

# **Biophysikalische Untersuchungen zur Funktion der Hepatitis C viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase**

Dissertation  
zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Stefan Reich

geb. am 29.11.1981 in Straubing.

Öffentlich verteidigt am 26.11.2012.

Gutachter: Professor Dr. S.-E. Behrens  
Professor Dr. G. Fischer  
Professor Dr. K. Tittmann

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis und Anmerkungen	4
<b>A Einleitung und Zielstellung</b>	<b>6</b>
<b>B Materialien und Methoden</b>	<b>20</b>
<b>Materialien</b>	<b>20</b>
Chemikalien	20
Oligonukleotide und Oligodesoxynukleotide	21
Geräte, Verbrauchsmaterialien und Sonstiges	21
<b>Methoden</b>	<b>23</b>
Proteinreinigung	23
HCV-Polymerase	23
Cyclophilin B	24
<i>stopped-flow</i> -Kinetiken	25
Assoziation von HCV-Polymerase und RNA	25
Dissoziation von Polymerase-RNA-Komplexen	26
Fluoreszenzspektroskopie	28
Circulardichroismus	30
NMR-Spektroskopie	30
Thermische Entfaltung partiell doppelsträngiger RNA ( <i>stem-loop</i> -RNA)	31
Wechselwirkung von Cyclophilin B und <i>stem-loop</i> -RNA	32
Wechselwirkung von HCV-Polymerase und <i>stem-loop</i> -RNA ohne und mit Nukleotiden	32
Peptidyl-prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase assay	33
Radioaktiver Polymerase assay	34
Analytische Ultrazentrifugation	34
Oligomerisierung von HCV-Polymerase und RNA	34
Sedimentationsanalysen von Cyclophilin B-RNA-Komplexen	34
<b>C Ergebnisse</b>	<b>36</b>
<b>I. Mechanistische Studien zur Wirkungsweise und Inhibierung der RNA-abhängigen RNA-Polymerase des Hepatitis C Virus</b>	<b>36</b>

I. I.	Quantifizierung der Bindung von RNA und HCV-Polymerase	36
I. II.	Quantifizierung der Bindung von Nukleotiden sowie des Inhibitors HCV-796 und der HCV-Polymerase	37
I. III.	Kinetische Studien zur Assoziation und Dissoziation von RNA und HCV-Polymerase	39
I. IV.	Mechanismus der Inhibierung der HCV-Polymerase durch den Inhibitor HCV-796	45
<b>II.</b>	<b>Die Initiation der viralen Genom-Replikation – die HCV-Polymerase in Aktion</b>	<b>48</b>
II. I.	Kinetische Studien zur Bindung einer nativen RNA-Matrize und der HCV-Polymerase (Genotyp 2a, Subtyp JFH-1)	48
II. II.	Thermodynamische Betrachtungen des RNA-Polymerase-Komplexes	50
II. II. I.	Perturbation der RNA-Polymerase-Komplexbildung durch Erhöhung der Ionenstärke (lineare freie Enthalpiebeziehungen)	50
II. II. II.	Bestimmung der thermodynamischen Beiträge zu RNA-Polymerase-Interaktionen (nach VAN'T HOFF)	52
II. III.	Quantifizierung der Bindung von Nukleotiden und HCV-Polymerase (Genotyp 2a, Subtyp JFH-1) mittels Circular dichroismus	55
II. IV.	Strukturelle und thermodynamische Betrachtungen der <i>stem-loop</i> -RNA ( <i>origin of replication</i> ).	59
II. IV. I.	Strukturelle Charakterisierung der <i>stem-loop</i> -RNA mittels 1D <sup>1</sup> H NMR-Spektroskopie	59
II. IV. II.	Thermodynamische Charakterisierung der Sekundärstruktur der <i>stem-loop</i> -RNA mittels 1D <sup>1</sup> H NMR-Spektroskopie	61
II. V.	Die Analyse der RNA-abhängigen RNA-Polymerisationsreaktion mittels 1D <sup>1</sup> H NMR-Spektroskopie	64
<b>III.</b>	<b>Anwendung der etablierten Methoden auf andere Systeme: Cyclophilin B – eine humane Peptidyl-prolyl-<i>cis/trans</i>-Isomerase mit Nukleinsäure-Bindungseigenschaften</b>	<b>68</b>
III. I.	Cyclophilin B wechselwirkt mit Nukleinsäuren	68
III. I. I.	Quantifizierung der Interaktion von Cyclophilin B und <i>stem-loop</i> -RNA und DNA	68
III. I. II.	Die Beiträge von ionischen und nicht-ionischen Wechselwirkungen zur Bindung von Cyclophilin B und <i>stem-loop</i> -RNA	69
III. II.	Cyclophilin B besitzt zwei – scheinbar voneinander unabhängige – Funktionen	71
III. II. I.	Die Peptidyl-prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase-Funktion von Cyclophilin B wird nicht beeinflusst durch die <i>stem-loop</i> -RNA	71

III. II. II.	Die Bindung von Nukleinsäuren ist unbeeinflusst durch Cyclosporin A, einem <i>active-site</i> -Inhibitor von Cyclophilin B als PPIase	73
III. III.	Zwei Moleküle Cyclophilin B binden im Gleichgewicht an ein Molekül der untersuchten <i>stem-loop</i> -RNA	74
III. IV.	Detektion von strukturellen Änderungen der <i>stem-loop</i> -RNA durch Interaktion mit Cyclophilin B mittels 1D <sup>1</sup> H NMR-Spektroskopie	75
<b>D</b>	<b>Diskussion und Zusammenfassung</b>	79
	<b>Mechanismus der Aktivität der RNA-abhängigen RNA-Polymerase des Hepatitis C Virus und die molekulare Wirkung des Inhibitors HCV-796</b>	79
	<b>Die Initiation der viralen Genom-Replikation – die HCV-Polymerase in Aktion</b>	85
	<b>Cyclophilin B – eine humane Peptidyl-prolyl-cis/trans-Isomerase mit Nukleinsäure-Bindungseigenschaften</b>	95
<b>E</b>	<b>Ausblick</b>	100
<b>F</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	102
<b>G</b>	<b>Anhang</b>	116
	<b>Aminosäuresequenzen der in dieser Arbeit untersuchten Proteine</b>	116
	HCV-Polymerase vom Genotyp 1b (Subtyp BK)	116
	HCV-Polymerase vom Genotyp 2a (Subtyp JFH-1)	116
	Cyclophilin B (human)	116
	<b>NMR-spektroskopische Experimente zur Zuordnung der NMR-Signale der Imino-Protonen der <i>stem-loop</i>-RNA</b>	117

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -CT	$\alpha$ -Chymotrypsin
a. u.	<i>arbitrary unit</i>
bp	Basenpaare
CD	Circulardichroismus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
FAM	Fluoreszein-aminomethyl-
h	Stunde
HCV	Hepatitis C Virus
HEPES	2-4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
mRNA	<i>messenger RNA</i>
Ni-NTA	Nickel-nitrilotriacetat
nt	Nukleotide
NTP	Ribonukleosidtriphosphat
NTR	<i>non translated region</i>
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
ss	einzelsträngig
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)-phosphin

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation

### Anmerkungen

Anglizismen sind in dieser Arbeit kursiv dargestellt.

Die Achsenbeschriftungen der Abbildungen sind in Englisch.

Dezimalstellen sind im Text durch Punkte getrennt.

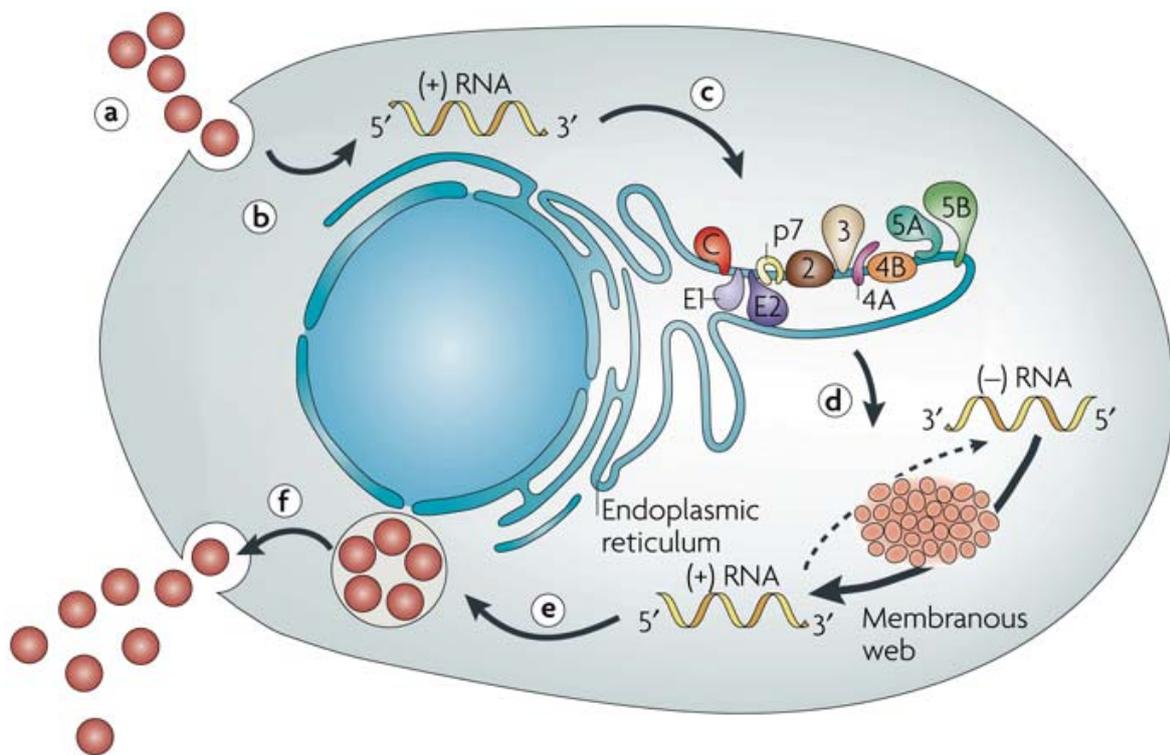
Die in der biochemischen Fachliteratur allgemein üblichen Abkürzungen für Metabolite und Biochemikalien sind nicht im Abkürzungsverzeichnis enthalten.

## Einleitung

Das Hepatitis C Virus (HCV) ist ein Humanpathogen, mit dem circa 3% der Weltbevölkerung infiziert sind (World Health Organization, WHO). Etwa 70% der HCV-positiven Patienten entwickeln eine chronische Infektion, die zu Leberzirrhose und Krebs führen kann. Jedes zweite derzeit behandelte Leberkarzinom wird auf eine HCV-Infektion zurückgeführt. Mit einer Erfolgsquote von 50% ist die aktuelle Behandlung von HCV durch Ribavirin und Interferon  $\alpha$  unspezifisch und nur unzureichend. Seit kurzem findet aber auch ein vielversprechender Inhibitor Anwendung, der spezifisch einen essentiellen Schritt im „Lebenszyklus“ des Hepatitis C Virus unterbindet. Allerdings wirkt dieser HCV-Protease-Inhibitor vorerst nur bei einer bestimmten Patientengruppe, da 11 unterschiedliche HCV-Genotypen existieren, die sich wiederum in mehrere Subtypen sowie Stämme aufteilen und unterschiedlich behandelt werden müssen (WHO). Zudem werden HCV-spezifische Therapieansätze durch eine hohe Mutationsrate des Virus und einer Selektion von resistenten Virusvarianten erschwert. Auch eine Impfung existiert bisher nicht. Um eine effektivere Bekämpfung des Virus zu erzielen ist es daher notwendig, molekulare Details des viralen „Lebenszyklus“ besser zu verstehen.

Die Hepatitis C Viren sind in der Familie *Flaviviridae* als Genus *Hepacivirus* klassifiziert. Das HCV ist ein umhülltes einzelsträngiges RNA-Virus [1]. Durch Rezeptor-vermittelte Endozytose gelangt das infektiöse virale Partikel, bestehend aus den viralen Proteinen Core, Envelope 1, Envelope 2 und p7, dem RNA-Genom und zellulären Membranlipiden sowie Lipoproteinen in die Wirtszelle. In einem nicht näher bekannten Prozess wird das virale Genom, eine 9.6 kb große einzelsträngige RNA, im Zytoplasma freigesetzt. Das virale Genom besteht aus einem einzelnen *open reading frame* (ORF), der von strukturierten 5'- und 3'-Bereichen flankiert wird. RNA-Strukturen in der 5'-nicht-translatierten Region (NTR) fungieren als *internal ribosome entry site* (IRES) für die zelluläre Translationsmaschinerie. Am endoplasmatischen Retikulum (ER) entsteht so ein aus etwa 3000 Aminosäuren bestehendes virales Polyprotein. Durch proteolytische Spaltung mittels zellulärer Signalpeptid-Peptidasen und Signal-Peptidasen reifen aus diesem Polyprotein, beginnend vom N-Terminus, die viralen Struktur-Proteine Core, Envelope 1,

Envelope 2 und p7. Durch anschließende Autoproteolyse der viralen Metallionen-abhängigen Cystein-Protease NS2/3 wird der native N-Terminus der viralen Protease/Helikase NS3 gebildet. Die proteolytische Aktivität von NS3 prozessiert das verbleibende virale Polyprotein unter Freisetzung der Nicht-Struktur-Proteine NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B. Über hydrophobe Regionen sowie Interaktionen sind virale Proteine an der ER-Membran lokalisiert. An Virus-induzierten Ausstülpungen des ER, dem so genannten *membranous web*, bilden sie zusammen mit Wirtsfaktoren einen Replikationskomplex, dessen Aufgabe die Vermehrung und Assemblierung des viralen Genoms zu neuen infektiösen Partikeln ist.



Nature Reviews | Microbiology

Abbildung 1: ‚Lebenszyklus‘ des Hepatitis C Virus [1].

(a) Über Rezeptorvermittelte Endozytose gelangt das Virus in die Wirtszelle und das virale Genom, eine einzelsträngige RNA positiver Orientierung, wird im Zytoplasma freigesetzt (b). Über die IRES rekrutiert diese virale RNA direkt die zelluläre Translationsmaschinerie, ein Polyprotein wird an der ER-Membran gebildet und in die 10 reifen viralen Proteine prozessiert (c). (d) Durch die Translation der viralen Proteine bildet sich ein ‚membranous web‘ am ER. In diesem Kompartiment formieren sich die viralen Proteine sowie zelluläre Komponenten zu einem Replikationskomplex. Über ein RNA-

Intermediat ((-)RNA) wird das virale Genom vervielfältigt und kann erneut translatiert werden oder (e) zu Virionen assemblieren, die nach Reifung als infektiöse virale Partikel die Wirtszelle verlassen (f).

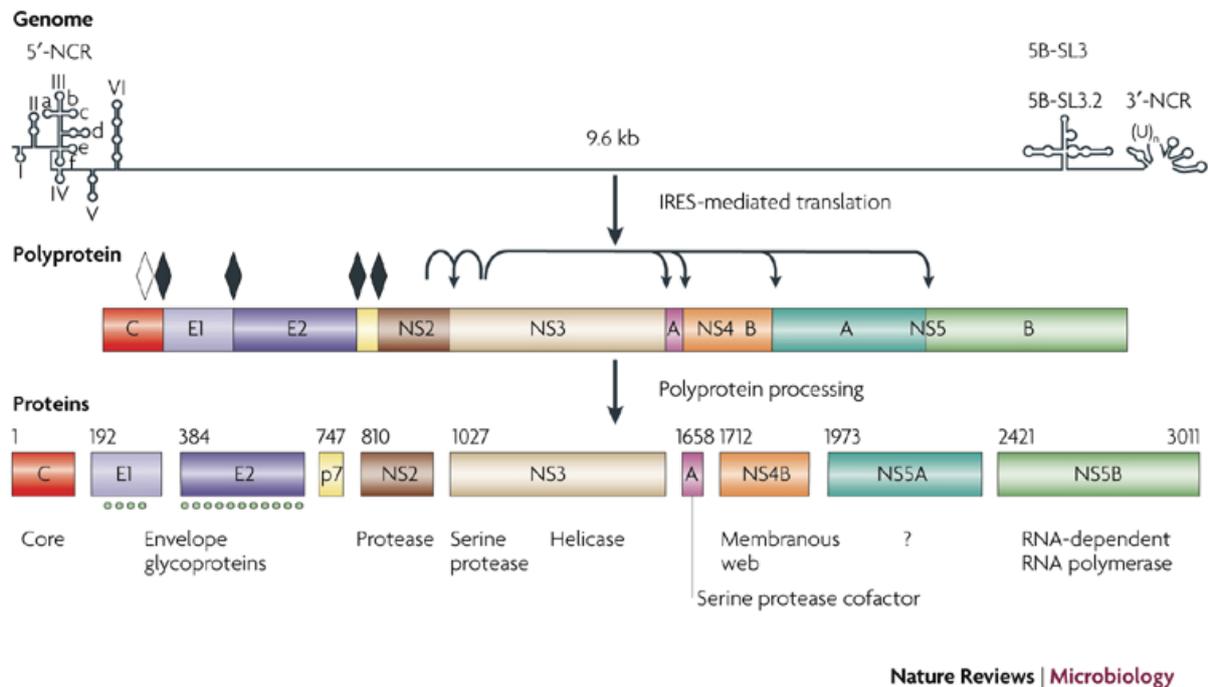


Abbildung 2: Das virale Genom und die viralen Proteine [1].

Das virale Genom, eine einzelsträngige RNA von 9,6 kb, bildet sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende komplexe RNA-Sekundär- und Tertiärstrukturen. Über die *internal ribosome entry site* (IRES) am 5'-Ende wird durch die zelluläre Translationsmaschinerie ein virales Polyprotein gebildet. Dieses wird durch zelluläre Signalpeptid-Peptidasen und Signal-Peptidasen (offene und geschlossene Rauten), Autoproteolyse des viralen NS2/3 sowie durch die virale Serin-Protease NS3 in 10 virale Proteine prozessiert. Die Strukturproteine bilden das Nukleokapsid Core (C), die N-glykosylierten Hüllproteine Envelope 1 (E1) und Envelope 2 (E2) und p7, das durch Oligomerisierung Ionenkanäle bildet. Die Nicht-Struktur-Proteine sind essentiell für die Replikation der RNA. NS3 besitzt neben der Serin-Protease-Funktion eine ATP-abhängige 3'→5' Helikase-Aktivität. NS4A ist ein Cofaktor und intermolekularer Membrananker von NS3. NS4B induziert die Ausbildung des ‚*membranous web*‘ an der ER-Membran. Die Funktion von NS5A bei der Replikation ist weitgehend unklar, es soll aber mit zellulären Abwehrmechanismen interferieren und ist an der Assemblierung viraler Partikel beteiligt. NS5B katalysiert die RNA-abhängige RNA-Polymerisationsreaktion.

Core, Envelope 1, Envelope 2 und p7 sind die so genannten Strukturproteine und für die Vermehrung des viralen Genoms innerhalb der Wirtszelle nicht essentiell [2]. Vielmehr schützen sie das virale Genom im extrazellulären Stadium des Virus und ermöglichen das erfolgreich Eindringen und Einschleusen viraler RNA in die Wirtszelle. Zwar fehlen (noch) hochaufgelöste Strukturen von Core (19 – 21 kDa) und auch die Assemblierung zu homogenen Core-Oligomeren *in vitro* gestaltet sich

schwierig, doch ist wahrscheinlich, dass Core das virale Nukleokapsid bildet [3-7]. Mit seiner N-terminalen basischen Domäne erfolgt die Bindung von RNA und (anschließende) Oligomerisierung. Über die hydrophobe C-terminale Domäne mit amphipathischen Helizes erfolgt die Lokalisierung von Core zu den *lipid droplets* an der ER-Membran, an denen wahrscheinlich die Assemblierung zu neuen infektiösen Partikeln stattfindet. Envelope 1 (~ 35 kDa) und Envelope 2 (~ 70 kDa) bilden die viralen Hüllproteine [8-10]. Über eine hydrophobe Transmembrandomäne sind sie in der ER-Membran verankert. Die Ektodomänen auf der luminalen Seite werden posttranslational N-glykosyliert und spielen beim Eintritt in eine neue Wirtszelle die entscheidende Rolle. Über Interaktionen mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche (LDL-Rezeptor, CD81, SR-BI, SR-BII, CLDN1, GAGs und andere) erfolgt die Endozytose des viralen Partikels, der Rab5-abhängig zu frühen Endosomen dirigiert wird [11]. Eine Reduktion des pH-Werts führt zu einer Fusion der viralen Hülle mit der endosomalen Membran, was die Freisetzung des viralen Genoms in das Zytoplasma zur Folge hat. Ob und welche Funktion das hydrophobe, Doppellipidmembrandurchspannende HCV-Protein p7 (7 kDa) dabei hat, ist unklar. Es gehört zu der Familie der Viroporine, bildet durch Oligomerisierung Kationen-selektive Membrankanäle [12, 13] und hat eine wichtige Rolle bei der Reifung und Freisetzung viraler infektiöser Partikel [14-16].

Speziell die Daten bezüglich des Eindringens des Hepatitis C Virus in die Wirtszelle und die Assemblierung und Freisetzung neuer infektiöser Partikel konnten erst seit der Entdeckung einer besonders aktiven Spezies des Virus' in diesem Umfang gewonnen werden. Dieses aus einem an akuter chronischer Hepatitis erkrankten japanischen Patienten isolierte Hepatitis C Virus – *Japanese Fulminant Hepatitis 1* (JFH-1) – repliziert in gut detektierbaren Mengen in Zellkultursystemen [17]. Auch bildet dieser HCV Subtyp JFH-1 des Genotyps 2a in Kultur hepatozellulärer Karzinomzellen neue infektiöse Partikel, so dass der gesamte „Lebenszyklus“ des Hepatitis C Virus ‚*in vitro*‘ untersucht werden kann [18]. Bis zu diesem Zeitpunkt (2005) konzentrierte sich die Erforschung von HCV, abgesehen von Tierversuchen mit Schimpansen sowie HCV-Pseudo-Partikeln (HCVpp) [19, 20], auf die seit 1999 existierenden ‚Replikon‘-Systeme [2]. Lohmann *et al.* entwickelten eine subgenomische RNA viralen Ursprungs, die nach Transfektion in bestimmte kultivierte Karzinomzellen in der Lage ist, sich selbstständig in der Wirtszelle zu

vermehrten. Dieses artifizielle Replikon-System ermöglichte zum ersten Mal in großem Umfang die Untersuchung sowohl der Translation viraler Nicht-Struktur-Proteine, als auch der Vervielfältigung viraler RNA. Die Bildung neuer infektiöser Partikel ist nicht möglich, da die RNA nur für die viralen Nichtstruktur-Proteine NS3 – NS5B kodiert. Essentiell für diese HCV-Replikation sind auch RNA-Strukturen in den 5' und 3' nicht-translatierten Regionen (NTR) [21-31]. Die 5' NTR mit der HCV-IRES sorgt für die Translation der viralen Proteine NS3 – NS5B [28, 29, 32, 33]. Diese sind ausreichend für die Bildung eines Komplexes an der ER-Membran. Durch diesen Replikationskomplex, bestehend aus den viralen Proteinen NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B sowie diversen Wirtsfaktoren, deren Rolle noch zu erforschen ist, wird die virale RNA *in vivo* vervielfältigt. Zwar werden mehrere Faktoren, zelluläre sowie virale Proteine diskutiert, die an der viralen Replikation beteiligt sind, doch wird die RNA-Polymerisierung von NS5B, der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase katalysiert [34-36].

Die Ausbildung dieses Replikationskomplexes wird durch NS4B induziert. NS4B ist ein stark hydrophobes integrales Membranprotein (27 kDa) und seine Expression führt zu massiven Veränderungen der Struktur und Menge von Membranen des endoplasmatischen Retikulums [37]. Dieses ‚membranous‘ web gilt als Replikationsort des Hepatitis C Virus und NS4B damit als *scaffold*-Protein für die Ausbildung und Formierung der etwa 500 kDa umfassenden viralen Replikationskomplexe [38, 39].

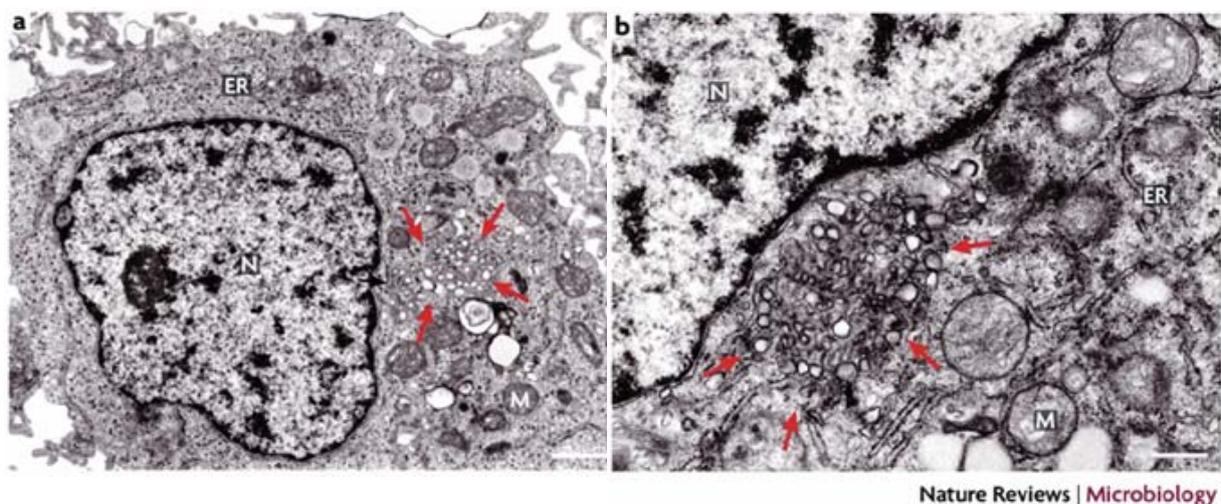


Abbildung 5: Mikroskopische Aufnahmen einer mit dem Hepatitis C Replikon transfizierten Zelle [1].

A) und B) Huh-7 Leberzellen wurden mit dem subgenomischen HCV-Replikon transfiziert (siehe Text). Rote Pfeile markieren die durch HCV induzierten Membranalterationen (*membranous web*), an denen die RNA-Replikation des Virus stattfindet. ER = endoplasmatisches Retikulum; N = Nukleus; M = Mitochondrium.

Das virale NS5A wird sowohl mit der Replikation viraler RNA [40-42], mit der Assemblierung zu neuen infektiösen Viruspartikeln [43], als auch mit einer Beeinträchtigung zellulärer Abwehrmechanismen in Verbindung gebracht [44-49]. *In vivo* kommt es in zwei distinkten phosphorylierten Zuständen vor [50]. Einer basal phosphorylierten Form mit 56 kDa und einer hyperphosphorylierten Variante mit einem apparenten Molekulargewicht von 58 kDa [51]. Sowohl die verantwortliche(n) zelluläre(n) Kinase(n), als auch die Auswirkungen dieser Phosphorylierungen sind spekulativ [52]. Zudem fehlen strukturelle Daten des gesamten Proteins sowie eine intrinsische enzymatische Aktivität. Die Bedeutung von NS5A für die Replikation des Hepatitis C Virus ist jedoch unumstritten [53]. N-terminal befindet sich eine für die virale Replikation unabdingbare amphipathische Helix, die für eine Membranlokalisierung sorgt. Der C-Terminus des NS5A-Proteins kann als Kernlokalisierungssignal fungieren [54]. Der überwiegende Teil des NS5A-Proteins befindet sich in einer intrinsisch ungeordneten Konformation, soll aber RNA-Bindungseigenschaften besitzen [40].

Das virale Nicht-Strukturprotein 3 (NS3, ~ 70 kDa) hat neben der proteolytischen Prozessierung des viralen Polyproteins eine Helikasefunktion [55-60]. ATP-abhängig kann NS3 das Gleichgewicht sowohl inter- als auch intramolekulare Nukleinsäure-Doppelstrangbereiche hin zur einzelsträngigen Konformation verschieben. Es ist in der Lage, RNA-Strukturen lokal und temporär von 3' nach 5' aufzulösen. Denkbar wäre, dass NS3 an der Faltung essentieller viraler RNA-Strukturen, wie der IRES oder anderen Sekundärstrukturen beteiligt ist [61]. Durch eine aktive Destabilisierung nicht-nativer Faltungsintermediate könnte die Population nativ gefalteter RNA-Strukturen erhöht werden. Eine mögliche Funktion der NS3-Helikase ist auch die Aufbereitung der RNA-Matrize für die RNA-abhängige RNA-Polymerisationsreaktion. Nukleinsäuren bilden zum einen Sekundärstrukturen aus, die auf Grund ihres Doppelstrang-Charakters Barrieren der Polymerisationsreaktion darstellen könnten. Eine Auflösung solcher Sekundärstrukturen unter Bildung der einzelsträngigen RNA-

Konformation sollte den Einbau von Nukleotiden komplementär zur RNA-Matrize erleichtern. In der Tat gibt es Studien die belegen, dass sowohl die Helikase NS3 und die Polymerase NS5B wechselwirken [62-64], als auch die Polymerase-Aktivität durch NS3 gesteigert wird [65]. Zum anderen ist auch das Polymerisationsprodukt bestehend aus RNA-Matrize (dem RNA-Substrat) und dem neu synthetisierten RNA-Strang inhärent eine thermodynamisch stabile doppelsträngige RNA. Damit die virale Polymerase eine Mehrsubstratreaktion, bezogen auf die RNA-Matrize effektiv katalysieren kann, muss die einzelsträngige RNA-Matrize aber nach jedem (vollständigen) Polymerisationszyklus wieder freigesetzt werden.

Bei dem viralen Peptid NS4A mit seinem integralen Membrananker handelt es sich um einen Kofaktor von NS3, der zu einer Lokalisierung von NS3 an der ER-Membran führt [66, 67]. Des weiteren steigert NS4A durch Bindung an eine  $\beta$ -barrel-Struktur am N-Terminus von NS3 in einer Art positiven Rückkopplung dessen Serin-Protease-Funktion [68, 69]. Auch beeinflusst NS4A in positiver Weise die RNA-Helikaseaktivität von NS3 [70, 71].

Das NS5B-Protein (~ 65 kDa) ist die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase; diese ist essenziell für die Amplifikation des viralen Genoms im Replikationsprozess [34, 72]. NS5B baut Nukleotide in einen wachsenden RNA-Strang von 5' nach 3' komplementär zu einer (einzelsträngigen) RNA-Matrize ein. Die Gruppe von M.M.C. LAI konnte 1999 zeigen, dass eine rekombinante HCV-Polymerase selbstständig in der Lage ist, das gesamte virale Genom als RNA-Matrize zu nutzen und *primer*-unabhängig (*de novo*) eine dazu komplementäre RNA von etwa 9.5 kb zu bilden [36]. Zwar wird für die RNA-abhängige RNA-Polymerisationsreaktion neben RNA-Matrize und Nukleotiden (NTPs) nur die HCV-Polymerase benötigt, doch ist diese *in vitro*-Reaktion nicht besonders effizient. Neben dem zu erwartenden Polymerisationsprodukt entstehen diverse RNA-Fragmente unterschiedlichster Größe als Nebenprodukte. Entweder beginnt die Polymerase ihre Reaktion nicht einheitlich am 3'-Ende der jeweiligen RNA-Matrize, oder sie beendet vorzeitig die Polymerisationsreaktion. Durch Basenpaarungen können einzelsträngige RNA-Matrizen Sekundärstrukturen ausbilden. Solche doppelsträngigen Sekundärstrukturen stellen Barrieren der Polymerisationsreaktion dar, da die Polymerase Nukleotide in einen von 5' nach 3' wachsenden RNA-Strang komplementär zu einer einzelsträngigen RNA-Matrize einbaut. In einem ersten

Polymerisationszyklus dient das virale Genom selbst als RNA-Matrize. Beginnend an dessen 3'-Ende synthetisiert die HCV-Polymerase eine dazu komplementäre RNA, die (-)-RNA. Dieses Replikationsintermediat fungiert dann in einem zweiten Polymerisationszyklus als RNA-Matrize und ermöglicht die Bildung des viralen Genoms, der (+)-RNA. In HCV-infizierten Zellen kann das virale Genom, im Gegensatz zu dem komplementären RNA-Intermediat, mittels RT-PCR gut nachgewiesen werden. Daher ist davon auszugehen, dass wenige Moleküle der (-)-RNA als Matrize ausreichen, um vielfache Kopien des viralen Genoms herzustellen. Das RNA-Intermediat, die (-)-RNA, ist also vorwiegend das RNA-Substrat der HCV-Polymerase [73]. Das 3'-Ende der (-)-RNA (komplementär in seiner Primärstruktur zur HCV-IRES), wie auch das 3'-Ende der (+)-RNA bilden aber thermodynamisch stabile RNA-Sekundärstrukturen [30, 31, 74-80]. Am äußersten 3'-Ende der (-)-RNA befindet sich eine konservierte *stem-loop*-RNA-Struktur, die vermutlich die virale RNA vor 3'-Exonukleasen schützt. Die Polymerisationsreaktion sollte aber an dieser *stem-loop*-RNA-Struktur am äußersten 3'-Ende initiieren, um nicht mit jedem Polymerisationszyklus genetische Information zu verlieren [81]. Somit müssen diese *stem-loop*-RNA-Strukturen in jedem Polymerisationszyklus überwunden werden. Analog zu anderen Polymerasen besitzt auch die HCV-Polymerase eine „rechte Hand“-Struktur [82-84]. Das aktive Zentrum mit einem essentiellen GDD-Motiv und koordinierten Magnesium-Ionen befindet sich auf der Handflächen-Domäne. Dort wird der nukleophile Angriff der 3'-Hydroxylgruppe eines bereits komplementär zur RNA-Matrize gebundenen Nukleotids auf das  $\alpha$ -Phosphoratom eines sich neu anlagernden Nukleosid-Triphosphats katalysiert. Umschlossen wird das aktive Zentrum von Finger- und Daumen-Domäne, die sich in einem ungewöhnlich engen Kontakt befinden (Abbildung 3) [85]. Die RNA-Matrize gelangt vermutlich über einen Kanal innerhalb der Finger-Domänen zum aktiven Zentrum [86], die Nukleosid-Triphosphate über einen „NTP-Tunnel“ zwischen Daumen- und der Finger-Domäne [87-89]. Analysiert man die Vielzahl der Kristallstrukturen der HCV-Polymerase wird deutlich, dass ohne weitere Konformationsänderungen der einzelnen Finger-Domänen nur einzelsträngige RNA-Matrizen bis zum aktiven Zentrum vordringen können [81]. Auch blockiert der C-Terminus, der der Daumen-Domäne entspringt, höchst wahrscheinlich den Austritt des doppelsträngigen Polymerisationsprodukts auf der „Rückseite“ der HCV-Polymerase [90, 91]. Auf der Innenseite der Daumen-Domäne, dem aktiven Zentrum zugewandt, befindet sich eine ungewöhnliche *beta*-

*flap*-Struktur, die in Verbindung mit Positionierungsreaktionen von sowohl der eintretenden RNA-Matrize als auch initialen Nukleotiden gebracht wird [81, 91, 92]. Sterische Gründe erfordern aber eine Reorganisation dieser *beta-flap*-Struktur, sobald die Elongationsphase der Polymerisationsreaktion beginnt und Nukleotide prozessiv in einen wachsenden RNA-Strang eingebaut werden [81, 83, 93]. Die C-terminalen 21 Aminosäuren stellen den Membrananker dar [94-98] und sind nicht essentiell für die katalytische Aktivität der HCV-Polymerase [91, 99-104]. Da eine Deletion dieses Membranankers die Löslichkeit des Enzyms deutlich verbessert, werden fast ausschließlich mit dieser Variante Untersuchungen *in vitro* durchgeführt. Auch in der vorliegenden Arbeit fand ausschließlich diese Deletionsvariante von C-terminal 21 Aminosäuren der HCV-Polymerase Verwendung.

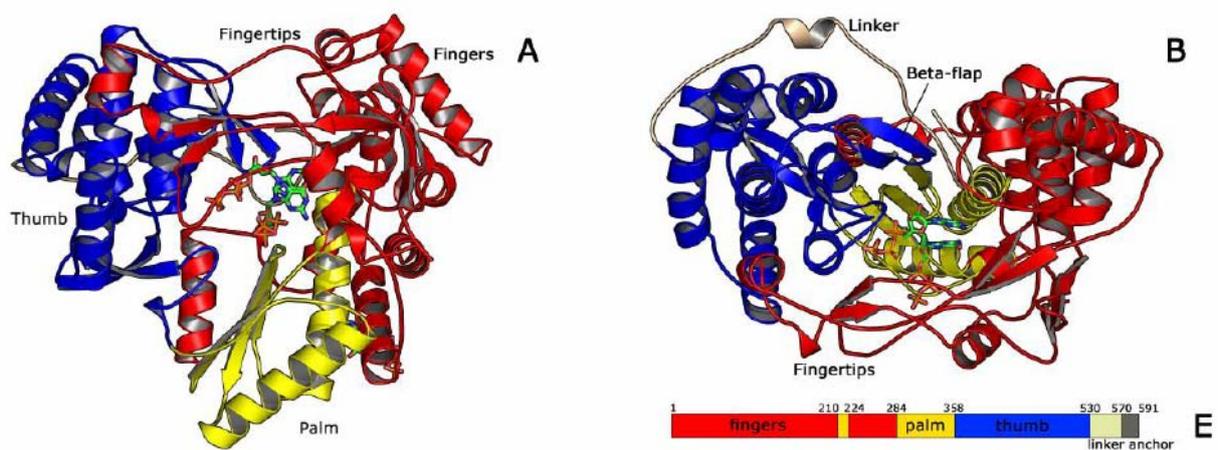


Abbildung 3: Schematische Darstellung der HCV-Polymerase [91].

Dargestellt ist die Kristallstruktur der HCV-Polymerase im *ribbon*-Diagramm mit der Handflächen-Domäne (*palm*) in gelb, der Daumen-Domäne (*thumb*) in blau und der Finger-Domäne (*fingers*) in rot. Die C-terminale ‚*linker*‘-Region ist in grau, die Elektronendichten zweier Nucleosid-Triphosphate im aktiven Zentrum sind in Stäbchendarstellung wiedergegeben. A) Ansicht von vorn. Der putative Eintritt der Nucleotide erfolgt über den NTP-Tunnel zwischen Daumen-Domäne und der Finger-Domäne. B) Ansicht der HCV-Polymerase von oben. Die RNA-Matrize gelangt vermutlich über die Finger-Domäne zwischen den ‚Fingerspitzen‘ (*fingertips*) und dem ‚*beta-flap*‘ zum aktiven Zentrum auf der Handflächen-Domäne. Der wahrscheinliche Austritt des doppelsträngigen RNA-Produkts erfolgt auf der Rückseite (von hier aus gesehen oben) und erfordert eine Umorientierung des C-terminalen ‚*linker*‘ sowie des ‚*beta-flap*‘. E) Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz der HCV-Polymerase mit der farblichen Kodierung entsprechend den jeweiligen Domänen. Dunkelgrau ist der Membrananker dargestellt, den die 21 C-terminalen Aminosäuren bilden. Dieser ist in den Kristallstrukturen nicht zu sehen, da dieser Bereich deletiert wurde.

Seit der ersten Beschreibung der Hepatitis C viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase durch Behrens *et al.* 1996 stellt dieses essentielle virale Enzym ein hoch interessantes Ziel der antiviralen Wirkstoffentwicklung dar. Neben Nukleosid-Analoga gibt es eine Reihe von Verbindungen, die mit allosterischen Bindungsstellen der HCV-Polymerase wechselwirken und so das Enzym inhibieren (*non-nucleoside inhibitors* NNI) (siehe Abbildung 4). Diskutiert wird, dass diese allosterischen Bindungsstellen sich in Regionen erhöhter Flexibilität befinden und eine Bindung essentielle Konformationsänderungen der HCV-Polymerase unterbindet [93, 105-110]. In diesem Kontext wird auch eine „GTP-Bindungsstelle“ diskutiert. Sie wurde in Kristallstrukturen der HCV-Polymerase entdeckt und befindet sich etwa 30 Å vom aktiven Zentrum entfernt in der Daumen-Domäne, in engem Kontakt mit den „Fingerspitzen“ [87]. Ob die Bindung von GTP an dieser Stelle die Polymerase positiv beeinflusst, ist Gegenstand intensiver Forschung und wird mitunter kontrovers diskutiert [85, 101, 109, 111]. Direkt neben dieser „GTP-Bindungsstelle“ befindet sich allerdings eine hydrophobe Bindetasche für Nicht-Nukleosid-Inhibitoren der Benzimidazol- und Indol-Klasse [105, 108-110, 112]. Eine Bindung dieser Substanzen soll die Interaktion der Daumen- mit der Finger-Domäne beeinflussen und dadurch inhibitorisch wirken [85, 105, 106, 108, 109].

Auch Nahe dem aktiven Zentrum auf der Handflächen-Domäne befinden sich Bindestellen für allosterische Inhibitoren (siehe Abbildung 4). HCV-796, eine niedermolekulare Verbindung der Bezofuran-Klasse, zeigte in präklinischen Studien gute Erfolge. Sowohl in *in vitro* Enzymtests inhibierte HCV-796 die durch die HCV-Polymerase katalysierte Produktbildung, als auch in Replikon-Systemen. Auch bei chimären Mäusen infiziert mit HCV führte eine Behandlung mit HCV-796 zu einer Reduktion der HCV-RNA um den Faktor 100 [113].

