

Aus dem

Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin  
Bernhard-Nocht-Strasse 74  
20359 Hamburg

Direktor Prof. Dr. med. Bernhard Fleischer

**Isolation und Charakterisierung einer minimalen funktionellen  
Domäne mit ATP-bindenden Eigenschaften der  
NTPase/Helikase des Hepatitis C Viruses**

***Dissertation***

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

***Reinhard Kühl***

aus Hamburg

Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 11.07.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. H. Schmitz

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. B. Fleischer

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. M. Aepfelbacher

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Arbeitshypothese und Fragestellung .....</b>	<b>4</b>
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>5</b>
2.1. Die Hepatitis C Infektion .....	5
2.2. Das Hepatitis C Virus.....	8
2.3. Die NS3 RNA Helikase .....	13
<b>3. Materialien und Methoden .....</b>	<b>17</b>
3.1. Chemikalien .....	17
3.2. Geräte .....	17
3.3. Wichtige Puffer .....	18
3.4. SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese (SDS/PAGE) .....	19
3.5. Silberfärbung von Proteinen in Polyakrylamidgelen.....	19
3.6. Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose .....	20
3.7. Immunologischer Nachweis von Proteinen („Immunoblot“).....	20
3.8. Affinitäts-Reinigung von anti-NS3-Antikörpern aus humanem Serum .....	21
3.9. Expression des rekombinanten HCV-Polyprotein-(1189-1525), der HCV NTPase/Helikase in Escherichia coli und proteolytische Trennung vom GST- Fusionsprotein .....	21
3.10. Proteolytische Prozessierung der ATP-bindenden Domäne der HCV NTPase/Helikase. ....	22
3.11. Nukleotid-Bindungs-Assay.....	23
3.12. ATPase-Assay .....	23
3.13. Interaktion des HCV-Polyproteins-(1203-1364) mit Oligo[dA].....	24
3.14. Affinitätsmarkierung mit 5´-FSBA .....	24
3.15. Andere Assays.....	25
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>26</b>
4.1. Bestimmung und Reinigung der ATP-bindenden Domäne der HCV NTPase/Helikase .....	26
4.2. Charakterisierung der ATP-Bindung der isolierten ATP-bindenden Domäne .....	30
4.4. Interaktionen des HCV-Polyproteins-(1203-1364) .....	33
4.5. Inhibition der ATP-Bindung an das HCV-Polyprotein-(1203-1364) und deren Effekt auf die ATPase-Aktivität der HCV NTPase/Helikase.....	34
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>38</b>
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>42</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>44</b>
<b>8. Danksagung .....</b>	<b>50</b>
<b>9. Lebenslauf.....</b>	<b>51</b>
<b>10. Veröffentlichungen .....</b>	<b>52</b>

## **1. Arbeitshypothese und Fragestellung**

Die NTPase/Helikase des Hepatitis C Virus ist ein Teil des nicht-Strukturproteines 3 (NS3) des Hepatitis C Virus. Die NTPase/Helikase ist fähig, RNA Strukturen enzymatisch zu entwinden. Diese Reaktion ist an die Energie freisetzende Hydrolyse von Nukleosidtriphosphat (NTP) gebunden. So besitzen alle bisher beschriebenen Helikasen auch eine ATPase-Aktivität.

Ziel dieser Arbeit ist es, durch limitierte Proteolyse eine minimale funktionelle Domäne, die ATP-bindende Eigenschaften besitzt, herzustellen und ihre Eigenschaften zu charakterisieren. Weiterhin sollen verschiedene Substanzgruppen auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, die Bindung von ATP an die zuvor isolierte ATP-bindende Domäne zu inhibieren. Außerdem soll untersucht werden, inwieweit Substanzen, die die ATP-Bindung an die minimale funktionelle Domäne beeinflussen, die ATPase-Aktivität des NS3 modifizieren. Die Annahme ist, dass Substanzen, die die ATP-Bindung an die ATP-bindende Domäne beeinflussen, auch die ATPase-Aktivität in gleicher Weise verändern.

Durch die Beschreibung von Modulatoren der ATP-Bindung der NTPase/Helikase des NS3 Proteines könnte ein Schritt hin auf die Entwicklung von neuen, potenten Inhibitoren der HCV-Virusreplikation gemacht werden.

## **2. Einleitung**

### **2.1. Die Hepatitis C Infektion**

Eine nach Bluttransfusionen auftretende non-A, non-B Hepatitis fiel zuerst Mitte der siebziger Jahre auf (Prince et al., 1974; Feinstone et al., 1975), das verantwortliche Agens konnte jedoch mit den zu dieser Zeit zur Verfügung stehenden Methoden nicht identifiziert werden. 1989 isolierten Choo et. al. (Choo et al., 1989) ein virales Genom aus Material von Schimpansen, die experimentell mit einem kontaminierten, humanen Faktor VIII-Präparat infiziert worden waren. Die Entwicklung eines Immunoassays, der auf der Detektion zirkulierender Antikörper gegen rekombinante Epitope beruhte, bewies, dass dieses Virus, genannt Hepatitis C Virus (HCV), das ätiologische Agens der meisten posttransfusionellen non-A, non-B Hepatitiden war (Kuo et al., 1989; Alter et al., 1989; Aach et al., 1991).

Das Hepatitis C Virus ist als häufigste infektiöse Ursache einer non-A, non-B Infektion für einen relevanten Anteil an den infektiös bedingten Hepatitiden und vor allem Leberzirrhosen der weltweiten Bevölkerung verantwortlich (Choo et al., 1989; Choo et al., 1990). Es besteht eine Assoziation zwischen dem serologischen Nachweis des Hepatitis C Virus und dem Auftreten einer Leberzirrhose und eines hepatozellulären Karzinomes (Bruix et al., 1990; Read et al., 1991; Resnick et al., 1993). Bei Lebererkrankungen, die im Endstadium zu einer Lebertransplantation führen, ist das Hepatitis C Virus das häufigste Pathogen (Bruix et al., 1990; Read et al., 1991; Resnick und Koff, 1993).

Die meisten akuten Infektionen mit dem Hepatitis C Virus sind asymptomatisch, nur 25 % der Patienten entwickeln einen Ikterus (Dienstag, 1983). Das Risiko für ein fulminantes oder subakutes Leberversagen ist gering (Yanagi et al., 1991; Wright et al., 1991). Die Inkubationszeit beträgt 15 bis 150 Tage. Anti-HCV Antikörper können mittels ELISA sechs bis acht Wochen, HCV-RNA mittels PCR ein bis zwei Wochen nach der Infektion detektiert werden (Tremolada et al., 1991; Farci et al., 1991). Anders als bei der Infektion mit Hepatitis A und

B Viren gibt es keine Antikörper gegen Epitope des Hepatitis C Virus, die als serologisches Anzeichen einer Elimination des Virus gelten oder gegen eine Infektion nach einer Impfung schützen können (Alter et al., 1989; Alter et al., 1992).

Aufgrund der unvollständigen Elimination des Hepatitis C Virus entwickeln bis zu 80 % der Patienten Zeichen einer chronischen Hepatitis und 20 bis 30 % eine Leberzirrhose (Shakil et al., 1995; Di Bisceglie et al., 1991; Esteban et al., 1991). Die durchschnittliche Zeitspanne bis zum Auftreten von Symptomen bei der chronischen Hepatitis beträgt 10 Jahre, bis zum Auftreten einer Zirrhose 21 Jahre und bis zur Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms 29 Jahre (Kiyosawa et al., 1990). Der Verlauf der Erkrankung wurde am besten in den Transfusions-assoziierten Fällen dokumentiert. Aufgrund der langen Latenzzeiten konnte die Erhöhung der Morbidität und Mortalität aufgrund leberassoziierter Erkrankungen nur bei jüngeren Kollektiven eindeutig nachgewiesen werden (Seeff et al., 1992; Tong et al., 1995).

Das Ziel einer Behandlung wäre die möglichst frühzeitige Eradikation des Hepatitis C Virus, um ein Fortschreiten der Erkrankung bis zum Endstadium der Lebererkrankung zu verhindern. Zur Zeit ist jedoch kein Medikament bekannt, das das Hepatitis C Virus reproduzierbar eliminieren kann. Gegenwärtig besteht die Therapie aus antiviral und immunmodulatorisch wirkenden Substanzen, die die virale Replikation und die Immunantwort des Erkrankten beeinflussen.

Die Kombinationstherapie von einem Interferon-alpha mit Ribavirin ist die empfohlene Standardtherapie der Hepatitis C (Shad und McHutchison, 2001). Die Interferone sind eine Protein-Familie, die antivirale und immunmodulatorische Eigenschaften besitzen. Sie binden an spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche und aktivieren verschiedene Enzyme und Gene, die die Penetration, das Uncoating und die Replikation der Viren beeinflussen (Peters, 1989). Die Interferone steigern zudem die Aktivität der Natürlichen-Killer-Zellen, beschleunigen die Reifung der zytotoxischen T-Lymphozyten und verstärken die Expression der HLA Antigene der Klasse I,

der HLA Antigene der Klasse I, womit sie die immunologische Räumung infizierter Zellen fördern (Samuel, 1991; Pignatelli, 1986).

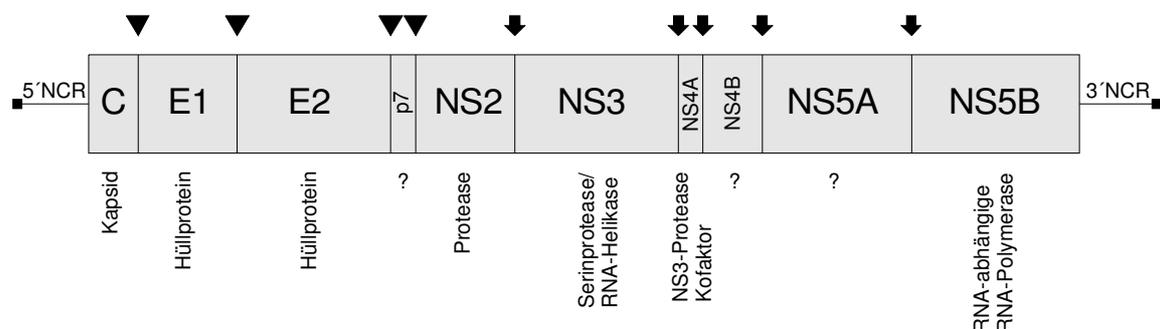
Das synthetische Nucleosidanalogen Ribavirin entwickelt eine antivirale Wirkung gegen verschiedene RNA- und DNA-Viren (Fernandez et al., 1986; Patterson und Fernandez-Larsson, 1990). Ribavirin hat verschiedene postulierte Wirkmechanismen. Es wird die Hemmung viraler Polymerasen, die Erschöpfung der intrazellulären Phosphat- bzw. Guanin-Nucleotid-Speicher sowie eine Störung der Interaktion zwischen viraler mRNA und Ribosomen diskutiert. Die Hemmung der Polymerase bzw. der RNA-Ribosomen-Interaktion scheint jedoch beim Hepatitis C Virus nicht von Bedeutung zu sein (Bartenschlager, 1997; Vitelli et al., 1998). Die Erschöpfung der intrazellulären Guanin-Nucleotid-Speicher als replikationshemmender Mechanismus für das Hepatitis C Virus wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die Zugabe von Guanosin die antivirale Wirkung des Ribavirins auf Viren aus der Familie des Hepatitis C Virus aufhebt. Durch die Kombinationstherapie aus Interferon-alpha mit Ribavirin kam es bei 50 % der Patienten mit einer Hepatitis C Virus-Infektion zu einem langfristigen Abfall der Transaminasen in den Normbereich ohne Nachweis von HCV-RNA (Braconier et al., 1995; Chemello et al., 1995).

Im Endstadium der Hepatitis C ist die Lebertransplantation die einzige Therapie. Die meisten Patienten sind zum Zeitpunkt der Transplantation jedoch virämisch, so dass es bei ca. 40 % der Transplantierten bis zum dritten Jahr nach dem Eingriff zu einer Reinfektion der transplantierten Leber und deren Schädigung kommt. (Wright et al., 1992; Feray et al., 1994). Die Infektion der transplantierten Leber führt jedoch selten zu einem Verlust des Organs oder zum Tod (Weinstein et al., 1994; Boker et al., 1995).

## 2.2. Das Hepatitis C Virus

HCV ist ein kleines Envelope-RNA Virus. Das Genom besteht aus einer ungefähr 9,6 Kilobasen langen, einsträngigen Plus-Strang RNA. Es beginnt mit einer nicht kodierenden, stark konservierten 5'-Sequenz, die als sog. internal ribosomal entry site (IRES) zur Initiation der Translation unabhängig von einer cap-Struktur dient. Es schließt sich ein einzelner, offener Leserahmen an, der für ein Polyprotein von 3010-3033 Aminosäuren kodiert, und eine nicht kodierende 3'-Region (Choo et al., 1991). Sie enthält jedoch neben einer hoch variablen Poly[U] Struktur eine stark konservierte Region von 98 Nukleotiden, die eine zentrale Bedeutung im viralen Replikationszyklus zu spielen scheinen (Clarke, 1997). Bisher ist es nicht möglich, das Hepatitis C Virus in kultivierten Zellen zu vermehren. Die meisten der vorhandenen Informationen über die Natur der vom Hepatitis C Virus exprimierten Proteine stammen aus vergleichenden Studien der Sequenz des Genoms mit der bekannter Viren sowie aus der Analyse von *in vitro* und *ex vivo* Systemen, die geklonte, virale cDNA exprimieren (Neddermann et al., 1997). Das Hepatitis C Virus wurde aufgrund kolinearer Regionen von Sequenzhomologien mit den Pestiviren und Flaviviren der Familie der *Flaviviridae* zugeordnet. Aufgrund jedoch geringer allgemeiner Übereinstimmung der primären Sequenzen der Polyproteine wurde es als eigenes Genus innerhalb der Familie klassifiziert (Miller und Purcell, 1990).

**Abb. 1) Schematische Darstellung der Organisation des Hepatitis C Virus Genoms und der Prozessierung des Polyproteins**



Die Grafik zeigt die Verteilung der von Hepatitis C Virus kodierten Proteine innerhalb des Genoms. Die Spaltungsstellen der Signalpeptidasen sind mit ▼, Spaltungsstellen der viralen Proteasen mit ⬇ indiziert. Unterhalb der Proteine sind deren bekannten Funktionen angegeben.

Das HCV-Polyprotein wird im Zytoplasma bzw. im Endoplasmatischen Retikulum (ER) der infizierten Zelle einer proteolytischen Prozessierung unterzogen, so dass mindestens 10 Proteine entstehen. Aus dem N-terminalen Ende des Polyproteins gehen die Strukturproteine hervor. Zu ihnen gehören das Kapsidprotein C (21 kDa) und die beiden Envelope-Glykoproteine, E1 (37 kDa) und E2 (61 kDa). Die Strukturproteine des Hepatitis C Virus werden durch zelluläre Signalpeptidasen, die mit dem Lumen des ER assoziiert sind, prozessiert (Neddermann et al., 1997). Die Wirts-Signalpeptidasen sind außerdem für die Biogenese des p7 verantwortlich, ein 7 kDa Protein unbekannter Funktion, das durch limitierte Proteolyse aus dem E2-p7-Precursor entsteht (Neddermann et al., 1997). Die Region des HCV-Polyproteins, die alle Nicht-Strukturproteine enthält, wird durch zwei viruseigene Proteasen prozessiert. Die Verbindung zwischen NS2 und NS3 wird autokatalytisch durch eine Zink-abhängige Protease gespalten, die aus dem NS2 und dem N-terminalen Abschnitt des NS3 gebildet wird. Der C-terminale Rest des HCV-Polyproteins wird durch die viruskodierte, im NS3 enthaltene Serinprotease weiter verdaut zu den Proteinen NS3 (68 kDa), NS4A (6 kDa), NS4B (26 kDa), NS5A (56-58 kDa) und NS5B (65 kDa) (Neddermann et al., 1997).

