

Schlussbericht zum Projekt mit dem FKZ: 01DP21013

Zuwendungsempfänger (ZE): Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI),
Inhoffenstr. 7, 38124 Braunschweig

Ansprechpartner beim ZE: Prof. Ursula Bilitewski, 0531-61811010, ursula.bilitewski@helmholtz-hzi.de

Tim Schwetje, 0531-61812209, tim.schwetje@helmholtz-hzi.de

Laufzeit: 01.11.2021 – 31.10.2024

Vorhaben

Verbundprojekt: Entdeckung neuer antiviraler Substanzen mit Kulturen filamentöser Pilze aus Europa und Thailand als Substanzquellen

Teilvorhaben des HZI: Neue antivirale Naturstoffe aus filamentösen Pilzen der Stammsammlung des HZI; Antiviralfun JFS20ST-127

Aufgabenstellung

Das Verbundprojekt verfolgte 3 übergeordnete Ziele:

- 1) Die Anwendung von Pilzen als Quelle für neue Naturstoffe sollte weiter vorangetrieben werden. Dazu sollte die Biodiversität insbesondere in Bezug auf die Taxonomie von Pilzen an den Partnerstandorten in Thailand, in der Tschechische Republik und in Deutschland charakterisiert werden.
- 2) Die von Pilzkulturen erhaltenen Extrakte und auch Reinsubstanzen sollten auf antimikrobielle, vor allem aber auf antivirale Eigenschaften untersucht werden.
- 3) Die internationale Zusammenarbeit zwischen den Gruppen des Verbundvorhabens sollte gefördert werden.

Wissenschaftlich – technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Die Covid-19 – Pandemie hat deutlich gemacht, dass ein dringender Bedarf an Wirkstoffen zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten besteht. Insbesondere für virale Infektionen stehen nur wenige Therapeutika zur Verfügung. Zur Bekämpfung von Covid-19 wurden weltweit vor allem solche Substanzen auf anti – SARS-CoV-2 – Wirkung untersucht, von denen schon biologische Wirkungen bekannt waren oder die sogar schon eine Zulassung als Medikament besaßen. Diese Ansätze waren jedoch bei Antragstellung nicht erfolgreich, so dass auch damit begonnen wurde, ganz neue Substanzen in die Untersuchungen einzubeziehen. Eine noch wenig erschlossene Quelle für antivirale Wirkstoffe sind Sekundärmetabolite, die von Pilzen produziert werden, während es erste Beispiele von bakteriellen Sekundärmetaboliten mit antiviralen Wirkungen bereits gab (Martinez et al., Microb. Cell Fact. 12 (2013) 85).

Am HZI waren die biotechnologische Infrastruktur zur Isolierung und taxonomischen Charakterisierung von Pilzen, zur Herstellung und Fraktionierung von Extrakten aus Pilzkulturen, zur metabolischen Analyse der Extrakte sowie Erfahrung mit der Optimierung der Ausbeuten der Kulturen bereits

vorhanden. Außerdem waren Tests zur Charakterisierung insbesondere der antimikrobiellen Bioaktivität von chemischen Substanzen etabliert.

Im Rahmen des Projektes sollten neue Extrakte von Pilzen insbesondere auf antivirale Wirkungen untersucht werden. Am HZI standen das Coronavirus SARS-CoV-2 und das Chikungunya-Virus (CHIKV), beides RNA-Viren, im Mittelpunkt. Beide Viren erfordern Labore der biologischen Sicherheitsstufe 3. Beim thailändischen Partner BIOTEC sollte noch das Dengue-Virus berücksichtigt werden. Da sich Viren nur in vitalen tierischen Zellen vermehren können, ist die Erfassung der toxischen Eigenschaften auf tierische Zellkulturen (Zytotoxizität) unerlässlich. Außerdem wurden Extrakte beim tschechischen Partner (Tschechische Akademie der Wissenschaften, Prag) auf ihre antimikrobiellen Eigenschaften untersucht.

