser in einem ersten Test-Screen getestet. Zur Überprüfung der Güte des Assays, in einem miniaturisierten Screening-Protokoll (96-Well Format), wurden Verbindungen getestet, deren antivirale Aktivität gegen Myxoviren bereits etabliert wurde, wie die RSV-spezifischen Verbindungen KUC109767 (10 μ M) (Matharu et al., 2014), GPAR3710 (10 μ M) (Yan et al., 2014) und BMS-433771 (10 μ M) (Cianci et al., 2004) und die IAV-spezifische Verbindung 5-Iodotubercidin (10 μ M) (Fox et al., 1998) sowie die gegen MeV aktiven Verbindungen ERDRP-0519 (10 μ M)

(Krumm et al., 2014) und AS-48 (40 μM) (J. J. Yoon et al., 2009). Als bekannte zytotoxische Verbindung wurde Cycloheximid (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) für die Validierung des Assays verwendet. Außerdem wurde das Set durch bekannte Substanzen mit einer breiten antiviralen Aktivität, wie Ribavirin (40 μM) und JMN3-003 (10 μM) (Krumm et al., 2011) ergänzt. Die Ergebnisse des initialen Screens bestätigten, dass dieser Screening Assay in der Lage ist, Substanzen mit antiviraler Aktivität gegen Myxoviren zu detektieren (**Abbildung 3–8**). Außerdem wurden für sowohl den NanoLuc- als auch den Renilla-Reporter sehr gute Z' -Werte von 0,68 bzw. 0,67 ermittelt (**Abbildung 3–8**). Es wurde ebenfalls bestätigt, dass das rRSV-L19F_{D489E}-FireflySMASh Konstrukt keine Sensitivität bezüglich ungewollter Fusionsinhibitoren aufwies, da die in diesen Screen integrierten RSV Fusionsblocker GPAR3710 und BMS-433771 (Cianci et al., 2004; Yan et al., 2014) keine signifikante Reduktion des Renilla-Reportersignals induzieren konnten. Um die Eignung des Assays in einem automatisierten Hochdurchsatz-Protokoll unter Verwendung automatisierter Robotertechnik (Hamilton-Liquid-Handler) zu testen, wurde dieser anschließend in einem 384-Well-Format an einem Pilotset aus verschiedenen Verbindungen aus einer National Compound Collection (NCC) getestet. Dieses Set wurde mehrmals getestet, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse an unterschiedlichen Tagen und auf verschiedenen Testplatten zu bestätigen. Auch in diesem 384-Well-Format konnte die Robustheit des Protokolls durch Z' -Faktoren größer 0,5 für beide Reportersysteme unterstrichen werden. Dieser Testscreen identifizierte elf Substanzen, die eine signifikante Reduktion (> oder = 75%) des Reportersignals entweder eines der Viren oder beider Viren hervorriefen. Unter diesen Verbindungen waren IAV-spezifische Substanzen wie Actinomycin D (Loh & Soergel, 1965) und Triptolid (Wan & Chen, 2014), RSV-spezifische Substanzen wie Temozolomid (J. Zhang, Stevens, & Bradshaw, 2012) und Etoposid (Morlet et al., 1999) sowie Verbindungen wie Methotrexat (Shanley & Debs, 1989), die eine inhibierende Wirkung auf die Replikation beider Viren zeigte und deren antivirale oder zytotoxische Aktivität

bereits beschrieben wurde. Die statistischen Analysen der unabhängigen Testwiederholungen ergaben außerdem eine hohe Reproduzierbarkeit (**Abbildung 3–8**).

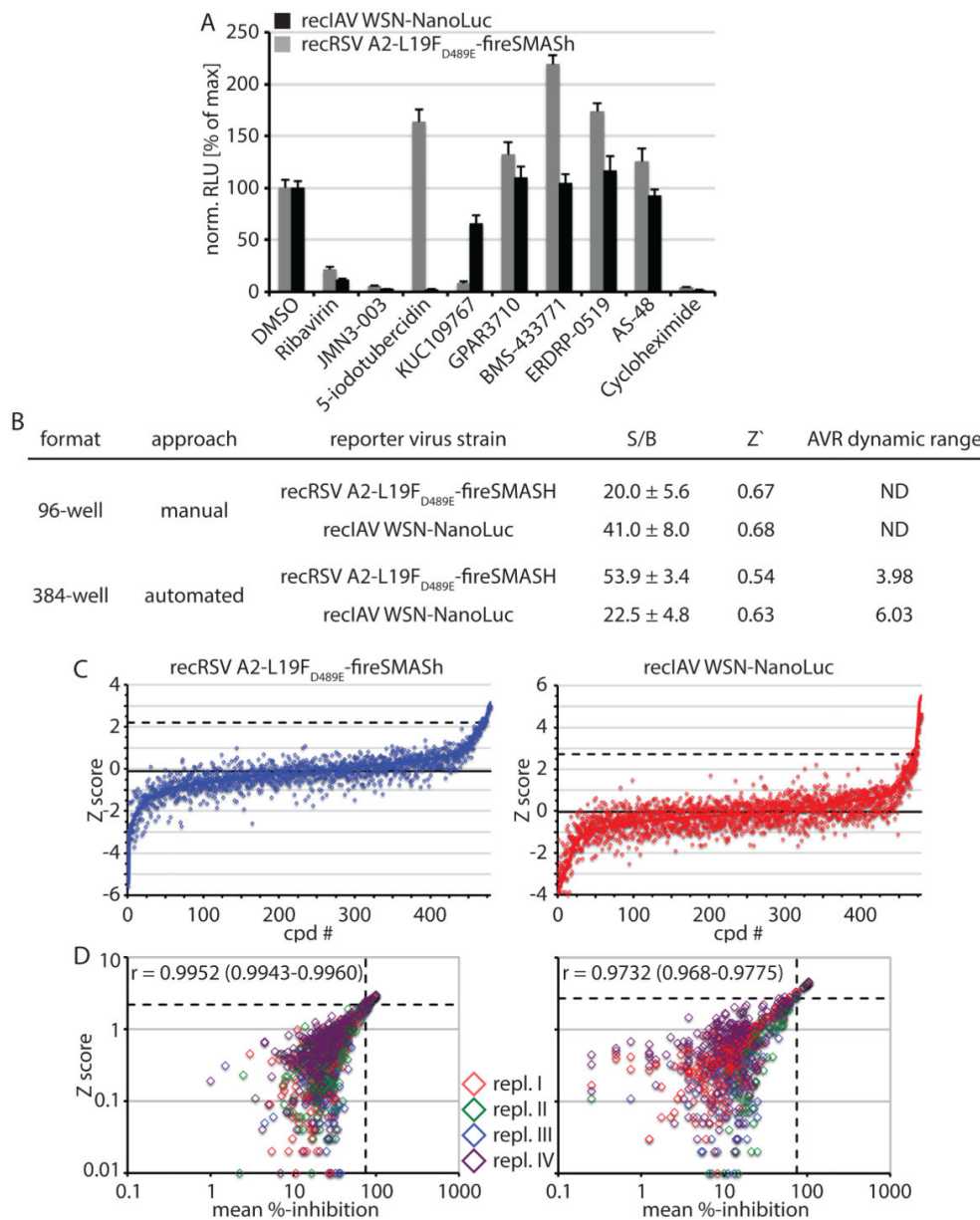


Abbildung 3–8: Assay Miniaturisierung und Validierung. (A) Assay Validierung mit bekannten RSV- und IAV-spezifischen Verbindungen und mit Substanzen die ein bekanntes, breites, antivirales Aktivitätsspektrum aufweisen. Als zytotoxische Substanz

wurde Cycloheximid verwendet (N=5; Mittelwert \pm SD sind angegeben). (B) Screeningparameter die im 96-Well Format (manuell, N=5; Mittelwert \pm SD sind angegeben) und im 384-Well-Format (automatisiert, N=128; Mittelwert \pm SD sind angegeben) erhalten wurden. JMN3-003 wurde als Referenzverbindung verwendet. Die y-Achse repräsentiert den mittleren dynamischen Bereich über alle vier identischen Testplatten. ND, not determined. (C) Z-Score-Profile des automatisierten Doppelmyxovirus-Assays, getestet an einem NCC (National Compound Collection) Pilotset im 384-Well-Format mit vier identischen Wiederholungen, analysiert für jedes der beiden Viren. Jeder Punkt symbolisiert den Z-Score einer Verbindung aus einem der vier Experimente. Die durchgehende schwarze Linie entspricht dem Mittelwert des Assay Z-Scores und die gestrichelte schwarze Linie symbolisiert die festgelegte Hitgrenze [Assay Mittelwert + $2,5 \times$ (Assay Z-Score SD)]. Die Screeningkonzentration der getesteten Verbindungen lag bei 5 μ M. (D) Individuelle Darstellung der Z-Scores der vier unabhängigen Experimente (I-IV), aufgetragen gegen die mittlere prozentuale Inhibition des Reportersignals für jede Verbindung. Die gestrichelten horizontalen bzw. vertikalen Linien bedeuten die festgelegten Hitgrenzen, basierend auf dem Z-Score [Assay Mittelwert + $2,5 \times$ (Assay Z-Score SD)] bzw. dem biologischen Effekt (mittlere Inhibition des Signals $\geq 75\%$). Die Zahlen bedeuten den Korrelationskoeffizienten nach Pearson (r) und das 95% Konfidenzintervall (in Klammern). Übernommen aus (Yan et al., 2015)

Nach erfolgreicher Miniaturisierung auf ein 384-Well-Format und Assay Validierung wurde dieses Doppelmyxovirus Screening-Protokoll in einem Testscreen an einer Wirkstoffbibliothek mit dem Umfang von 1280 pharmakologisch aktiven Verbindungen (Library of Pharmacologically Active Compounds, LOPAC, Sigma-Aldrich) angewandt. Die LOPAC-Bibliothek enthielt unter anderem für die Behandlung entsprechender viraler Infektionen zugelassene RSV- und IAV-inhibierende Wirkstoffe wie Zanamivir, Ribavirin und Amantadin. Mit diesem Testscreen sollte festgestellt werden, wie akkurat die Hit-Identifikation dieses Protokolls ist. Wie im Validierungsscreen wurde mit

einer Wirkstoffkonzentration von 5 μM getestet. Der Z'-Wert lag bei 0,31. Die Hit-Grenze wurde auf $2,5 \times Z$ Scores Standardabweichungen über dem Mittelwert ($M+2,5 Z$ Score SD) für rIAV-WSN-NLuc und $M+2,0 \times Z$ Score SD für rRSV-L19F_{D489E}-FireflySMASH festgelegt. Die Hit-Kandidaten wurden auf ihr zytotoxisches Potential bei der doppelten Screening-Konzentration (10 μM) getestet. Für Verbindungen die im primären Screen gegen eines oder beide rekombinanten Viren die Hit-Grenze erreichten oder übertrafen und im zytotoxischen Test die Lebensfähigkeit der Zellen um weniger als 50% inhibierten, wurden anschließend die Dosis-Wirkung-Beziehung gegen die im Screen verwendeten Reporterviren in einem Konzentrationsbereich von 10,0–0,078 oder 10,0–0,0006 μM bestimmt. Um eine Inhibition der Firefly-Luciferase oder der NS3 Protease des SMASH Systems für die aktiven Verbindungen gegen rRSV-L19F_{D489E}-FireflySMASH auszuschließen, wurden entsprechende Substanzen gegen rRSV A2-L19F-renilla getestet. Um eine Inhibition der Nano-Luciferase für Substanzen, die eine anti-IAV spezifische Wirkung zeigten, auszuschließen, hätte die Signalreduktion der Nano-Luciferase in Zellen, die mit einem Nano-Luciferase-Expressionsplasmid transfiziert wurden, in einem Counterscreen überprüft werden können. Da in diesem Testscreen aber nur Zanamivir selektiv das Influenza-A-Virus inhibierte, wurde dieser Test in den Counterscreens nicht angewandt.

Aus der Analyse des Test-Screens gingen Substanzen, die als antivirale Pharmaka bekannt waren, wie Zanamivir (Demicheli, Jefferson, Rivetti, & Deeks, 2000), Ribavirin (Smee, Bray, & Huggins, 2001)), Substanzen die eine bekannte Wirkung als Breitbandvirostatikum innehaben, wie Gemcitabin (Clouser et al., 2012; Denisova et al., 2012), Aminopterin (Fischer et al., 2013; Sidwell, Arnett, & Schabel, 1972), Brequinar (Lucas-Hourani et al., 2013; Yeo et al., 2015)) und Substanzen deren Myxovirus-inhibierende Wirkung noch nicht etabliert wurde (Fenretinid, BNTX-7, PMEG Hydrat) hervor (**Abbildung 3–9**).

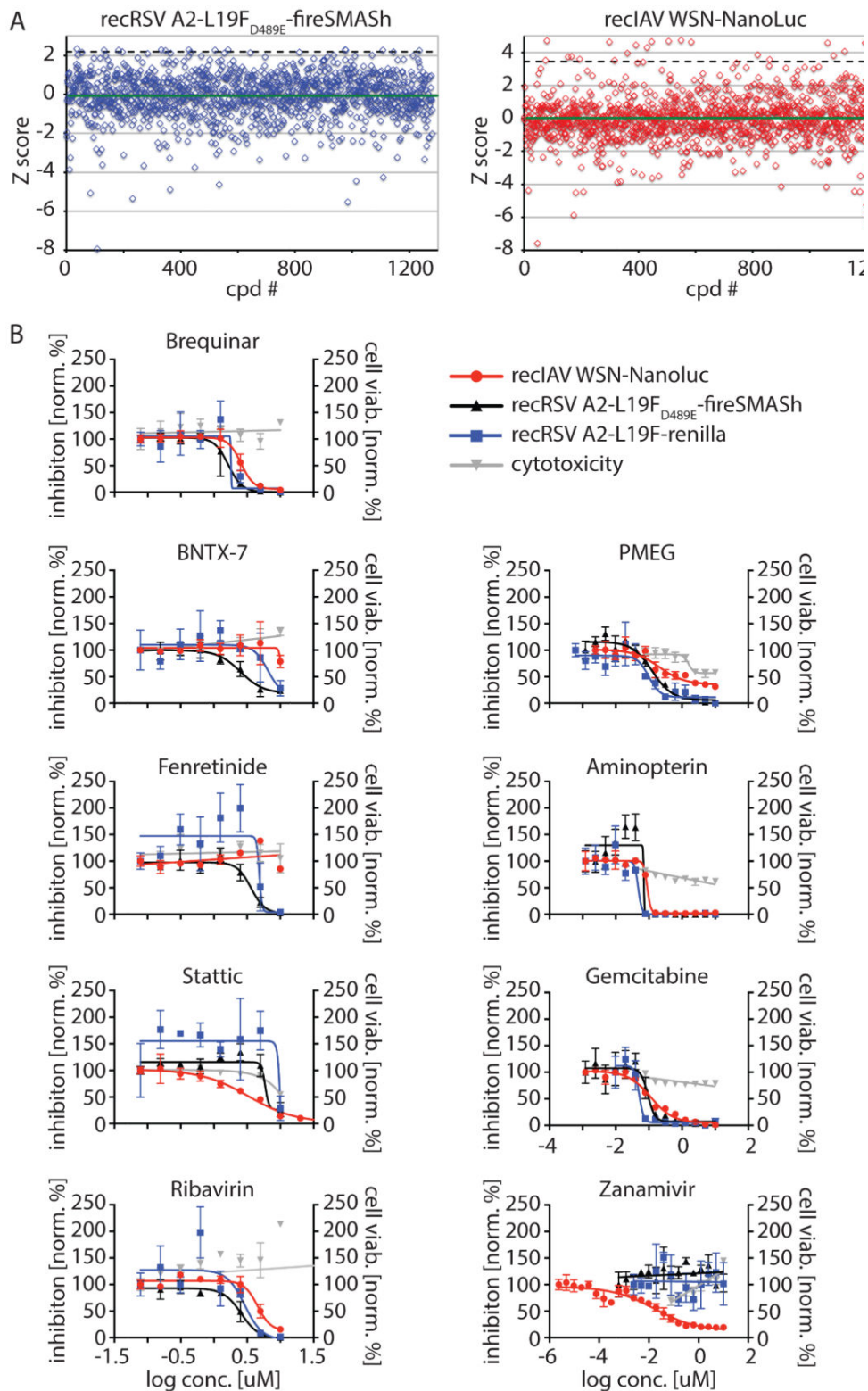


Abbildung 3–9: Testscreen einer 1280 Verbindungen umfassenden Substanzbibliothek der LOPEC mit bekannten bioaktiven Verbindungen. Gesamt Z'-Score = 0,31). (A) Z-

Score-Profil des automatisierten Proof-of-Concept-Screens im 384-Well-Format. Die durchgehende grüne Linie entspricht dem Mittelwert des Assay Z-Scores und die gestrichelte schwarze Linie symbolisiert die festgelegte Hitgrenze [Assay Mittelwert + $2,0 \times (\text{Assay Z-Score SD})$ für rRSV-L19F_{D489E}-FireflySMASH und Assay Mittelwert + $2,5 \times (\text{Assay Z-Score SD})$ für IAV-WSN-NanoLuc]. Die Screeningkonzentration der getesteten Verbindungen lag bei 5 μM . (B) Dosis-Wirkungs-Experimente in einem Konzentrationsbereich zwischen 10-0,078 oder 10-0,0006 μM . Nur Verbindungen mit CC_{50} -Werten $\geq 10 \mu\text{M}$ und der bestätigten Inhibition von mindestens einem Virus sind gezeigt. Die angegebenen Werte sind normalisiert (norm.) auf DMSO-Kontrollen und repräsentieren entweder die mittlere prozentuale Inhibition (inhibition [norm. %]) oder Lebensfähigkeit der Zellen (cell viability [norm. %]) der drei unabhängigen Experimente \pm SD. Die Regressionskurven für die antivirale (schwarz) bzw. zytotoxische (grau) Aktivität basieren auf einem Vier-Parameter-Modeling soweit es anwendbar war. Übernommen aus (Yan et al., 2015)

3.2 HT-Screen einer Substanzbibliothek mit 142.495 Verbindungen

Nach abgeschlossener Implementierung, Miniaturisierung, Validierung und einer erfolgreichen Machbarkeitsstudie an einer 1280 Verbindungen umfassenden Bibliothek pharmakologisch aktiver Verbindungen (Library of Pharmacologically Active Compounds, LOPAC1280) (Kapitel 3.1), wurde dieses Screening-Protokoll in einem Hochdurchsatz-Screen an einer 142.495 niedermolekulare Verbindungen umfassenden Substanzbibliothek angewandt. Diese Bibliothek an chemisch diversen Substanzen setzte sich aus kommerziell erwerbbareren Verbindungen (100.000 der Firma ChemBridge und 30.000 der Firma ChemDiv) und proprietären Verbindungen (1.155 vom Emory Institute for Drug Development (EIDD) und 11.520 Verbindungen von der Kansas University) zusammen. Diese Bibliotheken wurden für sogenannte Pan-Assay Interference Compounds (PAINS) (Dahlin et al., 2015) gefiltert. Bei PAINS

handelt es sich um Verbindungen, die aufgrund ihrer chemischen Struktur eine hohe Tendenz haben, in verschiedenen biologischen Assays mit ganz unterschiedlichen Fragestellungen als aktiv getestet zu werden. Jedoch beruht die scheinbare Aktivität dieser, auch als Assay-Artefakte bezeichneten Verbindungen, auf ungewollten biochemischen Prozessen, wie chemische Aggregation, Chelatisierung, Redox-Aktivität, Cystein Oxidation, Fluoreszenzeffekte und unselektive Bindung an Proteine. Um keine unnötigen Ressourcen in die Charakterisierung dieser klinisch irrelevanter Hit-Artefakte zu verschwenden, ist es wichtig, das Vorhandensein solcher PAINS in der Screening-Bibliothek ausschließen zu können.

3.2.1 Equipment, Software und Ablauf des HT-Screens

Die 142.495 verschiedenen Verbindungen wurden zu Konzentrationen von 10 mM in DMSO gelöst und in Mikrotiterplatten mit 384 Kavitäten (Wells) bei – 80 °C gelagert. Jede der Platten wurde mit einem individuellen Barcode versehen. Das MScreen-Softwarepaket (Jacob et al., 2012) wurde genutzt um die 142.495 Verbindungen verlässlich zu organisieren, die Screeningergebnisse zu speichern und zu analysieren. Jede einzelne Verbindung war in der Screening-Software (MScreen) durch ihre Position auf der Platte und dem Barcode der Platte definiert. Der Barcode diente als Verbindung zwischen der physischen Platte und ihrer in MScreen hinterlegten, digitalen Kopie.

Während des Screens wurden mit Hilfe eines Hamilton-Liquid-Handlers (Nimbus) (**Abbildung 3–10**) und eines an diesem angebrachten Pin-Tool Systems, 20 nL von einer 384-Well Mikrotitertestplatte, die die zu testenden Verbindungen enthielt, in die 384-Wells der Mikrotiterassayplatte, welche die zu infizierenden Zellen enthielt, transferiert (gestempelt). Dabei wurde die Barcodekombination aus Testplatte und Assayplatte von der Nimbus-Software erfasst und gespeichert. Anschließend wurden die Zellen mit beiden Viren, unter Verwendung eines Multiflow Mikrodispensers (BioTek) (nicht gezeigt in

Abbildung 3–10), infiziert. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden mit Hilfe eines H1-Synergy-Platereaders automatisiert und konsekutiv die beiden Luciferase-Substrate zugegeben, nach jeweiliger Inkubationszeit die Signale detektiert und zusammen mit dem Barcode der jeweiligen Assayplatte gespeichert. Diese Informationen wurden anschließend unter Angabe des Barcodes der Assayplatte mit der jeweiligen Testplatte in MScreen verknüpft. Für die statistische Auswertung wurden positive und negative Kontrollen in die beiden randständigen Spalten links und rechts auf jeder Platte gegeben. Anschließend wurden die Ergebnisse des Screens mithilfe der MScreen-Software analysiert. Anhand der Ergebnisse wurden Verbindungen, die die Hit-Grenze bei einem oder beiden Viren erreichten in einer Unterbibliothek zusammengefasst und erneut getestet. Verbindungen, die einem erneuten Test standhielten, wurden dann mit Hilfe des Liquid-Handlers für entsprechende Aktivitäts- und Toxizitäts-Dosis-Wirkung-Experimente in einer 384-Well-Testplatte in einem Konzentrationsbereich zwischen 10–0,039 μM oder 5,0–0,039 μM seriell verdünnt. Anschließend wurden Experimente zur Reportinterferenz und orthogonale Counterscreens durchgeführt (**Abbildung 3–11**).

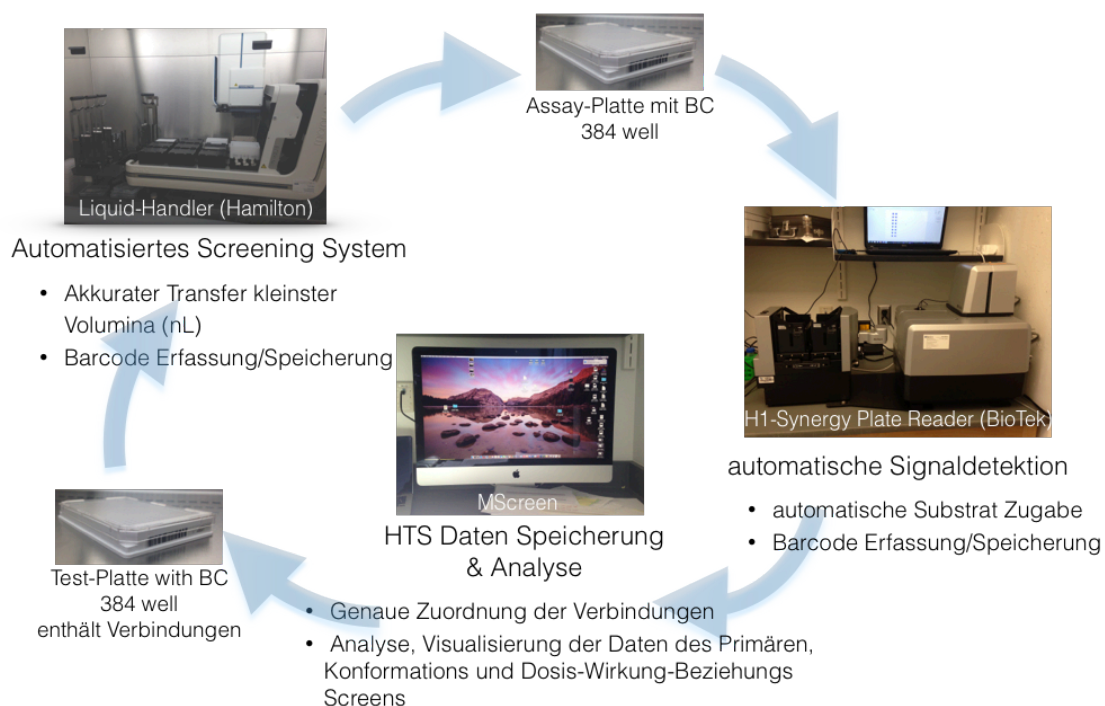


Abbildung 3–10: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte und der involvierten Geräte des automatisierten Doppelmyxovirus Hochdurchsatz-Screening-Protokolls.

3.2.2 Analyse des Screens und Counterscreens

Der Screen wurde auf Zellen der BEAS-2B-Zelllinie und einer Konzentration der zu testenden Verbindungen von $5 \mu\text{M}$ durchgeführt. Die niedrige Screeningkonzentration von $5 \mu\text{M}$ sollte in Kombination mit der etwas höher angesetzten Hit-Grenze [Mittelwert + $3,5 \times \text{Z-Score SD}$], eine Fokussierung des Screens auf Verbindungen mit einer hohen Potenz erreichen.

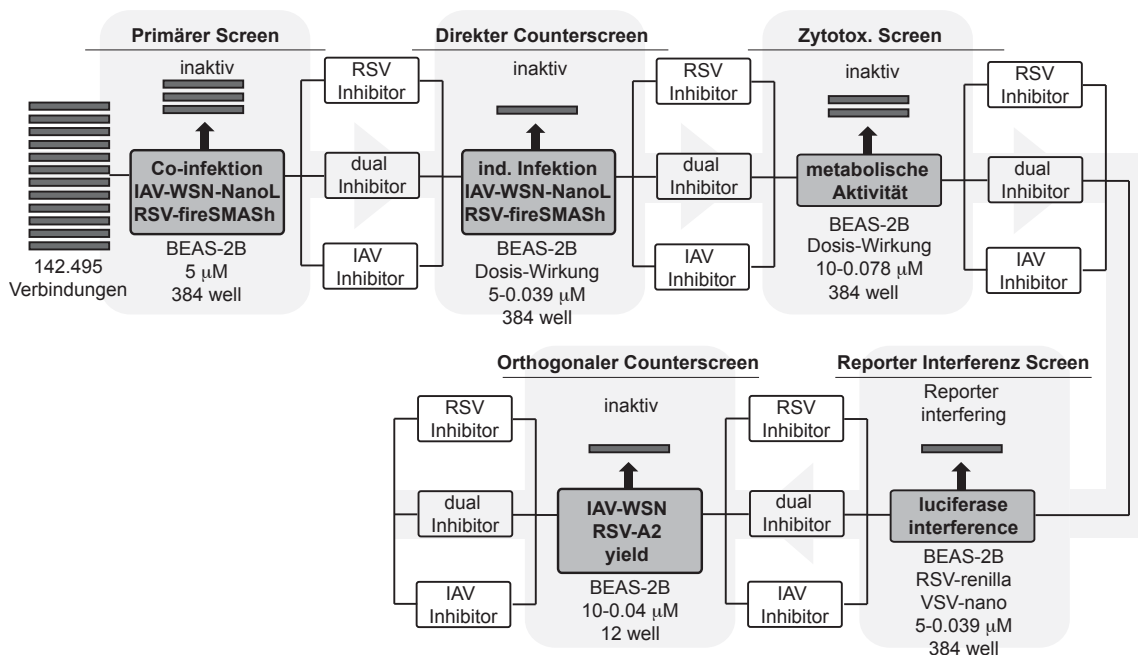


Abbildung 3–11: Flussdiagramm der einzelnen Screens und Counterscreens, die in dieser HTS-Kampagne angewandt wurden.

Für eine möglichst genaue Hit-Identifikation wurden zwei unterschiedliche statistische Verfahren angewandt. Für jede 384-Well Testplatte wurde zum einen die prozentuale Inhibition, bezogen auf die positiven und negativen Kontrollen (%-Inhibition) und zum anderen der Z-Score für jede getestete Verbindung auf der jeweiligen Platte errechnet. Die Z-Scores werden auf den Mittelwert aller Verbindungen auf einer Platte bezogen und sind somit unabhängig von den Kontrollen. Verbindungen, für die ein Z-Score $\geq 3,5$ und eine prozentuale Inhibition $\geq 75\%$ errechnet wurde, wurden als Hit-Kandidaten für direkte und orthogonale Counterscreens und zur zytotoxischen Charakterisierung ausgewählt. Um früh in der Hit-to-Lead-Prozedur Kenntnis darüber zu erlangen, ob die Signalreduktion auf einer Wechselwirkung mit dem Reporterprotein, anstelle einer viralen Struktur beruht, wurden die potentiellen Hit-Kandidaten gegen ein rekombinantes Vesicular-stomatitis-Virus (VSV), das

ebenfalls eine Nano-Luciferase ORF als Teil seines viralen Genoms trägt (VSV-NanoLuc) getestet. Ein weiteres wichtiges Experiment zur Evaluation der Aktivität der potentiellen Hit-Kandidaten ist die Dosis-Wirkung-Beziehung. Anhand dieser konnte einerseits die Aktivität, die im primären Screen festgestellt wurde, bestätigt oder widerlegt werden und zum anderen kann der Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit abnehmender Konzentrationen eine Aussage über das biochemische Verhalten der Verbindung zulassen. Für Verbindungen, die eine inhibierende Interaktion mit einem der viralen Proteine eingehen, sollte ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Aktivität zu beobachten sein. Verbindungen, die durch ungewünschte Interaktionen wie Aggregation mit dem Virus, in Wechselwirkung treten, zeigen hingegen einen plötzlichen, drastischen Wirkverlust, sobald eine gewisse Konzentration unterschritten wurde, und weisen somit keinen linearen Verlauf zwischen Konzentration und Aktivität auf.

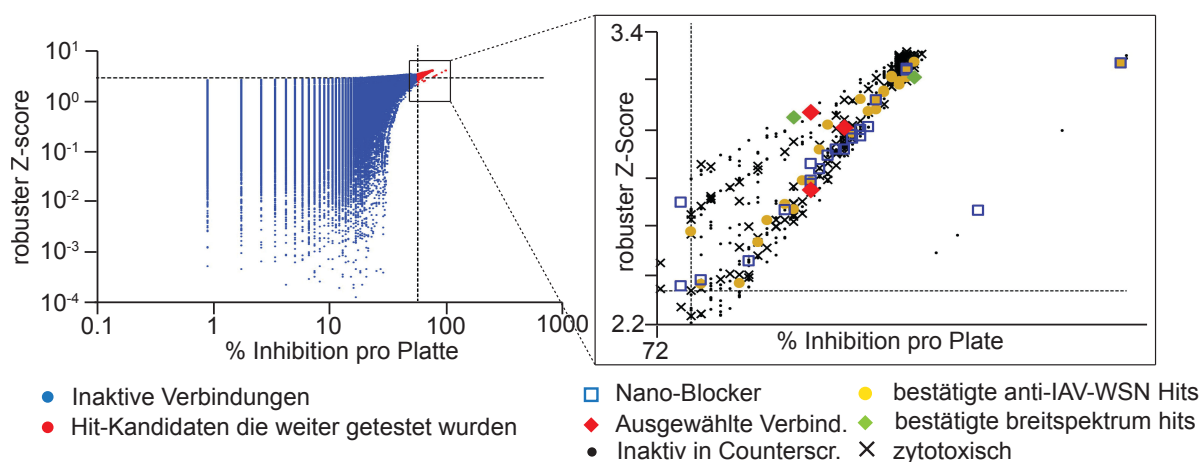


Abbildung 3–12: Übersicht der Ergebnisse des primären HTS und Strategie zur primären Hit-Identifikation. Die Rohdaten des Screens wurden einerseits unter Berücksichtigung der positiven und negativen Kontrollen (prozentuale Inhibition des Reportsignals pro Assayplatte, % inhibition by plate) und andererseits unabhängig von den Kontrollen (Z-Score) analysiert. Die gestrichelten Linien repräsentieren die Hit-

Grenze (75% Inhibition bzw. Z-Score Werte $\geq 3,5$). Die roten Punkte stehen für alle primären Hits (643), die für weitere Tests in Counterscreens ausgewählt wurden.

Die ausgewählten Hit-Kandidaten wurden anschließend in einem automatisierten Assay zur Bestimmung der Dosis-Wirkung-Beziehung in einem 384-Well-Format in einem Konzentrationsbereich von 20,0–0,009 μM getestet. Aus dem Screen gingen schließlich 324 Verbindungen hervor, die spezifisch das Signal des WSN-NanoLuc-Reportervirus inhibierten und die Hit-Grenze entweder erreichten oder übertrafen. Zusätzlich zeigten 319 Verbindungen eine inhibitorische Aktivität gegen beide Viren. Die Toxizitätsanalyse ergab, dass 28 der 324 IAV-spezifischen Verbindungen eine CC_{50} unter 10 μM aufwiesen und deshalb aus dem Hit-Pool entfernt wurden. Von den 319 Verbindungen, die die Reportersignale beider Viren inhibierten, wurden 126 aufgrund deren zytotoxischen Potentials aussortiert (**Abbildung 3–13**). Die Tatsache, dass ca. 9% der IAV-spezifischen Hit-Kandidaten das zytotoxische Screening nicht bestanden haben, während 40% der Verbindungen, die als gleichzeitig RSV- und IAV-inhibierend aus dem primären Screen hervorgingen, legt eine der Schwierigkeiten bei der Entdeckung von antiviralen Chemotherapeutika mit einer erweiterten Wirkbreite offen. Die scheinbare antimyxovirale Aktivität vieler Substanzen im primären Screen ist ein sekundärer Effekt, der wahrscheinlich auf wachstumshemmenden Prozessen in der Wirtszelle beruht.

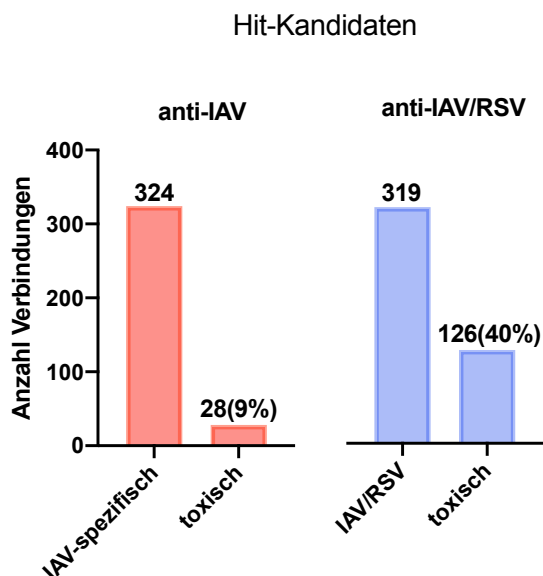


Abbildung 3–13: Übersicht über IAV-spezifische und RSV- und IAV-inhibierenden Verbindungen, die aus dem primären Hochdurchsatz-Screen hervorgingen und der jeweilige Anteil an Verbindungen, deren vermeintlich antivirale Wirkung auf zytotoxischen Effekten in der Wirtszelle beruhte.

Das im Rahmen dieser Arbeit implementierte und angewandte Protokoll zur Entdeckung neuer, niedermolekularer Verbindungen mit replikationsinhibierender Aktivität gegen IAV und RSV, klinisch relevante Vertreter der Myxovirus-Familie, beinhaltet zwei Innovationen: Zum einen kam zum ersten Mal ein uneingeschränkt replikationsfähiges IAV-Reportervirus der dritten Generation in einem Hochdurchsatz-Screen zum Einsatz. Zum anderen ermöglicht dieses Doppelmyxovirusinfektions-Protokoll die Entdeckung möglicher Hit-Kandidaten mit IAV- oder RSV-spezifischer Indikationsbreite oder antimyxoviral wirkenden Verbindungen, die auf beide Viren replikationsinhibierend wirken. Diese erstmalige, umfangreiche Anwendung des Doppelmyxovirusinfektions-Protokolls ergab mehrere entscheidende Erkenntnisse bzw. Vorteile: Für jedes der beiden Reportersysteme konnten auch unter Hochdurchsatzbedingungen robuste Screeningparameter erhalten

werden (**Abbildung 3–12**). Dieses Screening-Protokoll erwies sich als sehr zeit- und ressourceneffizient. Der Einsatz replikationskompetenter Reporterviren ermöglicht die Anwendung des Screens auf verschiedenen Zelllinien, darunter auch Zelllinien mit hoher klinischer Relevanz, wie Zellen des menschlichen Replikationstrakts, die in diesem Protokoll zur Anwendung kamen. Die Tatsache, dass es möglich ist, zwei Reportsysteme parallel auszuwerten, bringt den Vorteil mit sich, dass für RSV- bzw. IAV-spezifische Substanzen direkt eine Aussage über deren mögliches zytotoxisches Potential getroffen werden kann. Eine auf zytotoxischen Effekten beruhende Reduktion des viralen Reportersignals ist bei Verbindungen, die eine virusspezifische Aktivität aufweisen unwahrscheinlich und wurde in der Realität nur selten beobachtet (**Abbildung 3–13**). Die Hit-Rate für IAV-spezifische Verbindungen war relativ niedrig (0,03%), jedoch gab es keinen Hinweis darauf, dass dieser Sachverhalt mit dem Doppelinfektions-Protokoll im Zusammenhang steht. Die insgesamt zurückhaltende Hit-Rate wird der sorgfältig zusammengestellten Sammlung an testbaren, niedermolekularen Verbindungen unter dem Ausschluss von Assay-PAINS (Dahlin et al., 2015) zugerechnet.

Im Vergleich dazu stellte sich die Entdeckung von Verbindungen mit einer breiten antimyxoviralen Aktivität in diesem Ansatz als schwierig heraus. Für 40% der Verbindungen, die initial eine replikationsinhibierende Wirkung gegen beide Viren aufwiesen, konnte ein ungünstiges zytotoxisches Profil ermittelt werden (**Abbildung 3–13**) und die meisten der verbliebenen Kandidaten waren in den direkten Counterscreens gegenüber einem viralen Ziel unterlegen. Diese Ergebnisse deuten an, dass die Mehrheit der potentiell breitspektrumvirostatisch wirkenden Verbindungen, die durch Wechselwirkung mit einem zellulären Zielprotein verschiedene Viren, die auf dieses zelluläre Protein angewiesen sind, in ihrer Replikation hemmen, ihr klinisches Potential durch eine unüberwindbare Zytotoxizität einbüßen. Das gilt vor allem für Verbindungen, die verstärkt im pädiatrischen Bereich eingesetzt würden, wie es bei anti-RSV und anti-IAV-Chemotherapeutika der Fall wäre.

3.3 Evaluierung des Aktivitäts- und Zytotoxizitätsprofils der IAV-spezifischen Hit-Kandidaten

Basierend auf den Ergebnissen des primären, sowie den direkten und orthogonalen Counterscreens (**Abbildung 3–11**), wählten wir neun potente Hit-Kandidaten mit einem anti-IAV-spezifischen Aktivitätsmuster zur weiteren Evaluierung im Rahmen dieser Studie aus (**Abbildung 3–14, Tabelle 3-1**).

Tabelle 3–1: EC₅₀- und EC₉₀-Werte der neun Hit-Kandidaten, die zur weiteren Evaluierung ausgewählt wurden, gegen IAV-WSN-NanoLuc.

	IAV-WSN-NanoLuc	
	EC ₅₀ [μ M] ^{a,d,e}	EC ₉₀ [μ M] ^{a,d,e}
GRP-71271	0,05 (0,03–0,08)	0,31 (0,21–0,45)
GRP-103594	0,02 (0,01–0,04)	0,32 (0,26–0,38)
GRP-115249	0,06 (0,04–0,09)	0,46 (0,31–0,69)
<i>GRP-315^b</i>	2,08 (0,96–0,09)	12,2 (1,58–94,5)
<i>GRP-095^b</i>	0,56 (0,44–0,71)	2,08 (1,92–3,33)
GRP-398	1,33 (1,07–1,65)	3,28 (2,06–5,22)
<i>GRP-426^c</i>	1,67 (1,26–2,21)	7,32 (3,66–14,6)
GRP-114802	3,40 (2,42–4,71)	12,4 (5,40–28,4)
GRP-159581	0,01 (0,00–0,03)	0,12 (0,04–0,18)

^a die Werte repräsentieren drei unabhängige Experimente und wurden mittels four-parameter variable-slope Regressions Modell berechnet. Die Werte in Klammern geben das 95% Konfidenzintervall an.

^b Struktur analog zu GRP-115249.

^c Struktur analog zu GRP-398.

^d Daten basieren auf relativen RLUs.

^e Höchste getestete Konzentration war 20 μ M.

Viele der Verbindungen, die zur Testung in den Counterscreens ausgewählt wurden, wurden aufgrund nachgewiesener Interferenz mit dem Nano-Luciferase-Reporterprotein, fehlender oder unzureichender Aktivität im Dosis-Wirkung-Assay oder wirtszellabhängiger Aktivität aussortiert.

Die neun für weitere Tests ausgewählten Verbindungen beinhalteten sechs unterschiedliche, chemische Grundgerüste (**Abbildung 3–14**). Die Verbindungen GRP-115249, GRP-095 und GRP-315 sowie GRP-398 und GRP-426 bilden jeweils eine Gruppe chemisch analoger Strukturen.

