

## **Schlussbericht 01KI1723C**

**Projektleiter: PD Dr. rer. nat. Dr. habil. med. Albrecht von Brunn**

### **RAPID - Risikobewertung bei präpandemischen respiratorischen Infektionserkrankungen - neue zelluläre Barrieren zoonotischer, respiratorischer Viren auf Proteinebene**

#### **Teil I (Kurzbericht):**

Das Verbundprojekt wurde lange vor dem Ausbruch der zunächst rätselhaft beginnenden SARS-CoV-2 Pandemie Ende des Jahres 2019, geplant und gegründet. Es hätte zunächst niemand daran gedacht, dass unsere Zusammenarbeit mit den Projektpartnern so schnell an Relevanz gewinnen würden. Die Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung und Notwendigkeit, wissenschaftlich, aber auch praktisch auf solche Ausbrüche vorbereitet zu sein.

Ein wesentliches Ziel des Teilprojekts war die Identifizierung von elementaren Virus-Wirt Protein Interaktionen (PPIs) für ein potentiell auftretendes, neues Virus, von denen erwartet werden könnte, dass sie auch für andere neu auftretende Viren relevant sein würden. Als Modell diente das MERS-CoV. Mittels der Hefe-2-Hybrid (Y2H) Technologie wurden Interaktionen viraler ORFs mit zellulären Kontrollpunkt („checkpoint“) Genen untersucht. Während der ersten Phase des Teilprojektes wurde das MERS-CoV Orfeom in entsprechenden Hefevektoren kloniert und die Entwicklung von humanen Kontrollpunkt Genbanken initiiert bzw. weiterentwickelt. Diese wurden beim Auftreten neuer Erkenntnisse immer wieder erweitert. In weiteren Schritten wurden Experimente durchgeführt, um die Funktionsweise der viralen Proteine in tierischen und menschlichen Zellen zu untersuchen. Die Ergebnisse wurden analysiert, um Vorhersagen über Barrieren und Pathogenese zu treffen, und solche zu charakterisieren. Erwartet wurden Informationen hinsichtlich der viralen Pathogenese und möglicher Präventionsstrategien zur Bekämpfung von Coronaviren.

Für das Projekt wurden etablierte Technologien und Hochdurchsatzverfahren genutzt, die bereits erfolgreich zur Identifizierung von Protein-Interaktionen bei verschiedenen Viren eingesetzt wurden. Im Verlauf der Pandemie wurden bestehende immunologische, biochemische, zellbiologische und Y2H Technologien für SARS-CoV-2 angepasst und weiterentwickelt. Eine wichtige Basis des Projekts bildete eine umfassende Durchsicht der aktuellen Fachliteratur zu viralen Protein-Interaktionen und zellulären Signalwegen. Spezialisierte Online-Informations- und Dokumentationsdienste wurden genutzt, um aktuelle Forschungsergebnisse und Datenbanken zu erschließen. Gleichzeitig wurden umfassende Literaturrecherchen zu den weltweit schnell publizierten Daten über virale und zelluläre Protein-Interaktionen während der Pandemie durchgeführt.

Das Projekt wurde in enger Zusammenarbeit mit den verschiedenen Labors des RAPID Konsortiums „Risikobewertung bei präpandemischen respiratorischen Infektionserkrankungen“, insbesondere des Instituts für Virologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, der Med. Klinik Infektiologie und Pneumologie Charité – Universitätsmedizin Berlin, des Robert Koch-Instituts, des Institut für Virologie und Immunologie (IVI), Universität Bern, durchgeführt. Diese Kooperationen ermöglichte einen effizienten Austausch von Wissen und Ressourcen (insbesondere der Nutzung von S3 Labors), wodurch das Projekt maßgeblich beschleunigt wurde.