Ablauf des Vorhabens

WP1	Etablierung und Anpassung der antiviralen Screeningassays	Monate 1 – 6
WP2	Untersuchung antiviraler Substanzeigenschaften	Monate 6 – 36
WP3	Isolierung neuer Sekundärmetabolite	Monate 1 – 36
WP4	Umfangreiche Bioprofilierung - nicht nur am HZI	Monate 1 - 36
WP5	Biotechnologische Produktion – nicht notwendig	
WP6	Vergleich mit bekannten biologisch aktiven Substanzen	Monate 20 - 36

Wesentliche Ergebnisse und Zusammenarbeit mit anderen

WP1 Etablierung und Anpassung der antiviralen Screeningassays

Meilenstein 1: Verfügbarkeit von Testprotokollen zur Erfassung der antiviralen Aktivität von Sekundärmetaboliten

Durch die AG COPS wurden die Screeningassays gegen das Coronavirus SARS-CoV-2 und gegen das Chikungunya-Virus (CHIKV) im S3, bzw S3** - Labor des HZI etabliert. Da das S3**-Labor weniger frequentiert war, wurden die meisten Untersuchungen mit dem CHIKV durchgeführt. Beide Tests konnten in 384 well – Platten mit Testvolumina von nur 50 µL durchgeführt werden. Außerdem wurde das Testprotokoll so optimiert, dass nach der Infektion das Virus nicht entfernt wurde und kein erneuter Medienwechsel stattfand. Dadurch war der Verbrauch an Testsubstanzen bzw. Pilzextrakten minimal. Die Tests beruhten auf der Detektion der von den Viren verursachten zytopathischen Effekte mit Hilfe des CellTiterGlo – Testes. Dieser Test beruht auf der Erfassung des ATP-Gehaltes von Zellen durch Zugabe des Enzyms Luziferase und des Enzysubstrates Luziferin. In Gegenwart von Sauerstoff und Mg²⁺-Ionen korreliert die entstehende Lichtintensität mit dem ATP-Gehalt und damit mit der Vitalität der Zellen. Eine Infektionsdauer von 72h erwies sich als optimal, um eine deutliche Unterscheidung zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen zu erlauben.

Mit ähnlichen zeitlichen Abläufen wurde auch die Zytotoxizität der Extrakte und Reinsubstanzen ermittelt. Allerdings wurde die Zellvitalität aus Kostengründen mit dem Alamar-Blue – Test quantifiziert.

WP2 Untersuchung antiviraler Substanzeigenschaften, WP3 Isolierung neuer Sekundärmetabolite

Meilenstein 2: Identifizierung von gereinigten Naturstoffen oder Pilzextrakten mit antiviralen Eigenschaften

Meilenstein 3: Identifizierung von neuen Sekundärmetaboliten in Pilzextrakten mit antiviraler Wirkung

In Zusammenarbeit mit den Gruppen von M. Kolarik (Tschechische Republik) und J. Luangsa-Ard (Thailand) wurden verschiedene Pilzarten taxonomisch charakterisiert und eingeordnet, wie zum Beispiel Vertreter der Hypoxylaceae (s. Publikationsliste). Dabei wurden auch Extrakte dieser Pilze hergestellt und auf ihre chemische Zusammensetzung analysiert.

Dr. Nopporn Chutiwitoonchai (BIOTEC, Thailand) war vom 27.04. – 07.06.2022 am HZI / AG COPS zu Gast, um Untersuchungen zu antiviralen Eigenschaften von Pilzextrakten zu unterstützen. Dazu hatte er bereits in seinem Heimatlabor mehr als 1000 Extrakte hergestellt und zum HZI verschickt. Erste Untersuchungen zeigten, dass einige der Extrakte bakteriell kontaminiert waren und daher nicht verwendet werden konnten. Von den anderen Extrakten wurden zunächst zytotoxische Eigenschaften gegen die Wirtszellen des Coronavirus (VeroE6) und des CHIKV (Huh7) ermittelt. Aus diesen Voruntersuchungen resultierten ca. 200 Extrakte, die in der Folge auf antivirale Eigenschaften untersucht wurden. Von diesen Extrakten reduzierten im Primärscreen (nur eine Konzentration) 20 die Infektiosität von CHIKV auf < 40%, ohne gleichzeitig die Vitalität der Zellen zu beeinträchtigen. Im SARS-CoV-2 Test zeigten 10 Extrakte die entsprechenden Eigenschaften. Durch Verdünnungen konnte von 5 Extrakten der antivirale Effekt bestätigt werden. Allerdings lagen die Konzentrationen alle bei > 100 µg/mL. Außerdem zeigten sich bei diesen Konzentrationen auch zytotoxische Effekte, so dass der Selektivitätsindex bei keinem Extrakt > 4 war. Von einigen Pilzen konnten am HZI neue Extrakte hergestellt werden. Dabei zeigte sich, dass eine umfangreiche Medien- und Kultivierungsoptimierung notwendig ist, um reproduzierbare Aktivitätsdaten zu erhalten.

