

Funktionelle Charakterisierung des coronaviralen Replikationskomplexes

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Tobias Hertzig
aus Eisingen

Würzburg, 2006

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. John Ziebuhr

Gutachter: Prof. Dr. Roy Gross

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Diese Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Ich habe außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 11.09.2006

Die Experimente dieser Arbeit wurden am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe von PD Dr. John Ziebuhr durchgeführt.

Ich danke PD Dr. John Ziebuhr neben der Überlassung dieses Themas dafür, dass ich zu jeder Zeit ein offenes und interessiertes Ohr für wissenschaftliche Diskussionen vorgefunden habe.

Ich danke allen Kollegen und ehemaligen Kollegen für eine freundschaftliche Atmosphäre, die über den Laboralltag hinausreichte. Namentlich möchte ich an dieser Stelle Barbara Schelle danken, ohne deren praktische Erfahrung die Arbeit im Labor ungleich schwieriger verlaufen wäre.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Coronaviren	1
1.1.1 Taxonomie	1
1.1.2 Morphologie	2
1.1.3 Coronavirale Infektionen	3
1.1.4 Genomorganisation	4
1.1.5 Der coronavirale Replikationszyklus	6
1.1.5.1 Proteolytische Prozessierung	7
1.1.5.2 Replikation und Transkription	8
1.1.6 Weitere ausgewählte Nichtstrukturproteine von Coronaviren	9
1.1.6.1 Die Nichtstrukturproteine nsp7, nsp8 und nsp9	9
1.1.6.2 Das Nichtstrukturprotein nsp13	10
1.1.6.3 Die Nichtstrukturproteine nsp3, nsp14, nsp15 und nsp16	12
1.2 Chimäre Viren	13
1.3 Zielstellung der Arbeit	14
2 Material und Lösungen	16
2.1 Materialien	16
2.1.1 Chemikalien	16
2.1.1.1 Radiochemikalien	18
2.1.2 Kits	18
2.1.3 Enzyme	18
2.1.4 Geräte	19
2.1.5 Sonstiges	20
2.1.6 Bakterien	20
2.1.7 Viren	20
2.1.8 Zelllinien	20
2.1.9 Plasmide	20
2.1.10 Nährmedien für Bakterien	21
2.1.11 Nährmedien und Puffer für Zellkultur	21
2.2 Puffer und Lösungen	22

2.2.1 DNA-Minipräparation	22
2.2.2 Herstellung kompetenter Zellen	23
2.2.3 Puffer und Lösungen für Nukleinsäureelektrophorese	23
2.2.3.1 Agarosegele	23
2.2.3.1.1 DNA	23
2.2.3.1.2 RNA	23
2.2.3.2 Formaldehydgele	24
2.2.3.2 Proteingele	24
2.2.4 Puffer und Lösungen für Blots	24
2.2.4.1 Lösungen für Southern Blot	25
2.2.4.2 Lösungen für Northern Blot	25
2.2.5 Puffer für PolyA-RNA-Isolation mit Dynabeads	25
2.2.6 Lösung für DNA-Isolation und Aufreinigung	26
2.2.7 Sonstige Puffer und Lösungen	26
2.3 Software	26
3 Methoden	27
3.1 DNA	27
3.1.1 Standardmethoden	27
3.1.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
3.1.1.2 Restriktionsspaltung	28
3.1.1.3 Dephosphorylierung	28
3.1.1.4 Ligation	28
3.1.2 Reinigung von DNA	29
3.1.2.1 Phenol/ Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanolpräzipitation	29
3.1.2.2 Qiagen PCR Purification Kit	29
3.1.2.3 Bindung an Diatomeenerde	29
3.1.2.4 Gelextraktion	29
3.1.3 DNA-Isolation	30
3.1.3.1 Plasmid-DNA-Präparation aus Bakterien	30
3.1.3.1.1 Analytischer Maßstab (Mini-Präparation)	30
3.1.3.1.2 Präparativer Maßstab (Midi-Präparation)	30

3.1.3.2 DNA-Isolation aus eukaryontischen Zellen/ Vaccinia	30
3.1.3.2.1 Analytischer Maßstab	30
3.1.3.2.2 Präparativer Maßstab	30
3.1.4 DNA-Analyse	31
3.1.4.1 Agarosegelelektrophorese	31
3.1.4.2 Southern Blot	31
3.1.4.3 Sequenzierung	32
3.2 RNA	32
3.2.1 <i>In-vitro</i> -Transkription	32
3.2.2 Reverse Transkription	33
3.2.3 mRNA-Isolation	34
3.2.4 RNA-Analyse	34
3.2.4.1 Agarosegelelektrophorese zur Analyse von <i>In-vitro</i> -Transkripten	34
3.2.4.2 Northern Blot	35
3.2.5 Bestimmung der 5'-Enden von RNA-Molekülen	35
3.3 Proteine	35
3.3.1 <i>In-vitro</i> -Translation	35
3.3.2 Proteinelektrophorese im Polyacrylamidgel	36
3.4 Bakterien	36
3.4.1 Kulturen	36
3.4.2 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	36
3.4.3 Transformation	37
3.4.4 Mutagenese durch rekombinierbare DNA-Fragmente	37
3.5 Eukaryontische Zellen	38
3.5.1 Standardmethoden	38
3.5.1.1 Kulturen	38
3.5.1.2 Einfrieren von Zellen	38
3.5.1.3 Auftauen von Zellen	38
3.5.1.4 Ablösen und Aussäen von Zellen	38
3.5.1.5 Auszählen von Zellen	38
3.5.2 Transfektion von RNA und DNA in Säugerkzellen	39
3.5.2.1 Chemische Transfektion	39
3.5.2.2 Physikalische Transfektion	39
3.5.3 Replikonzellen	40

3.6 Viren	40
3.6.1 Vacciniaviren	40
3.6.1.1 Aufreinigung rekombinanter Vacciniaviren	40
3.6.1.2 Titerbestimmung	41
3.6.1.3 Selektion	42
3.6.1.3.1 Positivselektion	42
3.6.1.3.2 Negativselektion	43
3.6.2 HCoV-229E	43
3.6.2.1 TCID ₅₀ -Wert-Bestimmung	43
3.7 Verfahren zur Herstellung von HCoV-229E-Mutanten	44
3.7.1 Überblick	44
3.7.2 Herstellung geeigneter DNA-Moleküle für die homologe Rekombination mit Vacciniaviren	46
3.7.3 Erzeugung eines <i>gpt</i> -tragenden Vacciniavirus-Zwischenklons	47
3.7.4 Erzeugung des Vacciniavirus-Endklons und dessen Aufreinigung	49
3.7.5 Vorbereitung und Herstellung der RNA	50
3.7.6 Transfektion der rekombinanten HCoV-229E-RNA genomischer Länge und Isolierung eines rekombinanten Coronavirus	50
3.8 Zusammenfassung der verwendeten Primer und Klone	51
3.8.1 Herstellung des <i>gpt</i> -tragenden Zwischenklons vRec8	51
3.8.2 Substitution von <i>nsp8</i> von HCoV-229E durch <i>nsp8</i> von PEDV	51
3.8.3 Substitution von <i>nsp8</i> von HCoV-229E durch <i>nsp8</i> von HCoV-NL63	51
3.8.4 Mutagenese der Schnittstelle zwischen <i>nsp7</i> und 8	51
3.8.5 Mutagenese der Schnittstelle zwischen <i>nsp8</i> und 9	52
3.8.6 Mutagenese der Schnittstelle zwischen <i>nsp8</i> und 9	52
3.8.7 Substitution von <i>nsp7-8</i> von HCoV-229E durch <i>nsp7-8</i> von HCoV-NL63	52
3.8.8 Substitution von <i>nsp8-9</i> von HCoV-229E durch <i>nsp8-9</i> von HCoV-NL63	53
3.8.9 Substitution von <i>nsp7-9</i> von HCoV-229E durch <i>nsp7-9</i> von HCoV-NL63	53
3.8.10 Herstellung des <i>gpt</i> -tragenden Zwischenklons vHEL_GPT	53
3.8.11 Mutagenese von <i>nsp13</i>	54
3.8.12 Mutagenese der Schnittstelle zwischen <i>nsp12</i> und 13	55
3.8.13 Herstellung des <i>gpt</i> -tragenden Zwischenklons vEXO_GPT	55
3.8.14 Mutagenese von <i>nsp14</i>	55
3.8.15 Mutagenese der Schnittstelle zwischen <i>nsp13</i> und 14	56

3.8.16 Herstellung des <i>gpt</i> -tragenden Zwischenklons vENDO_GPT	56
3.8.17 Mutagenese von nsp15	56
3.8.18 Mutagenese der Schnittstelle zwischen nsp14 und 15	57
3.8.19 Herstellung des <i>gpt</i> -tragenden Zwischenklons vMTR_GPT	57
3.8.20 Insertion eines STOP-Codons zwischen nsp15 und nsp16	58
3.8.21 Mutagenese der Schnittstelle zwischen nsp15 und 16	58
3.8.22 Herstellung des HCoV-229E-Replikons unter Substitution der PL1-Schnittstelle durch TAV-2A-Sequenz, <i>neomycin</i> und EMCV-IRES-Element	58
3.8.23 Herstellung des <i>gpt</i> -tragenden Zwischenklons vTNI_ENDO_GPT	58
3.8.24 Mutagenese von nsp15 im Replikon	59
3.8.25 Primer zur Herstellung der Sonde für den Northern Blot	59
3.8.26 Primer zur Herstellung des Transkripts für die <i>In-vitro</i> -Translation	59
4 Ergebnisse	60
4.1 Allgemeines zur Analyse der Mutanten	60
4.1.1 Charakterisierung von HCoV-229E-Mutanten	60
4.1.2 Charakterisierung eines mutierten Replikon-(Rep-1)-Derivats	61
4.2 <i>Active-site</i> -Mutanten	61
4.2.1 Rekombinante Coronaviren mit Substitutionen in der Helikase, nsp13	61
4.2.1.1 Substitution eines katalytischen Restes in der ATPase-Domäne von nsp13	61
4.2.1.2 Substitutionen in der Zinkbindenden Domäne (ZBD) des nsp13	62
4.2.1.3 Substitutionen in der putativen <i>Hinge-spacer</i> -Region von nsp13	64
4.2.2 Rekombinante Coronaviren mit Substitutionen in der Exonuklease, nsp14	67
4.2.3 Rekombinante Coronaviren mit Substitutionen in der Endonuklease, nsp15	70
4.2.4 Deletion der putativen Methyltransferase, nsp16	74
4.3 Rekombinante Coronaviren mit Substitutionen in M ^{PRO} -Schnittstellen	75
4.3.1 Mutierte Schnittstellen im ORF1a-kodierten Bereich von pp1a/ pp1ab	76
4.3.2 Mutierte Schnittstellen im ORF1b-kodierten Bereich von pp1ab	79
4.4 Das HCoV-229E-Replikonsystem	82
4.4.1 Herstellung	82
4.4.2 Analyse	84
4.4.3 Anwendung des Replikons	86
4.5 Chimäre Viren	88

4.5.1 Substitution von nsp8	88
4.5.2 Substitution von nsp7-9	89
4.5.3 Substitution von nsp7+8 bzw. nsp8+9	101
5 Diskussion	105
5.1. Die Helikase von HCoV-229E, nsp13	105
5.1.1 Mutagenese der ATPase-Domäne	105
5.1.2 Mutagenese der ZBD	105
5.1.3 Mutagenese der putativen <i>Hinge-spacer</i> -Region	107
5.2 Mutagenese der Exonuklease, nsp14	107
5.3 Mutagenese der Endonuklease, nsp15	108
5.4 Deletion der putativen Methyltransferase, nsp16	111
5.5 Mutagenisierte M ^{PRO} -Schnittstellen	112
5.5.1 Mutierte Schnittstellen im ORF1a-kodierten Bereich von pp1a/ pp1ab	112
5.5.2 Mutierte Schnittstellen im ORF1b-kodierten Bereich von pp1ab	113
5.6 Das HCoV-229E-Replikonsystem	114
5.7 Chimäre Viren	115
6 Zusammenfassung	122
7 Summary	124
8 Abkürzungen	126
9 Literaturverzeichnis	129
10 Veröffentlichungen	139
11. Lebenslauf	140

1 Einleitung

1.1 Coronaviren

1.1.1 Taxonomie

Die Genera *Coronavirus* und *Torovirus* bilden gemeinsam die Familie der *Coronaviridae*, die wiederum mit den Familien *Arteriviridae* und *Roniviridae* in der Ordnung *Nidovirales* zusammengefasst wird. Nidoviren sind Viren mit einzelsträngigem RNA-Genom in positiver Orientierung, mit gleicher Polarität wie eine zelluläre m-RNA. Das nidovirale Genom enthält in seinem 5'-terminalen Bereich zwei sehr große offene Leseraster (ORFs), ORF1a und ORF1b, die sich in einem kleinen Bereich überlappen. Die beiden Leseraster kodieren für zwei Polyproteine (pp), pp1a und pp1ab, die während des Replikationszyklus durch viruskodierte Proteasen proteolytisch prozessiert werden. Die hierdurch entstehenden Nichtstruktursproteine (nsp) bilden –zusammen mit einigen zellulären Proteinen– den coronaviralen Replikasekomplex, der das Virusgenom repliziert und einen Satz von 3'-coterminalen subgenomischen mRNAs (sgRNAs) transkribiert. Neben Proteasen enthalten die Polyproteine aller gegenwärtig bekannten Nidoviren eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp), eine Helikase (Hel) mit N-terminaler Zinkfingerdomäne und eine uridylatspezifische Endonuklease (NendoU) (Gorbalenya et al., 1989b; Snijder et al., 1990; Cavanagh et al., 1993; Pringle 1996; Snijder et al., 1996; Cavanagh 1997; Ziebuhr & Siddell 1999; Cowley et al., 2000; van Dinten et al., 2000; Anand et al., 2002; Barrette-Ng et al., 2002; Hegyi & Ziebuhr 2002; van Vliet et al., 2002; Ziebuhr et al., 2003; Bhardwaj et al., 2004; Ivanov et al., 2004a; Seybert et al., 2005; Draker et al., 2006).

Die Gattung *Coronavirus* wurde auf der Grundlage von serologischen Kreuzreaktivitäten und Sequenzverwandtschaften in drei Gruppen (I, II und III) eingeteilt. Ein typischer Vertreter der Gruppe I ist das in dieser Arbeit untersuchte Humane Coronavirus HCoV-229E. Ebenfalls zu dieser Gruppe gehört das im Jahre 2004 entdeckte humanpathogene Coronavirus HCoV-NL63 (Fouchier et al., 2004; Pyrc et al., 2004; van der Hoek et al., 2004). Die Serogruppe II enthält das sehr gut untersuchte Maus-Hepatitis-Virus (MHV), aber auch weitere humanpathogene Coronaviren. Hierzu zählen das Humane Coronavirus OC43 (HCoV-OC43), das im Jahre 2004 in China isolierte Coronavirus HKU1 (CoV-HKU1) sowie das SARS-Coronavirus (SCoV), welches im Jahre 2003 vor allem im asiatischen Raum eine Epidemie mit über 800 Todesopfern verursachte (Drosten et al., 2003; Peiris et al., 2003a; Peiris et al., 2003b; Snijder et al., 2003; Peiris et al., 2004). Die Gruppe III beinhaltet derzeit ausschließlich aviäre Coronaviren. Der

bestuntersuchte Vertreter dieser Gruppe ist das Virus der infektiösen Bronchitis (IBV), das 1937 als erstes Coronavirus entdeckt wurde (Beaudette & Hudson 1937).