Das Kapsidprotein C ist von stark basischer Natur und scheint durch Multimerisation und Interaktion mit der viralen RNA das Kapsid des Hepatitis C Virus zu bilden. Weiterhin gibt es Hinweise, dass das Kapsidprotein C eine kritische Rolle für die Translokation der viralen, glykosylierten Strukturproteine in das ER spielt, in dem die für die Prozessierung und Glykosylierung der Proteine verantwortlichen Enzyme lokalisiert sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Kapsidprotein C in artifiziellen Systemen die Apoptose supprimieren und mit der zytoplasmatischen Domäne des Lymphotoxin- $\beta$ -Rezeptors (LTR) spezifisch interagieren kann. Da der LTR in die Regulation der Apoptose involviert ist, wird dem Kapsidprotein C eine immunmodulatorische Funktion und eine kritische Rolle in der Pathogenese der Krankheit und der Entwicklung der Viruspersistenz zugeschrieben. Schließlich wurde auch berichtet, dass das Kapsidprotein C mit zytoplasmatischen Lipidvesikeln assoziiert und so den zellulären Lipidstoffwechsel beeinflusst. Dies könnte die

Ursache der bei der Hepatitis C beobachteten Steatosis der Leber sein (Clarke, 1997).

Die Envelopeproteine (E1, E2) sind stark glykosylierte, transmembranöse Proteine, die in dem aus einer Lipiddoppelmembran bestehenden Envelope des Hepatitis C Virus eingebettet sind. Diese Proteine an der Oberfläche des Virus sind offensichtlich wichtige Komponenten für einen Impfstoff gegen das Hepatitis C Virus. Im E2-Protein fand sich eine hypervariable Region (HVR-1). Antikörper gegen diese Region scheinen einen neutralisierenden Effekt auf das Hepatitis C Virus auszuüben. Diese Region ist allerdings die unbeständigste Region des Hepatitis C Virus. Die Variabilität scheint auf zufälligen Mutationen und Selektion von Mutanten zu beruhen, die fähig sind, den neutralisierenden Antikörpern des Wirtes zu entkommen. Diese Beobachtungen lassen das Ziel der Entwicklung einer prophylaktischen Vakzine zweifelhaft erscheinen (Clarke, 1997).

Das nicht-Strukturprotein 2 (NS2) ist ein transmembranöses Protein, dessen C-Terminus im Lumen des ER und dessen N-Terminus im Zytosol liegt. Es konnte zwar durch Immunpräzipitation gezeigt werden, dass das NS2 mit den Strukturproteinen assoziiert ist, die biologische Funktion des Hauptteils des reifen NS2 bleibt jedoch unklar. Der C-Terminus des Proteins im Zusammenspiel mit dem N-Terminus des NS3 besitzt die Funktion einer Zink-abhängigen Protease, die während der Prozessierung des HCV-Polyproteins in einem autokatalytischen Prozess das NS2 vom NS3 trennt. Es ist kein weiteres Substrat dieser NS2/NS3-Protease bekannt (Clarke, 1997).

Das nicht-Strukturprotein 3 (NS3) besitzt eine Anzahl verschiedener enzymatischer Funktionen. Die katalytische Aktivität einer chymotrypsinartigen, Zink-abhängigen Serinprotease wurde in den N-terminalen 180 Aminosäuren des NS3 lokalisiert. Sie ist verantwortlich für die Proteolyse des HVC Polyproteins an den Verbindungen zwischen den NS3-NS4A, NS4A-NS4B, NS4B-NS5A und NS5A-NS5B Proteinen. Die proteolytische Aktivität des NS3 ist vom NS4A abhängig, das als Kofaktor fungiert. Der Grad der Abhängigkeit vom Kofaktor variiert jedoch je nach Spaltungsstelle. Während die Spaltung zwischen

NS5A/NS5B durch NS4A kaum beeinflusst wird, scheint die Spaltung zwischen NS4B/NS5A absolut abhängig von dem Kofaktor zu sein. Eine RNA-stimulierte Nukleosidtriphosphatase (NTPase) assoziiert mit einer RNA-Helikase finden sich in den C-terminalen 450 Aminosäuren des NS3. Die NTPase/Helikase ist ein essentielles, virales Protein, das in die Modulation der RNA-Struktur während der Replikation involviert ist (Gallinari et al., 1998; Tanji et al., 1994; Yao et al., 1997).

Neben den biochemischen Funktionen des NS3 für die Replikation der viralen Partikel scheint dieses Protein mit dem Stoffwechsel der Wirtszellen zu interagieren. Sakamuro (Shad und McHutchison, 2001) konnte zeigen, dass NIH 3T3 Zellen, die mit einem für NS3 codierenden Expressionsvektor transfiziert worden waren, rapide proliferierten, die Kontaktinhibition verloren und Tumore in Nacktmäusen formten. Diese Ergebnisse könnten auf einer spezifischen Interaktion des NS3 mit der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase C beruhen. Durch die Interaktion wird die Proteinkinase C inhibiert und ihre intrazelluläre Translokation gestört (Borowski et al., 1999c).

Die NS4 Region des Polyproteins enthält zwei Proteine, NS4A und NS4B genannt. NS4A ist ein kleines, ca. 6 kDa großes Protein, das verschiedenen Funktionen dient, z.B. als Verankerungspunkt des Replikationskomplexes oder als Kofaktor der NS3-Protease (s.o.). Für das NS4B ist zur Zeit keine Funktion bekannt.

Die NS5 Region des Polyproteins ist aus zwei Proteinen zusammengesetzt, dem NS5A und dem NS5B. Das NS5A ist ein polyphosphoryliertes Protein mit unklarer biologischer Funktion. Es enthält Signalsequenzen für die Translokation in den Nukleus und kann durch Immunfluoreszenz in den periplasmatischen Membranen des Nukleus detektiert werden. Da das NS5B ähnliche Sequenzen enthält, wird eine Komplexbildung zwischen NS5A/NS5B im Rahmen eines Replikationskomplexes vermutet. Weiterhin enthält das NS5A eine Sequenz, die die Empfindlichkeit des Virus gegenüber der Behandlung mit Interferon determiniert (IFN sensitivity determining region (ISDR)). Der Mechanismus scheint eine direkte Interaktion der ISDR mit der IFN induzierten Proteinkinase PKR zu

sein, einem Mediator der IFN induzierten Resistenz gegenüber Viren. Da die Wirkung von IFN zu einem großen Anteil auf der Funktion der PKR beruht, mag deren Inaktivierung durch NS5A ein wichtiger Mechanismus sein, durch den das Hepatitis C Virus der immunologischen Antwort des Wirtes entgeht (Clarke, 1997).

Die Sequenz des NS5B ist stark konserviert und enthält das Aminosäuremotiv G-D-D (Clarke, 1997). Dieses Motiv ist charakteristisch für alle bekannten RNA-abhängigen RNA-Polymerasen. Die Aktivität des NS5B als virale, RNA-abhängige RNA-Polymerase konnte nachgewiesen werden (Vo et al., 2004; Choi et al., 2003).

### 2.3. Die NS3 RNA Helikase

Die Modulation von RNA Strukturen ist ein essentieller Schritt in vielen fundamentalen Prozessen, eingeschlossen die RNA Synthese, das Splicing, die Replikation und Translation. Helikasen sind fähig, doppelsträngige RNA und DNA Strukturen enzymatisch zu entwinden, indem sie die Wasserstoffbrücken, die die beiden Stränge verbinden, unterbrechen (Kadare und Haeni, 1997; Gorbalenya und Koonin, 1993). Diese Reaktion ist mit der Energie freisetzenden Hydrolyse von Nukleosidtriphosphat (NTP) assoziiert. So besitzen alle bisher beschriebenen Helikasen eine ATPase-Aktivität (Kadare und Haenni, 1997).

Die computerunterstützte Suche von Sequenzhomologien hat gemeinsame Aminosäuremotive in den Proteinen identifiziert, die eine nachgewiesene Fähigkeit zur Bindung und Hydrolyse von NTP und zur Entwindung von Nukleinsäuren haben (Hodgman, 1988; Gorbalenya und Koonin, 1989). Auf diesen Sequenzvergleichen basierend wurden drei Superfamilien (SF) von Helikasen definiert. Die Hepatitis C Virus NS3 Helikase gehört nach dieser Einteilung zur Superfamilie 2 (SF2), die ähnliche Polypeptide der Potyvirus-, Flavivirus- und Pestivirusgruppen sowie die Helikase des Vacciniavirus einschließt (Kadare und Haenni, 1997).

Die Struktur mit den eindeutigsten Übereinstimmungen zwischen den drei SF ist das von Walker et al. (Walker et al., 1982) charakterisierte NTP-bindende Motiv. Dieses Motiv besteht aus den zwei Regionen A und B. Die Region A besteht aus einer Folge hydrophober Aminosäureresten gefolgt von der konservierten Sequenz GxxxxGKS/T, wobei x eine beliebige Aminosäure sein kann. Die Region B besteht aus der einer Reihe hydrophober Aminosäuren folgenden Sequenz DExH (Gorbalenya und Koonin, 1993). Kristallografische Studien haben gezeigt, dass die Region A direkt an der Bindung des  $\beta$ - und des  $\gamma$ -Phosphates des NTP beteiligt ist, während die Region B mit dem  $Mg^{2+}$  des  $Mg^{2+}$ -NTP-Komplexes interagiert (Yao et al., 1997; Kim et al., 1998; Walker et al., 1982). Mutationen in der Region A oder B wirken sich dramatisch auf die Aktivität der ATPase und Helikase aus (Gross und Shuman, 1995; Pause und Sonenberg, 1992; Black und Hruby, 1992; Yan und Tsai, 1991).

Da sich das Vorkommen der Walker Motive nicht auf Helikasen beschränkt und diese Motive auch in einer Vielzahl anderer NTP-hydrolysierender Enzyme vorkommen (Gorbalenya und Koonin, 1989; Walker et al., 1982), sind weitere Motive nötig, um die Signatur einer Helikase zu definieren. Die Helikasen der SF 2 besitzen sieben konservierte Segmente, genannt I (entspricht Region A), Ia und II (entspricht Region B) bis VI. Die Segmente Ia, III und IV sind am wenigsten konserviert. Basierend auf der hohen Anzahl basischer Reste, besonders Arg, wird vermutet, dass das Motiv VI an der Bindung der Nukleinsäuren beteiligt ist (Kadare und Haenni, 1997).

**Abb. 2) Konsensussequenzen der konservierten Motive der SF 2 Helikasen:**

Motiv	I	Ia	II	III	IV	V	VI
	h <sub>2</sub> x <sub>4</sub> GSGKS/Tx <sub>3</sub> hP	Rxha <sub>2</sub> xPTRxax <sub>2</sub> Eh	h <sub>4</sub> DExH	HxaTATPP	ah <sub>2</sub> aPS	hahxTDhxExGaxhx <sub>4</sub> a <sub>2</sub>	Tx <sub>5</sub> QRxGRaGR

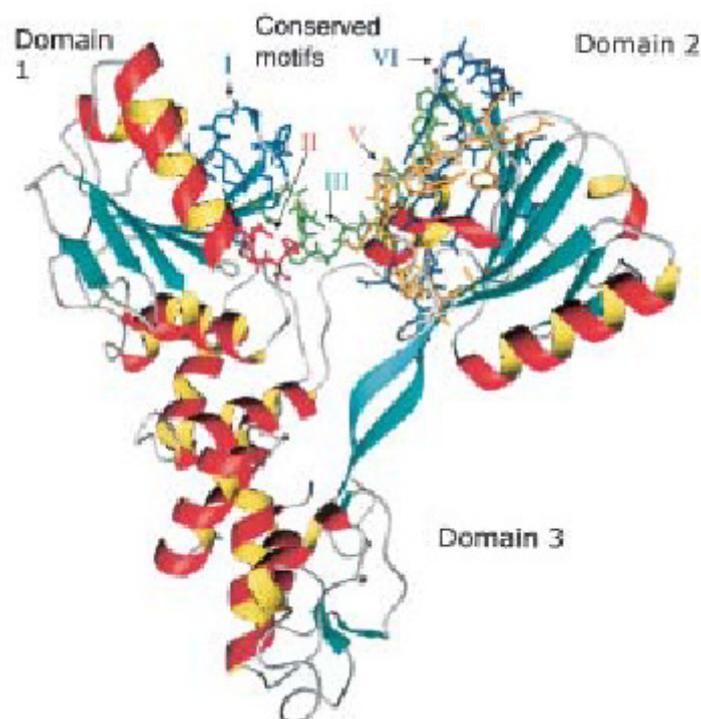
Die Konsensusmotive der SF 2 Helikasen stammen von Sequenzvergleichen (Koonin und Dolja, 1993). Die konservierten Aminosäuren werden anhand des Buchstaben-schlüssels für Aminosäuren dargestellt. Abkürzungen: h – Aminosäuren mit großen, hydrophoben Resten (aliphatisch oder aromatisch); a – Aminosäuren mit großen, aliphatischen Resten; x – Aminosäuren mit wechselnden Resten (Kadare und Haenni, 1997).

Durch kristallografische Methoden („multiple isomorphus replacement“ (MIR)) wurde die Struktur der HCV-Helikase alleine mit einer Auflösung von 2,1 Å (Yao et al., 1997: Abb. 3) bzw. 2,3 Å (Cho et al., 1998) und im Komplex mit einem Oligonukleotid mit einer Auflösung von 2,3 Å (Kim et al., 1998) bestimmt. Das Protein besteht aus drei etwa gleich großen Domänen (1-3) die durch Furchen voneinander getrennt sind. Die Domänen 1 und 3 sind dicht gepackt und bilden eine Einheit. Davon abgesetzt ist die Domäne 2. Kristallografisch konnte gezeigt werden, dass diese Domäne flexibel mit den beiden anderen Domänen verbunden ist (Yao et al., 1997; Kim et al., 1998). Die Domänen 1 und 2 enthalten alle für Helikasen typischen, konservierten Motive (Yao et al., 1997; Cho et al., 1998; Kim et al., 1998).

Die Domäne 1 enthält die Motive I und II (Walker A und B), die mit der NTP-Bindung assoziiert sind (Yao et al., 1997; Kim et al., 1998; Walker et al., 1982). Mutationen in diesen Motiven eliminierten die Fähigkeiten zur ATP-Hydrolyse in

diesen Enzymen (Black und Hruby, 1992; Yan und Tsai, 1991). Der Histidin-Rest des Motiv II scheint essentiell für das Zusammenspiel von ATPase- und Helikase-Aktivität zu sein, weil eine Mutation dieses Restes in einer funktionellen ATPase ohne Helikaseaktivität resultiert (Gross und Shuman, 1995 ; Heilek und Peterson, 1997). In Abwesenheit von Substraten binden die Aminosäurereste der Motive I und II aneinander und an die konservierte TAT-Sequenz des Motivs III. Motiv III ist Teil einer flexiblen Verbindungsregion zwischen den Domänen 1 und 2 (Kadare und Haenni, 1997; Yao et al., 1997). Die durch die NTP-Hydrolyse induzierten Änderungen in der Konformation des Moleküles werden durch diese Hinge-Region übertragen (Yao et al., 1997; Matson und Kaiser-Rogers, 1990).

