Aus dem



BERNHARD-NOCHT-INSTITUT FÜR TROPENMEDIZIN

Abteilung Virologie

Direktor: Prof. Dr. Bernhard Fleischer

Halogenierte Benzimidazole und Benzotriazole als Hemmstoffe der NTPase/Helikase von Hepatitis C und verwandten Viren

Dissertation

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

> Johanna P. G. Buchenau aus Winsen/Luhe

> > Hamburg, 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 17, 02, 2005

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzende:

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

Prof Dr. H. Schmits PD Dr. E. Fischer Prof Dr. St. Guncher

"Quand tu veux construire un bateau, ne commence pas par rassembler du bois, couper des planches et distribuer du travail, mais reveille au sein des hommes le desir de la mer grande et large."

Antoine de Saint-Exupéry

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis III
Tabellen und Abbildungen
1. Arbeitshypothese und Fragestellung1
1.1. Arbeitshypothese1
1.2. Fragestellung1
2. Einleitung2
2.1. Historischer Kontext2
2.2. Das Hepatitis C Virus2
2.2.1. Der Replikationszyklus des HCV
2.2.2. Struktur des Polyproteins der <i>Flaviviridae</i> 4
2.2.3. Die NTPase/Helikase5
2.3. Benzimidazole und Benzotriazole
3. Material und Methoden10
3.1. Material10
3.2. Methoden10
3.2.1. Bakterienexpression und Reinigung von HCV-, JEV- und Suv3(Δ1-159)- NTPase/Helikasen10
3.2.2. Zellkultur und Reinigung von WNV-NTPase/Helikase11
3.2.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung12
3.2.4. Tris-Borat-EDTA(TBE)-Polyacrylamidgel13
3.2.5. Oligomarkierung und Herstellung des NTPase/Helikase-Substrates13
3.2.6. Helikase-Assay

3.2.7. ATPase-Assay	15
3.2.8. Vorinkubation von Compounds mit Enzym auf Entwindungs- und Hydrolysewirksamkeit	15
4. Ergebnisse	16
4.1. Inhibitoren der HCV-NTPase/Helikase	17
4.2. Unterschiede in der IC ₅₀	18
4.2.1 Unter den NTPase/Helikasen	18
4.2.2 Durch unterschiedliche Substrate	18
4.2.3 Durch Vorinkubation	19
4.3. Wirkung der Verbindungen auf die ATPase-Aktivität	19
4.4. Vergleich mit anderen, durch die Inhibitoren hemmbaren Enzymen	20
5. Diskussion	20
5.1. Inhibitoren der HCV-NTPase/Helikase	21
5.2. Unterschiede in der IC_{50}	22
5.2.1 Unter den NTPase/Helikasen	22
5.2.2 Durch unterschiedliche Substrate	22
5.2.3 Durch Vorinkubation	23
5.3. Wirkung der Verbindungen auf die ATPase-Aktivität	23
5.4. Vergleich mit anderen, durch die Inhibitoren hemmbaren Enzymen	24
6. Zusammenfassung	27
Anhang	i
Literaturverzeichnis	i
Abkürzungsverzeichnis	viii

Aminosäurentabelle	X
Reaktionsansätze	
Lebenslauf	
Danksagung	xiii
Erklärung	xiv

TABELLEN UND ABBILDUNGEN

Tabellen

Tab. 1. Hemmung der Helikase-Aktivität von HCV-, WNV-, JEV- und Suv3(Δ1-159)- Enzymen durch Benzimidazole und Benzotriazole, unter Verwendung eines DNA-Substrats	16
Tab. 2. Hemmung der Helikase-Aktivität von HCV-, WNV-, JEV- und Suv3(Δ1-159)-	
Enzymen durch Benzimidazole und Benzotriazole, unter der Verwendung eines RNA-Substrats	17
8	

Abbildungen

Abb. 1. Vollständiger viraler Lebenszyklus des Hepatitis C Virus nach Zeisel et al. [8]	3
Abb. 2. Vereinfachte Darstellung der Struktur des Polyproteins der <i>Flaviviridae</i> , das die NS3-Region enthält [19]	.4
Abb. 3: Banddiagramm der HCV-RNA-NTPase/Helikase-Domänen und der Motive I-VI [33]	6
Abb. 4. Schematische Darstellung des Mechanismus der NTPase/Helikase-Aktivität nach Kim [31]	7
Abb. 5. Struktur des Adenosintriphosphat (ATP)	8
Abb. 6. Strukturen der Benzimidazol- und Benzotriazol-Derivate	9
Abb. 7. SDS-PAGE Analyse der verwendeten NTPase/Helikasen in dieser Studie	12
Abb. 8. Autoradigramm eines Helikase-Assays, das die Hemmung von gereinigter WNV- NTPase/Helikase mit einem RNA-Substrat durch DRBT demonstriert	14
Abb. 9. Hemmung der Helikaseaktivität gereinigter HCV- NTPase/Helikase mit DNA-Substrat1	17
Abb. 10. Wirkung der Vorinkubation mit verschiedenen Zeitperioden der HCV- NTPase/Helikase mit DRBT mit einem DNA-Substrat1	19
Abb.11. Hemmung der ATPase-Aktivität gereinigter HCV- NTPase/Helikase mit DNA-Substrat2	20
Abb. 12. Vergleich der ATP-Bindung der HCV-NS3-NTPase/Helikase und Proteinkinase CK2 [74]	25

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

1.1. Arbeitshypothese

Es sollen die Hemmeigenschaften von sechs halogenierten Benzimidazolund Benzotriazol-Derivaten die auf Entwindungs-Reaktion von Nukleosidtriphosphatase(NTPase)/Helikasen untersucht werden. Benzimidazole und Benzotriazole sind Aromaten, die wie die Purin-Basen, als kondensierte Fünfringe vorliegen. Sie haben basische Eigenschaften und können, durch Verbindung mit Pentose, Bestandteile von Nucleosiden sein. Diese Moleküle ähneln in ihrer Struktur und in ihren chemischen Eigenschaften den Purin-Bestandteilen der Nucleotidtriphosphate Adenosintriphosphat (ATP) und Guanosintriphosphat (GTP).

Es wurden drei virale Enzyme der Superfamilie 2 (SF2) der NTPase/Helikasen, des Hepatitis C Virus (HCV), des West Nil Virus (WNV), des Japanischen Enzephalitis Virus (JEV), und ein menschliches Enzym, die mitochondriale NTPase/Helikase Suv3 (Δ 1 -159), die der SF1 angehört, ausgewählt.

Anschließend sollen die Eigenschaften der Verbindungen auf die bisherigen Forschungsergebnisse zur Nucleotidbindung an NTPase/Helikasen bezogen werden und eine Aussage über eine mögliche Bindung an eine vermutete allosterische, bisher nicht identifizierte, zweite nucleotidbindende Stelle der NTPase/Helikasen getroffen werden. Dazu sollen ergänzende kinetische Studien mit eventuellen Inhibitoren zum Vergleich von ATP bindenden Stellen veranlasst werden.

1.2. Fragestellung

- 1. Wird die HCV-NTPase/Helikase gehemmt?
- 2. Gibt es Unterschiede der Inhibitorkonzentration, bei der eine halbmaximale Hemmung des Enzyms stattfindet (IC_{50}):
- 2.1. unter den Enzymen?
- 2.2. durch den Einsatz von RNA- oder DNA-Substrat?
- 2.3. durch Vorinkubation mit dem Enzym oder dem Substrat?
- 3. Hat der Inhibitor Einfluss auf die ATPase-Aktivität der NTPase/Helikasen?

4. Lassen sich durch Vergleich mit anderen Enzymen, die zuvor durch die Compounds gehemmt werden konnten, Rückschlüsse auf Struktur und Funktionsweise der NTPase/Helikasen ziehen?

2. EINLEITUNG

2.1. Historischer Kontext

Das Hepatitis C Virus wurde 1989 als häufigster Erreger der posttransfusionellen und sporadischen non-A-non-B Hepatitis identifiziert [1,2]. Die HCV Infektion führt zu akuter oder in 85% zu chronischer Hepatitis und kann zu Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom führen [3-5]. Sie betrifft nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) gegenwärtig mehr als 3% der Weltbevölkerung, etwa 170 Millionen Menschen sind chronisch infiziert und drei bis vier Millionen infizieren sich jährlich neu. Europaweit dürften nach Schätzungen zwei bis fünf Millionen HCV-infizierte Menschen leben. In Deutschland sind nach Untersuchungen des Bundes-Gesundheits-Surveys etwa 0,4% der Bevölkerung infiziert, die Prävalenz beträgt 800.000 und die jährliche Inzidenz 5.000. Schon heute stellt die dekompensierte Leberzirrhose als Folge einer chronischen HCV-Infektion eine der häufigsten Indikationen zur Lebertransplantation dar. Die Inzidenz von Neuinfektionen konnte durch Einführung des Anti-HCV-Screenings von Blut und Blutprodukten reduziert werden. Momentan existieren jedoch weder eine Impfung noch eine suffiziente Therapie. Innerhalb der nächsten 20 bis 30 Jahre ist mit einem Anstieg der Patienten mit Spätfolgen der Infektion zu rechnen. Zudem nimmt die Rate der Reinfektionen nach Transplantation zu.

2.2. Das Hepatitis C Virus

Das HCV ist der einzige Vertreter des Genus *Hepacivirus* der Familie der *Flaviviridae*. Heute lassen sich 6 Genotypen und mehrere Subtypen unterscheiden. Die genetische Organisation und Polyproteinprozessierung konnte weitestgehend geklärt werden, erst kürzlich gelang die Anzucht des Virus in der Zellkultur [6,7,8].

Die Entwicklung eines rekombinanten Impfstoffs ist aufgrund der hohen genetischen Variabilität des Virus erschwert. Trotz großer Anstrengungen ist bisher noch kein aussichtsreicher Vakzinekandidat in klinischen Prüfungen. Die aktuelle Therapie ist in den letzten Jahren stetig verbessert worden, ist aber dennoch nur mäßig wirksam und unterliegt Einschränkungen. Sie basiert auf der Verwendung von α -Interferon allein oder in Kombination mit dem antiviralen Wirkstoff Ribavirin [3,9,10,11]. Das Breitspektrum-Virostatikum Ribavirin wirkt als ein RNA-Virus Mutagen [12]. Überraschenderweise waren Versuche, weitere wirksame Anti-HCV-Wirkstoffe zu entwickeln, bisher begrenzt. Zur Zeit

befinden sich weiterentwickelte Interferone, ribavirinalternative Wirkstoffe, Immunmodulatoren, Antifibrotika und Inhibitoren viraler Enzyme in klinischen Studien. Die Ziele der Enzyminhibitoren sind vornehmlich die Serin-Protease und die Polymerase des HCV. Das HCV Genom kodiert ein Polyprotein, das anschließend in 10 Struktur- und Nicht-Struktur-Proteine (NS) gespalten wird. Eines von diesen ist das so genannte NS3. Es besitzt an seinem N-Terminus eine Serin-Protease und an seinem C-Terminus eine Helikase und eine NTPase [11,13]. Die Helikase des NS3 spielt eine Schlüsselrolle in der Virusreplikation. Sie scheint ein selten attraktives Ziel für die Behinderung der Virusreplikation zu sein [14,15].

2.2.1. Der Replikationszyklus des HCV

Abb. 1. Vollständiger viraler Lebenszyklus des Hepatitis C Virus nach Zeisel et al. [8]



Nach der Bindung an den Zielzellrezeptor durchdringt das Virus die Zellmembran und die Plus-Strang RNA gelangt aus dem Nucleokapsid in das Zytoplasma [16]. Die RNA dient einerseits als mRNA für die Translation und andererseits als Matrize für mehrere Minus-Strang RNAs. Nach der Translation in ein Polyprotein erfolgt die Prozessierung in die Strukturproteine (Core(C), Envelope1 (E1), E2, P7) und Nichtstrukturproteine (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) [17,18]. Die Replikation wird durch einen zytoplasmatischen membranassoziierten Replikase-Komplex, der aus mindestens zwei viralen Proteinen besteht, erreicht: NS3 mit der NTPase/Helikase und NS5B mit der RNA abhängigen RNA Polymerase. Die Minus-Strang RNAs werden in Plus-Strang RNAs transkribiert und mit viralen Strukturproteinen zum Nucleokapsid zusammengesetzt [7,8].

2.2.2. Struktur des Polyproteins der Flaviviridae



Abb. 2. Vereinfachte Darstellung der Struktur des Polyproteins der *Flaviviridae*, das die NS3-Region enthält [19].

Die enzymatischen Aktivitäten, die mit den Nicht-Struktur-Proteinen assoziiert sind, sind hervorgehoben. Die Pfeile deuten auf die Position der hochkonservierten Motive (Walker-Motiv A und B) im NTPase/Helikase-Molekül.

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

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

c. NS1 wird nur bei den Flaviviridae codiert.

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

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

f. Diese Funktion wird dem Hepacivirus zugeschrieben.

Das virale Genom kodiert ein Polyprotein aus ungefähr 3010 Aminosäuren [17,20], das nach Translation durch zelluläre, im Lumen des endoplasmatischen Retikulums lokalisierte, und zwei viralen Proteasen in mindestens zehn verschiedene virale Proteine prozessiert wird (Abb. 2.) [21,22]. Es werden mehrere Strukturproteine und Nichtstrukturproteine mit essentieller enzymatischer Aktivität für die virale Replikation gebildet [17,18]. Sowohl am 5´ als auch am 3´ Terminus ist das Genom, das einen offenen Leserahmen bildet, von einer unübersetzten Region begrenzt.

2.2.3. Die NTPase/Helikase

NTPase/Helikasen sind Nucleotidtriphosphat(NTP)-abhängige ubiquitäre Enzyme, mit der Fähigkeit während der genomischen Replikation Doppelstrang DNA- oder RNA-Strukturen enzymatisch zu entwinden [23, 24]. Mutationen in verschiedenen humanen NTPase/Helikase-Genen sind bisher mit sechs bekannten Erberkrankungen assoziiert: Werner-Syndrom, Bloom-Syndrom, Xeroderma pigmentosa, Trichothiodystrophie, Cockayne-Syndrom und mit der α-Thalassämie bedingten, X-chromosomal assoziierten, geistigen Retardierung [25]. Über 80% aller Plus-Strang RNA-Viren, deren Genom sequenziert wurde, codieren zumindest eine potentielle NTPase/Helikase.

Die HCV-NTPase/Helikase ist aus drei nahezu gleich großen Domänen aufgebaut. Die erste und zweite Domäne besitzt eine weitgehend ähnliche $\beta\alpha\beta$ -Konformation, während Domäne 3 aus α -Helices besteht. Die erste und dritte Domäne sind eng gepackt und von Domäne 2 durch eine tiefe Spalte getrennt. In Kristallstrukturvergleichen zweier NTPase/Helikasen wurde festgestellt, dass die Domäne 2 gegenüber Domäne 1 und 3 verschieblich gelagert ist [26].

Computergestützte Sequenzanalysen von bekannten und vermeintlichen NTPase/Helikasen haben zu ihrer Klassifizierung geführt. Sie sind in die drei Superfamilien (SF1, SF2 und SF3) und in eine kleinere Gruppe, Familie 4 genannt, eingeteilt [23,27,28]. Alle vier enthalten die Walker-A- und -B-Box Sequenzen (Abb. 3.). Von diesen Sequenzen ist bekannt, dass sie eine Rolle bei der NTP-Bindung und - Hydrolyse spielen [29]. Kristallstrukturanalysen der SF1 DNA-NTPase/Helikasen von *Escherichia coli* und *Bazillus stearothermophilus* und der SF2 HCV-RNA-NTPase/Helikase haben die Funktionen dieser konservierten Motive bestätigt [26,30,31,32].





Alle SF2 NTPase/Helikasen enthalten sieben hoch konservierte Aminosäuresequenzen (Motiv I-VII) [23,24], die auf der Oberfläche der Domänen 1 und 2 exprimiert sind [26,34]. Motiv I und II, auch als Walker-Motiv-A und -B bezeichnet [29], sind sowohl in allen NTPase/Helikasen vorhanden, als auch in einem weiten Spektrum anderer NTP-bindender Proteine [35]

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

1. Das NTPase/Helikase-Molekül bindet an einzelsträngige Regionen des Substrates und wirkt nicht aktiv an der Trennung doppelsträngiger DNA- oder RNA-Strukturen mit. Damit ist die aus der NTP-Hydrolyse der NTPase/Helikase gewonnene Energie für die Entwindungsreaktion nicht zwingend notwendig [26,36,37].