1.1.2 Morphologie

Coronavirale Partikel haben einen Durchmesser von 100 bis 120 nm und sind von einer Hüllmembran umgeben, die sich von intrazellulären Membrankompartimenten der Wirtszelle ableitet (Tooze & Tooze 1985; Griffiths & Rottier 1992). Im Elektronenmikroskop erinnern die Viruspartikel (im besonderen deren Oberfläche) an den Strahlenkranz der Sonne, woraus der Name „Coronaviren“ abgeleitet wurde. Hauptverantwortlich für dieses strahlenkranzartige Aussehen der Virusoberfläche ist das virale *Spike*-Protein (S-Protein), das Trimere bildet und mit seiner großen, globulären Domäne aus der Hüllmembran herausragt. Das S-Protein vermittelt die Bindung an zelluläre Rezeptoren sowie die Fusion mit der Zytoplasmamembran der Wirtszelle, und es induziert neutralisierende Antikörper (Compton et al., 1993). Neben dem S-Protein existieren zwei weitere Membranproteine, das M-Protein (*membrane protein*) und das E-Protein (*envelope protein*). Das M-Protein interagiert mit N-Protein-Molekülen des Nukleokapsids und führt auf diese Weise zu dessen Assoziation mit der Innenseite der Virusmembran (de Haan & Rottier 2005).

Für einige Coronaviren konnte zudem eine innere Substruktur, die man *core shell* (engl.: *core shell* = Kernschale) nennt und die aus dem M- und dem N-Protein besteht, elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden (Risco et al., 1996). Im Inneren des Virions befindet sich das helikale Nukleokapsid, das aus dem einzelsträngigen RNA-Genom und den mit ihm assoziierten Nukleokapsidprotein N besteht. Neben seiner strukturellen Funktion im Virion spielt das N-Protein eine bisher nicht exakt geklärte Rolle in der RNA-Replikation (Schelle et al., 2005).

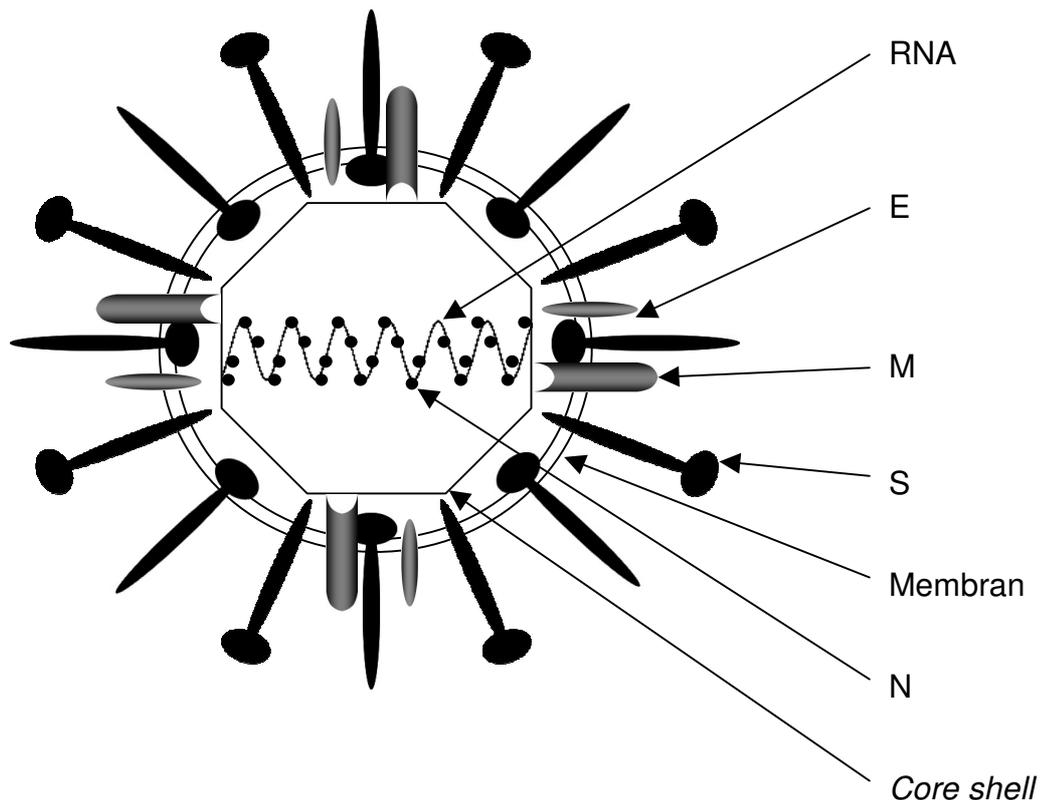


Abbildung 1.01: Coronavirale Partikel

Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau eines coronaviralen Partikels. RNA = Genom; E = Hüllprotein E (*envelope protein*); M = Membranprotein M; S = Oberflächenglykoprotein S (*spike protein*); Membran = Hüllmembran; N = Nukleokapsidprotein N; *Core shell* = innere Struktur („Kernschale“).

1.1.3 Coronavirale Infektionen

Coronaviren der Gruppen I und II sind bisher nur als Pathogene bei Menschen und Säugetieren in Erscheinung getreten (Siddell et al., 2005). Eine singuläre Studie, bei der angeblich ein Coronavirus der Gruppe II aus Haubentauchern isoliert werden konnte, blieb seit über 20 Jahren unbestätigt (Nuttall & Harrap 1982). Viren der Gruppe III infizieren nach dem derzeitigen Kenntnisstand ausschließlich Vögel. Vor kurzem wurden außerdem eine Vielzahl weiterer Coronaviren, die unterschiedlichen Coronavirusgruppen zugeordnet werden können, in Fledermäusen nachgewiesen (Li et al., 2006; Tang et al., 2006; Woo et al., 2006).

Derzeit kennt man fünf humanpathogene Vertreter aus der Familie der Coronaviren. HCoV-229E und HCoV-OC43 verursachen zumeist milde Infekte des oberen Respirationstraktes (Tyrrell et al., 1979; Vabret et al., 2003). HCoV-NL63 wurde hingegen im Jahre 2004 aus einem Säugling isoliert, das an den Symptomen einer schweren Bronchiolitis litt (Fouchier et al., 2004; Pyrc et al., 2004; van der Hoek et al., 2004), und das erst im Jahre 2005 entdeckte humane Coronavirus, HCoV-HKU1, wurde bei einem an Pneumonie erkrankten Patienten nachgewiesen

(Woo et al., 2005). Infektionen mit dem SARS-Coronavirus (SCoV) führen zu einer besonders schweren Erkrankung, die man als "schweres akutes Atemwegssyndrom" (*severe acute respiratory syndrome*) bezeichnet hat. Im Winter 2002/2003 überwand offenbar dieses bis dahin unbekannte Virus (bzw. ein sehr nahe verwandtes Virus) die Speziesbarriere zwischen seinem tierischen Wirt und dem Menschen. Man geht derzeit davon aus, dass Fledermäuse (*Rhinolophus sinicus*) das natürliche Reservoir von Viren sind, die mit SCoV sehr nahe verwandt sind. Zunächst sind diese Viren offenbar auf die Zibetkatze (*Paguma larvata*) übergegangen und haben sich dort angepasst und spezifische Mutationen erworben, bevor ihnen dann durch den Erwerb einer Reihe weiterer, adaptiver Mutationen (vor allem im S-Protein) der Einbruch in die menschliche Population gelang (Dobson 2005; Hampton 2005; Lau et al., 2005; Li et al., 2005; Normile 2005; Poon et al., 2005). Die zunächst lediglich in Südchina aufgetretene Infektion entwickelte sich im Frühjahr 2003 zu einer schweren Epidemie mit Erkrankungsfällen in zahlreichen Ländern weltweit. Die Sterblichkeitsrate lag bei circa 10 % der erkrankten Personen (Peiris et al., 2003a; Peiris et al., 2003b; Peiris et al., 2004).

1.1.4 Genomorganisation

1. Das Genom der Coronaviren ist ein einzelsträngiges RNA-Molekül mit positiver Orientierung und einer Größe von circa 27 – 32 kb. Damit besitzt diese Virusfamilie das größte Genom aller bekannten RNA-Viren.
2. Am 3'-Ende befindet sich eine Polyadenylsäure (Poly(A)-Schwanz) und am 5'-Ende höchstwahrscheinlich eine Cap-Struktur (Lai et al., 1982). Somit weist das coronavirale Genom alle charakteristischen Merkmale einer zellulären *messenger*-RNA (mRNA) auf und ist *per se* infektiös.
3. Weiterhin findet man an beiden Enden des Genoms sogenannte nichttranslatierte Regionen (NTRs), die in der Regel mehrere hundert Nukleotide umfassen. Für das 5'-Ende ist die Bezeichnung „nichttranslatierte Region“ möglicherweise nicht ganz korrekt, da hier bei allen Coronaviren ein sehr kleines offenes Leseraster zu finden ist, über dessen Expression es bisher keine zuverlässigen Daten gibt. Die NTRs enthalten RNA-Strukturen und Sequenzen, sogenannte *cis*-aktive Elemente, die für die Replikation bzw. Transkription erforderlich sind (Brian & Baric 2005). Die ersten 65 – 98 Nukleotide innerhalb der 5'-NTR werden *leader sequence* (engl.: *leader sequence* = Leitsequenz) oder einfach nur *Leader* genannt. Dieser *Leader* findet sich auch am 5'-Ende aller coronaviralen RNAs (Spaan et al., 1983; Lai & Cavanagh 1997).

4. Die beiden großen, am 5'-Ende des Genoms gelegenen Leseraster beanspruchen etwa zwei Drittel des Genoms und werden als ORF1a und ORF1b bezeichnet (siehe Abbildung 1.02). Innerhalb bzw. in der Nähe der kurzen Überlappungsregion der beiden Leseraster befindet sich ein sogenanntes *frameshift*-Element, das aus zwei essentiellen Elementen besteht. (1) Unmittelbar *upstream* (engl.: *upstream* = stromaufwärts, gemeint ist: 5'-terminal) des ORF1a-Translationsstopkodons befindet sich eine kurze Sequenz, 5'-UUUAAAC-3', die man als *slippery sequence* (engl.: *slippery sequence* = "rutschige" Sequenz) bezeichnet. Innerhalb dieser Sequenz findet (in einem bestimmten Prozentsatz aller Translationsereignisse) eine Verschiebung der in der ribosomalen "A-site" gebundenen tRNA um exakt ein Nukleotid (in die [-1]-Position) statt. (2) *Downstream* (stromabwärts, 3'-terminal) der *slippery sequence* befindet sich eine stabile RNA-Sekundärstruktur in Form eines sogenannten Pseudoknotens, der essentiell für eine effiziente Leserasterverschiebung ist (Brierley et al., 1987; Brierley et al., 1989; Herold & Siddell 1993). Das Leseraster 1a kodiert somit das Polyprotein (pp) 1a, während beide Leseraster (ORF1a und ORF1b) zusammen die Polyproteine pp1a und pp1ab kodieren. Die beiden Polyproteine beinhalten mit ganz wenigen Ausnahmen alle für die virale Replikation und Transkription erforderlichen Proteinfunktionen (Thiel et al., 2001b).

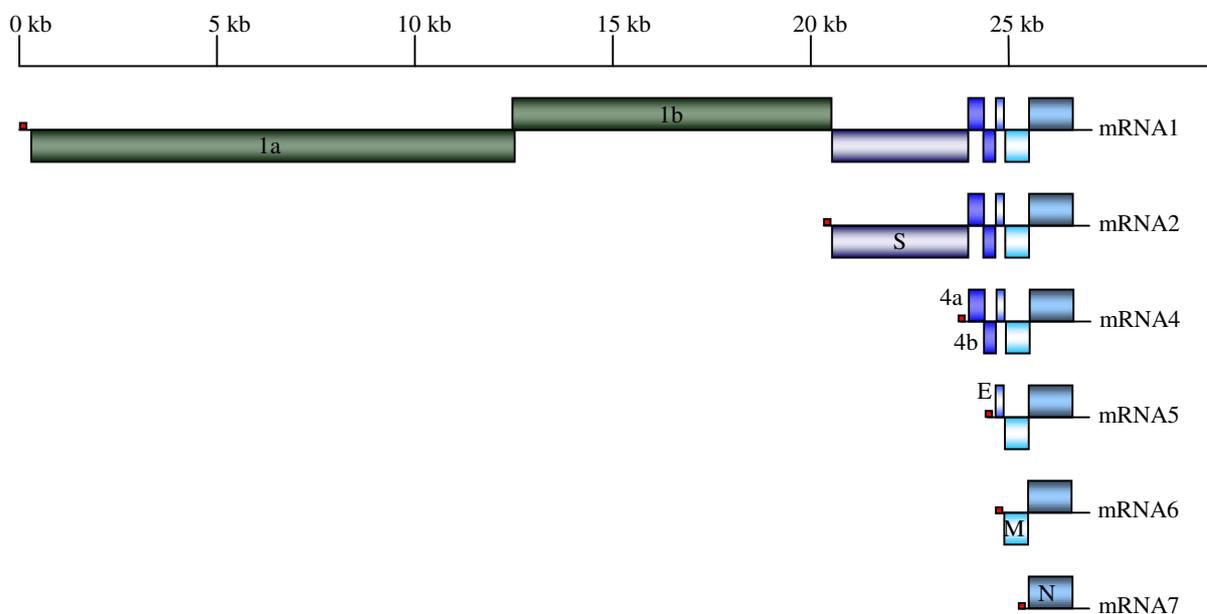


Abbildung 1.02: Die coronavirale Genomorganisation

Die Abbildung veranschaulicht am Beispiel von HCoV-229E die coronavirale Genomorganisation. Die verwendete Maßeinheit ist Kilobasen (kb). Die RNAs sind in 5'→3'-Orientierung abgebildet. Am 5'-Ende einer jeden RNA befindet sich der Leader (rot). Im Übergangsbereich von ORF1a und ORF1b befindet sich das *frameshift*-Element. Das (die) von einer jeweiligen mRNA exprimierte(n) Protein(e) sind mit Zahlen bzw. Buchstaben gekennzeichnet.

5. Das 3'-gelegene Drittel des Virusgenoms enthält offene Leseraster, die für die verschiedenen Strukturproteine kodieren, von denen vor allem S, E, M und N zu nennen sind (Abb. 1.02). Die Anordnung dieser Gene im Genom ist innerhalb des Genus *Coronavirus* konserviert (Brian & Baric 2005).

1.1.5 Der coronavirale Replikationszyklus

Nach dem rezeptorvermittelten Eintritt in die Wirtszelle wird das coronavirale Genom ins Zytoplasma freigesetzt. Da das Genom die Polarität einer mRNA besitzt, kann die coronavirale Replikase, also die Polyproteine pp1a und pp1ab, direkt von der genomischen RNA translatiert werden. Die Polyproteine initiieren/vermitteln dann einen kompletten viralen Replikationszyklus. Da dieser vollständige Replikationszyklus ganz allein von der viralen Genom-RNA -also ohne Beteiligung weiterer viraler Proteine- initiiert werden kann, bezeichnet man das Genom von Plusstrang-RNA-Viren auch als "infektiös". Die Leserasterverschiebung am *frameshift*-Element kann man als translationalen Regulationsmechanismus auffassen, da er ein bestimmtes molares Verhältnis zwischen den Polyproteinen pp1a und pp1ab sicherstellt. *In vitro* liegt das pp1a-zu-pp1ab-Verhältnis bei etwa 4 : 1 (Herold & Siddell 1993).