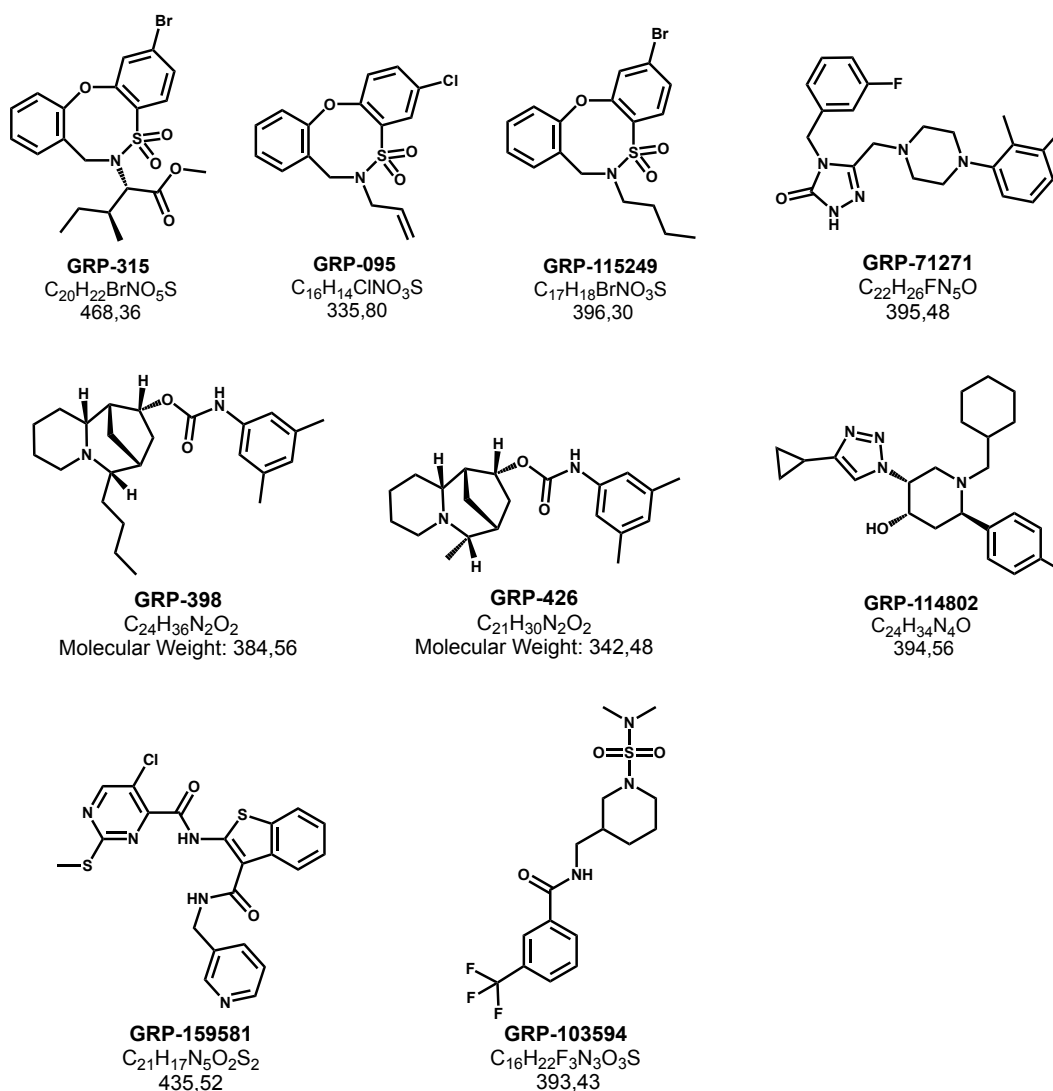


Abbildung 3-14: Darstellung der chemischen Strukturen der verschiedenen potentiellen Hit-Kandidaten, die aus dem Doppelmyxovirus HTS mit anti-IAV-spezifischer Aktivität hervorgingen. Die Verbindungen GRP-095 und GRP-315 gehören derselben chemischen Strukturklasse wie GRP-115249 an und die Verbindung GRP-426 ist strukturell direkt verwandt mit GRP-398. Daraus ergeben sich sechs chemisch unterschiedliche Strukturklassen.

Um die IAV-inhibierende Aktivität der Hit-Kandidaten zu bestätigen, wurden die Verbindungen in einem direkten Counterscreen gegen IAV-WSN-NanoLuc in

einem Dosis-Wirkung-Experiment getestet. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 3-1** zusammengefasst. Zusätzlich wurde die Wirksamkeit der Verbindungen in einem orthogonalen Counterscreen gegen das Standard A/WSN/1933 (H1N1) Virus (WSN) in einem Dosis-Wirkung-Experiment mit Konzentrationen zwischen 10,0–0,04 μM überprüft. Die Virustiter bei den unterschiedlichen Konzentrationen wurden mittels Plaque-Assay bestimmt. Die Dosis-Wirkung-Kurven und die errechneten, effektiven Konzentrationen bei der 50% der Wirkstärke erreicht wurden (EC_{50} -Werte), sind in **Abbildung 3–15** zusammengefasst. Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, zeigte Verbindung GRP-114802 zwar eine potente Inhibition des WSN-NanoLuc-Virus, jedoch keine inhibierende Aktivität gegen das Standard A/WSN/1933 (WSN)-Virus ($\text{EC}_{50} > 10 \mu\text{M}$) (**Abbildung 3–15**). Da GRP-114802 auch gegen das WSN-NanoLuc-Virus die geringste Potenz mit einer mittleren effektiven Konzentration (EC_{50}) von 3,4 μM und einem EC_{90} -Wert von 12,4 μM aufwies (**Tabelle 3-1**), wurde die Charakterisierung dieser Verbindung nicht weiter vorangetrieben, sondern wurde aus dem Hit-Pool entfernt. Die fehlende Aktivität von GRP-114802 gegen Standard WSN bei gleichzeitiger, effektiver Hemmung des WSN-NanoLuc könnte auf eine Hemmung der virusassoziierten Reporterexpression, zurückgeführt werden, da GRP-114802 keine explizite Inhibition des NanoLuc-Reporters im Reporterinterferenzscreen zeigte (Daten nicht gezeigt).

Die weiteren Verbindungen zeigten eine potente Inhibition des A/WSN/1933 (H1N1)-Virus, was sich in EC_{50} -Werten zwischen 0,17 und 0,38 μM und einer Senkung der viralen Titer um drei Logstufen ausdrückte (**Abbildung 3–15**).

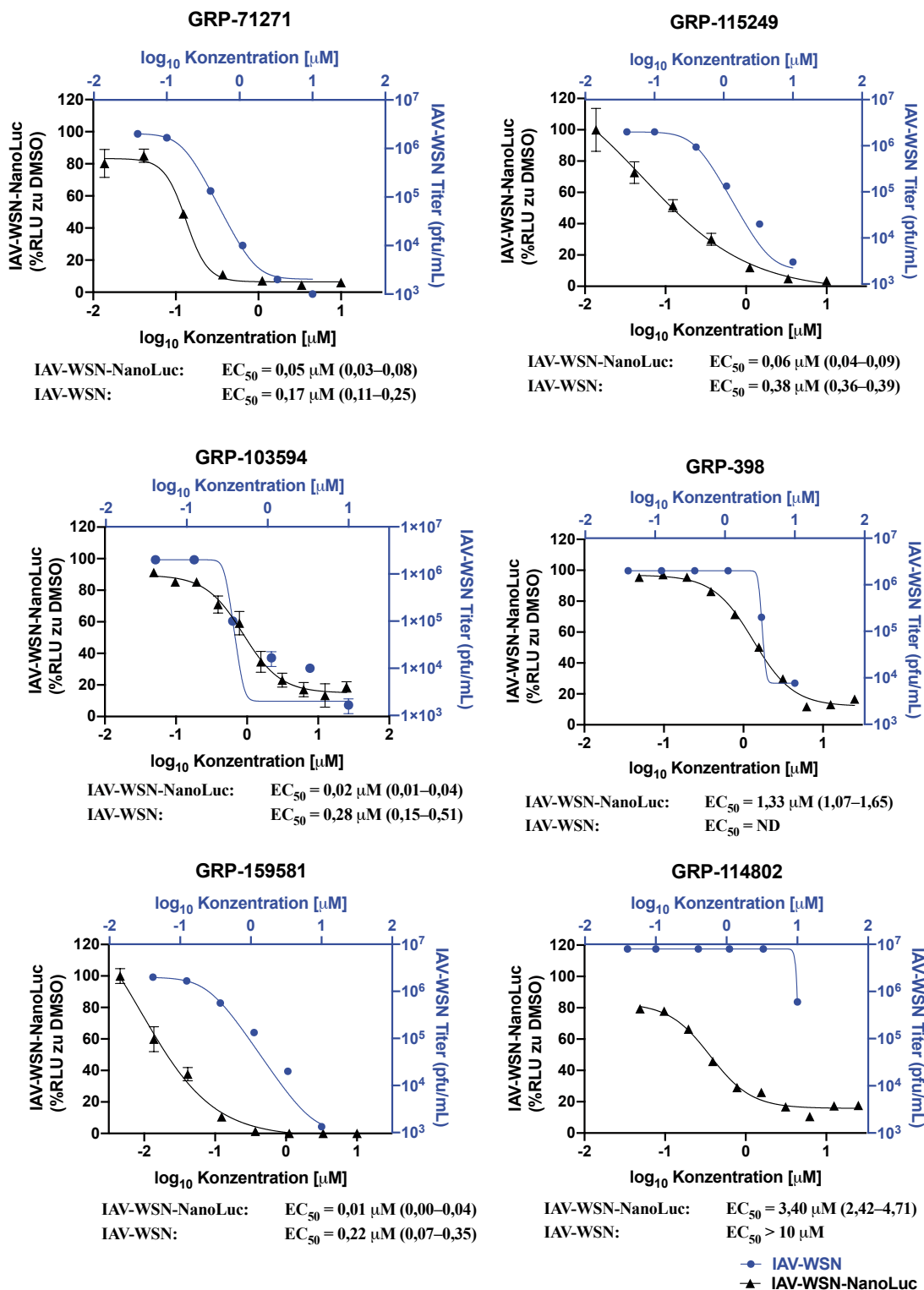


Abbildung 3–15: Aktivitätsprofile potentieller Hit-Kandidaten die zur weiteren Charakterisierung ausgewählt wurden. Dosis-Wirkung-Inhibitionskurven der

verschiedenen Verbindungen gegen IAV-WSN (blau), basierend auf Plaque-Titer und gegen IAV-WSN-Nanoluc (schwarz), basierend auf Luciferase-Aktivitäten. Die Titer und die Reportersignale wurden ca. 36 Stunden nach der Infektion bestimmt. Die Kurven wurden basierend auf dem Four-Parameter-Variable-Slope-Regressionsmodell berechnet. Jedes Symbol repräsentiert den Durchschnitt dreier unabhängiger Experimente \pm SD. Die Werte in Klammern repräsentieren das 95% Konfidenzintervall.

Da es sich bei den Verbindungen GRP-095 und GRP-315 um strukturanaloge Substanzen von GRP-115249 handelt und GRP-115249 mit einer EC_{50} von 0,06 μ M die größte Potenz besaß (**Tabelle 3-1**), wurde nur GRP-115249, als Leitverbindung dieser Strukturklasse, in den weiteren Experimenten getestet. Gleiches galt für die strukturanaloge Substanzen GRP-398 und GRP-426, von denen nur der potentere Vertreter GRP-398 als Repräsentant dieser Strukturklasse in den weiteren Experimenten getestet wurde (**Tabelle 3-1** und **Abbildung 3-15**).

Anschließend wurden die Verbindungen gegen ein H1N1-Isolat der Pandemie von 2009 (A/Netherlands/2009) getestet. Wir konstruierten eine rekombinante Version dieses Isolats (IAV-NL-NanoLuc), deren Replikation durch einen an das PB2-Genomsegment geklonten, offenen Leserahmen einer Nano-Luciferase quantifiziert werden konnte (Analog zu **Abbildung 3-2**).

Das Experiment wurde als Dosis-Wirkung-Experiment mit acht verschiedenen Konzentrationen zwischen 10,0–0,004 μ M durchgeführt (**Abbildung 3-16**). Die Bestimmung der viralen Replikation und Infektion erfolgte durch Detektion des Nano-Luciferase (NanoLuc)-Signals. Die einzige Verbindung, bei der keine Inhibition des IAV-NL-NanoLuc-Signals im von uns getesteten Konzentrationsbereich detektiert werden konnte, war GRP-159581 ($EC_{50} > 10 \mu$ M, **Tabelle 3-2** und **Abbildung 3-16**)

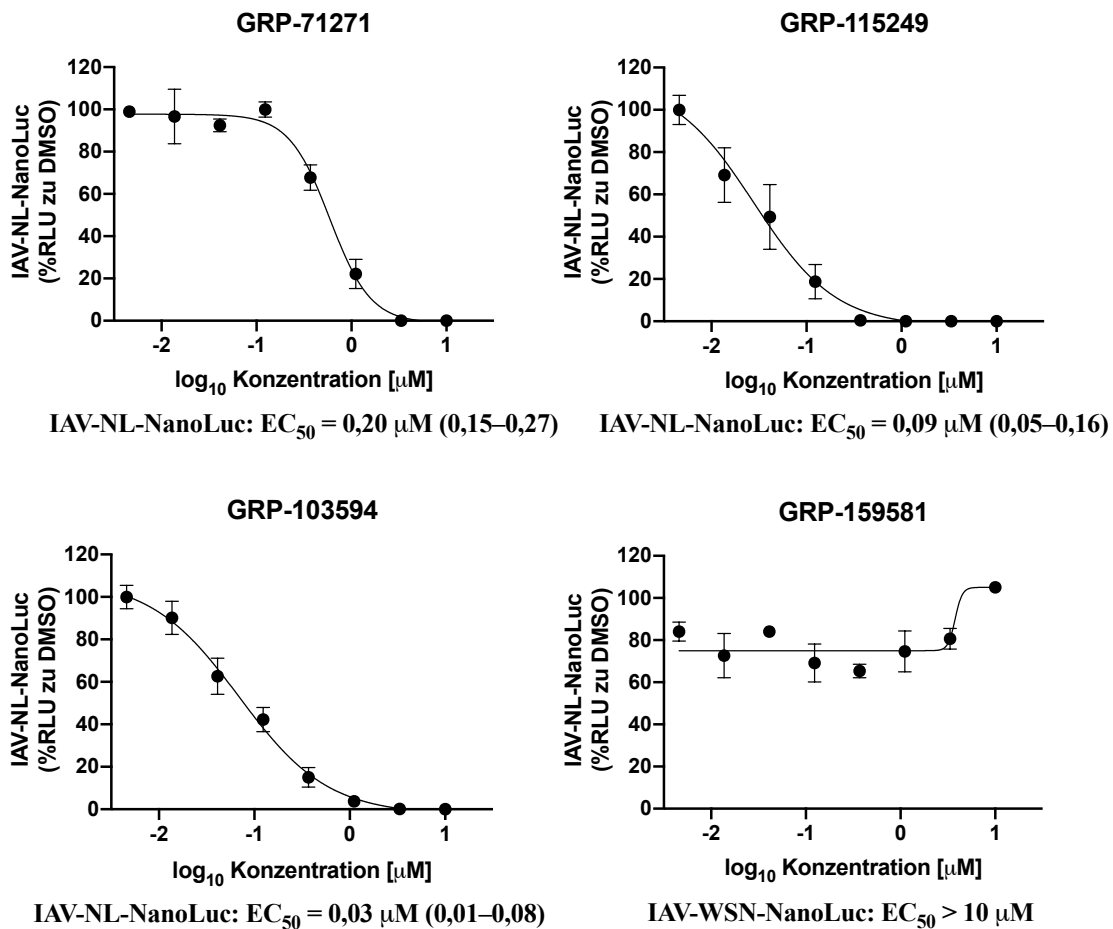


Abbildung 3–16: Aktivitätsprofile potentieller Hit-Kandidaten, die zur weiteren Charakterisierung ausgewählt wurden. Dosis-Wirkung-Inhibitionskurven der verschiedenen Verbindungen gegen das rekombinante, klinische Isolat der Pandemie von 2009 (A/Netherlands/2009 (H1N1)) IAV-NL-NanoLuc, basierend auf dem Nano-Luciferase Signal. Die Titer und die Reportersignale wurden ca. 36 Stunden nach der Infektion bestimmt. Die Kurven wurden basierend auf dem Four-Parameter-Variable-Slope-Regressionsmodell berechnet. Jedes Symbol repräsentiert den Durchschnitt dreier unabhängiger Experimente \pm SD. Die Werte in Klammern repräsentieren das 95% Konfidenzintervall.

Des Weiteren wurden alle Verbindungen gegen unterschiedliche IAV-Subtypen, die in der Vergangenheit an pandemischen IAV-Ausbrüchen beteiligt waren,

getestet. Dazu gehören neben H1N1 und H2N2 (A/Mallard/2007/Potsdam/83), deren HA-Proteine der Gruppe 1 zugeordnet werden, diverse H3N2-Viren, die ein HA-Protein der Gruppe 2 tragen (**Tabelle 3-2**).

Die viralen Titer wurden mittels Plaque-Assay bzw. Immunoplaque-Assay bestimmt. Von allen Verbindungen, die getestet wurden, war lediglich für GRP-71271 eine Inhibition des aviären A/Mallard/2007/Potsdam/83 (H2N2)-Virus innerhalb des getesteten Konzentrationsbereichs nachzuweisen ($EC_{50}=5,36 \mu\text{M}$) (**Tabelle 3-2**). Keiner der getesteten IAV-Subtypen der Gruppe 2 wurde durch die Hit-Kandidaten in ihrer Replikation und Infektion blockiert (**Tabelle 3-2**).

Die Hit-Kandidaten GRP-71271, GRP-103594, GRP-115249, GRP-398 und GRP-159581 wurden außerdem gegen Vertreter verschiedener RNA- und DNA-Viren, darunter das Masernvirus ((-)-ssRNA), das Respiratorische Synzytial-Virus ((-)-ssRNA), das Sindbis-Virus ((+)-ssRNA), das Vacciniavirus (dsDNA) und das Vesicular-stomatitis-Virus ((-)-ssRNA), getestet. Diese Experimente zeigten eine IAV-spezifische, antivirale Aktivität der GRP-Hit-Kandidaten (**Tabelle 3-2**).

Tabelle 3–2: EC₅₀-Werte der ausgewählten Hit-Kandidaten gegen verschiedene Viren.

Virus ^{a,g}	EC ₅₀ (µM)					
	GRP-71271	GRP-1115249	GRP-103594	GRP-398	GRP-159581	GRP-114802
IAV-WSN (H1N1) ^b	0,17 (0,11–0,25)	0,38 (0,36–0,39)	0,28 (0,15–0,51)	0,17 (0,00–0,31)	0,01 (0,00–0,04)	3,40 (2,42–4,71)
IAV-WSN-NanoLuc (H1N1) ^c	0,05 (0,03–0,08)	0,06 (0,04–0,09)	0,02 (0,01–0,04)	ND	0,22 (0,07–0,34)	> 10
IAV-NL-NanoLuc (H1N1) ^c	0,20 (0,15–0,27)	0,03 (0,01–0,08)	0,09 (0,05–0,16)	ND	> 10	> 10
A/Mallard/Poitsdam/83 (H2N2) ^b	5,36 (3,11–9,30)	> 10	> 20 ^d	> 10	> 10	ND
A/Panama/2007/99 (H3N2) ^{b,e}	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	ND
A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) ^{b,e}	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	ND
A/Wyoming/03/2003 (H3N2) ^{b,e}	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	ND
A/Aichi/2/68 (H3N2) ^{b,e}	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	ND
Masern Virus ^{e,f}	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	ND
Respiratorisches Synzytial Virus ^{e,f}	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	ND
Sindbis Virus ^{b,e}	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	ND
Vaccinia Virus ^{b,e}	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	ND
Vesicular-stomatitis Virus ^{e,e}	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	ND

^a die Werte repräsentieren drei unabhängige Experimente und wurden mittels four-parameter variable-slope Regressions Modell berechnet. Die Werte in Klammern geben das 95% Konfidenzintervall an. ND, not determined.

^b Daten wurden mittels Plaque Titer bestimmt.

^c Daten basieren auf relativen RLUs.

^d Höchste getestete Konzentration war 20 µM.

^e Höchste getestete Konzentration war 10 µM.

^f Daten basieren auf TCID₅₀ Werten.

^g Für IAVs wurden die CC₅₀-Werte auf BEAS-2B-Zellen bestimmt. Für GRP-71271, GRP-1115249, GRP-103594, GRP-0186 und GRP-114802 lagen diese bei

> 100 µM (höchste Konzentration getestet war 100 µM). Für GRP-398 ergab sich ein CC₅₀-Wert von 52,7 µM.

Parallel dazu wurden die Verbindungen umfangreichen, zytotoxischen Tests auf mehreren Zelllinien, mit hoher Krankheitsrelevanz und hoher experimenteller Relevanz in einem Konzentrationsbereich zwischen 100–0,04 μM unterzogen (**Tabelle 3–3**). Unter den getesteten Zelllinien waren auch aktivierte, humane, mononukleäre Zellen des Blutes (PBMC). Bei diesen Zellen handelt es sich um Immunzellen, die für die Infektionsbekämpfung wichtig sind (**Tabelle 3–3**).

Der zytotoxische Assay beruhte auf der Detektion des reduzierenden Potentials lebender Zellen durch ein nach Reduktion fluoreszierendes Reagenz.

Tabelle 3–3: Zytotoxizitätsprofile der ausgewählten Hit-Kandidaten auf verschiedenen Zelllinien oder stimulierten humanen PBMCs von gesunden Spendern.

Zelllinie ^a	CC ₅₀ (μM)					
	GRP-71271	GRP-115249	GRP-103594	GRP-398	GRP-159581	GRP-114802
MDCK	>100	>100	>100	62,8 (58,7-67,2)	>100	>100
BEAS-2B	>100	>100	>100	52,7 (26,2-106,2)	27,3 (24,8-41,6)	>100
Vero	>100	>100	>100	70,3 (55,5-89,0)	>100	>100
BSR T7/5	>100	>100	>100	47,5 (29,1-77,4)	>100	>100
HEp-2	>100	>100	>100	79,0 (66,5-74,3)	>100	>100
stimulierte menschl. PBMCs	>100	ND	>100	ND	ND	ND
S/I-Werte ^b	>500	>3.300	>1.100	310	2730	>29

^adie höchste getestete Konzentration war 100 μM . ND, not determined. Werte in Klammern beinhalten das 95% Konfidenzintervall

^bWerte wurden basierend auf den CC₅₀-Werten auf BEAS-2B-Zellen berechnet.

Die Auswertung dieser zytotoxischen Analyse ergab, dass auf allen getesteten Zelllinien, inklusive den PBMCs, die Verbindungen GRP-71271, GRP-115249, GRP-103594 und GRP-114802, innerhalb der von uns getesteten Konzentrationen, keine verminderte, metabolische Aktivität der Zellen beobachtet werden konnte.

Die Verbindungen GRP-398 und GRP-159581 zeigten ein von diesem Optimum abweichendes Zytotoxizitätsprofil (**Tabelle 3–3**). Verbindung GRP-159581 verursachte auf der BEAS-2B-Zelllinie bei höheren Konzentrationen, eine signifikante Beeinträchtigung der Zellvitalität, die in einem CC₅₀-Wert von

27,3 μM und einer maximalen Inhibition der metabolischen Aktivität auf <20% zum Ausdruck kam (**Abbildung 3–17**).

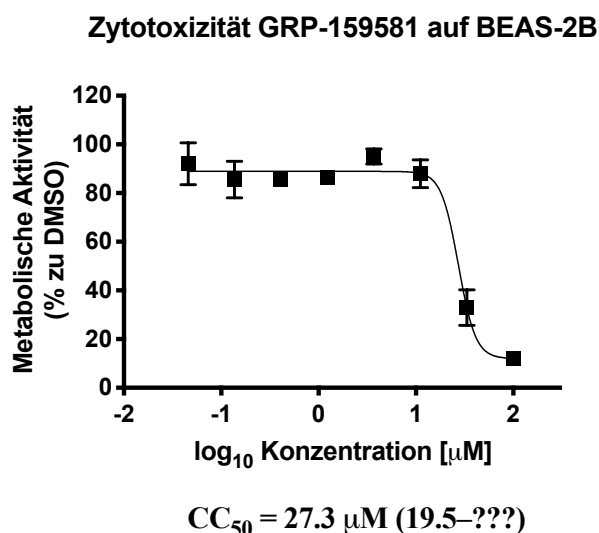
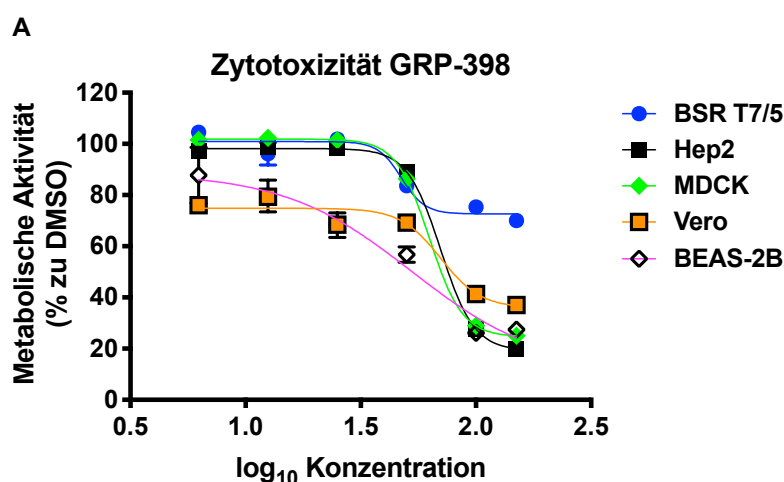


Abbildung 3–17: Zytotoxizitätsprofil der Verbindung GRP-159581 auf der experimentell und klinisch relevanten BEAS-2B-Zelllinie. Dosis-Wirkung-Kurve zur Bestimmung der mittleren, toxischen Konzentration (CC_{50}). Die Symbole repräsentieren die metabolische Aktivität der Zellen in Gegenwart der Verbindung GRP-159581 nach 72 Stunden Inkubationszeit bei 37°C. Die Kurven wurden basierend auf dem Four-Parameter-Variable-Slope-Regressionsmodell berechnet. Jedes Symbol repräsentiert den Durchschnitt dreier unabhängiger Experimente \pm SD. Die Werte in Klammern repräsentieren das 95% Konfidenzintervall. Das 95% Konfidenzintervall konnte aufgrund des Kurvenverlaufs nicht verlässlich berechnet werden. Die höchste getestete Konzentration war 100 μM .

Auf allen anderen Zelllinien, die getestet wurden, konnten für GRP-159581 CC_{50} -Werte >100 μM ermittelt werden (**Tabelle 3–3**). Aufgrund des, mit einem CC_{50} -Wert von 27,3 μM auf BEAS-2B-Zellen, von den anderen Verbindungen abweichenden Zytotoxizitätsmusters des Hit-Kandidaten GRP-159581 und

dessen Inaktivität gegen das rekombinante, pandemische H1N1 Virus von 2009 (**Tabelle 3–2**), wurde keine weitere Charakterisierung dieser Verbindung vorgenommen.

Auch GRP-398 zeigte ein auffälliges Zytotoxizitätsmuster. So konnten auf verschiedenen Zelllinien eine Abnahme der Zellvitalität auf Werte zwischen 70% und 20% detektiert werden. Um eine verlässliche Einschätzung des Zytotoxizitätsprofil von GRP-398 zu erlangen, wurde diese in einem Konzentrationsbereich von 150–6,2 μM erneut bestimmt. Daraus ergaben sich CC_{50} -Werte zwischen 47,5 und 79,0 μM in Abhängigkeit von der Zelllinie (**Abbildung 3–18 A und B**).



B

CC_{50} -Werte^a

MDCK	62.8 μM (58.7–67.2)
BEAS-2B	52.7 μM (26.2–106.2)
Vero	70.3 μM (55.5–89.0)
BSR T7/5	47.5 μM (29.1–77.4)
Hep2	79.0 μM (66.5–74.3)

Abbildung 3–18: Zytotoxizitätsprofil der Verbindung GRP-398 auf verschiedenen experimentell und klinisch relevanten Zelllinien. (A) Dosis-Wirkung-Kurven zur Bestimmung der halbmaximalen, toxischen Konzentration (CC_{50}). Die Symbole

repräsentieren die metabolische Aktivität der Zellen in Gegenwart der Verbindung GRP-398 nach 72 Stunden Inkubationszeit bei 37°C. Die Kurven wurden basierend auf dem Four-Parameter-Variable-Slope-Regressionsmodell berechnet. Jedes Symbol repräsentiert den Durchschnitt dreier unabhängiger Experimente \pm SD. (B) Tabellarische Darstellung der aus den Kurven ermittelten CC₅₀-Werte. Die Werte in Klammern repräsentieren das 95% Konfidenzintervall. Die höchste getestete Konzentration war 150 μ M.

Da die angegebenen CC₅₀-Werte die Konzentration der halbmaximalen Hemmung angeben, muss für eine vollständige Einschätzung des zytotoxischen Potentials einer Verbindung auf einer bestimmten Zelllinie, auch die relative Wirkstärke berücksichtigt werden. Aus **Abbildung 3–18** und der zugehörigen Tabelle geht hervor, dass GRP-398 eine um ca. 53 μ M höhere zytotoxische Potenz auf BSR T7/5-Zellen im Vergleich zu Hep2-Zellen aufweist (Unterschied CC₅₀-Werte). Jedoch ist die relative Wirkstärke von GRP-398 auf BSR T7/5 bei einer maximalen Inhibition der metabolischen Aktivität auf 70% (um 30%) um 50% geringer, als auf Hep2-Zellen, deren metabolische Aktivität um maximal 70%, also auf 30% gesenkt wurde. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass GRP-398, verglichen mit den anderen Hit-Kandidaten, eine messbare Inhibition der metabolischen Aktivität der getesteten Zelllinien verursacht.

Die hohen Potenzen der Verbindungen GRP-71271, GRP-115249, GRP-103594 und GRP-114802 mit EC₅₀-Werten zwischen 0,7 und 0,38 μ M und ihren günstigen Zytotoxizitätsprofilen spiegelten sich in äußerst robusten Selektivitätsindizes (SI = CC₅₀/EC₅₀) zwischen >500 und >3.300 wieder (**Tabelle 3–3**).

Basierend auf den Zytotoxizitäts- und Aktivitätsprofilen der verifizierten Hit-Kandidaten, wurden die Verbindungen GRP-71271, GRP-115249 und GRP-103594 für die folgende, mechanistische Charakterisierung ausgewählt,

während die Verbindungen GRP-159581 und GRP-114802 aus dem Hit-Pool entfernt wurden.

Die Evaluierung der Aktivitätsprofile ergab drei strukturchemisch diverse Verbindungen (GRP-71271, GRP-115249 und GRP-103594) mit einer IAV-spezifischen, antiviralen Aktivität mit mittleren effektiven Konzentrationen im nanomolaren Bereich gegen den attenuierten Laborstamm WSN und einem rekombinanten Isolat der Pandemie von 2009.

Diese Verbindungen wurden in der Folge auf ihren molekularen Wirkmechanismus untersucht.

3.4 Mechanistische Charakterisierung der verifizierten Hits

Um den molekularen Mechanismus der antiviralen Aktivität (molecular Mechanism of Action, MMoA) der drei unterschiedlichen Hit-Strukturklassen, zu entschlüsseln, wurde zunächst deren viruzidales Potential untersucht. Dazu wurde das an BEAS-2B-Zellen adsorbierte WSN-NanoLuc Virus, im Beisein von 10 μ M der jeweiligen Verbindung für zwei Stunden inkubiert. Damit das Virus nach Adsorption an die Zielzelle nicht vorzeitig von dieser internalisiert wurde und anschließend für eine Wechselwirkung mit der antiviralen Verbindung, aufgrund einer möglichen Membranimpermeabilität der getesteten Substanz, unzugänglich gewesen wäre, wurde die Inkubation der Zellen und des Virus bei einer Temperatur von 4°C durchgeführt. Bei dieser Temperatur ist die ansonsten fluide Zellmembran zu starr für Vorgänge, wie Membranfusion oder Endozytose. Anschließend wurden die antiviralen Substanzen vorsichtig ausgewaschen und die Zellen mit dem adsorbierten Virus bei 37°C inkubiert. Als Referenzexperiment wurde dieselbe Prozedur mit einem äquivalenten Volumen an Lösungsmittel, in dem die Verbindungen gelöst wurden (DMSO), durchgeführt. Nach 30 Stunden wurde die Replikation und Infektion des WSN-

NanoLuc-Virus mittels Luciferase-Aktivität detektiert (**Abbildung 3–19**). Wie der **Abbildung 3–19** zu entnehmen ist, konnte für die Präinkubation des WSN-NanoLuc-Virus mit jeder der drei Verbindungen ein Luciferase-Signal quantifiziert werden, das dem der DMSO-Kontrolle entsprach. Daraus ließ sich folgern, dass eine viruzidale Aktivität der Verbindungen GRP-71271, GRP-115249 und GRP-103594 als molekularer Mechanismus ihrer antiviralen Aktivität ausgeschlossen werden kann.

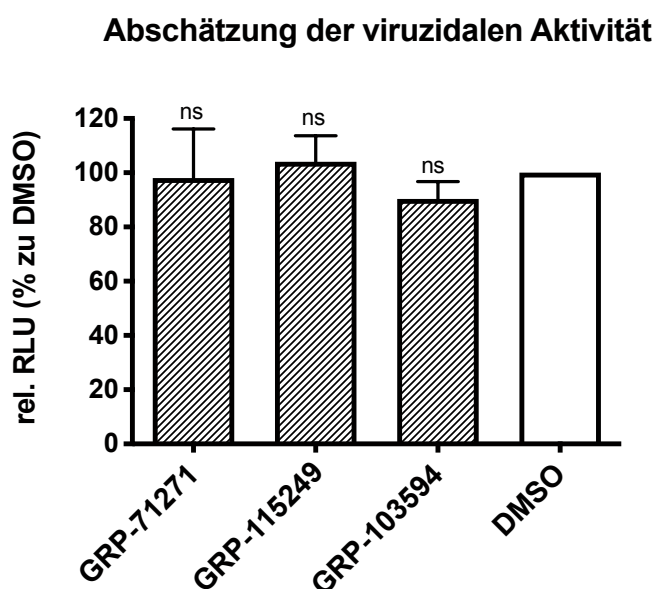


Abbildung 3–19: IAV-WSN-NanoLuc wurde mit 10 μ M der jeweiligen Verbindung für zwei Stunden bei 37°C präinkubiert. Nachdem die Verbindung ausgewaschen und BEAS-2B-Zellen mit dem vorbehandelten IAV-WSN-NanoLuc infiziert wurden, wurde die Luciferase-Aktivität nach 30 Stunden Inkubationszeit bei 37°C gemessen. Jede der Säulen repräsentiert den Mittelwert und SD von drei unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Analyse wurde One-way-ANOVA mit Sidak's Multiple-Comparison Posttest verwendet. ns bedeutet nicht signifikant [$P \geq 0,05$].

Um zu testen, ob die IAV-inhibierende Aktivität von GRP-71271, GRP-115249 und GRP-103594 auf der Aktivierung eines antiviralen Zustands in der Wirtszelle beruht, wurde das oben beschriebene Experiment zur Bestimmung der viruzidalen Aktivität leicht variiert. In diesem Experiment wurden die BEAS-2B Wirtszellen bei 37°C für zwei Stunden mit jeweils 10 μ M der entsprechenden Verbindung präinkubiert. Nach anschließender Auswaschung der zu testenden Substanzen wurden die Zellen mit IAV-WSN-NanoLuc infiziert und 30 Stunden später das Luciferase-Signal quantifiziert. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde ein Kontrollexperiment mit einem äquimolaren Volumen DMSO durchgeführt. Wie in **Abbildung 3–20** dargestellt, waren keine signifikanten Unterschiede in der Replikationsfähigkeit des IAV-WSN-NanoLuc in Zellen, die mit einer unserer Hit-Substanzen präinkubiert wurden, im Vergleich zum Kontrollexperiment (DMSO), festzustellen. Somit beruhte die anti-IAV-Aktivität der Verbindungen GRP-71271, GRP-115249 und GRP-103594 nicht auf der Aktivierung eines antiviralen Zustands in der Wirtszelle.

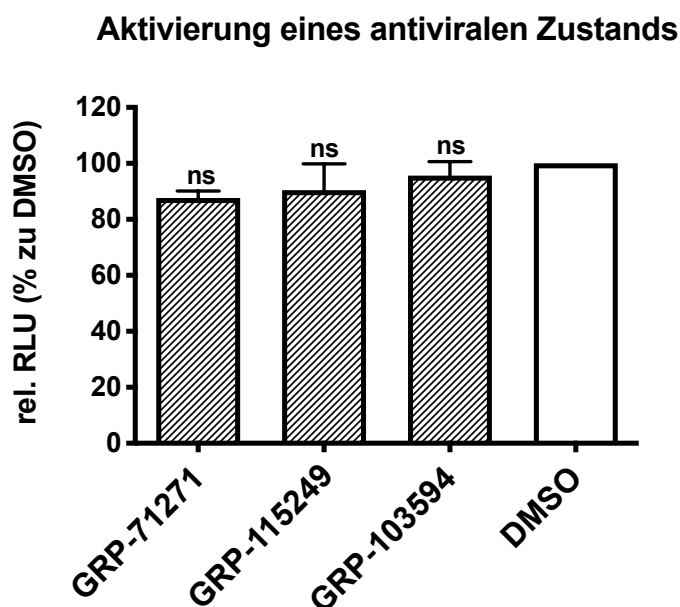


Abbildung 3–20: BEAS-2B-Zellen wurden mit 10 μ M der jeweiligen Verbindung für zwei Stunden bei 37°C präinkubiert. Nachdem die Verbindung ausgewaschen und die

Zellen mit IAV-WSN-NanoLuc infiziert wurden, wurde die Luciferase-Aktivität nach 30 Stunden Inkubationszeit bei 37°C gemessen. Jede der Säulen repräsentiert den Mittelwert und SD von drei unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Analyse wurde One-way-ANOVA mit Sidak's Multiple-Comparison-Posttest verwendet. ns bedeutet nicht signifikant [$P \geq 0,05$].

Das folgende Experiment zielte darauf ab zu klären, ob die Verbindungen GRP-71271, GRP-115249 oder GRP-103594 einen Einfluss auf die direkte Interaktion zwischen IAV-HA und dem zellulären Rezeptor, N-Acetylneuraminsäure, haben. Dazu wurden die Wirtszellen in der Gegenwart von IAV-WSN-NanoLuc und der jeweiligen Verbindung bei 4°C für zwei Stunden inkubiert. Die niedrige Temperatur ermöglicht eine Adsorption des IAV-WSN-NanoLuc an die Zielzellen, verhindert aber eine vorzeitige Infektion. Bevor die Zellen anschließend bei 37°C inkubiert wurden, wurde das Nährmedium ausgewaschen. Bei einer Blockierung der Virusadsorption an die BEAS-2B-Zellen durch die von uns getesteten Verbindungen, würden die Virionen mit dem überstehenden Nährmedium ausgewaschen werden und es wären reduzierte Reportersignale im Vergleich zum DMSO-Kontrollexperiment zu erwarten. In **Abbildung 3–21** sind die quantifizierten Ergebnisse dargestellt. Da die Luciferase-Signale keine signifikanten Unterschiede zwischen den Experimenten, in denen unsere Hit-Substanzen getestet wurden, verglichen mit dem DMSO-Kontrollexperiment aufwiesen, konnten wir eine Blockade der IAV-HA-Neuraminsäure-Interaktion durch die GRP-Verbindungen ausschließen.

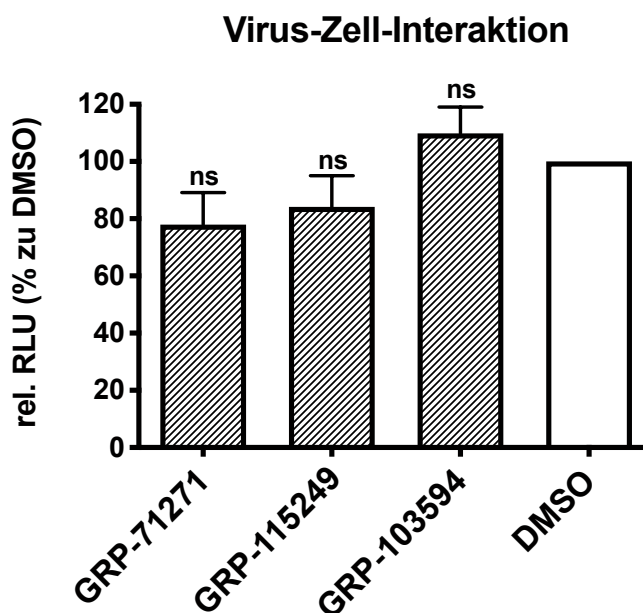


Abbildung 3–21: Das Virus wurde an BEAS-2B-Zellen in Gegenwart von 10 μM der jeweiligen Verbindung für zwei Stunden bei 4°C adsorbiert. Nachdem die Verbindung ausgewaschen und die Zellen mit IAV-WSN-NanoLuc infiziert wurden, wurde die Luciferase-Aktivität nach 30 Stunden Inkubationszeit bei 37°C gemessen. Jede der Säulen repräsentiert den Mittelwert und SD von drei unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Analyse wurde One-way-ANOVA mit Sidak's-Multiple-Comparison-Posttest verwendet. ns bedeutet nicht signifikant [$P \geq 0,05$].

In einem sogenannten Time-of-Addition Experiment wurde die Abhängigkeit der Wirksamkeit der Verbindungen vom Zeitpunkt ihrer Darreichung relativ zum Zeitpunkt der Infektion überprüft. Dazu wurden 10 μM der jeweiligen Verbindung zu bestimmten Zeitpunkten vor, während und nach der Infektion von BEAS-2B-Zellen mit IAV-WSN-NanoLuc appliziert und das Ausmaß der Inhibition der viralen Infektion und Replikation anhand des Luciferase-Signals 20 Stunden nach der Infektion überprüft. Um das Experiment auf die Betrachtung eines einzelnen Infektionszyklus zu fokussieren, wurden die BEAS-2B-Zellen mit einer hohen Multiplizität der Infektion ($\text{MOI} = 3,0$) infiziert. Auf

diese Weise stehen den Tochtervirionen keine uninfizierten Wirtszellen für einen zweiten Infektionszyklus zur Verfügung. Für das Kontrollexperiment wurde die Verbindung JMN3-003, die zu einem früheren Zeitpunkt von unserer Forschungsgruppe entwickelt wurde (Krumm et al., 2011; A. Sun et al., 2011), verwendet. JMN3-003 inhibiert Wirtszellfaktoren, die für die virale Replikation und Transkription notwendig sind, ohne Einfluss auf die Produktion des zellulären Genoms und der zellulären mRNA zu nehmen. Die Ergebnisse des Time-of-Addition-Assays sind in **Abbildung 3–22** dargestellt. Dem Schaubild ist zu entnehmen, dass die drei unterschiedlichen Wirkstoffklassen nur bei einer Darreichung zu einem frühen Zeitpunkt relativ zur Infektion ihre maximale inhibitorische Wirkstärke entfalten können. Eine Darreichung der Substanzen eine Stunde vor oder zum Zeitpunkt der Infektion der Zellen mit IAV-WSN-NanoLuc führte zu einer fast vollständigen Inhibition der viralen Vermehrung. Eine Verzögerung der Zugabe um eine Stunde nach der Infektion zeigte eine um 40% reduzierte Wirkstärke, bezogen auf das Normierungsexperiment, in dem DMSO ohne gelösten Wirkstoff verwendet wurde. Wurden die Substanzen zu noch späteren Zeitpunkten nach der Infektion dem Experiment zugegeben, war keine Inhibition der viralen Replikation und Infektion mehr detektierbar. Im Gegensatz dazu, zeigte die Kontrollverbindung JMN3-003 auch bei einer Darreichung sechs Stunden nach der Infektion, ein signifikantes, antivirales Potential, das durch ein um 70% reduziertes Luciferase-Signal, verglichen mit dem Normierungsexperiment (DMSO), messbar war (**Abbildung 3–22**). Daraus ließ sich ableiten, dass die antivirale Wirkung der drei unterschiedlichen chemischen Verbindungsklassen in einem der früheren Schritte des viralen Lebenszyklus zur Geltung kommt. Die reduzierte Wirkstärke bei einer Darreichung der Verbindungen eine Stunde nach der Infektion lässt den Schluss zu, dass der virale RdRp-Komplex als Zielprotein dieser Wirkstoffe unwahrscheinlich ist. Wie aus den Ergebnissen unter Verwendung des Wirkstoffs JMN3-003 ersichtlich ist, sind niedermolekulare Verbindungen, die die virale Replikation direkt oder indirekt hemmen, auch bei einer Darreichung

zu einem späteren Zeitpunkt relativ zur Infektion, befähigt eine entsprechende antivirale Aktivität zu entfalten.

