

Aus der Abteilung Virologie,
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
(Direktor: Prof. Dr. Bernhard Fleischer)

**Potente und selektive Inhibition der NTPase/Helikase-Aktivitäten des West-Nil-
Virus und anderer Mitglieder der Familie der *Flaviviridae* durch Ring-
Expanded-Nucleosides und Nukleotidanaloga (RENs)**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von
Andrea Haaß
aus Essen

Hamburg, 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzende:

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

1. Arbeitshypothese und Fragestellung	2
2. Einleitung	3
2.1. <i>Flaviviridae</i>	3
2.2. Die Inhibition der NTPase/Helikasen	8
3. Material und Methoden	12
3.1. Material	12
3.2. Zellkultur	12
3.3. Aufreinigung der NTPase/Helikasen	13
3.4. Das ATPase-Assay	14
3.5. Das Helikase-Assay	15
3.6. Die Dünnschichtchromatographie	15
3.7. Affinitätsmarkierung mit [¹⁴ C]-FSBA	16
3.8. Immunoblot	16
3.9. Die Herstellung von Substraten für die Helikase-Reaktion	17
3.10. Weitere Methoden	17
3.11. Die Inhibitoren	18
4. Ergebnisse	22
4.1. Die NTPase/Helikasen	22
4.2. Die Helikase-Reaktion	23
4.3. Die NTPase-Reaktion	29
5. Diskussion	33
5.1. Der Wirkungsmechanismus der NTPase/Helikasen	33
5.2. Der Inhibitionsmechanismus der RENs	35
6. Zusammenfassung	39
7. Literaturverzeichnis	40
8. Abkürzungen	51
9. Danksagungen	52
10. Lebenslauf	53
11. Erklärung	54

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Viren der Familie *Flaviviridae* sind kleine, sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 40 bis 60nm. Das Genom der *Flaviviridae* wird aus einzelsträngiger Plusstrang-RNA gebildet, die von einem Kapsid umgeben ist. Im Genom dieser Viren wurde RNA gefunden, die für NTPase/Helikasen codiert. Diese kann in fast allen biologischen Systemen nachgewiesen werden, in denen RNA eine bedeutende Rolle spielt.

Die NTPase/Helikasen spalten die Wasserstoffbrücken, die die beiden Stränge der RNA- oder DNA-Doppelhelix zusammenhalten, und katalysieren so deren enzymatische Entwindung. Diese ist für die Virusreplikation von großer Bedeutung. Die Aktivität der Helikase ist abhängig von der während der NTP-Hydrolyse freigesetzten Energie. Dieses lässt den Schluss zu, dass potentielle spezifische Inhibitoren der NTPase/Helikase der *Flaviviridae* durch die Entkoppelung der NTP-Hydrolyse mit der Entwindungsreaktion agieren können.

Hier wird eine Familie von Nukleosid-Analoga vorgestellt, die natürlichen Purinen ähnlich sind. Sie werden „Ring-Expanded-Nucleosides“ (RENs) genannt. Durch die Erweiterung des Purinrings werden Substanzen synthetisiert, die ein beachtliches inhibitorisches Potential haben, die Aktivität der NTPase/Helikase der *Flaviviridae* zu hemmen. Da die Hemmung der Helikase-Aktivität mit einer Reduktion der Virusreplikation einhergeht, stellen RENs eine Gruppe potentiell antiviraler Stoffe dar.

Welches Hemmpotential durch welche Art der Extension des Purinrings erreicht wird, und ob es selektive Wirkungen gegenüber einzelnen Mitgliedern der Familie der *Flaviviridae* gibt, soll in dieser Arbeit gezeigt werden.

2. Einleitung

2.1. *Flaviviridae*

Die Viren der Familie *Flaviviridae* sind kleine, sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 40 bis 60nm. Ihre RNA ist von einem isometrischen Kapsid umgeben, das aus nur einem einzigen Kapsidprotein aufgebaut ist. Das Genom der *Flaviviridae* besteht aus einzelsträngiger RNA mit einer Länge von 9000 bis 11000 Basen und enthält einen offenen Leserahmen, der am 5'- und 3'-Ende von nicht translatierten Bereichen umgeben ist (5'-UTR bzw. 3'-UTR) (Westaway et al. 1985, Westaway 1987, Monath 1996, Rice 1996).

Die *Flaviviridae* sind benannt nach dem klinischen Bild, das sich bei Infektion mit dem Gelbfiebervirus zeigt, welches als erstes der Viren aus dieser Familie entdeckt wurde. Charakteristisch für diese hämorrhagische Erkrankung sind: Hohes Fieber, generalisierte Myalgien, Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen, Zeichen einer hämorrhagischen Diathese und Ikterus.

Die Familie *Flaviviridae* wird in die Genera Flaviviren [Frühsommermeningoenzephalitis-Virus (FSME), Gelbfiebervirus, Dengue-Fieber-Virus (DENV), Japanische-Enzephalitis-Virus (JEV), West-Nil-Virus(WNV)], Hepaciviren (Hepatitis C-Virus) und Pestiviren (bovine viral diarrhea virus, classical swine fever virus, border disease virus) eingeteilt.

Von diesen Viren haben das FSME-Virus, das Gelbfiebervirus, DENV und das HC-Virus die größte humanpathogene Bedeutung. Sie verursachen schwere hämorrhagische Erkrankungen (Gelbfiebervirus, DENV), Enzephalitiden (JEV, WNV, FSME) oder Hepatitiden (Hepatitis C-Virus).

Unter den *Flaviviridae* gibt es große Unterschiede in biologischen Eigenschaften wie natürlichem Reservoir, Übertragungsart und Wirtsbereich. Sie besitzen jedoch einen Replikationszyklus, der bei allen Mitgliedern der Familie nach einem ähnlichen molekularbiologischen Prinzip abläuft. Sie binden an einen Rezeptor, z. B. CD 81 bei HCV (Pileri et al. 1998) oder Heparansulfat bei DENV (Chen et al. 1997), penetrieren

dann die Zellmembran und setzen anschließend ihre RNA aus dem Nukleokapsid in das Zytosol frei (Leysen et al. 2000).

Das Genom der *Flaviviridae* codiert ein Polyprotein von 3000 bis 4000 Aminosäuren. Bei den Hepaci- und den Flaviviren enthält die N-terminale Region drei, bei den Pestiviren fünf Strukturproteine. Der C-terminale Teil des Polyproteins wird bei den Hepaciviren in sechs Nicht-Struktur (NS)-Proteine (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B) eingeteilt, bei den Flaviviren besteht es aus sieben Nicht-Struktur-Proteinen (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B und NS5) (Westaway et al. 1985, Westaway 1987, Monath 1996, Rice 1996, Meyers u. Thiel 1996, Leysen et al. 2000).

Diese Nicht-Struktur-Proteine sind keine Bestandteile des Virions, ihre Funktionsfähigkeit ist jedoch dennoch von entscheidender Bedeutung für die Virusreplikation, besonders die Bestandteile des Replikasekomplexes mit ihrer Helikase (NS3)- und Polymerase (NS5B)-Aktivität spielen eine Rolle (Bartenschläger 1997, Ishido et al. 1998, Neddermann et al. 1999, Koch u. Bartenschläger 1999, Gu et al. 2000, Leysen et al. 2000, Matusan et al. 2001).

Mit dem NS3-Protein ist eine Reihe enzymatischer Aktivitäten assoziiert, die für die Virusreplikation wichtig sind. Daher scheint dieses Protein ein viel versprechendes Ziel antiviraler Substanzen zu sein.

2.1.1. Das West-Nil-Virus

Das West-Nil-Virus (WNV) gehört zum Genus *Flavivirus*. Es verursacht besonders bei älteren Menschen Erkrankungen mit Grippe-ähnlicher Symptomatik, die durch Meningitiden, Enzephalitiden oder Poliomyelitiden mit bleibenden neurologischen Schäden kompliziert werden können. Das erste Mal wurde das WNV 1950 im Nildelta beobachtet, später kamen Epidemien auch in Südafrika, der zentralafrikanischen Republik, Israel, und Madagaskar vor. Zunehmende Bedeutung erlangte das Virus nach seinem letzten Ausbruch in Nordamerika im Jahre 1999.

Für die interkontinentale Verbreitung des WNV werden Vögel verantwortlich gemacht, die ein wichtiger Wirt des Virus sind. WNV gehört zu den ARBO (arthropod-borne)-Viren, d.h. es wird wie viele andere Flaviviren durch Stechmücken übertragen. WNV

konnte in einer Vielzahl von *Culex*, *Aedes* und *Anopheles spp.* nachgewiesen werden. Endwirt des WNV sind Menschen, Pferde und viele andere Säugetiere.

Die 11kb lange virale RNA, die nach Penetration der Zellmembran aus dem Nukleokapsid freigesetzt wird, wird in ein Polyprotein translatiert, welches sowohl durch zelluläre Proteasen als auch durch den NS2B+NS3-Protease-Komplex (NS2B-3-Protease), der durch das Virus codiert ist, proteolytisch gespalten wird. So werden die Struktur- und Nicht-Struktur-Proteine des Virus gebildet: NH₂-C-prM(M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-COOH.

2.1.2. Das Japanische-Enzephalitis-Virus

Das Japanische-Enzephalitis-Virus (JEV) ist ein Flavivirus, welches ebenfalls durch Stechmücken übertragen wird. Auch hier sind Vögel ein wichtiger Wirt, aber Schweine und andere Haustiere bilden ebenfalls ein Virusreservoir. JEV ist in weiten Teilen Asiens verbreitet. Vor allem in Japan, China, Taiwan, Korea und dem fernöstlichen Teil Rußlands gibt es Endemiegebiete. Das Virus verursacht neurologische Krankheitsbilder, die mit Meningitis oder Enzephalitis einhergehen. Auch Krampfanfälle und akute schlaffe Lähmungen kommen vor. Die Letalität liegt zwischen 15 und 30%. Die Überlebenden tragen häufig neuropsychiatrische Folgeschäden davon, die besonders bei Kindern stark ausgeprägt sind.

Vor einer Infektion mit JEV schützt ein formalin-inaktivierter Totimpfstoff. In China wird darüber hinaus auch ein attenuierter Lebendimpfstoff verwendet.

2.1.3. Das Dengue-Fieber-Virus

Auch das Dengue-Fieber-Virus (DENV) ist ein Flavivirus, das in den tropischen Regionen Asiens, Ozeaniens, Australiens, Amerikas und Afrikas vorkommt. Besonders von *Aedes aegypti*-Moskitos wird es auf den Menschen übertragen.

Das Dengue-Fieber-Virus, von dem vier Serotypen bekannt sind, verursacht neben dem klassischen Dengue-Fieber auch das hämorrhagische Dengue-Fieber (DHF) und das Dengue-Schock-Syndrom (DSS).

Krankheitssymptome, die beim klassischen Dengue-Fieber auftreten, sind generalisierte Myalgien, Übelkeit, Erbrechen Schwindel und ein makulopapulöses Exanthem, das sich vom Stamm zentrifugal ausbreitet. Bei Kindern kommen zusätzlich respiratorische Symptome vor. Das DHF ist zusätzlich durch Fieber, hämorrhagische Manifestation, Thrombozytopenie ($<100.000/\text{mm}^3$) und Hämokonzentration (Hkt $>20\%$) gekennzeichnet. Beim DSS treten zusätzlich Schocksymptome und schwere Hypotonie auf.

DENV ist eines der bedeutendsten durch Arthropoden übertragenen Viren. Weltweit treten jährlich etwa 100 Millionen Fälle von Dengue-Fieber auf.

Infektion mit dem Virus hinterlässt serotypspezifische Immunität. Die Möglichkeit der Prävention durch Impfung gibt es bislang nicht.

2.1.4. Das Hepatitis C-Virus

Das Hepatitis C-Virus (HCV) ist bislang der einzige Vertreter des Genus Hepacivirus der Familie *Flaviviridae*. 1989 wurde entdeckt, dass es die Ursache der „non-A-non-B“-Hepatitis ist (Choo et al. 1989). Das Virus wird überwiegend über Blut, kontaminierte Instrumente oder Blutprodukte übertragen. Die meisten Infektionen bleiben zunächst asymptomatisch, bei 85% der Infizierten persistiert das Virus allerdings im Körper und verursacht eine chronische Hepatitis, deren Zeichen sich bei der histologischen Untersuchung der Leber zeigen. Im Laufe von Jahrzehnten entwickeln 20-30% der Patienten eine Leberzirrhose (McHutchinson et al. 1998, Poynard et al. 1998). Diese geht in seltenen Fällen in ein hepatozelluläres Karzinom über. Zurzeit sind mehr als 170 Millionen Menschen auf der Welt mit HCV infiziert.

Das Hepatitis C-Virus besitzt eine große genetische Heterogenität, weshalb es in sechs Genotypen (1-6) mit mehr als 100 Subtypen klassifiziert wird. Die Genotypen unterscheiden sich in ihrer geographischen Verbreitung und in ihrem Ansprechen auf eine Therapie deutlich. Zurzeit stehen in der Therapie der Hepatitis C Ribavirin und das Interferon- α zur Verfügung, einen Impfstoff zur Prophylaxe wie bei Hepatitis A und B gibt es jedoch leider noch nicht.

Das Genom des Hepatitis C-Virus ist 9,6kb lang. Die 5'-nicht-translatierte Region (5'-UTR), die etwa 340 Basen lang ist, bindet mit ihrer „internal ribosomal entry site“ an das Ribosom (Tsukiyama-Kohara et al. 1992, Poole et al. 1995). Hingegen ist die Funktion der 3'-UTR noch nicht vollständig bekannt.

Die vier Struktur- und sechs Nicht-Struktur-Proteine des Hepatitis C-Virus werden in folgender Reihenfolge zusammengesetzt: NH₂-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH (Westaway 1987, Monath 1996, Rice 1996, Pryor et al. 1998).

Zelluläre Proteasen spalten zunächst die Envelope-Proteine (E1 und E2), das Kapsid-Protein (C-Protein) und ein sehr hydrophobes Protein (P7) mit noch ungeklärter Funktion voneinander ab (Bartenschläger 1997, Zhong et al. 1999). Eine virale Zn²⁺-abhängige Protease ist für die Abspaltung des NS2- vom NS3-Protein verantwortlich. Diese ist mit den Segmenten assoziiert, die benachbart zu NS2 und NS3 liegen (Pallaoro et al. 2001).

Damit die NS-Region von der Region, die C-terminal des NS3 liegt, abgespalten werden kann, wird eine aktive virale Serin-Protease benötigt. Diese zusätzliche proteolytische Aktivität ist mit der NH₂-terminalen Region des NS3 assoziiert (van Doorn 1994, Monath 1996, Rice 1996). Durch diese proteolytischen Spaltungen entstehen der NS3-Protease-Kofaktor (NS4A), zwei Proteine mit noch ungeklärter Funktion (NS4B und NS5A) und die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B.

NS5B und NS3 stellen zwei der viralen putativen Proteine dar, die den membranständigen Replikase-Komplex bilden, der für einen Teil der genomischen Replikation verantwortlich ist.

