

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität

Frankfurt am Main

betreut am

Zentrum der Inneren Medizin

Medizinische Klinik I

Direktor: Prof. Dr. Stefan Zeuzem

**Molekulare Mechanismen der Selektion
Resistenz-assoziiertes Hepatitis C Virusvarianten**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

Frankfurt am Main

vorgelegt von

Michael Konetschnik

aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2019

Dekan:	Prof. Dr. Josef M. Pfeilschifter
Referent:	PD Dr. Christoph Welsch
Korreferent:	Prof. Dr. Helmut Geiger
Tag der mündlichen Prüfung:	25.11.2019

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV	
Tabellenverzeichnis.....	V	
Abkürzungsverzeichnis	VI	
1	Einleitung.....	1
1.1	Epidemiologie.....	1
1.2	Übertragung	1
1.3	Krankheitsverlauf.....	2
1.4	Genotypen.....	2
1.5	Das Hepatitis C-Virus	3
1.6	Die NS3/4A-Protease	4
1.7	Therapie der Hepatitis C	6
1.8	Der Q80K-Polymorphismus.....	8
2	Material und Methoden.....	11
2.1	Material	11
2.1.1	Chemikalien.....	11
2.1.2	Verbrauchsmaterial	12
2.1.3	Antikörper	13
2.1.4	Bakterienstämme	13
2.1.5	Plasmid	13
2.1.6	Primer.....	14
2.1.7	Enzyme	14
2.1.8	Antibiotika.....	15
2.1.9	Standards und Kits	15
2.1.10	Puffer und Lösungen	15
2.1.11	Geräte	18
2.1.12	Software	19

2.2	Methoden	21
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	21
2.2.1.1	Ortsgerichtete Mutagenese	21
2.2.1.2	Restriktionsverdau	22
2.2.1.3	Agarose-Gelelektrophorese	23
2.2.1.4	Sequenzierung und Mutationskontrolle im Sequenzalignment	24
2.2.1.5	Isolierung von Plasmid-DNA	25
2.2.1.6	Konzentrationsbestimmung der DNA	25
2.2.2	Mikrobiologische Methoden.....	26
2.2.2.1	Herstellung von Flüssigkulturen	26
2.2.2.2	Herstellung von Agarplatten.....	26
2.2.2.3	Transformation von XL-10 Gold- <i>E.coli</i> -Bakterien.....	26
2.2.2.4	Transformation von Rosetta TM 2(DE3) pLysS <i>E.coli</i> -Zellen.....	27
2.2.2.5	Herstellung einer Vorkultur für die Proteinexpression	28
2.2.2.6	Expression der rekombinanten NS3/4A-Protease.....	28
2.2.3	Proteinanalytische Methoden	29
2.2.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	29
2.2.3.2	Proteinauftrennung mittels SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese.....	29
2.2.3.3	Ermittlung der Proteinreinheit.....	30
2.2.3.4	Western Blot-Analyse zum Nachweis der NS3/4A-Protease ..	31
2.2.3.5	Immundetektion	31
2.2.4	Proteinchemische Methoden	33
2.2.4.1	Mechanische Zellyse mittels Sonifikation	33
2.2.4.2	Proteinaufreinigung	34
2.2.4.3	Bestimmung der Proteininstabilität mittels Thermal Shift-Assay	37
2.2.4.4	Bestimmung der Enzymaktivität mittels FRET-Assay	40

2.2.5	Statistik.....	43
2.2.6	<i>In silico</i> -Sequenz- und Strukturanalyse	43
3	Ergebnisse	45
3.1	Proteinexpression unterschiedlicher NS3/4A-Proteasevarianten ..	46
3.2	Effekte von Aminosäureaustauschen auf die Enzymaktivität der NS3/4A-Protease	48
3.3	Effekte von Aminosäureaustauschen auf die Stabilität der Proteinfaltung der NS3/4A-Protease	53
3.4	<i>In silico</i> -Sequenz- und Strukturanalyse von Aminosäureaustauschen in der NS3/4A-Protease	58
3.5	<i>In silico</i> -3D-Strukturanalyse und Topologie der Aminosäureaustausche im NS3-Protease-Helikase-Komplex.....	61
4	Diskussion.....	63
5	Zusammenfassung.....	71
6	Abstract	73
7	Anhang.....	75
8	Literaturverzeichnis	76
9	Lebenslauf.....	81
10	Schriftliche Erklärung	84
11	Danksagung	85

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das HCV-Polyprotein	4
Abbildung 2: Das NS3/4A-Protein	6
Abbildung 3: Globale Entstehung und Vererbung des Q80K-Polymorphismus	10
Abbildung 4: Agarose-Gelelektrophorese.....	23
Abbildung 5: Sequenzalignment aller NS3/4A-Varianten	24
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Protein-Detektion mittels Antikörper	32
Abbildung 7: Prinzip der Ni-NTA-Affinitätschromatographie	34
Abbildung 8: Versuchsaufbau der Affinitätschromatographie	36
Abbildung 9: Kurvenverlauf beim Thermal Shift-Assay	38
Abbildung 10: Schematische Darstellung des FRET-Assays	41
Abbildung 11: 5-FAM Referenz-Standard	42
Abbildung 12: Coomassie-Gel und Western Blot	47
Abbildung 13: Zusammenfassende Darstellung der ermittelten Fluoreszenzwerte.....	49
Abbildung 14: Reaktionsgeschwindigkeiten im Vergleich.....	51
Abbildung 15: Michaelis-Menten-Kinetik der NS3/4A-Varianten.....	52
Abbildung 16: Zusammenfassende Darstellung der ermittelten Schmelzkurven.....	53
Abbildung 17: Schmelzkurven im Vergleich	56
Abbildung 18: Einfluss von Q80K und seiner second site-Austausche auf die Proteinfaltung.....	57
Abbildung 19: Sequenzlogo der Aminosäurepositionen 80, 91 und 174 der NS3/4A-Protease für die beiden Genotypen 1a und 1b im Vergleich	59
Abbildung 20: Strukturanalyse und Topologie der NS3/4A- Aminosäureaustausche.....	61
Abbildung 21: 3D-Struktur der NS3/4A-Protease	69
Abbildung 22: Expressionsvektor pET-15b	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien.....	11
Tabelle 2: Verbrauchsmaterial.....	12
Tabelle 3: Antikörper	13
Tabelle 4: Bakterienstämme.....	13
Tabelle 5: Plasmid.....	13
Tabelle 6: Primer	14
Tabelle 7: Enzyme.....	14
Tabelle 8: Antibiotika	15
Tabelle 9: Standards und Kits	15
Tabelle 10: Puffer und Lösungen	15
Tabelle 11: Geräte.....	18
Tabelle 12: Software	19
Tabelle 13: Reaktionsansatz für die ortsgerichtete Mutagenese	22
Tabelle 14: Standardprogramm der ortsgerichteten Mutagenese	22
Tabelle 15: Zusammensetzung Assay Buffer (pH 7,4).....	39
Tabelle 16: Zusammensetzung Versuchsansatz (pH 7,4).....	39
Tabelle 17: Zusammensetzung Kontrollansatz (pH 7,4).....	39
Tabelle 18: Software-Setup Thermal Shift-Assay.....	40
Tabelle 19: NS3/4A-Varianten mit unterschiedlichen Mutationsmustern.....	46
Tabelle 20: Proteinkonzentrationen der exprimierten NS3/4A-Varianten	47
Tabelle 21: Enzymkinetische Parameter und Schmelzpunkte der NS3/4A - Varianten.....	57

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Ausgeschriebener Begriff
Abs	Absorption
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosin-Triphosphat
Bp	Basenpaare
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
β-ME	β-Mercaptoethanol
β-OG	Octyl β-D-glucopyranosid
c	Konzentration
C-terminal	Carboxyterminal
DAA	Direct-acting antiviral agent
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSF	Differential Scanning Fluorimetry
ds	doppelsträngig
ER	Endoplasmatisches Retikulum
E. Coli	Escherichia Coli
5-FAM	5-Carboxyfluorescein
FDA	Food & Drug Administration
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie- Transfer
Fwd.	Forward
g	Gramm
GT	Genotyp
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCL	Hydrochlorid
HCV	Hepatitis C-Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
His	Histidin

HRP	Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRES	Internal Ribosomal Entry Site
k_{cat}	Wechselzahl
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
kDa	Kilodalton
L	Liter
Lac	Lactose
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Mol
mA	Milliampere
MAVS	Mitochondrial Antiviral Signaling Protein
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
mM	Millimol
mV	Millivolt
N-terminal	Aminoterminal
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NASH	Nicht-alkoholische Fettleberhepatitis
NANBH	NonA-NonB-Hepatitis
NI	Nukleo(s)tidischer Inhibitor
NNI	Nicht-nukleo(s)tidischer Inhibitor
NS	Nicht-Strukturgebendes
ng	Nanogramm
Ni-NTA	Nickel-Nitriloacetat
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDB	Protein Database
Pfu	Pyrococcus furiosus

PEG	pegyliert
Prom.	Promotor
RAV	Resistenz-assoziierte Variante
Rev.	Reverse
rpm	rounds per minute
RNA	Ribonukleinsäure
RKI	Robert Koch-Institut
SDS	Natriumdodecylsulfat
SN	Supernatant
S.O.C	Super Optimal Broth
SVR	Sustained Virological Response
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
T_m	Schmelzpunkt
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
U	Units
UV	Ultraviolett
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit
WHO	World Health Organization
$ZnCl_2$	Zinkchlorid

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie

Die Hepatitis C Virus (HCV)-Infektion ist eine weltweit verbreitete Infektionskrankheit, an der laut Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zurzeit ca. 71 Millionen Menschen chronisch erkrankt sind.¹ Die Prävalenz der HCV-Infektion ist abhängig von der geographischen Lage. Zentral- und Ostasien, aber auch Nordafrika und der Mittlere Osten stellen dabei Regionen mit sehr hoher Prävalenz von Menschen mit Antikörpern gegen den Erreger der Hepatitis C dar.² Die HCV-Prävalenz in Deutschland liegt bei ca. 0,3 %.³ Erstmals wurde das Hepatitis C Virus 1989 in zwei Arbeiten von Choo und Kuo beschrieben.^{4,5} Bis zu diesem Zeitpunkt wurde die Erkrankung unspezifisch als Non-A, Non-B-Hepatitis (NANBH) bezeichnet.^{4,5}

1.2 Übertragung

Übertragen wird das HC-Virus durch den parenteralen Kontakt mit kontaminiertem Blut. Besonders der gemeinsame Gebrauch von Spritzen und Kanülen beim intravenösen Drogenkonsum stellt ein hohes Übertragungsrisiko dar.⁶ Zu den weiteren Risikogruppen zählen außerdem polytransfundierte Patienten, Empfänger von Blutprodukten und Organtransplantaten sowie Hämodialysepatienten.⁷ Nach Einführung des Screenings von Blutprodukten auf HCV im Jahr 1990 ist die Wahrscheinlichkeit einer Infektion durch Blutprodukte deutlich reduziert.⁸ Medizinisches Personal ist weiterhin durch Nadelstichverletzungen gefährdet, ebenso wie Neugeborene HCV-positiver Mütter durch die perinatale Übertragung des HC-Virus. Die sexuelle Transmission, v.a. bei verletzenden Sexualpraktiken, ist ebenso ein möglicher Infektionsweg.⁶ Bei ca. 10 % der infizierten Patienten bleibt jedoch auch nach genauer Anamnese der Übertragungsweg unbekannt.⁷

1.3 Krankheitsverlauf

Nach dem ersten parenteralen Kontakt mit dem HC-Virus kommt es innerhalb von 4-12 Wochen zu einer akuten Entzündung der Leber. Diese sogenannte akute Hepatitis verläuft in den meisten Fällen mild oder klinisch inapparent. In wenigen Fällen kann sich die Infektion durch unspezifische Symptome wie allgemeines Krankheitsgefühl, Oberbauchschmerz, Müdigkeit, Inappetenz und Gelbfärbung der Haut und Skleren äußern. Fulminante Verläufe einer akuten Hepatitis sind selten.^{9,10} Die HCV-Infektion zeichnet sich mit 75-85 % durch einen hohen Anteil chronisch verlaufender Infektionen aus. Sobald die Virus-RNA mindestens sechs Monate lang im Blut des Patienten nachweisbar ist, spricht man von einer chronischen Infektion.⁷ Bleibt die Krankheit unbehandelt, entwickelt sich in ca. 10-20 % der Fälle innerhalb von 20 Jahren eine Leberzirrhose mit konsekutiv erhöhtem Risiko für das Auftreten eines hepatozellulären Karzinoms (HCC).⁷ Kofaktoren wie zum Beispiel Alkoholkonsum, eine nicht-alkoholische Fettleberhepatitis (NASH), männliches Geschlecht, Infektionsalter und eine Koinfektion mit dem Hepatitis B- oder Humanen Immundefizienz-Virus können zum fibrotischen Umbau der Leber beitragen und die Progredienz der Lebererkrankung zur Zirrhose oder die Entstehung eines HCC beschleunigen.⁹

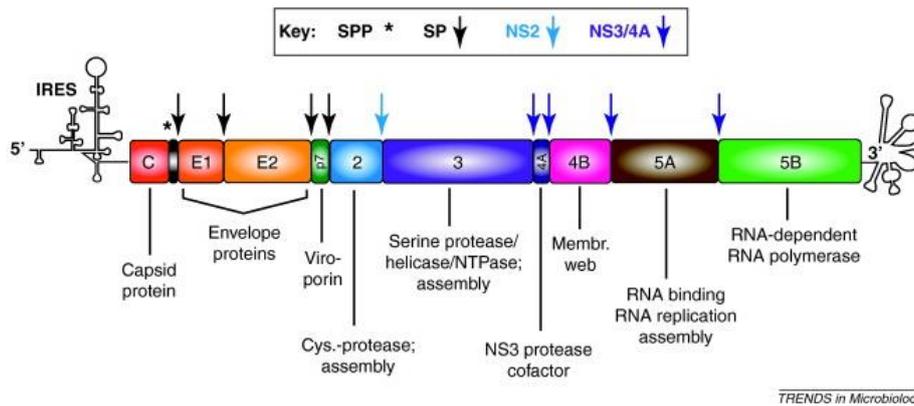
1.4 Genotypen

Das HC-Virus wird in bis zu 8 Genotypen (GT) eingeteilt.¹¹ Dabei unterscheiden sich die HCV-Isolate um mindestens 30 % der zur Charakterisierung verwendeten Nukleotidsequenz. Da sich die Sequenzen innerhalb der einzelnen Genotypen noch einmal untereinander um bis zu 20 % unterscheiden, werden die Genotypen in weitere Subtypen unterteilt.¹² Der global am häufigsten anzutreffende Genotyp ist der Genotyp 1. Auf ihn entfällt mit rund 46 % fast die Hälfte aller HCV-Infektionen weltweit. Auch der Genotyp 3 ist mit etwa einem Drittel aller Hepatitis C-Fälle global weit verbreitet. Die restlichen Genotypen zeichnen sich durch eine starke geografische Fokussierung aus. Mit einem Anteil

von 8,3 % aller weltweiten HCV-Infektionen ist die Prävalenz des Genotyps 4 deutlich auf Nord- und Zentralafrika sowie den Mittleren Osten beschränkt, wohingegen man in Ostasien häufiger die Genotypen 2 und 6 antrifft. Der Genotyp 5 wird nur für einen Bruchteil aller weltweiten HCV-Infektionen verantwortlich gemacht.¹³ In Deutschland trifft man bei den 400.000 – 500.000 chronisch infizierten Patienten vor allem den Genotyp 1 an.¹⁴

1.5 Das Hepatitis C-Virus

Das Hepatitis C Virus ist ein umhülltes RNA-Virus, das zur Familie der Flaviviridae gehört.¹⁵ Es besitzt ein 9,6 kb langes Positiv-Strang-RNA-Genom, welches für ein ca. 3.000 Aminosäuren langes Vorläufer-Polyprotein codiert. Dieses wird in infizierten Hepatozyten co- und posttranslational am rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) durch virale und wirtseigene Proteasen an spezifischen Stellen gespalten. Dabei entstehen zehn einzelne Proteine (Abbildung 1). Zu den strukturgebenden Proteinen gehören das Core-Protein C, das Membranprotein p7 und die beiden Hüllproteine E1 und E2. Sie sind für die Verpackung und das Assembly neuer infektiöser Viruspartikel zuständig. Zu den nicht-strukturgebenden Proteinen zählen die Proteine NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B. Einige der nicht-strukturgebenden Proteine besitzen eine enzymatische Aktivität. Dazu gehören die Cystein-Protease NS2-3, die NS3-Helikase und NS3/4A-Serin-Protease, sowie die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B.^{16–18}



TRENDS in Microbiology

Abbildung 1: Das HCV-Polyprotein

Das HCV-Polyprotein wird durch virale (blaue Pfeile) und wirtseigene (schwarze Pfeile) Proteasen gespalten. Flankiert wird die mRNA des Polyproteins von einem 5'- und einem 3'-untranslatierten Bereich sowie einer IRES (internal ribosomal entry site), welche die Translation initiiert. Es entstehen strukturgebende und nicht-strukturgebende Proteine. Die Funktion der einzelnen Proteine innerhalb des viralen Replikationszyklus ist darunter dargestellt. Abkürzungen: SSP, signal peptide peptidase; SP, signal peptidase; cys., cysteine; membr., membranous.¹⁶

1.6 Die NS3/4A-Protease

Die NS3/4A-Protease ist Teil eines multifunktionalen Enzymkomplexes und besteht aus der aminoterminalen Proteasedomäne des NS3-Proteins und dem NS4A-Cofaktor. Sie ist entscheidend an der proteolytischen Spaltung des viralen Vorläufer-Polyproteins beteiligt. Nach rezeptorvermittelter Endozytose des Virus in den Hepatozyten spaltet sich NS3/4A co-translational vom naszierenden Polyprotein ab, schneidet das Polyprotein an den drei weiteren Stellen NS4A/NS4B, NS4B/NS5A und NS5A/NS5B, und bildet gemeinsam mit weiteren Virus- und Wirtskomponenten an der Membran des rauen ER den viralen Replikationskomplex. Daneben trägt die NS3/4A-Protease durch die Inaktivierung antiviraler Faktoren der angeborenen Immunität, insbesondere MAVS und TRIF, zur Unterdrückung des Immunsystems bei. MAVS und TRIF sind wichtige Mediatoren, welche zur Induktion antiviraler Zytokine und Chemokine beitragen. Die Inaktivierung dieser antiviralen Faktoren ermöglicht es dem Virus, sich dauerhaft in den Hepatozyten festzusetzen.^{16,19}

Außerdem ist die NS3/4A-Protease über Interaktionen mit anderen Proteinen in die Verpackung infektiöser Viruspartikel, dem sogenannten particle assembly, involviert.²⁰

Das gesamte NS3-Protein setzt sich aus einer C-terminalen Helikase-Domäne und einer N-terminalen Serin-Protease-Domäne zusammen (Abbildung 2).¹⁷ Beide Domänen sind durch einen flexiblen Linker miteinander verbunden.²¹ Ihre volle Funktionalität ist dabei stark von der wechselseitigen Interaktion abhängig. Die Helikase-Domäne besitzt die Fähigkeit, doppelsträngige RNA-Bereiche unter ATP-Verbrauch für die Replikation aufzubrechen und ist somit für die Bildung infektiöser Virus-RNA wichtig.²²

Die weiter aminoterminal gelegene NS3-Protease-Domäne ist 180 Aminosäuren lang und gehört zur Familie der Chymotrypsin-artigen Serin-Proteasen. Sie besitzt in ihrem aktiven Zentrum eine katalytische Triade, bestehend aus His57, Asp81 sowie Ser139 und wird von einem Zink-Ion stabilisiert. Die nicht-kovalente Bindung des Co-Faktors NS4A spielt für die Enzymaktivität der NS3-Protease eine entscheidende Rolle. Daneben trägt NS4A mit seiner hydrophoben Transmembran-Helix zur Assoziation der NS3-Protease an intrazelluläre Membranen bei. Die Bildung der NS3/4A-Protease am rauen ER ist für die co- und posttranslationale Spaltung des Polyproteins und somit auch für die Bildung des Replikationskomplexes notwendig.¹⁹

Da die NS3/4A-Protease eine zentrale Rolle im Replikationszyklus des HC-Virus spielt, macht dies das Protein zu einem wichtigen Angriffspunkt in der spezifischen antiviralen Therapie.²³

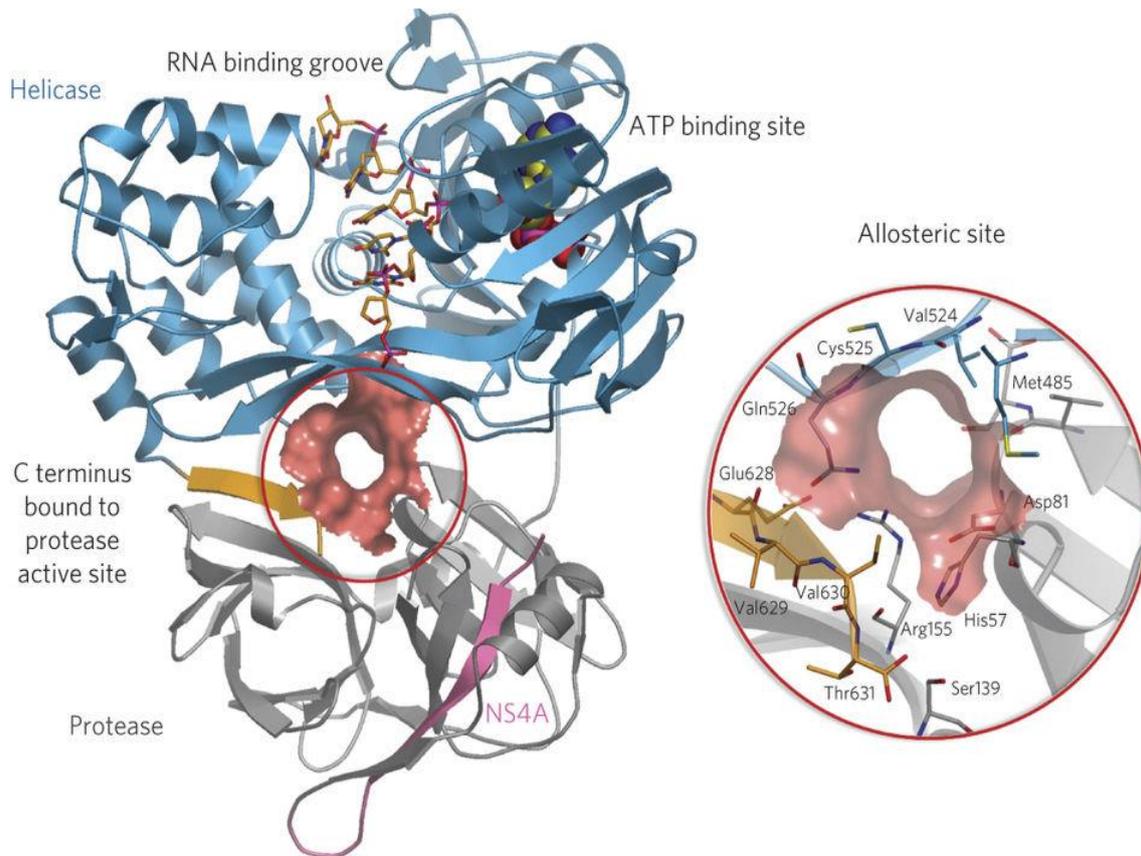


Abbildung 2: Das NS3/4A-Protein

Zu sehen ist die Kristallstruktur des NS3/4A-Proteins. Dargestellt sind die Protease-Domäne (grau), der NS4A-Cofaktor (rosa) und die Helikase-Domäne (blau) mit RNA- und ATP-Bindestelle. Außerdem sichtbar sind die katalytische Triade (Ser139, His57 und Asp81) sowie die allosterische Site (rot).⁵⁸

1.7 Therapie der Hepatitis C

Noch vor einigen Jahren wurde die Hepatitis C unspezifisch mit einer Kombination aus pegyliertem Interferon (PEG-IFN) und Ribavirin behandelt. Dabei konnte nur etwa die Hälfte der Patienten dauerhaft geheilt werden. Außerdem war die antivirale Behandlung oftmals mit ausgeprägten Nebenwirkungen verbunden.²⁴