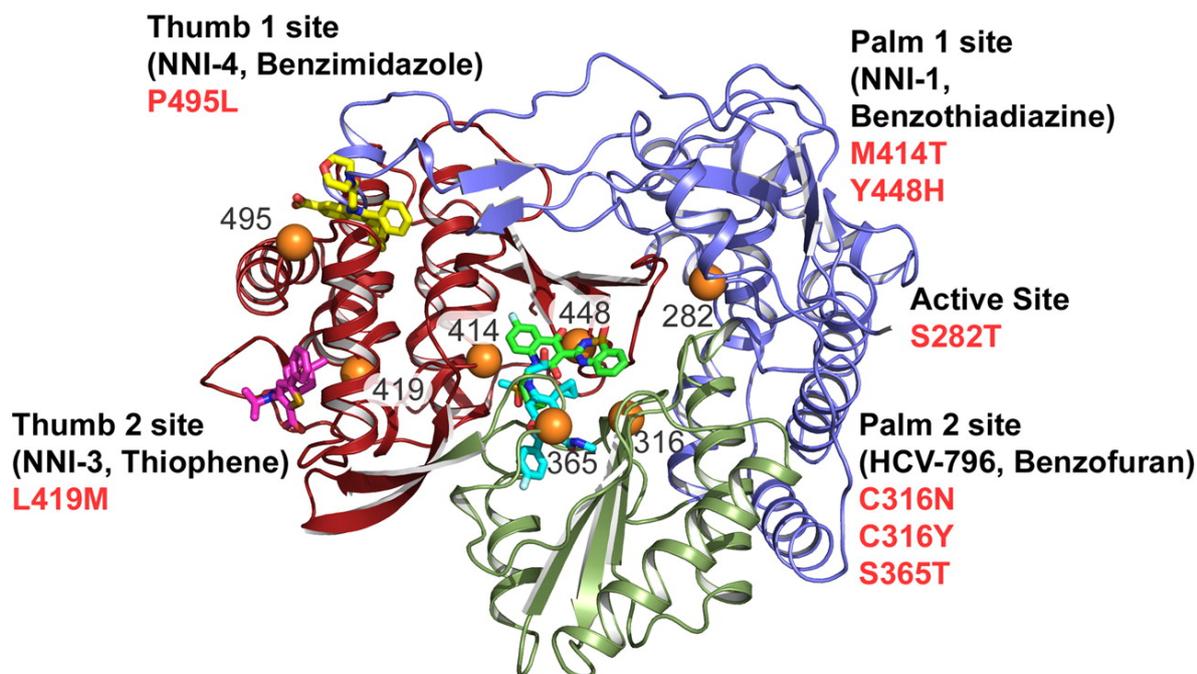


Abbildung 4: Bindestellen für allosterische Inhibitoren der HCV-Polymerase [114].

Die Kristallstruktur der HCV-Polymerase ist im *Ribbon*-Diagramm mit der Handflächen-Domäne in grün, Daumen-Domäne in rot und Finger-Domäne in blau dargestellt. Das aktive Zentrum befindet sich im Zentrum auf der Handflächen-Domäne. Eine Mutation von Serin 282 zu Threonin verringert allgemein den Einbau von Nukleotiden in einen wachsenden RNA-Strang, erhöht aber die Diskriminierung von 2'-modifizierten Nukleotiden gegenüber Ribonukleotiden [115]. Jeweils 2 allosterische Bindestellen sowie ein Vertreter (in Stäbchendarstellung) der jeweiligen Verbindungsklasse sind in der Handflächen-Domäne (*,Palm 1 site'* und *,Palm 2 site'*) sowie der Daumen-Domäne (*,Thumb 1 site'* und *,Thumb 2 site'*) angegeben. In rot sind jeweils Aminosäuresubstitutionen hervorgehoben, die Resistenzen gegen die Gruppe der entsprechenden Nicht-Nukleosid-Inhibitoren (NNI) führen.

Begründet durch die Assoziation diverser zellulärer Proteine und Nukleinsäuren mit dem viralen Replikationskomplex in infizierten Zellen werden diese als Wirtsfaktoren diskutiert und ihnen oft aktivierende Einflüsse auf die virale Replikation zugesprochen. Humanes Cyclophilin A beispielsweise soll die Prozessierung des viralen Polyproteins fördern [116] sowie die Konformation von NS5A beeinflussen [40, 117-119], zelluläre Helikasen (p68, RHA, DDX3) die Translation und / oder die RNA-abhängige RNA-Polymerisation [120-123]. Auch weitere RNA-bindende Proteine und auch Nukleinsäuren selbst (miR122) sind in diese Prozesse involviert [122, 124]. Dem humanen Cyclophilin B wurde eine besonders interessante Rolle zugeschrieben, nämlich die direkte Interaktion mit der HCV-Polymerase und

Stimulierung dessen RNA-Bindungseigenschaften [125, 126]. Obwohl bisher nur minimale Konformationsänderungen der HCV-Polymerase in Kristallstrukturen detektiert werden konnten werden sowohl durch Übereinanderlagerung mit anderen Polymerasen, als auch durch die Vielzahl unterschiedlicher Bindestellen allosterischer Inhibitoren größere Konformationsänderungen, auch sterisch bedingt, im Zuge der Polymerisationsreaktion erwartet [83]. Als ein Vertreter der Peptidylprolyl-*cis/trans*-Isomerasen kann Cyclophilin B prinzipiell Faltungszustände und Konformationen von Proteinen beeinflussen [127]. Möglicherweise stellt die Hepatitis C virale RNA-abhängige RNA-Polymerase ein Substrat für das humane Cyclophilin B dar. Die Population einer bestimmten Konformation der Polymerase könnte zu einer verbesserten Affinität zu Nukleinsäuren führen.

### Zielstellung

Seit über 20 Jahren ist die HCV-Polymerase Gegenstand intensiver Forschung. Neben *in vivo* Experimenten mit Zellkultursystemen und replizierenden HCV-RNAs werden Untersuchungen *in vitro* mit gereinigter HCV-Polymerase durchgeführt. Dabei wird vor allem die durch die HCV-Polymerase katalysierte Produktbildung analysiert. Hierzu wird meist mit einem diskontinuierlichen assay nach Behrens *et al.* der Einbau radioaktiv-markierter Nukleotide komplementär zu einer RNA-Matrize mittels Phosphor-*imaging* detektiert [34]. Als RNA-Matrize finden dabei eine Vielzahl unterschiedlicher Nukleinsäuren Verwendung. Ebenso wird in unterschiedlichen Studien bei verschiedenen Reaktionsbedingungen experimentiert, so dass Ergebnisse nur bedingt miteinander vergleichbar sind.

In dieser Arbeit sollten (biophysikalische) Methoden etabliert werden, nicht nur die Produktbildung, sondern alle zur Katalyse notwendigen Reaktionsschritte der HCV-Polymerase *in vitro* zu untersuchen, zu quantifizieren und damit im molekular-mechanistischen Detail zu charakterisieren.

Die Polymerisationsreaktion stellt eine Zwei-Substrat-Reaktion dar. Die Polymerase muss sowohl mit dem Polymersubstrat RNA interagieren, welches als Matrize zur Bildung doppelsträngigen RNA-Produkts dient, als auch mit Nukleotiden, aus denen sich der wachsende RNA-Strang zusammensetzt. Zur Quantifizierung der Interaktion

von HCV-Polymerase und NTPs sollte eine spektroskopische Methode etabliert werden. Die Bindung und Freisetzung von RNA sollte mittels Fluoreszenzspektroskopie unter Verwendung Fluorophor-markierter RNAs quantifiziert werden. Anhand der detaillierten Charakterisierung von Substratbindung und Produktfreisetzung sollte dann die Wirkungsweise des allosterischen Inhibitors HCV-796 der HCV-Polymerase erforscht werden. Diese niedermolekulare Verbindung zeigte einen starken negativen Effekt auf die HCV-Replikation und bindet Kristallstrukturen zufolge nahe dem aktiven Zentrum an der Handflächen-Domäne der HCV-Polymerase. Welchen Reaktionsschritt HCV-796 allerdings beeinflusst, und ob Konformationsänderungen der HCV-Polymerase dabei eine Rolle spielen, war unbekannt.

Auch eine vergleichende Studie zweier HCV-Polymerasen (Genotyp 2a, Subtyp JFH-1 und Genotyp 1b, Subtyp BK) hinsichtlich Substratbindung und Produktbildung sollte durchgeführt werden. Die Polymerase vom Genotyp 1b, Subtyp BK war bis zur Isolierung von JFH-1 eine der aktivsten beschriebenen HCV-Polymerasen. JFH-1 ist bisher das einzige HCV-Isolat, welches in sehr gut detektierbaren Mengen in Zellkultursystemen repliziert und infektiöse Partikel bildet. Dafür verantwortlich wird mitunter auch die HCV-Polymerase dieses Isolats gemacht.

Die Untersuchung von gereinigter HCV-Polymerase, einzelsträngiger RNA-Matrize und Nukleotiden entspricht aber nur bedingt den Bedingungen *in vivo*, da die Polymerisation des viralen Genoms in Replikationskomplexen an der ER-Membran unter Beteiligung viraler sowie zellulärer Proteine und Faktoren stattfindet. Zudem weist die native RNA-Matrize Sekundär- sowie Tertiärstrukturen auf. Um die Bedingungen *in vitro* möglichst den natürlichen anzupassen, sollte die Initiation der Vervielfältigung des viralen Genoms nachgestellt werden. Dazu sollte eine natürliche RNA, das 3'-Ende der HCV (-)-RNA, welches RNA-Sekundärstrukturen ausbildet, als Matrize verwendet werden. Solche RNA-Sekundärstrukturen sollten den Einbau von Nukleotiden komplementär zu einer RNA-Matrize behindern, da zumindest am aktiven Zentrum der HCV-Polymerase die RNA-Matrize in der einzelsträngigen Konformation vorliegen müsste. Demzufolge sollten Faktoren, die RNA-Strukturen beeinflussen, auch einen (indirekten) Effekt auf die Polymerisationsreaktion haben. Um dies untersuchen zu können, sollten Methoden etabliert werden, strukturelle Änderungen der RNA-Matrize verfolgen zu können. Dieses System soll dann die Basis für weiterführende Studien bilden, um virale sowie zelluläre Faktoren und

deren direkten oder indirekten Einfluss auf die HCV-Polymerisationsreaktion zu untersuchen. In diesem Kontext sollte auch Cyclophilin B, ein möglicher Wirtsfaktor der HCV-Polymerisationsreaktion, untersucht werden.

# Materialien und Methoden

## Materialien

### Chemikalien

Ammoniumsulfat	Merck
Borsäure	Roth
Cyclosporin A	Roche
DTT	Applichem
D <sub>2</sub> O	Cortecnet
EDTA (Titrplex <sup>®</sup> III)	Merck Millipore
Ethanol (absolut)	Roth
Formamid	Roth
Glyzerin (wasserfrei)	Applichem
Glyzerin (deuteriert)	Cortecnet
Harnstoff	Applichem
HEPES	Applichem
Imidazol	Merck
IPTG	Roth
Kanamycinsulfat	Applichem
Lysozym	Roth
Magnesiumchlorid	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydroxid	Merck
NTPs (je 100 mM)	Fermentas
NTPs (lyophilisiert)	Sigma-Aldrich
Phosphorsäure 85%	KMF Laborchemie
PMSF	Sigma
Polyacrylamid	Roth
Protease Inhibitor ‚complete‘	Roche
Salzsäure 37%	KMF Laborchemie
Streptomycinsulfat	Merck

TCEP	Sigma-Aldrich
Tris-Base	Roth

### Oligonukleotide und Oligodesoxynukleotide

Oligonukleotide, auch mit einer 5'-FAM-Ex-Modifizierung wurden von IBA GmbH, Göttingen angefertigt und HPLC-gereinigt geliefert (HPLC grade).

ssRNA	5`-CUAAGAUGCUCGCUGC-3`
<i>stem-loop</i> -RNA	5`-UCGCCCCUAUUAGGGGCAGGU-3`
<i>stem-loop</i> -DNA	5`-d(TCGCCCCTATTAGGGGCAGGT)-3`

### Geräte, Verbrauchsmaterialien und Sonstiges

Äkta purifier	GE Healthcare
analytische Ultrazentrifuge Optima XL-A	Beckman Coulter
Fluorimeter Fluoromax-4	Jobin-Yvon Horiba
Gaulin Homogenisator	APV Homogenisator
Jasco J-810 Spectropolarimeter	Jasco
Ultrazentrifuge L8-60M	Beckman Coulter
UV/VIS Spektrometer V-550	Jasco
Zentrifuge Rotina 38R	Hettich
Cellulose Nitrat Filter Ø 45 µm	Sartorius
Dialysemembran Spectra/Por Ø 11,5 mm	Spectrum
Dialysemembran Visking dialysis tubing 36/32 Ø 27 mm	SERVA
Spritzenfilter steril Rotilabo Ø 0,45 µm und 0,22 µm	Roth
SUMO-Protease ( <i>Ulp-1</i> )	Präpariert nach Mossessova, E. und Lima, C.D. [128]
α-Chymotrypsin	Sigma-Aldrich

Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA

stopped-flow Apparatur mit Fluoreszenz-Detektor (SX.20 MV)

Inhibitor HCV-796

(5-cyclopropyl-2-(4-fluorophenyl)-6-[(2-hydroxyethyl)(methanesulfonyl)amino]-N-methyl-1-benzofuran-3-carboxamide)

Sigma-Aldrich

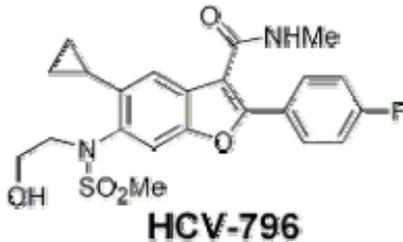
Applied Photophysics

Zur Verfügung gestellt durch Dr.

Vadim Bichko, Vize-Präsident

Virologie, ChemDiv, San Diego,

CA 92121



Strukturformel nach Kneteman *et al.* [113].

Ni-NTA (FF)

GE Healthcare

Poly(U)-Sephacrose 4B

GE Healthcare

SP-Sephacrose

GE Healthcare

Resource Q-Sephacrose

GE Healthcare

Superdex 75 (pg)

GE Healthcare

## Plasmide

Kodierendes Gen	Vektor	Restriktion / Ligation über
NS5B $\Delta$ 21 (Genotyp 1b, Subtyp BK)	pET Sumo (Adapt)	Bsa I (5'), Hind III (3')
NS5B $\Delta$ 21 (Genotyp 2a, Subtyp JFH-1)	pET Sumo (Adapt)	Bsa I (5'), Hind III (3')
Cyclophilin B	pQE60	Dankend erhalten von Dr. Cordelia Schiene-Fischer, Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle (Saale)

## Methoden

### Proteinreinigung

#### HCV-Polymerase NS5B

*Escherichia coli* BL21(star) DE3 hatten bei 30 °C nach IPTG-Induktion die HCV-Polymerase NS5B ohne den C-terminalen Membrananker von 21 Aminosäuren mit N-terminalem SUMO-His<sub>6</sub>-tag (Plasmid siehe Seite 22 und Diplomarbeit Stefan Reich, 2007, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) für 4 h rekombinant produziert. Nach Zellernte waren diese schockgefroren worden und wurden bei – 40 °C aufbewahrt. Zur Reinigung des Zielproteins, der nativen HCV-Polymerase, wurden die Zellen in Aufschlusspuffer (20 mM NaPh, 500 mM NaCl, 50 mM Imidazol, pH = 7.6) resuspendiert, mit 2 mM PMSF, einer Protease-Inhibitor-Mischung (Roche, ‚complete‘) und 0.1 mg/mL Lysozym versetzt. Nach Zellaufschluss (*french press*; 2 x > 600 bar) und Zentrifugation (Rotor 45 Ti, 35000 rpm, 45', 4°C) wurde der Überstand mit 0.5 g/mL Ammoniumsulfat versetzt, 30' bei 6 °C inkubiert und erneut zentrifugiert (Rotor 45 Ti, 35000 rpm, 25', 4°C). Der Niederschlag wurde mit Aufschlusspuffer resuspendiert, unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (Rotor 45 Ti, 35000 rpm, 45', 4°C) abgetrennt und der Überstand über eine mit Aufschlusspuffer äquilibrierte Ni-NTA-Sepharose-Affinitätschromatographiesäule (GE Healthcare, 25 mL FF) gegeben. Gebundenes Material wurde durch 500 mM Imidazol eluiert und zusammen mit *Ulp-1* (SUMO-Protease, siehe Geräte, Verbrauchsmaterialien und Sonstiges, Seite 19) gegen 2 x 1 L Tris-Puffer (50 mM Tris/Cl, 500 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, 1 mM DTT, pH = 7.6) bei 6 °C dialysiert. Die native HCV-Polymerase wurde auf 50 mM Tris/Cl, 150 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, 1 mM DTT, pH = 7.6 verdünnt und an eine poly(U)-Sepharose 4B-Affinitätschromatographiesäule (GE Healthcare, 20 mL) gebunden. Durch kontinuierliche Erhöhung der NaCl-Konzentration wurde das Zielprotein bei etwa 0.3 M NaCl eluiert. Mittels abschließender Ni-NTA-Sepharose-Affinitätschromatographie (GE Healthcare, 20 mL FF) wurden letzte Verunreinigungen durch einen Gradienten von 0 bis 250 mM Imidazol in 3 Säulenvolumina bei 50 mM Tris/Cl, 500 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, pH =

7.6 abgetrennt. Anders als die native HCV-Polymerase vom Genotyp 1b (Subtyp BK) befand sich die native HCV-Polymerase vom Genotyp 2a (Subtyp JFH-1) bei diesem Schritt im Durchfluss und wurde durch eine Fällung mit 0.5 g/mL Ammoniumsulfat (siehe oben) konzentriert. Das zur Homogenität gereinigte Zielprotein wurde gegen 2 x 1 L Reaktionspuffer (50 mM HEPES/NaOH, 20% (v/v) Glycerin, 6.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM TCEP, pH = 7.45) bei 6 °C dialysiert. Der lösliche Überstand wurde zur weiteren Verwendung mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Proteinkonzentration der HCV-Polymerase wurde spektrometrisch durch die Absorption bei 280 nm mit den Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{280 \text{ nm}}$  (Genotyp 1b, Subtyp BK) = 83770 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> und  $\epsilon_{280 \text{ nm}}$  (Genotyp 2a, Subtyp JFH-1) = 85260 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> bestimmt.

### **Cyclophilin B (human)**

*Escherichia coli* Bakterien M15 hatten humanes Cyclophilin B beginnend mit Methionin aber ohne die N-terminale Kernlokalisierungs-Sequenz rekombinant produziert (Aminosäuresequenz siehe Anhang; Plasmid siehe Seite 22). In 50 mM Tris/Cl, 0.5 M NaCl, pH = 8 schockgefrorene und bei -40 °C gelagerte Zellen wurden aufgetaut, mit 2 mM PMSF und 0.1 mg/mL Lysozym inkubiert und mittels *french press* (2 x 600 bar) aufgeschlossen. Der Überstand der anschließenden Ultrazentrifugation (Rotor 45 Ti, 35000 rpm, 45', 4°C) wurde mit 0.7% (w/v) Streptomycinsulfat für 45' bei 6 °C inkubiert, erneut zentrifugiert (Rotor 45 Ti, 35000 rpm, 45', 4°C) und der lösliche Überstand in 50 mM Tris/Cl, 0.5 M NaCl, 10% (v/v) Glycerin, 15 mM Imidazol, pH = 7.6 über eine Ni-NTA-Sepharose-Affinitätschromatographiesäule (GE Healthcare, 25 mL FF) gegeben. Der Durchfluss, in dem sich das Zielprotein befand, wurde auf 50 mM Tris/Cl, 50 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, pH = 7.6 verdünnt und damit eine Kationenaustauschchromatographiesäule (GE Healthcare, SP-Sepharose, 20 mL) beladen. Durch einen linearen NaCl-Gradienten wurde das Zielprotein bei etwa 0.2 M NaCl eluiert und über einen Anionenaustauscher (GE Healthcare, Resource Q, 5 mL) gegeben. Dieser Durchfluss mit dem Zielprotein wurde bei 50 mM Tris/Cl, 50 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin,

pH = 7.6 einer Größenausschlusschromatographie (GE Healthcare, Superdex 75 µg, 120 mL) unterzogen. Das so zur Homogenität gereinigte Cyclophilin B wurde vereinigt, schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde spektrometrisch durch die Absorption bei 280 nm mit dem Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{280\text{ nm}} = 16960\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  bestimmt.

### ***stopped-flow-Kinetiken***

Schnelle Kinetiken wurden durch Mischung gleicher Volumina der Reaktanden mittels einer *stopped-flow*-Apparatur mit Fluoreszenz-Detektor (Applied Photophysics, SX.20 MV) bei 22.5 °C in 50 mM HEPES/NaOH, 20% (v/v) Glycerin, 6.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM TCEP, pH = 7.5 aufgenommen. Bei einer Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{exc}} = 491\text{ nm}$  und einer Spaltbreite von 2.2 nm wurde die Lichtemission bei  $\lambda_{\text{em}} \geq 515\text{ nm}$  zeitaufgelöst gemessen.

### **Assoziation von HCV-Polymerase und RNA**

Die Assoziation von HCV-Polymerase vom Genotyp 1b (Subtyp BK) und 5'-Fluorophor-markierter einzelsträngiger RNA (siehe Materialien, Seite 18) wurde mit einer Endkonzentration von 0.04 µM Protein und 0.05 – 1.53 µM RNA gemessen. Die zeitaufgelöste Änderung der Fluoreszenz (relativ zur Ausgangsfluoreszenz) wurde einer vierfach-exponentiellen, konsekutiven Reaktion 1. Ordnung entsprechend Gleichung 1 angepasst.

Gleichung 1:

$$\Delta F = -v \cdot \exp(-k'_v \cdot t) - x \cdot \exp(-k'_x \cdot t) - y \cdot \exp(-k'_y \cdot t) - z \cdot \exp(-k'_z \cdot t) + n$$

$\Delta F$  Änderung der Fluoreszenzintensität

v, x, y, z Signalamplituden der entsprechenden Phasen

$k'_v, k'_x, k'_y, k'_z$  beobachtete Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung der entsprechenden Phasen

t Reaktionszeit

n Fluoreszenzintensität nach Ende der Reaktion

Die 4 apparenten Geschwindigkeitskonstanten wurden gegen die jeweilige RNA-Konzentration aufgetragen und entsprechend Gleichung 2 ausgewertet.

Gleichung 2:

$$k'_V = k_{\text{on}} \cdot [\text{RNA}] + k_{\text{off}}$$

$k'_V$  beobachtete Geschwindigkeitskonstante (scheinbar) 1. Ordnung

$k_{\text{on}}$  Geschwindigkeitskonstante der Assoziation

$k_{\text{off}}$  Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation

Die Assoziation von HCV-Polymerase vom Genotyp 2a (Subtyp JFH-1) und sowohl einzelsträngiger RNA (siehe Materialien, Seite 21) sowie nativer 5'-Fluorophor-markierter *stem-loop*-RNA wurden mit 0.27  $\mu\text{M}$  Protein und 0.01 – 0.82  $\mu\text{M}$  RNA gemessen. Die zeitaufgelöste Änderung der Fluoreszenz (relativ zur Ausgangsfluoreszenz) wurde einer vierfach-exponentiellen, konsekutiven Reaktion 1. Ordnung entsprechend Gleichung 2 angepasst. Die 4 apparenten Geschwindigkeitskonstanten wurden gegen die jeweilige RNA-Konzentration aufgetragen. Die größte beobachtete Geschwindigkeitskonstante ist entsprechend einer bimolekularen Reaktion nach Gleichung 2 abhängig von der Konzentration der Liganden.

### **Dissoziation von Polymerase-RNA-Komplexen**

Um die Dissoziation von HCV-Polymerase (Genotyp 1b, Subtyp BK) und 5'-Fluorophor-markierter einzelsträngiger RNA (siehe Materialien, Seite 21) zu untersuchen, wurden 0.08  $\mu\text{M}$  Protein und 0.21  $\mu\text{M}$  RNA präinkubiert. Durch schnelle Verdünnung (1:2) dieses binären Komplexes mit 0 – 1.2 mM NTPs wurde die Dissoziationsreaktion nach der neuen Gleichgewichtseinstellung

gemessen. Die zeitaufgelöste Änderung der Fluoreszenz (relativ zur Ausgangsfluoreszenz) wurde einer vierfach-exponentiellen, konsekutiven Reaktion 1. Ordnung entsprechend Gleichung 3 angepasst.

Gleichung 3:

$$\Delta F = v \cdot \exp(-k'_v \cdot t) + x \cdot \exp(-k'_x \cdot t) + y \cdot \exp(-k'_y \cdot t) + z \cdot \exp(-k'_z \cdot t) + n$$

$\Delta F$	Änderung der Fluoreszenzintensität
$v, x, y, z$	Signalamplituden der entsprechenden Phasen
$k'_v, k'_x, k'_y, k'_z$	apparente Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung der entsprechenden Phasen
$t$	Reaktionszeit
$n$	Fluoreszenzintensität zu Beginn der Reaktion

Die 4 apparenten Geschwindigkeitskonstanten sowie die entsprechenden Amplituden und die Gesamtamplitude der Reaktion wurden gegen die jeweilige Nukleotidkonzentration aufgetragen. Eine Auswertung nach einer hyperbolen Gleichung lieferte den  $K_M$  der Nukleotide.

Um den Einfluss des Inhibitors HCV-796 auf die Dissoziation eines Polymerase-RNA-Komplexes zu untersuchen, wurden 0.08  $\mu\text{M}$  HCV-Polymerase (Genotyp 1b, Subtyp BK), 0.21  $\mu\text{M}$  Fluoreszenz-markierte einzelsträngige RNA (siehe Materialien, Seite 21) und 0 – 110  $\mu\text{M}$  HCV-796 in 50 mM HEPES/NaOH, 20% (v/v) Glycerin, 6.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM TCEP, 1.1% (v/v) DMSO, pH = 7.5 präinkubiert. Durch schnelle Verdünnung (1:2) mit 6 mM NTPs wurde die Dissoziationsreaktion gestartet, die Änderung der Fluoreszenz verfolgt und eine Regression nach Gleichung 3 durchgeführt. Die 4 apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation des Komplexes wurden gegen die jeweilige Konzentration an HCV-796 aufgetragen. Eine Auswertung nach einer hyperbolen Gleichung liefert  $K_i$ .

## Fluoreszenzspektroskopie

### Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten von Proteinen und Nukleinsäuren

Alle Gleichgewichtsmessungen von Fluoreszenz-markierten Nukleinsäuren und Proteinen wurden mit dem Fluoreszenz-Spektrometer Fluori-Max 4 (Jobin Yvon) und Quarzküvetten (Hellma, 4 x 10 mm) durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei  $\lambda_{\text{exc}} = 491$  nm mit einer Spaltbreite von 0.2 nm. Die Änderung der Fluoreszenz wurde bei  $\lambda_{\text{em}} = 515$  nm, 5 nm Spaltbreite und einer Integrationszeit von 0.1 s bis zur Gleichgewichtseinstellung verfolgt. Sofern nicht anders angegeben, erfolgten die Messungen in 50 mM HEPES/NaOH, 20% (v/v) Glycerin, 6.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM TCEP, pH = 7.5 bei T = 22.5 °C und 0.06  $\mu$ M 5'-FAM-markierter Nukleinsäure. Die Gleichgewichtskonstanten wurden nach Gleichung 4 und 5 bestimmt.

Gleichung 4:

$$\Delta F = 1 - \frac{(m+n+K_D) - \sqrt{(m+n+K_D)^2 - 4 \cdot m \cdot n}}{2 \cdot m}$$

$\Delta F$	Änderung der Fluoreszenzintensität
m	Konzentration der Fluoreszenz-markierten Nukleinsäure
n	Proteinkonzentration
$K_D$	Dissoziationskonstante

Gleichung 5:

$$K_D = K_A^{-1}$$

$K_A$	Gleichgewichtskonstante
-------	-------------------------

Die Abhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten von der Ionenstärke nach dem Modell einer linearen freien Enthalpiebeziehung (LFER) wurde entsprechend Gleichung 6 ausgewertet.

Gleichung 6:

$$\Delta G = -RT \cdot \ln K_A$$

$$\Delta G = \Delta G^0 - m \cdot [\text{NaCl}]$$

$$\ln K_A = \frac{m}{RT} \cdot [\text{NaCl}] - \frac{\Delta G^0}{RT}$$

$\Delta G$	Differenz der freien Gibbs'schen Energie
$\Delta G^0$	Differenz der freien Gibbs'schen Energie bei 0 mM NaCl im Messpuffer
$R$	Universelle Gaskonstante
$T$	Temperatur (K)
$m$	Korrelationskoeffizient
$K_A$	Gleichgewichtskonstante

Die Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten wurde entsprechend Gleichung 7 ausgewertet. Nach VAN'T HOFF können daraus die einzelnen thermodynamischen Beiträge zur Bindung ermittelt werden.

Gleichung 7:

$$\Delta G^0 = -RT \cdot \ln K_A$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

$$\ln K_A = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R}$$

$\Delta G^0$	Differenz der freien Gibbs'schen Energie
$\Delta H^0$	Differenz der Enthalpie
$\Delta S^0$	Differenz der Entropie
$K_A$	Gleichgewichtskonstante

## Circulardichroismus zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten von Proteinen und NTPs

CD-Spektren von 17.5  $\mu\text{M}$  HCV-Polymerase Genotyp 1b (Subtyp BK) oder 20  $\mu\text{M}$  HCV-Polymerase Genotyp 2a (Subtyp JFH-1) und Nukleotiden beziehungsweise Inhibitor HCV-796 wurden an einem Jasco J-810 Spektropolarimeter in 50 mM HEPES/NaOH, 20% (v/v) Glycerin, 6.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM TCEP, pH = 7.5 bei  $T = 22.5\text{ }^\circ\text{C}$  und folgenden Geräteeinstellungen durchgeführt: 0.5 nm *data pitch*, 1 s *response*, 20 nm/min *scanning speed*, 1 nm *slit widths*, *standard sensitivity*. 20 Spektren wurden jeweils akkumuliert und geglättet (*adaptive smoothing; convolution width and deviation noise = 5*). Die Signaländerung bei 241 nm wurde gegen die jeweilige Ligandenkonzentration aufgetragen und nach einer sigmoiden Funktion (Gleichung 8) ausgewertet.

Gleichung 8:

$$\Delta\text{CD} = \frac{\text{CD}_{\text{max}} \times \text{NTP}^n}{K_s^n + \text{NTP}^n}$$

$\Delta\text{CD}$	Änderung der Elliptizität
$\text{CD}_{\text{max}}$	Maximale Amplitude der Änderung der Elliptizität
NTP	Konzentration der Nukleotide
$K_s$	mikroskopische Dissoziationskonstante
$n$	HILL-Koeffizient

## NMR-Spektroskopie

In Doppelstrangbereichen von Nukleinsäuren wechselwirken komplementäre Nukleotide über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander. Durch diese Interaktion sind die beteiligten Protonen (der Lactamform der Nukleobasen) immobilisiert und tauschen nicht mehr mit dem Lösungsmittel aus. Pro kanonischer Basenpaarung ist

dies je das Amidproton am N1 von Guanin sowie das Amidproton am N3 von Uracil beziehungsweise Thymin. Im  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum können diese Protonen bei einer distinkten chemischen Verschiebung detektiert werden und werden im Folgenden entsprechend der Fachliteratur als Imino-Protonen bezeichnet [129, 130].

### Thermische Entfaltung partiell doppelsträngiger RNA (*stem-loop*-RNA)

Mit einem Bruker Avance III 600 Spektrometer wurden 1D  $^1\text{H}$  NMR-Spektren von 0.1 mM *stem-loop*-RNA (siehe Materialien, Seite 21) in 50 mM HEPES/NaOH, 200 mM NaCl, 6.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM TCEP, 5% (v/v) Glycerin (deutert), pH = 7.5 und 10% (v/v)  $\text{D}_2\text{O}$  temperaturabhängig aufgenommen. Wassersignale wurden durch *double pulse field gradient spin echo approach* unterdrückt und die Spektren mittels TopSpin 2.1 prozessiert. Das Integral der Signale der Imino-Protonen (12.2 – 13.5 ppm) wurde gegen die Temperatur aufgetragen und nach einem reversiblen Zwei-Zustandsmodell (Gleichung 9) ausgewertet.

Gleichung 9:

$$\Delta G_T^0 = \Delta H_{T_m}^0 \cdot \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) - \Delta C_p \cdot \left[T_m - T + T \cdot \ln\left(\frac{T}{T_m}\right)\right]$$

$$\Delta G_{T_m}^0 = \Delta H_{T_m}^0 - T \Delta S_{T_m}^0 = 0$$

$$\Delta S_{T_m}^0 = \frac{\Delta H_{T_m}^0}{T_m}$$

$$X = \frac{n_N + n_U \cdot \exp(z)}{1 + \exp(z)}$$

$$z = \frac{\Delta H_{T_m}^0 \cdot \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) - \Delta C_p \cdot \left[T_m - T + T \cdot \ln\left(\frac{T}{T_m}\right)\right]}{RT}$$

$\Delta G_T^0$       Differenz der Gibbs'schen freien Energie bei der entsprechenden Temperatur T (K)

$\Delta H_{T_m}^0$	Differenz der Gibbs'schen freien Energie bei der Übergangstemperatur $T_m$ (K)
$\Delta S_{T_m}^0$	Differenz der Entropie bei der Übergangstemperatur $T_m$ (K)
$\Delta C_p$	Änderung der Wärmekapazität während der Faltung / Entfaltung
$T_m$	Temperatur am Übergangsmittelpunkt
$X$	Änderung der Amplitude des Imino-Protonen 1D- $^1\text{H}$ NMR-Signals
$n_N$	Amplitude des Imino-Protonen 1D- $^1\text{H}$ NMR-Signals nativer RNA
$n_U$	Amplitude des Imino-Protonen 1D- $^1\text{H}$ NMR-Signals entfalteter RNA

### Wechselwirkung von Cyclophilin B und *stem-loop*-RNA

Mit einem Spektrometer Bruker Avance III 600 wurden 1D  $^1\text{H}$  NMR-Spektren von 54  $\mu\text{M}$  *stem-loop*-RNA (siehe Materialien, Seite 21) in Abhängigkeit von der Konzentration an Cyclophilin B bei 295.6 K aufgenommen. Wassersignale wurden durch *double pulse field gradient spin echo approach* unterdrückt und die akkumulierten Spektren von jeweils 2560 Einzelspektren mittels TopSpin 2.1 prozessiert (*line broadening* = 5 Hz). Ausgehend von 54  $\mu\text{M}$  *stem-loop*-RNA und 270  $\mu\text{M}$  Cyclophilin B in 50 mM HEPES/NaOH, 6.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM TCEP, 10% (v/v)  $\text{D}_2\text{O}$ , pH = 7.5 wurde die Proteinkonzentration schrittweise durch Verdünnung des Ansatzes mit 54  $\mu\text{M}$  *stem-loop*-RNA in Messpuffer erniedrigt. Das Integral der Basislinien-korrigierten Imino-Protonen der *stem-loop*-RNA (13.50 – 12.46 ppm) wurde gegen das molare Verhältnis der Reaktionspartner aufgetragen.

### Wechselwirkung von HCV-Polymerase und *stem-loop*-RNA ohne und mit Nukleotiden

Die Interaktion von HCV-Polymerase (Genotyp 2a, Subtyp JFH-1) und der nativen *stem-loop*-RNA sowie die RNA-abhängige RNA-Polymerisationsreaktion nach Zugabe von Nukleotiden zum Protein-RNA-Komplex (Binärkomplex) wurde mit dem NMR-Spektrometer Bruker Avance III 800 und einem Kryoprobekopf untersucht. 1D  $^1\text{H}$  NMR-Spektren von jeweils

30  $\mu\text{M}$  HCV-Polymerase und / oder 30  $\mu\text{M}$  *stem-loop*-RNA wurden in 50 mM HEPES/NaOH, 200 mM NaCl, 6.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM TCEP, 5% (v/v) Glycerin (deuteriert), pH = 7.5 und 10% (v/v)  $\text{D}_2\text{O}$  bei 295.6 K gemessen. Zur Untersuchung der RNA-abhängigen RNA-Polymerisationsreaktion mit Bildung des doppelsträngigen RNA-Produkts wurden zum Binärkomplex 0.5 mM Nukleotide zugegeben. Wassersignale wurden durch *double pulse field gradient spin echo approach* unterdrückt und die Spektren mittels TopSpin 2.1 prozessiert (*line broadening* = 5 Hz). Die Integrale der Signale von Imino-Protonen basengepaarter Nukleotide wurden zeitabhängig dargestellt. Spektren mit einer Zeitauflösung von 21 h wurden durch den Faktor  $(21/8)^{-1}$  den über 8 h akkumulierten Spektren angepasst. Die angegebene Reaktionszeit bezieht sich auf die gemittelte Akkumulationszeit des jeweiligen Spektrums ab Beginn der Reaktion.

### **Assay der Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerase**

Die Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Aktivität von Cyclophilin B in Abhängigkeit von der Konzentration an *stem-loop*-RNA wurde mit einem Spektrometer Jasco V650 mit Peltier-Element Jasco ETC-505T bei 10 °C gemessen. Die Absorptionzunahme bei 390 nm (2 nm *slit width*, 0.5 s *data pitch*, *response fast*) wurde zeitaufgelöst in Reaktionspuffer (50 mM HEPES/NaOH, 6.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM TCEP, 0.2% (v/v) DMSO, pH = 7.4) und 72  $\mu\text{M}$  (45  $\mu\text{g/mL}$ ) Substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA) nach Zugabe von 1.7 mg/mL  $\alpha$ -Chymotrypsin mit einer Zeitverzögerung von 10 s in diesem Protease-gekoppeltem Assay detektiert (nach Fischer *et al.* [131]). Die Geschwindigkeitskonstante dieser Reaktion 1. Ordnung wurde von der Geschwindigkeitskonstanten der durch 1.3 nM Cyclophilin B katalysierten Reaktion abgezogen und nach Gleichung 13 die katalytische Effizienz des Enzyms (Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Aktivität) berechnet. Die katalytische Effizienz der PPIase wurde bei 0 – 25  $\mu\text{M}$  *stem-loop*-RNA bestimmt und gegen die jeweilige Konzentration an RNA aufgetragen.

## Radioaktiver Polymerase assay

In je 40  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer (50 mM HEPES/NaOH, 20% (v/v) Glycerin, 6.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM TCEP, pH = 7.5) wurden 0.04  $\mu\text{M}$  HCV-Polymerase, 0.2  $\mu\text{M}$  einzelsträngige RNA (16 nt, siehe Seite 21), 3 mM ATP, GTP und UTP, 0.1  $\mu\text{M}$  [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]CTP (3000 Ci  $\text{mmol}^{-1}$ , Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Deutschland) sowie die angegebene Konzentration an Inhibitor HCV-796 (0  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  oder 10  $\mu\text{M}$ ; siehe Seite 22) für 2 Stunden bei  $T = 22^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach Phenol/Chloroform-Extraktion (Standardprotokoll nach SAMBROOK & RUSSELL, 2001; (wassergesättigtes) Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol = 25:24:1) wurden Nukleinsäuren bei 0.3 M Ammoniumacetat durch 67% (v/v) Ethanol präzipitiert und in RNA-Probenpuffer (50% Formamid, 5 mM EDTA, pH = 8, Farbstoffe Xylencyanol und Bromphenolblau) resuspendiert. Durch denaturierende Polyacrylgelelektrophorese (6.5 M Harnstoff, 12% Polyacrylamid, 89 mM Tris, 89 mM Borat, 2 mM EDTA) wurden die Nukleinsäuren bei 25 mA entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und mittels Phosphor-*imaging* detektiert.

## Analytische Ultrazentrifugation

### Oligomerisierung der Binärkomplexe von HCV-Polymerase und RNA

Mittels analytischer Ultrazentrifugation (Beckmann Coulter Optima XL-A) wurde das Oligomerisierungsverhalten von HCV-Polymerase mit sowohl einzelsträngiger Nukleinsäure als auch *stem-loop*-RNA (siehe Materialien, Seite 18) untersucht. Nach Präinkubation von 4  $\mu\text{M}$  HCV-Polymerase und jeweils 5  $\mu\text{M}$  der Nukleinsäure in 50 mM HEPES/NaOH, 20% (v/v) Glycerin, 6.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM TCEP, pH = 7.5 und 0 – 0.2 M NaCl wurde die Mischung bei  $T = 293\text{ K}$  und 40000 rpm für 4 h zentrifugiert. Auch die anschließende Gleichgewichtszentrifugation bei 12000 rpm wurde anhand der Absorption bei 280 nm verfolgt. Die Auswertung erfolgte mit der entsprechenden *software* und lieferte apparente Molekulargewichte sowie

Aussagen über eine RNA-induzierte Oligomerisierung der HCV-Polymerase in Abhängigkeit von der Ionenstärke (NaCl).

### **Sedimentationsanalysen von Cyclophilin B-RNA-Komplexen**

Die Sedimentation von Cyclophilin B und der *stem-loop*-RNA wurde mit einer analytischen Ultrazentrifuge (Beckmann Coulter, Optima XL-A) in 50 mM HEPES/NaOH, 6.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM TCEP, pH = 7.5 bei T = 293 K untersucht. Nach Präinkubation von 20 μM *stem-loop*-RNA mit 0 – 84 μM Cyclophilin B wurde der Ansatz bei 40000 rpm zentrifugiert. Die Absorption in der Lösung wurde bei der analytischen Wellenlänge von 294 nm verfolgt. Mit der entsprechenden *software* wurde der apparente Sedimentationskoeffizient ermittelt und gegen das jeweilige molare Protein-RNA-Verhältnis aufgetragen.

# Ergebnisse

## I. Mechanistische Studien zur Wirkungsweise und Inhibierung der RNA-abhängigen RNA-Polymerase des Hepatitis C Virus.

### I. I. Quantifizierung der Bindung von RNA und HCV-Polymerase (Binärkomplex).

RNA-abhängige RNA-Polymerasen katalysieren die Synthese eines RNA-Moleküls komplementär zu einer einzelsträngigen RNA-Matrize. An die wachsende RNA-Kette wird in einer nukleophilen Substitutionsreaktion ein Nukleotid unter Freisetzung von Pyrophosphat geknüpft. Um eine solche Reaktion zu katalysieren, müssen Polymerasen zwei Substrate binden – Nukleotide und die RNA-Matrize, zu der ein komplementärer Strang synthetisiert werden soll.