Da etliche Extrakte zytotoxische Eigenschaften besaßen, die die antiviralen Eigenschaften überdeckten, wurden in der Folge neue Substanzen, die durch die chemische Analyse entdeckt wurden, isoliert und als Reinsubstanz auf antivirale Eigenschaften gegen CHIKV getestet. Dies führte bereits zu mehreren gemeinsamen Publikationen (Publikationen 1, 5, 6). Allerdings waren die Wirksamkeiten der Sekundärmetabolite in der Regel nicht sehr hoch ($IC_{50} > 10 \mu M$). Nur verschiedene Epiechinodol-Derivate, die erst kürzlich von Vertretern der Gattung Amylostereum isoliert worden waren, zeigten IC_{50} -Werte < 10 µM (Publikation in Vorbereitung).

Daher wurde begonnen, die CRISPR-Cas9 – Technologie zur Inaktivierung von Genen in Wirtszellen zu etablieren, um damit den Infektionsprozess besser zu verstehen und dadurch möglicherweise neue Angriffspunkte für Wirkstoffe zu entdecken und Wirkmechanismen der Substanzen aufklären zu können. Diese Untersuchungen führten zum Beispiel zur Entdeckung der Bedeutung von Methylierungsreaktionen für die CHIKV-Infektion, so dass Methyltransferasen als neue antivirale Targets weiter untersucht werden (Publikation in Vorbereitung). Durch zellfreie Target-basierte Tests lässt sich das Problem der Zytotoxizität von Extrakten umgehen.

WP4 Umfangreiche Bioprofilierung - nicht nur am HZI

Meilenstein 4: Biologische Wirkungsprofile neuer Sekundärmetabolite

Zur Profilierung der Produktion von Sekundärmetaboliten aus Pilzen gehört auch die Identifizierung und Klassifizierung der Pilzproduzenten. Wie die bereits erschienenen Publikationen zeigen, wurde hier die erfolgreiche Zusammenarbeit mit unseren internationalen Partnern erfolgreich fortgesetzt (Publikationen 3, 4, 7). Allerdings erwies sich die reproduzierbare Produktion im größeren Maßstab als sehr aufwändig und wurde daher im Rahmen des Projektes nicht fortgeführt.

Neben den Produzentenstämmen wurden auch die identifizierten neuen Sekundärmetabolite biologisch charakterisiert. In Kooperation mit M. Kolarik (Tschechische Republik) standen vor allem antimikrobielle und zytotoxische Eigenschaften und zusätzlich Wirkungen gegen bakterielle Biofilme im Mittelpunkt. Hier zeigten insbesondere die Farinosone aus dem Pilz *Samsoniella aurantia* vielversprechende Eigenschaften (Publikation 2).

WP6 Vergleich mit bekannten biologisch aktiven Substanzen

Meilenstein 5: Vergleich der Bioprofile der neuen Sekundärmetabolite mit Bioprofilen von Repurposing-Substanzen

In Ergänzung zu den Untersuchungen neuer Sekundärmetabolite aus Pilzen wurde die Teilbibliothek aus 2464 bereits bekannten bioaktiven Substanzen von der Europäischen Forschungsinfrastruktur EU-OPENSOURCE auf antimikrobielle und antivirale Eigenschaften profiliert. Von diesen Substanzen zeigten etwa 3% eine Wirkung gegen wenigstens eine der Gram-negativen Bakterien. Dagegen lag der Anteil an Substanzen mit Wirkungen gegen CHIKV oder SARS-CoV-2 bei < 1% (Publikation in Vorbereitung). Dies deckt sich in etwa mit den Erfolgsaussichten, die bei den Naturstoffextrakten beobachtet wurden, wobei zu beachten ist, dass es sich bei der EU-OPENSOURCE – Teilbibliothek um eine vorselektierte Substanzbibliothek handelt.

Vergleich mit dem ursprünglichen Arbeits- und Kostenplan

Arbeitsplan

Die Arbeiten konnten im wesentlichen wie geplant durchgeführt werden, so dass jetzt von einer Vielzahl von Extrakten und Sekundärmetaboliten aus Pilzen Daten vorliegen, die eine Beurteilung in Bezug auf antivirale Eigenschaften zulassen. Allerdings hatten sich bereits bei den ersten Studien die Mehrzahl der Extrakte als zytotoxisch erwiesen, so dass in der Folge vor allem Reinsubstanzen untersucht wurden. Außerdem ergaben sich Schwierigkeiten bei der ursprünglich geplanten aktivitätsgesteuerten Fraktionierung von Extrakten, da die dafür benötigte Infrastruktur und das Know-How zwar am HZI vorhanden waren, aber dafür größere Mengen der Extrakte benötigt wurden, so dass dies nur für solche Stämme möglich war, die bereits am HZI vorhanden waren, und nicht für neue Isolate der tschechischen oder thailändischen Partner. Hier zeigte sich dann als weiteres Problem, dass Aktivitätsdaten, die mit den ursprünglichen Extrakten gewonnen worden waren, nach Kultivierung am HZI nicht immer reproduziert werden konnten. Deshalb wurde auch der Aspekt der Prozessoptimierung und Vergrößerung des Kultivierungsmaßstabs nicht weiter verfolgt.