#### **Teil II (eingehende Darstellung):**

Die vorgegebenen Ziele wurden erreicht und der neuen Situation, das Auftreten der SARS-CoV-2 Pandemie, angepasst. Personal- und Sachmittel wurden für die Durchführung des Projekts verwendet, welches sich in entsprechenden Publikationen widerspiegelt. Reisekosten wurden für Präsentationen auf virologischen Tagungen, sowie für Reisen zu Kollaborationspartnern des Konsortiums verwendet. Unsere Arbeiten führten zur Entdeckung von Pan-Coronavirus Inhibitoren (Cyclosporin A und nicht-immunsuppressive Derivate; inklusive Patent), welches im Verlauf der Pandemie von anderen Arbeitsgruppen bestätigt wurde. Diese Hemmstoffe inhibieren ebenfalls

SARS-CoV-2. Diese Arbeiten veranlassten eine Reihe von internationalen Arbeitsgruppen dazu, ebenfalls dazu, auf diesem Gebiet zu forschen, welches sich in einer Großen Anzahl von Zitationen unserer Arbeiten widerspiegelt. Die Identifizierung der Interaktionen coronaviraler Proteine (z.B. Proteasen, Polymerasen) mit zellulären „Checkpoint“-Genen (z.B. Cyclophiline, Acetylasen, Ubiquitinasen) sowie die Beeinflussung wichtiger antiviraler Signalwege (z.B. des angeborenen Immunsystems, Interferone, p53, NFkB) eröffnet Potenziale für die Entwicklung breitbandwirksamer antiviraler Substanzen.

Ebenso eindeutige, unmittelbar sichtbare Erfolgskriterien sind hochwertige Publikationen in international renommierten Fachzeitschriften, die Teilnahme vom PL und von AG Mitgliedern an nationalen und internationalen Fachkonferenzen und entsprechende Pressemitteilungen.

#### Publikationen:

Y. Ma-Lauer, ... and Albrecht von Brunn. Oxysterole-Binding Protein targeted by SARS-CoV-2 Viral Proteins regulates Coronavirus Replication. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, section Virus and Host (accepted).

L. Xie, ... A. von Brunn, Jian Lei. Viral vector-based cancer treatment and current clinical applications. *MedComm – Oncology*. 2023;2e55.

F. Yang, ... A. von Brunn\*, Di Zhu\*. Targeting Cyclophilin A and CD147 to Inhibit Replication of SARS-CoV-2 and SARS-CoV-2-Induced Inflammation. *Mol. Pharmacology* 104, 239-254, 2023.

Berthold EJ, ... and von Brunn A. Effects of immunophilin inhibitors and non-immunosuppressive analogs on coronavirus replication in human infection models. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022, 12:958634.

Q. Ma, ... A. von Brunn, ... and S. Steiger. Soluble uric acid inhibits  $\beta$ 2 integrin-mediated neutrophil recruitment in innate immunity. *Blood* 2022. 55)

A. von Brunn. A special issue of *Viruses* (ISSN 1999-4915). This special issue belongs to the section "SARS-CoV-2 and COVID-19". Special issue guest editor: Special Issue "Broad-Spectrum Antivirals of Coronaviruses Replication", 2021.

A. Wieser, ... A. v. Brunn, ... C. Haisch. Aerosol decontamination and spatial separation using a free-space LED-based UV-C light curtain. *medRxiv* 2021.

A. Kratzel, ... A. von Brunn ... V.A. Thiel. A genome-wide CRISPR screen identifies interactors of the autophagy pathway as conserved coronavirus targets. *PLoS Biol.* 2021. 19(12): e3001490.

N.A. ten Hagen ... A. von Brunn ...H.A. Volk (2021). Discrimination of SARS-CoV-2 infections from other viral respiratory infections by scent detection dogs. *Frontiers in Medicine* 8.2245.

J. Lei, ... and von Brunn, A.\* (2021). The SARS-unique domain (SUD) of SARS-CoV and SARS-CoV-2 interacts with human Paip1 to enhance viral RNA translation. *EMBO J.* 40, 11, e102277.

C.Liu, von Brunn, A., Zhu, D. (2020). Cyclophilin A and CD147: novel therapeutic targets for the treatment of COVID-19. *Med. Drug Disc.* 7, 100056.

R. Zhou, R., R. Zeng, von Brunn, A., Lei, J. (2020). Structural characterization of the C-terminal domain of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Molecular Biomedicine* 1:2.

N.N. Poulsen, ... A. von Brunn, M. Hornum and J.M. Blomberg (2020) Cyclosporine and COVID-19: Risk or Favorable? *American J. Transplantation (Am J Transplant.* 2020; 20:2975-2982.