Unter Ausnutzung des *quenching* einer Fluoreszenz-markierten RNA durch Interaktion mit der Polymerase kann die Bindung von Polymerase und RNA quantifiziert werden. Als einfache RNA-Matrize wurde als Modell eine kurze, 16 Nukleotide lange einzelsträngige RNA gewählt. Ein Fluorophor (Fluoreszein-aminomethyl-) an dessen 5'-Ende diente als spektroskopische Sonde. Zugabe von steigenden Konzentrationen an Polymerase führte zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität (Abbildung 6). Mittels Gleichung 4 (siehe Seite 28) kann aus den Bindungskurven die Dissoziationskonstante (beziehungsweise die Gleichgewichtskonstante) ermittelt werden. Eine Erhöhung der Ionenstärke durch Zugabe von NaCl führte zu einer verringerten Affinität von Polymerase und RNA. Offensichtlich tragen ionische Wechselwirkungen zur Komplexbildung bei. Trägt man die bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen ermittelten  $K_D$ -Werte gegen die entsprechende NaCl-Konzentration auf, zeigt sich eine Abhängigkeit nach Gleichung 6 (siehe Seite 29) mit  $K_D^0 = 0.03 \mu\text{M}$  und entsprechend  $\Delta G^0 = -42.7 \text{ kJ mol}^{-1}$  und  $m = -76 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ .

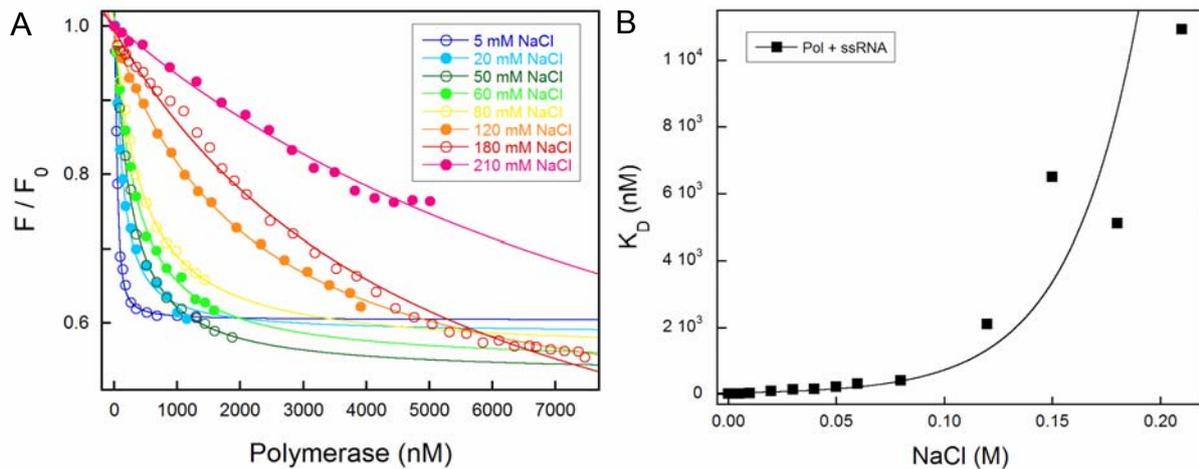


Abbildung 6: Quantifizierung der Bindung von HCV-Polymerase (Genotyp 1b, Subtyp BK) und ssRNA in Abhängigkeit der Konzentration an NaCl.

A) Dargestellt ist die Fluoreszenzänderung relativ zur Ausgangsfluoreszenz von  $0.06 \mu\text{M}$  FAM-markierter einzelsträngiger RNA durch Bindung der HCV-Polymerase (Genotyp 1b, Subtyp BK) bei unterschiedlicher Ionenstärke. Die jeweiligen NaCl-Konzentrationen sind in der Legende gekennzeichnet. Eine Regression der Datenpunkte nach Gleichung 4 (Seite 28) lieferte jeweils die Dissoziationskonstante  $K_D'$ . Diese  $K_D'$ -Werte sind in B) gegen die entsprechende Konzentration an NaCl aufgetragen. Durch eine Auswertung nach dem Modell einer linearen freien Enthalpiebeziehung (Gleichung 6, Seite 29) erhält man  $K_D^0 = 0.03 \mu\text{M}$  mit einer Perturbation der Protein-RNA-Komplexbildung durch NaCl von  $m = -76 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ .

## I. II. Quantifizierung der Bindung von Nukleotiden sowie des Inhibitors HCV-796 und der HCV-Polymerase.

Entsprechend der RNA-Matrize werden die komplementären Nukleotide als Substrate einer Polymerisationsreaktion benötigt und müssen von der Polymerase gebunden werden.

Interessanterweise besitzt die RNA-abhängige RNA-Polymerase ein Signal im Circular dichroismus, welches sensitiv für die Bindung von Nukleotiden ist (Abbildung 7). Das lokale Minimum von bisher unbekannter Ursache im CD-Spektrum der Polymerase bei etwa  $241 \text{ nm}$  verringerte sich durch Zugabe und Bindung der Nukleotide ATP, CTP, GTP, UTP sowie einem allosterischen Inhibitor HCV-796 (siehe Abbildung 4, Seite 16 und Materialien und Methoden Seite 22). HCV-796 ist eine niedermolekulare Verbindung, die durch Bindung an der Handflächen-Domäne nahe dem aktiven Zentrum die HCV-Polymerase NS5B und somit auch die

Replikation des Hepatitis C Virus inhibiert. Die Abnahme der Signalintensität bei 241 nm durch Erhöhung der Ligandenkonzentration konnte zur Quantifizierung der Bindung verwendet werden. Eine sigmoide Regression lieferte  $S_{0.5}$ -Werte und Hill-Koeffizienten für die Bindung von Polymerase und den vier Nukleotiden sowie dem Inhibitor HCV-796 (Tabelle 1). Hill-Koeffizienten von etwa 1.7 verweisen auf die Bindung von jeweils zwei Liganden mit positiver Kooperativität an das Protein. Ein Ligand bindet vermutlich in der Nukleotidbindungstasche, ein weiterer, wegen der hohen chemischen Ähnlichkeit von RNA und Nukleotid, an die RNA-Bindungsstelle. Im Fall der Bindung des allosterischen Inhibitors HCV-796 wurde, wie auch bei der Bindung der Nukleotide, eine Änderung im Circular dichroismus der HCV-Polymerase bei der entsprechenden Wellenlänge detektiert, zudem aber auch eine bathochrome Verschiebung des lokalen Minimums beobachtet. Dies weist auf eine ähnliche, jedoch nicht identische Bindung von Nukleotiden und HCV-796 hin.

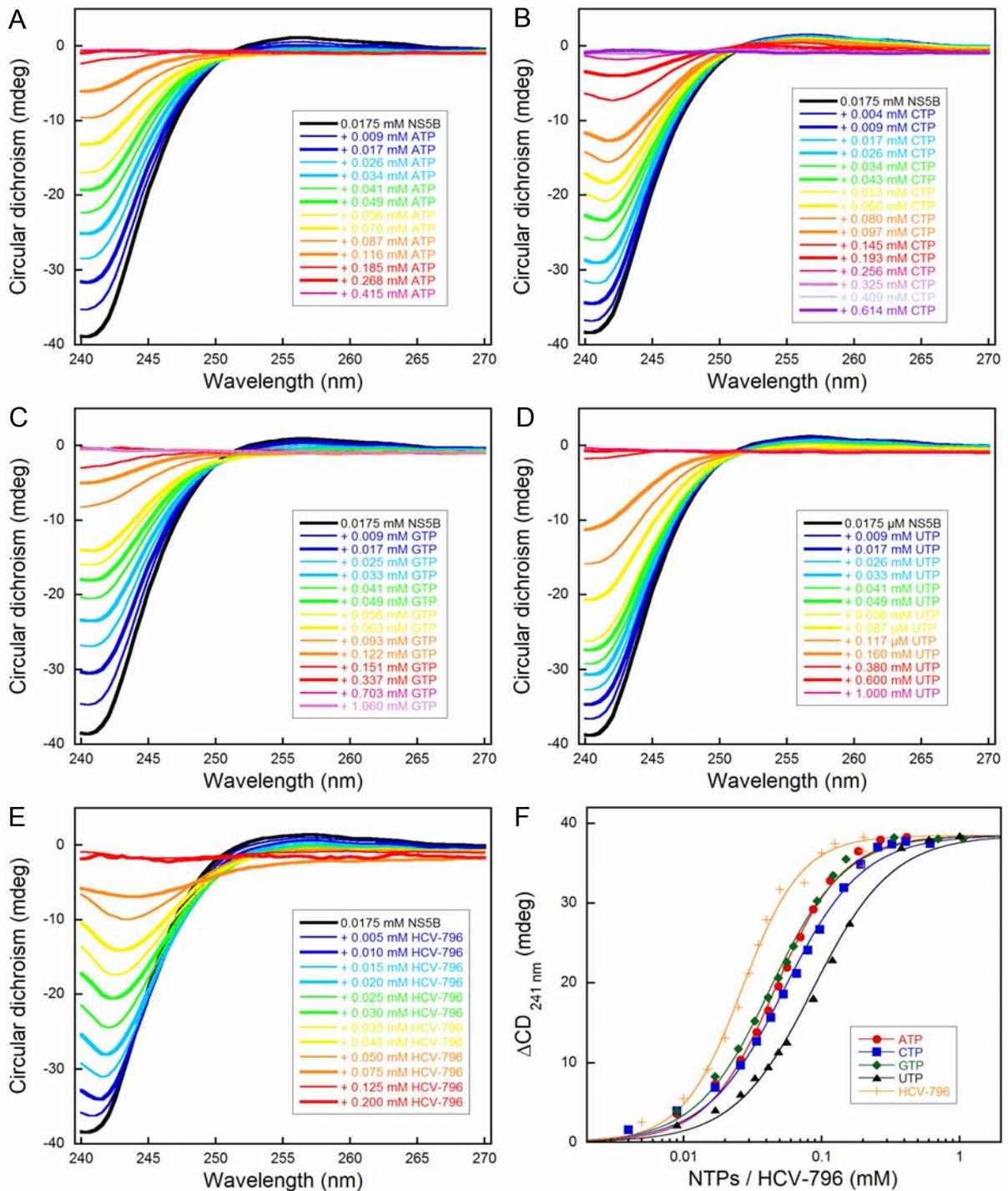


Abbildung 7: Charakterisierung der Interaktion von HCV-Polymerase (Genotyp 1b, Subtyp BK) mit Nukleotiden und Inhibitor HCV-796 mittels Circulardichroismus.

CD-Spektren von 17.5 μM HCV-Polymerase mit steigenden Konzentrationen an A) ATP, B) CTP, C) GTP, D) UTP und E) HCV-796. Die jeweiligen Konzentrationen des Liganden sind in den Legenden gekennzeichnet. F) Eine sigmoide Regression der Signaländerung bei 241 nm gegen die entsprechende Ligandenkonzentration ermöglicht die Quantifizierung der Interaktion.

	$K_D^*$ (mM)	$K_S$ (mM <sup>n</sup> )	Kooperativität n
ATP	0.05	0.005	1.8
CTP	0.05	0.011	1.5
GTP	0.04	0.006	1.6
UTP	0.09	0.025	1.5
HCV-796	0.03	0.0007	2.0

Tabelle 1: Dissoziationskonstanten von HCV-Polymerase (Genotyp 1b, Subtyp BK) und ATP, CTP, GTP und UTP sowie dem allosterischen Inhibitor HCV-796.

\* Der  $K_D$ -Wert entspricht der Ligandkonzentration, bei der halbmaximale Effekte beobachtbar sind ( $S_{0.5}$ ).

### I. III. Kinetische Studien zur Assoziation und Dissoziation von RNA und HCV-Polymerase.

Die Interaktion von Polymerase und RNA kann nicht nur im Gleichgewicht, sondern auch kinetisch gemessen werden. Unter Ausnutzung des *quenching* der Fluorophormarkierten einzelsträngigen RNA bei Bindung an die Polymerase kann sowohl die Assoziation als auch die Dissoziation verfolgt werden. Dazu wurden mittels der *stopped-flow*-Technik schnelle Kinetiken aufgenommen.

Die Assoziationsreaktion von HCV-Polymerase (Genotyp 1b, Subtyp BK) und einzelsträngiger RNA erfolgte über mehrere Intermediate; mindestens 4 Phasen konnten detektiert werden (Abbildung 8). Dementsprechend wurden die Kinetiken der Bildung dieses Binärkomplexes nach einer vierfach-exponentiellen Reaktion 1. Ordnung ausgewertet (Gleichung 1, siehe Seite 25). Daraus resultierten vier beobachtbare Geschwindigkeitskonstanten, welche bei konstanter Proteinkonzentration von 0.04  $\mu$ M und steigenden RNA-Konzentrationen gemessen und gegen die jeweilige RNA-Konzentration aufgetragen wurden. Dabei zeigte keine der apparenten Geschwindigkeitskonstanten eine lineare Abhängigkeit von der eingesetzten RNA-Konzentration, wie es für eine bimolekulare Reaktion zu erwarten wäre. Da die apparenten Geschwindigkeitskonstanten unabhängig von der RNA-Konzentration waren, entsprechen sie intramolekularen Reaktionen pseudo 1. Ordnung mit  $k_{A1}' = 20 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{A2}' = 0.6 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{A3}' = 0.05 \text{ s}^{-1}$  und  $k_{A4}' \sim 0.003 \text{ s}^{-1}$ . Dies können etwa Positionierungsreaktionen oder Konformationsänderungen sein. Zwar konnte

die bimolekulare Reaktion 2. Ordnung nicht detektiert werden, sie kann aber mit  $k_{\text{off}} \geq k_{A1}' = 20 \text{ s}^{-1}$  und  $K_D = 0.03 \text{ } \mu\text{M}$  abgeschätzt werden. Nach  $K_D = k_{\text{off}} / k_{\text{on}}$  ergibt sich  $k_{\text{on}}^{\text{calc}} \geq 600 \text{ s}^{-1} \text{ } \mu\text{M}^{-1}$ . Dieser Wert ist am Diffusionslimit und kann auch mit *stopped-flow*-Kinetiken nicht mehr aufgelöst werden.

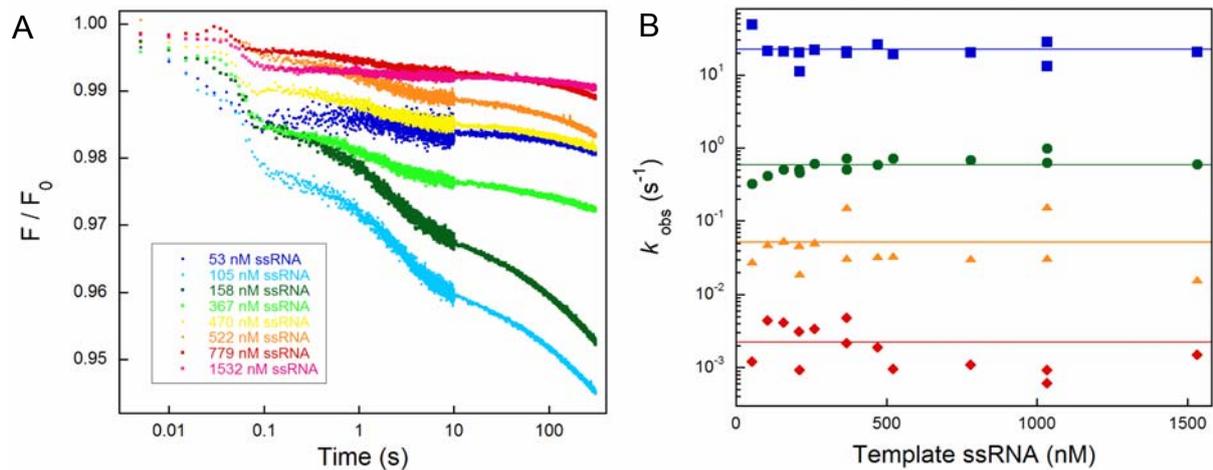


Abbildung 8: Die zeitaufgelöste Assoziation von HCV-Polymerase (Genotyp 1b, Subtyp BK) und ssRNA.

A) Die Änderung der Fluoreszenz (relativ zur Startfluoreszenz) der markierten einzelsträngigen RNA durch Komplexbildung mit der HCV-Polymerase wurde zeitaufgelöst detektiert. Bei einer konstanten Konzentration von  $0.04 \text{ } \mu\text{M}$  HCV-Polymerase wurde die RNA-Konzentration variiert (siehe Legende) und die Kinetiken einer vierfach-exponentiellen Reaktion 1. Ordnung (Gleichung 1, siehe Seite 25) angepasst. B) Die vier apparenten Geschwindigkeitskonstanten waren unabhängig von der RNA-Konzentration und entsprechen somit intramolekularen Reaktionen 1. Ordnung.

Neben der Polymerase-RNA-Assoziation kann auch die Dissoziation untersucht werden – sofern ein Gleichgewicht vorliegt. Dazu wurden  $0.08 \text{ } \mu\text{M}$  Polymerase und  $0.21 \text{ } \mu\text{M}$  einzelsträngige RNA präinkubiert. Dies entspricht bei einem  $K_D$ -Wert (Polymerase und ssRNA) von  $0.03 \text{ } \mu\text{M}$  etwa  $0.07 \text{ } \mu\text{M}$  Polymerase-RNA-Komplex. Dieser Komplex wurde durch Verdünnung (1 + 1) zur Dissoziation gebracht. Nach erneuter Gleichgewichtseinstellung sollten nun noch  $0.03 \text{ } \mu\text{M}$  Polymerase-RNA-Komplex vorliegen, etwa 60 % des ursprünglichen Komplexes dissoziieren in freie RNA und Polymerase. Dabei wurde die Änderung des Fluoreszenzsignals der markierten RNA verfolgt (Abbildung 9). Wie bei der Assoziationsreaktion treten auch bei der Dissoziationsreaktion Intermediate auf, mindestens 4 Phasen konnten

detektiert werden. Die Kinetiken wurden daher nach einer vierfach exponentiellen Gleichung ausgewertet. So konnten die vier apparenten Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung der Dissoziation von HCV-Polymerase und einzelsträngiger RNA mit  $k_{D1} = 15 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{D2} = 1 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{D3} = 0.1 \text{ s}^{-1}$  und  $k_{D4} = 0.005 \text{ s}^{-1}$  bestimmt werden.

Nukleotide sind neben der RNA-Matrize für die Katalysereaktion essentielle Substrate einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase. In Abwesenheit von Nukleotiden dissoziieren Polymerase und RNA-Matrize durch Verdünnung entsprechend dem neuen Gleichgewicht wieder. Verdünnt man einen Polymerase-RNA-Komplex mit dem zweiten Substrat, den Nukleosid-Triphosphaten, kann die RNA-abhängige RNA-Polymerisationsreaktion stattfinden. Es findet eine Partitionierung der Dissoziation von Polymerase und einzelsträngiger, Fluorophor-markierter RNA-Matrize und doppelsträngigem, Fluorophor-markiertem RNA-Produkt statt. Misst man die Dissoziation von Polymerase und RNA bei steigenden Nukleotid-Konzentrationen, kann deren Effekt auf die Freisetzung der RNA quantifiziert werden – vorausgesetzt, die Assoziation der Nukleotide ist deutlich schneller als die Dissoziation der RNA. Die aufgenommenen Fluoreszenzänderungen nach Induktion der Dissoziation, entweder durch Verdünnung mit Puffer oder Nukleotiden, wurden nach einer vierfach exponentiellen Reaktion 1. Ordnung angepasst (Abbildung 9; Gleichung 3, siehe Seite 27). Die so erhaltenen vier beobachteten Geschwindigkeitskonstanten sowie die entsprechenden Amplituden wurden gegen die jeweilige Nukleotid-Konzentration aufgetragen. Interessanterweise verringerten Nukleotide die Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation von markierter RNA und HCV-Polymerase. Bei Nukleotiden in Sättigung wurden apparente Geschwindigkeitskonstanten der RNA-Polymerase-Dissoziation mit  $k_{D1+NTP} = 3 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{D2+NTP} = 0.3 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{D3+NTP} = 0.04 \text{ s}^{-1}$  und  $k_{D4+NTP} = 0.009 \text{ s}^{-1}$  detektiert. Verglichen mit der einfachen Dissoziation von RNA in Abwesenheit von Nukleotiden erfolgte in Gegenwart beider Substrate die Enzym-katalysierte Reaktion, was die Freisetzung der Fluorophor-markierten RNA scheinbar verlangsamt. Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der RNA-Dissoziation zeigten eine hyperbole Abhängigkeit von der Nukleotid-Konzentration nach MICHAELIS und MENTEN. Dies war am stärksten bei der schnellsten beobachteten Phase der Dissoziation ausgeprägt, die halbmaximale Effektorkonzentration betrug hier etwa 0.02 mM. Diese Verringerung der apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation von HCV-Polymerase und ssRNA durch Nukleotide nahm bei den kleineren

Geschwindigkeitskonstanten ab. Bei der langsamsten beobachtbaren Geschwindigkeitskonstante war kein Effekt der Nukleotide mehr feststellbar.

Aber nicht nur die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten, auch die Signalamplituden zeigten einheitlich eine hyperbole Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration an Nukleotiden (Abbildung 9 C). Auch hier konnten die Amplituden einzeln oder in ihrer Summe an eine hyperbole Gleichung angepasst werden. Daraus resultierte eine halbmaximale Effektorkonzentration der Nukleotide von  $0.06 \pm 0.02$  mM. Ob die Zunahme der Signalamplitude durch eine Verdrängung der markierten RNA durch NTPs oder durch eine Verringerung der Affinität in Folge von (partiell) doppelsträngiger RNA-Produktbildung erfolgte, ist bisher unklar.

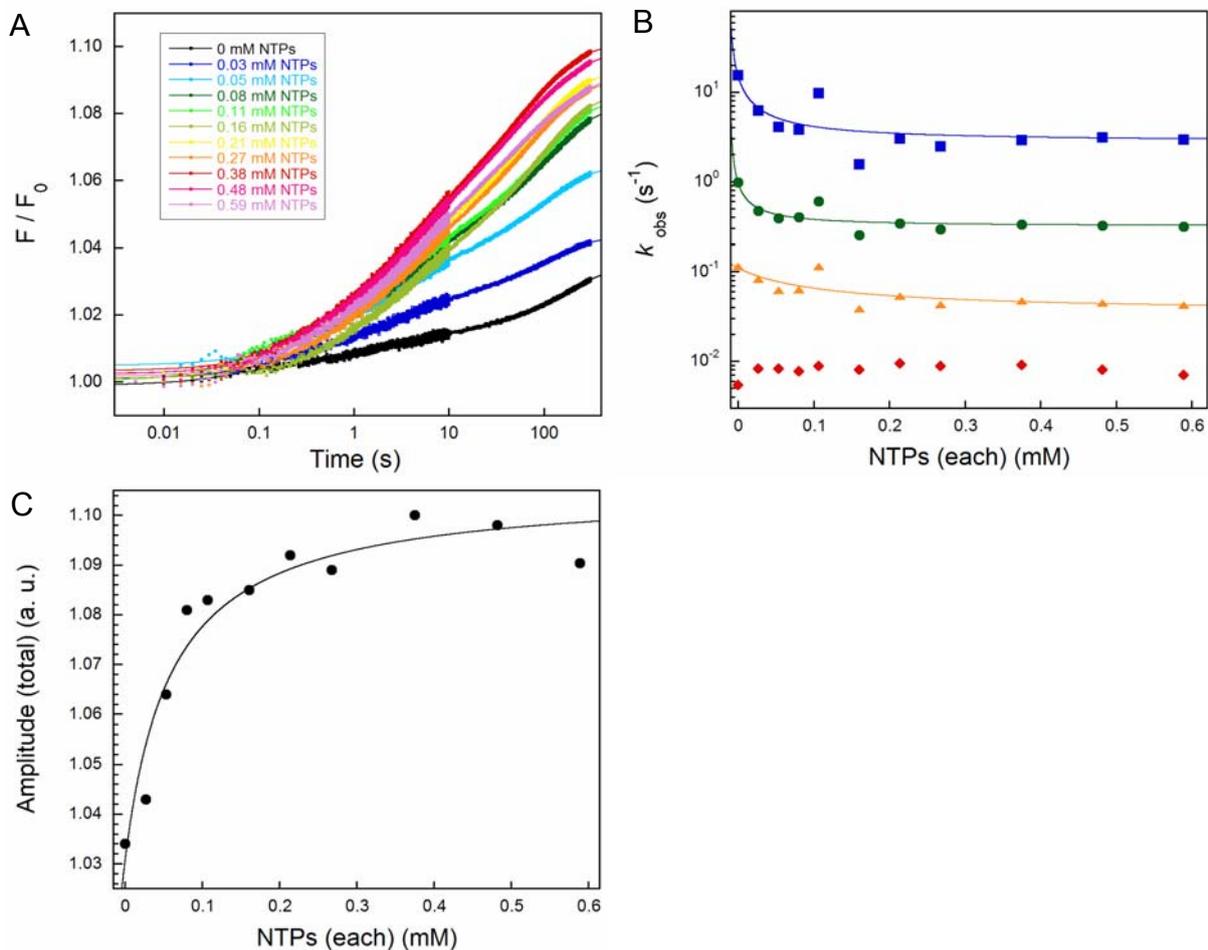


Abbildung 9: Der Einfluss von Nukleotiden auf die Dissoziation von HCV-Polymerase (Genotyp 1b, Subtyp BK) und ssRNA.

A) Die Dissoziation von präinkubierten  $0.08 \mu\text{M}$  HCV-Polymerase und  $0.21 \mu\text{M}$  Fluorophor-markierter ssRNA durch Verdünnung (1 + 1) mit steigenden Konzentrationen an NTPs (siehe Legende) wurde zeitaufgelöst verfolgt. Die Zunahme der Fluoreszenz wurde nach einer vierfach exponentiellen Reaktion 1. Ordnung angepasst. B) Die 4 apparenten Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen

Phasen waren hyperbol von der NTP-Konzentration abhängig. In Gegenwart der Nukleotide, notwendig für die Polymerisationsreaktion mit Produktbildung doppelsträngiger RNA, verlangsamte sich die Freisetzung der markierten RNA. Die halbmaximale Effektorkonzentration der NTPs auf die Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziationsreaktion betrug etwa 0.02 mM. C) Auch die Gesamtamplitude der Dissoziationsreaktion zeigte eine hyperbole Abhängigkeit von der Konzentration an Nukleotiden mit einer halbmaximalen Effektorkonzentration  $K_M$  (NTPs) = 0.06 mM.

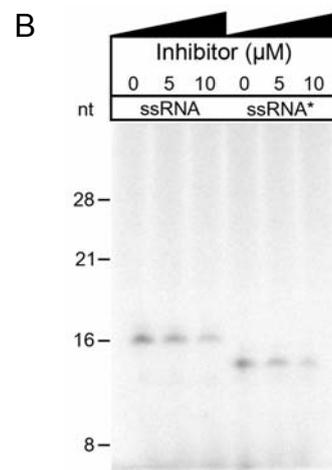
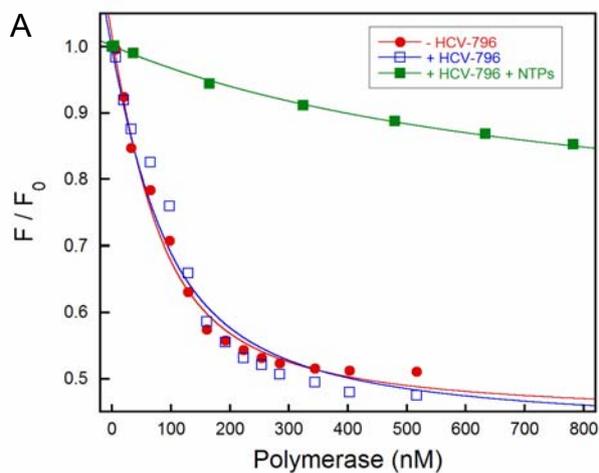
#### **I. IV. Mechanismus der Inhibierung der HCV-Polymerase durch den Inhibitor HCV-796.**

Mit den bisher etablierten Methoden der Charakterisierung der Hepatitis C viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase (Genotyp 1b, Subtyp BK) sollte die Wirkungsweise des allosterischen Inhibitors HCV-796 untersucht werden. Aus Kristallstrukturen war bekannt, dass dieser Inhibitor nahe dem aktiven Zentrum an der „Handfläche“ der Polymerase bindet (Hang *et al.* [114]).

Zuerst wurde der Einfluss des Inhibitors HCV-796 auf die RNA-Bindung der Polymerase mit dem in Kapitel I. I. beschriebenen Verfahren untersucht. Bei einer Konzentration von 0.06  $\mu\text{M}$  einzelsträngiger RNA und steigender Menge an Polymerase beeinflussten selbst 100  $\mu\text{M}$  HCV-796 die Polymerase-RNA-Komplexbildung nicht ( $K_D$  (+/- HCV-796) = 0.05  $\mu\text{M}$ ). In Gegenwart von Nukleotiden in Sättigung (je 3 mM) jedoch führte der Inhibitor HCV-796 zu einer stark verringerten Affinität von Polymerase und RNA ( $K_D$  = 0.7  $\mu\text{M}$ ). Offensichtlich interferierte der Inhibitor HCV-796 also ausschließlich in einer NTP-induzierten Konformation der Polymerase mit der RNA-Bindung (Abbildung 10 A).

Neben der Betrachtung der Wirkungsweise des Inhibitors im Gleichgewicht wurde auch dessen Einfluss kinetisch untersucht. Dazu wurde, wie im Methodenteil beschrieben (siehe Seite 26 und 27), der präformierte Polymerase-RNA-Komplex durch Verdünnung mit Nukleotiden in Sättigung und steigenden Mengen an Inhibitor HCV-796 zur Dissoziation gezwungen. Die durch die Freisetzung der markierten RNA auftretende Änderung der Fluoreszenz wurde zeitaufgelöst verfolgt, nach einem vierfach-exponentiellen konsekutiven Reaktionsmechanismus ausgewertet und die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation gegen die Inhibitor-Konzentration aufgetragen (Abbildung 10 C, 10 D). Anders als bei der Dissoziationsreaktion von Polymerase und RNA in Gegenwart von nur Nukleotiden, die zu einer verlangsamten Freisetzung der RNA führten (Kapitel I. III.), konnte in Gegenwart des Inhibitors HCV-796 und Nukleotiden in Sättigung eine beschleunigte Freisetzung der RNA detektiert werden. Bei Nukleotiden und Inhibitor HCV-796 in Sättigung wurden Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation von RNA und HCV-Polymerase mit  $k_{D1 +NTP+I} = 15 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{D2 +NTP+I} = 1.5 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{D3 +NTP+I} = 0.25 \text{ s}^{-1}$  und  $k_{D4 +NTP+I} = 0.03 \text{ s}^{-1}$  beobachtet. Eine hyperbole Regression dieser apparenten Geschwindigkeitskonstanten lieferte einen  $K_i$ -Wert des Inhibitors HCV-796 von

0.01 mM. Die Inhibierung der Produktbildung durch HCV-796 mit einem  $K_i \sim 0.01$  mM konnte auch in einem radioaktiven Polymerase-assay bestätigt werden (siehe Materialien und Methoden, Seite 35). Hier wird der Einbau radioaktiv markierter Nucleotide durch die Polymerase in säure-unlösliche Produkte detektiert. Diese Nucleinsäuren werden mittels denaturierender Gelelektrophorese ihrer Größe entsprechend aufgetrennt und durch Phosphor-*imaging* sichtbar gemacht. Die Schwärzung ist ein Maß für die Produktbildung und nahm mit steigenden Inhibitor-Konzentrationen ab. Bei 0.01 mM HCV-796 wurde nur noch etwa die Hälfte der Signalintensität des Polymerisations-Produkts beobachtet (Abbildung 10 B). Beide Messverfahren zur Quantifizierung der inhibitorischen Wirkung von HCV-796, der diskontinuierliche, radioaktive Aktivitätstest sowie der diskontinuierliche, spektroskopische zeigten bei einer Konzentration von 0.01 mM HCV-796 einen halbmaximalen Effekt. Auch das neu etablierte Testsystem unter Ausnutzung der Fluoreszenzeigenschaften markierter RNAs eignet sich also, Hemmstoffe der HCV-Polymerase zu charakterisieren und deren Einfluss zu quantifizieren.



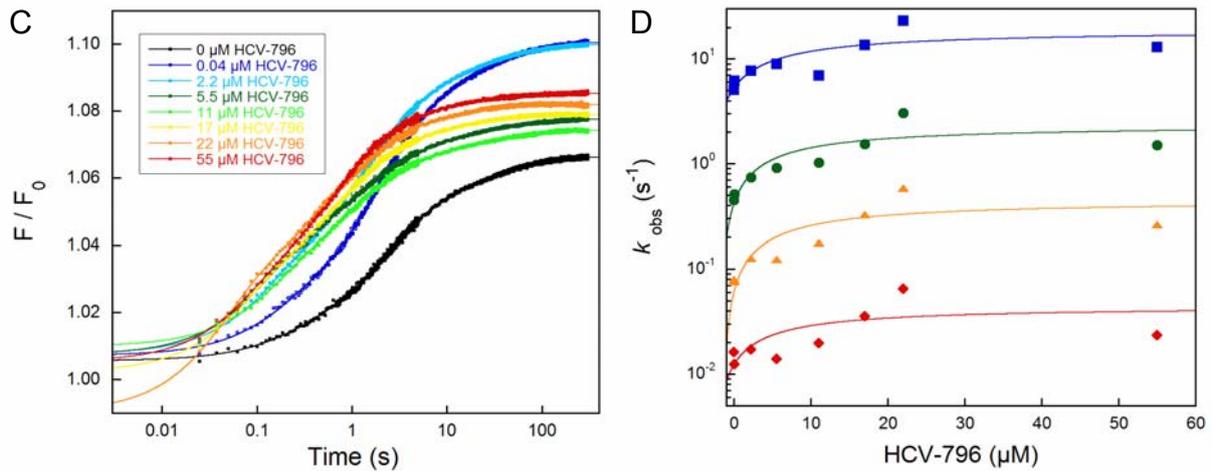


Abbildung 10: Der Wirkungsmechanismus des HCV-Polymerase-Inhibitors HCV-796.

A) Änderung des Fluoreszenzsignals (relativ zur Startfluoreszenz) von 0.06 μM 5'-FAM-markierter einzelsträngiger RNA durch Bindung der HCV-Polymerase (Genotyp 1b, Subtyp BK) im Gleichgewicht (rote Kreise). Auch 100 μM des Inhibitors HCV-796 beeinflussten den  $K_D$ -Wert der Bindung von RNA und Polymerase von 0.05 μM nicht (blaue offene Quadrate). In Gegenwart von Nukleotiden in Sättigung (3 mM) und 100 μM HCV-796 verringerte sich die Affinität von Polymerase und RNA stark (grüne geschlossene Quadrate).

B) Radioaktiver Polymerase-assay mit 0.04 μM HCV-Polymerase (Genotyp 1b, Subtyp BK), je 0.2 μM einzelsträngiger RNA (ssRNA) oder 5'-FAM-markierter einzelsträngiger RNA (ssRNA\*), je 3 mM ATP, GTP und UTP, 0.1 μM [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]CTP und 0, 5 und 10 μM Inhibitor HCV-796. Bei einem RNA-Marker von 16 Nukleotiden (nt) wurde das Polymerisationsprodukt mittels Phosphor-*imaging* detektiert (siehe Materialien und Methoden, Seite 35).

C) Die Dissoziation von präinkubierten 0.08 μM HCV-Polymerase (Genotyp 1b, Subtyp BK), 0.21 μM 5'-FAM-markierter einzelsträngiger RNA und einer Endkonzentration von 0 – 55 μM HCV-796 (siehe Legende) durch Verdünnung (1 + 1) mit Nukleotiden in Sättigung. Die Änderung des Fluoreszenzsignals (relativ zur Startfluoreszenz) wurde nach einer vierfach exponentiellen Reaktion 1. Ordnung ausgewertet.

D) Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation von RNA und Polymerase bei Nukleotiden in Sättigung nahmen hyperbol mit der Konzentration des Inhibitors HCV-796 zu. Mit einem  $K_i = 0.01$  mM verhinderte HCV-796 die doppelsträngige Produktbildung durch Freisetzung der RNA-Matrize in Anwesenheit von NTPs.

## **II. Die Initiation der viralen Genom-Replikation – die HCV-Polymerase in Aktion.**

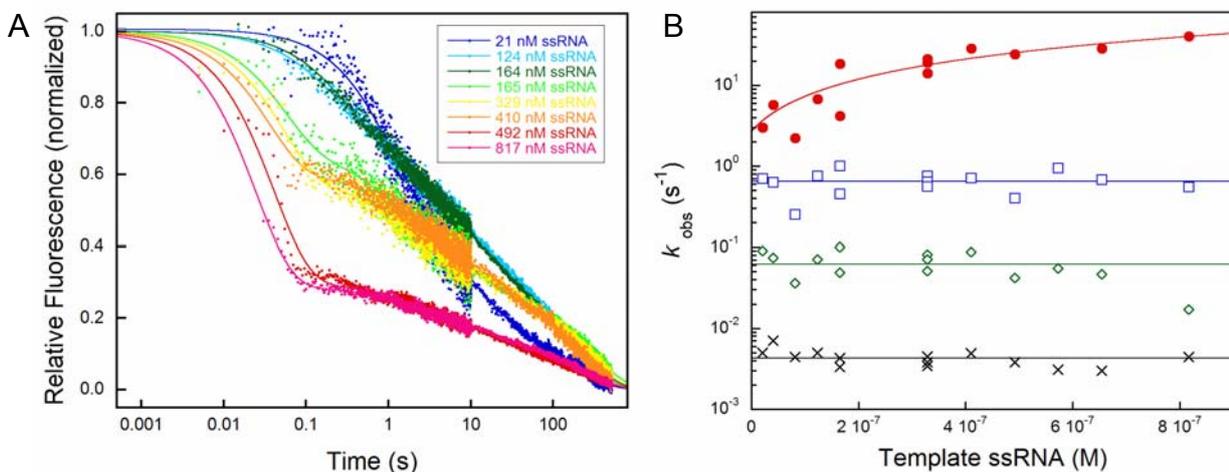
Die bis hier beschriebene Charakterisierung der HCV-Polymerase war mit der Polymerase des HCV Genotyps 1b, Subtyps BK durchgeführt worden. Seit 2005 existiert aber ein HCV-Isolat, welches nicht nur in der Lage ist, in Zellkultur zu replizieren, sondern auch infektiöse Partikel zu bilden [18]. Damit konnte zum ersten Mal der gesamte ‚Lebenszyklus‘ des Hepatitis C Virus in Zellkultursystemen untersucht werden. Da sich aktuell die Erforschung von HCV fast ausschließlich mit diesem HCV-Isolat vom Genotyp 2a, Subtyp JFH-1 beschäftigt, sollten weitere Studien auch in dieser Arbeit mit der HCV-Polymerase vom Genotyp 2a, Subtyp JFH-1 durchgeführt werden. Die verbesserte Replikation des HCV-Isolats vom Genotyp 2a, Subtyp JFH-1 verglichen mit anderen HCV-Isolaten wird, neben der viralen Helikase NS3 und den 5'- sowie 3'-NTRs, auch einer überaus „aktiven“ HCV-Polymerase zugesprochen [31]. Ein Vergleich der beiden HCV-Polymerasen vom Genotyp 1b, Subtyp BK und Genotyp 2a, Subtyp JFH-1 hinsichtlich der Bindung von Nukleotiden und einzelsträngiger RNA findet sich in der Diskussion wieder (siehe Seite 85 und folgende).

Außerdem sollte, neben der bisher untersuchten einzelsträngigen RNA-Matrize, ein möglichst natives RNA-Substrat als Matrize verwendet werden. Wie schon in der Einleitung beschrieben, stellt das 3'-Ende der HCV (-)-RNA den Ausgangspunkt zur Synthese des viralen (+)-RNA-Genoms dar und sollte am äußersten Ende eine *stem-loop*-RNA Sekundärstruktur ausbilden. Dieses aus 21 Nukleotiden bestehende strukturierte RNA-Molekül (siehe Materialien Seite 21) wird im Folgenden als *stem-loop*-RNA bezeichnet und wurde hinsichtlich seiner Interaktion mit der HCV-Polymerase (Genotyp 2a, Subtyp JFH-1) sowie mittels 1D <sup>1</sup>H NMR-Spektroskopie bezüglich seiner Struktur charakterisiert.

### **II. I. Kinetische Studien zur Bindung einer nativen RNA-Matrize und der HCV-Polymerase (Genotyp 2a, Subtyp JFH-1).**

Betrachtet man die Assoziationsreaktion der HCV-Polymerase vom Genotyp 2a (Subtyp JFH-1) und Fluorophor-markierter RNA zeitaufgelöst, waren wie auch bei der

Assoziation der HCV-Polymerase vom Genotyp 1b (Subtyp BK) 4 Phasen detektierbar. Auch hier erfolgte die Bindung von RNA über Intermediate. Die Änderung des Fluoreszenzsignals von sowohl einzelsträngiger RNA, als auch nativer *stem-loop*-RNA durch Interaktion mit der HCV-Polymerase wurde zeitaufgelöst in Abhängigkeit der RNA-Konzentration detektiert und einer vierfach exponentiellen Reaktion pseudo 1. Ordnung angepasst (Abbildung 11; Gleichung 1, siehe Seite 25). Jeweils die schnellste beobachtete Geschwindigkeitskonstante der Interaktion von HCV-Polymerase (Genotyp 2a, Subtyp JFH-1) und ssRNA als auch *stem-loop*-RNA zeigte nach Gleichung 2 (Seite 26) eine lineare Abhängigkeit von der eingesetzten RNA-Konzentration. Sie stellt somit jeweils die bimolekulare Reaktion 2. Ordnung dar, die Formierung des MICHAELIS-Komplexes. Die  $k_{\text{off}}$ -Werte der Bindung von Polymerase und ssRNA als auch *stem-loop*-RNA glichen sich mit etwa  $3 \text{ s}^{-1}$ . Unterschiede zeigten sich in den  $k_{\text{on}}$ -Werten. Mit  $k_{\text{on}}(\text{ssRNA}) = 45 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$  war die Bindung von einzelsträngiger RNA deutlich schneller als die Bindung der teilweise doppelsträngigen *stem-loop*-RNA ( $k_{\text{on}}(\text{stem-loop-RNA}) = 8 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ ). Dies spiegelte sich entsprechend  $K_D = k_{\text{off}} / k_{\text{on}}$  in einer höheren Affinität der Polymerase zu einzelsträngiger RNA wieder. Die der initialen, bimolekularen Reaktion folgenden 3 Phasen waren unabhängig von der RNA-Konzentration. Diese 3 beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation ähnelten sich für die beiden RNA-Matrizen mit  $k_{A2}' \sim 0.5 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{A3}' \sim 0.05 \text{ s}^{-1}$  und  $k_{A4}' = 0.004 \text{ s}^{-1}$ . Sie entsprechen intramolekularen, konsekutiven Reaktionen pseudo 1. Ordnung wie etwa Positionierungsreaktionen oder Konformationsänderungen.