**Abb. 3) Ribbon Diagramm der HCV RNA Helikase Domäne (PDB Nummer 1HEI)**



Das Motiv VI, eine hoch konservierte, Arginin-reiche Sequenz, liegt auf der Oberfläche von Domäne 2. Die Funktion wird kontrovers diskutiert. Aufgrund kristallografischer Daten wurde vermutet, dass dieses Motiv für die RNA-Bindung benötigt wird (Yao et al., 1997; Cho et al., 1998). Auf der anderen Seite weist die Struktur der HCV NTPase/Helikase mit gebundenem dU8 (Kim et al., 1998) auf eine direkte Beteiligung an der ATP-Bindung hin.

Motiv Ia, in der Domäne 1, und Motiv V, in der Furche zwischen ersten beiden Domänen, sowie Motiv IV scheinen mit den gebundenen Oligonukleotiden zu interagieren (Kim et al., 1998).

Zudem wurde in kinetischen Studien gezeigt, dass ATP nicht durch das nicht hydrolysierbare ATP-Analogon Adenosin-5´-(3-thiotriphosphate) (ATP-γ-S) als Substrat in dem Prozess der RNA-Entwindung ersetzt werden kann. Dies suggeriert, dass die durch die Hydrolyse des ATP freigesetzte Energie zur Entwindung der RNA benötigt wird (Shuman, 1992; Wagner et al., 1998). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis wurde beobachtet, dass 5´-Fluorosulfonylbenzoyl-adenosine (5´-FSBA), ein ATP-Analogon, das konservierte Lysine in ATP-bindenden Stellen verschiedener Proteine alkyliert, die Aktivität der Helikase reduziert (Kyono et al., 1998).

Mutationen und nicht-/kovalente Blockaden der für die ATP-Bindung verantwortlichen Motive I und II oder eine Unterbindung der Interaktionen zwischen der die ATPase enthaltenden und der potentiell RNA bindenden Domäne setzen die Helikaseaktivität des NS3 herab, sie können sie sogar unterbinden. Daher scheint die Reduktion der ATP-Bindung bzw. eine Blockade der ATP-bindenden Stelle ein vielversprechender Ansatz, um die Aktivität der NTPase und folglich auch der Helikase zu hemmen.

In diesem Kontext kann die Charakterisierung der biochemischen Eigenschaften der isolierten ATP-bindenden Domäne der Helikase eine rationale Basis für die Entwicklung von effektiven Inhibitoren der NTPase/Helikase liefern.

### **3. Materialien und Methoden**

#### **3.1. Chemikalien**

Die "Sequencing grade" Proteasen, Proteaseinhibitoren und polyklonalen anti-5'-FSBA Antikörper von Kaninchen wurden von der Firma Boehringer (Mannheim) bezogen. Menschliche, das NS3 des Hepatitis C Virus erkennende Antisera wurden freundlicher Weise von Frau Dr. Polywka (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie, UKE Hamburg) zur Verfügung gestellt. [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP (3000 Ci/mmol) und [ $^{125}\text{I}$ ]-Protein A (91,1  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ) wurden von der Firma Amersham (Braunschweig) und [ $^{14}\text{C}$ ]-FSBA (47,6 mCi/mmol) von der Firma Du Pont NEN (Bad Homburg) bezogen. Alle anderen Chemikalien wurden bei der Firma Sigma (Deisenhofen) erworben.

#### **3.2. Geräte**

Elektrophorese- und Blotkammer und alle dazugehörigen Reagenzien stammten von Biorad (München), die Gelfiltrationssäulen Superdex-200 ("High Load") und Superdex G-25 von der Firma Amersham, die Nitrozellulosefilter BA 85 (0,45  $\mu\text{m}$ ) von Schleicher & Schüll (Dassel), die Röntgenfilme von Kodak (Stuttgart). Die Radioaktivität wurde mit einer Canberra Packard 460C-Anlage gemessen, die Quantifizierung von Proteinen in mit Commassie gefärbten Polyakrylamidgelen erfolgte mit Hilfe der Gelimage-Software von Amersham.

### **3.3. Wichtige Puffer**

#### **TGT-Puffer**

- 20 mM TRIS/HCl pH 7,5
- 10 % Glycerol
- 0,05 % Triton X-100
- 1 mM EDTA
- 1 mM  $\beta$ -Merkaptoethanol

#### **TTBS-Puffer**

- 20 mM TRIS/HCl pH 7,5
- 150 mM NaCl
- 0,05 % Tween 80

#### **Proteaseinhibitoren-Cocktail**

- 0,5 mg/ml BSA
- 5 U/ml Aprotinin
- 10 mM (4-Amidinophenyl)-Methansulfonylfourid (APMSF)
- 4 mM 4-(2-Aminoethyl)-Benzoylsulfonylfourid (AEBSF)
- 5 mM Phenylmethylsulfonylfourid (PMSF)

#### **Sample-Puffer (für SDS/PAGE)**

- 62,5 mM TRIS/HCl pH 6,8
- 10 % Glycerol
- 1 % SDS
- 1 %  $\beta$ -Merkaptoethanol
- 0,005 % Bromphenolblau

### **3.4. SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese (SDS/PAGE)**

Die Gelelektrophorese ist laut Vorschrift von Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt worden. Die Polyakrylamidkonzentration der Trenngele variierte zwischen 12,5 % und 20 %. Die Konzentration des Polyakrylamids in den Sammelgelen betrug stets 5 %. Der für die Trenngele notwendige Lower-Puffer (pH 8,8) enthielt 400 mM TRIS/HCl, 0,1 % SDS (m/v) und 0,025 %  $\text{NaN}_3$ . Der für die Sammelgele notwendige Upper-Puffer (pH 6,8) enthielt 125 mM TRIS/HCl und 0,1 % SDS (m/v). Die Elektrophorese der Gele erfolgte bei 200 V und 30 mA.

Nach der Elektrophorese sind die Proteine entweder auf Nitrozellulose geblottet (s.u.), mit Silber (s.u.) oder mit Coomassie Blue gefärbt worden. Die Färbung erfolgte mit 0,1 % Coomassie Blue (m/v) in einer Fixierlösung (10 % Essigsäure (v/v) und 30 % Ethanol (v/v)) für 15 min. bei 60 °C. Das Entfärben der Gele erfolgte für 30 min. bei 60 °C in 10 % TCA mit 0,5 % Phosphorsäure.

Bei radioaktiv markierten Proteinen sind die Gele nach Entfärben gewaschen worden, anschließend getrocknet und auf Röntgenfilmen exponiert worden. Zusätzlich sind entweder die radioaktiv markierten Proteinbanden aus den Gelen ausgeschnitten und gezählt oder die Autoradiogramme mittels Gelimage-Software von Amersham ausgewertet worden.

### **3.5. Silberfärbung von Proteinen in Polyakrylamidgelen**

Die Silberfärbung erfolgte gemäß der Vorschrift von Morrissey (Morrissey, 1981). Nach der Elektrophorese sind die Gele fixiert, in aqua dem. gewaschen, reduziert und in 0,1 %  $\text{AgNO}_3$  inkubiert worden. Nach kurzem Spülen in aqua dem. wurden die Proteinbanden anschließend mit 50  $\mu\text{l}$  Formaldehyd (37 %) in 100 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (3 %) bis zur gewünschten Intensität entwickelt. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von Zitronensäurekristallen. Die Reduktion des Backgrounds bis zur gewünschten Entfärbung erfolgte durch

Schwenken des Geles in „Farmerschem Abschwächer“ (60 %  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_7$ , 30 % Kaliumhexacyanoferrat und 10 % Natriumcarbonat als 0,5 %ige, wässrige Lösung, frisch angesetzt). Nach anschließendem Waschen in aqua dem. sind die Gele getrocknet worden (s.o.).

### **3.6. Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose**

Der Transfer von Proteinen aus SDS-Gelen (s.o.) auf Nitrozellulose erfolgte nach der Vorschrift von Towbin (Towbin et al., 1979) bei Raumtemperatur mit konstant 40 V im Transfer-Puffer über Nacht. Anschließend erfolgte die Färbung der Proteine mit Ponceau. Nach der Kennzeichnung der molekularen Massen Waschen in TTBS-Puffer mit BSA.

### **3.7. Immunologischer Nachweis von Proteinen („Immunoblot“)**

Nach der Auftrennung der Proteine in der SDS/PAGE wurden diese wie oben beschrieben auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Die unspezifischen Bindungsstellen der Membranen wurden für 1 h mit 1 mg/ml BSA in TTBS-Puffer geblockt. Danach wurden die Membranen für 2 h mit den humanen Antisera (1:500 in TTBS-Puffer, 10% Glycerol, 3 mg/ml BSA) inkubiert. Die Membranen wurden wieder in 1 mg/ml BSA in TTBS-Puffer gewaschen, und die Antikörper wurden mit [ $^{125}\text{I}$ ]-Protein A (0,5  $\mu\text{Ci/ml}$ ) oder mit anti-humanen Kaninchenantikörpern gefolgt von [ $^{125}\text{I}$ ]-Protein A detektiert. Die Nitrozellulosemembranen wurden getrocknet und auf Röntgenfilmen exponiert.

### **3.8. Affinitäts-Reinigung von anti-NS3-Antikörpern aus humanem Serum**

Über das Fusionsprotein Glutathion-S-Transferase (GST) wurde NS3 an eine Chromatographiesäule (Glutathionsepharose 4B) gebunden. Mit Hilfe dieser Matrix wurden die anti-NS3-Antikörper aus den humanen Seren isoliert. Die Reinheit der exprimierten und aufgereinigten Proteine wurde durch SDS/PAGE mit anschließender Silberfärbung kontrolliert. Die Spezifität der Antikörper wurde anhand eines NS3 enthaltenden Bakterienlysates nachgewiesen.

### **3.9. Expression des rekombinanten HCV-Polyprotein-(1189-1525), der HCV NTPase/Helikase in *Escherichia coli* und proteolytische Trennung vom GST-Fusionsprotein**

Das in dieser Arbeit untersuchte HCV-Polyprotein-(1189-1525) ist von Herrn Dr. Feucht (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie, UKE Hamburg) nach einer Methode von Mayer (Mayer et al., 1992) in *Escherichia coli* exprimiert worden. Über das Fusionsprotein Glutathion-S-Transferase (GST) wurde das NS3 mit einer Affinitätschromatographiesäule (Glutathionsepharose 4B) aus dem Bakterienlysate isoliert. Die Reinheit der exprimierten und aufgereinigten Proteine wurde durch SDS/PAGE mit anschließender Silberfärbung kontrolliert. Die HCV-Identität dieser Proteine wurde durch Immunoblots mit humanen, affinitätsgereinigten anti-NS3 Antikörpern bestätigt.

Um durch das GST-Fusionsprotein bedingte Effekte auszuschließen, wurde das GST-HCV-Polyprotein-(1189-1525) einer limitierten Proteolyse mit Thrombin unterzogen. Dazu wurden 100 µg GST-HCV-Polyprotein-(1189-1525) für 180 min. mit 2 µg Thrombin unter leichtem Schütteln bei 25 °C inkubiert. Das GST wurde dann durch Affinitätschromatographie mit Glutathionsepharose 4B vom HCV-Polyprotein-(1189-1525) getrennt. Die Reinheit des HCV-Polyproteins-(1189-1525) wurde nach der Separation der Proteine durch SDS/PAGE mit anschließender Silberfärbung bestätigt und das NS3-Protein für die folgenden Assays benutzt.

Die HCV NTPase/Helikase (HCV-Polyprotein-(1175-1657)) wurde von Herrn Dr. Lih-Hwa Hwang (Hepatitis Research Center, National Taiwan University Hospital, Taipei, Taiwan) in *Escherichia coli* exprimiert (Tai et al., 1996) und wie oben beschrieben gereinigt. Die Reinheit des gereinigten Proteins betrug 80-85 %.

### **3.10. Proteolytische Prozessierung der ATP-bindenden Domäne der HCV NTPase/Helikase.**

Die Proteolyse des gereinigten HCV-Polyproteins-(1189-1525) zur Bestimmung der minimalen ATP-bindenden Domäne wurde mit verschiedenen Proteasen wie folgt durchgeführt: Jeweils 125 pmol des HCV-Polyproteins-(1189-1525) wurden mit 1,25 bzw. 2,5 pmol Trypsin, Thermolysin oder V8-Protease für 10 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion fand in TGT-Puffer mit 3 mM CaCl<sub>2</sub> in einem totalen Volumen von 50 µl statt und wurde durch das Hinzufügen von 5 µl Proteaseinhibitoren-Cocktail terminiert.

Das HCV-Polyprotein-(1203-1364) als minimale ATP-bindende Domäne wurde proteolytisch aus dem HCV-Polyprotein-(1189-1525) hergestellt: 20 nmol des HCV-Polyproteins-(1189-1525) wurden mit 1 nmol der *S. aureus* Protease V8 in TGT-Puffer für 60 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch das Hinzufügen von 10 µl 200 mM PMSF Lösung gestoppt und die Proteolyseprodukte mit einer Superdex-200 Säule in TGT-Puffer voneinander separiert. Die das HCV-Polyprotein-(1203-1364) enthaltenden Fraktionen (Nr.: 20-21; jeweils 3,2 ml) wurden vereint und konzentriert. Die konzentrierte Probe wurde in TGT-Puffer ohne Triton X-100 aufgenommen. Der Konzentrationsprozess wurde fortgesetzt, bis die Proteinkonzentration 2 mg/ml betrug und die Triton X-100 Konzentration auf < 0,01% eingestellt war. Die Reinheit des Proteins betrug 95%.

Die Grenzen des gereinigten HCV-Polyprotein-(1203-1364) wurden durch terminale Sequenzierung bestimmt. Die C-terminale Sequenzierung wurde von Dr.

Gauss (TopLab, München) und die N-terminale Sequenzierung von Dr. Buck (Universität Hamburg) durchgeführt.

### **3.11. Nukleotid-Bindungs-Assay**

Die Bindung des ATP an das HCV-Polyprotein-(1203-1364) wurde mit zwei Methoden untersucht: (i) durch eine Mikrofiltrationsmethode (ii) durch eine Gelfiltration (gel exclusion chromatography).

(i) Mikrofiltration. Die 50 pmol HCV-Polyprotein-(1203-1364) enthaltende Reaktionsmischung (50  $\mu$ l) wurde bei 30 °C für 30 min, soweit nicht anders in der jeweiligen Legende spezifiziert, in folgender Lösung inkubiert: 20 mM TRIS/HCl pH 7,5, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM  $\beta$ -Merkaptoethanol, 10% Glycerol, 0,01% Triton X-100, 0,1 mg/ml BSA und 43,6  $\mu$ M [<sup>-32</sup>P]-ATP (0,5  $\mu$ Ci). Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 500  $\mu$ l Phosphatpuffer (PBS) mit einer Temperatur von 4 °C gestoppt und die Proben wurden durch Nitrozellulosefilter in einer Mikrofiltrationsvorrichtung (BIO-RAD) gefiltert. Die Nitrozellulosefilter wurden zweimal mit 2 ml PBS gewaschen, getrocknet und das gebundene [<sup>-32</sup>P]-ATP durch die Zählung der Cerenkov Strahlung gemessen.