In der jüngeren Vergangenheit wurden eine Reihe von spezifisch wirkenden, antiviralen Medikamenten zugelassen, die direkt in den viralen Replikationszyklus des Hepatitis C Virus eingreifen und somit die Vermehrung

des Virus supprimieren. Diese Medikamente werden deshalb auch „direct-acting antiviral agents (DAAs)“ genannt.²⁵

Um die Replikation des Virus durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase zu unterdrücken, wurden nicht-nukleo(s)tidische Inhibitoren (NNI) sowie nukleo(s)tidische Inhibitoren (NI) entwickelt. Nukleo(s)tidische Inhibitoren führen bei der RNA-Synthese zu einem Kettenabbruch, während nicht-nukleo(s)tidische Inhibitoren die NS5B-Polymerase allosterisch hemmen. Neben den NS5A-Inhibitoren, die hemmend auf die Replikation und Interaktion des NS5A-Proteins mit anderen Nicht-Strukturellen-Proteinen wirken, spielen insbesondere die NS3/4A-Protease-Inhibitoren eine zentrale Rolle in der Behandlung der chronischen Hepatitis C.^{25,26}

Den gängigen Therapieregimen ist gemeinsam, dass verschiedene DAAs miteinander kombiniert werden. Die Kombinationstherapie führt zu hohen Heilungsraten und in gleichem Zuge zu einer geringeren Entstehung von Resistenzen. Weiterhin spielt die zusätzliche Einnahme von Ribavirin in einigen Fällen eine wichtige Rolle in der antiviralen Therapie.^{25,26}

Definitionsgemäß spricht man aktuell von einer Heilung einer chronischen Hepatitis C-Infektion, wenn 12 Wochen nach Therapieende keine Virus-RNA im Blut des Patienten nachweisbar ist. Dieser Endpunkt wird als „Sustained Virological Response“ (SVR) bezeichnet.²⁷

Zurzeit können mit den neuen antiviralen Medikamenten SVR-Raten von über 90 % erreicht werden.²⁸ Dennoch stellen Resistenzentstehungen gegen antivirale Medikamente für einige Patienten nach wie vor eine klinische Herausforderung dar.²⁹ Das Hepatitis C-Virus zeichnet sich hier durch seine hohe genetische Heterogenität aus. Der Grund für diese Heterogenität liegt zum einen in der fehlenden Korrekturlese-Eigenschaft der RNA-abhängigen RNA-Polymerase und zum anderen in der hohen Replikationsrate des Virus von bis zu 10^{12} Virionen pro Tag.^{30,31}

Dies führt dazu, dass während einer Infektion neben einer dominanten Viruspopulation noch mehrere genetisch ähnliche Virusvarianten in einem infizierten Individuum nebeneinander existieren. Die Co-Existenz dieser Virusvarianten in einem infizierten Patienten fasst man dabei unter dem Begriff

„Quasispezies“ zusammen. Durch die rasante Vermehrung, gepaart mit einer hohen Fehlerquote, kommt es schon vor Therapiebeginn zum Entstehen von resistenten Virusvarianten, die zum verminderten Ansprechen auf antivirale Medikamente führen können. Zu den häufigsten sogenannten „Baseline-Polymorphismen“ der NS3/4A-Protease zählt dabei der Aminosäureaustausch Q80K.^{30,32,33}

1.8 Der Q80K-Polymorphismus

Im Jahr 2011 wurden die beiden ketoamidischen Protease-Inhibitoren Boceprevir sowie Telaprevir jeweils in Kombination mit pegyliertem Interferon- α und Ribavirin zur Therapie von GT 1-Infektionen zugelassen. Dies bedeutete einen Durchbruch in der Therapie der chronischen Hepatitis C, da nun spezifisch Zielproteine des Virus inhibiert werden konnten.^{34–36}

Mit der Zulassung von Simeprevir kam wenige Jahre später ein neuer Protease-Inhibitor auf den Markt, der mit dem Vorteil einer verkürzten Therapiedauer, einer Einnahme von nur einer Tablette am Tag und einem geringeren Nebenwirkungsprofil assoziiert war.³⁷ Auffällig war jedoch, dass es unter der Therapie mit Simeprevir insbesondere beim Genotyp 1a gehäuft zum Therapieversagen kam.³⁷ Es stellte sich heraus, dass sowohl therapienaive Patienten mit GT 1a-Infektion als auch Patienten, bei denen zuvor eine antivirale Therapie fehlgeschlagen war, von dem Nicht-Ansprechen der Simeprevir-Therapie betroffen waren. Unter GT 1b-Infektion war dieses Phänomen wesentlich seltener zu beobachten.³³ Als Ursache für dieses Therapieversagen wurde der Q80K-Polymorphismus identifiziert, bei dem es zum Austausch von Glutamin gegen Lysin an der Position 80 der NS3/4A-Protease kommt.³³ Analysen von Lenz et al. haben gezeigt, dass 13,7 % aller untersuchten Patienten mit GT 1-Infektion die Mutation Q80K besaßen. Bemerkenswerterweise war Q80K in fast 30 % der GT 1a-Infektionen, jedoch nur in unter 1 % der GT 1b-Infektionen, nachzuweisen.³³

Global betrachtet zeigt sich eine geographische Heterogenität bezüglich Q80K mit Fokussierung auf den nordamerikanischen und europäischen Raum. Während in den USA bis zu 47 % aller GT 1a-Patienten den Q80K-Polymorphismus in sich tragen, ist die Prävalenz in Europa mit etwa 19 % deutlich niedriger.³⁸

Aufgrund der hohen Prävalenz von Q80K bei GT 1a-Infektionen empfiehlt die US Food & Drug Administration (FDA) ein Routine-Screening auf diese Mutation. Die Empfehlung richtet sich vor allem an therapienaive Patienten des GT 1a, die mit Simeprevir behandelt werden sollen. Ziel dieses Screenings ist es, ein Therapieversagen zu verhindern.³⁷

Phylogenetische Analysen von McCloskey et al. haben ergeben, dass 96 % aller untersuchten Q80K-GT 1a-Sequenzen von einem genetischen Vorfahren abstammen (Abbildung 3). Die Ursprungsmutation wird auf die 1940er Jahre rückdatiert und scheint in den USA stattgefunden zu haben.³²

Neben Q80K wurden von McCloskey et al. second site-Austausche identifiziert, A91S/T und S174N, welche auffällig häufig zusammen mit Q80K auftreten, sich scheinbar kurz nach Q80K entwickelt haben und dabei ebenfalls stabil weitergegeben wurden. Möglicherweise scheinen epistatische Beziehungen unter diesen Aminosäureaustauschen ursächlich für das langfristig stabil gekoppelte Auftreten neben Q80K zu sein.³² Als Epistase wird dabei die Interaktion von Genen bezeichnet, bei welcher die phänotypische Ausprägung eines Gens durch genetische Änderungen an anderen Genloci beeinflusst wird.³⁹

Interessanterweise lässt sich für andere bekannte natürliche Resistenz-assoziierte Aminosäureaustausche keine derartige phylogenetische Historie nachweisen. Normalerweise sind RAVs mit einer verminderten viralen Fitness assoziiert.⁴⁰ Die virale Fitness wird als Fähigkeit zur Bildung infektiöser Partikel definiert und kann in Zellkulturversuchen durch die Ermittlung der Replikationsfrequenz bestimmt werden.⁴⁰ Für den natürlichen Polymorphismus Q80R in NS3/4A konnten bereits verminderte Replikationsraten gezeigt werden.³³ Somit ist es wahrscheinlich, dass Q80K ebenfalls zu verminderten Replikationsraten mit konsekutivem Fitnessdefizit führt. Second site-Austausche wie A91S/T und S174N könnten möglicherweise kompensatorische Effekte auf

die NS3/4A-Proteaseaktivität des Virus ausüben und den Ausgleich eines Fitnessdefizits zur Folge haben.

Bisher sind diese second site-Austausche in der Literatur noch nicht genauer beschrieben und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen unbekannt. Da die NS3/4A-Protease eine enzymatische Funktion besitzt, liegt die Vermutung nahe, dass second site-Austausche Einflüsse auf die proteolytische Aktivität der Protease haben könnten. Q80K könnte dabei die Rolle eines „gate keepers“ übernehmen und das Entstehen von weiteren Austauschen fördern.

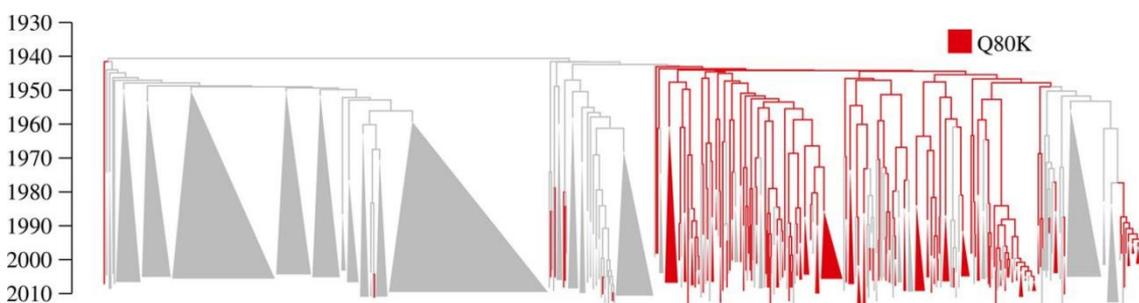


Abbildung 3: Globale Entstehung und Vererbung des Q80K-Polymorphismus

Globale phylogenetische Analysen zeigen die untersuchten NS3-Sequenzen, welche den Q80K-Polymorphismus enthalten (rot). Fast alle NS3-Sequenzen mit Q80K stammen von einer Ursprungsmutation ab, welche am Anfang der 1940er-Jahre entstanden sein muss. Der phylogenetische Baum wurde unter Verwendung der Nukleotid-Sequenzen für die Codon-Positionen 9-174 der NS3-Protease erstellt.³²

Fragestellung der Arbeit

Die beschriebenen phylogenetischen Zusammenhänge zwischen dem Q80K Polymorphismus und den second site-Austauschen S174N und A91T/S legen kompensatorische Mechanismen nahe, die für solche Varianten in der NS3/4A-Protease bisher nicht beschrieben wurden. In der vorliegenden Arbeit sollen daher die Auswirkungen von Q80K auf die Proteinfaltung der NS3/4A Protease und die enzymatische Aktivität am aufgereinigten Protein untersucht werden, um schließlich potentielle kompensatorische Mechanismen *in silico* zu charakterisieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acetic Acid	Sigma Aldrich
Acrylamid (Rotiphorese Gel; wässrige 30 % Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung im Verhältnis 37,5:1)	Roth
Agarose (peqGold)	VWR Peqlab
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck Millipore
Aqua dest	Sigma Aldrich
Aqua dest	Roth
Aqua dest	Millipore
Brilliant Blue G-250	Roth
β -Mercaptoethanol	AppliChem
β -Mercaptoethanol	Stratagene
Coomassie Plus The Better Bradford Assay Reagent	Thermo Scientific
Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix	New England BioLabs
DNA Gel Loading Dye (6x)	Thermo Scientific
Ethanol 70 % vergällt	Roth
Glycerol	AppliChem
Glycin	Merck Millipore
HCL 37 %	Roth
HEPES	AppliChem
Imidazol	Roth
Isopropyl-b-D-thiogalaktosid (IPTG)	PanReac AppliChem
Isopropanol	Sigma Aldrich
Milchpulver	Roth
Methanol	Sigma Aldrich

NaOH 50 %	Roth
Ni-NTA Agarose	Quiagen
Luminata Forte Western HRP Substrate	Millipore
Pfu 10X Reaction Buffer	Promega
Ponceau S-Lösung	AppliChem
RNAse-free water	Quiagen
Roti-Load 1 (4x)	Roth
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth
SYPRO® Orange Protein Gel Stain (5,000X Concentrate in DMSO)	Thermo Scientific
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
Tris	AppliChem
Tween 20 Bio Chemica	AppliChem
Zinkchlorid	Riedel de Haen

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
96 well-Mikroplatte	Greiner bio-one
Duran Erlenmeyer Weithals 2000 ml	Chemoline
Falcon™ 25/50ml Zentrifugenröhrchen	Thermo Fisher Scientific
Filter Paper Grad 1F	Munktell (Ahlstrom)
Glasplatte, ausgeschnitten	Biometra, Analytik Jena
Glasplatten mit Spacer	Biometra, Analytik Jena
Küvetten 10 x 4 x 45 mm	Sarstedt
Nitrocellulose Blotting Membran	GE Healthcare Life Sciences
Parafilm M®	Bemis
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen unsteril 10,20,200,1000 µl	Starlab
Reagiergefäße Eppendorf 1,5 ml	Sarstedt
Silikonabdichtung	Biometra, Analytik Jena
Stripetten 5, 10, 25 ml	Sigma-Aldrich
Waschsäule (Econo-Pac Chromatography Column)	Bio Rad

2.1.3 Antikörper

Tabelle 3: Antikörper

Name	Spezies	Verdünnung	verdünnt in	Hersteller
Anti-Hepatitis C Virus NS3 antibody	Ziege	1:3000	Milchpulverlösung	AbCam
donkey anti-goat IgG-HRP	Esel	1:4000	Milchpulverlösung	Santa Cruz Biotechnology

2.1.4 Bakterienstämme

Tabelle 4: Bakterienstämme

Bakterienart	Name	Hersteller
<i>E.coli</i>	XL10-Gold® Ultracompetent Cells	Stratagene
<i>E.coli</i>	Rosetta™ 2(DE3) pLysS Competent Cells	Novagen

2.1.5 Plasmid

Tabelle 5: Plasmid

Plasmid	Hersteller
pET-15b	Novagen

2.1.6 Primer

Table 6: Primer

Primer	Sequenz (Oligonukleotid-Länge)	Hersteller
Q80K Fwd	5' ACCAATGTGGACAAAGACCTTGTGGGCTGG 3' (30)	Eurofins Genomics
Q80K Rev	5' CCAGCCCACAAGGTCTTTGTCCACATTGGT 3' (30)	Eurofins Genomics
S91A Fwd	5' CGCTCCTCAAGGTGCCCGCTCATTGACAC 3' (29)	Eurofins Genomics
S91A Rev	5' GTGTCAATGAGCGGGCACCTTGAGGAGCG 3' (29)	Eurofins Genomics
S91T Fwd	5' CGCTCCTCAAGGTACCCGCTCATTGACAC 3' (29)	Eurofins Genomics
S91T Rev	5' GTGTCAATGAGCGGGTACCTTGAGGAGCG 3' (29)	Eurofins Genomics
N174S Fwd II	5' CTTTATCCCTGTGGAGAGCCTAGGGACAAC CATGA 3' (35)	Eurofins Genomics
N174S Rev II	5' TCATGGTTGTCCCTAGGCTCTCCACAGGGA TAAAG 3' (35)	Eurofins Genomics
K80Q Fwd	5' ACCAATGTGGACCAAGACCTTGTGGGCTGG 3' (30)	Eurofins Genomics
K80Q Rev	5' CCAGCCCACAA GTCTTGGTCCACATTGGT 3' (30)	Eurofins Genomics
T7-prom.	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3' (20)	Thermo Fisher Scientific

2.1.7 Enzyme

Table 7: Enzyme

Enzym	Hersteller
Dpn1	New England BioLabs
Pfu-DNA-Polymerase	Promega

2.1.8 Antibiotika

Tabelle 8: Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller
Carbenicillin	Fisher BioReagents
Chloramphenicol	AppliChem

2.1.9 Standards und Kits

Tabelle 9: Standards und Kits

Verwendungszweck	Produktname	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese	GeneRuler 1kb DNA Ladder	Thermo Scientific
DNA-Isolierung	HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Quiagen
DNA-Isolierung	QIAprep Spin Miniprep Kit	Quiagen
FRET-Assay	SensoLyte® 520 HCV Protease Assay Kit *Fluorimetric*	Anaspec
Ortsgerichtete Mutagenese	QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
SDS-Gelelektrophorese	Precision Plus Protein Kaleidoscope	Bio Rad

2.1.10 Puffer und Lösungen

Tabelle 10: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Assay Buffer	889 µl Aqua Millipore 10 µl Hepes 1 M (pH 7,4) 37,5 µl NaCl 4 M
Blot-Puffer	5,82 g Tris 2,93 g Glycin 3,75 ml 1 % SDS 200 ml MeOH Ad 1000 ml mit Aqua millipore

Coomassie-Entfärbelösung	40 % MeOH 10 % Acetic Acid Ad mit Aqua Millipore
Coomassie-Färbelösung	50 % MeOH 10 % Acetic Acid 0,25 % Brilliant Blue G-250 Ad mit Aqua Millipore
Elutions-Puffer	50mM HEPES 10 % Glycerol 1M NaCl 0,1 % Octyl β -D-glucopyranosid 2mM β -Mercaptoethanol 250mM Imidazol Ad 120ml mit Aqua millipore pH 7,4
Imidazol-Stocklösung 2 M	68,1g Imidazol Ad 500ml Aqua Millipore pH 7,5
Laemmli-Laufpuffer (10x)	30,3 g Tris 144,0 g Glycin 10 g SDS Ad 1000 ml mit Aqua millipore
Lyse-Puffer (A10)	50 mM HEPES 10 % Glycerol 0,3 M NaCl 0,1 % Octyl β -D-glucopyranosid 2 mM β -Mercaptoethanol 10 mM Imidazol Ad 120 ml mit Aqua millipore pH 7,4
Milchpulverlösung 5 %	25 g Milchpulver 500 ml TBS (1x)
Protein-Induktions-Lösung	25 ml LB-Medium (+Carbenicillin [50 μ g/ μ l]) 500 μ l ZnCl ₂ (1 M) 500 μ l IPTG (1 M)

Sammelgel (5 %)	1,7 ml Aqua millipore 0,7 ml Sammelgelpuffer 0,3 ml Acrylamid 10 µl APS 10 µl TEMED
Sammelgel-Puffer	60,6 g Tris 4 g SDS Ad 1000 ml mit Aqua millipore pH 6,8
TBS-Puffer (10x)	200 mM Tris 1,5 M NaCl pH 7,4
TBS-T-Puffer	200 mM Tris 1,5 M NaCl 0,05 % Tween pH 7,4
Trenngel (10 %)	2,0 ml Aqua Millipore 1,3 ml Trenngelpuffer 0,1 ml Glycerin (50%) 2,0 ml Acrylamid 20 µl APS 10 µl TEMED
Trenngel-Puffer	181,7 g Tris 4 g SDS Ad 1000 ml mit Aqua millipore pH 8,8
Wasch-Puffer (A20)	50 mM HEPES 10 % Glycerol 0,3 M NaCl 0,1 % Octyl β-D-glucopyranosid 2 mM β-Mercaptoethanol 20 mM Imidazol Ad 100ml mit Aqua millipore pH 7,4

Wasch-Puffer (B50)	50 mM HEPES 10 % Glycerol 1 M NaCl 0,1 % Octyl β -D-glucopyranosid 2 mM β -Mercaptoethanol 50 mM Imidazol Ad 100 ml mit Aqua millipore pH 7,4
Wasch-Puffer (B60)	50 mM HEPES 10 % Glycerol 1 M NaCl 0,1 % Octyl β -D-glucopyranosid 2 mM β -Mercaptoethanol 60 mM Imidazol Ad 900 ml mit Aqua millipore pH 7,4

2.1.11 Geräte

Tabelle 11: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	Systec V-75	Systec
Blotting-Kammer	Trans-Blot® Turbo™ Transfer Starter System	Beckman
Elektrophorese- Laufkammer	Horizon 11-14 Gel Elektrophorese Laufkammer	Sartorius
Gelelektrophorese-Imager	Gel Doc™ XR+	Bio Rad
Gelelektrophorese- Stromversorgung	Consort Electrophoresis Power Supply, 800 Series	Thermo Fisher Scientific
Gelelektrophorese- Stromversorgung	Electrophoresis Power Supply EPS 301	Bio Rad
FRET-Detektionsgerät	EnVision Multitable Plate Reader	PerkinElmer
Feinwaage	PT310 Top-loading Balances	Life Technologies
Feinwaage	Präzisionswaage TE601	Eppendorf

Inkubationsschüttler	New Brunswick™ Innova® 44	VWR
Mikrozentrifuge	MiniStar silverline	VWR
pH-Meter	Five Easy	Mettler Toledo
Photometer	NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7	Beckman Coulter
Photometer	DU® 800 Series UV/Vis Spectrophotometer	General Electric Healthcare Life Sciences
Pipettierhilfe	pipetus®	Eppendorf
Pipette	Pipette 10µl Research Plus	Eppendorf
Pipetten	Pipetman 20, 200, 1000µl	Gilson
Reagenzglasmixer (Vortex)	VWR® Analog Vortex Mixer	Eppendorf
Real-Time PCR Cycler	StepOnePlus™	Amersham Biosciences
Rotator	RM 5-30V	CAT
Rotator	VWR-Rotator	VWR
Thermocycler	Thermomixer Compact	Eppendorf
Ultraschall-Desintegrator	Sonifier 150	Biometra, Analytik Jena
Vertikale Gelelektrophorese Pufferkammer (Minigel- Twin)	Biometra Minigel Twin	Branson
Western Blot-Imager	LAS-4000 mini	GE Healthcare Lifescience
Zentrifuge	J2-HS Centrifuge	Sartorius
Zentrifuge	Centrifuge 5430 R	Bio Rad

2.1.12 Software

Tabelle 12: Software

Funktion	Name	Hersteller
Agarose-Gel-Entwicklung	Image Lab 3.0	Bio-Rad
Auslesen der Gelelektrophorese	Image Lab™ Software	Bio Rad
DNA-Konzentrations-Messung	NanoDrop 1000 3.7.1	Thermo Scientific Fisher

Erstellung von Graphen und Bestimmung der Michaelis-Menten-Kinetik sowie der Schmelzpunkte	GraphPad PRISM 7	GraphPad Software, Inc.
Literaturverwaltung	Citavi	Swiss Academic Software
Messung der OD und Proteinkonzentration	DU 800 Spectrophotometer	Beckman Coulter
Photometrische Bestimmung der Enzymkinetik	EnVision	Perkin Elmer
Spektrophotometrische Bestimmung der Proteinkonzentration	DU 800 Spectrophotometer	Beckman Coulter
Statistik	Excel	Microsoft
Western Blot-Imaging	LAS-4000 mini Version 2.0	Fujifilm

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Ortsgerichtete Mutagenese

Um die unterschiedlichen Aminosäureaustausche in der NS3/4A-Protease-Sequenz einzufügen, wurde das „Quick-Change™ Site-Directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene nach Angaben des Herstellers verwendet. Hierfür wurden Primer mit einer Länge von 25-45 Basen mit dem PCR-Primer-Design-Tool der Firma Eurofins Genomics konstruiert. Dabei weisen die Primer in ihrer Sequenz die jeweiligen Punktmutationen für die geplanten Aminosäureaustausche auf (Tabelle 6). Als Ausgangsvektor wurde pET15b (siehe Anhang) mit der in die Multiple Cloning Site eingefügten Sequenz von His-NS4A(21-32)-GSGS-NS3(3-181) verwendet (zur Verfügung gestellt von Prof. Tetsuro Shimakami, Kanazawa University, Japan).^{41,68} Da die NS3/4A-Sequenz des HCV-H77-strains bereits die Austausch A91S und S174N aufweist, mussten zzgl. Primer konzipiert werden, welche für die Wildtyp-Aminosäuren (A91 und S174) an diesen beiden Positionen codieren.

Für die ortsgerichtete Mutagenese wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR: „polymerase chain reaction“) angewandt.

Folgender Reaktionsansatz wurde für einen PCR-Ansatz von 25 µl verwendet:

Tabelle 13: Reaktionsansatz für die ortsgerichtete Mutagenese

Substanz	Volumen [µl]
10xReaction Buffer	2,5
DS-DNA-Template	x µl \triangleq 20 ng
Oligonucleotide-Primer Fwd. (10pmol/µl)	1,5
Oligonucleotide-Primer Rev. (10pmol/µl)	1,5
dNTP-Mix (verdünnt auf 2,5 mM)	2,5
Pfu-DNA-Polymerase (3 U/µl)	0,5
RNAse-freies Wasser	ad 25

Zum Ausschluss einer Kontamination mit Fremd-DNA wurde zu Kontrollzwecken außerdem ein Reaktionsansatz mit RNAse-freiem Wasser anstelle der Template-DNA hergestellt. Hierfür wurden gleiche Volumina wie für die Template-DNA verwendet.