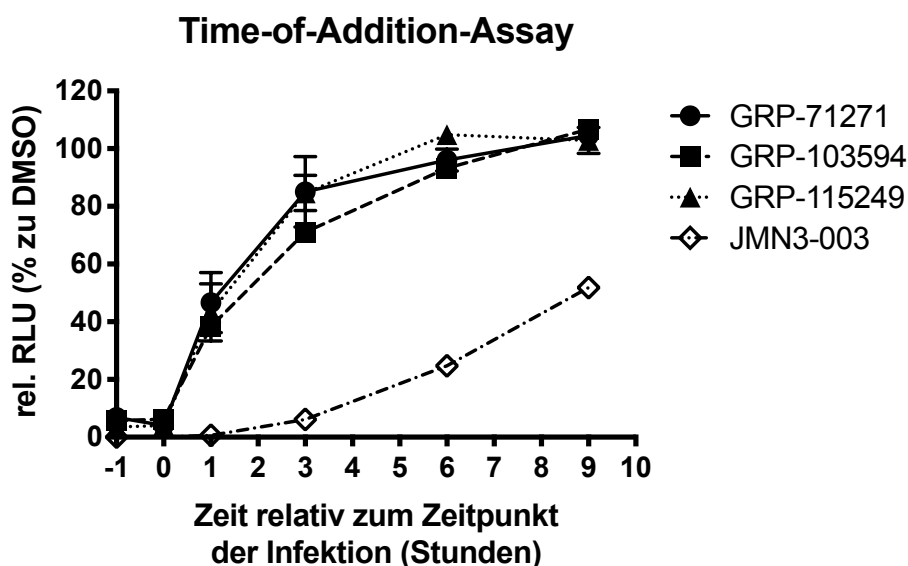


Abbildung 3–22: Abhängigkeit der Wirksamkeit der Verbindungen GRP-71271, GRP-103594 und GRP-115249 gegen IAV-WSN-NanoLuc in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Zugabe von 10 μ M der jeweiligen Verbindung auf BEAS-2B-Zellen relativ zum Zeitpunkt der Infektion. Die Luciferase-Aktivität wurde nach 20 Stunden Inkubationszeit bei 37°C gemessen. Die Werte repräsentieren den Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten.

Das Wirkmuster von GRP-71271, GRP-115249 und GRP-103594, welches sich aus dem Time-of-Addition-Assay ergab, zeigte, dass diese nur in der Frühphase des Infektionszyklus antiviral wirksam sind. Dieses Muster ist charakteristisch für Verbindungen, die die Fusion der viralen mit der Wirtszellmembran blockieren, sogenannte Fusionsinhibitoren, oder für Verbindungen, die die initiale Virus-Zell-Interaktion unterbinden. Die inhibitorische Wirkung der GRP-Verbindungen auf die Virus-Zell-Interaktion

wurde bereits durch vorangegangene Experimente ausgeschlossen (**Abbildung 3–21**).

Auch wenn die Ergebnisse des Time-of-Addition-Experiments nicht auf eine direkte oder indirekte Inhibition der viralen Replikationsmaschinerie durch die Verbindungen GRP-71271, GRP-115249 und GRP-103594 hindeuteten, konnte dieser Wirkmechanismus nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Um den Einfluss der drei Hit-Klassen auf den RdRp-Apparat und dessen Funktion in einem isolierten Experiment zu erlangen, wurden diese in einem Plasmid basierten, IAV-WSN-abhängigen Minireplikon-Reporterassay (Yan et al., 2013) getestet. Das Prinzip dieses Experiments ist schematisch in **Abbildung 3–23** dargestellt.

In diesem Experiment wurden 293T-Zellen mit einem Reporter-Plasmid transfiziert. Dieses Plasmid beherbergt einen offenen Leserahmen, der für eine Firefly-Luciferase kodiert, der von virusspezifischen Basensequenzen (Leader, Trailer) flankiert wird und in Plusstrangorientierung vorliegt. Das 3'-Ende dieses Konstrukts enthält außerdem die Promotorsequenz der zellulären RNA-Polymerase I.

Die zelluläre RNA-Polymerase I transkribiert das Reporterkonstrukt inklusive der flankierenden, virusspezifischen Basensequenzen in ein negativstrangorientiertes RNA-Segment ((-)-RNA). Dieses wird vom viralen RdRp-Komplex als virale (-)-RNA erkannt und in eine virale mRNA transkribiert, die dann von zellulären Ribosomen translatiert wird. Die einzelnen Komponenten des viralen Polymerase-Komplex, die Proteine PB1, PB2, PA, NP, werden nach Transfektion entsprechender Plasmide von den Zellen exprimiert.

Anschließend kann das Firefly-Signal detektiert und die Aktivität des IAV-WSN-RdRp-Komplexes quantifiziert werden. Dieser Assay ermöglicht es, Verbindungen zu finden, die die verschiedenen Schritte der Synthese bzw. der Assemblierung der Proteine des RdRp-Komplexes und alle Schritte, die zur Produktion neuer viraler RNA-Moleküle unter Berücksichtigung entsprechender

Wirtszellfaktoren, von denen der virale RdRp-Komplex abhängig ist, inhibieren können.

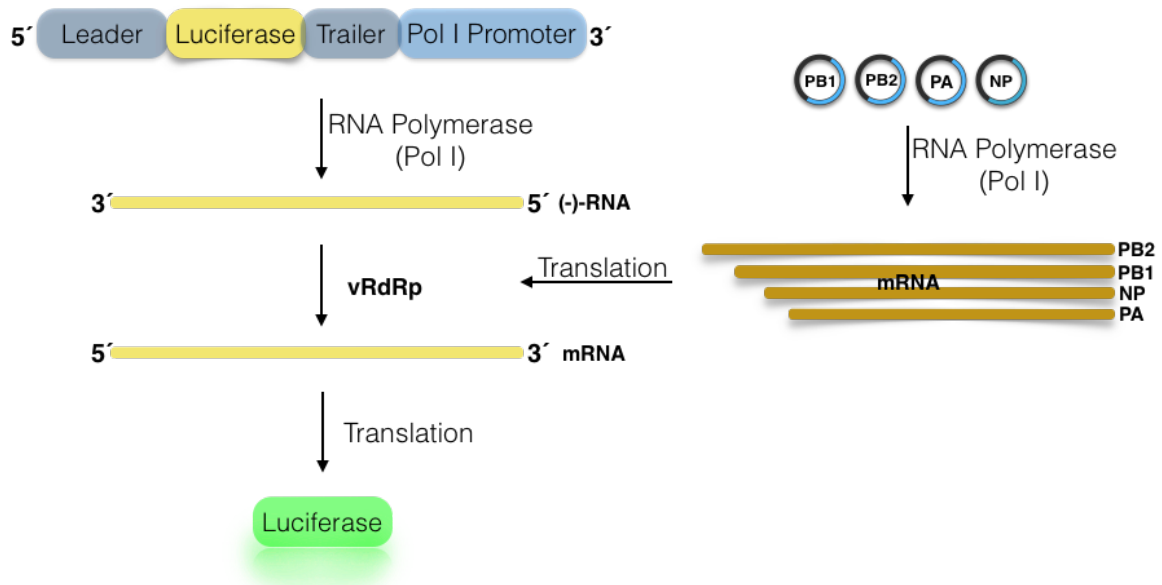


Abbildung 3–23: Schematische Darstellung des IAV-WSN-basierten Minireplikon Assay.

Alle GRP-Verbindungen wurden auf mögliche RdRp-inhibierende Eigenschaften in diesem Minireplikon-Assay getestet, in dem die transfizierten 293T-Zellen in der Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen der jeweiligen Verbindung, oder DMSO zur Normalisierung, inkubiert wurden. Als positive Kontrolle wurde der bereits bekannte RdRp-Blocker JMN3-003 (Krumm et al., 2011; A. Sun et al., 2011) verwendet. Nach 20 Stunden Inkubationszeit bei 37°C wurde das Firefly-Signal detektiert. Die Auswertung des Experiments ist in **Abbildung 3–24** dargestellt.

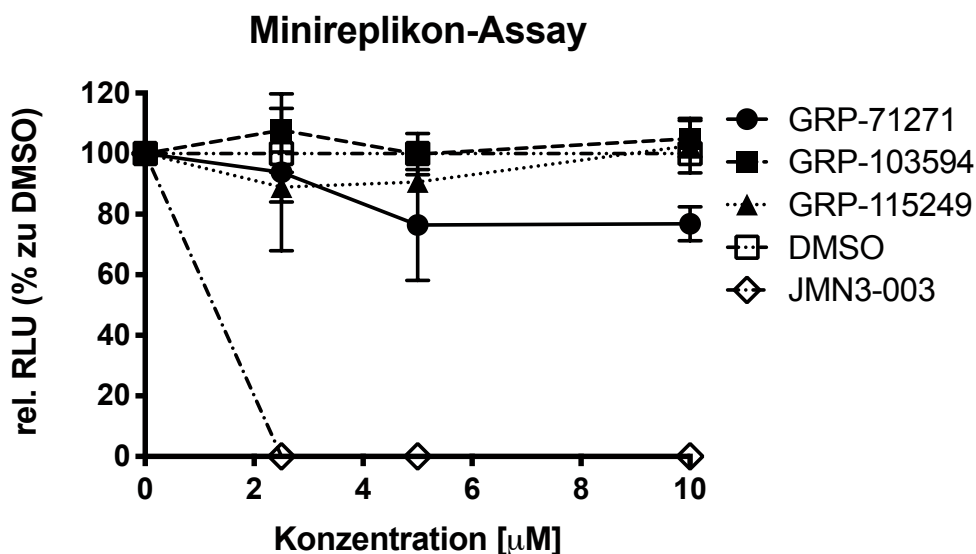


Abbildung 3–24: IAV-WSN-basierter Minireplikon-Assay. 293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für IAV-WSN NA, PA, PB1, PB2 und NP plus einem Expressionsplasmid des IAV-WSN-Minigenom-Reporters, der ein Firefly-Luciferase-Gen enthält (Yan et al., 2013), transfiziert und in der Gegenwart von 10 μM der jeweiligen Verbindung oder einem äquimolaren Volumen DMSO inkubiert. Die Luciferase-Aktivität wurde nach 36 Stunden Inkubationszeit bei 37°C gemessen. Die Werte repräsentieren den Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten.

Im Gegensatz zu JMN3-003 konnte keine der getesteten GRP-Verbindungen in einem Konzentrationsbereich zwischen 10 und 0,04 μM eine Minderung des Luciferase-Signals induzieren. Folglich konnte eine Wechselwirkung der Hit-Verbindungen mit einem der Proteine PB1, PB2, PA und NP als molekularer Mechanismus der anti-IAV-Aktivität ausgeschlossen werden.

In zwei weiteren Experimenten wurde die These überprüft, dass es sich bei GRP-71271, GRP-115249 und GRP-103594 um Verbindungen handeln könnte, die den Zelleintritt des Virus stören. In einem Hämolyse-Inhibitions-Assay wurden Hühnererythrozyten mit isolierten IAV-WSN-Virionen vermischt.

Zusätzlich wurde entweder GRP-71271, GRP-115249 oder GRP-103594 in unterschiedlichen Konzentrationen in der virionenhaltigen Erythrozytensuspension gelöst. Als negative Kontrolle wurde JMN3-003 verwendet. Anschließend wurde der pH-Wert auf 5,1 gesenkt, um die Fusion der WSN-Viren mit den roten Blutzellen auszulösen, was den Austritt von Hämoglobin zur Folge hatte. Das Ausmaß der Hämoglobinfreisetzung wurde mittels Absorptionsmessungen bei 410 nm bestimmt.

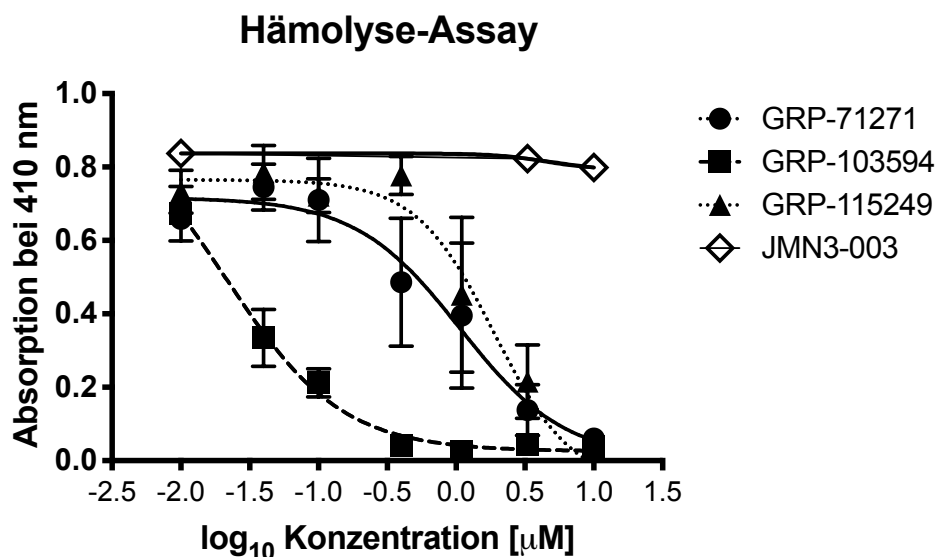


Abbildung 3–25: Hühnererythrozyten wurden mit gereinigten IAV-WSN-Virionen und der entsprechenden Verbindung oder einem äquimolaren Volumen DMSO vermischt und bei einem pH-Wert von 5,1 für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Absorption des freigesetzten Hämoglobins wurde bei einer Wellenlänge von 410 nm bestimmt. Die Werte wurden auf die Absorptionswerte einer wie oben beschrieben behandelten Erythrozyten-Probe, die jedoch nicht mit IAV-WSN vermischt wurde, bezogen. Die Werte repräsentieren den Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten.

Aus den Ergebnissen der Hämolyse-Experimente ging hervor, dass die Hit-Substanzen die virusinduzierte Hämolyse der Hühnererythrozyten und somit die Freisetzung von Hämoglobin konzentrationsabhängig inhibieren konnten (**Abbildung 3–25**). Der RdRp-Inhibitor JMN3-003 hingegen, hatte keine anti-hämolytische Wirkung (**Abbildung 3–25**). Dieses Resultat erhärtete die Vermutung, dass GRP-71271, GRP-115249 und GRP-103594 die Fusogenität des Virus beeinflussen könnten. Anschließend wurde diese Annahme in einem Zell-Zell-Fusionsassay bestätigt. Dazu wurden BSR-T7/5-Zellen mit Expressionsplasmiden, die für IAV-WSN-HA oder für das Green-Fluorescent-Protein codieren, in einem Verhältnis von 5:1 transfiziert. Nach der Expression und Inkorporation der HA-Proteine in die Zellmembran der BSR-T7/5-Zellen, kann die fusogene Aktivität von HA durch die Bildung von Synzytien beobachtet werden. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin behandelt und einem pH-Wert von 5,1 ausgesetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, um die IAV-WSN-HA-induzierte Fusion benachbarter BSR-T7/5-Zellen zu provozieren. Das Ausmaß der Fusion konnte anschließend durch die Bildung von Synzytien unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden. Das GF-Protein erleichterte dabei die Visualisierung der Synzytien durch ein Verschwimmen der Zellgrenzen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Dieses Experiment wurde mit jeweils 10 µM der zu testenden Verbindung oder mit JMN3-003 bzw. DMSO als Kontrollen durchgeführt. Wie in den fluoreszenzmikroskopischen Bildern in **Abbildung 3–26** zu erkennen ist, war keine Synzytienbildung, in der Gegenwart von GRP-71271, GRP-115249 oder GRP-103594 wahrnehmbar, während in den Experimenten mit JMN3-003 oder DMSO die Fusion der BSR-T7/5-Zellen deutlich sichtbar wurde.

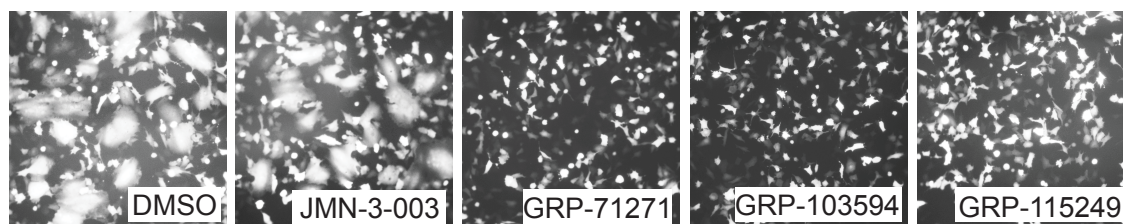


Abbildung 3–26: Zell-basierter Fusionsassay. BRS T7/5-Zellen wurden mit einem IAV-WSN HA- oder EGFP-Expressionsplasmid im Verhältnis 10:1 transfiziert und anschließend mit TPCK-Trypsin behandelt und einem pH-Wert von 5,1 für fünf Minuten bei 37°C in der Gegenwart der jeweiligen Verbindung oder einem äquimolaren Volumen DMSO ausgesetzt. Die Bildung von Synzytien wurde nach 30 Minuten Inkubationszeit bei 37°C unter dem Fluoreszenzmikroskop verfolgt. Die entsprechenden Sichtfelder sind in den gezeigten Bildern bei einer 100-fachen Vergrößerung dargestellt.

Zusammengefasst bestätigten die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente, zur Eingrenzung des molekularen Mechanismus der antiviralen Aktivität, die Entdeckung dreier, neuer und strukturell unterschiedlicher Verbindungen, die den IAV-Eintritt in die Wirtszelle blockieren. Das anti-IAV-spezifische Aktivitätsprofil und die Tatsache, dass keine der drei Strukturklassen die Adsorption des Virus an die Wirtszelle unterbinden konnte, deutete darauf hin, dass die Verbindungen keinen Einfluss auf die Rezeptorbindung oder die Aufnahme des Virus in die Wirtszelle mittels Endozytose haben. Vielmehr war die antivirale Aktivität durch die Hemmung der Expression der HA-Proteine, durch die Beeinträchtigung des intrazellulären Transports des HA-Proteins oder durch die Hemmung der Membranfusion zwischen Virus und Zielzelle zu erklären.

3.4.1 Identifikation der viralen Zielstruktur

Um nachzuweisen bzw. auszuschließen, dass die drei Hit-Verbindungsklassen die Synthese, den Transport innerhalb der Zelle oder die Membraninkorporierung des IAV-HA-Proteins beeinflussen, wurde in BSR-T7/5-Zellen eine Vektorplasmid-basierte, transiente Genexpression des IAV-WSN-HA in der Gegenwart von 10 μ M der jeweiligen Verbindung oder einer äquimolaren Menge an DMSO, durchgeführt. Anschließend wurde das Ausmaß der HA-Expression durch Biotinylierung der Oberflächenproteine der transfizierten BSR-T7/5-Zellen und darauffolgender Ausfällung durch immobilisiertes Streptavidin untersucht. Die Visualisierung der Ergebnisse erfolgte mittels Western-Blot unter Verwendung HA-spezifischer Antikörper. Die Banden des Western-Blots wurden durch densitometrische Analysen quantifiziert. Zusätzlich wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt, indem ein leerer Vektor transfiziert wurde, um einen Einfluss des Transfektionsvorgangs selbst auf die Genexpression ausschließen zu können. Als interner Standard, zur Abschätzung der generellen Genexpression der Zellen, wurde neben den HA-Proteinen (α -IVA-HA, **Abbildung 3–27**) zusätzlich der zelluläre Transferrin-Rezeptor mit entsprechenden Antikörpern auf dem Western-Blot detektiert (α -TfR, **Abbildung 3–27**).

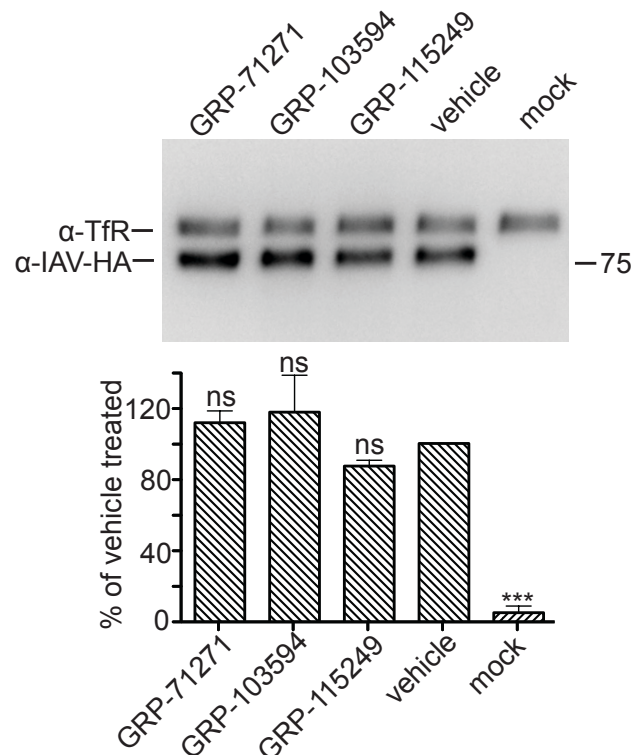


Abbildung 3–27: Biotinylierung der Oberflächenproteine von BSR T7/5-Zellen, die transient mit einem Expressionsplasmid, das für IAV-WSN HA kodiert, transfiziert und in der Gegenwart von 10 μ M der entsprechenden Verbindung oder einem äquimolaren Volumen DMSO inkubiert wurden. Streptavidin gebundene, biotinylierte Proteine wurden anschließend mittels SDS-PAGE entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern gegen HA oder dem zellulären Transferrin-Rezeptor (TfR), als internem Standard markiert. Die Säulen zeigen Mittelwerte und SD für densitometrische Analysen der Signalintensität der Proteinbanden von drei unabhängigen Experimenten. Im Kontrollexperiment erhielten die Zellen einen leeren DNA-Vektor (mock). Zur statistischen Analyse wurde One-way-ANOVA mit Sidak's Multiple-Comparison-Posttest angewandt (ns, nicht signifikant [$P \geq 0,05$]).

Die entsprechenden Quantifizierungen, der HA-Expression in Gegenwart von GRP-71271, GRP-115249, GRP-103594 oder nur DMSO, sind in **Abbildung 3–27** dargestellt. Die densitometrischen Analysen der WB-Banden zeigten, dass

die transiente Oberflächenexpression des IAV-HA in Gegenwart von 10 μ M der jeweiligen Verbindung, dem Niveau der HA-Oberflächenexpression in der DMSO-Kontrolle entsprachen. Dies lässt nicht auf eine in diesem Experiment erfassbare Wirkung der GRP-Verbindungen auf die HA-Synthese oder den HA-Transport zur Zelloberfläche schließen. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Hit-Verbindungen eine direkte Interaktion mit dem HA-Protein eingehen, um auf diese Weise, den Vorgang der HA-vermittelten Membranfusion zu inhibieren.

Um eine direkte Interaktion der Verbindungen GRP-71271, GRP-115249 und GRP-103594 mit IAV-WSN-HA nachzuweisen, wurde die markierungsfreie Methode der Bio-Layer-Interferometrie (BLI) angewandt. Diese optische Analysetechnik ist in der Lage, biomolekulare Interaktionen zu messen und beruht auf der Detektion und Auswertung von Lichtwelleninterferenzmustern (**Abbildung 3–30**).

Für dieses Experiment wurde eine trimere, Foldon-stabilisierte Ektodomäne des IAV-WSN-HA-Proteins generiert und exprimiert (solHA). Für den Einsatz des solHA im BLI-Experiment wurde an den DNA-Abschnitt, der die genetische Information der Ektodomäne des HA-Proteins enthält (AS 412-529), mehrere Tags gekoppelt. An das C-terminale Ende dieses DNA-Abschnitts folgte ein Avi-Tag. Dieser Tag codiert für eine spezifische Aminosäuresequenz aus 15 Aminosäuren (GLNDIFEAQKIEWHE), die als Substrat für das Escherichia Coli Enzym BirA, das die Funktion einer Biotin-Ligase hat, fungiert (Beckett, Kovaleva, & Schatz, 1999). BirA katalysiert die selektive Kopplung eines Biotinrestes an die Lysinseitenkette (K), innerhalb des Avi-Tags. Auf den Avi-Tag folgte eine Foldon-Trimerisierungs-Domäne, die zur Stabilisierung des solHA beiträgt. An die Foldon-Trimerisierungs-Domäne folgte schließlich noch ein His-Tag. Ein N-terminal gelegenes Signalpeptid stellte die Sekretion des solHA sicher. Das solHA wurde in 293T-Zellen exprimiert und anschließend aus der überstehenden Lösung an einem Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTS)-Harz

über den His-Tag gebunden. Durch Behandlung mit Thrombin wurde solHA wieder eluiert. Das gereinigte solHA wurde anschließend unter Zugabe der Biotin-Ligase BirA in-vitro-biotinyliert und mittels Gel-Permeations-Chromatographie gereinigt (**Abbildung 3–28**).



Abbildung 3–28: Schematische Darstellung des löslichen, Foldon-stabilisierten HA-Konstrukts, wie es an den Super-Streptavidin (SSA) beschichteten Sensor im BLI-Experiment immobilisiert wurde.

In **Abbildung 3–29** sind die Western-Blots (WB) unter Verwendung eines spezifischen anti-IAV-HA-Antikörpers oder eines Antikörpers gegen HRP-konjugiertes Streptavidin und der entsprechende Silber-Färbung des gereinigten, löslichen und biotinylierten IAV-WSN HA-Proteins dargestellt.

Das gereinigte, Foldon-stabilisierte, lösliche HA-Protein wurde anschließend an spezielle Super-Streptavidin (SSA) beschichtete Sensoren des Interferometers immobilisiert. Dieses an den Sensor gebundene solHA wurde anschließend in verschiedene Analytlösungen getaucht, die die jeweilige Verbindung in unterschiedlichen Konzentrationen zwischen 50 nM und 25,6 μ M enthielten. Für ein negatives Kontrollexperiment wurde eine entsprechende Verdünnungsreihe mit der Verbindung GRP-71271-9 angelegt.

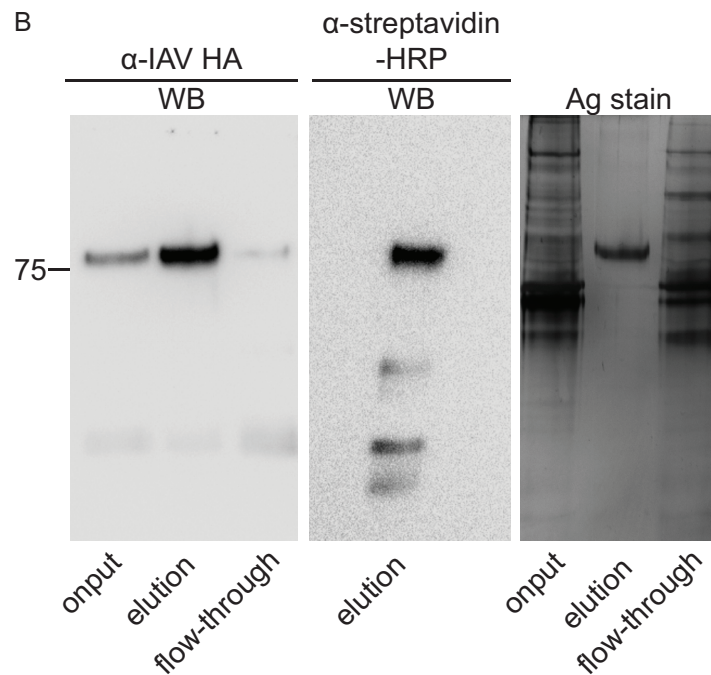


Abbildung 3–29: Reinigung des Foldon-stabilisierten, löslichen IAV-WSN-HA-Proteins. Das mittels Nickel-Affinitätschromatographie gereinigte, lösliche HA-Protein wurde vor der SDS-PAGE in-vitro an einem C-terminal inserierten Avi-Tag biotinyliert. Die erhaltenen Gele wurden entweder Western-Blotting (WB) unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen IAV-WSN-HA oder gegen HRP-konjugiertes Streptavidin oder direkt einer Silber-Färbung (Ag stain) unterzogen.

GRP-71271-9 ist eine strukturanaloge Verbindung zu GRP-71271, die keine antivirale Aktivität in unseren Experimenten zeigte ($EC_{50} > 50 \mu\text{M}$, **Tabelle 3–5**). Nach der Bindung der gelösten Moleküle an das immobilisierte und sensorgebundene Protein, analysiert das Interferometer Interferenzmuster von Lichtwellen, die einer internen Lichtquelle entstammen. Diese Interferenzmuster basieren auf Wellenlängenveränderungen, die sich durch Änderungen der optischen Dichte an der Spitze des Sensors ergeben. Die optische Dichte ändert sich, wenn die gelösten Analyte an das sensorgebundene Protein

assoziiieren oder von diesem dissoziieren. Dies ermöglicht die Analyse und Quantifizierung dieser Prozesse in Echtzeit (**Abbildung 3–30**).

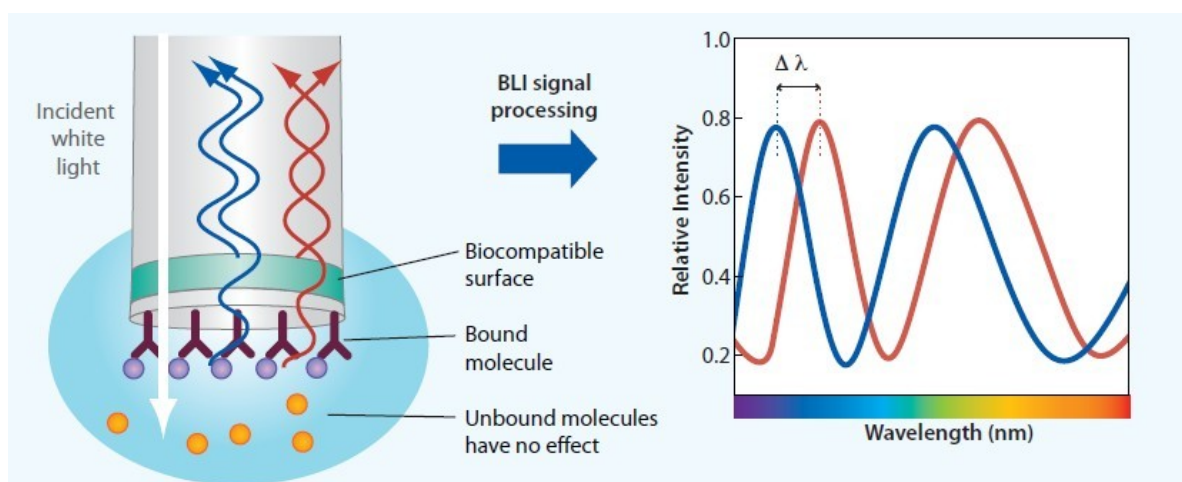


Abbildung 3–30: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Bio-Layer-Interferometers. Durch Änderungen in der optischen Dichte durch Bindung und Dissoziation der gelösten Analyte an das sensorimmobilisierte Protein werden Wellenlängenveränderungen der Lichtquelle des Sensors detektiert und analysiert. Übernommen von fortéBIO.

Die Affinitätskonstanten K_D wurden aus dem Quotienten aus der separat ermittelten Dissoziationskonstante k_{diss} und Assoziationskonstante k_{ass} für jede Verbindung berechnet. Die in **Abbildung 3–31** dargestellten Bindungskurven der getesteten, aktiven Verbindungen GRP-71271, GRP-115249, GRP-103594, zeigen eine schnelle Assoziation- und Dissoziation an solHA, wie es für niedermolekulare Verbindungen typisch ist.

Die inaktive Verbindung GRP-71271-9 (**Tabelle 3–5**) zeigte bei keiner der getesteten Konzentrationen eine Veränderung der optischen Dichte am Sensor, was die Spezifität des Experiments zeigte.

Die K_D -Werte der einzelnen Verbindungen lagen zwischen 0,54 und 1,8 μM ($R^2 \geq 0,84$) und somit in guter Näherung an den Werten der jeweiligen EC_{50} -Konzentrationen.

Die konzentrationsabhängige Bindung der drei aktiven Hit-Verbindungen und die errechneten Affinitätskonstanten sind der Nachweis für eine direkte Interaktion der drei GRP-Verbindungen mit IAV-WSN-HA. Die Aussagekraft dieses Experiments wird zusätzlich durch die Tatsache unterstützt, dass für die inaktive Verbindung GRP-71271-9 (**Tabelle 3–5**) keine produktiven Assoziations- und Dissoziationskurven mit solHA nachgewiesen werden konnten.

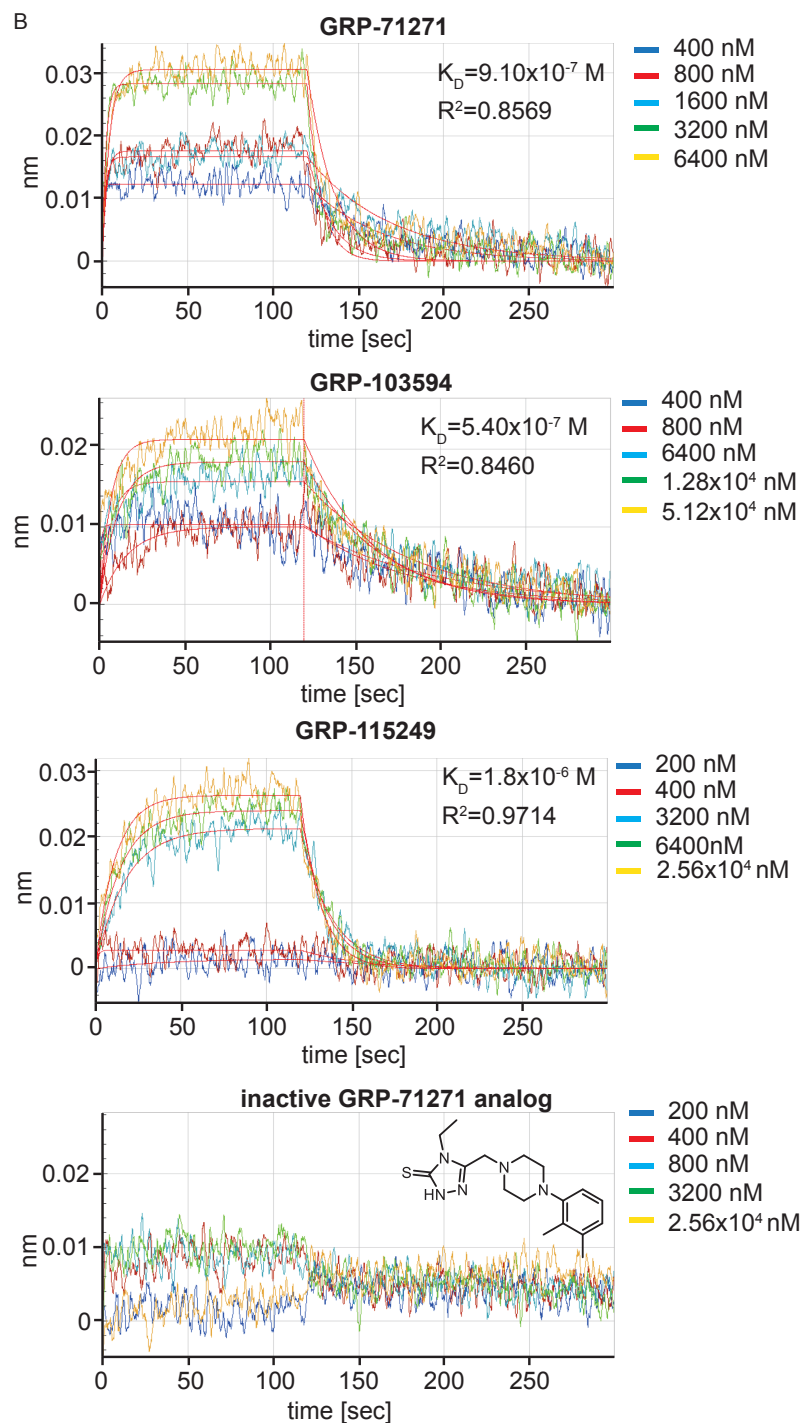


Abbildung 3–31: Bio-Layer-Interferometrie (BLI). Analyse der Bindung der Hit-Verbindungen an das gereinigte, lösliche HA-Protein, das an Super-Streptavidin (SSA) beschichteten Sensoren immobilisiert wurde. Es sind die Assoziations- und Dissoziationkurven für alle drei Hit-Verbindungen sowie von einer zu GRP-71271

analogen, inaktiven Verbindung bei unterschiedlichen Konzentrationen gezeigt. Die Linien repräsentieren Regressionsmodelle und die angegebenen Werte die berechneten Dissoziationskonstanten (K_D) bzw. die Anpassungsgüte der Werte (R^2) des verwendeten Regressionsmodells.

3.4.2 Virus-Adaptation an die antiviralen Hit-Verbindungen und Analyse des Resistenzprofils

Um die in-vitro-Studien der BLI-Analysen mit experimentellen Ansätzen zu belegen, die sich auf der Bioaktivität der Hit-Verbindungen begründen lassen, und um eine Vorstellung von der Mikrodomäne zu bekommen, mit der diese Verbindungen innerhalb des HA-Proteins in Wechselwirkung treten, führten wir Adaptationsexperimente mit WSN-NanoLuc durch, um die Entstehung von Resistenzmutationen zu provozieren. Um eine Anpassung des WSN-NanoLuc-Virus an die Verbindungen GRP-71271, GRP-115249 und GRP-103594 zu provozieren, wurde das Virus in der Gegenwart von ansteigenden Konzentrationen der jeweiligen Verbindung zu Tochtervirionen passagiert. Als Ausgangskonzentration wurde die 10-fache Konzentration der entsprechenden mittleren effektiven Konzentration (EC_{50}), der jeweiligen Verbindung, verwendet. Wenn die Replikation des Virus in einem Nährmedium, in dem $20 \mu\text{M}$ der entsprechenden antiviralen Verbindung gelöst waren, mit der Replikation des Virus im Kontrollexperiment ohne viralen Hemmstoff (DMSO äquivalent) vergleichbar war, wurde das HA-Genom isoliert und durch Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR) in eine cDNA umgewandelt. Diese wurde anschließend sequenziert und auf etwaige Mutationen analysiert. Aus vier erfolgreichen Adaptationsexperimenten (eines für jede der drei Verbindungen, plus ein zusätzliches für GRP-71271) gingen zwei Virusmutanten hervor, die jeweils eine einzelne Mutation innerhalb HA trugen und jeweils ein Virus, das entweder zwei bzw. drei Mutationen innerhalb HA aufwies (**Abbildung 3–32**).

Insgesamt wurden durch RT-PCR und Sequenzierung der vier resistenten Virusisolate sieben Punktmutationen identifiziert. Von diesen sieben Mutationen waren zwei in HA1 lokalisiert (I275T und V323I) und fünf in HA2 (K58Q, D85N, F110L, N154S, T156A). In **Abbildung 3–32** ist die dreidimensionale Präfusionskonformation des trimeren HA-Proteins im Bändermodell und die Lokalisationen der verschiedenen Mutationen dargestellt. Daraus ist zu entnehmen, dass die Mutationen in drei unterschiedlichen Clustern auftraten: Ein Cluster lag in einem membranahen (proximalen) Teil der HA-Stamm-Domäne (N154S, T156A), ein weiterer am distalen Ende der HA-Stamm-Domäne (K58Q [HA2], D85N [HA2]) und der dritte Cluster konnte der Basis der Kopfdomäne von HA (V323I [HA1]) zugeordnet werden. Die Mutation V323I an der Basis der globulären Domäne hat in der dreidimensionalen Faltung des HA-Proteins eine enge topografische Beziehung zu den Mutationen K58Q und D85N, die den Cluster am distalen Ende des HA-Stamms bilden (**Abbildung 3–32**). Nur die Mutation I257T lässt sich als einzige keinem der drei Cluster zuordnen und befindet sich in der Nähe der Spitze der globulären Domäne. Die Mutationen K58Q (Adaptation an GRP-103594) und F110L (Adaptation an GRP-71271) wurden jeweils als singuläre Mutation aus den entsprechenden, resistenten WSN-NanoLuc-Mutanten isoliert. Die Mutationen D85N und N154S wurden als paarig auftretende Basenvariationen aus einer WSN-NanoLuc-Mutante, die aus einem Anpassungsexperiment an GRP-115249 hervorging, isoliert. Aus einem weiteren Anpassungsexperiment des WSN-NanoLuc an die Verbindung GRP-71271 wurde eine Virusmutante isoliert, die an drei Positionen innerhalb HA eine Punktmutation aufwies. Dabei handelte es sich um folgende Änderungen: I257T, V323I und T156A (**Abbildung 3–32**).