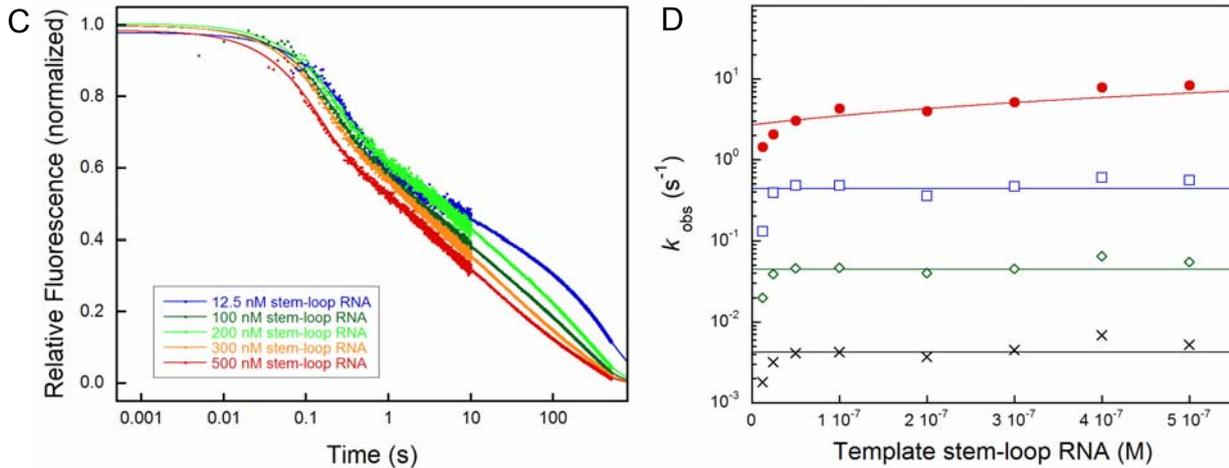


Abbildung 11: Bindung von HCV-Polymerase (Genotyp 2a, Subtyp JFH-1) und RNA zeitaufgelöst.

Durch schnelles Mischen von HCV-Polymerase (Genotyp 2a, Subtyp JFH-1) und 5'-FAM-markierter RNA konnte die Assoziationsreaktion durch Änderung des Fluoreszenzsignals beobachtet und einer vierfach exponentiellen Reaktion 1. Ordnung angepasst werden.

A) Zwischen Ausgangs- und Endwert normierte Änderung der Fluoreszenz von 0.02 – 0.82  $\mu\text{M}$  Fluorophor-markierter einzelsträngiger RNA durch Bindung von final 0.27  $\mu\text{M}$  HCV-Polymerase. B) Die Auswertung der zeitaufgelösten Bindung von HCV-Polymerase und ssRNA (siehe A) lieferte 4 apparente Geschwindigkeitskonstanten mit  $k_{A4}' = 0.004 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{A3}' = 0.06 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{A2}' = 0.6 \text{ s}^{-1}$  und  $k_{A1}' = 3 \text{ s}^{-1} + 45 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1} \cdot [\text{ssRNA}]$ .

C) Zwischen Ausgangs- und Endwert normierte Änderung der Fluoreszenz von 0.01 – 0.50  $\mu\text{M}$  Fluorophor-markierter *stem-loop*-RNA durch Bindung von final 0.27  $\mu\text{M}$  HCV-Polymerase. D) Die Auswertung der zeitaufgelösten Bindung von HCV-Polymerase und der nativen *stem-loop*-RNA-Matrize (siehe C) lieferte 4 beobachtete Geschwindigkeitskonstanten mit  $k_{A4}' = 0.004 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{A3}' = 0.05 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{A2}' = 0.4 \text{ s}^{-1}$  und  $k_{A1}' = 3 \text{ s}^{-1} + 8 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1} \cdot [\text{stem-loop-RNA}]$ .

## II. II. Thermodynamische Betrachtungen des RNA-Polymerase-Komplexes.

### II. II. I. Perturbation der RNA-Polymerase-Komplexbildung durch Erhöhung der Ionenstärke (lineare freie Enthalpiebeziehungen).

Betrachtet man die Polymerase-RNA-Interaktion im Gleichgewicht, so findet man eine höhere Affinität zu einzelsträngiger RNA verglichen mit strukturierter *stem-loop*-RNA. Da die *stem-loop*-RNA eine native Matrize der HCV-Polymerase darstellt, sollte die Interaktion, auch im Vergleich mit der unspezifischen, einzelsträngigen RNA,

eingehender untersucht werden. Wurde die Ionenstärke des Systems durch NaCl erhöht, erniedrigte sich generell die Affinität von Polymerase und Nukleinsäuren (Abbildung 12). Zur Assoziation beider Makromoleküle scheinen ionische Wechselwirkungen beizutragen (siehe Kapitel I. I., Seite 36). Eine Erhöhung der Ionenstärke führte zu einer Perturbation der Interaktion nach der Theorie einer linearen freien Enthalpiebeziehung (BRØNSTED). Die Dissoziationskonstante war exponentiell abhängig von der Konzentration des Störstoffes, in diesem Fall NaCl, oder entsprechend  $\ln K_A = \ln K_A^0 - m' \cdot [\text{NaCl}]$  beziehungsweise  $\Delta G = \Delta G^0 - m \cdot [\text{NaCl}]$ . Mit  $\Delta G^0$  wird hier die freie Gibbs'sche Reaktionsenthalpie der Interaktion von HCV-Polymerase und RNA bei 0 mM NaCl in 50 mM HEPES/NaOH, 20% (v/v) Glycerin, 6.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM TCEP, pH = 7.5 und T = 295.6 K bezeichnet. Erstaunlicherweise unterschieden sich die Interaktion von HCV-Polymerase (Genotyp 2a, Subtyp JFH-1) und einzelsträngiger beziehungsweise *stem-loop*-RNA hinsichtlich ihrer NaCl-Abhängigkeit. Zwar ist die Affinität zu einzelsträngiger RNA bei niedrigen Konzentrationen an NaCl ( $\Delta G^0_{(\text{ssRNA})} = -34.9 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) höher als die zur partiell doppelsträngigen *stem-loop*-RNA ( $\Delta G^0_{(\text{stem-loop-RNA})} = -30.7 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), doch ist auch die Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration größer ( $m_{(\text{ssRNA})} = -29.2 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ,  $m_{(\text{stem-loop-RNA})} = -13.5 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ). Daraus folgt, dass zur Bindung von Polymerase und *stem-loop*-RNA zusätzliche, nicht-ionische Wechselwirkung beitragen. Beide RNAs werden also auf unterschiedliche Weise gebunden.

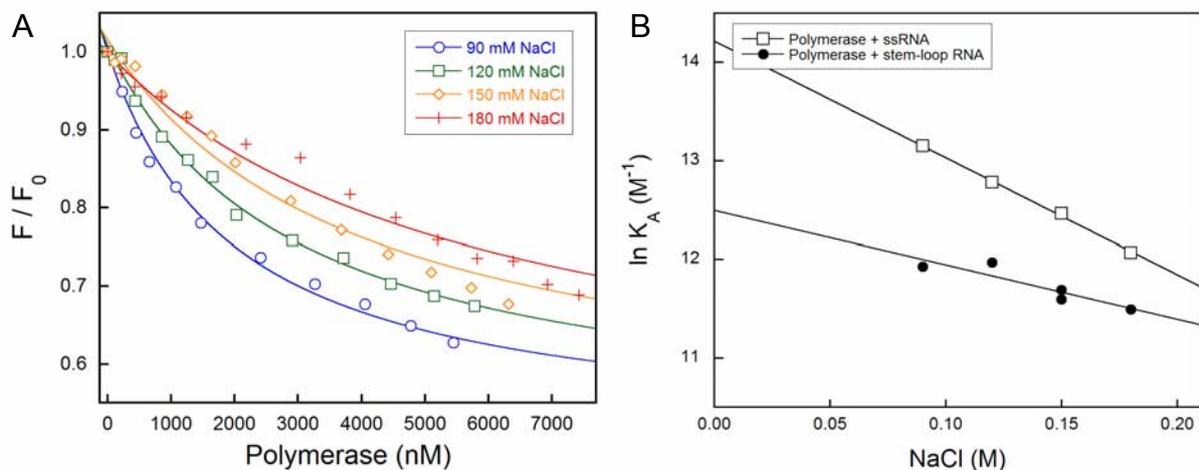


Abbildung 12: Perturbation der Interaktion von HCV-Polymerase und RNA durch NaCl.

A) Die relative Änderung des Fluoreszenzsignals von 0.06  $\mu\text{M}$  5'-FAM-markierter einzelsträngiger RNA durch Bindung der HCV-Polymerase (Genotyp 2a, Subtyp JFH-1) ermöglichte nach Gleichung 4

(siehe Seite 28) die Quantifizierung der Interaktion. Die Affinität von HCV-Polymerase und ssRNA wurde bei NaCl-Konzentrationen von 90 mM (blau, Kreis), 120 mM (grün, Quadrat), 150 mM (gelb, Raute) und 180 mM (rot, Kreuz) bestimmt und zeigt eine Abnahme mit steigender Ionenstärke.

B) Bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen wurden die Affinitäten von HCV-Polymerase (Genotyp 2a, Subtyp JFH-1) und Fluorophor-markierter sowohl einzelsträngiger RNA als auch *stem-loop*-RNA bestimmt. Der natürliche Logarithmus der Gleichgewichtskonstanten von HCV-Polymerase und ssRNA (offene Quadrate) und *stem-loop*-RNA (geschlossene Kreise) war linear abhängig von der Konzentration an NaCl entsprechend  $\Delta G = \Delta G^0 - m \cdot [\text{NaCl}]$  (siehe Tabelle 2).  $\Delta G^0$  bezieht sich auf die freie Gibbs'sche Reaktionsenthalpie der Interaktion von HCV-Polymerase und der gekennzeichneten RNA bei 0 mM NaCl in 50 mM HEPES/NaOH, 20% (v/v) Glycerin, 6.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM TCEP, pH = 7.5 und T = 295.6 K.

	$\Delta G^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$m$ (kJ mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )
ssRNA	- 34.9	- 29.2
<i>stem-loop</i> -RNA	- 30.7	- 13.5

Tabelle 2: NaCl perturbiert die Interaktion von HCV-Polymerase und RNA entsprechend einer linearen freien Enthalpiebeziehung.

$\Delta G^0$  bezieht sich auf die freie Gibbs'sche Reaktionsenthalpie der Interaktion von HCV-Polymerase und der gekennzeichneten RNA bei 0 mM NaCl in 50 mM HEPES/NaOH, 20% (v/v) Glycerin, 6.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM TCEP, pH = 7.5 und T = 295.6 K.

## II. II. II. Bestimmung der thermodynamischen Beiträge zu RNA-Polymerase-Interaktionen (nach VAN'T HOFF).

Um die für beide RNAs unterschiedliche Art der Bindung (Kapitel II. II. I.) näher zu untersuchen, wurden bei einer konstanten NaCl-Konzentration von 150 mM die Affinitäten von beiden RNAs zur Polymerase bei Variation der Temperatur bestimmt (Abbildung 14). Die NaCl-Konzentration von 150 mM wurde gewählt, da sie erstens einer etwa physiologischen Ionenstärke entspricht und zweitens bei diesen Bedingungen die HCV-Polymerase auch in Gegenwart von Nukleinsäuren eindeutig als Monomer vorliegt (analytische Ultrazentrifugation, PD Dr. Hauke Lilie). Mit  $\Delta G = -RT \ln K_A$  und  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  ergibt sich ein linearer Zusammenhang von  $\ln K_A$  und der reziproken Messtemperatur entsprechend Gleichung 7 (siehe Seite 25). Aus einer linearen Regression lassen sich nach VAN'T HOFF die thermodynamischen

Parameter  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  und  $\Delta G$  der Wechselwirkung von Polymerase und der jeweiligen RNA berechnen. Faszinierend ist, dass sich auch in dieser Versuchsreihe Unterschiede in der Bindung von Polymerase und einzelsträngiger und partiell doppelsträngiger *stem-loop*-RNA zeigten. Die Gleichgewichtskonstante der Bindung von HCV-Polymerase (Genotyp 2a, Subtyp JFH-1) und einzelsträngiger RNA war scheinbar unabhängig von der Reaktionstemperatur. Dies bedeutet, dass kein enthalpischer Beitrag in der Komplexbildung realisiert wird ( $\Delta H_{(ssRNA)} \sim 0 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Die Bindung von einzelsträngiger RNA mit  $\Delta G_{(ssRNA)} = -31 \text{ kJ mol}^{-1}$  bei 150 mM NaCl und 295.6 K bestand ausschließlich aus dem entropischen Beitrag  $-T\Delta S_{(ssRNA)} = -31 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Die Komplexbildung von *stem-loop*-RNA und HCV-Polymerase war enthalpisch sogar ungünstig mit  $\Delta H_{(stem-loop-RNA)} = +37 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Dieser endotherme Beitrag wurde durch den starken entropischen Beitrag von  $-T\Delta S_{(stem-loop-RNA)} = -66 \text{ kJ mol}^{-1}$  kompensiert. Somit realisiert sich durch die Bindung von *stem-loop*-RNA und HCV-Polymerase (Genotyp 2a, Subtyp JFH-1) eine freie Reaktionsenthalpie von  $\Delta G_{(stem-loop-RNA)} = -29 \text{ kJ mol}^{-1}$  bei 150 mM NaCl und 295.6 K.

Daraus konnte geschlossen werden, dass die Interaktion von Polymerase und RNA allgemein entropisch getrieben ist ( $\Delta S > 0$ ). Dies bedeutet, dass sich durch die Polymerase-RNA-Komplexbildung die Entropie des Systems erhöht (siehe Diskussion).

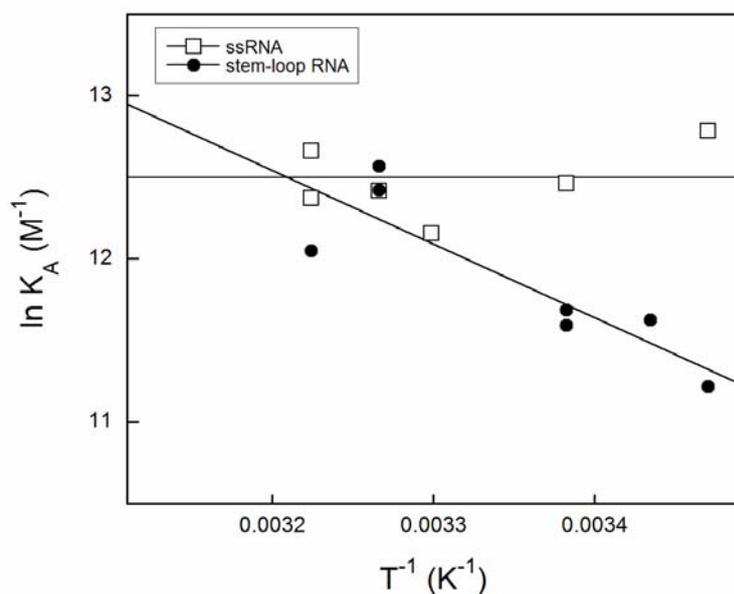


Abbildung 13: Bestimmung der thermodynamischen Beiträge zur Bindung von HCV-Polymerase und einzelsträngiger beziehungsweise stem-loop-RNA.

Gleichgewichtskonstanten von HCV-Polymerase (Genotyp 2a, Subtyp JFH-1) und Fluorophor-markierter sowohl einzelsträngiger RNA (Quadrate) als auch partiell doppelsträngiger stem-loop-RNA (Kreise) wurden bei 150 mM NaCl und unterschiedlichen Temperaturen bestimmt. Eine Auswertung nach VAN'T HOFF lieferte die thermodynamischen Beiträge der Komplexbildung (siehe Tabelle 3).

	$\Delta G$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$- T\Delta S$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
ssRNA	- 31	0	- 31
stem-loop-RNA	- 29	+ 37	- 66

Tabelle 3: Thermodynamischen Parameter der Interaktion von HCV-Polymerase und einzelsträngiger sowie stem-loop-RNA.

Die angegebenen Werte beziehen sich auf 50 mM HEPES/NaOH, 20% (v/v) Glycerin, 150 mM NaCl, 6.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM TCEP, pH = 7.5 und T = 295.6 K.

## **II. III. Die Bindung von Nukleotiden und HCV-Polymerase (Genotyp 2a, Subtyp JFH-1) detektiert mittels Circular dichroismus.**

Um eine RNA-abhängige RNA-Polymerisationsreaktion katalysieren zu können, muss auch die HCV-Polymerase vom Genotyp 2a, Subtyp JFH-1 neben der RNA-Matrize die dazu komplementären Nukleotide binden. Wie schon für die HCV-Polymerase vom Genotyp 1b, Subtyp BK gezeigt (siehe Seite 37 und folgende) eignet sich dazu die Circular dichroismus-Spektroskopie.

Abbildung 15 A zeigt das Nah-UV-CD-Spektrum der HCV-Polymerase vom Genotyp 2a, Subtyp JFH-1. Durch die unterschiedliche Absorption von links- und rechts-zirkular polarisiertem Licht durch chirale Tryptophane und Tyrosine des Proteins entsteht ein lokales Minimum bei 270 – 290 nm. Unbekannten Ursprungs sind das lokale Maximum bei etwa 255 nm sowie das lokale Minimum bei 241 nm. Diese Signale befinden sich an der Grenze des Fern-UV- zum Nah-UV-Bereich und können daher Elementen der Sekundär- als auch der Tertiärstruktur der Polymerase entsprechen. Interessanterweise sind diese beiden Signale, wie schon bei HCV-Polymerase vom Genotyp 1b, Subtyp BK gezeigt (Kapitel I. II.), sensitiv für die Bindung von Nukleotiden. Zugabe der einzelnen Nukleotide ATP, CTP, GTP und UTP führte zu einer Abnahme der Signalintensitäten sowohl des charakteristischen lokalen Minimums bei 241 nm als auch des lokalen Maximums bei 255 nm (Abbildung 15 B - E). Diese Signaländerungen, die eine strukturelle Änderung der Polymerase als Ursache haben, konnten zur Quantifizierung der Bindung von Nukleotiden genutzt werden (Abbildung 15 F). Eine Anpassung der Signaländerung bei 241 nm nach einer sigmoiden HILL-Gleichung lieferte die entsprechenden Affinitäten ( $S_{0.5}$ -Werte) der Polymerase und des jeweiligen Nukleotids (Tabelle 4). Die Affinitäten der einzelnen Nukleotide und der HCV-Polymerase vom Genotyp 2a (Subtyp JFH-1) lagen mit  $S_{0.5}$  (ATP) = 0.06 mM,  $S_{0.5}$  (GTP) = 0.04 mM,  $S_{0.5}$  (CTP) = 0.06 mM und  $S_{0.5}$  (UTP) = 0.1 mM im mikromolaren Bereich und sind nahezu identisch mit denen für die HCV-Polymerase vom Genotyp 1b (Subtyp BK) (siehe I. II.). Zudem konnte auch für die Bindung der HCV-Polymerase (Genotyp 2a) und allen NTPs ein HILL-Koeffizient von etwa 1.5 bestimmt werden. Dies bedeutet, dass jeweils zwei Nukleotid-Moleküle in der Lage sind, an die Polymerase zu binden. Die Bindung von einem Nukleotid verbessert die Affinität zum zweiten Nukleotid, man spricht von positiver Kooperativität. Wie schon erwähnt wird davon ausgegangen,

dass ein Nukleotid mit der Nukleotid-Bindungsstelle wechselwirkt und das zweite Nukleotid, auf Grund der chemischen Ähnlichkeit zu RNA, die Nukleinsäure-Bindungsstelle unter den gewählten Reaktionsbedingungen besetzt.

Nicht nur die Bindung von RNA scheint Konformationsänderungen der Polymerase zu induzieren, auch die Wechselwirkung mit Nukleotiden führt zu strukturellen Änderungen der Polymerase, wie durch Circular dichroismus gezeigt wurde. Erwähnenswert ist, dass sich die CD-Signaländerungen der Polymerase hinsichtlich der Bindung der einzelnen Nukleotide leicht unterscheiden. Die Bindung von ATP und UTP resultierte in einer leicht hypsochromen Verschiebung des lokalen Minimums bei 241 nm um etwa 1 – 2 nm. Die Bindung von CTP hingegen führte zu einer hypsochromen Verschiebung von etwa 2 nm des lokalen Maximums bei 255 nm. Die Bindung von GTP ließ keine spektralen Verschiebungen erkennen.

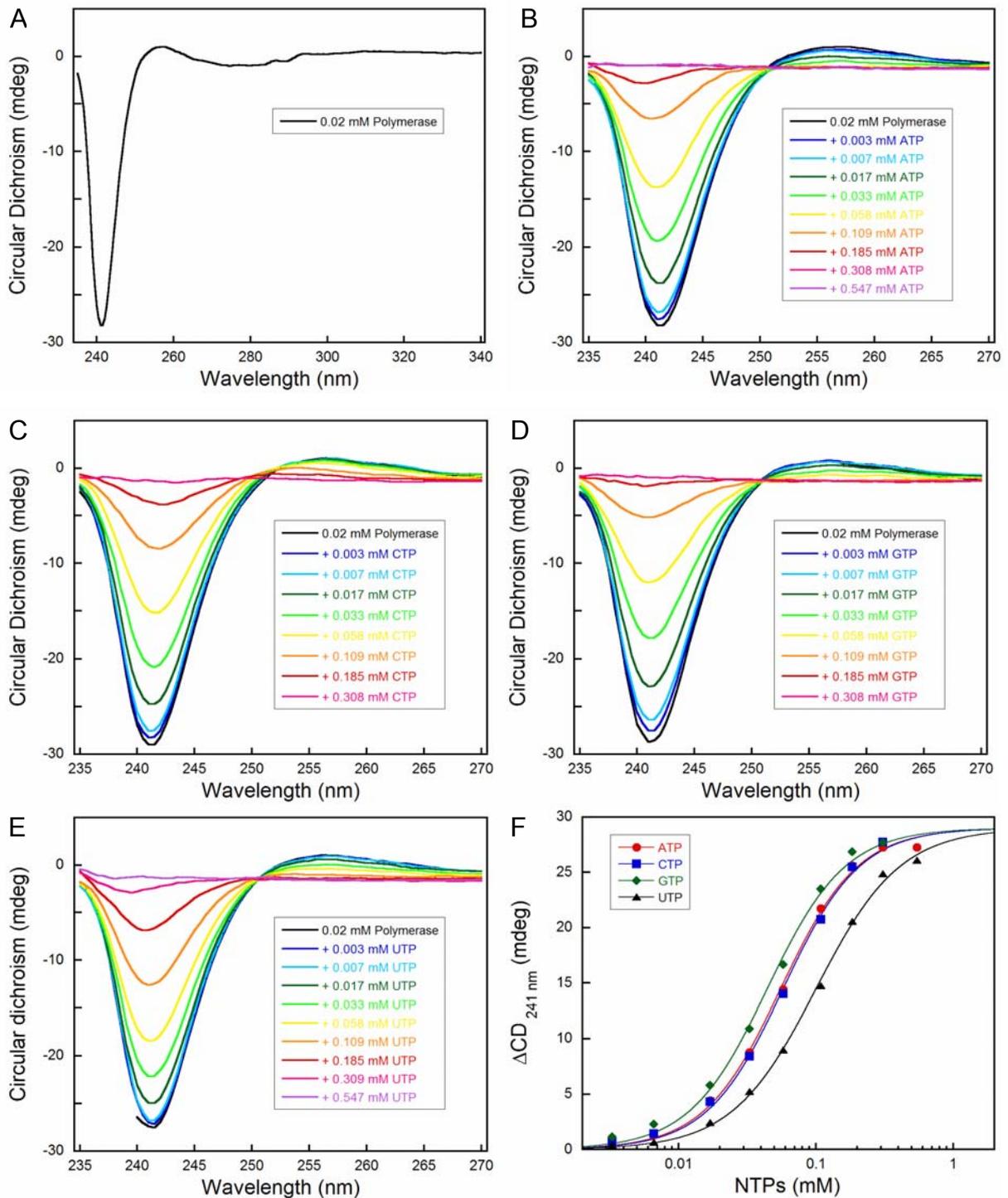


Abbildung 14: Bindung von Nukleotiden führt zu Konformationsänderungen der HCV-Polymerase.

A) Das CD-Spektrum der HCV-Polymerase (Genotyp 2a, Subtyp JFH-1) zeigte durch die Chiralität von Tryptophanen und Tyrosinen ein lokales Minimum bei 270 – 290 nm. Zudem besitzt es ein lokales Maximum bei etwa 255 nm sowie ein starkes lokales Minimum bei 241 nm, beide unbekanntem Ursprungs und sensitiv für Nukleotide. Die CD-Spektren von jeweils 0.02 mM HCV-Polymerase (Genotyp 2a, Subtyp JFH-1) wurden in Abhängigkeit von B) ATP, C) CTP, D) GTP und E) UTP gemessen. Die Zugabe von Nukleotiden führte zu einer Abnahme sowohl des lokalen Maximums bei 255 nm als auch des lokalen Minimums bei 241 nm auf Grund konformationeller Änderungen der

Sekundär- und / oder Tertiärstruktur des Proteins. F) Die Signaländerung bei 241 nm wurde zur Quantifizierung der Interaktion von Polymerase und Nukleotide genutzt (siehe Tabelle 4).

	$K_D^*$ (mM)	$K_S$ (mM <sup>n</sup> )	Kooperativität n
ATP	0.06	0.011	1.5
CTP	0.06	0.012	1.6
GTP	0.04	0.009	1.5
UTP	0.10	0.038	1.4

*Tabelle 4: Affinitäten von HCV-Polymerase (Genotyp 2a, Subtyp JFH-1) und ATP, CTP, GTP und UTP.*

\* Der  $K_D$ -Wert entspricht der Ligandkonzentration, bei der ein halbmaximaler Effekt beobachtbar ist ( $S_{0.5}$ ).

## **II. IV. Strukturelle und thermodynamische Betrachtungen der *stem-loop*-RNA.**

Die HCV-Polymerase arbeitet in einer 5'→3' Richtung bezogen auf den neu wachsenden RNA-Strang. Um nicht in jedem Replikationsschritt genomische Information zu verlieren, sollte das äußerste 3'-Ende der HCV (-)-RNA als RNA-Matrize zur Synthese des viralen Genoms ((+)-RNA) dienen. Das 3'-Ende der (-)-RNA weist, wie auch die 5'-UTR des viralen Genoms, Sekundärstrukturen auf. Laut einer *software* zur Vorhersage von Nukleinsäuresekundärstrukturen (mfold, [132]) besitzt das äußerste 3'-Ende der (-)-RNA, die Initiationsstelle der HCV-Genomsynthese, die Sekundärstruktur einer *stem-loop*-RNA. Dies sollte mittels NMR-Spektroskopie untersucht und Aussagen über ihre thermodynamische Stabilität getroffen werden, besonders im Hinblick auf eine Interaktion dieser RNA-Sekundärstruktur mit der HCV-Polymerase.

### **II. IV. I. Strukturelle Charakterisierung der *stem-loop*-RNA mittels <sup>1</sup>H NMR-Spektroskopie.**

Nukleinsäuren sind Polymere, die aus einzelnen Monomeren, den Nukleotiden, bestehen. Die Anordnung der 4 verschiedenen Nukleotide Adenosin, Guanosin, Cytidin und Uridin bestimmt die Primärstruktur der Nukleinsäuren. Darüber hinaus können sich auch Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen ausbilden. Eine Nukleinsäure-Sekundärstruktur bildet sich, wenn (meist) komplementäre Nukleobasen über Wasserstoffbrückenbindungen und *stacking*-Interaktionen miteinander wechselwirken. Aus einem einzelsträngigen Molekül formiert sich so ein (partiell) doppelsträngiger Bereich. Tragen zu diesem Doppelstrangbereich die Wasserstoffbrückenbindungen von entweder Uracil oder Guanin mit ihren entsprechenden Bindungspartnern bei, sind Protonen der Lactamstruktur der Nukleotide, so genannte Imino-Protonen, durch diese Bindung fixiert und können nicht mehr mit dem Lösungsmittel austauschen. Bei einer spezifischen chemischen Verschiebung werden diese Imino-Protonen im <sup>1</sup>H NMR-Spektrum sichtbar. Dieser spektrale Bereich bei etwa 13 ppm überlappt nicht mit den <sup>1</sup>H NMR-Signalen von Proteinen und ist daher gut geeignet, Nukleinsäuren hinsichtlich ihres Doppelstrang-Charakters zu untersuchen.

Die in dieser Arbeit untersuchte *stem-loop*-RNA, die als Initiationsstelle zur Synthese des viralen Genoms dient, besteht aus 21 Nukleotiden. Abbildung 16 A zeigt schematisch die mittels „mfold“ [132] berechnete Sekundärstruktur dieser *stem-loop*-RNA. Ein doppelsträngiger „stem“ bestehend aus 5 Basenpaaren ist durch einen *penta-loop* verbunden. Am 3'-Ende besitzt der *stem-loop* einen Überhang von 4 einzelsträngigen Nukleotiden, am 5'-Ende sind es zwei.

Das 1D  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum dieser *stem-loop*-RNA zeigte in dem spektralen Bereich typisch für Imino-Protonen 5 deutliche Signale (Abbildung 16 B) entsprechend der 5 vorhergesagten intramolekularen Basenpaare. Ein schwaches zusätzliches Signal war bei 12.85 ppm erkennbar. Dieses resultiert aus einer geringen Population einer zusätzlichen Basenpaarung, wodurch sich ein doppelsträngiger Bereich aus 6 Basenpaaren bildet, der nun über einen *triple-loop* verbunden ist. Durch Variation der RNA-Sequenz sowie 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY NMR-Spektroskopie (siehe Anhang Abbildung 2) konnten die NMR-Signale der einzelnen Imino-Protonen den entsprechenden Basenpaarungen zugeordnet werden (Abbildung 16 B).

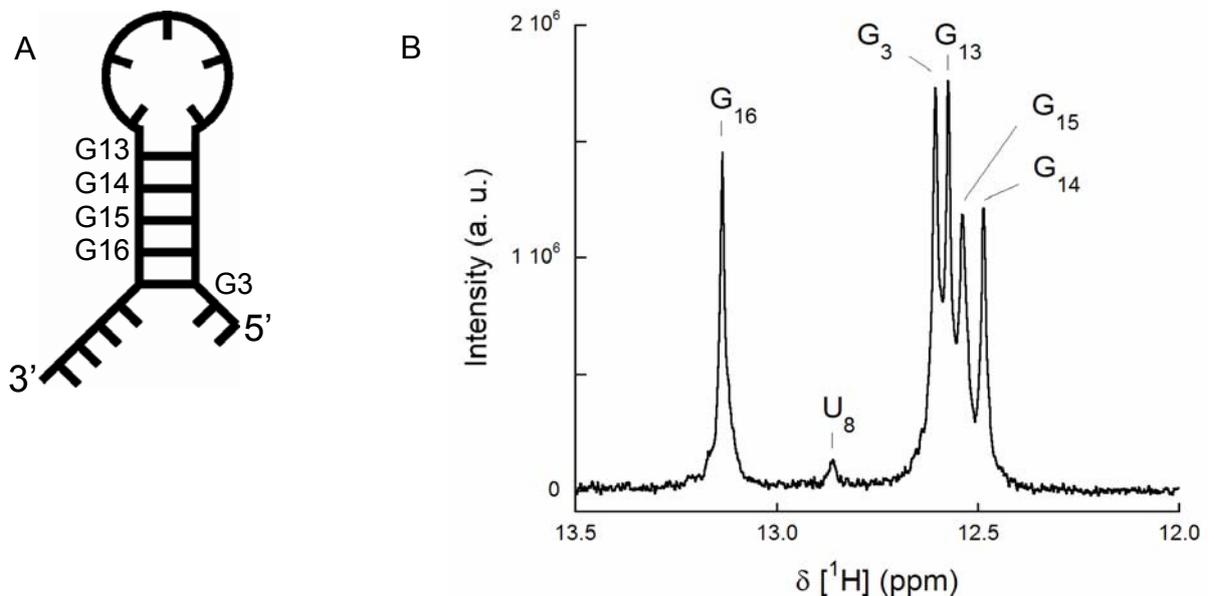


Abbildung 15: Die Struktur der *stem-loop*-RNA - die native Initiationsstelle der Polymerase zur Synthese neuen viralen Genoms.

A) Ausgehend von der Primärstruktur kann die Sekundärstruktur von kurzen Nucleinsäuren vorhergesagt werden. Im Falle der *stem-loop*-RNA formt sich die schematisch dargestellte Struktur.

Am 5'-Ende sind zwei Nukleotide einzelsträngig, am 3'-Ende vier. Dazwischen liegt ein doppelsträngiger *stem* aus fünf Basenpaarungen (von 5' → 3': G<sub>3</sub>C<sub>17</sub>, C<sub>4</sub>G<sub>16</sub>, C<sub>5</sub>G<sub>15</sub>, C<sub>6</sub>G<sub>14</sub>, C<sub>7</sub>G<sub>13</sub>). Dieser ist über den *penta-loop* U<sub>8</sub> A<sub>9</sub> U<sub>10</sub> U<sub>11</sub> A<sub>12</sub> verbunden.

B) Mittels 1D <sup>1</sup>H NMR-Spektroskopie der *stem-loop*-RNA konnte die vorhergesagte Sekundärstruktur bestätigt werden. Entsprechend den 5 Basenpaarungen der *stem-loop*-RNA sind die 5 Imino-Protonen-Signale deutlich erkennbar. Ein kleineres Signal bei 12.85 ppm deutet auf eine geringe Population von RNA-Molekülen mit einer zusätzlichen U<sub>8</sub>A<sub>12</sub>-Basenpaarung hin. Durch Variation der Primärstruktur sowie 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY NMR-Spektren der *stem-loop*-RNA (siehe Anhang Abbildung 2) konnten die NMR-Signale der Imino-Protonen den einzelnen Basenpaarungen zugeordnet werden.

## **II. IV. II. Thermodynamische Charakterisierung der Sekundärstruktur der *stem-loop*-RNA- mittels 1D <sup>1</sup>H NMR-Spektroskopie.**

Da eine RNA-abhängige RNA-Polymerase Nukleotide komplementär zur RNA-Matrize einbaut, sind RNA-Sekundärstrukturen für die Produktbildungsreaktion hinderlich. Von großem Interesse war daher die Stabilität der Sekundärstruktur der *stem-loop*-RNA, die sich im Gleichgewicht mit der einzelsträngigen Konformation befindet. Die thermische Denaturierung ist eine Methode, Strukturen von Nukleinsäuren reversibel aufzulösen. Eine solche thermische Denaturierung kann auch mit NMR-Spektroskopie verfolgt werden. In Abbildung 17 A und 17 B ist der spektrale Bereich der Imino-Protonen der 1D <sup>1</sup>H NMR-Spektren der *stem-loop*-RNA bei unterschiedlichen Temperaturen gezeigt. Da in der einzelsträngigen Konformation der RNA die Imino-Protonen mit dem Lösungsmittel frei austauschen, werden sie nicht mehr detektierbar. Somit können die absoluten Integrale der einzelnen Signale mit der Sekundärstruktur korreliert werden. Betrachtet man die integrierten Signale der einzelnen Imino-Protonen in Abhängigkeit von der Temperatur, können Rückschlüsse auf die Stabilitäten der einzelnen Basenpaarungen getroffen werden (Abbildung 17 C). Eine Auswertung der integrierten NMR-Signale der Imino-Protonen nach einem Zwei-Zustandsmodell (siehe Gleichung 9, Seite 31) lieferte die thermodynamischen Parameter der einzelnen Basenpaare (Tabelle 5). Interessanter Weise besitzen die randständigen Basenpaare G<sub>3</sub>-C<sub>17</sub> (T<sub>m</sub> = 341 K) und G<sub>13</sub>-C<sub>7</sub> (T<sub>m</sub> = 336 K) sowie G<sub>16</sub>-C<sub>4</sub> (T<sub>m</sub> = 335 K) eine deutlich höhere thermodynamische Stabilität als die innen liegenden Basenpaare G<sub>15</sub>-C<sub>5</sub> (T<sub>m</sub> = 307 K) und G<sub>14</sub>-C<sub>6</sub> (T<sub>m</sub> = 312 K).

Im Hinblick auf die Polymerisationsreaktion ist dies von besonderem Interesse, da die Polymerase in einer 5'→3'-Richtung bezogen auf das neu zu synthetisierende RNA-Molekül arbeitet. Das heißt, die terminale Basenpaarung G<sub>3</sub>-C<sub>17</sub> der *stem-loop*-RNA-Matrize ist die erste Basenpaarung, die sich öffnen muss um Nukleotide komplementär einzubauen. Mit ihrer hohen Stabilität stellt sie die energetische Barriere dar, um die Sekundärstruktur der *stem-loop*-RNA aufzulösen.

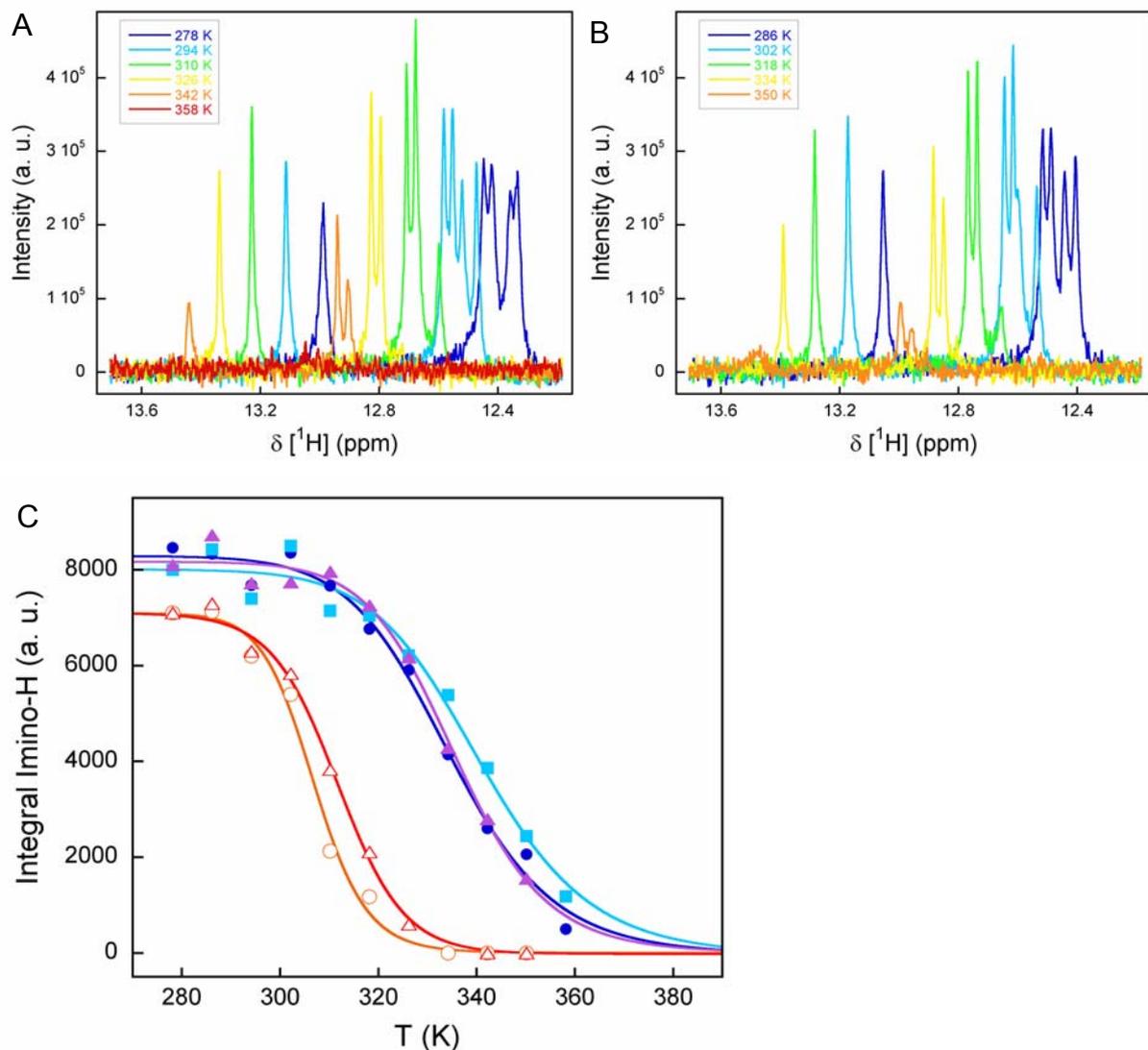


Abbildung 16: Untersuchung der thermischen Stabilität der *stem-loop*-RNA-Sekundärstruktur mittels 1D <sup>1</sup>H NMR-Spektroskopie.