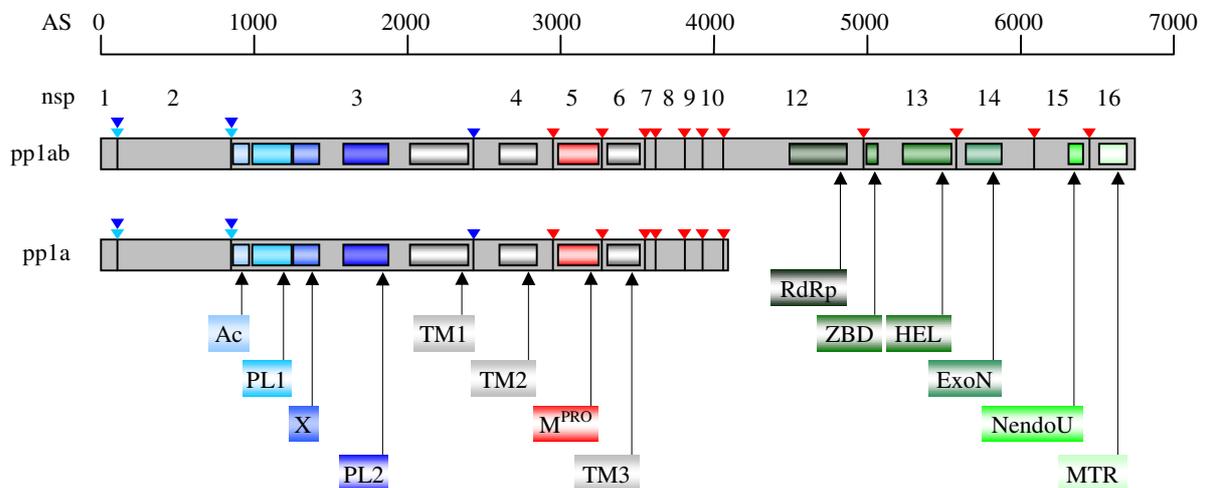


Abbildung 1.03:

Die Abbildung zeigt das Prozessierungsschema der Polyproteine 1a und 1ab des HCoV-229E. Die verwendete Maßeinheit ist Aminosäuren. Ausgewählte bereits charakterisierte bzw. putative Domänen sind farbig gekennzeichnet. Hellblaue Dreiecke markieren Schnittstellen der PL1, dunkelblaue Dreiecke markieren Schnittstellen der PL2, und rote Dreiecke markieren Schnittstellen der M^{PRO}. Nsp11 befindet sich am C-terminalen Ende des pp1a. Ac = Saure Domäne von nsp3; PL1 und PL2 = Papain-ähnliche Protease-Domänen 1 und 2; X = Adenosindiphosphat-1"-Phosphatase-Domäne (auch X-Domäne genannt); TM1, TM2 und TM3 = Transmembrandomänen 1, 2 und 3; M^{PRO} = Hauptprotease; RdRp = putative RNA-abhängige RNA-Polymerase-Domäne; ZBD und HEL = Zinkfinger- und Helikase-Domäne in nsp13; ExoN = Exonuklease-Domäne; NendoU = Endonuklease-Domäne; MTR = putative Methyltransferase-Domäne

1.1.5.1 Proteolytische Prozessierung

Co- und posttranslational erfahren die beiden viralen Polyproteine eine intensive autoproteolytische Prozessierung durch die beiden *Papain-like*-Proteasen 1 (PL1) und 2 (PL2) sowie die Hauptprotease M^{PRO}. Letztere wird häufig auch als *main protease*, *3C-like protease* (3CL^{PRO}) bzw. coronavirale *chymotrypsin-like protease* bezeichnet.

Die proteolytische Prozessierung führt zur Freisetzung von 16 Nichtstrukturproteinen (nsps). PL1 und PL2 spalten dabei mit partiell überlappender Spezifität die drei aminoterminalen Schnittstellen von pp1a und pp1ab (siehe Abb. 1.03) (Ziebuhr et al., 1995; Herold et al., 1998a; Herold et al., 1998b; Ziebuhr & Siddell 1999; Ziebuhr et al., 2001).

Die Hauptprotease M^{PRO} ist hingegen für die übrigen 11 Schnitte in pp1a und pp1ab verantwortlich (siehe Abbildung 1.03). Das Erkennungsmotiv für die Spaltung ist im wesentlichen durch die zwei Aminosäuren direkt vor der Spaltstelle (Position P2 und P1) und die unmittelbar folgende Aminosäure (Position P1') definiert: P2 P1 ↓ P1'. Für die Positionen P2 und P1 sind Leucin (L) und Glutamin (Q) hochkonserviert. An der Position P1' sind, bis auf ganz wenige Ausnahmen, kleine aliphatische Aminosäuren, wie Serin (S), Alanin (A) und Glycin (G), zu finden. Eine dieser Ausnahmen bildet die Spaltstelle zwischen den Nichtstrukturproteinen nsp8 und nsp9, wo sich bei allen Coronaviren das konservierte Motiv LQ↓N findet. Es konnte gezeigt werden, dass auch diese Sequenz (mit einem Asparagin [N] an der Position P1') ein Substrat für die 3CL^{PRO} darstellt. Es wird jedoch deutlich weniger effizient gespalten (Hegyí & Ziebuhr 2002). Ein möglicher Grund für die strenge Konservierung dieser unüblichen Schnittstelle könnte sein, dass ein mit zeitlicher Verzögerung gespaltenes nsp8-nsp9-Intermediat eine spezielle und möglicherweise essentielle Funktion besitzt. Andererseits könnte aber auch das aminoterninale Asparagin für die Funktion von nsp9 (selbst) essentiell sein (Ziebuhr et al., 1995; Ziebuhr et al., 1998; Ziebuhr & Siddell 1999; Hegyí & Ziebuhr 2002).

Die Hauptprotease der Coronaviren besteht aus insgesamt drei Domänen, von denen zwei auch bei allen anderen Proteinen der Chymotrypsinfamilie konserviert sind. Zwölf antiparallele β -Faltblattstrukturen bilden gemeinsam die zwei konservierten Proteasedomänen, die auch das aktive Zentrum der Protease enthalten. Die Funktion der dritten Domäne ist bisher nicht völlig aufgeklärt (Anand et al., 2002; Anand et al., 2003). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sie maßgeblich an der bisher für alle charakterisierten Coronavirus-Hauptproteasen beschriebenen Dimerisation beteiligt ist (Ng & Liu 2000; Anand et al., 2002; Shi et al., 2004; Chen et al., 2005).

Die Bedeutung der Hauptprotease für die Replikation liegt in der Freisetzung der replikations- und transkriptionsrelevanten viralen Proteine. Es wird dabei allgemein davon ausgegangen, dass sowohl die Reihenfolge bestimmter Spaltungen als auch der zeitliche Ablauf der Prozessierung hochgradig reguliert sind. Damit stellt die M^{PRO} als zentrales posttranslationales Regulationselement der Genexpression ein interessantes Zielmolekül für anticoronavirale Therapieansätze dar (Ziebuhr et al., 2000; Anand et al., 2003; Yang et al., 2005).

1.1.5.2 Replikation und Transkription

Das Schlüsselprotein der coronaviralen RNA-Synthese ist zweifellos das Nichtstrukturprotein 12 (nsp12), das eine RNA-abhängige RNA-Polymerase-Domäne (RdRp, von engl.: *RNA-dependent-RNA-polymerase*) enthält. Im vergangenen Jahr konnte die Aktivität dieses Enzyms erstmals biochemisch nachgewiesen werden (Cheng et al., 2005). Die RNA-Polymerase der Nidoviren wird in die RNA-Polymerase-Superfamilie 1 eingeordnet (Koonin & Dolja 1993). Das Enzym katalysiert in einem Multi-Enzym-Komplex aus viralen und zellulären Proteinen die Replikation des Genoms und die Transkription subgenomischer RNAs (Shi & Lai 2005). Es gibt klare Evidenzen dafür, dass dieser Enzymkomplex fest mit intrazellulären Membranen assoziiert ist (van der Meer et al., 1999; Sims et al., 2000; Gosert et al., 2002).

Die Replikation der genomischen RNA erfordert die Synthese einer kompletten negativsträngigen Kopie des Genoms, die als Antigenom bezeichnet wird und anschließend als Matrize zur Herstellung neuer positivsträngiger, genomischer RNAs dient.

Im Gegensatz zur Replikation werden bei der coronaviralen Transkription RNA-Moleküle subgenomischer Länge erzeugt, die nur einen Teil der Genomsequenz enthalten. Das Besondere bei der coronaviralen Transkription ist die Herstellung eines umfangreichen Satzes subgenomischer mRNAs (sgRNA) mit identischen 5'- und 3'-Enden. Jede dieser subgenomischen mRNAs besitzt in der Nähe ihres 5'-Endes ein offenes Leseraster und enthält darüber hinaus die restliche, weiter stromabwärts gelegene Genomsequenz. Alle subgenomischen RNAs sind demzufolge 3'-coterminal. Im Allgemeinen wird nur das 5'-terminal gelegene offene Leseraster einer sgRNA translatiert. Daraus ergibt sich, dass alle subgenomischen RNA-Moleküle, mit Ausnahme des kleinsten, funktionell monocistronisch, aber strukturell polycistronisch, sind.

Charakteristisch für die coronavirale Transkription ist, dass sie RNAs erzeugt, die alle eine identische Sequenz, den sogenannten *Leader*, an ihrem 5'-Ende besitzen. Auf diese Weise sind die genomische RNA und alle coronaviralen sgRNAs nicht nur an ihren 3'-Enden, sondern auch an ihren 5'-Enden coterminal.

Der 5'-*Leader* und der 3'-gelegene Hauptteil der subgenomischen RNA (sog. *body sequence*) werden jeweils durch ein sog. TRS-Element („transkriptionsregulierende Sequenz“) miteinander verbunden. Dieses Element besteht in der Regel aus acht konservierten Nukleotiden und befindet sich im Virusgenom zum einen unmittelbar downstream des *Leaders*, wo es als *Leader-TRS* bezeichnet wird, und zum anderen als sogenannte *Body-TRS* (engl.: *body* = Rumpf) unmittelbar *upstream* des von der jeweiligen RNA translatierten (5'-terminalen) Leserasters.

Die Synthese der zur Herstellung der subgenomischen RNAs benötigten negativsträngigen Matrizen erfolgt diskontinuierlich (Sawicki & Sawicki 1998). Dabei wird die Synthese des naszierenden Minusstrangs in der Nähe von *Body-TRS*-Elementen verlangsamt bzw. gestoppt, wobei möglicherweise die *Body-TRS*-Elemente als Attenuierungssignale fungieren. Durch diese Attenuierung wird ein Wechsel der Matrize, nämlich in die Nähe des 5'-Endes des Genoms (die *Leader-TRS*), begünstigt. Dieser Matrizenwechsel erfordert eine komplementäre Basenpaarung zwischen der jeweiligen *Body-TRS* und dem *Leader-TRS*-Element. Nach dem Matrizenwechsel wird dann die 5'-*Leader*-Sequenz kopiert und somit die subgenomische Minusstrang-Synthese abgeschlossen. Die subgenomischen Minusstränge dienen anschließend als Matrize für die Bildung der subgenomischen Plusstränge, welche dann für die Expression der Strukturproteine genutzt werden. Die entscheidenden *cis*-aktiven Faktoren für die diskontinuierliche Transkription sind also die *Leader*- und die *Body-TRS*-Elemente. Es gilt jedoch als wahrscheinlich, dass auch noch andere Sequenzen/Strukturen sowie virale und zelluläre Proteine an der Transkription beteiligt sind (Zhang & Lai 1995a; Zhang & Lai 1995b; van der Hoek et al., 2004; Zuniga et al., 2004; Sola et al., 2005). Für Arteriviren konnte beispielsweise gezeigt werden, dass mindestens zwei virale Proteine spezifische Funktionen innerhalb der diskontinuierlichen Transkription besitzen (van Dinten et al., 1997; Tijms et al., 2001).

1.1.6 Weitere ausgewählte Nichtstrukturproteine von Coronaviren

1.1.6.1 Die Nichtstrukturproteine nsp7, nsp8 und nsp9

Die Mehrzahl der Prozessierungsprodukte des coronaviralen Polyproteins sind bisher nur unvollständig charakterisiert worden, auch wenn in den letzten Jahren zumindest für einige dieser Proteine erste Studien veröffentlicht wurden. Zu diesen Produkten zählt auch eine am Carboxyterminus des Polyproteins 1a gelegene Triade von kleinen Proteinen (nsp7, nsp8 und nsp9), die bei HCoV-229E Molekulargewichte von ca. 5, 23 bzw. 12 kDa aufweisen.

Die Nichtstrukturproteine 7 und 8 sind innerhalb des Genus *Coronavirus* konserviert. Nsp7 besteht aus vier antiparallelen α -Helices (Peti et al., 2005; Zhai et al., 2005). Nsp8 zeigt in der Kristallstruktur zwei mögliche Konformationen. Beide ähneln einem Golfschläger, wobei eine

der beiden Konformationen jedoch einen geknickten Schaft besitzt. Die Proteine 7 und 8 binden aneinander und bilden einen hexadekameren Superkomplex aus jeweils acht nsp7- und nsp8-Molekülen. Dieser Superkomplex zeigt die Architektur eines Ringes mit einem Durchmesser von circa 30 Å. Damit könnte der Komplex einen RNA-Doppelstrang umschließen, wobei positivgeladene Aminosäuren von nsp8 mit der Nukleinsäure interagieren könnten. Diese These konnte durch Substitutionsexperimente entsprechender Aminosäurereste *in vitro* gestützt werden (Zhai et al., 2005). In MHV-infizierten Zellen konnte darüber mittels Co-Immunpräzipitation und Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass nsp8 Teil eines größeren Proteinkomplexes sind, der außerdem noch die RdRp (nsp12), die Hauptprotease und nsp9 enthält, und dass nsp7, nsp8, nsp9, nsp10, nsp13 (Helikase) sowie nsp5 (Hauptprotease) in diesen Zellen kolokalisieren (Bost et al., 2000; Brockway et al., 2003).

Das Nichtstrukturprotein 9 besteht aus sechs teilweise sich kreuzenden β -Faltblättern und einer α -Helix. In der Kristallstruktur wie auch in Lösung bilden nsp9-Moleküle Dimere. Die Aminosäuresequenz selbst lässt keine Verwandtschaft mit anderen Proteinen erkennen. Die Strukturanalyse des Proteins ergab jedoch Ähnlichkeiten mit einer Subdomäne von Serinproteasen der Trypsin-Familie. Da nsp9 jedoch die charakteristische katalytische Triade von Serinproteasen fehlt, kann eine proteolytische Funktion für dieses Protein weitgehend ausgeschlossen werden. Die biologische Bedeutung dürfte vielmehr in der Bindung einzelsträngiger RNA liegen, wie bereits in *In-vitro*-Experimenten gezeigt werden konnte (Egloff et al., 2004; Sutton et al., 2004). Wenngleich für die Proteine nsp7, nsp8 und nsp9 bisher keine Daten aus *In-vivo*-Experimenten vorliegen, die die Funktion dieser Proteine aufhellen könnten, so weisen ihre Eigenschaften, insbesondere die Bindung doppel- und einzelsträngiger RNA und die Interaktion mit einigen der Schlüsselenzyme/-proteine der viralen Replikation auf eine zentrale Rolle dieser 3 Proteine im Replikationszyklus hin (Bost et al., 2000; Brockway et al., 2003; Egloff et al., 2004; Sutton et al., 2004; Peti et al., 2005; Zhai et al., 2005).

1.1.6.2 Das Nichtstrukturprotein nsp13

Das coronavirale Nichtstrukturprotein nsp13 ist eine Helikase der Superfamilie 1 (Gorbalenya et al., 1989b; Gorbalenya et al., 1989a). Helikasen sind neben der RdRp die am höchsten konservierten Untereinheiten der Replikationsmaschinerie von RNA-Viren, was für eine Schlüsselrolle dieses Proteins in der Replikation spricht (Koonin & Dolja 1993). Die Helikase der Corona- bzw. Nidoviren unterscheidet sich in zwei Merkmalen von Helikasen anderer positivsträngiger RNA-Viren: Zum einen befindet sich die Helikase von Nidoviren carboxyterminal zur Polymerase und zum anderen enthält nsp13 –neben der eigentlichen

Helikasedomäne– eine weitere, aminoterminal gelegene zinkbindende Domäne (Gorbalenya et al., 1989a; Heusipp et al., 1997; Seybert et al., 2005).