Durch diese Einschränkungen war die Zahl der Proben, die auf antivirale Eigenschaften untersucht wurden, geringer als ursprünglich geplant. Dadurch war mehr Kapazität für die Etablierung von Methoden zur Aufklärung von Wirkmechanismen vorhanden. Diese Arbeiten wurden auf das CHIKV fokussiert, da das für dieses Virus benötigte S3**-Labor nicht so stark frequentiert war wie das für SARS-CoV-2 benötigte S3-Labor und dadurch mehr Flexibilität bei der Durchführung der Arbeiten bestand. Auftakt der mechanistischen Untersuchungen waren „Time-of-addition“ – Experimente, bei denen der Zeitpunkt der Substanzanwesenheit variiert wurde. In der Folge wurde dann die CRISPR-Cas9 – Technologie etabliert, bei der gezielt einzelne Gene der Wirtszellen inaktiviert werden. Dadurch kann ihr Beitrag zur Infektion oder zur Wirkung der Substanzen aufgeklärt werden. Zur Validierung der Inaktivierung des jeweiligen Gens werden PCR-Methoden benutzt.

Kostenplan

Ausgelöst durch die Covid19-Pandemie mussten vor allem die Reisepläne geändert werden, da erst 2022 Reisen in die Partnerländer wieder möglich wurden. Das Kick-off Treffen führten wir daher im Januar 2022 noch als virtuelles Treffen durch. Unsere thailändische Partnerin, Dr. Jennifer Luangsa-ard (BIOTEC), organisierte für den 17.03.2022 einen Workshop mit dem Schwerpunkt „Mycological biodiversity research and drug discovery based on Thai fungi“. An ihm nahmen C. Lambert und K. Schmidt aus der Gruppe von Prof. M. Stadler teil. Wegen eines positiven Corona-Testergebnisses konnte Prof. M. Stadler nicht reisen. Im Anschluss an den Workshop reisten C. Lambert und K. Schmidt noch mit zum Partnerinstitut BIOTEC. Dort lernten sie künftige Gäste ihrer Abteilung kennen und diskutierten mit ihnen die am HZI geplanten Arbeiten.

Das Westerdijk Spring Symposium „Rise of the Fungi“ in Amsterdam im April 2022 konnte ebenfalls bereits als Präsenz-Symposium durchgeführt werden. Da an ihm auch unsere thailändischen Partner teilnahmen, beschlossen wir, im Anschluss ein Projekttreffen am HZI durchzuführen. Dr. Nopporn Chutiwitoonchai, BIOTEC, blieb im Anschluss an das Projekttreffen für einen Forschungsaufenthalt am HZI (s. WP2). Auch das Projekttreffen 2023 fand im Anschluss an das Westerdijk Spring Symposium „Fungal Evolution“ statt, dieses Mal jedoch beim tschechischen Partner in Prag. Das Abschluss-treffen wurde mit dem International Mycology Congress (IMC12) in Maastricht, Niederlande, kombiniert und am HZI durchgeführt, da dieser Kongress auch von unseren Partnern besucht wurde.

Die für das Projekt beschafften Materialien wurden wie geplant für die Durchführung der viralen Tests (z.B. Zellkulturen, Pipettenspitzen, Mikrotiterplatten, Testreagenzien), die Extraktion und Analyse der Metabolite aus den Extrakten (verschiedenen Lösungsmittel), sowie die Validierung von CRISPR-Cas9 – Geninaktivierungen eingesetzt.

Bereits erfolgte Verwertung der Ergebnisse durch Veröffentlichungen

Die erhaltenen Ergebnisse wurden bei Projekttreffen vom 19.04. – 21.04.2023 in Prag und vom 07.08. – 09.08.2024 in Braunschweig vorgestellt. Außerdem wurde das Projekt bei dem Workshop „Mycological Biodiversity Research and Drug Discovery Based on Thai Fungi“ im März 2022 in Thailand und bei dem International Mycology Congress (August 2024) in Maastricht präsentiert.