C. Li, P. Romagnani, A. von Brunn, H.J. Anders. (2020). SARS-CoV-2 and Europe: timing of containment measures for outbreak control. *Infection* 48(3):483-486. doi: 10.1007/s15010-020-01420-9

L. Zhang,... A. von Brunn ... R. Hilgenfeld (2020). Alpha-ketoamides as broad-spectrum inhibitors of coronavirus and enterovirus replication Structure-based design, synthesis, and activity assessment. *J. Medicinal Chemistry*: 63(9):4562-4578. doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b01828

Y. Ma-Lauer, ... and A. von Brunn (2020). Influences of cyclosporin A and non-immunosuppressive derivatives on cellular cyclophilins and viral nucleocapsid protein during human coronavirus 229E replication. *Antiviral Research* 173, 104620.

A. Badolo, ... A. von Brunn A, Weiss SR, R. Hilgenfeld (2018). Third Tofo Advanced Study Week on Emerging and Re-emerging Viruses, 2018. *Antiviral Res.* 2019: 162:142-150.

#### Pressemitteilungen:

LMU München 19.04.2021: How SARS coronaviruses reprogram host cells to their own benefit:

<https://www.lmu.de/en/newsroom/news-overview/news/how-sars-coronaviruses-reprogram-host-cells-to-their-own-benefit.html>

LMU München, Med. Fak. 20.04.2022: Wie SARS-Coronaviren die menschliche Zelle umfunktionieren:

<https://www.med.lmu.de/aktuell/2021/sars/index.html>

Uni Lübeck 19.04.2021: SARS-Coronaviren funktionieren die menschliche Zelle um:

<https://www.uni-luebeck.de/aktuelles/pressemittteilung/artikel/sars-coronaviren-funktionieren-die-menschliche-zelle-um.html>

### Teil III:

Das Projekt des RAPID Konsortiums hat durch die Konstruktion neuer, auf zunächst MERS-CoV spezialisierten Y2H-cDNA-Bibliotheken („checkpoint“ Genbanken) und die Anpassung und Weiterentwicklung immunologischer, biochemischer und zellbiologischer Technologien an SARS-CoV-2 wichtige Beiträge zur Vorbereitung auf zoonotische respiratorische Bedrohungen geleistet. Durch die Identifizierung und Charakterisierung von Protein-Interaktionen auf zellulärer Ebene konnten wertvolle Erkenntnisse zur Übertragbarkeit und Pathogenese von Viren gewonnen werden, die für die Prävention und Bekämpfung zukünftiger Pandemien von großer Bedeutung sind.

Ein Hauptziel des Projekts war es, anhand von Coronaviren präpandemische Fragestellungen zu bearbeiten und Werkzeuge zu entwickeln, die im Falle einer Pandemie schnell anwendbar sind. Die überraschende SARS-CoV-2 Pandemie im Jahr 2020 hat die Bedeutung dieser Arbeiten drastisch unterstrichen. Im Fokus des Teilprojekts stand die Identifizierung von essentiellen Virus-Wirt-Protein-Interaktionen (PPIs, zunächst anhand des MERS-CoV Orfeoms), die auch für andere neu auftretende Viren relevant sind. Im Rahmen der SARS-Cov-2 Pandemie konzentrierten wir uns darauf, mit Hilfe der Hefe-2-Hybrid (Y2H) Technologie (mit anschließenden Untersuchungen in Säugerzellen) Interaktionen zwischen viralen ORFs und zellulären Checkpoint-Genen zu finden, welche als mögliche Ziele für antivirale Therapien dienen können.

In unseren früheren Arbeiten im Rahmen der SARS-CoV Pandemie konnten wir mittels unserer Y2H- und weiterer Techniken zelluläre Cyclophiline als wichtige Interaktionspartner von verschiedenen Coronavirus ORFs identifizieren. Für diese konnten wir nachweisen, dass sie als Kontrollpunkt Proteine essentiell für die CoV Replikation sind. Wir konnten deren Funktionshemmer (Cyclosporin A und nicht-immunsuppressive Derivate Alisporivir und NIM811) als Pan-Corona Hemmstoffe identifizieren. Ähnliche Sensitivitäten wurde auch für Sars-CoV-2 festgestellt.