Mit dem NS3-Protein ist eine Reihe verschiedener enzymatischer Aktivitäten assoziiert: N-terminal ist eine Protease lokalisiert, C-terminal liegt die NTPase/Helikase. Außerdem hat NS3 die Funktion einer Nukleosid-Triphosphatase. NS5B fungiert als RNA-abhängige RNA- Polymerase.

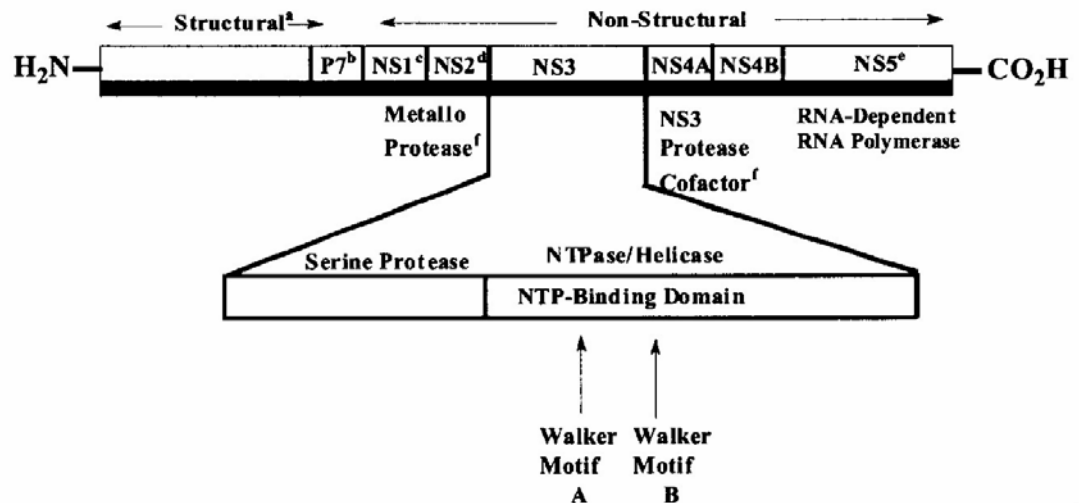


Abb.1: Vereinfachte Darstellung der Struktur des Polyproteins der *Flaviviridae*, das die NS3-Region enthält. Die enzymatischen Aktivitäten, die mit den Nicht-Struktur-Proteinen assoziiert sind, wurden gezeigt. Die Pfeile deuten auf die Position des hochkonservierten Motivs (Walker-Motiv A und B) mit dem NTPase/Helikase-Molekül.

a. Der NH₂-terminale Teil des Polyproteins der Mitglieder des Genus *Flavivirus* besteht aus drei Strukturproteinen: einem Nukleokapsid-Protein (C), einem Precursor-Membranprotein (pre-M) und einem Envelope-Protein (E); das Polyprotein der Hepaciviren besteht aus einem Nukleokapsid-Protein (C) und zwei Envelope-Proteinen (E1 und E2).

b. Das Peptid P7 mit unbekannter Funktion wird nur bei den Hepaciviren codiert. Bislang ist unklar, ob P7 zu den Struktur- oder zu den Nicht-Struktur-Proteinen gehört.

c. NS1 wird nur bei den Flaviviren codiert.

d. Das NS2-Protein der Flaviviren besteht aus zwei Proteinen, dem NS2A und dem NS2B mit unbekannter Funktion.

e. Das NS5-Protein der Hepaciviren ist geteilt in die Proteine NS5A und NS5B. Die RNA-Polymerase-Aktivität ist mit dem NS5B-Protein assoziiert.

f. Diese Funktion wird den Hepaciviren zugeschrieben.

2.2. Die Inhibition der NTPase/Helikasen

NTPase/Helikasen sind nukleotidphosphatabhängige Enzyme, die ubiquitär zu finden sind. Etwa 80% aller Plusstrang-RNA-Viren, deren Genom sequenziert wurde, codieren für mindestens eine potentielle Helikase. NTPase/Helikasen haben die Aufgabe, die während der genomischen Replikation entstandene Doppelstrang-DNA oder -RNA enzymatisch zu entwinden.

Die NTPase/Helikasen der *Flaviviridae* bestehen aus drei gleich großen Domänen, die durch sogenannte „clefts“ voneinander getrennt werden (Yao et al. 1997, Cho et al. 1998, Kim et al. 1998). Die durch die Viren codierten Enzyme werden aufgrund der unterschiedlichen Aminosäuresequenz des Walker-Motivs A, welches sich zusammen mit dem Walker-Motiv B auf der Oberfläche der Domäne 1 befindet, in die Superfamilien I bis III eingeteilt. Die NTPase/Helikasen von HCV, WNV und JEV gehören der Superfamilie II (SF II) an.

Auf der Oberfläche der Domänen 1 und 2 der NTPase/Helikasen der SF II sind sieben hoch konservierte Aminosäuresequenzen enthalten (Motive I bis VII). Die Motive I und II, auch Walker-Motive A und B, finden sich sowohl in allen NTPase/Helikasen als auch in einer Vielzahl anderer NTP-bindender und -utilisierender Proteine. Diese Motive bilden die „NTP-Bindungstasche“ und haben folgende Funktion:

Die endständige Phosphatgruppe des NTP bindet an das Walker-Motiv A, während das Walker-Motiv B einen Chelatkomplex mit dem Mg^{2+} -Ion des Mg^{2+} -NTP-Komplexes bildet (Walker et al. 1982).

Wenn kein Substrat vorhanden ist, binden die Walker-Motive aneinander und zusätzlich an die konservierte Sequenz auf Motiv III, welches Teil einer flexiblen „switch region“ ist, die die Domänen 1 und 2 miteinander verbindet. (Kadare u. Haenni 1997, Yao et al. 1997). Durch diese „switch region“ werden die Konformationsänderungen vermittelt, die durch NTP-Hydrolyse induziert werden (Yao et al. 1997, Matson u. Kaiser-Rogers 1990).

Noch nicht geklärt ist, welche Rolle das Arginin-reiche Motiv VI spielt. Röntgenkristallographische Untersuchungen lassen vermuten, dass das Motiv für die RNA-Bindung von Bedeutung ist (Yao et al. 1997, Cho et al. 1998). Allerdings ist auch eine direkte Beteiligung der Argininreste bei der ATP-Bindung möglich (Kim et al. 1998).

Für die Entwindungsreaktion der DNA bzw. RNA werden zwei alternative Mechanismen in Erwägung gezogen, die auf strukturellen und biochemischen Analysen beruhen:

1. Das NTPase/Helikase-Molekül bindet an einzelsträngige Regionen des Substrates und wirkt nicht aktiv an der Trennung doppelsträngiger DNA- oder RNA-Strukturen mit. Damit ist die aus der NTP-Hydrolyse der NTPase/Helikase gewonnene Energie für die Entwindungsreaktion nicht zwingend notwendig (Lüking et al. 1998, Yao et al. 1997, Matson u. Kaiser-Rogers 1990). Dieser „passive“ Mechanismus wird unterstützt durch die Beschreibung einer Entwindungsaktivität der HCV-NTPase/Helikase in Abwesenheit von ATP (Porter u. Preugschat 2000).

2. Ein zweiter „aktiver“ Mechanismus fordert mindestens zwei Nukleinsäure-Bindungsstellen und die ATP-Abhängigkeit der Entwindungsreaktion (Yao et al. 1997, Matson u. Kaiser-Rogers 1990). Hier wird durch NTP eine Konformationsänderung des Moleküls erreicht und so die Bindung von DNA- oder RNA-Substrat an die entsprechende Bindungsstellen erleichtert (Yao et al. 1997).

Unter Berücksichtigung dieser postulierten Entwindungsmechanismen, kann davon ausgegangen werden, dass die durch die NTP-Hydrolyse freiwerdende Energie für die Translokation des Enzyms an den Doppelstrang-DNA- bzw. RNA-Strukturen genutzt wird, oder durch die Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen, die die Stränge zusammenhalten, verbraucht wird.

Eine Hemmung der Entwindungsaktivität und damit auch eine Inhibition der Virusreplikation scheint also möglich zu sein durch Verminderung der NTP-Verwertung durch erschwerte Zugänglichkeit der NTP-Bindungsstelle für ATP.

Durch Substanzen, die kompetitiv oder nicht-kompetitiv eine verminderte Bindung von ATP an die isolierte Domäne I der HCV-NTPase/Helikase bewirken, konnte auch die ATPase-Aktivität des Enzyms gehemmt werden (Borowski et al. 2001a). Für die Hemmung der ATPase-Aktivität und die verminderte Bindung von ATP waren ähnlich hohe Inhibitorkonzentrationen erforderlich.

Nun stellt sich noch die Frage, ob die NTPase- und die Helikase-Aktivität aneinander gekoppelt sind. Viele Beobachtungen sprechen dafür, dass dies nicht notwendigerweise der Fall ist:

1. Die Enzyme fungieren als Polynukleotid-stimulierte, aber nicht als Polynukleotid-abhängige NTPasen. Die Stimulation der ATPase-Aktivität der NTPase/Helikasen der *Flaviviridae* durch einzelsträngige Nukleinsäuren ist allerdings nicht mit einer Änderung der Wanderungsgeschwindigkeit der Helikase entlang des Substrates verbunden (Hesson et al. 2000). So kann die ATPase-Aktivität durch 5-Fluoro-2-Selenocytosin oder Derivaten von O-6-Benzylguanin über einen nicht-kompetitiven Mechanismus stimuliert werden, ohne die Helikase-Aktivität zu beeinflussen.

Auf der anderen Seite kann auch die Helikase-Aktivität z.B. durch Chlorethylguaninderivate stimuliert werden ohne die NTPase-Aktivität zu verändern (Borowski et al. 2001b).

2. Die NTPase- und die Helikase-Reaktion verschiedener Helikasen (BVDB, HCV, WNV) unterscheiden sich deutlich in ihren optimalen Reaktionsbedingungen wie pH-Wert oder Konzentrationen von Salzen und Detergentien (Borowski et al. 2002c)

3. Material und Methoden

3.1. Material

Alle Ring-Expanded-Nucleosides und Nukleotidanaloga wurden von Prof. Ramachandra S. Hosmane (Laboratory for Drug Design and Synthesis, Department of Chemistry and Biochemistry, University of Maryland, Baltimore County, USA) zur Verfügung gestellt.

Humane WNV-positive Antiseren lieferte Frau Gabriele Rietdorf aus dem Bernhard-Nocht-Institut, Abteilung Virologie.

Frau Privatdozentin Dr. Susanne Polywka (Institut für Infektionsmedizin, Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf) stellte HCV-positive Anti-NS3-Seren zur Verfügung. Die Synthese der Oligonukleotide übernahm Herr Dr. Michael Schreiber (Bernhard-Nocht-Institut, Abteilung Virologie).

Von Herrn Prof. em. Dr. Helmuth Hilz (ehemals Gen.-Dir. Institut für Medizinische Biochemie, Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf) wurde α,β -CH₂-ADP bezogen. Die übrigen Nucleotide lieferte die Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen. [γ -³²P]-ATP (220 Tbq/mmol), [γ -³³P]-ATP (110 Tbq/mmol) sowie [2,8-³H]-ATP (81,48 Tbq/mmol) stammten von der Firma Hartmann Analytic GmbH Braunschweig. Von der Firma Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, wurde [¹²⁵I]-markiertes Protein A bezogen. [¹⁴C(U)]-AMP (21,6 GBq/mmol und 5'-[¹⁴C]-Fluorosulfoylbenzyladenosin (1,7 GBq/mmol) stammten von der Firma NEN/Du Pont Boston, MA, USA. Alle übrigen Chemikalien wurden von der Firma Sigma verwendet.

3.2. Zellkultur

Vero-E6-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium gezüchtet. Dem Medium wurden 10%iges fetales Kälberserum (Gibco/BRL, Eggenstein), 100µg/ml Ampicillin und 60µg/ml Gentamicin zugesetzt. In der logarithmischen Wachstumsphase wurden die Zellen mit dem ATCC-Stamm VR-82 des West-Nil-Virus infiziert (Wengler et al. 1990). Am

fünften Tag nach der Infektion wurde das Zellkulturmedium gewonnen, welches dann für die Aufreinigung der WNV-NTPase/Helikase verwendet wurde.

3.3. Aufreinigung der WNV-, JEV-, HCV- und Suv3_(Δ1-159)-NTPase/Helikasen

Die Aufreinigung der WNV-NTPase/Helikase wurde aus dem Zellkulturmedium von WNV-infizierten Vero-E6-Zellen durchgeführt, wie in den Anleitungen von Borowski et al. 2001b beschrieben.

Nach der Äquilibration des konzentrierten Zellkulturmediums über vier Stunden bei 4°C mit 10ml Reactive Red 120 Agarose (Sigma) wurde es mit TGT-Puffer vermischt (20mM Tris-HCL pH 7,5; 10% Glycerol; 0,05% Triton X-100; 1mM EDTA; 1mM β-Mercaptoethanol).

Nach Sedimentation der Matrix wurde diese in eine Chromatographiesäule transferiert und mit TGT-Puffer gewaschen. In diesem Puffer konnte das an die Matrix gebundene Protein mit 1M KCL eluiert werden. Nach Ultrafiltration auf einer 30kDa-Membran betrug das konzentrierte Endvolumen 2ml.

Mit dem so gewonnenen Material wurde im Anschluss eine Gel-Ausschluss-Chromatographie auf einer Superdex-200-Säule (Hi-Load 16/60kX; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) durchgeführt.

Die Fraktionen, in denen das Protein, das ATPase- bzw. Helikase-Aktivität besitzt, vorhanden war, wurden erneut einer Chromatographie mit 5ml Reactive Red 120 Agarose, wie oben beschrieben, unterzogen. Das Protein konnte durch Salzgradienten eluiert, danach mit Polyethylenglycol (30% w/v) präzipitiert, anschließend zentrifugiert und schließlich in TGT-Puffer in Lösung gebracht werden.

Das so gelöste Protein wurde auf eine Hydroxyapatit-Säule (HA-Ultrogel) aufgebracht, die mit TGT-Puffer voräquilibriert war. Anschließend erfolgten drei Waschgänge, der erste mit 10ml TGT-Puffer, der zweite mit 2ml TGT-Puffer in 1M KCL und der dritte mit 5ml TGT-Puffer. Mit 1ml TGT in 50mM KH₂PO₄ wurde die WNV-NTPase/Helikase eluiert, mit PEG im selben Puffer zur Präzipitation gebracht und mit TGT-Puffer solubilisiert.

Die NTPase/Helikase des HCV-NS3-Proteins wurde in *E.coli* exprimiert und aufgereinigt wie es in folgenden Publikationen beschrieben wurde (Kim et al. 1995, Gwack et al.1996). Die Bakterien wurden zentrifugiert und in Lysispuffer (100mM

Tris/HCL pH 7,5; 20% Glycerol; 0,1% Triton X-100; 200mM NaCl; 1mM β -Mercaptoethanol; 2mM Phenylmethylsulfonylfluorid; 10mM Imidazol) sonifiziert. Bei 26.000 x g wurde das unlösliche Material pelletiert, der Überstand mit 3ml einer mit TGT-Puffer äquilibrierten Matrix, die mit Nickel beladen war (NiNTA, Qiagen) vermischt.