Einige der im Projekt gewonnenen Daten wurden bereits in wissenschaftlichen Journalen publiziert (die HZI-externen Autor:innen sind in kursiv gekennzeichnet):

- 1) Katharina Schmidt, Esteban Charria-Girón, Tatiana E. Gorelik, Christian Kleeberg, Jackson M. Muema, Simone Heitkämper, Bart Verwaaijen, Eric Kuhnert, Jennifer Gerke, Jörn Kalinowski, Kevin D. Hyde, Marc Stadler, Russell Cox, Frank Surup; *Lienhwalides: Unique Tropolone–Maleidride Hybrids from *Hypoxylon lienhwacheense**, ChemBioChem (2025) <https://doi.org/10.1002/cbic.202500037>
- 2) Rita Toshe, Syeda J. Khalid, Blondelle Matio Kemkuignou, Esteban Charria-Girón, Paul Eckhardt, Birthe Sandargo, *Kunlapat Nuchthien*, J. Jennifer Luangsa-ard, Till Opatz, Hedda Schrey, Sherif S. E-bada, Marc Stadler; *Antibiofilm and cytotoxic metabolites from the entomopathogenic fungus *Samsoniella aurantia**, Beilstein J. Org. Chem (2025) 21, 327–339; <https://doi.org/10.3762/bjoc.21.23>
- 3) Marjorie Cedeño-Sanchez, Esteban Charria-Girón, Christopher Lambert, J. Jennifer Luangsa-Ard, Cony Decock, Raimo Franke, Mark Brönstrup, Marc Stadler; *Segregation of the genus Parahypoxylon (Hypoxylaceae, Xylariales) from Hypoxylon by a polyphasic taxonomic approach*; MycoKeys (2023) 95, 131-162; doi: 10.3897/mycokeys.95.98125
- 4) Esteban Charria-Girón, Alberto Miguel Stchigel, Adéla Čmoková, Miroslav Kolařík, Frank Surup, Yasmina Marin-Felix; *Amesia hispanica* sp. nov., Producer of the Antifungal Class of Antibiotics Dactylfungins; J. Fungi (2023) 9, 463; <https://doi.org/10.3390/jof9040463>

5) Winnie Chemutai Sum, Sherif S Ebada, Jackson M Muema, Harald Kellner, Attila Mándi, Tibor Kurtán, Marc Stadler; Hermansones A and B: Bioactive naphthazarin congeners from the European crust fungus *Hermanssonia centrifuga*; *Fitoterapia* (2024)
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2024.106261>

6) Caren Holzenkamp, Jan-Peer Wennrich, Jackson M. Muema, Samad Ashrafi, Wolfgang Maier, Marc Stadler, Sherif S. Ebada; Laburnicotides A–F: Acyclic *N*-Acetyl Oligopeptides from the Nematode-Cyst-Associated Fungus *Laburnicola nematophila*; *ACS Omega* (2024) 9, 21658 – 21667,
<https://doi.org/10.1021/acsomega.4c02719>

7) Marjorie Cedeño-Sanchez, Tian Cheng, Christopher Lambert, *Miroslav Kolarik*, Eric Kuhnert, Russell J. Cox, Jörn Kalinowski, Bart Verwaaijen, Marc Stadler; Unraveling intragenomic polymorphisms in the high-quality genome of Hypoxylaceae: a comprehensive study of the rDNA cistron; *Mycol. Prog.* (2024) 23:5 <https://doi.org/10.1007/s11557-023-01940-2>

Verwertungsplan

Da keine neuen Naturstoffe mit vielversprechenden antiviralen Eigenschaften entdeckt wurden, wurden keine Patente angemeldet. Auch der Transfer zur Industrie war daher nicht möglich.

Die Erfahrungen aus diesem Projekt bilden aber die Grundlage für künftige Kooperationen zwischen den Abteilungen MWIS (Marc Stadler) und CBIO (Mark Brönstrup) und fließen auch in das von der EU geförderte Verbundvorhaben COMBINE ein, in dem es um antivirale Wirkstoffe für den Einsatz bei künftigen Pandemien geht. In Zukunft könnten die durch die mechanistischen Untersuchungen entdeckten möglichen Angriffspunkte weiter untersucht und für die Wirkstoffsuche ausgenutzt werden. Dazu gehören die zum Schwefelstoffwechsel gehörenden Methionin- und Cystein – Reaktionszyklen, sowie durch Methyltransferase katalysierte Methylierungsreaktionen.