Im Rahmen dieses und weiterer Coronavirus Projekte wurden bereits bzw. werden sechs naturwissenschaftliche bzw. medizinische Doktoranden promoviert. Weitere Interaktionsanalysen von MERS-CoV und SARS-CoV-1/-2 ORFs mit zellulären Proteinen haben mehrere Kontrollpunkt-Proteine identifiziert, die für die Virusreplikation essentiell sind und als mögliche Ziele für antivirale Therapien dienen könnten. Einige wichtige Ergebnisse sind. So konnten wir zeigen, dass die MERS-CoV PLprotease den NF- $\kappa$ B Signalweg durch die Acetylase HDAC1 (Histone deacetylase 1) und die Ubiquitinase MKRN2 (Makorin Ring Finger Protein 2) unterdrückt. Der nukleäre Faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) ist ein zellulärer Transkriptionsfaktor, der die Expression von Zytokinen wie IL-6, IL-12 und TNF- $\alpha$  induziert und eine wichtige Rolle in der antiviralen Immunantwort spielt. HDAC1 zielt auf die NF- $\kappa$ B Untereinheit p65 und reguliert die NF- $\kappa$ B-induzierte Genexpression. MERS-CoV PLpro verursacht eine erhöhte Expression von HDAC1, welches zu einer verstärkten Deacetylierung von p65 und Unterbindung funktionsfähiger NF- $\kappa$ B Signalwege führt. MKRN2 zielt ebenfalls auf die NF- $\kappa$ B Untereinheit p65 durch Poly-ubiquitinierung und proteasomale Degradation. MERS-CoV PLpro führt zu einer Akkumulation von MKRN2. Hierdurch werden die NF- $\kappa$ B Signalwege negativ reguliert. Somit

beeinflusst die MERS-CoV PLpro wichtige NF- $\kappa$ B Funktionen durch Unterdrückung der Signalwege beider Kontrollpunkt-Proteine.

Insbesondere mit Beginn der SARS-CoV-2 Pandemie wurden eine Reihe von Laborpraktika, einschließlich Bachelorarbeiten, im Rahmen der studentischen, naturwissenschaftlichen Ausbildung und Lehre durchgeführt.

Unsere systembiologischen Ansätze komplementieren den Anspruch des RAPID Konsortiums auf präpandemische Risikobeurteilung durch Agentien über die Identifizierung zellulärer Barriere Marker auf Proteinebene. Durch die Identifizierung der Interaktionen viraler Proteine (e.g. Proteasen, Polymerasen) mit zellulären „checkpoint“ Genen (e.g. Cyclophiline, Acetylasen, Ubiquitinasen) und die Beeinflussung wichtiger antiviraler Signalwege (e.g. des angeborenen Immunsystems, Interferone, p53, NF $\kappa$ B) ergeben sich Potentiale zu Entwicklung antiviraler Substanzen mit Breitbandwirkung). Weitere wissenschaftliche Verwertungsmöglichkeiten bestehen in einer Reihe von Publikationen.

Die Arbeits-, Zeit- und Ausgabenplanung hatte sich insofern geändert, als eine kostenneutrale Verlängerung beantragt und genehmigt wurde. Erfolg und Durchführbarkeit der Verbundarbeit waren infolge der SARS-CoV-2 Pandemie nicht gefährdet, sondern wurden sogar befördert. Als Coronavirus Labor hatten wir die Möglichkeit, während der Pandemie weiterzuarbeiten.

Wirtschaftliche Verwertungsmöglichkeiten ergeben sich aus der Identifizierung inhibitorischer Moleküle, welche die Komplexbildung viraler Proteine mit weiteren wichtigen zellulären Proteinen verhindern. Basis hierfür können neue Strukturvorhersage Programme sein. Diese ermöglichen, vorhergesagte Strukturen zunächst *in silico* gegen „small molecule“ Datenbanken, in welchen Millionen von kleinen Molekülen gespeichert sind, laufen zu lassen, um potentielle inhibitorische Moleküle zu identifizieren. Dies stellt einen neuen, einzigartigen und vielversprechenden Weg der antiviralen, möglicherweise therapeutischen Intervention dar. Letzteres ist dringend notwendig, da e.g. die wenigen bisherigen anti-SARS-CoV-2 Therapeutika nicht allumfassend und wirklich zufriedenstellend wirken.