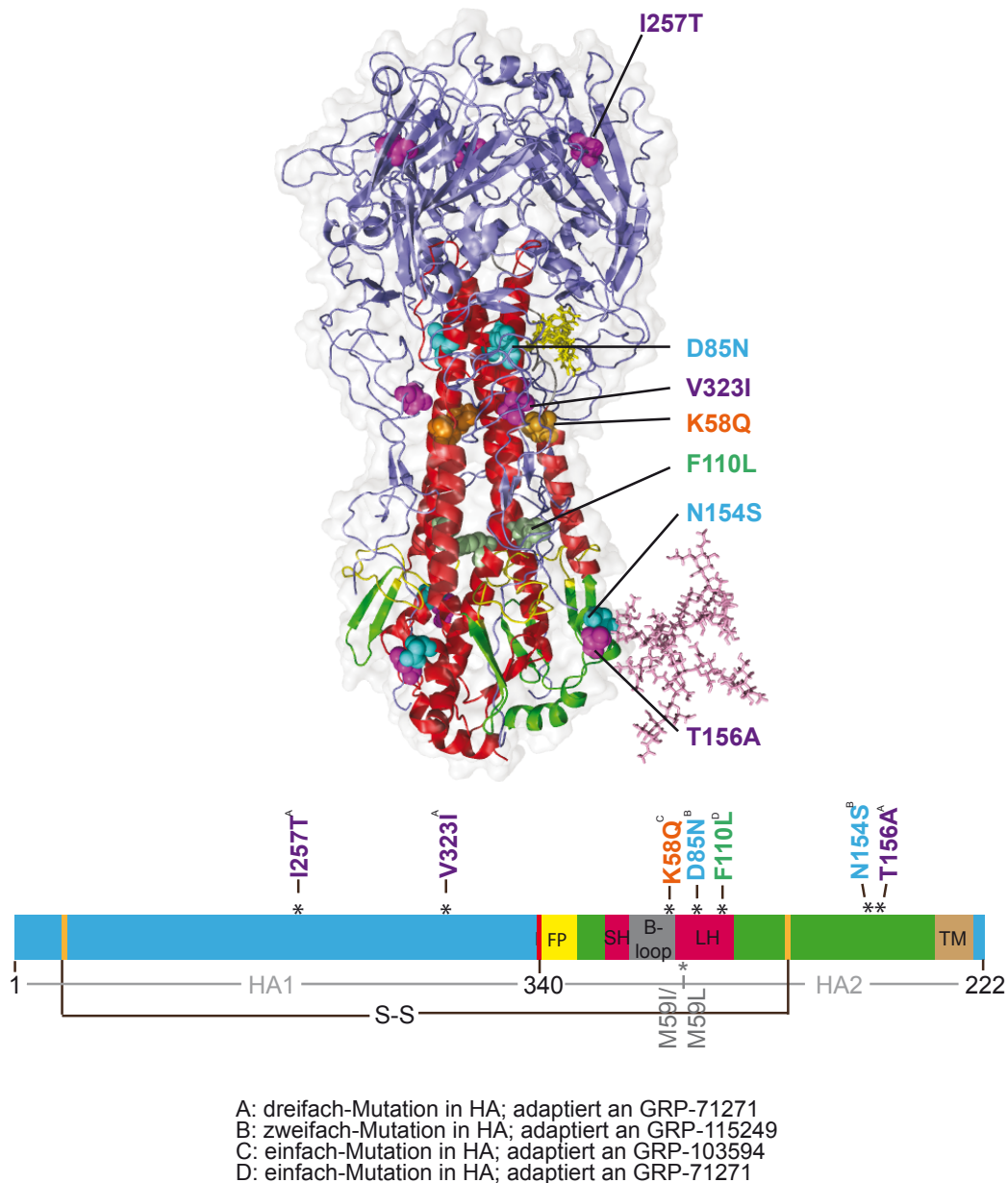


Abbildung 3–32: Bändermodell des HA-Trimers in seiner Präfusionskonformation (oben) und eine lineare, schematische Darstellung der Proteinorganisation (unten) und Angabe der Resistenzmutationen, die aus unseren Experimenten hervorgingen. HA1 ist in Blau gehalten, HA2 in Grün. Die folgenden Domänen wurden hervorgehoben: Fusionspeptid (FP), kleine Helix (SH), B-Schleife (B-loop), große Helix (LH) und die Transmembrandomäne (TM). Eines der drei zur Zellmembran am proximalsten gelegene N-Glykane ist im Strukturmodell (oben) dargestellt. Die Position der Disulfidbrücke, die die beiden HA-Untereinheiten miteinander verbindet, ist in der

schematischen Darstellung (unten) eingezeichnet (S-S; schwarze Linie). Die Resistenzmutationen, die aus Studien mit anderen Fusionsinhibitoren hervorgingen, sind in Hellgrau angegeben.

Um nachzuweisen, dass die isolierten Mutationen für die Anpassung des Virus an die jeweilige Verbindung verantwortlich sind, wurden die einzelnen Mutationen durch ortsspezifische Mutagenese in das HA-Genomplasmid eingeführt und die entsprechenden, rekombinanten Viren erschaffen. Nach anschließender Amplifizierung und Reinigung wurden die rekombinanten Virusmutanten auf deren Suszeptibilität, gegenüber den drei Strukturklassen von Fusionsinhibitoren, in einem Konzentrationsbereich zwischen 8,0 und 0,06 μM getestet (**Abbildung 3–33**). Die Virusmutanten, die die Mutationen K58Q oder F110L trugen, also jene Punktmutationen, die singulär aus den entsprechenden Adaptationsexperimenten hervorgingen, verloren jegliche Suszeptibilität gegen alle drei Strukturklassen (**Abbildung 3–33, A**).

Bei der Betrachtung der Punktmutationen, die aus Virusmutanten isoliert wurden, die mehr als einen Basenaustausch aufwiesen (I257T, V323I, T156A, D85N und N154S, **Abbildung 3–32**), wurde interessanterweise festgestellt, dass die singuläre Einführung einer dieser Mutationen in WSN-HA keine Resistenz der Virusmutante gegen die Fusionsinhibitoren auslösen konnte (**Abbildung 3–33, B und C**). Erst die Einführung der entsprechenden Punktmutationspaare, wie sie aus den entsprechenden Virusmutanten aus den Anpassungsexperimenten gegen GRP-71271 bzw. GRP-115249 hervorgingen, also V323I (HA1)/T156A (HA2) und D85N (HA2)/N154S (HA2), führte zu einer robusten Resistenz gegen die drei Fusionsinhibitoren. Die Ergebnisse der Dosis-Inhibition-Kurven sind in **Abbildung 3–34** dargestellt.

Die Einführung der dritten Punktmutation I257T (HA1) in die rekombinante WSN-NanoLuc-Mutante zusätzlich zu den Mutationen V323I (HA1)/T156A (HA2) hatte keinen Effekt auf das Resistenzprofil der Virusmutante und schien somit nicht Teil des Resistenzmechanismus zu sein.

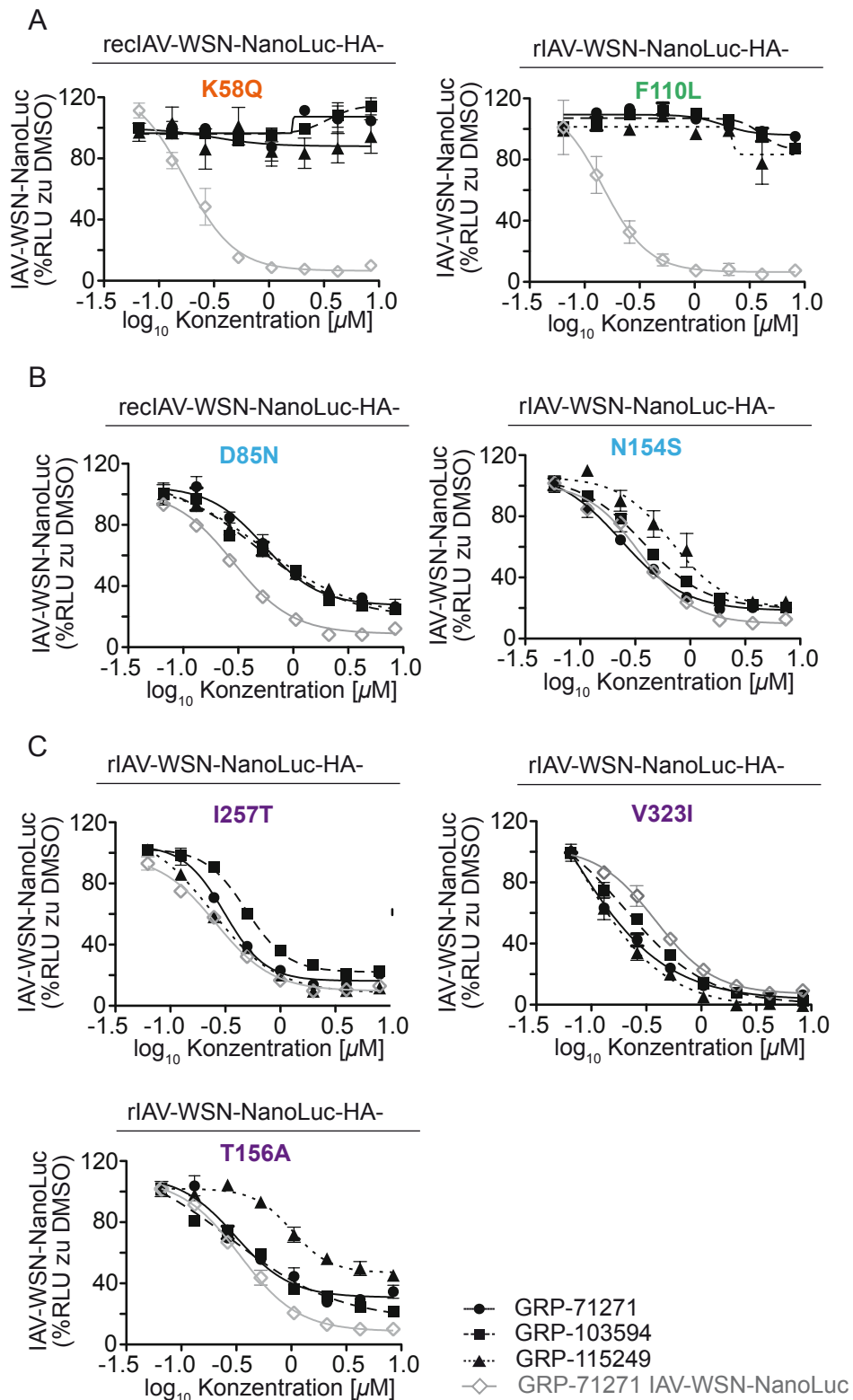


Abbildung 3-33: Dosis-Wirkung-Experimente der rekombinanten IAV-WSN-NanoLuc-Stämme, die die entsprechenden Punktmutationen in ihrem HA-Protein

tragen, gegen die drei Hit-Verbindungen. (A) WSN-Mutanten, die singuläre Mutationen in HA aufwiesen. K58Q ging aus dem Adaptionsexperiment mit GRP-103594 hervor, während die Mutation F110L aus einer Adaptation an GRP-71271 hervorging. (B) Rekombinante WNS-Mutanten, die die aufgetretenen Doppelmutationen singulär in HA tragen. Adaptiert an GRP-115249. (C) Rekombinante WNS-Mutanten, die die aufgetretenen Dreifachmutationen singulär in HA tragen. Adaptiert an GRP-71271. Die Luciferase-Aktivitäten wurden 40 Stunden nach der Infektion bestimmt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten \pm SD. Für Datensätze, bei denen es möglich war, wurden mittels des Four-Parameter-Variable-Slope-Regressionsmodells die effektiven, halbmaximalen, inhibitorischen Konzentrationen berechnet (angegeben in **Tabelle 3–4**). Mutationen, die singulär aufkamen, wurden auch als singuläre Mutation in HA getestet. Die graue Kurve, in jedem der Graphen repräsentiert die Aktivität der Verbindung GRP-71271 gegen das IAV-WSN-NanoLuc mit Standard-HA.

Interessanterweise beschrieben zwei unabhängigen Studien, dass die Mutationen M59I bzw. M59L zu Resistenzen gegen zwei strukturell unterschiedliche IAV-H1N1-Fusionsinhibitoren führten (Lai et al., 2015; White et al., 2015). Da die aus unserem Adaptationsexperiment mit GRP-103594 hervorgegangene Punktmutation K58Q in direkter Nachbarschaft zu M59I und M59L lag, wurde überprüft, ob die entsprechenden M59I oder M59L tragenden Virusmutanten auch gegen die in dieser Arbeit beschriebenen Fusionsinhibitoren resistent waren. Die Einführung der M95I-Mutation in IAV-WSN-NanoLuc führte zu einem vollständigen Suszeptibilitätsverlust des Virus gegen alle drei, in dieser Arbeit beschriebenen, Fusionsinhibitoren (**Tabelle 3–4**). Diese Ergebnisse der molekülstrukturunabhängigen Resistenz legen die Vermutung nahe, dass die Punktmutationen an den Positionen 58 und 59 einen einheitlichen Resistenzmechanismus gegen chemisch unterschiedliche Fusionsinhibitoren bewirken.

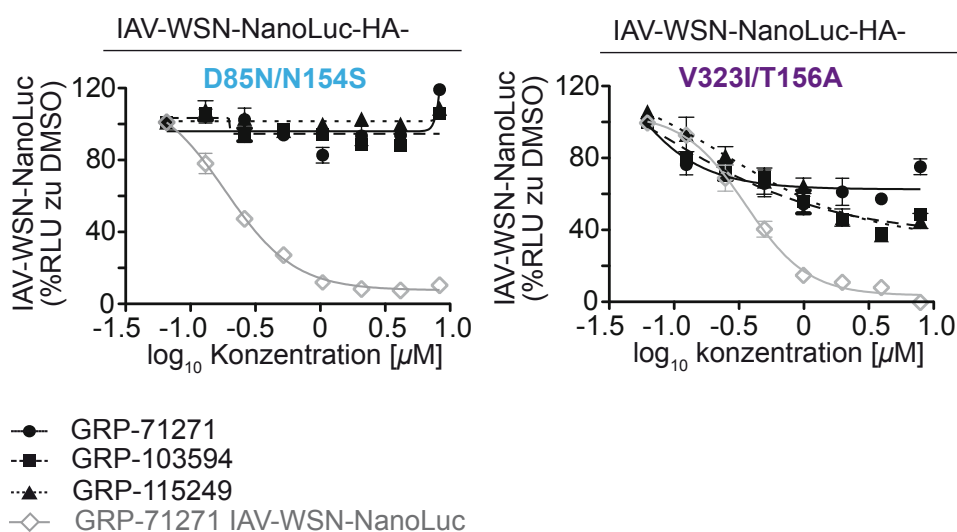


Abbildung 3–34: Dosis-Wirkung-Experimente der rekombinanten IAV-WSN-Nanoluc Stämme, die in ihren HA-Proteinen die entsprechenden Mutationen tragen, gegen die drei Hit-Verbindungen. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten \pm SD. Die mittleren, inhibitorischen Konzentrationen wurden mittels des Four-Parameter-Variable-Slope-Regressionsmodells berechnet und in sind in **Tabelle 3-4** angegeben. Die graue Kurve in jedem der Graphen repräsentiert die Aktivität der Verbindung GRP-71271 gegen das IAV-WSN-NanoLuc mit Standard-HA.

Diese Ergebnisse zeigten, dass alle drei Strukturklassen, die die Fusionsinhibitoren dieser Studie repräsentierten, trotz ihrer unterschiedlichen Chemie derselben Resistenzgruppe angehörten. WSN-NanoLuc war in der Lage, durch unterschiedliche Strategien, basierend auf einer singulären Mutation in der B-Schleife von HA2 oder durch Einführung eines kooperativen Mutationspaares, dem molekularen Wirkmechanismus der Fusionsinhibitoren zu entgehen.

Unterschiedliche Studien konnten zeigen, dass Mutationen in der B-Schleife von HA2 zu einem Wirkverlust von sechs strukturell unterschiedlichen Verbindungen, die den Eintritt von IAV in die Wirtszelle blockieren, führte (Basu

et al., 2014; Tan et al., 2007; White et al., 2015). Auch die Ergebnisse der Adaptationsexperimente in dieser Studie zeigten einen entsprechenden Suszeptibilitätsverlust der Virusmutante, der auf der K58Q Mutation in der B-Schleife von HA2 basierte. Zusätzlich wurde ein für Influenza-A-Viren bisher unbekannter, kooperativer Resistenzmechanismus, der auf zwei Punktmutationen in unterschiedlichen Mikrodomänen des HA-Proteins beruht, entdeckt. Dieser für IAV ungewöhnliche Resistenzmechanismus scheint eine weitere Strategie zu sein, die es dem Virus ermöglicht, der antiviralen Aktivität chemisch unterschiedlicher Fusionsinhibitoren zu entkommen.

Tabelle 3–4: Überprüfung der konzentrationsabhängigen Inhibition der verschiedenen IAV-WSN-NanoLuc-Mutanten durch GRP-71271, GRP-103594 und GRP-115249.

IAV-WSN-NanoLuc-HA Mutation(en)	EC ₉₀ (µM) ^a		
	GRP-71271	GRP-103594	GRP-115249
Standard HA	0,3 (0,20-0,49)	0,3 (0,23-0,49)	0,2 (0,22-0,79)
I257T	0,8 (0,62-1,02)	1,3 (1,00-1,56)	1,1 (0,80-1,43)
V323I	0,7 (0,27-0,96)	1,3 (0,83-2,02)	0,5 (0,24-1,01)
T156A	1,0 (0,55-2,03)	3,3 (1,35-3,98)	2,3 (0,98-1,58)
D85N	1,8 (0,92-3,58)	3,6 (1,23-10,56)	4,2 (1,61-10,87)
N154S	1,1 (0,75-1,66)	1,7 (1,31-2,21)	2,5 (1,11-5,64)
V323I/T156A	>8,0	>8,0	>8,0
I257/V323I/T156A	>8,0	>8,0	>8,0
D85N/N154S	>8,0	>8,0	>8,0
V323I/N154S	>8,0	>8,0	>8,0
D85N/T156A	>8,0	>8,0	>8,0
K58Q	>8,0	>8,0	>8,0
F110L	>8,0	>8,0	>8,0
M59I	>8,0	>8,0	>8,0

^a Werte repräsentieren drei unabhängige Experimente und wurden durch Vier-Parameter Variable-Slope Regressions Modell berechnet. Die Zahlen in den Klammern repräsentieren das 95% Konfidentintervall. Die höchste getestete Konzentration war 8 µM.

3.4.3 Genauere Betrachtung des kooperativen Resistenzmechanismus

Ein kooperativer Resistenzmechanismus der auf zwei Punktmutationen innerhalb verschiedener Mikrodomänen des selben Proteins basiert, wurde bereits bei anderen Viren wie zum Beispiel HIV beobachtet (Foulkes-Murzycki, Rosi, Kurt Yilmaz, Shafer, & Schiffer, 2013). Jedoch ist die Abhängigkeit der Resistenz von zwei unterschiedlichen Mutationen innerhalb des IAV-HA-Proteins ungewöhnlich und wurde bisher noch nicht beschrieben.

Ein elementarer Teil des kooperativen Mechanismus scheint die Entfernung eines N-verknüpften Glykans an der HA-Stamm-Domäne zu sein. Die Stamm-Domäne des HA-Proteins beherbergt drei universell konservierte N-Glykane, die in allen IAV-H1N1-HAs vorkommen (Wagner, Heuer, Wolff, Herwig, & Klenk, 2002). Die aus den Adaptationsexperimenten dieser Studie hervorgegangenen Mutationen N154S und T156A führten zu einer unproduktiven Alternierung einer N-Glykosylierungsstelle in der HA-Stamm-Domäne, in deren Folge es zu einer Entfernung der am weitesten proximal zur Lipidmembran gelegenen Zuckerkette kommt. Diese proximalste Zuckermodifikation scheint die einzige der drei am Stamm von HA vorkommenden N-Glykane zu sein, die ohne Beeinträchtigung der Replikationsfähigkeit des Virus in Zellkultur entfernt werden kann (Wagner, Heuer, et al., 2002).

Um festzustellen, ob die Mutationen in HA einen Einfluss auf die Expression der HA-Proteine haben, wurden die HA-Mutanten durch die Transfektion eines Vektorplasmids, welches das entsprechende, mutierte HA-Genom enthielt, in BSR-T7/5-Zellen exprimiert. Mittels Biotinylierung und Fällung mit Streptavidin der Oberflächenproteine und anschließender, densitometrischer Analyse der WB-Banden der immundetektierten HA-Proteine wurde die Expression der HA-Mutanten quantifiziert und mit dem Wildtyp-Protein verglichen. Wie **Abbildung 3–35 (A)** zu entnehmen ist, wurden keine Unterschiede bezüglich der Oberflächenexpression der verschiedenen HA-Mutanten im Vergleich zum Standard-HA festgestellt.

Es war jedoch auffällig, dass die HA-Mutanten, die entweder die Punktmutation T156A oder N154S trugen, eine im Vergleich zum Standard-HA bzw. im Vergleich zu den HA-Mutanten, die diese Mutationen nicht trugen, eine veränderte Mobilität in der Gelelektrophorese aufwiesen.

Für den Beweis, dass die Mobilitätsunterschiede in dem Fehlen je eines N-Glykans pro HA-Monomer zu begründen war, wurden die biotinylierten und an Streptavidin gebundenen Oberflächenproteine mit PNGase F inkubiert, um alle Zuckermodifikationen von HA zu entfernen. Anschließend wurden die Proteine wieder nach ihrer Größe getrennt und die HA-Proteine per Immundetektion sichtbar gemacht. Wie in **Abbildung 3–35 (B)** gezeigt, waren nach der Behandlung mit PNGase F keine Mobilitätsunterschiede zwischen den verschiedenen HA-Mutanten und dem Standard-HA mehr festzustellen. Diese Ergebnisse bestätigten, dass die Mutationen T156A und N154S für die Entfernung einer Zuckermodifikation am HA-Protein ursächlich sind.

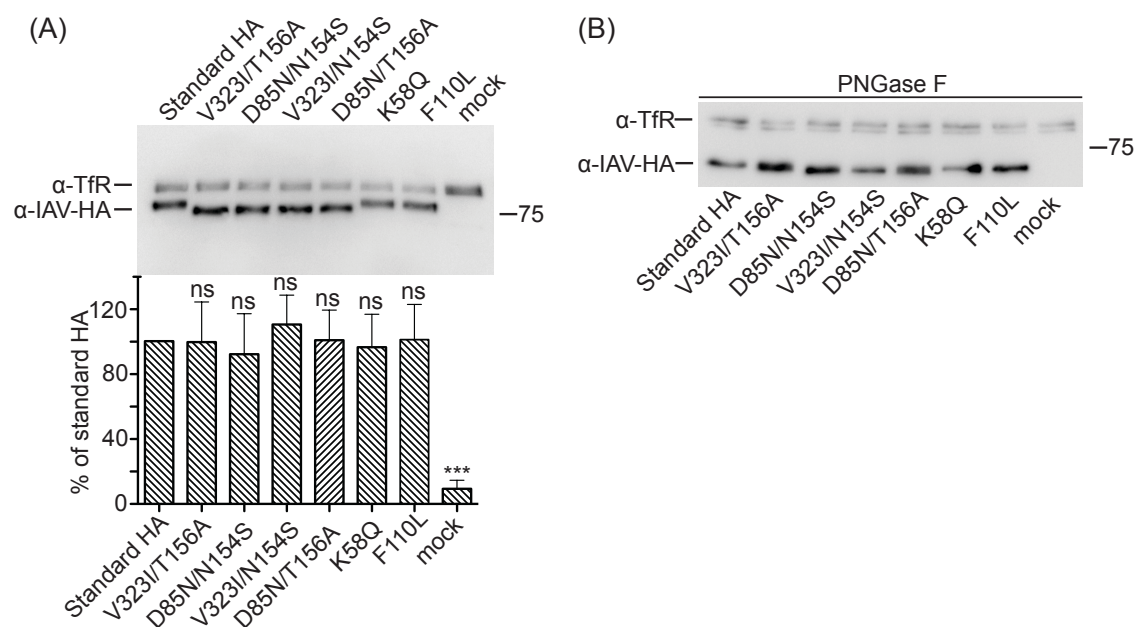


Abbildung 3–35: (A) Oberflächen-Biotinylierung von BSR T7/5-Zellen, die transient mit einem Expressionsplasmid, das für IAV-WSN-HA mit den angegebenen Mutationen oder Standard-HA (standard HA) kodiert, transfiziert wurden. Streptavidin

gebundene, biotinylierte Oberflächenproteine wurden anschließend mittels SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern gegen HA oder dem zellulären Transferrin-Rezeptor (TfR) als internem Standard detektiert. Die Säulen zeigen Mittelwerte und SD für densitometrische Analysen der Signalintensität der Proteinbanden von drei unabhängigen Experimenten. Im Kontrollexperiment erhielten die Zellen einen leeren DNA-Vektor (mock). Zur statistischen Analyse wurde One-way-ANOVA mit Sidak's Multiple-Comparison-Posttest angewandt (ns, nicht signifikant [$P \geq 0,05$]). (B) Immunoblot der Proben aus (A) nach der Deglykosylierung mit PNGase F.

Da die beiden Kombinationen an Punktmutationen in HA D85N/T156A und V323I/N154S, die jeweils paarweise in unterschiedlichen Adaptationsexperimenten aufgekomen sind und jede der vier Mutationen für sich keine Resistenz verursachte (**Tabelle 3-4**), sollte die Frage beantwortet werden, ob der Resistenzmechanismus von exakt diesen Mutationspaaren abhängig ist oder ob die Resistenz durch das Entfernen des proximalsten N-Glykans am Stamm von HA in Kombination mit einer der beiden Mutationen an der Basis der globulären Domäne (V323I oder D85N) bedingt wurde.

Um die beiden Möglichkeiten zu testen, generierten wir zwei rekombinante WSN-NanoLuc-Mutanten, die jeweils eine Kreuzkombination der beiden Mutationspaare, also V323I/N154S und D85N/T156A, trugen, und testeten diese auf deren Suszeptibilität gegen die unterschiedlichen GRP-Verbindungen in einem Dosis-Wirkung-Experiment. Die Luciferase-Aktivität der rekombinanten Virusmutanten in Abhängigkeit der verschiedenen Konzentrationen an GRP-71271, GRP-115249 oder GRP-103594 sind in **Abbildung 3-36** dargestellt.

Wie daraus zu entnehmen ist führten auch die nicht natürlich aufgekomenen Punktmutationspaare V323I/N154S und D85N/T156A zu einer robusten Resistenz gegen jede der strukturell diversen Verbindungen. Die erhaltenen Ergebnisse waren vergleichbar mit jenen Resistenzmustern, die für die Virusmutanten, die die natürlich entstandenen Mutationspaare V323I/T156A

und D85N/N154S trugen, erhalten wurden. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Entfernung, der am proximalsten zur Membran gelegenen Zuckermodifikation am Stamm von HA für den Mechanismus der kooperativen Resistenz zwar eine essentielle Funktion hat, jedoch nicht alleine für den Resistenzmechanismus verantwortlich ist.

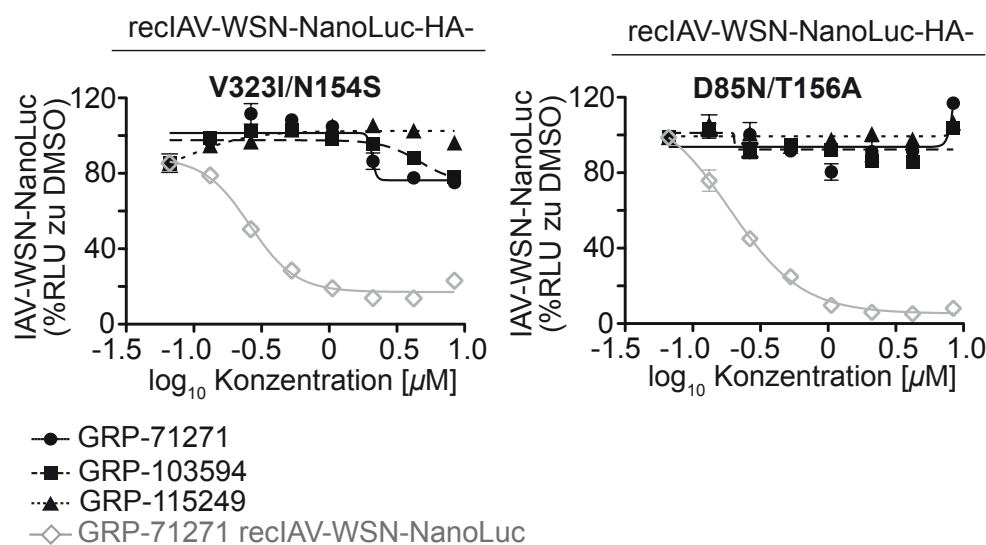


Abbildung 3–36: Dosis-Wirkung-Experimente der rekombinanten IAV-WSN-NanoLuc-Mutanten, die in ihren HA-Proteinen die entsprechenden Kreuzkombinationen der kooperativen Mutationspaare tragen gegen die drei Hit-Verbindungen. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten \pm SD. Die effektiven, halbmaximalen, inhibitorischen Konzentrationen wurden mittels des Four-Parameter-Variable-Slope-Regressionsmodells berechnet und in sind in **Tabelle 3-4** angegeben. Die graue Kurve in jedem der Graphen repräsentiert die Aktivität der Verbindung GRP-71271 gegen IAV-WSN-NanoLuc mit Standard-HA.

Ein wichtiger Aspekt, der auch klinisch von Bedeutung ist, ist der Einfluss der verschiedenen Resistenzmutationen auf die Replikations- und Infektionsfähigkeit der entsprechenden Virusmutanten. Um den

Zusammenhang zwischen der viralen Fitness und den aus den Adaptationsexperimenten hervorgegangenen Mutationen greifbar zu machen, wurden die relativen Replikationsdynamiken aller resistenter Virusmutanten mit der Replikationsrate des Standard-IAV-WSN-NanoLuc auf BEAS-2B-Zellen verglichen. In diesem Experiment wurde auch die M59I-Mutation und die willkürlich generierten Mutationspaare V323I/N154S und D85N/T156A getestet (**Abbildung 3–37**). Aus den erhaltenen Wachstumskurven der rekombinanten Virusmutanten ging hervor, dass es zwischen den Viren, die nur eine Punktmutation in ihrem HA trugen, große Unterschiede bezüglich ihrer viralen Fitness gab. Während IAV-WSN-NanoLuc HA_{F110L} eine dem Standard IAV-WSN-NanoLuc vergleichbare Vermehrungsdynamik aufwies, zeigten die Virusmutanten mit den Mutationen M59I und K58Q ein deutlich vermindertes Replikationsvermögen.

Beim Vergleich der Virusmutanten, die zwei Mutationen in HA trugen, fiel auf, dass die Mutation an Position 85 zu einer verminderten Replikationsrate im Vergleich zum Standard-Virus führte. Die V323I-Mutation hingegen hatte keinen negativen Effekt auf die virale Replikationsfähigkeit und wies in Kombination mit der Punktmutation N154S oder T156A eine Vermehrungsrate auf, die der des Standard-Virus entsprach. Daraus konnte auch geschlossen werden, dass die Mutationen N154S und T156A, die für die Löschung der N-Glykosylierungssequenz verantwortlich sind, keinen entscheidenden Einfluss auf die virale Fitness haben, zumindest in diesem zellkulturbasierten Experiment. (**Abbildung 3–37**).

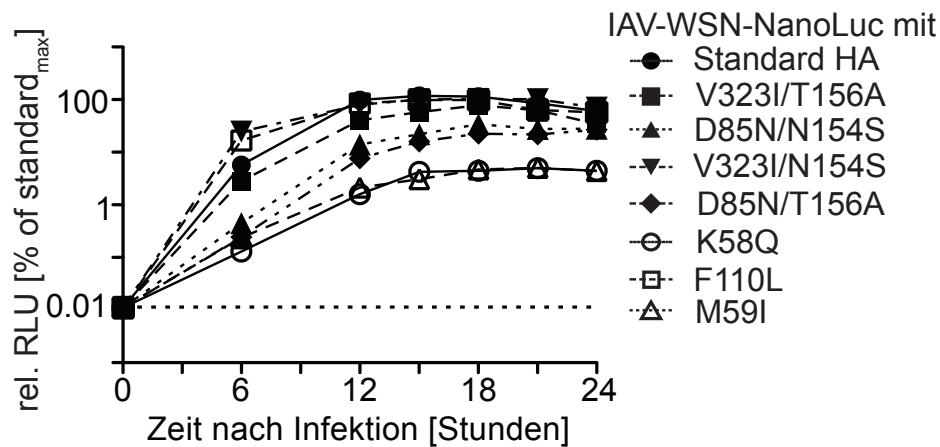


Abbildung 3–37 Darstellung der Wachstumskurven der rekombinanten IAV-WSN-Viren mit unterschiedlichen Mutationen im HA-Protein. Replikationsvermögen der Viren sind in % relativ zum Standard-IAV-WSN angegeben.

Die zur Zellmembran proximalste Zuckermodifikation am HA-Stamm hatte weder einen Einfluss auf die Bioaktivität von HA noch auf das Replikationsvermögen des Virus in Zellkultur. Jedoch ist bekannt, dass die variablen Glykosylierungsmuster des HA-Proteins neben der Rezeptorbindung, der Beschaffenheit des Antigens und neben der Ausbildung der korrekten dreidimensionalen Struktur, auch die pH-Stabilität dieses Fusionsproteins beeinflussen. Folglich ist die N-Glykanstruktur an HA für die Pathogenität und Wirtsspezifität des Influenza-A-Virus mit verantwortlich (Mair et al., 2014). Die pH-Stabilität schwankt zwischen pH 5 und 6, abhängig vom Virusstamm und HA-Subtyp und ist eine wichtige Kenngröße des HA-Proteins. Die pH-Stabilität des HA-Proteins entscheidet über den Zeitpunkt des irreversiblen Übergangs des Proteins aus seinem metastabilen Präfusionszustand in seine stabile Haarnadel-Konformation und somit über die anschließende Fusion der viralen mit der Endosomenmembran der Wirtszelle. Folglich wird auf diese Weise auch die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Infektion mit beeinflusst. Eine zu

frühe Fusion durch ein pH-labileres HA-Protein könnte in einer Inaktivierung des Virus durch das Immunsystem der Wirtszelle führen, während ein zu stabiles HA und einer folglich eher späten Fusion mit der Gefahr des Abbaus des Virus im Lysosom einhergeht.

Um die pH-Stabilität der verschiedenen HA-Mutanten abschätzen zu können, wurden Vektor-Plasmide, die für die entsprechende HA-Mutante oder das Standard-HA codierten in BSR-T7/5-Zellen transfiziert. Anschließend wurden die Zellen, die nun die jeweilige HA-Mutante in ihre Zellmembran inkorporiert hatten, unterschiedlichen pH-Werten ausgesetzt. Unter Beobachtung der Entstehung von HA-induzierten Riesenzellen (Synzytien) bei unterschiedlichen pH-Werten zwischen 5,2 und 5,7 wurde die individuelle pH-Stabilität bestimmt.

Die Mikroskopiebilder, der verschiedenen HA-Mutanten bei verschiedenen pH-Werten, sind in **Abbildung 3–38** dargestellt. In Zellen, die das Standard-IAV-WSN HA-Protein exprimierten, konnte ab einem pH-Wert von 5,4 die Bildung von mehrkernigen Riesenzellen beobachtet werden. Diese Marke diente folglich als Referenzwert für die Einschätzung der pH-Stabilität der zu testenden HA-Mutanten. Zellen, die HA-F110L oder HA-K58Q exprimierten, zeigten erst bei einem pH-Wert von 5,2 die Bildung von Synzytien. Folglich erhöhten die Mutationen an den Positionen 110 und 58 die pH-Stabilität des HA-Proteins. Über eine ähnliche Erhöhung der pH-Stabilität von HA wurde in anderen Studien für eine K58I-Mutation für ein H1 und H5 HA berichtet (Reed et al., 2010; Steinhauer et al., 1996).

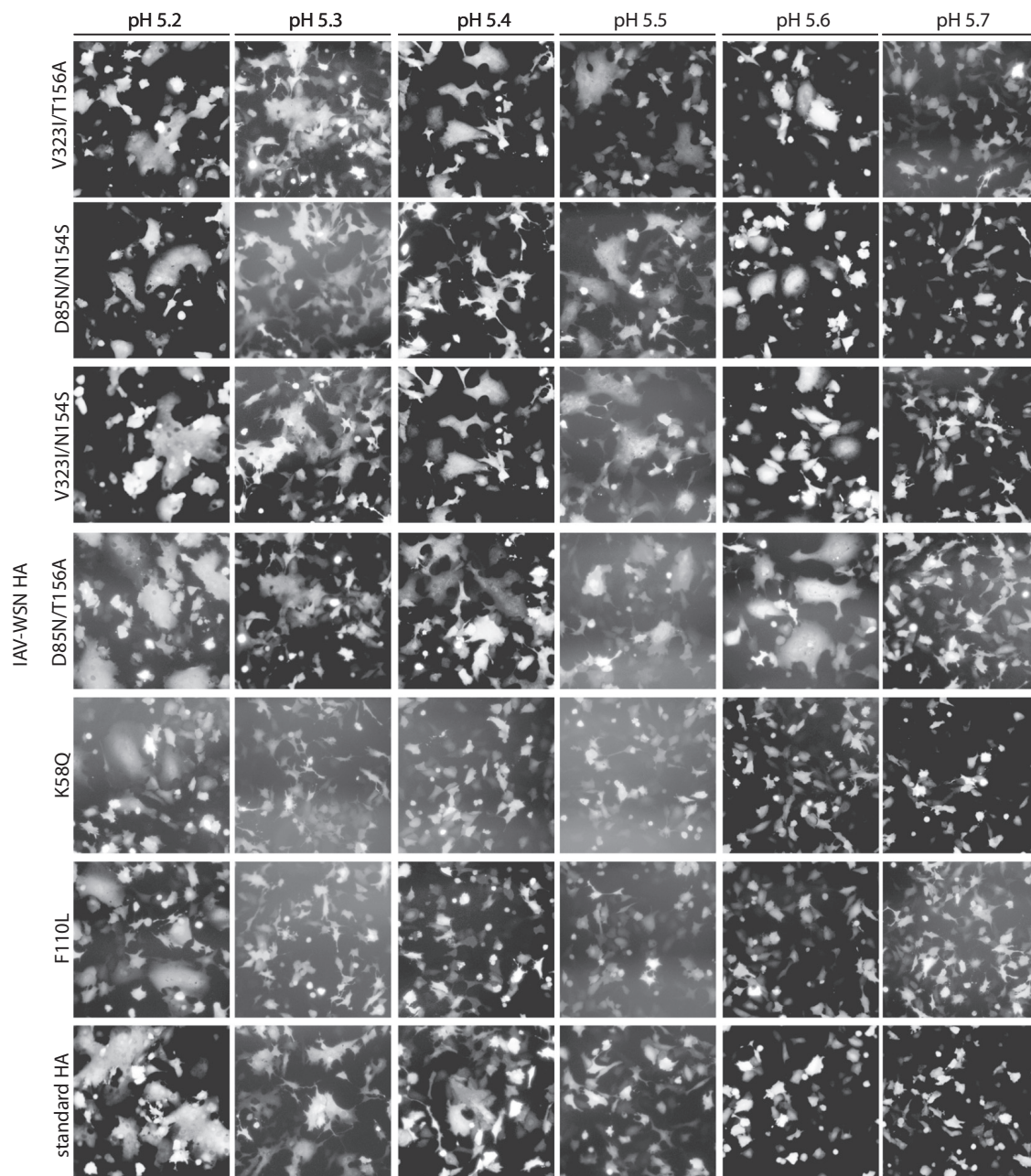


Abbildung 3–38: Zell-Zell-Fusions-Assay zur Abschätzung der pH-Stabilität der unterschiedlichen HA-Mutanten in BSR-T7/5-Zellen. Die BSR-T7/5-Zellen wurden mit je einem Expressionsplasmid, das für IAV-WSN HA oder EGFP kodiert, in einem Verhältnis von 10:1 transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin behandelt und den entsprechenden pH-Werten für 5 min bei 37°C ausgesetzt. Nach 30 min Inkubationszeit bei 37°C wurde die Bildung von Synzytien durch Mikroskopie bei 100-facher Vergrößerung bewertet. Standard-HA, IAV-WSN HA ohne Mutation.

Die pH-Stabilität der metastabilen Präfusionskonformation wird vor allem durch Salzbrücken, aber auch durch schwächere, nichtkovalente Bindungsarten, wie Wasserstoffbrücken, hydrophobe Wechselwirkungen und van-der-Waals Kräfte, zwischen funktionellen Gruppen bestimmter Aminosäure-Reste innerhalb der Untereinheiten des Trimers bestimmt (siehe Kapitel 1.1.4.4, **Abbildung 1–6**). Durch die Protonierung entsprechender funktioneller Gruppen im späten Endosom werden die stabilisierenden Wechselwirkungen unter dem Verlust (z.B. R-COOH aus R-COO⁻) oder der Einführung (z.B. R-NH₃⁺ aus R-NH₂) von Ladungen destabilisiert und HA2 kann in den thermodynamisch stabilen Postfusionszustand übergehen.

Durch Punktmutationen, die die ionische Struktur und somit die stabilisierenden Salzbrücken des metastabilen Zustands des HA-Proteins verändern, kann die pH-Stabilität beeinflusst werden. Bei der K58Q-Mutation wird ein Lysin-Rest, der unter physiologischen Bedingungen als R-NH₃⁺ ionisiert vorliegt, durch ein Glutamin-Rest ersetzt, der bei einem pH von 7,4 keine Ladung trägt. Auch bei der K58I-Mutation wird der Lysin-Rest durch einen neutralen Isoleucin-Rest ersetzt. Diese fehlende ionisierbare Seitenkette scheint die pH-Stabilität von HA zu erhöhen. Außerdem ist K58 Teil der B-Schleife in der Präfusionskonformation, die sich im stabilen Postfusionszustand, in eine Doppelwendel (Coiled-Coil) umlagert. Es ist leicht ersichtlich, dass es außerdem von Bedeutung ist, in welcher Mikrodomäne die Mutation erfolgt. Für die pH-Stabilität sind vor allem vier Mikrodomänen von Bedeutung: Das Fusionspeptid (die ersten 25 N-terminalen Aminosäuren in HA2), die Fusionspeptid-Tasche, bestehend aus Aminosäure-Resten von HA1 und HA2, die das Fusionspeptid umgeben, die Doppelwendeldomäne in HA2 (enthält unter anderem Aminosäure 59) und der Bereich, in dem Aminosäure-Reste beider Untereinheiten direkten Kontakt miteinander haben. Die Aminosäure an Position 110 ist sehr nahe an der Tasche, die das Fusionspeptid in der metastabilen Konformation beherbergt, gelegen und liegt in direkter Nachbarschaft zu D109 und H111 in HA2. D109 ist zusammen mit D112 und K51 (HA1) in allen IAV-HAs konserviert und Teil der Peptidtasche. Auch H111,

K/R106 und Y17 (HA1) sind als Teil der Peptidtasche in allen H1 HAs konserviert und interagieren direkt mit dem Fusionspeptid. In verschiedenen Studien wurde bereits über den Einfluss der Reste an den Positionen 17, 109 und 112 auf die pH-Stabilität berichtet (Gething, Doms, York, & White, 1986) (Thoennes et al., 2008) (Wiley & Skehel, 1987).