Tabelle 14: Standardprogramm der ortsgerichteten Mutagenese

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Anfangsdenaturierung	95	5
Denaturierung	95	0,5
Annealing	55	1
Elongation	68	7
Endelongation	68	8
Lagerung	4	∞

} 18x

2.2.1.2 Restriktionsverdau

Zur Entfernung der parentalen Ursprungs-DNA wurde der gesamte PCR-Ansatz mit 2 µl der Restriktionsendonuklease DpnI über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Endonuklease schneidet spezifisch parentale methylierte oder hemi-methylierte DNA. Neusynthetisierte DNA bleibt aufgrund der nicht vorhandenen Methylierung vom Restriktionsverdau unberührt.

2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Um eine erfolgreiche Amplifikation der mutierten NS3/4A-Gensequenz zu überprüfen, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dies ist ein Verfahren, bei dem DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Das Gel bildet durch Polymerisation eine Art Maschenwerk, in dem sich die negativ geladenen DNA-Moleküle durch Anlegen einer Spannung von der Kathode zur Anode bewegen. Je kleiner das DNA-Fragment ist, desto schneller ist die Geschwindigkeit mit der sich das Fragment im Gel bewegt. Der beigefügte Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid bindet während der Elektrophorese an die DNA und macht die Fragmente nach Abschluss der Elektrophorese unter UV-Licht im Gel Doc™ XR+ (Bio Rad) sichtbar.

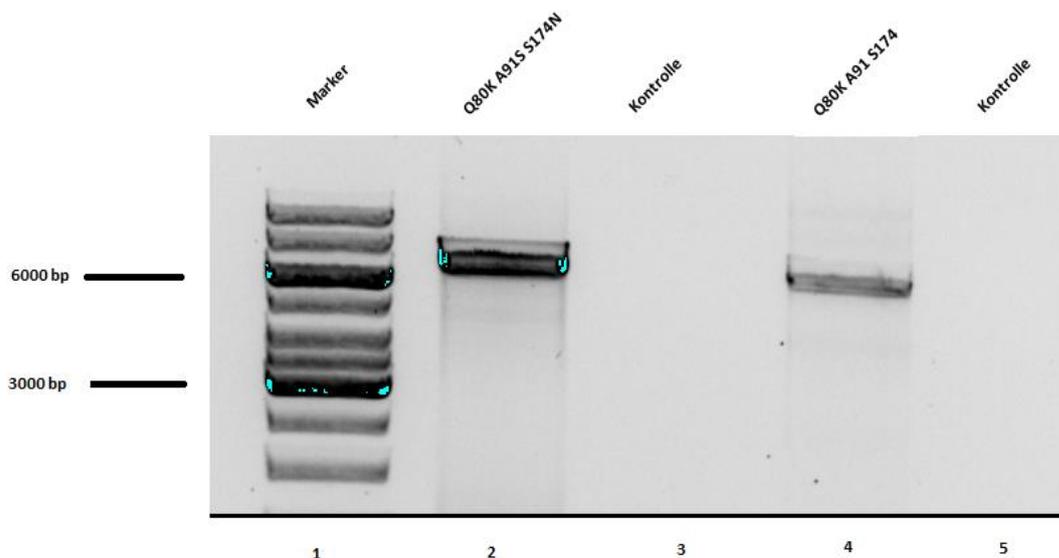


Abbildung 4: Agarose-Gelelektrophorese

Beispielhaft dargestellt ist die Agarose-Gelelektrophorese der Varianten Q80K/A91S/S174N (Bahn 2) sowie der Variante Q80K (Bahn 4). Auf Bahn 3 und 5 sind jeweils Kontrollproben zum Ausschluss einer Kontamination mit Fremd-DNA aufgetragen. Als Vergleich dient auf Bahn 1 der DNA-Standard.

Für die DNA-Gelelektrophorese wurde ein Gel mit einer Agarosekonzentration von 0,8 % (w/V) gewählt. Nachfolgend wurden 2 µl des PCR-Produktes mit 10 µl 6x DNA-Gel-Loading-Dye versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Als Größenstandard wurden 5 µl des GeneRuler 1kb DNA Ladder Mix in die erste

Geltasche gegeben. Danach wurden die DNA-Fragmente innerhalb von 50 Minuten bei 120 V aufgetrennt.

2.2.1.4 Sequenzierung und Mutationskontrolle im Sequenzalignment

Um den Erfolg der Mutagenese zu kontrollieren, wurde die DNA über Eurofins Genomics mit dem T7-prom.-Primer sequenziert. Unter Verwendung der Open Source Software SeaView⁴² wurden die Sequenzen miteinander verglichen und auf die gewünschte Mutation hin untersucht (Abbildung 5).

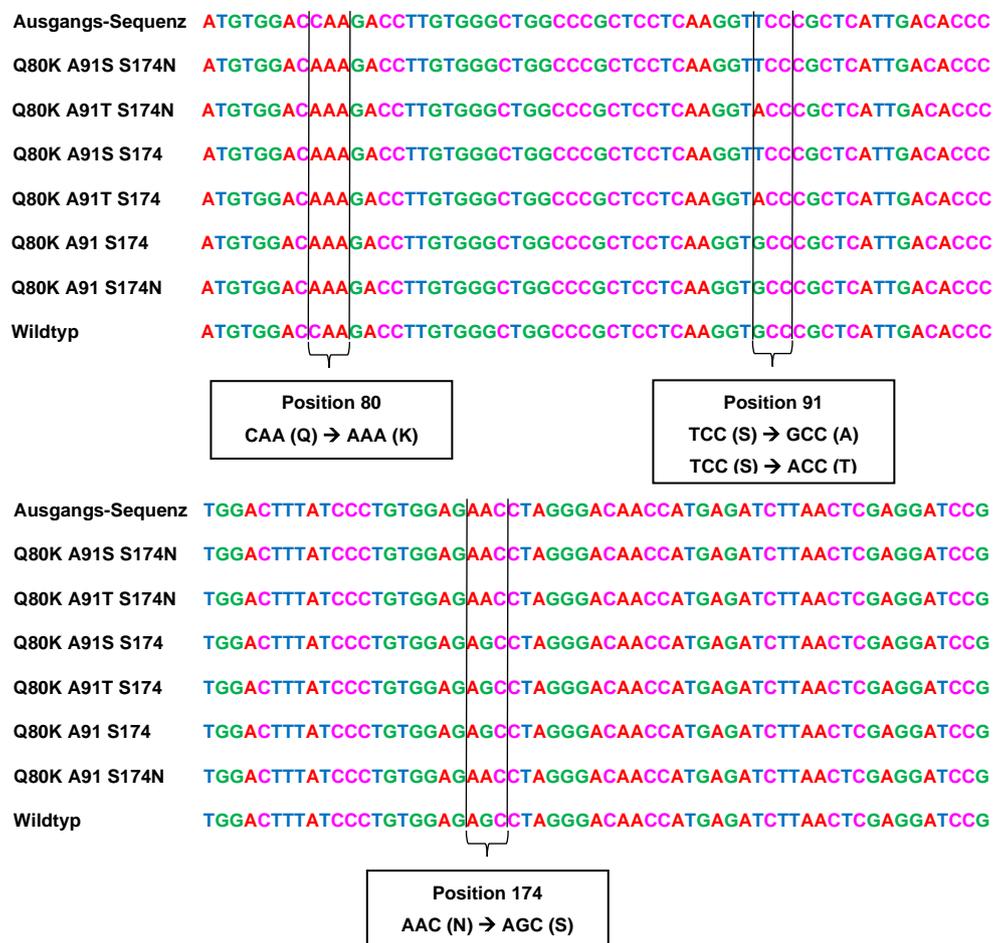


Abbildung 5: Sequenzalignment aller NS3/4A-Varianten

Dargestellt ist ein Ausschnitt des Sequenzalignments aller NS3/4A-Varianten. Als Ausgangssequenz für die Klonierung diente die NS3/4A-Protease-Sequenz des HCV-Strains H77S.2.

2.2.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA (bis 20 µg) wurden 10 x 10 ml LB-Medium mit über Nacht gewachsenen Bakterienkolonien beimpft. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Bakterienansätze im Schüttler über Nacht bei 37 °C (225 rpm). Die Plasmid-DNA konnte nun im nächsten Schritt unter Verwendung des „QIAprep Spin Miniprep Kits“ (Qiagen) entsprechend der Herstellerangaben isoliert werden.

Für die Isolierung großer Mengen Plasmid-DNA (bis 500 µg) wurden 100 µl einer Bakterienkultur mit 300 ml LB-Medium über Nacht im Schüttler (225 rpm) bei 37 °C inkubiert. Die Isolierung der DNA erfolgte unter Anwendung des „HiSpeed Plasmid Kits“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

2.2.1.6 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentrationsmessung der isolierten DNA erfolgte mithilfe eines Spektrophotometers und der dazugehörigen Software. Hierfür wurde 1 µl der isolierten DNA-Probe auf die Messeinheit des Nanodrops pipettiert und die DNA-Konzentration photometrisch über die optische Dichte (OD) der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

Formel für die Konzentrationsberechnung der DNA:

$$c [\mu\text{l}/\mu\text{g}] = \text{OD}_{260} \times 50$$

c = Konzentration

OD = Optische Dichte

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Herstellung von Flüssigkulturen

Für die Herstellung von Flüssigkulturen wurde LB-Medium-Pulver „Lennox“ nach Herstellerangaben verwendet. Nach Autoklavierung und Abkühlen des LB-Mediums wurde Carbenicillin (Endkonzentration 50 µg/µl) als Selektionsmarker hinzu pipettiert.

2.2.2.2 Herstellung von Agarplatten

Die Herstellung von Agarplatten für die Transformation erfolgte mit LB-Agar-Pulver „Lennox“ nach Herstellerangaben. Nach Autoklavierung und Hinzugabe von Carbenicillin (Endkonzentration 50 µg/µl) wurden die Platten gegossen und bei 4 °C im Kühlraum gelagert.

2.2.2.3 Transformation von XL-10 Gold-*E.coli*-Bakterien

Durch die Transformation kann fremde, gentechnisch veränderte Plasmid-DNA in Bakterienzellen eingebracht werden. Dort kommt es dann zur Vervielfältigung der Plasmid-DNA durch die Bakterien.

In dieser Arbeit wurde zur Transformation die sogenannte Hitzeschock-Methode verwendet. Dabei wurden 50 µl der aufgetauten Bakterien in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen aliquotiert und 2 µl β-Mercaptoethanol hinzu pipettiert. Anschließend wurde das Falcon-Röhrchen vorsichtig geschüttelt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert, während es alle zwei Minuten erneut vorsichtig geschüttelt wurde. Nach Hinzugabe des kompletten, verdauten PCR-Ansatzes und erneutem, vorsichtigen Schütteln erfolgte die weitere Inkubation für 30 Minuten auf Eis. Nun wurden die Zellen in einem Wasserbad (42 °C) für genau 30 Sekunden einem Hitzeschock ausgesetzt und danach für weitere zwei Minuten auf Eis inkubiert. Während dieses Vorgangs wurde die Plasmid-DNA in die Bakterienzellen

aufgenommen. Nachfolgend wurden 400 µl S.O.C.-Medium, vorgewärmt auf 37 °C, zum Ansatz hinzugefügt. Die Ansätze wurden dann bei 37 °C für eine Stunde im Schüttler (225 rpm) inkubiert. Als Nächstes wurden 400 µl des Transformations-Ansatzes auf einer Agarplatte mit einem Drigalski-Spatel ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Bei erfolgreich durchgeführter Transformation war am nächsten Tag ein Wachstum von multiplen Bakterienkolonien auf der Agarplatte zu erwarten.

2.2.2.4 Transformation von Rosetta™2(DE3) pLysS *E.coli*-Zellen

Für die Transformation und Expression der rekombinanten NS3/4A-Protease wurden kompetente Rosetta™2(DE3) pLysS *E.coli*- Zellen und der Vektor pET-15b His-NS4A-GSGS-NS3 (zur Verfügung gestellt von Prof. Tetsuro Shimakami, Kanazawa University, Japan) verwendet.^{41,68} Neben einer Gensequenz für einen His-Tag, welcher später wichtig für die Proteinaufreinigung ist, enthält der Expressionsvektor außerdem ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Ampicillin. Da das verwandte Antibiotikum Carbenicillin stabiler ist, wurde in dieser Arbeit dieses Antibiotikum verwendet. Des Weiteren besitzen die verwendeten Bakterien ein Resistenzgen für das Antibiotikum Chloramphenicol.

Für die Transformation der kompetenten Rosetta™2(DE3) pLysS *E.coli*-Zellen wurde ebenfalls die Hitzeschock-Methode verwendet. Dafür wurden ca. 10 ng des mutierten DNA-Plasmids zu 20 µL Zellen pipettiert. Es folgte daraufhin eine einminütige Inkubation des Ansatzes auf Eis, ein Hitzeschock von 40-45 Sekunden im Wasserbad (42 °C) sowie eine weitere Inkubation auf Eis für zwei Minuten. Nach Hinzugabe von 250 µl vorgewärmten S.O.C.-Mediums (37 °C) wurde der Transformationsansatz anschließend bei 37 °C für eine Stunde im Schüttler (225 rpm) inkubiert.

2.2.2.5 Herstellung einer Vorkultur für die Proteinexpression

Um eine Vorkultur für die Proteinexpression vorzubereiten, wurde 100 ml LB-Medium mit Carbenicillin (Endkonzentration 50 µg/µl) und Chloramphenicol (Endkonzentration 34 µg/µl) versetzt und mit dem gesamten Transformationsansatz der Rosetta™2(DE3) pLysS-*E.coli*-Zellen beimpft. Die Vorkultur wurde dann über Nacht bei 37 °C im Schüttler (225 rpm) inkubiert.

2.2.2.6 Expression der rekombinanten NS3/4A-Protease

Um ausreichende Mengen an Protein zu erhalten, wurden zunächst fünf mal 1 l LB-Medium, versetzt mit Carbenicillin (Endkonzentration 50 µg/µl), mit je 5 ml der Vorkultur beimpft. Danach wurden die Bakterienkulturen bei 37 °C und 140 rpm in einem Schüttler inkubiert und in regelmäßigen Zeitabständen die OD bestimmt, um das Bakterienwachstum zu kontrollieren. Die photometrische Bestimmung der OD erfolgte in einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm. Die Dauer bis zum Erreichen der gewünschten OD von 0,6-0,8 belief sich im Durchschnitt auf etwa vier bis fünf Stunden.

Nach Erreichen der optimalen OD wurde die Fermentationstemperatur auf 18 °C gesenkt und die Proteinexpression durch Hinzugabe von je 5 ml einer LB-Medium-Stocklösung, versetzt mit IPTG und ZnCl₂, induziert, sodass sich Endkonzentrationen von 0,1 mM IPTG und 100 µM ZnCl₂ ergaben. Nach 18 Stunden erfolgte schließlich das Ernten der Bakterienkulturen.

2.2.3 Proteinanalytische Methoden

2.2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um eine quantitative Aussage über die Konzentration des aufgereinigten Proteins zu machen, wurde die Bradford-Methode verwendet.⁴³

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden dabei 2 µl des Proteinextraktes mit 798 µl Coomassie-Proteinstaining vermischt. Für die Nullwertmessung wurden statt des Proteinextrakts 2 µl Aqua dest. hinzugefügt. Die Absorption wurde im Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm analysiert. Schließlich konnte die Konzentration über folgende Formel berechnet werden:

$$c \text{ [}\mu\text{g}/\mu\text{l]} = \frac{\text{Abs}}{(0,055 * x)}$$

c = Konzentration

Abs = Absorption

x = Proteinextrakt-Volumen [µl], verwendet für die Konzentrationsbestimmung

2.2.3.2 Proteinauftrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Identifizierung und Quantifizierung des aufgereinigten Proteins wurde das Prinzip der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)⁴⁴ genutzt. Bei diesem Verfahren werden die Proteine der Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu werden die Proteine durch Zugabe des anionischen Detergens Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS) stark negativ geladen und verlieren somit ihre Eigenladung. Zudem werden Disulfidbrücken durch Hinzugabe von Thiolen aufgebrochen und durch das Erhitzen des

Proteingemisches Sekundär- und Tertiärstrukturen aufgehoben. Die Proteine stehen somit linearisiert und gleich geladen zur Auftrennung bereit.

Das zu durchlaufende Gel besteht aus einem Polyacrylamid-Maschenwerk, welches die Proteine je nach Größe mehr oder weniger stark bremst. Kleine Proteine durchlaufen das Maschenwerk dabei schneller, größere Proteine entsprechend langsamer. Zusammengesetzt ist das Gel aus einem Sammel- und einem Trenngel. Im pH-neutralen und weitmaschigen Sammelgel werden die Proteine zuerst gesammelt und an der Grenze zum Trenngel aufkonzentriert. Im basischen, engmaschigeren Trenngel erfolgt schließlich die Auftrennung der Größe nach. Angetrieben werden die gleichmäßig negativ geladenen Proteine durch ein elektrisches Feld, welches sie von der Kathode zur Anode laufen lässt.

Eine Menge von 6 µl des zu analysierenden Proteinextraktes wurde mit 5 x Laemmli-Puffer (Roti-Load) versetzt und danach bei 95 °C für fünf Minuten aufgeköcht.

Im Folgenden wurden die Lauftaschen eines 10 %igen Gels mit 10 µl des Proteinstandards (Precision Plus Protein, Kaleidoscope) sowie den vorbereiteten Proteinextrakten beladen. Nun wurden die Proteine bei 120 mV für 90 Minuten aufgetrennt.

2.2.3.3 Ermittlung der Proteinreinheit

Die Coomassie-Färbung ist eine Methode zur Abschätzung der Reinheit elektrophoretisch aufgetrennter Proteine im Polyacrylamid-Gel. Hierzu wurde das Polyacrylamid-Gel mit der Coomassie-Färbelösung für zehn Minuten inkubiert, wobei sich der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau-G-250 unspezifisch an die Aminosäureseitenketten der Proteine anlagerte. Da neben den Proteinen auch das Polyacrylamid-Gel unspezifisch angefärbt wird, wurde die Coomassie-Färbelösung abgeschüttet und das Gel in der Coomassie-Entfärbelösung für drei bis vier Stunden inkubiert.

2.2.3.4 Western Blot-Analyse zum Nachweis der NS3/4A-Protease

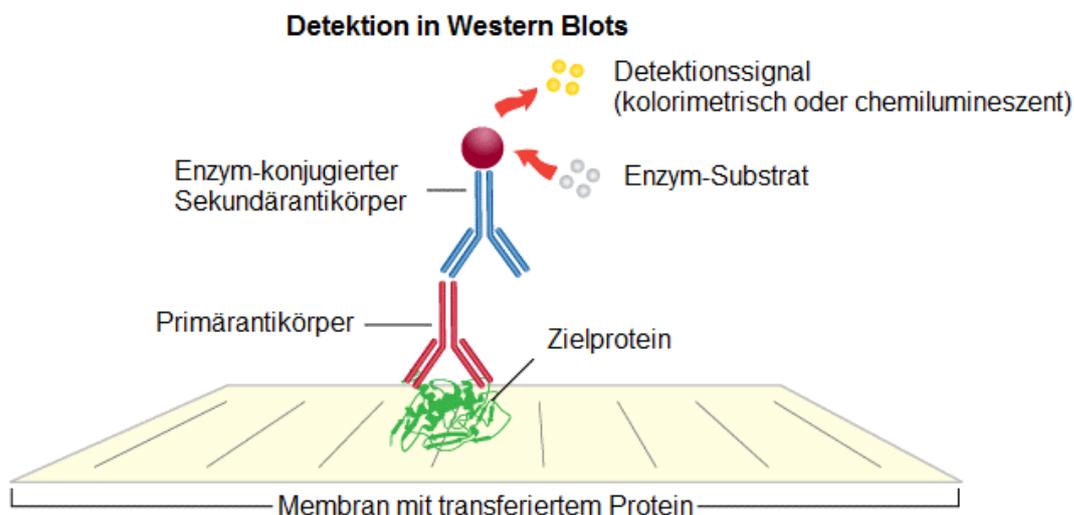
Bei einem Western Blot werden die zuvor aufgetrennten, negativ geladenen Proteine durch ein senkrecht zum Gel angesetztes elektrisches Feld auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Diese Membran besitzt eine hohe Proteinbindungskapazität. Hierbei wird die Semi-Dry-Blot-Methode angewendet. Für den Proteintransfer wurde zunächst das Trenngel zusammen mit der Nitrocellulose zwischen jeweils zwei Filterpapieren platziert. Die Filterpapiere wurden zuvor zehn Minuten, die Nitrocellulose eine Minute in Blot-Puffer getränkt. Um eine vollständige Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulose zu ermöglichen, wurden verbliebene Luftblasen vorsichtig mit einer Plastikrolle ausgestrichen. Schließlich erfolgte der Proteintransfer in einer entsprechenden Western Blot-Kammer für 70 Minuten bei 0,3 A und 25 V.

Um den erfolgreichen Proteintransfer zu überprüfen, wurde die Nitrocellulose-Membran anschließend für fünf Minuten mit Ponceau S-Lösung inkubiert. Ponceau S bindet reversibel an die auf der Membran befindlichen Proteine und macht diese als Banden sichtbar. Nach Abschütten der Ponceau S-Lösung erfolgte das Entfärben durch zweimaliges, vorsichtiges Spülen mit Aqua dest.

2.2.3.5 Immundetektion

Die Nitrocellulose-Membran wurde für eine Stunde mit Milchpulverlösung (TBS + 5 % Milchpulver) bei Raumtemperatur inkubiert, um einer unspezifischen Antikörper-Bindung vorzubeugen. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper (Anti-Hepatitis C Virus NS3 antibody [8 G-2]; Abcam; verdünnt 1:3000 in 5 ml TBS + 5 % Milchpulver) bei 4 °C über Nacht auf einem Rollenschüttler inkubiert. Als nächstes wurde die Membran erneut gewaschen (2x mit TBS-T, 1x mit TBS; jeweils 10 Minuten). Anschließend wurde die Membran für eine Stunde mit einem Sekundär-Antikörper (donkey anti-goat IgG-HRP (sc-2020); Santa Cruz Biotechnology; verdünnt 1:4000 in 5 ml TBS + 5 % Milchpulver) bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde der Blot wieder dreifach gewaschen.

Zur Detektion des konjugierten Zweitantikörpers wurde schließlich die Membran mit 800 µl des Substrates Luminata Western HRP Chemolumineszenz (Millipore) benetzt. Die Chemolumineszenz-Reaktion wurde im Auto-Exposure-Modus des Detektionsgerätes LAS4000 aufgenommen, wobei die Einstellung der Entwicklungszeit automatisch erfolgte.



Bearbeitet nach <http://www.ispybio.com/search/protocols/Westernblot%20protocol36.htm>

Abbildung 6: Schematische Darstellung der Protein-Detektion mittels Antikörper

Das Protein liegt nach dem Proteintransfer auf der Nitrocellulose-Membran gebunden vor. Nachdem der Primärantikörper sich an das Protein gekoppelt hat, positioniert sich der Zweitantikörper am Fc-Teil des Primärantikörpers. Am Zweitantikörper besteht eine Verknüpfung zu einer Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP), welche die Umsetzung des HRP-Substrats katalysiert und so zur Entstehung eines Fluoreszenzsignals beiträgt. Dieses kann als Proteinbande im Detektionsgerät sichtbar gemacht werden.⁶⁵

2.2.4 Proteinchemische Methoden

2.2.4.1 Mechanische Zellyse mittels Sonifikation

Zu Beginn wurden die Zellsuspensionen in sechs 500 ml-Eppendorf-Behältern verteilt und bei 8.000 rpm zentrifugiert, bis der Überstand klar und die Bakterien als Pellet am Boden der Behälter angereichert waren. Im nächsten Schritt konnten die Pellets bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren oder direkt weiterverarbeitet werden. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Für den Zellaufschluss wurden die Pellets mit je 20 ml des Lyse-Puffers A10 resuspendiert und gleichmäßig in sechs 50 ml-Falcon-Röhrchen transferiert. Die Suspension eines jeden Falcons wurde nun jeweils fünf Mal für 30 Sekunden mit einer dazwischen liegenden Pause von 30 Sekunden sonifiziert.