(ii) Gelfiltration (gel exclusion chromatography). Der Bindungsassay wurde wie oben beschrieben mit 50 pmol HCV-Polyprotein-(1203-1364) durchgeführt. Nach der Inkubation wurde die Protein-gebundene Radioaktivität von der nicht gebundenen durch eine Gelfiltration mit einer 0,4 cm x 12 cm messenden Sephadex G-25 getrennt.

### **3.12. ATPase-Assay**

Als Standard ATPase-Assay wurden 10 pmol der HCV NTPase/Helikase für 30 min bei 30 °C in 25  $\mu$ l Reaktionsmischung (20 mM TRIS/HCl pH 7,5, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM  $\beta$ -Merkaptoethanol, 10% Glycerol, 0,01% Triton X-100, 0,1 mg/ml

BSA und 11,0  $\mu\text{M}$  [ $^{32}\text{P}$ ]-ATP (0,5  $\mu\text{Ci}$ ) inkubiert. Das Stoppen der Reaktion fand durch den Zusatz von 0,5 ml Aktivkohle-Suspension (2 mg/ml) statt. Nach dem Zentrifugieren bei 10.000 x g für 10 min wurden 50  $\mu\text{l}$  Aliquote des Überstandes in Bezug auf ihre Radioaktivität durch die Zählung der Cerenkov Strahlung gemessen. Die kinetischen Parameter wurden durch die nicht lineare Regressionsanalyse unter Benutzung von Enzfitter (BioSoft) und Sigma Plot (Jandel Corp.) bestimmt.

### **3.13. Interaktion des HCV-Polyproteins-(1203-1364) mit Oligo[dA]**

Die Interaktion des HCV-Polyprotein-(1203-1364) mit Oligo[dA] wurde mit auf Zellulose-Matrix immobilisierter Oligo[dA] (Amersham) getestet. 50  $\mu\text{g}$  Oligo[dA]-Zellulose aufgenommen in 100  $\mu\text{l}$  TGT-Puffer wurden bei nicht sättigenden Konzentrationen des HCV-Polyproteins-(1203-1364) (10  $\mu\text{g}$ ) für 30 min bei 30°C in der Anwesenheit von 3 mM  $\text{MgCl}_2$  und einem Nukleotid (ATP (0,3 mM; 1 mM; 3 mM; 10 mM) oder GTP (10 mM) oder ATP- $\gamma$ -S (10 mM) oder ADP (10 mM) oder ADP- $\beta$ -S (10 mM)) oder einem Polynukleotid (poly[dA] (50mM) oder poly[A] (50 mM)) inkubiert. Nach der Inkubation wurde nicht gebundenes Protein durch das Waschen der Oligo[dA]-Zellulose mit TGT-Puffer entfernt. Die Matrix wurde mit 100  $\mu\text{l}$  Sample Puffer gemischt, gekocht und das Protein wurde der SDS/PAGE unterzogen. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt und densitometrisch mit Gelimage (Amersham) analysiert.

### **3.14. Affinitätsmarkierung mit 5'-FSBA**

Die Markierung der ATP-bindenden Stelle des HCV-Polyprotein-(1189-1525) mit [ $^{14}\text{C}$ ]-5'-FSBA wurde entsprechend der Methode von Woodford und Pardee (Woodford und Pardee, 1986) mit den von Borowski et. al. (Borowski et al., 1996) beschriebenen Modifikationen ausgeführt. 50  $\mu\text{l}$  Reaktionsgemisch enthielten 0,1 mM [ $^{14}\text{C}$ ]-5'-FSBA, 20 mM TRIS/HCl pH 7,5, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10% Glycerol und 5  $\mu\text{g}$  Protein. Nach einer Inkubation von 30 min bei 30°C wurde Sample

Puffer hinzugefügt. Die Proben wurden gekocht und mittels SDS/PAGE aufgetrennt. Nach Trocknung der Gele wurden diese bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  für zwei Tage auf einem Röntgenfilm exponiert.

Die Spezifität der  $[^{14}\text{C}]\text{-5'}$ -FSBA -Bindung wurde durch die Blockierung mit verschiedenen Nukleotiden oder mit nicht hydrolysierbaren Nukleotid-Analoga gezeigt. Die Proben wurden mit  $0,1\text{ }\mu\text{M}$   $[^{14}\text{C}]\text{-5'}$ -FSBA in der Anwesenheit von  $10\text{ }\mu\text{M}$  ATP,  $10\text{ }\mu\text{M}$  ADP,  $10\text{ }\mu\text{M}$  AMP,  $10\text{ }\mu\text{M}$  ATP- $\gamma$ -S,  $10\text{ }\mu\text{M}$  ADP- $\beta$ -S oder  $10\text{ }\mu\text{M}$  NAD (Nikotinamid-Adenindinukleotid) inkubiert.

### **3.15. Andere Assays**

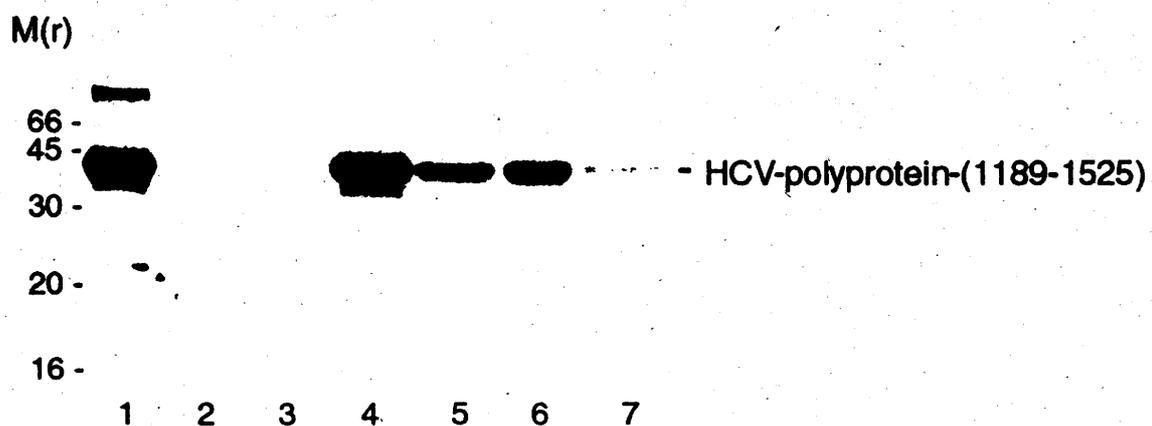
Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Lowry (Lowry et al., 1951) gemessen. Nach der Auftrennung der Proteine in der SDS/PAGE und Silberfärbung wurde die Reinheit der Proteine durch densitometrische Analyse der Polyakrylamidgele gemessen (s.o.).

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Bestimmung und Reinigung der ATP-bindenden Domäne der HCV NTPase/Helikase

In vorangegangenen Studien zeigten wir, dass das Fragment des nicht-Strukturproteins 3 des Hepatitis C Virus, bestehend aus den Aminosäureresten 1189 bis 1525 (entspricht den Domänen 1 und 2 der HCV NTPase/Helikase (Yao et al., 1997; Borowski et al., 1996), durch die kovalente Bindung von [<sup>14</sup>C]-5'-FSBA, einem reaktiven Analogon des ATP, markiert werden kann. Die Inkorporation von [<sup>14</sup>C]-5'-FSBA in das Protein kann durch ATP, ADP, deren nicht hydrolysierbare Analoga ATP- $\gamma$ -S und ADP- $\beta$ -S und NAD (Nikotinamid-Adenindinukleotid) blockiert werden (Abb. 4). AMP und cAMP inhibierten die Bindung von [<sup>14</sup>C]-5'-FSBA nicht.

**Abb. 4) SDS/PAGE des HCV-Polyproteins-(1189-1525) kovalent modifiziert mit [<sup>14</sup>C]-5'-FSBA in der Präsenz konkurrierender Nukleotide.**



HCV-Polyprotein-(1189-1525) wurde inkubiert allein (Spalte 1), mit 10  $\mu$ M ATP (Spalte 2), 10  $\mu$ M ADP (Spalte 3), 10  $\mu$ M AMP (Spalte 4), 10  $\mu$ M ATP- $\gamma$ -S (Spalte 5), 10  $\mu$ M ADP- $\beta$ -S (Spalte 6) oder 10  $\mu$ M NAD (Spalte 7) in der Anwesenheit von 0,1  $\mu$ M [<sup>14</sup>C]-5'-FSBA (200 nCi) wie in Material und Methoden beschrieben. Die Proben wurden einer SDS/PAGE unterzogen, die Gele getrocknet und bei -80°C für 2 Tage auf einem Röntgenfilm exponiert.

In weiteren Experimenten versuchten wir ein minimales, funktionelles Fragment (Domäne) des NS3 zu erhalten, das ATP bindet. Das HCV-Polyprotein-(1189-1525) wurde partieller Proteolyse mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen der Proteasen V8, Thermolysin, Proteinase K, Trypsin und Chymotrypsin unterzogen. Die Produkte der Proteolyse wurden durch SDS/PAGE aufgetrennt und durch Immunoblots mit affinitätsgereinigtem humanen anti-NS3 Antikörpern analysiert. Die Digestion mit Trypsin, Thermolysin und der Protease V8 erwiesen sich als am informativsten, weil sich hierbei eine kleine Anzahl gut definierter Fragmente ergab (Abb. 5A). Die Trypsin-, Thermolysin- und Protease V8-Verdauprodukte wurden dann mit 5'-FSBA markiert und durch einen Immunoblot mit anti-FSBA Antikörpern von Kaninchen analysiert. Wie in Abb. 5B gezeigt band der Antikörper nach der Verdauung durch Trypsin an ein 42 kDa Protein, das das unverdaute HCV-Polyprotein-(1189-1525) darstellt, und an ein 26 kDa Fragment des Trypsinverdaues (Abb. 5B, Linie 1 und 2) sowie an ein 19 kDa Fragment des Protease V8-Verdaues (Abb. 5B, Linie 5 und 6). Andererseits ergab die Behandlung des HCV-Polyproteins-(1189-1525) mit Thermolysin kein 5'-FSBA-bindendes Abbauprodukt (Abb. 5B, Linie 3 und 4). Das durch Trypsin produzierte 5'-FSBA-bindende Fragment wurde der N-terminalen Sequenzierung unterzogen. Die ersten fünf Zyklen ergaben die Sequenz Ser-Thr-Val-Phe-Thr und identifizierten damit Arg1206 als Spaltungsstelle. Die Sequenzierung des durch die Protease V8 produzierten Segmentes ergab die Sequenz Thr-Thr-Met-Arg-Ser und legte damit Glu1203 als Spaltungsstelle fest. Ein durchschnittliches Molekulargewicht von 110-120 Da pro Aminosäure angenommen, können wir Lys1406 als die C-terminale Spaltungsstelle für das 26 kDa Lysin Verdauprodukt annehmen. Im Falle des V8 Verdauproduktes wird Glu1363 oder Glu1364 als C-terminale Spaltungsstelle des 19 kDa Fragmentes angenommen. Densitometrische Vergleiche zwischen Coomassie gefärbten Blots und Autoradiografien von mit [<sup>125</sup>I]-Protein A detektierten anti-FSBA Antikörpern ergaben eine gleiche Bindungskapazität in Bezug auf 5'-FSBA für beide Fragmente.

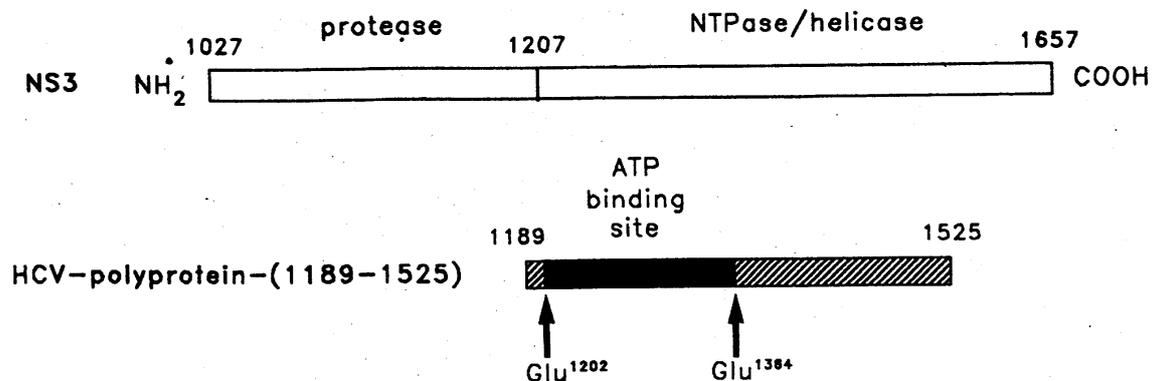
**Abb. 5) Analyse der ATP-Bindungskapazität der HCV-Polyproteins-(1189-1525)-Fragmente, die durch limitierte Proteolyse generiert wurden.**



Proben mit 125 pmol HCV-Polyprotein-(1189-1525) wurden mit 1,25 pmol oder 2,5 pmol Trypsin inkubiert (Spalte 1 und 2); 1,25 pmol oder 2,5 pmol Termolysin (Spalte 3 und 4); 1,25 pmol oder 2,5 pmol V8-Protease (Spalte 5 oder 6) und ohne Protease (Spalte 7). Die Verdauprodukte wurden mit 5'-FSBA markiert, durch SDS/PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosefolie transferiert und einem Immunoblot mit anti-NS3 (Panel A) oder mit anti-FSBA Antikörpern (Panel B) unterzogen. Die Blots wurden 10 h exponiert.

Da das durch die Verdauung mit V8 erhaltene 19 kDa Fragment das kleinste 5'-FSBA-bindende Fragment war, bestimmten wir die C-terminale Sequenz der Domäne. Die ersten zwei Zyklen der C-terminalen Sequenzierung ergaben die Aminosäuresequenz Glu-Glu, die im NS3 einzigartig ist, und bestätigten somit das Glu1364 als C-terminale Spaltstelle der durch V8 generierten ATP-bindenden Domäne der HCV NTPase/Helikase. Die Lokalisation der Spaltstellen sind in Abb. 6 illustriert.