Biochemisch konnte eine Vielfalt von Aktivitäten für nsp13 nachgewiesen werden. So zeigt die coronavirale Helikase eine Duplexentwindungsaktivität in 5'-3'-Orientierung für RNA und DNA, wobei sicher RNA das biologisch relevante Substrat darstellt, da Coronaviren ausschließlich im Zytoplasma der Wirtszelle replizieren. Die Duplexentwindungsaktivität erfordert Energie, die nsp13 aus der Hydrolyse von Nukleosidtriphosphaten und Desoxynukleosidtriphosphaten gewinnen kann (Seybert et al., 2000b; Ivanov & Ziebuhr 2004). Die Rolle der NTPase-Aktivität für die Aktivität der Helikase und die essentielle Bedeutung der Helikaseaktivität für die virale Replikation konnte für das Arterivirus EAV mittels biochemischer und revers-genetischer Experimente demonstriert werden (Seybert et al., 2005). Darüber hinaus wurde für dieses Protein eine RNA-5'-Triphosphatase-Aktivität nachgewiesen, die im Zusammenhang mit der Cap-Synthese am 5'-Ende der viralen RNAs stehen könnte (Ivanov et al., 2004b).

Die N-terminale, zinkbindende Domäne (ZBD) ist durch eine konservierte Abfolge von zwölf (bei Coronaviren) bzw. 13 (bei Arteriviren) Cysteinen und Histidinen gekennzeichnet. Die strukturelle Integrität dieser Domäne ist für die Funktion der coronaviralen Helikase essentiell. In biochemischen Assays beeinflussten Substitutionen der Zinkionen-bindenden Aminosäuren der ZBD die ATPase- und Entwindungsaktivität der eigentlichen Helikasedomäne signifikant; in einigen Fällen führten diese Substitutionen sogar zu einem kompletten Funktionsverlust der NTPase/Helikase. Zellkulturexperimente mit EAV-Mutanten zeigten, dass biochemisch inaktivierende Substitutionen in der Helikase mit der Lebensfähigkeit des Virus nicht vereinbar sind. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass selbst einige der Mutationen, die lediglich zu einer Reduktion (nicht jedoch der Inaktivierung) der helikaseassoziierten NTPase-Aktivität geführt hatten, die Virusreplikation in Zellkultur komplett ausschalteten (Seybert et al., 2005).

Unmittelbar carboxyterminal folgt auf die zinkbindende Domäne bei Arteriviren ein Bereich, der *hinge spacer* (engl.: *hinge* = Scharnier; *spacer* = Abstandhalter) genannt wird und eine Scharnierfunktion zwischen der ZBD und der Helikasedomäne besitzen könnte (van Dinten et al., 2000). In diesem Zusammenhang konnte von van Dinten *et al.* (van Dinten et al., 1997) gezeigt werden, dass eine bestimmte Mutation in diesem Bereich die Fähigkeit des Virus, subgenomische RNAs zu synthetisieren, nahezu komplett ausschaltet, während die Replikation unbeeinträchtigt blieb. Daraus wurde gefolgert, dass die Helikase bei Arteriviren nicht nur eine essentielle Rolle in der Replikation spielt, sondern darüber hinaus auch eine eigenständige Funktion in der diskontinuierlichen Transkription besitzt.

1.1.6.3 Die Nichtstrukturproteine nsp3, nsp14, nsp15 und nsp16

Einige der coronaviralen Nichtstrukturproteine zeigen interessante Homologien zu Proteinen aus zwei verschiedenen Enzymkaskaden im zellulären RNA-Metabolismus. Dazu gehören einerseits die im ORF1b kodierten Exonuklease- (nsp14), Endoribonuklease- (nsp15) und 2'-O-Methyltransferaseaktivitäten (nsp16) und andererseits die Adenosindiphosphat-Ribose-1"-Phosphatase (ADRP), die Teil des vom ORF1a kodierten nsp3 ist, sowie eine zyklische Phosphodiesterase (CPD), die nur bei einigen Coronaviren der Gruppe II zu finden ist (Snijder et al., 2003). Die CPDase wird bei diesen Viren jedoch nicht vom Replikase-Gen, sondern von einer eigenen sgRNA kodiert. Bei den erwähnten Enzymkaskaden handelt es sich einerseits um die Synthese und Prozessierung von sog. *small nucleolar RNAs* (snoRNAs, engl.: *small nucleolar RNAs* = kleine nukleoläre RNAs) durch zelluläre Endo- und Exonukleasen. Diese snoRNAs regulieren die spezifische Methylierung von ribosomalen RNA-Molekülen durch zelluläre Methyltransferasen (Wang et al., 2000; Kiss 2001; Filipowicz & Pogacic 2002; Laneve et al., 2003; Putics et al., 2005). Die biochemische Charakterisierung des nsp16, eines Proteins, das Homologien zu pro- und eukaryontischen S-adenosylmethioninabhängigen 2'-O-Methyltransferasen aufweist, steht noch aus (Bugl et al., 2000). Hingegen konnte in einer vor kurzem erschienen Arbeit der Nachweis geführt werden, dass Coronaviren eine Exonuklease der DEDD-Superfamilie besitzen. Dieses Protein, nsp14, zeigte *in vitro* eine manganabhängige 3'-5'-Exonukleaseaktivität, die sowohl auf einzel- als auch auf doppelsträngige nichtmethylierte RNA-Substrate wirkt (Minskaia et al., 2006). Auch die Aktivität des coronaviralen nsp15 konnte bestätigt und biochemisch charakterisiert werden. Das Protein (auch NendoU genannt) hat eine Endoribonukleaseaktivität, die in Gegenwart divalenter Manganionen einzelsträngige sowie doppelsträngige, nichtmethylierte RNA-Substrate an Uridin-Resten spaltet. Das Enzym erzeugt dabei Produkte mit 2'-3'-Cyclophosphat-Enden. Es wurde gezeigt, dass nsp15 Hexamere bildet und ein katalytisches Zentrum besitzt (His, His, Lys), das mit dem der RNase A verwandt ist, obwohl die beiden Proteine in anderer (struktureller) Hinsicht nicht miteinander verwandt sind (Bhardwaj et al., 2004; Ivanov et al., 2004a; Guarino et al., 2005; Ricagno et al., 2006).

Bei dem zweiten angesprochenen zellulären Stoffwechselweg handelt es sich um die Prozessierung eines Nebenproduktes des tRNA-Spleißens. Hierbei wird Adenosindiphosphat-ribose-1"-2"-Zyklophosphat (Appr>p) zunächst durch eine Zyklophosphatdiesterase (CPD) in Adenosindiphosphat-ribose-1"-Phosphat umgewandelt und anschließend von einer Adenosinribosediphosphat-1"-phosphoesterase (ADRP) weiter umgesetzt (Culver et al., 1994; Martzen et al., 1999). Proteindomänen mit ADRP-Aktivitäten konnte kürzlich für HCoV-229E, TGEV und SCoV nachgewiesen werden (Putics et al., 2005; Putics et

al., 2006). Die Aktivitäten sind mit einer nsp3-Subdomäne assoziiert, die häufig auch als X-Domäne bezeichnet wird. Ihre Funktion *in vivo* ist bisher nicht bekannt, jedoch ist sie für die HCoV-229E-Replikation in Zellkultur entbehrlich (Putics et al., 2005).

1.2 Chimäre Viren

Der Begriff „Chimäre“ leitet sich vom griechischen Ausdruck *Chimaira* (gr.: *Χίμαιρα* = die Ziege) ab. In der griechischen Mythologie ist die eigentliche Chimäre ein Mischwesen aus Löwe, Ziege, Schlange oder Drache. Es finden sich dort noch eine Vielzahl weiterer Mischwesen, wie z.B. Pegasus (Pferd und Vogel), Greif (Löwe und Adler) und Sphinx (Frau, Vogel und Löwe). Gemeinsam ist all diesen Kreaturen, dass die Elemente unterschiedlicher Spezies vereinen. In den Naturwissenschaften bezeichnet man mit Chimären „einen auf dem Wege der Mutation oder Pfropfung entstandenen Organismus“ (Duden), oder einen Organismus, der die Merkmale zweier unterschiedlicher Arten miteinander vereint und nicht auf natürlichem Wege entstanden ist (Wikipedia-Online-Enzyklopädie, www.wikipedia.de, Stichwort: „Chimäre“).

Chimäre Coronaviren können beispielsweise durch Substitution eines Proteins durch das homologe Protein eines anderen Virus erzeugt werden. Bei einfachen Experimenten unter Austausch eines einzelnen Proteins oder weniger Proteine könnte man begrifflich von einem „Akzeptorvirus“, in das die kodierende Sequenz des fremden Proteins eingesetzt wird, und einem „Donorvirus“, von dem diese Sequenz stammt, sprechen. In der Vergangenheit wurden einige chimäre Coronaviren mittels gerichteter Rekombination vor allem zwischen verschiedenen MHV-Stämmen (Lavi et al., 1998b; Phillips et al., 1999; Phillips et al., 2001) oder zwischen MHV und anderen Coronaviren erzeugt (Peng et al., 1995; Lavi et al., 1998a; Kuo et al., 2000; Popova & Zhang 2002). Die hierbei angewandte Methode basierte im wesentlichen auf Co-Infektionen bzw. Co-Infektionen/ RNA-Transfektionen und anschließender Selektion des gewünschten chimären Virus in dafür geeigneten Zellen. Die Methode bringt es mit sich, dass die Substitutionen auf den Strukturgen-Bereich beschränkt blieben. Mit solchermaßen erzeugten Viren konnte gezeigt werden, dass die virale Pathogenese bzw. der Tropismus für einen bestimmten Organismus und sogar für ein bestimmtes Gewebe hauptsächlich durch das S-Protein bestimmt wird (Lavi et al., 1998b; Phillips et al., 1999; Kuo et al., 2000; Phillips et al., 2001; Popova & Zhang 2002). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass u.U. auch das N-Protein die Pathogenese beeinflussen kann (Lavi et al., 1998a).

1.3 Zielstellung der Arbeit

Das (für RNA-Viren außergewöhnlich große) Proteom von Coronaviren beinhaltet zahlreiche Enzymfunktionen, die zum Teil von anderen RNA-Viren nicht kodiert werden. Da bis vor wenigen Jahren ein revers-genetisches System für Coronaviren nicht zur Verfügung stand, erfolgte die Charakterisierung dieser Proteine bisher nahezu ausschließlich mittels biochemischer Methoden.

In der vorliegenden Arbeit sollten – mit Hilfe revers-genetischer Verfahren – einige der replikativen Proteine von HCoV-229E hinsichtlich ihrer Funktion im intrazellulären Replikationszyklus näher charakterisiert werden.

Für die Planung der Experimente sollten, falls verfügbar, die aus biochemischen Experimenten erhaltenen Informationen genutzt werden, insbesondere, um potentiell katalytische Reste in den Proteinen nsp13, nsp14, nsp15 und nsp16 zu substituieren. Die Charakterisierung des Phänotyps dieser Art von Mutanten sollte erste Einblicke in die möglichen Funktionen des untersuchten Enzyms ermöglichen.

In einer zweiten experimentellen Reihe sollten Virusmutanten erzeugt werden, deren posttranslationale pp1a/pp1ab-Prozessierung durch Mutagenese ausgewählter M^{PRO}-Schnittstellen beeinträchtigt war. Hierbei sollten mögliche Konsequenzen einer gestörten posttranslationalen Regulation der Genexpression auf die virale Replikation analysiert werden.

In einem weiteren, alternativen Ansatz sollten chimäre Viren erzeugt werden. Dieser Ansatz basierte auf der Annahme, dass homologe Proteine innerhalb der Coronaviren der Gruppe I die gleichen oder zumindest sehr ähnliche Strukturen, Funktionen, Aktivitäten bzw. Substratspezifitäten besitzen. Dennoch konnte damit gerechnet werden, dass diese Proteine im Kontext eines fremden Virus funktionelle Defizite entstehen lassen, die entweder zu nichtlebensfähigen Viren oder aber zu replikationskompromittierten Viren führen. Die Effekte solcher Substitutionen sollten dabei sowohl unmittelbar nach der Transfektion von chimären RNAs untersucht werden als auch (im Falle von lebensfähigen Viren) nach Passagierung in Zellkultur. Von besonderem Interesse war dabei die Identifizierung von adaptiven Mutationen, die nach einer Passagierung lebensfähiger, chimärer Viren in Zellkultur entstehen könnten. Auf diese Weise sollten dann erste Einblicke in mögliche Interaktionen des gegebenen Proteins mit anderen Untereinheiten der Replikase oder aber bestimmten RNA-Sequenzen oder -strukturen gewonnen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine intrazellulär selbständig replizierende RNA, ein sogenanntes Replikon, auf Basis des humanen Coronavirus 229E konstruiert werden. Das Ziel

bestand in erster Hinsicht darin, die Adaptionen dieser RNA auf den permanent intrazellulären Status zu ermitteln. Darüber hinaus kann dieses Replikonsystem genutzt werden, nicht lebensfähige Virusmutanten zu untersuchen.

2 Materialien und Lösungen

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

<u>Chemikalien</u>	<u>Firma/ Artikelnummer</u>
2-Amino-6-Mercaptopurin (6-TG)	Sigma Aldrich/ #A-4882
AG® 501-X8 Resin	Bio-Rad/ #142-6424
Agarose (low EEO)	AppliChem/ #A2114,0500
Agarose (Low Melting Point)	Invitrogen/ #9012366
Ammoniumsulfat	Sigma-Aldrich/ #A4915
Ammoniumpersulfat (APS)	Invitrogen/ #15523012
Ampicillin	Ratiopharm/ #PZN-2036628
BactoAgar	BD/ #214010
Bactotrypton	BD/ #211705
bis-Acrylamid	Roth/ #7867.1
Borsäure	Roth/ #6943.3
Bromphenolblau	Sigma/ #B-8026
Calciumchlorid (Dihydrat)	Merck/ #2382
Casaminoacids	BD/ #223050
Chloroform	AppliChem/ #A1585, 2500
Coomassie-Brilliantblau R250	Serva/ #17525
Desoxynucleotidtriphosphate	Amersham Bioscience/ #27-2035-013
Diatomaceous Earth	Sigma-Aldrich/ #D5384
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck/ #2931
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen/ #20459
Essigsäure	AppliChem/ #A0820, 2500PE
Ethanol (100 %)	AppliChem/ #A1613, 2500 PE
Ethidiumbromid	Invitrogen/ #15585-011
EDTA	Sigma-Aldrich/ #E1644
Ficoll	Sigma Aldrich/ #F-2637
Formaldehyd (37 %)	AppliChem/ #A0823
Formamid	Roth/ #0749
Fötale Rinderserum	Biochrom KG/ #S0115

2 Materialien und Lösungen

Geneticin	Gibco/ #10131-019
Glycerol (100 %)	Roth/ #3783.2
Glycin	Roth/ #3908
Guanidinthiocyanat	Roth/ #0017.2
HEPES	Sigma-Aldrich/ #H4034-500G
Heringssperma-DNA	Sigma-Aldrich/ #D1626
Hygromycin B in PBS	Invitrogen/ #10687-010
Hypoxanthin	Calbiochem/ #4010
Isoamylalkohol	Merck/ #979
Isopropanol	AppliChem/ #A0900
Kaliumchlorid	Roth/ #6781.1
Kristallviolett	Merck/ #1408
Lipofectin®	Invitrogen/ #18292-037
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich/ #L9650
m7G(5')ppp(5')G/ (Cap-Analogon)	NEB/ #S14044L
Magnesiumchlorid	Merck/ #5833,1000
Methanol	AppliChem/ #A0688
Mykophenolsäure (MPA)	Sigma/ #M3536
3-(N-Morpholino)-propansulfon- säure Natriumsalz (MOPS)	Sigma Aldrich #M9381
Natriumacetat	AppliChem/ #A1522
Natriumchlorid	Merck/ #1.06404.5000
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem/ #A1112,0500
Natronlauge 1 mol/ L	Ferak/ #71814
Nucleosidtriphosphate	Pharmacia Biotech/ #27-2025-01
Optimem1+Glutamax1	Gibco/ #51985-026
Phenol (Rotio-Phenol)	Roth/ #0038
Piperazine-Sulfonsäure	Sigma-Aldrich/ #P2949
RNA Lagerungspuffer	1mM Natriumcitrat (pH 6,4), (Ambion/ #7001)
RNase-Inhibitor	Promega/ #N251A
Saccharose	AppliChem/ #A2211,100
Salzsäure (rauchend, 37%)	AppliChem/ #A0659,2500 PE
N,N,N',N'-Tetramethylethylen- diamin (TEMED)	Sigma/ #T9281