Um entstandene Zelltrümmer zu entfernen, erfolgte eine Zentrifugation der Suspension für 30 Minuten (8.000 rpm). Nach Überführen des Überstands in 50 ml-Falcon-Röhrchen wurden diese erneut zentrifugiert. Zelltrümmer sollten sich dadurch am Boden als Pellet festsetzen.

Um der Frage nachzugehen, ob während diesen beiden Zentrifugationsschritten relevante Proteinmengen verloren gehen, wurden nach jeder Zentrifugation der sonifizierten Suspensionen Kontrollproben der Überstände (Supernatant) und Pellets gesichert. Hierzu wurden 50 µl des Überstands und 50 µl des Pellets, welches zuvor in 10 ml Aqua ad iniectabilia resuspendiert worden war, in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und für die SDS-Page (siehe 2.2.3.2) bei -20 °C aufbewahrt. Benannt wurden diese Kontrollproben dem Zentrifugationsschritt entsprechend mit Supernatant 1 (SN1), Pellet 1 (P1) oder Supernatant 2 (SN2), Pellet 2 (P2).

2.2.4.2 Proteinaufreinigung

Die Ni-NTA-Affinitätschromatographie ist ein Verfahren zur Aufreinigung rekombinanter Fusionsproteine unter Benutzung einer Nickel-Nitriloacetat-Agarose.

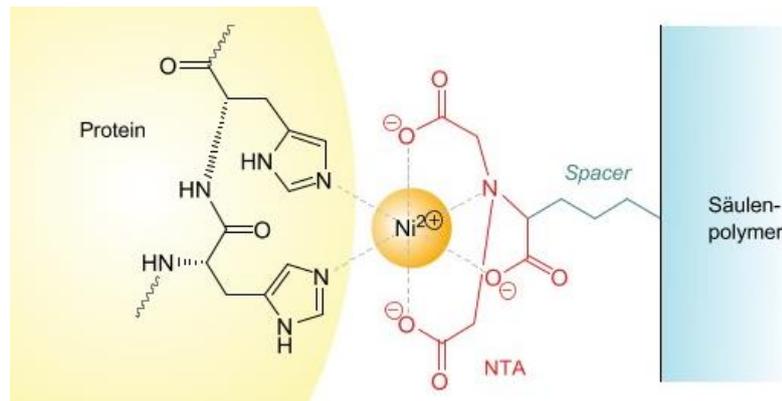


Abbildung 7: Prinzip der Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Schematische Darstellung der Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Die exprimierten Proteine binden aufgrund ihres His-Tags mit hoher Spezifität und Affinität an die Ni-NTA-Matrix. Ausgenutzt wird die Bildung eines Chelat-Komplexes zwischen den Histidin-Seitenketten des His-Tags und den Nickel-Ionen der Agarose. Im Anschluss können die Proteine durch einen Imidazol-Gradienten eluiert werden.⁶⁶

Die Aufreinigung erfolgte zunächst als Batch-Aufreinigung und abschließend über eine Waschsäule.

Für die optimale Nutzung der Ni-NTA-Agarose wurden je 2 ml der Agarose auf vier 50 ml-Falcon-Röhrchen aliquotiert und zusammen mit je 4 ml des Waschpuffers A20 (Tabelle 10) für zwei Minuten durch Zentrifugation (500 g) äquilibriert. Der Überstand dieses Waschschritts wurde verworfen. Im Folgenden wurde das Zellysate gleichmäßig auf die Falcon-Röhrchen mit der Agarose verteilt und über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Nach Zentrifugation der Suspension bei 500 g für vier Minuten wurde zu Kontrollzwecken 50 µl des Überstands (SN3) für die SDS-PAGE entnommen. Auch diese Probe wurde bis zur SDS-PAGE bei -20 °C aufgehoben. Der Überstand wurde verworfen. Nach Resuspension der Agarose mit je 5 ml des Waschpuffers A20 wurde diese gleichmäßig auf zwei 15 ml-Falcon-Röhrchen verteilt. Es folgten acht Zyklen aus

jeweils einem Wasch- und einem Zentrifugationsschritt. Gewaschen wurde mit je 5 ml des Waschpuffers A20. Die Zentrifugation erfolgte jeweils für zwei Minuten (500 g). Nach jeder Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, sodass die Agarose erneut mit 5 ml Waschpuffer A20 resuspendiert werden konnte. Die gleiche Prozedur wurde mit dem Waschpuffer B50 (Tabelle 10) durchlaufen. Alle nun folgenden Schritte wurden im Kühlraum bei 4 °C vorgenommen.

Als nächstes wurde die Agarose mit je 5 ml des Waschpuffers B50 resuspendiert und in eine Waschsäule (Econo-Pac Chromatography Column, BIO-RAD) pipettiert. Um möglichst alle Agarose-Beads zu transferieren, wurden die Falcon-Röhrchen nochmals mit je 5 ml des verbliebenen Puffers B50 ausgespült und auf die Suspension in der Waschsäule gegeben. Anschließend wurde die Agarose mit 900 ml des Waschpuffers B60 (Tabelle 10) gewaschen. Dabei macht man sich das „gravity flow-Prinzip“ (Abbildung 8) zu Nutze, bei dem der Puffer die Waschsäule aufgrund der Schwerkraft durchlaufen kann. Zuletzt wurde das Protein mit dem Elutionspuffer (Tabelle 10) in die bereitstehenden 1,5 ml-Reaktionsgefäße eluiert, für die langfristige Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

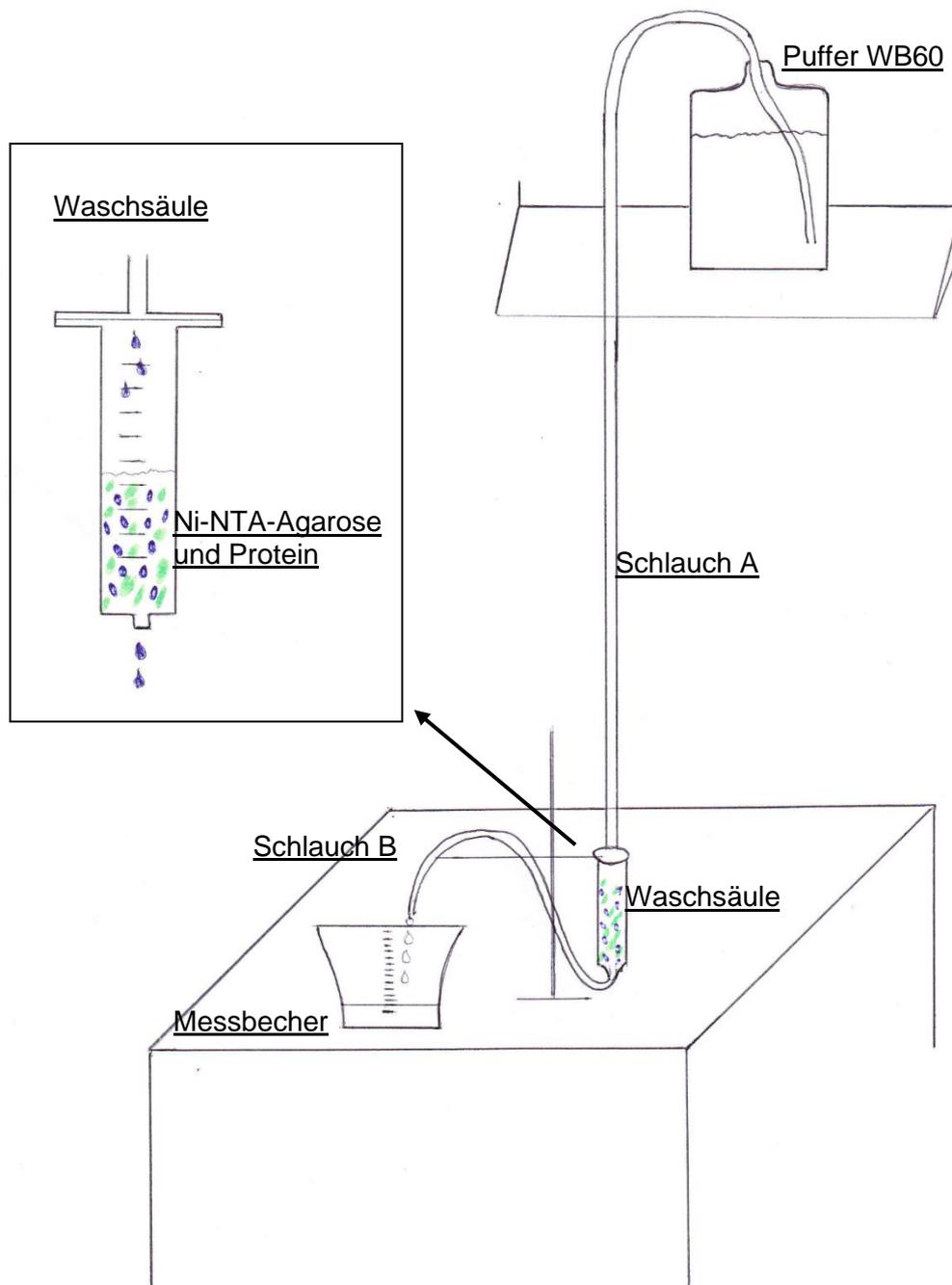


Abbildung 8: Versuchsaufbau der Affinitätschromatographie

Die Agarose (blaue Kugeln) befindet sich mit dem gebundenen Protein (grüne Striche) in der Waschsäule (siehe Bildausschnitt links). Sie wird von einem Haltearm eines Ständers fixiert und ist mit Schlauch A und B in einem abgedichteten System verbunden. Schlauch A wird in eine mit Puffer WB60 befüllte Glasflasche getaucht, welche etwa einen halben Meter über der Waschsäule platziert ist. Der Schlauch muss für die Verwendung des gesamten Puffers komplett bis an den Flaschenboden eingetaucht sein. Durch das „gravity flow-Prinzip“ kann der Puffer der Schwerkraft nach die Waschsäule durchlaufen. Schlauch B wird über den Haltearm des Ständers geführt, sodass der durchfließende Puffer in einem Messbecher aufgefangen werden kann. Durch die Führung des Schlauchs um den Haltearm herum wird ein Austrocknen der Agarose verhindert. Der restliche, verbliebene Puffer wird somit zurückgehalten, was einer ungewollten Denaturierung der aufgereinigten Proteine vorbeugt.

2.2.4.3 Bestimmung der Proteinstabilität mittels Thermal Shift-Assay

Der Thermal Shift-Assay, in der Literatur auch Differential Scanning Fluorimetry (DSF) oder ThermoFluor™ genannt, ist eine Methode zur Betrachtung unter anderem möglicher Effekte von Aminosäureaustauschen auf die Faltung von Proteinen.⁴⁵⁻⁴⁷ In dieser Arbeit sollten die Auswirkungen des Aminosäureaustauschs Q80K und der assoziierten second site-Austausche auf die Faltung der NS3/4A-Protease untersucht werden. Ziel dieses Assays war die Bestimmung einer Schmelzkurve und eines Schmelzpunktes T_m , um einen Vergleich bezüglich der Proteinstabilität zwischen den einzelnen NS3/4A-Varianten zu ziehen.

Dabei wurde die aufgereinigte NS3/4A-Protease in einem StepOnePlus Realtime-PCR-Cycler schrittweise um ein Grad Celsius von 20 °C auf 95 °C erwärmt, was zur Freilegung hydrophober Proteinbereiche der Protease führte. Der hinzugefügte Farbstoff SYPRO Orange lagerte sich dabei mit hoher Affinität an die entsprechenden hydrophoben Bereiche des Proteins an und generierte ein Fluoreszenzsignal (Abbildung 9).

Unter Verwendung der Software GraphPad⁴⁸ und der Boltzmann-Gleichung wurden für die unterschiedlichen Proteinvarianten jeweils sigmoidale Schmelzkurve erstellt. Diese spiegeln den Verlauf des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit zur Temperatur wider. Außerdem wurde für jede Variante ein Schmelzpunkt T_m bestimmt. Dieser wird durch die Ermittlung des Kurvenwendepunkts erhalten und beschreibt die Temperatur, an der 50 % des Proteins noch gefaltet vorliegen. Je höher der Schmelzpunkt einer Variante, desto stabiler ist die Proteinfaltung.⁴⁵

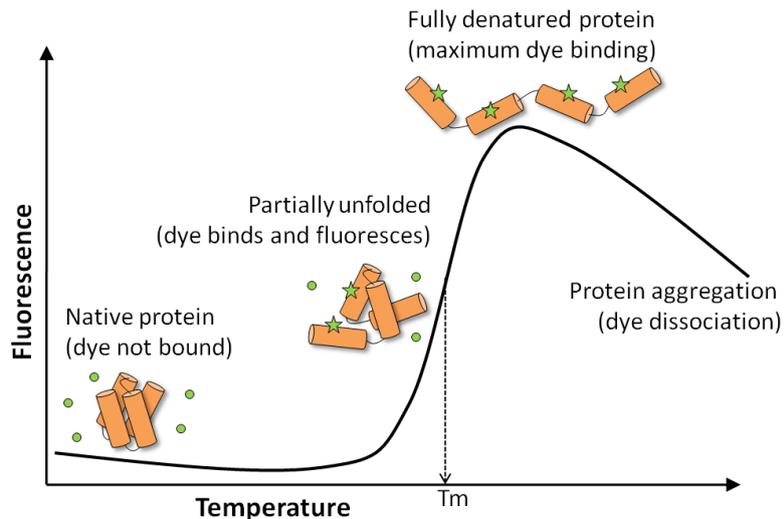


Abbildung 9: Kurvenverlauf beim Thermal Shift-Assay

Schematische Darstellung einer Schmelzkurve. Bei niedrigen Temperaturwerten liegt das Protein gefaltet vor und ist für den Farbstoff unzugänglich. Mit steigenden Temperaturwerten kommt es zur schrittweisen Denaturierung und Exposition hydrophober Proteinbereiche, welche nun von dem Farbstoff gebunden werden. Das Fluoreszenzsignal steigt nun steil an und erreicht ein Fluoreszenz-Maximum, welches daraufhin aufgrund der zunehmenden Proteinaggregation und Farbstoffdissoziation wieder abnimmt.⁶⁷

Zu Beginn des Experiments wurde eine Stammlösung mit Assay Buffer (Tabelle 15) hergestellt und die aufgereinigte NS3/4A-Protease darin verdünnt (Endkonzentration 0,1 μM). Für jede Variante wurde ein Versuchsansatz mit einem Gesamtvolumen von 140 μl für jeweils sieben Proben à 20 μl vorbereitet (Tabelle 16). Die NS3/4A-Protease wurde erst kurz vor Messbeginn hinzugegeben. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne NS3/4A-Protease mit einem Gesamtvolumen von 40 μl für zwei Proben à 20 μl hergestellt. Alle Proben wurden jeweils in eine Vertiefung der 96 well-Platte pipettiert, woraufhin diese mit einer durchsichtigen Folie versiegelt wurde. Zur Vermeidung von Lufteinschlüssen wurden die Reaktionsansätze im Anschluss kurz zentrifugiert. Um eine Exposition des Farbstoffs mit UV-Strahlung zu vermeiden, wurde die Platte mit Alu-Folie abgedeckt.

Zum Schluss wurde die Platte mit den Reaktionsansätzen in das Lesegerät des Real-Time-PCR-Cyclers gegeben und die Messung gestartet. Alle Varianten wurden zur gleichen Zeit auf einer Platte gemessen.

Tabelle 15: Zusammensetzung Assay Buffer (pH 7,4)

Substanz	Volumen
Aqua Millipore	889 µl
Hepes 1M	10 µl
NaCl 4M	37,5 µl

Tabelle 16: Zusammensetzung Versuchsansatz (pH 7,4)

Substanz	Volumen
Assay Buffer	28 µl
ZnCl ₂ (10 mM)	7 µl
SYPRO Orange (1:300 verdünnt in Aqua millipore)	17,5 µl
NS3/4A-Protease (0,1 µM)	87,5 µl

Tabelle 17: Zusammensetzung Kontrollansatz (pH 7,4)

Substanz	Volumen
Assay Buffer	33 µl
ZnCl ₂ (10 mM)	2 µl
SYPRO Orange (1:300 verdünnt in Aqua millipore)	5 µl
NS3-Protease (0,1 µM)	-----

Tabelle 18: Software-Setup Thermal Shift-Assay

Setup	Setting
Experiment properties	<ul style="list-style-type: none"> • Experiment type: Melt Curve • Reagents: Other • Ramp speed: Standard
Target properties	<ul style="list-style-type: none"> • Reporter: ROX • Quencher: None
Plate layout	<ul style="list-style-type: none"> • Assign targets to all wells in use • Passive reference: None
Run method	<ul style="list-style-type: none"> • Reaction Volume Per Well: 20 µl • Thermal profile: Step 1, Temp: 20 °C, Time: 2 minutes Step 2, Temp: 95 °C, Time: 2 minutes • Ramp mode: Continuous • Ramp rate: 1 %

2.2.4.4 Bestimmung der Enzymaktivität mittels FRET-Assay

Um die Auswirkungen der einzelnen Aminosäureaustausche auf die Enzymaktivität der NS3/4A-Protease zu bestimmen, wurde ein FRET-Assay (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer; nach Theodor Förster 1948)⁴⁹ verwendet.

Die Methode basiert auf dem strahlungsfreien Energietransfer von einem angeregten Donor auf einen Akzeptor. Dieser Transfer ist nur möglich, wenn Donor und Akzeptor sich in enger räumlicher Nähe zueinander befinden. Das Emissionsspektrum des Donors muss dabei mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen. Überschreitet die räumliche Nähe von Akzeptor und Donor eine bestimmte Entfernung, kommt es zu einem Abbruch des Energietransfers.

Verwendet wird ein synthetisch hergestelltes 5-FAM/QXLTM520 FRET-Peptidsubstrat (5 - FAM - SLGRKIQIQ - K(QXL[®] 520) - NH₂; Anaspec), welches die NS4A/4B-Schnittstelle des HCV-Polyproteins enthält. Die Schnittstelle liegt zwischen dem Donor (5-FAM) und dem Akzeptor (QXLTM520), sodass sich Donor und Akzeptor in enger räumlicher Nähe zueinander befinden. 5-FAM ist ein Fluoreszenzfarbstoff mit einem Exzitations-/Emissionsmaximum von 492/518

nm. QXL™520 ist ein nicht-fluoreszierender Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum von 520 nm. Das Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt fast komplett mit dem Emissionsspektrum des Donors. Bei Intaktheit des Peptidsubstrats wird das Emissionssignal des Donors durch die Absorption des gekoppelten Akzeptors somit unterdrückt. Kommt es jedoch zur Spaltung des Peptidsubstrats durch die NS3/4A-Protease und damit zur Dislokation des Akzeptors, wird ein Emissionssignal des Donors generiert und im Spektrophotometer (Envision multilable plate reader; PerkinElmer) bei einer Exzitation/Emission von 490/520 nm detektiert (Abbildung 10). Mit den ermittelten Fluoreszenzwerten ist eine Aussage über die enzymatische Aktivität der NS3/4A-Proteasevarianten möglich.⁵⁰

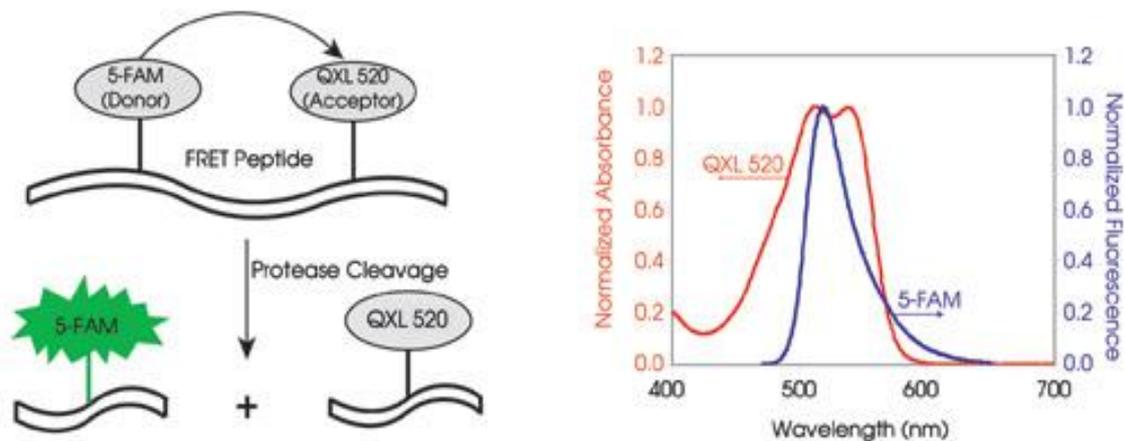


Abbildung 10: Schematische Darstellung des FRET-Assays

Auf der linken Seite ist schematisch das FRET-Prinzip dargestellt. Donor und Akzeptor sind über die NS4A/4B-Schnittstelle des HCV-Polyproteins gekoppelt. Solange sich Donor und Akzeptor in enger räumlicher Nähe zueinander befinden, kommt es zu einer Unterdrückung des Emissionssignals von 5-FAM durch die Absorption des Akzeptors. Nach Spaltung durch die NS3/4A-Protease wird das Emissionssignal des Donors messbar, da der Akzeptor das Signal aufgrund der Dislokation nun nicht mehr absorbieren kann. Auf der rechten Seite ist das Absorptionsspektrum des Akzeptors (rot) zu sehen, welches fast komplett mit dem Emissionsspektrum des Donors (blau) überlappt und somit bei Intaktheit des Peptidsubstrats das Emissionssignal des Donors unterdrückt.⁵⁰

Für die Kalibrierung des Geräts wurde der 5-FAM Referenzstandard (Anaspec) nach Angaben des Herstellers verwendet. Hierzu wurden Fluoreszenzmessungen mit verschiedenen 5-FAM Konzentrationen durchgeführt und eine Standardgerade ermittelt (Abbildung 11).

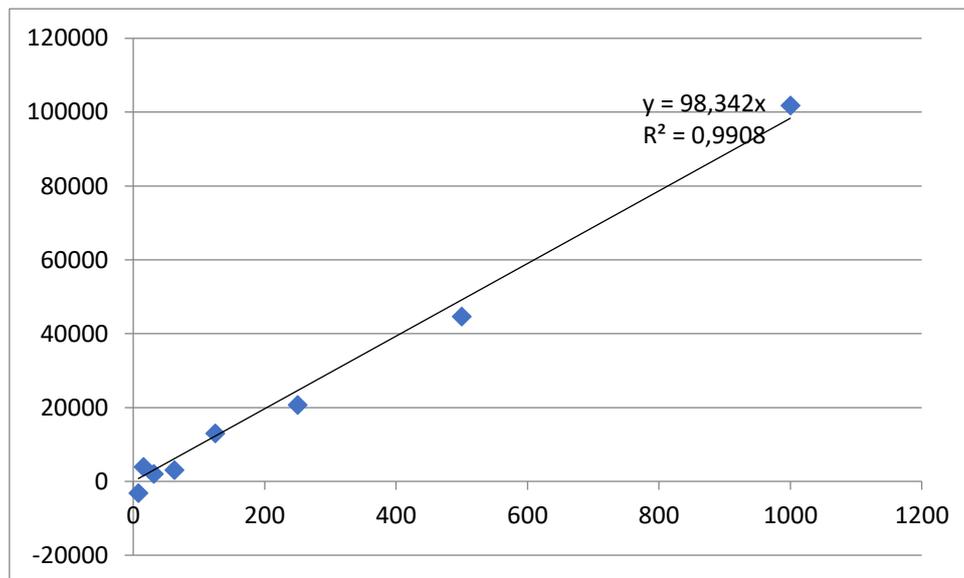


Abbildung 11: 5-FAM Referenz-Standard

Für die Kalibrierung des Geräts wurde eine Standardgerade erstellt. Hierfür wurde der Referenzstandard (5-FAM) kontinuierlich in Aqua ad injectabilia verdünnt (1000 nM; 500 nM; 250 nM; 125 nM; 62,5 nM; 31,25 nM; 15,625 nM; 7,8125 nM, 0 nM). Im Folgenden wurden von jeder Konzentrationsstufe 50 µl des verdünnten Referenzstandards in eine Vertiefung der 96 well-Platte pipettiert und 50 µl der unverdünnten Substrat-Lösung (Anaspec) hinzugefügt. Die Messung erfolgte bei einer Exzitation/Emission von 490/520 nm. Für die Erstellung der Standardgeraden wurden die ermittelten Fluoreszenzwerte gegen die Konzentration des Referenzstandards aufgetragen.

