

Zusammenfassung

Die Bekämpfung viraler Infektionen stellt durch das schnelle Auftreten Medikamenten-resistenter Virusvarianten eine immer neue Herausforderung an die Entwicklung neuartiger Inhibitoren und Inhibitionsstrategien dar. Dies gilt insbesondere für Erreger, wie das humane Immundefizienz Virus (HIV), die durch eine hohe Mutationsrate charakterisiert sind. Eine der häufigsten Behandlungsstrategien zielt auf die spezifische Hemmung viruseigener Enzyme ab, die keine zellulären Homologe besitzen und somit hochspezifisch inhibiert werden können. Allerdings können hier bereits einzelne Punktmutationen ausreichen, um dem HI-Virus eine Resistenz zu verleihen. Ein neuer innovativer Ansatz beruht deshalb auf der Hemmung von Wirtszellproteinen, die für die Virusreplikation essenziell sind. Einem derartigen indirekten Eingriff in ihren Lebenszyklus können sich Viren weitaus schwerer entziehen. Hier besteht die besondere Herausforderung darin, eine inhibitorische Wirkung zu erreichen und gleichzeitig zelltoxische Effekte im Wirt zu vermeiden.

Die Nutzung entsprechender zellulärer Zielstrukturen als Angriffspunkte für neue Therapieansätze ist das zentrale Thema der hier vorliegenden Arbeit. So wurden zum Einen potenzielle Inhibitoren der Aktivierung des zellulären HIV-1 Kofaktors eIF-5A untersucht, zum Anderen wurden neue synthetische Peptide identifiziert, die eine antivirale Aktivität bei Infektionen mit HIV-1 und Herpes Simplex Viren (HSV) aufweisen. Schließlich wurden Untersuchungen zum Wirkmechanismus dieser Inhibitoren durchgeführt.

Der aktivierte eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF-5A) ist ein für die HIV-1 Replikation essenzielles zelluläres Protein, welches als Kofaktor des viralen Rev Regulatorproteins für die nukleozytoplasmatische Translokation intronhaltiger viraler mRNA benötigt wird. Als bisher einziges Säugerzellprotein enthält eIF-5A in seiner aktiven Form die außergewöhnliche Aminosäure Hypusin. Es handelt sich hierbei um die Modifikation eines Lysinrestes, die hochspezifisch in zwei aufeinander folgenden enzymatisch katalysierten Schritten erfolgt. Es konnte bereits früher gezeigt werden, dass eine Hemmung der hierfür verantwortlichen Enzyme Deoxyhypusinsynthase (DHS) oder Deoxyhypusinhydroxylase (DOHH) zu einer effizienten Hemmung der HIV-1 Replikation führt. Bislang verwendete Inhibitoren der DOHH zeigten jedoch toxische Nebenwirkungen. Die DOHH wurde dabei ausschließlich mit unspezifischen Eisenchelatoren inhibiert, wobei kein Effekt auf den Rev-vermittelten RNA-Transport nachgewiesen werden konnte. Für die DHS-Inhibitoren wurde dagegen eine Hemmung des mRNA Transports über den von Rev frequentierten CRM1 Kernexportweg beschrieben, was dieses Enzym zu einem attraktiven Zielprotein für neue Inhibitoren machte.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden deshalb sieben neue potenzielle DOHH-Hemmstoffe hinsichtlich ihrer antiviralen Aktivität untersucht, deren Struktur sich an den bekannten Inhibitoren orientierte.

Eine der Verbindungen, JK8-2, hemmte die HIV-1 Replikation zu über 70%. Funktionelle Studien zeigten jedoch keinen Einfluss von JK8-2 auf die Rev-Funktion und ebenso keine Spezifität für die DOHH. Durch weiterführende Untersuchungen konnte der Wirkmechanismus einem inhibitorischen Effekt vor oder während der Provirusintegration zugeordnet werden.

Durch den Einsatz von RNA-Interferenz (RNAi) sollte anschließend geklärt werden, ob der durch die DOHH katalysierte zweite Schritt der Hypusinmodifikation tatsächlich essenziell für die Rev-Funktion ist. Mit Hilfe zahlreicher RNAi-Methoden konnte in stabilen DOHH *knockdown* Zellen die DOHH-Proteinmenge um 70% vermindert werden. Funktionelle Untersuchungen zeigten aber weder einen Einfluss auf Rev, noch auf die Replikation von HIV-1. Die DOHH-Reaktion ist demnach entweder nicht essenziell für die HIV-Replikation oder die nach dem *knockdown* verbleibende Proteinmenge immer noch ausreichend für die Rev-Funktion.

Auf der Suche nach neuen Inhibitoren der DHS wurden sechs Verbindungen analysiert, die strukturelle Ähnlichkeiten mit dem DHS-Substrat Spermidin aufweisen. Von den getesteten Verbindungen zeigte ein Wirkstoff, der DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff DAPI, eine ausgeprägte antivirale Wirkung in HIV-1 infizierten Zellen, ohne deren allgemeinen Metabolismus, Zellzyklus oder Apoptoseverhalten zu beeinflussen. Die Spezifität für DHS war verglichen mit dem bekannten Inhibitor CNI-1493 jedoch schwach und ein Einfluss auf die Rev-Funktion nicht nachweisbar.

Das HI-Virus wird meist beim ungeschützten Geschlechtsverkehr übertragen und infiziert Leukozyten. Die Infektion schwächt das Immunsystem bis es zum Ausbruch von AIDS und zum Tod durch opportunistische Erkrankungen kommt. Zu solchen opportunistischen Erregern zählen die weit verbreiteten Herpes Simplex Viren (HSV), welche ebenfalls sexuell übertragen werden können.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde für die ursprünglich als Inhibitoren der bakteriellen Sepsis beschriebenen SALP (*synthetic anti-lipopolysaccharide peptides*) auch eine ausgeprägte antivirale Wirkung, sowohl in der HIV-1 Infektion als auch bei der Infektion mit HSV nachgewiesen, ohne toxisch auf die Zellen zu wirken. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Behandlung von Zellen mit den kationischen Peptiden die initiale Bindung von Viruspartikel und Zielzelle effizient hemmt. Durch konfokal- und elektronenmikroskopische Untersuchungen, sowie Isothermalen Titrationskalorimetriemessungen wurde auf der Zelloberfläche ubiquitär exprimiertes Heparansulfat als SALP-Bindungspartner identifiziert. Heparansulfat wird als universeller zellulärer Anheftungspartner von vielen Pathogenen genutzt. Somit stellen SALP vielversprechende Kandidaten als Komponente von topisch applizierten Breitband-Mikrobiziden zur Verhinderung von sexuell übertragbaren Virusinfektionen dar.