<i>tri</i> -Natriumcitrat-Dihydrat	AppliChem/ #A1351,1000
Tris	Roth/ #4855.3
Triton X-100	Sigma-Aldrich/ #T9284
Xanthin	Calbiochem/ #6820
Xylencyanol FF	Serva/ #38505
Hefeextrakt	BD/ #212750

2.1.1.1 Radiochemikalien

α -[³² P]-dCTP (370 Mbq/ ml)	Amersham Bioscience/ #AA0075
L-[³⁵ S]-Methionin (370 Mbq/ ml)	Amersham Bioscience/ #AG1094

2.1.2 Kits

Big Dye Terminator v 3.1

Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems/ #4336917
DynaBeads® Oligo (dT) ₂₅	Dynal Biotech/ #610.02
FirstChoice® RLM-RACE-Kit	Ambion/ #1700
Megaprime DNA Labelling System	Amersham Bioscience/ #RPN 1607
QIAprep Spin Miniprep Kit (50)	QIAGEN/ #27106
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN/ #28106
Pure Yield™ Plasmid	
Midiprep System	Promega/ #A2492
Rabbit Reticulocyte Lysate System	GE Healthcare/ #RPN3151
RiboMAX™ Large Scale	
RNA Production System-T7	Promega/ #P1330
pGEM®-T easy Vector System I	Promega/ #A1360

2.1.3 Enzyme

Enzym	Firma/ Artikelnummer
BsaI, 5 U/μl	NEB/ #R0535S
BsmBI, 10U/μl	NEB/ #R0580L
ClaI, 10U/μl	Promega/ #R655A
CIP (alkaline Phosphatase)	Roche/ #713023
DpnI, 10U/μl	Fermentas/ #ER1702

EagI, 10U/μl	NEB/ #R0505L
HindIII, 10U/μl	Fermentas/ #ER0501
Lysozym	Sigma/ #L-6876
Pfu-DNA-Polymerase, 3U/μl	Promega/ #M774A
PNK, 10U	Fermentas/ #EK0031
T4-Polynukleotidkinase, 10U/μl	Fermentas/ #EK0031
Proteinase K, (10μg/μl)	Sigma-Aldrich/ #P-6556
Rnase-freie RQ1-DNase, 1U/μl	Promega/ #M610C
RNasin (RNase Inhibitor)	Promega/ #N251A
T4-DNA-Ligase, 5U/μl	Fermentas/ #EL0011
T4-DNA-Polymerase, 5U/μl	Fermentas/ #EP0061
Taq-Polymerase S, 5U/μl	Genaxxon/ #M3001.2500
Transkriptor (Reverse Transcriptase) 20U/μl	Roche/ #92959420
Triple Master PCR System, 5U/μl	Eppendorf/ #954140245

2.1.4 Geräte

<u>Gerätebezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
UV-Stratalinker 1800	Stratagene
Master Cycler Personal	Eppendorf
Elektroporator II	Invitrogen
Fluoreszenzmikroskop Leitz DM IL	Leica
Hybridisierungssofen 400 Hy	Bachofer
Mikroskop CK2, Model 3000/300	Olympus
FLA 3000 Phosphorimager	Fujifilm
Rotoren GS-3	Sorvall
Surespin 33	Kendro
Biofuge pico (Tischzentrifuge)	Heraeus
Discovery™ 90SF (Zentrifuge)	Sorvall
Evolution RC (Zentrifuge)	Sorvall
Multifuge 1 S-R (Zentrifuge)	Heraeus
Rotanta/K (Zentrifuge)	Hettich

2.1.5 Sonstiges

Blottingpapier	Schleicher & Schuell/ #10426694
Micro-Bio-Spin® P30 Tris Chromatography Columns	Bio-RAD/ #732-6223
Nylonmembran Nytran Supercharge	Schleicher & Schuell/ #16416296
DNA-Marker λ -DNA	Fermentas/ #SD0011
	EcoRI-/ HindIII-verdaut

2.1.6 Bakterien

<i>E. coli</i> K12 TOP10F'	Invitrogen/ #C615-00
----------------------------	----------------------

2.1.7 Viren

HCoV-229E	(Hamre & Procknow 1966; Herold et al., 1993)
HCoV-NL63	(Pyrce et al., 2004; van der Hoek et al., 2004)
PEDV (CV777)	(Kocherhans et al., 2001)
Rekombinantes Vacciniavirus vHCoV-inf-1	(Thiel et al., 2001a)

2.1.8 Zelllinien

BHK-21	ATCC #CCL-10
BHK-HCoV-N-Zellen	(Schelle et al., 2005)
CV-1	ATCC #CCL-70
D980R	von G. L. Smith, Imperial College, London, UK
MRC-5	ATCC #CCL-171

2.1.9 Plasmide

pBluescript II KS(+)	Stratagene
pGEM®-T easy	Promega/ #A137A

2.1.10 Nährmedien für Bakterien

LB-Medium (-)	10 g Bacto Trypton 5 g Yeast Extract 2 g Bacto Casaminoacids 10 g Natriumchlorid 0,3 ml 5 N NaOH; ad 1 L H ₂ O
LB-Medium (+)	LB-Medium (-) mit Ampicillin 100 µg/ ml
LB-Platten	1 l LB-Medium 16 g Agar

2.1.11 Nährmedien und Puffer für Zellkultur

Hausmedium	500 ml MEM mit Earles Salzen und L-Glutamin 25 ml fötales Rinderserum 0,5 ml Antibiotika 12 ml 5,6 %-iges NaHCO ₃
Hausmedium+H	500 ml MEM mit Earle's Salzen und L-Glutamin 25 ml fötales Rinderserum 0,5 ml Antibiotika 12 ml 5,6 %-iges NaHCO ₃ 5 ml 2 M HEPES
Komplett-Medium	500 ml MEM mit Earle's Salzen und GlutaMax™ I, Gibco/ #42360-024 25 mM HEPES 50 ml fötales Rinderserum 0,5 ml Antibiotika
Doppel-MEM	500 ml DMEM 50 ml fötales Rinderserum 1 ml Antibiotikum 24 ml 5,6 %-iges NaHCO ₃
Opti-MEM I	Gibco/ #51985-026

Nährmedien für:

BHK-21:	Hausmedium+H
D980R:	Hausmedium
BHK-HCoV-N- Zellen	500 ml Hausmedium, 1 ml Geneticin (50 mg/ ml), 1 ml Hygromycin B (50 mg/ml)
CV-1:	Komplett-Medium
MRC-5:	Komplett-Medium
Replikonzellen:	Komplett-Medium, 400 µg/ ml Geneticin

Zellkulturzusätze:

Antibiotika	Penicillin G (10 ⁴ Einheiten/ ml) Streptomycinsulfat (10mg/ ml)
ATV	Medienküche
Fötales Rinderserum	Pan Biotech/ #3302-P2409
HEPES, 2 M (steril filtriert)	47,66g HEPES in 100 ml 0,12 N NaOH (pH 6,3-6,6)
Hygromycin	Hygromycin B in PBS (50 mg/ ml) Gibco/ # 10687-010
Nicht essentielle Aminosäuren	Gibco/ #11140-035
PBS	Medienküche
6-Thioguanin-Lösung	1 mg/ ml in 0,1 N steril filtriertem NaOH
Trypsin 0,25 % (steril filtriert)	Medienküche

2.2 Puffer und Lösungen

2.2.1 DNA-Minipräparation

Puffer 1	5 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,5) 2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), 1 ml RNase A (10 µg/ ml) ad 100 ml H ₂ O
Puffer 2	0,2 M NaOH 1 % [w/v] SDS
Puffer 3	3 M Kaliumacetat (pH 5,5)

2 Materialien und Lösungen

L6	10 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,4) 8,8 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), 2,6 ml Triton X-100 120 g Guanidinthiocyanat 13,2 ml H ₂ O
Diatomeen-Lösung	10 g Diatomaceous Earth 50 ml H ₂ O, 0,5 ml 37 %-ige HCl
Waschpuffer	10 ml 5 M NaCl 5 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,5) 2,5 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) auf 250 ml H ₂ O 250 ml Ethanol

2.2.2 Herstellung kompetenter Zellen

Calciumchloridlösung	60 mM CaCl ₂ 15 % [v/v] Glycerin 10 mM PIPES-NaOH (pH 7,0)
----------------------	---

2.2.3 Puffer und Lösungen für Nukleinsäureelektrophorese

2.2.3.1 Agarosegele

2.2.3.1.1 DNA

10 x TBE-Laufpuffer, 1 L	106 g Tris 55 g Borsäure 46,5 g EDTA
DNA-Proben-Färbe-Lösung	40 % [w/v] Saccharose 0,25 % [w/v] Bromphenolblau

2.2.3.1.2 RNA

Laufpuffer	1 x TBE 0,1 % [w/v] SDS
RNA-Proben-Färbe-Lösung	40 % [w/v] Saccharose 0,25 % [w/v] Bromphenolblau 0,1 % [w/v] SDS

2 Materialien und Lösungen

2.2.3.2 Formaldehydgele

10 x MOPS	0,2 M MOPS 0,05 M Natriumacetat 0,01 M EDTA (pH 8,0) Mit Essigsäure auf pH 7,0 einstellen
Deionisiertes Formamid	Formamid mit 5 % [w/v] AG® 501-X8 Resin
Denaturierungslösung	100 µl 10 x MOPS 150 µl 37 %-iges [v/v] filtriertes Formaldehyd 500 µl deionisiertes Formamid
Northernproben- Färbe-Lösung	50 % [v/v] Glycerin 1 mM EDTA 0,4 % [w/v] Bromphenolblau 0,4 % [w/v] Xylencyanol FF

2.2.3.2 Proteingele:

Proteinlaufpuffer	25 mM Tris-HCl (pH 8,8) 200 mM Glycin 0,1 % [w/v] SDS
Protein-Probenpuffer	60 mM Tris-HCl (pH6,8) 100 mM DTT 10 % [v/v] Glycerol 2 % [w/v] SDS 0,01 % [w/v] Bromphenolblau
Coomassie-Fixierlösung	25 % [v/v] Isopropanol 10 % [v/v] Essigsäure 0,05 % [w/v] Coomassie-Brilliantblau R250
Entfärbelösung	25 % [v/v] Methanol 7,25 % [v/v] Essigsäure

2.2.4 Puffer und Lösungen für Blots

20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M <i>tri</i> -Natriumcitrat-Dihydrat
Blotpuffer	10 x SSC

2 Materialien und Lösungen

Hybridisierungspuffer	5 x SSC 5 x Denhardts 1 % [w/v] SDS 100 µg/ ml Heringssperma-DNA
50 x Denhardts	5 g Ficoll 5 g Polyvinylpyrrolidon 5 g BSA ad 500 ml H ₂ O

2.2.4.1 Lösungen für Southern Blots:

Southernlösung 1	0,2 M HCl
Southernlösung 2	0,5 M NaOH 1 M NaCl
Southernlösung 3	1 M Tris-HCl (pH 7,5) 1,5 M NaCl

2.2.4.2 Lösungen für Northern Blots:

Northernlösung 1	0,05 M NaOH
Northernlösung 2	0,1 M Tris/ HCl (pH 7,5)
Northernlösung 3	10 x SSC

2.2.5 Puffer für PolyA-RNA-Isolation mit Dynabeads

2 x Bindepuffer	20 mM TRIS-HCl (pH 7,5) 1 M LiCl ₂ 2 mM EDTA 1 % [w/v] SDS
Lysepuffer	10 mM TRIS-HCl (pH 7,5) 0,14 M NaCl 5 mM KCl 1 % [v/v] NP40
EDTA-Lösung	2 mM EDTA
Waschpuffer	10 mM TRIS-HCl (pH 7,5) 150 mM LiCl ₂ 1 mM EDTA

2.2.6 Lösung für DNA-Isolation und Aufreinigung

2 x Proteinase-K-Puffer	200 mM Tris-HCl (pH 7,5)
	10 mM EDTA
	0,4 % [w/v] SDS
	400 mM NaCl
Phenol-Chloroform	24 ml Phenol
	24 ml Chlorophorm
	2 ml Isoamylalkohol
Chlorophorm- Isoamylalkohol	24 ml Chlorophorm
	1 ml Isoamylalkohol

2.2.7 Sonstige Puffer und Lösungen

Agar-Overlay (100 ml)	50 ml DoppelMedium für D980R
	50 ml 2 % [w/w] Low-Melting-Point Agarose
	100 µg 6-TG
Lithiumchloridlösung	7,5 M LiCl ₂
	75 mM EDTA

2.3 Software

Adobe Photoshop Vers. 7.0

AIDA Advanced Image Data Analyzer Vers. 3.20.116

DNA Strider 1.4f2

Edit Seq, Power Macintosh EditSeq Vers. 4.00

Microsoft Office 2004

SeqMan, expert Sequence analysis software, Power Macintosh SeqMan Vers. 4.00

Genetic Analyzer, Data Collection Software Vers. 1.1 Sequencing Analysis 3.7

3 Methoden

3.1 DNA

3.1.1 Standardmethoden

3.1.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei einer PCR werden DNA-Moleküle durch eine wiederholte Abfolge von DNA-Denaturierungs-, Primer-Anlagerungs- und DNA-Syntheseschritten durch eine thermostabile DNA-Polymerase amplifiziert.

Als Standard für eine PCR mit der Taq-Polymerase diente in der Arbeit folgendes Protokoll, das gegebenenfalls den Bedürfnissen angepasst wurde. Alle Reaktionen begannen mit einem initialen Denaturierungsschritt, der bei 94°C ablief und 1 Minute dauerte. Hierauf folgte die zyklische Wiederholung von Denaturierung, Anlagerung und Synthese. Die Denaturierung fand bei 94°C und die Anlagerung je nach Primer bei 45 bis 50°C statt. Beide Schritte dauerten jeweils 30 Sekunden. Für die anschließende Synthese der komplementären Stränge wurde pro kb erwarteter Länge 1 Minute Reaktionszeit veranschlagt. Die DNA-Synthese erfolgte bei 72°C, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase. Insgesamt wurden zwischen 30 und 35 Zyklen durchgeführt. Zum Schluß jeder PCR erfolgte ein abschließender Syntheseschritt, der bei 72°C für 2 Minuten pro kb erwarteter Produktlänge ablief. Zur kurzfristigen Lagerung bis zur Wiederverwendung wurden die PCR-Produkte auf 4°C abgekühlt. Bei Polymerase-Kettenreaktionen mit der Pfu-Polymerase wurde die Dauer der Syntheseschritte jeweils verdoppelt. Der zyklisch wiederholte Syntheseschritt dauerte demnach 2 Minuten und der abschließende Syntheseschritt 4 Minuten je kb erwarteter Produktlänge.

Ein typischer Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl enthielt:

38,5	µl	H ₂ O
5	µl	Reaktionspuffer (10 x)
2	µl	Primer 1 (50 ng/ µl, ca. 25 nts)
2	µl	Primer 2 (50 ng/ µl, ca. 25 nts)
1	µl	dNTP (je 10 mM)
0,5	µl	Taq-Polymerase (5 U/ µl)
1	µl	Matrize

3.1.1.2 Restriktionsspaltung

Bei einer Restriktionsspaltung macht man sich die Fähigkeit von Restriktionsendonukleasen zunutze, DNA-Moleküle sequenzspezifisch zu schneiden. Dabei entstehen DNA-Fragmente mit 5'- bzw 3'-überhängenden oder mit glatten Enden.