Nach dem Transfer dieser Matrix auf eine mit TGT voräquilibrierte Hydroxyapatit-Säule (HA-Ultrogel), wurde diese mit TGT-Puffer in 200mM NaCl und 20mM Imidazol gewaschen. Anschließend konnte das gebundene Protein mit 0,5M Imidazol im selben Puffer eluiert werden.

Mit Hilfe eines Coomassie-Blau gefärbten SDS-Polyacrylamidgels konnte die Reinheit des auf diese Weise erhaltenen HCV-Proteins geprüft werden. Sie lag zwischen 60 und 70%. Die Konzentration der eluierten Fraktion gelang durch Ultrafiltration auf einer 30kDa-Membran. Anschließend wurde sie über eine mit TGT-Puffer äquilibrierte Superdex-200-Säule fraktioniert.

Zur Untersuchung der Eigenschaften der HCV-NTPase/Helikase wurden die Fraktionen, die >80% der maximalen ATPase- und Helikase-Aktivitäten zeigten, miteinander vermischt und anschließend für die Versuche verwendet.

Die JEV-NTPase/Helikase und die Suv3(Δ 1-159)-NTPase/Helikase wurden ebenfalls in *E.coli* exprimiert und aufgereinigt. Die Reinheit dieser beiden Helikasen in der Endpräparation wurde ebenfalls in einem Coomassie-Blau gefärbten SDS-Polyacrylamidgel überprüft.

3.4. Das ATPase-Assay

Die Messung der ATPase-Aktivität der WNV, JEV-, HCV- und Suv3(Δ 1-159)-NTPase/Helikasen erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Für die Versuche wurden 2pmol WNV-, 4pmol JEV- und 0,5pmol HCV-NTPase/Helikase verwendet. Die Enzyme wurden in 25 μ l eines Reaktionsansatzes bestehend aus 20mM Tris/HCL pH 7,5; 2mM MgCl₂; 1mM β -Mercaptoethanol; 10%

Glycerol; 0,01% Triton X-100; 0,1mg/ml BSA; 25nCi [γ - ^{32}P]-ATP sowie einer ATP-Konzentration, die der K_m entsprach inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 30min bei 30°C und wurde durch Zugabe von 0,5ml Aktivkohle beendet. Anschließend wurden die Proben bei 10.000 x g für 10min zentrifugiert, dann ein Aliquote von 100 μ l vom Überstand abgenommen und einer Szintillationszählung zugeführt.

3.5. Das Helikase-Assay

Die Bestimmung der Helikase-Aktivität erfolgte mit 2pmol der WNV-, 4pmol der JEV- und 0,5pmol der HCV-NTPase/Helikase. Die Entwindung eines teilweise hybridisierten doppelsträngigen DNA-Substrates (4,7pM) wurde in 25 μ l einer Reaktionsmischung mit 20mM Tris/HCL pH 7,5; 2mM MgCl_2 ; 1mM β -Mercaptoethanol; 10% Glycerol; 0,01% Triton X-100; 0,1mg/ml BSA und bei einer ATP-Konzentration, die der K_m für die ATPase-Reaktion entsprach, vollzogen. Zur Testung des inhibierenden Potentials der RENs wurden die Substanzen den Reaktionsansätzen in Konzentrationen von 3 μ g/ml, 30 μ g/ml und 300 μ g/ml zugesetzt. Die Durchführung der Reaktion dauerte bei 30°C 30 Minuten und wurde durch die Zugabe von 5 μ l eines Stopp-Puffers (100 μ M Tris/HCL pH 7,5; 20mM EDTA; 0,5% SDS; 0,1% Triton X-100, 25% Glycerol; 0,1% Bromphenolblau) beendet. In einem 15%-igem Tris-Borat-EDTA-(TBE)-Polyacrylamidgel mit 0,1% SDS wurden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Trocknung der Gele wurden diese bei -70°C auf Kodak-Röntgenfilmen (BioMax-MR1) 12-14 Stunden lang exponiert. Die Teile der Gele, die dem abgespaltenen DNA-Strang und dem nicht-entwundenen Substrat entsprachen, wurden ausgeschnitten und die ^{32}P -Strahlung gemessen. Alternativ hierzu wurde die Radioaktivität des abgespaltenen DNA-Stranges und des nicht-entwundenen Substrates mit Gel-Image-Software (Amersham Pharmacia Biotech) gemessen.

3.6. Die Dünnschichtchromatographie

Wie oben für das ATPase-Assay beschrieben, wurde die durch WNV-, JEV- und HCV-NTPase/Helikasen vermittelte Hydrolyse des [$2,8$ - ^3H]-ATP durchgeführt, durch Inkubation der Proben für 5 Minuten bei 95°C wurde die Reaktion beendet.

Es folgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 10.000 x g. Vom Überstand wurden Aliquoten von 2µl entnommen und auf Plastik-beschichtete Zelluloseblätter (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) aufgebracht. Anschließend folgte eine Auftrennung durch Dünnschichtchromatographie in 0,8 M (NH₄)₂SO₄. Nach Trocknung der Zelluloseblätter wurden diese auf BioMax-MR-1-Filmen mit Verstärkerfolie (BioMax MS Intensifying Screen, Kodak AG, Stuttgart) exponiert.

Zur genaueren Quantifizierung wurden die auf den Röntgenfilmen entdeckten „hot spots“ aus den Zelluloseblättern ausgeschnitten und einer Szintillationszählung zugeführt.

3.7. Affinitätsmarkierung der NTP- Bindungsstellen mit [¹⁴C]-FSBA

Die Markierung der NTP-Bindungsstelle der WNV- und HCV-NTPase/Helikase mit [¹⁴C]-FSBA wurde nach der Woodford-Pardee-Methode (Woodford-Pardee 1986) durchgeführt. Durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und Kochen der Proben wurde die Markierungsreaktion beendet. Durch SDS-PAGE-Elektrophorese wurden die Proteine getrennt. Nach Trocknung der Gele wurden diese auf Kodak BioMax MR-1-Filmen mit Verstärkerfolie (BioMax MS Intensifying Screen) exponiert. In Kontrollexperimenten wurde die Inkubation mit [¹⁴C]-FSBA in Anwesenheit von ATP in fünffachem Überschuss durchgeführt.

3.8. Immunoblot

Nach der gelelektrophoretischen Trennung der Proteine wurden diese auf Nitrozellulosefolien (Schleicher und Schüell GmbH, Dassel; BA 85; 0,45mm) aufgetragen.

Anschließend wurden diese Folien eine Stunde mit 1mg/ml BSA in 25mM Tris/HCl pH 7,5; 150mM NaCl und 0,05% Tween 80 (TTBS-Puffer) inkubiert, dann 2 Stunden mit den jeweiligen Antisera in der Verdünnung 1:500 in TTBS-Puffer mit 10% Glycerol und 3mg/ml BSA und schließlich in TTBS-Puffer mit 1mg/ml BSA gewaschen. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte durch Inkubation der Folie mit Anti-humanen-Antikörpern vom Kaninchen (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen) und anschließender Inkubation mit ¹²⁵I-markiertem Protein A. Nach Trocknung der auf diese

Weise behandelten Nitrozellulosefolien wurden diese auf Kodak BioMax-MR-1-Filmen mit Verstärkerfolie (BioMax MS Intensifying Screen) exponiert.

3.9. Die Herstellung von Substraten für die Helikase-Reaktion

Indem zwei partiell komplementäre DNA-Oligonukleotide hybridisiert wurden, konnte das Substrat für das Helikase-Assay hergestellt werden. Diese Oligonukleotide wurden anhand der Desoxynukleosid-Version der beschriebenen RNA-Stränge synthetisiert (Gallinari et al. 1998)

Der „release strand“ (26-mer) mit der Sequenz 5'-CAAACCTCTCTCTTCTCTCAACA AAAAA-3' wurde am 5'-Ende mittels einer T4-Polynukleotidkinase (MBI, Fermentas, Vilnius, Litauen) mit [γ -³²P]-ATP nach dem vom Hersteller empfohlenen Verfahren markiert.

Für die Verschmelzungsreaktion wurde das markierte Oligonukleotid in einem molaren Verhältnis von 1:10 mit dem „template strand“ (40-mer) mit der Sequenz 5'-AGAGAG AGAGGTTGAGAGAGAGAGAGTTTGAGAGAGAGAGAG-3' eingesetzt.

Wie in Borowski et al. 2001 beschrieben, wurden die beiden Oligonukleotide 5 Minuten lang bei 96°C denaturiert und langsam wieder renaturiert. Die auf diese Weise hergestellte Duplex-DNA wurde einer Elektrophorese in einem nativen 15%igen TBE-Polyacrylamidgel unterzogen, durch Autoradiographie sichtbar gemacht und anschließend extrahiert. Die Menge der als Substrat für die WNV-NTPase/Helikase verwendeten Duplex-DNA wurde mit der Ethidiumbromid-Fluoreszenz-Quantifikationsmethode bestimmt.

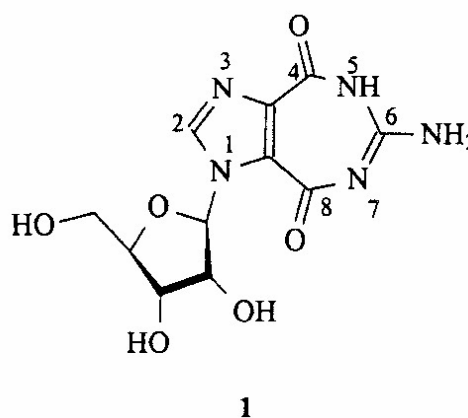
3.10. Weitere Methoden

Die Proteinkonzentrationen in den NTPase/Helikase-Präparationen wurden mittels SDS-PAGE bestimmt, wie von Hames und Rickwood 1990 beschrieben. Mit Hilfe der Softwareprogramme Enzfitter, Version 1.05 (Elsevier-BioSoft, Cambridge, England) und Sigmaplot (Jandel Scientific Corp.; San Rafael, CA USA) wurden kinetische Parameter berechnet.

3.11. Die Inhibitoren

Alle Ring-Expanded-Nucleosides (RENs) und Nukleotidanaloga wurden von Prof. Ramachandra S. Hosmane (Laboratory for Drug Design and Synthesis, Department of Chemistry and Biochemistry, University of Maryland, Baltimore County, USA) zur Verfügung gestellt.

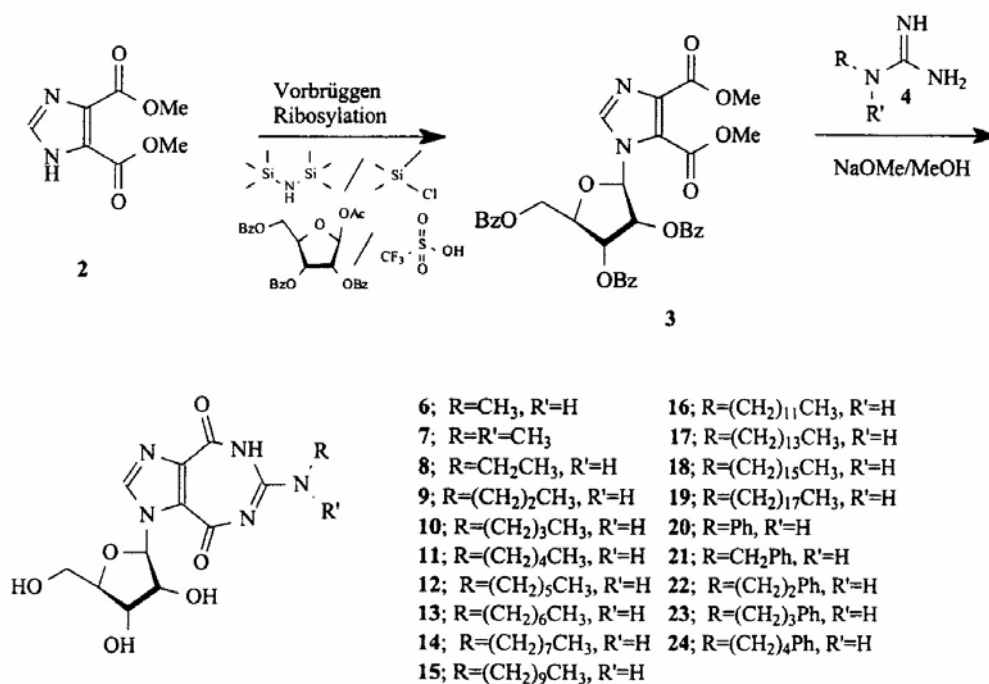
Der „Mutter-REN“, die Ausgangssubstanz aller Inhibitoren ist REN 1, 6-amino-imidazol [4,5-*e*][1,3]diazepine-4,8-dione (**1**).



Die viel versprechenden Beobachtungen der Antihelikase-Aktivität von REN 1, führten zur Synthese weiterer RENs und Nukleotidanaloga. Zwei auffällige Loci, die für eine strukturelle Modifikation der Substanzen geeignet sind, sind die Positionen 6 und 1, an denen die Aminogruppe bzw. der Zucker angehängt wurden.

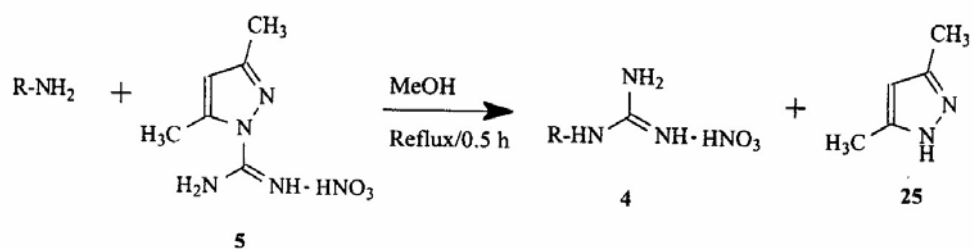
Durch Modifikationen und den Austausch der Substituenten durch Alkyl-, Aralkyl-, und aromatische Gruppen erhält man die Inhibitoren des Schema 1, REN 2,3 und 6-24.