2. Ein zweiter "aktiver" Mechanismus fordert mindestens zwei Nukleinsäure-Bindungsstellen und die ATP-Abhängigkeit der Entwindungsreaktion [26,37]. Hier wird durch NTP eine Konformationsänderung des Moleküls erreicht und so die Bindung von DNA- oder RNA-Substrat an die entsprechende Bindungsstellen erleichtert (Abb. 4.) [26].





Die Bindung des Polynucleotids durch die HCV-NTPase/Helikase bildet einen breiten Spalt zwischen Domäne 1 und 2. Die Bindung von ATP geschieht über den β -Phosphat-Rest von ATP an Motiv I (GSGKT) und über die Bindung des γ -Phosphats mit dem gebundenen Mg²⁺ an die konservierten aziden Reste von Motiv II (DECH). Dies führt zum Schluss des Spaltes zwischen den beiden Domänen und zur Bindung von konservierten Argininen in Motiv VI (QRRGRTGR) an die ATP-Phosphate. Der Schluss der beiden Domänen führt zur Translokation des Einzelstrangs in 5'-3' Richtung. Die Hydrolyse von ATP führt wiederum zur Öffnung des Spaltes und zur Freisetzung von ADP.

Die Blockierung der katalytischen NTP-bindenden Stelle führt zur Hemmung der NTPase [38]. Bindungsstudien haben zwei nucleotidbindende Stellen der HCV-NTPase/Helikase gezeigt [39]. Die Lokalisation und die Funktion der zweiten Stelle sind bisher unbekannt. Es wird jedoch mehr und mehr gezeigt, dass die NTPase- und Helikase-Aktivität der SF2 Enzyme durch die Besetzung dieser vermuteten nucleotidbindenden Stelle moduliert werden könnten. Ribavirin-5'-triphosphat ist ein potenter klassischer kompetetiver Inhibitor der NTPase-Aktivität des West Nil Virus- (WNV) und der HCV-NTPase/Helikase bei niedrigen ATP Konzentrationen ($< K_m$). Es war nicht in der Lage, die ATPase-Aktivität bei hohen ATP Konzentrationen ($> K_m$) zu hemmen. Im Gegenteil, es stimulierte sogar die Enzymaktivität. Ribavirin-5'-triphosphat hemmt die Helikase-Aktivität beider Enzyme mäßig. Dies geschieht durch einen Mechanismus, der von der ATP-Konzentration unabhängig ist [40,41,42]. Am wahrscheinlichsten ist dies durch die Bindung an die zweite allosterische nucleotidbindende Stelle zu erklären.

2.3. Benzimidazole und Benzotriazole

Mehrere Versuche, HCV-NTPase/Helikase-Inhibitoren zu entwickeln, sind beschrieben worden. Zuvor wurde lediglich in Patenten von zwei Serien solcher Substanzen berichtet [43,44]. Sie sind aus zwei Benzimidazolen oder Aminophenyl-Benzimidazolen zusammengesetzt. Verbunden werden diese durch symmetrische Linker von variabler Länge. Es wurde berichtet, dass sich die IC₅₀-Werte dieser Verbindungen für die Hemmung der HCV-Helikase-Aktivität im niedrig mikromolaren Bereich befinden. Anschließend wurde dies in einer Structure-Activity-Relationship Studie bestätigt und erweitert [45]. Ein wenig weniger wirksam sind mehrere, wieder nur in Patenten beschriebene, Aminothiadiazoline [46].

Abb. 5. Struktur des Adenosintriphosphat (ATP)



Benzimidazole und Benzotriazole sind Aromaten, die wie die Purin-Basen als kondensierte Fünfringe vorliegen. Sie haben basische Eigenschaften und können, durch Verbindung mit

Pentose, Bestandteile von Nucleosiden sein. Diese Moleküle ähneln in ihrer Struktur und in ihren chemischen Eigenschaften den Purin-Bestandteilen der Nucleotidtriphosphate ATP (Abb. 5.) und GTP. Die Strukturen der sechs hier verwendeten, zum Teil halogenierten und zum Teil als Nucleosid vorliegenden Benzimidazole und Benzotriazole sind in Abb. 6. dargestellt.

Abb. 6. Strukturen der Benzimidazol- und Benzotriazol-Derivate.



 α -DMRB – 5,6-Dimethyl-1- α -D-Ribofuranosylbenzimidazol

 $TCBT-4,\!5,\!6,\!7\text{-}Tetrachlorobenzotrialzol$

TBBT – 4,5,6,7-Tetrabromobenzotrialzol

TBBT ist ein spezifischer ATP-kompetetiver Hemmstoff der Proteinkinase Caseinkinase 2 (CK2). Er wurde ursprünglich entwickelt, um zwischen den Proteinkinasen CK1 und CK2 zu unterscheiden [47]. Anschließend konnte gezeigt werden, dass er unter mehr als 30 Serin/Threonin- und Tyrosin Proteinkinasen eine hohe Selektivität für die CK2 zeigt [48]. In der Kristallstruktur des Komplexes der katalytischen Untereinheit der CK2 mit TBBT befindet sich TBBT im aktiven Standort der CK2 [49]. Normalerweise wird dieser vom Purin-Teil der natürlichen Substrate ATP und GTP eingenommen.

Eine Überprüfung der Hemmeigenschaften von TBBT und ähnlichen Benzimidazolen und Benzotriazolen erscheint also vor dem Hintergrund der Identifizierung und Charakterisierung einer zweiten vermuteten nucleotidbindenden Stelle als sinnvoll. Hiermit könnte zum weiteren Verständnis der Funktion der NTPase/Helikase und damit der möglichen Entwicklung von antiviralen Medikamenten beigetragen werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

Die DNA-Oligonucleotide wurden von M. Schreiber (Bernhard-Nocht Institut, Hamburg, Deutschland) vorbereitet. Die RNA-Oligonucleotide wurden bei HHMI Biopolymer/Keck Foundation, Biotechnology Resource Laboratory, Yale University School of Medicine (New Haven, CT, USA) gekauft. [γ -³²P]ATP (220 TBq/mM) und [γ -³³P]ATP (110 TBq/mM) wurden von Hartman Analytic bezogen. Alle anderen Chemikalien wurden bei Sigma gekauft.

Die halogenierten Benzimidazol- und Benzotriazol-Nucleoside wurden von D. Shugar und seiner Arbeitsgruppe wie zuvor beschrieben synthetisiert [47,50]. TBBT wurde durch Modifizierung des von Wiley et al. beschriebenen Bromierungs-Verfahrens synthetisiert [51]. TCBT wurde durch Chlorieren der Benzotriazole synthetisiert, entsprechend dem modifizierten Verfahren von Wiley et al. [51].

Das nichthalogenierten α -DMRB, ein Schlüsselbestandteil des Vitamins B₁₂, wurde freundlicherweise von D. Vikic-Topic (Ruder Boskovic Institute, Zagreb, Kroatien) zur Verfügung gestellt.

3.2. Methoden

3.2.1. Bakterienexpression und Reinigung von HCV-, JEV- und Suv3(Δ 1-159)-NTPase/Helikasen

Die NTPase/Helikase-Domäne des HCV NS3, die JEV-NTPase/Helikase und die Suv3(Δ 1-159)-NTPase/Helikase wurden in *E. coli* exprimiert und wie zuvor beschrieben gereinigt [52,53,54]. Die Expression in *E. coli* wurde durch die Zugabe von Isopropylthioβ-D-Galaktosid (IPTG) in einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Nach einer Inkubation von 3 h bei 37°C wurden die Bakterien durch Zentrifugation (5000 G für 1 h bei 4°C) geerntet.

Die geernteten Bakterien wurden in Lysis-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 7,5; 20% Glycerol; 0,1% Triton X-100; 200 mM NaCl; 1 mM β -Mercaptoethanol; 2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid; 10 mM Imidazol) aufgenommen und durch Sonication aufgeschlossen. Unlösliches Material wurde bei 26.000 G abzentrifugiert, der Überstand mit 3 ml einer mit nickelbeladenen Matrix (Qiagen) gemischt, mit gleicher Menge Basis-Puffer

versetzt (20 mM Tris/HCl *p*H 7,5; 10% Glycerol; 0,05% Triton X-100; 1 mM β-Mercaptoethanol) und für 12 h bei 21° C inkubiert. Die Matrix wurde auf eine Hydroxyapatit-Säule (HA-Ultrogel) übertragen und ungebundene Proteine mit Wasch-Puffer (Basis-Puffer; 200 mM NaCl; 20 mM Imidazol) herausgespült. Das gebundene Protein wurde mit Elutions-Puffer (Basis-Puffer; 200 mM NaCl; 0,5 M Imidazol) von der Matrix gewaschen. Mit Hilfe einer mit Coomassie-Blau gefärbten Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) konnte die Reinheit des auf diese Weise erhaltenen Proteins geprüft werden. Sie lag zwischen 65 und 70%. Durch anschließende Ultrafiltration auf einer 30-kDa-Membran wurde das Enzym konzentriert. Der Überstand wurde mit TGT-Puffer (20 mM Tris/HCl *p*H 7,5; 10 % Glycerol; 0,05% Triton X-100; 1 mM EDTA; 1 mM β-Mercaptoethanol) versetzt und auf einer Superdex-200 Säule (Hi-Load 16/60kX; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) fraktioniert. Die Fraktionen, die die meisten ATPase- und Helikase-Aktivitäten enthielten (> 80%), wurden vermischt und zur Untersuchung der Enzymeigenschaften verwendet.

3.2.2. Zellkultur und Reinigung von WNV-NTPase/Helikase

Vero-E6-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium gezüchtet. Dem Medium wurden 10%-iges fetales Kälberserum (Gibco/BRL, Eggenstein), 100µg/ml Ampicillin und 60µg/ml Gentamicin zugesetzt. In der logarithmischen Wachstumsphase wurden die Zellen mit dem ATCC-Stamm VR-82 des West Nil Virus infiziert [55]. Am fünften Tag nach der Infektion wurde das Zellkulturmedium gewonnen, welches dann für die Aufreinigung der WNV-NTPase/Helikase verwendet wurde.

Die Aufreinigung der WNV-NTPase/Helikase wurde aus dem Zellkulturmedium von WNV-infizierten Vero-E6-Zellen durchgeführt [41]. Nach der Äquilibrierung des konzentrierten Zellkulturmediums über 4 h bei 4°C mit 10ml Reactive Red 120 Agarose (Sigma) wurde es mit TGT-Puffer vermischt. Nach Sedimentation der Matrix wurde diese in eine Chromatographiesäule transferiert und mit TGT-Puffer gewaschen. In diesem Puffer konnte das an die Matrix gebundene Protein mit 1M KCl eluiert werden. Nach Ultrafiltration auf einer 30-kDa-Membran betrug das konzentrierte Endvolumen 2ml. Mit dem so gewonnenen Material wurde im Anschluss eine Gel-Ausschluss-Chromatographie auf einer Superdex-200-Säule (Hi-Load 16/60kX; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Die Fraktionen, in denen das Protein, das ATPase- bzw. Helikase-Aktivität besaß, vorhanden war, wurden erneut einer Chromatographie mit 5ml Reactive Red 120 Agarose, wie oben beschrieben, unterzogen. Das Protein konnte durch

Salzgradienten eluiert, danach mit 30% igem Polyethylenglycol(PEG) präzipitiert, anschließend zentrifugiert und schließlich in TGT-Puffer in Lösung gebracht werden. Das so gelöste Protein wurde auf eine Hydroxyapatit-Säule (HA-Ultrogel) aufgebracht, die mit TGT-Puffer voräquilibriert war. Anschließend erfolgten drei Waschgänge, der erste mit 10ml TGT-Puffer, der zweite mit 2ml TGT-Puffer der 1M KCL enthielt und der dritte mit 5ml TGT-Puffer.

Die NTPase/Helikase wurde mit 1 ml TGT-Puffer, der 50 mM KH₂PO₄ enthielt eluiert, mit PEG ausgefällt und in TGT Puffer aufgelöst. Die Analyse der letzten Enzympräparation durch Coomassie-Blau gefärbte SDS-PAGE zeigte zwei Proteine mit Molekülmassen von 66 und 60 kDa. Eine N-terminale Sequenzierung erlaubte die Identifizierung dieser Proteine als BSA und WNV NTPase/Helikase (Abb. 7., Spalte 2) [41]. Die Proteinkonzentrationen der Präparationen der NTPase/Helikasen wurden, wie von Hames und Rickwood beschrieben durch SDS-PAGE bestimmt [56]. Kinetische Parameter wurden über nichtlineare Regressionsanalyse mit Hilfe des ENZFITTER (BioSoft) und SIGMAPLOT (Jandel Corp.) bestimmt.

3.2.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung



Abb. 7. SDS-PAGE Analyse der verwendeten NTPase/Helikasen in dieser Studie.

Aliquots der letzten Präparation der HCV- (1,2 μ g Protein, Spalte 1), WNV- (5,5 μ g Protein, Spalte 2), JEV-(1,5 μ g Protein, Spalte 3) und Suv3(Δ 1-159)-NTPase/Helikase (1,0 μ g Protein, Spalte 4) wurden mittels SDS-PAGE getrennt und anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt. Molekül-Massen-Marker sind auf der linken Seite angezeigt. Die Pfeile zeigen die Standorte der NTPase/Helikasen an.

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde gemäß Laemmli ausgeführt [57]. Die Konzentration des Sammelgels, welches die obere Phase bildete, lag bei 7,5% Acrylamid. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels variierte zwischen 10% bis 20% Acrylamid. Die Sammelgele waren mit "Upper" Puffer (125 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,1% SDS) und die Trenngele mit "Lower" Puffer (400 mM Tris/HCl pH 8.8; 0,1% SDS) gepuffert. Die Elektrophoresen wurden in einer Mini-Protean-Kammer (Bio-Rad, München) ausgeführt.

Die Bedingungen waren konstant 200 V in SDS-PAGE Lauf-Puffer (190 mM Glycerin; 25 mM Tris/HCl *p*H 6,8; 0,1% SDS). Zur weiteren Verwendung wurden die Gele Coomassie-Blau gefärbt. Die Trenngele wurden mit Färber (10% Essigsäure; 30% Ethanol; 0,1% Coomassie-Blau) bei 60°C im Wasserbad für 30 Min. gefärbt und fixiert. Entfärbt wurden die Gele in Entfärber (10% Essigsäure; 30% Ethanol) im Wasserbad.

3.2.4. Tris-Borat-EDTA(TBE)-Polyacrylamidgel

Native TBE-Polyacrylamidgele wurden in einer Konzentrationen von 15% Acrylamid hergestellt. Die einphasigen Gele enthielten TBE (90 mM Tris-Borat; 20 mM EDTA *p*H 8,0; 0,1% SDS) [41]. Die Polyacrylamidgele wurden sowohl in einer Mini-Protean-Kammer (Bio-Rad) als auch in einer Pegasus-Kammer elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde TBE verwendet. Die Elektrophoresebedingungen waren konstant 90 V für 4 h (Bio-Rad), beziehungsweise 6 h (Pegasus), bei 23°C.

3.2.5. Oligomarkierung und Herstellung des NTPase/Helikase-Substrates

Indem zwei partiell komplementäre DNA-Oligonucleotide hybridisiert wurden, konnte das Substrat für das Helikase-Assay hergestellt werden. Diese Oligonucleotide wurden anhand der Desoxynucleotid-Version der beschriebenen RNA-Stränge synthetisiert [58]. Der "release strand" (26-mer) mit der Sequenz 5'-CAAACTCTCTCTCTCTCAACAAAAA-3' wurde am 5'-Ende mittels einer T4-Polynukleotidkinase (MBI, Fermentas, Vilnius, Litauen) mit [y-32P]-ATP nach dem vom Hersteller empfohlenen Verfahren markiert. Für die Verschmelzungsreaktion wurde das markierte Oligonucleotid in einem molaren Verhältnis strand" 5'-1:10 mit dem "template (40-mer) mit der Sequenz von

Das radioaktiv zu markierende Oligonucleotid wurde für 5 Min. bei 95°C denaturiert. Für die Reaktion wurden jeweils 5 pM Oligonucleotid verwendet und in den Reaktionsansatz (50 mM Tris/HCl *p*H 6,8; 10 mM MgCl₂; 5 mM DTT; 20 U Polynukleotidkinase T4; 10,2 pM $[\gamma^{-32}P]$ ATP (0,03 Ci) ad 50 ml Aqua dest.) überführt. Nach Inkubation für 1 h bei 30°C wurde die Reaktion durch Hybridisierung mit dem Komplementärstrang abgestoppt. Hierfür wurde der markierte DNA-Strang mit dem unmarkierten Komplementärstrang in einem 1:3 Verhältnis auf 80°C erhitzt und in 4 h langsam renaturiert.