A) und B) 1D <sup>1</sup>H NMR-Spektren von 0.1 mM *stem-loop*-RNA wurden bei 278 – 358 K aufgenommen. Die entsprechenden Temperaturen sind in den Legenden gekennzeichnet. Durch Erhöhung der Temperatur verschiebt sich das Gleichgewicht der partiell doppelsträngigen *stem-loop*-RNA zu

Gunsten der einzelsträngigen Konformation. Dies resultiert in einer Abnahme der Signalintensitäten der Imino-Protonen sensitiv für Basenpaarungen.

C) Die integrierten Imino-Protonen NMR-Signale der *stem-loop*-RNA (G<sub>3</sub>-C<sub>17</sub> geschlossenes Quadrat; G<sub>16</sub>-C<sub>4</sub> geschlossener Kreis; G<sub>15</sub>-C<sub>5</sub> offener Kreis; G<sub>14</sub>-C<sub>6</sub> offenes Dreieck; G<sub>13</sub>-C<sub>7</sub> geschlossenes Dreieck) wurden gegen die entsprechende Temperatur aufgetragen und nach einem Zwei-Zustandsmodell ausgewertet (Gleichung 9, Seite 31). Die thermodynamischen Parameter der einzelnen Basenpaare sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Basenpaar	$\Delta H_{T_m}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_{T_m}$ (kJ mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	$T_m$ (K)	$\Delta c_p$ (kJ mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	$\Delta G^{296 K}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
G <sub>3</sub> -C <sub>17</sub>	88	0.26	341	0.06	11.3
G <sub>16</sub> -C <sub>4</sub>	88	0.26	335	0.06	10.1
G <sub>15</sub> -C <sub>5</sub>	147	0.48	307	0.11	5.0
G <sub>14</sub> -C <sub>6</sub>	118	0.38	312	0.08	4.2
G <sub>13</sub> -C <sub>7</sub>	101	0.30	336	0.07	11.7
U <sub>8</sub> -A <sub>12</sub>	-	-	-	-	-

Tabelle 5: Die thermodynamische Stabilität der Sekundärstruktur der *stem-loop*-RNA.

NMR-Signale der Imino-Protonen der *stem-loop*-RNA wurden bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen und nach einem Zwei-Zustandsmodell der thermischen Denaturierung ausgewertet (Gleichung 9, Seite 31).

## II. V. Die RNA-abhängige RNA-Polymerisationsreaktion verfolgt mit 1D $^1\text{H}$ NMR-Spektroskopie.

Eine RNA-abhängige RNA-Polymerase baut Nukleotide komplementär zu einer RNA-Matrize in einen wachsenden RNA-Strang ein. Um dies zu gewährleisten, müssen Sekundärstrukturen der RNA-Matrize lokal aufgelöst werden. Das Polymerisationsprodukt ist ein doppelsträngiges RNA-Molekül aus der RNA-Matrize und dem neu synthetisierten RNA-Strang, die wegen ihrer Komplementarität stabile Basenpaarungen ausbilden. Auch diese Basenpaarungen sollten sich durch über Wasserstoffbrückenbindungen fixierte Imino-Protonen von Guanin oder Uracil mittels  $^1\text{H}$  NMR-Spektroskopie detektieren lassen. Somit sollte sich auch die Produktbildung der Polymerisationsreaktion mit  $^1\text{H}$  NMR-Spektroskopie verfolgen lassen.

Es wurden je 30  $\mu\text{M}$  HCV-Polymerase (Genotyp 2a, Subtyp JFH-1) und *stem-loop*-RNA-Matrize mit Nukleotiden in Sättigung (500  $\mu\text{M}$  je NTP) in 50 mM HEPES/NaOH, 5% (v/v) Glycerin (deuteriert), 200 mM NaCl, 6.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM TCEP, pH = 7.5 inkubiert. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen mit einem  $K_D$  (Polymerase – *stem-loop*-RNA)  $\leq 5 \mu\text{M}$  entspricht dies mindestens 20  $\mu\text{M}$  Polymerase-RNA-Komplex, der durch Einbau von Nukleotiden 20  $\mu\text{M}$  Produkt-RNA bilden kann. Von den verbleibenden 10  $\mu\text{M}$  RNA-Matrize könnten bei oben genannter Affinität in einem zweiten Polymerisationszyklus maximal 8  $\mu\text{M}$  Produkt gebildet werden. Diese Menge verringert sich noch, bezieht man zudem mit ein, dass auf Grund einer gewissen Affinität auch zur doppelsträngigen Produkt-RNA nicht die gesamten 30  $\mu\text{M}$  HCV-Polymerase zum zweiten Polymerisationszyklus beitragen können. In dem ersten Polymerisationszyklus wird also mit mindestens 66% die Hauptmenge an Produkt-RNA gebildet, mit jedem weiteren entsprechend weniger. In Näherung kann also von einer Ein-Produkt-Bildungsreaktion (*single turnover*) gesprochen werden.

Basierend auf der 21 Nukleotid-langen RNA-Matrize wird im Zuge der Polymerisationsreaktion ein doppelsträngiges RNA-Produkt mit 21 Basenpaarungen erwartet. Da sich für jede kanonische Basenpaarung je ein Imino-Proton NMR-Signal entwickelt, sollte das Integral der NMR-Signale dieser Imino-Protonen näherungsweise mit der Anzahl der Basenpaarungen und somit der Produktbildung doppelsträngiger RNA korrelieren.

Im Experiment änderte sich in den ersten 16 Stunden Reaktionszeit (Polymerase + *stem-loop*-RNA + NTPs) das 1D  $^1\text{H}$  NMR-Signalprofil der Imino-Protonen nicht

(Abbildung 17 A). In dem folgenden Spektrum, das über den Reaktionszeitraum von 16 bis 24 h akkumulierte, waren dagegen NMR-Signale zusätzlicher Imino-Protonen detektierbar, die auf eine beginnende Produktbildung und Freisetzung aus dem Enzym-Produkt-Komplex deuteten. In dem von 25 bis 45 h Reaktionszeit akkumulierten Spektrum war dann die Reaktion mit der Bildung von 20  $\mu\text{M}$  Produkt bereits vollständig abgeschlossen.

Vergleicht man die  $^1\text{H}$  NMR-Spektren des durch die HCV-Polymerase katalysierten RNA-Produkts und des chemisch synthetisierten, erwarteten doppelsträngigen RNA-Produkts, kann durch das fast identische Signalprofil eine durch die HCV-Polymerase katalysierte Produktbildung angenommen werden (Abbildung 17 C).

In grober Näherung waren somit nach einer *lag*-Phase von etwa 20 Stunden innerhalb von etwa 5 Stunden 20  $\mu\text{M}$  Produkt-RNA von 20  $\mu\text{M}$  des Polymerase-RNA-Komplexes gebildet worden. Bei 21 eingebauten Nukleotiden entsprach dies etwa  $1.4 \mu\text{M NTPs min}^{-1} (20 \mu\text{M Polymerase-RNA-Komplex})^{-1}$  oder  $0.1 \text{ Nukleotid min}^{-1}$  ausgehend vom Polymerase-RNA-Komplex.

In Abbildung 17 B ist das Integral der NMR-Signale der Imino-Protonen zeitaufgelöst dargestellt. Der initiale Abfall der absoluten Signalintensität in dem betrachteten spektralen Bereich resultierte durch die Zugabe von Nukleotiden zu dem Binärkomplex aus HCV-Polymerase und *stem-loop*-RNA. Nukleotide, essentiell für die Polymerisationsreaktion, beeinflussten in dem nun Katalyse-kompetenten Ternärkomplex die Affinität der *stem-loop*-RNA positiv ( $K_M < K_D$ ). Dies führte zu einer Verringerung der Konzentration an ungebundener *stem-loop*-RNA, was die initiale Abnahme der NMR-Signalintensität der Imino-Protonen bedingte.

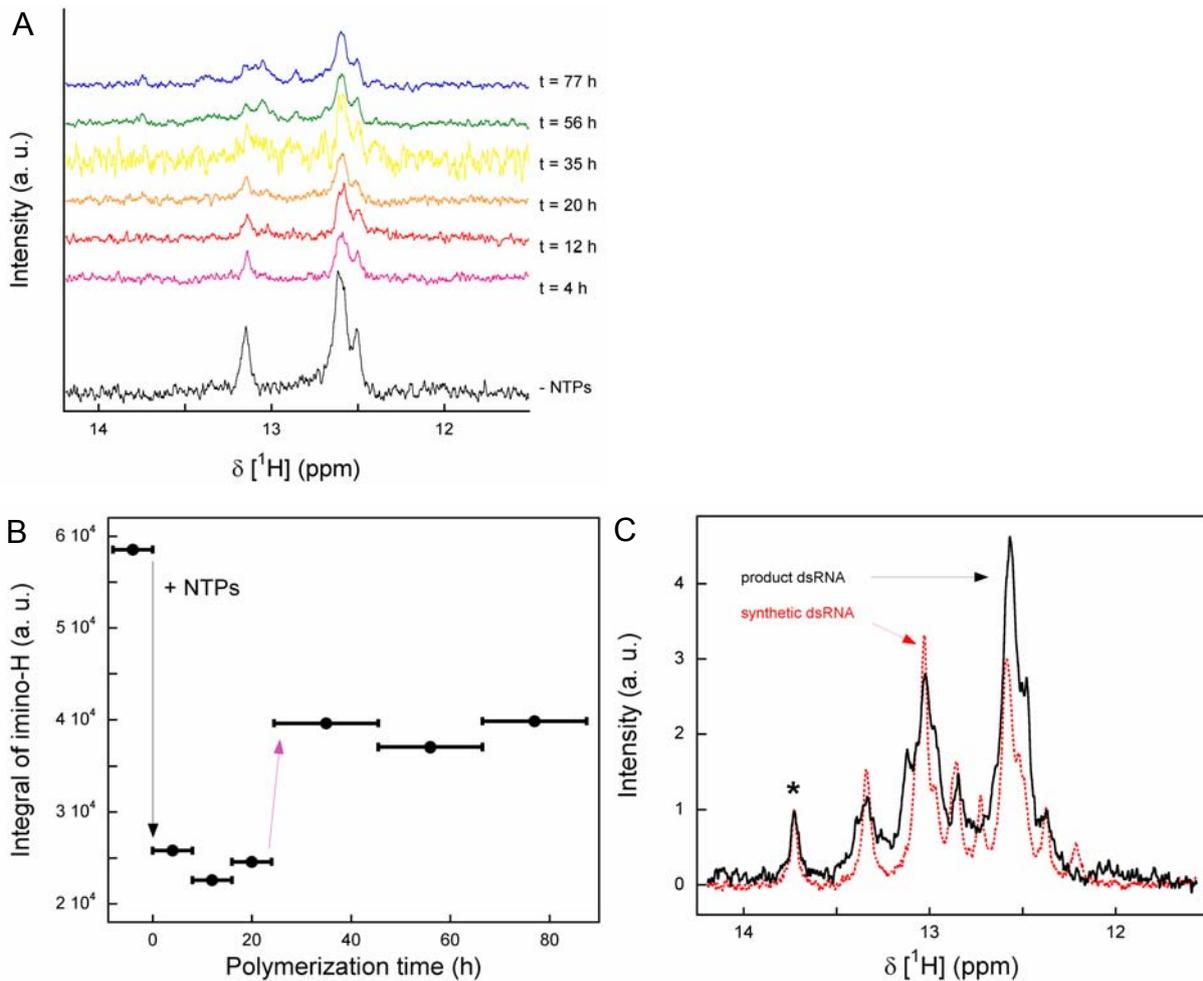


Abbildung 17: Die RNA-abhängige RNA-Polymerisationsreaktion detektiert mit 1D  $^1\text{H}$  NMR-Spektroskopie.

A) Die RNA-abhängige RNA-Polymerisationsreaktion wurde mit 1D  $^1\text{H}$  NMR-Spektroskopie verfolgt. Dargestellt ist der spektrale Bereich sensitiv für die Imino-Protonen doppelsträngiger Nucleinsäuren. Spektren von 30  $\mu\text{M}$  HCV-Polymerase und 30  $\mu\text{M}$  stem-loop RNA (etwa 20  $\mu\text{M}$  Binärkomplex) (schwarz) nach Inkubation mit 500  $\mu\text{M}$  NTPs wurden für 0 – 8 h (violett), 8 – 16 h (rot), 16 – 24 h (orange), 24 – 45 h (gelb), 45 – 66 h (grün) und 66 – 87 h (blau) aufgenommen. In Folge der Polymerisationsreaktion mit der Produktbildung (doppelsträngige RNA) entwickelt sich pro gebildete Basenpaarung ein NMR-Signal dieser neuen Imino-Protonen. Das Fehlen von detektierbaren RNA-Intermediaten deutet auf eine prozessive Reaktion.

B) Das Integral der NMR-Signale der Imino-Protonen (sensitiv für Basenpaare) ist gegen die Reaktionszeit entsprechend einer Progresskurve aufgetragen. Der  $K_M$ -Wert für die RNA-Matrize im Katalyse-kompetenten Holoenzym ist kleiner als der entsprechende  $K_D$ -Wert und bedingte die initiale Abnahme der absoluten NMR-Signalintensität der Imino-Protonen durch Zugabe der Nucleotide. Mit fortschreitender Polymerisation und doppelsträngiger RNA-Produktbildung entwickelten sich zusätzliche NMR-Signale von Imino-Protonen.

C) Das durch die HCV-Polymerase katalysierte doppelsträngige RNA-Produkt aus der *stem-loop*-RNA als Matrize und Nukleotiden (schwarz) ist dem zu erwartenden chemisch synthetisierten RNA-Produkt (rot) gegenübergestellt. Gezeigt sind die 1D  $^1\text{H}$  NMR-Spektren der Nucleinsäuren in dem spektralen Bereich sensitiv für Basenpaarungen, normiert auf das markierte NMR-Signal bei 13.75 ppm. Das Integral dieses NMR-Signals entspricht etwa 0.05 des gesamten Integrals der NMR-Signale der Imino-Protonen.

### **III. Anwendung der etablierten Methoden auf andere Systeme: Cyclophilin B – eine humane Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerase mit Nukleinsäure-Bindungseigenschaften.**

Die bisher beschriebenen Methoden wie die Verwendung Fluorophor-markierter Nukleinsäuren zur Quantifizierung von Interaktionen oder die 1D <sup>1</sup>H NMR-Spektroskopie zur strukturellen Aufklärung von Nukleinsäuren sind nicht auf die Charakterisierung von HCV-Polymerase-RNA-Wechselwirkungen beschränkt. Vielmehr können sie allgemein zur Untersuchung von Protein-Nukleinsäure-Interaktionen angewandt werden. Dies soll im Folgenden kurz am Beispiel des humanen Proteins Cyclophilin B, beschrieben als ein Protein mit Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Aktivität [127], gezeigt werden.

Ursprünglich war Cyclophilin B eine Rolle in der Replikation des Hepatitis C Virus zugeschrieben worden. Dies beruhte zum Teil auf der HCV-inhibierenden Wirkung mancher PPIase-Inhibitoren. Desweiteren zeigte eine Studie, dass spezifisch Cyclophilin B die RNA-Bindungseigenschaft der HCV-Polymerase verstärkt [125]. In der aktuellen Fachliteratur wird nun allerdings Cyclophilin A als *target* beschrieben, eine Reduktion des Gehalts an zellulärem Cyclophilin B wirkt sich nicht auf die HCV-Replikation aus [133]. Im Zuge dieser vorliegenden Arbeit sollte ursprünglich auch der Einfluss von Cyclophilin B auf die RNA-Bindung der HCV-Polymerase untersucht werden. Allerdings konnte bisher kein direkter Effekt auf die HCV-Polymerase festgestellt werden. Wie im Folgenden ausgeführt ist wurde vielmehr beobachtet, dass Cyclophilin B selbst die Eigenschaft besitzt, zumindest *in vitro* mit Nukleinsäuren zu interagieren.

#### **III. I. Cyclophilin B wechselwirkt mit Nukleinsäuren.**

##### **III. I. I. Quantifizierung der Interaktion von Cyclophilin B und *stem-loop*-RNA beziehungsweise DNA.**

Wie oben gezeigt, kann durch die Verwendung Fluorophor-markierter Nukleinsäuren die Wechselwirkung von Proteinen und Nukleinsäuren quantifiziert werden. Die Zugabe von Cyclophilin B zu 5'-FAM-markierten Nukleinsäuren resultierte in einer Abnahme der Fluoreszenzintensität der markierten Nukleinsäure auf Grund einer

Komplexbildung. In Abbildung 18 ist dies exemplarisch für die in den vorherigen Kapiteln beschriebene *stem-loop*-RNA (HCV) sowie die äquivalente Desoxyribonukleinsäure gezeigt. Eine Auswertung der erhaltenen Isothermen nach Gleichung 4 und 5 (Seite 28) lieferte die entsprechenden Affinitäten. Die Interaktion von Cyclophilin B und *stem-loop*-RNA konnte mit  $K_D = 2.6 \mu\text{M}$  bestimmt werden, die der *stem-loop*-DNA mit  $K_D = 5.5 \mu\text{M}$ . Die höhere Affinität zu der RNA legt nahe, dass Ribonukleinsäuren und nicht Desoxyribonukleinsäuren möglicherweise natürliche Interaktionspartner von Cyclophilin B sind.

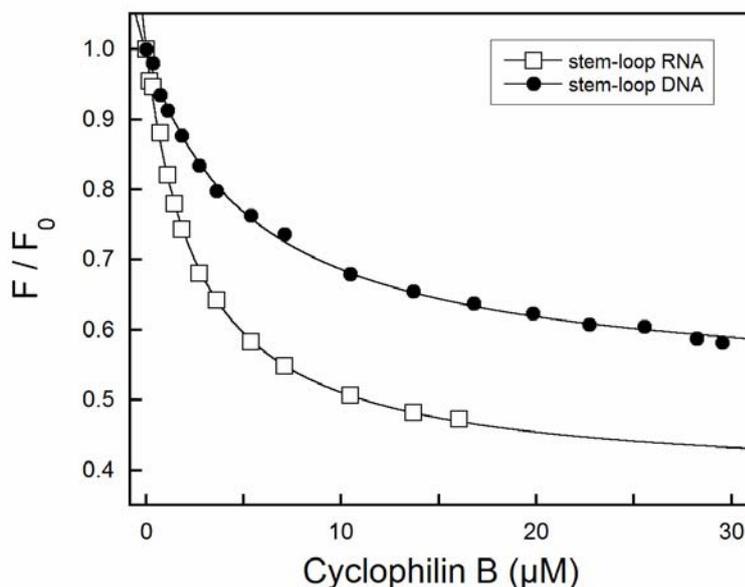


Abbildung 18: Cyclophilin B bindet DNA und RNA.

Die relative Änderung des Fluoreszenzsignals von  $0.06 \mu\text{M}$  5'-FAM-markierter *stem-loop*-RNA (offene Quadrate) sowie *stem-loop*-DNA (geschlossene Kreise) durch Bindung an Cyclophilin B ermöglichte nach Gleichung 4 (Seite 28) die Quantifizierung der Interaktion. Mit einem  $K_D$  (*stem-loop*-RNA) =  $2.6 \mu\text{M}$  ist die Affinität von Cyclophilin B zu *stem-loop*-RNA höher als zu der entsprechenden DNA ( $K_D$  (*stem-loop*-DNA) =  $5.5 \mu\text{M}$ ).

### III. I. II. Die Beiträge von ionischen und nicht-ionischen Wechselwirkungen zur Bindung von Cyclophilin B und der *stem-loop*-RNA.

Durch Bestimmung der Affinitäten von Cyclophilin B und der *stem-loop*-RNA von HCV in Abhängigkeit von der Ionenstärke und / oder Hydrophobizität konnte die

Komplexbildung näher charakterisiert werden. Analog zu Kapitel I. I. und II. II. I. resultierte eine Erhöhung der Ionenstärke des Systems durch NaCl in einer verringerten Affinität von Protein und RNA (Abbildung 19). NaCl störte die Interaktion entsprechend einer linearen freien Enthalpiebeziehung ( $\Delta G = \Delta G^0 - m \cdot [\text{NaCl}]$ ) mit  $m = -67.1 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$  bei  $\Delta G^0 = -30.8 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Mit  $\Delta G^0$  wird hier die freie Gibbs'sche Reaktionsenthalpie der Interaktion bei 0 mM NaCl in 50 mM HEPES/NaOH, 6.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM TCEP, pH = 7.5 und  $T = 295.6 \text{ K}$  bezeichnet. Auch eine Erhöhung der Hydrophobizität durch Zugabe von Glycerin resultierte in einer verminderten Protein-RNA-Komplexbildung, die Abhängigkeit von der Ionenstärke blieb aber unbeeinflusst. Zugabe von 20% (v/v) Glycerin (etwa 2.74 M) führten zu einer Abnahme der gesamten freien Bindungsenthalpie um  $\Delta\Delta G = 2 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Neben starken ionischen Wechselwirkungen tragen also auch hydrophobe Interaktionen zur Komplexbildung von Cyclophilin B und der *stem-loop*-RNA bei.

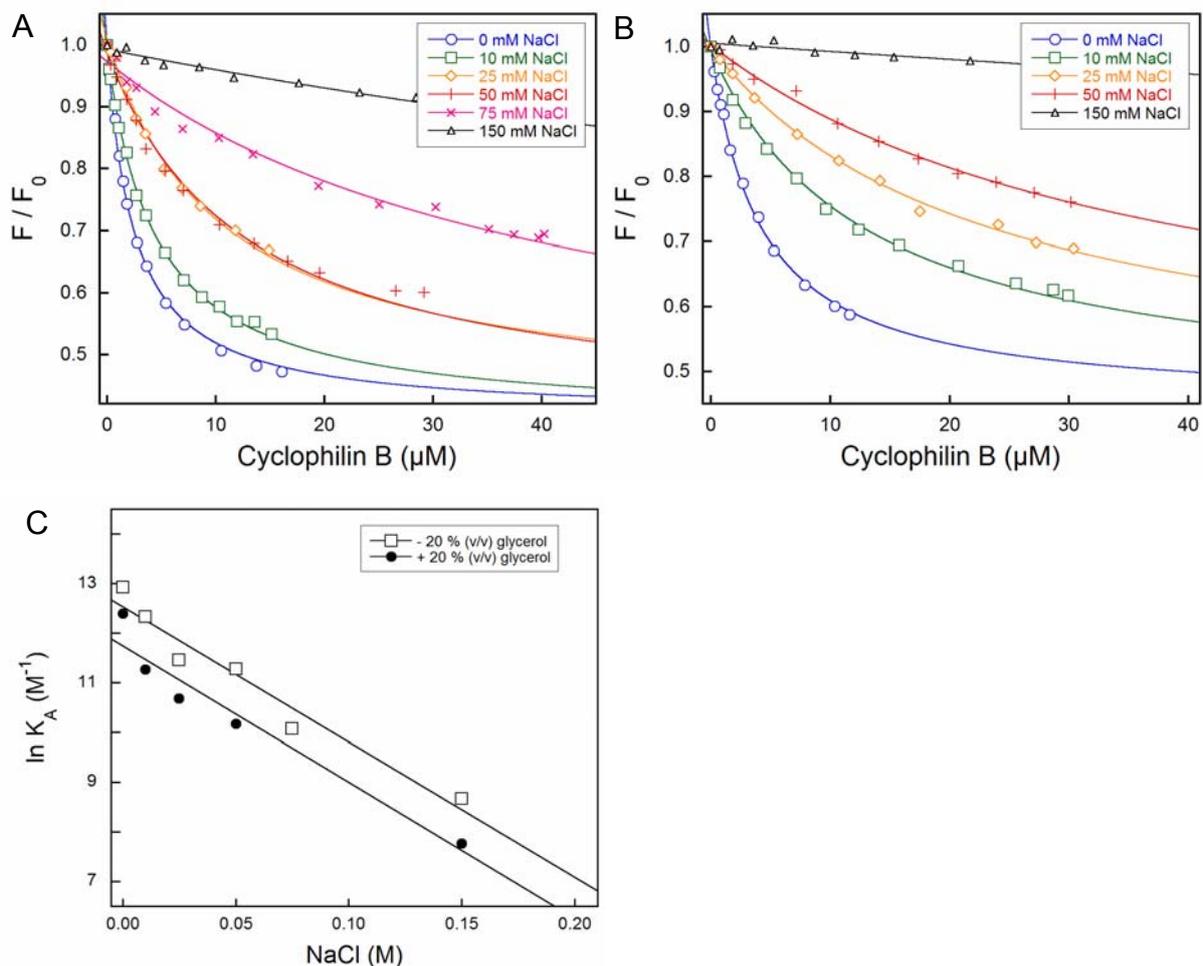


Abbildung 19: Die Interaktion von Cyclophilin B und stem-loop-RNA in Abhängigkeit von der Ionenstärke und Hydrophobizität.

A) Dargestellt ist die Fluoreszenzänderung relativ zur Ausgangsfluoreszenz von 0.06  $\mu\text{M}$  FAM-markierter stem-loop-RNA durch Bindung an Cyclophilin B bei 0 mM (blau), 10 mM (grün), 25 mM (gelb), 50 mM (rot), 75 mM (pink) und 150 mM NaCl (schwarz) in 50 mM HEPES/NaOH, 6.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM TCEP, pH = 7.5 bei  $T = 295.6$  K. Durch eine Regression der Datenpunkte nach Gleichung 4 (Seite 28) erhält man die jeweiligen Dissoziationskonstanten.

B) Die Fluoreszenzänderung relativ zur Ausgangsfluoreszenz von 0.06  $\mu\text{M}$  FAM-markierter stem-loop-RNA durch Bindung von Cyclophilin B ermöglichte die Quantifizierung der Interaktion. Es wurden Dissoziationskonstanten bei 0 mM (blau), 10 mM (grün), 25 mM (gelb), 50 mM (rot) und 150 mM NaCl (schwarz) in 50 mM HEPES/NaOH, 20% (v/v) Glycerin, 6.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM TCEP, pH = 7.5 bei  $T = 295.6$  K bestimmt.

C) Die Affinitäten von Cyclophilin B und stem-loop-RNA sind nach einer linearen freien Enthalpiebeziehung linear abhängig von der NaCl-Konzentration. Eine Regression entsprechend Gleichung 6 (siehe Seite 29) offenbarte eine Perturbation der Protein-RNA-Wechselwirkung durch NaCl mit  $m = -67 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$  bei  $\Delta G^0 = -31 \text{ kJ mol}^{-1}$ .  $\Delta G^0$  entspricht hier der freien Gibbs'schen Reaktionsenthalpie der Interaktion bei 0 mM NaCl in 50 mM HEPES/NaOH, 6.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM TCEP, pH = 7.5 und  $T = 295.6$  K (offene Quadrate; siehe A). Die Präsenz von 20% (v/v) Glycerin (geschlossene Kreise; siehe B) beeinflusste nicht die Perturbation der Cyclophilin B-stem-loop-RNA-Interaktion durch NaCl ( $m = -67 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ), verringerte aber die gesamte freie Reaktionsenthalpie der Bindung um  $\Delta\Delta G = 2 \text{ kJ mol}^{-1}$ .

### III. II. Cyclophilin B besitzt zwei – scheinbar voneinander unabhängige – Funktionen.

#### III. II. I. Die Peptidyl-prolyl-cis/trans-Isomerase-Funktion von Cyclophilin B wird nicht beeinflusst durch die stem-loop-RNA.

Für das humane Protein Cyclophilin B ist die Katalyse von Peptidyl-prolyl-cis/trans-Isomerisierungen als enzymatische Aktivität beschrieben [127], die über eine etablierte Methode detektiert werden kann [134-136]. Sie beruht auf der proteolytischen Spaltung des kurzen Peptid-Derivates Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA durch  $\alpha$ -Chymotrypsin ausschließlich in dessen trans-Konformation und der daraus resultierenden Freisetzung der spektroskopischen Sonde pNA. Dies kann über die Absorptionzunahme bei 390 nm zeitaufgelöst verfolgt werden. Eine zugegebene Peptidyl-prolyl-cis/trans-Isomerase (PPIase) beschleunigt die cis-trans-Isomerisierung des markierten Peptids, somit dessen proteolytische Spaltung und Freisetzung der spektroskopischen Sonde. Durch Zugabe von Additiven kann man

deren Einfluss auf die Reaktion untersuchen (Abbildung 20). So wurde bei steigenden Konzentrationen an *stem-loop*-RNA die *cis-trans*-Isomerisierung des Modell-Peptids durch Cyclophilin B verfolgt und die Auswirkung der *stem-loop*-RNA auf die PPlase-Funktion von Cyclophilin B bestimmt. RNA hatte keinen Einfluss auf die proteolytische Aktivität von  $\alpha$ -Chymotrypsin. In Übereinstimmung mit publizierten Daten wurde eine katalytische Effizienz von Cyclophilin B ( $k_{\text{cat}} / K_{\text{M}}$ ) von etwa  $8 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$  ermittelt (siehe Seite 33) [127]. Auch bei der höchsten gemessenen RNA-Konzentration, bei der mit dem  $K_{\text{D}} = 3 \text{ }\mu\text{M}$  etwa 77 % Cyclophilin B mit der RNA wechselwirken sollten, konnte kein merklicher Einfluss auf die PPlase-Funktion detektiert werden.

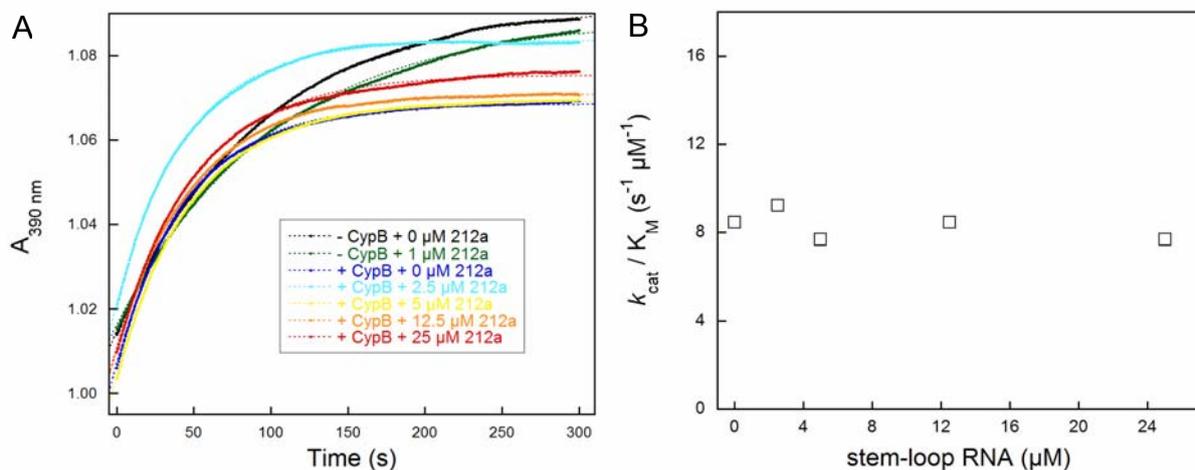


Abbildung 20: Die PPlase-Aktivität von Cyclophilin B ist unbeeinflusst von der untersuchten RNA-Interaktion.

A) Mit der von Fischer *et al.* etablierten Methode wurde die PPlase-Aktivität von 1.3 nM Cyclophilin B bei 0  $\mu\text{M}$  (blau), 2.5  $\mu\text{M}$  (hellblau), 5  $\mu\text{M}$  (gelb), 12.5  $\mu\text{M}$  (orange) und 25  $\mu\text{M}$  (rot) *stem-loop*-RNA bei 283.15 K bestimmt. Die unkatalysierte *cis* zu *trans* Umwandlung des Substrats Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA und Freisetzung der spektroskopischen Sonde pNA durch  $\alpha$ -Chymotrypsin wurde ohne (schwarz) und mit 1  $\mu\text{M}$  (grün) *stem-loop*-RNA verfolgt. Durch die Anpassung der Progresskurven an eine Reaktion 1. Ordnung konnten die Geschwindigkeitskonstanten der unkatalysierten Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung des Substrats mit  $k = 0.01 \text{ s}^{-1}$  und der durch 1.3 nM Cyclophilin B katalysierten mit  $k_{+\text{PPI}} = 0.021 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$  bestimmt werden.

B) Die unkatalysierte Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung mit  $k = 0.01 \text{ s}^{-1}$  wurde von den Geschwindigkeitskonstanten der durch Cyclophilin B katalysierten Reaktion abgezogen. Diese Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{cat}}$  der PPlase-Aktivität wurde durch die Enzymkonzentration dividiert und als katalytische Effizienz ( $k_{\text{cat}} / K_{\text{M}}$ ) in Abhängigkeit der *stem-loop*-RNA dargestellt.

### III. II. II. Die Bindung von Nucleinsäuren ist unbeeinflusst durch Cyclosporin A, einem *active-site* Inhibitor der PPlase-Aktivität von Cyclophilin B.

Im vorherigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass die Bindung der *stem-loop*-RNA die PPlase-Funktion von Cyclophilin B nicht beeinflusst. Nun sollte geklärt werden, ob die Nucleinsäure-Bindung von Cyclophilin B durch die PPlase-Funktion beeinträchtigt ist. Dazu wurde die Affinität von Cyclophilin B und der *stem-loop*-RNA bei steigenden Konzentrationen von Cyclosporin A (CsA) bestimmt. Cyclosporin A, ein zyklisches Undekapeptid-Derivat, ist ein sehr gut charakterisierter PPlase-Inhibitor. Er bindet im aktiven Zentrum der PPlase-Funktion und wirkt als kompetitiver Inhibitor mit nanomolarer Affinität [127]. Abbildung 21 A zeigt die Bindungskurven von jeweils 0.06  $\mu\text{M}$  *stem-loop*-RNA und Cyclophilin B bei den angegebenen CsA-Konzentrationen. Die erhaltenen Dissoziationskonstanten sind in Abbildung 21 B gegen die jeweilige Konzentration an CsA aufgetragen. Über den gesamten Messbereich konnte kein merklicher Einfluss von Cyclosporin A auf die *stem-loop*-RNA-Bindung von Cyclophilin B festgestellt werden.

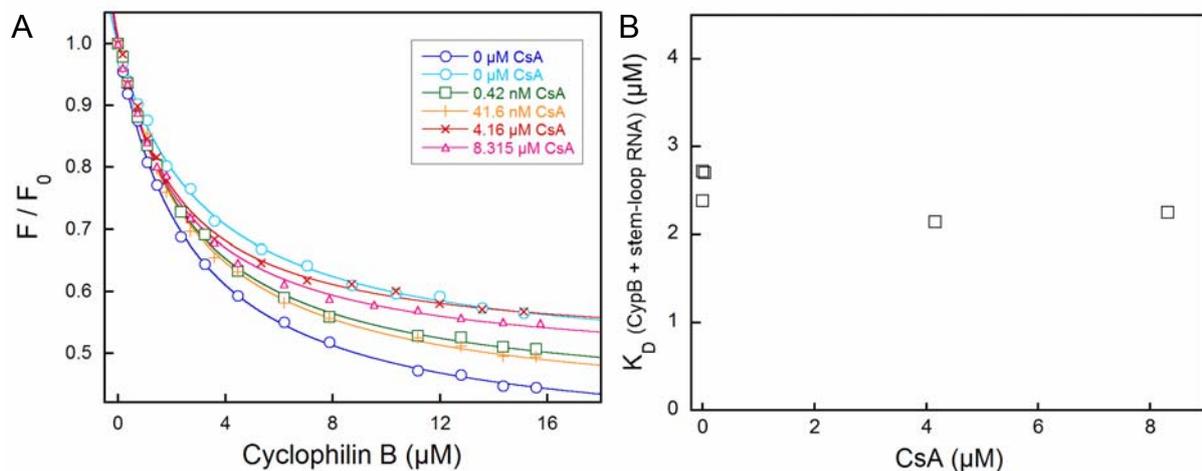


Abbildung 21: Die Bindung von *stem-loop*-RNA und Cyclophilin B ist unabhängig von dem PPlase-Inhibitor CsA.

A) Dargestellt ist die Fluoreszenzänderung relativ zur Ausgangsfluoreszenz von 0.06  $\mu\text{M}$  FAM-markierter *stem-loop*-RNA durch Bindung an Cyclophilin B bei 0 nM (blau und hellblau), 0.42 nM (grün), 42 nM (gelb), 4.2  $\mu\text{M}$  (rot) und 8.3  $\mu\text{M}$  (pink) Cyclosporin A.

B) Eine Regression der Bindungskurven nach Gleichung 4 (Seite 28) lieferte eine Dissoziationskonstante von  $K_D = 2.5 \pm 0.4$   $\mu\text{M}$  der Interaktion von Cyclophilin B und der *stem-loop*-RNA und war unabhängig von der verwendeten CsA-Konzentration.

### III. III. Zwei Moleküle Cyclophilin B binden – im Gleichgewicht – an ein Molekül der untersuchten *stem-loop*-RNA.

Im Folgenden wurde die Stöchiometrie der Interaktion von Cyclophilin B und der *stem-loop*-RNA eingehender mittels Sedimentationsanalysen charakterisiert. Verglichen mit den molekularen Massen beider Interaktionspartner, Cyclophilin B ( $M = 22$  kDa) und *stem-loop*-RNA ( $M = 7$  kDa), sollte eine Komplexbildung zu einem höheren apparenten Molekulargewicht und einer schnelleren Sedimentation führen. So wurden konstant  $20 \mu\text{M}$  *stem-loop*-RNA mit steigenden Konzentrationen an Cyclophilin B präinkubiert und anschließend bei  $40000$  rpm in einer analytischen Ultrazentrifuge analysiert. Die Sedimentation der Protein-RNA-Gemische wurde bei der analytischen Wellenlänge von  $294$  nm verfolgt. Aus den aufgenommenen Sedimentationskurven konnte jeweils der Sedimentationskoeffizient  $S$  bestimmt werden. Da in vorangegangenen Experimenten ein  $K_D$ -Wert von Cyclophilin B und *stem-loop*-RNA von  $3 \mu\text{M}$  bestimmt worden war, sollte bei den hier eingesetzten Konzentrationen beider Interaktionspartner das Gleichgewicht stark auf der Seite des Protein-RNA-Komplexes liegen.

Bis zu einem molaren Verhältnis von 2 Molekülen Cyclophilin B zu 1 Molekül *stem-loop*-RNA) wurde ein linear steigender apparenter Sedimentationskoeffizient detektiert (Abbildung 22). Eine weitere Erhöhung des molaren Verhältnisses der Reaktionspartner führte nicht zu einer weiteren Steigerung des apparenten Sedimentationskoeffizienten. Tatsächlich wurde eine scheinbar verlangsamte Sedimentation detektiert. Überschüssiges, daher ungebundenes Cyclophilin B verkleinerte den apparenten Sedimentationskoeffizienten wieder. Das molare Verhältnis von Cyclophilin B zu *stem-loop*-RNA des maximalen apparenten Sedimentationskoeffizienten entsprach der Stöchiometrie der Bindung. Es wurde keine Aggregation beobachtet, so dass von einem definierten, löslichen Komplex bestehend aus zwei Molekülen Cyclophilin B und einem Molekül der *stem-loop*-RNA ausgegangen werden kann.

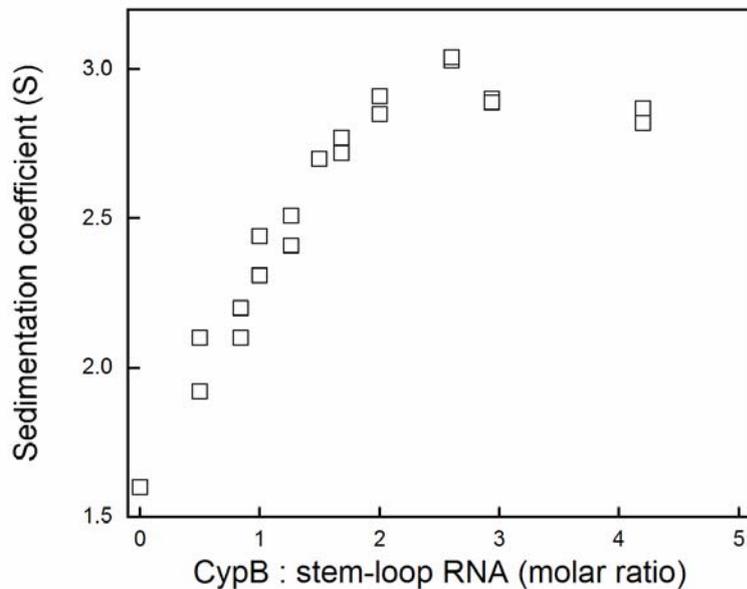


Abbildung 22: Analyse der Interaktion von Cyclophilin B und stem-loop-RNA mittels analytischer Ultrazentrifugation.

Jeweils 20  $\mu\text{M}$  der stem-loop-RNA wurden mit steigenden Konzentrationen an Cyclophilin B inkubiert. Mittels analytischer Ultrazentrifugation wurde der Sedimentationskoeffizient des Gemisches bestimmt und gegen das molare Verhältnis von Cyclophilin B zu stem-loop-RNA aufgetragen. Das Maximum des Sedimentationskoeffizienten entspricht dem stöchiometrischen Verhältnis einer vollständigen Interaktion von Protein und RNA und liegt bei etwa 2 Molekülen Cyclophilin B zu 1 Molekül der stem-loop-RNA.

### III. IV. Strukturelle Änderungen der stem-loop-RNA durch Interaktion mit Cyclophilin B detektiert mittels NMR-Spektroskopie.