Schema 1



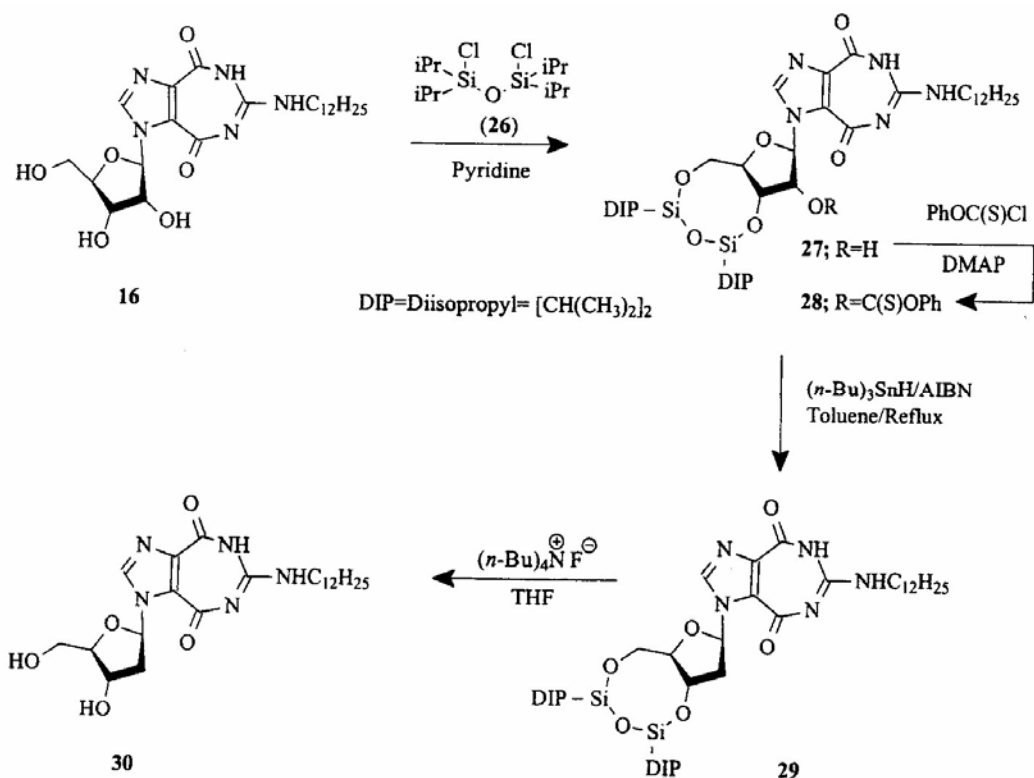
Über Compound Nr. 5 wurden schließlich die RENs 4 und 25 synthetisiert (siehe Schema 2).

Schema 2

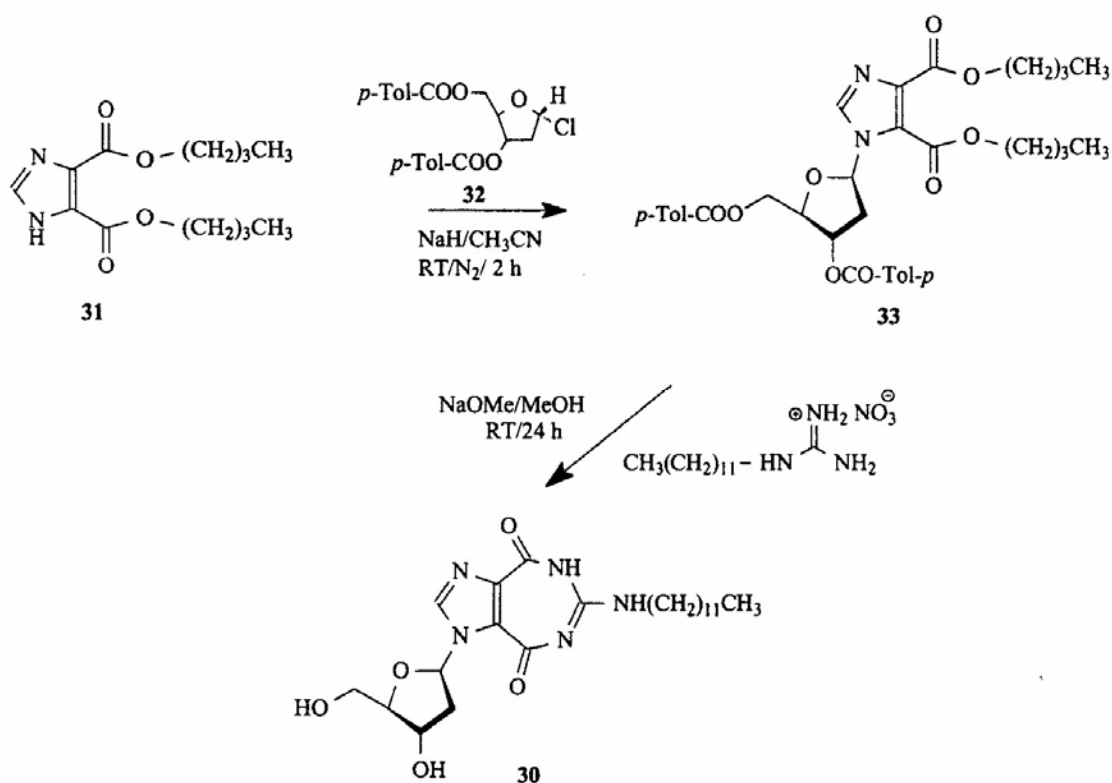


Die Schemata 3 und 4 zeigen die Synthese des Compound Nr. 16, die auf zwei Wegen möglich ist.

Schema 3

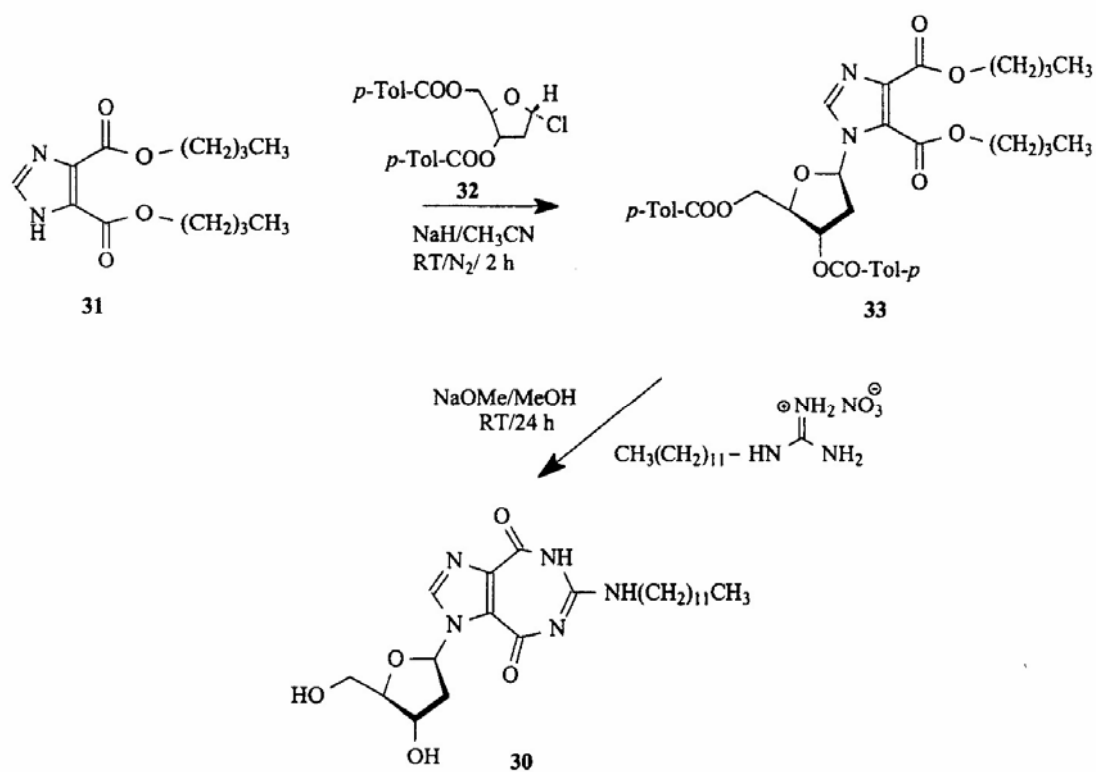


Schema 4

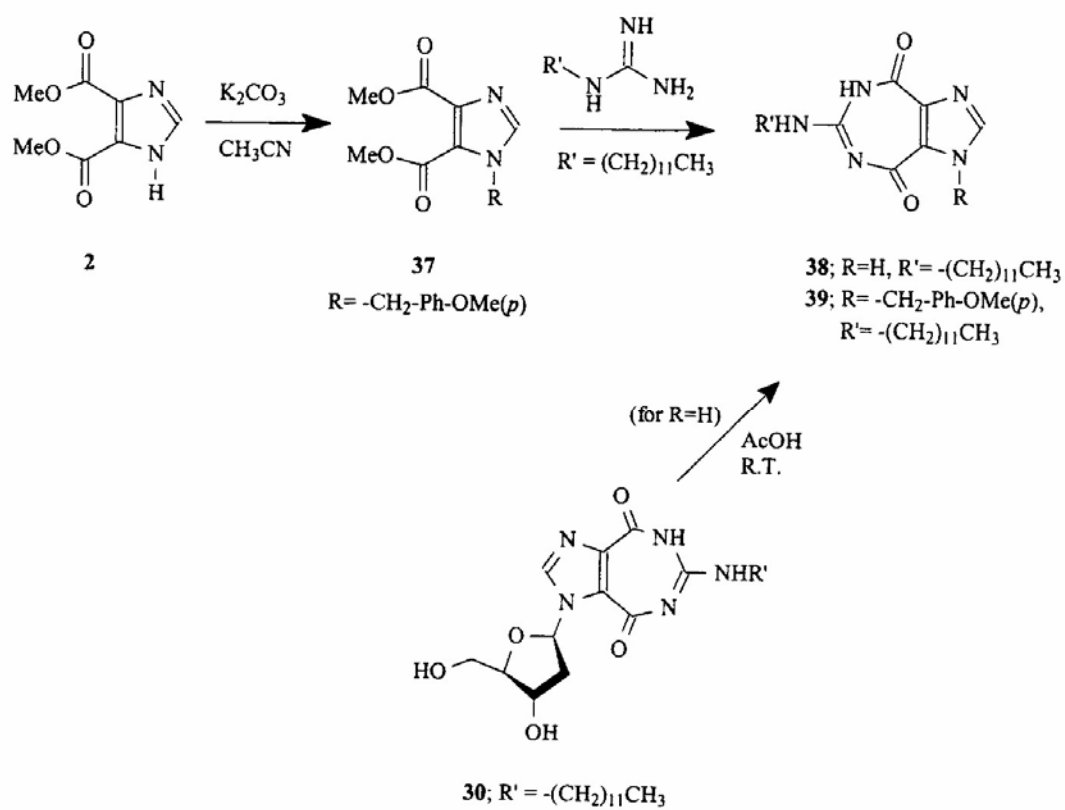


REN 30 war wiederum die Ausgangssubstanz für weitere potentielle Inhibitoren, die durch Modulation der Substituenten synthetisiert wurden. Ergebnis dieser Modifikationen sind die Substanzen der Schemata 5 und 6.

Schema 5



Schema 6



4. Ergebnisse

4.1. Die NTPase/Helikasen

Die NTPase/Helikasen der drei nah verwandten *Flaviviridae* West-Nil-Virus, Hepatitis C-Virus und Japanische-Enzephalitis-Virus wurden mit dem Ziel für Studien ausgewählt, diese Enzyme durch Ring-Expanded-Nucleosides und Nukleotidanaloga zu hemmen.

Die Selektivität der durch die RENs vermittelten Inhibition gegenüber den viralen Enzymen soll überprüft und eingeschätzt werden, indem ein Enzym aus einer menschlichen Quelle ebenfalls in die Studie mit eingeschlossen wird. Dieses Enzym ist eine deletierte Form des Suv3-Proteins, die Suv3_(Δ1-159)-NTPase/Helikase. In der Struktur dieses Proteins sind Regionen zu erkennen, die erhebliche Homologien zu den ATP- und RNA-Bindungsstellen der untersuchten viralen NTPase/Helikasen aufweisen. Diese Version der Suv3-NTPase/Helikase, die aus 159 Aminosäuren besteht, wurde in *E.coli* exprimiert. Mittels PCR wurde die dieses Protein codierende humane Suv-cDNA amplifiziert. Die Homogenität der so entstandenen Enzympräparation wurde schließlich durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Coomassie-Blau-Färbung gesichert.

Wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, wurde die WNV-NTPase/Helikase aus Zellkulturmedium von Vero-E6-Zellen aufgereinigt, die mit WNV infiziert waren. Die Enzympräparation wurde mit einem Coomassie-Blau gefärbten SDS-Polyacrylamidgel analysiert. So konnten ein Protein mit einer molaren Masse von 66kDa entsprechend BSA und ein Protein mit einer molaren Masse von 60kDa, das der WNV-NTPase/Helikase entspricht, gezeigt werden. Durch NH₂-terminale Sequenzierung, FSBA-Bindungsassays und Immunoblot-Analysen konnte die Identität des aufgereinigten WNV-Proteins und des BSA bestätigt werden (Borowski et al. 2001b).

Die biochemischen Eigenschaften der HCV-NTPase/Helikase konnten nach Expression eines „His-taq“-markierten Polypeptids mit 466 COOH-terminal gelegenen Aminosäureresten des NS3 in *E.coli* untersucht werden. Zunächst erfolgte die Disruption der

Bakterien, anschließend wurde die in Triton X-100 gelöste Proteinfraction mit einer Nickel-Affinitätschromatographie unter nicht-denaturierenden Bedingungen gereinigt. Durch eine anschließende Gelfiltrationschromatographie mit einer Superdex 200-Säule konnten Hintergrundproteine entfernt werden. So zeigt sich in der Coomassie-Blau-Färbung des SDS-Polyacrylamidgels eine homogene Enzympräparation.

Mit Hilfe eines Immunoblots mit Anti-NS3/Hel-(1&2)-Antikörpern (Borowski et al. 2001b) und FSBA-Bindungsassays konnte die NTPase/Helikase-Aktivität bestätigt werden.

Alle Enzympräparationen waren frei von fremden NTPasen, Helikasen und NTP-Bindungsaktivitäten.

4.2. Die Helikase-Reaktion

Um zu zeigen, welches hemmende Potential die RENs und die Nukleotidanaloga in Bezug auf die Helikase-Reaktion besitzen, wurden DNA- und RNA-Substrate präpariert, die aus zwei partiell hydrolysierten DNA- und RNA-Oligonukleotiden bestehen. Die Entwindungsaktivität der Helikasen wurde durch Darstellung der kürzeren der angelagerten Ketten des DNA- oder RNA-Doppelstrangs ermittelt. Interessanterweise wirkte sich Beschaffenheit der verwendeten Substrate nicht auf die Entwindungseffizienz aus.

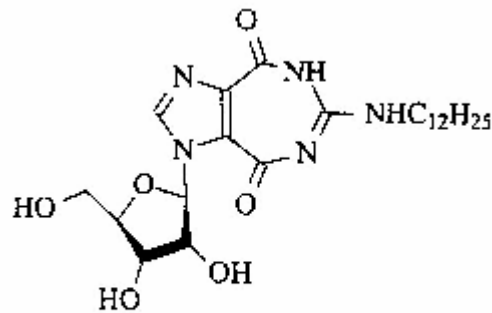
Da sich Enzyme aus unterschiedlichen Quellen in ihrem ATP-Bedarf und in dessen Gebrauch bei der Entwindungsreaktion unterscheiden, wurden die Untersuchungen unter Verwendung von Enzymmengen mit gleicher Entwindungsaktivität durchgeführt. Die Enzyme wurden also mit einem DNA- bzw. RNA-Substrat kalibriert, das bei einer ATP-Konzentration entwunden wurde, die mit dem für die ATPase-Reaktion K_m -Wert übereinstimmt.