Die auf diese Weise hergestellte Duplex-DNA wurde einer Elektrophorese in einem nativen 15%igen TBE-Polyacrylamidgel unterzogen und für 25 Min. bei 23°C

autoradiographiert. Die DNA-Hybride wurden aus dem Gel geschnitten und in Aqua dest. eluiert. Die Menge an dsDNS oder dsRNA, die als Substrat für die NTPase/Helikasen verwendet wurde, wurde durch die Ethidiumbromid-Fluoreszenz-Quantifikationsmethode bestimmt [59].

3.2.6. Helikase-Assay

Abb. 8. Autoradigramm eines Helikase-Assays, das die Hemmung von gereinigter WNV-NTPase/Helikase mit einem RNA-Substrat durch DRBT demonstriert.



Die Helikase-Aktivität der vier geprüften NTPase/Helikasen wurde mittels der oben beschriebenen, teilweise hybridisierten, DNA- oder RNA-Substrate ermittelt (4,7 pM Nucleotidbasen). Eine spezifische Menge des jeweiligen Enzyms wurde mit einer der K_m in der ATPase-Reaktion entsprechenden Konzentration von ATP versetzt (0,5 pM HCV mit 105 μ M ATP; 2 pM WNV mit 9,5 μ M ATP; 4 pM JEV mit 235 μ M ATP; 0,2 pM Suv3(Δ 1-159) mit 4,2 μ M ATP). Der Standardreaktionsansatz besaß, unter dem Zusatz von 20 mM Tris/HCl ρ H 7,5, 1 mM β -Mercaptoethanol, 10% Glycerol, 0,01% Triton X-100, 2 mM MgCl₂, 0,1 mg/ml BSA, im Endvolumen 25 μ l. Der Reaktionsansatz wurde 30 Min. bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde mittels 5 μ l Stopp-Puffer beendet (100 μ M Tris/HCl ρ H 7,5; 20 mM EDTA; 0,5% SDS; 0,1% Triton X-100; 25% Glycerol; 0,1% Bromophenolblau). In einem 15% igem TBE-Polyacrylamidgel wurden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt [41]. Nach Trocknung der Gele wurden diese bei -70°C auf Kodak- Autoradiogramm-Filmen (BioMax-MR1) für 12-14 h exprimiert (Abb. 8.). Die Banden im Gel, die dem abgespaltenen Nucleotid-Strang und dem nicht-entwundenen Substrat entsprachen, wurden ausgeschnitten und die [γ -³²P]-Radioaktivität gemessen. Die

freien Einzelstränge und die Doppelstränge wurden mittels der GELIMAGE Software (Amersham Pharmacia Biotech) quantifiziert.

3.2.7. ATPase-Assay

Ein Standard-ATPase-Assay wurde für 30 Min. bei 30°C durchgeführt [38,40,41]. Die Prüfung wurde analog zum Helikase-Assay mit 0,5 pM HCV-, 2 pM WNV-, 4 pM JEVoder 0,2 pM Suv3(Δ 1-159)-NTPase/Helikase durchgeführt. Die Enzyme wurden in einem Standardreaktionsansatz (20 mM Tris/HCl *p*H 7,5; 10% Glycerol; 0,01% Triton X-100; 1 mM β -Mercaptoethanol; 3 mM MgCl₂; 0,1 mg/ml BSA; 0,5 μ Ci [γ -³²P]ATP) mit einem Endvolumen von 25 μ l inkubiert. Die ATP-Konzentrationen entsprach den zuvor bestimmten K_m -Werten für die ATPase-Reaktion jeder der NTPase/Helikasen. Der Reaktionsansatz wurde durch Zusatz von 0,5 ml Aktivkohlesuspension (2 mg/ml) gestoppt. Nach Zentrifugation bei 10000 G für 10 Min. wurden 100 μ l Aliquots vom Überstand entnommen und einer Szintillationszählung unterzogen. Die kinetischen Daten wurden durch eine nichtlineare Regressionsanalyse unter Verwendung von ENZFITTER (BioSoft) und SIGMAPLOT (Jandel Corp.) analysiert.

3.2.8. Vorinkubation von Compounds mit Enzym auf Entwindungs- und Hydrolysewirksamkeit

Das gewählte Enzym wurde für 30°C in 20 µl TGT Puffer für verschiedene Zeiträume und mit verschiedene Konzentrationen des gewählten Compounds vorinkubiert. Die Entwindungs-Reaktion und ATP-Hydrolyse wurde durch die Zugabe von MgCl₂, ATP, BSA und DNA- oder RNA-Substrat in 10 µl TGT Puffer initiiert, entsprechend den Konzentrationen im Standard-Helikase-Assay. In Kontrollversuchen wurden die NTPase/Helikase ohne Hemmstoff unter denselben Bedingungen vorinkubiert und analysiert.

4. Ergebnisse

Die sechs Benzimidazol- und Benzotriazol-Derivate zeigen in den Helikase-Assays unterschiedlich starke Hemmung auf alle untersuchten NTPase/Helikasen. Es lassen sich manche Enzyme der gleichen Superfamilie von allen Derivaten weniger stark hemmen als andere, insbesondere die NTPase/Helikase des JEV lässt sich lediglich durch TBBT mäßig hemmen. Sowohl mit DNA- als auch, wenn auch insgesamt schwächer ausgeprägt, mit **RNA-Substrat** zeigen einige der Benzimidazolund Benzotriazol-Derivate Hemmeigenschaften im mikromolaren Bereich. Wie in die Kumulativ-Ergebnisse von 28 Untersuchungsserien in Tabelle 1 und 2 zeigen, stellen sich DRBT und TBBT als potente Inhibitoren der NTPase/Helikasen dar. Zuvor wurden bereits vier der Benzimidazol- und Benzotriazol-Derivate auf die Eigenschaften der Hemmung der CK2 untersucht, diese Ergebnisse wurden zum Vergleich in die Ergebnisdarstellung mit DNA-Substrat eingefügt.

Tab. 1. Hemmung der Helikase-Aktivität von HCV-, WNV-, JEV- und Suv $3(\Delta 1-159)$ -Enzymen durch Benzimidazole und Benzotriazole, unter Verwendung eines DNA-Substrats.

	IC ₅₀ (μM)			<i>K</i> _i (μM)		
Inhibitor	HCV	WNV	JEV	Suv3(Δ1–159)	CK2	
DBRB	320	>500	>500	>500	8	
DRBT	1.5	3.0	>500	5.5	_	
DRB	450	>500	>500	>500	24	
α-DMRB	108	>500	>500	>500	_	
TCBT	380	27	>500	>500	6	
TBBT	20	1.7	200	50	0.6	

Die Helikase-Aktivität der NTPase/Helikasen wurde als eine Funktion der steigenden Konzentrationen der Derivate mittels Helikase-Assay bestimmt. Die K_i Werte für Hemmung der CK2 stammen aus den Referenzen [47,48,50].

Substrats.				
	IC_{50} (μ M)			
Inhibitor	HCV	WNV	JEV	Suv3(Δ1–159)
DBRB	>500	245	>500	>500
DRBT	>500	0.3	>500	>500
DRB	>500	12	>500	>500
α-DMRB	>500	>500	>500	>500
TCBT	>500	15	>500	480
TBBT	60	0.9	250	200

Tab. 2. Hemmung der Helikase-Aktivität von HCV-, WNV-, JEV- und Suv $3(\Delta 1-159)$ -Enzymen durch Benzimidazole und Benzotriazole, unter der Verwendung eines RNA-Substrats.

Die Helikase-Aktivität der NTPase/Helikasen wurde als eine Funktion der steigenden Konzentrationen der Derivate mittels Helikase-Assay bestimmt.

4.1. Inhibitoren der HCV-NTPase/Helikase

Abb. 9. Hemmung der Helikaseaktivität gereinigter HCV-NTPase/Helikase mit DNA-Substrat.



Verschiedene Konzentrationen von Benzimidazol- und Benzotriazol-Analoga wurden dem Reaktionsmedium gleichzeitig mit dem Enzym hinzugefügt. Entwindungs- und Hydrolytische-Aktivitäten in der Abwesenheit des Hemmstoffs wurden als 100% genommen; DRB (\blacksquare), DBRB (\bullet), DRBT (\bigtriangledown), α -DMRB (\blacktriangle), TCBT (\diamond), TBBT (\circ).

In der Helikase-Prüfung der HCV-NTPase/Helikase beeinflusst die Variation der ATP-Konzentration im Bereich 0,1-1000 μ M und der DNA-Substratskonzentration im Bereich 1.6-14.7 pM die gemessenen IC₅₀-Werte der Hemmstoffe nicht feststellbar. Die Gesamtergebnisse für alle vier NTPase/Helikasen sind in Tabelle 1 dargestellt. Die selben Ergebnisse sind in Abb. 9. dargestellt und zeigen dort eindeutiger die starken hemmenden Wirkungen von DRBT und TBBT, besonders die nahezu totale Hemmung der Enzymaktivität bei einer DRBT Konzentration von 10 μ M.

4.2. Unterschiede in der IC₅₀

Es zeigen sich deutliche Unterschiede in der IC_{50} der Benzimidazol- und Benzotriazol-Derivate. Einige Compounds sind mikromolare Hemmstoffe einer oder mehrerer NTPase/Helikasen. Manche Enzyme lassen sich weniger stark, andere besonders gut hemmen. Auch können Unterschiede durch Verwendung von DNA- oder RNA-Substrat gesehen werden. Bei manchen Compounds kann eine stärkere Hemmwirkung durch Vorinkubation erreicht werden.

4.2.1. - Unter den NTPase/Helikasen

DRBT ist ein mikromolarer Hemmstoff (IC₅₀ von 1.5-5.5 μ M) der Helikase-Aktivitäten mit DNA-Substrat von HCV, WNV und Suv3(Δ 1-159), aber nicht von JEV.

Das Tetrachlorobenzotriazol TCBT ist nur ein schwacher Hemmstoff des HCV-Enzyms und ein mäßiger Hemmstoff der WNV-Helikase-Aktivität, während das entsprechende Tetrabromobenzotriazole TBBT 20 mal wirksamer gegen beide Enzyme ist. Sogar im Falle der JEV- und Suv3(Δ 1-159)-Enzyme, bei denen TCBT fast inaktiv ist, führt der Ersatz durch TBBT zu messbarer Hemmung.

4.2.2. - Durch unterschiedliche Substrate

Unter Verwendung des RNA-Substrats sind die geprüften Verbindungen (mit Ausnahme von TBBT) viel schwächere Hemmstoffe der Helikase-Aktivitäten der HCV-, JEV- und Suv3(Δ 1 -159)-NTPase/Helikasen (Tab. 2). Eine zu beachtende Ausnahme stellt das WNV-Enzym dar, für das alle Derivate, mit Ausnahme von α -DMRB, vergleichbare oder wirksamere (DRBT, DRB) Hemmstoffe unter Verwendung von RNA-Substrat sind (Abb. 8)

4.2.3. - Durch Vorinkubation

Die Hemmung durch DRBT auf das HCV Enzym wird durch Vorinkubation mit dem Enzym ohne DNA-Substrat deutlich gesteigert. Vorinkubation für 15, 30 und 45 Min., gefolgt vom Zusatz des Substrats, führt zu IC_{50} -Werten von 1,1 μ M, 0,45 μ M und 0,1 μ M. Nach über 60 min Vorinkubation mit dem Enzym wird eine Plateauebene bei IC_{50} ¹/₄ 0,09 μ M erreicht (Abb. 10.A). Weiterhin haben Kontrollversuche, in denen DRBT mit dem DNA-Substrat vorinkubiert wurde, keine Wirkung auf die IC_{50} -Werte gezeigt. Keine solche Wirkung der Vorinkubation wurde mit TBBT beobachtet.

Abb. 10. Wirkung der Vorinkubation mit verschiedenen Zeitperioden der HCV-NTPase/Helikase mit DRBT mit einem DNA-Substrat.



(A) Hemmung der Helikase-Aktivität und (B) Hemmung der ATPase-Aktivität. Aliquots vom Enzym wurden mit steigenden Konzentrationen von DRBT oder in seiner Abwesenheit für 15 min (\mathbf{V}), 30 min ($\mathbf{\bullet}$), 45 min (\mathbf{I}), 60 min ($\mathbf{\Delta}$) und 90 min ($\mathbf{\bullet}$) inkubiert.

4.3. Wirkung der Verbindungen auf die ATPase-Aktivität

Die Aufmerksamkeit wurde außerdem auf die Wirkungen der verschiedenen Compounds auf die ATPase-Aktivität des HCV Enzyms gerichtet; beobachtet wurde die Freigabe von ³³P aus [γ -³³P]ATP. Bei einer ATP-Konzentration, die der K_m (105 µM) entspricht, zeigt keines der Derivate bei Konzentrationen bis zu 500 µM eine feststellbare Hemmung (Abb. 11).

Sogar im Falle von DRBT führt eine ausgedehnte Vorinkubation mit dem Enzym zu keiner beachtenswerten Hemmung der ATPase-Aktivität (Abb. 10.B). Dies ist auch der Fall, wenn die ATP-Konzentration schrittweise bis zum $10^{-1}-5^{-1}$ fachen des $K_{\rm m}$ -Wertes reduziert wird.

Abb. 11. Hemmung der ATPase-Aktivität gereinigter HCV-NTPase/Helikase mit DNA-Substrat.



Die verschiedenen Konzentrationen der Benzimidazol- und Benzotriazol-Analoga wurden dem Reaktionsmedium gleichzeitig mit dem Enzym hinzugefügt. Entwindungs- und Hydrolytische-Aktivitäten in der Abwesenheit des Hemmstoffs wurden als 100% genommen; DRB (\blacksquare), DBRB (\bullet), DRBT (\blacktriangledown), α -DMRB (\blacktriangle), TCBT (\diamond), TBBT (\circ).

4.4. Vergleich mit anderen, durch die Inhibitoren hemmbaren Enzymen

Die ermittelten IC_{50} -Werte für die Hemmung der Helikase-Aktivität lassen sich mit den jeweiligen Hemmparametern der durch die CK2 katalysierten Phosphorylierungs-Reaktion vergleichen, sie sind in Tabelle 1 aufgeführt. Es ist beachtenswert, dass die CK2 ein ähnliches Muster der Antwort auf TBBT und TCBT zeigt, wie die HCV-NTPase/Helikase und deren Verwandte [47]. Aufgrund der Ergebnisse der Untersuchungen wurden ergänzende kinetische Studien mit TBBT zum Vergleich von ATP-bindenden Stellen der HCV-NTPase/Helikase und der CK2 veranlasst.

5. DISKUSSION

Benzimidazole und ihre Nucleoside, halogenierte Analoga eingeschlossen, sind lange als Hemmstoffe der Replikation verschiedener Viren bekannt sind. Die frühere Literatur, durch Tamm und Caliguri ausgiebig überprüft [60], ist von Townsend et al. aktualisiert worden [61]. Kürzlich veröffentlichte Hemmstoffe von HCV (siehe Einführung) schließen bis-Benzimidazol-Analoga ein. Besonders relevant sind die 2,5,6-trihalogeno-1-β-D-Ribosylbenzimidazole, von denen als starke und selektive Hemmstoffe von menschlichem Cytomegalovirus-Nachbildungen berichtet wird [62]. Im Gegensatz zu vielen anderen antiviralen Nucleosid-Analoga, die intrazelluläre Phosphorylierung für die antivirale Aktivität erfordern, wirken diesen Substanzen als solche [63]. Es wurde vermutet, dass ihr Aktionsmechanismus über Hemmung der Produkte der menschlichen Cytomegalovirus Gene UL89 und UL56 abläuft [62]. Dieselben Autoren berichteten früher, dass die heterozyklische Base selbst, d.h. 2,5,6-Trihalogenobenzimidazol, auch allein ein guter Hemmstoff ist [61]. Sie wurden aber wegen ihrer hohen Zytotoxizität auf nicht infizierte Zellen nicht weiter studiert.

Auffällig ist, dass die stärksten Inhibitoren in dieser Untersuchung DRBT und TBBT Benzotriazol-Derivate sind. Die bisher beschriebenen antiviral wirksamen Verbindungen dieser Substanzgruppe waren, wie oben beschrieben, Benzimidazole. Ob die Benzotriazole eine höhere Affinität zur Bindungsstelle der Hemmstoffe besitzen oder ob diese wohlmöglich einen anderen Hemmmechanismus aufweisen, lässt sich durch diese Untersuchung nicht feststellen.