In der unmittelbaren Nähe der Aminosäure F110 zur Peptidtasche liegt eine mögliche Erklärung für den Einfluss der F110L-Mutation auf die erhöhte pH-Stabilität dieser HA-Mutante. Der Austausch eines Phenylalanin-Restes gegen einen ebenfalls apolaren Leucin-Rest hat selbstverständlich keine ionischen Effekte zur Folge jedoch wird ein aromatisches π -Orbitalsystem entfernt was durchaus Folgen für die Interaktion mit möglichen Wechselwirkungspartnern und für die Stabilität der metastabilen Struktur des Proteins haben kann.

Alle HA-Mutanten, denen die Zuckermodifikation am Stamm durch eine der beiden T156A- oder N154S-Mutationen verloren ging, zeigten eine erhöhte pH-Labilität, die sich in der Ausbildung von Riesenzellen bereits bei einem pH-Wert von 5,6 bemerkbar machte. Dieser Wert liegt 0,2 Einheiten über dem Vergleichswert des Standard-HA.

Fasst man die Ergebnisse der pH-Stabilität und der viralen Replikationsfähigkeit in Abhängigkeit der Mutationen in HA zusammen, ist die kooperative Resistenz des Virus gegen die verschiedenen Strukturklassen an Fusionsinhibitoren durch die Entfernung des proximalsten N-Glykans am HA-Stamm plus einer weiteren Mutation an der Basis der globulären Domäne bedingt. Während die Mutationen T156A oder N154S keinen Einfluss auf das Replikationsvermögen der Virusmutanten zu haben scheinen, verminderte der Verlust des N-Glykans die Stabilität der Präfusionskonformation des Proteins. Dabei ist die präzise Natur der Mutationspaare nicht relevant, solange die Mutation die N-Glykosylierungssignalsequenz Asn(N)-X-Ser(S)/Thr(T) verändert.

Die unterschiedlichen pH-Stabilitäten der HA-Mutanten, die entweder eine singuläre Mutation oder zwei kooperative Mutationen tragen, deutete auf die

Existenz unterschiedlicher Mechanismen hin durch die IAV der Wirkweise von Fusionsinhibitoren entgehen kann.

Um die Mechanismen, die hinter der kooperativen und der primären Resistenz stehen, besser zu verstehen, wurden ausgewählte HA-Mutanten in Bio-Layer-Interferometrie Experimenten untersucht.

Dazu wurden zwei HA-Mutanten, die jeweils als repräsentative Mutante für den jeweiligen Resistenzmechanismus ausgewählt wurden, nach Expression und Reinigung entsprechend der Beschreibung aus Kapitel 3.4.1 an Super-Streptavidinsensoren immobilisiert.

Für die Untersuchung der HA-Mutanten, die einen einzigen Aminosäuretausch in der Nähe des distalen Endes der Doppelwendelstruktur in HA2 trugen, wählten wir, für die bessere Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen vorangegangener Studien, die HA-Mutante mit der Mutation M59I. Für die Repräsentation des kooperativen Resistenzmechanismus wurde das Mutationspaar D85N(HA2)/T154S(HA2) ausgewählt. Anschließend wurde an den sensorimmobilisierten HA-Mutanten mittels BLI getestet, ob die Bindungsaffinität der Verbindungen GRP-71271 und GRP-115249 durch die entsprechenden HA-Mutationen beeinflusst wird.

Aus den BLI-Experimenten ging hervor, dass die K_D -Werte der getesteten Verbindungen GRP-71271 und GRP-115249 für die HA-Mutante M59I um etwa zwei Größenordnungen höher waren als für Standard-HA, was auf eine beeinträchtigte Bindung der getesteten Verbindungen an HA-M59I hinweist (**Abbildung 3–39**).

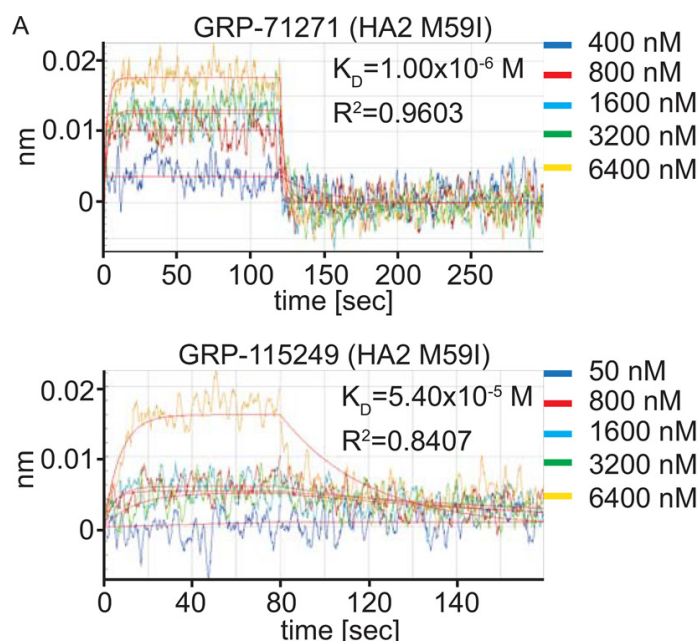


Abbildung 3–39: Bio-Layer-Interferometrie (BLI)-Analyse der Bindungskinetik der Verbindungen GRP-71271 und GRP-115249 an die gereinigte, lösliche HA-Mutante M59I, die an Super-Streptavidin (SSA) beschichteten Sensoren immobilisiert wurde. Es sind die Assoziations- und Dissoziationskurven der angegebenen Verbindungen bei unterschiedlichen Konzentrationen gezeigt. Die Linien repräsentieren Regressionsmodelle und die angegebenen Werte die berechneten Dissoziationskonstanten (K_D) bzw. die Anpassungsgüte der Werte (R^2) des verwendeten Regressionsmodells.

Im Gegensatz dazu wichen die K_D -Werte der Verbindungen GRP-71271 und GRP-115249 in den BLI-Experimenten mit der HA-Doppelmutante D85N/N154S weniger als 2,5-fach von den Werten ab, die aus den Experimenten mit dem Standard-HA hervorgingen, was darauf hinweist, dass die Bindungsaffinität der getesteten Substanzen an HA durch die Mutationen D85N/N154S nicht vermindert wird.

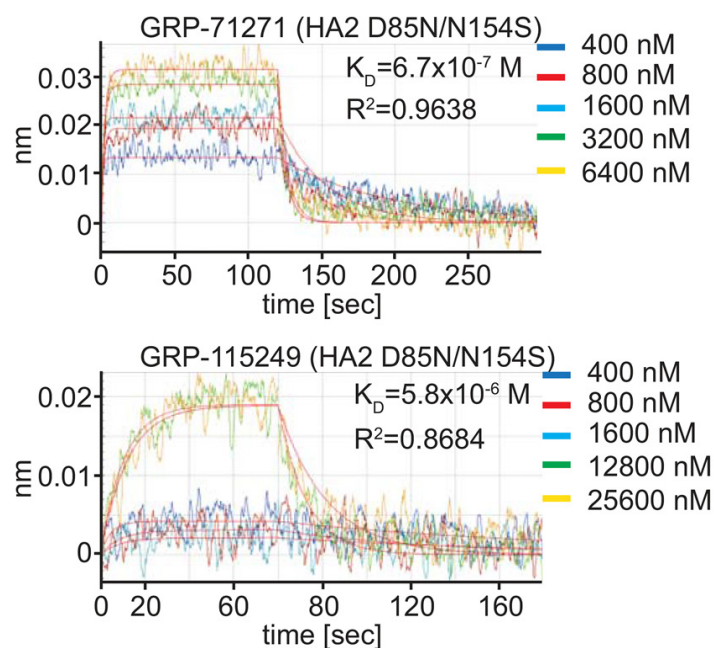


Abbildung 3–40: Bio-Layer-Interferometrie (BLI)-Analyse der Bindung der Verbindungen GRP-71271 und GRP-115249 an das gereinigte, lösliche, die entsprechenden Mutationen tragende HA-Protein das an Super-Streptavidin (SSA) beschichteten Sensoren immobilisiert wurde. Es sind die Assoziations- und Dissoziationskurven der angegebenen Verbindungen bei unterschiedlichen Konzentrationen gezeigt. Die Linien repräsentieren Regressionsmodelle und die angegebenen Werte nennen die berechneten Dissoziationskonstanten (K_D) bzw. die Anpassungsgüte der Werte (R^2) des verwendeten Regressionsmodells.

Während die Mutation an Position 59, die in der Nähe des distalen Endes der Stamm-Domäne in HA2 gelegen ist, zu einer verminderten Bindungsfähigkeit der getesteten Fusionsinhibitoren führte, konnte eine unveränderte Affinität der Verbindungen GRP-71271 und GRP-115249 für HA-D85N/N154S detektiert werden. Eine mögliche Erklärung für diesen Sachverhalt liegt in der Annahme, dass die Aminosäuren an den Positionen 58 und 59 Teil der Bindungstasche für die Fusionsinhibitoren sind bzw. die Bindungsverhältnisse innerhalb der Tasche beeinflussen und somit direkt die Stärke der Interaktion zwischen HA und den

niedermolekularen Verbindungen beeinflussen können. Die kooperative Resistenz auf der anderen Seite, wird über einen alternativen Mechanismus vermittelt, der die Bindungsaffinität der strukturell unterschiedlichen Fusionsinhibitoren zu den entsprechenden Aminosäuren innerhalb der Bindungstasche nicht beeinträchtigt.

3.4.4 In-silico-Bindungsstudien

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die verschiedenen Strukturklassen in einem in-silico-Docking-Simulationsexperiment unter Anwendung eines induced-fit Modells getestet. Als Modell-Glykoprotein wurde die Kristallstruktur der Präfusionskonformation des HA-Proteins des A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) (RCSB Protein-Database Eintrag 1RU7) verwendet.

In den in-silico-Analysen und den Affinitätsbeurteilungen möglicher hypothetischer Bindungsdomänen für die drei Strukturklassen an Fusionsinhibitoren wurde eine bestimmte Bindungstasche vorgeschlagen, die für jede der drei Strukturen die höchste errechnete Wahrscheinlichkeit erreichte. Diese spezielle Tasche ist in **Abbildung 3–41** zusammen mit der Verbindung GRP-71271 dargestellt.

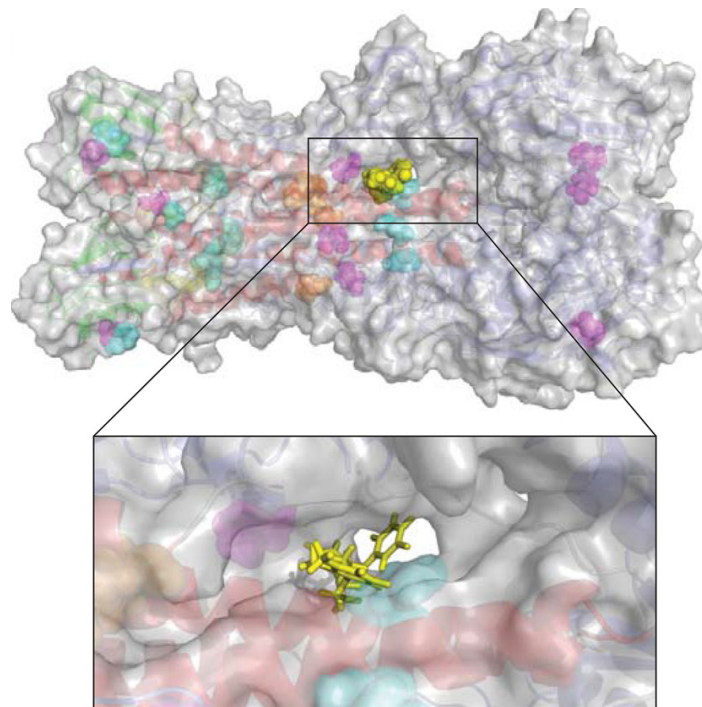


Abbildung 3–41: Strukturmodell der Bindungstasche für GRP-71271, die mit der höchsten Wahrscheinlichkeit vorhergesagt wurde. Die Farben der unterschiedlichen Strukturdomänen und Resistenzmutationen entsprechen denen in **Abbildung 3–32**.

Eine genauere Betrachtung der vorhergesagten Bindungstasche ergab, dass die seitlichen Begrenzungen durch zwei Aminosäuresequenzen (Aminosäure 277 bis 280 und Aminosäure 314 bis 319) der HA1-Untereinheit, einem Abschnitt des α -helicalen Stamms in HA2, und durch Aminosäureseitenketten, die Teil der B-Schleife sind, gebildet werden. Der obere Teil der Tasche wird von den Aminosäuren 121 bis 125 (HA1) und 74 bis 79, die Teil der B-Schleife in HA2 sind, abgedeckt. Die Aminosäuren an Position 58 und 59, deren Mutation eine robuste Resistenz gegen die Fusionsinhibitoren dieser Studie mit einhergehender Beeinträchtigung deren Bindungsaffinität an HA verursachten, liegen in unmittelbarer Nähe zur errechneten Bindungstasche und könnten an der Gestaltung der räumlichen Geometrie dieser Tasche beteiligt sein. Da diese spezielle Mikrodomäne an der Kontaktstelle zweier HA-Monomere liegt, wäre

es möglich, dass die Bindung jener Fusionsinhibitoren an diese Mikrodomäne, zu einer Stabilisierung der Präfusionskonformation des HA-Proteins führt und auf diese Weise die Fusogenität des Virus beeinträchtigt wird.

Interessanterweise wurde für alle, bisher beschriebenen Fusionsinhibitoren für IAV-HAs der Gruppe 1 (White et al., 2015) (Lai et al., 2015) (Basu et al., 2014) diese Mikrodomäne, bzw. an diese Mikrodomäne angrenzende Aminosäuren, als primäre Interaktionsstelle vorausgesagt.

Verständlicherweise wurde in den in-silico-Modellen für jede der unterschiedlichen Verbindungen, abhängig von ihrer chemischen Struktur eine individuelle räumliche Geometrie und unterschiedliche polare und apolare Wechselwirkungen mit entsprechenden Seitenketten innerhalb der Mikrodomäne berechnet.

In **Abbildung 3–42** und **Abbildung 3–43** sind die 2D-Transformationen der dreidimensionalen Bindungsgeometrien unter Berücksichtigung der wichtigsten Wechselwirkungen der jeweiligen GRP-Verbindung mit den unmittelbar angrenzenden Aminosäuren, innerhalb der errechneten Bindungstasche, dargestellt. Aus diesen Transformationen ging hervor, dass sich innerhalb der Tasche, zum einen mehrere hydrophobe Seitenketten befinden, zum anderen einige polare Seitenketten für die Ausbildung von H-Brückenbindungen oder von polaren Wechselwirkungen mit den funktionellen Gruppen der antiviralen Substanzen verfügbar sind. Besonders für GRP-71271 ergaben die in-silico-Simulationen der Molekül-Protein-Interaktion eine sehr günstige Wechselwirkung, die eine fast komplette Einbettung des Moleküls in die Tasche mit einer sehr geringen Exposition einzelner Strukturelemente der Verbindung nach außerhalb der Tasche, voraussagt. Dies wird in **Abbildung 3–42** durch den durchgängigen, gestrichelten Konturplott angedeutet.

Außerdem wurde in der in-silico-Analyse der Bindungsgeometrie von GRP-71271 innerhalb der Bindungstasche prognostiziert, dass Aminosäure K308 (HA1) an der Verankerung des zentralen Ringsystems von GRP-71271 in der Bindungstasche beteiligt ist.

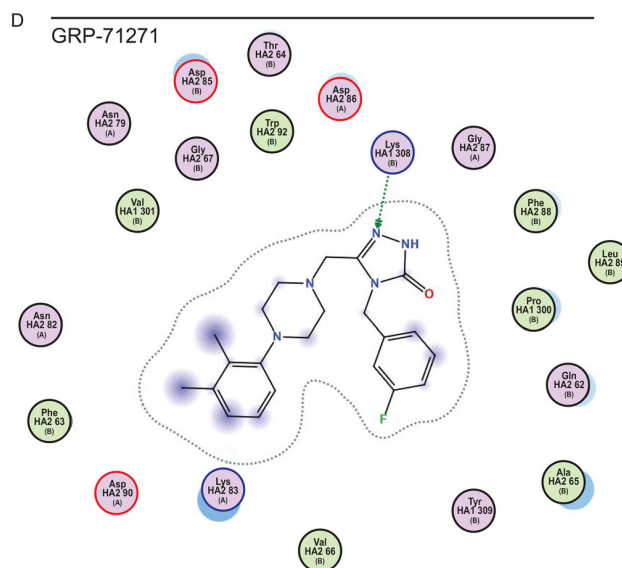


Abbildung 3–42: 2D-Transformation der vorhergesagten Wechselwirkungen zwischen GRP-71271 und Aminosäureseitenketten der berechneten Bindungstasche des A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) HA-Proteins (RCSB Protein-Database Eintrag 1RU7).

Für die Verbindungen GRP-103594 und GRP-115249 wurden Bindungsgeometrien vorhergesagt in denen die Moleküle etwas stärker exponiert sind, der Konturplott teils unterbrochen ist, aber die Wechselwirkung zwischen Molekül und Protein durch zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen bzw. π -System-Wechselwirkungen stabilisiert werden (**Abbildung 3–43**).

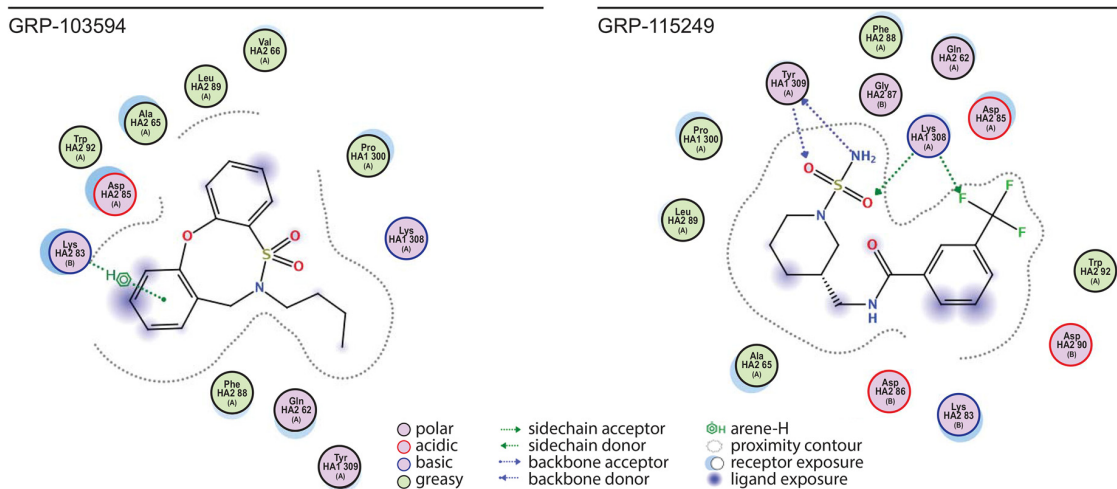


Abbildung 3–43: 2D-Transformation der vorhergesagten Wechselwirkungen zwischen GRP-103594 und GRP-115249 mit Aminosäureseitenketten der berechneten Bindungstasche des A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)-Virus HA-Proteins (RCSB Protein-Databse Eintrag 1RU7).

Um die Aussagekraft unserer in-silico-Experimente zu testen und um weitere Informationen über die Molekül-Protein-Interaktionen innerhalb der Bindungstasche zu gewinnen, wurden weitere in-silico-Dockingexperimente durchgeführt. In einem zweiten Ansatz wurde die Bindungsgeometrie der Hit-Strukturen an einem aviären HA-Protein (A/chicken/Potsdam/4705/1984 (H2N2)) im Präfusionszustand (RCSB Protein-Databse Eintrag 2WRF) berechnet.

Von den drei getesteten Verbindungen wurde nur für GRP-71271 eine geeignete Bindungskonformation, innerhalb der vorhergesagten Mikrodomäne im aviären H2N2-HA, erhalten. Die Strukturen der Verbindungen GRP-103594 und GRP-115249 waren nicht in der Lage, die Bindungstasche ohne sterisch ungünstige Wechselwirkungen zu besetzen (**Abbildung 3–44**).

Diese auf in-silico-Berechnungen basierenden Ergebnisse stimmen mit der experimentellen in-vivo-Charakterisierung der Hit-Verbindungen überein. Nur

für GRP-71271 konnte eine inhibitorische Aktivität gegen ein aviäres H2N2-Virus nachgewiesen werden (**Tabelle 3-2**).

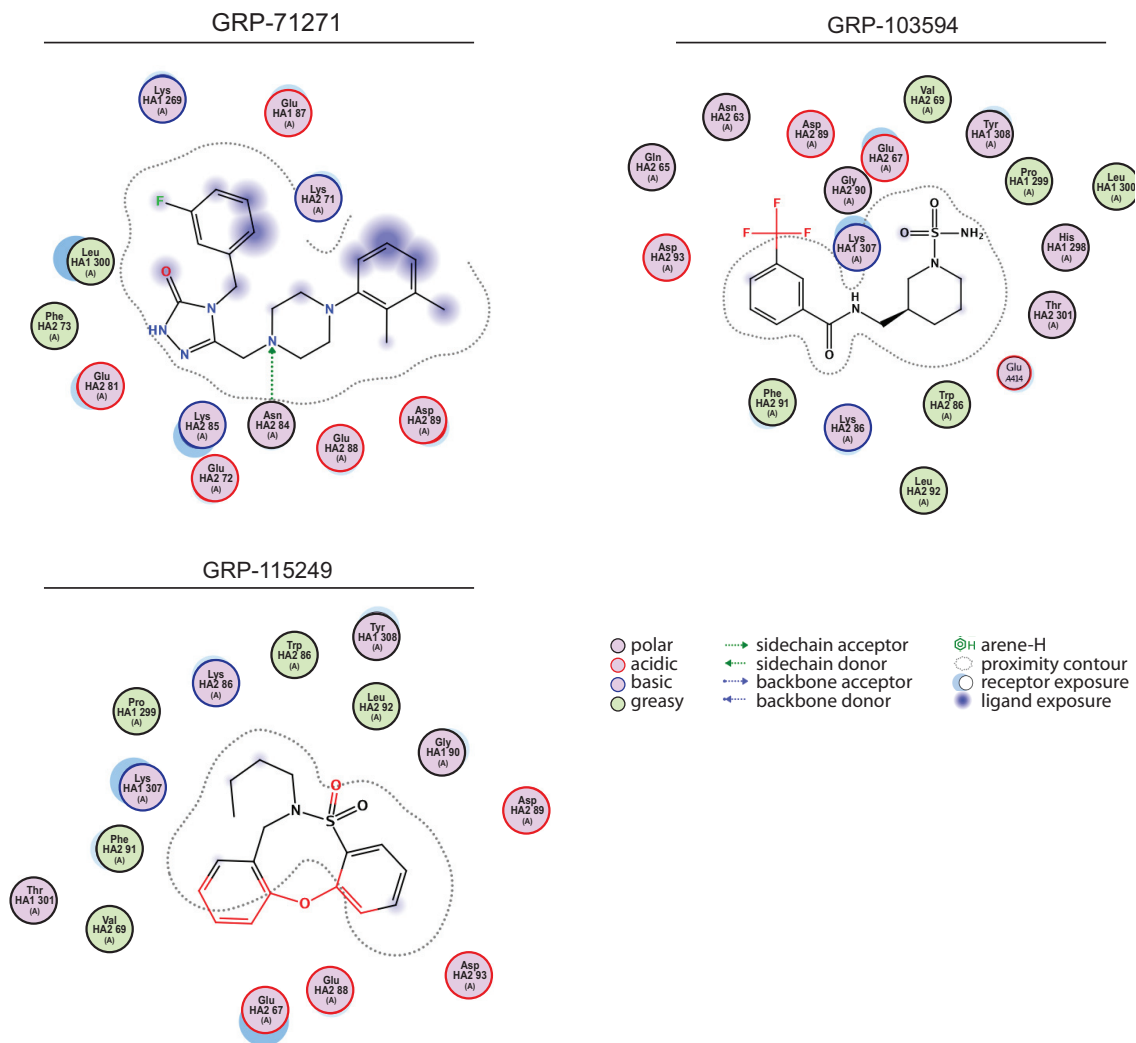


Abbildung 3-44: 2D-Transformation der vorhergesagten Wechselwirkungen zwischen GRP-71271, GRP-103594 und GRP-115249 mit Aminosäureseitenketten der berechneten Bindungstasche im A/Chicken/Potsdam4705/1984 (H2N2) HA-Protein (RCSB Protein-Datenbank Eintrag 2WRF). Die blauen Markierungen deuten Lösungsmittelpositionen bestimmter GRP-71271 Strukturelemente an. Die Verbindungen GRP-103594 und GRP-115249 wurden in-silico in die Bindungstasche gezwungen, jedoch deuten die rot markierten Strukturen destruktive, sterische Interaktionen innerhalb der Bindungstasche an.

3.4.5 Vergleich der in-silico- und in-vivo-Aktivität verschiedener GRP-71271-Strukturanaloga

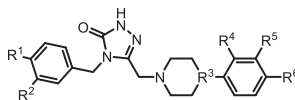
Zusätzlich wurde ein weiterer Ansatz verfolgt, die Aussagekraft der in-silico-Experimente zu testen und weitere Einblicke in die Molekül-Protein-Interaktion zu gewinnen.

Es wurde eine Bibliothek an strukturell analogen Verbindungen zu GRP-71271 erstellt und deren antivirale Aktivität sowohl in in-vivo- als auch in in-silico-Experimenten überprüft.

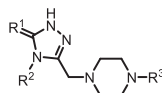
Die Überprüfung der in-vivo-Aktivität wurde in Dosis-Wirkung-Experimenten gegen WSN-NanoLuc durchgeführt. Parallel dazu wurden in-silico-Dockingstudien der strukturverwandten Verbindungen an H1N1-HA durchgeführt und die Ergebnisse verglichen. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 3-5** zusammengefasst.

Von allen getesteten strukturanalogen Verbindungen zeigten drei (GRP-71271-1, GRP-71271-2 und GRP-71271-8) eine IAV-WSN-NanoLuc-inhibierende Aktivität im mittleren mikromolaren Bereich. Die Verbindung GRP-71271-10 mit einer mittleren effektiven Konzentration von 38,9 μM wurde nicht als potenter Inhibitor gewertet. Die Ergebnisse des in-silico-Dockings stimmten erstaunlich genau mit den Ergebnissen des biologischen Assays überein. Entsprechend wurden für alle aktiven strukturanalogen Verbindungen eine vorhersagbare Bindungsgeometrie innerhalb der Bindungstasche mit entsprechenden Wechselwirkungen zwischen dem Molekül und den Aminosäureseitenketten vorhergesagt (**Abbildung 3-45**). Verbindungen, denen keine Bioaktivität nachgewiesen werden konnte, waren entweder nicht in der Lage, diese Bindungstasche zu besetzen oder verstießen gegen geometrische Beschränkungen, die sich aus der Form der Tasche ergaben.

Tabelle 3–5: Testung der Aktivität und Potenz von 14 strukturanalogen Verbindungen zu GRP-71271 gegen IAV-WSN-NanoLuc.



Verbindung	Reste an Position						EC ₅₀ (μM) ^b	CC ₅₀ (μM) ^b	Docking Vorhersage
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶			
GRP-71271	H	F	N	Me	Me	H	0,05	>10	Bindungspose modelliert
GRP-71271-1	F	H	CH	H	H	H	10,0	>10	Bindungspose modelliert
GRP-71271-2	OMe	H	CH	H	H	H	3,6	>10	Bindungspose modelliert
GRP-71271-3	F	H	N	F	H	F	>10	>10	keine Bindung in Tasche
GRP-71271-4	H	F	CH	H	H	H	>10	>10	Docking nahe der Tasche
GRP-71271-5	H	F	N	H	F	F	>10	>10	Docking nahe der Tasche
GRP-71271-6	F	H	N	H	F	F	>10	>10	Docking nahe der Tasche
GRP-71271-7	H	F	N	F	H	F	>10	>10	Docking nahe der Tasche



	R ¹	R ²	R ³			
GRP-71271-8	S	Ph	2,3-Me-C ₆ H ₃	8,7	>50	Bindungspose modelliert
GRP-71271-9	S	CH ₃ CH ₂	2,3-Me-C ₆ H ₃	>50	>50	keine Bindung in Tasche
GRP-71271-10	O	<i>o</i> -C ₆ H ₄ -OMe	<i>p</i> -C ₆ H ₄ -F	38,9	>50	Bindungspose modelliert
GRP-71271-11	O	<i>p</i> -C ₆ H ₄ -OMe	Me	>50	>50	keine Bindung in Tasche
GRP-71271-12	S	Ph	<i>p</i> -C ₆ H ₄ -F	>50	>50	keine Bindung in Tasche
GRP-71271-13	/	<i>rac</i> -1-(1-phenylethyl)	2,3-Me-C ₆ H ₃	>50	>50	keine Bindung in Tasche
GRP-71271-14	O	(<i>S</i>)-1-(1-(4fluorophenylethyl))	2,3-Me-C ₆ H ₃	>50	>50	Dockt kaum in Tasche

^a Die Werte repräsentieren drei unabhängige Experimente, die durch ein Vier-Parameter-Variable-Slope-Regressionsmodell berechnet wurden.

^b Für die Werte im oberen Teil der Tabelle wurden die Verbindungen mit einer maximalen Konzentration von 10 μM getestet; die Verbindungen in der unteren Hälfte der Tabelle wurden mit einer maximalen Konzentration von 50 μM getestet.

Interessanterweise wurden auch die Aktivitätsunterschiede zwischen den aktiven Verbindungen in der *in-silico*-Studie anerkannt. Für alle identifizierten, bioaktiven GRP-71271-Analoga wurden produktive Bindungsgeometrien erhalten (**Abbildung 3–45**), wenn auch weniger günstige als für GRP-71271, was mit den tatsächlichen Unterschieden der inhibitorischen Aktivität übereinstimmt.

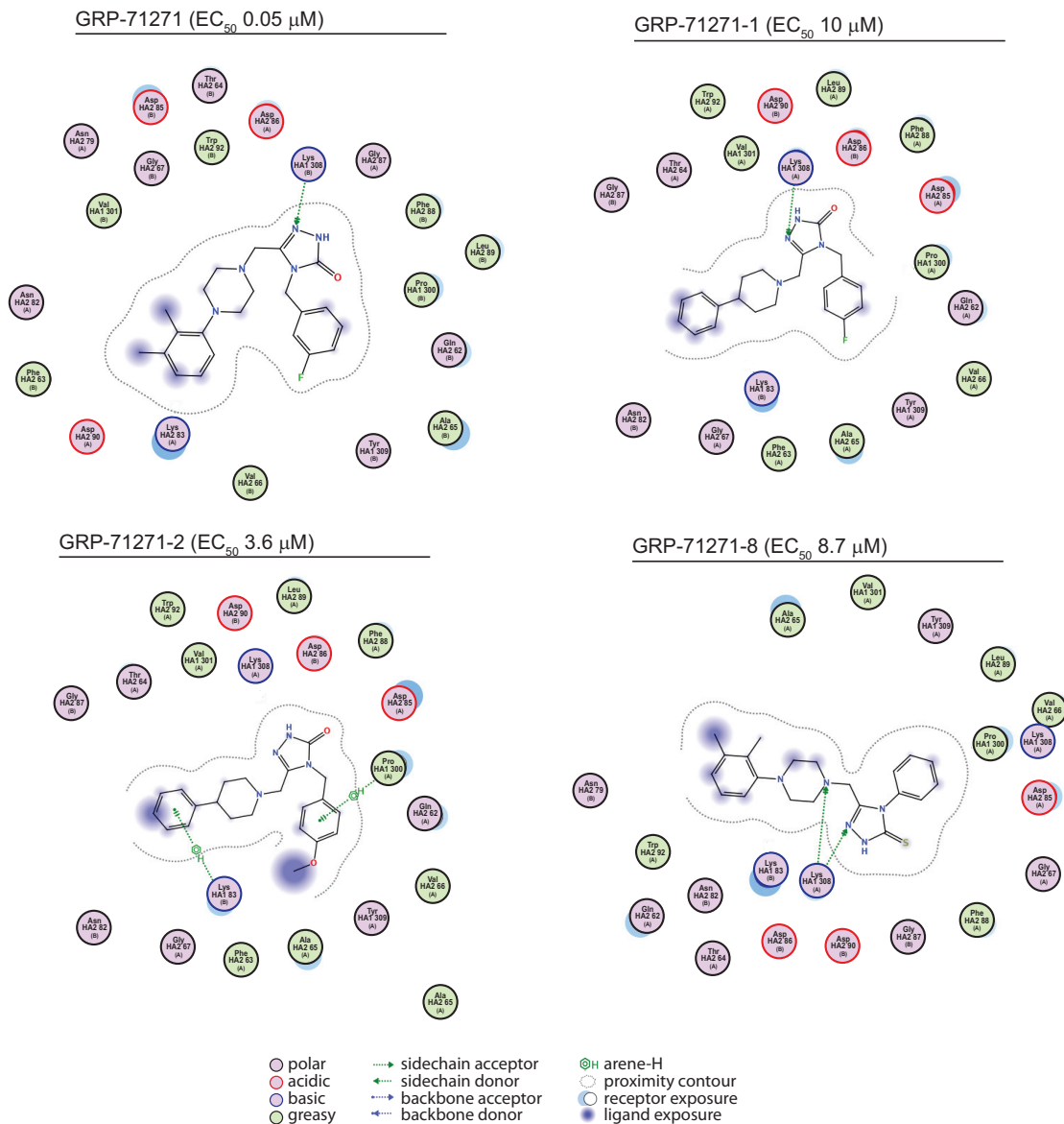


Abbildung 3–45: 2D-Transformation der vorhergesagten Wechselwirkung zwischen GRP-71271 und strukturanalogen Verbindungen mit EC_{50} -Werten $\leq 10 \mu$ M mit Aminosäureseitenketten der berechneten Bindungstasche im A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) HA-Protein (RCSB Protein-Database Eintrag 1RU7). Die zu GRP-71271 analogen Verbindungen besetzen die vorhergesagte Bindungstasche, weisen aber einen unterbrochenen Konturplot und Lösungsmittel exponierte Strukturelemente auf, was auf eine weniger günstige Population der Bindungstasche im Vergleich zu GRP-71271 hindeutet.

Niedermolekulare Verbindungen, die in der Lage sind, als Fusionsinhibitoren die Replikationsfähigkeit bestimmter, behüllter Viren zu inhibieren, haben in der Vergangenheit bereits ihre Effektivität im klinischen und präklinischen Einsatz bewiesen (Henrich & Kuritzkes, 2013) (Jordan et al., 2015). Die letzten Jahrzehnte brachten verschiedene Fusionsinhibitoren hervor, die gegen das Influenza-A-Virus aktiv sind und durch strukturbasierte Ansätze bzw. durch Screens entdeckt wurden (Hoffman, Kuntz, & White, 1997) (Bodian et al., 1993) (Plotch et al., 1999) (Minagawa, Kouzuki, & Kamiguchi, 2002) (Luo, Colonno, & Krystal, 1996) (Staschke et al., 1998). In drei aktuelleren Studien wurde von sechs niedermolekularen Verbindungen berichtet, die die Membranfusion von Influenza-A-Viren, die ein HA-Protein der Gruppe 1 (siehe **Tabelle 1-1**) tragen, blockieren (White et al., 2015) (Lai et al., 2015) (Basu et al., 2014). In einer der Studien wurden pseudotypisierte Lentiviren als Vektor-Viren, die IAV-HA-Proteine auf ihrer Oberfläche trugen, eingesetzt, um nach IAV-inhibierenden Verbindungen zu screenen (Basu et al., 2014). Es ist ersichtlich, dass ein solches System auf die Entdeckung von IAV-Fusionsinhibitoren reduziert ist. Die beiden anderen Studien hingegen nutzten offene Screeningdesigns, die auf der Beobachtung des IAV-induzierten zytopathischen Effekts (Lai et al., 2015) oder auf der Verwendung eines IAV-Reportervirus der zweiten Generation beruhten (White et al., 2015). Diese Studien waren in der Lage, Verbindungen zu detektieren, die in allen Phasen des viralen Lebenszyklus aktiv sein können und waren somit nicht auf die ausschließliche Entdeckung von Fusionsinhibitoren beschränkt. Fasst man die Anzahl der Verbindungen zusammen, die in den beiden offenen Screens und in unserem Screen, der auf einem IAV-Reportervirus der dritten Generation basiert, also Protokolle die zur Detektion potentieller antiviraler Verbindungen mit unterschiedlichsten viralen Zielstrukturen getestet wurden, kommt man auf über 1.100.000 Verbindungen. Die Ergebnisse dieser unabhängigen Studien zeigten, dass es eine gewisse Dominanz für die Entdeckung von IAV-Fusionsinhibitoren gibt. Aus den zwei vorangegangenen Studien gingen fünf Verbindungen hervor, die den Eintritt von IAV in die Wirtszelle blockieren. Zwei dieser Verbindungen sind chemisch

analog zueinander und eine weitere Verbindung weist eine strukturelle Verwandtschaft auf, so dass sich zusammen mit den drei chemisch unterschiedlichen Hits, die aus unserem Screen hervorgingen, eine Gesamtzahl von sechs unabhängigen, chemischen Grundgerüsten ergibt, die ein gemeinsames, antivirales Profil tragen (**Abbildung 3–46**). Alle Verbindungen zeigen ein Aktivitätsprofil gegen IAVs die HA-Proteine der Gruppe 1 tragen. Die antivirale Potenz der Verbindungen wird durch Mutationen an den Positionen 58 und 59 in der B-Schleife entscheidend beeinträchtigt und wie sich aus in-silico-Experimenten ergab, scheint jede der Verbindungen innerhalb derselben Mikrodomäne am distalen Ende des Stamms des präfusions-HA zu binden. Das deutet darauf hin, dass das HA-Protein das dominierende Ziel ist für antivirale niedermolekulare Verbindungen, die IAVs der Gruppe 1 inhibieren und aus Screening-Protokollen mit offenem Design hervorgehen. Die Ergebnisse der in-silico-Experimente, wurden entweder durch provozierte Resistenzen (Lai et al., 2015) oder Bio-Layer-Interferometrie (BLI) bzw. $^1\text{H-NMR}$ -Analysen (White et al., 2015) unterstützt und zeigten interessante Ergebnisse. Sind die in-silico-Berechnungen korrekt, könnte die Anzahl der möglichen Mikrodomänen in HA für die Interaktion mit verschiedenen niedermolekularen Fusionsinhibitoren auf eine einzige beschränkt sein. Die strukturell diversen Verbindungen scheinen alle die gleiche Bindungstasche zu besetzen jedoch mit unterschiedlichen Bindungsgeometrien und Seitenkettenwechselwirkungen.

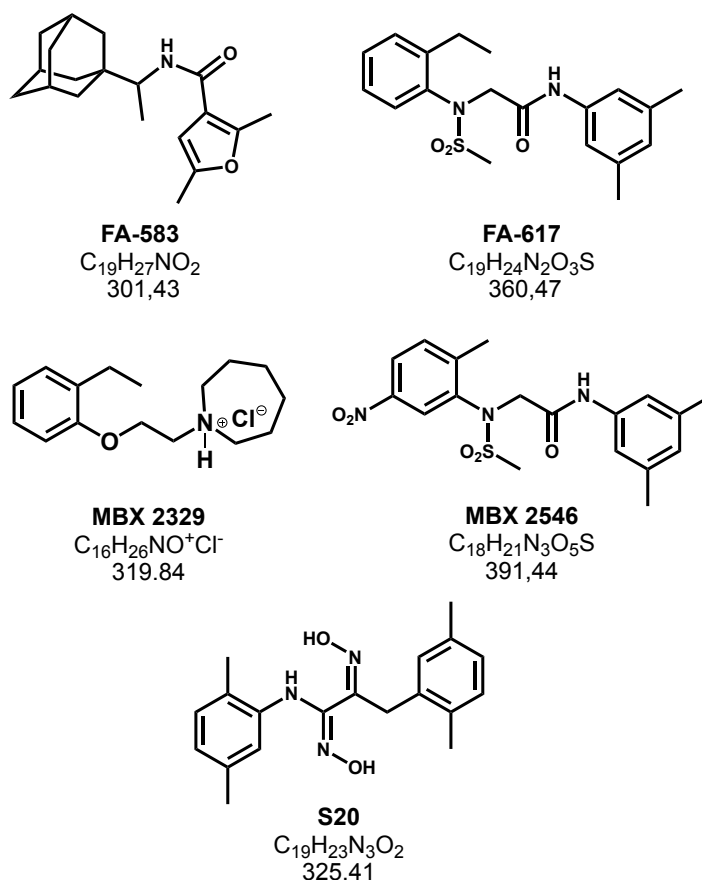


Abbildung 3–46: Darstellung der chemischen Strukturen der verschiedenen IAV-Fusionsinhibitoren, die aus unterschiedlichen Studien hervorgegangen sind (FA-583 und FA-617 aus (Lai et al., 2015), MBX 2329 und MBX 2546 aus (Basu et al., 2014), S20 aus (White et al., 2015)). Die Verbindungen FA-617 (Lai et al., 2015) und MBX 2546 (Basu et al., 2014) sind direkte Strukturanaloga zueinander. Die Verbindung S20 (White et al., 2015) weist eine strukturelle Verwandtschaft zur Verbindungen FA-617 und MBX 2547 auf.

Die Hypothese einer dominanten Bindungstasche in HA, die von verschiedensten, niedermolekularen Fusionsinhibitoren besetzt wird, erhielt Unterstützung durch folgende Erkenntnisse: Zum einen zeigten Kokristallstrukturen mehrerer IAV-Fusionsinhibitoren, die eine spezifische Aktivität gegen HAs der Gruppe 2 zeigen und in unabhängigen Experimenten

entdeckt wurden, dass diese Verbindungen in eine definierte Bindungstasche innerhalb der HA-Stamm-Domäne binden (Hoffman et al., 1997). Die sich aus den kristallografischen Untersuchungen ergebende Bindungstasche liegt in der Nähe der Bindungstasche, die von Fusionsinhibitoren besetzt wird, die an Gruppe 1 HAs binden (R. J. Russell et al., 2008). Des Weiteren ist es in der Forschung an antimyxoviralen Molekülen nicht beispiellos, dass Hit-Verbindungen mit unterschiedlicher Strukturchemie, die aus Screening-Kampagnen hervorgegangen sind und mit viralen Glykoproteinen wechselwirken, eine Tendenz aufweisen, an eine einzige dominante Mikrodomäne innerhalb des Glykoproteins zu binden. Für viele der niedermolekularen RSV-Therapeutika, die aus verschiedenen Hochdurchsatz-Screens hervorgingen, stellten sich heraus, dass deren antivirale Aktivität auf der Inhibition der Fusogenität des RSV-F-Proteins basiert (Weisshaar et al., 2015). Die Analysen der Resistenzmutationen (Yan et al., 2014) und Kokristallisationen mit verschiedenen RSV-Fusionsinhibitoren (Battles et al., 2016) lassen darauf schließen, dass alle bekannten und chemisch diversen Verbindungen, die die Fusogenität des RSV-F-Proteins inhibieren, an einer einzigen Mikrodomäne an der Basis der globulären Domäne des RSV-Fusionsproteins binden. Die chemisch diversen Moleküle besetzen dabei die gleiche Bindungstasche jedoch ist deren dreidimensionale Ausrichtung, bedingt durch individuelle Wechselwirkungen zwischen funktionellen Gruppen dieser Verbindungen und den Aminosäureseitenketten, die die Bindungstasche auskleiden und formen, für jede Verbindung unterschiedlich (Weisshaar et al., 2015) (Battles et al., 2016) (R. Cox & Plemper, 2016).