Um den Anteil aktiven Enzyms für die Berechnung der Umsatzrate (k_{cat}) zu bestimmen, wurden kleine Mengen der Protease (30 nM) mit größeren Mengen des Substrats (6 µM) inkubiert und die Fluoreszenz alle 20 Sekunden gemessen. Daraufhin wurde eine Gerade passend zur Steigung der linearen Initialphase angelegt und diese bis zur Y-Achse extrapoliert. Der Schnittpunkt mit der Y-Achse stimmt mit der Konzentration des aktiven Enzyms überein.^{22,51}

Für die Enzymaktivitätsmessung der einzelnen NS3/4A-Proteasevarianten wurden die NS3/4A-Protease (Endkonzentration: 100 nM) und die Substratlösung (Endkonzentrationen: 0,125 μ M, 0,25 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 4 μ M, 6 μ M, 12 μ M) in Assay Buffer (Anaspec) verdünnt. Pro Variante wurden je 50 μ l der verdünnten NS3/4A-Protease in 8 Vertiefungen der 96 well-Platte pipettiert und je 50 μ l der verdünnten Substratlösung in aufsteigender Konzentration hinzugefügt. Als Kontrollansatz wurden 50 μ l der unverdünnten Substratlösung zu 50 μ l Aqua ad injectabilia gegeben. Die Fluoreszenz wurde nach Reaktionsstart alle 10 Sekunden für 15 Minuten bei einer Exzitation/Emission von 490/520 nm gemessen. Die Hintergrundfluoreszenz des Kontrollansatzes wurde jeweils von den ermittelten Werten abgezogen. Durch Bestimmung der Steigung während der linearen Anfangsphase wurde für jede Substratkonzentration die initiale Reaktionsgeschwindigkeit (V_0) ermittelt. Im Anschluss wurde für jede NS3/4A-Variante eine Kurve mit den Reaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit zur Substratkonzentration erstellt. Die Bearbeitung der Daten und Charakterisierung der Michaelis-Menten-Kinetik (K_M , k_{cat}) erfolgte mit der EnVision Workstation unter Verwendung von Excel und der Software GraphPad⁴⁸.

2.2.5 Statistik

Mittelwerte und Standardfehler wurden mittels GraphPad berechnet. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten wurde mit einem zweiseitigen T-Test bestimmt (Konfidenzintervall 95 %).

2.2.6 *In silico*-Sequenz- und Strukturanalyse

Die Sequenzen der Genotyp 1a NS3-Protease wurden über die euHCV-Datenbank⁶⁹ abgerufen (Datum: 13.04.2016) und nach den folgenden Kriterien ausgewählt/gefiltert: single protein with standard name ns3, confirmed GT 1a and published before 2010. Identische Sequenzen wurden ausgeschlossen. Übrig

blieben 224 Sequenzen für den GT 1a und 358 Sequenzen für den GT 1b. Mit der Software weblogo⁵² wurde ein multiples Sequenzalignment erstellt.

Für die *in silico*-Strukturanalyse wurde die Kristallstruktur PDB-1CU1 aus der Protein-Datenbank RCSB PDB verwendet.⁵³ Dabei handelt es sich um einen Komplex der NS3-Protease gemeinsam mit der Helikasedomäne und dem Kofaktor NS4A mit einer Auflösung von 2.5 Ångström.⁵⁴ Die Visualisierung der Proteinstruktur und das Mapping der Aminosäureaustausche auf die 3D-Struktur erfolgte mittels PyMOL.⁵⁵

3 Ergebnisse

In der hier durchgeführten Arbeit sollen die Auswirkungen des natürlich vorkommenden Polymorphismus Q80K sowie der second site-Austausche A91S/T und S174N auf die Funktion und Stabilität der NS3/4A-Protease untersucht werden.

Die genannten second site-Aminosäureaustausche treten auffällig oft gemeinsam mit Q80K im NS3/4A-Proteasegen auf.³² Für diese Beobachtung gibt es bisher jedoch keine molekularbiologische Erklärung. Möglich wäre, dass die second site-Austausche sich günstig auf die Proteinfaltung und/oder enzymatische Aktivität der Protease auswirken und entsprechend Fitnessdefizite durch Q80K im HCV-Genotyp 1a optimieren.

Um dies zu überprüfen, sollen in der vorliegenden Arbeit die Einflüsse sowohl des Q80K-Polymorphismus als auch seiner second site-Austausche A91S/T und S174N auf (i) die Proteinfaltung und (ii) die enzymatische Aktivität der NS3/4A-Protease untersucht werden. Dabei sollen die unterschiedlichen Muster an second site-Austauschen hinsichtlich einer potentiell kompensatorischen Rolle bei der Proteinfaltung und/oder Proteaseaktivität untersucht werden.

Schließlich sollen die einzelnen Aminosäurepositionen auf verfügbare experimentelle Strukturmodelle aus der Proteindatenbank RCSB PDB⁵³ abgebildet werden, um anhand ihrer Position in der 3D Struktur des Proteins Aussagen über potentielle Effekte der entsprechenden Aminosäureaustausche auf die Proteinstruktur zu machen und damit potentielle molekulare Mechanismen der Fitnesskompensation zu identifizieren.

Für die Expression Resistenz-assoziiierter Varianten von NS3/4A wurde das Plasmid pET15b His-NS4A-GSGS-NS3 mit der Gensequenz des H77S.2-Isolats (HCV Genotyp 1a) verwendet.^{41,68} Per ortsgerichteter Mutagenese (siehe 2.2.1.1) wurden Austausche an den Positionen 80, 91 und 174 vorgenommen, sodass nach der Mutagenese neben der Wildtyp-Proteasesequenz auch Proteasen mit unterschiedlichen Mustern an Aminosäureaustauschen zur Proteinexpression in *E. coli* und nachfolgenden biophysikalischen Charakterisierung vorlagen (Tabelle 19).

Tabelle 19: NS3/4A-Varianten mit unterschiedlichen Mutationsmustern

Wildtyp	Q80	A91	S174
Single-Variante (Q80K)	Q80K	A91	S174
Doppel-Varianten	Q80K	A91S	S174
	Q80K	A91T	S174
	Q80K	A91	S174
Triple-Varianten	Q80K	A91S	S174N
	Q80K	A91T	S174N

3.1 Proteinexpression unterschiedlicher NS3/4A-Proteasevarianten

Nach erfolgreicher Mutagenese wurden die einzelnen Protease-Varianten in *E.coli* exprimiert und das Protein für die weitere Charakterisierung mittels biophysikalischer Assays aufgereinigt (siehe 2.2.2.6).

Exemplarisch dargestellt ist im Folgenden die Detektion des hochreinen Proteins für die Varianten Q80K und Q80K/A91T mit einem spezifischen Antikörper im Western Blot (siehe 2.2.3.4).

Im Coomassie-Gel (links) stellen sich bei 23 kDa die Banden der aufgereinigten Protease-Varianten dar. Bei etwa 60 kDa lässt sich eine weitere diskrete Bande detektieren, die einer für die weitere Charakterisierung unerheblichen Verunreinigung entspricht. Die beiden Banden rechts im Bild entsprechen der mittels Western Blot bei 23 kDa detektierten NS3/4A-Protease (Abbildung 12).

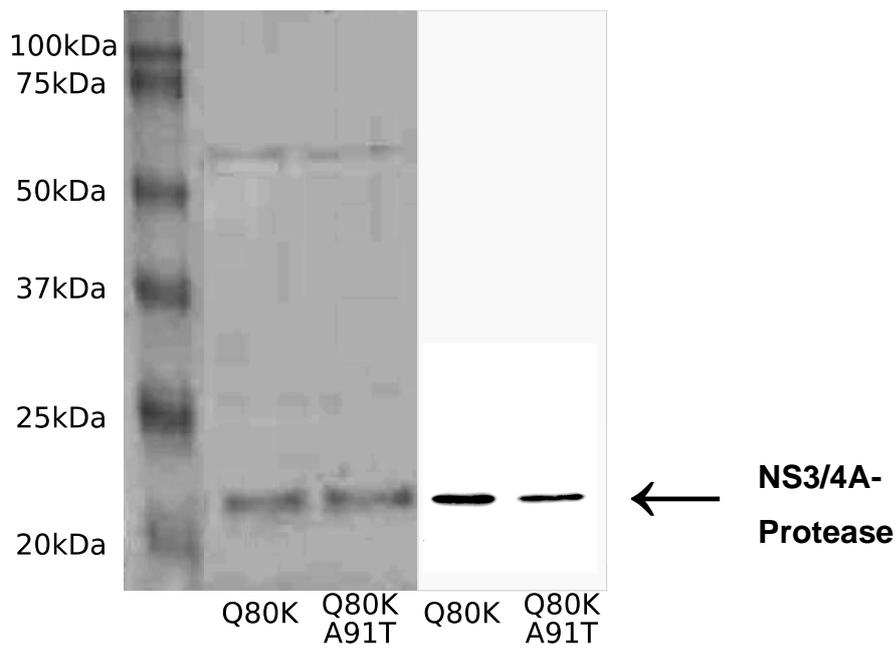


Abbildung 12: Coomassie-Gel und Western Blot

Rosetta2TM(DE3) pLysS-E.coli-Zellen wurden mit einem Expressionsvektor, der die NS3/4A-Varianten Q80K, A91S/T und S174N in unterschiedlichen Mutationsmustern enthielt, transformiert. Exemplarisch dargestellt sind das Coomassie-Gel und der Western Blot der aufgereinigten Varianten Q80K und Q80K/A91T.

Tabelle 20: Proteinkonzentrationen der exprimierten NS3/4A-Varianten

NS3/4A-Variante	max. Proteinkonzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]
Wildtyp	0,7
Q80K	1,23
Q80K/A91S	1,17
Q80K/A91S/S174N	1,0
Q80K/A91T	0,28
Q80K/S174N	0,74
Q80K/A91T/S174N	0,69

Die Proteinausbeute wurde mit der Bradford-Methode bei einer Exzitation/Emission von 470nm/595nm ermittelt. Die Proteinkonzentration wurde mithilfe der im Methodenteil dargestellten Formel berechnet (siehe 2.2.3.1).

Nach erfolgreicher Expression von Wildtyp und Protease-Varianten wurden nachfolgend die enzymatische Aktivität der NS3/4A-Protease mittels eines FRET-basierten Assays (siehe 3.2) sowie die Stabilität der Proteinfaltung mittels Thermal Shift-Assay (siehe 3.3) untersucht.

3.2 Effekte von Aminosäureaustauschen auf die Enzymaktivität der NS3/4A-Protease

Um eine Aussage über mögliche Veränderungen der enzymatischen Aktivität der NS3/4A-Protease durch den Q80K-Polymorphismus und seine second site-Austausche zu machen, wurde ein FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)-basierter Assay verwendet. Der Assay basiert auf der proteolytischen Spaltung eines mit einem Fluoreszenz-Tag markierten natürlichen peptidischen Substrates der NS3/4A-Protease, welches die Schnittstelle NS4A/B des viralen Polyproteins enthält (siehe 2.2.4.4).⁵⁰

Für jede Variante wurde die Reaktionsgeschwindigkeit unter verschiedenen Substratkonzentrationen gemessen (Abbildung 13) und nachfolgend die Michaelis-Menten-Kinetik ermittelt (Abbildung 15). Um die Affinität der NS3/4A-Protease zum Peptidsubstrat zu berechnen, wurde die Substratkonzentration bestimmt, bei welcher die enzymatische Reaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft (K_M). Je kleiner der ermittelte K_M -Wert, desto höher ist die Affinität der NS3/4A-Protease zu ihrem Substrat und umgekehrt. Zuzüglich wurden die Umsatzrate des Peptidsubstrats (k_{cat}) sowie die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) bestimmt (Abbildung 15).

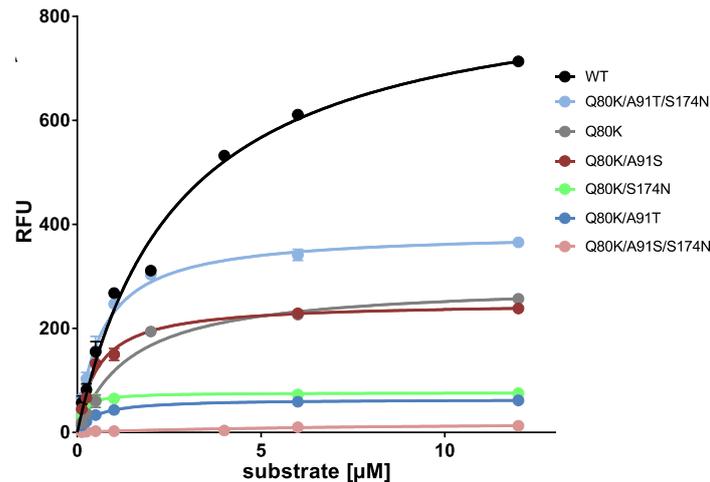


Abbildung 13: Zusammenfassende Darstellung der ermittelten Fluoreszenzwerte

Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde für jede NS3/4A-Variante mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen bestimmt.

Mit einer Reaktionsgeschwindigkeit von ca. 288 RFU/s (Relative Fluorescence Units/s) erreicht die Q80K-Variante lediglich ca. ein Drittel der für den Wildtyp gemessenen Maximalgeschwindigkeit von ca. 875 RFU/s (Abbildung 14A). Außerdem zeigt sich bei Q80K eine signifikant niedrigere Umsetzung des Peptidsubstrats ($k_{cat}=1,80/\text{min}$) im Vergleich zum Wildtyp-Protein ($k_{cat}=5,46/\text{min}$; $P=0,0002$). Dabei scheint die Bindungsaffinität der Q80K-Variante zum natürlichen Substrat ($K_M=1,44 \mu\text{M}$) verglichen mit dem Wildtyp-Protein ($K_M=2,71 \mu\text{M}$; $P=0,03$) signifikant höher zu liegen (Abbildung 15).

Während die Doppel-Variante Q80K/A91S mit einer Reaktionsgeschwindigkeit von ca. 250 RFU/s eine ähnlich niedrige Maximalgeschwindigkeit wie Q80K erreicht (Abbildung 14B), zeigt sich auch bei dieser Mutante eine signifikant höhere Bindungsaffinität zum Peptidsubstrat ($K_M=0,56 \mu\text{M}$) sowohl im Vergleich zum Wildtyp-Protein ($P=0,0024$), als auch im Vergleich zur Q80K-Variante Q80K ($P=0,02$). Der Unterschied der Umsatzraten zwischen Einzel- und Doppel-Variante ist jedoch nicht signifikant ($k_{cat}=1,56/\text{min}$; $P=0,11$).

Im Vergleich zum Wildtyp, zu Q80K und zur Doppelvariante Q80K/A91S weist die Triple-Variante Q80K/A91S/S174N mit ca. 21,5 RFU/s die niedrigste Reaktionsgeschwindigkeit auf (Abbildung 14C), einhergehend mit einem deutlich niedrigeren Substratumsatz. Verglichen mit Q80K ist der Umsatz mit lediglich ca.

0,13/min signifikant niedriger ($P < 0,0001$). Interessant ist, dass im Vergleich zu Q80K ($P = 0,22$) und auch zur Doppel-Variante Q80K/A91S ($P = 0,18$) die Bindungsaffinität der Triple-Variante Q80K/A91S/S174N abnimmt, was sich in einem vergleichsweise hohen K_M -Wert von 8,16 μM widerspiegelt.

Bei der Doppel-Variante Q80K/A91T liegt im Vergleich zu Q80K mit ca. 64 RFU/s die Reaktionsgeschwindigkeit ebenfalls deutlich niedriger (Abbildung 14D), einhergehend mit einer um fast 80 % niedrigeren Umsatzrate ($k_{\text{cat}} = 0,40/\text{min}$; $P = 0,0002$). Im Gegensatz dazu zeigen sich signifikant höhere Werte in der Bindungsaffinität für das Substrat im Vergleich zu Q80K ($K_M = 0,48 \mu\text{M}$; $P = 0,0245$). Verglichen mit dem Wildtyp liegt Q80K/A91T um mehr als 90 % unter dem Substratumsatz und unterhalb der Reaktionsgeschwindigkeit des Wildtypproteins ($P < 0,0001$), wohingegen die Bindungsaffinität um mehr als das Vierfache zunimmt ($P = 0,0027$).

Ähnliche Ergebnisse zeigen sich bei der Doppel-Variante Q80K/S174N. Während die Reaktionsgeschwindigkeit mit ca. 76 RFU/s deutlich unter dem Wert von Q80K liegt (Abbildung 14E) und es zu einer signifikanten Senkung der Umsatzrate kommt ($k_{\text{cat}} = 0,48$; $P = 0,0002$), werden bei der Bindungsaffinität von Q80K/S174N signifikant höhere Werte im Vergleich zu Q80K gemessen ($K_M = 0,14 \mu\text{M}$; $P < 0,0001$). Die ermittelten Werte der Reaktionsgeschwindigkeit und der Umsatzrate von Q80K/S174N liegen um mehr als 90 % niedriger als die des Wildtyps ($P < 0,0001$), wobei die Bindungsaffinität um fast 95 % höher ist als die des Wildtyps ($P = 0,0012$).

Als einzige Mutante zeigt die Triple-Variante Q80K/A91T/S174N höhere Werte in der Reaktionsgeschwindigkeit und Umsatzrate als Q80K. Neben einem Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit um etwa 34 % ($V_{\text{max}} = 385,8 \text{ RFU/s}$) (Abbildung 14F) kommt es hier zu einer signifikanten Zunahme der Umsatzrate ($k_{\text{cat}} = 2,41/\text{min}$; $P = 0,0148$) und der Affinität zum Peptidsubstrat ($K_M = 0,67 \mu\text{M}$; $P = 0,0398$). Verglichen mit dem Wildtyp liegen jedoch auch bei dieser Variante die Werte für Reaktionsgeschwindigkeit und Umsatzrate signifikant unterhalb derer des Wildtypproteins ($P = 0,0004$), wobei auch bei dieser Mutante die Bindungsaffinität signifikant stärker ausgeprägt ist als die des Wildtyps ($P = 0,0032$).

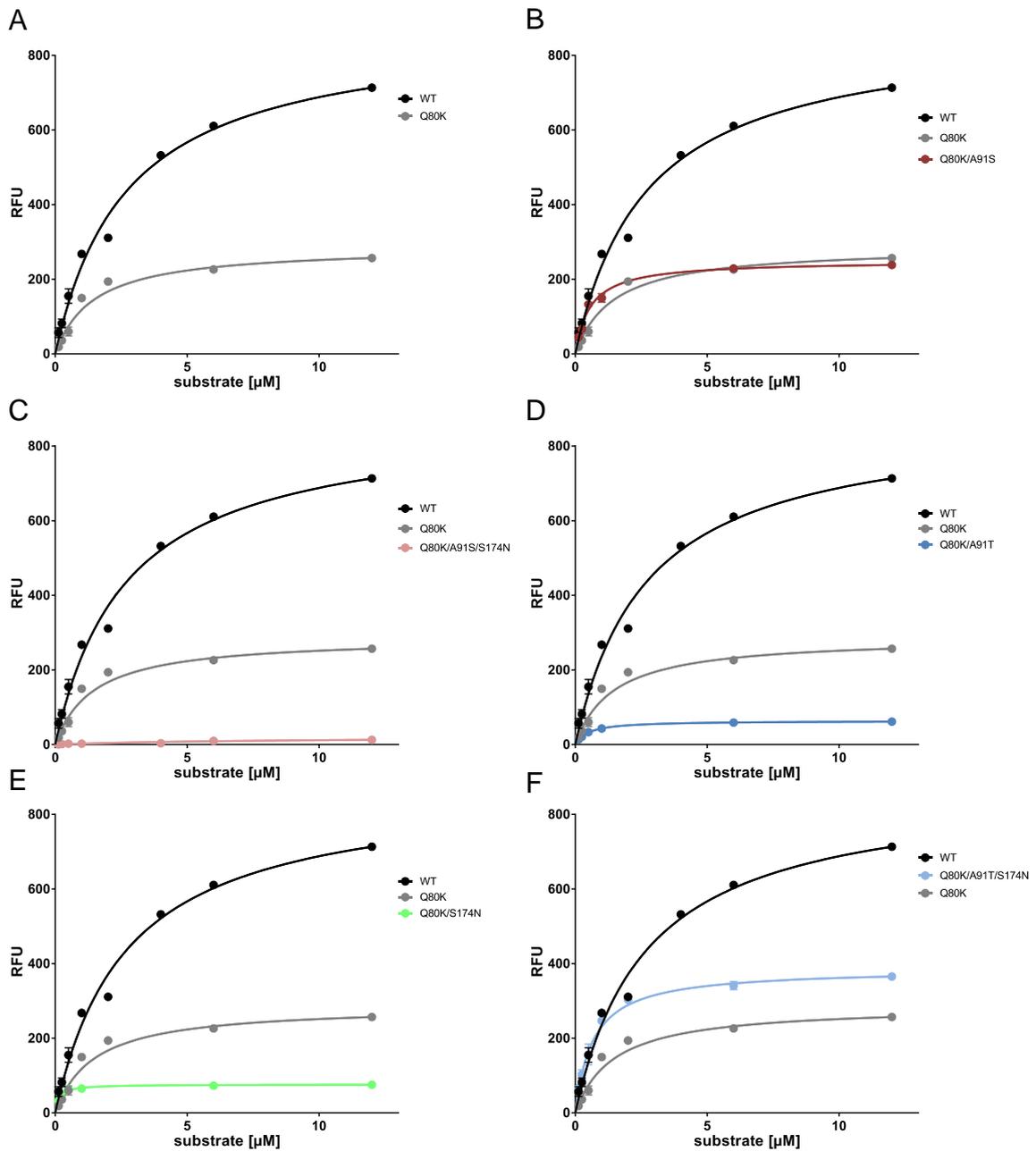


Abbildung 14: Reaktionsgeschwindigkeiten im Vergleich

In Graph A dargestellt sind die Reaktionsgeschwindigkeitskurven von Q80K und dem Wildtyp. Die Graphen B-F zeigen die Kurven der verschiedenen Varianten im Vergleich zu Q80K und dem Wildtyp. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist gegenüber der Substratkonzentration aufgetragen. Q80K/A91T/S174N zeigt in Graph F als einzige Variante eine Kurve mit höheren Reaktionsgeschwindigkeitswerten als Q80K. Generell liegen die Reaktionsgeschwindigkeitskurven der NS3/4A-Varianten deutlich unter der Kurve des Wildtyps.

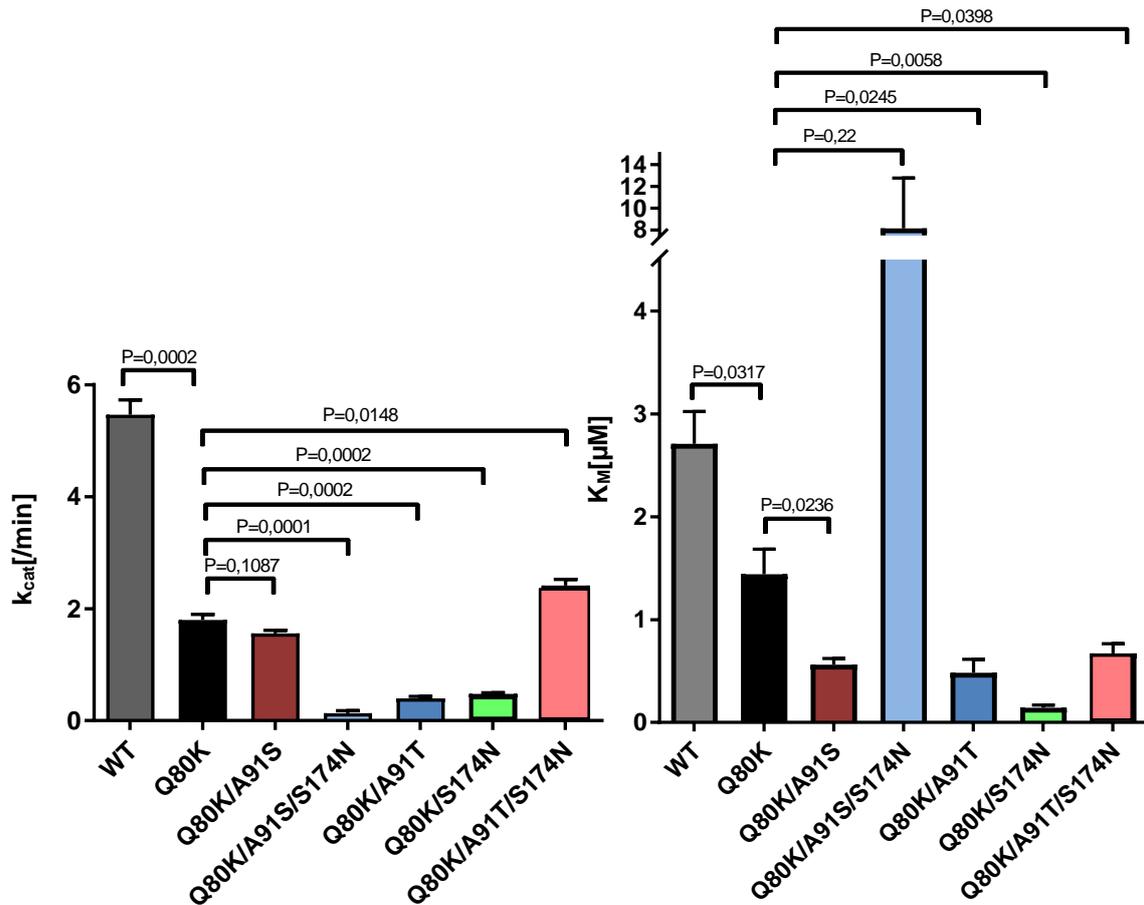


Abbildung 15: Michaelis-Menten-Kinetik der NS3/4A-Varianten

K_M und k_{cat} wurden durch Anlegen einer nicht-linearen Regressionskurve bestimmt. Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert sowie die Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. P-Werte wurden mit einem zweiseitigen T-Test berechnet.