Die mit dem NS3 assoziierte Helikase-Aktivität ist wegen ihrer Schlüsselrolle in der Virusreplikation schon länger als ein attraktives Ziel zur Entwicklung von wirksamen Medikamenten gegen HCV und verwandte *Flaviviridae* betrachtet worden [14,15,64]. Medikamente, die sich gegen die entwindende Aktivität richten, könnten über ein oder mehrere der folgenden Mechanismen wirken [65]:

a) Hemmung der ATPase-Aktivität durch interferieren mit der ATP-Bindung und dadurch Beschränkung der benötigten Energie zum entwinden,

b) Hemmung der ATP-Hydrolyse oder Freigabe von ADP durch Blockieren der Öffnung oder Schließung von Domäne 2,

c) Hemmung der Bindung des RNA- (oder DNA-)Substrates,

d) Hemmung der Entwindung durch allosterische Blockade der Helikase-Translokation

e) Hemmung der Verbindung von ATP-Hydrolyse und der Entwindungs-Reaktion.

5.1. Inhibitoren der HCV-NTPase/Helikase

Die vorgestellte Versuchsreihe beschreibt sechs halogenierte Benzimidazole und Benzotriazole, die die Entwindungs-Reaktion der viralen SF2 NTPase/Helikasen von HCV, WNV, JEV und das menschliche SF1 Enzym Suv3(Δ 1-159) hemmen. Zwei der untersuchten Compounds, DRBT und TBBT, zeigen stärkere Hemmeigenschaften auf die HCV-NTPase/Helikase. Der Konzentrationsbereich des DNA-Substrates war zu gering um einen direkten Schluss bezüglich des Hemmmechanismus zu ziehen. Wie zuvor auch mit der WNV-NTPase/Helikase gezeigt [41], wurden starke Substrat/Produkt-Hemmungen der Entwindungs-Reaktion vom HCV-Enzym beobachtet, als die DNA-Substratskonzentration 15 pM überstieg. Durch angeschlossene weitere Untersuchungen des Bindungsmodus der Compounds mit der HCV-NTPase/Helikase durch D. Shugar, lässt sich die HCV-NTPase/Helikase mit anderen bereits untersuchten Enzymen vergleichen (s.u.).

5.2. Unterschiede in der IC₅₀

5.2.1. - Unter den NTPase/Helikasen

DRBT (mit einem Benzotriazol-Ring) ist ein mikromolarer Hemmstoff (IC₅₀ von 1.5-5.5 μ M) der Helikase-Aktivitäten mit DNA-Substrat von HCV, WNV und Suv3 (Δ 1-159), aber nicht JEV. JEV lässt sich im Vergleich zum SF1 Enzym Suv3(Δ 1-159) deutlich schlechter hemmen, obwohl es zur SF2 gehört. Dies legt die Vermutung nahe, dass die JEV-NTPase/Helikase sich von den anderen Enzymen seiner Superfamilie unterscheidet. Für das WNV Enzym waren unter Verwendung von RNA-Substrat alle Derivate außer DMRB, vergleichbare oder wirksamere (DRBT, DRB) Hemmstoffe, als unter Verwendung von DNA. Damit unterscheidet sich nicht nur das JEV-Enzym, sondern auch das WNV-Enzym von den drei anderen untersuchten NTPase/Helikasen. Die Bedeutung dieser Beobachtung ist noch unklar, es scheint aber, dass detaillierte Studien der Struktur und Funktion dieser Enzyme im Vergleich, neue Erkenntnisse bringen könnten.

5.2.2. - Durch unterschiedliche Substrate

Im natürlichen Replikationszyklus dient die virale Plus-Strang RNA als Matrize für mehrere Minus-Strang RNAs und als natürliches Substrat des membranassoziierten Replikase-Komplexes. Unter Verwendung des RNA-Substrats sind die geprüften Compounds, mit Ausnahme von TBBT (mit einem Benzotriazol-Ring), aber viel schwächere Hemmstoffe der Helikase-Aktivitäten der HCV-, JEV- und Suv3(Δ 1 -159)-NTPase/Helikasen, als unter Verwendung von DNA-Substrat. Lediglich für das WNV-Enzym waren unter Verwendung von RNA-Substrat alle Derivate außer α -DMRB, vergleichbare oder wirksamere (DRBT, DRB) Hemmstoffe, als unter Verwendung von DNA. DRBT war mit einem RNA Substrat ein guter und selektiver Hemmstoff des West Nil Virus-Enzyms (IC₅₀ \approx 0.3 µM), mit einem DNA-Substrat allerdings viel schwächer (IC₅₀ \approx 3 µM).

Obwohl sich die hemmende Wirkung aus direkter Interaktion der Compounds mit den Enzymen zu ergeben scheint, kann eine Aktion auf dem Level des RNA- und/oder DNA-Substrates nicht eindeutig ausgeschlossen werden. Der Konzentrationsbereich des DNA-Substrates war zu gering um einen direkten Schluss bezüglich des Hemmmechanismus zu ziehen. Wie zuvor auch mit der WNV-NTPase/Helikase gezeigt [41], wurden starke Substrat/Produkt-Hemmungen der Entwindungs-Reaktion vom HCV-Enzym beobachtet, als die DNA-Substratskonzentration 15 pM überstieg. Es wurde gezeigt, dass verschiedene Benzimidazol-Analoga in dsRNA und/oder dsDNA Strukturen interkalieren [66,67,68] und ihre Eigenschaften als Substrate für NTPase/Helikasen modifizieren können, wie es mit einigen Imidazo[4,5-d]pyridazin-Derivaten der Fall ist [69]. Die Interaktion dieser Compounds mit RNA und/oder DNA scheint außerdem von der Basen-Sequenz des Polynucleotids abhängig zu sein [70].

Untersuchungen mit der Frage, warum lediglich die WNV-NTPase/Helikase durch DRBT mit RNA-Substrat sehr gut zu Hemmen ist, die anderen Enzyme jedoch nicht, und warum TBBT mit RNA-Substrat schwächere Hemmeigenschaften (mit Ausnahme des WNV Enzyms) ausbildet, könnten zur weiteren Aufklärung des Hemmmodus führen.

5.2.3. - Durch Vorinkubation

Der Mechanismus der Hemmung von DRBT im Gegensatz zu TBBT scheint ein wenig anders zu sein und braucht mehr als 60 min, um die volle hemmende Aktivität zu entwickeln. Die Ursache der langsamen Interaktion mit dem Enzym bleibt unklar, aber nicht ohne vorrangiges Interesse. Vorherige Beobachtungen mit 5'-p-Fluoro-Sulfonyl-Benzoyl-Adenosin (FSBA) zeigte, dass diese Substanz auch 90-120 min für die Blockade benötigt. Sie bildet kovalente Bindung an einer oder mehreren Stellen der WNV-NTPase/Helikase [41].

5.3. Wirkung der Verbindungen auf die ATPase-Aktivität

Die Hemmung durch die untersuchten Compounds wird von keiner Änderung in ATPase-Aktivität begleitet. Es folgt eindeutig, dass keiner der Hemmstoffe um den katalytischen ATP bindenden Standort der NTPase konkurriert. Für die Entwindungs-Reaktion der DNA bzw. RNA gibt es zur Zeit zwei Hypothesen mit alternativen Mechanismen, die auf strukturellen und biochemischen Analysen beruhen:

1. Das NTPase/Helikase-Molekül bindet an einzelsträngige Regionen des Substrates und wirkt nicht aktiv an der Trennung doppelsträngiger DNA- oder RNA-Strukturen mit. Damit ist die aus der NTP-Hydrolyse der NTPase/Helikase gewonnene Energie für die Entwindungsreaktion nicht zwingend notwendig [26,36,37].

2. Ein zweiter "aktiver" Mechanismus fordert mindestens zwei Nukleinsäure-Bindungsstellen und die ATP-Abhängigkeit der Entwindungsreaktion [26,37]. Hier wird durch NTP eine Konformationsänderung des Moleküls erreicht und so die Bindung von DNA- oder RNA-Substrat an die entsprechende Bindungsstellen erleichtert (Abb. 4.) [26].

Durch einige der untersuchten Compounds konnte zwar eine Hemmung der Helikase-Aktivität der untersuchten NTPase/Helikasen erreicht werden, jedoch keine Hemmung der ATPase-Aktivität. Die Beobachtung, dass die Verbindungen nicht um den katalytischen ATP bindenden Standort der NTPase konkurrieren, unterstützt die Forderung nach zwei Nukleinsäure-Bindungstellen der zweiten Hypothese. Die erste Hypothese lässt sich, unter dem Aspekt der nicht auszuschließenden Interkalation der Benzimidazol- und Benzotriazol-Derivate mit dsRNA und/oder dsDNA Strukturen [66,67,68], nicht entkräften.

5.4. Vergleich mit anderen, durch die Inhibitoren hemmbaren Enzymen

Die Struktur der HCV-NS3-NTPase/Helikase zeigt höchste Ähnlichkeit mit UvrB [71,72]. Sie ist eine DNA-Helikase, die für Nucleotid-Exzisionsreparatur geeignet ist und ein Mitglied derselben Helikase-Superfamilie 2 ist, wie die HCV-NS3-NTPase/Helikase [73]. Kristallstrukturanalysen der PcrA Helikase zeigten, dass bei der Bindung von ATP und Nukleinsäure, zur Sicherstellung der ATPase-Aktivität, Interdomänen- (Domänenschluß), Intradomänen- und Seitenketten-Konformations-Änderungen auftreten [32]. Die PcrA Helikase gehört zur Helikase-Superfamilie 1. Aus der Überlagerung der Domänen 1 und 1a von NS3 und UvrB wurde der relative Standort von ATP im Komplex der HCV-NS3-NTPase/Helikasen mit dU8-Oligonucleotid (Protein Data Bank Nummer 1A1V) [31] vom UvrB-ATP-Komplex (Protein Data Bank Nummer 1D9Z) abgeleitet [71]. Beide Strukturen NTPase/Helikase-dU8-Komplex und UvrB-ATP-Komplex stellen offene Formen der Enzyme dar. Abb. 12.A zeigt, dass bei der HCV-NS3-NTPase/Helikase die ATP-

Bindungen in der Tasche zwischen Domänen 1 und 2 hauptsächlich über Interaktionen mit den Motiven I (GxGKS/T) und II (DExH) auf Domäne 1 stattfinden [74].



Abb. 12. Vergleich der ATP-Bindung der HCV-NS3-NTPase/Helikase und Proteinkinase CK2 [74].

(A) Banddiagramm eines Komplexes aus HCV-NS3-NTPase/Helikase, MgATP und ssDNA. Die konservierten Motive, die mit der ATP-Bindung zusammen hängen, Motiv I (phosphatbindendes Motiv oder Walker-Motiv-A [29]), Motiv II (Mg²⁺ bindendes Motiv oder Walker-Motiv-B) und Motiv VI sind Rot dargestellt. (B) Banddiagramm eines Komplexes aus katalytischer Untereinheit der CK2 und MgATP. ATP bindende Motive, Gly-reiche Schleife (Walker-Motiv-A) und DFG Schleife (Mg²⁺ bindendes Motiv, das die DWG Sequenz der CK2 umfasst) sind Rot dargestellt. Mg²⁺ Ionen sind als weiße Kugeln dargestellt.

Der starke Hemmstoff der HCV- und WNV-NTPase/Helikase, TBBT, ist ein spezifischer ATP-kompetetiver Hemmstoff der Proteinkinase CK2. Er wurde ursprünglich entwickelt, um zwischen den Proteinkinasen CK1 und CK2 zu unterscheiden [47]. Anschließend konnte gezeigt werden, dass er unter mehr als 30 Serin/Threonin- und Tyrosin Proteinkinasen eine hohe Selektivität für die CK2 zeigt [48]. In der Kristallstruktur des Komplexes der katalytischen Untereinheit der Zea May CK2 mit TBBT, befindet sich TBBT im aktiven Standort der CK2 [49]. Normalerweise wird dieser vom Purin-Teil der natürlichen Substrate ATP und GTP eingenommen. Er liegt grob orientierend in derselben Ebene wie die Purinbasen, fügt sich tief in die hydrophobe Tasche von CK2 ein und passt nahezu perfekt in die Proteintasche (Abb. 12.B) [74]. Die Proteinhemmstoffinteraktionen sind fast ausschließlich hydrophob. Wegen der Sperrigkeit der Bromatome sind diese in erster Linie für die hydrophoben Interaktionen mit den apolaren Ketten von CK2 verantwortlich. Die einzige polare Interaktion, durch H-Brücken vermittelt, besteht zwischen dem N¹ des TBBT Triazol-Rings und zwei geladenen Seitenketten des Proteins [49]. TCBT ist mit den weniger sperrigen Chloratomen ein viel schwächerer Hemmstoff von CK2 [47].

Die Analyse des Bindungsmodus von ATP in der HCV-NTPase/Helikase Struktur erklärt, warum TBBT kein ATP-kompetetiver Hemmstoff ist. Bei der HCV-NTPase/Helikase bindet das ATP, im Vergleich zur Proteinkinase, gewissermaßen gegenüber, mit dem Adenin-Ring von dem Spalt zwischen den Domänen weg angeordnet (Abb. 12). TBBT als ein spezifischer Hemmstoff von CK2 ahmt den Purin-Ring des ATP im Komplex mit CK2 nach und wird tief im hydrophoben aktiven Zentrum, in einer Tasche zwischen den oberen und unteren Domänen vergraben. Wenn es ein ATP-kompetitiver Hemmstoff der HCV-NTPase/Helikase wäre, würde es die Position des Adenin-Rings in der Öffnung der breiten Spalte zwischen Domänen 1 und 2 einnehmen. Wie oben beschrieben sind die Proteinhemmstoffinteraktionen aufgrund der Bromatome fast ausschließlich hydrophob. Die hemmende Stärke von TBBT ist stark von den engen Wechselwirkungen zu der hydrophoben Oberfläche der Domäne abhängig. Dieser Teil der Spalte ist selbst nach Domänenschluss zu groß, um eine feste Bindung mit TBBT zu erlauben. Außerdem wird angenommen, dass der Schluss der Spalte zwischen Domänen 1 und 2 stark von Interaktionen von Arginin-Resten des Motiv VI (QRxGRxGR) in Domäne 2 mit den Phosphatgruppen von ATP gesteuert wird [31]. Die Oberflächen-Regionen, an denen der Zucker und die Triphosphat-Anteile des ATP binden sind hoch polar [74]. Es scheint unwahrscheinlich, dass die TBBT-Bindung zu solchen strukturellen Änderungen führen könnte, um fest an der katalytischen ATP-bindenden Stelle binden zu können. Folglich muss TBBT die Helikase durch einen der oben beschriebenen Mechanismen c)-e) hemmen. Versuche, den Hemmmechanismus von TBBT auf der atomaren Ebene zu verstehen, abgeleitet von der dreidimensionalen Struktur der NS3-NTPase/Helikase, sind gegenwärtig das Thema von detaillierteren Andockstudien.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die halogenierten Benzimidazole und Benzotriazole, die in diese Studie einbezogen sind, sind ausgezeichnete wegweisende Zusammensetzungen für die Entwicklung von stärkeren Hemmstoffen der Hepatitis C Virus (HCV)-Nucleotidtriphosphatase(NTPase)/Helikase.

Von 4,5,6,7-Tetrabromobenzotrialzol (TBBT) wurde zuvor als ein hoch selektiver Inhibitor der Caseinkinase 2 (CK2) berichtet [47,48]. Im Verlauf der Untersuchung wurde beobachtet, dass TBBT ein guter Inhibitor der Helikase-Aktivität ist. Die IC_{50} liegt im niedrigen mikromolaren Bereich. Die IC_{50} ist etwa 20 µM mit einem DNA-Substrat, aber nur 60 µM mit einem RNA-Substrat.

Mehrere TBBT verwandte Verbindungen waren enzym- und/oder substratspezifische Hemmstoffe. 5,6-Dichloro-1- β -D-Ribofuranosylbenzotriazol (DRBT) war mit einem RNA-Substrat ein guter und selektiver Hemmstoff vom West Nil Virus-Enzym (IC₅₀ \approx 0.3 μ M), mit einem DNA-Substrat allerdings viel schwächer (IC₅₀ \approx 3 μ M). Das Tetrachlor-Analogon von TBBT, 4,5,6,7,-Tetrachlorobenzotriazol (TCBT), ist im Vergleich zu TBBT sowohl ein schwächerer Hemmstoff der CK2, als auch aller vier hier untersuchter Helikasen.

Vorinkubation der Enzyme ohne Substrat mit DRBT verbesserte die hemmende Potenz, die IC_{50} bei der HCV-Helikase-Aktivität wurde von 1,5 auf 0,1 μ M reduziert. Bei TBBT ließ sich keine Wirkung der Vorinkubation erkennen, so dass sich ein anderer Modus der Interaktion mit dem Enzym vermuten lässt.

Durch einige der untersuchten Compounds konnte eine Hemmung der Helikase-Aktivität der untersuchten NTPase/Helikasen erreicht werden, es konnte jedoch durch keine Verbindung eine Hemmung der ATPase-Aktivität festgestellt werden. Die Verbindungen konkurrieren also nicht um den katalytischen ATP-bindenden Standort der NTPase.