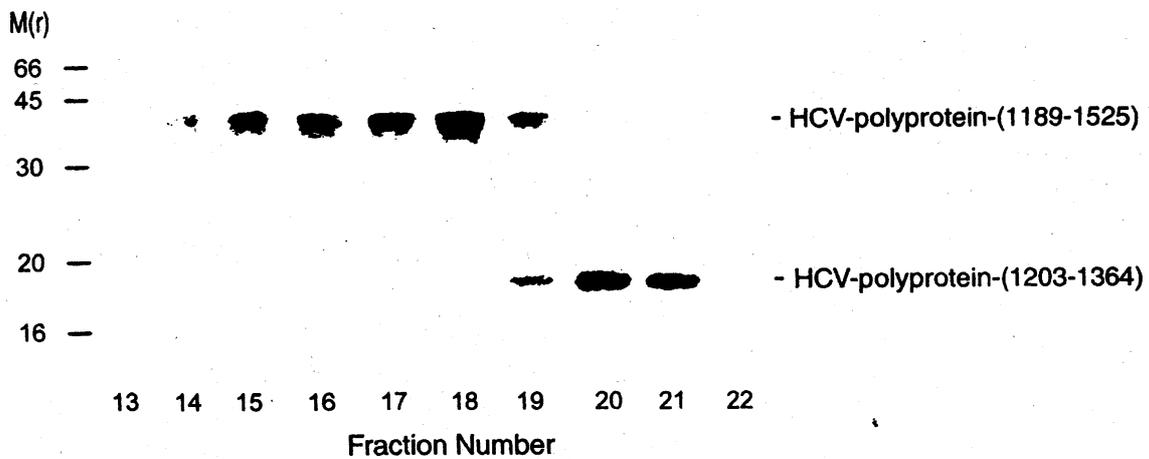
**Abb. 6) Schematische Präsentation der Lokalisation der durch V8 Protease generierten ATP-bindenden Domäne innerhalb des NS3.**



Die obere Box repräsentiert die Struktur und assoziierte enzymatische Aktivitäten des ganzen NS3. Die untere Box zeigt die Lokalisation des in dieser Studie benutzten Fragments, das HCV-Polyprotein-(1189-1525) des NS3-Moleküles. Die ausgefüllte Box stellt die durch V8 hergestellte ATP-bindenden Domäne dar. Auf die V8-Spaltungsstellen innerhalb des HCV-Polyproteins-(1189-1525) weisen die Pfeile hin. Die Aminosäuren wurden nach der von Takamizawa (Takamizawa et al., 1991) veröffentlichten Aminosäure-Sequenz nummeriert.

Um die nukleotidbindende Domäne des NS3 (HCV-Polyprotein-(1203-1364)) in gereinigter Form zu erhalten, wurde die Behandlung des HCV-Polyproteins-(1189-1525) mit V8 verlängert. Dies führte zu einem Abbau der Masse des HCV-Polyproteins-(1189-1525), während das FSBA-bindende Fragment resistent gegen weiteren Verdau blieb. Das verbleibende HCV-Polyprotein-(1189-1525) wurde durch eine nach relativer Masse trennende Chromatographie mit einer Superdex 200 Säule von den Verdauprodukten getrennt. Die Analyse der erhaltenen Fraktionen in Coomassie gefärbten SDS/Polyakrylamidgelen ergab zwei Proteine mit den molekularen Massen von 42 kDa (Fraktion 15-18) bzw. 19 kDa (Fraktion 20-21) (Abb. 7). Das erste entspricht dem unverdauten HCV-Polyprotein-(1189-1525) und das zweite dem HCV-Polyprotein-(1203-1364).

**Abb. 7) Trennung des HCV-Polyproteins-(1189-1525) von der mit V8 generierten ATP-bindenden Domäne der HCV NTPase/Helikase durch eine Superdex 200 Säule.**

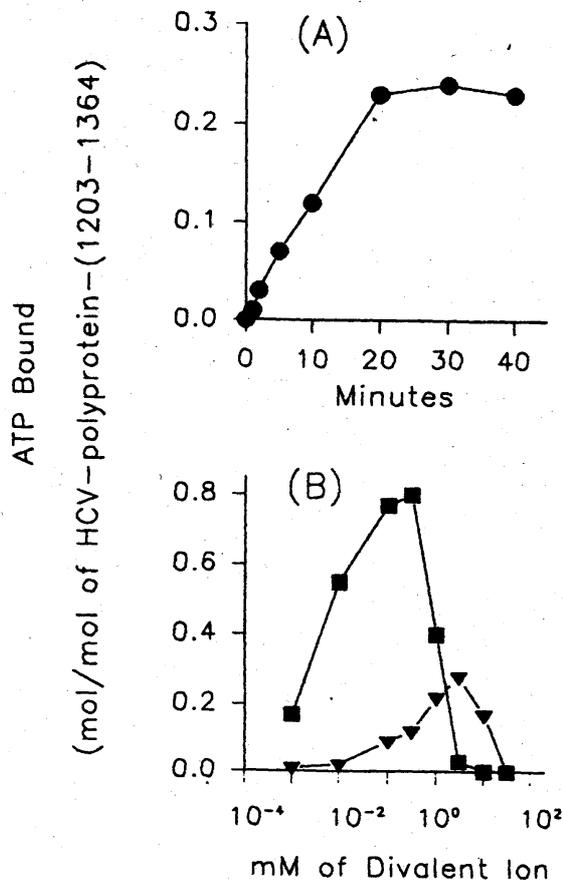


20 nmol des HCV-Polyproteins-(1189-1525) wurden mit 1 nmol der V8-Protease verdaut. Die Reaktion wurde gestoppt und die Verdauprodukte wurden durch eine nach relativer Masse trennende Gelchromatographie mit einer Superdex 200 Säule getrennt wie in Material und Methoden beschrieben. Aliquote (30  $\mu$ l) der Fraktionen wurden durch SDS/PAGE getrennt und die Gele mit Coomassie gefärbt.

#### **4.2. Charakterisierung der ATP-Bindung der isolierten ATP-bindenden Domäne**

Das von der Superdex 200 Säule eluierte HCV-Polyprotein-(1203-1364) wurde für die Experimente benutzt, in denen wir die Interaktion des ATPs mit der ATP-bindenden Domäne der HCV NTPase/Helikase untersuchten. Mit chromatografischen Assays und Mikrofiltrationsassays charakterisierten wir die optimalen Konditionen für die ATP-Bindung. Die Formation des ATP-HCV-Polyprotein-(1203-1364)-Komplexes war nach 1-2 min detektierbar und erreichte nach 20 min (Abb. 8A) ein Plateau. Die Bindung von ATP an das HCV-Polyprotein-(1203-1364) war von dem Vorhandensein der divalenten, metallischen Kationen  $Mn^{2+}$  oder  $Mg^{2+}$  abhängig. Beide Kationen zeigten unterschiedliche Konzentrationen, bei denen es zu einer optimalen ATP-Bindungsrate kommt. Die optimale Konzentrationen waren 0,3 mM für  $Mn^{2+}$  und 3,0 mM für  $Mg^{2+}$ . Die ATP-Bindungskapazität des HCV-Polyproteins-(1203-1364) war bei der optimalen  $Mg^{2+}$ -Konzentration 2,8 mal kleiner als bei der optimalen  $Mn^{2+}$ -Konzentration. (Abb.8B).

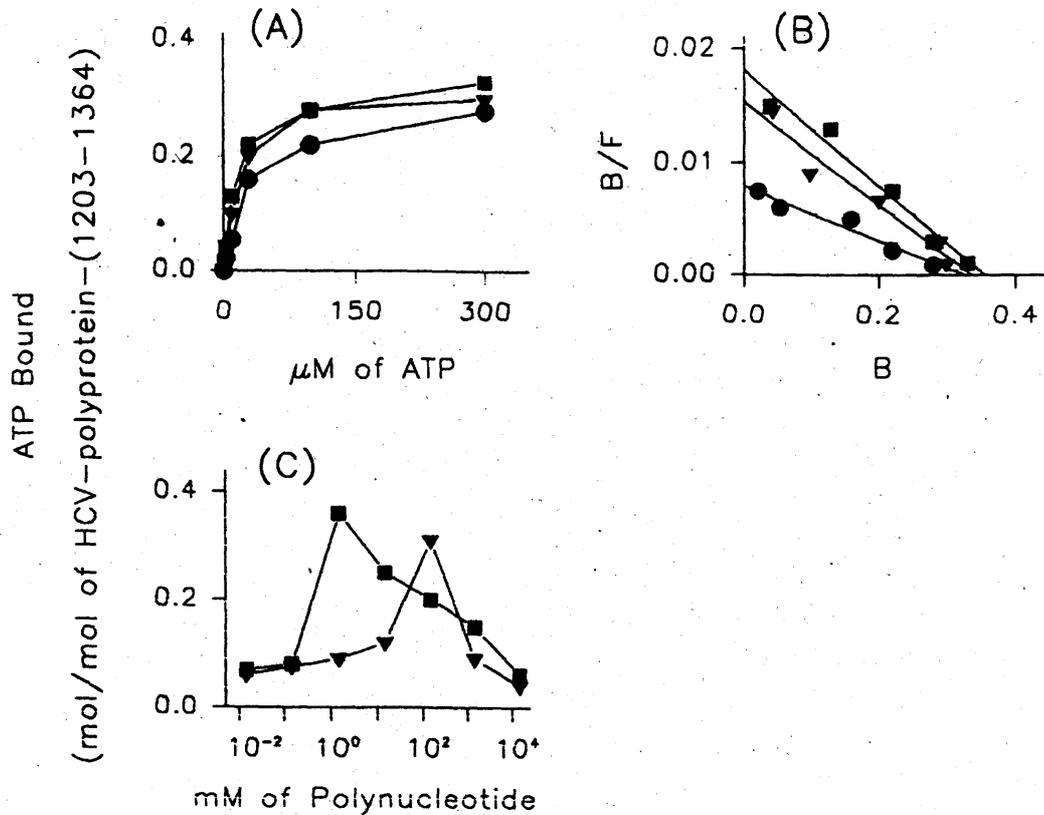
**Abb. 8) Zeitlicher Verlauf und Abhängigkeit von divalenten Kationen der ATP-Bindung der ATP-bindenden Domäne der HCV NTPase/Helikase.**



(A) Proben (50 pmol) des HCV-Polyproteins-(1203-1364) wurden mit ATP (43,6  $\mu$ M) inkubiert und die ATP-Bindung wurde durch Mikrofiltration oder Gel-filtration nach den angegebenen Zeiten wie unter Material und Methoden beschrieben beendet. (B) Effekt ansteigender Konzentrationen von Mg<sup>2+</sup> ( $\blacktriangledown$ ) und Mn<sup>2+</sup> ( $\blacksquare$ ) auf die Bindung von ATP an das HCV-Polyprotein-(1203-1364), bestimmt mit beiden oben erwähnten Methoden.

Weiterhin charakterisierten wir die ATP-Bindung durch eine Methode mit kompetitiver Verdrängung. [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP konkurrierte mit verschiedenen Konzentrationen nicht markierten ATPs, das dem Reaktionsgemisch hinzugefügt wurde. Die Menge des an das HCV-Polyprotein-(1203-1364) gebundenen markierten und gesamten (markiert und unmarkiert) ATPs wurde bestimmt und die Daten mit ENZFITTER analysiert. Abb. 9A zeigt den Effekt ansteigender ATP-Konzentrationen auf das Ausmaß der ATP-Bindungsreaktion. Die Bindung war maximal bei 7,0 mM gesamten ATPs und halbmaximal in der Anwesenheit von 43,6  $\mu$ M gesamten ATPs. Nach der Methode von Scatchard (Scatchard, 1949) (gebundener/freier Ligand versus gebundener Ligand) ausgewertet sprechen diese Daten für eine einzelne ATP-Bindungsstelle (Abb. 9B).

Abb. 9) Charakteristiken der ATP-Bindung an die ATP-bindenden Domäne der HCV NTPase/Helikase.



(A und B) Der Assay mit 50 pmol HCV-Polyprotein-(1203-1364) und ATP in den angegebenen Konzentrationen wurde in der Abwesenheit (●) und Anwesenheit von Poly[dA] (■) und Poly[A] (▼) ausgeführt. Die Polynukleotide wurden in den Konzentrationen hinzugefügt, bei denen das Maximum der Stimulation der ATP-Bindung zu messen war (1 mM Poly[dA] und 100 mM Poly[A]). Der Assay der direkten Bindung (A) und der Blot nach Scatchard (B) werden gezeigt. (C) Effekt der ansteigenden Konzentration von Poly[dA] und Poly[A] auf die ATP-Bindungskapazität des HCV-Polyproteins-(1203-1364). Der ATP-Bindungsassay enthält 50 pmol HCV-Polyprotein-(1203-1364), 43,6 μM ATP und Poly[dA] (■) oder Poly[A] (▼) in den angegebenen Konzentrationen. Die ATP-Bindungsrate wurde mit Hilfe der Mikrofiltrationsmethode unter Standardbedingungen wie in Materialien und Methoden beschrieben bestimmt. Die Konzentrationen der Polynukleotide sind in mmol Nukleotidbasen angegeben.

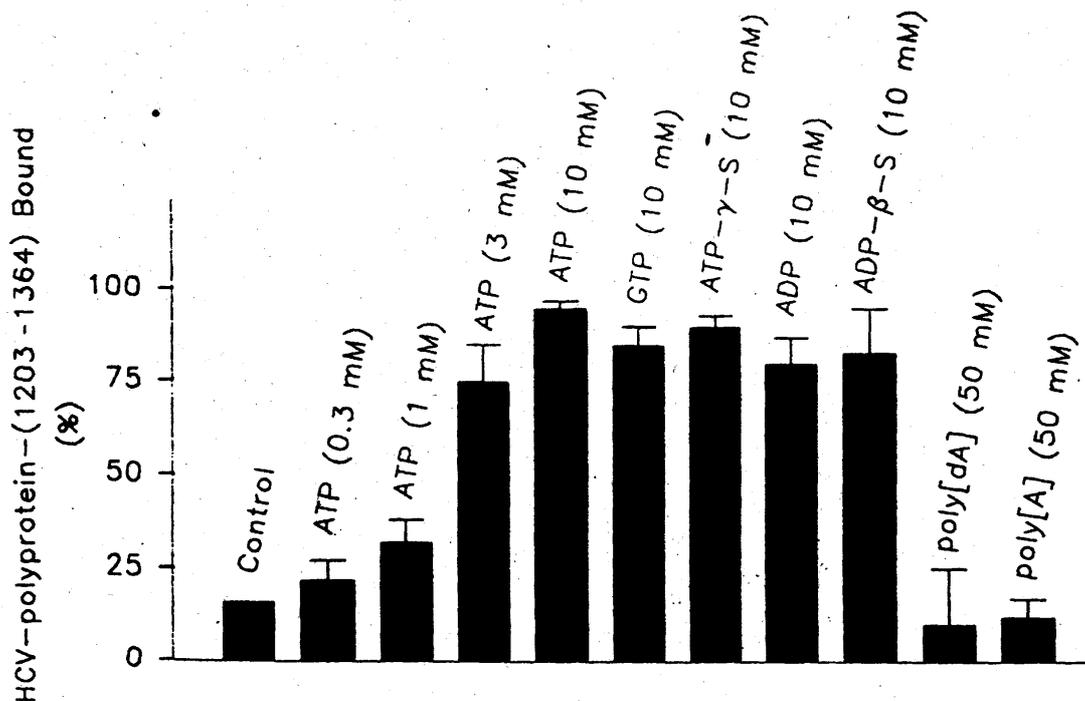
#### 4.4. Interaktionen des HCV-Polyproteins-(1203-1364)

Da die homopolymerischen Polynukleotide als potente Modulatoren der mit dem NS3 und mit anderen verwandten Viren assoziierten NTPase- und Helikaseaktivität bekannt sind (Gallinari et al., 1998; Tai et al., 1996; Suzich et al., 1993; Warrener et al., 1993), untersuchten wir den Einfluß von Poly[dA] und Poly[A] auf die Rate der ATP-Bindung des HCV-Polyproteins-(1203-1364). Die ATP-Bindung wurde unter optimalen Reaktionsbedingungen in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen der Polynukleotide gemessen. Wie in Abb. 9C gezeigt, verstärken beide Polynukleotide die ATP-Bindung um das 4-fache mit dem maximalen Effekt bei 1 mM Poly[dA] bzw. 100 mM Poly[A]. Die Analyse der Bindung des ATP an das HCV-Polyprotein-(1203-1364) in der Anwesenheit von Poly[dA] oder Poly[A] nach Scatchard ergab, dass die Polynukleotide die Affinität des HCV-Polyproteins-(1203-1364) für ATP erhöhen. Der  $K_d$ -Wert betrug in der Anwesenheit von Poly[dA] 17,5  $\mu$ M und in der Anwesenheit von Poly[A] 20,0  $\mu$ M. Weiterhin war ein kleiner, wenn überhaupt vorhandener Effekt der Polynukleotide auf die Anzahl der Bindungsstellen zu bemerken. Somit deuten die Resultate darauf hin, dass die Polynukleotide die ATP-Bindungsrate durch eine Verstärkung der Affinität der vorhandenen Bindungsstellen erhöhen (Abb. 9A und 9B).