Die Charakterisierung der enzymatischen Aktivität zeigt zusammenfassend eine statistisch signifikante Abnahme der Umsatzrate und Maximalgeschwindigkeit der NS3/4A-Protease durch den Aminosäureaustausch Q80K im Vergleich zum Wildtyp-Protein. Parallel hierzu steigt die Bindungsaffinität gegenüber dem Peptidsubstrat durch den Q80K-Austausch deutlich an, was den negativen Effekt auf die Umsatzrate teilweise erklären kann. Die second site-Austausche scheinen den negativen Effekt von Q80K auf die enzymatische Aktivität dabei zunächst nicht direkt zu kompensieren. Bis auf die Varianten Q80K/A91S und Q80K/A91T/S174N kommt es durchgängig bei allen getesteten Varianten zu signifikanten Einbußen in der Umsatzrate des Peptidsubstrats gegenüber dem

Wildtypprotein als auch gegenüber der Q80K-Variante. Die Bindungsaffinität der Protease zum natürlichen Substrat scheint dabei mit Ausnahme der Triple-Variante Q80K/A91S/S174N bei allen Varianten gegenüber Wildtyp und Q80K-Variante anzusteigen.

3.3 Effekte von Aminosäureaustauschen auf die Stabilität der Proteinfaltung der NS3/4A-Protease

Zur Beurteilung potentieller Effekte des Q80K-Polymorphismus und seiner assoziierten second site-Austausche A91T/S und S174N auf die Faltung der NS3/4A-Protease, wurde für jede Variante der Schmelzpunkt mittels Thermal Shift-Assay ermittelt. Durch die kontinuierliche Erwärmung der NS3/4A-Protease kommt es schrittweise zur Denaturierung des Proteins, wobei kovalente und nichtkovalente Bindungen aufgebrochen werden. Die dabei freiwerdenden hydrophoben Proteinbereiche generieren über einen entsprechenden Farbstoff ein Fluoreszenzsignal (siehe Material und Methoden). Der Verlauf des Fluoreszenzsignals (Relative Fluorescence Units/RFU) spiegelt sich in einer sigmoidalen Schmelzkurve wider (siehe 2.2.4.3). Der jeweilige Schmelzpunkt wird als Surrogatmarker für die Stabilität der Proteinfaltung und den Effekt einzelner Aminosäureaustausche auf die korrekte Proteinfaltung interpretiert.⁵⁶ In Abbildung 16 sind die Schmelzkurven der unterschiedlichen Varianten und des Wildtypproteins gemeinsam dargestellt.

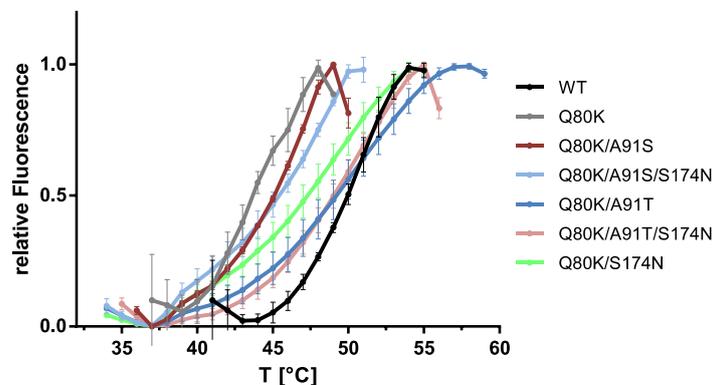


Abbildung 16: Zusammenfassende Darstellung der ermittelten Schmelzkurven

Nachfolgend werden die Schmelzkurven und ermittelten Schmelzpunkte der NS3/4A-Proteasen für die jeweiligen Aminosäureaustausche separat diskutiert.

Mit einem Schmelzpunkt von 50,6 °C erreicht der Wildtyp den höchsten Schmelzwert aller getesteten NS3/4A-Proteasevarianten. Im Vergleich dazu führt der Q80K-Polymorphismus zu einem um mehr als 6 °C niedrigeren Schmelzpunkt ($T_m=44,1$ °C), was eine signifikant niedrigere Thermostabilität anzeigt ($P<0,0001$). Der signifikante Verlust der Thermostabilität wird durch die Verschiebung der Q80K-Schmelzkurve zu niedrigen Temperaturen hin deutlich (Abbildung 17A).

Für die Doppel-Variante Q80K/A91S zeigt sich im Vergleich zur Q80K-Mutante ein signifikanter Anstieg des Schmelzpunkts auf 45,0 °C ($\Delta T_m=0,9$ °C; $P=0,0364$), was an der Verschiebung der Schmelzkurve zu höheren Temperaturwerten sichtbar wird (Abbildung 17B). Verglichen mit dem Wildtyp liegt der Schmelzpunkt von Q80K/A91S jedoch mit einem Temperaturunterschied von mehr als 5 °C weiterhin signifikant niedriger ($P<0,0001$).

Betrachtet man die Ergebnisse der Triple-Variante Q80K/A91S/S174N, so ist im Vergleich zu Q80K ein signifikanter Temperaturanstieg des Schmelzpunkts um 4,5 °C zu verzeichnen ($T_m= 48,6$ °C; $P=0,018$). Parallel dazu nähert sich der Schmelzpunkt der Triple-Variante auf bis zu 2 °C dem Schmelzpunkt des Wildtyps an, was sich ebenfalls an der Verschiebung der Schmelzkurve von Q80K/A91S/S174N in Richtung der Schmelzkurve des Wildtyps erkennen lässt (Abbildung 17C).

Noch deutlicher zeigt sich der Anstieg des Schmelzpunkts bei der Doppel-Variante Q80K/A91T. Hier liegt der Schmelzpunkt im Vergleich zu Q80K mit einem Anstieg von 5,5 °C auf 49,6 °C signifikant höher ($P<0,0001$) und damit lediglich 1 °C unter dem Schmelzpunkt des Wildtypproteins ($P<0,01$). Die Annäherung des Schmelzpunktes dieser Doppel-Variante zum Wildtyp wird in Abbildung 17D deutlich.

Analog zeigt sich bei der Doppel-Variante Q80K/S174N im Vergleich zu Q80K ein signifikanter Anstieg des Schmelzpunkts um 4,3 °C auf 48,4 °C ($P<0,0001$), wobei dieser mit einer Temperaturdifferenz von 2,2 °C weiterhin signifikant unter dem Schmelzpunkt des Wildtypproteins liegt ($P=0,0054$) (Abbildung 17E).

Die deutlichste Zunahme des Schmelzpunktes im Vergleich zu Q80K ist bei der Triple-Variante Q80K/A91T/S174N zu verzeichnen. Mit einem Anstieg um 6 °C kommt es hier zu einem signifikanten Anstieg des Schmelzpunktes auf 50,1 °C ($P < 0,0001$), einhergehend mit einer Annäherung auf bis zu 0,5 °C in Richtung des Schmelzpunktes des Wildtypproteins. Die deutliche Annäherung des Schmelzpunktes von Q80K/A91T/S174N hin zum Wildtyp spiegelt sich am Verlauf der Schmelzkurven in Abbildung 17F wider.

Zusammenfassend zeigt sich bei der Charakterisierung der Thermostabilität, dass Q80K im Vergleich zum Wildtyp und den second site-Varianten zu einer signifikanten Erniedrigung des Schmelzpunktes führt. Dies hat einen Verlust der Thermostabilität des Proteins zur Folge. Im Gegensatz dazu lässt sich bei allen untersuchten second site-Varianten im Vergleich zu Q80K eine signifikante Zunahme der Thermostabilität beobachten. Am ausgeprägtesten ist dieser Effekt bei der Triple-Variante Q80K/A91T/S174N, wo sich der Schmelzpunkt auf bis zu 0,5 °C dem Schmelzpunkt des Wildtypproteins annähert. Der Wildtyp weist mit einem Schmelzpunkt von 50,6 °C die höchste Thermostabilität auf. Aufgrund der beobachteten Ergebnisse liegt ein kompensatorischer Effekt der second site-Austausche auf die Thermostabilität und damit die Faltung der NS3/4A-Protease nahe.

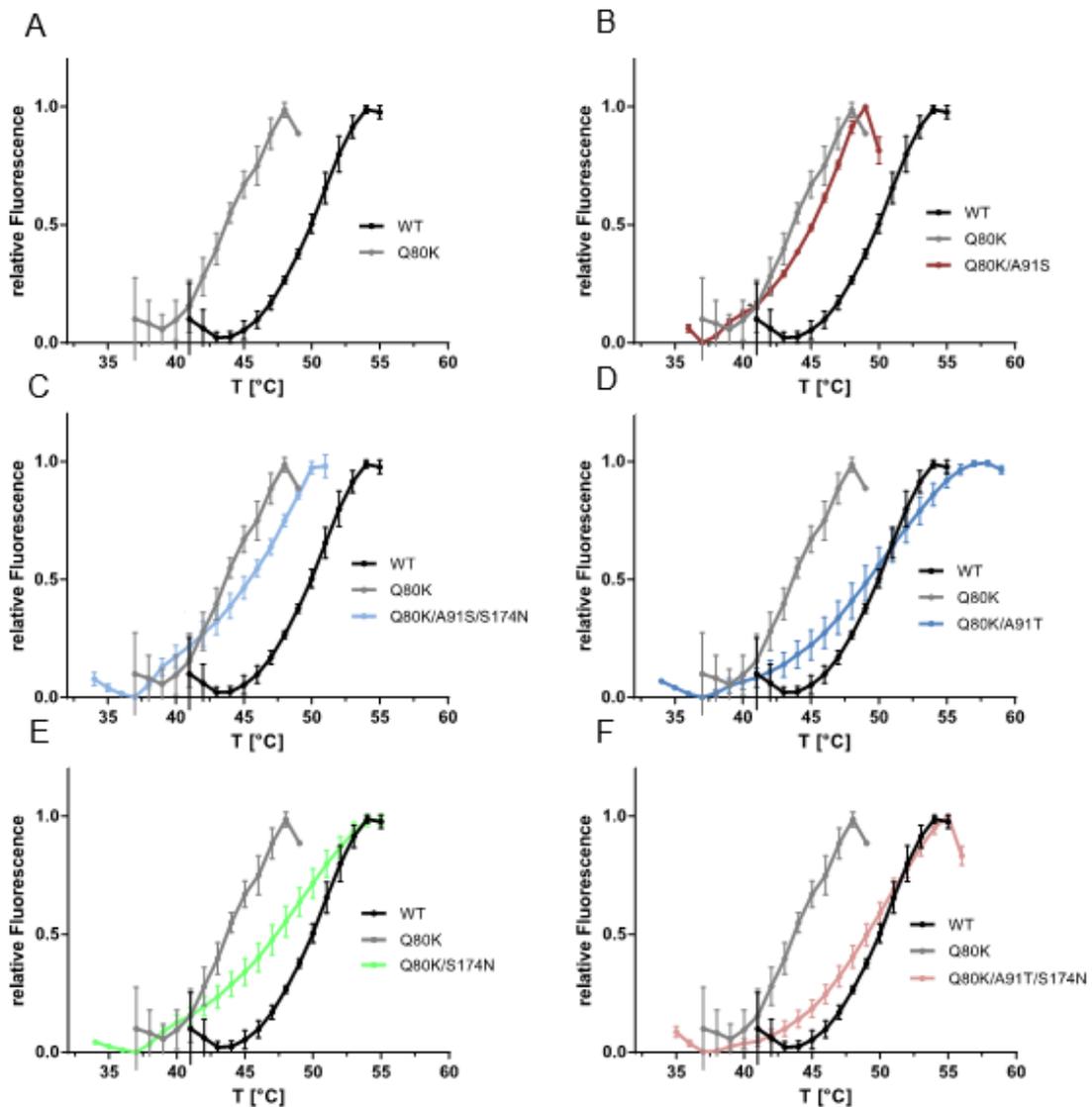


Abbildung 17: Schmelzkurven im Vergleich

Dargestellt sind die Schmelzkurven von Q80K im Vergleich mit dem Wildtyp (Graph A) und die Schmelzkurven der second site-Varianten im Vergleich mit Q80K und dem Wildtyp (Graph B - F). Von allen untersuchten Varianten ist die Schmelzkurve von Q80K am stärksten zu niedrigeren Temperaturbereichen hin verschoben. Bei der Schmelzkurve der Variante Q80K/A91T/S174N ist in Graph F die deutlichste Annäherung an die Schmelzkurve des Wildtyps zu erkennen.

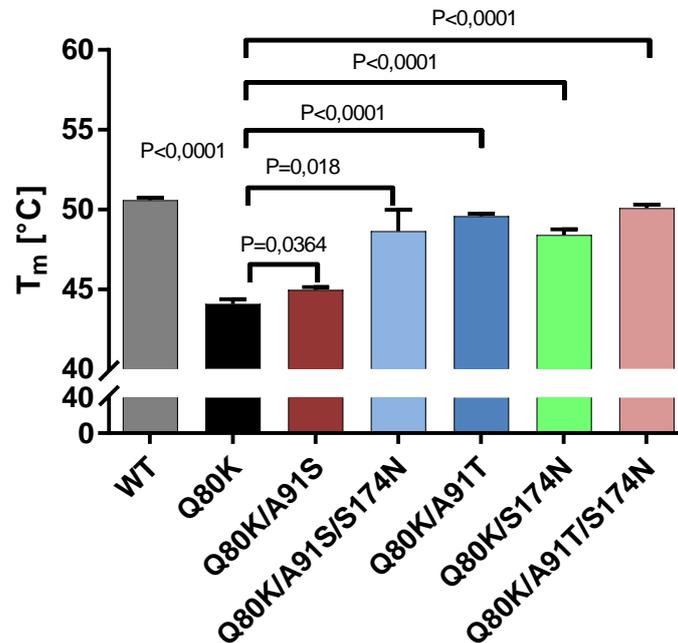


Abbildung 18: Einfluss von Q80K und seiner second site-Austausche auf die Proteinfaltung

Mittelwert und Standardabweichung der ermittelten Schmelzpunkte sind als Fehlerbalken aufgeführt und wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten ermittelt. P-Werte wurden durch einen zweiseitigen T-Test ermittelt.

Tabelle 21: Enzymkinetische Parameter und Schmelzpunkte der NS3/4A -Varianten

NS3/4A-Variante	T _m [°C]	SEM	V _{max} [RFU/s]	k _{cat} min ⁻¹	SEM	K _M [μM]	SEM
WT	50,59	±0,15	874,5	5,46	±0,26	2,71	±0,31
Q80K	44,08	±0,29	287,9	1,8	±0,1	1,44	±0,24
Q80K/A91S	44,95	±0,19	249,6	1,56	±0,06	0,56	±0,06
Q80K/A91S/S174N	48,64	±1,33	21,48	0,13	±0,04	8,16	±4,62
Q80K/A91T	49,57	±0,16	63,9	0,4	±0,03	0,48	±0,13
Q80K/S174N	48,4	±0,37	76,38	0,48	±0,02	0,14	±0,03
Q80K/A91T/S174N	50,09	±0,21	385,8	2,41	±0,11	0,67	±0,09

Schmelzpunkte und Michaelis-Menten-Kinetik wurden durch einen Thermal Shift-Assay und einen FRET-Assay ermittelt. Dargestellt sind die Werte mit Standardabweichung (SEM).

3.4 *In silico*-Sequenz- und Strukturanalyse von Aminosäureaustauschen in der NS3/4A-Protease

Zur Charakterisierung der Diversität an den Positionen 80,91 und 174 der NS3/4A-Protease wurden verfügbare Sequenzen aus der Proteindatenbank euHCVdb⁶⁹ mittels eines Sequenzlogos (Abbildung 19) charakterisiert. Insgesamt wurden 582 NS3/4A-Proteasesequenzen von sogenannten Majorvarianten der beiden Genotypen 1a (224 Sequenzen) und 1b (358 Sequenzen) verglichen.

Auffällig ist die deutlich höhere Sequenz-Diversität an den ausgewählten Positionen beim Genotyp 1a, wohingegen beim Genotyp 1b kaum Abweichungen vom Wildtyp auftreten und insbesondere der Q80K-Polymorphismus nur sehr selten auftritt (<0.5 %). Im Gegensatz hierzu zeigt sich beim Genotyp 1a an allen drei Aminosäurepositionen eine ausgeprägte Sequenz-Diversität, was auf einen niedrigen Konservierungsgrad dieser Aminosäurepositionen im Genotyp 1a hindeutet.

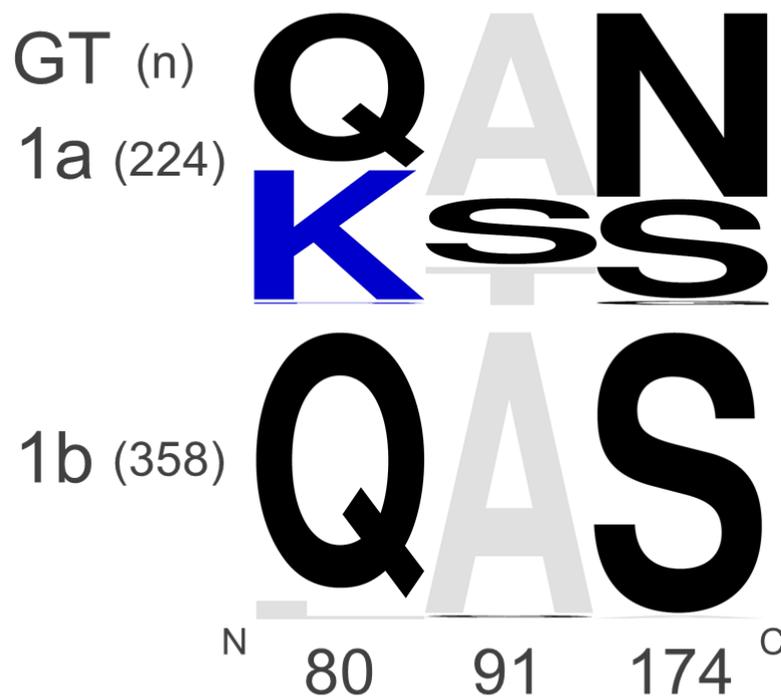


Abbildung 19: Sequenzlogo der Aminosäurepositionen 80, 91 und 174 der NS3/4A-Protease für die beiden Genotypen 1a und 1b im Vergleich

Die Höhe der Buchstaben im Sequenzlogo korrespondiert zur relativen Häufigkeit der jeweiligen Aminosäure an der entsprechenden Position im Alignment. Genotyp und Anzahl der abgerufenen Sequenzen (in Klammern) sind auf der linken Seite dargestellt. Die Aminosäuren sind ihren physikochemischen Eigenschaften nach gekennzeichnet: hydrophob (grau) – ACFILMPTVWY; positiv geladen (blau) – HKR; negativ geladen (rot) – DE; Rest (schwarz) – GNQS

Aminosäureaustausche an den Positionen 80, 91 und 174 der NS3/4A-Protease und ihrer Bedeutung für die physikochemischen Eigenschaften des Proteins an der jeweiligen Position⁵⁷:

Q80K: Glutamin (Q) ist eine aliphatische Aminosäure mit einer polaren Seitenkette, welche vorzugsweise an der Oberfläche von Proteinen und im aktiven Zentrum von Enzymen zu finden ist. Der Austausch gegen Lysin (K) ist ein nichtkonservativer Austausch mit Substitution der polaren Seitenkette durch eine positiv geladene Seitenkette.

A91S/T: Von allen biogenen Aminosäuren weist Alanin (A) am wenigsten spezifische physikochemische Eigenschaften auf und ist aufgrund seiner kurzen

Seitenkette selten in direkte Aminosäure-Interaktionen involviert. Bei den beiden Austauschen gegen Serin (S) und Threonin (T) handelt es sich jeweils um nichtkonservative Aminosäureaustausche. Die unpolare, nur gering hydrophobe Seitenkette des Alanins wird dabei gegen polare Seitenketten ausgetauscht, welche jeweils durch ihre reaktive Hydroxylgruppe in der Lage sind Wasserstoffbrücken auszubilden. Hinsichtlich der Größe unterscheiden sich die beiden polaren Aminosäuren untereinander nur um ein C-Atom, wobei beide Seitenketten nicht signifikant länger sind als die Wildtyp-Aminosäure Alanin.

S174N: Beim Austausch von Serin (S) gegen Asparagin (N) wird eine kurze, polare Seitenkette mit reaktiver Hydroxylgruppe, gegen eine längere, polare Seitenkette ausgetauscht. Demnach handelt es sich um einen konservativen Austausch.

3.5 *In silico*-3D-Strukturanalyse und Topologie der Aminosäureaustausche im NS3-Protease-Helikase-Komplex

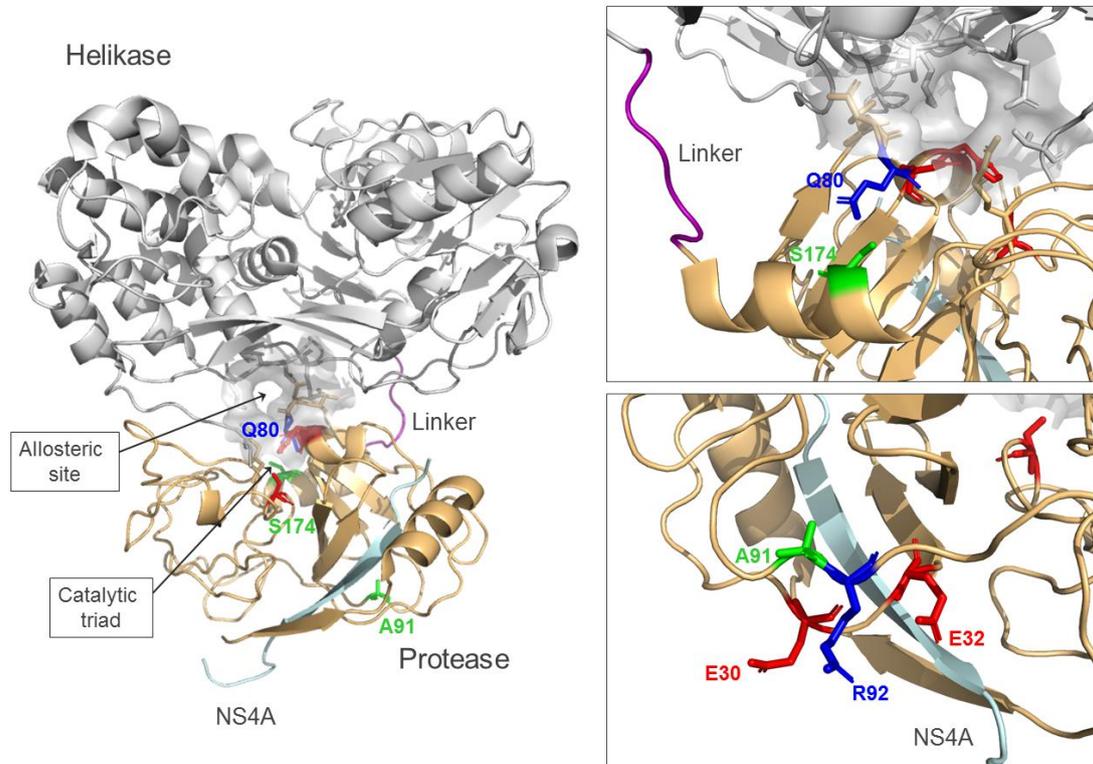


Abbildung 20: Strukturanalyse und Topologie der NS3/4A-Aminosäureaustausche

3D-Struktur der NS3-Protease-Helikase aus RCSB-PDB 1CU1. In grau die Helikasedomäne, lachsfarben die Proteasedomäne mit allosterischer Site und katalytisch aktivem Zentrum. Der peptidische Kofaktor NS4A ist in hellblau kenntlich gemacht. Die Aminosäurepositionen 80, sowie 174 und 91 sind jeweils in blau und grün farblich hervorgehoben (Abbildung links). Rechts im Bild dargestellt sind oben die beiden Positionen 80 und 174 in ihrem strukturellen Kontext, sowie unten die Position 91.