Aufgrund der Ergebnisse der Untersuchungen wurden ergänzende kinetische Studien zum Vergleich von ATP bindenden Stellen veranlasst. Sie zeigten, dass der Aktionsmodus der Hemmstoffe mit der Helikase, im Gegensatz zur CK2, nicht durch Interaktion mit der katalytischen ATP-bindenden Stelle, sondern durch Besetzen einer zuvor vermuteten, allosterischen Nucleosid/Nucleotid bindenden Stelle bedingt ist [67].

ANHANG

Literaturverzeichnis

- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW & Houghton M (1989), Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science, 244(4902): p. 359-62.
- Choo QL, Weiner AJ, Overby LR, Kuo G, Houghton M & Bradley DW (1990), Hepatitis C virus: the major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. Br Med Bull, 46(2): p. 423-41.
- McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling MH, Cort S & Albrecht JK (1998), *Interferon a-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C*. Hepatitis Interventional Therapy Group. N. Engl. J. Med. 339, 1485–1492.
- 4. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, Bain V, Heathcote J, Zeuzem S, Trepo C & Albrecht J (1998), Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). Lancet, 352(9138): p. 1426-32.
- Saito I, Miyamura T, Ohbayashi A, Harada H, Katayama T, Kikuchi S, Watanabe Y, Koi S, Onji M, Ohta Y et al. (1990), *Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 87(17): p. 6547-9.
- 6. Watashi K, Hijikata M, Hosaka M, Yamaji M & Shimotohno K (2003) Cyclosporin A supresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. Hepatology. 38: 1282-1288
- Lindenbach BD & Rice CM (2005) Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. Nature. 436: 933-938
- 8. Zeisel MB & Baumert TF (2006) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture: A breakthrough for basic and applied research.
 J Hepatol, 44: 436-439
- Cummings KJ, Lee SM, West ES, Cid-Ruzafa J, Fein SG, Aoki Y, Sulkowski MS & Goodman SN (2001), Interferon and ribavirin vs interferon alone in the re-treatment of chronic hepatitis C previously nonresponsive to interferon: ametaanalysis of randomized trials. JAMA 285,193–199.
- **10.** Tam RC, Lau JYN & Hong Z (2002), *Mechanisms of action of ribavirin in antiviral therapies.* Antiviral Chem. Chemother. 12, 261–272.

- Wang QM & Heinz BA (2000), Recent advances in prevention and treatment of hepatitis C virus infections. Prog. Drug Res. 55, 1–32.
- Crotty S, Maag D, Arnold JJ, Zhong W, Lau JYN, H ong Z, Andino R & Cameron CE (2000), The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. Nat. Med. 6,137 5–1379,.
- 13. Rosenberg S (2001), Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus.
 J. Mol. Biol. 313,451–464.
- 14. Matusan AE, Pryor MJ, Davidson AD & Wright PJ (2001), Mutagenesis of the dengue virus type 2 NS3 protein within and outside helicase motifs: Effects on enzyme activity and virus replication. J. Virol. 75,963 3–9643.
- Gu B, Liu C, Lin-Goerke J, Malley DR, Gutshall LL, Feltenberger CA & Del Vecchio AM (2000), The RNA helicase and nucleotide triphosphatase activities of the bovine viral diarrhea virus NS3 protein are essential for viral replication. J. Virol. 74,17 94–1800.
- 16. Higginbottom A, Quinn ER, Kuo CC, Flint M, Wilson LH, Bianchi E, Nicosia A, Monk PN, McKeating JA & Levy S (2000), Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. J Virol, 74(8): p. 3642-9.
- 17. Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby R, Barr PJ et al. (1991), Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. Proc Natl Acad Sci U S A, 88(6): p. 2451-5.
- Sharom FJ, Yu X, Chu JW & Doige CA (1995), Characterization of the ATPase activity of P-glycoprotein from multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells. Biochem J, 308 (Pt 2): p. 381-90.
- **19.** Haaß A (2006)

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

- 20. Takamizawa A, Mori C, Fuke I, Manabe S, Murakami S, Fujita J, Onishi E, Andoh T, Yoshida I & Okayama H (1991), Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. J Virol,. 65(3): p. 1105-13.
- 21. Rice CM (1996),

Flaviviridae: the viruses and their replication., in fields virologie, KD Fields BN, Howley PM, Editor, Lipincott-Raven: Philadelphia. p. 931-960.

- **22.** Westaway EG (1987), *Flavivirus replication strategy.* Adv Virus Res,. 33: p. 45-90.
- 23. Gorbalenya AE & Koonin EV (1993), Helicases: Amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. Curr. Opin. Struct. Biol. 3,419 –429.
- 24. Kadare G & Haenni AL (1997), *Virus-encoded RNA helicases.* J Virol,. 71(4): p. 2583-90.
- 25. Ellis NA (1997), DNA helicases in inherited human disorders. Curr Opin Genet Dev, 7(3): p. 354-63.
- 26. Yao N, Hesson T, Cable M, Hong Z, Kwong A, Le H & Weber P (1997), Structure of the hepatitis C virus RNA helicase domain. Nat. Struct. Biol. 4,46 3–467.
- 27. Ilyina TV & Koonin EV (1992), Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circleDNAreplication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucary otes and archaebacteria. Nucleic Acids Res. 20,32 85.
- Ilyina TV, Gorbalenya AE & Koonin EV (1992), Organization and evolution of bacterial and bacteriophage primase-helicase systems. J. Mol. Evol. 34,3 51–357.
- 29. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ & Gay NJ (1982), Distantly related sequences in the a- and b-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. EMBO J. 1,9 45–951.
- 30. Korolev S, Hsieh J, Gauss GH, Lohman TM & Waksman G (1997), Major domain swiveling revealed by the crystal structures of complexes of E. coli Rep helicase bound to single stranded DNA and ADP. Cell 90,63 5–647.
- 31. Kim JL, 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.
- Velankar SS, Soultanas P, Dillingham MS, Subramanya HS & Wigley DB (1999), Crystal structures of complexes of PcrA DNA helicase with a DNA substrate indicate an inchworm mechanism. Cell 97,7 5–84.
- **33.** Müller O (2004)

Dissoziation der NTPase und Helikase- Aktivitäten der Superfamilie II NTPase/Helikasen am Beispiel der Hepatitis C Virus NTPase/Helikase. Med. Dissertation. Universität Hamburg

- 34. Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM & Rice CM (1993), Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. J Virol,. 67(3): p. 1385-95.
- 35. Ramakrishnan C, Dani VS & Ramasarma T (2002), A conformational analysis of Walker motif A [GXXXXGKT (S)] in nucleotide-binding and other proteins. Protein Eng, 15(10): p. 783-98.
- **36.** Lüking A, Stahl U & Schmidt U (1998), *The protein family of RNA helicases.* Crit Rev Biochem Mol Biol 33:259-296
- Matson SW & Kaiser-Rogers KA (1990), DNA helicases. Ann Rev Biochem 59: 289-329
- Borowski P, Kuehl R, Mueller O, Hwang LH, 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. Eur. J. Biochem. 266,723.
- 39. Porter D (1998), Inhibition of the hepatitis C virus helicaseassociated ATPase activity by the combination of ADP, NaF, MgCl2, and poly(rU).
 J. Biol. Chem. 273,73 90–7396.
- 40. Borowski P, Mueller O, Niebuhr A, Kalitzky M, Hwang LH, Schmitz H, Siwecka MA & Kulikowski T (2000), ATP binding domain of NTPase/helicase as target for hepatitis C antiviral therapy. Acta Biochim. Polon. 47,1 73–180.
- 41. Borowski P, Niebuhr A, Mueller O, Bretner M, Felczak K, Kulikowski T & Schmitz H (2001), Purification and characterization of West Nile virus nucleoside triphosphatase (NTPase)/helicase: evidence for dissociation of the NTPase and helicase activities of the enzyme. J. Virol. 75,32 20–3229.
- 42. Borowski P, Lang M, Niebuhr A, Haag A, Schmitz H, Schulze zur Wiesch J, Choe J, Siwecka MA & Kulikowski T (2001), Inhibition of the helicase activity of HCV NTPase/helicase by 1-b-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3 carboxamide-5¢-triphosphate (ribavirin-TP). Acta Biochim. Polon. 48,739 –744.
- 43. Diana GD & Bailey TR (1997) Patent. US5633388.
- 44. Diana GD, Bailey TR. & Nitz TJ (1997) Patent. WO9736554.
- 45. Phoon CW, Ng PY, Ting AE, Yeo SL & Sim MM (2001), Biological evaluation of hepatitis C virus helicase inhibitors. Bioorg. Med. Chem. Lett. 11,164 7–1650.
- 46. Janetka JW, Ledford BE & Mullican MD (2000), Patent. WO0024725.

- 47. Szyszka R, Grankowski N, Felczak K & Shugar D (1995), Halogenated benzimidazoles and benzotriazoles as selective inhibitors of protein kinases CK I and CK II from Saccharomyces cerevisiae and other sources. Biochem. Bioophys. Res. Commun. 208,4 18–424.
- 48. Sarno S, Reddy H, Meggio F, Ruzzene M, Davies SP, Donella-Deana A, Shugar D & Pinna LA (2001), Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 (casein kinase-2). FEBS Lett. 496,4 4–48.
- 49. Battistutta R, De Moliner E, Sarno S, Zanotti G & Pinna LA (2001), Structural features underlying selective inhibition of protein kinase CK2 by ATP site-directed tetrabromo-2-benzotriazole. Protein Sci. 10,220 0–2206.
- 50. Dobrowolska G, Muszynska G & Shugar D (1991), Benzimidazole nucleoside analogues as inhibitors of plant (maize seedling) casein kinases. Biochim. Biophys. Acta. 1080,22 6.
- 51. Wiley RH & Hussung KF (1957), *Halogenated benzotriazoles*.J. Am. Chem. Soc. 79,4 395–4400.
- 52. Gwack Y, Kim DW, Han JH & Choe J (1996), Characterization of RNA binding activity and RNA helicase activity of the hepatitis C virus NS3 protein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 255,6 54–659.
- Chang YS, Liao CL, Tsao CH, Chen MC, Liu CI, Chen LK & Lin YL (1999), Membrane permeabilization by small hydrophobic nonstructural proteins of Japanese encephalitis virus. J. Virol. 73,625 7–6264.
- 54. Dmochowska A, Kalita K, Krawczyk M, Golik P, Mroczek K, Lazowska J, Stepien PP & Bartnik E (1999), *A human putative Suv3-like RNA helicase is conserved between Rhodobacter and all eukaryotes.* Acta Biochim. Pol. 46,155–162.
- 55. Wengler G, Castle E, Leidner U, Nowak T et al. (1986), Sequence analysis of membrane protein V3 of the flavivirus West Nile virus and of its gene. Virology 147:264-274
- 56. Hames BD & Rickwood D (1990), Gel Electrophoresis of Proteins: a Practical Approach.2nd edn. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.

57. Laemmli UK,

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970. 227(259): p. 680-5.

58. 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. 72,675 8–6769.

- 59. Sambrook J, Fritsch F & Maniatis T (1989), Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring. Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- 60. Tamm I & Caliguri L (1972), 2-(a-Hydroxybenzyl)benzimidazole and Related Compounds. In Chemotherapy of Virus Diseases (Bauer, D.J., ed.),pp,1 15–179. Pergamon Press, Oxford,U K.
- 61. Townsend LB, Devivar RV, Turk SR, Nassiri MR & Drach JC (1995), Design, synthesis, and antiviral activity of certain 2,5,6-trihalo-1-(beta-D-ribofuranosyl) benzimidazoles. J. Med. Chem. 38,40 98–4105.
- 62. Krosky PM, Borysko KZ, Nassiri MR, Devivar RV, Ptak RG, Davis MG, Biron KK, Townsend LB & Drach JC (2002), *Phosphorylation of beta-D-ribosylbenzimidazoles is not required for activity against human cytomegalovirus*. Antimicrob. Agents Chemother. 46,47 8–486.
- 63. Shugar D (1999), Viral and host-cell protein kinases: enticing antiviral targets and relevance of nucleoside, and viral thymidine, kinases. Pharmacol. Ther. 82,31 5–335.
- **64.** Blight KJ, Kolykhalov AA, Reed KE, Agapov EV & Rice CM (1998), *Molecular virology of hepatitis C virus: an update with respect to potential antiviral targets.* Antivir. Ther. 3, 71–81.
- **65.** Yao N & Weber PC (1998), *Helicase, a target for novel inhibitors of hepatitis C virus.* Antivir. Ther. 3,93–97.
- 66. Kubota Y, Iwamoto T & Seki T (1999), The interaction of benzimidazole compounds with DNA: intercalation and groove binding modes. Nucleic Acids Symp Ser. 42,53–54.
- 67. Wood AA, Nunn CM, Czarny A, Boykin DW & Neidle S (1995), Variability in DNA minor groove width recognised by ligand binding: the crystal structure of a bisbenzimidazole compound bound to the DNA duplex d (CGCGAATTCGCG) 2. Nucleic Acids Res. 23,36 78–3684.
- 68. Sapse AM, Sapse D, Jain DC & Lown JW (1995), Quantum chemical studies employing an ab initio combination approach on the binding of the bisbenzimidazole Hoechst 33258 to the minor groove of DNA. J. Biomol. Struct Dyn. 12, 857–868.
- 69. Borowski P, Lang M, Haag A, Schmitz H, Choe J, Chen HM & Hosmane RS (2002), Characterization of imidazo[4,5-d] pyridazine nucleosides as modulators of unwinding reaction mediated by West Nile virus nucleoside triphosphatase/ helicase: evidence for activity on the level of substrate and/ or enzyme. Antimicrob. Agents Chemother. 46,1 231–1239.

- 70. Marsch G, Ward RL, Colvin M & Turteltaub KW (1994), Non-covalent DNA groove-binding by 2-amino-1-methyl-6 phenylimidazo[4,5-b]pyridine. Nucleic Acids Res. 22,5 415.
- **71.** Theis K, Chen PJ, Skorvaga M, Van Houten B & Kisker C (1999), *Crystal structure of UvrB, a DNA helicase adapted for nucleotide excision repair.* EMBO J. 18,68 99–6907.
- 72. Holm L & Sander C (1995), Dali: a network tool for protein structure comparison. Trends Biochem. Sci. 20,478 –480.
- 73. Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP & Blinov VM (1989), Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. Nucleic Acids Res. 17,471 3–4730.
- 74. Borowski P, Deinert J, Schalinski S, Bretner M, Ginalski K, Kulikowski T & Shugar D(2003), Halogenated benzimidazoles and benzotriazoles as inhibitors of the NTPase/helicase activities of hepatitis C and related viruses. Eur. J. Biochem. 270, 1645-1653 (Siehe Anhang)

Abkürzungsverzeichnis

α-DMRB	5,6-Dimethyl-1-α-D-Ribofuranosylbenzimidazol
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
[γ- ³³ P]ATP	Adenosintriphosphat, mit ³³ P an der y-Phosphat-Stelle markiert
Ċ	Core-Protein
Ci	Curie ($1Ci = 0.037$ TBq)
CK	Caseinkinase
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure
ssDNA	Einzelstrang-Desoxyribonukleinsäure
DRB	5,6-Dichloro-1-β-D-Ribofuranosylbenzimidazol
DBRB	5,6-Dibromo-1-β-D-Ribofuranosylbenzimidazol
DRBT	5,6-Dichloro-1-β-D-Ribofuranosylbenzotriazol
DTT	Dithiothreitol
dU8	Oligonucleotid (Protein Data Bank Nummer 1A1V)
Е	Envelope-Protein
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylene Diamine Tetracetic Acid
FSBA	5'-p-Fluoro-Sulfonyl-Benzoyl-Adenosin
G	Gravitationskonstante
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCV	Hepatitis C Virus
IC_{50}	Inhibitorkonzentration bei der eine halbmaximale Hemmung des
50	Enzyms stattfindet
IPTG	Isopropylthio-\u03b3-D-Galaktosid
JEV	Japanisches Enzephalitis Virus
k	Kilo
KCl	Kaliumchlorid
KH2PO4	Kaliumdihydrogenphosphat
K;	Inhibitorkonzentration bei der eine halbmaximale Hemmung des
1	Enzyms stattfindet
K _m	Michaeliskonstante
1	Liter
μ	Mikro
m	Milli
М	Mol
Mg^{2+}	Magnesium-Ion
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min.	Minuten
NaCl	Natriumchlorid
NS	Nicht Struktur Protein
NTP	Nukleosidtriphosphat
p	Piko
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PcrA	Helikase der Superfamilie 1
PEG	Polyethylenglycol
pre-M	Precursor-Membranprotein