Die RENs aus Schema 1, Compounds 7-24, besitzen verschiedene Substituenten an Position 6, die sich in ihrer Länge und der Anzahl von Alkyl- und Aralkylgruppen deutlich unterscheiden.

Die für die Compounds 7-14 und 20-24 erzielten Ergebnisse waren sehr unterschiedlich, sie sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die IC_{50} -Werte schwankten zwischen 70 μ g/ml und

>500µg/ml. Dieses ist ein Zeichen dafür, dass die Inhibitoren bei konventionellen Standards inaktiv sind.

Eine bemerkenswerte Ausnahme stellt jedoch Substanz 16 mit einer 12-Carbon-Alkyl-Kette dar. Dieser zeigt IC₅₀-Werte von 1-3µg/ml gegen die WNV-Helikase und 10µg/ml gegen die JEV-Helikase, ist allerdings gegen die HCV-Helikase inaktiv (IC₅₀ >500µg/ml).



16

Die Tatsache, dass dieser Compound 16 ebenfalls inaktiv gegen das menschliche Enzym Suv3_(Δ1-159) war (IC₅₀ >500µg/ml), veranlasst zu der Annahme, dass REN 16 selektiv gegenüber den NTPase/Helikasen der Vertreter des Genus Flavivirus sein könnte.

Veranlasst durch die Antihelikase-Aktivität bzw. -selektivität dieser Substanz 16 gegenüber WNV- und JEV-NTPase/Helikase, wurde dessen 2'-Desoxyanalogon REN 30 (siehe Schemata 3 und 4) getestet.

REN 30 zeigte ebenfalls eine vergleichbare Antihelikase-Aktivität sowohl gegen WNV- (IC₅₀ = 3-10µg/ml) als auch gegen JEV- (IC₅₀ = 5-10µg/ml) NTPase/Helikase.

Gegen HCV-NTPase/Helikase war dieser Compound ebenso inaktiv (IC₅₀ >500µg/ml).

Im Gegensatz zu Substanz 16 inhibierte er allerdings auch das humane Enzym Suv3_(Δ1-159) mit IC₅₀-Werten von 3-5µg/ml, was vermuten lässt, dass dieser REN gegenüber den viralen NTPase/Helikasen weniger selektiv ist.

Diese Ergebnisse mit REN 30 warfen die nahe liegende Frage auf, welche Bedeutung die α/β-Konfiguration an der Base-Zucker-Bindung, dem anomeren Kohlenstoff, hat. Vor diesem Hintergrund wurde Compound 36 (Schema 5), das α-Anomer von REN 30, synthetisiert und untersucht.

Compound 36 zeigte, ebenso wie sein β -anomerer Gegenstück REN 30, potente und selektive Aktivität gegen die Entwindungsaktivität der WNV-Helikase ($IC_{50} = 3\text{-}10\mu\text{g/ml}$) und war inaktiv, genauso wie Compound 30, gegenüber der HCV-Helikase ($IC_{50} = 300\text{-}500\mu\text{g/ml}$).

Die unterschiedlichen Ergebnisse, die mit den verschiedenen Pentosen und deren anomeren Konfigurationen erzielt wurden, ließen eine wichtige Frage aufkommen, die die Modulation der Helikase-Reaktion von *Flaviviridae* durch RENs betrifft. Bis hierher war nicht klar, ob der Zucker bzw. der Zucker-ähnliche Teil der Compounds überhaupt notwendig für die Antihelikase-Aktivität der RENs ist.

Um diese Frage zu klären wurde REN 38 (siehe Schema 6), ein „Mutter“-Heterozyklus von REN 30 synthetisiert, der allerdings frei von jeglicher Aktivität zu sein schien.

Es folgte die Synthese eines Analogons von Compound 38, der an Stelle des Zuckeranteils eine *p*-methoxybenzyl-Gruppe besitzt, die an den Imidazolring angehängt ist. So entstand REN 39. Überraschenderweise war Compound 39 sowohl potent als auch selektiv gegen die Helikase-Aktivität der WNV-NTPase/Helikase mit einem IC_{50} -wert von $5\mu\text{g/ml}$. Gegenüber den Helikase-Aktivitäten der Enzyme von HCV und JEV war dieser Compound allerdings inaktiv.

Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass eine einfache Aralkylgruppe an der Stelle eines Zuckeranteils für ein hervorragendes Aktivitäts-/Selektivitätsprofil nicht nur ausreichend, sondern dafür sogar vorzuziehen ist.

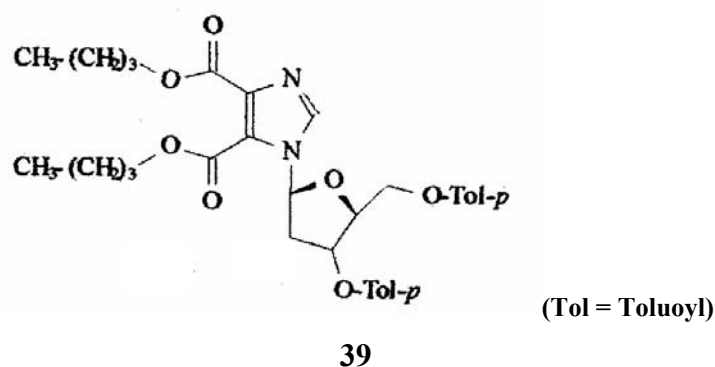


Tabelle 1

Inhibierender oder aktivierender Effekt von RENs gegen die Helikase-Aktivität der NTPase/Helikase von WNV, HCV und JEV, als Substrat wurde DNA verwendet. Um die Selektivität der RENs zu prüfen, wurde eine Version der humanen NTPase/Helikase Suv3_(Δ 1-159) mit in die Studie eingeschlossen.

Compound Nr.	WNV IC₅₀ (µg/ml)	HCV IC₅₀ (µg/ml)	JEV IC₅₀ (µg/ml)	Suv3_(Δ1-159) IC₅₀ (µg/ml)
7-14	300->500	>500	70->500	ND
15	30-100	ND	>500	>500
16	1-3	>500	10	>500
17	3-10	ND	10-15	300
18	250	ND	>500	>500
19	5	ND	>500	>500
20	Aktivator: ED ₂₀₀ = 300	ND	>500	>500
21-24	>500	>500	>500	ND
30	3-10	>500	5-10	3-5
36	3-10	300-500	300	250
38	500	ND	>500	>500
39	5	>500	>500	>500

Die Helikase-Aktivität ist festgelegt als eine Funktion wachsender Konzentrationen der Compounds in der Anwesenheit von ATP in einer Konzentration, die den K_m der verschiedenen Enzyme entspricht, (9,5 µM für WNV, 105µM für HCV, 235µM für JEV und 4.2µM für SUV3_(Δ 1-159)) und in Anwesenheit von 4,7pM DNA-Substrat (Konzentration der Nukleotidbase). Das Substrat und der Einzelstrang wurden in TBE-Polyacrylamidgel getrennt und durch Exposition des getrockneten Gels auf einem Röntgenfilm für 20 Stunden sichtbar gemacht. Die dem Einzelstrang entsprechenden Teile des Gels wurden herausgeschnitten und die ³²P-Radioaktivität wurde, wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, quantifiziert. Das inhibierende Potential der Compounds wurde ausgedrückt als Inhibitorkonzentration bei der 50% der Entwindungsaktivität gemessen wurden. Die Helikase-Aktivität, die in Abwesenheit der Compounds gemessen wurde, wurde auf 100% festgesetzt. Der Ausdruck IC₅₀ ist definiert als Konzentration der RENs, bei der 50% der Enzymaktivität gehemmt wird. Der Ausdruck ED₂₀₀ beschreibt die effektive Dosis des Compounds, bei der 200% der Aktivität des Enzyms erreicht werden. ND: nicht determiniert. Die dargestellten Daten sind die repräsentativen Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten.

Alle bisherigen biochemischen Ergebnisse wurden unter Verwendung von DNA-Substrat erzielt. Es stellte sich die Frage, ob die Verwendung von RNA-Substrat Unterschiede machen würde. Die Antwort war überraschend:

Die mit RNA-Substrat erzielten Resultate sind für einige ausgewählte RENs in Tabelle 2 aufgeführt. Es ist offensichtlich, dass sich diese Ergebnisse in den meisten Fällen signifikant von den mit DNA-Substrat erzielten Ergebnissen unterscheiden, manchmal sogar das absolute Gegenteil darstellen.

Einer dieser Fälle ist Compound 30, der unter Verwendung von DNA-Substrat vollkommen inaktiv gegenüber der HCV-NTPase/Helikase ist ($IC_{50} > 500 \mu\text{g/ml}$), benutzt man allerdings RNA-Substrat, entwickelt er eine wirklich potente Aktivität ($IC_{50} 30\text{-}50 \mu\text{g/ml}$) gegenüber demselben Enzym.

Auch in Fällen, in denen die Inhibition sowohl mit DNA- als auch mit RNA-Substrat unter Verwendung derselben NTPase/Helikase untersucht wurde, zeigte das Ausmaß der Hemmung signifikante Unterschiede. Zum Beispiel war REN 30 bei der Inhibition der Helikase-Aktivität der WNV- und JEV-NTPase/Helikase mit einem RNA-Substrat 2-6-mal potenter als mit DNA-Substrat. Compound 16, das Ribose-Gegenstück zu REN 30, zeigt ähnliche Unterschiede bei der Benutzung von DNA-Substrat. Weiterhin stellte sich dar, dass Inhibitor 16 selektiver gegen die WNV-NTPase/Helikase ist, wenn RNA-Substrat verwendet wird.

Alle diese Daten über die Antihelikase-Aktivität, die mit einer Anzahl verschiedener RENs unter Verwendung von RNA- bzw. DNA-Substrat gewonnen wurden, lassen die wichtige grundsätzliche biochemische Frage aufkommen, welches der Aktivitätsmechanismus der RENs ist.

Eine nähere Betrachtung der Ergebnisse aus den Tabellen 1 und 2 zeigt, dass es keinen offensichtlichen oder einheitlichen Mechanismus der inhibierenden Aktivität der RENs gibt.

Im Gegenteil, es finden sich deutliche Aktivitätsunterschiede zwischen den Ribose- und den Desoxyriboseanaloga, zwischen den Analoga mit α - bzw. β -anomerer Konfiguration und zwischen den Analoga mit bzw. ohne Substituenten am Imidazolring.

Signifikant sind ebenfalls Aktivitätsunterschiede von Analoga mit verschiedenen Längen, Größen und Substituententypen am heterozyklischen Ring.

Obwohl es schwierig ist, für alle aufgelisteten RENs einen gemeinsamen Operationsmechanismus festzulegen, gibt es einen möglichen Mechanismus, der zwar bisher noch nicht bewiesen ist, der es aber dennoch wert ist, näher betrachtet zu werden:

Das einzige gemeinsame molekulare Merkmal unter den strukturell verschiedenen RENs, die Antihelikase-Aktivität zeigten, ist, dass sie das gleiche grundlegende Strukturskelett des „Referenz-RENs“ 1 besitzen. Dieser Compound 1 ist mit seinem Carbonyl- und Aminosubstituenten am heterozyklischen Ring ein naher Verwandter des Guanosins. Der Inhibitionsmechanismus der RENs könnte also auf einer nichtkovalenten Interaktion mit der DNA- oder RNA-Doppelhelix beruhen.

Dieser Aktivitätsmechanismus der RENs wird gestützt durch die Beobachtung, dass Compound 30 einen engen Komplex mit einem DNA-Substrat bildet, der in Anwesenheit von 0,5% sodium dodecyl sulfate (SDS) komplett stabil ist. Obwohl diese Tatsache schon ausführlich untersucht wurde, war festzustellen, dass die Migration des DNA-Substrates bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Anwesenheit von Compound 30 behindert wurde, sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit des Enzyms.

Tabelle 2

Inhibitionsaktivität (IC_{50}) der RENs gegenüber der Helikase-Aktivität der NTPase/Helikase des WNV, des HCV und des JEV unter Verwendung von RNA-Substrat. Um die Selektivität der RENs zu prüfen, wurde eine Version der humanen Suv3(Δ 1-159)-NTPase/Helikase mit in die Studie eingeschlossen.

Compound Nr.	WNV IC_{50} (μg/ml)	HCV IC_{50} (μg/ml)	JEV IC_{50} (μg/ml)	Suv3(Δ1-159) IC_{50} (μg/ml)
15	300	ND	>500	500
16	10	300	>500	150
17	>500	ND	ND	30-100
18	500	ND	ND	30
19	100	ND	250	30
20	Aktivator: ED ₂₀₀ = 100	200	>500	>500
30	1,5	30-50	2	ND
36	100-200	500	200	150
38	>500	>500	>500	>500
39	1-3	>500	>500	>500

Die Helikase-Aktivität ist festgelegt als eine Funktion wachsender Konzentrationen der Compounds in der Anwesenheit von ATP in einer Konzentration, die den K_m der verschiedenen Enzyme entspricht, ($9,5\mu$ M für WNV, 105μ M für HCV, 235μ M für JEV und $4,2\mu$ M für Suv3(Δ 1-159)) und in Anwesenheit von $4,7\text{pM}$ RNA-Substrat (Konzentration der Nukleotidbase). Der Ausdruck IC_{50} ist definiert als Konzentration der RENs, bei der 50% der Enzymaktivität gehemmt wird. Der Ausdruck ED₂₀₀ beschreibt die effektive Dosis des Compounds, bei der 200% der Aktivität des Enzyms erreicht werden. ND: nicht determiniert. Die dargestellten Daten sind die repräsentativen Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten.

4.3. Die NTPase-Reaktion

Nach den Untersuchungen der Helikase-Reaktion, wurde die Aufmerksamkeit auf die NTPase-Reaktion gerichtet, die ebenfalls durch die viralen Enzyme vermittelt wird. Bei diesen Untersuchungen standen zwei Aspekte im Vordergrund:

1. Es stellt sich die Frage, ob die genannten Compounds aus Tabelle 1 und 2 ebenfalls die virale NTPase hemmen.
2. Resultiert die Hemmung der NTPase-Reaktion aus der Hemmung der Entwindungs- (=Helikase-) Reaktion durch RENs?

Die Aktivität der viralen NTPase wurde in einem Standardassay bestimmt, mit dem man die Menge an ^{33}P i bestimmen kann, das während der enzymvermittelten Hydrolyse aus $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ freigesetzt wird.

Die ATPase-Aktivität wurde als eine Funktion wachsender Konzentrationen der RENs beschrieben, die ebenfalls mit dem Helikasetest untersucht wurden. Allerdings hemmte keiner der Compounds die hydrolytische Aktivität der Enzyme bis zu einer Konzentration von 0,5mM, wenn die Untersuchungen bei ATP-Konzentrationen gemacht wurden, die dem K_m -Wert, der für jede virale NTPase/Helikase bestimmt wurde, entsprechen.