Die  $^1\text{H}$  NMR-Spektroskopie der stem-loop-RNA eignete sich hervorragend, um einige strukturelle Informationen zu gewinnen und fand bei der Charakterisierung der Bindung an Cyclophilin B Verwendung. Es wurden 1D  $^1\text{H}$  NMR-Spektren von konstant 54  $\mu\text{M}$  stem-loop-RNA bei verschiedenen Konzentrationen von Cyclophilin B aufgenommen. Begonnen wurde mit einem molaren Verhältnis von Cyclophilin B zur stem-loop-RNA von 5 zu 1. Nach Aufnahme eines akkumulierten Spektrums wurde unter Beibehaltung von konstant 54  $\mu\text{M}$  stem-loop-RNA das Protein verdünnt. In Abbildung 23 A ist der spektrale Bereich sensitiv für die Imino-Protonen der Nukleinsäure-Basenpaarungen gezeigt. Die 5 beziehungsweise 6 Basenpaare sind

markiert (siehe Abbildung 15). Die zwei Signale bei 12.0 und 11.5 ppm stammen von den beiden Tryptophanen des Proteins Cyclophilin B. Abnehmende Konzentrationsverhältnisse von Cyclophilin B zur *stem-loop*-RNA führten zu einem Anstieg der Signalintensitäten der Imino-Protonen der Basenpaarungen auf das Ausgangsniveau freier *stem-loop*-RNA. Die Reversibilität der Interaktion wurde so gezeigt. In Abbildung 23 C ist das Integral der Signale der Imino-Protonen gegen die entsprechende Konzentration an Cyclophilin B, beziehungsweise das molare Verhältnis von Cyclophilin B zu *stem-loop*-RNA, aufgetragen. Bis zu einem Verhältnis von etwa 2.3 Molekülen Cyclophilin B zu einem Molekül RNA ergab sich eine lineare Abnahme des Integrals der NMR-Signale der Imino-Protonen. Eine weitere Erhöhung der Proteinkonzentration veränderte diese NMR-Signale nicht mehr, der Komplex aus Cyclophilin B und *stem-loop*-RNA hatte sich vollständig gebildet. Bei den eingesetzten 54  $\mu\text{M}$  *stem-loop*-RNA und einem  $K_D = 3 \mu\text{M}$  lag das Gleichgewicht stark auf der Seite des Komplexes. Im Rahmen der Messtoleranzen binden daher 2 Moleküle Cyclophilin B an ein Molekül der *stem-loop*-RNA.

Betrachtet man die NMR-Signale der Imino-Protonen von G<sub>13</sub>, G<sub>14</sub>, G<sub>15</sub>, G<sub>16</sub> und G<sub>3</sub> der *stem-loop*-RNA bei steigender Konzentration an Cyclophilin B genauer (Abbildung 23 B), so fällt neben der allgemeinen Intensitätsabnahme eine chemische Verschiebung der einzelnen Signale auf. Die Signale bei etwa 12.61 ppm (G<sub>3</sub>) und 12.57 ppm (G<sub>13</sub>) erfahren durch die Wechselwirkung mit Cyclophilin B eine Hochfeld-Verschiebung um etwa 0.01 ppm in Richtung stärker abgeschirmter Kerne. Das Signal bei etwa 12.50 ppm (G<sub>15</sub>) verschiebt sich im Komplex um circa 0.01 ppm Richtung Tieffeld zu „elektronisch“ stärker abgeschirmten Kernen.

Nicht nur auf die NMR-Signale sensitiv für durch Wasserstoffbrückenbindungen zweier Nukleobasen fixierter Imino-Protonen, sondern auch in anderen spektralen Bereichen konnten Einflüsse von Cyclophilin B auf die *stem-loop*-RNA beobachtet werden. In Abbildung 23 D ist ein <sup>1</sup>H NMR-Signal bei 1.75 ppm zu sehen, das erst bei einem molaren Verhältnis von 2.3 Cyclophilin B zu 1 *stem-loop*-RNA beobachtbar war und mit abnehmender Proteinkonzentration wieder verschwand. Sowohl der Ursprung dieses Signals, als auch dessen ungewöhnliche Abhängigkeit von der Protein- und RNA-Konzentration, ist unbekannt.

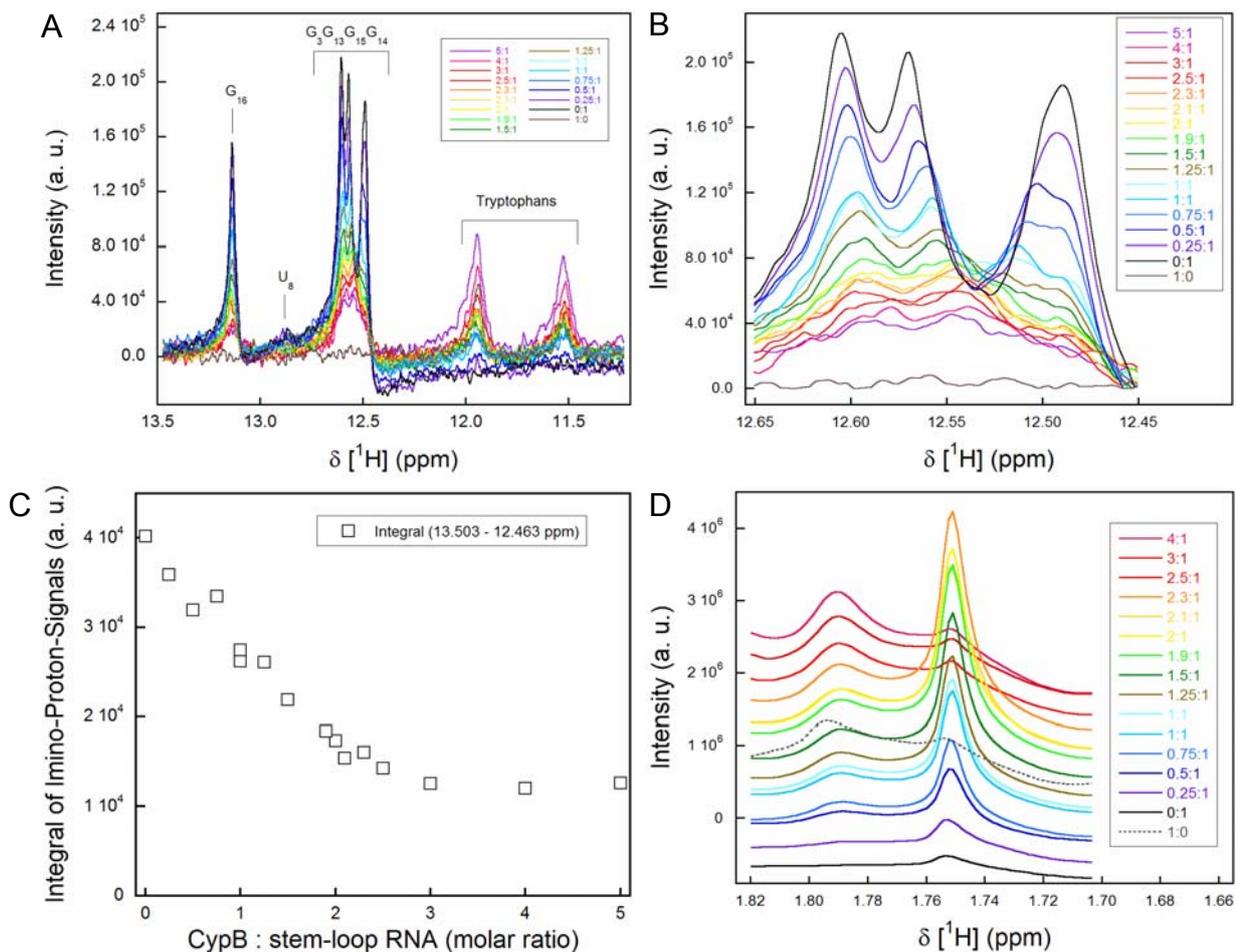


Abbildung 23: Die Interaktion von Cyclophilin B und stem-loop-RNA detektiert mittels 1D  $^1\text{H}$  NMR-Spektroskopie.

A) 1D  $^1\text{H}$  NMR-Spektren des Bereichs sensitiv für Nucleinsäure-Basenpaarungen von 54  $\mu\text{M}$  stem-loop-RNA und 0 – 270  $\mu\text{M}$  Cyclophilin B. Die molaren Verhältnisse von Cyclophilin B zu RNA sind in der Legende gekennzeichnet. Das Spektrum 1:0 (grau) entspricht 54  $\mu\text{M}$  Cyclophilin B in Abwesenheit von RNA. Gekennzeichnet sind Imino-Protonen der 5 beziehungsweise 6 Basenpaarungen der stem-loop-RNA (siehe Abbildung 15) sowie der zwei Tryptophane des Proteins. Mit Zunahme der Konzentration an Cyclophilin B nahmen die NMR-Signalintensitäten der Imino-Protonen der stem-loop-RNA ab. Dieser Prozess war reversibel.

B) Nahaufnahme der 1D  $^1\text{H}$  NMR-Spektren von 0 – 270  $\mu\text{M}$  Cyclophilin B und 54  $\mu\text{M}$  stem-loop-RNA (molares Verhältnis siehe Legende) in dem spektralen Bereich sensitiv für die Imino-Protonen der Basenpaarungen  $\text{G}_3\text{C}_{17}$ ,  $\text{C}_5\text{G}_{15}$ ,  $\text{C}_6\text{G}_{14}$  und  $\text{C}_7\text{G}_{13}$ . Mit steigender Proteinkonzentration kam es durch Protein-RNA-Komplexbildung zu einer Zunahme der apparenten molekularen Masse, einer verlangsamten Rotationszeit und einer allgemeinen Abnahme der NMR-Signalintensitäten der stem-loop-RNA. Außerdem wurde eine chemische Verschiebung einzelner NMR-Signale der Imino-Protonen um etwa 0.01 ppm durch Interaktion mit Cyclophilin B beobachtet.

C) Die allgemeine Abnahme der Intensitäten der NMR-Signale der Imino-Protonen durch Komplexbildung mit Cyclophilin B und dadurch verlangsamter Rotationszeit kann zur Quantifizierung der Bindung verwendet werden. Das Integral der NMR-Signale der Imino-Protonen der stem-loop-

RNA nahm linear mit steigendem molarem Verhältnis von Cyclophilin B zu *stem-loop*-RNA bis etwa 2:1 ab. Eine weitere Erhöhung der Proteinkonzentration hatte keinen Effekt auf die NMR-Signale der Imino-Protonen der *stem-loop*-RNA. Bei einem molaren Verhältnis von 2 Molekülen Cyclophilin B zu einem Molekül *stem-loop*-RNA hatte sich der Komplex vollständig gebildet.

D) Bei einer chemischen Verschiebung von etwa 1.75 ppm ist in den 1D  $^1\text{H}$  NMR-Spektren von 0 – 270  $\mu\text{M}$  Cyclophilin B und 54  $\mu\text{M}$  *stem-loop*-RNA (molares Verhältnis siehe Legende) ein interessantes Signal unbekanntes Ursprungs zu beobachten. Es entwickelte sich kontinuierlich bis zu einem molaren Verhältnis von Cyclophilin B zu *stem-loop*-RNA von 2.3 : 1. Durch eine weitere Erhöhung der Proteinkonzentration konnte dieses Signal nicht mehr detektiert werden.

## Diskussion und Zusammenfassung

### **Mechanismus der Aktivität der RNA-abhängigen RNA-Polymerase des Hepatitis C Virus (Genotyp 1b) und die molekulare Wirkung des Inhibitors HCV-796.**

Eine RNA-abhängige RNA-Polymerisationsreaktion, wie sie von der HCV-Polymerase NS5B katalysiert wird, ist eine Zwei-Substrat-Reaktion. Sowohl die RNA-Matrize, als auch Nucleotide müssen von der Polymerase gebunden werden. Komplementär zu der RNA-Matrize lagern sich Nucleosid-Triphosphate an. Die 3'-Hydroxyl-Gruppe des bereits Matrizen-gebundenen RNA-Moleküls attackiert nukleophil das  $\alpha$ -Phosphoratom eines sich neu anlagernden Nucleosid-Triphosphats. Unter Freisetzung von Pyrophosphat wird das Nucleotid in den von 5' nach 3' wachsenden RNA-Strang eingebaut und dessen 3'-Hydroxyl-Gruppe kann in der nächsten Polymerisationsreaktion nun als nukleophiler Substituent fungieren. Auf Grund der Komplementarität des RNA-Substrats, der RNA-Matrize und des neu synthetisierten RNA-Strangs entsteht ein doppelsträngiges RNA-Produkt.

Durch die Fluoreszenzlöschung bei der Bindung von HCV-Polymerase an 5'-FAM-markierte RNA konnte die Komplexbildung untersucht und quantifiziert werden. Es wurde eine Affinität von  $K_D = 0.03 \mu\text{M}$  der HCV-Polymerase vom Genotyp 1b (Subtyp BK) zu einzelsträngiger RNA, bestehend aus 16 Nucleotiden, in 50 mM HEPES/NaOH, 20% (v/v) Glycerin, 6.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM TCEP, pH = 7.5 bei 295.6 K bestimmt. Zudem wurde der negative Einfluss von NaCl auf die Protein-RNA-Interaktion systematisch untersucht, um Aussagen über den Bindungsmodus zu erhalten. Eine Erhöhung der Ionenstärke, hier durch NaCl, perturbierte die ionischen Wechselwirkungen der bei physiologischem pH-Wert entgegengesetzt geladenen Makromoleküle HCV-Polymerase ( $pI = 9$ ) und einzelsträngige Nucleinsäure. Es ist mitunter schwierig, diese Ergebnisse mit anderen publizierten Ergebnissen zu vergleichen, da gleich mehrere Größen einen erheblichen Einfluss auf die Polymerase-RNA-Affinitäten haben. Zum einen die verschiedenen Aminosäuresequenzen der Polymerasen unterschiedlicher HCV-Genotypen und Subtypen, in Sequenz, Struktur und Länge unterschiedliche RNA-Matrizen sowie

unterschiedliche Reaktionsbedingungen. Im Zuge einer massenspektrometrischen Studie zur Identifizierung von RNA-Interaktionsstellen der Polymerase erforschte die Gruppe um CHENG C. KAO allerdings die auch in dieser Arbeit charakterisierte HCV-Polymerase des Genotyps 1b (Subtyp BK) [86]. Bei ähnlichen Reaktionsbedingungen (50 mM HEPES, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.002% Tween 20, pH = 7.5) wurde die minimale Länge einer einzelsträngigen RNA bestimmt, die notwendig für eine effektive Bindung an die HCV-Polymerase ist. In diesem Zusammenhang variierten Kim *et al.* die NaCl-Konzentration und bestimmten bei 50 mM, 75 mM, 100 mM und 125 mM NaCl die Affinitäten des Enzyms und einzelsträngiger RNA-Matrizen von 5, 7 und 14 Nukleotiden Länge. Die Zunahme der Anisotropie durch Komplexbildung werteten sie nach einer sigmoiden HILL-Gleichung aus. Die in der veröffentlichten Studie angegebenen K<sub>D</sub>-Werte der einzelnen RNA-Konstrukte sind in Abbildung 24 gegen die NaCl-Konzentration aufgetragen und der in dieser Arbeit untersuchten 16 Nukleotide langen einzelsträngigen RNA gegenüber gestellt. Sowohl die Affinitäten bei 0 mM NaCl, als auch die Abhängigkeit der Dissoziationskonstante von der NaCl-Konzentration stimmen im Rahmen der Messungenauigkeiten mit den hier durchgeführten Messungen überein. Kleinere Abweichungen sind eventuell reduzierenden Bedingungen, 20% (v/v) Glycerin statt 0.002% Tween 20, der unterschiedlichen RNA-Primärstruktur oder den 6 Histidinen am C-Terminus der von Kim *et al.* untersuchten HCV-Polymerase geschuldet.

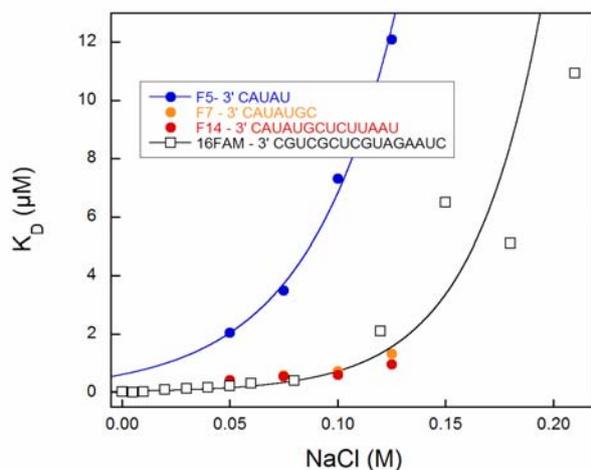


Abbildung 24: Vergleich der Affinitäten von HCV-Polymerase (Genotyp 1b, Subtyp BK) und einzelsträngigen RNAs aus unabhängigen Studien.

Die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Dissoziationskonstanten von HCV-Polymerase (Genotyp 1b, Subtyp BK) und der 16 Nukleotide langen einzelsträngigen RNA bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen (schwarze Quadrate) sind den von Kim *et al.* publizierten Daten gegenüber gestellt [86]. Kim *et al.* untersuchten bei ähnlichen Reaktionsbedingungen und fast identischer HCV-Polymerase die Affinitäten zu einzelsträngigen RNA-Konstrukten der Länge von 5 Nukleotiden (blaue Kreise), 7 Nukleotiden (gelbe Kreise) und 14 Nukleotiden (rote Kreise). Die in der publizierten Arbeit angegebenen  $K_D$ -Werte sind gegen die entsprechende Konzentration an NaCl aufgetragen und zeigen eine ähnliche Affinität sowie Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration wie die eigenen Daten. RNA-Konstrukte werden scheinbar erst ab 7 Nukleotiden Länge optimal gebunden.

Neben der Charakterisierung der Bindung von RNA-Matrize und HCV-Polymerase im Gleichgewicht konnte mit den in dieser Arbeit etablierten Methoden die Bindung auch zeitaufgelöst untersucht werden. Mehrere, mindestens 4 Phasen der Komplexbildung waren detektierbar, allerdings im Fall der HCV-Polymerase vom Genotyp 1b, Subtyp BK nicht die bimolekulare, initiale Bindungsreaktion zweiter Ordnung. Die 4 beobachteten Phasen der Reaktion mit  $k_{A1}' = 20 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{A2}' = 0.6 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{A3}' = 0.05 \text{ s}^{-1}$  und  $k_{A4}' \sim 0.003 \text{ s}^{-1}$  entsprechen intramolekularen Reaktionen pseudo 1. Ordnung, wie etwa Positionierungsreaktionen oder durch Bindung der RNA induzierte Konformationsänderungen der Polymerase. Solche Konformationsänderungen der HCV-Polymerase werden schon lange vermutet [83, 84, 91-93, 105, 107, 108, 110, 137] und konnten kürzlich von Rigat *et al.* durch limitierte Proteolyse der HCV-Polymerase bestätigt werden [138]. Unter der Annahme, dass die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation ( $k_{\text{off}}$ ) größer oder gleich der schnellsten beobachteten Geschwindigkeitskonstante der Assoziationsreaktion ( $k_{A1}' = 20 \text{ s}^{-1}$ ) sein muss, kann mit der bekannten Dissoziationskonstante ( $K_D = 0.03 \text{ }\mu\text{M}$ ) die bimolekulare Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{on}}$  abgeschätzt werden. Nach  $K_D = k_{\text{off}} / k_{\text{on}}$  ergibt sich  $k_{\text{on}}^{\text{calc}} \geq 600 \text{ s}^{-1} \text{ }\mu\text{M}^{-1}$ . Dies wäre, besonders bei 20% (v/v) Glycerin im Reaktionsansatz, am Diffusionslimit und kann auch mit *stopped-flow*-Kinetiken nicht mehr zeitlich aufgelöst werden. Nicht ausgeschlossen werden kann aber, dass die initiale Bindung von HCV-Polymerase (Genotyp 1b, Subtyp BK) und der 5'-Fluoreszenz-markierten einzelsträngigen RNA spektroskopisch unsichtbar ist.

Das zweite Substrat, essentiell für die Bildung einer doppelsträngigen Produkt-RNA, ist jeweils das Nukleosid-Triphosphat komplementär zur RNA-Matrize. Mittels Circular dichroismus konnte diese Interaktion detektiert und quantifiziert werden. Neben Affinitäten von  $S_{0.5}(\text{ATP}) = 0.05 \text{ mM}$ ,  $S_{0.5}(\text{GTP}) = 0.04 \text{ mM}$ ,

$S_{0.5}$  (CTP) = 0.05 mM und  $S_{0.5}$  (UTP) = 0.09 mM wurde bei der Bindung von HCV-Polymerase und jeweils den einzelnen vier NTPs eine positive Kooperativität mit einem HILL-Koeffizient von  $\sim 1.7$  detektiert. Zumindest in Abwesenheit der RNA-Matrize können jeweils 2 Nukleotid-Moleküle an die HCV-Polymerase binden, wobei das erste Bindungsereignis das zweite begünstigt. Denkbar ist, dass ein NTP-Molekül an der Nukleotidbindestelle der Polymerase bindet und das zweite, auf Grund der chemischen Ähnlichkeit zur RNA-Matrize, in der RNA-Bindestelle. Eine andere Erklärung wäre, dass sich auch in Abwesenheit von einer RNA-Matrize zwei Nukleotide im aktiven Zentrum der Polymerase anlagern, bereit zu einer Matrizen-unabhängigen Bildung eines Dinukleotids. Auch in Kristallstrukturen der HCV-Polymerase, inkubiert mit Nukleotiden, wurden im aktiven Zentrum Elektronendichten entsprechend zweier Moleküle NTP detektiert [87, 91]. Veröffentlichte Affinitäten der Nukleotide zur Polymerase sind bisher als  $K_M$  ausgedrückt worden und beziehen sich auf den Einfluss der NTPs auf die RNA-Produktbildungsreaktion. Dabei werden, abhängig von den allgemeinen und speziellen Reaktionsbedingungen,  $K_M$ -Werte im  $\mu$ M-Bereich detektiert [89, 102, 139]. Gravierende Unterschiede werden zwischen der Initiationsreaktion, des Einbaus der ersten 2 – 4 Nukleotide und der Elongationsphase beobachtet.  $K_M$ -Werte der Nukleotide für die Initiationsphase liegen im unteren millimolaren Bereich, für die Elongationsphase im unteren mikromolaren Bereich [107, 140]. Die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Methoden ermöglichen die Quantifizierung der Nukleotid-Bindung in Abwesenheit von RNA-Matrize und zeigen, dass beide Substrate, sowohl die RNA-Matrize als auch Nukleotide, einzeln gebunden werden können. Da sich durch Interaktion mit NTPs die Elliptizität der HCV-Polymerase entsprechend Sekundär- oder Tertiärstrukturänderungen änderte bedeutet dies, dass Nukleotide eine Konformationsänderung der HCV-Polymerase induzieren. Leider kann solch eine Konformationsänderung in Kristallstrukturen nur begrenzt beobachtet werden. Dies mag daran liegen, dass nicht alle möglichen Konformationen kristallisierbar sind [105]. Eine elegante Studie von Rigat *et al.* belegt aber, dass in Lösung Konformationsänderungen der Polymerase existieren [138]. Danach wird durch die Bindung von RNA-Matrize in einer ersten Konformationsänderung eine Region der HCV-Polymerase proteolytisch zugänglich. Nach Zugabe von Nukleotiden hebt offenbar eine zweite Konformationsänderung der HCV-Polymerase diese Hypersensitivität wieder auf. Betrachtet man die Struktur des Enzyms, ähnelt sie

einer rechten Hand mit Daumen-, Handfläche- und Finger-Domäne. Finger- und Daumen-Domäne sind durch Wechselwirkungen des ‚ $\Delta 1$  loop‘ von ‚Finger 1‘ und einer hydrophoben Tasche in der Daumen-Domäne in engem Kontakt und umschließen das aktive Zentrum. Niedermolekulare Verbindungen, die diese Wechselwirkung unterbinden, wirken als allosterische Inhibitoren der HCV-Polymerase. Genau wie auch die Bindung von RNA resultieren sie in einer proteolytisch zugänglichen ‚offenen‘ Konformation der Polymerase, in deren Folge der ‚Finger 1‘ proteolytisch angreifbar wird (Rigat *et al.*). Eine Addition von Nukleotiden zu der RNA-induzierten ‚offenen‘ Konformation schützt den ‚Finger 1‘ wieder vor Proteolyse, vergleichbar mit der Situation im Apoenzym. Die Konformationsänderung durch NTPs induziert also nach Rigat *et al.* offenbar wieder eine ‚geschlossene‘ Konformation. Neben dieser Bindungsstelle für allosterische Inhibitoren an der Daumen-Finger-Grenzfläche gibt es weitere über das gesamte Protein verteilte Interaktionsstellen. Allen gemeinsam ist, dass sie vermutlich Konformationsänderungen im Zuge der RNA-abhängigen RNA-Polymerisation unterbinden. Diese Bindungsstellen, lokalisiert durch Kristallstrukturen oder resistente Varianten der HCV-Polymerase, sind *hot spots* für Konformationsänderungen. Der in dieser Arbeit charakterisierte allosterische Inhibitor HCV-796 bindet in der Handflächen-Domäne nahe dem aktiven Zentrum [114]. Das lokale Minimum bei 241 nm im CD-Spektrum der HCV-Polymerase, sensitiv für die Interaktion mit Nukleotiden, ist ebenfalls sensitiv für die Wechselwirkung des Inhibitors HCV-796. Dies konnte mit  $S_{0.5}$  (HCV-796) = 0.03 mM,  $K_D^{app}$  = 0.001 mM und einem HILL-Koeffizienten von 2 quantifiziert werden. Da die Interaktion mit HCV-796 zu einer Abnahme aber auch bathochromen Verschiebung des lokalen Minimums führte, ist die Bindung der Polymerase und NTPs sowie HCV-796 zwar ähnlich, aber nicht identisch.

In Abwesenheit von NTPs beeinflusste der Inhibitor die Polymerase-RNA-Interaktion nicht. In Anwesenheit von Nukleotiden aber konnte gezeigt werden, dass HCV-796 sowohl die Affinität von Polymerase und RNA im Gleichgewicht erniedrigt, als auch die Dissoziation der RNA-Matrize mit einem  $K_i$  = 0.01 mM beschleunigt. Von Hang *et al.* veröffentlichte, deutlich niedrigere  $K_i$ -Werte des Inhibitors HCV-796 lassen sich auf eine C316N Variante der untersuchten HCV-Polymerasen unterschiedlicher Subtypen zurückführen. Auch könnten unterschiedliche Reaktionsbedingungen oder Proteinpräparationen eine Ursache sein.

In Abwesenheit von Nukleotiden dissoziierten HCV-Polymerase (Genotyp 1b, Subtyp BK) und die einzelsträngige RNA, unabhängig von HCV-796, über mehrere Intermediate mit den beobachteten Geschwindigkeitskonstanten  $k_{D1} = 15 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{D2} = 1 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{D3} = 0.1 \text{ s}^{-1}$  und  $k_{D4} = 0.005 \text{ s}^{-1}$ . In Gegenwart von Nukleotiden erfolgt die doppelsträngige RNA-Produktbildung, was zu einer Partitionierung von RNA-Matrizen- und RNA-Produkt-Freisetzung führte. Mit einer halbmaximalen Effekorkonzentration von etwa 0.02 mM verlangsamten Nukleotide diese Dissoziationsreaktion der Produkt-RNA verglichen mit der der RNA-Matrize auf  $k_{D1 +NTP} = 3 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{D2 +NTP} = 0.3 \text{ s}^{-1}$  und  $k_{D3 +NTP} = 0.04 \text{ s}^{-1}$ . Die langsamste apparente Geschwindigkeitskonstante war mit  $k_{D4 +NTP} = 0.009 \text{ s}^{-1}$  leicht beschleunigt. Der Inhibitor HCV-796 jedoch hebte die verlangsamte RNA-Dissoziation (verursacht durch die RNA-Produktbildung) mit einer halbmaximalen Effekorkonzentration von etwa 0.01 mM wieder auf. Bei Nukleotiden in Sättigung inhibierte HCV-796 die Produktbildung und beschleunigte die Freisetzung der einzelsträngigen RNA-Matrize mit den apparenten Geschwindigkeitskonstanten  $k_{D1 +NTP+I} = 15 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{D2 +NTP+I} = 1.5 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{D3 +NTP+I} = 0.25 \text{ s}^{-1}$  und  $k_{D4 +NTP+I} = 0.03 \text{ s}^{-1}$ . Dies entspricht, mit Ausnahme der langsamsten Phase, etwa den beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation von RNA-Matrize und HCV-Polymerase in Abwesenheit von Nukleotiden sowie Inhibitor HCV-796. Die langsamste beobachtete Phase der RNA-Freisetzung in Gegenwart von Nukleotiden und HCV-796 war mit  $k_{D4+NTP+I} = 0.03 \text{ s}^{-1}$  aber etwa eine Größenordnung schneller als die entsprechende Phase in Abwesenheit der Effektoren ( $k_{D4} = 0.005 \text{ s}^{-1}$ ). Dies mag im Rahmen von Messtoleranzen verantwortlich sein für die Reduktion der Affinität der HCV-Polymerase und der RNA im Gleichgewicht von  $K_D = 0.05 \text{ }\mu\text{M}$  auf  $K_{D +NTP+I} = 0.7 \text{ }\mu\text{M}$  in Gegenwart von Nukleotiden und Inhibitor HCV-796. Nur in der NTP-induzierten Konformation der HCV-Polymerase interferierte HCV-796, der in der Handflächen-Domäne bindet, mit der RNA-Produktbildung und bewirkte eine nicht-produktive Freisetzung der RNA-Matrize. Nukleotide induzieren also in der Tat eine Konformationsänderung der HCV-Polymerase, die sich nicht nur, wie von Rigat *et al.* gezeigt wurde auf die Finger-Domäne, sondern auch auf die Handflächen-Domäne auswirkt.

## Die Initiation der viralen Genom-Replikation – die HCV-Polymerase in Aktion.

Das Hepatitis C Virus vom Genotyp 2a, Subtyp JFH-1 ist das bisher einzige Hepatitis C Virus Isolat, das in gut detektierbarem Ausmaß in Zellkulturen repliziert [17]. Als Grund dafür wurde auch über eine stärker ‚aktive‘ Polymerase spekuliert [31, 104]. JFH-1 2a wurde aus einem an akuter chronischer Hepatitis erkrankten japanischen Patienten (*Japanese Fulminant Hepatitis*) isoliert und ist eines der virulentesten bekannten Hepatitis C Virus Isolate. Die katalytische Aktivität der RNA-abhängigen RNA-Polymerase dieses HCV-Genotyps 2a, Subtyps JFH-1 ist etwa 10-fach höher als bei einer verwandten HCV-Polymerase des Genotyps 2a, Subtyps J-6 und etwa 100-fach größer als bei HCV-Polymerasen des Genotyps 1b [104, 139]. Für die gesteigerte Aktivität wurde eine verbesserte Initiation der Polymerisationsreaktion beschrieben. Die katalytische Aktivität bezieht sich hier auf den Einbau radioaktiv markierter Nukleotide in ein Nukleinsäureprodukt, als Initiation wird der Schritt zwischen RNA-Bindung und Elongationsphase bezeichnet.

Mit dem hier etablierten Testverfahren zur Quantifizierung der Interaktion von HCV-Polymerase und Nukleinsäuren konnten die in dieser Arbeit verwendeten HCV-Polymerasen vom Genotyp 2a, Subtyp JFH-1 und Genotyp 1b, Subtyp BK hinsichtlich der RNA-Bindung verglichen werden. Bei den identischen Reaktionsbedingungen 50 mM HEPES/NaOH, 20% (v/v) Glycerin, 6.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM TCEP, pH = 7.5 und T = 295.6 K besaß die HCV-Polymerase vom Genotyp 1b, Subtyp BK mit  $K_D = 0.03 \mu\text{M}$  eine deutlich höhere Affinität zu der verwendeten einzelsträngigen RNA verglichen mit dem  $K_D = 0.7 \mu\text{M}$  der HCV-Polymerase vom Genotyp 2a, Subtyp JFH-1 (extrapolierter Wert; siehe Abbildung 12, Seite 51). Diese Interaktion der einzelsträngigen RNA und der HCV-Polymerase vom Genotyp 1b, Subtyp BK war allerdings auch deutlich sensitiver gegenüber einer Störung durch NaCl verglichen mit der Bindung an die HCV-Polymerase vom Genotyp 2a, Subtyp JFH-1 ( $m = -76 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$  (Genotyp 1b, Subtyp BK) beziehungsweise  $m = -29 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$  (Genotyp 2a, Subtyp JFH-1); siehe Gleichung 6, Seite 29). Bei einer etwa physiologischen Ionenstärke von 150 mM NaCl (50 mM HEPES/NaOH, 20% (v/v) Glycerin, 150 mM NaCl, 6.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM TCEP, pH = 7.5, T = 295.6 K) ähnelten sich die Dissoziationskonstanten der einzelsträngigen RNA und der HCV-Polymerase

vom Genotyp 1b, Subtyp BK mit  $K_D = 3 \mu\text{M}$  verglichen mit  $K_D = 4 \mu\text{M}$  bei der HCV-Polymerase vom Genotyp 2a, Subtyp JFH-1. Entsprechend der festgestellten linearen freien Enthalpiebeziehung (Gleichung 6, Seite 29) besitzt bei zum Beispiel 0.6 M NaCl die HCV-Polymerase vom Genotyp 2a, Subtyp JFH-1 mit  $K_D = 0.00086 \text{ M}$  noch eine gewisse Affinität zu der einzelsträngigen RNA, die HCV-Polymerase vom Genotyp 1b, Subtyp BK mit einem Wert von  $K_D = 3.2 \text{ M}$  allerdings nur noch theoretisch.

Es bestehen also erhebliche Unterschiede bei den beiden untersuchten HCV-Polymerasen, was die Bindung der einzelsträngigen RNA-Matrize angeht. Die stark von der Ionenstärke abhängige Bindung einzelsträngiger RNA und HCV-Polymerase vom Genotyp 1b, Subtyp BK, legt den Schluss nahe, dass deutlich mehr ionische Wechselwirkungen zur Interaktion beitragen als bei der verwandten HCV-Polymerase vom Genotyp 2a, Subtyp JFH-1. Entsprechend befinden sich bei der HCV-Polymerase vom Genotyp 1b, Subtyp BK, vergleicht man die Aminosäuresequenz beider Polymerasen, mehr geladene Aminosäuren in den Regionen der mutmaßlichen Interaktion mit RNA (Finger-Domäne, Kontaktfläche Finger-Daumen-Domäne). Dementsprechend sollte eine Erhöhung der Hydrophobizität einen deutlich stärker negativen Einfluss auf die Interaktion von RNA und der HCV-Polymerase vom Genotyp 2a, Subtyp JFH-1 haben als bei der HCV-Polymerase vom Genotyp 1b, Subtyp BK. Durch den gezielten Austausch einzelner Aminosäuren und Analyse der resultierenden Affinität zu RNA in Abhängigkeit von der Ionenstärke und / oder Hydrophobizität könnte so die Polymerase-RNA-Interaktion eingehender charakterisiert und lokalisiert werden.

Mittels Circular dichroismus konnte ein Verfahren etabliert werden, die Interaktion von HCV-Polymerase und Nukleotiden in Abwesenheit von einer RNA-Matrize zu untersuchen. Anders als bei der Interaktion der HCV-Polymerase und RNA-Matrize zeigten sich bei der Wechselwirkung mit Nukleotiden keine gravierenden Unterschiede bezüglich der untersuchten HCV-Polymerasen. Beide HCV-Polymerasen, Genotyp 1b, Subtyp BK und Genotyp 2a, Subtyp JFH-1, interagierten mit den Nukleotiden ATP, CTP und GTP mit einer halbmaximalen Effektorkonzentration von etwa  $S_{0.5} = 0.05 \text{ mM}$ . Lediglich UTP zeigte bei beiden untersuchten Polymerasen eine leicht verminderte Affinität von  $S_{0.5} = 0.1 \text{ mM}$ . Möglicherweise könnte eine reduzierte Affinität der HCV-Polymerase zu UTP

verhindern, dass im Zytosol vorkommenden zelluläre mRNAs mit ihrem poly(A)-Schwanz fälschlicherweise als RNA-Matrizen verwendet werden.

Mit dem etablierten Testverfahren zur Quantifizierung der Polymerase-RNA-Interaktion [141] wurde auch die Bindung der *stem-loop*-RNA und der HCV-Polymerase vom Genotyp 2a (Subtyp JFH-1) untersucht. Auch die Bindung der HCV-Polymerase an 5'-Fluoreszenz-markierte *stem-loop*-RNA, der nativen RNA-Matrize, führt zu einer Löschung des Fluoreszenzsignals. Kinetisch sind, wie auch bei der Interaktion der HCV-Polymerase vom Genotyp 1b (Subtyp BK) und einzelsträngiger RNA, mehrere, mindestens 4 Phasen detektierbar. Die Bindungsreaktion erfolgt also über Intermediate. Bei der HCV-Polymerase vom Genotyp 2a, Subtyp JFH-1, ist die Geschwindigkeitskonstante der schnellsten beobachteten Phase allerdings abhängig von der RNA-Konzentration, entsprechend einer bimolekularen Reaktion 2. Ordnung. Sie repräsentiert somit die initiale Bindung beider Makromoleküle. An diese Formierung des MICHAELIS-Komplexes schließen sich 3 detektierbare, intramolekulare Reaktionen pseudo 1. Ordnung an. Auch die Bindung der HCV-Polymerase vom Genotyp 2a (Subtyp JFH-1) und Fluorophor-markierter einzelsträngiger RNA verläuft über eine initiale bimolekulare Reaktion sowie 3 intramolekulare Reaktionen. Die 3 intramolekularen Reaktionen der Bindung von HCV-Polymerase vom Genotyp 2a (Subtyp JFH-1) und einzelsträngiger sowie *stem-loop*-RNA gleichen sich mit  $k_{A4}' \sim 0.004 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{A3}' \sim 0.05 \text{ s}^{-1}$  und  $k_{A2}' \sim 0.5 \text{ s}^{-1}$ . Sie stellen entweder Positionierungsreaktionen oder Konformationsänderungen dar. Zudem sind die Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation mit  $k_{\text{off}} \sim 3 \text{ s}^{-1}$  für beide RNA-Matrizen nahezu identisch. Unterschiede manifestieren sich lediglich in der bimolekularen Assoziationskonstante  $k_{\text{on}}$ . Mit einem  $k_{\text{on}}(\text{ssRNA}) = 45 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$  ist die Bindung von einzelsträngiger RNA und HCV-Polymerase vom Genotyp 2a (Subtyp JFH-1) deutlich schneller als die Bindung der partiell doppelsträngigen *stem-loop*-RNA mit  $k_{\text{on}}(\text{stem-loop-RNA}) = 8 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ . Entsprechend  $K_D = k_{\text{off}} / k_{\text{on}}$  folgt eine höhere Affinität der HCV-Polymerase zu einzelsträngiger RNA, was auch in Gleichgewichtsmessungen bestätigt werden konnte.

Wie schon in den kinetischen Messungen der Interaktion gezeigt, ist auch im Gleichgewicht die Affinität zu einzelsträngiger RNA mit  $\Delta G^0_{(\text{ssRNA})} = -35 \text{ kJ mol}^{-1}$  höher als zur partiell doppelsträngigen *stem-loop*-RNA ( $\Delta G^0_{(\text{stem-loop-RNA})} = -31 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Jedoch stört NaCl die Interaktion zu einzelsträngiger RNA stärker als die

Wechselwirkung zur nativen *stem-loop*-RNA-Matrize. Da die Bindung der nativen *stem-loop*-RNA-Matrize schwächer als die einzelsträngiger RNA ist, aber auch weniger durch eine Perturbation von NaCl beeinflusst ist, folgt, dass zur Bindung von Polymerase und *stem-loop*-RNA zusätzliche, nicht-ionische Wechselwirkung beitragen. Beide RNAs werden auf unterschiedliche Weise gebunden (vergleiche [142]). Denkbar wäre, dass diese ‚spezifische‘ Interaktion der HCV-Polymerase mit dem nativen Substrat weitere Effekte im Zuge der viralen Replikation hat. Etwa könnten zusätzliche Faktoren, wie die im viralen Genom kodierte RNA-Helikase NS3, zum Initiationskomplex von HCV-Polymerase und nativer RNA-Matrize rekrutiert werden. Es wurde beschrieben, dass die HCV-Helikase, welche doppelsträngige Nukleinsäuren in einer 3'→5'-Richtung entwindet [56, 59], mit der HCV-Polymerase wechselwirkt [62-64]. Eine solche ATP-getriebene Entwindung von Doppelstrangbereichen würde eine Aufbereitung der RNA-Matrize für die HCV-Polymerase darstellen. In der Tat gibt es Publikationen, die eine gesteigerte katalytische Aktivität der HCV-Polymerase in Gegenwart der HCV-Helikase beschreiben [65].