RNA	Ribonukleinsäure
dsRNA	Doppelstrang-Ribonukleinsäure
ssRNA	Einzelstrang-Ribonukleinsäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SF	Superfamilie
Suv3 (Δ1 -159)	Menschliche mitochondriale NTPase/Helikase (Oligopeptid der
	Aminosäuren 1 bis 159)
TBBT	4,5,6,7-Tetrabromobenzotrialzol
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBq	Terabecquerel (1 TBq = $27,027027027$ Ci)
TCBT	4,5,6,7-Tetrachlorobenzotrialzol
Tris/HCl	(Tris-Phosphat-EDTA-Puffer)-HCl
Triton X-100	Polyoxyethyliertes Octyl Phenol; alpha-[4-(1,1,3,3-
	Tetramethylbutyl)phenyl]-Omega-hydroxypoly(Oxy-1,2-Ethandiyl)
U	Unit
UvrB	Helikase der Superfamilie 2
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WNV	West Nil Virus

Aminosäurentabelle

Alanin	ALA	А
Arginin	ARG	R
Aspartat	ASP	D
Asparagin	ASN	Ν
Cystein	CYS	С
Glutamat	GLU	Ε
Glutamin	GLN	Q
Glycin	GLY	G
Histidin	HIS	Н
Isoleucin	ILE	Ι
Leucin	LEU	L
Lysin	LYS	Κ
Methionin	MET	Μ
Phenylalanin	PHE	F
Prolin	PRO	Р
Serin	SER	S
Threonin	THR	Т
Tryptophan	TRP	W
Tyrosin	TYR	Y
Valin	VAL	V

Reaktionsansätze

Lysis-Puffer	100 mM Tris/HCl pH 7,5; 20% Glycerol; 0,1% Triton X-
	100; 200 mM NaCl; 1 mM β -Mercaptoethanol; 2 mM
	Phenylmethylsultonyltluorid; 10 mM Imidazol
Basis-Puffer	20 mM Tris/HCl pH 7,5; 10% Glycerol; 0,05% Triton X-
	100; 1 mM
	β-Mercaptoethanol
Wasch-Puffer	Basis-Puffer; 200 mM NaCl; 20 mM Imidazol
Elutions-Puffer	Basis-Puffer; 200 mM NaCl; 0,5 M Imidazol
TGT-Puffer	20 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 % Glycerol; 0,05% Triton X-
	100; 1 mM EDTA; 1 mM β-Mercaptoethanol
SDS-PAGE- "Upper" Puffer	125 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,1% SDS
SDS-PAGE- "Lower" Puffer	400 mM Tris/HCl pH 8.8; 0,1% SDS
SDS-PAGE-Lauf-Puffer	190 mM Glycerin; 25 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,1% SDS
SDS-PAGE-Färber	10% Essigsäure; 30% Ethanol; 0,1% Coomassie-Blau
SDS-PAGE-Entfärber	10% Essigsäure; 30% Ethanol
15%iges TBE-Gel	90 mM Tris-Borat; 20 mM EDTA pH 8,0; 0,1% SDS
Oligomarkierung-	50 mM Tris/HCl pH 6,8; 10 mM MgCl2; 5 mM DTT; 20 U
Reaktionsansatz	Polynukleotidkinase T4; 10,2 pM [y-32P] ATP (0,03 Ci)
Helikase-Assay-	20 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM β-Mercaptoethanol; 10%
Standardreaktionsansatz	Glycerol; 0,01% Triton X-100; 2 mM MgCl2; 0,1 mg/ml
	BSA
Helikase-Assay-Stopp-Puffer	100 μM Tris/HCl pH 7,5; 20 mM EDTA; 0,5% SDS; 0,1%
	Triton X-100; 25% Glycerol; 0,1% Bromophenolblau
ATPase-Assay-	20 mM Tris/HCl pH 7,5; 10% Glycerol; 0,01% Triton X-
Standardreaktionsansatz	100; 1 mM β-Mercaptoethanol; 3 mM MgCl2; 0,1 mg/ml
	BSA; 0,5 μCi [γ-32P]ATP
	//iLI_J

Danksagung

Ich danke Herrn Privatdozent Dr. P. Borowski für die Überlassung des interessanten Themas und Einführung in die Proteinbiochemie, leider ist es ihm nicht mehr möglich das Produkt der gemeinsamen Arbeit zu erleben. Prof. Dr. Schmitz danke ich für seine Unterstützung und für die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten und Geräte.

Sehr herzlich danke ich Herrn Prof. D. Shugar für die Überlassung der Benzimidazole und Benzotriazole und für anschließende Strukturanalysen, die wichtige Beiträge zu dieser Arbeit waren. D. Vikic-Topic danke ich für das überlassene nichthalogenierte α-DMRB.

Mein besonderer Dank gilt meinem derzeitigem Chefarzt Herrn Prof. B. Nashan, sowie meinem Oberarzt Herrn Privatdozent Dr. L. Fischer für die Unterstützung bei der Vollendung dieser Arbeit.

Auch möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie, bei meinen Freunden und insbesondere bei Anne-Kathrin Matouschek und Patrick Buchenau für die unermüdliche Toleranz und kritische Anteilnahme bedanken.

Erklärung

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 keinem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um die Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:

Halogenated benzimidazoles and benzotriazoles as inhibitors of the NTPase/helicase activities of hepatitis C and related viruses

Peter Borowski¹, Johanna Deinert¹, Sarah Schalinski¹, Maria Bretner², Krzysztof Ginalski^{3,4}, Tadeusz Kulikowski² and David Shugar^{2,4}

¹Abteilung fur Virologie, Bernhard-Nocht-Institut fur Tropenmedizin, Hamburg, Germany; ²Institute of Biochemistry & Biophysics, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland; ³BioInfoBank, Poznan, Poland; ⁴ICM, University of Warsaw, Poland

A search has been initiated for lead inhibitors of the nonstructural protein 3 (NS3)-associated NTPase/helicase activities of hepatitis C virus, the related West Nile virus, Japanese encephalitis virus and the human mitochondrial Suv3 enzyme. Random screening of a broad range of unrelated low-molecular mass compounds, employing both RNA and DNA substrates, revealed that 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (TBBT) hitherto known as a potent highly selective inhibitor of protein kinase 2, is a good inhibitor of the helicase, but not NTPase, activity of hepatitis C virus NTPase/helicase. The IC₅₀ is approximately 20 µм with a DNA substrate, but only 60 µм with an RNA substrate. Several related analogues of TBBT were enzymeand/or substrate-specific inhibitors. For example, 5,6-dichloro-1-(β-D-ribofuranosyl)benzotriazole (DRBT) was a good, and selective, inhibitor of the West Nile virus enzyme with an RNA substrate (IC₅₀ \approx 0.3 µM), but much weaker with a DNA substrate (IC₅₀ \approx 3 μ M). Preincubation of the enzymes, but not substrates, with DRBT enhanced inhibi-

Hepatitis C virus (HCV) infection, which results in chronic or acute hepatitis, and may lead to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma, is currently known to affect more than 3% of the population worldwide. No vaccine has been developed as yet, and current therapy, based on the use of α -interferon, alone or in combination with the antiviral

tory potency, e.g. the IC_{50} vs the hepatitis C virus helicase activity was reduced from 1.5 to 0.1 µm. No effect of preincubation was noted with TBBT, suggesting a different mode of interaction with the enzyme. The tetrachloro congener of TBBT, 4,5,6,7,-tetrachlorobenzotriazole (TCBT; a much weaker inhibitor of casein kinase 2) is also a much weaker inhibitor than TBBT of all four helicases. Kinetic studies, supplemented by comparison of ATP-binding sites, indicated that, unlike the case with casein kinase 2, the mode of action of the inhibitors vs the helicases is not by interaction with the catalytic ATP-binding site, but rather by occupation of an allosteric nucleoside/nucleotide binding site. The halogeno benzimidazoles and benzotriazoles included in this study are excellent lead compounds for the development of more potent inhibitors of hepatitis C virus and other viral NTPase/helicases.

Keywords: NTPase/helicases; hepatitis C and related viruses; inhibitors; halogenated benzimidazoles/benzotriazoles.

agent ribavirin, is only moderately effective [1-4]. The broad-spectrum antiviral ribavirin itself has recently been shown to act as an RNA virus mutagen [5]. Surprisingly, efforts to develop effective antiHCV agents have hitherto been limited.

The HCV genome encodes a polyprotein, which is then cleaved into 10 structural and nonstructural (NS) proteins. One of these is the so-called NS3 protein, which exhibits serine protease activity at the N-terminus, and helicase and nucleotide triphosphatase (NTPase) activities at the C-terminus [4,6]. The helicase activity of NS3, which plays a key role in viral replication, appears to be an exceptionally attractive target for termination of viral replication [7,8].

Computer-assisted sequence analysis of known and putative NTPase/helicases has led to their classification as three superfamilies (SF1, SF2 and SF3), and a smaller group referred to as family 4 [9–11]. All four contain the Walker A and B box sequences known to be involved in NTP binding and hydrolysis [12]. Crystal structures of the SF1 DNA NTPase/helicases from *Escherichia coli* and *Bacillus stearothermophilus*, and of the SF2 HCV RNA NTPase/helicase, have confirmed the functions of these conserved motifs [13–16]. Blockage of the NTP-binding site leads to inhibition of NTPase activity [17]. Binding studies by Porter [18] have revealed two nucleotide-binding sites in the HCV NTPase/helicase, the location and function of the

Correspondence to P. Borowski, Abteilung fur Virologie, Bernhard-Nocht-Institut fur Tropenmedizin, D-20359 Hamburg, Germany. Fax: +49 40 42818378, Tel.: +49 40 42818458,

E-mail: borowski@bni.uni-hamburg.de and D. Shugar, Institute of Biochemistry & Biophysics, Polish Academy of Sciences,

⁵a Pawinskiego St., 02–106 Warsaw, Poland.

Fax/Tel.: +48 39 121623, E-mail: shugar@ibb.waw.pl

Abbreviations: HCV, Hepatitis C virus; WNV, West Nile virus; JEV, Japanese encephalitis virus; Suv3, mitochondrial human NTPase/ helicase; NS3, nonstructural protein 3; NTPase, nucleoside triphosphatase; CK2, casein kinase 2; DRB, 5,6-dichloro-1-(β -D-ribofuranosyl)benzimidazole; DBRB, 5,6-dibromo-1-(β -D-ribofuranosyl) benzimidazole; DRBT, 5,6-dichloro-1-(β -D-ribofuranosyl)benzotriazole; α -DMRB, 5,6-dimethyl-1-(α -D-ribofuranosyl)benzimidazole; TCBT, 4,5,6,7,-tetrachlorobenzotriazole; TBBT, 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole.

⁽Received 17 September 2002, revised 12 December 2002, accepted 20 December 2002)

second being as yet unknown. However, there is accumulating evidence that the NTPase and helicase activities of the SF2 family enzymes may be modulated by occupation of these putative nucleotide-binding sites. Ribavirin-5'-triphosphate, a potent classical competitive inhibitor of the NTPase activities of the West Nile virus (WNV) and HCV NTPase/helicases at low ATP concentrations ($< K_m$), failed to inhibit the ATPase activities at high ATP concentrations ($> K_m$) and, indeed, even stimulated enzyme activity. By contrast, ribavirin-5'-triphosphate moderately inhibits the helicase activities of both enzymes by a mechanism that is independent of the ATP concentration [19–21], most likely due to occupation of the second nucleotide binding site.

Several attempts to develop HCV NTPase/helicase inhibitors have been described. Two series of such compounds, previously reported only in patents [22,23], are composed of two benzimidazole, or aminophenylbenzimidazole, moieties attached to symmetrical linkers of variable lengths. These were reported to exhibit IC_{50} values for inhibition of the HCV helicase activity in the low micromolar range, subsequently confirmed and extended in a Structure–Activity Relationship (SAR) study reported by Phoon *et al.* [24]. Somewhat less effective are several aminothiadiazoliums, again described only in patents [25].

During the course of random screening of a wide range of unrelated compounds in a search for lead inhibitors of HCV NTPase/helicase activities, it was noted that 4,5,6,7tetrabromobenzotriazole (TBBT), previously reported as a highly selective inhibitor of protein kinase 2 (CK2) [26,27], is a good inhibitor of the helicase activity, with an IC₅₀ in the low micromolar range. We herein describe the inhibitory properties of TBBT, and a number of related benzotriazoles and benzimidazoles, at the NTPase/helicase sites of HCV and the related viruses Japanese encephalitis virus (JEV) and WNV, as well as the human NTPase/ helicase Suv3.

Materials and methods

Materials

DNA oligonucleotides were prepared by M. Schreiber (Bernhard-Nocht-Institute, Hamburg, Germany). RNA oligonucleotides were purchased from HHMI Biopolymer/Keck Foundation, Biotechnology Resource Laboratory, Yale University School of Medicine (New Haven, CT, USA). $[\gamma^{-32}P]ATP$ (220 Tbq·mmol⁻¹) and $[\gamma^{-33}P]ATP$ (110 Tbq·mmol⁻¹) were from Hartman Analytic. All other chemicals were obtained from Sigma.

Halogenated benzimidazole and benzotriazole nucleosides were synthesized as described previously [27,28 and references therein]. We are indebted to D. Vikic-Topic (Ruder Boskovic Institute, Zagreb, Croatia) for the gift of the nonhalogenated 5,6-dimethyl-1-(α -D-ribofuranosyl) benzimidazole (α -DMRB), a key constituent of vitamin B₁₂.

Synthesis of 4,5,6,7,-tetrachlorobenzotriazole (TCBT)

TCBT (4,5,6,7,-tetrachlorobenzotriazole) was synthesized by chlorination of benzotriazole according to the modified procedure of Wiley *et al.* [29]. The yield was 65%, with TLC values of $R_{\rm F}$ 0.13 (CHCl₃ + MeOH, 100 + 1), melting point 254–256 °C, lit. [29] 256–260 °C, and UV values of pH 2, λ_{max} 273 nm (7900), 282 nm (8600), 299 nm (5900), pH 6, λ_{max} 290 nm (11 300), 296 nm (11 500), 308 nm (6460); pH 12, λ_{max} 290 nm (13 000), 296 nm (13 180), 308 nm (7670), ¹³C NMR (d₆ dimethylsulfoxide), 137.508; 127.937; 118.841. Mass spectroscopy gave m/z (MH⁺), 257.9102; theoretical value for C₆H₂Cl₄N₃ MH⁺, 257.917.

Synthesis of 4,5,6,7,-tetrabromobenzotriazole (TBBT)

TBBT was synthesized by modification of bromination procedure described by Wiley *et al.* [29]. The yield was 60%, with TLC values of $R_{\rm F}$ 0.16 (CHCl₃ + MeOH, 100 + 1), melting point 264–266 °C, lit. [29] 262–266 °C, and UV values of MeOH, $\lambda_{\rm max}$ 288 nm (9600), 300 nm (8670), 311 nm (6000), pH 2, $\lambda_{\rm max}$ 279 nm (3400), 289 nm (3500), 303 nm (2800) pH 6–12, $\lambda_{\rm max}$ 291 nm (10 800), 299 nm (10 250), 310 nm (6670), ¹³C NMR (d₆ dimethylsulfoxide), 143.002; 136.862; 124.637, 113.233; 107.122. Mass spectroscopy gave m/z (MH⁺), 435.872; theoretical value for C₆H₂Br₄N₃ MH⁺, 435.718.

Sources and purification of HCV, JEV, Suv3(Δ 1-159) and WNV NTPase/helicases

The NTPase/helicase domain of HCV NS3 was expressed in E. coli and purified as described previously [30], with certain modifications. The bacteria were collected by centrifugation (5000 g for 1 h at 4 °C) and disrupted by sonication in lysis buffer (100 mM Tris/HCl pH 7.5, 20% glycerol, 0.1% Triton X-100, 200 mM NaCl, 1 mM β-mercaptoethanol, 2 mм phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mм imidazole). Insoluble material was pelleted at 26 000 g and the supernatant mixed with 3 mL nickel-charged resin (Qiagen) equilibrated with buffer containing 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 10% glycerol, 0.05% Triton X-100 and 1 mM β -mercaptoethanol) for 12 h. The matrix was transferred to a column and washed with the foregoing buffer supplemented with 200 mM NaCl and 20 mM imidazole. Bound protein, eluted with 0.5 M imidazole in the same buffer, to a purity of 65-70%, was concentrated by ultrafiltration on a 30-kDa membrane and fractionated on a Superdex-200 column (Hi-Load; Amersham Pharmacia Biotech) equilibrated with TGT buffer (20 mM Tris/HCl pH 7.5, 10% glycerol, 0.05% Triton X-100, 1 mм EDTA, 1 mm β -mercaptoethanol). Fractions containing most of the ATPase and helicase activities ($\approx 80\%$) were pooled and used to investigate the enzyme properties.