Die schrittweise Senkung der Konzentrationen bis zu Werten, die dem 1×10^{-5} -fachen der K_m jeden Enzyms entsprachen, führte zu keiner signifikanten Hemmung der ATPase-Aktivität.

Überraschenderweise wurde allerdings bei Konzentrationen der RENs $>500\mu\text{M}$ und von ATP $>10 \times K_m$ eine Aktivierung der ATPase-Aktivität beobachtet.

Schon früher wurden ähnliche Beobachtungen des aktivierenden Effekts auf die ATPase-Aktivität mit Ribavirin gemacht, einem Nukleosid, das aus einem 1,2,4-Triazolring mit einer Carboxyamid-Seitenkette besteht und dafür bekannt ist, mit Nukleosidbindungsstellen verschiedener Enzyme zu interagieren. .

Es besteht die Vermutung, dass es eine zweite Nukleosidbindungsstelle innerhalb der SFII-NTPase/Helikase gibt (Porter et al. 1998). Man kann spekulieren, dass die erste, die mit Walker-Motiven [kurze Aminosäuresequenzen, die mit dem β - und γ -Phosphoratom des Nukleosid-5'-Triphosphates (Walker A) und mit dem an das β - und γ -Phosphoratom gebundene Mg^{2+} oder Mn^{2+} (Walker B) interagieren und von denen bekannt ist, dass sie in die Hydrolyse von NTPs involviert sind] ausgestattet ist, eine wesentlich höhere Affinität zu Nukleosid-5'-Triphosphaten besitzt.

Im Gegensatz dazu ist die zweite Bindungsstelle wesentlich weniger selektiv und kann durch Nukleoside, Nukleotide oder auch durch eine Nukleobase besetzt werden. Diese zweite Bindungsstelle erfüllt vorzugsweise eine Regulationsfunktion in Bezug auf die ATPase- und/oder Helikase-Aktivität.

Diese Hypothese wird durch Bindungsstudien, die unter Verwendung der isolierten Domäne I der HCV-NTPase/Helikase, die die erste NTP-Bindungsstelle mit Walker-Motiven besitzt, durchgeführt wurden, unterstützt.

So wurde bekannt, dass der bekannte ATPase-Aktivator O⁶-Benzyl-N-chloroethylguanin oder der Helikaseaktivator N⁷-Chloroethylguanin nicht in der Lage ist, an das Enzym gebundenes FSBA oder ATP zu verdrängen (Borowski et al. 2001).

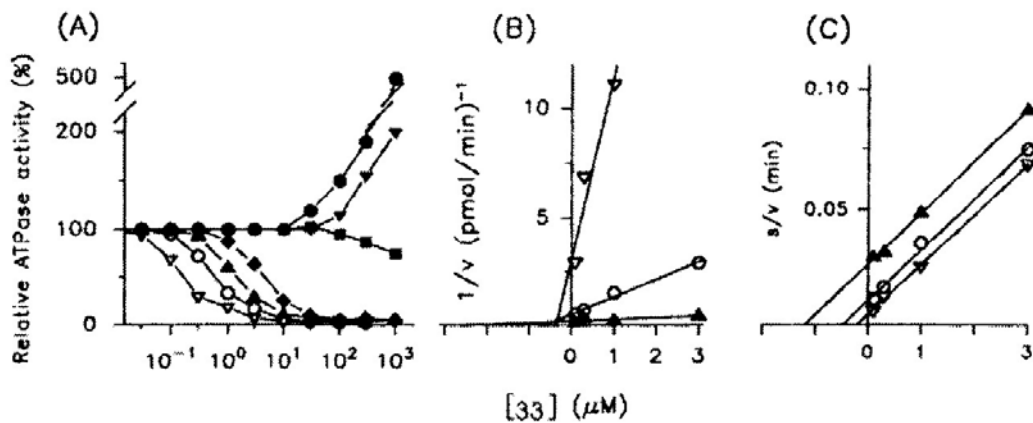


Abb.2: Modulation der ATPase-Aktivität der WNV-NTPase/Helikase durch REN-5'-Triphosphate bei verschiedenen ATP-Konzentrationen. (A) Untersuchung der ATPase-Aktivität als eine Funktion wachsender Konzentrationen des REN 33 in Anwesenheit verschiedener ATP-Konzentrationen. Die gezeigten Versuche wurden mit ATP-Konzentrationen von (●) 95 μM; (▼) 9,5 μM; (■) 0,95 μM; (◆) 95 nM; (▲) 9,5 nM; (○) 0,95 nM und (▽) 95 pM. (B und C) Kinetikanalysen der Inhibition der WNV-ATPase-Aktivität mit REN 33 bei niedrigeren ATP-Konzentrationen. Die Daten wurden erhoben bei ATP-Konzentrationen von 9,5 nM, 0,95 nM und 95 pM und nach den Methoden von Dixon (B) und Cornish-Bowden (C) aufgezeichnet. Die Ergebnisse enthalten Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Ergebnisse über die REN-vermittelte Inhibition bzw. Aktivierung, die getrennt für Helikase- bzw. NTPase-Aktivität erzielt wurden, führten zu dem hypothetischen Arbeitsmodell, dass die Ergebnisse, wie in Abbildung 3 gezeigt wird, erklärt. In Übereinstimmung zu diesem Modell besitzen die Enzyme eine zusätzliche allosterische Bindungsstelle, an die nukleosid- und nukleotidanalogen Moleküle binden können. Die Besetzung dieser Bindungsstelle ist weitgehend verantwortlich für die Modulation der NTPase und der Helikase.

Zu diesem Zeitpunkt ist allerdings noch unklar, ob es sich um eine gemeinsame Bindungsstelle sowohl für die Helikase als auch die NTPase handelt, oder ob es zwei unabhängige allosterische Bindungsstellen für die beiden Enzyme gibt.

5. Diskussion

5.1. Der Wirkungsmechanismus der NTPase/Helikasen

Helikasen sind ubiquitär vorkommende Enzyme, die in die zelluläre Rekombination und Replikation involviert sind. Das Interesse an den Helikasen basiert auf der Beobachtung, dass das HCV-Genom für eine Helikase innerhalb des NS3-Proteins codiert. Da etwa 3% der Weltbevölkerung mit HCV infiziert sind, und nur für eine kleine Gruppe dieser Patienten eine effektive Therapie verfügbar ist, wird ein wirksames Anti-HCV-Medikament dringend benötigt. Folglich ist die HCV-Helikase ein attraktives Ziel für die Entwicklung eines antiviralen Mittels gegen die HCV-Infektion.

Obwohl die Helikase-Aktivität identifiziert und das damit assoziierte Protein schon vor über 20 Jahren aufgereinigt wurde, sind die Kinetik und der Aktivitätsmechanismus für diese Enzymgruppe noch nicht vollständig aufgeklärt.

Folglich wurden Studien initiiert, um den Mechanismus der NTPase/Helikase-Aktivität zu untersuchen. Hierzu wurde die HCV-Helikase-Domäne des HCV-Genotyp 1b ausgewählt, welcher in der amerikanischen und japanischen Bevölkerung der am häufigsten vertretene Subtyp ist.

Es existieren zwei Modelle, die den Wirkmechanismus der NTPase/Helikasen darstellen sollen. Durch Analysen der ATP-abhängigen Helikase-Reaktion eines fluoreszierenden Doppelstrangoligomers mit einer definierten Sequenz konnten weitere Erkenntnisse über die Kinetik der Helikase-Aktivität dieser Enzyme erlangt werden. Die Helikase ist als ein monomeres Protein aktiv, das einen passiven Wirkungsmechanismus nahe legt. Weiterhin beschleunigt das Enzym im ATP-abhängigen Helikase-Assay die Entwindung der Einzelstrang-DNA.

Das erste „aktive“ Modell zeigt, dass durch NTP eine Konformationsänderung des Enzyms erreicht wird und dadurch die Bindung des Substrates an die entsprechenden Bindungsstellen erleichtert wird. Dieser Mechanismus erfordert das Vorhandensein von mindestens zwei Nukleinsäure-Bindungsstellen (Porter et al. 1998).

Diese ATP-abhängige Helikase-Reaktion kann als zwei Teilreaktionen betrachtet werden:

Die erste Teilreaktion ist die Trennung von Basenpaaren innerhalb des Nukleinsäuredoppelstrangs, die Translokation des Basenpaares sowie die Isomerisation des Enzyms von einem hohen zu einem niedrigeren Energielevel.

Die zweite Teilreaktion stellt die Verbindung zur ATP-Hydrolyse dar, um das Enzym wieder auf ein hohes Energieniveau zu bringen, damit es einen neuen Zyklus der Trennung von Basenpaaren durchlaufen kann. Die Beobachtung einer ATP-unabhängigen Reaktion führt allerdings zu der Annahme, dass die Grundenergie der Enzyme für die Trennung multipler Basenpaare ausreicht (Porter und Preugschat 2000).

Durch Helikasen wird die Entwindungsreaktion in Abwesenheit von Hilfsproteinen vermittelt. Dies erfolgt entweder stöchiometrisch, d.h. multiple Helikasemoleküle werden pro getrenntem Basenpaar benötigt, oder katalytisch, d.h. von einem Helikasemolekül werden mehrere Basenpaare getrennt.

Helikasen trennen im Replikationszyklus, wie oben beschrieben, ATP-abhängig die beiden Stränge genomischer RNA. Zusätzlich zu dieser Aktivität besitzen die Enzyme eine ATP-abhängige DNA-Helikase-Aktivität sowie eine Nukleinsäure-aktivierte ATPase-Aktivität. Nun soll gezeigt werden, dass die Enzyme ebenfalls eine ATP-unabhängige Entwindungsaktivität besitzen, bei der Doppelstrang-DNA als Substrat dient.

Helikasen binden häufig mit hoher Affinität an einzelsträngige Nukleinsäuren. Analog zu anderen Einzelstrang-bindenden Proteinen wie dem eukaryoten Replikationsprotein A, dem Adenovirus-DNA-bindenden Protein, dem Herpes simplex-Virus Typ 1 ICP8-Protein und dem T4gp32-Protein, die eine ATP-unabhängige DNA-Doppelstrang-Trennung bewirken, ist es möglich, dass die HCV-Helikase ebenfalls eine ATP-unabhängige Helikase-Reaktion unterstützt (Georgaki et al. 1992, Boehmer et al. 1993). Vermutlich ist die Entwindungsaktivität der letztgenannten Enzyme das Ergebnis der hohen Affinität zu Einzelstrang-DNA.

Dieses zweite Aktivitätsmodell, das durch die Beschreibung einer ATP-unabhängigen Entwindungsaktivität der HCV-NTPase/Helikase unterstützt wird, zeigt, dass das

Enzymmolekül an einzelsträngige Regionen des Substrates bindet und bei der Trennung doppelsträngiger DNA- und RNA-Strukturen nicht aktiv mitwirkt. Demnach wäre die bei der NTP-Hydrolyse freiwerdende Energie für die Entwindungsreaktion nicht zwingend notwendig (Porter und Preugschat 2000).

Die Kinetik der nukleinsäurestimulierten NTPase-Aktivität ist bereits bekannt (Preugschat et al. 1996). Es zeigt sich, dass die Geschwindigkeit der ATP-Hydrolyse durch Stimulation mit (dU)₁₈ um das 27-fache steigt. Die Bindung von (dU)₁₈ an das Enzym ist mit einer deutlichen Veränderung der intrinsischen Protein-Fluoreszenz assoziiert. Mit Hilfe dieser Veränderungen kann die Reaktion des Enzyms mit (dU)₁₈ demonstriert werden. Dabei wird deutlich, dass die Assoziationsrate in Abwesenheit von ATP 50-mal höher ist als in dessen Anwesenheit. Die Dissoziationsrate hingegen wird von ATP nicht beeinflusst (Porter et al. 1998).

Allerdings wurde beobachtet, dass die hE(V432A)-Mutante der HCV-Helikase nur eine sehr geringe ATP-abhängige Strangtrennungs-Aktivität zeigte, dafür aber hohe Affinität zu Einzelstrang-DNA. Da diese Mutante ATP-unabhängige Strangtrennung nicht bewirkte, aber mit hoher Affinität an Einzelstrang-DNA bindet, ist diese Bindungsaktivität nicht das Hauptmerkmal für die ATP-unabhängige Entwindungsaktivität, die für die HCV-Helikase beobachtet wurde (Preugschat 2000).

5.2. Der Inhibitionsmechanismus der RENS

Die Ring-Expanded-Nucleosides und Nukleotidanaloga wurden mit dem Ziel synthetisiert, die NTPase/Helikasen einiger Mitglieder der Familie der *Flaviviridae* (HCV, JEV, WNV) zu hemmen. Zur Prüfung der Selektivität der RENS gegenüber diesen NTPase/Helikasen wurde ein humanes Enzym, die Suv3(Δ 1-159)-Helikase, ebenfalls in die Studie eingeschlossen. Die im Kapitel „Material und Methoden“ vorgestellten Compounds wurden gegen diese vier Enzyme getestet.

In der Regel ist die Inhibitionskonstante K_i der gebräuchliche Parameter, um die Enzyminhibition auszudrücken, dennoch gibt es einige Gründe, die Ergebnisse als IC_{50} zu präsentieren. Die IC_{50} entspricht der Konzentration des Inhibitors, die für eine Hemmung der Enzymaktivität von 50% benötigt wird.

1. Die Inhibition der Helikase-Aktivität durch RENs beruht auf einem Mechanismus, über den man nur spekulieren kann. Außerdem scheint die Hemmung ATP-unabhängig zu sein. Unter diesen Bedingungen kann die K_i nur grob und unzuverlässig geschätzt werden.
2. Die Toxizität vieler RENs wurde früher schon in Zellkultursystemen getestet. Hier wurden die Ergebnisse ebenfalls als IC_{50} präsentiert. Um die Konformität und auch den leichten Vergleich zu gewährleisten, wurde beschlossen, die IC_{50} als Einheit für den Ausdruck der Aktivität vorzuziehen.
3. Die potentesten RENs werden zur Zeit *in vivo* als antivirale Stoffe getestet, und dafür ist es wesentlich praktischer, die *in vivo*- und die *in vitro*-Daten durch Verwendung der IC_{50} - oder der IC_{90} -Werte zu vergleichen.

Der Wirkungsmechanismus der RENs ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Basierend auf der Kristallstruktur der HCV-RNA-NTPase/Helikase und der DNA-Helikase von *E.coli* und *Bacillus stearothermophilus* wurden verschiedene Alternativen der Entwindungsreaktion in Erwägung gezogen. Zunächst soll das Enzym an das Substrat binden und an der gut charakterisierten NTP-Bindungsstelle NTP hydrolysieren. Die freigesetzte Energie ist für die Translokation des Enzyms entlang der DNA oder RNA notwendig. Die Entwindungsreaktion resultiert aus der Okkupation von Einzelstrangregionen, die durch thermische Fluktuation an der Gabel entstehen. Alternativ dazu könnte die Energie auch auf die Gabel transferiert werden und für die Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden Stränge zusammenhalten, verwendet werden.