Anwendung fand die Restriktionsspaltung hauptsächlich bei der Analyse und bei der Konstruktion von DNA-Molekülen.

Bei den Klonierungsexperimenten in dieser Arbeit kamen bevorzugt die Restriktionsendonukleasen BsaI und BsmBI zum Einsatz. Beide Enzyme schneiden außerhalb ihres Erkennungsmotivs und bieten so den Vorteil, beliebige 5'-Überhänge einführen zu können. Sowohl die zu klonierenden PCR-Produkte wie die Vektoren wurden mit den genannten Enzymen gespalten. Die Reaktionen fanden für 2 Stunden bei einer Temperatur von 50°C mit BsaI bzw. 55°C mit BsmBI statt. Das Gesamtvolumen der Ansätze betrug 100 µl. Das verwendete Enzym wurde in einer Endkonzentration von 0,5 U/ µl eingesetzt.

Weiterhin wurde die Restriktionsendonuklease DpnI eingesetzt, um DNA-Matrizen aus einem PCR-Ansatz zu entfernen. Dieses aus dem Bakterium *Diplococcus pneumoniae* stammende Enzym schneidet ausschließlich methylierte DNA-Moleküle an einer relativ häufig vorkommenden Tetranukleotidsequenz. Da die Produkte einer PCR nicht methyliert sind, werden sie von DpnI nicht als Substrat verwendet. Zu 50 µl PCR-Produkt wurde 3 µl Enzym (Fermentas, 10 u/ µl) hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 2 Stunden.

3.1.1.3 Dephosphorylierung

Um in Ligationsansätzen eine Religation des zuvor gespaltenen Vektors zu verhindern, wurden geschnittene Plasmid-DNA-Moleküle an ihren Enden dephosphoryliert. Die entsprechenden Reaktion wurde durch die alkalische Phosphatase, isoliert aus Kalbsdarm (*calf intestine phosphatase*, CIP) ausgeführt. Hierzu wurden 10 units des Enzyms (NEB, 10 u/ µl) zur linearisierten Plamid-DNA (Vektor) gegeben und der Reaktionsansatz für ungefähr 45 Minuten bei 37°C inkubiert.

3.1.1.4 Ligation

Ligationsreaktionen wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase über Nacht bei 17°C durchgeführt. Die in ein entsprechendes Plasmid einzuführende DNA wurde dabei in einem molaren Verhältnis zur Vektor-DNA von circa 5:1 eingesetzt.

3.1.2 Reinigung von DNA

3.1.2.1 Phenol/ Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanolpräzipitation

Der zu reinigenden DNA wurde ein äquivalentes Volumen eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemischs (25:24:1; [v/v/v]) zugegeben. Nach guter Durchmischung der organischen und wässrigen Phasen wurde das Gemisch 5 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit einem äquivalenten Volumen eines Chloroform/ Isoamylalkohol-Gemisches (24:1; [v/v]) versetzt, gut durchmischt und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Abschließend wurde die wässrige Phase abgenommen und mit 2,5 Volumina 100 % Ethanol und 1/ 20 Volumen 5 M NaCl-Lösung vermischt. Die ausfallende DNA konnte nach zweimaliger Zentrifugation für jeweils 10 Minuten und dazwischenliegendem „Waschen“ mit 70 % [v/v] Ethanol in einem beliebigem Volumen H₂O aufgenommen werden.

3.1.2.2 Qiagen PCR Purification Kit

Um PCR-Produkte von nichteingebauten Nukleotiden, Primern, Enzymen, Salzen und anderen Substanzen zu befreien, wurde eine Reinigung mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Herstelleranweisungen vorgenommen.

3.1.2.3 Bindung an Diatomeenerde

Bei dieser Art der Aufreinigung von DNA wurde die zu reinigende DNA mit zwei Volumina L6 vermischt und mit 50 µl einer Diatomeenlösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch mittels Vakuum durch eine kleine Säule mit Filtereinsatz gesaugt und das Diatomeenerdepellet mit 2 ml Waschpuffer (siehe Kapitel 2.2.1) gewaschen. Nach einem zweiminütigen Zentrifugationsschritt konnte die gebundene DNA durch Zugabe von 50 µl H₂O aus dem Diatomeenerdepellet über einen weiteren Zentrifugationsschritt eluiert werden.

3.1.2.4 Gelextraktion

Um DNA aus Agarosegelen zu isolieren, wurde die Gelbande unter UV-Licht sichtbar gemacht und aus dem Gel ausgeschnitten. Der ausgeschnittene Bereich wurde anschließend in 2,5 Volumina L6 bei 50°C gelöst. Zur Isolation der DNA wurde dann wie im Kapitel 3.1.2.3 beschrieben verfahren.

3.1.3 DNA-Isolation

3.1.3.1 Plasmid-DNA-Präparation aus Bakterien

3.1.3.1.1 Analytischer Maßstab (Mini-Präparation)

Zur Extraktion von Plasmid-DNA aus Prokaryonten in analytischem Maßstab wurde eine sogenannte Minipräparation durchgeführt. Sie wurde hauptsächlich angewandt, um die Identität der DNA verschiedener Klone schnell und kostengünstig zu überprüfen.

1,5 ml einer Übernachtskultur plasmidtragender *E. coli*-Zellen des Stamms Top10F' wurden für 30 Sekunden zentrifugiert und das Bakterienpellet in 150 µl Puffer 1 aufgenommen. Anschließend wurden 150 µl Puffer 2 sowie 150 µl Puffer 3 dazugegeben, wobei jeweils nach Zugabe des Puffers vorsichtig gemischt wurde. Puffer 3 führte zu einem Ausfällen von chromosomaler DNA und Proteinen in einem Komplex mit SDS, der als weißer Niederschlag sichtbar wurde. Durch Zentrifugation für 10 Minuten in der Tischzentrifuge wurde das Präzipitat sedimentiert. Zur Isolation der Plasmid-DNA wurde der Überstand wie unter Kapitel 3.1.2.3 beschrieben gereinigt.

Alternativ wurde zur Gewinnung hochgereinigter Plasmid-DNA der QIAprep Spin Minipep Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet.

3.1.3.1.2 Präparativer Maßstab (Midi-Präparation)

Die Isolation von Plasmid-DNA aus Prokaryonten im präparativen Maßstab wurde mit dem Pure Yield™ Plasmid Midiprep System nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.1.3.2 DNA-Isolation aus eukaryontischen Zellen/ Vaccinia

3.1.3.2.1 Analytischer Maßstab

Die Isolation von Vacciniavirus-DNA aus infizierten CV-1-Zellen in analytischem Maßstab wurde hauptsächlich angewandt, um die genomische DNA verschiedener Vacciniavirusklone schnell und kostengünstig zu charakterisieren.

Hierzu wurden infizierte CV-1-Zellen aus einer 3-cm-Schale abgekratzt und in der Tischzentrifuge für 30 Sekunden zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl Proteinase-K-Puffer aufgenommen, 3 µl Proteinase-K (10 mg/ ml) zugegeben und für 2 Stunden bei 50°C inkubiert. Die freigesetzte DNA wurde anschließend, wie unter Kapitel 3.1.2.1 beschrieben, gereinigt.

3.1.3.2.2 Präparativer Maßstab

Zur Isolation größerer Mengen gereinigter Vacciniavirus-DNA wurde ein 200 µl Aliquot gereinigten Vacciniavirus mit einem Volumenteil zweifach konzentrierten Proteinase-K-Puffers

und 8 µl Proteinase-K (10 mg/ ml) vermischt und für circa 2 Stunden bei 50°C inkubiert bis die Lösung klar wurde. Die freigesetzte DNA wurde anschließend wie unter Kapitel 3.1.2.1 beschrieben, gereinigt.

3.1.4 DNA-Analyse

3.1.4.1 Agarosegelelektrophorese

Als negativ geladenes Molekül wandert DNA im elektrischen Feld zur Anode. Befindet sich die DNA dabei in einer gelartigen Matrix, so wandert sie in Abhängigkeit ihrer Größe.

In der vorliegenden Arbeit wurden 1-2 %-ige [w/v], ethidiumbromidhaltige (0,5 µg/ ml) TBE-Agarosegele (15 x 13 cm) in 1 x TBE-Puffer verwendet. Die zu analysierende DNA-Probe wurden mit 1/ 6 Volumen DNA-Probenpuffer gemischt. Die folgende Elektrophorese fand bei 130 V bis zur gewünschten Auftrennung statt. Die im Gel enthaltene DNA wurde anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Zur Abschätzung der Molekülgrößen wurde parallel ein DNA-Größenmarker (siehe Kapitel 2.1.5) aufgetragen.

3.1.4.2 Southern Blot

Beim Southern Blot wird DNA aus einem Gel auf eine Membran überführt (geblottet), um sie durch Hybridisierung mit spezifischen radiochemischen oder chemischen Sonden charakterisieren zu können. Der Vorteil des Southern Blots gegenüber dem ethidiumbromidhaltigen Agarosegel ist die Spezifität des Nachweises und die Amplifikation des Signals.

Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Southern Blots begannen mit einer Restriktionsspaltung mit dem Enzym HindIII und einer nachfolgenden Agarosegelelektrophorese. Die entsprechenden Methoden sind unter 3.1.1.2 und 3.1.4.1 beschrieben. Anschließend wurden die im Gel enthaltene DNA-Fragmente für 20 Minuten auf einem Schwenker in 250 ml Southernlösung 1 bzw. Southernlösung 2 depuriniert und denaturiert. Hierdurch wurde der spätere Transfer aus dem Gel erleichtert. Das anschließende Schwenken für 20 Minuten in 250 ml Southernlösung 3 diente der Neutralisation.

Währenddessen wurde die Nylonmembran in zehnfach konzentriertem SSC und die Bodenplatte der Blotkammer in VE-Wasser getränkt. Die Anordnung der Elemente der Blotkammer war wie folgt: In der Blotkammer lag die Bodenplatte, auf welche die Nylonmembran gelegt wurde. Zwischen Membran und Gel befand sich eine Maske.

Der eigentliche Transfer der DNA-Moleküle aus dem Gel auf die Membran fand über 2 Stunden bei 2 bar Vacuum in 1 Liter Blotpuffer statt. Danach wurde die Membran getrocknet, bevor die DNA-Fragmente im Crosslinker kovalent an die Membran gebunden wurden.

Es folgte eine Stunde Prähybridisierung der Membran in circa 15 ml Hybridisierungspuffer in der Hybridisierungsröhre bei 68°C. Währenddessen wurde die Sonde für die Hybridisierung nach den Herstellerangaben des Megaprime-DNA-Labeling-Systems hergestellt. Als Matrizen dienten drei PCR-Fragmente, die in ihrer Gesamtheit das komplette HCoV-229E-cDNA-Genom repräsentierten. Die [³²P]-markierte DNA-Sonde wurde nach einem Pufferwechsel in die Röhre gegeben und bei 68°C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal bei Raumtemperatur mit circa 30 ml 2 x SSC/ 0,1 % [w/v] SDS und dreimal bei 68°C für je 30 Minuten mit 0,2 x SSC/ 0,1 % [w/v] SDS gewaschen, bevor der Blot auf einen Röntgenfilm oder eine Phosphorimagerplatte aufgelegt wurde.

3.1.4.3 Sequenzierung

Die Nukleotidsequenz von DNA-Molekülen wurde nach der Methode von Sanger bestimmt (Sanger et al., 1977). Eine Variante dieser Methode macht sich den Kettenabbruch während der DNA-Synthese beim Einbau von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden zunutze. Durch anschließendes Auftrennen der Reaktionsprodukte entsprechend der Fragmentgröße und Detektieren der basenspezifischen Markierung kann man die Sequenz des jeweiligen DNA-Moleküls ableiten. In dieser Arbeit wurden die Sequenzierungsreaktionen nach den Herstellerangaben des Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kits durchgeführt.

Das Standardprogramm der Sequenzierreaktion bestand aus 25 Zyklen. Der Denaturierungsschritt dauerte jeweils 10 Sekunden und erfolgte bei 96°C. Das anschließende Annealing fand für 5 Sekunden bei 50°C statt und die Elongation für 4 Minuten bei 60°C. Im Anschluss wurden die Ansätze auf 4°C bis zu ihrer Analyse gelagert. Alle nachfolgenden Schritte der Aufreinigung und chromatographischen Analyse der Sequenzierungsprodukte wurden von der Diagnostikabteilung im Institut übernommen.

3.2 RNA

3.2.1 *In-vitro*-Transkription

Die in dieser Arbeit benötigten Transkripte wurden mit dem RiboMAXTM Large Scale RNA Production System-T7 hergestellt, wobei die Herstellerangaben je nach Länge des gewünschten

Transkripts angepasst werden mussten. Ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 μl setzte sich folgendermaßen zusammen:

3,8	μl	rATP, rCTP, rUTP (100 mM)
0,7	μl	rGTP (100 mM)
5	μl	Cap-Analogon (30 mM m7G(5')ppp(5')G)
10	μl	5 x Transkriptionspuffer
2	μl	RNasin
15,5	μl	H ₂ O/ DNA (>1 μg)
5	μl	T7-Enzymmix

Die Transkriptionsreaktion wurde bei 30°C inkubiert und dauerte 150 Minuten. Es folgten 20 Minuten Inkubation des Ansatzes in Gegenwart von 1 U DNase bei 37°C. Nach Zugabe von einem halben Volumenteil Lithiumchlorid (7,5 M LiCl₂, 75 mM EDTA) präzipitierte die entstandene RNA bei -20°C für 30 Minuten und konnte durch eine halbstündige Zentrifugation bei 4°C mit der Tischzentrifuge pelletiert werden. Das Pellet wurde mit 500 μl 70 % [v/v] Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und in 50 μl RNA Lagerungspuffer aufgenommen. Anschließend konnte die RNA-Konzentration photometrisch quantifiziert und ggf. auf 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt werden. Die qualitative Analyse der Transkripte wurde wie unter Abschnitt 3.2.4.1 beschrieben durchgeführt.

3.2.2 Reverse Transkription

Unter reverser Transkription versteht man das Umschreiben einer RNA in eine cDNA. In der vorliegenden Arbeit wurde die Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche) verwendet, die aufgrund ihrer Aktivität bei höheren Reaktionstemperaturen eine cDNA-Synthese auch von RNA-Matrizen mit stabilen Sekundärstrukturen erlaubte. Ein typischer Reaktionsansatz von 20 μl enthielt:

11,5	μl	H ₂ O
4	μl	5 x RT-Puffer
1	μl	dNTP (je 10 mM)
1	μl	Primer (50 ng/ μl , ca. 25 nts)
0,5	μl	Transcriptor Reverse Transcriptase
1	μl	RNA-Lösung

3.2.3 mRNA-Isolation

Alle positivsträngigen coronaviralen RNAs sind am 3'-Ende polyadenyliert, was ihre Isolation aus eukaryotischen Zellen mit Hilfe magnetischer Oligo(dT)₂₅-Dynabeads® erlaubte.

Je nach Zellzahl wurden zwei Protokolle verwendet. Die folgenden Angaben beziehen sich auf die Isolation aus den Zellen einer 10-cm-Schale. In Klammern ist das Protokoll für die Isolation aus den Zellen einer 3-cm-Platte aufgeführt.

Zu Beginn mussten die Dynabeads gewaschen werden. Dazu wurden 150 µl der Dynabeadslösung (30 µl) in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß für 30 Sekunden in den Magnetständer gestellt. Der Überstand wurde abgenommen, die Beads in 500 µl 2 x Bindepuffer (100 µl) resuspendiert, das Gefäß in den Ständer gestellt, erneut der Überstand entfernt und die Dynabeads in 500 µl 2 x Bindepuffer (100 µl) aufgenommen.