Die Interaktion zwischen Polynukleotiden und HCV-Polyprotein-(1203-1364) wurde weiterhin durch die Nutzung von Oligo[dA] immobilisiert an Zellulose studiert. Wenn das HCV-Polyprotein-(1203-1364) mit Oligo[dA] unter Standardbedingungen inkubiert wurde, war nur eine schwache Bindung des Proteins zu beobachten (ungefähr 15% des Proteins). Das Hinzufügen von ATP zum Reaktionsansatz verstärkte jedoch erheblich die Bindung des HCV-Polyproteins-(1203-1364) an die Oligo[dA]-Zellulose. Das Ausmaß des Effektes war von der ATP-Konzentration abhängig. Das Maximum der Bindung (ca. 95% des Proteins) war bei ATP-Konzentrationen von 10 mM zu beobachten. Ein ähnlicher Effekt war bei dem Hinzufügen von GTP, ATP- $\gamma$ -S, ADP und ATP- $\beta$ -S anstelle von ATP zum Reaktionsgemisch zu beobachten. Die Addition von Poly[dA] oder Poly[A] zum Reaktionsansatz verhinderte die Bindung (Abb. 10). Andere Nukle-

otide wie CTP, TTP, AMP und cAMP stimulierten nicht die HCV-Polyprotein-(1203-1364)-Bindung an die Oligo[dA]-Zellulose (Daten nicht gezeigt).

**Abb. 10) Interaktion der ATP-bindenden Domäne der HCV NTPase/Helikase mit Oligo[dA]-Zellulose.**



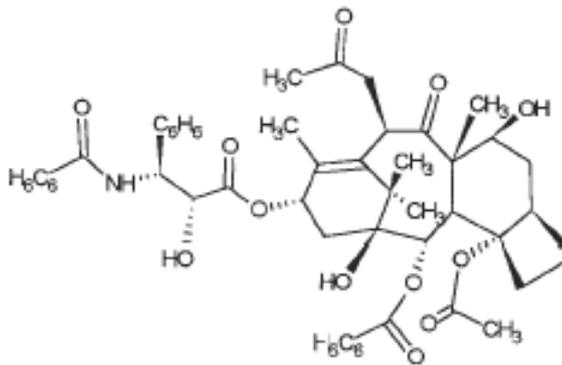
125 pmol HCV-Polyprotein-(1203-1364) reagierte mit Oligo[dA]-Zellulose in An- und Abwesenheit der Nukleotide und Polynukleotide in den angegebenen Konzentrationen. Das gebundene Protein wurde der SDS/PAGE unterzogen und mit Coomassie gefärbt. Die Quantifizierung erfolgte durch densitometrische Messung digitalisierter Bilder der Gele mit der Software Gelimage. Der 100%-Wert entspricht der Menge des eingesetzten Proteins.

#### **4.5. Inhibition der ATP-Bindung an das HCV-Polyprotein-(1203-1364) und deren Effekt auf die ATPase-Aktivität der HCV NTPase/Helikase**

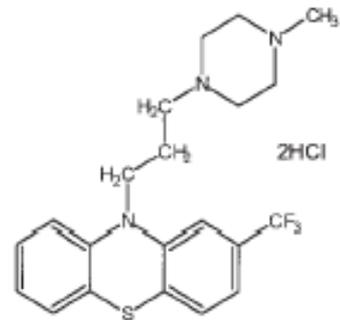
Eine Anzahl von Verbindungen, die für ihre Interaktionen mit den ATP-bindenden Stellen anderer Proteine bekannt sind, wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die ATP-Bindung an das HCV-Polyprotein-(1203-1364) zu inhibieren. Die kinetischen Analysen der Inhibition wurden bei der ATP-Konzentration (43,6  $\mu$ M), bei der die halbmaximale ATP-Bindung an das HCV-Polyprotein-(1203-1364) gemessen worden war, durchgeführt. Unter den getesteten Verbindungen reduzierte 2-Hydroxy-5-(2,5-dihydroxybenzyl)-aminobenzoessäure

(Aminobenzoat), ein Tyrosinkinaseinhibitor (Onoda et al., 1989), die ATP-Bindung an das HCV-Polyprotein-(1203-1364). Überraschend reduzierten außerdem Paclitaxel, ein Mikrotubuli stabilisierendes Agens, und Trifluoperazin, ein Calmodulinantagonist, die ATP-Bindung.

**Abb. 11) Strukturformeln der Inhibitoren der HCV Helicase: Paclitaxel und Trifluoperazine**



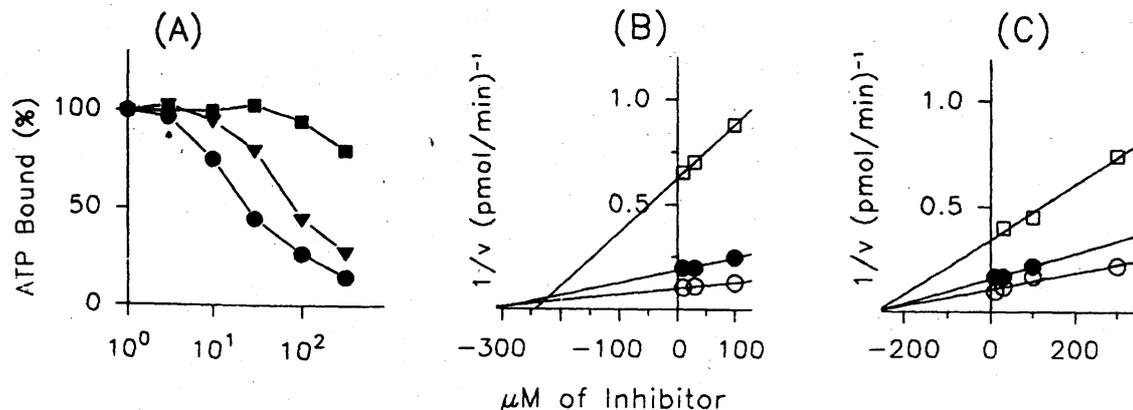
Paclitaxel (Taxol)



Trifluoperazine

Die Verbindungen inhibierten die ATP-Bindung dosisabhängig mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 1,2 mM Aminobenzoat, 22 µM Paclitaxel und 98 µM Trifluoperazin (Abb. 12A). Aufgrund des hohen IC<sub>50</sub>-Wertes für Aminobenzoat konzentrieren wir uns in dieser Arbeit auf Paclitaxel und Trifluoperazin.

**Abb. 12) Kinetische Analyse der Interaktion von Aminobenzoat, Paclitaxel und Trifluoperazin mit der ATP-bindenden Domäne der HCV NTPase/Helikase.**

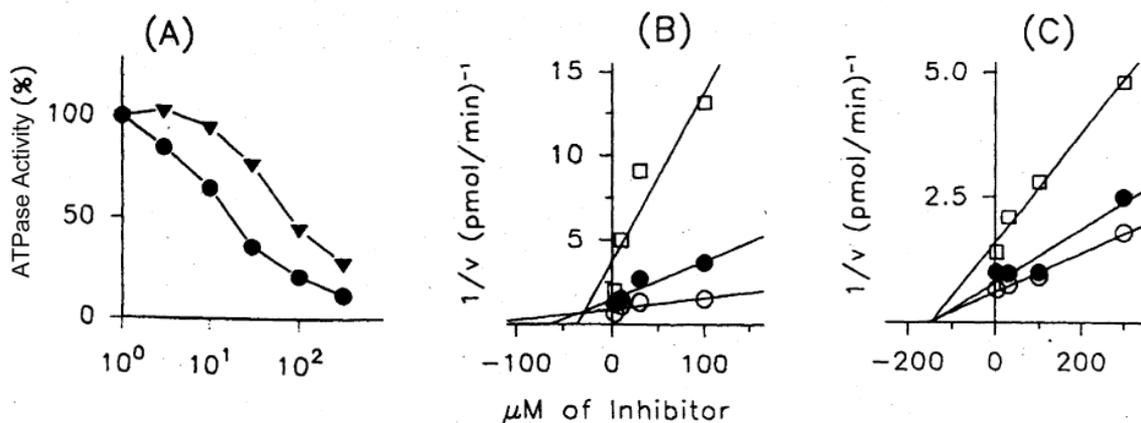


(A) Effekt ansteigender Konzentrationen von Aminobenzoat (■), Paclitaxel(●) und Trifluoperazin (▼) auf die ATP-Bindungskapazität des HCV-Polyproteins-(1203-1364). Die Konzentration des ATPs in dem Reaktionsgemisch entsprach dem  $K_d$ -Wert ( $43,6 \mu\text{M}$ ). (B und C) Effekt der ansteigenden Konzentration des ATPs auf die Inhibition der ATP-Bindung an das HCV-Polyprotein-(1203-1364) durch Paclitaxel (B) und Trifluoperazin (C). Die benutzten ATP-Konzentrationen waren das 0,3- (○), 1- (●) und 3- (◻) fache des  $K_d$ -wertes ( $43,6 \mu\text{M}$ ). Der Typ der Inhibition wurde nach Dixon analysiert. Die ATP-Bindung wurde durch die in Materialien und Methoden beschriebene Mikrofiltrationsmethode bestimmt.

Wir untersuchten die Art und Weise der Hemmung der ATP-Bindung an das HCV-Polyprotein-(1203-1364). Kinetische Analysen nach der Methode von Dixon (reziproke Geschwindigkeit der Bindungsreaktion gegen die Inhibitorenkonzentration) (Dixon, 1952) ergaben Unterschiede in den Mechanismen der Hemmung von Paclitaxel und Trifluoperazin. Während das Paclitaxel die ATP-Bindung an das HCV-Polyprotein-(1203-1364) durch einfache Konkurrenz hemmt (Abb. 12B), ist die Inhibition durch Trifluoperazin am besten mit dem nicht-kompetitiven Mechanismus zu beschreiben (Abb. 12C). Diesen Resultaten folgten weitere Experimente, um zu bestimmen, ob die enzymatische NTPase-Aktivität der HCV NTPase/Helikase für die Hemmung durch Paclitaxel und Trifluoperazin empfänglich ist. Die Inhibition der NTPase-Aktivität wurde bei der ATP-Konzentration untersucht, die dem für die NTPase bestimmten  $K_m$ -Wert entspricht ( $11,0 \mu\text{M}$ ). Wie in Abb. 13A demonstriert, hemmten beide Verbindungen die NTPase. Die Inhibition war von der Konzentration der Inhibitoren abhängig und die gemessenen  $IC_{50}$ -Werte ( $17,0 \mu\text{M}$  Paclitaxel und  $105 \mu\text{M}$  Trifluoperazin) entsprachen weitgehend den  $IC_{50}$ -Werten, die für die Hemmung der ATP-Bindung an das HCV-Polyprotein-(1203-1364) gemessen worden waren.

Weiterhin entsprachen die Modi der Hemmung, die mit grafischen Methoden analysiert wurden, dem kompetitiven Modus für Paclitaxel und dem nicht-kompetitiven Modus für Trifluoperazin (Abb. 13B und 13C). Die Ergebnisse demonstrieren, dass die Inhibition der ATPase-Aktivität der HCV NTPase/Helikase ausschließlich aus der Reduktion der Zugänglichkeit der ATP-bindenden Domäne des Enzymes resultierte.

**Abb. 13) Kinetische Analyse der Inhibition der ATPase-Aktivität der HCV NTPase/Helikase durch Paclitaxel und Trifluoperazin.**



Der ATPase-Assay wurde mit 10 pmol der HCV NTPase/Helikase entsprechend der in m+m beschriebenen Methode durchgeführt. (A) Effekt der ansteigenden Konzentrationen von Paclitaxel (●) und Trifluoperazin (▼) auf ATPase-Aktivität der HCV NTPase/Helikase. Die ATP-Konzentration in dem Reaktionsansatz entspricht dem für die ATPase bestimmten  $K_m$ -Wert (11,0  $\mu\text{M}$ ). (B und C) Effekt der ansteigenden Konzentration des ATPs auf die Inhibition der ATPase-Aktivität durch Paclitaxel (B) und Trifluoperazin (C). Die benutzten ATP-Konzentrationen waren das 0,3- (○), 1- (●) und 3- (□) fache des  $K_m$ -wertes. Der Typ der Inhibition wurde nach Dixon analysiert.

## **5. Diskussion**

Eine proteinaseresistente Domäne der HCV NTPase/Helikase, die die ATP-bindende Stelle des Enzymes enthält, wurde *in vitro* durch limitierte Proteolyse produziert. Das erhaltene Fragment scheint durch Regionen mit angrenzenden Domänen des NS3 verbunden zu sein, die empfindlich für eine Proteolyse sind. Unsere vorangegangenen Studien lassen vermuten, dass diese Verbindungsregionen ein gemeinsamer Angriffspunkt für verschiedene Proteasen sein könnten. Der Verdau des HCV-Polyproteins-(1189-1525) mit Trypsin führt zu einer Spaltung hinter Arg1342 und Lys1378 (Borowski et al., 1999b). Somit kann das Peptid von 36 Aminosäuren, das zwischen Arg1342 und Lys1378 lokalisiert ist, als Hinge-Region zwischen zwei Domänen der HCV NTPase/Helikase bezeichnet werden (Borowski et al., 1999b). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen sind Resultate aktueller kristallografischer Studien, die darauf hin weisen, dass diese Region eine flexible Verbindung zwischen den Domänen I und II darstellt (Yao et al., 1997; Kim et al., 1998). Bisher ist nicht bekannt, ob die Serinprotease des NS3 und die Domäne I der NTPase/Helikase über eine ähnliche, flexible Region verbunden sind. Die Ergebnisse der von uns durchgeführten partiellen Proteolyse lassen die Existenz so einer Verbindung zwischen den Domänen erwarten. Zusätzlich zur V8 Spaltungsstelle bei Glu1202 erfassten wir eine Trypsin-Spaltungsstelle bei Arg1206. Ob diese Verbindungsregion Veränderungen der Konformation der ATP-bindenden Domäne überträgt, bleibt unbekannt.

Diese Arbeit hat zum ersten Mal experimentell gezeigt, dass die N-terminal gelegene Domäne I der HCV NTPase/Helikase ATP bindet. Dies bestätigt Annahmen aus der Analyse der Motive in der Aminosäuresequenz (Kadare und Haeni, 1997; Walker et al., 1982) und den aktuellen kristallografischen Studien (Yao et al., 1997; Kim et al., 1998).