Auf der Grundlage dieser Vorstellung können verschiedene Mechanismen betrachtet werden, wie die Helikase-Aktivität beeinflusst werden könnte:

1. Die Inhibition könnte aufgrund einer Hemmung der NTPase-Aktivität durch Interferenz mit der NTP-Bindungsstelle erfolgen.
2. Ein allosterischer Mechanismus könnte für die Inhibition verantwortlich sein.
3. Die Hemmung erfolgt aufgrund einer Entkopplung zwischen NTPase- und Entwindungsreaktion.

Zusätzlich zu diesen Mechanismen kommt noch in Frage, dass die Interferenz der Helikase mit ihrem Substrat unterbunden wird durch

4. die kompetitive Blockade der Substratbindungsstelle oder durch

5. die Hemmung der Entwindung durch sterische Inhibition der Translokation des Enzyms entlang der Polynukleotidkette.

Natürlich gibt es noch weitere Mechanismen, wie die Aktivität der Helikasen unterbunden werden könnte. Porter et al. (2000) berichten von putativen Nukleosidbindungsstellen innerhalb des NTPase/Helikase-Moleküls. Die Lokalisation dieser Bindungsstelle ist bisher allerdings nicht bekannt. Trotzdem sprechen die gesammelten Erfahrungen dafür, dass die NTPase- und die Helikase-Aktivität der viralen Superfamilie II durch Besetzung eben dieser Nukleosidbindungsstelle moduliert werden könnten. Zum Beispiel kann Ribavirin-5'-Triphosphat (RTP), ein klassischer potenter und kompetitiver Inhibitor der NTPase-Aktivität der WNV- und HCV-Helikase bei niedrigen ATP-Konzentrationen, die ATPase-Aktivität bei höheren ATP-Konzentrationen ($>K_m$) nicht hemmen. Stattdessen stimuliert es die Enzymaktivität. Im Gegensatz dazu hemmt RTP die Helikase-Aktivität beider Enzyme durch einen ATP-unabhängigen Mechanismus.

Es gibt eine Mehrzahl von Publikationen, die nicht-kovalente Interaktionen von Analoga von Nukleobasen, Nukleosiden und Nukleotiden zeigen. Insbesondere bei Haupt- und Nebenbindungsstellen von DNA- und RNA-Doppelhelices ist es vorstellbar, dass es einen ähnlichen Mechanismus für die RENS gibt, besonders seit bekannt ist, dass die Bindungsstellen sehr sensitiv gegenüber der Art des Substituenten am möglichen Bindungspartner sind (Marsch et al 1994, Morales et al. 2000).

Die überwiegende Zahl der RENS, die die NS3-assoziierte Helikase-Aktivität hemmen, scheinen ihren Effekt durch Bindung an die Haupt- oder Nebenbindungsstelle des DNA- oder RNA-Substrates für die Helikase zu erzielen.

Bei hohen ATP-Konzentrationen scheinen die Compounds die allosterische Bindungsstelle zu besetzen und dadurch die Enzymaktivierung zu verursachen. Das Vorhandensein einer allosterischen Bindungsstelle könnte also erklären, dass NTPase- und Helikase-Aktivitäten der viralen NTPase/Helikase ungekoppelt erscheinen.

Von den verschiedenen gebundenen RENS mit ihren unterschiedlichen Substitutionen und topologischen Strukturmerkmalen wird erwartet, dass sie die Interaktionen der NTPase/Helikasen mit einem DNA- oder RNA-Substrat unterschiedlich modulieren.

Das Ergebnis der verschiedenen Modulationen könnte eine stabilere oder eine weniger stabile Doppelhelix sein. Das würde mit dem beobachteten inhibierenden bzw.

aktivierenden Effekt der unterschiedlichen RENs auf die Entwindungsaktivität der viralen Helikasen übereinstimmen.

Die in dieser Arbeit vorgestellten RENs, die die ATPase- und Helikase-Aktivität der WNV-, JEV- und HCV-NTPase/Helikasen beeinflussen, also sowohl aktivieren als auch inhibieren, sollen nach dem in Abb. 3 dargestellten Modell arbeiten, nach dem die Enzyme eine zweite allosterische NTP-Bindungsstelle besitzen. Die erste Bindungsstelle besitzt eine hohe Affinität zu Nukleosid-5'-Triphosphaten, ist allerdings auch sehr selektiv, da Phosphatgruppen für die Bindung benötigt werden. Daraus folgt, dass die RENs nicht über diese Bindungsstelle agieren können. Die zweite Bindungsstelle ist wesentlich weniger selektiv und kann durch Nukleoside, Nukleotide oder auch durch eine Nukleobase besetzt werden. Diese zweite Bindungsstelle erfüllt vorzugsweise eine Regulationsfunktion in Bezug auf die ATPase- und/oder Helikase-Aktivität, und stellt somit einen viel versprechenden Angriffspunkt für die RENs dar. Bislang ist allerdings noch nicht geklärt, ob es eine gemeinsame Bindungsstelle für Helikase und NTPase gibt, oder ob zwei unabhängige Bindungsstellen vorhanden sind.

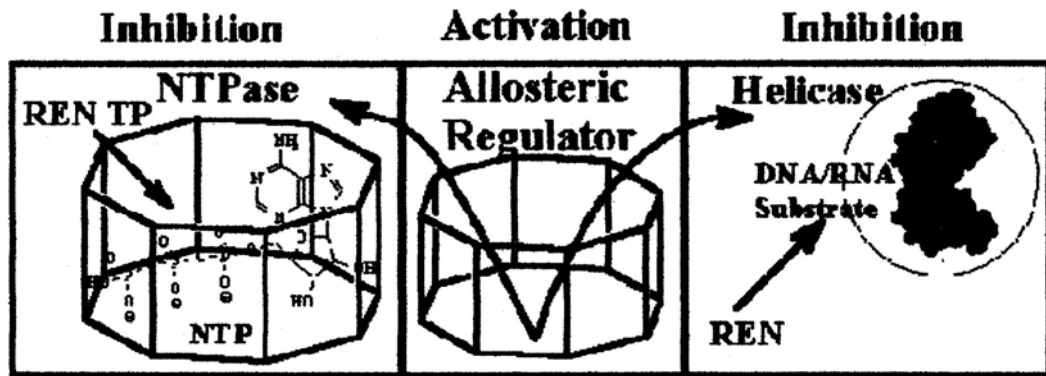


Abb.3: Hypothetisches Modell, um die beobachtete Inhibition und/oder Aktivierung der Helikasen ebenso wie der NTPasen von WNV-, HCV- und JEV- NTPase/Helikase durch Ring-Expanded-Nucleosides, Nukleotide und heterozyklische Basen zu erklären. Nach diesem Modell sollen die Enzyme eine zusätzliche allosterische Bindungsstelle besitzen, die für die Modulation der NTPase/Helikase verantwortlich ist.

6. Zusammenfassung

Einige Mitglieder der Familie der *Flaviviridae* gehören zu den Viren, die in der heutigen Zeit eine immer bedeutendere Rolle spielen, und die Erkrankungen verursachen, die nach wie vor schwer therapierbar sind. Zu diesen gehören unter anderem das HCV und das WNV, ferner auch JEV. Diese Viren sind Ursache von Hepatitiden, hämorrhagischen Erkrankungen und Enzephalitiden, die häufig bleibende neurologische Schäden hinterlassen.

Angriffspunkt einer antiviralen Therapie könnten Enzyme sein, die für die Virusreplikation unabdingbar sind: die NTPase/Helikasen. Diese sind ubiquitär vorkommende Proteine, deren Funktion in der Katalysierung der Entwindungsreaktion besteht. Die *Flaviviridae* codieren für ein Polyprotein, das aus Struktur- und Nicht-Struktur-Proteinen besteht. Mit den Nicht-Struktur-Proteinen sind viele enzymatische Aktivitäten assoziiert, darunter auch die NTPase/Helikase. Für die Funktionsweise der NTPase/Helikase gibt es zwei Modelle. Ein Aktives beschreibt die Funktion des Enzyms als ATP-abhängig, während ein Passives die bei der ATP-Hydrolyse frei werdende Energie für die Entwindungsaktivität nicht fordert.

Als mögliche Inhibitoren der Enzymaktivität wurden so genannte RENs synthetisiert. Sie alle sind Abkömmlinge des Guanosins. RENs hemmen die Helikase-Aktivität, während sie auf die NTPase-Aktivität keinen Einfluss haben. Der Wirkungsmechanismus ist bislang noch nicht geklärt. Vermutlich besitzen die NTPase/Helikasen zwei allosterische Bindungsstellen. Die erste ist sehr selektiv und kann nur Nukleosidtriphosphate binden, während die zweite wesentlich unselektiver und daher auch für Nukleoside, Nukleotide und Nukleobasen zugänglich ist. Die RENs wirken vermutlich über diese zweite, relativ unselektive Bindungsstelle innerhalb der Helikase und können so die Enzymaktivität modulieren.

7. Literaturverzeichnis

Bartenschläger R (1997) Candidate targets for hepatitis C virus-specific antiviral therapy. *Intervirology* 40:378-393

Black ME, Hruby DE (1992) Site-directed mutagenesis of a conserved domain in vaccinia virus thymidine kinase. Evidence for a potential role in magnesium binding. *J Biol Chem* 267:6801-6806

Boehemer PE, Lehman IR (1993) Herpes simplex virus type 1 ICP8: helix-destabilizing properties. *J Virol* 67:711-715

Borowski P, Heiland M, Oehlmann K, Becker B, Kornetzky L, Feucht HH, Laufs R (1996) Non-structural protein 3 of hepatitis C virus inhibits phosphorylation mediated by cAMP-dependent protein kinase. *Eur J Biochem* 237:611-618

Borowski P, Kornetzky L, Laufs R (1998) Properties of the Proteolytically Generated Catalytic Domain (42 kDA kinase) of Epidermal Growth Factor receptor: Comparison with Holoenzyme. *J Biochem* 123:380-385

Borowski P, Kühl R, Lauf R, Schulze zur Wiesch J, Heiland M (1999a) Identification and characterization of a histone binding site of the non-structural protein 3 of hepatitis C virus. *J Clin Virol* 13:61-69

Borowski P, Kühl R, Mueller O, Hwang LH, Schulze zur Wiesch J, Schmitz H (1999b) Biochemical properties of a minimal functional domain with ATP binding activity of the NTPase/helicase of hepatitis C virus. *Eur J Biochem* 266 :715-723

Borowski P, Mueller O, Niebuhr A, Kalitzky M, Hwang LH, Schmitz H, Siwecka MA, Kulikowski T (2000) ATP-binding domain of NTPase/helicase as a target for hepatitis C antiviral therapy. *Acta Biochim Polon* 47 :173-180

Borowski P, Lang M, Niebuhr a, Haag A, Schmitz H, Schulze zur Wiesch J, Choe J, Siwecka MA, Kulikowski, t (2001a) Inhibition of the helicase activity of HCV

NTPase/helicase by 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4, triazole-3-carboxamide-5'-triphosphate (Ribaverin-Triphosphat). *Acta Biochim Polon* 48 :739-744

Borowski P, Niebuhr A, Mueller O, Bretner M, Felczak K, Kulikowski T, Schmitz H (2001b) Purification and Charakterization of West Nile Virus Nucleoside Triphosphatase/Helicase: Evidence for Dissociation of the NTPase and Helicase Activities of the Enzyme. *J Virol* 75:3220-3229

Borowski P, Lang M, Haag A, Schmitz H, Choe J, Chen HM, Hosmane R (2002a) Characterization of imidazol [4,5-d]pyridazine nucleosides as modulators of unwinding reaction mediated by West-Nil-Virus nucleoside triphosphatase/helicase: evidence for activity on the level of substrate and/or enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 46:1231-1239

Borowski P, Niebuhr A, Schmitz H, Hosmane RS, Bretner M, Siwecka MA, Kulikowski T (2002b) NTPase/helicase of Flaviviridae: inhibitors and inhibition of the enzyme. *Acta Biochim Polon* 49:597-614

Borowski P, Schalinski S, Schmitz H (2002c) Nucleotide triphosphatase/helicase of hepatitis C virus as a target for antiviral therapy. *Antiviral Res.* 55:397-412

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice MC (1990) Flavivirus genome organization, expression and replication. *Ann Rev Microbiol* 44:649-688

Chang YS, Liao CL, Tsao CH, ChenMCet al. (1999) Membrane permeabilization by small hydrophobic nonstructural proteins of Japanese encephalitis virus *J Virol* 73(8):6257-64

Chase JW, Williams KR (1986) Single-stranded DNA binding proteins required for DNA replication. *Annu Rev Biochem* 55:103-136

Chen HM, Hosmane RS (2001) Synthesis of 1-(2'-O-methyl- β -D-ribofuranosyl)-1h-imiazol[4,5-d]pyridazin-4,7(5h,6h)-dione: an attractive building block for antisense and triple helical applications. *Molecules* 6:203-207

Chen Y, Maguire T, Hilemann RE, Fromm JR et al. (1997) Denguevirus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfat. *Nature Medicine* 3:866-871

Cho HS, Ha NC, Kang LW, Chung KM et al. (1998) Crystal structure of RNA helicase from genotype 1b hepatitis C virus, A feasible mechanism of unwinding duplex RNA. *J Biol Chem* 273:15045-15053

Choo QL, Kuo G, Weiner AL, Bradley D, Houghton M (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B-hepatitis. *Science* 244:359-362

Choo QL, Weiner AL, Overby LR, Kuo G, Houghton M, Bradley W (1990) Hepatitis C: the major causative agent of a viral non-A, non-B-hepatitis. *Br Med Bull* 46:423-441

Cornish-Bowden A (1974) A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors. *Biochem J* 137:143-144

Diana GD, Bailey TR (1996) Compounds composition and methods for treatment of hepatitis C. U.S. Patent No. 5,633,388

Diana GD, Bailey TR, Nitz TJ (1998) Compounds composition and methods for treatment of hepatitis C. U.S. Patent No 6,127,384

Dixon M (1952) The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J* 55:170-171

Dmochowska A, Kalit K, Krwczyk M, Golik P et al. (1999) A human putative Suv3-like RNA helicase is conserved between *Rhodobacter* and all eukaryotes. *Acta Biochim Pol* 46(1):155-162

Fuller-Pace FV (1994) RNA helicases: modulators of RNA structure. *Trends cell Biol* 4:271-274

Gallinari P, Brennan D, Nardi C, Brunetti L, Tomei L, Steinkühler C, De Francesco R (1998) Multiple enzymatic activities associated with recombinant NS3 of hepatitis C virus. *J Virol* 72:6758-6769

Ganapathi R, Kamath N, Constantinou A, Grabowski D et al. (1991) Effect of the calmodulin inhibitor trifluoperazine on phosphorylation of P-glycoprotein and topoisomerase II: relationship to modulation of subcellular distribution DNA damage and cytotoxicity of doxorubicin in multidrug resistant L 120 mouse leukemia cells. *Biochem Pharmacology* 41:21-26