Der Zellrasen wurde mit 10 ml (1 ml) kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen abgekratzt und im gleichen Volumen resuspendiert. Die Zellen wurden in einem 14-ml-Reaktionsgefäß in der Multifuge 1S-R bei 2500 UpM und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert (Tischzentrifuge, max rpm, 30 Sekunden), das Pellet in 500 µl Lysispuffer (100 µl) aufgenommen, in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und für 1 Minute auf Eis inkubiert. Bei dem nachfolgenden Zentrifugationsschritt in der Tischzentrifuge für 30 Sekunden wurden bei maximaler Geschwindigkeit die unlöslichen Zellbestandteile pelletiert und der Überstand in das Reaktionsgefäß mit den gewaschenen Dynabeads überführt. Während der fünfminütigen Inkubationsdauer bei Raumtemperatur banden die RNAs an die Beads und konnten bei den beiden folgenden Waschschritten mit 1 ml (200 µl) Waschpuffer gereinigt werden. Anschließend wurden die Dynabeads in 10 µl (6 µl) EDTA-Lösung aufgenommen, die Ansätze für 2 Minuten bei 65°C inkubiert und sofort in den Magnetständer gestellt. Der Überstand enthielt nun die RNA-Moleküle und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zum Schutz vor RNasen wurde 1 µl RNasin (0,5 µl) zugegeben.

3.2.4 RNA-Analyse

3.2.4.1 Agarosegelelektrophorese zur Analyse von *In-vitro*-Transkripten

Zur qualitativen Analyse transkribierter RNA wurde 1 µg des Reaktionsprodukts mit RNA-Proben-Färbe-Lösung (DNA-Proben-Färbe-Lösung mit 0,1 % [w/v] SDS) versetzt und auf ein 0,8 x TBE/ 0,1 % [w/v] SDS-Agarosegel (6 x 10 cm) aufgetragen. Die Elektrophorese fand bei 80 V für circa 150 Minuten statt.

3.2.4.2 Northern Blot

Der Transfer von RNA-Molekülen aus einem Gel auf eine Membran wird Northern Blot genannt. In der vorliegenden Arbeit wurden diese hauptsächlich zur Analyse der viralen RNA-Synthese des humanen Coronavirus 229E durchgeführt.

Die zu untersuchenden RNA-Lösungen wurden zunächst in drei Volumenteilen

Denaturierungslösung bei 65°C inkubiert, bevor sie mit 1 µl Northernproben-Färbe-Lösung auf das formaldehydhaltige Agarosegel aufgetragen wurden. Die Elektrophorese fand für 17 Stunden bei 25 V unter ständiger Laufpufferzirkulation mittels einer Pumpe statt.

Anschließend wurde das Gel durch jeweils 30 minütiges Schwenken in 250 ml Northernlösung 1, Northernlösung 2 bzw. Northernlösung 3 auf den eigentlichen Transfer vorbereitet. Die weitere Vorgehensweise ist prinzipiell identisch mit der unter Kapitel 3.1.4.2 beschriebenen. In diesem Fall wurde jedoch für die Herstellung der Sonde eine DNA verwendet, die dem 3' nichttranslatierten Bereich des HCoV-229E entspricht (PCR: Oli180 – TNI24,3Kdown; HCoV-229E nts 26857-27235).

3.2.5 Bestimmung der 5'Enden von RNA-Molekülen

Die Bestimmung 5'Enden von RNA-Molekülen wurden mittels des FirstChoice® RLM-Race-Kits nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.3 Proteine

3.3.1 In-vitro-Translation

In-vitro-Translationsprodukte wurden mittels des Rabbit Reticulocyte Lysate Systems hergestellt. Ein Reaktionsansatz von 25 µl enthält:

3	µl	<i>in vitro</i> transkribierte RNA (1 µg/ µl)
2	µl	12,5 x Translationspuffer (ohne Methionin)
1	µl	2,5 M Kaliumacetat
0,5	µl	25 mM Magnesiumacetat
2	µl	L-[³⁵ S]-Methionin
6,5	µl	H ₂ O
10	µl	<i>rabbit reticulocyte lysate</i>

Die Reaktion fand für eine Stunde bei 37°C statt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz bei – 20°C gelagert.

3.3.2 Proteinelektrophorese im Polyacrylamidgel

Zur Analyse von Proteinen wurden SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli (Laemmli 1970) verwendet. Die Gellösungen wurden nach dem in der folgenden Tabelle gezeigten Protokoll vorbereitet.

Komponente	Sammelgel	Trenngel (17,4 %)
30 % [w/v] Acrylamid (ml)	0,58	6,8
2,5 % [w/v] Bisacrylamid (ml)	0,22	0,5
1 M Tris-HCl pH 8.8 (ml)	-	4,48
1 M Tris-HCl pH 6.8 (ml)	0,42	-
10 % [w/v] SDS (μ l)	34	140
H ₂ O (ml)	2,12	-
10 % [w/v] APS (μ l)	17	40
TEMED (μ l)	2	4

Diese Mischungen wurden für 12 x 10 cm große Gele verwendet. Als Laufpuffer wurde Tris-Glycin-Puffer verwendet. Proteinproben wurden mit 6 Volumen Proteinprobenpuffer (2 x) vermischt und für 2 Minuten bei 95°C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte in einer vertikalen Elektrophoresekammer mit einer Stromstärke von 35 mA in einem 1-mm-dicken Gel. Die Gele wurden zur Anfärbung der Proteine mit Coomassie-Lösung (2 Stunden) und Entfärbelösung (übernacht) behandelt. Die Gele wurden anschließend auf Filterpapier überführt und unter Vakuum bei 80°C getrocknet.

3.4 Bakterien

3.4.1 Kulturen

Die verwendeten *E. coli* TOP10F' wurden in LB-Medium bzw. LB-Agarplatten LB-Medium kultiviert. Falls erforderlich, wurde Ampicillin hinzugegeben (Endkonzentration 100 μ g/ml).

3.4.2 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen (Dagert & Ehrlich 1979)

400 ml LB-Medium wurde mit 400 μ l einer Übernachtskultur *E. coli* TOP10F' beimpft. Die Bakterien wurden bis zu einer OD₅₉₀ von 0,374 kultiviert und anschließend abzentrifugiert (20 Minuten, 6000 UpM, 4°C, Multifuge 1S-R), Das Bakterienpellet wurde in 40 ml kalter, steriler CaCl₂-Lösung suspendiert und dann erneut zentrifugiert (10 min, 3000 UpM, 4°C, Multifuge 1S-R). Anschließend wurde das Pellet erneut in CaCl₂-Lösung resuspendiert. Die Suspension wurde

für 30 Minuten auf Eis inkubiert and anschließend in der Multifuge 1S-R zentrifugiert (10 Minuten, 4°C, 3000 UpM). Das erhaltene Bakterienpellet wurde in 10 ml CaCl₂-Lösung aufgenommen und in 200-µl-Portionen aufgeteilt. Diese Aliquots wurden auf Trockeneis eingefroren und bis zur ihrer Verwendung bei –80°C gelagert.

3.4.3 Transformation

Kompetente *E. coli*-TOP10F'-Zellen wurden mit Plasmiden, die eine Ampicillinresistenz vermittelten, transformiert. Hierzu wurde die Plasmid-DNA (maximal 20 µl) zu 200 µl Bakterien gegeben und der Ansatz für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42°C und eine erneute Inkubation auf Eis für 2 Minuten. Dann wurde 1 ml ampicillinfreies LB-Medium zugegeben und die Kultur für 50 Minuten bei 37°C im Schüttler bebrütet. Die Zellen wurden anschließend kurz abzentrifugiert und der Überstand (bis auf einen Rest von etwa 100-200 µl) abgenommen. Die Zellen wurden im verbliebenen Medium resuspendiert, auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausplattiert und anschließend bei 37°C inkubiert.

3.4.4 Mutagenese durch rekombinierbare DNA-Fragmente (Yao et al., 1992)

Beim Verfahren der PCR/ In-vivo-Rekombinations-Mutagenese nutzt man die Fähigkeit von *E. coli* zur homologen Rekombination. Hierbei werden *E.-coli*-Zellen mit linearen DNA-Fragmenten, die an ihren Enden überlappende Sequenzen besitzen, transformiert. Die DNA-Fragmente bilden in ihrer Gesamtheit ein replizierbares Plasmid. Kommt es in der *E.-coli*-Zelle zu einer homologen Rekombination zwischen den eingebrachten DNA-Fragmenten, wird eine zirkuläre Plasmid-DNA rekonstituiert, die repliziert werden kann und eine Ampicillinresistenz vermittelt, auf die anschließend selektiert werden kann, um rekombinante Klone zu isolieren. Bei den für die Transformation verwendeten DNA-Fragmenten handelte es sich meist um PCR-Produkte, die in einem (oder beiden) ihrer Randbereiche Mutationen trugen, die zuvor durch geeignete PCR-Primer eingebracht wurden. Als Matrize für diese PCR-Ansätze diente eine geeignete Plasmid-DNA (siehe 3.1.1.1), die anschließend mittels DpnI in zahlreiche Fragmente gespalten wurde. Ein Aliquot dieses Restriktionsansatzes wurde in kompetente Zellen transformiert (siehe 3.4.3) und Klone mit rekonstituierten –jetzt jedoch ortsspezifisch mutagenisierten– Plasmiden wurden auf ampicillinhaltigen LB-Medien selektiert. Die Sequenzen der mutagenisierten Plasmide wurden mittels DNA-Sequenzierung überprüft.

3.5 Eukaryontische Zellen

3.5.1 Standardmethoden

3.5.1.1 Kulturen

Säugerzellen wurden in der Regel bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Eine Ausnahme bildeten Zellen, die mit dem HCoV-229E infiziert wurden. Aufgrund der Instabilität der Virionen wurden HCoV-infizierte Zellen bei 33°C kultiviert.

3.5.1.2 Einfrieren von Zellen

Die Zellen aus einer 800-ml-Gewebekulturflasche wurden, wie in Kapitel 3.5.1.4 beschrieben, abgelöst und pelletiert (Multifuge 1S-R, 1000 UpM, 2 Minuten). Das Zellpellet wurde in 2 ml FCS/ 10 % DMSO resuspendiert und auf zwei kältestabile Ampullen verteilt. Diese wurden in Styroporbehältnisse gesteckt und zunächst bei –70°C eingefroren, bevor sie am folgenden Tag in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

3.5.1.3 Auftauen von Zellen

Eine in flüssigem Stickstoff gelagerte Ampulle wurde im Wasserbad erwärmt. Sobald die Zellsuspension vollständig aufgetaut war, wurde der Inhalt der Ampulle in eine Gewebekulturflasche, die mit der doppelten Menge des üblichen Volumens Medium gefüllt war, gegeben. Am nächsten Tag wurde dann das Medium gewechselt.

3.5.1.4 Ablösen und Aussäen von Zellen

Zunächst wurde das Medium von den konfluent gewachsenen Zellen vollständig abgenommen. Der Zellrasen wurde anschließend mit etwas ATV abgespült. Das ATV wurde entfernt und durch gerade soviel ATV ersetzt, dass der Boden des Gefäßes vollständig bedeckt war. Sobald sich die Zellen abgelöst hatten, wurden diese in neue Zellkulturgefäße verteilt und frisches Medium hinzugegeben.

3.5.1.5 Auszählen von Zellen

Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Kammer bestimmt. Hierbei wird auf die Kammer ein Deckglas gelegt und ein Tropfen einer Zellsuspension seitlich an den Rand des Deckgläschens gegeben, wodurch die Suspension in den Spalt zwischen der Zählkammer und dem Deckgläschen gezogen wird. In die Zählkammer waren neun Quadrate eingraviert, auf denen sich die Zellen befanden. Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden die Zellen mehrerer 1-mm²-

Quadrate unter dem Mikroskop gezählt und der arithmetische Mittelwert bestimmt. Die exakte Zellzahl pro Milliliter Ausgangszellsuspension wurde aus dem Produkt des Mittelwertes und des Kammerfaktors (10.000) berechnet. Durch entsprechende Verdünnung mit Medium wurde dann die gewünschte Zellzahl pro Volumeneinheit eingestellt.

3.5.2 Transfektion von RNA und DNA in Säugerzellen

3.5.2.1 Chemische Transfektion

Je 5×10^5 CV-1-Zellen wurden in die Näpfe einer 6-Loch-Platte ausgesät und am folgenden Tag mit dem für das entsprechende Experiment geeigneten Vacciniavirus infiziert (*multiplicity of infection* [moi] = 1). Eine Stunde nach der Infektion wurden 12 µl Lipofectin mit 200 µl Optimem® für eine Dreiviertelstunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend weitere 200 µl Optimem® mit ca. 1 µg Plasmid-DNA hinzugefügt. Zwei Stunden nach der Virusinfektion wurde das Infektionsmedium durch das DNA-Lipofektin-Optimem®-Gemisch ersetzt und weitere 400 µl Optimem® hinzugegeben. Sechs Stunden nach der Infektion wurde der Transfektionsüberstand durch Kompletmedium ersetzt. Drei Tage nach der Infektion/Transfektion wurden die Zellen abgekratzt und in einem Milliliter Kompletmedium aufgenommen. Dieser sog. Transfektionsstock wurde abschließend mehrfach schockgefroren und aufgetaut, um intrazelluläres und zellassoziertes Vacciniavirus freizusetzen.

3.5.2.2 Physikalische Transfektion (Elektroporation)

Diese Methode der Transfektion wurde zum Einbringen von *in vitro* synthetisierten HCoV-229E-RNAs genomischer Länge verwendet. Ein Tag vor der Transfektion wurde dem Zellkulturmedium von BHK-HCoV-N-Zellen, die in einer 800-ml-Gewebekulturflasche gehalten wurden, Doxycyclin in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben. Sechs Stunden später wurden die BHK-HCoV-N-Zellen abgelöst (siehe Kapitel 3.5.1.4). Die erhaltene Zellsuspension wurde mit eiskaltem PBS auf 50 ml aufgefüllt und abzentrifugiert (3 min, 1000 UpM, 4°C, Multifuge 1S-R). Das Pellet wurde in 50 ml eiskaltem PBS aufgenommen und nochmals zentrifugiert. Währenddessen wurde 15 µg der zu transfizierenden RNA in eine auf Eis gelagerte Elektroporationsküvette pipettiert. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet (ca. $1-2 \times 10^7$ Zellen) in 800 µl kaltem PBS aufgenommen und in die Küvette überführt. Die Elektroporation erfolgte durch 2 Pulse bei 330 V, 1000 µF und 70 Ω. Nach kurzer Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit einer Pasteurpipette aus der Küvette entnommen und in eine 10-cm-Zellkulturschale mit bereits vorgelegtem Kompletmedium, das 1 µg/ml Doxycyclin enthielt, gegeben. Die

Schale wurde anschließend für 24 Stunden bei 37°C inkubiert und nach einem Mediumwechsel mit Kompletmedium, das 1 µg/ml Doxycyclin enthielt, bei 33°C kultiviert. Drei Tage nach der Transfektion wurden die polyadenylierte RNA aus den Zellen, wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben isoliert und mittels Northern Blotting (siehe 3.2.4.2) ausgewertet.

3.5.3 Replikonzellen

Hierbei handelt es sich um Zellen, in denen, unter entsprechendem Selektionsdruck, eine HCoV-229E-RNA subgenomischer Länge –die man als Replikon oder auch autonom replizierende RNA bezeichnet– stabil repliziert. Diese RNA kodiert alle für ihre eigene Replikation und Transkription erforderlichen Proteinfunktionen und enthält zusätzlich ein Neomycin-Resistenzgen, das eine Geneticin-Selektion erlaubt, sowie ein *gfp*-Reporter-gen. Um diese Replikonzellen zu erzeugen, wurden 15 µg der entsprechenden *in vitro* transkribierten HCoV-229E-Replikon-RNA (Rep-1) sowie 10 µg einer *in vitro* transkribierten RNA, die das HCoV-229E-N-Protein kodiert, in BHK-21-Zellen co-transfiziert. Die Vorgehensweise entsprach exakt der unter 3.5.2.2 beschriebenen Methodik. Die spätere Kultur und Selektion von "Replikonzellen" erfolgte in Kompletmedium mit 400 µg Geneticin pro Milliliter Medium. Der Nachweis einer Replikon-vermittelten Transkription erfolgte durch die Expression des GFP-Proteins. Die entsprechende grüne Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Leica Leitz DM IL) nachgewiesen.