Der erfolgreiche Einsatz von antiviralen Therapeutika im klinischen Alltag ist stark abhängig von der Frequenz und Persistenz aufkommender Resistenzmutationen im Virus. Die hohe genomische Plastizität der verschiedenen RNA-Viren inklusive des Influenza-A-Virus und die sich daraus ergebende Anpassung des Virus an antivirale Medikamente, erfordert die ständige Weiterentwicklung und Neuentdeckung wirkungsvoller antiviraler

Wirkstoffe. Für die Behandlung von IAV-Infektionen wird der Einsatz der Adamantan-Therapeutika aufgrund von Resistenzen nicht länger empfohlen und die Effektivität der Neuraminidase-Inhibitoren ist durch präexistierende Resistenzmutationen in zirkulierenden IAV-Stämmen stark eingeschränkt (van der Vries et al., 2010) (Le et al., 2005). Deshalb ist es wichtig, bei der Entwicklung neuer Wirkstoffkandidaten, früh mögliche Resistenzmechanismen des Virus zu evaluieren. Unsere Experimente ergaben, dass das Virus zwei unterschiedliche Strategien nutzt, um der antiviralen Wirkweise der GRP-Fusionsinhibitoren zu entgehen. Der erste Mechanismus basiert auf einer einzelnen Mutation innerhalb von HA2. Die Mutation an Position 58 in der B-Schleife von HA2 führte zu einer erniedrigten Bindungsaffinität der GRP-Fusionsinhibitoren und beruht somit mit hoher Wahrscheinlichkeit auf einem primären Resistenzmechanismus, der die Interaktion des antiviralen Wirkstoffs mit dem Zielprotein erschwert. Die Aminosäureseitenketten der B-Schleife könnten Teil der primären Bindungstasche sein oder die sterische Zugänglichkeit dieser Tasche für die Fusionsinhibitoren beeinflussen. Vorangegangene Studien, die die Entdeckung chemisch unterschiedlicher IAV-Gruppe 1-Fusionsinhibitoren beschrieben, berichteten über eine Mutation an Position 59 (M59I), die zu einer signifikanten Senkung der antiviralen Potenz der Hit-Verbindungen führte. Da die M59I-Mutation die Suszeptibilität des Virus gegenüber der Aktivität der antiviralen GRP-Verbindungen signifikant senkte, ist davon auszugehen, dass beide Mutationen (M59I und K58Q) auf demselben Resistenzmechanismus beruhen. Die Ergebnisse des in-silico-Dockings ergaben, dass die Positionen 58 und 59 in HA2 sehr nah an der vorhergesagten Bindungstasche liegen. Für die in den Adaptationsexperimenten dieser Studie aufgekommene F110L-Mutation trifft dies jedoch nicht zu. Die Aminosäure an Position 110 liegt zentral in der dreifach-Helix, die die Stamm-Domäne von HA2 bildet und ist somit nicht in unmittelbarer Nähe der berechneten Bindungstasche lokalisiert. Es ist uns nicht möglich, alternative Bindungsdomänen, die nicht durch unsere in-silico-Berechnungen berücksichtigt wurden, auszuschließen. Eine genauere

Betrachtung der Aminosäure-Reste, die an Position 110 ausgetauscht werden, liefert eine mögliche mechanistische Erklärung der Resistenz durch jene Mutation. Die Entfernung des Phenylalanin-Restes könnte zu einer strukturellen Verzerrung innerhalb der B-Schleife kommen, die sich auch auf die Bindungstasche auswirken könnte. Phenylalanin-Reste sind aufgrund ihrer planaren Struktur und ihres π -Systems wichtige Elemente für stabilisierende Helix-Helix-Interaktionen. Dies wurde für die konservierten Phenylalanin-Reste an Position 63 und 70 in der B-Schleife von HA2, deren Anwesenheit für die Stabilisierung der Trimerstruktur des postfusions HA-Proteins von großer Bedeutung ist, gezeigt (Xu & Wilson, 2011) (Bullough, Hughson, Skehel, & Wiley, 1994) (Gruenke, Armstrong, Newcomb, Brown, & White, 2002). Die Entfernung des Phenylalanin-Rests an Position 110 könnte die Struktur der dreifachen Helix in der Präfusionskonformation von HA verändern, was möglicherweise einen Einfluss auf die Struktur der Bindungstasche haben könnte.

Der zweite Resistenzmechanismus, den wir basierend auf den Ergebnissen unserer Experimente vorschlagen, beruht auf dem kooperativen Effekt zweier Mutationen. Eine der kooperativen Mutationen ist für die Entfernung des am meisten proximal zur Membran gelegenen N-Glykans am Stamm von HA verantwortlich und führt nur in Kombination mit entweder der V323I (HA1)- oder D85N (HA2)-Mutation zu einer Aufhebung der Suszeptibilität des Virus für die GRP-Fusionsinhibitoren. Eine solche kooperative Resistenz, die das gleichzeitige Vorhandensein zweier Mutationen erfordert, ist sehr selten für niedermolekulare Fusionsinhibitoren. Basierend auf den folgenden Fakten schlagen wir einen sekundären Resistenzmechanismus für den kooperativen Effekt der beiden Mutationspaare vor, der keinen direkten Einfluss auf die Interaktion zwischen der antiviralen Verbindung und dem Zielprotein hat. Den antiviralen Molekülen ist es nicht möglich, gleichzeitig mit beiden Seitenketten in Wechselwirkung zu treten, die durch die kooperativen Mutationen ausgetauscht werden. Außerdem waren die Affinitäten der getesteten GRP-Verbindungen für

die kooperativen HA-Doppelmutanten praktisch identisch mit denen für Standard-HA und die kooperierenden Doppelmutationen erhöhten den HA-Trigger-pH-Wert, was auf eine reduzierte Konformationsstabilität des doppelmutierten Prefusions-HA-Trimers hindeutet. Auch für RSV werden unterschiedliche Resistenzmechanismen für die Aufhebung der Wirkweise verschiedener RSV-Fusionsinhibitoren angenommen. Im Fall von RSV sind jedoch keine kooperativen Mutationen für die sekundäre Resistenz verantwortlich, sondern die tatsächliche Beschaffenheit des Aminosäureaustausches an der gleichen Position steuert den Resistenzmechanismus (Weisshaar et al., 2015) (Yan et al., 2014) (Battles et al., 2016).

Die Analysen der Auswirkung der verschiedenen HA-Mutationen auf die virale Fitness zeigten, dass die Mutationen K58Q und M59I in der B-Schleife von HA2 die Vermehrungsrate des Virus senken und auch der finale Titer nach 24 Stunden deutlich geringer war im Vergleich zum Wildtyp-Virus, was eine eingeschränkte virale Fitness in-vivo wahrscheinlich macht. In unseren Experimenten hatte die Entfernung der Zuckermodifikation am Stamm von HA an Position N154 keine negativen Einflüsse auf die virale Vermehrungsrate und den finalen Titer. Das N-Glykan an Position N154 gilt als die einzige von drei konservierten Zuckermodifikationen an der HA-Stamm-Domäne, die ohne großen Nachteile für den viralen Lebenszyklus in der Zellkultur entfernt werden kann (Wagner, Heuer, et al., 2002). Die Tatsache, dass diese drei N-Glykane in allen zirkulierenden IAV-Stämmen konserviert sind, macht es sehr wahrscheinlich, dass das Fehlen eines dieser Glykane, die virale Fitness zirkulierender Viren beeinträchtigen würde. Die F110L-Mutation hatte in unseren Experimenten keinen negativen Einfluss auf die Vermehrungsraten des Virus und auch die viralen Titer waren mit dem Standard-Virus vergleichbar. Interessanterweise zeigten IAVs der Gruppe 2, die an den Positionen 109 und 112 in HA2 eine Mutation tragen, eine Amantadin-Resistenz. Für eine abschließende Abschätzung der Fitness eines F110L

tragenden Virus müssten die Pathogenität und Übertragbarkeit evaluiert werden.

Die Gruppenspezifität potentieller, IAV-Chemotherapeutika reduziert natürlich deren Entwicklungspotential. Jedoch gleichen die hohe Ausgangspotenz, die geringe Zytotoxizität und das chemische Grundgerüst, das keine unmittelbaren, strukturellen Nachteile aufweist und zur synthetischen Modifikation geeignet ist, diese Schwäche aus. Die Eignung zur chemischen Modifizierbarkeit der GRP-Moleküle wurde in dieser Studie für GRP-71271 im Rahmen der noch auszuweitenden Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehung gezeigt. Es ist unwahrscheinlich, dass chemische Modifizierungen die Gruppenspezifität dieser Fusionsinhibitoren überwinden können, jedoch könnte die Kombination mit einem ebenso starken Fusionsinhibitor mit einer anderen Gruppenspezifität den Weg in Richtung klinischer Anwendung für eine vielversprechende, aber derzeit noch nicht erforschte Art von Grippetherapeutika aufzeigen.

4 Abschließende Bemerkungen und Ausblick

Influenza-A-Viren (IAV) und die mit ihnen assoziierten, jährlich wiederkehrenden epidemischen oder pandemischen Ausbrüche bedeuten eine ständige sozioökonomische Belastung (Gasparini, Amicizia, Lai, & Panatto, 2012) und eine gesundheitliche Gefährdung, vor allem für immunsupprimierte Personen (Kunisaki & Janoff, 2009). Trotz großer, jährlicher Bemühungen, eine ausreichende Menge eines wirksamen Impfstoffs bereitzustellen, ist kein andauernder, adäquater Schutz gegen IAV garantiert (Lewnard & Cobey, 2018). Zumal der klinische Einsatz der verfügbaren M2- und NA-inhibierenden Grippemedikamente durch aufkommende oder bereits bestehende Resistenzmutationen in den zirkulierenden Stämmen nur bedingt wirksam ist (Hussain et al., 2017). Zusätzlich sehen wir uns der Gefahr neuer, hochpathogener, aviärer IAV (HPAI) ausgesetzt, deren zoonotisches Potential schwer abzuschätzen ist (Kalthoff, Globig, & Beer, 2010) (J. S. Peiris et al., 2016) (Pusch & Suarez, 2018). Aus diesen Gründen ist der Bedarf an neuen, wirksamen Grippemedikamenten hoch.

Der im Rahmen dieser Studie angewandte Screeningassay und die daraus hervorgegangen Verbindungen könnten den Weg in Richtung eines neuen Grippemedikaments aufzeigen. Jedoch wurden auch allgemeine Hindernisse bei der Entdeckung und Entwicklung neuer Grippemedikamente unter Anwendung eines Phänotyp-basierenden Screeningansatzes deutlich. Trotz der Tatsache, dass das Screeningdesign durch den Einsatz vollständig replikationskompetenter Reporterviren, so gestaltet wurde, dass Moleküle die unterschiedliche virale Proteine in jedem Schritt des viralen Replikationszyklus inhibieren, entdeckt werden können, wurde eine Fokussierung auf Verbindungen, die die HA-vermittelte Membranfusion inhibieren, beobachtet. Diese Beobachtung deckt sich mit ähnlichen Studien anderer Arbeitsgruppen (White et al., 2015) (Lai et al., 2015). Ein möglicher Erklärungsansatz liegt in

der leichteren Zugänglichkeit von HA als Oberflächenprotein. Auch wenn HA nicht das einzige virale Protein auf der Oberfläche eines IAV-Virions ist, hat es eine numerische Dominanz aufzuweisen. Ein weiterer, einflussnehmender Faktor der schwer abzuschätzen ist, ist die Membranpermeabilität der verschiedenen niedermolekularen Verbindungen. Ausgehend von ihrem Molekulargewicht sollte von einer freien Diffusion durch die Lipiddoppelschicht auszugehen sein, jedoch kann das Vorhandensein polarer funktioneller Gruppen diese erschweren. Die Anwendung eines multizyklischen Infektionsverlaufs ist dennoch am vielversprechendsten, für die Entdeckung antiviraler Wirkstoffe mit unterschiedlichen Wirkmechanismen und Zielproteinen, in einem phänotypbasierten Screeningansatz (PDD), wie er in dieser Studie zum Einsatz kam. Bei der Entwicklung eines neuen, klinisch anwendbaren IAV-Inhibitors ist eine mögliche Erschwernis, die die Dominanz von Fusionsinhibitoren in PDD mit sich bringt, die Tatsache, dass HA eine hohe genetische Variabilität aufweist. Zwar sind andere Genomsegmente derselben Fehlerrate während der Replikation unterworfen, da sie von demselben fehleranfälligen Polymerase-Komplex kopiert werden (antigenic drift), jedoch konnte für HA, zusammen mit bestimmten Domänen in NS1, eine besonders hohe genomische Plastizität und Mutationstoleranz nachgewiesen werden (Heaton, Sachs, Chen, Hai, & Palese, 2013). Dies gilt allerdings nicht für die konservierte HA2 Stamm-Domäne, die derzeit als erfolgversprechendes Ziel bei der Entwicklung kreuzreaktiver Antikörper angesehen wird (K. Subbarao & Matsuoka, 2013) (Krammer & Palese, 2013). Die hohe Mutationstoleranz in den variablen Domänen von HA geht mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einher, dass Virusmutanten entstehen, die keinen funktionellen Nachteil haben und in der Folge nicht durch natürliche Auslese untergehen. Ähnliches ist auch bei der viralen Resistenzentwicklung gegen die klinisch zur Anwendung kommenden M2- und NA-Inhibitoren zu beobachten. Heute ist bekannt, dass viele der zirkulierenden IAV-Stämme Mutationen in M2 bzw. NA aufweisen, die die Wirkweise der jeweiligen Inhibitoren untergraben, gleichzeitig aber keinen entscheidenden Nachteil für diese Virusmutanten haben (Hussain et al., 2017).

Mit diesem genetischen Vorteil können sich die zirkulierenden, resistenten Virusmutanten in der Wirtspopulation weiter ausbreiten und mit ihnen die Medikamentenresistenz.

Ein ähnlicher Sachverhalt wurde für RSV festgestellt. Hier deuten die Daten darauf hin, dass das Virus durch den Austausch einer Base der Wirkweise aller bekannten und strukturell diversen F Protein-inhibierenden Verbindungen entgehen kann, ohne einen messbaren Nachteil für die virale Fitness im Tiermodell (Weisshaar et al., 2015) (Yan et al., 2014).

Ein weiterer Punkt, der in Bezug auf das Entwicklungspotential von IAV-Fusionsinhibitoren eine Schwierigkeit darstellt, ist die Gruppenspezifität. Wie die IAV-HA-Inhibitoren verwandter Studien (White et al., 2015) (Lai et al., 2015), zeigten auch die GRP-Verbindungen eine gruppenspezifische Wirksamkeit gegen HAs der Gruppe 1. Auch hier erweist sich, dass die hohe genetische Variabilität des HA-Proteins die Entwicklung von HA-Inhibitoren erschwert. Außer den H1N1 Viren sind auch die Viren des H3N2 Subtyps, die ein HA der Gruppe 2 tragen, von besonderer klinischer Wichtigkeit. Da diese ebenfalls an den jährlichen Grippeausbrüchen beteiligt sind, werden sie auch in den tri- bzw. tetravalenten Impfstoffen berücksichtigt (Houser & Subbarao, 2015). Aus diesem Grund sollte ein Grippemedikament, das auf Fusionsinhibitoren basiert, auch gegen Gruppe 2 HAs wirksam sein. Da es unwahrscheinlich ist, dass strukturelle Modifikationen die Gruppenspezifität der HA-Inhibitoren überwinden könnten, läge ein möglicher Lösungsansatz in der Entwicklung eines Kombinationspräparats aus zwei ähnlich potenten HA-Inhibitoren, von denen der eine HAs der Gruppe 1 und der andere HAs der Gruppe 2 inhibiert. Für die Entdeckung eines ähnlich potenten Gruppe 2-HA-Inhibitors könnte ein entsprechendes H3N2-NanoLuc Reportervirus der dritten Generation zur Anwendung kommen, dessen Replikation im antiviralen Assay leicht quantifizierbar ist und das einen multizyklischen Infektionsverlauf erlauben würde, analog zum WSN-NanoLuc Reportervirus, das in dieser Studie verwendet wurde.

Unter Berücksichtigung der eben beschriebenen Problematik bei der Entwicklung von HA-Inhibitoren, wäre der virale Polymerase-Komplex ein mögliches, vielversprechendes Ziel für niedermolekulare Inhibitoren, denn den Proteinen des IAV-Polymerase-Komplexes (PB1, PB2 und PA) konnte eine sehr geringe Mutationstoleranz nachgewiesen werden (Heaton, Sachs, et al., 2013). Allerdings sind die Ergebnisse unserer Studie und die ähnlicher Arbeiten (White et al., 2015) (Lai et al., 2015) so zu bewerten, dass der IAV-Polymerase-Komplex für niedermolekulare Inhibitoren schwerer zugänglich ist als die Transmembranproteine. Zumindest in einem Phänotyp-basierten Ansatz. Ein alternativer Ansatz wäre es einen Zielstruktur-basierten Assay zu entwickeln, in dem die Enzymaktivität des Polymerasekomplexes *ex vivo* quantifiziert werden kann. Dieser Assay könnte dann dazu verwendet werden, niedermolekulare Verbindungen auf ihre Polymerase-Komplex-hemmende Aktivität zu testen. Die Implementierung eines solchen *ex vivo* Assays (Swale et al., 2016) ist eine große Herausforderung, zum einen da mehrere Proteine in ihrer nativen und funktionsfähigen Form isoliert werden müssen und zum anderen muss eine replizierbare Quantifizierung der Polymeraseaktivität etabliert werden. Ein weiterer Ansatz bestünde darin kritische und subtypübergreifend konservierte Domänen innerhalb des Polymerase-Komplexes (Stubbs & Te Velthuis, 2014) oder anderer viraler Proteine als Zielstruktur in einem strukturbasierten Ansatz zur Entdeckung neuer, gruppenunspezifischer IAV-Inhibitoren zu verwenden. Natürlich hätten beide Assays die typischen Nachteile eines Zielstruktur-basierten Ansatzes (TDD), die in Kapitel 1.2 angesprochen wurden. Seit Oktober 2018 ist in den USA Baloxavir marboxil als Grippemedikament zugelassen. Dieses Medikament hemmt das PA-Protein, das Teil des heterotrimeren Polymerasekomplexes ist (Hayden et al., 2018). Allerdings wurde auch bei diesem Wirkmechanismus das rasche Aufkommen von Resistenzmutationen beschrieben (Omoto et al., 2018) (Takashita et al., 2019). Zwar konnten diese Studien noch keine Aussage darüber treffen, ob die Resistenzmutanten eine beeinträchtigte virale Fitness aufweisen oder nicht, sollte dies nicht der Fall sein, werden sich entsprechende Virusmutanten

innerhalb der zirkulierenden Population ausbreiten und zu einem Wirkverlust dieses Medikaments führen.

Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse wäre der wahrscheinlich erfolgversprechendste chemotherapeutische Ansatz die Anwendung eines Kombinationspräparats bestehend aus zwei potenten HA-Inhibitoren und einem subtypübergreifend wirksamen Polymerase-Inhibitor. Eine ähnliche Strategie wird seit einiger Zeit erfolgreich bei der Behandlung von HIV-Infektionen angewandt (HAART) (Brechtel, Breitbart, Galietta, Krivo, & Rosenfeld, 2001). Um dieser Wirkstoffkombination zu entgehen, müsste das Virus in zwei Proteinen Resistenzmutationen ausbilden. Einerseits ist die Wahrscheinlichkeit für das Aufkommen eines solchen Resistenzmusters geringer als für die Resistenzentwicklung gegen einen einzigen Wirkstoff, zum anderen wäre es vorstellbar, dass die Kombination aus einer Mutation im Polymerase-Komplex und einer Mutation im HA-Protein zu einer Attenuierung des Virus führen und/oder dessen Übertragbarkeit beeinflussen könnte.

Um den therapeutischen Wert, der in dieser Studie vorgestellten Fusionsinhibitoren, besser einschätzen zu können, sollte untersucht werden, welche Auswirkungen die eingeführten Resistenzmutationen auf das Virus haben. Im Rahmen dieser Studie wurden etwaige zellkulturbasierten Experimente bereits durchgeführt. Aus denen ging hervor, dass der Basenaustausch an Position 110 keinen messbaren Einfluss auf die Replikationskinetik der Virusmutante hatte, während die Mutationen K58Q und M59I, in der B-Schleife von HA2, die zu einer verminderten Bindungsaffinität der GRP-Verbindungen führte zu einer eingeschränkten Replikationskinetik und einem erniedrigten finalen Virustiter nach 24 Stunden führte. Außerdem ergaben unsere Ergebnisse, dass die Entfernung des am proximalsten zur Virusmembran gelegenen N-Glykans durch die Mutationen T156A und N154S keinen Einfluss auf die Replikationsdynamik hatte. Aufgrund der Konserviertheit dieser Zuckermodifikation in zirkulierenden Stämmen, wäre es jedoch überraschend, wenn das Fehlen dieses N-Glykans keinen Nachteil für das Virus

bedeuten würde. Entsprechend sollten die Virusmutanten in einem Tiermodell auf ihre Fitness, ihre Pathogenität und ihre Übertragbarkeit getestet werden.

Um die sehr guten Ausgangspotenzen, die günstigen Zytotoxizitätsprofile und die chemische Modifizierbarkeit der GRP-Verbindungen auszunutzen und weiter zu entwickeln, sollten die Struktur-Aktivitätsstudien, die für GRP-71271 begonnen wurden, weiter vorangetrieben werden. Zusätzlich sollten Kenntnisse über mögliche Metabolisierungswege durch das P450-System der Leber gewonnen und diese in der synthetisch, chemischen Modifizierung berücksichtigt werden. Ebenso wie die Erkenntnisse über die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parameter der GRP-Verbindungen, die es noch zu gewinnen gilt.

Im Rahmen der pharmakologischen Evaluierung sollte die antivirale Wirkung im Tiermodell untersucht werden und mögliche Resistenzmutanten und deren Resistenzmechanismen mit den Mechanismen verglichen werden, die aus den zellkulturbasierten Adaptationsexperimenten hervorgingen.

Zusammenfassend können die Ergebnisse dieser Studie als vielversprechender Ausgangspunkt zur Entwicklung neuer, potenter Grippemedikamente angesehen werden.

Die Analyse und Charakterisierung der RSV-spezifischen Verbindungen waren nicht Teil dieser Arbeit und sind patentrechtlich geschützt.

5 Materialien und Methoden

Zelllinien und Transfektionen

Humane Bronchialepithelzellen (BEAS-2B; ATCC CRL-9609), humane embryonale Nierenzellen (293T; ATCC CRL-3216), Madin-Darby Hundenieren Zellen (MDCK; ATCC CCL-34), Baby Hamster Nierenzellen (BHK-21; ATCC CCL-10) die die T7-Polymerase exprimieren (BSR T7/5) und Nierenepithelzellen der westlichen Grünmeerkatze (Vero; ATCC CCL1-82) wurden bei 37°C und 5% CO₂ in Dulbeco's modified Eagle's Medium (DMEM) angereichert mit 7,5% fetalem Kälberserum (FBS) inkubiert. Gesammelte mononukleäre Zellen des peripheren menschlichen Bluts (PBMCs) wurden bei 37°C und 5% CO₂ in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium angereichert mit 10% FBS, 2 mM Glutamin, 1% nicht essentiellen Aminosäuren und 1% Natriumpyruvat. Genejuice (Invitrogen) wurde für alle transienten Transfektionen verwendet.

Viren

Influenza-A/WSN/1933 (WSN) (H1N1), Influenza-A/Panama/2007/99 (H3N2), Influenza-A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), Influenza-A/Wyoming/03/2003 (H3N2) und Influenza-A/Aichi/2/1968 (H3N2)-Viren wurden für zwei Tage bei 37°C in MDCK-Zellen vermehrt. Influenza-A/Mallard/Potsdam/83 (H2N2)-Virus wurde in zehn Tage alten embryonierten Hühnereiern für zwei Tage bei 37°C vermehrt. Die Titer der Influenza-Viren wurden mittels Standard Plaque-Assay bestimmt. Das Masernvirus wurde in Vero Zellen für zwei Tage bei 37°C vermehrt und der Titer durch die Bestimmung der mittleren infektiösen Dosis in Zellkultur (TCID₅₀) in Vero-Zellen ermittelt. Respiratorisches Synzytial Virus (RSV) wurde in HEp-2-Zellen vermehrt und mittels TCID₅₀ in Vero-Zellen titriert. Sindbis Virus und Vesicular stomatitis Virus (VSV) wurden in Vero-Zellen vermehrt und mittels TCID₅₀ in Vero-Zellen titriert. Vaccinia Virus wurde in Vero-Zellen vermehrt in mittels Plaque-Assay titriert.

Reinigung der Viren

Tochervirionen wurden entweder aus dem Zellüberstand (IAV) oder durch einmaliges Einfrieren und Auftauen aus den Wirtszellen gewonnen (RSV) und gesammelt. Anschließend wurden die Viren bei 4000 rpm für 20 min bei 4°C von Zellresten abgetrennt. Die Virionen wurden in DMEM aufgenommen und mittels eines 20%-60% Succrose-Gradienten in TNE-Puffer (1 mM Tris [pH 7,2], 100 mM NaCl, 10 mM EDTA)(30.000 rpm für 120 min bei 4°C) aufgereinigt und aus der Grenzfläche des Gradienten gesammelt. Die gereinigten Viren wurden bei -80°C gelagert.

Bildung des rIAV/09-NanoLuc und Gewinnung der rekombinanten IAV-Stämme

Der rekombinante IAV-(rIAV)-Reporterstamm IAV-NL/09-NanoLuc (H1N1) wurde unter Verwendung eines Acht-Plasmid-Influenzavirus-Rescuesystems gewonnen (E. Hoffmann, Neumann, Kawaoka, Hobom, & Webster, 2000). Das rIAV-NL/09-NanoLuc, dessen Luciferase-Reporter im PA-Segment beherbergt ist, wurde entsprechend der bekannten Strategie (Heaton, Leyva-Grado, et al., 2013) gebildet. Eine Genkassette bestehend aus einem inaktivierten 3'-PA-Verpackungssignal, einem offenen Leserahmen der Nano-Luciferase, einer Endoplasmatischen Retikulum Retentionssequenz (KDEL) und einer Kopie des originalen PA-Verpackungssignals, flankiert von einem AseI und ApaI Restriktionssignal, wurden von GeneWiz synthetisiert und in das PA-Plasmid geklont. Um die rekombinanten IAV-NL und IAV-WSN zu gewinnen, wurden 293T-Zellen mit allen acht Plasmiden transfiziert, mit Tosylsulfonyl-Phenylalanin chloromethylketon (TPCK) angereichertem Trypsin behandelt und nach 24 h Inkubationszeit bei 37°C auf MDCK-Zellen gegeben. Die entstandenen rekombinanten IAV-Stämme wurden auf MDCK-Zellen vermehrt und die Titer der Tochervirionen mittels Nano-Luciferase oder Plaque-Assay bestimmt.

Verbindungen

Das Screening-Set an Molekülen wurde aus kommerziellen (Chembridge [100.000 Verbindungen] und ChemDiv [30.000 Verbindungen], beide Bibliotheken wurden von Verbindungen, die eine ungewünschte Reaktivität aufweisen befreit) und proprietären (Emory Institute for Drug Development, EIDD [1,155 Verbindungen] und Kansas University [11.520 Verbindungen]) Molekülbibliotheken zusammengestellt. Jede Verbindung wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) zu einer Konzentration von 10 μ M gelöst und bei –80°C gelagert. Das MScreen-Software-Paket (Jacob et al., 2012) wurde zur digitalen Organisation der Verbindungen, HTS-Datenspeicherung und -Datenanalyse genutzt. Zur Produktion eines Screening Sets wurden alle Verbindungen in MScreen hinterlegt und in 384-Well Tochterplatten unter der Zuhilfenahme des Nimbus96-Liquid-Handlers (Hamilton-Robotics) übertragen. Die beiden randständigen Spalten auf jeder Platte (32-Kavitäten pro Platte) wurden in einem Schachbrettmuster mit positiven und negativen (DMSO) Kontrollen befüllt.

Automatisiertes HTS-Protokoll in 384-Well Mikrotiterplatten

BEAS-2B-Zellen (8×10^3 Zellen/Well) wurden in mit Barcodes versehene 384-Well Platten mit weißen Wänden und transparentem Boden unter Benutzung des automatischen MultiFlo-Dispensers (BioTek) gegeben, am Boden gesammelt (150 x g für 90 s bei 25°C) und bei 37°C und 5% CO₂ für fünf Stunden inkubiert. Die jeweilige Verbindung wurde mit einer finalen Konzentration von 5 μ M (20 nL/Well) unter Verwendung eines High-Density Pin Tools (V&P Scientific), das an den Pipettionskopf des Nimbus-Liquid-Handlers angebracht war, zugegeben mit anschließender Co-Infektion mit rRSV A2-L19F_{D489E}-fireSMASH (Multiplizität der Infektion [MOI] = 0,1) und rIAV-NanoLuc (MOI = 0,02) durch Zugabe von 10 μ L/Well unter Verwendung des MultiFlo-Dispensers. Anschließend wurde die gesamte Platte zentrifugiert (150 x g für 90 s bei 25°C) und für 40 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die finale

Konzentration des Lösungsmittels (DMSO) war 0,05%. Die Barcodes der Testplatte und der Assay-Platte wurden bei der Übertragung der Verbindungen von der Nimbus-Einheit automatisch erfasst und gespeichert. Unter Verwendung eines H1-Synergy-Platereaders mit integriertem Barcodelesegerät wurden die Assayplatten automatisch in das Platereader-System geladen, mit Nano-Glo-Substrat (10 μ M/Well) vermengt und die resultierende Biolumineszenz nach drei Minuten Einwirkzeit für jedes Well detektiert. Die Daten wurden automatisch zusammen mit den Barcodes der Platten gespeichert.

Datennormalisierung und Analyse

Das MScreen-Datenpaket wurde zur automatisierten Datenanalyse verwendet. Die Rohdaten, die vom Platereader zusammen mit der jeweiligen vom Nimbus-System erstellten Verbindungsplatte-Assayplatten-Beziehung erstellt wurden, wurden in das MScreen-Paket importiert. Die normalisierten Werte der relativen Inhibition wurden für jede Verbindung durch die Subtraktion der Werte vom Durchschnittswert der Kontrollen auf der entsprechenden Platte, gefolgt von der Division des erhaltenen Wertes durch die Differenz zwischen den Mittelwerten der positiven und negativen Kontrolle erhalten. Robuste Z-Scores wurden folgendermaßen berechnet: $Z\text{-Score} = [S_i - \text{Median}(S_{\text{all}})]/\text{MAD}(S_{\text{all}})$ und $\text{MAD}(S_{\text{all}}) = 1,4826 \times \text{Median} [|S_i - \text{Median}(S_{\text{all}})|]$, wobei S_i den Wert einer bestimmten Verbindung und S_{all} die Werte aller Verbindungen auf einer bestimmten Platte repräsentiert. Als Hit-Kandidaten wurden Verbindungen definiert, die eine Inhibition der normalisierten Signalintensität gegen ein Virus oder beide Viren von $\geq 75\%$ und einen robusten Z-Score von $\geq 3,5$ erreichten. Die SciFinder-Datenbank (American Chemical Society) wurde für die Analyse der chemischen Struktur der Hit-Kandidaten auf bereits bekannte Bioaktivitäten verwendet.

Dosis-Wirkung-Counterscreen

Eine dreifache Verdünnungsreihe der ausgewählten Hit-Kandidaten wurde in drei Wiederholungen pro Verbindung in 384-Well Platten unter Zuhilfenahme des Nimbus-Liquid-Handlers erstellt. BEAS-2B-Zellen (8×10^3 Zellen/Well) wurden wie oben beschrieben ausgesät, die Verdünnungsreihen wurden durch das Pin-Tool auf die Assay-Platten übertragen und die Zellen anschließend entweder mit rRSV-L19F_{D489E}-fireSMASh (MOI = 0,1) und IAV-WSN-NanoLuc (MOI = 0,02) infiziert oder wurden nicht infiziert, um deren Lebensfähigkeit in Gegenwart der Verbindungen zu untersuchen. Reportersignale wurden wie oben beschrieben erhalten und gespeichert. Um die Vitalität der Zellen in Gegenwart der Verbindungen zu ermitteln, wurde PrestoBlue Substrat (Life Technologies) nach 40 Stunden Inkubationszeit der Zellen bei 37°C (5 µL/Well) zugegeben und nach 45 Minuten Inkubationszeit wurde die Top-Read Fluoreszenz (Exzitation bei 560 nm, Emission bei 590 nm und Instrument Gain von 85) unter Verwendung des H1-Synergy-Platereaders bestimmt. Rohdaten aller Dosis-Wirkung-Experimente wurde nach folgender Formel berechnet: % Inhibition = $(X_{\text{Probe}} - X_{\text{Min}})/(X_{\text{Max}} - X_{\text{Min}}) \times 100$. Dabei stellt X_{Min} den Durchschnitt der positiven Kontrollen und X_{Max} den Durchschnitt der negativen Kontrollen dar. Four-Parameter-Viable-Slope-Regressionsmodell wurde für die Berechnung der mittleren effektiven (EC₅₀) und der mittleren toxischen (TC₅₀) Konzentrationen angewandt.

Assay-Interferenz-Screen

Verdünnungsreihen der ausgewählten Hit-Kandidaten wurden gegen rVSV-NanoLuc (MOI = 0,02), das für diesen Counterscreen hergestellt wurde und gegen das früher Entwickelte rRSV-A2-renilla-Virus (Yan et al., 2013) (Hotard et al., 2012) getestet. Die Reportersignale wurden nach 24 Stunden (rVSV-NanoLuc) bzw. 48 Stunden (rRSV-A2-renilla) Inkubationszeit bei 37°C bestimmt.

Orthogonaler Counterscreen

BEAS-2B- oder MDCK-Zellen ($1,5 \times 10^5$ Zellen/Well) wurden in einer 12-well Platte ausgesät. Bei einer Bedeckung des Well Bodens mit 90% Zellen wurden diese in Anwesenheit der zu testenden Verbindung mit IAV-WSN (MOI = 0,02) infiziert. Für manche Viren war das Medium mit $1,0 \mu\text{g/mL}$ TPCK-Trypsin angereichert. Nach 36 bis 48 Stunden nach der Infektion wurde der Zellüberstand gesammelt und die viralen Titer mittels Plaque-Assay bestimmt.

Zytotoxizitäts-Assay

MDCK-Zellen ($1,2 \times 10^4$ Zellen/Well), BSR T7/5-Zellen ($1,0 \times 10^4$ Zellen/Well), HEp2-Zellen ($1,0 \times 10^0$ Zellen/Well), BEAS-2B-Zellen ($1,0 \times 10^4$ Zellen/Well) und Vero-Zellen ($1,0 \times 10^4$ Zellen/Well) oder stimulierte menschliche PBMCs wurden in eine 96-Well Platte ausgesät. Zur Stimulation wurden die PBMCs in RPMI Medium mit 100 ng/mL Phorbol-Myrisatetat (PMA) und $1 \mu\text{g/mL}$ Ionomycin für sechs Stunden bei 37°C vor dem Aussäen in die Mikrotiterplatten und der Zugabe der Verbindungen inkubiert. Sechzehn Wells erhielten positive (Cycloheximid) und negative (DMSO) Kontrollen. Die Testverbindungen wurden in den übrigen Wells in drei Wiederholungen und Verdünnungsreihen mit Konzentrationen zwischen $20,0$ und $0,009 \mu\text{M}$ gegeben. Um die Vitalität der Zellen zu bestimmen, wurden $10 \mu\text{L/Well}$ PrestoBlue-Substrat (Life Technology) nach 72 Stunden Inkubationszeit bei 37°C zugegeben und nach zwei weiteren Stunden Inkubationszeit bei 37°C wurden die Fluoreszenzwerte (Exzitation bei 560 nm , Emission bei 590 nm und Instrument Gain von 85) mit dem H1-Synergy-Platereader bestimmt.

Statistische Analyse

Für die Analyse der Daten wurden die Softwarepakete Excel und Prism 6 (GraphPad) verwendet. Die effektiven Konzentrationen 50% (EC_{50}) und 90% (EC_{90}) wurden mittels Four-Parameter-Variable-Slope-Regression-Modell berechnet. Die statistische Signifikanz zwischen zwei Werten oder Wertgruppen

wurde durch Two-Way-Analyse der Varianz (ANOVA; Prism 6) in Kombination mit Sidak's Multi-Comparison-Posttest bestimmt, wie in den Legenden zu den Grafiken angegeben. Experimentelle Abweichungen wurden durch Fehlerbalken, die die Standardabweichung (SD) repräsentieren dargestellt.

Hämolyse Assay

Frische Hühnererythrozyten (rote Blutzellen [RBCs]) wurden dreimal mit Phosphat gepuffertem Salin (PBS) gewaschen und resuspendiert, um eine 2%ige (Volumen %) Suspension in PBS zu erhalten. Die Suspension wurde bei 4°C gehalten. Ein Viruskonzentrat wurde mit dem gleichen Volumen einer 2%igen RBC-Suspension in PBS vermischt. Nach einer Inkubationszeit der RBC-Virus-Mischung auf Eis für 30 Minuten wurden die Testverbindungen oder Kontrollen (DMSO oder JMN3-003) zugegeben. Anschließend wurde die Mischung nach weiteren zehn Minuten Inkubationszeit auf Eis zentrifugiert (3.500 rpm für fünf Minuten), der Überstand verworfen und die Zellen plus den gebundenen Virionen in 200 µL PBS, dessen pH-Wert auf 5,1 eingestellt wurde, und entweder Testverbindung oder Kontrolle (DMSO oder JMN3-003) enthielt, resuspendiert. Um die Hämolyse der Hühnererythrozyten zu provozieren, wurde die Mischung für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Um intakte Erythrozyten zu entfernen, wurden die Proben zentrifugiert (3.500 rpm für fünf Minuten) und 100 µL des Überstands wurden in eine 96-Well Mikrotiterplatte mit flachem Boden überführt und die Absorption bei 410 nm mit dem H1-Synergy-Platereader gemessen.

IAV-Minigenom-Assay

Für den IAV-Minigenom-(Minireplikon)-Reporter-Assay wurden 293T-Zellen mit 1,0 µg WSN-Firefly-Luciferase-Reporterplasmid und 0,5 µg PB1, PB2, NP und PA-Expressionsplasmiden transfiziert. Drei Stunden nach der Transfektion wurden die Verbindungen oder Kontrollen (DMSO oder JMN3-003) zugegeben

und bei 37°C für 30 Stunden inkubiert. Nach der angegebenen Inkubationszeit wurde das Luciferase-Signal gemessen.

Induktion viraler Resistenz

Zellen wurden mit IAV-WSN-NanoLuc (MOI = 0,02) in Gegenwart der Verbindung mit einer Konzentration, die das zehnfache der EC₅₀ entspricht, infiziert. Die virale Vermehrung wurde durch Bestimmung des Luciferase-Reporter-Signals verfolgt. Die Konzentrationen der Verbindungen wurden schrittweise erhöht bis zu einem Maximum von ca. 20 µM in Abhängigkeit einer robusten viralen Replikation. Hatte das Virus eine Replikationsrate in der Gegenwart des Virus erreicht, die der DMSO-Kontrolle entsprach, wurde das Virus in größerem Maßstab in Gegenwart von 5 µM der jeweiligen Verbindung vermehrt und die cDNA-Kopien des HA-Segments, die aus der extrahierten, viralen RNA gewonnen wurden, wurden einer Sequenzanalyse unterzogen. Um die Resistenz zu bestätigen, wurden die erhaltenen Mutationen mittels Site-directed Mutagenesis, unter Verwendung des QuickChange-Protokolls (Stratagene), in das das IAV-WSN-HA-Segment Genomplasmid eingeführt. Anschließend wurde das entsprechende, replikationsfähige Virus erschaffen. Nach der Vermehrung und Reinigung des Virus mittels Succrose-Gradientenultrazentrifugation wurde die Resistenz durch Dosis-Wirkung-Experimente in einem 96-Well Format in einem Konzentrationsbereich von 8,0 – 0,06 µM und anschließender Berechnung der EC₅₀-Werte bestätigt.

Oberflächen-Biotinylierung und Streptavidin-Bindung

BSR T7/5-Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid, das für IAV-WSN-HA codiert, transfiziert. Nach 36 Stunden bei 37°C wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 20 Minuten auf Eis biotinyliert. Durch Zugabe von DMEM, angereichert mit 10% FBS, wurde die Biotinylierungsreaktion beendet. Anschließend wurden die Zellen für 15 Minuten bei 4°C mit RIPA-Puffer behandelt und die lysierten Zellen zentrifugiert (14.000 rpm für 30 Minuten bei

4°C). Der Überstand wurde mit gewaschenen Streptavidin-Perlen vermischt und für zwei Stunden bei 4°C inkubiert. Nachdem die Perlen gewaschen wurden, wurden die biotinylierten Proteine durch Inkubation für 25 Minuten bei 50°C mit Urea-Dithiothieol (Urea-DTT) von den Perlen gelöst. Entsprechende ausgefällte und biotinylierte Proteine wurden einer Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F) vermittelte Deglykosylierung unterzogen, bevor sie durch Gel-Fraktionierung aufgetrennt wurden. Die Proben wurden in 1 × Glykoprotein-Puffer 1 (New England BioLabs) für 20 Minuten bei 55°C denaturiert und anschließend mit PNGase F in 1 × Glykoprotein Puffer 2 und NP-40 für 40 Minuten bei 37°C behandelt.