Georgaki A, Strack b, Podust V, Hubscher U (1992) DNA unwinding activity of replication protein. *FEBS Lett.* 308:240-245

Gobalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, Blinov VM (1989) Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res* 17:4713-4730

Gordon FD, Poterucha JJ, Germer J, Zein NN et al. (1997) Relationship between hepatitis C after liver transplantation. *Transplantation* 63:1419-1423

Gu B, Liu C, Lin-Goerke J, Malley DR et al. (2000) The RNA helicase and nucleotide triphosphatase activities of the bovine diarrhoea virus NS3 protein are essential for viral replication *J Virol* 74: 1794-1800

Gwack Y, Kim DW, Han JH, Choe J (1996) Characterization of RNA binding activity of the hepatitis C virus NS3 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 225:654-659

Halsted SB (1992) The XXth century dengue pandemic: need for surveillance and research. *World Health Stat Q* 45:292-298

Hay B, Jan LY, Jan YN (1988) A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by *vasa* and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases. *Cell* 55:577-587

Hesson T, Mannarino A, Cable M (2000) Probing the relationship between RNA-stimulated ATPase and helicase activities of HCV NS3 using 2'-O-methylRNA substrates. *Biochemistry* 39:2619-2625

Ishido S, Fujita T, Hotta H (1998) Complex formation of NS5B with NS3 and NS4A proteins of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 244:35-40

Kadare G, Haeni A (1997) Virus-encoded RNA helicase. *J Virol* 71:2583-2590

Kim JL, Morgenstern K, Griffith J, Dwyer M et al. (1998) Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure* 6:89-100

Koch JO, Bartenschläger R (1999) Modulation of hepatitis C virus NS5a hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A and NS4B. *J Virol* 73:138-146

Korolev S, Hsieh j, Gauss GH, Lohmann TM et al. (1997) Major domain swiveling revealed by the crystal structures of complexes of *E. coli* Rep helicase bound to single-stranded DNA and ADP. *Cell* 90:635-647

Kuo M, Chin C, Hsu S, Shiao J et al. (1996) Characterization of the NTPase activity of Japanese encephalitis virus NS3 protein. *J Gen Virol* 77:2077-2084

Lain S, Martin MT, Riechmann JL, Garcia JA (1991) Novel catalytic activity associated with positive strand RNA virus infection : Nucleic acid stimulated ATPase activity of the plum pox potyvirus helicase-like protein. *J Virol* 65:1-6

Lain MK, Riechmann L, Martin MT, Garcia JA (1989) Homologous potyvirus and flavivirus proteins belonging to a superfamily of helicase-like proteins. *Gene* 82:357-362

Leary TP, Desai SM, Erker JC, Mushahwar IK (1998) The sequence and genomic organization of a GB virus. A variant isolated from captive tamarins J Gen Virol 78:2307-2313

Levin m, Patel S (1999) The helicase from hepatitis C virus is active as an oligomer. J Biol Chem 274:31839-31846

Leysen P, De Clercq E, Neyts J (2000) Perspectives for the treatment of infections with *flaviviridae*. Clin Microbiol Rev 13:67-82

Ludwig J (1981) Chemical synthesis of nucleoside triphosphates. Acta Biochim et Biophys Acad Sci Hung 16:131-133

Lüking A, Stahl U, Schmidt U (1998) The protein family of RNA helicases. Crit Rev Biochem Mol Biol 33:259-296

Marsch GA, Ward RL, Colvin M, Turteltaub, KW (1994) Non-covalent DNA groove-binding by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol [4,5-*b*]pyridine. Nucleic Acids Res. 22:5408-5415

Matson SW, Kaiser-Rogers KA (1990) DNA helicases. Ann Rev Biochem 59: 289-329

Matusan AE, Pryor MJ, Davidson AD, Wright PJ (2001) Mutagenesis of the dengue virus Type 2 NS3 protein within and outside helicase motifs: effects on enzyme activity and virus replication. J Virol 75:9633-9643

McHutchinson JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffmann ML et al. (1998) Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. N Engl J Med 339:1485-1492

Meyers G, Thiel HJ (1996) Molecular characterization of pestiviruses. Adv Virus Res 7:53-118

Miller H, Purcell R (1990) Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestivirus and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. Proc Nat Acad Sci USA 87:2057-2061

Miller JP, Kiwana LJ, Streeter DG, Robins RK et al. (1977) The relationship between the metabolism of ribavirin and its proposed mechanism of action. Ann N.Y. Acad Sci USA 287:211-229

Mishra NC, Broom AD (1991) A novel synthesis of nucleoside 5'-triphosphates. J Chem Soc Chem Commun 1276-1277

Mizokami M, Orito E (1999) molecular evolution of hepatitis viruses. Intervirology 42:159-165

Monath TP (1987) Yellow fever: a medically neglected disease. Report on a seminar. Rev Infect Dis 9: 165-175

Morales JC, Kool ET, (2000) Functional hydrogen-bonding map of the minor groove binding tracks of six polymerases. Biochemistry 39:12979-12988

Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, Pilot-Matias TJ et al. (1995) genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the *fluviviridae* associated with GB agent hepatitis. J Virol 69:5621-5630

Neddermann P, Clementi A, De Francesco R (1999) Hyperphosphorylation of the hepatitis C NS5A protein requires an active NS3 protease, NS4A, NS4B and NS5A encoded on the same polyprotein. J Virol 73:9984-9991

Nettelton PE, Entrian G (1995) uminant pestiviruses. Br Vet J 151 :615-642

Pallaoro m, Lahm A, Biasiol G, Brunetti M et al. (2001) Characterization of the hepatitis C virus NS2/3 processing reaction by using purified precursor protein. J Virol 75:9939-9946

Phoon CW, Ng YP, Ting AE, Yeo SL, Sim MM (2001) Biological evaluation of hepatitis C virus helicase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 11:1647-1650

Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G et al. (1998) Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282:938-941

Poole TL, Wang C, Popp RA, Potgeier LN et al. (1995) Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosomal entry. *Virology* 206:750-754

Porter D (1998) A kinetic analysis of the oligonucleotide-modulated ATPase-activity of the helicase domain of the NS3 protein from hepatitis C virus. *Biol Chem* 273:14247-14253

Porter DJ, Preugschat F (2000) Strand-separating activity of hepatitis C virus helicase in the absence of ATP. *Biochemistry* 39:5166-5173

Poynard T, Marcellin P, Lee S, Niederau C et al. (1998) Randomized trial of interferon alpha-2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha 2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *Interventional Hepatitis Therapy Group (IHIT). Lancet* 352:1426-1432

Preugschat F, Averett D, Clarke B, Porter D (1996) A steady-state and presteady-state kinetic analysis of the NTPase activity associated with the hepatitis C virus NS3 helicase domain. *J Biol Chem* 271:24449-24457

Pryor MJ, Gualano RC, Lin AD, Davidson AD et al. (1998) Growth restriction of dengue virus type 2 by site specific mutagenesis of virus-encoded glycoproteins. *J Gen Virol* 79: 2631-2639

Shuman S (1992) vaccinia virus RNA helicase : An essential enzyme related to the DE-H family of RNA-dependend NTPases. *Proc Nat Acad Sci USA* 89:10935-10939

Subramanya HS, Bird LE, Brannigan JA, Wigley DB et al. (1996) Crystal structure of a DExx box DNA helicase. *Nature* 384:379-383

Suzich J, Tamura J, Palmer-Hill F, Warrener P, Grakoui A, Rice C, Feinstone S, Colett M (1993) Hepatitis C Virus NS3 Protein Polynucleotide-stimulated Nucleoside triphosphatase and Comparison with the related Pestivirus and Flavivirus Enzymes *J Virol* 67:6152-6158

Speight G, Westaway G (1989) Positive identification of NS4A, the last of the hypothetical nonstructural proteins of flaviviruses. *Virology* 170:299-301

Tai CL, Chi WK, Chen DS, Hwang LH (1996) The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural Protein 3 (NS3). *J Virol* 70:8477-8484

Tamura JK, Warrener P, Colett M (1993) RNA-stimulated NTPase activity associated with the p80 protein of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology* 193:1-10

Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A et al. (1992) Internal ribosomal entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* 66:1476-1483

Utama A, Shimizu H, Morikawa S, Hasebe F et al. (2000) Identification and characterization of the RNA helicase activity of Japanese encephalitis virus NS3 protein. *FEBS Lett.* 465:74-78

Van Doorn LJ (1994) Review: Molecular biology of the hepatitis C virus. *J Med Virol* 43:345-356

Wagner JDO, Janowski E, Company M, Pyle AM et al. (1998) The DEAH-box protein PRP22 is an ATPase that mediates ATP dependent mRNA release from the spliceosome and unwinds RNA duplexes. *EMBO J.* 17:2926-2937

Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO* 1:945-951

Warrener P, Collett MS (1995) Pestivirus NS3 (p80) protein possesses RNA helicase activity. *J Virol* 69: 1720-1726

Wassarman DA, Seitz JA (1991) RNA splicing, alive with DEAD proteins. *Nature* 349:463-464

Wengler G, Castle E, Leidner U, Nowak T et al. (1986) Sequence analysis of membrane protein V3 of the flavivirus West Nile virus and of its gene. *Virology* 147:264-274

Wengler G, Nowak T, Castle E (1990) Description of a procedure which allows isolation of viral nonstructural proteins BHK vertebrate cells infected with the West Nile flavivirus in a state which allows their direct chemical characterization. *Virology* 177:795-801

Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich Y, Horzinek MC et al. (1985) *Flaviviridae*. *Intervirology* 24:183-192

Westaway EG (1987) Flavivirus replication strategy. *Adv Virus Res* 33:45-90

Woodford T, Pardee AB (1986) Histone H1 kinase in exponential and synchronous populations of Chinese hamster fibroblast. *J Biol Chem* 261:4669-4676

Yan HG, Tsai MD (1991) Mechanism of adenylate kinase. Demonstration of a functional relationship between aspartate 93 and Mg^{2+} by site-directed mutagenesis and proton, phosphorus-31 and magnesium-25 NMR. *Biochemistry* 30:5539-5546

Yao N, Hesson T, Cable M, Hong Z, Kwong A, Le H, Weber P (1997) Structure of the hepatitis C virus RNA helicase domain. *Nat Struct Biol* 4:463-467

Yoshikawa M, Kato T, Takenishi T (1967) A novel method of phosphorylation of nucleotides to 5'-nucleotides. *Tetrahedron Lett.* 50:5065-5068

Zhang N, Chen Hm, Koch V, Schmitz H et al. Ring expanded („fat“) nucleoside and nucleotide analogues exhibit potent in vitro activity against *Flaviviridae* NTPases/helicases including those of the West Nile virus (WNV), hepatitis C virus (HCV) and Japanese encephalitis virus (JEV). Submitted to *J Med Chem*

Zhong W, Ingravallo P, Wright-Minogue J, Skelton A et al. (1999) Nucleoside triphosphatase and RNA Helicase activities associated with GB virus B nonstructural protein 3. *Virology* 261:216-226

Zimmermann TP, Deeproose RD (1978) Metabolism of 5-amino 1- β -D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide and related five-membered heterocycles to 5'triphosphates in human blood and L5178Y cells. *Biochem Pharmacol* 27:709-716

8. Abkürzungen

ADP:	Adenosindiphosphat
AMP:	Adenosinmonophosphat
AMP-PCP:	β -, γ -Methylenadenosin-5'-Triphosphat
AMP-PNP:	5'-Adenylyl-Imidodiphosphat
ATP:	Adenosinriphosphat
BSA:	Bovines Serumalbumin
BVDV:	Bovin viral diarrhea virus
DENV:	Dengue-Fieber-Virus
DMF:	Dimethylformamid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
EDTA:	Ethylendiamin-Tetraacetat
EGTA:	Ethylenglycol-Tetraacetat
FSBA:	Fluorosulfonylbenzyladenosin
HCV:	Hepatitis C-Virus
JEV:	Japanische Enzephalitis-Virus
PAGE:	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG:	Polyethylenglykol
PLC:	Planar liquid chromatography
PMSF:	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA:	Ribonukleinsäure
SDS:	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SF:	Superfamily
TBE:	Tris Borat EDTA, tick-borne encephalitis
TBS:	Tris buffered saline
TGT:	Tris Glycerol Tween
TLC:	Thin layer chromatography
TTBS:	Tween Tris Borat EDTA
WNV:	West-Nil Virus
YFV:	Gelbfiebertvirus

9. Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Schmitz möchte ich für seine Unterstützung und für die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten und Geräte danken.

Insbesondere danke ich Herrn Privatdozent Dr. Peter Borowski für die Überlassung des interessanten Themas, die ausgezeichnete wissenschaftlich Betreuung und die stete Hilfsbereitschaft.

Sehr herzlich danke ich Herrn Prof. Ramachandra S. Hosmane für die Überlassung der Ring-Expanded-Nucleosides, die ein wichtiger Beitrag zu dieser Arbeit waren.

10. Lebenslauf

Andrea Katrin Haaß,
geboren am 11. Mai 1980 in Essen

Schulbildung

1986-1990	Grundschule in Essen
1990-1999	Burggymnasium Essen
Juni 1999	Erreichen der Allgemeinen Hochschulreife

Beruflicher Werdegang

01. Juli 1999	Diensteintritt in die Bundeswehr als Sanitätsoffizieranwärterin						
April 2000	Aufnahme des Medizinstudiums an der Universität Hamburg						
März 2002	Bestehen der Ärztlichen Vorprüfung						
März 2003	Bestehen des ersten Abschnitts der ärztlichen Prüfung						
März 2005	Bestehen des zweiten Abschnitts der ärztlichen Prüfung						
April 2005 bis März 2006	Praktisches Jahr (drei Tertiale): <table> <tr> <td>Innere Medizin</td> <td>AK St.Georg, Hamburg</td> </tr> <tr> <td>Chirurgie</td> <td>AK St.Georg, Hamburg</td> </tr> <tr> <td>Pädiatrie</td> <td>Altonaer Kinderkrankenhaus, Hamburg</td> </tr> </table>	Innere Medizin	AK St.Georg, Hamburg	Chirurgie	AK St.Georg, Hamburg	Pädiatrie	Altonaer Kinderkrankenhaus, Hamburg
Innere Medizin	AK St.Georg, Hamburg						
Chirurgie	AK St.Georg, Hamburg						
Pädiatrie	Altonaer Kinderkrankenhaus, Hamburg						
Mai 2006	Bestehen des dritten Abschnitts der ärztlichen Prüfung						
14.Juni 2006	Beförderung zum Stabsarzt						
seit 14. Juni 2006	Tätigkeit als Assistenzärztin in der internistischen Abteilung des Bundeswehrkrankenhauses Hamburg						

Wissenschaftliche Laufbahn

seit April 2002	Doktorandin am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Abteilung Virologie Leiter: Prof. Dr. Herbert Schmitz
-----------------	---

11. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.