The JEV NTPase/helicase was expressed in *E. coli* [31] and purified according to the protocol for the HCV enzyme, as above.

N-terminally truncated Suv3 NTPase/helicase, Suv3(Δ 1-159), was expressed in *E. coli*. A 1881-bp fragment of the human Suv3 cDNA, coding for Suv3 protein truncated 159 aa from the amino terminus, was amplified by PCR using the following primers: forward, 5'-CATGCC ATGGCGCCATTTTTCTTGAGACATGCC-3'; reverse, 5'-CTGGGATCCGTCCGAATCAGGTTCCTTC-3' (purchased from Sigma), and the pKK plasmid as a template [32]. The resulting fragment was cloned into *NcoI* and *Bam*HI sites of the pQE60 expression vector (Qiagen). Sequences of both strands were verified, using an ABI Prism



Fig. 1. SDS/PAGE analysis of the NTPase/helicases used in this study. Aliquots of the final preparation of the HCV (1.2 µg protein, lane 1), WNV (5.5 µg protein, lane 2), JEV (1.5 µg protein, lane 3), and Suv3(Δ 1–159) NTPase/helicases (1.0 µg protein, lane 4) were separated by SDS/PAGE followed by staining with Coomassie blue. Molecular mass markers are indicated on the left. Arrows indicate the locations of the NTPase/helicases.

377 DNA Sequencer. The His-tagged Suv3(Δ 1–159) was purified by the method described above for HCV NTPase/helicase.

The final preparations of the enzymes were homogenous, as demonstrated by Coomassie Blue staining of SDS/ polyacrylamide gels (Fig. 1, lanes 1,3,4).

The WNV NTPase/helicase was purified from the cell culture medium of virus-infected Vero E6 cells as described previously [20], with some modifications. Briefly, the concentrated cell culture medium was mixed with 10 mL Reactive Red120 agarose (Sigma) equilibrated with TGT buffer for 4 h at 4 °C. The matrix was collected by sedimentation, transferred to a column and washed with TGT buffer. Bound protein was eluted with 1 M KCl in the same buffer, concentrated by ultrafiltration on a 30-kDa membrane to a final volume of 2 mL, and subjected to gel exclusion chromatography on a Superdex-200 column. Fractions expressing ATPase and helicase activities were chromatographed again on Reactive Red120 agarose (5 mL) as described above. The salt-eluted protein was precipitated with poly(ethylene glycol) (30%, w/w), collected by centrifugation (5000 g for 1 h at 4 °C) solubilized with TGT buffer, and applied to a hydroxyapatite (HA-Ultrogel) column preequilibrated with TGT buffer. The column was washed with 10 mL TGT buffer, then with 2 mL TGT buffer containing 1 м KCl, and again with 5 mL TGT buffer. The NTPase/helicase was eluted with 1 mL TGT buffer containing 50 mM KH₂PO₄, precipitated with poly(ethylene glycol) and dissolved in TGT buffer. The analysis of the final enzyme preparation by Coomassie bluestained SDS/PAGE revealed two proteins with molecular masses of 66 and 60 kDa. N-terminal sequencing allowed the identification of these proteins as BSA and WNV NTPase/helicase (Fig. 1, lane 2) [20].

Protein concentrations of preparations of the NTPase/ helicases were determined by SDS/PAGE as described by Hames and Rickwood [33]. Kinetic parameters were determined by nonlinear-regression analysis using ENZFIT-TER (BioSoft) and SIGMA PLOT (Jandel Corp.).

ATPase and helicase assays

ATPase activity of the NTPase/helicases was determined as described previously [17,19,20]. Briefly, assays were performed with 2 pmol of WNV, 0.5 pmol of HCV, 4 pmol of JEV or 0.2 pmol of Suv3($\Delta 1$ –159) NTPase/helicases. The enzymes were incubated in a reaction mixture (final volume 25 μ L) containing 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 2 mM MgCl₂, 1 mM β -mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.01% Triton X-100, 0.1 mg·mL⁻¹ BSA, 25 nCi [γ -³³P]ATP, and ATP adjusted to concentrations corresponding to the K_m values determined for the ATPase reaction of each of the NTPase/helicases. The reaction was conducted for 30 min at 30 °C and terminated by addition of 0.5 mL activated charcoal (2 mg·mL⁻¹). Following centrifugation at 10 000 *g* for 10 min, 100 μ L aliquots of the supernatant were removed and subjected to scintillation counting.

Helicase activity was tested with 2 pmol WNV, 0.5 pmol HCV, 4 pmol JEV or 0.2 pmol of Suv3(Δ 1–159) NTPase/ helicase. Unwinding of the partially hybridized DNA or RNA substrate (4.7 pm of nucleotide base) was monitored in a reaction mixture (final volume 25 µL) containing 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 2 mM MgCl₂, 1 mM β-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.01% Triton X-100, 0.1 mg mL⁻¹ BSA and ATP at concentrations indicated in the figure legends. The reaction was conducted for 30 min at 30 °C and stopped by addition of 5 µL termination buffer (100 µm Tris/HCl pH 7.5, 20 mm EDTA, 0.5% SDS, 0.1% Triton X-100, 25% glycerol and 0.1% bromophenol blue). Samples were fractionated on a 15% Tris/borate/ EDTA polyacrylamide gel containing 0.1% (w/w) SDS [20]. The gels were dried and exposed to Kodak X-ray films at -70 °C. The areas of the gels corresponding to the released strand and to the nonunwound substrate were cut out and ³²P radioactivity counted. Alternatively, the films were scanned and the radioactivity associated with the released strand and with the nonunwound substrate quantified with GELIMAGE software (Amersham Pharmacia Biotech). Assays were carried out with the same level of enzyme activity, as determined with the DNA substrate under conditions described above.

Effect of preincubation of compounds with enzyme on unwinding and hydrolysis efficacy

The selected enzyme was preincubated with a given compound at 30 °C in 20 μ L of TGT buffer for various periods of time and various concentrations of compound. The unwinding reaction was then initiated by addition of MgCl₂, ATP, BSA and DNA or RNA substrate at concentrations used in the standard helicase assay. ATP hydrolysis was started by the addition of MgCl₂, ATP and BSA at concentrations used in the ATPase assay, in 10 μ L





Table 1. Inhibition by benzimidazoles and benzotriazoles of the helicase activities of the enzymes from HCV, WNV, JEV and Suv3(Δ 1–159), with use of a DNA substrate. Helicase activity was determined as a function of increasing concentrations of the compounds in the presence of ATP adjusted to 9.5 μ M, 105 μ M, 235 μ M and 4.2 μ M for WNV, HCV, JEV and Suv3(Δ 1–159) NTPase/helicases, respectively, and 4.7 pmol of DNA substrate (concentration of nucleotide base) as described in Materials and methods. K_i values for inhibition of protein kinase CK2 are from refs [26–28].

Inhibitor	ІС ₅₀ (μм)				
	HCV	WNV	JEV	Suv3(Δ1–159)	CKII
DBRB	320	> 500	> 500	> 500	8
DRBT	1.5	3.0	> 500	5.5	_
DRB	450	> 500	> 500	> 500	24
α-DMRB	108	> 500	> 500	> 500	_
TCBT	380	27	> 500	> 500	6
TBBT	20	1.7	200	50	0.6

TGT buffer. In control experiments, the NTPase/helicase was preincubated alone under the same conditions.

Substrates for helicase reactions

The RNA substrate for the helicase assays consisted of two partially hybridized oligonucleotides with sequences as reported by Gallinari et al. [34]. The DNA substrate was obtained by annealing two DNA oligonucleotides synthesized with sequences corresponding to the deoxynucleotide versions of the aforementioned RNA strands. The release strands (26-mer) were 5'-end labeled with $[\gamma^{-32}P]ATP$, using T4 polynucleotide kinase (MBI, Fermentas) as recommended by the manufacturer. For the annealing reaction the labelled oligonucleotide was combined at a molar ratio of 1:10 with the template strand (40-mer), denatured for 5 min at 96 °C and slowly renatured as described elsewhere [20]. The duplex DNA was electrophoresed on a 15% native Tris/borate/EDTA polyacrylamide gel, visualized by autoradiography and extracted as described previously [20]. The amount of DNA or RNA duplex used as substrate for the WNV NTPase/helicase was determined by the ethidium bromide fluorescent quantitation method [35].

Results

The DNA helicase activity of the HCV enzyme, monitored under optimal conditions [20,21] in the presence of 105 μM

ATP, corresponding to the $K_{\rm m}$ for ATP in the ATPase reaction, was followed in the presence of varying concentrations of the benzimidazole and benzotriazole analogues (Fig. 2). The resulting IC₅₀ values for inhibition of helicase activity, compared with the respective inhibitory parameters of the phosphorylation reaction catalysed by CK2, are listed in Table 1. The same results, shown in Fig. 3A, demonstrate more clearly the potent inhibitory effects of DRBT and TBBT, particularly the almost total inhibition of activity by 10 μ M of the former.

In the helicase assay, performed with the HCV NTPase/ helicase, changes in the ATP concentration over the range $0.1-1000 \ \mu\text{M}$, and in the DNA substrate concentration in the range $1.6-14.7 \ \text{pM}$, did not detectably affect the measured IC₅₀ values of the inhibitors. It may be concluded that the inhibitors do not compete with ATP (see below). However the concentration range of the DNA substrate was necessarily too limited to draw any conclusion regarding the mode of inhibition, because, as previously shown with the WNV NTPase/helicase [20] strong substrate/product inhibition of the unwinding reaction by the HCV enzyme was observed when the DNA substrate concentration exceeded 15 pm (not shown).

The responses of the helicase activities of the other three enzymes towards the various compounds, determined with the DNA substrate, were monitored at ATP concentrations corresponding to their respective $K_{\rm m}$ values in the ATPase reactions, that is 9.5 μ M for WNV, 235 μ M for JEV and 4.2 μ M for Suv3(Δ 1–159). Overall results for all four

Fig. 3. Inhibition of (A) helicase activity with a DNA substrate and (B) ATPase activity of purified HCV NTPase/helicase by various concentrations of benzimidazole and benzotriazole analogues, added to the reaction medium simultaneously with the enzyme. Unwinding and hydrolytic activities in the absence of inhibitor were taken as 100%: DRB (■), DBRB (●), DRBT (▼), α-DMRB (▲), TCBT (♦), TBBT (O). (C) Autoradigraphy demonstrating inhibition of purified WNV NTPase/helicase by DRBT with an RNA substrate. The reaction was conducted in the absence (lanes 1,2,7) or in the presence of DRBT at 0.3 µM (lane 3), 1.0 µM (lane 4), 3.0 µM (lane 5), 10 µM (lane 6), all added to the reaction mixture simultaneously with enzyme. Lanes 1 and 7, the reaction mixture did not include enzyme and the substrate was heat-denatured (lane 1) or native (lane 7). The reaction was stopped by the addition of termination buffer, and substrate separated from released product on a Tris/borate/EDTA polyacrylamide gel. The dried gel was exposed to Kodak X-ray film at -70 °C for 12 h.

NTPase/helicases are presented in Table 1. It should be noted that DRBT (with a benzotriazole ring) is a micromolar inhibitor (IC₅₀ of 1.5–5.5 μ M) of the helicase activities of HCV, WNV and Suv3(Δ 1–159), but not JEV.

The tetrachlorobenzotriazole TCBT is only a weak inhibitor of the HCV enzyme, and a moderate inhibitor of the WNV helicase activity, whereas the corresponding tetrabromobenzotriazole TBBT is 20-fold more effective against both these enzymes. Even in the case of the JEV and Suv3(Δ 1–159) enzymes, where TCBT is almost inactive, its replacement by TBBT leads to measurable inhibition. It is noteworthy that CK2 displayed a similar pattern of response to TBBT and TCBT [27].

Somewhat unexpected was the finding that, using the RNA substrate, the compounds examined (with the exception of TBBT) were much weaker inhibitors of the helicase activities of the HCV, JEV and Suv3(Δ 1–159) NTPase/helicases (Table 2). A notable exception was the WNV enzyme, for which all compounds, but not α -DMRB, were comparable, or more effective (DRBT, DRB) inhibitors, shown in the case of DRBT in Fig. 3C.

The two most effective inhibitors of the HCV helicase activity, DRBT and TBBT (Table 1) differ significantly in their mechanisms of action. Inhibition by DRBT was dramatically increased when it was preincubated with the enzyme in the absence of the DNA substrate. Preincubation for 15, 30 and 45 min, followed by addition of the substrate, led to IC_{50} values of 1.1 μ M, 0.45 μ M and 0.1 μ M, respectively, and, after 60 min preincubation with the enzyme, attained a plateau level at $IC_{50} = 0.09 \ \mu$ M (Fig. 4A). No such effect of preincubation was observed with TBBT. Furthermore, control experiments, in which DRBT was preincubated with the DNA substrate, had no effect on the IC_{50} values.

The amino acid sequence of the N-terminal region of Suv3(Δ 1–159) NTPase/helicase is highly homologous to domains I and II, but not III, of HCV NTPase/helicase. Consequently, it is of interest that preincubation of Suv3(Δ 1–159) NTPase/helicase with DRBT, but not with TBBT, led to a similar enhancement of inhibition as observed with HCV NTPase/helicase (data not shown).

Attention was then directed to the effects of the various analogues on the ATPase activity of the HCV enzyme, monitored by release of ³³P from $[\gamma^{-33}P]ATP$. At an ATP



concentration corresponding to its $K_{\rm m}$ (105 µM), none of the compounds, at concentrations up to 500 µM, exhibited detectable inhibition (Fig. 3B). Even in the case of DRBT an extensive preincubation with the enzyme did not lead to

Table 2. Inhibition by benzimidazoles and benzotriazoles of the helicase activities of the enzymes from HCV, WNV, JEV and Suv3(Δ 1–159), with the use of an RNA substrate. Helicase activity was determined as described in Table 1 with 4.7 pmol of RNA substrate (concentration of nucleotide base).

Inhibitor	IC ₅₀ (µм)			
	HCV	WNV	JEV	Suv3(Δ1–159)
DBRB	> 500	245	> 500	> 500
DRBT	> 500	0.3	> 500	> 500
DRB	> 500	12	> 500	> 500
α-DMRB	> 500	> 500	> 500	> 500
TCBT	> 500	15	> 500	480
TBBT	60	0.9	250	200

noteworthy inhibition of the ATPase activity (Fig. 4B). This was also the case when the ATP concentration was reduced stepwise to as low as 10^{-5} of its $K_{\rm m}$ value. It clearly follows that none of the inhibitors competes for the ATP-binding site(s) of the NTPase.

Discussion

The NS3-associated helicase activity has long been considered an attractive target for development of effective drugs against HCV and related flaviviruses, because of its key role in viral replication [7,8,36]. Drugs targeting the unwinding activity could act via one or more of the following mechanisms [37]: (a) inhibition of ATPase activity by interfering with ATP binding and therefore by limiting the energy necessary for the unwinding, (b) inhibition of ATP hydrolysis or release of ADP by blocking opening or closing of domain 2, (c) inhibition of RNA (or DNA) substrate binding, (d) inhibition of unwinding by sterically blocking helicase translocation or (e) inhibition of coupling of ATP hydrolysis to unwinding.

The present study describes several halogenated benzimidazoles and benzotriazoles which inhibit the unwinding reaction of three selected viral SF2 NTPase/helicases and, albeit to a lesser extent, the SF1 human enzyme Suv3. Inhibition is not accompanied by any change in ATPase activity. Although the inhibitory effect appears to result from direct interaction of the compounds with the enzymes, some action at the level of the RNA and/or DNA substrates cannot be unequivocally excluded. Various benzimidazole analogues have been demonstrated to intercalate into dsRNA and/or dsDNA structures [38–40], and may modify their properties as substrates for NTPase/helicases, as is the case with some imidazo[4,5-d]pyridazine derivatives [41]. Moreover, the interaction of these compounds with RNA and/or DNA appears to be dependent on the base sequence of the polynucleotide [42].

It is intriguing that the potent inhibitor of the HCV and WNV NTPase/helicases, TBBT, is a specific ATP-competitive inhibitor of protein kinase CK2, originally developed to discriminate between protein kinases CK1 and CK2 [27], and subsequently shown to exhibit striking selectivity towards CK2 amongst more than 30 serine/threonine and tyrosine protein kinases [26]. In the crystal structure of the complex of the catalytic subunit of Zea mays CK2 with TBBT [43], the latter is located in the CK2 active site normally occupied by the purine moieties of the natural substrates ATP and GTP, oriented roughly in the same plane as the purine bases, and embedded deeply in the hydrophobic pocket of CK2, fitting the protein cavity almost perfectly (Fig. 5A). The protein-inhibitor interactions are almost exclusively hydrophobic and, given the bulkiness of the bromine atoms, these are primarily responsible for the hydrophobic interactions with the apolar chains of CK2. The only polar interaction, mediated by a pair of hydrogen-bonded water molecules, involves the N(1) of the TBBT triazole ring and two charged side-chains of the protein [43]. TCBT, with the less bulky chlorine atoms, is a much weaker inhibitor of CK2 [27].