In weiteren Untersuchungen sollte die unterschiedliche Bindung bezüglich der Abhängigkeit von der Ionenstärke der HCV-Polymerase (Genotyp 2a, Subtyp JFH-1) und einzelsträngiger beziehungsweise *stem-loop*-RNA untersucht werden. So wurde bei einer etwa physiologischen NaCl-Konzentration von 150 mM die Affinität der HCV-Polymerase zu den beiden RNA-Matrizen in Abhängigkeit der Temperatur bestimmt. Nach VAN'T HOFF ergibt sich eine lineare Abhängigkeit von  $\ln K_A$  und der reziproken Reaktionstemperatur mit  $\ln K_A = (\Delta S/R) - (\Delta H/R) * T^{-1}$ . Die gesamte freie Reaktionsenthalpie  $\Delta G$  der Protein-RNA-Interaktion kann damit in die entropischen und enthalpischen Beiträge aufgespalten werden. Interessanter Weise tragen zur Bindung einzelsträngiger RNA nach Außen hin keine enthalpischen Beiträge bei. Die stark NaCl-abhängige Bindung einzelsträngiger RNA mit einem  $\Delta G_{(ssRNA)} = -31 \text{ kJ mol}^{-1}$  bei 150 mM NaCl und 295.6 K setzt sich ausschließlich aus dem entropischen Beitrag  $-T\Delta S_{(ssRNA)} = -31 \text{ kJ mol}^{-1}$  zusammen. Demgegenüber ist die Bindung der *stem-loop*-RNA enthalpisch sogar ungünstig mit  $\Delta H_{(stem-loop-RNA)} = +37 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Dieser endotherme Beitrag wird durch den stark entropischen Beitrag von  $-T\Delta S_{(stem-loop-RNA)} = -66 \text{ kJ mol}^{-1}$  kompensiert, so dass in der Summe eine gesamte Reaktionsenthalpie  $\Delta G_{(stem-loop-RNA)} = -29 \text{ kJ mol}^{-1}$  durch die Bindung von *stem-loop*-RNA und HCV-Polymerase (Genotyp 2a, Subtyp JFH-1)

bei 295.6 K frei wird. Die energetisch begünstigte Interaktion der HCV-Polymerase und beider RNA-Matrizen ist entropisch getrieben. Das heißt, verglichen mit den Ausgangszuständen nimmt die Entropie des Systems durch die Komplex-Bildung beider Makromoleküle zu (siehe auch [143-147]). Durch die stark ionische Interaktion von HCV-Polymerase und einzelsträngiger RNA werden Gegenionen von sowohl RNA als auch Protein frei gesetzt, die die Entropie des Systems im gebundenen Zustand erhöhen. Nach Außen hin wird keine Reaktionswärme frei, da sich offenbar die enthalpisch begünstigte Protein-RNA-Interaktion und die enthalpisch ungünstige Freisetzung der Gegenionen kompensieren. Die Bindung der *stem-loop*-RNA ist mit  $m_{(\text{stem-loop-RNA})} = - 13.5 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$  aber weit weniger ionischer Natur. Die Lösungsmittel-Entropie sollte also, verglichen mit der Bindung einzelsträngiger RNA, einen kleineren Effekt haben. Jedoch wird im Gegenteil bei der Bindung von HCV-Polymerase und *stem-loop*-RNA eine deutlich größere Entropiezunahme zusammen mit einem endothermen Energiebeitrag verzeichnet. Enthalpisch endotherm ist etwa das Aufbrechen von existierenden Wechselwirkungen. Wird die Entropie als eine Größe möglicher Mikrozustände eines Systems betrachtet, kann eine Zunahme der Entropie auch eine Zunahme konformationeller Flexibilität bedeuten. Eine Abnahme der Entropie kann dementsprechend dann als eine ‚Versteifung‘ des Systems angesehen werden (siehe auch [144-146], [148]). Analysiert man die Kristallstrukturen der HCV-Polymerase und vergleicht sie mit verwandten Strukturen von zum Beispiel der HIV-Reversen Transkriptase oder der  $\Phi 6$  RNA-Polymerase wird deutlich, dass sich die HCV-Polymerase in einer ‚geschlossenen‘ Konformation befindet [82-84, 104]. Die Struktur ähnelt einer rechten Hand. Das aktive Zentrum befindet sich in der Mitte und wird von ‚Daumen‘- und ‚Finger‘-Domäne umschlossen. Eine ungewöhnlich enge Interaktion der ‚Daumen‘- und ‚Finger‘-Domäne wird beobachtet, in deren Konsequenz einzelne ‚Finger‘-Domänen immobilisiert scheinen. Der putative Austritt des doppelsträngigen RNA-Produkts wird vom C-Terminus blockiert. Schon früh wurde spekuliert, dass es im Rahmen der Polymerisationsreaktion zu merklichen Konformationsänderungen kommen muss [81, 83, 91, 93, 105, 107, 108, 110, 137, 138]. Die Struktur einer ‚offenen‘ Konformation konnte aber bisher nicht beobachtet werden, ebenso wie Ko-Kristalle von HCV-Polymerase mit RNA-Matrizen größer als 5 Nukleotide [87, 88]. Kim *et al.* aber zeigten, dass erst RNA-Moleküle ab 7 Nukleotiden Länge effektiv mit der HCV-Polymerase interagieren [86]. Die Schwierigkeit, eine ‚offene‘ Kristallstruktur der

HCV-Polymerasen sowie einen nativen RNA-Polymerase-Komplex zu erhalten ist im Einklang mit einer Entropiezunahme und einer Zunahme der konformationellen Flexibilität durch die Polymerase-RNA-Komplexbildung, da flexible Strukturen nur schwer kristallisieren.

In Gegenwart von Nukleotiden und einer RNA-Matrize kann die durch die HCV-Polymerase katalysierte Polymerisationsreaktion beginnen. Üblicherweise wird die RNA-Produktbildung durch den Einbau radioaktiv-markierter Nukleotide detektiert. Als eine neue Messmethode der RNA-abhängigen RNA-Polymerisationsreaktion wurde hier die 1D  $^1\text{H}$  NMR-Spektroskopie etabliert. Im Zuge der Polymerisationsreaktion bilden sich auf Grund der inhärenten Komplementarität von RNA-Matrize und dem neu synthetisierten RNA-Strang Basenpaarungen über Wasserstoffbrückenbindungen aus, die mittels 1D  $^1\text{H}$  NMR-Spektroskopie detektiert werden können [129, 130]. Diese charakteristischen NMR-Signale korrelieren näherungsweise mit dem Doppelstrang-Charakter von Nucleinsäuren. Die zeitabhängige Zunahme des Integrals der NMR-Signale der Imino-Protonen nach Inkubation von HCV-Polymerase, RNA-Matrize und Nukleotiden kann also als Fortschreiten der doppelsträngigen RNA-Produktbildung angesehen werden. Die Reaktionsbedingungen wurden dabei so gewählt, dass eine Produktbildungsreaktion mittels NMR-Spektroskopie zeitaufgelöst verfolgt werden kann. Eine initiale Abnahme der NMR-Signale der Imino-Protonen resultiert durch Zugabe von Nukleotiden zu dem Binärkomplex aus HCV-Polymerase und *stem-loop*-RNA. In Gegenwart der für die Polymerisationsreaktion essentiellen Nukleotide wird der Katalyse-kompetente Zustand der HCV-Polymerase erreicht. Verglichen mit dem  $K_D$ -Wert besitzt dieses Holoenzym eine höhere Affinität zur RNA-Matrize ( $K_M < K_D$ ). Dies führt zu einer Abnahme der Konzentration an freier *stem-loop*-RNA, die als RNA-Matrize diente, und somit zu der Abnahme des Integrals der NMR-Signale der Imino-Protonen. Bedingt durch die Produktbildung doppelsträngiger RNA entwickeln sich mit fortschreitender Reaktionszeit zusätzliche NMR-Signale von sich neu bildenden Imino-Protonen. Diese irreversible Reaktion ohne detektierbare Zwischenprodukte kann mit etwa  $0.1 \text{ NTP min}^{-1}$  abgeschätzt werden. Zwar ist diese Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{cat}} = 0.1 \text{ NTP min}^{-1}$  (bei  $20 \mu\text{M}$  Holoenzym) der 21 bp doppelsträngigen RNA-Produktbildung, verglichen mit anderen Polymerasen wie der DNA-abhängigen RNA-Polymerase T7, um mehrere Größenordnungen geringer,

doch sind vergleichbare Aktivitäten für HCV-Polymerasen beschrieben [74, 89, 99, 104]. Berücksichtigen muss man hier wieder die jeweils unterschiedlichen HCV-Genotypen und Subtypen, die in Sequenz und Länge unterschiedlichen RNA-Matrizen sowie die Reaktionsbedingungen, die einen maßgeblichen Einfluss auf die Reaktion haben.

Wie NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigten, besitzt die untersuchte *stem-loop*-RNA eine definierte Sekundärstruktur. Am äußersten 3'-Ende folgt vier einzelsträngigen Nukleotiden ein doppelsträngiger *stem*-Bereich von 5-6 Basenpaaren, der über einen *loop* von 3-5 ungepaarten Nukleotiden verbunden ist. Da die intramolekulare RNA-Sekundärstruktur im Gleichgewicht mit der einzelsträngigen Konformation steht, kann mittels 1D  $^1\text{H}$  NMR-Spektroskopie die thermische Stabilität dieser partiell doppelsträngigen Sekundärstruktur bestimmt werden [149, 150]. Die makroskopische thermische Entfaltung der RNA-Sekundärstruktur kann durch Auswertung der NMR-Signale der einzelnen Imino-Protonen nach einem Zwei-Zustandsmodell mikroskopisch betrachtet werden. So zeigten die randständigen Basenpaare G<sub>3</sub>-C<sub>17</sub> ( $T_m = 341\text{ K}$ ), G<sub>16</sub>-C<sub>4</sub> ( $T_m = 335\text{ K}$ ) und G<sub>13</sub>-C<sub>7</sub> ( $T_m = 336\text{ K}$ ) einen ähnlichen, um etwa 25 K höheren Temperaturübergangsmittelpunkt als die mittig im *stem*-Bereich befindlichen Basenpaare G<sub>15</sub>-C<sub>5</sub> ( $T_m = 307\text{ K}$ ) und G<sub>14</sub>-C<sub>6</sub> ( $T_m = 312\text{ K}$ ). Der reversible thermische Entfaltungsprozess der Sekundärstruktur der *stem-loop*-RNA ist offenbar nicht-kooperativ. Es existiert ein Entfaltungsintermediat mit ungepaarten, einzelsträngigen G<sub>15</sub> und G<sub>14</sub> aber noch doppelsträngigen randständigen Basenpaaren G<sub>3</sub>-C<sub>17</sub>, G<sub>16</sub>-C<sub>4</sub> und G<sub>13</sub>-C<sub>7</sub>. Zwar werden mit  $4.2 - 17.6\text{ kJ mol}^{-1}$  pro Basenpaarung vergleichbare thermodynamische Stabilitäten beschrieben [151], doch stellt der hier beobachtete Entfaltungsweg eine ungewöhnliche Ausnahme dar. Die, verglichen mit den Basenpaaren G<sub>15</sub>-C<sub>5</sub> ( $\Delta G^{296\text{ K}} = 5.0\text{ kJ mol}^{-1}$ ) und G<sub>14</sub>-C<sub>6</sub> ( $\Delta G^{296\text{ K}} = 4.2\text{ kJ mol}^{-1}$ ), hohe thermische Stabilität der terminalen Basenpaarung G<sub>3</sub>-C<sub>17</sub> ( $\Delta G^{296\text{ K}} = 11.3\text{ kJ mol}^{-1}$ ) stellt eine Energiebarriere der Sekundärstruktur der *stem-loop*-RNA dar und ist auch die erste Basenpaarung, die im Zuge der Polymerisationsreaktion zur Synthese der (+)-RNA aufgelöst werden muss. Diese terminale Basenpaarung der *stem-loop*-RNA kann also der limitierende Faktor der Synthese der komplementären *stem-loop*-RNA sein, da nur lokal einzelsträngige RNA als Matrize dienen kann.

Verwendet man eine einzelsträngige RNA als Matrize, wird keine *lag*-Phase der RNA-Produktbildung beobachtet. Dies konnte durch einen radioaktiven Polymerase-assay nach Behrens *et al.* gezeigt werden (Knick und Reich *et al.*, nicht-publizierte Daten). Somit scheint ausgeschlossen, dass die initiale Bildung der ersten Di- oder Tri-Nukleotide diese *lag*-Phase der Produktbildung unter Verwendung der *stem-loop*-RNA als Matrize verursacht. Vielmehr wird wahrscheinlich, dass die partiell doppelsträngige Sekundärstruktur der *stem-loop*-RNA selbst die Geschwindigkeit der Produktbildung begrenzt. Sie stellt somit die thermodynamische Barriere der Polymerisationsreaktion dar, die kinetisch nach etwa 20 Stunden überwunden wird. Dementsprechend sollten thermodynamisch instabilere *stem-loop*-RNA-Konstrukte eine kürzere, stabilere Varianten hingegen eine längere Verzögerungsphase der RNA-Produktbildung zur Folge haben. Interessant wäre, neben der Stabilität der Sekundärstruktur der *stem-loop*-RNA im Gleichgewicht auch die Geschwindigkeiten der Bildung beziehungsweise Auflösung dieser Sekundärstruktur zu kennen.

In einer eindrucksvollen Arbeit von Simister *et al.* (2009) [104] wurde die HCV-Polymerase vom Genotyp 2a, Subtyp JFH-1 nicht nur strukturell, sondern auch hinsichtlich seiner katalytischen Aktivität, bestimmt durch den Einbau radioaktiv-markierter Nukleotide in Produkt-RNA, untersucht. Als RNA-Matrizen fanden sowohl die genomische (+)-RNA, als auch die komplementäre (-)-RNA sowie am 5'-Ende verkürzte (-)-RNA-Konstrukte Verwendung. Zwar können innerhalb weniger Minuten radioaktiv-markierte Produkte detektiert werden, doch entsprechen diese nicht der Größe der vollständigen RNA-Matrize. Unter Umständen beginnt die HCV-Polymerase in diesen *in vitro* Experimenten nicht an dem äußersten 3'-Ende der (-)-RNA, welches die stabile *stem-loop*-RNA Sekundärstruktur bildet. Durch eine Sequenzierung der Produkt-Nukleinsäuren könnte geklärt werden, ob es sich um Abbruchfragmente handelt, oder ob die Polymerase die Initiation nicht am äußersten 3'-Ende beginnt. Das eine RNA-Matrize mit 3'-Ende nicht zwingend erforderlich ist, um ein Polymerisationsprodukt zu erhalten, zeigten Ranjith-Kumar *et al.* [137], indem sie erfolgreich eine zirkuläre RNA als Matrize für die HCV-Polymerase verwendeten. Ein weiteres interessantes Ergebnis der Arbeit von Simister *et al.* ist, dass die Länge und Zusammensetzung der verwendeten RNA-Matrize offenbar einen erheblichen Einfluss auf die Geschwindigkeit des Einbau's von Nukleotiden hat. Eine verlangsamte Produktbildung wurde bei kürzeren RNA-Matrizen beobachtet. Auch dies spricht dafür, dass die Initiation der HCV-Polymerisation ein

geschwindigkeitsbestimmender Schritt ist. Dementsprechend sollten Faktoren, die Sekundärstrukturen der RNA-Matrize am Initiationsort auflösen, die Polymerisationsreaktion beschleunigen. Im Kontext des viralen Replikationszyklus kommt dabei möglicherweise wiederum der HCV-Helikase NS3 eine entscheidende Bedeutung zu. Faszinierend wäre, das Zusammenspiel von HCV-Polymerase und HCV-Helikase zu untersuchen, besonders im Hinblick auf eine Aufbereitung der RNA-Matrize hin zu einer einzelsträngigen Konformation.

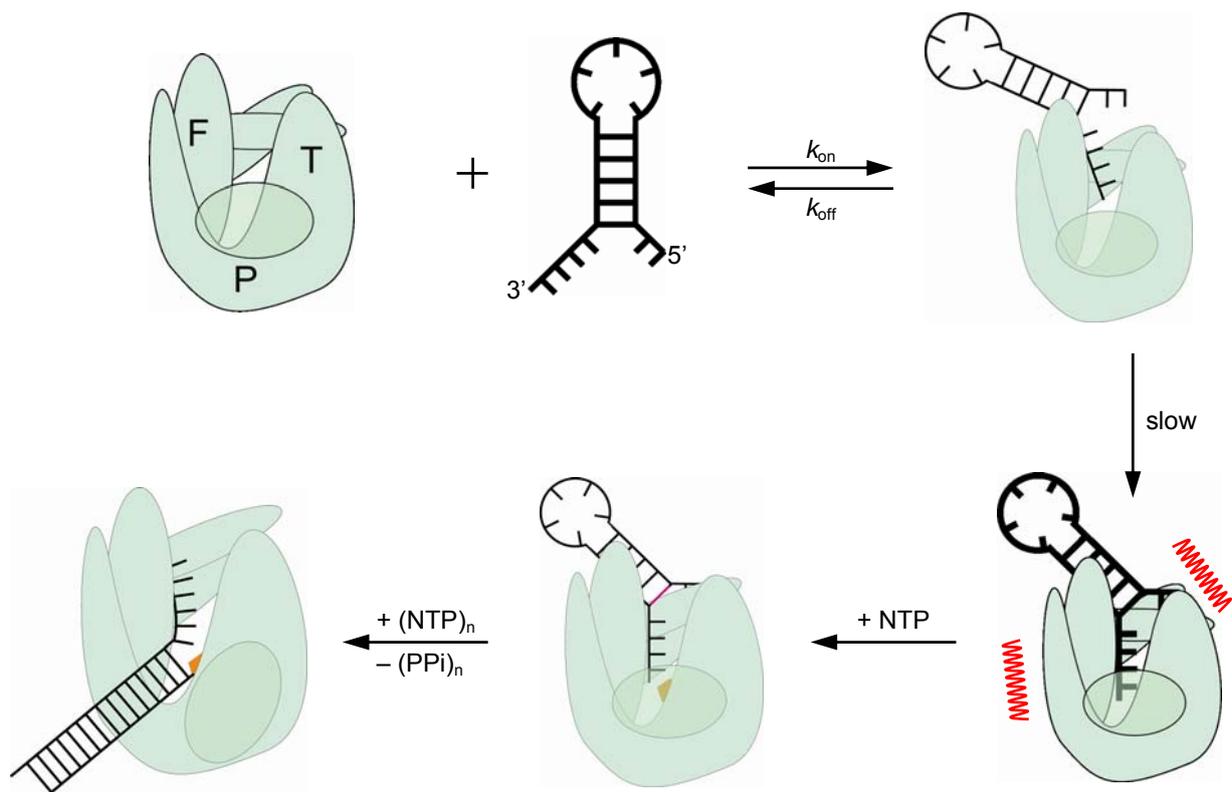


Abbildung 25: Die Initiation der HCV-Polymerisationsreaktion – eine schematische Übersicht.

Die HCV-Polymerase ist schematisch und in blau dargestellt. F, P und T deuten die einzelnen Domänen Finger (F, *finger*), Handfläche (P, *palm*) sowie Daumen (T, *thumb*) an. Transparent ist der C-Terminus angedeutet. Die *stem-loop*-RNA ist ebenfalls schematisch wiedergegeben, 3'- sowie 5'-Ende sind angedeutet. Die *stem-loop*-RNA stellt die native RNA-Matrize der Initiation der viralen RNA-Amplifikation dar. Der detektierbaren initialen Interaktion von HCV-Polymerase und RNA-Matrize folgen mehrere Intermediate (siehe II. I.). VAN'T HOFF-Analysen sprechen für eine Zunahme der konformationellen Flexibilität durch Interaktion von HCV-Polymerase und der nativen *stem-loop*-RNA-Matrize (siehe II. II. III.). Eine Zugabe von Nukleotiden bewirkt eine weitere Konformationsänderung der HCV-Polymerase (siehe II. III.) und sorgt für eine optimale Positionierung der RNA-Matrize. Die äußerste Basenpaarung der RNA-Matrize (lila) stellt die energetische Barriere der RNA-Sekundärstruktur dar (siehe II. IV. I.). Da die RNA-abhängige RNA-Polymerase Nukleotide basierend

auf Komplementarität zur RNA-Matrize in einen wachsenden RNA-Strang einbaut, kann die RNA-Sekundärstruktur die Produktbildung (doppelsträngige RNA) limitieren (siehe II. V.).

## **Cyclophilin B – eine humane Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerase mit Nukleinsäure-Bindungseigenschaften.**

Cyclophilin B (CypB) ist ein Vertreter der Immunophiline. Cyclophiline wurden als zelluläre Interaktionspartner von Cyclosporin A (CsA), einem Immunsuppressor, identifiziert [152]. Der Cyclophilin-CsA-Komplex wechselwirkt und inhibiert Calcineurin, eine zelluläre Phosphatase essentiell für die Reifung von Zytokinen wie TNF $\alpha$  und IL-2 [153-159]. Des Weiteren katalysieren Cyclophiline die *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidbindungen N-terminal von Prolinen [131]. Diese Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Aktivität (PPIase) spielt eine wichtige Rolle bei der Interkonvertierung von Protein-Konformationen, speziell auch in der Signaltransduktion [134, 135, 160, 161]. Cyclophiline sind seit über 20 Jahren bekannt und ihre Katalyse bei der Proteinfaltung *in vitro* ist unumstritten [162-164]. Dennoch ist es schwierig, ihre Funktion *in vivo* im Detail zuzuordnen, da Deletionsmutanten einzelner Vertreter nur bedingt phänotypisch detektierbare Merkmale zeigen. Dies mag daran liegen, dass eine Vielzahl von PPIasen existieren, die sich gegenseitig kompensieren können.

Der prototypische Vertreter ist Cyclophilin A (CypA). Dieses Eindomänen-Protein (18 kDa) ist vorwiegend im Zytosol lokalisiert. Neben seiner immunsuppressiven Wirkung im Komplex mit CsA, einem effektiven PPIase-Inhibitor, ist es an der Faltung von Proteinen beteiligt. Zum einen beschleunigt es durch die PPIase-Funktion langsame Faltungsschritte, zum anderen kann es als Chaperon wirken, Faltungsintermediate stabilisieren und so die nativ gefaltete Population erhöhen. Es besitzt eine essentielle Bedeutung im ‚Lebenszyklus‘ des humanen Immunodefizienz-Virus (HIV) [165-168] und ist ein wichtiger zellulärer Kofaktor des Hepatitis C Virus [116, 118, 133, 169-173].

Weitere Vertreter der Cyclophiline existieren, die eine große Homologie zu Cyclophilin A und zusätzliche N- und/oder C-terminalen Domänen besitzen. Cyclophilin D (CypD) zum Beispiel, ein 40 kDa Protein, lokalisiert in der Mitochondrien-Matrix und ist ein Bestandteil der mitochondrialen *permeability transition pore*. CypD soll CsA-abhängig die Öffnung dieses Poren-Komplexes regulieren und damit Apoptose/Nekrose-Prozesse beeinflussen [174-176].

Dem etwa 20 kDa großen Protein Cyclophilin C (CypC) wird ein Magnesium-abhängiger Abbau von DNA in 50 kb-Fragmenten zugeschrieben [177]. Wie alle

Cyclophiline besitzt es auch die PPIase-Domäne, weist aber eine höhere Homologie zu Cyclophilin B als zu dem prototypischen Vertreter CypA auf.

Cyclophilin B (CypB) wird sowohl im extrazellulären Raum, im Endoplasmatischen Retikulum als auch im Nucleus detektiert [178, 179]. Extrazellulär kann es über glykosylierte Aminoglykane mit Zelloberflächen wechselwirken und zum Beispiel T-Lymphozyten rekrutieren [179-182]. Auch besitzt CypB C-terminal ein ER-Retentionssignal und soll an der Protein-Qualitätskontrolle im ER beteiligt sein [127, 182-184]. N-terminal findet man ein Kernlokalisierungssignal (NLS) das dazu beiträgt, internalisierte Liganden wie Prolactin (PRL) im Komplex in den Zellkern zu transportieren [185]. Es konnte gezeigt werden, dass dieser CypB-PRL-Komplex im Zellkern die Stat5-abhängige Transkription positiv beeinflusst, wahrscheinlich über die PPIase-abhängige Verdrängung eines negativen Regulators von Stat5 [186]. In einer eindrucksvollen Arbeit wurde eine weitere Interaktion von CypB mit dem nukleären Transkriptionsfaktor Stat3 belegt [187]. Diese Interaktion verbessert die Wechselwirkung von Stat3 mit seinen Promotoren und wirkt sich positiv auf die Transkription der Zielgene aus. Auch im Zusammenhang mit HCV wurde CypB eine das Virus fördernde Bedeutung zugeschrieben. Watashi *et al.* konnten 2005 durch Ko-Immunopräzipitationen eine spezifische Interaktion von CypB und der HCV-Polymerase detektieren [125]. Diese CsA-sensitive Wechselwirkung sollte die RNA-Bindungseigenschaft der HCV-Polymerase verbessern. Leider konnten diese Effekte von anderen Arbeitsgruppen nur unzureichend reproduziert werden, so dass diese Ergebnisse kontrovers diskutiert werden [133, 188-190] und die CsA-sensitive Replikation des Hepatitis C Virus vielmehr einer Bedeutung von Cyclophilin A in der viralen Polyproteinprozessierung und Assemblierung zugeschrieben wird [116, 133, 173].

Verglichen mit Cyclophilin A besitzt Cyclophilin B einen zusätzlichen C-terminalen Bereich und einen stark basischen isoelektrischen Punkt. Bei physiologischen pH-Werten ist es positiv geladen. In Abbildung 26 ist das humane Cyclophilin B räumlich dargestellt. Auch in dieser Arbeit wurde ausschließlich eine Variante von Cyclophilin B ohne die N-terminalen 32 Aminosäuren untersucht. Die Aminosäuresequenz des verwendeten Cyclophilin B findet sich im Anhang.

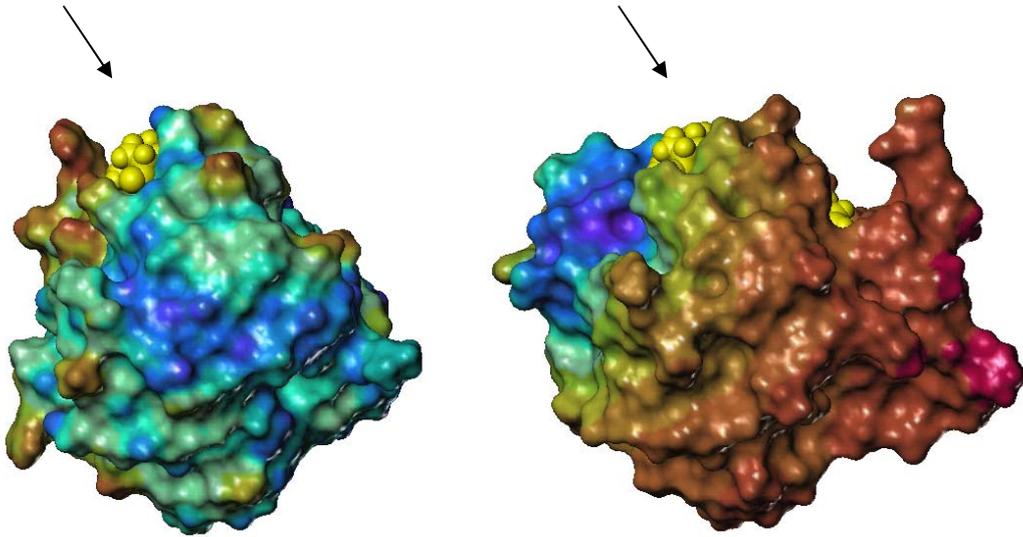


Abbildung 26: Vergleich der Kristallstrukturen von humanem Cyclophilin A und B.

Basierend auf Röntgenkristallstrukturanalysen sind die räumlichen Strukturen von humanem Cyclophilin A (links; PDB 2CPL) und humanem Cyclophilin B (rechts; PDB 1CYN) dargestellt. Der schwarze Pfeil deutet auf das jeweilige aktive Zentrum der Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Funktion. Das Tryptophan im PPIase-Zentrum ist in gelb abgebildet. In der übrigen Farbgebung entspricht rot basischen, blau sauren und grün neutralen Aminosäuren.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cyclophilin B intrinsisch Nucleinsäure-Bindungseigenschaften besitzt. Mittels 5'-Fluorophor-markierten Nucleinsäuren wurde die Bindung von Cyclophilin B und der 21 Nukleotide großen *stem-loop*-RNA (siehe Abbildung 15) sowie der äquivalenten Desoxyribonucleinsäure quantifiziert. Die erhaltenen Dissoziationskonstanten weisen mit  $K_D$  (*stem-loop*-RNA) = 2.6  $\mu\text{M}$  und  $K_D$  (*stem-loop*-DNA) = 5.5  $\mu\text{M}$  auf moderate Affinitäten und eine leichte Präferenz für Ribonucleinsäuren hin. Sehr wahrscheinlich ist, dass die Affinität von Cyclophilin B zu ‚nativen‘ Nucleinsäure-Interaktionspartnern erhöht ist. Interessant wäre in diesem Zusammenhang, die Interaktion von Cyclophilin B mit etwa den Promotorbereichen Stat3- beziehungsweise Stat5-abhängiger Transkription sowie den entsprechenden RNA-Produkten zu untersuchen. Beachten muss man dabei, dass bereits an die hier untersuchte *stem-loop*-RNA offenbar zwei Moleküle Cyclophilin B binden können. Zu diesem Ergebnis gelangten, unabhängig voneinander, Sedimentationsanalysen sowie 1D  $^1\text{H}$  NMR-Interaktionsstudien von Komplexen aus CypB und *stem-loop*-RNA. In den Studien zur Quantifizierung der Affinitäten unter Ausnutzung des *quenching* Fluorophor-

markierter RNA durch Bindung von CypB konnte aber keine Phasierung beobachtet werden. Dies deutet entweder auf (fast) identische Affinitäten der beiden RNA-Bindungsstellen zu dem Protein hin, oder aber nur eine Bindung kann mit dieser Methode detektiert werden. Neben hydrophoben Wechselwirkungen tragen größten Teils ionische Interaktionen zu der mittels Fluoreszenzspektroskopie detektierbaren Komplexbildung von Cyclophilin B und *stem-loop*-RNA bei. NaCl stört diese Interaktion entsprechend einer linearen freien Enthalpiebeziehung (Gleichung 6, siehe Seite 29) mit  $m = -67.1 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$  bei  $\Delta G^0 = -30.8 \text{ kJ mol}^{-1}$  (mit  $\Delta G^0$  wird hier die freie Gibbs'sche Reaktionsenthalpie der Interaktion in 50 mM HEPES/NaOH, 6.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM TCEP, pH = 7.5 und T = 295.6 K bezeichnet). Die Abhängigkeit der detektierten Interaktion von *stem-loop*-RNA und Cyclophilin B von der NaCl-Konzentration ist etwa fünfmal größer als die der HCV-Polymerase (Genotyp 2a, Subtyp JFH-1) und der gleichen RNA (Kapitel II. II. I). Um die Konsequenzen der Wechselwirkung von Cyclophilin B und der *stem-loop*-RNA bezüglich der RNA-Sekundärstruktur zu untersuchen, wurden 1D <sup>1</sup>H NMR-Spektren aufgenommen. In dem spektralen Bereich sensitiv für Basenpaarungen konnte generell eine Abnahme der Signalintensitäten durch Interaktion mit Cyclophilin B festgestellt werden. Dies, sowie die Linienverbreiterung der NMR-Signale der Imino-Protonen durch Zugabe von CypB korreliert mit einer Komplexbildung beider Makromoleküle. Die thermische Entfaltung der RNA-Sekundärstruktur führte jedoch zu einem vollständigen Verschwinden dieser NMR-Signale charakteristisch für Doppelstrangbereiche. Doch selbst bei einem molaren Überschuss an Cyclophilin B sind diese NMR-Signale der *stem-loop*-RNA noch detektierbar und konstant. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die allgemeine Sekundärstruktur der *stem-loop*-RNA durch die CypB-Bindung erhalten bleibt. Jedoch werden leichte spektrale Verschiebungen einzelner Imino-Protonen NMR-Signale von etwa 0.01 ppm durch die Bindung von Cyclophilin B registriert. Dies deutet darauf hin, dass sich die lokale geladene Umgebung der entsprechenden Imino-Protonen, die durch je eine Basenpaarung komplementärer Nukleotide fixiert sind, ändert. Da doppelsträngige Nukleinsäuren sich in einer Helix-artigen Konformation befinden wäre es möglich, dass die Bindung von Cyclophilin B einen Einfluss auf diese Windung der *stem-loop*-RNA um die eigene Achse hat. Durch weiterführende Strukturanalysen könnte dies, sowie die an der RNA-Interaktion beteiligten Aminosäuren aufgeklärt werden.

Interessanter Weise scheint die Nukleinsäure-Bindung unabhängig von der Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Funktion von Cyclophilin B zu sein. Mit dem von Fischer *et al.* [131] etablierten Testverfahren wurde eine katalytische Effizienz der PPlase von CypB von  $8 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$  bei 283.15 K in 50 mM HEPES/NaOH, 6.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM TCEP, pH = 7.5 bestimmt. Die PPlase-Aktivität war unabhängig von der untersuchten *stem-loop*-RNA, sollte aber mit höher affinen Nukleinsäuren wiederholt und verifiziert werden. Auch zeigte sich, dass die Bindung von Nukleinsäuren nicht mit der Bindung von Cyclosporin A, einem Inhibitor des aktiven Zentrums der PPlase-Funktion, interferiert. Somit scheinen beide Eigenschaften von Cyclophilin B, die Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung sowie die Nukleinsäurebindung, unabhängige Ereignisse zu sein. Denkbar wäre, dass Cyclophilin B über die Nukleinsäurebindung spezifisch rekrutiert wird und dann durch seine PPlase-Funktion als eine Art molekularer Schalter fungiert und Konformationsänderungen eines assoziierten Zielproteins bewirkt. Dies ist jedoch spekulativ und bedarf einer Überprüfung.

Faszinierend wäre es, spezifische Nukleinsäure-Interaktionen ausfindig zu machen. So könnte die Funktion von Cyclophilin B *in vivo* weiter und eingehender charakterisiert werden.

## Ausblick

In dieser Arbeit wurden biophysikalische Methoden etabliert, mit dem Ziel, die einzelnen Prozesse der RNA-abhängigen RNA-Polymerisationsreaktion der Hepatitis C viralen Polymerase im molekular-mechanistischen Detail zu untersuchen. Mittels Circular dichroismus konnte die Wechselwirkung mit Nukleotiden quantifiziert werden. Affinitäten zu Nukleinsäuren wurden durch Fluoreszenzspektroskopie sowohl kinetisch als auch thermodynamisch bestimmt. NMR-spektroskopische Untersuchungen komplementierten die funktionellen Studien mit strukturellen Daten über die Produktbildung sowie die Prozessivität der HCV-Polymerase.

Erfolgreich wurde am Beispiel des allosterischen Inhibitors HCV-796 dessen Wirkungsweise gezeigt. Nur in der durch Nukleotide induzierten Konformation der HCV-Polymerase verringerte HCV-796 drastisch die Affinität zur RNA-Matrize und somit die doppelsträngige Produktbildung. Interessant und möglich wäre, auch weitere Effektoren der RNA-abhängigen RNA-Polymerisationsreaktion detailliert zu beschreiben. So existiert eine Vielzahl allosterischer Inhibitoren der HCV-Polymerase, die mit unterschiedlichen Regionen des Enzyms wechselwirken und wahrscheinlich unterschiedliche Mechanismen der Inhibierung aufweisen. Neben diesen niedermolekularen Verbindungen können aber auch weitere Effektoren der Polymerisationsreaktion erforscht werden. Verschiedenste virale und zelluläre Proteine (NS3-Helikase, NS5A, RNA-bindende Proteine, Cyclophiline) und Nukleinsäuren (miR122) werden als Modulatoren diskutiert, jedoch ist deren molekularer Einfluss oft nicht bekannt. Mit den hier beschriebenen *in vitro* Methoden können sowohl direkte, die Aktivität der HCV-Polymerase beeinflussende, als auch indirekte, die Konformation der RNA-Matrize modulierende Effekte untersucht werden. So sollte etwa die Polymerisationsreaktion durch eine Aufbereitung der nativen strukturierten RNA-Matrize (z.B. durch Helikasen) in Form einer Verschiebung des Gleichgewichts zur einzelsträngigen Konformation begünstigt werden. In diesem Zusammenhang könnte durch weiterführende Studien dem humanen Cyclophilin B eine Funktion im Replikationszyklus von HCV zugeschrieben werden.

Es konnte gezeigt werden, dass Cyclophilin B in der Lage ist, mit Nukleinsäuren zu interagieren. Am Beispiel der HCV *stem-loop*-RNA wurde durch 1D <sup>1</sup>H NMR-Spektroskopie gezeigt, dass diese Wechselwirkung in noch unbekannter Art die

Sekundärstruktur dieser RNA (moderat) beeinflusst. Diese Interaktion war unabhängig von der Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Funktion und umgekehrt. Cyclophilin B besitzt also 2 funktionelle Zentren. Äußerst interessant wäre, sowohl eine spezifische Nukleinsäure-Interaktion als auch ein natürliches Substrat der PPlase-Funktion ausfindig zu machen und den Einfluss auf sowohl die Konformation der Nukleinsäure als auch auf das PPlase-Substrat zu bestimmen.

Generell wurde ein Methodenrepertoire etabliert, Protein-Nukleinsäure-Interaktionen *in vitro* funktionell und strukturell zu charakterisieren. Es ist eine realistische Perspektive, dass sich diese Methoden so auch in anderen Systeme anwenden lassen werden, seien es Transkriptionsfaktoren, RNA-Chaperone, Nukleinsäurebindeproteine und andere Effektoren und Modulatoren zellulärer Prozesse.

## Literaturverzeichnis

1. Moradpour, D., F. Penin, and C.M. Rice, *Replication of hepatitis C virus*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(6): p. 453-63.
2. Lohmann, V., et al., *Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line*. Science, 1999. **285**(5424): p. 110-3.
3. Santolini, E., G. Migliaccio, and N. La Monica, *Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein*. J Virol, 1994. **68**(6): p. 3631-41.
4. Matsumoto, M., et al., *Homotypic interaction and multimerization of hepatitis C virus core protein*. Virology, 1996. **218**(1): p. 43-51.
5. Nolandt, O., et al., *Analysis of hepatitis C virus core protein interaction domains*. J Gen Virol, 1997. **78** ( Pt 6): p. 1331-40.
6. Boulant, S., et al., *Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets*. J Biol Chem, 2006. **281**(31): p. 22236-47.
7. Majeau, N., et al., *The N-terminal half of the core protein of hepatitis C virus is sufficient for nucleocapsid formation*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 4): p. 971-81.
8. Tarr, A.W., et al., *Cloning, expression, and functional analysis of patient-derived hepatitis C virus glycoproteins*. Methods Mol Biol, 2007. **379**: p. 177-97.
9. Lavie, M., A. Goffard, and J. Dubuisson, *Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer*. Curr Issues Mol Biol, 2007. **9**(2): p. 71-86.
10. Op De Beeck, A., L. Cocquerel, and J. Dubuisson, *Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 11): p. 2589-95.
11. von Hahn, T. and C.M. Rice, *Hepatitis C virus entry*. J Biol Chem, 2008. **283**(7): p. 3689-93.
12. Pavlovic, D., et al., *The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 6104-8.
13. Gonzalez, M.E. and L. Carrasco, *Viroporins*. FEBS Lett, 2003. **552**(1): p. 28-34.
14. Penin, F., et al., *Structural biology of hepatitis C virus*. Hepatology, 2004. **39**(1): p. 5-19.
15. Steinmann, E., et al., *Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions*. PLoS Pathog, 2007. **3**(7): p. e103.
16. Jones, C.T., et al., *Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus*. J Virol, 2007. **81**(16): p. 8374-83.

17. Kato, T., et al., *Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon*. *Gastroenterology*, 2003. **125**(6): p. 1808-17.
18. Zhong, J., et al., *Robust hepatitis C virus infection in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(26): p. 9294-9.
19. Bartosch, B., J. Dubuisson, and F.L. Cosset, *Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes*. *J Exp Med*, 2003. **197**(5): p. 633-42.
20. Hsu, M., et al., *Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(12): p. 7271-6.
21. Friebe, P., et al., *Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication*. *J Virol*, 2005. **79**(1): p. 380-92.
22. Lee, H., et al., *cis-acting RNA signals in the NS5B C-terminal coding sequence of the hepatitis C virus genome*. *J Virol*, 2004. **78**(20): p. 10865-77.
23. Friebe, P. and R. Bartenschlager, *Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication*. *J Virol*, 2002. **76**(11): p. 5326-38.
24. Friebe, P., et al., *Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication*. *J Virol*, 2001. **75**(24): p. 12047-57.
25. Yoo, B.J., et al., *5' end-dependent translation initiation of hepatitis C viral RNA and the presence of putative positive and negative translational control elements within the 5' untranslated region*. *Virology*, 1992. **191**(2): p. 889-99.
26. Ito, T. and M.M. Lai, *An internal polypyrimidine-tract-binding protein-binding site in the hepatitis C virus RNA attenuates translation, which is relieved by the 3'-untranslated sequence*. *Virology*, 1999. **254**(2): p. 288-96.
27. Ito, T., S.M. Tahara, and M.M. Lai, *The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site*. *J Virol*, 1998. **72**(11): p. 8789-96.
28. Tsukiyama-Kohara, K., et al., *Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA*. *J Virol*, 1992. **66**(3): p. 1476-83.
29. Fukushi, S., et al., *Complete 5' noncoding region is necessary for the efficient internal initiation of hepatitis C virus RNA*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. **199**(2): p. 425-32.
30. Friebe, P. and R. Bartenschlager, *Role of RNA structures in genome terminal sequences of the hepatitis C virus for replication and assembly*. *J Virol*, 2009. **83**(22): p. 11989-95.
31. Murayama, A., et al., *RNA polymerase activity and specific RNA structure are required for efficient HCV replication in cultured cells*. *PLoS Pathog*. **6**(4): p. e1000885.

32. Reynolds, J.E., et al., *Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation*. Embo J, 1995. **14**(23): p. 6010-20.
33. Honda, M., et al., *Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA*. Virology, 1996. **222**(1): p. 31-42.
34. Behrens, S.E., L. Tomei, and R. De Francesco, *Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus*. Embo J, 1996. **15**(1): p. 12-22.
35. Choi, H.B., Y.G. Kim, and J.W. Oh, *Biochemical properties of full-length hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase expressed in insect cells*. Exp Mol Med, 2003. **35**(6): p. 475-85.
36. Oh, J.W., T. Ito, and M.M. Lai, *A recombinant hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase capable of copying the full-length viral RNA*. J Virol, 1999. **73**(9): p. 7694-702.
37. Egger, D., et al., *Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex*. J Virol, 2002. **76**(12): p. 5974-84.
38. Gouttenoire, J., F. Penin, and D. Moradpour, *Hepatitis C virus nonstructural protein 4B: a journey into unexplored territory*. Rev Med Virol, 2010. **20**(2): p. 117-29.
39. Elazar, M., et al., *An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication*. J Virol, 2004. **78**(20): p. 11393-400.
40. Foster, T.L., et al., *Cyclophilin A interacts with domain II of hepatitis C virus NS5A and stimulates RNA binding in an isomerase-dependent manner*. J Virol, 2011. **85**(14): p. 7460-4.
41. Quezada, E.M. and C.M. Kane, *The Hepatitis C Virus NS5A Stimulates NS5B During In Vitro RNA Synthesis in a Template Specific Manner*. Open Biochem J, 2009. **3**: p. 39-48.
42. Shirota, Y., et al., *Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity*. J Biol Chem, 2002. **277**(13): p. 11149-55.
43. Wang, S., et al., *Viperin inhibits hepatitis C virus replication by interfering with binding of NS5A to host protein hVAP-33*. J Gen Virol, 2012. **93**(Pt 1): p. 83-92.
44. Ranjith-Kumar, C.T., et al., *A cell-based assay for RNA synthesis by the HCV polymerase reveals new insights on mechanism of polymerase inhibitors and modulation by NS5A*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22575.