Gelfraktionierung und Immunodetektion

Proteinproben wurden mittels SDS-Page unter Verwendung eines 10% Tris-Glycin-Gels fraktioniert. Die fraktionierten Proteine wurden auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran transferiert und mit 5% Milch (nonfat) in PBS mit Tween (PBST) beschichtet und anschließend mit anti-IAV-HA (H1N1)-Antiserum (GTX127357; GeneTex) für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur behandelt mit darauffolgender Markierung mit anti-TfR-Antikörper (ab84036; Abcam) für 1,5 Stunden behandelt. Die beschichteten Membranen wurden dann mit Horseradish-Peroxidase (HRP)-konjugiertem Antiserum behandelt und mittels Chemolumineszenz unter Verwendung der Bio-Rad ChemiDoc-Imagingeinheit ausgewertet.

In-silico-Docking

Dockingexperimente wurden mit MOE 2015.1001 unter Verwendung des Amber10 Kraftfeldes durchgeführt. The A/PR/8/34 (H1N1) (RCSB Protein-Database Eintrag 1RU7) und A/chicken/Potsdam/4705/1984 (H2N2) (RCSB Protein-Database Eintrag 2WRF) Virus HA Kristallstruktur wurden für die Dockingexperimente verwendet. Die Strukturmodelle wurden in das MOE Paket (Version 2015.1001) geladen, um für die Dockingexperimente vorbereitet zu

werden. Nach Protonierung und Berechnung des niedrigsten Energiezustands wurde ein Induced-fit-Modell, für das in-silico-Docking der Fusionsinhibitoren in die IAV-HA-Struktur verwendet. Jedes Atom wurde dabei als ein möglicher Interaktionspartner angesehen. Nachdem die Docking-Berechnungen abgeschlossen waren, wurden die Ergebnisse analysiert, um die wahrscheinlichste Bindungstasche zu evaluieren.

Expression und Reinigung des löslichen HA-Proteins

Ein DNA-Fragment, das für die Ektodomäne des HA-Proteins (Aminosäuren 412 bis 529) codiert, wurde an eine C-terminale BirA-Biotinylierungssequenz (GLNDIFEAQKIEWHE, Avitag), eine Foldon-Trimerisierungs-Domäne und einen His-Tag gekoppelt. Eine Thrombin-Spaltstelle wurde zwischen den Avi-Tag und die Foldon-Domäne eingefügt. Diese Sequenz wurde dann in ein pCDNA-HA-Helfer-Plasmid, das für die Aminosäuren 1 bis 411 des IAV-HA-Proteins codiert eingefügt. Das gesamte, lösliche HA-Konstrukt wurde dann in ein pCMV-ER/myc-Vektor so geklont, dass das N-terminale Signalpeptid mit im Leserahmen enthalten war. Das rekombinante, lösliche HA-Protein wurde in 293T-Zellen, die transient mit dem pCMV-ER/myc-Vektor transfiziert wurden, exprimiert. Als Transfektionsreagenz wurde GeneJuice verwendet. Das Medium wurde 12 Stunden nach der Transfektion durch serumfreies DMEM ersetzt. 48 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gesammelt und mit Tris, pH 8,0 gepuffert. Das HA-enthaltende Medium wurde über eine mit Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) Harz gepackte Säule geleitet. Das Harz wurde anschließend mit einem Puffer aus 20 mM Tris, pH 8,0, 250 mM NaCl und 5 mM Imidazol gewaschen und anschließend wiederum mit Tris-Puffer, der 20 mM Imidazol enthielt, gewaschen. Thrombin (8 U/100 µg HA) wurde verwendet, um HA vom Harz zu lösen. Fraktionen, die das gereinigte, lösliche HA-Protein enthielten, wurden gesammelt und auf 5 mg/mL konzentriert. Nach der Reinigung wurden die löslichen HA-Proteine durch die Zugabe von 25 µg BirA-Enzym/mg Gesamtprotein entsprechend des Standardprotokolls biotinyliert

(Avidity). Biotinylierte HA-Proteine wurde mittels Gel-Permeations-Chromatographie (Superdex 200; GE Healthcare) gereinigt und auf ca. 5 mg/mL konzentriert.

Bio-Layer Interferometrie (BLI)

Die Bindungs-Assays am löslichen IAV-WSN-HA-Konstrukt wurden mittels Bio-Layer-Interferometrie unter Verwendung des Octet-Red-96-Systems (Fortebio) durchgeführt. Das gereinigte und biotinylierte HA-Protein wurde an Super-Streptavidin (SSA) beschichtete Biosensoren (Fortebio) in PBS gebunden. Die mit HA beladenen Sensoren wurden in Lösungen mit ansteigenden Konzentrationen an Fusionsinhibitoren in PBS mit 0,1% DMSO getaucht. Die Dissoziationsraten wurden bestimmt, indem die HA-beladenen SSA-Sensoren in PBS ohne Verbindung getaucht wurden. Unspezifische Bindung wurde durch SSA-Referenzsensoren, die biotinylierte anti-FLAG Antikörper (M2; Sigma) gebunden hatten, adressiert. Die Echtzeit-Bindungskinetik der verschiedenen Verbindungen an HA wurde mithilfe des Octet-Red-Softwarepakets analysiert und berechnet. Dafür wurden ein Konzentrationsbereich zwischen 50 nM und 25,6 μ M verwendet, um die Bindung der niedermolekularen Verbindungen zu analysieren. Die Assoziation der Verbindungen (k_{on}) wurde gemessen durch das Eintauchen der HA-gebundenen SSA-Sensoren in acht oder neun verschiedene Konzentrationen an Fusionsinhibitor für 80 bis 120 Sekunden in Kinetikpuffer. Die Dissoziation (k_{off}) der niedermolekularen Verbindungen wurde für 120 bis 180 Sekunden in Kinetikpuffer gemessen. Die Experimente wurden bei 30°C unter ständiger Durchmischung (1.000 rpm) durchgeführt. Das Verhältnis aus k_{off} zu k_{on} wurde für die Bestimmung des Dissoziationskonstante im Gleichgewichtszustand (K_D) herangezogen.

Virale Wachstumskurven in Zellkulturen

BEAS-2B-Zellen wurden mit der entsprechenden IAV-WSN-NanoLuc-Mutante oder dem Standard WSN-Virus (MOI = 0,02) infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion wurde die virale Replikation durch die Nano-Luciferase-Aktivität bestimmt. Für jede Mutante bzw. Standard-WSN wurden die bestimmten Relativen Lichteinheiten (Relative Light Units, RLUs) zum Zeitpunkt $t = 0$ von den RLU-Werten der nachfolgenden Zeitpunkte abgezogen und alle Aktivitätszahlen wurden relativ zum maximalen Signal des Standard IAV-WSN-NanoLuc ausgedrückt.

Zell-basierter Fusionsassay

BSR T7/5-Zellen wurden mit 1,5 μg eines DNA Expressionsplasmids, das für das entsprechende HA-Protein kodiert und 0,15 μg eines DNA-Plasmids, das die Information zur Expression des Enhanced-Green-Fluoreszierenden-Proteins (EGFP) enthält, transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPCK-angereichertem Trypsin für 15 Minuten und anschließend in PBS, dessen pH-Wert an die angegebenen Werte angeglichen wurde, für fünf Minuten bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit DMEM, das mit 10% FBS angereichert war, neutralisiert und die Bildung von Synzytien wurde mithilfe des Mikroskops nach 60 Minuten bei 37°C verfolgt.

6 Referenzen

- Amorij, J. P., Huckriede, A., Wilschut, J., Frijlink, H. W., & Hinrichs, W. L. (2008). Development of stable influenza vaccine powder formulations: challenges and possibilities. *Pharm Res*, *25*(6), 1256-1273. doi:10.1007/s11095-008-9559-6
- Anderson, L. J., Parker, R. A., & Strikas, R. L. (1990). Association between respiratory syncytial virus outbreaks and lower respiratory tract deaths of infants and young children. *J Infect Dis*, *161*(4), 640-646.
- Andries, K., Moeremans, M., Gevers, T., Willebrords, R., Sommen, C., Lacrampe, J., . . . Wyde, P. R. (2003). Substituted benzimidazoles with nanomolar activity against respiratory syncytial virus. *Antiviral Res*, *60*(3), 209-219.
- Appleyard, G., & Maber, H. B. (1974). Plaque formation by influenza viruses in the presence of trypsin. *J Gen Virol*, *25*(3), 351-357. doi:10.1099/0022-1317-25-3-351
- Arrowsmith, J. (2011a). Trial watch: Phase II failures: 2008-2010. *Nat Rev Drug Discov*, *10*(5), 328-329. doi:10.1038/nrd3439
- Arrowsmith, J. (2011b). Trial watch: phase III and submission failures: 2007-2010. *Nat Rev Drug Discov*, *10*(2), 87. doi:10.1038/nrd3375
- Basu, A., Antanasijevic, A., Wang, M., Li, B., Mills, D. M., Ames, J. A., . . . Bowlin, T. L. (2014). New small molecule entry inhibitors targeting

- hemagglutinin-mediated influenza a virus fusion. *J Virol*, 88(3), 1447-1460. doi:10.1128/JVI.01225-13
- Battles, M. B., Langedijk, J. P., Furmanova-Hollenstein, P., Chaiwatpongsakorn, S., Costello, H. M., Kwanten, L., . . . McLellan, J. S. (2016). Molecular mechanism of respiratory syncytial virus fusion inhibitors. *Nat Chem Biol*, 12(2), 87-93. doi:10.1038/nchembio.1982
- Baum, L. G., & Paulson, J. C. (1990). Sialyloligosaccharides of the respiratory epithelium in the selection of human influenza virus receptor specificity. *Acta Histochem Suppl*, 40, 35-38.
- Baum, L. G., & Paulson, J. C. (1991). The N2 neuraminidase of human influenza virus has acquired a substrate specificity complementary to the hemagglutinin receptor specificity. *Virology*, 180(1), 10-15.
- Beckett, D., Kovaleva, E., & Schatz, P. J. (1999). A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Sci*, 8(4), 921-929. doi:10.1110/ps.8.4.921
- Beigel, J., & Bray, M. (2008). Current and future antiviral therapy of severe seasonal and avian influenza. *Antiviral Res*, 78(1), 91-102. doi:10.1016/j.antiviral.2008.01.003
- Belser, J. A., Lu, X., Szretter, K. J., Jin, X., Aschenbrenner, L. M., Lee, A., . . . Katz, J. M. (2007). DAS181, a novel sialidase fusion protein, protects mice from lethal avian influenza H5N1 virus infection. *J Infect Dis*, 196(10), 1493-1499. doi:10.1086/522609

- Beyleveld, G., White, K. M., Ayllon, J., & Shaw, M. L. (2013). New-generation screening assays for the detection of anti-influenza compounds targeting viral and host functions. *Antiviral Res*, *100*(1), 120-132. doi:10.1016/j.antiviral.2013.07.018
- Bjornson, C. L., & Johnson, D. W. (2008). Croup. *Lancet*, *371*(9609), 329-339. doi:10.1016/S0140-6736(08)60170-1
- Blick, T. J., Sahasrabudhe, A., McDonald, M., Owens, I. J., Morley, P. J., Fenton, R. J., & McKimm-Breschkin, J. L. (1998). The interaction of neuraminidase and hemagglutinin mutations in influenza virus in resistance to 4-guanidino-Neu5Ac2en. *Virology*, *246*(1), 95-103. doi:10.1006/viro.1998.9194
- Bodian, D. L., Yamasaki, R. B., Buswell, R. L., Stearns, J. F., White, J. M., & Kuntz, I. D. (1993). Inhibition of the fusion-inducing conformational change of influenza hemagglutinin by benzoquinones and hydroquinones. *Biochemistry*, *32*(12), 2967-2978.
- Bosch, F. X., Garten, W., Klenk, H. D., & Rott, R. (1981). Proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinins: primary structure of the connecting peptide between HA1 and HA2 determines proteolytic cleavability and pathogenicity of Avian influenza viruses. *Virology*, *113*(2), 725-735.
- Bottcher, C., Ludwig, K., Herrmann, A., van Heel, M., & Stark, H. (1999). Structure of influenza haemagglutinin at neutral and at fusogenic pH by electron cryo-microscopy. *FEBS Lett*, *463*(3), 255-259.

- Bottcher, E., Matrosovich, T., Beyerle, M., Klenk, H. D., Garten, W., & Matrosovich, M. (2006). Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *J Virol*, *80*(19), 9896-9898. doi:10.1128/JVI.01118-06
- Bottini, A., De, S. K., Baaten, B. J., Wu, B., Barile, E., Soonthornvacharin, S., . . . Pellecchia, M. (2012). Identification of small molecules that interfere with H1N1 influenza A viral replication. *ChemMedChem*, *7*(12), 2227-2235. doi:10.1002/cmdc.201200453
- Brechtel, J. R., Breitbart, W., Galietta, M., Krivo, S., & Rosenfeld, B. (2001). The use of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with advanced HIV infection: impact on medical, palliative care, and quality of life outcomes. *J Pain Symptom Manage*, *21*(1), 41-51.
- Bullough, P. A., Hughson, F. M., Skehel, J. J., & Wiley, D. C. (1994). Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature*, *371*(6492), 37-43. doi:10.1038/371037a0
- Cady, S. D., & Hong, M. (2008). Amantadine-induced conformational and dynamical changes of the influenza M2 transmembrane proton channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(5), 1483-1488. doi:10.1073/pnas.0711500105
- Cady, S. D., Schmidt-Rohr, K., Wang, J., Soto, C. S., Degrado, W. F., & Hong, M. (2010). Structure of the amantadine binding site of influenza M2 proton channels in lipid bilayers. *Nature*, *463*(7281), 689-692. doi:10.1038/nature08722

- Carr, J., Ives, J., Kelly, L., Lambkin, R., Oxford, J., Mendel, D., . . . Roberts, N. (2002). Influenza virus carrying neuraminidase with reduced sensitivity to oseltamivir carboxylate has altered properties in vitro and is compromised for infectivity and replicative ability in vivo. *Antiviral Res*, *54*(2), 79-88.
- Chamberlain, A. T., Wells, K., Seib, K., Kudis, A., Hannan, C., Orenstein, W. A., . . . Berkelman, R. L. (2012). Lessons learned from the 2007 to 2009 Haemophilus influenzae type B vaccine shortage: implications for future vaccine shortages and public health preparedness. *J Public Health Manag Pract*, *18*(3), E9-E16. doi:10.1097/PHH.0b013e31821dce27
- Chen, J., Lee, K. H., Steinhauer, D. A., Stevens, D. J., Skehel, J. J., & Wiley, D. C. (1998). Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation. *Cell*, *95*(3), 409-417.
- Chen, W., Calvo, P. A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., . . . Yewdell, J. W. (2001). A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med*, *7*(12), 1306-1312. doi:10.1038/nm1201-1306
- Chien, C. Y., Xu, Y., Xiao, R., Aramini, J. M., Sahasrabudhe, P. V., Krug, R. M., & Montelione, G. T. (2004). Biophysical characterization of the complex between double-stranded RNA and the N-terminal domain of the NS1 protein from influenza A virus: evidence for a

- novel RNA-binding mode. *Biochemistry*, 43(7), 1950-1962.
doi:10.1021/bi030176o
- Chou, Y. Y., Heaton, N. S., Gao, Q., Palese, P., Singer, R. H., & Lionnet, T. (2013). Colocalization of different influenza viral RNA segments in the cytoplasm before viral budding as shown by single-molecule sensitivity FISH analysis. *PLoS Pathog*, 9(5), e1003358.
doi:10.1371/journal.ppat.1003358
- Chung, H. K., Jacobs, C. L., Huo, Y., Yang, J., Krumm, S. A., Plemper, R. K., . . . Lin, M. Z. (2015). Tunable and reversible drug control of protein production via a self-excising degron. *Nat Chem Biol*, 11(9), 713-720. doi:10.1038/nchembio.1869
- Cianci, C., Yu, K. L., Combrink, K., Sin, N., Pearce, B., Wang, A., . . . Krystal, M. (2004). Orally active fusion inhibitor of respiratory syncytial virus. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(2), 413-422.
- Clouser, C. L., Holtz, C. M., Mullett, M., Crankshaw, D. L., Briggs, J. E., O'Sullivan, M. G., . . . Mansky, L. M. (2012). Activity of a novel combined antiretroviral therapy of gemcitabine and decitabine in a mouse model for HIV-1. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(4), 1942-1948. doi:10.1128/AAC.06161-11
- Conenello, G. M., Zamarin, D., Perrone, L. A., Tumpey, T., & Palese, P. (2007). A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathog*, 3(10), 1414-1421. doi:10.1371/journal.ppat.0030141

- Connor, R. J., Kawaoka, Y., Webster, R. G., & Paulson, J. C. (1994). Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology*, *205*(1), 17-23. doi:10.1006/viro.1994.1615
- Copeland, C. S., Doms, R. W., Bolzau, E. M., Webster, R. G., & Helenius, A. (1986). Assembly of influenza hemagglutinin trimers and its role in intracellular transport. *J Cell Biol*, *103*(4), 1179-1191.
- Copeland, C. S., Zimmer, K. P., Wagner, K. R., Healey, G. A., Mellman, I., & Helenius, A. (1988). Folding, trimerization, and transport are sequential events in the biogenesis of influenza virus hemagglutinin. *Cell*, *53*(2), 197-209.
- Cox, N. J., & Subbarao, K. (2000). Global epidemiology of influenza: past and present. *Annu Rev Med*, *51*, 407-421. doi:10.1146/annurev.med.51.1.407
- Cox, R., & Plemper, R. K. (2016). Structure-guided design of small-molecule therapeutics against RSV disease. *Expert Opin Drug Discov*, 1-14. doi:10.1517/17460441.2016.1174212
- Cros, J. F., Garcia-Sastre, A., & Palese, P. (2005). An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. *Traffic*, *6*(3), 205-213. doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00263.x
- Cummings, R. D., Soderquist, A. M., & Carpenter, G. (1985). The oligosaccharide moieties of the epidermal growth factor receptor in A-431 cells. Presence of complex-type N-linked chains that

- contain terminal N-acetylgalactosamine residues. *J Biol Chem*, 260(22), 11944-11952.
- Dahlin, J. L., Nissink, J. W., Strasser, J. M., Francis, S., Higgins, L., Zhou, H., . . . Walters, M. A. (2015). PAINS in the assay: chemical mechanisms of assay interference and promiscuous enzymatic inhibition observed during a sulfhydryl-scavenging HTS. *J Med Chem*, 58(5), 2091-2113. doi:10.1021/jm5019093
- Daniels, R., Kurowski, B., Johnson, A. E., & Hebert, D. N. (2003). N-linked glycans direct the cotranslational folding pathway of influenza hemagglutinin. *Mol Cell*, 11(1), 79-90.
- Das, S. R., Hensley, S. E., David, A., Schmidt, L., Gibbs, J. S., Puigbo, P., . . . Yewdell, J. W. (2011). Fitness costs limit influenza A virus hemagglutinin glycosylation as an immune evasion strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(51), E1417-1422. doi:10.1073/pnas.1108754108
- Das, S. R., Puigbo, P., Hensley, S. E., Hurt, D. E., Bennink, J. R., & Yewdell, J. W. (2010). Glycosylation focuses sequence variation in the influenza A virus H1 hemagglutinin globular domain. *PLoS Pathog*, 6(11), e1001211. doi:10.1371/journal.ppat.1001211
- de Jong, J. C., Claas, E. C., Osterhaus, A. D., Webster, R. G., & Lim, W. L. (1997). A pandemic warning? *Nature*, 389(6651), 554. doi:10.1038/39218
- de Jong, M. D., Simmons, C. P., Thanh, T. T., Hien, V. M., Smith, G. J., Chau, T. N., . . . Farrar, J. (2006). Fatal outcome of human influenza A

- (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med*, 12(10), 1203-1207. doi:10.1038/nm1477
- Demicheli, V., Jefferson, T., Rivetti, D., & Deeks, J. (2000). Prevention and early treatment of influenza in healthy adults. *Vaccine*, 18(11-12), 957-1030.
- Denisova, O. V., Kakkola, L., Feng, L., Stenman, J., Nagaraj, A., Lampe, J., . . . Kainov, D. E. (2012). Obatoclax, saliphenylhalamide, and gemcitabine inhibit influenza a virus infection. *J Biol Chem*, 287(42), 35324-35332. doi:10.1074/jbc.M112.392142
- Diederich, S., Berhane, Y., Embury-Hyatt, C., Hisanaga, T., Handel, K., Cottam-Birt, C., . . . Pasick, J. (2015). Hemagglutinin-Neuraminidase Balance Influences the Virulence Phenotype of a Recombinant H5N3 Influenza A Virus Possessing a Polybasic HA0 Cleavage Site. *J Virol*, 89(21), 10724-10734. doi:10.1128/JVI.01238-15
- Doronina, V. A., de Felipe, P., Wu, C., Sharma, P., Sachs, M. S., Ryan, M. D., & Brown, J. D. (2008). Dissection of a co-translational nascent chain separation event. *Biochem Soc Trans*, 36(Pt 4), 712-716. doi:10.1042/BST0360712
- Dou, D., Revol, R., Ostbye, H., Wang, H., & Daniels, R. (2018). Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. *Front Immunol*, 9, 1581. doi:10.3389/fimmu.2018.01581
- Douglas, J. L., Panis, M. L., Ho, E., Lin, K. Y., Krawczyk, S. H., Grant, D. M., . . . Cihlar, T. (2003). Inhibition of respiratory syncytial virus fusion by

the small molecule VP-14637 via specific interactions with F protein. *J Virol*, 77(9), 5054-5064.

Droebner, K., Pleschka, S., Ludwig, S., & Planz, O. (2011). Antiviral activity of the MEK-inhibitor U0126 against pandemic H1N1v and highly pathogenic avian influenza virus in vitro and in vivo. *Antiviral Res*, 92(2), 195-203. doi:10.1016/j.antiviral.2011.08.002

Eierhoff, T., Hrinčius, E. R., Rescher, U., Ludwig, S., & Ehrhardt, C. (2010). The epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes uptake of influenza A viruses (IAV) into host cells. *PLoS Pathog*, 6(9), e1001099. doi:10.1371/journal.ppat.1001099

Elliot, A. J., & Fleming, D. M. (2008). Influenza and respiratory syncytial virus in the elderly. *Expert Rev Vaccines*, 7(2), 249-258. doi:10.1586/14760584.7.2.249

Falchi, A., Arena, C., Andreoletti, L., Jacques, J., Leveque, N., Blanchon, T., . . . Varesi, L. (2008). Dual infections by influenza A/H3N2 and B viruses and by influenza A/H3N2 and A/H1N1 viruses during winter 2007, Corsica Island, France. *J Clin Virol*, 41(2), 148-151. doi:10.1016/j.jcv.2007.11.003

Fass, D. (2003). Conformational changes in enveloped virus surface proteins during cell entry. *Adv Protein Chem*, 64, 325-362.

Fischer, M. A., Smith, J. L., Shum, D., Stein, D. A., Parkins, C., Bhinder, B., . . . Fruh, K. (2013). Flaviviruses are sensitive to inhibition of thymidine synthesis pathways. *J Virol*, 87(17), 9411-9419. doi:10.1128/JVI.00101-13

- Fontana, J., Cardone, G., Heymann, J. B., Winkler, D. C., & Steven, A. C. (2012). Structural changes in Influenza virus at low pH characterized by cryo-electron tomography. *J Virol*, *86*(6), 2919-2929. doi:10.1128/JVI.06698-11
- Foulkes-Murzycki, J. E., Rosi, C., Kurt Yilmaz, N., Shafer, R. W., & Schiffer, C. A. (2013). Cooperative effects of drug-resistance mutations in the flap region of HIV-1 protease. *ACS Chem Biol*, *8*(3), 513-518. doi:10.1021/cb3006193
- Fox, T., Coll, J. T., Xie, X., Ford, P. J., Germann, U. A., Porter, M. D., . . . Wilson, K. P. (1998). A single amino acid substitution makes ERK2 susceptible to pyridinyl imidazole inhibitors of p38 MAP kinase. *Protein Sci*, *7*(11), 2249-2255. doi:10.1002/pro.5560071102
- Furuta, Y., Takahashi, K., Kuno-Maekawa, M., Sangawa, H., Uehara, S., Kozaki, K., . . . Shiraki, K. (2005). Mechanism of action of T-705 against influenza virus. *Antimicrob Agents Chemother*, *49*(3), 981-986. doi:10.1128/AAC.49.3.981-986.2005
- Gabriel, G., Herwig, A., & Klenk, H. D. (2008). Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin alpha1 is a determinant of host range of influenza A virus. *PLoS Pathog*, *4*(2), e11. doi:10.1371/journal.ppat.0040011
- Gao, H., Sun, Y., Hu, J., Qi, L., Wang, J., Xiong, X., . . . Liu, J. (2015). The contribution of PA-X to the virulence of pandemic 2009 H1N1 and

- highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses. *Sci Rep*, 5, 8262.
doi:10.1038/srep08262
- Gao, Y., Zhang, Y., Shinya, K., Deng, G., Jiang, Y., Li, Z., . . . Chen, H. (2009). Identification of amino acids in HA and PB2 critical for the transmission of H5N1 avian influenza viruses in a mammalian host. *PLoS Pathog*, 5(12), e1000709.
doi:10.1371/journal.ppat.1000709
- Garten, W., Bosch, F. X., Linder, D., Rott, R., & Klenk, H. D. (1981). Proteolytic activation of the influenza virus hemagglutinin: The structure of the cleavage site and the enzymes involved in cleavage. *Virology*, 115(2), 361-374.
- Gasparini, R., Amicizia, D., Lai, P. L., & Panatto, D. (2012). Clinical and socioeconomic impact of seasonal and pandemic influenza in adults and the elderly. *Hum Vaccin Immunother*, 8(1), 21-28.
doi:10.4161/hv.8.1.17622
- Gaucherand, L., Porter, B. K., Levene, R. E., Price, E. L., Schmaling, S. K., Rycroft, C. H., . . . Gaglia, M. M. (2019). The Influenza A Virus Endoribonuclease PA-X Usurps Host mRNA Processing Machinery to Limit Host Gene Expression. *Cell Rep*, 27(3), 776-792 e777. doi:10.1016/j.celrep.2019.03.063
- Geraci, J. R., St Aubin, D. J., Barker, I. K., Webster, R. G., Hinshaw, V. S., Bean, W. J., . . . Schooley, R. T. (1982). Mass mortality of harbor seals: pneumonia associated with influenza A virus. *Science*, 215(4536), 1129-1131.

- Gerhard, W. (2001). The role of the antibody response in influenza virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol*, 260, 171-190.
- Gething, M. J., Doms, R. W., York, D., & White, J. (1986). Studies on the mechanism of membrane fusion: site-specific mutagenesis of the hemagglutinin of influenza virus. *J Cell Biol*, 102(1), 11-23.
- Glaser, L., Conenello, G., Paulson, J., & Palese, P. (2007). Effective replication of human influenza viruses in mice lacking a major alpha2,6 sialyltransferase. *Virus Res*, 126(1-2), 9-18. doi:10.1016/j.virusres.2007.01.011
- Gong, X. Q., Sun, Y. F., Ruan, B. Y., Liu, X. M., Wang, Q., Yang, H. M., . . . Yu, H. (2017). PA-X protein decreases replication and pathogenicity of swine influenza virus in cultured cells and mouse models. *Vet Microbiol*, 205, 66-70. doi:10.1016/j.vetmic.2017.05.004
- Gregory, V., Bennett, M., Orkhan, M. H., Al Hajjar, S., Varsano, N., Mendelson, E., . . . Lin, Y. P. (2002). Emergence of influenza A H1N2 reassortant viruses in the human population during 2001. *Virology*, 300(1), 1-7.
- Groothuis, J. R., Simoes, E. A., Levin, M. J., Hall, C. B., Long, C. E., Rodriguez, W. J., . . . et al. (1993). Prophylactic administration of respiratory syncytial virus immune globulin to high-risk infants and young children. The Respiratory Syncytial Virus Immune Globulin Study Group. *N Engl J Med*, 329(21), 1524-1530. doi:10.1056/NEJM199311183292102

- Gruenke, J. A., Armstrong, R. T., Newcomb, W. W., Brown, J. C., & White, J. M. (2002). New insights into the spring-loaded conformational change of influenza virus hemagglutinin. *J Virol*, *76*(9), 4456-4466.
- Guo, Y., Dong, J., Wang, M., Zhang, Y., Guo, J., & Wu, K. (2001). Characterization of hemagglutinin gene of influenza A virus subtype H9N2. *Chin Med J (Engl)*, *114*(1), 76-79.
- Harrison, S. C. (2008). Viral membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol*, *15*(7), 690-698. doi:10.1038/nsmb.1456
- Hatada, E., & Fukuda, R. (1992). Binding of influenza A virus NS1 protein to dsRNA in vitro. *J Gen Virol*, *73* (Pt 12), 3325-3329. doi:10.1099/0022-1317-73-12-3325
- Hatta, M., Hatta, Y., Kim, J. H., Watanabe, S., Shinya, K., Nguyen, T., . . . Kawaoka, Y. (2007). Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice. *PLoS Pathog*, *3*(10), 1374-1379. doi:10.1371/journal.ppat.0030133
- Hause, B. M., Collin, E. A., Liu, R., Huang, B., Sheng, Z., Lu, W., . . . Li, F. (2014). Characterization of a novel influenza virus in cattle and Swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. *MBio*, *5*(2), e00031-00014. doi:10.1128/mBio.00031-14
- Hay, A. J., Wolstenholme, A. J., Skehel, J. J., & Smith, M. H. (1985). The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J*, *4*(11), 3021-3024.
- Hayashi, T., MacDonald, L. A., & Takimoto, T. (2015). Influenza A Virus Protein PA-X Contributes to Viral Growth and Suppression of the Host

- Antiviral and Immune Responses. *J Virol*, 89(12), 6442-6452.
doi:10.1128/JVI.00319-15
- Hayden, F. G., Sugaya, N., Hirotsu, N., Lee, N., de Jong, M. D., Hurt, A. C., . . .
Baloxavir Marboxil Investigators, G. (2018). Baloxavir Marboxil for
Uncomplicated Influenza in Adults and Adolescents. *N Engl J
Med*, 379(10), 913-923. doi:10.1056/NEJMoa1716197
- Heaton, N. S., Leyva-Grado, V. H., Tan, G. S., Eggink, D., Hai, R., & Palese, P.
(2013). In vivo bioluminescent imaging of influenza a virus
infection and characterization of novel cross-protective
monoclonal antibodies. *J Virol*, 87(15), 8272-8281.
doi:10.1128/JVI.00969-13
- Heaton, N. S., Sachs, D., Chen, C. J., Hai, R., & Palese, P. (2013). Genome-
wide mutagenesis of influenza virus reveals unique plasticity of
the hemagglutinin and NS1 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*,
110(50), 20248-20253. doi:10.1073/pnas.1320524110
- Hebert, D. N., Zhang, J. X., Chen, W., Foellmer, B., & Helenius, A. (1997). The
number and location of glycans on influenza hemagglutinin
determine folding and association with calnexin and calreticulin. *J
Cell Biol*, 139(3), 613-623.
- Henrich, T. J., & Kuritzkes, D. R. (2013). HIV-1 entry inhibitors: recent
development and clinical use. *Curr Opin Virol*, 3(1), 51-57.
doi:10.1016/j.coviro.2012.12.002
- Herfst, S., Schrauwen, E. J., Linster, M., Chutinimitkul, S., de Wit, E., Munster,
V. J., . . . Fouchier, R. A. (2012). Airborne transmission of

- influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science*, 336(6088), 1534-1541. doi:10.1126/science.1213362
- Herlocher, M. L., Carr, J., Ives, J., Elias, S., Truscon, R., Roberts, N., & Monto, A. S. (2002). Influenza virus carrying an R292K mutation in the neuraminidase gene is not transmitted in ferrets. *Antiviral Res*, 54(2), 99-111.
- Hoffman, L. R., Kuntz, I. D., & White, J. M. (1997). Structure-based identification of an inducer of the low-pH conformational change in the influenza virus hemagglutinin: irreversible inhibition of infectivity. *J Virol*, 71(11), 8808-8820.
- Hoffmann, E., Neumann, G., Kawaoka, Y., Hobom, G., & Webster, R. G. (2000). A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(11), 6108-6113. doi:10.1073/pnas.100133697
- Hoffmann, H. H., Kunz, A., Simon, V. A., Palese, P., & Shaw, M. L. (2011). Broad-spectrum antiviral that interferes with de novo pyrimidine biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(14), 5777-5782. doi:10.1073/pnas.1101143108
- Horimoto, T., & Kawaoka, Y. (2005). Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat Rev Microbiol*, 3(8), 591-600. doi:10.1038/nrmicro1208
- Hotard, A. L., Shaikh, F. Y., Lee, S., Yan, D., Teng, M. N., Plemper, R. K., . . . Moore, M. L. (2012). A stabilized respiratory syncytial virus reverse genetics system amenable to recombination-mediated

- mutagenesis. *Virology*, 434(1), 129-136.
doi:10.1016/j.virol.2012.09.022
- Houser, K., & Subbarao, K. (2015). Influenza vaccines: challenges and solutions. *Cell Host Microbe*, 17(3), 295-300.
doi:10.1016/j.chom.2015.02.012
- Hsu, A. C., Barr, I., Hansbro, P. M., & Wark, P. A. (2011). Human influenza is more effective than avian influenza at antiviral suppression in airway cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 44(6), 906-913.
doi:10.1165/rcmb.2010-0157OC
- Huang, Q., Korte, T., Rachakonda, P. S., Knapp, E. W., & Herrmann, A. (2009). Energetics of the loop-to-helix transition leading to the coiled-coil structure of influenza virus hemagglutinin HA2 subunits. *Proteins*, 74(2), 291-303. doi:10.1002/prot.22157
- Huang, Q., Opitz, R., Knapp, E. W., & Herrmann, A. (2002). Protonation and stability of the globular domain of influenza virus hemagglutinin. *Biophys J*, 82(2), 1050-1058. doi:10.1016/S0006-3495(02)75464-7
- Huang, Q., Sivaramakrishna, R. P., Ludwig, K., Korte, T., Bottcher, C., & Herrmann, A. (2003). Early steps of the conformational change of influenza virus hemagglutinin to a fusion active state: stability and energetics of the hemagglutinin. *Biochim Biophys Acta*, 1614(1), 3-13.
- Huet, S., Avilov, S. V., Ferbitz, L., Daigle, N., Cusack, S., & Ellenberg, J. (2010). Nuclear import and assembly of influenza A virus RNA

- polymerase studied in live cells by fluorescence cross-correlation spectroscopy. *J Virol*, 84(3), 1254-1264. doi:10.1128/JVI.01533-09
- Hussain, M., Galvin, H. D., Haw, T. Y., Nutsford, A. N., & Husain, M. (2017). Drug resistance in influenza A virus: the epidemiology and management. *Infect Drug Resist*, 10, 121-134. doi:10.2147/IDR.S105473
- Hutchinson, E. C., & Fodor, E. (2013). Transport of the influenza virus genome from nucleus to nucleus. *Viruses*, 5(10), 2424-2446. doi:10.3390/v5102424
- Imai, M., Watanabe, T., Hatta, M., Das, S. C., Ozawa, M., Shinya, K., . . . Kawaoka, Y. (2012). Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature*, 486(7403), 420-428. doi:10.1038/nature10831
- Isaacs, A., & Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 147(927), 258-267.
- Isaacs, A., Lindenmann, J., & Valentine, R. C. (1957). Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 147(927), 268-273.
- Ito, T., Couceiro, J. N., Kelm, S., Baum, L. G., Krauss, S., Castrucci, M. R., . . . Kawaoka, Y. (1998). Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol*, 72(9), 7367-7373.

- Ito, T., Suzuki, Y., Mitnaul, L., Vines, A., Kida, H., & Kawaoka, Y. (1997). Receptor specificity of influenza A viruses correlates with the agglutination of erythrocytes from different animal species. *Virology*, 227(2), 493-499. doi:10.1006/viro.1996.8323
- Ito, T., Suzuki, Y., Takada, A., Kawamoto, A., Otsuki, K., Masuda, H., . . . Kawaoka, Y. (1997). Differences in sialic acid-galactose linkages in the chicken egg amnion and allantois influence human influenza virus receptor specificity and variant selection. *J Virol*, 71(4), 3357-3362.
- Jacob, R. T., Larsen, M. J., Larsen, S. D., Kirchhoff, P. D., Sherman, D. H., & Neubig, R. R. (2012). MScreen: an integrated compound management and high-throughput screening data storage and analysis system. *J Biomol Screen*, 17(8), 1080-1087. doi:10.1177/1087057112450186
- Jagger, B. W., Wise, H. M., Kash, J. C., Walters, K. A., Wills, N. M., Xiao, Y. L., . . . Digard, P. (2012). An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science*, 337(6091), 199-204. doi:10.1126/science.1222213
- Johnson, D. (2009). Croup. *BMJ Clin Evid*, 2009.
- Johnson, N. P., & Mueller, J. (2002). Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bull Hist Med*, 76(1), 105-115.
- Johnson, S., Oliver, C., Prince, G. A., Hemming, V. G., Pfarr, D. S., Wang, S. C., . . . Young, J. F. (1997). Development of a humanized

monoclonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus. *J Infect Dis*, 176(5), 1215-1224.

Jordan, R., Shao, M., Mackman, R. L., Perron, M., Cihlar, T., Lewis, S. A., . . .

Gershwin, L. J. (2015). Antiviral Efficacy of a Respiratory Syncytial Virus (RSV) Fusion Inhibitor in a Bovine Model of RSV Infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(8), 4889-4900. doi:10.1128/AAC.00487-15

Kalthoff, D., Globig, A., & Beer, M. (2010). (Highly pathogenic) avian influenza

as a zoonotic agent. *Vet Microbiol*, 140(3-4), 237-245. doi:10.1016/j.vetmic.2009.08.022

Karlas, A., Machuy, N., Shin, Y., Pleissner, K. P., Artarini, A., Heuer, D., . . .

Meyer, T. F. (2010). Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature*, 463(7282), 818-822. doi:10.1038/nature08760

Kilpatrick, A. M., Chmura, A. A., Gibbons, D. W., Fleischer, R. C., Marra, P. P.,

& Daszak, P. (2006). Predicting the global spread of H5N1 avian influenza. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(51), 19368-19373. doi:10.1073/pnas.0609227103

Kim, C. U., Lew, W., Williams, M. A., Liu, H., Zhang, L., Swaminathan, S., . . .