Figure 5A demonstrates that, in the HCV NS3 NTPase/ helicase, ATP binds in the cleft between domains 1 and 2, largely via interactions with motifs I (GxGKS/T) and II (DexH) on domain 1. The relative location of ATP in the





Fig. 4. (A) Effect of preincubation for various time periods of HCV NTPase/helicase with DRBT on the inhibition of helicase activity with a DNA substrate and (B) on inhibition of its ATPase activity. Aliquots of the enzyme were incubated in the presence of increasing concentrations of DRBT, or in its absence, for 15 min (\mathbf{V}) , 30 min (\mathbf{O}) , 45 min (\mathbf{D}) , 60 min (\mathbf{A}) and 90 min (\mathbf{O}) .



Fig. 5. Comparison of ATP binding in HCV NS3 helicase and protein kinase CK2. (A) Ribbon diagram of HCV NS3 helicase complexed with MgATP and ssDNA. Conserved motifs involved in ATP binding, with motif I (phosphate-binding motif, or Walker motif A [12]), motif II (Mg^{2+} -binding motif, or Walker motif B) and motif VI shown in red. (B) Ribbon diagram of CK2 kinase catalytic subunit complexed with MgATP. ATP-binding motifs, Gly-rich loop (Walker motif A) and DFG loop (Mg^{2+} -binding motif comprising DWG sequence in CK2), are shown in red. Mg^{2+} ions are shown as white spheres.

complex of the HCV NS3 NTPase/helicase with dU8 oligonucleotide (Protein Data Bank number 1A1V) [15] was derived from the UvrB/ATP complex (Protein Data Bank number 1D9Z) [44] following superposition of domains 1 and 1a of NS3 and UvrB, respectively. As revealed by the Dali server [45], the structure of HCV NS3 NTPase/helicase shares highest similarity with UvrB, a DNA helicase adapted for nucleotide excision repair, and a member of the same helicase II superfamily, in contrast to PcrA helicase, which belongs to the helicase I superfamily [46]. Both structures, NTPase/helicase complexed with dU8, and UvrB complexed with ATP, represent open forms of the enzymes and, as revealed by the crystal structure of PcrA helicase [16], additional interdomain (domain closure), and intradomain and side-chain conformational changes, occur upon binding of ATP and nucleic acid to ensure ATPase activity.

Analysis of the mode of binding of ATP in the HCV NTPase/helicase structure explains why TBBT is not an ATP-competitive inhibitor. In the HCV NTPase/helicase, ATP binds in a manner opposite to that in protein kinases, with the adenine ring directed away from the cleft between domains (Fig. 5). TBBT, as a specific inhibitor of CK2, mimics the purine ring of ATP in the complex with CK2, being deeply buried in the active site hydrophobic pocket between the upper and lower domains. If it were an ATP-competitive inhibitor of HCV NS3 NTPase/helicase, it would occupy the position of the adenine ring in the opening of the wide cleft between domains 1 and 2. Bearing in mind that the inhibitory potency of TBBT depends largely on complementarity of hydrophobic surfaces, this part of the cleft is too large to allow for its tight binding, even after

domain closure. Moreover, closure of the cleft between domains 1 and 2 is considered to be driven largely by interactions of arginine residues from motif VI (ORxGRxGR) in domain 2 with the phosphate groups of ATP [15]. It appears highly unlikely that TBBT binding could lead to such structural changes. Finally, surface regions where the sugar and triphosphate moieties of ATP bind are highly polar (data not shown). Consequently TBBT must inhibit the helicase by one of the mechanisms (c-e) referred to above. Attempts to understand the inhibitory mechanism of TBBT at the atomic level, from the threedimensional structure of the NS3 NTPase/helicase, are currently the subject of more detailed docking studies. The mechanism of inhibition by DRBT appears to be somewhat different and needs, in contrast to TBBT, more than 60 min to develop full inhibitory activity. The cause of the slow interaction with the enzyme remains unclear, but not without precedence. Our previous observations with 5'-O-(4-fluorosulfonylbenzoyl)adenosine (FSBA) demonstrated that this compound also requires 90-120 min for blockade, accompanied by covalent binding to site(s) of WNV NTPase/helicase [20].

Finally, attention should be drawn to the fact that benzimidazoles and their nucleosides, including halogenated analogues, have long been known as inhibitors of replication of various viruses. The earlier literature, extensively reviewed by Tamm and Caliguri [47], has been updated by Townsend *et al.* [48]. More recently reported inhibitors of HCV (see Introduction) include *bis*-benzimidazole analogues.

Particularly relevant are the 2,5,6-trihalogeno-1-β-D-ribosylbenzimidazoles reported as potent and selective inhibitors of human cytomegalovirus replication [49]. Unlike many other antiviral nucleoside analogues, which require intracellular phosphorylation for antiviral activity [50], these compounds have been shown to act as such, and it has been proposed that their mechanism of action is via inhibition of the products of the human cytomegalovirus genes UL89 and UL56 [49]. It is, however, of some significance that the same authors [48] had earlier noted that the heterocyclic bases themselves, i.e. the 2,5,6-trihalogenobenzimidazoles, are also good inhibitors, but were not further studied because of their higher cytotoxicities in uninfected cells. It appears to us that further studies on the inhibitory properties of these bases should prove helpful in delineating their mechanism of action, as well as those of their nucleosides. It is conceivable that these bases, and/or their nucleosides, may be NTPase/helicase inhibitors, bearing in mind that herpes viruses possess two NTPase/helicases [51].

Acknowledgements

This research was supported by EC grants EMBEU No. ICA 1-CT-2000-70010 and FP5 RTD No. QLRT-2001-01079.

References

- McHutchison, J.G., Gordon, S.C., Schiff, E.R., Shiffman, M.L., Lee, W.M., Rustgi, V.K., Goodman, Z.D., Ling, M.H., Cort, S. & Albrecht, J.K. (1998) Interferon α-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N. Engl. J. Med.* 339, 1485–1492.
- Cummings, K.J., Lee, S.M., West, E.S., Cid-Ruzafa, J., Fein, S.G., Aoki, Y., Sulkowski, M.S. & Goodman, S.N. (2001) Interferon and ribavirin vs interferon alone in the re-treatment of chronic hepatitis C previously nonresponsive to interferon: a metaanalysis of randomized trials. JAMA 285, 193–199.
- Tam, R.C., Lau, J.Y.N. & Hong, Z. (2002) Mechanisms of action of ribavirin in antiviral therapies. *Antiviral Chem. Chemother.* 12, 261–272.
- Wang, Q.M. & Heinz, B.A. (2000) Recent advances in prevention and treatment of hepatitis C virus infections. *Prog. Drug Res.* 55, 1–32.
- Crotty, S., Maag, D., Arnold, J.J., Zhong, W., Lau, J.Y.N., Hong, Z., Andino, R. & Cameron, C.E. (2000) The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat. Med.* 6, 1375–1379,.
- Rosenberg, S. (2001) Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. J. Mol. Biol. 313, 451–464.
- Matusan, A.E., Pryor, M.J., Davidson, A.D. & Wright, P.J. (2001) Mutagenesis of the dengue virus type 2 NS3 protein within and outside helicase motifs: Effects on enzyme activity and virus replication. J. Virol. 75, 9633–9643.
- Gu, B., Liu, C., Lin-Goerke, J., Malley, D.R., Gutshall, L.L., Feltenberger, C.A. & Del Vecchio, A.M. (2000) The RNA helicase and nucleotide triphosphatase activities of the bovine viral diarrhea virus NS3 protein are essential for viral replication. *J. Virol.* 74, 1794–1800.
- Gorbalenya, A.E. & Koonin. E.V. (1993) Helicases: Amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 419–429.
- Ilyina, T.V. & Koonin, E.V. (1992) Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaebacteria. *Nucleic Acids Res.* 20, 3285.

- Ilyina, T.V., Gorbalenya, A.E. & Koonin, E.V. (1992) Organization and evolution of bacterial and bacteriophage primase-helicase systems. J. Mol. Evol. 34, 351–357.
- 12. Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. & Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**, 945–951.
- Korolev, S., Hsieh, J., Gauss, G.H., Lohman, T.M. & Waksman, G. (1997) Major domain swiveling revealed by the crystal structures of complexes of *E. coli* Rep helicase bound to single stranded DNA and ADP. *Cell* **90**, 635–647.
- Yao, N., Hesson, T., Cable, M., Hong, Z., Kwong, A., Le, H. & Weber. P. (1997) Structure of the hepatitis C virus RNA helicase domain. *Nat. Struct. Biol.* 4, 463–467.
- Kim, J.L., 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.
- Velankar, S.S., Soultanas, P., Dillingham, M.S., Subramanya, H.S. & Wigley, D.B. (1999) Crystal structures of complexes of PcrA DNA helicase with a DNA substrate indicate an inchworm mechanism. *Cell* 97, 75–84.
- Borowski, P., Kühl, R., Mueller, O., Hwang, L.-H., 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. *Eur. J. Biochem.* 266, 723.
- Porter, D. (1998) Inhibition of the hepatitis C virus helicaseassociated ATPase activity by the combination of ADP, NaF, MgCl2, and poly (rU). J. Biol. Chem. 273, 7390–7396.
- Borowski, P., Mueller, O., Niebuhr, A., Kalitzky, M., Hwang, L.-H., Schmitz, H., Siwecka, M.A. & Kulikowski, T. (2000) ATP binding domain of NTPase/helicase as target for hepatitis C antiviral therapy. *Acta Biochim. Polon.* 47, 173–180.
- Borowski, P., Niebuhr, A., Mueller, O., Bretner, M., Felczak, K., Kulikowski, T. & Schmitz, H. (2001) Purification and characterization of West Nile virus nucleoside triphosphatase (NTPase)/ helicase: evidence for dissociation of the NTPase and helicase activities of the enzyme. J. Virol. 75, 3220–3229.
- Borowski, P., Lang, M., Niebuhr, A., Haag, A., Schmitz, H., Schulze zur Wiesch, J., Choe, J., Siwecka, M.A. & Kulikowski, T. (2001) Inhibition of the helicase activity of HCV NTPase/helicase by 1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3 carboxamide-5'-triphosphate (ribavirin-TP). *Acta Biochim. Polon.* 48, 739–744.
- 22. Diana, G.D. & Bailey, T.R. (1997) Patent. US5633388.
- 23. Diana, G.D., Bailey, T.R. & Nitz, T.J. (1997) Patent. WO9736554.
- Phoon, C.W., Ng, P.Y., Tong, A.E., Yeo, S.L. & Sim, M.M. (2001) Biological evaluation of hepatitis C virus helicase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 1647–1650.
- Janetka, J.W., Ledford, B.E. & Mullican, M.D. (2000) Patent. WO0024725.
- Sarno, S., Reddy, H., Meggio, F., Ruzzene, M., Davies, S.P., Donella-Deana, A., Shugar, D. & Pinna, L.A. (2001) Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). *FEBS Lett.* **496**, 44–48.
- Szyszka, R., Grankowski, N., Felczak, K. & Shugar, D. (1995) Halogenated benzimidazoles and benzotriazoles as selective inhibitors of protein kinases CK I and CK II from *Saccharomyces cerevisiae* and other sources. *Biochem. Bioophys. Res. Commun.* 208, 418–424.
- Dobrowolska, G., Muszynska, G. & Shugar, D. (1991) Benzimidazole nucleoside analogues as inhibitors of plant (maize seedling) casein kinases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1080, 226.
- Wiley, R.H. & Hussung, K.F. (1957) Halogenated benzotriazoles. J. Am. Chem. Soc. 79, 4395–4400.

- Gwack, Y., Kim, D.W., Han, J.H. & Choe. J. (1996) Characterization of RNA binding activity and RNA helicase activity of the hepatitis C virus NS3 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 654–659.
- Chang, Y.S., Liao, C.L., Tsao, C.H., Chen, M.C., Liu, C.I., Chen, L.K. & Lin, Y.L. (1999) Membrane permeabilization by small hydrophobic nonstructural proteins of Japanese encephalitis virus. *J. Virol.* 73, 6257–6264.
- Dmochowska, A., Kalita, K., Krawczyk, M., Golik, P., Mroczek, K., Lazowska, J., Stepien, P.P. & Bartnik, E. (1999) A human putative Suv3-like RNA helicase is conserved between Rhodobacter and all eukaryotes. *Acta Biochim. Pol.* 46, 155–162.
- Hames, B.D. & Rickwood, D. (1990) Gel Electrophoresis of Proteins: a Practical Approach, 2nd edn. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.
- 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.
- Sambrook, J., Fritsch, F. & Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring. Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Blight, K.J., Kolykhalov, A.A., Reed, K.E., Agapov, E.V. & Rice, C.M. (1998) Molecular virology of hepatitis C virus: an update with respect to potential antiviral targets. *Antivir. Ther.* 3, 71–81.
- Yao, N. & Weber, P.C. (1998) Helicase, a target for novel inhibitors of hepatitis C virus. *Antivir. Ther.* 3, 93–97.
- Kubota, Y., Iwamoto, T. & Seki, T. (1999) The interaction of benzimidazole compounds with DNA: intercalation and groove binding modes. *Nucleic Acids Symp Ser.* 42, 53–54.
- Wood, A.A., Nunn, C.M., Czarny, A., Boykin, D.W. & Neidle, S. (1995) Variability in DNA minor groove width recognised by ligand binding: the crystal structure of a bis-benzimidazole compound bound to the DNA duplex d (CGCGAATTCGCG) 2. *Nucleic Acids Res.* 23, 3678–3684.
- 40. Sapse, A.M., Sapse, D., Jain, D.C. & Lown, J.W. (1995) Quantum chemical studies employing an *ab initio* combination approach on the binding of the bis-benzimidazole Hoechst 33258 to the minor groove of DNA. *J. Biomol. Struct Dyn.* **12**, 857–868.

- 41. Borowski, P., Lang, M., Haag, A., Schmitz, H., Choe, J., Chen, H.M. & Hosmane, R.S. (2002) Characterization of imidazo[4,5-d] pyridazine nucleosides as modulators of unwinding reaction mediated by West Nile virus nucleoside triphosphatase/helicase: evidence for activity on the level of substrate and/or enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 1231–1239.
- Marsch, G., Ward, R.L., Colvin, M. & Turteltaub, K.W. (1994) Non-covalent DNA groove-binding by 2-amino-1-methyl-6 phenylimidazo[4,5-β]pyridine. *Nucleic Acids Res.* 22, 5415.
- Battistutta, R., De Moliner, E., Sarno, S., Zanotti, G. & Pinna, L.A. (2001) Structural features underlying selective inhibition of protein kinase CK2 by ATP site-directed tetrabromo-2-benzotriazole. *Protein Sci.* 10, 2200–2206.
- Theis, K., Chen, P.J., Skorvaga, M., Van Houten, B. & Kisker, C. (1999) Crystal structure of UvrB, a DNA helicase adapted for nucleotide excision repair. *EMBO J.* 18, 6899–6907.
- Holm, L. & Sander, C. (1995) Dali: a network tool for protein structure comparison. *Trends Biochem. Sci.* 20, 478–480.
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P. & Blinov, V.M. (1989) Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* 17, 4713–4730.
- Tamm, I. & Caliguri, L. (1972) 2-(α-Hydroxybenzyl)benzimidazole and Related Compounds. In *Chemotherapy of Virus Diseases* (Bauer, D.J., ed.), pp, 115–179. Pergamon Press, Oxford, UK.
- Townsend, L.B., Devivar, R.V., Turk, S.R., Nassiri, M.R. & Drach, J.C. (1995) Design, synthesis, and antiviral activity of certain 2,5,6-trihalo-1-(beta-D-ribofuranosyl) benzimidazoles. *J. Med. Chem.* 38, 4098–4105.
- Krosky, P.M., Borysko, K.Z., Nassiri. M.R., Devivar, R.V., Ptak, R.G., Davis, M.G., Biron, K.K., Townsend, L.B. & Drach, J.C. (2002) Phosphorylation of beta-D-ribosylbenzimidazoles is not required for activity against human cytomegalovirus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 478–486.
- Shugar, D. (1999) Viral and host-cell protein kinases: enticing antiviral targets and relevance of nucleoside, and viral thymidine, kinases. *Pharmacol. Ther.* 82, 315–335.
- Marintcheva, B. & Weller, S.K. (2001) A tale of two HSV-1 helicases: roles of phage and animal virus helicases in DNA replication and recombination. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 70, 77–118.