Die untersuchten biochemischen Eigenschaften der isolierten ATP-bindenden Domäne, die Affinität für ATP und die Abhängigkeit von divalenten Kationen, waren vergleichbar mit den Eigenschaften des Holoenzymes unter entsprechenden experimentellen Bedingungen (Gallinari et al., 1998; Wagner et al., 1998; Suzich et al., 1993).

Abgesehen von diesen Ähnlichkeiten zeigt die ATP-bindende Domäne einen offensichtlichen Unterschied, wenn es mit dem Holoenzym verglichen wird. Die Domäne enthält eine der Substrat/Polynukleotid-Bindungsstellen der HCV NTPase/Helikase. Diese Stelle muss eine regulatorische Rolle spielen, weil die Bindung von Poly[dA] oder Poly[A] in einer erhöhten Affinität der Domäne für ATP resultiert. Auf der anderen Seite verstärkt die Besetzung der ATP-bindenden Stelle die Bindungsrate für Polynukleotide. Dies suggeriert, dass die Regulation der NTPase-Aktivität durch Poly[dA] und Poly[A] als ein positiver Feedback-Mechanismus dient. Diese Resultate stehen in offensichtlichem Kontrast zu vorherigen Berichten, die zeigen, dass ATP die Affinität der HCV NTPase/Helikase für Poly[dU] vermindert und dass Poly[dU] die Affinität des Enzymes für ATP reduziert (Preugschat et al., 1996). Diese Unterschiede mögen zumindest zum Teil dadurch zu erklären sein, dass verschiedene Polynukleotide verschiedene Effekte auf die ATPase-Aktivität der HCV NTPase/Helikase ausüben. Während Poly[A] und Poly[U] die ATPase-Aktivität stimulieren, hemmt Poly[G] diese (Tai et al., 1996). Es ist denkbar, dass diese unterschiedlichen Resultate von unterschiedlichen Regulationen der Affinität des Enzymes für ATP durch Polynukleotide herrühren.

Die Resultate dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Mechanismen, durch die die Polynukleotide die Affinität der ATP-bindenden Domäne für ATP regulieren, komplexer sind. Während die optimalen ATP-Konzentrationen für die Bindung von ATP (7,0 mM) und für die Bindung von Polynukleotiden (10,0 mM) vergleichbar sind, ist die Kurve der Titration von ATP im kompetitiven Verdrängungs-Assay nicht parallel mit der Kurve des ATP-Bedarfes für die Polynukleotidbindung. Die ATP-Konzentration, die für die halbmaximale Besetzung der ATP-bindenden Stellen der ATP-bindenden Domäne benötigt wird, war 40-fach niedriger als die Konzentration, die für die halbmaximale Stimulation der Bindung von Oligo[dA]-Zellulose benötigt wurde. Weiterhin ergab die ATP-Bindungsrate gemessen als Funktion der Polynukleotidkonzentration einen optimalen Wert der Polynukleotidkonzentration anstelle einer Sättigungskurve, da bei höheren Konzentrationen die Polynukleotide sogar einen inhibitorischen Ef-

fekt auf die ATP-Bindung ausübten. Auch die Kettenlänge der Polynukleotide scheint entscheidend für diese Interaktionen zu sein (Preugschat et al., 1996).

Es gibt viele Hinweise, dass die Polynukleotide die ATPase-Aktivität modulieren, indem sie die Substratbindungsstelle(n) der HCV NTPase/Helikase besetzen. Während Poly[A] und Poly[U] die NTPase-Aktivität stimulieren und Poly[G] inhibiert, reduzieren alle die Helikase-Aktivität des Enzymes. In Anwesenheit dieser Polynukleotide wurde eine reduzierte Bindung des RNA-Substrates an die Helikase beobachtet (Tai 1996). In diesem Kontext ist interessant, dass RNA und DNA ähnlich wie Poly[dA] und Poly[A] die ATP-Bindungskapazität des HCV-Polyproteins-(1203-1364) erhöhen (Daten nicht gezeigt). Zusammengefasst deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der Zugang zur Substrat-/Polynukleotid-Bindungsstelle, die in der ATP-bindenden Domäne der HCV NTPase/Helikase lokalisiert ist, durch die Menge des gebundenen ATPs reguliert wird.

Die Inhibition der ATP-Bindung an das HCV-Polyprotein-(1203-1364) durch Verbindungen, die strukturell nicht mit dem ATP verwandt sind, ist von besonderem Interesse. Paclitaxel, ein amitotisches Agens, gewonnen aus der pazifischen Eibe (*Taxus baccata*) (Wani et al., 1971), kompetitiert mit ATP um die ATP-bindende Stelle der HCV NTPase/Helikase. Dieses Resultat ist nicht überraschend. In einer Studie zum Kartieren struktureller Domänen des murinen P-Glykoproteines, eines Mitgliedes der ABC (ATP-Bindungskassette) Superfamilie der Membranproteine, wurde demonstriert, dass ein photoreaktives Paclitaxelanalogen direkt an Aminosäuren band, die dem Walker A Motiv der zweiten nukleotidbindenden Tasche des Proteins direkt benachbart sind (Wu et al., 1998). Diese Beobachtung lässt eine relativ niedrige Spezifität der ATP-bindenden Domäne für verschiedene Verbindungen vermuten. Tatsächlich wurde berichtet, dass eine breite Auswahl von Verbindungen wie Acyclovirtriphosphat, azyklisches ATP oder Tripolyphosphate von der HCV NTPase/Helikase hydrolysiert werden kann (Preugschat et al., 1996). In ähnlicher Weise zeigen die RNA-Helikasen des Bovinen Virusdiarrhoe-Virus (Warrener und Collet, 1995), des Gelbfiebervirus (Tamura, 1993) und des Sharka-Virus (Plum Pox Potyvirus) (Lain et al., 1991) eine geringe Selektivität für NTPs.

Der Mechanismus, durch den Trifluoperazin die ATP-Bindung und die ATPase-Aktivität inhibiert, ist komplexer. Bis jetzt haben wir nicht bestimmen können, ob der nicht-kompetitive Mechanismus der Hemmung auf einer Änderung der Konformation des HCV-Polyproteins-(1203-1364) oder auf einer sterischen Blockade der ATP-bindenden Stelle durch das Trifluoperazin beruht. Die Regulation der Zugänglichkeit der ATP-bindenden Stelle durch Trifluoperazin ist jedoch nicht ohne Beispiel. Es wurde berichtet, dass die NTPase-Aktivität des P-Glykoproteins der Eizellen des Chinesischen Hamsters durch Trifluoperazin hochreguliert werden kann (Sharom et al., 1995). Kinetische Studien ergaben einen "gemischten" Mechanismus der Aktivierung, der auf einer Interaktion zwischen der ATPase-Domäne des P-Glykoproteins und einer davon getrennten Bindungsstelle für Trifluoperazin, die in der transmembranen Region des Proteins lokalisiert ist, beruht (Gros et al., 1991).

Auf der Basis dieser Beobachtungen und der publizierten Daten mag die Inhibition der ATP-Bindung an die ATP-bindenden Domäne der HCV NTPase/Helikase eine attraktive Strategie zur Entwicklung potenter Inhibitoren des Enzymes repräsentieren. Die erwähnte, relativ geringe Selektivität der ATP-bindenden Domäne zusammen mit der Möglichkeit, die ATP-Bindung durch andere Mechanismen als durch Konkurrenz zu hemmen, sprechen dafür, dass ein randomisiertes Screening von Verbindungen im Gegensatz zu dem Design von Inhibitoren basierend auf der Struktur des Enzymes der optimale Weg ist, potente Inhibitoren zu finden. Diese Substanzen mögen den Startpunkt für neue therapeutische Konzepte bilden, die auf einer Inhibition der viralen Helikase beruhen.

## 6. Zusammenfassung

Die RNA-stimulierte Nukleosidtriphosphatase und Helikase des Hepatitis C Virus (HCV) besteht aus drei Domänen. In der ersten Domäne finden sich hoch konservierte Motive ATP-bindender Stellen. Die in dieser Arbeit vorgestellte ATP-bindende Domäne wurde durch die limitierte Proteolyse eines größeren Fragmentes des HCV-Polyproteins gewonnen und chromatographisch gereinigt. Die Identität der Domäne, die aus den Aminosäuren 1203-1364 des HCV-Polyproteins besteht, wurde durch C- und N-terminale Sequenzierung und die Fähigkeit 5'-Fluorosulfonylbenzoyl-adenosine (FSBA) zu binden bestätigt.

Die kinetische Analyse der ATP-Bindung ergibt eine "single class"-Bindungsstelle mit einer  $K_d$  von 43,6  $\mu\text{M}$ . Die Bindung ist zu sättigen und ist abhängig von dem Vorliegen von  $\text{Mn}^{2+}$ - oder  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen in der Reaktionslösung. Poly[A] und Poly[dA] zeigen eine interessante Eigenschaft als Regulatoren der ATP-Bindungs Kapazität der Domäne. Die Polynukleotide binden an die Domäne und erhöhen deren Affinität zu ATP. Andererseits erhöht ATP auch die Affinität der Domäne zu den Polynukleotiden.

Verschiedene Compounds, die für ihre Fähigkeit bekannt sind, mit nukleotidbindenden Stellen von Enzymen verschiedener Klassen zu interagieren, wurden auf ihr Potential, die ATP-Bindung zu inhibieren, untersucht. Es wurden zwei Reagenzien mit inhibitorischer Wirkung gefunden und die Mechanismen der Hemmung der ATP-Bindung durch kinetische Analysen ermittelt: Paclitaxel, das die ATP-Bindung kompetitiv hemmt ( $\text{IC}_{50} = 22 \mu\text{M}$ ), und Trifluoperazine, das die ATP-Bindung durch einen nicht-kompetitiven Mechanismus hemmt ( $\text{IC}_{50} = 98 \mu\text{M}$ ). Kinetische Untersuchungen der Inhibition der NTPase/Helikase durch Paclitaxel und Trifluoperazin weisen darauf hin, dass beide Compounds die NTPase-Aktivität des Holoenzym durch die Interaktion mit der ATP-bindenden Domäne hemmen, weil die Inhibition von der Konzentration der Inhibitoren abhängig war und sich die  $\text{IC}_{50}$ -Werte für die Hemmung der ATP-Bindung und der Hemmung der NTPase-Aktivität weitestgehend entsprachen.

Aufgrund der hier dargestellten Daten halte ich die Inhibition der ATP-Bindung an die ATP-bindende Domäne für eine attraktive Strategie zur Entwicklung potenter Inhibitoren des Enzyms.

## 7. Literaturverzeichnis

- Aach, R.D., Stevens, C.E., Hollinger, F.B., Mosley, J.W., Peterson, D.A., Taylor, P.E., et al. (1991) Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. *N Engl J Med.* 325, 1325-1329.
- Alter, H.J., Purcell, R.H., Shih, J.W., Melpolder, J.C., Houghton, M., Choo, Q.L., et al. (1989) Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med.* 321, 1494-1500.
- Alter, M.J., Margolis, H.S., Krawczynski, K., Judson, F.N., Mares, A., Alexander, W.J., et al. (1992) The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med.* 327, 1899-1905.
- Bartenschlager, R. (1997) Molecular targets in inhibition of hepatitis c virus replication. *Antivir Chem Chemotherapy.* 8, 281-301.
- Black, M.E. und Hruby, D.E. (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.
- Boker, K.H., Bahr, M.J., Dalley, G., Maschek, H., Tillmann, H.L., Oldhaver, K., et al. (1995) Long term outcome of hepatitis C virus infection after liver transplantation [Abstract]. *Hepatology.* 22, 134A.
- Borowski P, Schulze zur Wiesch J, Resch K, Feucht H, Laufs R, Schmitz H. (1999c) Protein kinase C recognizes the protein kinase A-binding motif of nonstructural protein 3 of hepatitis C virus. *J. Biol. Chem.* 274, 30722-30728.
- Borowski, P., Heiland, M., Feucht, H., Laufs, R. (1999a) Characterisation of non-structural protein 3 of hepatitis C virus as modulator of protein phosphorylation mediated by PKA and PKC. Evidences for action on the level of substrate and enzyme. *Arch. Virol.* 144, 687-701.
- Borowski, P., Heiland, M., Oehlmann, K., Becker, B., Kornetzky, L., Feucht, H.-H., 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., Kühl, R., Laufs, R., Schulze zur Wiesch, J., Heiland, M. (1999b) Identification and characterization of a histone binding site of nonstructural protein 3 of hepatitis C virus. *J. Clin. Virol.* 13, 61-69.
- Braconier, J.H., Paulsen, O., Engman, K., Widell, A. (1995) Combined alpha-interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis C: a pilot study. *Scand J Inf Dis* 27, 325-329.
- Bruix, J., Barrera, J.M., Calvet, X., Ercilla, G., Costa, J., Sanchez-Tapias, J.M., et al. (1989) Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis. *Lancet.* 2, 1004-1006.
- Chemello, L., Cavalletto, L., Bernardinello, E., Guido, M., Pontisso, P., Alberti, A (1995) The effect of interferon alfa and ribavirin combination therapy in naive patients with chronic hepatitis C. *J Hepatology.* 23, 8-12.
- Choi, H.B., Kim, Y.G., Oh, J.W. (2003) Biochemical properties of full-length hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase expressed in insect cells. *Exp-Mol-Med.* 35, 475-485
- Choo, L., Kuo, G., Weiner, A., Bradley, D., Houghton, M. (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244, 359-362.

- Choo, L., Richman, K., Han, H., Berger, K., Lee, C., Dong, C., Gallegos, C., Coit, D., Medina-Selby, A., Barr, J., Weiner, A., Bradley, D., Kuo, G., Houghton, M. (1991) Genetic organization and diversity of hepatitis C virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 2451-2455.
- Choo, L., Weiner, A., Overby, L., Kuo, G., Houghton, M. (1990) Hepatitis C virus: the major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. *Br. Med. Bull.* 46, 423-441.
- Clarke, B. (1997) Molecular virology of hepatitis C virus. *J. Gener. Virol.* 78, 2397-2410.
- Di Bisceglie, A.M., Goodman, Z.D., Ishak, K.G., Hoofnagle, J.H., Melpolder, J.J., Alter, H.J. (1991) Long-term clinical and histopathological follow-up of chronic posttransfusion hepatitis. *Hepatology.* 14, 969-974.
- Dienstag, J.L. (1983) Non-A, non-B hepatitis. I: recognition, epidemiology, and clinical features. *Gastroenterology.* 85, 439-462.
- Dixon, M. (1952) The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem. J.* 55, 170-171.
- Esteban, J.I., Lopez-Talavera, J.C., Genesca, J., Madoz, P., Viladomiu, L., Muniz, E., et al. (1991) High rate of infectivity and liver disease in blood donors with antibodies to hepatitis C virus. *Ann Intern Med.* 115, 443-449
- Farci, P., Alter, H.J., Wong, D., Miller, R.H., Shih, J.W., Jett, B., et al. (1991) A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med.* 325, 98-104.
- Feinstone, S.M., Kapikian, A.Z., Purcell, R.H., Alter, H.J., Holland, P.V. (1975) Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med.* 292, 767-770.
- Feray, C., Gigou, M., Samuel, D., Paradis, V., Wilber, J., David, M.F., et al. (1994) The course of hepatitis C virus infection after liver transplantation. *Hepatology.* 20, 1137-1143.
- Fernandez, H., Banks, G., Smith, R. (1986) Riavirin: A clinical overview. *Eur J Epidemiol.* 2, 1-14.
- Feucht, H.H., Zöllner, B., Polywka, S., Laufs, R. (1995) Study on reliability of commercially available hepatitis C virus antibody tests. *J. Clin. Microbiol.* 33, (1995), 620-624
- Gallinari, P., Brennan, D., Nardi, C., Brunetti, M., Tomei, L., Steinkühler, C., De Francesco, R. (1998) Multiple enzymatic activities associated with recombinant NS3 of hepatitis C virus. *J. Virol.* 72, 6758-6769
- Gallinari, P., Brennan, D., Nardi, C., Brunetti, M., Tomei, L., Steinkühler, C. und De Francesco, R. (1998) Multiple enzymatic activities associated with recombinant NS3 of hepatitis C virus. *J. Virol.* 72, 6758-6769.
- Gorbalenya, A.E. und Koonin, E.V. (1989) Viral proteins containing the purine NTP-binding sequence pattern. *Nucleic Acids Res.* 17, 8413-8440.
- Gorbalenya, A.E. und Koonin, E.V. (1993) Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 419-429.
- Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S., Rice, C. (1993) Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J. Virol.* 67, 1385-1395.
- Gros, P., Dhir, R., Croop, J., Talbot, F. (1991) A single amino acid substitution strongly modulates the activity and substrate specificity of the mouse *mdr1* and *mdr3* drug efflux pumps. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 7289-7293.
- Gross, C.H. und Shuman, S. (1995) Mutational analysis of vaccinia virus nucleoside triphosphate phosphohydrolase II, a DexH box RNA helicase. *J. Virol.* 69, 4727-4736.