45. Jiang, Y.F., et al., *The oncogenic role of NS5A of hepatitis C virus is mediated by up-regulation of survivin gene expression in the hepatocellular cell through p53 and NF-kappaB pathways*. Cell Biol Int, 2011. **35**(12): p. 1225-32.
46. He, Y., K.A. Staschke, and S.L. Tan, *HCV NS5A: A Multifunctional Regulator of Cellular Pathways and Virus Replication*. 2006.
47. Sene, D., et al., *Hepatitis C virus (HCV) evades NKG2D-dependent NK cell responses through NS5A-mediated imbalance of inflammatory cytokines*. PLoS Pathog, 2010. **6**(11): p. e1001184.
48. Enomoto, N., et al., *Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region*. J Clin Invest, 1995. **96**(1): p. 224-30.
49. Gale, M.J., Jr., et al., *Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein*. Virology, 1997. **230**(2): p. 217-27.
50. Kaneko, T., et al., *Production of two phosphoproteins from the NS5A region of the hepatitis C viral genome*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **205**(1): p. 320-6.
51. Tanji, Y., et al., *Phosphorylation of hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS5A*. J Virol, 1995. **69**(7): p. 3980-6.
52. Fridell, R.A., et al., *Distinct functions of NS5A in hepatitis C virus RNA replication uncovered by studies with the NS5A inhibitor BMS-790052*. J Virol, 2011. **85**(14): p. 7312-20.
53. Gao, M., et al., *Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect*. Nature, 2010. **465**(7294): p. 96-100.
54. Ide, Y., et al., *Characterization of the nuclear localization signal and subcellular distribution of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A*. Gene, 1996. **182**(1-2): p. 203-11.
55. Tai, C.L., et al., *The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3)*. J Virol, 1996. **70**(12): p. 8477-84.
56. Gwack, Y., et al., *Characterization of RNA binding activity and RNA helicase activity of the hepatitis C virus NS3 protein*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **225**(2): p. 654-9.
57. Kim, D.W., et al., *C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **215**(1): p. 160-6.
58. Suzich, J.A., et al., *Hepatitis C virus NS3 protein polynucleotide-stimulated nucleoside triphosphatase and comparison with the related pestivirus and flavivirus enzymes*. J Virol, 1993. **67**(10): p. 6152-8.

59. Huang, Z.S., C.C. Wang, and H.N. Wu, *HCV NS3 protein helicase domain assists RNA structure conversion*. FEBS Lett, 2010. **584**(11): p. 2356-62.
60. Gu, M. and C.M. Rice, *Three conformational snapshots of the hepatitis C virus NS3 helicase reveal a ratchet translocation mechanism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(2): p. 521-8.
61. Rajkowitsch, L., et al., *RNA chaperones, RNA annealers and RNA helicases*. RNA Biol, 2007. **4**(3): p. 118-30.
62. Zhang, C., et al., *Stimulation of hepatitis C virus (HCV) nonstructural protein 3 (NS3) helicase activity by the NS3 protease domain and by HCV RNA-dependent RNA polymerase*. J Virol, 2005. **79**(14): p. 8687-97.
63. Ishido, S., T. Fujita, and H. Hotta, *Complex formation of NS5B with NS3 and NS4A proteins of hepatitis C virus*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **244**(1): p. 35-40.
64. Jennings, T.A., et al., *RNA unwinding activity of the hepatitis C virus NS3 helicase is modulated by the NS5B polymerase*. Biochemistry, 2008. **47**(4): p. 1126-35.
65. Piccininni, S., et al., *Modulation of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity by the non-structural (NS) 3 helicase and the NS4B membrane protein*. J Biol Chem, 2002. **277**(47): p. 45670-9.
66. Bartenschlager, R., et al., *Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing*. J Virol, 1994. **68**(8): p. 5045-55.
67. Hamill, P. and F. Jean, *Enzymatic characterization of membrane-associated hepatitis C virus NS3-4A heterocomplex serine protease activity expressed in human cells*. Biochemistry, 2005. **44**(17): p. 6586-96.
68. Yan, Y., et al., *Complex of NS3 protease and NS4A peptide of BK strain hepatitis C virus: a 2.2 Å resolution structure in a hexagonal crystal form*. Protein Sci, 1998. **7**(4): p. 837-47.
69. Kim, J.L., et al., *Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide*. Cell, 1996. **87**(2): p. 343-55.
70. Pang, P.S., et al., *The hepatitis C viral NS3 protein is a processive DNA helicase with cofactor enhanced RNA unwinding*. Embo J, 2002. **21**(5): p. 1168-76.
71. Kuang, W.F., et al., *Hepatitis C virus NS3 RNA helicase activity is modulated by the two domains of NS3 and NS4A*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **317**(1): p. 211-7.
72. Lohmann, V., et al., *Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity*. J Virol, 1997. **71**(11): p. 8416-28.

73. Reigadas, S., et al., *HCV RNA-dependent RNA polymerase replicates in vitro the 3' terminal region of the minus-strand viral RNA more efficiently than the 3' terminal region of the plus RNA*. Eur J Biochem, 2001. **268**(22): p. 5857-67.
74. Astier-Gin, T., et al., *Template requirements and binding of hepatitis C virus NS5B polymerase during in vitro RNA synthesis from the 3'-end of virus minus-strand RNA*. Febs J, 2005. **272**(15): p. 3872-86.
75. Mahias, K., et al., *Identification of a structural element of the hepatitis C virus minus strand RNA involved in the initiation of RNA synthesis*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(12): p. 4079-91.
76. Kashiwagi, T., et al., *Promoter/origin structure of the complementary strand of hepatitis C virus genome*. J Biol Chem, 2002. **277**(32): p. 28700-5.
77. Collier, A.J., et al., *A conserved RNA structure within the HCV IRES eIF3-binding site*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(5): p. 375-80.
78. Lukavsky, P.J., et al., *Structure of HCV IRES domain II determined by NMR*. Nat Struct Biol, 2003. **10**(12): p. 1033-8.
79. Lukavsky, P.J., et al., *Structures of two RNA domains essential for hepatitis C virus internal ribosome entry site function*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(12): p. 1105-10.
80. Paulsen, R.B., et al., *Inhibitor-induced structural change in the HCV IRES domain IIa RNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(16): p. 7263-8.
81. Hong, Z., et al., *A novel mechanism to ensure terminal initiation by hepatitis C virus NS5B polymerase*. Virology, 2001. **285**(1): p. 6-11.
82. Ago, H., et al., *Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus*. Structure, 1999. **7**(11): p. 1417-26.
83. Bressanelli, S., et al., *Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(23): p. 13034-9.
84. Lesburg, C.A., et al., *Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site*. Nat Struct Biol, 1999. **6**(10): p. 937-43.
85. Chinnaswamy, S., et al., *Regulation of de novo-initiated RNA synthesis in hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase by intermolecular interactions*. J Virol, 2010. **84**(12): p. 5923-35.
86. Kim, Y.C., et al., *Functional analysis of RNA binding by the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase*. J Biol Chem, 2005. **280**(45): p. 38011-9.
87. Bressanelli, S., et al., *Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides*. J Virol, 2002. **76**(7): p. 3482-92.

88. O'Farrell, D., et al., *Substrate complexes of hepatitis C virus RNA polymerase (HC-J4): structural evidence for nucleotide import and de-novo initiation*. J Mol Biol, 2003. **326**(4): p. 1025-35.
89. Labonte, P., et al., *Modulation of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity by structure-based site-directed mutagenesis*. J Biol Chem, 2002. **277**(41): p. 38838-46.
90. Adachi, T., et al., *The essential role of C-terminal residues in regulating the activity of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1601**(1): p. 38-48.
91. Harrus, D., et al., *Further insights into the roles of GTP and the C terminus of the hepatitis C virus polymerase in the initiation of RNA synthesis*. J Biol Chem, 2010. **285**(43): p. 32906-18.
92. Ranjith-Kumar, C.T., et al., *Multiple interactions within the hepatitis C virus RNA polymerase repress primer-dependent RNA synthesis*. J Mol Biol, 2003. **330**(4): p. 675-85.
93. Howe, A.Y., et al., *Molecular mechanism of a thumb domain hepatitis C virus nonnucleoside RNA-dependent RNA polymerase inhibitor*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(12): p. 4103-13.
94. Schmidt-Mende, J., et al., *Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase*. J Biol Chem, 2001. **276**(47): p. 44052-63.
95. Ivashkina, N., et al., *The hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase membrane insertion sequence is a transmembrane segment*. J Virol, 2002. **76**(24): p. 13088-93.
96. Moradpour, D., et al., *Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication*. J Virol, 2004. **78**(23): p. 13278-84.
97. Lee, H., et al., *The C-terminal hydrophobic domain of hepatitis C virus RNA polymerase NS5B can be replaced with a heterologous domain of poliovirus protein 3A*. J Virol, 2006. **80**(22): p. 11343-54.
98. Brass, V., et al., *Hepatitis C virus RNA replication requires a conserved structural motif within the transmembrane domain of the NS5B RNA-dependent RNA polymerase*. J Virol, 2010. **84**(21): p. 11580-4.
99. Ferrari, E., et al., *Characterization of soluble hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase expressed in Escherichia coli*. J Virol, 1999. **73**(2): p. 1649-54.
100. Uchiyama, Y., et al., *Measurement of HCV RdRp activity with C-terminal 21 aa truncated NS5b protein: optimization of assay conditions*. Hepatol Res, 2002. **23**(2): p. 90-97.

101. Luo, G., et al., *De novo initiation of RNA synthesis by the RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) of hepatitis C virus*. J Virol, 2000. **74**(2): p. 851-63.
102. Vo, N.V., J.R. Tuler, and M.M. Lai, *Enzymatic characterization of the full-length and C-terminally truncated hepatitis C virus RNA polymerases: function of the last 21 amino acids of the C terminus in template binding and RNA synthesis*. Biochemistry, 2004. **43**(32): p. 10579-91.
103. Yamashita, T., et al., *RNA-dependent RNA polymerase activity of the soluble recombinant hepatitis C virus NS5B protein truncated at the C-terminal region*. J Biol Chem, 1998. **273**(25): p. 15479-86.
104. Simister, P., et al., *Structural and functional analysis of hepatitis C virus strain JFH1 polymerase*. J Virol, 2009. **83**(22): p. 11926-39.
105. Di Marco, S., et al., *Interdomain communication in hepatitis C virus polymerase abolished by small molecule inhibitors bound to a novel allosteric site*. J Biol Chem, 2005. **280**(33): p. 29765-70.
106. Betzi, S., et al., *Identification of allosteric inhibitors blocking the hepatitis C virus polymerase NS5B in the RNA synthesis initiation step*. Antiviral Res, 2009. **84**(1): p. 48-59.
107. Liu, Y., et al., *Mechanistic study of HCV polymerase inhibitors at individual steps of the polymerization reaction*. Biochemistry, 2006. **45**(38): p. 11312-23.
108. Biswal, B.K., et al., *Crystal structures of the RNA-dependent RNA polymerase genotype 2a of hepatitis C virus reveal two conformations and suggest mechanisms of inhibition by non-nucleoside inhibitors*. J Biol Chem, 2005. **280**(18): p. 18202-10.
109. Biswal, B.K., et al., *Non-nucleoside inhibitors binding to hepatitis C virus NS5B polymerase reveal a novel mechanism of inhibition*. J Mol Biol, 2006. **361**(1): p. 33-45.
110. Wang, M., et al., *Non-nucleoside analogue inhibitors bind to an allosteric site on HCV NS5B polymerase. Crystal structures and mechanism of inhibition*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9489-95.
111. Cai, Z., et al., *Mutagenesis analysis of the rGTP-specific binding site of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase*. J Virol, 2005. **79**(18): p. 11607-17.
112. Love, R.A., et al., *Crystallographic identification of a noncompetitive inhibitor binding site on the hepatitis C virus NS5B RNA polymerase enzyme*. J Virol, 2003. **77**(13): p. 7575-81.
113. Kneteman, N.M., et al., *HCV796: A selective nonstructural protein 5B polymerase inhibitor with potent anti-hepatitis C virus activity in vitro, in mice with chimeric human livers, and in humans infected with hepatitis C virus*. Hepatology, 2009. **49**(3): p. 745-52.

114. Hang, J.Q., et al., *Slow binding inhibition and mechanism of resistance of non-nucleoside polymerase inhibitors of hepatitis C virus*. J Biol Chem, 2009. **284**(23): p. 15517-29.
115. Dutartre, H., et al., *General catalytic deficiency of hepatitis C virus RNA polymerase with an S282T mutation and mutually exclusive resistance towards 2'-modified nucleotide analogues*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(12): p. 4161-9.
116. Kaul, A., et al., *Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics*. PLoS Pathog, 2009. **5**(8): p. e1000546.
117. Verdegem, D., et al., *Domain 3 of NS5A protein from the hepatitis C virus has intrinsic alpha-helical propensity and is a substrate of cyclophilin A*. J Biol Chem, 2011. **286**(23): p. 20441-54.
118. Coelmont, L., et al., *DEB025 (Alisporivir) inhibits hepatitis C virus replication by preventing a cyclophilin A induced cis-trans isomerisation in domain II of NS5A*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13687.
119. von Hahn, T., et al., *Hepatocytes that express variants of cyclophilin a are resistant to HCV infection and replication*. Gastroenterology, 2012. **143**(2): p. 439-447 e1.
120. Geissler, R., R.P. Golbik, and S.E. Behrens, *The DEAD-box helicase DDX3 supports the assembly of functional 80S ribosomes*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(11): p. 4998-5011.
121. Goh, P.Y., et al., *Cellular RNA helicase p68 relocalization and interaction with the hepatitis C virus (HCV) NS5B protein and the potential role of p68 in HCV RNA replication*. J Virol, 2004. **78**(10): p. 5288-98.
122. Isken, O., et al., *Nuclear factors are involved in hepatitis C virus RNA replication*. RNA, 2007. **13**(10): p. 1675-92.
123. He, Q.S., et al., *Comparisons of RNAi approaches for validation of human RNA helicase A as an essential factor in hepatitis C virus replication*. J Virol Methods, 2008. **154**(1-2): p. 216-9.
124. Kambara, H., et al., *Establishment of a novel permissive cell line for the propagation of hepatitis C virus by expression of microRNA miR122*. J Virol, 2012. **86**(3): p. 1382-93.
125. Watashi, K., et al., *Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase*. Mol Cell, 2005. **19**(1): p. 111-22.
126. Heck, J.A., X. Meng, and D.N. Frick, *Cyclophilin B stimulates RNA synthesis by the HCV RNA dependent RNA polymerase*. Biochem Pharmacol, 2009. **77**(7): p. 1173-80.

127. Price, E.R., et al., *Human cyclophilin B: a second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(5): p. 1903-7.
128. Mossesso, E. and C.D. Lima, *Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast*. Mol Cell, 2000. **5**(5): p. 865-76.
129. Feigon, J. and D.R. Kearns, *<sup>1</sup>H NMR investigation of the conformational states of DNA in nucleosome core particles*. Nucleic Acids Res, 1979. **6**(6): p. 2327-37.
130. Johnston, P.D., N. Figueroa, and A.G. Redfield, *Real-time solvent exchange studies of the imino and amino protons of yeast phenylalanine transfer RNA by Fourier transform NMR*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(7): p. 3130-4.
131. Fischer, G., et al., *Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins*. Nature, 1989. **337**(6206): p. 476-8.
132. Zuker, M., *Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3406-15.
133. Yang, F., et al., *Cyclophilin A is an essential cofactor for hepatitis C virus infection and the principal mediator of cyclosporine resistance in vitro*. J Virol, 2008. **82**(11): p. 5269-78.
134. Fischer, G. and H. Bang, *The refolding of urea-denatured ribonuclease A is catalyzed by peptidyl-prolyl cis-trans isomerase*. Biochim Biophys Acta, 1985. **828**(1): p. 39-42.
135. Fischer, G., H. Bang, and C. Mech, *[Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides]*. Biomed Biochim Acta, 1984. **43**(10): p. 1101-11.
136. Liu, J., et al., *Cloning, expression, and purification of human cyclophilin in Escherichia coli and assessment of the catalytic role of cysteines by site-directed mutagenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(6): p. 2304-8.
137. Ranjith-Kumar, C.T. and C.C. Kao, *Recombinant viral RdRps can initiate RNA synthesis from circular templates*. RNA, 2006. **12**(2): p. 303-12.
138. Rigat, K., et al., *Ligand-induced changes in hepatitis C virus NS5B polymerase structure*. Antiviral Res, 2010. **88**(2): p. 197-206.
139. Weng, L., et al., *Modification of hepatitis C virus 1b RNA polymerase to make a highly active JFH1-type polymerase by mutation of the thumb domain*. Arch Virol, 2009. **154**(5): p. 765-73.
140. Ferrari, E., et al., *Hepatitis C virus NS5B polymerase exhibits distinct nucleotide requirements for initiation and elongation*. J Biol Chem, 2008. **283**(49): p. 33893-901.

141. Reich, S., et al., *Mechanisms of activity and inhibition of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase*. J Biol Chem, 2010. **285**(18): p. 13685-93.
142. Rajendran, S., M.J. Jezewska, and W. Bujalowski, *Human DNA polymerase beta recognizes single-stranded DNA using two different binding modes*. J Biol Chem, 1998. **273**(47): p. 31021-31.
143. Marlow, M.S., et al., *The role of conformational entropy in molecular recognition by calmodulin*. Nat Chem Biol, 2010. **6**(5): p. 352-8.
144. Nesmelova, I.V., et al., *Lactose binding to galectin-1 modulates structural dynamics, increases conformational entropy, and occurs with apparent negative cooperativity*. J Mol Biol, 2010. **397**(5): p. 1209-30.
145. Wang, W., et al., *Creating conformational entropy by increasing interdomain mobility in ligand binding regulation: a revisit to N-terminal tandem PDZ domains of PSD-95*. J Am Chem Soc, 2009. **131**(2): p. 787-96.
146. Frederick, K.K., et al., *Conformational entropy in molecular recognition by proteins*. Nature, 2007. **448**(7151): p. 325-9.
147. Walsh, S.T., *A biosensor study indicating that entropy, electrostatics, and receptor glycosylation drive the binding interaction between interleukin-7 and its receptor*. Biochemistry, 2010. **49**(40): p. 8766-78.
148. Mills, J.L., et al., *NMR structure and dynamics of the engineered fluorescein-binding lipocalin FluA reveal rigidification of beta-barrel and variable loops upon enthalpy-driven ligand binding*. Biochemistry, 2009. **48**(31): p. 7411-9.
149. Rinnenthal, J., et al., *Direct observation of the temperature-induced melting process of the Salmonella fourU RNA thermometer at base-pair resolution*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(11): p. 3834-47.
150. Nikolova, E.N. and H.M. Al-Hashimi, *Thermodynamics of RNA melting, one base pair at a time*. RNA, 2010. **16**(9): p. 1687-91.
151. Woodson, S.A., *Compact intermediates in RNA folding*. Annu Rev Biophys, 2010. **39**: p. 61-77.
152. Handschumacher, R.E., et al., *Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A*. Science, 1984. **226**(4674): p. 544-7.
153. Liu, J., et al., *Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes*. Cell, 1991. **66**(4): p. 807-15.
154. Werlen, G., et al., *Calcineurin preferentially synergizes with PKC-theta to activate JNK and IL-2 promoter in T lymphocytes*. Embo J, 1998. **17**(11): p. 3101-11.
155. Fruman, D.A., et al., *Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(9): p. 3686-90.

156. Goldfeld, A.E., et al., *Calcineurin mediates human tumor necrosis factor alpha gene induction in stimulated T and B cells*. J Exp Med, 1994. **180**(2): p. 763-8.
157. O'Keefe, S.J., et al., *FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin*. Nature, 1992. **357**(6380): p. 692-4.
158. Liu, J., et al., *Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity*. Biochemistry, 1992. **31**(16): p. 3896-901.
159. Colombani, P.M., A. Robb, and A.D. Hess, *Cyclosporin A binding to calmodulin: a possible site of action on T lymphocytes*. Science, 1985. **228**(4697): p. 337-9.
160. Lang, K., F.X. Schmid, and G. Fischer, *Catalysis of protein folding by prolyl isomerase*. Nature, 1987. **329**(6136): p. 268-70.
161. Theuerkorn, M., G. Fischer, and C. Schiene-Fischer, *Prolyl cis/trans isomerase signalling pathways in cancer*. Curr Opin Pharmacol, 2011. **11**(4): p. 281-7.
162. Fischer, G. and F.X. Schmid, *The mechanism of protein folding. Implications of in vitro refolding models for de novo protein folding and translocation in the cell*. Biochemistry, 1990. **29**(9): p. 2205-12.
163. Schonbrunner, E.R., et al., *Catalysis of protein folding by cyclophilins from different species*. J Biol Chem, 1991. **266**(6): p. 3630-5.
164. Lilie, H., et al., *Prolyl isomerases catalyze antibody folding in vitro*. Protein Sci, 1993. **2**(9): p. 1490-6.
165. Luban, J., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B*. Cell, 1993. **73**(6): p. 1067-78.
166. Franke, E.K., H.E. Yuan, and J. Luban, *Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions*. Nature, 1994. **372**(6504): p. 359-62.
167. Thali, M., et al., *Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions*. Nature, 1994. **372**(6504): p. 363-5.
168. Braaten, D., E.K. Franke, and J. Luban, *Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription*. J Virol, 1996. **70**(6): p. 3551-60.
169. Fischer, G., P. Gallay, and S. Hopkins, *Cyclophilin inhibitors for the treatment of HCV infection*. Curr Opin Investig Drugs, 2010. **11**(8): p. 911-8.
170. Tang, H., *Cyclophilin inhibitors as a novel HCV therapy*. Viruses, 2010. **2**(8): p. 1621-34.
171. Hopkins, S., et al., *SCY-635, a novel nonimmunosuppressive analog of cyclosporine that exhibits potent inhibition of hepatitis C virus RNA replication in vitro*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(2): p. 660-72.

172. Ciesek, S., et al., *Cyclosporine A inhibits hepatitis C virus nonstructural protein 2 through cyclophilin A*. *Hepatology*, 2009. **50**(5): p. 1638-45.
173. Chatterji, U., et al., *The isomerase active site of cyclophilin A is critical for hepatitis C virus replication*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(25): p. 16998-7005.
174. Nakagawa, T., et al., *Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death*. *Nature*, 2005. **434**(7033): p. 652-8.
175. Schinzel, A.C., et al., *Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(34): p. 12005-10.
176. Crompton, M., S. Virji, and J.M. Ward, *Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore*. *Eur J Biochem*, 1998. **258**(2): p. 729-35.
177. Montague, J.W., F.M. Hughes, Jr., and J.A. Cidlowski, *Native recombinant cyclophilins A, B, and C degrade DNA independently of peptidylprolyl cis-trans-isomerase activity. Potential roles of cyclophilins in apoptosis*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(10): p. 6677-84.
178. Price, E.R., et al., *Cyclophilin B trafficking through the secretory pathway is altered by binding of cyclosporin A*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(9): p. 3931-5.
179. Allain, F., A. Denys, and G. Spik, *Characterization of surface binding sites for cyclophilin B on a human tumor T-cell line*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(24): p. 16537-40.
180. Cacalano, N.A., et al., *Evidence for a functional receptor for cyclosporin A on the surface of lymphocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(10): p. 4353-7.
181. Denys, A., et al., *Involvement of two classes of binding sites in the interactions of cyclophilin B with peripheral blood T-lymphocytes*. *Biochem J*, 1998. **336** (Pt 3): p. 689-97.
182. Allain, F., et al., *Interaction with glycosaminoglycans is required for cyclophilin B to trigger integrin-mediated adhesion of peripheral blood T lymphocytes to extracellular matrix*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(5): p. 2714-9.
183. Bernasconi, R., et al., *Cyclosporine A-sensitive, cyclophilin B-dependent endoplasmic reticulum-associated degradation*. *PLoS One*, 2010. **5**(9).
184. Kim, J., et al., *Overexpressed cyclophilin B suppresses apoptosis associated with ROS and Ca<sup>2+</sup> homeostasis after ER stress*. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 21): p. 3636-48.
185. Rycyzyn, M.A., et al., *Role of cyclophilin B in prolactin signal transduction and nuclear retrotranslocation*. *Mol Endocrinol*, 2000. **14**(8): p. 1175-86.

186. Rycyzyn, M.A. and C.V. Clevenger, *The intranuclear prolactin/cyclophilin B complex as a transcriptional inducer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(10): p. 6790-5.
187. Bauer, K., et al., *Cyclophilins contribute to Stat3 signaling and survival of multiple myeloma cells*. Oncogene, 2009. **28**(31): p. 2784-95.
188. Chinnaswamy, S., et al., *A locking mechanism regulates RNA synthesis and host protein interaction by the hepatitis C virus polymerase*. J Biol Chem, 2008. **283**(29): p. 20535-46.
189. Robida, J.M., et al., *Characterization of hepatitis C virus subgenomic replicon resistance to cyclosporine in vitro*. J Virol, 2007. **81**(11): p. 5829-40.
190. Ishii, N., et al., *Diverse effects of cyclosporine on hepatitis C virus strain replication*. J Virol, 2006. **80**(9): p. 4510-20.

## Anhang

### Aminosäuresequenzen der in dieser Arbeit untersuchten Proteine:

#### **HCV-Polymerase vom Genotyp 1b (Subtyp BK)**

SMSYTWGALITPCAAEESKLPINALSNSLLRHHNMVYATTSRSAGLRQKKVTFDRLQVLDDHYRDVL  
KEMKAKASTVKAKLLSVEEACKLTPPHSAKSKFGYGAKDVRNLSSKAVNHIHSVWKDLEDVTPIDT  
TIMAKNEVFCVQPEKGGRRKPARLIVFPDLGVRVCEKMALYDVVSTLPQVVMGSSYGFQYSPGQRVEF  
LVNTWKSCKNPMGFSYDTRCFDSTVTENDIRVEESIQCCDLAPEARQAIKSLTERLYIGGPLTNSKG  
QNCGYRRCRASGVLTTSCGNTLTCYLKASAACRAAKLQDCTMLVNGDDLWICESAGTQEDAASLRV  
FTEAMTRYSAPPDPPQPEYDLELITSCSSNVSAHDASGKRVIYLRDPTTPLARAAWETARHTPV  
NSWLGNIIMYAPTLWARMILMTHFFSILLAQEQLKALDCQIYGACYSIEPLDLPQIIERLHGLSAFSLHS  
YSPGEINRVASCLRKLGVPPLRVWRHRARSVRARLLSQGGRAATCGKYLFNWAVKTKLKLTPIPAAS  
QLDLSGWVAVAGYSGGDIYHLSRARPR.

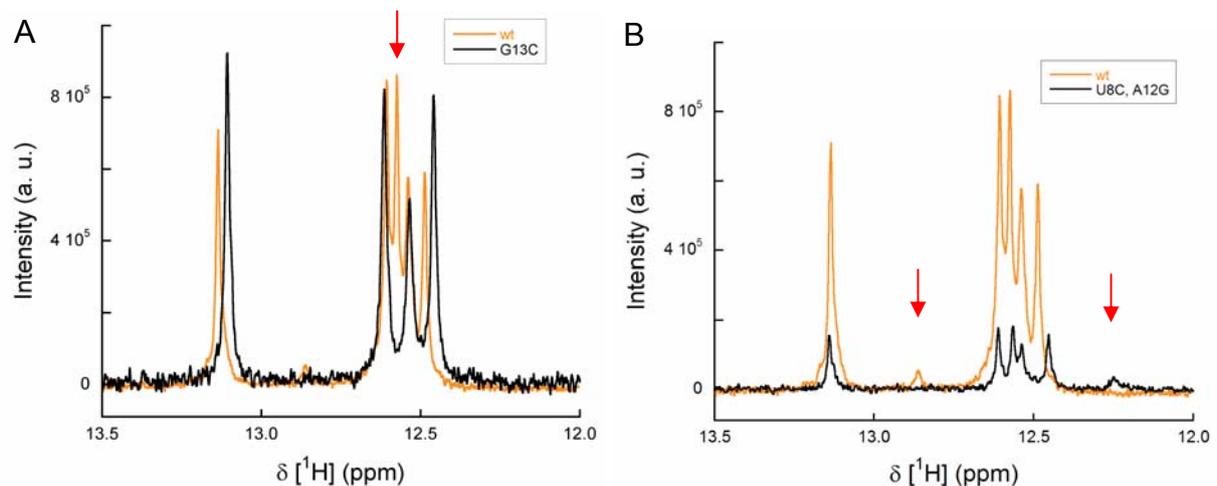
#### **HCV-Polymerase vom Genotyp 2a (Subtyp JFH-1)**

SMSYSWTGALITPCSPEEEKLPINPLSNSLLRYHNKVYCTTSKSASQRAKKVTFDRTQVLDAHYDSVL  
KDIKLAASKVSARLLTLEEACQLTPPHSARSKYGFGAKEVRSLSGRAVNHISVWKDLEDPQTPIPTTI  
MAKNEVFCVDPKGGKKPARLIVYFDLGVVCEKMALYDITQKLPQAVMGASYGFQYSPAQRVEYLL  
KAWAEKKDPMGFSYDTRCFDSTVTERDIRTEESIQACSLPEEARTAIHSLTERLYVGGPMFNKSGQT  
CGYRRCRASGVLTTSMGNTITCYVKALAACKAAGIVAPTMLVCGDDLVISESQGTEDERNLRAFTE  
AMTRYSAPPDPPRPEYDLELITSCSSNVSVLGRGRRRYLTRDPTTPLARAAWETVRHSPINSW  
LGNIIQYAPTIWVRMVLMTTHFFSILMVQDQLDQNLNFEMYGSVYSVNPLDLPALIERLHGLDAFSMHTY  
SHHELTRVASALRKLGAAPLRVWKSARAVRASLISRGGKAAVCGRYLFNWAVKTKLKLTPPEARLL  
DLSSWFTVGAGGGDIFHSVSRARPR.

#### **Cyclophilin B (human)**

MDEKKKGPKVTVKVYFDLRIGDEDVGRVIFGLFGKTVPKTVDNFVALATGEKGFYKNSKFHRVIKDF  
MIQGGDFTRGDGTGGKSIYGERFPDENFKLKHYGPGWVSMANAGKDTNGSQFFITVKTAWLDGKH  
VVFQKVLGMEVVRKVESTKTDSRDKPLKDVIADCGKIEVEKPFIAIKE.

## NMR-spektroskopische Experimente zur Zuordnung der Imino-Protonen NMR-Signale der *stem-loop*-RNA:



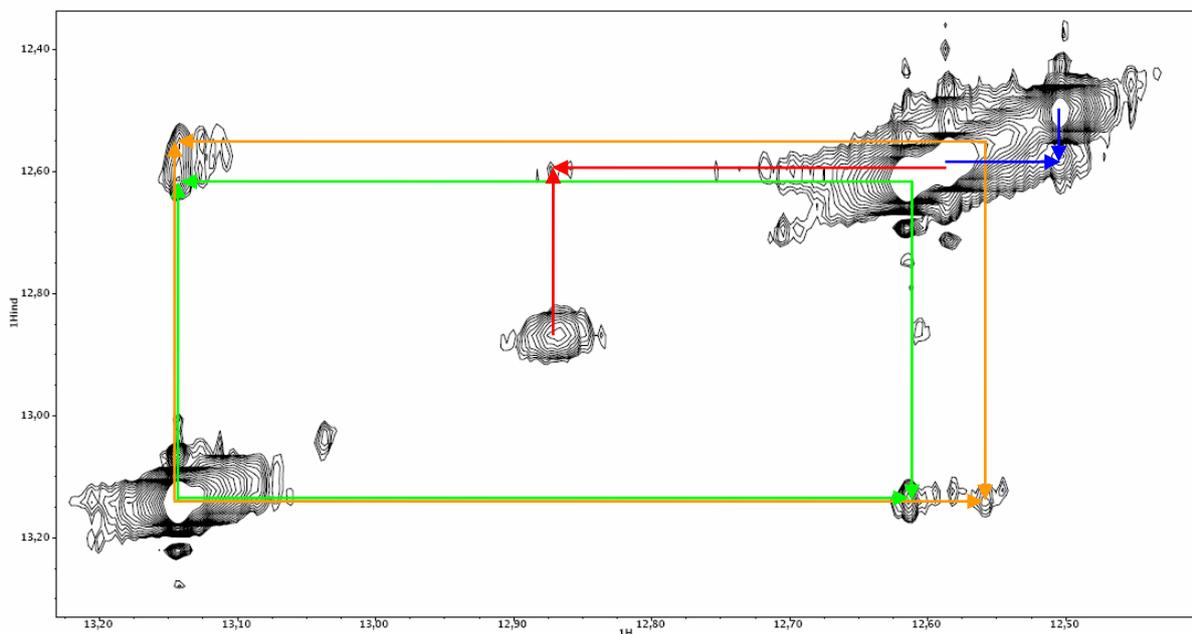
Anhang Abbildung 1: 1D  $^1\text{H}$  NMR-Spektren der *stem-loop*-RNA sowie Varianten in dem spektralen Bereich sensitiv für Basenpaarungen.

Das Imino-Protonen NMR-Spektrum der in dieser Arbeit charakterisierten *stem-loop*-RNA (orange, in der Legende mit „wt“ gekennzeichnet; siehe Materialien und Methoden, Seite 21) ist jeweils einer Variante der *stem-loop*-RNA gegenübergestellt (schwarz, in der Legende mit der entsprechenden Nukleotidsubstitution angedeutet). Spektren von je 0.1 mM RNA wurden bei  $T = 296\text{ K}$  in 50 mM HEPES/NaOH, 200 mM NaCl, 6.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM TCEP, 5% (v/v) Glyzerin (deutertiert), pH = 7.5 und 10% (v/v)  $\text{D}_2\text{O}$  mit einem Bruker Avance III 600 Spektrometer aufgenommen. Wassersignale wurden durch *double pulse field gradient spin echo approach* unterdrückt und die Spektren mittels TopSpin 2.1 prozessiert.

A) Die *stem-loop*-RNA-Variante G13C entwickelt, verglichen mit der Wildtyp-Sequenz (siehe Materialien und Methoden, Seite 21), nur 4 statt 5 Imino-Protonen NMR-Signale (siehe Abbildung 15, Seite 60). Durch die Nukleotidsubstitution G13C kann sich die Basenpaarung  $\text{G}_{13}\text{-C}_7$ , durch den Pfeil gekennzeichnet, nicht ausbilden. Es resultiert eine *stem-loop*-RNA-Sekundärstruktur mit einem ‚hepta-loop‘ und den Basenpaaren  $\text{G}_3\text{-C}_{17}$ ,  $\text{G}_{16}\text{-C}_4$ ,  $\text{G}_{15}\text{-C}_5$  und  $\text{G}_{14}\text{-C}_6$ . Durch die fehlende Basenpaarung  $\text{G}_{13}\text{-C}_{17}$  ist die niedrig-populierte Basenpaarung  $\text{U}_8\text{-A}_{12}$  noch stärker destabilisiert und nicht mehr detektierbar.

B) Die *stem-loop*-RNA-Doppelvariante U8C, A12G entwickelt, verglichen mit der Wildtyp-Sequenz (siehe Materialien und Methoden, Seite 21 sowie Abbildung 15,

Seite 60), ebenfalls 5 Imino-Protonen NMR-Signale. Die Nukleotidsubstitutionen U8C und A12G führen zu einer Substitution der niedrig-populierten Basenpaarung U<sub>8</sub>-A<sub>12</sub> durch die theoretisch stabilere Basenpaarung C<sub>8</sub>-G<sub>12</sub>. Die allgemeine Sekundärstruktur der *stem-loop*-RNA bleibt dadurch unverändert. Das Imino-Proton NMR-Signal der Basenpaarung C<sub>8</sub>-G<sub>12</sub> erfährt aber, verglichen mit dem ursprünglichen Signal von U<sub>8</sub>-A<sub>12</sub>, eine chemische Verschiebung Richtung Hochfeld (durch Pfeile gekennzeichnet).



Anhang Abbildung 2: 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY NMR-Spektren der *stem-loop*-RNA zur Zuordnung der Imino-Protonen NMR-Signale.

2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY NMR-Spektren von 1 mM *stem-loop*-RNA (siehe Materialien und Methoden, Seite 21) wurden bei T = 296 K in 50 mM HEPES/NaOH, 200 mM NaCl, 6.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM TCEP, 5% (v/v) Glycerin (deuteriert), pH = 7.5 und 10% (v/v) D<sub>2</sub>O mit einem Bruker Avance III 800 Spektrometer und einem Kryoprobenkopf mit Mischzeiten t<sub>m</sub> = 120 ms und 250 ms und spektralen Weiten von 20.01 ppm in beide Dimensionen aufgenommen. In der indirekten Dimension wurden 1024 Inkremente mit je 160 Akkumulationen aufgenommen. Die Auflösung in der direkten Dimension betrug 8192 Schritte. Die <sup>1</sup>H Träger-Frequenz war auf 4.7 ppm gesetzt, Wassersignale wurden durch *double pulse field gradient spin echo approach* unterdrückt und die Spektren mittels TopSpin 2.1 prozessiert. Es konnten 4

intramolekulare  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOE-Signale detektiert werden, die durch Pfeile in der Abbildung angedeutet sind. Das  $^1\text{H}$  NMR-Signal bei 13.14 ppm entwickelte ein Spin-System mit den  $^1\text{H}$  NMR-Signalen bei 12.62 ppm und 12.56 ppm. Das  $^1\text{H}$  NMR-Signal bei 12.59 ppm entwickelte ein Spin-System mit den  $^1\text{H}$  NMR-Signalen bei 12.87 ppm und 12.51 ppm. Dadurch konnten die einzelnen Imino-Proton NMR-Signale den jeweiligen intramolekularen Basenpaarungen der *stem-loop*-RNA entsprechend Abbildung 15 (Seite 60) zugeordnet werden.

## Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei den beiden Betreuern meiner Doktorarbeit bedanken, Professor Dr. Sven-Erik Behrens und PD Dr. habil. Ralph Peter Golbik, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Danke Sven für dein Interesse, deine Geduld und dein Mitwirken an dieser Arbeit sowie Publikation(en), dass ich in deinen Labors ein doch eher enzymologisches Thema bearbeiten durfte und dass sich das Große nicht im Kleinen verlor.

Ralph, herzlichen Dank! Durch deine direkte und intensive Betreuung, von den Grundlagen der Proteinreinigung angefangen, hast du eine hervorragende Ausbildung ermöglicht. Sehr zu schätzen weiß ich die vielen konstruktiven und motivierenden Diskussionen.

Moin Hauke! Danke für die sehr direkten, kritischen und hilfreichen Diskussionen und Denkanstöße.

Allen aktuellen sowie ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe Behrens möchte ich herzlich für das durchweg angenehme und sehr freundliche Arbeitsklima danken: Johanna, Christine, Christin, Maika, Anke, Maria, Susi, Jana, Martina, Anja, Beate, Sylke, Yvonne, Constanze, Anke, Jana, Eileen, Annika, Birgit, Ralph, Torsten, René, Paul, Thomas, Sebastian, Thomas, Tobias ...

René und Paul möchte ich speziell für die Durchführung zahlreicher radioaktiver Polymerasetests danken. Alles Gute, habe d`Ehre!

Jochen, dankeschön für die Nutzung deiner Geräte, die unkomplizierte Kooperation und angenehme Kommunikation!

Micha, vielen Dank für die Einführung in die NMR-Spektroskopie, die Durchführung der NMR-Spektroskopie sowie die angenehme Zusammenarbeit!

Für die (finanzielle) Unterstützung möchte ich besonders dem Graduiertenkolleg 1026 (Milton, Mechtild, Martina) sowie der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalts danken.

Dem gesamten Graduiertenkolleg 1026, allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Biochemie, Biotechnologie, Biophysik sowie angrenzender Institute danke ich für das stets freundliche und angenehme Arbeitsklima.

## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich bisher mit dieser Arbeit weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch an einer anderen Einrichtung um die Erlangung eines akademischen Grades beworben habe.

Ich versichere weiterhin, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Die den genutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Halle (Saale), 18.09.2012

Stefan Reich

## **Stefan Reich – Curriculum Vitae**

Name, Vorname	Reich, Stefan
Akademischer Grad	Diplom Biochemiker
Geburtsdatum, Geburtsort	29.11.1981, Straubing
Geschlecht, Staatsangehörigkeit	männlich, deutsch
Anschrift (privat)	Windthorststr. 1 06114 Halle (Saale)
Kontakt	stefan.reich@biochemtech.uni-halle.de Tel.: 004917621981292

### **Ausbildung**

Seit 10/2007	Doktorand an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Mikrobielle Biotechnologie  Dissertation 'Biophysikalische Untersuchungen zur Funktion der Hepatitis C viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase'
2002 – 2007	Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  Diplomarbeit 'Charakterisierung der Wechselwirkung der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase NS5B (HCV) und der humanen Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase Cyclophilin B'  Diplomprüfungen: Allgemeine Biochemie Enzymologie Organische Chemie Immunologie Pflanzenphysiologie
2002	Wehrdienst
1988 – 2001	Erwerb der Hochschulreife (Ludwigs-Gymnasium, Straubing)

## Stipendien

- 2010 – 2011 Promotionsstipendium des Graduiertenkollegs GRK 1026  
'Conformational Transitions in Macromolecular Interactions'
- 2008 – 2010 Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt

## Publikationen

Reich, S., Golbik, R. P., Geissler, R., Lilie, H., & Behrens, S. E. (2010)  
Mechanisms of activity and inhibition of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA  
polymerase  
*J. Biol. Chem.* **285**, 13685-13693