Abgebildet auf die 3D-Struktur des NS3-Protease-Helikase-Komplexes unter Verwendung des Strukturmodells RCSB-PDB 1CU1 liegen die in der vorliegenden Arbeit charakterisierten Aminosäureaustausche an den Positionen 80, 91 und 174 oberflächenexponiert im Bereich der Proteasedomäne. Die beiden Positionen 80 und 174 sind unmittelbar benachbart (ca. 4.6 Ångström Abstand zwischen den jeweiligen Aminosäureseitenketten), wohingegen die Position 91 in der Proteasedomäne deutlich entfernt liegt (ca. 20 Ångström Abstand zwischen den Seitenketten der Residuen 91 und 80) (Abbildung 20 und

21). Die Seitenketten von Q80 und S174 sind in PDB-1CU1 aufeinander ausgerichtet, was einen direkten sterischen Effekt auf die jeweils andere Position durch Aminosäureaustausche an diesen beiden Positionen nahelegt. Im Vergleich hierzu sind durch die große räumliche Distanz zwischen den Positionen 80 und 174 auf der einen Seite und Position 91 auf der anderen Seite keine direkten sterischen Effekte zwischen 80/174 und 91 durch Aminosäureaustausche zu erwarten. Möglich wären hingegen allosterische Effekte, über die sich Aminosäureaustausche auch über entsprechend große Distanzen wechselseitig beeinflussen könnten.

Neben der Lage der einzelnen Positionen relativ zueinander erscheint insbesondere deren Topografie innerhalb des Proteinkomplexes und hier insbesondere die Lage in Bezug auf strukturell und funktionell relevante NS3-Bereiche aufschlussreich zu sein. Q80 ist unmittelbar am katalytischen Zentrum der NS3/4A-Protease und im NS3-Interface zwischen Proteasedomäne und Helikasedomäne lokalisiert.²² Hier interagiert Q80 direkt mit Aminosäuren der allosterischen Site (Abbildung 20).⁵⁸ Die Aminosäure S174 ist in einer C-terminalen α -Helix der Proteasedomäne lokalisiert, welche unmittelbar an den Linker zwischen den beiden NS3-Domänen Protease und Helikase angrenzt.²¹ Alle genannten Strukturelemente deuten auf einen unmittelbaren Effekt von Aminosäureaustauschen an den Position 80 und 174 auf (i) die katalytische Aktivität der NS3/4A-Protease und (ii) die Interaktion mit der NS3-Helikase und damit ggf. auf das Assembly infektiöser viraler Partikel hin.^{21,22,58} Im Gegensatz hierzu weist die Position 91 keinen direkten Bezug zur Helikasedomäne von NS3 auf, sowie keinen direkten Bezug zu funktionellen Elementen der NS3/4A-Protease (Abbildung 20 und 21).

4 Diskussion

Der hier untersuchte Q80K-Austausch in der NS3/4A-Protease des Hepatitis C Virus spielt klinisch beim Therapieansprechen unter der Behandlung mit makrozyklischen Proteaseinhibitoren wie beispielsweise Simeprevir eine entscheidende Rolle und ist mit einem deutlich erhöhten Risiko für ein Therapieversagen verbunden.³⁷ Zulassungsstudien für Simeprevir bei therapie-naiven HCV-Patienten zeigten verminderte SVR-Raten (Sustained Virological Response) bei Patienten mit Q80K im Vergleich zu Patienten ohne Q80K,⁵⁹ weshalb die FDA ein Screening auf Q80K vor Therapiebeginn empfiehlt.³⁷

Interessanterweise ist Q80K als Polymorphismus bei ca. 13,7 % aller Patienten mit chronischer HCV-Infektion zu finden und tritt dabei mit ca. 29,5 % insbesondere beim Genotyp 1a bereits vor Therapiebeginn auf. Im Gegensatz dazu wird Q80K in anderen Genotypen nur sporadisch detektiert.³³ Außerdem zeichnet sich der Polymorphismus durch seine geographische Heterogenität aus. Während Q80K insbesondere bei Genotyp 1a-Patienten aus Nordamerika (48,1 %) und Europa (19,4 %) zu finden ist, kommt der Polymorphismus in Südamerika (9,1 %) deutlich seltener vor.³³

Eine Arbeit von McCloskey et al. aus dem Jahr 2014 widmete sich der Entstehung und der Verbreitung des Q80K-Polymorphismus.³² Mittels phylogenetischer Untersuchungen konnten die Autoren zeigen, dass der Austausch schon in den 1940er Jahren entstanden sein muss und somit nicht als Medikamenten-induzierte Resistenzvariante angesehen werden kann.³² Weitere Analysen ergaben, dass ca. 96 % aller untersuchten NS3/4A-Q80K Sequenzen von einem genetischen Vorfahren abstammen (Abbildung 3). Phylogenetische Untersuchungen zur geographischen Lokalisation dieser Q80K-Ursprungsmutation weisen auf die USA hin und scheinen auch das häufige Auftreten von Q80K im nordamerikanischen und europäischen Raum zu erklären.³²

Neben Q80K fanden die Autoren dabei Austausche an zwei weiteren Positionen der NS3/4A-Protease, welche auffällig oft gemeinsam mit dem Q80K-Polymorphismus in der NS3/4A-Proteasesequenz nachzuweisen waren, A91S/T und S174N. Basierend auf den phylogenetischen Daten postulierten die Autoren

einen möglichen epistatischen Zusammenhang zwischen Q80K und diesen second site-Austauschen.³² A91S/T und S174N sind wahrscheinlich in einem engen zeitlichen Zusammenhang mit der Q80K-Ursprungsmutation entstanden.³²

Die Tatsache, dass sich die Austausche Q80K, A91S/T und S174N über einen Zeitraum von jetzt ca. 80 Jahren koevolutionär entwickelt haben und sich stabil etablieren konnten, weist auf einen Vorteil in der viralen Fitness gegenüber anderen Virusvarianten im HCV-Genotyp 1a hin. Unter „viraler Fitness“ versteht man die Fähigkeit von Virusvarianten zu replizieren und infektiöse virale Partikel zu bilden.^{40,60} Shimakami et al. konnten zeigen, dass Q80-Varianten im Genotyp 1a mit einem Defizit in der replikativen Fitness einhergehen.⁴⁰ Daher liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den Q80K-spezifischen second site-Austauschen A91S/T und S174N um Fitness-kompensatorische Austausche handeln könnte. Solche kompensatorischen Austausche werden zwar im Rahmen der Quasispezies-Theorie regelmäßig diskutiert,⁶¹ sind aber für die NS3/4A-Protease des Hepatitis C Virus bisher in nur wenigen Fällen beschrieben worden.⁶²

Ob es sich bei A91S/T und S174N um solche kompensatorische Austausche handelt und welche Mechanismen hier gegebenenfalls der Kompensation von Fitnessdefiziten zugrunde liegen könnten, wurde bisher nicht untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, welchen Einfluss sowohl Q80K als auch seine second site-Austausche auf die Proteinfaltung und die enzymatische Aktivität der Protease haben. Naheliegender wäre beispielsweise ein direkter Effekt der second site-Austausche auf die Enzymkinetik. Denkbar wären allerdings auch indirekte Effekte auf die Replikationseffizienz des Virus durch eine Optimierung der Proteinfaltung und damit der Interaktion der NS3/4A-Protease im viralen Replikationskomplex mit anderen Virus- und/oder Wirtsfaktoren.

Um die jeweiligen Hypothesen zu untersuchen wurde zunächst der Effekt von Q80K und verschiedener Kombinationen von Q80K und seiner second site-Austausche auf die enzymatische Aktivität der Protease charakterisiert. Hierzu wurden die aufgereinigten NS3/4A-Varianten in einem FRET-basierten Assay mit einem Fluorophor-markierten Peptid der NS4A/B-Schnittstelle des viralen

Polyproteins untersucht. Die Charakterisierung der Proteasevarianten erfolgte durch Bestimmung verschiedener Parameter der Enzymkinetik: des K_M -Wertes als Maß für die Affinität zum Substrat, der Wechselzahl k_{cat} , welche den molekularen Substratumsatz angibt, und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} . Dabei gilt je größer k_{cat} und je kleiner K_M , desto größer ist die katalytische Effizienz eines Enzyms. Die ermittelten Parameter ermöglichen damit eine exakte Charakterisierung der Effekte einzelner Austausche auf die proteolytische Aktivität der NS3/4A-Protease und damit auf einen wesentlichen Aspekt der Replikation des Virus.

Hierbei konnte ein negativer Effekt von Q80K auf die enzymatische Aktivität der Protease nachgewiesen werden (Abbildung 15). Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit lag um ca. 66 % niedriger als im Wildtypprotein ($P=0.0002$), bei gleichzeitig signifikant niedrigerem K_M -Wert ($P=0.03$) im Vergleich zum Wildtyp und damit höherer Affinität zum Substrat. Angesichts der unmittelbaren Nachbarschaft von Q80 zur katalytischen Trias der Protease (Abbildung 21) erscheint dieser Effekt nicht überraschend, macht jedoch die hohe Prävalenz von Q80K als Therapie-unabhängige Majorvariante bei Genotyp 1a-Patienten umso erstaunlicher.

Umso naheliegender erscheint daher auch die Hypothese, dass es sich bei den second site-Austauschen A91S/T und S174N um kompensatorische Austausche handeln könnte. Anders als erwartet, konnten jedoch in der hier vorliegenden Arbeit keine entscheidenden kompensatorischen Effekte der second site-Austausche auf die Enzymkinetik der NS3/4A-Q80K Protease im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden (Abbildung 15). Bei den meisten NS3/4A-Proteasevarianten kam es im Vergleich zu NS3/4A-Q80K sogar zu signifikant niedrigeren Substrat-Umsatzraten und zu einem Absinken der Maximalgeschwindigkeit der Enzymreaktion. Zwar zeigten sich bei NS3/4A-Q80K/A91S im Vergleich zu allen anderen getesteten Varianten weniger ausgeprägte negative Effekte auf die enzymatische Aktivität, jedoch ergibt sich insgesamt kein Anhaltspunkt für einen direkten kompensatorischen Effekt der second site-Austausche auf die enzymatische Aktivität der NS3/4A-Q80K Protease. Ein limitierender Faktor und wichtig für die Interpretation der

Ergebnisse der Enzymkinetiken des in dieser Arbeit gewählten experimentellen Ansatzes ist die isolierte Proteinexpression der NS3/4A-Proteasedomäne.

Forschungsarbeiten zur Funktion der NS3/4A-Protease haben gezeigt, dass neben den katalytisch aktiven Bereichen der Protease auch die wechselseitige Interaktion mit der Helikasedomäne von NS3 eine Rolle für die proteolytische Aktivität von NS3/4A und die Spaltung des viralen Polyproteins spielen kann. Vermittelt wird die Protease-Helikase-Interaktion dabei über das NS3-Interface zwischen den beiden Domänen. Dabei spielt insbesondere eine allosterische Site, welche den Wechsel zwischen aktiver und inaktiver Konformation des NS3-Proteins reguliert, sowie der sogenannte Linker zwischen Protease und Helikase eine entscheidende Rolle.^{21,22,58} Beran und Pyle konnten zeigen, dass die Enzymaktivität der NS3/4A-Protease von der Anwesenheit sowie der optimalen Ausrichtung der Helikase zur Protease abhängig ist.²² Aufgrund der Tatsache, dass die NS3/4A-Protease in der hier vorliegenden Arbeit in einem vereinfachten Modell ohne Helikase exprimiert wurde, liegt die Vermutung nahe, dass der kompensatorische Effekt der second site-Austausche über eine Optimierung der Proteinfaltung gegebenenfalls indirekt über die Helikase-Interaktion vermittelt werden könnte.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die Effekte von Q80K und seiner second site-Austausche auf die Faltung der NS3/4A-Protease mit einem Thermal Shift-Assay untersucht. Beim Thermal Shift-Assay handelt es sich um ein fluoreszenzbasiertes Verfahren, bei dem durch die kontinuierliche Erwärmung eines aufgereinigten Proteins ein Schmelzpunkt ermittelt wird, der Rückschlüsse auf die Stabilität der Proteinfaltung zulässt.

Die Ermittlung der Schmelzpunkte zeigte signifikante Effekte durch NS3/4A-Q80K und seine second site-Austausche auf die Stabilität der NS3/4A-Protease. Im Vergleich zum Wildtyp-Protein weist NS3/4A-Q80K eine deutlich niedrigere Thermostabilität auf ($P < 0.0001$) (Abbildung 18). Unter Betrachtung der physikochemischen Effekte des nicht-konservativen Austauschs scheint sich die Substitution des polaren Glutamins gegen das positiv geladene Lysin hier auf angrenzende Strukturelemente auszuwirken. Anders als Glutamin spielt Lysin häufig eine kritische Rolle in der Proteinfaltung, insbesondere durch Ausbildung

von polaren Interaktionen und Wasserstoffbrücken, sog. „Salzbrücken“.⁵⁷ Änderungen im Salzbrückenmuster durch den Austausch von Glutamin gegen Lysin könnten hier zu einer Veränderung der Proteinfaltung führen und den negativen Effekt auf die Thermostabilität und damit Faltung der Q80K-Protease erklären.

Im Vergleich zu NS3/4A-Q80K konnte hingegen für alle second site-Austausche eine Verschiebung der Schmelzkurven zu höheren Werten und damit ein Anstieg der Thermostabilität beobachtet werden (Abbildung 17). Für die meisten second site-Austausche glich sich hierbei die Schmelztemperatur der des Wildtyp-Proteins an. Der Austausch A91S zeigte in den Thermal Shift-Experimenten die geringsten kompensatorischen Effekte, wohingegen sich Varianten mit den Austauschen A91T und S174N stets durch einen signifikanten Anstieg des Schmelzpunkts auszeichneten ($P < 0,0001$) (Abbildung 18).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Stabilisierung der Faltung als indirekter Kompensationsmechanismus für den Verlust der Enzymaktivität unter Q80K eine entscheidende Rolle spielt und wahrscheinlich von zentraler Bedeutung für den Erhalt der Fitness bei Q80K-Varianten des Genotyps 1a des Hepatitis C-Virus ist.

Die bereits erwähnten Strukturelemente innerhalb des NS3-Protease-Helikase-Komplexes, welche die Interaktion beider Domänen regulieren, verdeutlichen die potentielle Rolle der Proteinfaltung für ein effizientes Zusammenspiel zwischen den beiden NS3-Domänen. Neben dem Linker, der Helikase und Protease miteinander verbindet, konnten Saalhou-Bethell et al. eine allosterische Site identifizieren und charakterisieren, welche den Wechsel zwischen aktiver und inaktiver Konformation des NS3-Proteins reguliert.^{21,58} Beide Strukturelemente beeinflussen maßgeblich die Enzymaktivität der NS3/4A-Protease und stellen somit potentielle modulierende Elemente im Zusammenhang mit der Kompensation von Fitnessdefiziten dar.^{21,58} Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden die jeweiligen Austausche *in silico* mittels dreidimensionaler Strukturanalyse lokalisiert und auf ihren möglichen Einfluss auf die aufgeführten Strukturelemente überprüft.

Die Position Q80 liegt im Domänen-Interface in unmittelbarer Nachbarschaft zur allosterischen Site. Die Strukturanalyse zeigt weiterhin, dass sich S174 in direkter

räumlicher Nachbarschaft zu Q80 befindet (lediglich 4.6 Ångström Abstand zwischen den beiden Seitenketten der Aminosäurereste) mit einer Orientierung der Seitenketten zueinander hin (Abbildung 20). Dieser Sachverhalt lässt sterische Wechselwirkungen zwischen den beiden Residuen wahrscheinlich erscheinen. Des Weiteren ist S174 in einer zum Linker unmittelbar angrenzenden α -Helix lokalisiert. Q80K könnte durch eine direkte sterische Wechselwirkung mit S174 zu einer molekularen Verschiebung dieser Helix und damit zu einem lokalen Konformationswechsel im Bereich des Linkers führen. Somit wäre ein Effekt auf die Enzymkinetik der NS3/4A-Protease auch indirekt über eine Modulation der Interaktion zwischen Protease und Helikase möglich. Fitnesskompensatorische Effekte durch Q80K-assoziierte second site-Austausche wären demnach ebenfalls über einen solchen Mechanismus erklärbar. Die im Thermal Shift beobachtete Zunahme des Schmelzpunkts der Q80K-Protease durch den second site-Austausch S174N unterstützt diese Hypothese. Der Austausch des polaren Serins gegen das ebenfalls polare, jedoch um ein C-Atom längere Asparagin, könnte dabei die durch Q80K entstandene Konformationsänderung kompensieren, die ursprüngliche Faltung wiederherstellen und somit über eine Optimierung der Protease-Helikase-Interaktion die virale Fitness kompensieren.

Anders als S174 ist der zweite, vermutlich kompensatorisch wirkende Austausch bei A91 in der 3D-Struktur weit entfernt von Q80 und damit auch weit entfernt von den oben diskutierten strukturellen Elementen (Abbildung 20). Ein direkter Einfluss auf das katalytische Zentrum der Protease durch Austausche an A91 erscheint unwahrscheinlich. Ein Bezug besteht topografisch zwischen A91 und NS4A, welches als Peptid ein wichtiger Kofaktor für die korrekte Faltung der NS3/4A-Protease darstellt und somit die enzymatische Aktivität unmittelbar beeinflusst. Mit R92 wurde ein direkter Nachbar von A91 identifiziert, welcher durch seine positiv geladene Seitenkette ggf. Salzbrücken mit den benachbarten Aminosäuren E30 und E32 ausbildet und somit eine potentiell wichtige Rolle bei der Konformation eines β -Faltblatts innerhalb der Protease spielt, an dem auch NS4A beteiligt ist (Abbildung 20).

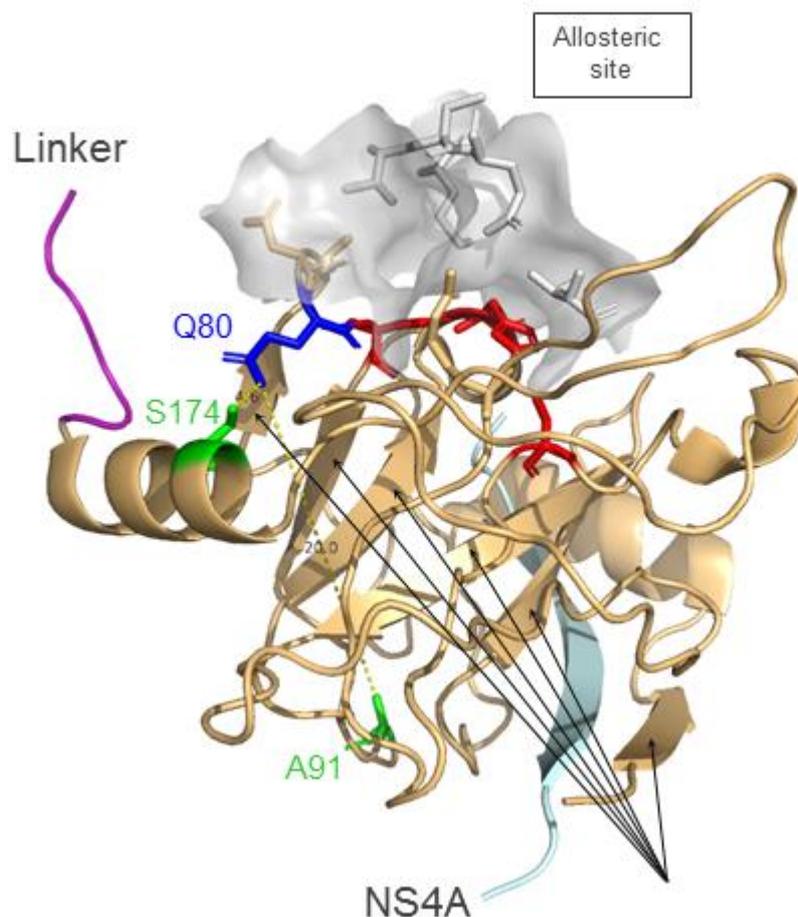


Abbildung 21: 3D-Struktur der NS3/4A-Protease

Dargestellt ist die Kristallstruktur der NS3-Protease-Domäne mit NS4A. Farblich markiert sind Q80 (blau), die second site-Austausche (grün), der Linker (lila), die katalytische Triade (rot) sowie die allosterische Site (grau).

Durch den Austausch der polaren Aminosäuren Serin und Threonin gegen das unpolare Alanin an Position 91 könnte es hier zu einer Veränderung der lokalen Konformation und damit zu einem indirekten Effekt auf die Assoziation von NS4A mit der Protease kommen. Somit scheint auch im Fall von A91 ein Effekt auf die Faltung des Proteins und somit ein indirekter Effekt auf die Proteaseinteraktion mit der Helikase als potentieller Fitness-kompensatorischer Mechanismus wahrscheinlich. Der hochsignifikante ermittelte Anstieg der Schmelztemperatur für insbesondere A91T als second site-Austausch mit Q80K lässt diesen Schluss zu ($P < 0.0001$).

Eine mögliche Erklärung für die große räumliche Distanz zwischen Q80K und den second site-Austauschen A91S/T liefert das Sektorenmodell von McLaughlin

et al.⁶³ Demnach haben die meisten Aminosäuren eines Proteins keine nennenswerte Relevanz für die Aufrechterhaltung der Faltung und entwickeln sich im Laufe der Evolution nahezu unabhängig von ihrer direkten, strukturellen Umgebung. Nur ca. 20 % der Aminosäuren eines Proteins sind zu einem zusammenhängenden Netzwerk zusammenschlossen, sogenannten Sektoren. Diese Netzwerke an Residuen erstrecken sich über große Distanzen durch das Protein, entwickeln sich durch Co-Evolution und interagieren über elektrostatische Wechselwirkungen, um die Struktur und Faltung und demnach die Funktion eines Proteins aufrecht zu erhalten.^{63,64}

Übertragen auf die NS3/4A-Protease bedeutet dies, dass Q80K und seine second site-Austausche gegebenenfalls Teil eines solchen Sektors sind, zu dem wahrscheinlich noch weitere Residuen sowohl in der Protease- als auch der Helikasedomäne gehören.

Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse erscheint ein direkter, kompensatorischer Einfluss der second site-Austausche A91S/T und S174N auf die Enzymkinetik der Q80K-Protease unwahrscheinlich. Vielmehr hat sich gezeigt, dass second site-Austausche die Faltung der NS3/4A-Protease bei Q80K stabilisieren und somit Defizite in der Enzymkinetik durch den Q80K-Polymorphismus über indirekte Effekte kompensieren. Demnach tragen die charakterisierten second site-Austausche kritisch zur Stabilität des Q80K-Polymorphismus im Proteasegen des HCV Genotyp 1a bei. Weitere Daten aus infektiöser Zellkultur sowie aus enzymatischen Assays unter Verwendung des full-length-NS3-Proteins sind notwendig, um die exakten Mechanismen der Fitnesskompensation aufzuklären.