Stevens, R. C. (1997). Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic

- acid analogues with potent anti-influenza activity. *J Am Chem Soc*, 119(4), 681-690.
- Kim, J. I., & Park, M. S. (2012). N-linked glycosylation in the hemagglutinin of influenza A viruses. *Yonsei Med J*, 53(5), 886-893. doi:10.3349/ymj.2012.53.5.886
- Kimble, B., Nieto, G. R., & Perez, D. R. (2010). Characterization of influenza virus sialic acid receptors in minor poultry species. *Virology*, 7, 365. doi:10.1186/1743-422X-7-365
- Kiso, M., Mitamura, K., Sakai-Tagawa, Y., Shiraishi, K., Kawakami, C., Kimura, K., . . . Kawaoka, Y. (2004). Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. *Lancet*, 364(9436), 759-765. doi:10.1016/S0140-6736(04)16934-1
- Klenk, H. D., Rott, R., & Orlich, M. (1977). Further studies on the activation of influenza virus by proteolytic cleavage of the haemagglutinin. *J Gen Virol*, 36(1), 151-161. doi:10.1099/0022-1317-36-1-151
- Klenk, H. D., Rott, R., Orlich, M., & Blodorn, J. (1975). Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology*, 68(2), 426-439.
- Konig, R., Stertz, S., Zhou, Y., Inoue, A., Hoffmann, H. H., Bhattacharyya, S., . . . Chanda, S. K. (2010). Human host factors required for influenza virus replication. *Nature*, 463(7282), 813-817. doi:10.1038/nature08699
- Krammer, F., & Palese, P. (2013). Influenza virus hemagglutinin stalk-based antibodies and vaccines. *Curr Opin Virol*, 3(5), 521-530. doi:10.1016/j.coviro.2013.07.007

- Krause, J. C., Tsibane, T., Tumpey, T. M., Huffman, C. J., Basler, C. F., & Crowe, J. E., Jr. (2011). A broadly neutralizing human monoclonal antibody that recognizes a conserved, novel epitope on the globular head of the influenza H1N1 virus hemagglutinin. *J Virol*, *85*(20), 10905-10908. doi:10.1128/JVI.00700-11
- Krauss, S., Obert, C. A., Franks, J., Walker, D., Jones, K., Seiler, P., . . . Webster, R. G. (2007). Influenza in migratory birds and evidence of limited intercontinental virus exchange. *PLoS Pathog*, *3*(11), e167. doi:10.1371/journal.ppat.0030167
- Krumm, S. A., Ndungu, J. M., Yoon, J. J., Dochow, M., Sun, A., Natchus, M., . . . Plemper, R. K. (2011). Potent host-directed small-molecule inhibitors of myxovirus RNA-dependent RNA-polymerases. *PLoS One*, *6*(5), e20069. doi:10.1371/journal.pone.0020069
- Krumm, S. A., Yan, D., Hovingh, E. S., Evers, T. J., Enkirch, T., Reddy, G. P., . . . Plemper, R. K. (2014). An orally available, small-molecule polymerase inhibitor shows efficacy against a lethal morbillivirus infection in a large animal model. *Sci Transl Med*, *6*(232), 232ra252. doi:10.1126/scitranslmed.3008517
- Kunisaki, K. M., & Janoff, E. N. (2009). Influenza in immunosuppressed populations: a review of infection frequency, morbidity, mortality, and vaccine responses. *Lancet Infect Dis*, *9*(8), 493-504. doi:10.1016/S1473-3099(09)70175-6
- Lai, K. K., Cheung, N. N., Yang, F., Dai, J., Liu, L., Chen, Z., . . . Kao, R. Y. (2015). Identification of Novel Fusion Inhibitors of Influenza A

- Virus by Chemical Genetics. *J Virol*, 90(5), 2690-2701.
doi:10.1128/JVI.02326-15
- Lamb, R. A., & Choppin, P. W. (1983). The gene structure and replication of influenza virus. *Annu Rev Biochem*, 52, 467-506.
doi:10.1146/annurev.bi.52.070183.002343
- Le, Q. M., Kiso, M., Someya, K., Sakai, Y. T., Nguyen, T. H., Nguyen, K. H., . . . Kawaoka, Y. (2005). Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature*, 437(7062), 1108. doi:10.1038/4371108a
- Lewnard, J. A., & Cobey, S. (2018). Immune History and Influenza Vaccine Effectiveness. *Vaccines (Basel)*, 6(2).
doi:10.3390/vaccines6020028
- Li, Z., Chen, H., Jiao, P., Deng, G., Tian, G., Li, Y., . . . Yu, K. (2005). Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model. *J Virol*, 79(18), 12058-12064.
doi:10.1128/JVI.79.18.12058-12064.2005
- Liu, Q., Zhou, Y. H., & Yang, Z. Q. (2016). The cytokine storm of severe influenza and development of immunomodulatory therapy. *Cell Mol Immunol*, 13(1), 3-10. doi:10.1038/cmi.2015.74
- Loh, P. C., & Soergel, M. (1965). Growth characteristics of reovirus type 2: actinomycin D and the synthesis of viral RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 54(3), 857-863.
- Lozach, P. Y., Huotari, J., & Helenius, A. (2011). Late-penetrating viruses. *Curr Opin Virol*, 1(1), 35-43. doi:10.1016/j.coviro.2011.05.004

- Lucas-Hourani, M., Dauzonne, D., Jorda, P., Cousin, G., Lupan, A., Helynck, O., . . . Vidalain, P. O. (2013). Inhibition of pyrimidine biosynthesis pathway suppresses viral growth through innate immunity. *PLoS Pathog*, 9(10), e1003678. doi:10.1371/journal.ppat.1003678
- Luke, G. A., de Felipe, P., Lukashev, A., Kallioinen, S. E., Bruno, E. A., & Ryan, M. D. (2008). Occurrence, function and evolutionary origins of '2A-like' sequences in virus genomes. *J Gen Virol*, 89(Pt 4), 1036-1042. doi:10.1099/vir.0.83428-0
- Luo, G., Colonna, R., & Krystal, M. (1996). Characterization of a hemagglutinin-specific inhibitor of influenza A virus. *Virology*, 226(1), 66-76. doi:10.1006/viro.1996.0628
- Ma, W., Garcia-Sastre, A., & Schwemmler, M. (2015). Expected and Unexpected Features of the Newly Discovered Bat Influenza A-like Viruses. *PLoS Pathog*, 11(6), e1004819. doi:10.1371/journal.ppat.1004819
- MacDonald, N., Hatchette, T., Elkout, L., & Sarwal, S. (2011). Mumps is back: why is mumps eradication not working? *Adv Exp Med Biol*, 697, 197-220. doi:10.1007/978-1-4419-7185-2_14
- Mahadevia, P. J., Masaquel, A. S., Polak, M. J., & Weiner, L. B. (2012). Cost utility of palivizumab prophylaxis among pre-term infants in the United States: a national policy perspective. *J Med Econ*, 15(5), 987-996. doi:10.3111/13696998.2012.690013
- Mair, C. M., Ludwig, K., Herrmann, A., & Sieben, C. (2014). Receptor binding and pH stability - how influenza A virus hemagglutinin affects host-

- specific virus infection. *Biochim Biophys Acta*, 1838(4), 1153-1168. doi:10.1016/j.bbamem.2013.10.004
- Malakhov, M. P., Aschenbrenner, L. M., Smees, D. F., Wandersee, M. K., Sidwell, R. W., Gubareva, L. V., . . . Fang, F. (2006). Sialidase fusion protein as a novel broad-spectrum inhibitor of influenza virus infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(4), 1470-1479. doi:10.1128/AAC.50.4.1470-1479.2006
- Manicassamy, B., Manicassamy, S., Belicha-Villanueva, A., Pisanelli, G., Pulendran, B., & Garcia-Sastre, A. (2010). Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(25), 11531-11536. doi:10.1073/pnas.0914994107
- Marazzi, I., Ho, J. S., Kim, J., Manicassamy, B., Dewell, S., Albrecht, R. A., . . . Tarakhovskiy, A. (2012). Suppression of the antiviral response by an influenza histone mimic. *Nature*, 483(7390), 428-433. doi:10.1038/nature10892
- Marsh, G. A., Hatami, R., & Palese, P. (2007). Specific residues of the influenza A virus hemagglutinin viral RNA are important for efficient packaging into budding virions. *J Virol*, 81(18), 9727-9736. doi:10.1128/JVI.01144-07
- Mase, M., Tanimura, N., Imada, T., Okamatsu, M., Tsukamoto, K., & Yamaguchi, S. (2006). Recent H5N1 avian influenza A virus increases rapidly in virulence to mice after a single passage in

- mice. *J Gen Virol*, 87(Pt 12), 3655-3659. doi:10.1099/vir.0.81843-0
- Matharu, D. S., Flaherty, D. P., Simpson, D. S., Schroeder, C. E., Chung, D., Yan, D., . . . Golden, J. E. (2014). Optimization of potent and selective quinazolinones: inhibitors of respiratory syncytial virus that block RNA-dependent RNA-polymerase complex activity. *J Med Chem*, 57(24), 10314-10328. doi:10.1021/jm500902x
- Matrosovich, M., Tuzikov, A., Bovin, N., Gambaryan, A., Klimov, A., Castrucci, M. R., . . . Kawaoka, Y. (2000). Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J Virol*, 74(18), 8502-8512.
- Matrosovich, M. N., Krauss, S., & Webster, R. G. (2001). H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity. *Virology*, 281(2), 156-162. doi:10.1006/viro.2000.0799
- Matrosovich, M. N., Matrosovich, T. Y., Gray, T., Roberts, N. A., & Klenk, H. D. (2004). Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J Virol*, 78(22), 12665-12667. doi:10.1128/JVI.78.22.12665-12667.2004
- McGeoch, D., Fellner, P., & Newton, C. (1976). Influenza virus genome consists of eight distinct RNA species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(9), 3045-3049.
- McKimm-Breschkin, J. (2000). VP-14637 ViroPharma. *Curr Opin Investig Drugs*, 1(4), 425-427.

- Mehle, A., & Doudna, J. A. (2009). Adaptive strategies of the influenza virus polymerase for replication in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(50), 21312-21316. doi:10.1073/pnas.0911915106
- Mibayashi, M., Martinez-Sobrido, L., Loo, Y. M., Cardenas, W. B., Gale, M., Jr., & Garcia-Sastre, A. (2007). Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *J Virol*, *81*(2), 514-524. doi:10.1128/JVI.01265-06
- Minagawa, K., Kouzuki, S., & Kamigauchi, T. (2002). Stachyflin and acetylstachyflin, novel anti-influenza A virus substances, produced by *Stachybotrys* sp. RF-7260. II. Synthesis and preliminary structure-activity relationships of stachyflin derivatives. *J Antibiot (Tokyo)*, *55*(2), 165-171.
- Moeller, A., Kirchdoerfer, R. N., Potter, C. S., Carragher, B., & Wilson, I. A. (2012). Organization of the influenza virus replication machinery. *Science*, *338*(6114), 1631-1634. doi:10.1126/science.1227270
- Morens, D. M., & Fauci, A. S. (2007). The 1918 influenza pandemic: insights for the 21st century. *J Infect Dis*, *195*(7), 1018-1028. doi:10.1086/511989
- Morens, D. M., Taubenberger, J. K., & Fauci, A. S. (2008). Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J Infect Dis*, *198*(7), 962-970. doi:10.1086/591708

- Morens, D. M., Taubenberger, J. K., & Fauci, A. S. (2009). The persistent legacy of the 1918 influenza virus. *N Engl J Med*, *361*(3), 225-229. doi:10.1056/NEJMp0904819
- Morlet, N., Stayt, J., Vaegan, Salonikas, C., Naidoo, D., Crouch, R., . . . Coroneo, M. (1999). Etoposide as a virocidal anticytomegalovirus therapy: intravitreal toxicology and pharmacology in rabbits. *Aust N Z J Ophthalmol*, *27*(5), 342-349.
- Moss, R. B., Hansen, C., Sanders, R. L., Hawley, S., Li, T., & Steigbigel, R. T. (2012). A phase II study of DAS181, a novel host directed antiviral for the treatment of influenza infection. *J Infect Dis*, *206*(12), 1844-1851. doi:10.1093/infdis/jis622
- Murti, K. G., Webster, R. G., & Jones, I. M. (1988). Localization of RNA polymerases on influenza viral ribonucleoproteins by immunogold labeling. *Virology*, *164*(2), 562-566.
- Nakatsu, S., Murakami, S., Shindo, K., Horimoto, T., Sagara, H., Noda, T., & Kawaoka, Y. (2018). Influenza C and D Viruses Package Eight Organized Ribonucleoprotein Complexes. *J Virol*, *92*(6). doi:10.1128/JVI.02084-17
- Nelson, M. I., & Holmes, E. C. (2007). The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet*, *8*(3), 196-205. doi:10.1038/nrg2053
- Nemeroff, M. E., Barabino, S. M., Li, Y., Keller, W., & Krug, R. M. (1998). Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3'end formation of cellular pre-mRNAs. *Mol Cell*, *1*(7), 991-1000.

- Nidom, C. A., Takano, R., Yamada, S., Sakai-Tagawa, Y., Daulay, S., Aswadi, D., . . . Kawaoka, Y. (2010). Influenza A (H5N1) viruses from pigs, Indonesia. *Emerg Infect Dis*, 16(10), 1515-1523. doi:10.3201/eid1610.100508
- Noah, D. L., Twu, K. Y., & Krug, R. M. (2003). Cellular antiviral responses against influenza A virus are countered at the posttranscriptional level by the viral NS1A protein via its binding to a cellular protein required for the 3' end processing of cellular pre-mRNAs. *Virology*, 307(2), 386-395.
- Nobusawa, E., Ishihara, H., Morishita, T., Sato, K., & Nakajima, K. (2000). Change in receptor-binding specificity of recent human influenza A viruses (H3N2): a single amino acid change in hemagglutinin altered its recognition of sialyloligosaccharides. *Virology*, 278(2), 587-596. doi:10.1006/viro.2000.0679
- Noda, T., Murakami, S., Nakatsu, S., Imai, H., Muramoto, Y., Shindo, K., . . . Kawaoka, Y. (2018). Importance of the 1+7 configuration of ribonucleoprotein complexes for influenza A virus genome packaging. *Nat Commun*, 9(1), 54. doi:10.1038/s41467-017-02517-w
- Nunes-Correia, I., Eulalio, A., Nir, S., & Pedroso de Lima, M. C. (2004). Caveolae as an additional route for influenza virus endocytosis in MDCK cells. *Cell Mol Biol Lett*, 9(1), 47-60.
- O'Donnell, C. D., Vogel, L., Wright, A., Das, S. R., Wrammert, J., Li, G. M., . . . Subbarao, K. (2012). Antibody pressure by a human monoclonal

antibody targeting the 2009 pandemic H1N1 virus hemagglutinin drives the emergence of a virus with increased virulence in mice. *MBio*, 3(3). doi:10.1128/mBio.00120-12

Ohuchi, M., Ohuchi, R., Feldmann, A., & Klenk, H. D. (1997). Regulation of receptor binding affinity of influenza virus hemagglutinin by its carbohydrate moiety. *J Virol*, 71(11), 8377-8384.

Omoto, S., Speranzini, V., Hashimoto, T., Noshi, T., Yamaguchi, H., Kawai, M., . . . Cusack, S. (2018). Characterization of influenza virus variants induced by treatment with the endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. *Sci Rep*, 8(1), 9633. doi:10.1038/s41598-018-27890-4

Oslund, K. L., & Baumgarth, N. (2011). Influenza-induced innate immunity: regulators of viral replication, respiratory tract pathology & adaptive immunity. *Future Virol*, 6(8), 951-962. doi:10.2217/fvl.11.63

Palese, P., Tobita, K., Ueda, M., & Compans, R. W. (1974). Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology*, 61(2), 397-410.

Patterson, K. D., & Pyle, G. F. (1991). The geography and mortality of the 1918 influenza pandemic. *Bull Hist Med*, 65(1), 4-21.

Peiris, J. S., Cowling, B. J., Wu, J. T., Feng, L., Guan, Y., Yu, H., & Leung, G. M. (2016). Interventions to reduce zoonotic and pandemic risks from avian influenza in Asia. *Lancet Infect Dis*, 16(2), 252-258. doi:10.1016/S1473-3099(15)00502-2

- Peiris, M., Yuen, K. Y., Leung, C. W., Chan, K. H., Ip, P. L., Lai, R. W., . . . Shortridge, K. F. (1999). Human infection with influenza H9N2. *Lancet*, 354(9182), 916-917.
- Pina, A. S., Hussain, A., & Roque, A. C. (2009). An historical overview of drug discovery. *Methods Mol Biol*, 572, 3-12. doi:10.1007/978-1-60761-244-5_1
- Plotch, S. J., O'Hara, B., Morin, J., Palant, O., LaRocque, J., Bloom, J. D., . . . Gluzman, Y. (1999). Inhibition of influenza A virus replication by compounds interfering with the fusogenic function of the viral hemagglutinin. *J Virol*, 73(1), 140-151.
- Poon, L. L., Pritlove, D. C., Fodor, E., & Brownlee, G. G. (1999). Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template. *J Virol*, 73(4), 3473-3476.
- Prussia, A., Thepchatri, P., Snyder, J. P., & Plemper, R. K. (2011). Systematic approaches towards the development of host-directed antiviral therapeutics. *Int J Mol Sci*, 12(6), 4027-4052. doi:10.3390/ijms12064027
- Pusch, E. A., & Suarez, D. L. (2018). The Multifaceted Zoonotic Risk of H9N2 Avian Influenza. *Vet Sci*, 5(4). doi:10.3390/vetsci5040082
- Puthavathana, P., Auewarakul, P., Charoenying, P. C., Sangsiriwut, K., Pooruk, P., Boonnak, K., . . . Sawanpanyalert, P. (2005). Molecular characterization of the complete genome of human influenza

- H5N1 virus isolates from Thailand. *J Gen Virol*, 86(Pt 2), 423-433.
doi:10.1099/vir.0.80368-0
- Qian, X. Y., Chien, C. Y., Lu, Y., Montelione, G. T., & Krug, R. M. (1995). An amino-terminal polypeptide fragment of the influenza virus NS1 protein possesses specific RNA-binding activity and largely helical backbone structure. *RNA*, 1(9), 948-956.
- Qiu, Y., & Krug, R. M. (1994). The influenza virus NS1 protein is a poly(A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly(A). *J Virol*, 68(4), 2425-2432.
- Rapoport, E. M., Mochalova, L. V., Gabius, H. J., Romanova, J., & Bovin, N. V. (2006). Search for additional influenza virus to cell interactions. *Glycoconj J*, 23(1-2), 115-125. doi:10.1007/s10719-006-5444-x
- Razinkov, V., Gazumyan, A., Nikitenko, A., Ellestad, G., & Krishnamurthy, G. (2001). RFI-641 inhibits entry of respiratory syncytial virus via interactions with fusion protein. *Chem Biol*, 8(7), 645-659.
- Reading, P. C., Pickett, D. L., Tate, M. D., Whitney, P. G., Job, E. R., & Brooks, A. G. (2009). Loss of a single N-linked glycan from the hemagglutinin of influenza virus is associated with resistance to collectins and increased virulence in mice. *Respir Res*, 10, 117.
doi:10.1186/1465-9921-10-117
- Reed, M. L., Bridges, O. A., Seiler, P., Kim, J. K., Yen, H. L., Salomon, R., . . . Russell, C. J. (2010). The pH of activation of the hemagglutinin protein regulates H5N1 influenza virus pathogenicity and

- transmissibility in ducks. *J Virol*, 84(3), 1527-1535.
doi:10.1128/JVI.02069-09
- A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. (1980). *Bull World Health Organ*, 58(4), 585-591.
- Robertson, J. S., Schubert, M., & Lazzarini, R. A. (1981). Polyadenylation sites for influenza virus mRNA. *J Virol*, 38(1), 157-163.
- Rogers, G. N., & D'Souza, B. L. (1989). Receptor binding properties of human and animal H1 influenza virus isolates. *Virology*, 173(1), 317-322.
- Rogers, G. N., & Paulson, J. C. (1983). Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology*, 127(2), 361-373.
- Rosenthal, P. B., Zhang, X., Formanowski, F., Fitz, W., Wong, C. H., Meier-Ewert, H., . . . Wiley, D. C. (1998). Structure of the haemagglutinin-esterase-fusion glycoprotein of influenza C virus. *Nature*, 396(6706), 92-96. doi:10.1038/23974
- Rota, P. A., Wallis, T. R., Harmon, M. W., Rota, J. S., Kendal, A. P., & Nerome, K. (1990). Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. *Virology*, 175(1), 59-68.
- Rott, R. (1992). The pathogenic determinant of influenza virus. *Vet Microbiol*, 33(1-4), 303-310.
- Russell, C. J., & Webster, R. G. (2005). The genesis of a pandemic influenza virus. *Cell*, 123(3), 368-371. doi:10.1016/j.cell.2005.10.019

- Russell, R. J., Gamblin, S. J., Haire, L. F., Stevens, D. J., Xiao, B., Ha, Y., & Skehel, J. J. (2004). H1 and H7 influenza haemagglutinin structures extend a structural classification of haemagglutinin subtypes. *Virology*, 325(2), 287-296. doi:10.1016/j.virol.2004.04.040
- Russell, R. J., Kerry, P. S., Stevens, D. J., Steinhauer, D. A., Martin, S. R., Gamblin, S. J., & Skehel, J. J. (2008). Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(46), 17736-17741. doi:10.1073/pnas.0807142105
- Ryan-Poirier, K., Suzuki, Y., Bean, W. J., Kobasa, D., Takada, A., Ito, T., & Kawaoka, Y. (1998). Changes in H3 influenza A virus receptor specificity during replication in humans. *Virus Res*, 56(2), 169-176.
- Salerno, D., Hasham, M. G., Marshall, R., Garriga, J., Tsygankov, A. Y., & Grana, X. (2007). Direct inhibition of CDK9 blocks HIV-1 replication without preventing T-cell activation in primary human peripheral blood lymphocytes. *Gene*, 405(1-2), 65-78. doi:10.1016/j.gene.2007.09.010
- Sangawa, H., Komeno, T., Nishikawa, H., Yoshida, A., Takahashi, K., Nomura, N., & Furuta, Y. (2013). Mechanism of action of T-705 ribosyl triphosphate against influenza virus RNA polymerase. *Antimicrob Agents Chemother*, 57(11), 5202-5208. doi:10.1128/AAC.00649-

- Scheiffele, P., Roth, M. G., & Simons, K. (1997). Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *EMBO J*, *16*(18), 5501-5508. doi:10.1093/emboj/16.18.5501
- Schneider, W. M., Chevillotte, M. D., & Rice, C. M. (2014). Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol*, *32*, 513-545. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120231
- Schwarz, F., & Aebi, M. (2011). Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Curr Opin Struct Biol*, *21*(5), 576-582. doi:10.1016/j.sbi.2011.08.005
- Schwegmann, A., & Brombacher, F. (2008). Host-directed drug targeting of factors hijacked by pathogens. *Sci Signal*, *1*(29), re8. doi:10.1126/scisignal.129re8
- Scola, P. M., Sun, L. Q., Wang, A. X., Chen, J., Sin, N., Venables, B. L., . . . McPhee, F. (2014). The discovery of asunaprevir (BMS-650032), an orally efficacious NS3 protease inhibitor for the treatment of hepatitis C virus infection. *J Med Chem*, *57*(5), 1730-1752. doi:10.1021/jm500297k
- Shanley, J. D., & Debs, R. J. (1989). The folate antagonist, methotrexate, is a potent inhibitor of murine and human cytomegalovirus in vitro. *Antiviral Res*, *11*(2), 99-106.
- Shi, M., Jagger, B. W., Wise, H. M., Digard, P., Holmes, E. C., & Taubenberger, J. K. (2012). Evolutionary conservation of the PA-X open reading

- frame in segment 3 of influenza A virus. *J Virol*, 86(22), 12411-12413. doi:10.1128/JVI.01677-12
- Shinde, V., Bridges, C. B., Uyeki, T. M., Shu, B., Balish, A., Xu, X., . . . Finelli, L. (2009). Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005-2009. *N Engl J Med*, 360(25), 2616-2625. doi:10.1056/NEJMoa0903812
- Shope, R. E. (1931). Swine Influenza : I. Experimental Transmission and Pathology. *J Exp Med*, 54(3), 349-359.
- Sidwell, R. W., Arnett, G., & Schabel, F. M., Jr. (1972). In vitro effect of a variety of biologically active compounds on human cytomegalovirus. *Chemotherapy*, 17(4), 259-282. doi:10.1159/000220858
- Skehel, J. J., Stevens, D. J., Daniels, R. S., Douglas, A. R., Knossow, M., Wilson, I. A., & Wiley, D. C. (1984). A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(6), 1779-1783.
- Smee, D. F., Bray, M., & Huggins, J. W. (2001). Antiviral activity and mode of action studies of ribavirin and mycophenolic acid against orthopoxviruses in vitro. *Antivir Chem Chemother*, 12(6), 327-335. doi:10.1177/095632020101200602
- Smith, G. J., Fan, X. H., Wang, J., Li, K. S., Qin, K., Zhang, J. X., . . . Guan, Y. (2006). Emergence and predominance of an H5N1 influenza variant in China. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(45), 16936-16941. doi:10.1073/pnas.0608157103

- Sovinova, O., Tumova, B., Pouska, F., & Nemeč, J. (1958). Isolation of a virus causing respiratory disease in horses. *Acta Virol*, 2(1), 52-61.
- Staschke, K. A., Hatch, S. D., Tang, J. C., Hornback, W. J., Munroe, J. E., Colacino, J. M., & Muesing, M. A. (1998). Inhibition of influenza virus hemagglutinin-mediated membrane fusion by a compound related to podocarpic acid. *Virology*, 248(2), 264-274. doi:10.1006/viro.1998.9273
- Steel, J., Lowen, A. C., Mubareka, S., & Palese, P. (2009). Transmission of influenza virus in a mammalian host is increased by PB2 amino acids 627K or 627E/701N. *PLoS Pathog*, 5(1), e1000252. doi:10.1371/journal.ppat.1000252
- Steinhauer, D. A. (1999). Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology*, 258(1), 1-20. doi:10.1006/viro.1999.9716
- Steinhauer, D. A., Martin, J., Lin, Y. P., Wharton, S. A., Oldstone, M. B., Skehel, J. J., & Wiley, D. C. (1996). Studies using double mutants of the conformational transitions in influenza hemagglutinin required for its membrane fusion activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(23), 12873-12878.
- Stubbs, T. M., & Te Velthuis, A. J. (2014). The RNA-dependent RNA polymerase of the influenza A virus. *Future Virol*, 9(9), 863-876. doi:10.2217/fvl.14.66

- Subbarao, E. K., London, W., & Murphy, B. R. (1993). A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J Virol*, *67*(4), 1761-1764.
- Subbarao, K., & Matsuoka, Y. (2013). The prospects and challenges of universal vaccines for influenza. *Trends Microbiol*, *21*(7), 350-358. doi:10.1016/j.tim.2013.04.003
- Sun, A., Ndungu, J. M., Krumm, S. A., Yoon, J. J., Thepchatri, P., Natchus, M., . . . Snyder, J. P. (2011). Host-directed Inhibitors of Myxoviruses: Synthesis and in vitro Biochemical Evaluation. *ACS Med Chem Lett*, *2*(11), 798-803. doi:10.1021/ml200125r
- Sun, S., Wang, Q., Zhao, F., Chen, W., & Li, Z. (2011). Glycosylation site alteration in the evolution of influenza A (H1N1) viruses. *PLoS One*, *6*(7), e22844. doi:10.1371/journal.pone.0022844
- Sun, S., Wang, Q., Zhao, F., Chen, W., & Li, Z. (2012). Prediction of biological functions on glycosylation site migrations in human influenza H1N1 viruses. *PLoS One*, *7*(2), e32119. doi:10.1371/journal.pone.0032119
- Sutton, T. C. (2018). The Pandemic Threat of Emerging H5 and H7 Avian Influenza Viruses. *Viruses*, *10*(9). doi:10.3390/v10090461
- Suzuki, Y., Matsunaga, M., & Matsumoto, M. (1985). N-Acetylneuraminyllactosylceramide, GM3-NeuAc, a new influenza A virus receptor which mediates the adsorption-fusion process of viral infection. Binding specificity of influenza virus A/Aichi/2/68

- (H3N2) to membrane-associated GM3 with different molecular species of sialic acid. *J Biol Chem*, 260(3), 1362-1365.
- Swale, C., Monod, A., Tengo, L., Labaronne, A., Garzoni, F., Bourhis, J. M., . . . Crepin, T. (2016). Structural characterization of recombinant IAV polymerase reveals a stable complex between viral PA-PB1 heterodimer and host RanBP5. *Sci Rep*, 6, 24727. doi:10.1038/srep24727
- Swinney, D. C. (2013a). The contribution of mechanistic understanding to phenotypic screening for first-in-class medicines. *J Biomol Screen*, 18(10), 1186-1192. doi:10.1177/10870571113501199
- Swinney, D. C. (2013b). Phenotypic vs. target-based drug discovery for first-in-class medicines. *Clin Pharmacol Ther*, 93(4), 299-301. doi:10.1038/clpt.2012.236
- Swinney, D. C., & Anthony, J. (2011). How were new medicines discovered? *Nat Rev Drug Discov*, 10(7), 507-519. doi:10.1038/nrd3480
- Takashita, E., Kawakami, C., Morita, H., Ogawa, R., Fujisaki, S., Shirakura, M., . . . On Behalf Of The Influenza Virus Surveillance Group Of, J. (2019). Detection of influenza A(H3N2) viruses exhibiting reduced susceptibility to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir in Japan, December 2018. *Euro Surveill*, 24(3). doi:10.2807/1560-7917.ES.2019.24.3.1800698
- Takeda, M., Leser, G. P., Russell, C. J., & Lamb, R. A. (2003). Influenza virus hemagglutinin concentrates in lipid raft microdomains for efficient

- viral fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(25), 14610-14617.
doi:10.1073/pnas.2235620100
- Talon, J., Horvath, C. M., Polley, R., Basler, C. F., Muster, T., Palese, P., & Garcia-Sastre, A. (2000). Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. *J Virol*, 74(17), 7989-7996.
- Tan, S. L., Ganji, G., Paeper, B., Proll, S., & Katze, M. G. (2007). Systems biology and the host response to viral infection. *Nat Biotechnol*, 25(12), 1383-1389. doi:10.1038/nbt1207-1383
- Tate, M. D., Brooks, A. G., & Reading, P. C. (2011). Specific sites of N-linked glycosylation on the hemagglutinin of H1N1 subtype influenza A virus determine sensitivity to inhibitors of the innate immune system and virulence in mice. *J Immunol*, 187(4), 1884-1894. doi:10.4049/jimmunol.1100295
- Taubenberger, J. K., & Morens, D. M. (2006). 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerg Infect Dis*, 12(1), 15-22. doi:10.3201/eid1201.050979
- Taubenberger, J. K., & Morens, D. M. (2008). The pathology of influenza virus infections. *Annu Rev Pathol*, 3, 499-522. doi:10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154316
- Thoennes, S., Li, Z. N., Lee, B. J., Langley, W. A., Skehel, J. J., Russell, R. J., & Steinhauser, D. A. (2008). Analysis of residues near the fusion peptide in the influenza hemagglutinin structure for roles in

- triggering membrane fusion. *Virology*, 370(2), 403-414.
doi:10.1016/j.virol.2007.08.035
- Thompson, W. W., Shay, D. K., Weintraub, E., Brammer, L., Bridges, C. B., Cox, N. J., & Fukuda, K. (2004). Influenza-associated hospitalizations in the United States. *JAMA*, 292(11), 1333-1340.
doi:10.1001/jama.292.11.1333
- Thompson, W. W., Shay, D. K., Weintraub, E., Brammer, L., Cox, N., Anderson, L. J., & Fukuda, K. (2003). Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA*, 289(2), 179-186.
- Tong, S., Zhu, X., Li, Y., Shi, M., Zhang, J., Bourgeois, M., . . . Donis, R. O. (2013). New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog*, 9(10), e1003657. doi:10.1371/journal.ppat.1003657
- Trifonov, V., Khiabani, H., & Rabadan, R. (2009). Geographic dependence, surveillance, and origins of the 2009 influenza A (H1N1) virus. *N Engl J Med*, 361(2), 115-119. doi:10.1056/NEJMp0904572
- Tumpey, T. M., Maines, T. R., Van Hoeven, N., Glaser, L., Solorzano, A., Pappas, C., . . . Garcia-Sastre, A. (2007). A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission. *Science*, 315(5812), 655-659.
doi:10.1126/science.1136212
- van der Vries, E., Stelma, F. F., & Boucher, C. A. (2010). Emergence of a multidrug-resistant pandemic influenza A (H1N1) virus. *N Engl J Med*, 363(14), 1381-1382. doi:10.1056/NEJMc1003749

- van Riel, D., Munster, V. J., de Wit, E., Rimmelzwaan, G. F., Fouchier, R. A., Osterhaus, A. D., & Kuiken, T. (2006). H5N1 Virus Attachment to Lower Respiratory Tract. *Science*, 312(5772), 399. doi:10.1126/science.1125548
- van Riel, D., Munster, V. J., de Wit, E., Rimmelzwaan, G. F., Fouchier, R. A., Osterhaus, A. D., & Kuiken, T. (2007). Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals. *Am J Pathol*, 171(4), 1215-1223. doi:10.2353/ajpath.2007.070248
- Vane, J. R., & Botting, R. M. (2003). The mechanism of action of aspirin. *Thromb Res*, 110(5-6), 255-258.
- Vigerust, D. J., & Shepherd, V. L. (2007). Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *Trends Microbiol*, 15(5), 211-218. doi:10.1016/j.tim.2007.03.003
- von Itzstein, M., Wu, W. Y., Kok, G. B., Pegg, M. S., Dyason, J. C., Jin, B., . . . et al. (1993). Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature*, 363(6428), 418-423. doi:10.1038/363418a0
- Wagner, R., Heuer, D., Wolff, T., Herwig, A., & Klenk, H. D. (2002). N-Glycans attached to the stem domain of haemagglutinin efficiently regulate influenza A virus replication. *J Gen Virol*, 83(Pt 3), 601-609. doi:10.1099/0022-1317-83-3-601

- Wagner, R., Matrosovich, M., & Klenk, H. D. (2002). Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev Med Virol*, *12*(3), 159-166. doi:10.1002/rmv.352
- Wagner, R., Wolff, T., Herwig, A., Pleschka, S., & Klenk, H. D. (2000). Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. *J Virol*, *74*(14), 6316-6323.
- Wan, Z., & Chen, X. (2014). Triptolide inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication by promoting proteasomal degradation of Tat protein. *Retrovirology*, *11*, 88. doi:10.1186/s12977-014-0088-6
- Wang, C. C., Chen, J. R., Tseng, Y. C., Hsu, C. H., Hung, Y. F., Chen, S. W., . . . Wong, C. H. (2009). Glycans on influenza hemagglutinin affect receptor binding and immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(43), 18137-18142. doi:10.1073/pnas.0909696106
- Wang, H., Feng, Z., Shu, Y., Yu, H., Zhou, L., Zu, R., . . . Wang, Y. (2008). Probable limited person-to-person transmission of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus in China. *Lancet*, *371*(9622), 1427-1434. doi:10.1016/S0140-6736(08)60493-6
- Wang, W., Lu, B., Zhou, H., Suguitan, A. L., Jr., Cheng, X., Subbarao, K., . . . Jin, H. (2010). Glycosylation at 158N of the hemagglutinin protein and receptor binding specificity synergistically affect the antigenicity and immunogenicity of a live attenuated H5N1 A/Vietnam/1203/2004 vaccine virus in ferrets. *J Virol*, *84*(13), 6570-6577. doi:10.1128/JVI.00221-10

- Watanabe, T., Watanabe, S., Noda, T., Fujii, Y., & Kawaoka, Y. (2003). Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes. *J Virol*, 77(19), 10575-10583.
- Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M., & Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev*, 56(1), 152-179.
- Wei, C. J., Boyington, J. C., Dai, K., Houser, K. V., Pearce, M. B., Kong, W. P., . . . Nabel, G. J. (2010). Cross-neutralization of 1918 and 2009 influenza viruses: role of glycans in viral evolution and vaccine design. *Sci Transl Med*, 2(24), 24ra21. doi:10.1126/scitranslmed.3000799
- Weiner, L. B., Masaquel, A. S., Polak, M. J., & Mahadevia, P. J. (2012). Cost-effectiveness analysis of palivizumab among pre-term infant populations covered by Medicaid in the United States. *J Med Econ*, 15(5), 997-1018. doi:10.3111/13696998.2012.672942
- Weissenhorn, W., Wharton, S. A., Calder, L. J., Earl, P. L., Moss, B., Aliprandis, E., . . . Wiley, D. C. (1996). The ectodomain of HIV-1 env subunit gp41 forms a soluble, alpha-helical, rod-like oligomer in the absence of gp120 and the N-terminal fusion peptide. *EMBO J*, 15(7), 1507-1514.
- Weisshaar, M., Cox, R., & Plemper, R. K. (2015). Blocking Respiratory Syncytial Virus Entry: A Story with Twists. *DNA Cell Biol*, 34(8), 505-510. doi:10.1089/dna.2015.2896

- White, K. M., De Jesus, P., Chen, Z., Abreu, P., Jr., Barile, E., Mak, P. A., . . . Shaw, M. L. (2015). A Potent Anti-influenza Compound Blocks Fusion through Stabilization of the Prefusion Conformation of the Hemagglutinin Protein. *ACS Infect Dis*, 1(2), 98-109. doi:10.1021/id500022h
- Wiley, D. C., & Skehel, J. J. (1987). The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu Rev Biochem*, 56, 365-394. doi:10.1146/annurev.bi.56.070187.002053
- Wilson, I. A., Skehel, J. J., & Wiley, D. C. (1981). Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature*, 289(5796), 366-373.
- Wu, W. W., Sun, Y. H., & Pante, N. (2007). Nuclear import of influenza A viral ribonucleoprotein complexes is mediated by two nuclear localization sequences on viral nucleoprotein. *Virology*, 4, 49. doi:10.1186/1743-422X-4-49
- Wyde, P. R., Chetty, S. N., Timmerman, P., Gilbert, B. E., & Andries, K. (2003). Short duration aerosols of JNJ 2408068 (R170591) administered prophylactically or therapeutically protect cotton rats from experimental respiratory syncytial virus infection. *Antiviral Res*, 60(3), 221-231.
- Wyde, P. R., Moore-Poveda, D. K., O'Hara, B., Ding, W. D., Mitsner, B., & Gilbert, B. E. (1998). CL387626 exhibits marked and unusual

- antiviral activity against respiratory syncytial virus in tissue culture and in cotton rats. *Antiviral Res*, 38(1), 31-42.
- Xu, R., & Wilson, I. A. (2011). Structural characterization of an early fusion intermediate of influenza virus hemagglutinin. *J Virol*, 85(10), 5172-5182. doi:10.1128/JVI.02430-10
- Yan, D., Krumm, S. A., Sun, A., Steinhauer, D. A., Luo, M., Moore, M. L., & Plemper, R. K. (2013). Dual myxovirus screen identifies a small-molecule agonist of the host antiviral response. *J Virol*, 87(20), 11076-11087. doi:10.1128/JVI.01425-13
- Yan, D., Lee, S., Thakkar, V. D., Luo, M., Moore, M. L., & Plemper, R. K. (2014). Cross-resistance mechanism of respiratory syncytial virus against structurally diverse entry inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(33), E3441-3449. doi:10.1073/pnas.1405198111
- Yan, D., Weisshaar, M., Lamb, K., Chung, H. K., Lin, M. Z., & Plemper, R. K. (2015). Replication-Competent Influenza Virus and Respiratory Syncytial Virus Luciferase Reporter Strains Engineered for Co-Infections Identify Antiviral Compounds in Combination Screens. *Biochemistry*, 54(36), 5589-5604. doi:10.1021/acs.biochem.5b00623
- Yen, H. L., Liang, C. H., Wu, C. Y., Forrest, H. L., Ferguson, A., Choy, K. T., . . . Peiris, M. (2011). Hemagglutinin-neuraminidase balance confers respiratory-droplet transmissibility of the pandemic H1N1 influenza virus in ferrets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(34), 14264-14269. doi:10.1073/pnas.1111000108

- Yen, H. Y., Liu, Y. C., Chen, N. Y., Tsai, C. F., Wang, Y. T., Chen, Y. J., . . . Wong, C. H. (2015). Effect of sialylation on EGFR phosphorylation and resistance to tyrosine kinase inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *112*(22), 6955-6960. doi:10.1073/pnas.1507329112
- Yeo, K. L., Chen, Y. L., Xu, H. Y., Dong, H., Wang, Q. Y., Yokokawa, F., & Shi, P. Y. (2015). Synergistic suppression of dengue virus replication using a combination of nucleoside analogs and nucleoside synthesis inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*, *59*(4), 2086-2093. doi:10.1128/AAC.04779-14
- Yoon, J. J., Krumm, S. A., Ndungu, J. M., Hoffman, V., Bankamp, B., Rota, P. A., . . . Plemper, R. K. (2009). Target analysis of the experimental measles therapeutic AS-136A. *Antimicrob Agents Chemother*, *53*(9), 3860-3870. doi:10.1128/AAC.00503-09
- Yoon, S. W., Webby, R. J., & Webster, R. G. (2014). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, *385*, 359-375. doi:10.1007/82_2014_396
- York, A., & Fodor, E. (2013). Biogenesis, assembly, and export of viral messenger ribonucleoproteins in the influenza A virus infected cell. *RNA Biol*, *10*(8), 1274-1282. doi:10.4161/rna.25356
- Yoshizumi, T., Ichinohe, T., Sasaki, O., Otera, H., Kawabata, S., Mihara, K., & Koshihara, T. (2014). Influenza A virus protein PB1-F2 translocates into mitochondria via Tom40 channels and impairs innate immunity. *Nat Commun*, *5*, 4713. doi:10.1038/ncomms5713

- Yu, H., Zhou, Y. J., Li, G. X., Ma, J. H., Yan, L. P., Wang, B., . . . Tong, G. Z. (2011). Genetic diversity of H9N2 influenza viruses from pigs in China: a potential threat to human health? *Vet Microbiol*, *149*(1-2), 254-261. doi:10.1016/j.vetmic.2010.11.008
- Yu, K. L., Zhang, Y., Civiello, R. L., Kadow, K. F., Cianci, C., Krystal, M., & Meanwell, N. A. (2003). Fundamental structure-activity relationships associated with a new structural class of respiratory syncytial virus inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett*, *13*(13), 2141-2144.
- Zamarin, D., Garcia-Sastre, A., Xiao, X., Wang, R., & Palese, P. (2005). Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog*, *1*(1), e4. doi:10.1371/journal.ppat.0010004
- Zaraket, H., Bridges, O. A., & Russell, C. J. (2013). The pH of activation of the hemagglutinin protein regulates H5N1 influenza virus replication and pathogenesis in mice. *J Virol*, *87*(9), 4826-4834. doi:10.1128/JVI.03110-12
- Zhang, J., Liu, T., Tong, X., Li, G., Yan, J., & Ye, X. (2012). Identification of novel virus inhibitors by influenza A virus specific reporter cell based screening. *Antiviral Res*, *93*(1), 48-54. doi:10.1016/j.antiviral.2011.10.014
- Zhang, J., Pekosz, A., & Lamb, R. A. (2000). Influenza virus assembly and lipid raft microdomains: a role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins. *J Virol*, *74*(10), 4634-4644.

- Zhang, J., Stevens, M. F., & Bradshaw, T. D. (2012). Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr Mol Pharmacol*, 5(1), 102-114.
- Zhang, J. H., Chung, T. D., & Oldenburg, K. R. (1999). A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen*, 4(2), 67-73. doi:10.1177/108705719900400206
- Zheng, W., Thorne, N., & McKew, J. C. (2013). Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery. *Drug Discov Today*, 18(21-22), 1067-1073. doi:10.1016/j.drudis.2013.07.001
- Zu, M., Li, C., Fang, J. S., Lian, W. W., Liu, A. L., Zheng, L. S., & Du, G. H. (2015). Drug Discovery of Host CLK1 Inhibitors for Influenza Treatment. *Molecules*, 20(11), 19735-19747. doi:10.3390/molecules201119653
- Zurcher, T., Luo, G., & Palese, P. (1994). Mutations at palmylation sites of the influenza virus hemagglutinin affect virus formation. *J Virol*, 68(9), 5748-5754.

7 Danksagung

Zuallererst möchte ich Prof. Richard Karl Plemper meinen ausdrücklichen Dank aussprechen. Dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Dissertation unter seiner Anleitung und mit seiner Unterstützung anzufertigen. Dankbar bin ich auch für die fördernde und fordernde Betreuung, für die zahlreichen Gespräche, die auch über die Forschung hinausgingen, und seine enthusiastische und stets unerschütterliche Art im Laboralltag. Die Zeit in seinem Labor hat mich als Wissenschaftler und als Mensch weitergebracht und sehr geprägt.

Ein sehr großer Dank gilt auch Prof. Dieter Wolf, der es mir überhaupt erst ermöglicht hat, die experimentellen Studien meiner Promotion auf dem Feld der Virologie in den USA ausführen zu können. Ohne sein Vertrauen und seine Unterstützung hätte es das Abenteuer über dem Großen Teich nicht gegeben.

Natürlich möchte ich mich bei allen bedanken, die mit mir im Labor von Prof. Richard Plemper geforscht haben. Vielen Dank für die sehr angenehme Zusammenarbeit. Ein ausdrückliches Dankeschön gilt Dr. Robert Cox für seine wissenschaftliche Expertise, seine Hilfe im Laboralltag und die spaßigen Momente außerhalb des Labors sowie an Zachary Morehouse für seine unterstützende Hilfe bei der Organisation der zahlreichen Verbindungen und der Datenanalyse sowie für seine immer positive Art und die gute Stimmung im Labor. An dieser Stelle möchte ich auch Melinda Brindley erwähnen, auch wenn ich leider nur kurz mit ihr das Labor teilen durfte, ist sie mir als besonders hilfsbereit und unterstützend, auch außerhalb des Labors in Erinnerung geblieben. Danke auch an Jeong Yoon für die Hilfe bei einigen Experimenten und für seine extrem sympathische Art. Danke an Dan Yan für ihre Expertise und natürlich an Vidhi Thakkar, meine ehemalige Mitbewohnerin.

Ein großer Dank auch an alle anderen, die ich im Plemper-Lab kennenlernen durfte. Danke an Kathrin und Jonas, auch für die entstandene Freundschaft und Danke an Venice, Julien, Sukanya, Liang, Kristen, Jasmine und.

Ich möchte meiner Frau Sina danken für ihre unendliche Geduld und Unterstützung, vor allem während dem Verfassen dieser Arbeit, und für die besonderen letzten neun Monate meiner Zeit in den USA.

Ganz großer Dank gebührt meiner ganzen Familie vor allem meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Omas.

Zuletzt möchte ich mich bei allen bedanken, die ihren Teil dazu beigetragen haben, um mir diese spezielle Zeit und diese Promotion zu ermöglichen und die in den vorangegangenen Zeilen keine Erwähnung fanden.