- Heilek, G.M. und Peterson, M.G. (1997) A point mutation abolishes the helicase but not the nucleoside triphosphatase activity of hepatitis C virus NS3 protein. *J. Virol.* 71, 6264-6266.
- Heukeshoven, J. und Dernick, R. (1985) Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6, 103-112.
- Hodgman, T.C. (1988) A new superfamily of replicative proteins. *Nature* 333, 22-23.
- Houghton, M., Weiner, A., Han, J., Kuo, G., Choo, G. (1991). Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 14, 381-388.
- Hunt, D.F., Henderson, R.A., Shabanowitz, J., Sakaguchi, K., Michel, H., Sevilir, N., Cox, A.L., Appella, E., Engelhard, V.H. (1992) Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* 255, 1261-1263.
- Kadare, G. und Haeni, A. (1997) Virus-encoded RNA helicase. *J. Virol.* 71, 2583-2590.
- Kim, J., Morgenstern, K., Griffith, J., Dwyer, M., Thomson, J., Murcko, M., Lin, C., Caron, P. (1998) Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure* 6, 89-100.
- Kiyosawa, K., Sodeyama, T., Tanaka, E., Gibo, Y., Yoshizawa, K., Nakano, Y., et al. (1990) Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology.* 12, 671-675.
- Koonin, E.V. und Dolja, V.V. (1993) Evolution and taxonomy of positiv-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28, 375-430.
- Kuo, G., Choo, Q.L., Alter, H.J., Gitnick, G.L., Redeker, A.G., Purcell, R.H., et al. (1989) An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science.* 244, 362-364
- Kyono, K., Miyashiro, M., Taguchi, I. (1998) Detection of hepatitis C virus helicase activity using the scintillation proximity assay system. *Anal. Biochem.* 257, 120-126.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227: 680-685
- Lain, S., Martin, M., Riechmann, J., Garcia, J. (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.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.J., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Mayer, B. J., Jackson, P.K., Van Etten, R. A., Baltimore, D. (1992), Point mutations in the abl SH2 domain coordinately impair phosphotyrosine binding in vitro and transforming activity in vivo, *Mol. Cell. Biol.* 12: 609-618
- Miller, H. und Purcell, R. (1990) Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87, 2057-2061.
- Morrissey, J.H. (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* 117, 307-310.
- Neddermann, P., Tomei, L., Steinkühler, C., Gallinari, P., Tramontano, A., de Francesco, R. (1997) The nonstructural proteins of the hepatitis C virus: structure and functions. *Biol. Chem.* 378, 469-476.

- Onoda, T., Iinuma, H., Sasaki, Y., Hamada, M., Isshiki, K., Naganawa, H., Takeuchi, T., Totsuda, K., Umezawa, K. (1989) Isolation of a novel tyrosine kinase inhibitor, lavendustin A, from *Streptomyces griseolavendus*. *J. Natl Prod.* 52, 1252-1256.
- Patterson, J.L., Fernandez-Larsson, R. (1990) Molecular mechanism of action of ribavirin. *Review in Infectious Diseases* 12, 1139-1146.
- Pause, A. und Sonenberg, N. (1992) Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. *EMBO J.* 11, 2643-2654.
- Peters, M. (1989) Mechanism of action of interferons. *Semin Liver Dis.* 9, 235-239.
- Pignatelli, M., Waters, J., Brown, D., Lever, A., Iwarson, S., Schaff, Z., et al. (1986) HLA class I antigens on the hepatocyte membrane during recovery from acute hepatitis B virus infection and during interferon therapy in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology.* 6, 349-353.
- Preugschat, F., Averett, D., Clarke, B., Porter, D. (1996) A steady-state and pre-steady-state kinetic analysis of the NTPase activity associated with the hepatitis C virus NS3 helicase domain. *J. Biol. Chem.* 271, 24449-24459.
- Prince, A.M., Brotman, B., Grady, G.F., Kuhns, W.J., Hazzi, C., Levine, R.W., et al. (1974) Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *Lancet.* 2, 241-246.
- Read, A.E., Donegan, E., Lake, J., Ferrell, L., Galbraith, C., Kuramoto, I.K., et al. (1991) Hepatitis C in patients undergoing liver transplantation. *Ann Intern Med.* 114, 282-284.
- Resnick, R.H. und Koff, R. (1993) Hepatitis C-related hepatocellular carcinoma. Prevalence and significance. *Arch Intern Med.* 153, 1672-1677.
- Samuel, C.E. (1991) Antiviral actions of interferon. Interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities. *Virology.* 183, 1-11.
- Scathard, G. (1949) The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51, 660-672.
- Seeff, L.B., Buskell-Bales, Z., Wright, E.C., Durako, S.J., Alter, H.J., Iber, F.L., et al. (1992) Long-term mortality after transfusion-associated non-A, non-B hepatitis. The National Heart, Lung, and Blood Institute Study Group. *N Engl J Med.* 27, 1906-1911.
- Shad, J.A. und McHutchison, J.G. (2001) Current and future therapies of hepatitis C. *Clin. Liver Disease* 5, 335-359.
- Shakil, A.O., Conry-Cantilena, C., Alter, H.J., Hayashi, P., Kleiner, D.E., Tedeschi, V., et al. (1995) Volunteer blood donors with antibody to hepatitis C virus: clinical, biochemical, virologic, and histologic features. The Hepatitis C Study Group. *Ann Intern Med.* 123, 330-337.
- Sharom, F., Yu, X., Chu, J., Doige, C. (1995) Characterization of the ATPase activity of P-glycoprotein from multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells. *Biochem. J.* 308, 381-390.
- Shuman, S. (1992) Vaccinia virus RNA helicase: an essential enzyme related to the DE-H family of RNA-dependent NTPases. *Proc. Natl Acad. USA* 89, 10935-10939.
- Suzich, J., Tamura, J., Palmer-Hill, F., Warrener, P., Grakoui, A., Rice, C., Feinstone, S., Collett, 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.
- Tai, C.-L., Chi, W.-K., Chen, D.-S., Hwang, L.-H. (1996) The helicase activity associated with Hepatitis C virus nonstructural Protein 3 (NS3). *J. Virol.* 70, 8477-8484.

- Takamizawa, A., Mori, C., Fuke, I., Manabe, S., Murakami, S., Fujita, J., Onoshi, E., Andoh, T., Yoshida, I., Okayama, H. (1991) Structure and organization of the hepatitis C genome isolated from human carriers. *J. Virol.* 65, 1105-1113.
- Tamura, J., Warrener, P., Collett, M. (1993) RNA-stimulated NTPase activity associated with the p80 protein of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology* 193, 1-10.
- Tanji, Y., Hijikata, M., Hirowatari, Y., Shimotohno, K. (1994) Hepatitis C virus polyprotein processing kinetics and mutagenic analysis of serine proteinase-dependent cleavage. *J. Virol.* 68, 8418-8422.
- Tong, M.J., el-Farra, N.S., Reikes, A.R., Co, R.L. (1995) Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *N Engl J Med.* 332, 1463-1466.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354
- Tremolada, F., Casarin, C., Tagger, A., Ribero, M.L., Realdi, G., Alberti, A., et al. (1991) Antibody to hepatitis C virus in post-transfusion hepatitis. *Ann Intern Med.* 114, 277-281.
- Vitelli, A., Bellei, B., Neuner, P., Serafini, S., Altamura, S., De Francesco, R., Tomei, L. (1998) Nucleosides analogues with anti-viral activity on bovine viral diarrhea virus as candidate inhibitors of hepatitis C RNA-dependent RNA polymerase. *Proceedings of th 5th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses.* Venice, Italy, Abstract L14.
- Vo, N.V., Tuler, J.R., Lai, M.M. (2004) Enzymatic characterization of the full-length and C-terminally truncated hepatitis C virus RNA polymerases: function of the last 21 amino acids of the C terminus in template binding and RNA synthesis. *Biochemistry* 43, 10579-10591
- Wagner, J., Jankowsky, E., Company, M., Pyle, A., Abelson, J. (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, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., Gay, N.J. (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 J.* 1, 945-951.
- Wani, M., Taylor, L., Wall, M., Coggon, P., McPhail, A. (1971) Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of Taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* 93, 2325-2327.
- Warrener, P. und Collett, M. (1995) Pestivirus NS3 (p80) protein possesses RNA helicase activity. *J. Virol.* 69, 1720-1726.
- Warrener, P., Tamura, J.K., Collett, M. (1993) RNA-stimulated NTPase activity associated with Yellow fever virus NS3 protein expressed in bacteria. *J. Virol.* 67, 989-996.
- Weinstein, J.S., Poterucha, J.J., Rakela, J., Krom, R.A., Wiesner, R.H. (1994) Long-term outcome of hepatitis C infected liver transplant recipients [Abstract]. *Hepatology.* 20, 133A.
- Woodford, T. und Pardee, A.B. (1986) Histone H1 kinase in exponential and synchronous populations of Chinese hamster fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 261, 4669-4676.
- Wright, T.L., Donegan, E., Hsu, H.H., Ferrell, L., Lake, J.R., Kim, M., et al. (1992) Recurrent and acquired hepatitis C viral infection in liver transplant recipients. *Gastroenterology.* 103, 317-322.
- Wright, T.L., Hsu, H., Donegan, E., Feinstone, S., Greenberg, H., Read, A., et al. (1991) Hepatitis C virus not found in fulminant non-A, non-B hepatitis. *Ann Intern Med.* 115, 111-112.

Wu, Q., Bounaud, P.Y., Kuduk, S., Yang, C.P., Ojima, I., Horwitz, S., Orr, G. (1998) Identification of the domains of photoincorporation of the 30 - and 7-benzophenoneanalogues of taxol in the carboxyl- terminal half of murine mdr1b P-glycoprotein. *Biochemistry* 37, 11272-11279.

Wyatt, J.L. und Colman, R.F. (1977) Affinity labeling of rabbit muscle pyruvate kinase by 50 -p-fluorosulfonylbenzoyl adenosine. *Biochemistry* 16, 1333-1342.

Yan, H.G. und Tsai, M.D. (1991) Mechanism of adenylate kinase. Demonstration of a functional relationship between aspartate 93 and Mg<sup>2+</sup> by site-directed mutagenesis and proton, phosphorus-31, and magnesium-25 NMR. *Biochemistry* 30, 5539-5546.

Yanagi, M., Kaneko, S., Unoura, M., Murakami, S., Kobayashi, K., Sugihara, J., et al. (1991) Hepatitis C virus in fulminant hepatic failure [Letter]. *N Engl J Med.* 324, 1895-1896.

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

## **8. Danksagung**

Für die kollegiale Zusammenarbeit bedanke ich mich bei meinen Mitdoktoranden Kerstin Resch und Julian Schulze zur Wiesch sehr herzlich.

Bei Herrn Prof. Dr. Herbert Schmitz möchte ich mich für die Betreuung dieser Arbeit bedanken. Bei Herrn PD Dr. Peter Borowski möchte ich mich für die sehr ausdauernde und exzellente Anleitung der praktischen Arbeit bedanken.

Bei Prof. Dr. H.-H. Feucht und Prof. Dr. L.-H. Hwang danke ich für die Überlassung der HCV-Proteine, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## 9. Lebenslauf

### Angaben zur Person:

Name: Reinhard Kühl  
Geburtstag und -ort: 15.9.1972 in Hamburg  
Familienstand: verheiratet, eine Tochter, ein Sohn

### Beschäftigungsverhältnisse:

April 2000 bis September 2001 Arzt im Praktikum am Altonaer Kinderkrankenhaus, Hamburg  
November 2001 bis Dezember 2005 Arzt am Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin des Klinikums der Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald  
Seit Januar 2006 Arzt an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Diakonissenanstalt Flensburg

### Schulbildung:

August 1978 bis Juli 1982 Grundschule Sonnenweg in Hamburg  
August 1982 bis Juni 1991 Besuch des altsprachlichen Zweiges des Matthias-Claudius-Gymnasiums in Hamburg  
Juni 1991 Abitur

### Zivildienst:

August 1991 bis Oktober 1992 Mithilfe in der Pflege auf einer Station für Klein- und Schulkinder des Kinderkrankenhauses Wilhelmstift

### Berufsausbildung:

Oktober 1992 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Hamburg  
Oktober 1994 Ärztliche Vorprüfung  
August 1995 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
März 1998 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
Oktober 1998 bis September 1999 Praktisches Jahr: Chirurgie mit Anteil Kinderchirurgie, Johannesburg General Hospital, Südafrika; Pädiatrie, Altonaer Kinderkrankenhaus; Innere Medizin, Allgemeines Krankenhaus Altona  
Dezember 1999 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
November 2007 Annerkennung als Facharzt für Kinder- und Jugendmedizin

## **10. Veröffentlichungen**

Im Rahmen der Dissertation entstandene Veröffentlichungen:

Kühl, R., Schulze zur Wiesch, J., Feucht, H-H., Laufs, R., Hwang, L-H., Borowski, P. (1998) Die ATP-bindende Domäne des Nicht-Strukturproteins 3 des Hepatitis C Virus als potentieller Angriffspunkt antiviraler Substanzen. Poster, Kongress der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie und der Deutschen Gesellschaft für Infektologie, Berlin

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

Borowski, P., Roloff, S., Medem, S., Kühl, R., Laufs, R. (1999) Protein kinase C- $\alpha$  produces reciprocal effects on phorbol ester stimulated tyrosine phosphorylation of a 50 kDa kinase in Jurkat cells. *Biological Chemistry* 380, 403-412

Kühl, R., Schulze zur Wiesch, J., Laufs, R., Heiland, M., Borowski, P. (1999) A new biological activity of NS3 of HCV. Poster, 9<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Berlin, *Clinical Microbiology and Infection* 5, Suppl. 3

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

### **EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel 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.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Reinhard Kühl