5 Zusammenfassung

Schätzungen der WHO zufolge waren 2015 weltweit rund 71 Millionen Menschen von einer chronischen Hepatitis C-Infektion betroffen. Die chronische Hepatitis C ist mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung einer Leberzirrhose und eines hepatozellulären Karzinoms assoziiert. Die NS3/4A-Protease als zentraler Bestandteil der Replikationsmaschinerie des Virus spaltet das HCV-Polyprotein und ist in die Inaktivierung antiviraler Proteine involviert. Durch ihren maßgeblichen Einfluss auf die virale Fitness stellt sie einen entscheidenden Faktor für die chronische Persistenz des Virus im Wirtsorganismus dar. Die Protease ist auch eine wichtige Zielstruktur für spezifische antivirale Medikamente in der Behandlung der chronischen Hepatitis C. Der natürlich vorkommende Polymorphismus Q80K in der NS3/4A-Protease ist bei bis zu 47 % der Patienten schon vor Therapiebeginn feststellbar, insbesondere beim Genotyp 1a. Q80K führt zum Therapieversagen bei makrozyklischen Proteaseinhibitoren, insbesondere Simeprevir. Phylogenetische Analysen konnten zeigen, dass 96 % aller HCV-Gensequenzen mit Q80K von einem gemeinsamen, genetischen Vorfahren abstammen und sich die Mutation seit Mitte des 20. Jahrhunderts scheinbar stabil ausgehend vom nordamerikanischen Kontinent etabliert hat. Daneben wurden mit A91S/T und S174N sogenannte second site-Austausche identifiziert, die assoziiert mit Q80K vorkommen. Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, welchen Einfluss diese second site-Austausche auf die Enzymaktivität und Proteinfaltung der Protease haben und ob sie mögliche Veränderungen durch den Q80K-Polymorphismus kompensieren. Nach Expression und Aufreinigung der NS3/4A-Protease wurden die Effekte von Q80K, A91S/T und S174N auf die Enzymaktivität und Thermostabilität mittels fluoreszenzbasierter Verfahren untersucht und im Zusammenhang mit einer *in silico*-3D-Strukturanalyse der Protease interpretiert. Es zeigte sich, dass A91S/T und S174N jeweils zu einer Angleichung der Thermostabilität des Proteins an den Wildtyp führen und somit Defizite in der Faltung der Protease durch Q80K kompensiert werden. Aufgrund der experimentellen Daten und der Topografie dieser Austausche innerhalb der NS3-Protease-Helikase-Struktur ist von indirekten Effekten der second site-

Austausche auf die replikative Fitness der Virusvarianten auszugehen. Die hier charakterisierten Austausche in der NS3/4A-Protease tragen durch eine Stabilisierung der Proteinfaltung kritisch zur Stabilität des Q80K-Polymorphismus im Proteasegen des HCV Genotyp 1a bei.

6 Abstract

Chronic infection with the hepatitis C virus affects about 71 million people worldwide and is a major cause in the development of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Being involved in the processing of the viral polyprotein and the suppression of the innate immune response, the viral NS3/4A protease plays an important role in the replication cycle of the virus and contributes to the replicative fitness of the virus. As such the NS3/4A protease is a key target site for specific antiviral treatment against HCV infection. Q80K is a natural occurring polymorphism of the NS3/4A protease, leading to reduced susceptibility to the protease inhibitor Simeprevir. Depending on the geographical region, Q80K is prevalent in up to 47 % of infected patients mostly in genotype 1a. Phylogenetic investigations showed that 96 % of all HCV infections with Q80K were descended from one single lineage. According to these investigations, Q80K must have occurred in the mid of the 20th century in the United States, suggesting high transmissibility.

In addition, the second-site substitutions A91S/T and S174N have been identified as strongly associated with Q80K. The amino acid substitution Q80K in the NS3/4A protease of the hepatitis C virus is highly prevalent only in genotype 1a, however, the underlying molecular mechanisms are largely unknown. This study/work aimed to investigate the potential impact of the second-site amino acid substitutions A91S/T and S174N on the enzymatic activity and/or protein fold of the NS3/4A-Q80K protease in a genotype 1a genomic background. After expression and purification of the NS3/4A protease for the wild type protein and the selected variants, the effect of Q80K on the protease fold and enzymatic activity, as well as potential compensatory mechanisms due to A91S/T and S174N were characterized by thermal shift and a FRET-based protease activity assay. Subsequently, the experimental data were interpreted in conjunction with data from *in silico* structure modeling based on available experimental structure information from the Protein Databank RCSB PDB. The data show a compensatory effect of A91S/T and S174N on changes in the NS3/4A protein fold caused by Q80K. In contrast, no such effect was observed in enzyme kinetics, possibly due to the lack of the NS3 helicase domain in the expressed

constructs. The 3D structure topology of the second-site amino acid substitutions in NS3 suggests an indirect effect of the substitutions A91S/T and S174N on the protease–helicase domain interface. Based on these data, the fitness compensatory mechanism for Q80K variants due to second-site mutations is likely mediated by modulatory mechanisms on the interplay between both NS3 domains, protease and helicase, that can impact e. g. RNA replication and/or infectious virus particle assembly.

7 Anhang

pET-15b sequence landmarks

T7 promoter	463-479
T7 transcription start	452
His•Tag coding sequence	362-380
Multiple cloning sites (<i>Nde</i> I - <i>Bam</i> H I)	319-335
T7 terminator	213-259
lacI coding sequence	(866-1945)
pBR322 origin	3882
<i>bla</i> coding sequence	4643-5500

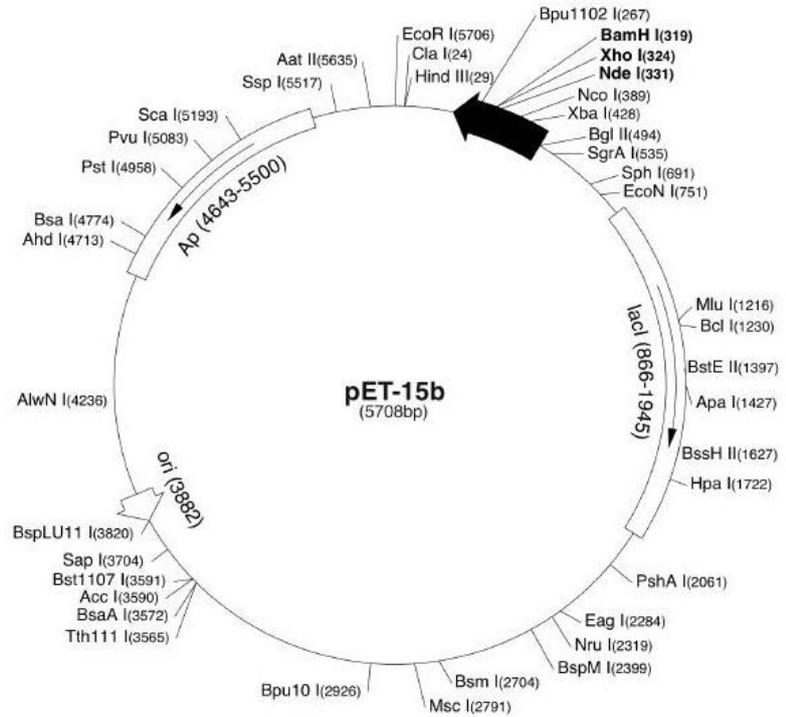


Abbildung 22: Expressionsvektor pET-15b

Der Expressionsvektor pET-15b von Novagen besitzt ein Resistenzgen für das Antibiotikum Ampicillin. Das NS3/4A-Konstrukt befindet sich unter der Kontrolle des T7-Promotors, der zusammen mit der RosettaTM2(DE3) pLysS-*E. coli*-Zellen exprimierten T7-RNA-Polymerase ein hochaktives Expressionssystem ausbildet. Für die Proteinaufreinigung ist dem NS3/4A-Konstrukt noch eine His-Tag-Sequenz vorschaltet.⁶⁸

8 Literaturverzeichnis

1. Global hepatitis report, 2017. [Geneva, Switzerland]: World health organization; 2017.
2. Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*. 2013;57(4):1333-1342. doi:10.1002/hep.26141.
3. Poethko-Müller C, Zimmermann R, Hamouda O, et al. Die Seroepidemiologie der Hepatitis A, B und C in Deutschland: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2013;56(5-6):707-715. doi:10.1007/s00103-013-1673-x.
4. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989;244(4902):359-362.
5. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*. 1989;244(4902):362-364.
6. Robert Koch Institut. Hepatitis C: RKI-Ratgeber. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_HepatitisC.html#doc2389942bodyText5. Updated January 31, 2018. Accessed June 27, 2018.
7. Chen SL, Morgan TR. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci*. 2006;3(2):47-52.
8. Irshad M, Mankotia DS, Irshad K. An insight into the diagnosis and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 2013;19(44):7896-7909. doi:10.3748/wjg.v19.i44.7896.
9. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of hepatitis C: 2002—June 10-12, 2002. *Hepatology*. 2002;36. doi:10.1053/jhep.2002.37117.
10. World Health Organization. Hepatitis C; Factsheet Nr. 164. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164_apr2014/en/. Updated Juli 2015. Accessed June 27, 2018.
11. Borgia SM, Hedskog C, Parhy B, et al. Identification of a Novel Hepatitis C Virus Genotype From Punjab, India: Expanding Classification of Hepatitis C Virus Into 8 Genotypes. *J Infect Dis*. 2018;218(11):1722-1729. doi:10.1093/infdis/jiy401.
12. SMITH DB, Simmonds P. Review: Molecular epidemiology of hepatitis C virus. *J Gastroenterol Hepatol*. 1997;12(7):522-527. doi:10.1111/j.1440-1746.1997.tb00477.x.
13. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2015;61(1):77-87. doi:10.1002/hep.27259.
14. Hofmann WP, Sarrazin C, Zeuzem S. Current standards in the treatment of chronic hepatitis C. *Dtsch Arztebl Int*. 2012;109(19):352-358. doi:10.3238/arztebl.2012.0352.

15. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J Gen Virol.* 2004;85(Pt 11):3173-3188. doi:10.1099/vir.0.80401-0.
16. Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V, André P. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol.* 2011;19(2):95-103. doi:10.1016/j.tim.2010.11.005.
17. Brass V, Moradpour D, Blum HE. Molecular virology of hepatitis C virus (HCV): 2006 update. *Int J Med Sci.* 2006;3(2):29-34.
18. Moradpour D, Rice CM. Replication and Pathogenesis of Hepatitis C Virus. In: Boyer TD, Wright TL, Manns MP, Zakim D, eds. *Zakim and Boyer's hepatology: A textbook of liver disease.* 5th ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2006:125-147.
19. Bartenschlager R, Lohmann V, Penin F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(7):482-496. doi:10.1038/nrmicro3046.
20. Stapleford KA, Lindenbach BD. Hepatitis C virus NS2 coordinates virus particle assembly through physical interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzyme complexes. *J Virol.* 2011;85(4):1706-1717. doi:10.1128/JVI.02268-10.
21. Kohlway A, Pirakitikulr N, Ding SC, et al. The linker region of NS3 plays a critical role in the replication and infectivity of hepatitis C virus. *J Virol.* 2014;88(18):10970-10974. doi:10.1128/JVI.00745-14.
22. Beran RKF, Pyle AM. Hepatitis C viral NS3-4A protease activity is enhanced by the NS3 helicase. *J Biol Chem.* 2008;283(44):29929-29937. doi:10.1074/jbc.M804065200.
23. Chatel-Chaix L, Baril M, Lamarre D. Hepatitis C Virus NS3/4A Protease Inhibitors: A Light at the End of the Tunnel. *Viruses.* 2010;2(8):1752-1765. doi:10.3390/v2081752.
24. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2002;347(13):975-982. doi:10.1056/NEJMoa020047.
25. Zeuzem S. Treatment Options in Hepatitis C. *Dtsch Arztebl Int.* 2017;114(1-02):11-21. doi:10.3238/arztebl.2017.0011.
26. Lange CM, Jacobson IM, Rice CM, Zeuzem S. Emerging therapies for the treatment of hepatitis C. *EMBO Mol Med.* 2014;6(1):4-15. doi:10.1002/emmm.201303131.
27. Burgess SV, Hussaini T, Yoshida EM. Concordance of sustained virologic response at weeks 4, 12 and 24 post-treatment of hepatitis c in the era of new oral direct-acting antivirals: A concise review. *Ann Hepatol.* 2016;15(2):154-159. doi:10.5604/16652681.1193693.
28. Kowdley KV, Gordon SC, Reddy KR, et al. Ledipasvir and sofosbuvir for 8 or 12 weeks for chronic HCV without cirrhosis. *N Engl J Med.* 2014;370(20):1879-1888. doi:10.1056/NEJMoa1402355.
29. Sarrazin C. The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice. *J Hepatol.* 2016;64(2):486-504. doi:10.1016/j.jhep.2015.09.011.
30. Welsch C. Genetic barrier and variant fitness in hepatitis C as critical parameters for drug resistance development. *Drug Discov Today Technol.* 2014;11:19-25. doi:10.1016/j.ddtec.2013.12.003.

31. Neumann AU, Lam NP, Dahari H, et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science*. 1998;282(5386):103-107.
32. McCloskey RM, Liang RH, Joy JB, et al. Global origin and transmission of hepatitis C virus nonstructural protein 3 Q80K polymorphism. *J Infect Dis*. 2015;211(8):1288-1295. doi:10.1093/infdis/jiu613.
33. Lenz O, Verbinnen T, Fevery B, et al. Virology analyses of HCV isolates from genotype 1-infected patients treated with simeprevir plus peginterferon/ribavirin in Phase IIb/III studies. *J Hepatol*. 2015;62(5):1008-1014. doi:10.1016/j.jhep.2014.11.032.
34. Zeuzem S, Andreone P, Pol S, et al. Telaprevir for retreatment of HCV infection. *N Engl J Med*. 2011;364(25):2417-2428. doi:10.1056/NEJMoa1013086.
35. Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, et al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2011;364(25):2405-2416. doi:10.1056/NEJMoa1012912.
36. Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, et al. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med*. 2011;364(13):1207-1217. doi:10.1056/NEJMoa1009482.
37. Lin MV, Chung R. Recent FDA approval of sofosbuvir and simeprevir. Implications for current HCV treatment. *Clinical Liver Disease*. 2014;3(3):65-68. doi:10.1002/cld.332.
38. Kai-Henrik Pfeiffer, Christoph Sarrazin. Hepatitis&More - 2/2014 - Kai-Henrik Pfeiffer und Christoph Sarrazin, Frankfurt - Bedeutung von Polymorphismen – Q80K und andere RAV. <http://www.hepatitisandmore.de/archiv/2014-2/bedeutung-von-polymorphismen-q80k-und-andere-rav.shtml>. Accessed April 5, 2017.
39. Moog U, Rieß O. *Medizinische Genetik für die Praxis: Diagnostik, Beratung, Fallbeispiele*: Thieme; 2014. <https://books.google.de/books?id=2p37AwAAQBAJ>.
40. Shimakami T, Welsch C, Yamane D, et al. Protease inhibitor-resistant hepatitis C virus mutants with reduced fitness from impaired production of infectious virus. *Gastroenterology*. 2011;140(2):667-675. doi:10.1053/j.gastro.2010.10.056.
41. Taremi SS, Beyer B, Maher M, et al. Construction, expression, and characterization of a novel fully activated recombinant single-chain hepatitis C virus protease. *Protein Sci*. 1998;7(10):2143-2149. doi:10.1002/pro.5560071011.
42. SeaView. <http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview3>. Updated February 10, 2014. Accessed November 16, 2018.
43. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-254.
44. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685.
45. Niesen FH, Berglund H, Vedadi M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature Protocols*. 2007;2(9):2212-2221. doi:10.1038/nprot.2007.321.

46. Vivoli M, Novak HR, Littlechild JA, Harmer NJ. Determination of protein-ligand interactions using differential scanning fluorimetry. *J Vis Exp*. 2014;(91):51809. doi:10.3791/51809.
47. Pantoliano MW, Petrella EC, Kwasnoski JD, et al. High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *J Biomol Screen*. 2001;6(6):429-440. doi:10.1177/108705710100600609.
48. Prism - graphpad.com. <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>. Accessed November 16, 2018.
49. Förster T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* 1948;437(1-2):55-75. doi:10.1002/andp.19484370105.
50. Cecilia L. Po and Dr. Vera Rakhmanova, Inc A. Sensitive FRET Assays Aid Drug Discovery. https://www.photonics.com/Articles/Sensitive_FRET_Assays_Aid_Drug_Discovery/a34701. Updated August 1, 2008. Accessed November 15, 2018.
51. Copeland RA. *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: A guide for medicinal chemists and pharmacologists*. 2nd ed. Hoboken, NJ: Wiley; 2013.
52. Crooks GE. WebLogo - Create Sequence Logos. <https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>. Accessed November 16, 2018.
53. Rose PW, Bi C, Bluhm WF, et al. The RCSB Protein Data Bank: New resources for research and education. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Database issue):D475-82. doi:10.1093/nar/gks1200.
54. Yao N, Reichert P, Taremi SS, Prosser WW, Weber PC. Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase. *Structure*. 1999;7(11):1353-1363.
55. PyMOL | pymol.org. <https://pymol.org/2/>. Accessed November 16, 2018.
56. Huynh K, Partch CL. Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay. *Curr Protoc Protein Sci*. 2015;79:28.9.1-14. doi:10.1002/0471140864.ps2809s79.
57. Barnes MR, Gray IC. *Bioinformatics for Geneticists*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2003.
58. Saalau-Bethell SM, Woodhead AJ, Chessari G, et al. Discovery of an allosteric mechanism for the regulation of HCV NS3 protein function. *Nat Chem Biol*. 2012;8(11):920-925. doi:10.1038/nchembio.1081.
59. Jacobson IM, Dore GJ, Foster GR, et al. Simeprevir with pegylated interferon alfa 2a plus ribavirin in treatment-naive patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection (QUEST-1): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2014;384(9941):403-413. doi:10.1016/S0140-6736(14)60494-3.
60. Domingo, Menéndez-Arias, Holland. RNA virus fitness. *Rev Med Virol*. 1997;7(2):87-96.
61. Domingo E, Sheldon J, Perales C. Viral quasispecies evolution. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2012;76(2):159-216. doi:10.1128/MMBR.05023-11.
62. Yi M, Tong X, Skelton A, et al. Mutations conferring resistance to SCH6, a novel hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor. Reduced RNA replication fitness and partial rescue by second-site mutations. *J Biol Chem*. 2006;281(12):8205-8215. doi:10.1074/jbc.M510246200.
63. McLaughlin RN, Poelwijk FJ, Raman A, Gosal WS, Ranganathan R. The spatial architecture of protein function and adaptation. *Nature*. 2012;491(7422):138-142. doi:10.1038/nature11500.

64. Kass I, Horovitz A. Mapping pathways of allosteric communication in GroEL by analysis of correlated mutations. *Proteins*. 2002;48(4):611-617. doi:10.1002/prot.10180.
65. Technologies L. General Western Blot Protocol - Leinco Technologies. <http://www.ispybio.com/search/protocols/Westernblot%20protocol36.htm>. Accessed November 15, 2018.
66. Chemgapedia. http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/16/biochem/pcr/pcr_del/deletion.vlu/Page/vsc/de/ch/16/biochem/pcr/pcr_anwendung/fusionsproteine.vscml/Supplement/1.html. Accessed November 16, 2018.
67. GloMelt™ Thermal Shift Protein Stability Kit | Biotium. <https://biotium.com/product/glomelt-thermal-shift-protein-stability-kit/>. Accessed November 15, 2018.
68. pET-15b DNA - Novagen | 69661. http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/pET-15b-DNA-Novagen,EMD_BIO-69661#anchor_VMAP. Accessed November 16, 2018.
69. euHCVdb®: The European HCV Database Home Page. <https://euhcvdb.ibcp.fr/euHCVdb/>. Accessed November 16, 2018.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname:	Konetschnik, Michael
Geburtsdatum:	01.03.1991
Geburtsort:	Frankfurt am Main
Familienstand:	ledig
Mutter:	Wäldchen, Maria, geb. Schäfer (Dipl. Geografin)
Vater:	Konetschnik, Anton (Dipl. Elektroingenieur)
Konfession:	katholisch
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Hochschulausbildung

05/2018 – 04/2019	Praktisches Jahr 3. Pflichttertial: Chirurgie (Asklepios Klinik, Langen) 2. Pflichttertial: Innere Medizin (Asklepios Klinik, Langen) 1. Wahltertial: Allgemeinmedizin Praxis Dr. med. Jäger / Dr. med. Levkovych (Mörfelden - Walldorf)
04/2018	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Note - gut - (Goethe-Universität, Frankfurt a.M.)
04/2016 – 10/2016	Forschungssemester im Rahmen der Dissertation (Goethe-Universität, Frankfurt a.M.)
09/2014	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Note - sehr gut - (Goethe-Universität, Frankfurt a.M.)
seit 09/2012	Humanmedizinstudium (Goethe-Universität, Frankfurt a.M.)
04/2012 – 05/2012	Lehramtsstudium L3 (Gymnasium) in den Fächern Französisch und Englisch (Goethe-Universität, Frankfurt a.M.)

Stipendium

2016	Frankfurter Promotionsstipendium des Fachbereichs Medizin (Goethe-Universität, Frankfurt a.M.)
------	---

Berufliche Laufbahn

08/2011 – 02/2012	Flugbegleiter Interkontinental (Deutsche Lufthansa, Frankfurt a.M.)
-------------------	--

Praktika

06/2012 – 08/2012	Krankenpflegepraktikum Station Gastroenterologie, Prof. Dr. med. Dominik Faust (Asklepios Klinik, Langen)
01/2008	Beobachtung sportmedizinischer Untersuchungen / Tests (Sportmedizinisches Institut, Frankfurt a.M.)

Zivildienst

08/2010 – 06/2011 Betreuung praktisch bildbarer Schüler
(Janusz-Korczak Schule, Langen)

Schulbildung

08/2001 – 06/2010 Dreieichgymnasium, Langen
Abschluss: Abitur (1,4)

Weitere Tätigkeiten

2014 – 2016 Wissenschaftliche Hilfskraft im vorklinischen Kurs
Anatomie unter der Leitung von Dr. med. Olaf Bahlmann
(Goethe-Universität, Frankfurt a.M.)

2015 – 2016 Ehrenamtlicher Mentor für Erstsemester im Projekt „Medimentum“
(Goethe-Universität, Frankfurt a.M.)

10 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Molekulare Mechanismen der Selektion
Resistenz-assoziiertes Hepatitis C Virusvarianten

in der Medizinischen Klinik I des Zentrums für Innere Medizin im Universitätsklinikum Frankfurt am Main unter Betreuung und Anleitung von PD Dr. Christoph Welsch mit Unterstützung durch Dr. Georg Dultz ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. Christoph Welsch, der mir dieses interessante Promotionsthema überlassen und mich im Verlauf der Promotion stets mit Engagement unterstützt hat. Vielen Dank für die hilfreichen Anregungen, die konstruktive Kritik sowie die motivierende Betreuung.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Stefan Zeuzem, Direktor der Medizinischen Klinik I der Universitätsklinik Frankfurt am Main, der es mir ermöglicht hat, meine Dissertation im Rahmen des Frankfurter Promotionsstipendiums in seinem Institut voranzutreiben und zu realisieren.

Ein großes Dankeschön geht an die Mitarbeiter des Biomedizinischen Forschungslabors der Universitätsklinik Frankfurt am Main. Dabei möchte ich mich vor allem bei Christian Grimm, Dr. Katrin Bäumer sowie Dr. Claudia Stross aus der AG Welsch für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente sowie die Ratschläge bei der Erstellung der Dissertationsschrift bedanken. Danke für die nette, konstruktive Arbeitsatmosphäre und die freundliche Zusammenarbeit.

Besonders danken möchte ich außerdem Dr. Georg Dultz, der mir mit seiner Hilfe und Expertise bei der Durchführung der Versuche stets beiseite gestanden und zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen hat.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Cousine Denise für das abschließende Korrekturlesen der Dissertationsschrift herzlich bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Freundin Katrin. Vielen Dank für deine Geduld und Nachsicht, dein Engagement beim Korrekturlesen meiner Dissertationsschrift sowie deine moralische Unterstützung während dieser anspruchsvollen Zeit.

Abschließend möchte ich meinen Eltern danken, die im Laufe meines Studiums, aber vor allem durch das gesamte Leben hinweg, stets in jeglicher Hinsicht hinter mir gestanden und mich unterstützt haben.