.

3.6 Viren

3.6.1 Vacciniaviren

3.6.1.1 Aufreinigung rekombinanter Vacciniaviren

Genomische DNA von rekombinanten Vacciniaviren, die eine komplette oder nahezu komplette cDNA-Kopie des HCoV-229E-Genoms (bzw. davon abgeleiteter mutierten Formen) enthielten, diente als Matrize zur Herstellung entsprechender HCoV-229E-RNAs genomischer bzw. subgenomischer Länge mittels *In-vitro*-Transkription. Um ausreichende Mengen gereinigter genomischer DNA für die Transkription zu erhalten, mussten zunächst die entsprechenden Viren aufgereinigt werden. Zu diesem Zweck wurden 12 große Glasflaschen ("Ruf-Flaschen"), die dicht mit BHK-21 bewachsen waren, mit dem entsprechenden Vacciniavirus infiziert. Sobald der beobachtete zytopathische Effekt den gesamten Zellrasen erfaßt hatte, wurden die Glasflaschen bei -20°C eingefroren. Beim Auftauen löste sich dann der Zellrasen vom Gefäßboden. Der gesamte Inhalt der Flaschen wurde in 500-ml-Zentrifugenbecher überführt und abzentrifugiert

(15 min, 7000 UpM, GSA-Rotor). Der erhaltene Überstand wurde verworfen und das Pellet in 12 ml 10 mM Tris-HCl/ 1 mM EDTA (pH 7,0) resuspendiert. Diese Suspension wurde dreimal auf Trockeneis eingeforen und wieder aufgetaut, bevor sie einer zweiminütigen Behandlung im Ultraschallbad unterzogen wurde. Anschließend wurden die auf Eis gelagerten Zellen mittels eines Glas-Homogenisators (*douncer*) weiter aufgeschlossen. Hierbei wurde die Zellsuspension dreißigmal hintereinander durch den engen Zwischenraum, der zwischen dem Glasstempel und der ihn umgebenden Röhrchenwand bestand, vorsichtig hindurchgepreßt. Bei der anschließenden Zentrifugation (Multifuge 1S-R, 3 min, 2000 UpM, 4°C) wurden Inhaltsstoffe der Suspension, deren spezifisches Gewicht über dem der Vacciniaviruspartikel lag, pelletiert. Der erhaltene Überstand wurde auf eine konzentrierte Saccharoselösung (16 ml, 30 % [w/w]) pipettiert und in der Ultrazentrifuge für 80 Minuten zentrifugiert (14000 UpM, Rotor Surespin33, 4 °C). Da das spezifische Gewicht von Vacciniaviren zwischen dem einer 32 %-igen und einer 36 %-igen Saccharoselösung liegt, wurden unter diesen Bedingungen die Vacciniaviruspartikel pelletiert, während Bestandteile geringerer Dichte im Überstand verblieben, der anschließend verworfen wurde. Das Pellet wurde in einem Gemisch aus 4,5 ml 10 mM Tris-HCl/ 1 mM EDTA (pH 7,0) und 0,5 ml einer 0,25 %-igen Trypsinlösung resuspendiert und für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung auf einen tags zuvor hergestellten und bei 4°C über Nacht gelagerten Saccharosegradienten (24 %, 28 %, 32 %, 36 %, 40 % Saccharose [w/w]), gegeben. Nach der Zentrifugation in der Ultrazentrifuge (12.000 UpM, 45 Minuten, Surespin33-Rotor, 4 °C) wurden ein bis zwei dünne weiße Banden mit vacciniaviralen Partikeln sichtbar, die vorsichtig isoliert wurden. Falls ein Pellet vorhanden war, wurde dieses mit dem oben beschriebenen Gemisch aus 4,5 ml 10 mM Tris-HCl/ 1 mM EDTA (pH 7,0) und 0,5 ml einer 0,25 %-igen Trypsinlösung resuspendiert und einer nochmaligen Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Die isolierte Vacciniavirussuspension wurden mit einem äquivalenten Volumen 10 mM Tris-HCl/ 1 mM EDTA (pH 7,0) durchmischt und in der Ultrazentrifuge pelletiert (80 Minuten, 14000 UpM, Rotor Surespin33, 4 °C). Das pelletierte konzentrierte Vacciniavirus wurde in 1 ml 10 mM Tris-HCl/ 1 mM EDTA (pH 7,0) resuspendiert und in 5 Portionen zu je 200 µl bei -20°C eingefroren.

3.6.1.2 Titerbestimmung

Zur Bestimmung des Vacciniavirus-Titers (angegeben in *plaque-forming units*, pfu, pro Milliliter) wurden CV-1-Zellen in die Näpfe einer 6-Loch-Platte ausgesät und 2 Tage später mit einer Verdünnungsreihe einer Vaccinia-Virus-Lösung infiziert. Zwei Stunden nach der Infektion wurde das Medium abgenommen und einige Tropfen Kristallviolett (1 % [w/v] in Ethanol) auf

den Zellrasen gegeben. Nach 5 Minuten wurde die Kristallviolettlösung entfernt und die Platte für weitere 5 Minuten an der Luft getrocknet. Die Plaques konnten nun einfach identifiziert und ausgezählt werden. Der Virustiter wurde aus der Anzahl der Plaques und der jeweiligen Verdünnungsstufe errechnet.

3.6.1.3 Selektion

In der vorliegenden Arbeit wurde das *gpt*-Gen von *E. coli* als Selektionsmarker zur Isolierung rekombinanter Vacciniaviren verwendet. Das Gen kodiert die Guanin-Phosphoribosyltransferase und kann sowohl zur Positiv- als auch zur Negativselektion verwendet werden (Kerr & Smith 1991).

3.6.1.3.1 Positivselektion

Zunächst wurde das *gpt*-Gen in die Nähe der zu mutagenisierenden Region auf der coronaviralen cDNA eingebracht. Dies erfolgte mittels vacciniavirusvermittelter homologer Rekombination. Die dabei erhaltenen rekombinanten Vacciniaviren wurden als "Zwischenklone" bezeichnet. Zur Erzeugung dieser Zwischenklone wurden CV-1-Zellen in die Vertiefungen von 6-Loch-Platten – wie im Abschnitt 3.5.1.4 beschrieben – ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen Selektionsmedium ausgetauscht, das 250 µg/ml Xanthin, 15 µg/ml Hypoxanthin und 25 µg/ml Mycophenolsäure enthielt. Am darauffolgenden Tag wurde das Selektionsmedium erneuert, und die Zellen wurden mit vHCoV-inf-1 infiziert und einem Plasmid transfiziert, das das *gpt*-Gen – flankiert von geeigneten HCoV-229E-cDNA-Sequenzen – enthielt. Der Transfektionsansatz (der als "Transfektionsstock" bezeichnet wurde) wurde nach 3 Tagen abgenommen und anschließend mehreren Plaquereinigungen in Gegenwart des Selektionsmediums unterzogen. In der ersten Runde der Plaquereinigung wurden unterschiedliche Verdünnungen (10^{-1} bis 10^{-3}) des Transfektionsstocks zur Infektion eingesetzt, bei allen nachfolgenden Runden wurde ca. $\frac{1}{4}$ des Volumens, in dem der jeweilige "gepickte" Plaque suspendiert worden war, eingesetzt. Zwei bis drei Tage nach der Infektion konnten die Virus-Plaques im Zellrasen deutlich unter dem Mikroskop erkannt werden. Sie wurden durch einen Kreis markiert und anschließend isoliert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen im angezeichneten Hof vorsichtig mit der Pipettenspitze abgekratzt und in 100 µl Medium aufgenommen. Bevor diese virusinfizierten Zellen für eine neue Runde der Plaquereinigung eingesetzt wurden, wurde die Suspension dreimal auf Trockeneis eingefroren und anschließend aufgetaut. Anschließend erfolgte noch eine zweiminütige Behandlung im Ultraschallbad. Die Anzahl der Plaquereinigungen belief sich auf bis zu 10 Runden.

3.6.1.3.2 Negativselektion

Sogenannte "Endklone", also rekombinante Vacciniaviren, bei denen das im Zwischenklon vorhandene *gpt*-Gen wieder entfernt und durch die gewünschte HCoV-229E-Sequenz ersetzt wurde, wurden durch *gpt*-Negativselektion isoliert. Zu diesem Zweck wurden D980R-Zellen in die Näpfe einer 6-Loch-Platte ausgesät, und am folgenden Tag wurde Selektionsmedium, das 6-TG (1 µg/ ml Endkonzentration) enthielt, zugegeben. In diesem Medium wurden die Zellen am nächsten Tag infiziert. In der ersten Runde der Plaquereinigung wurden unterschiedliche Verdünnungen (10^{-1} bis 10^{-3}) des Transfektionsstocks zur Infektion eingesetzt, bei allen anderen Runden ca. $\frac{1}{4}$ des Volumens, in dem die Zellen des gepickten Plaques aufgenommen worden waren. Circa 3 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen mit Agarose (Selektionsmedium mit 1 % [w/v] L.M.P.-Agarose) überschichtet. 3 Stunden nach der Infektion konnten einzelne Plaques identifiziert und isoliert werden. Dabei wurden mit einer Pipettenspitze die Zellen eines Plaques abgekratzt ("gepickt") und anschließend in ca. 100 µl Medium mehrmals auf und ab pipettiert. Bevor mit dieser virushaltigen Lösung eine neue Runde der Plaquereinigung durchgeführt werden konnte, wurde sie je dreimal auf Trockeneis eingefroren und wieder aufgetaut und anschließend einer zweiminütigen Ultraschallbadbehandlung unterzogen. Für eine zweifelsfreie Isolierung vacciniaviraler Einzelklone waren bei der Negativselektion maximal drei Plaquereinigungen erforderlich.

3.6.2 HCoV-229E

3.6.2.1 TCID₅₀-Wert-Bestimmung

Der HCoV-229E-Titer (Anzahl infektiöser HCoV-229E-Partikel pro Volumeneinheit) wurde über die Bestimmung der TCID₅₀/ ml ermittelt. Hierfür wurden MRC5-Zellen aus einer 800 ml Zellkulturflasche –wie in Kapitel 3.5.1.4 beschrieben– abgelöst und in 50 ml Medium aufgenommen. Mit diesem Volumen konnten Zellen in fünf 96-Loch-Titrationsplatten ausgesät werden (100 µl/ Napf). Am folgenden Tag wurden die Zellen mit jeweils 100 µl virushaltigen Mediums einer bestimmten Verdünnungsstufe infiziert. Der TCID₅₀-Wert (engl.: 50 % tissue culture infectious dose) ist definiert als die Verdünnungsstufe einer Virussuspension, in der mit 50 %-iger Wahrscheinlichkeit ein infektiöses Viruspartikel vorhanden ist. Aus dem prozentualen Anteil infizierter Näpfe bei einer bestimmten Verdünnungsstufe kann dann die Zahl infektiöser Viruspartikel in der Ausgangslösung errechnet werden (infektiöse Viruspartikel pro Milliliter).

Die Berechnung des TCID₅₀-Wert ergibt sich wie folgt:

$$\begin{aligned} \text{TCID}_{50} &= 10^{-A} \\ -\log \text{TCID}_{50} &= A \\ A &= E + (M^{>50} - 50) / (M^{>50} - M^{<50}) \end{aligned}$$

Wobei:

- E = Betrag des Exponenten der Verdünnung von M^{>50}
- M^{>50} = Mortalitätsrate M in % aus der niedrigsten Verdünnungsstufe, bei der der Betrag von M einen Wert größer als 50 annimmt.
- M^{<50} = Mortalitätsrate M in % aus der niedrigsten Verdünnungsstufe, bei der der Betrag von M einen Wert kleiner als 50 annimmt.
- M = Quotient aus Σd und der Summe von Σd und Σa .
- Σd = Summe der Vertiefungen mit CPE aus einer bestimmten Verdünnungsstufe und den Näpfen mit CPE aus den höheren Verdünnungsstufen.
- Σa = Summe der Vertiefungen ohne CPE aus einer bestimmten Verdünnungsstufe und den Näpfen ohne CPE aus den niedrigeren Verdünnungsstufen

Womit sich der Virustiter (infektiöse Viruspartikel/ Volumen) aus

$$\begin{aligned} \text{Titer} &= \text{TCID}_{50}^{-1} \text{ infektiöse Partikel/ } 100 \mu\text{l} \\ &\text{bzw.} \\ \text{Titer} &= 10 \times \text{TCID}_{50}^{-1} \text{ infektiöse Partikel/ } 1 \text{ ml} \end{aligned}$$

ergibt.

3.7 Verfahren zur Herstellung von HCoV-229E-Mutanten

3.7.1 Überblick

Wie bereits weiter oben dargestellt, basierte die in dieser Arbeit verwandte Methode zur Herstellung mutierter (= rekombinanter) Formen von HCoV-229E im wesentlichen auf der genetischen Manipulation eines Vacciniavirus, vHCoV-inf-1 (Thiel et al., 2001a), in dessen

Genom Dr. Volker Thiel vor einigen Jahren eine komplette cDNA-Kopie des Genoms von HCoV-229E (flankiert von zwei Restriktionsspaltstellen) eingesetzt hatte. Dieses spezielle Vacciniavirus wurde als Vektor zur Vervielfältigung der coronaviralen cDNA eingesetzt. Darüber hinaus wurde es genutzt, um durch Techniken der homologen Rekombination gezielte Mutationen in die klonierte HCoV-229E-cDNA einzuführen. Am 5'-Ende der in vHCoV-inf-1 klonierten HCoV-229E-cDNA-Sequenz befand sich ein T7-Promotor, der benötigt wurde, um *in vitro* –mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase– HCoV-229E-RNA genomischer Länge zu synthetisieren. Um die für diese *In-vitro*-Transkription benötigte vacciniavirale DNA-Matrize in ausreichender Reinheit und Menge zu gewinnen, musste die Vacciniavirus-DNA aus vHCoV-inf-1-infizierten Zellen aufgereinigt und anschließend an ihrem 3'-Ende mit einer geeigneten Endonuklease gespalten werden, um eine *in vitro* transkribierte HCoV-229E-RNA mit exakt definierten 3'-Ende zu erhalten. Diese RNA wurde dann in Zellen transfiziert und initiierte dort einen kompletten Replikationszyklus der zur Freisetzung infektiöser Coronaviren führte, die anschließend näher charakterisiert werden konnten. Zur Herstellung mutierter Formen der HCoV-229E-RNA wurde die in vHCoV-inf-1 klonierte HCoV-229E-cDNA gezielt manipuliert, wobei Verfahren der homologen Rekombination zur Anwendung kamen. Dieses Mutageneseverfahren bestand im wesentlichen aus 5 Schritten:

- (1) Herstellung geeigneter DNA-Moleküle für die vacciniavirusvermittelte, homologe Rekombination,
- (2) Erzeugung eines *gpt*-tragenden Vacciniavirus-Zwischenklons,
- (3) Erzeugung des Vacciniavirus-Endklons und Aufreinigung der genomischen DNA,
- (4) Synthese der HCoV-229E-RNA,
- (5) Erzeugung eines rekombinanten HCoV-229E aus der *in vitro* transkribierten HCoV-229E-RNA.

Die Vorgehensweise zur Herstellung einer HCoV-229E-Mutante soll weiter unten an einem ausgewählten Projekt exemplarisch dargestellt werden. Für die Planung all dieser Projekte waren jedoch –ganz allgemein– eine Reihe von Aspekten und Limitierungen des Systems zu berücksichtigen. Zum einen sind hier die Restriktionsschnittstellen *Cl*I und *Eag*I zu nennen, die bei am 3'-Ende der HCoV-229E-cDNA vorhanden waren. Die Spaltung mit einem dieser Enzyme musste im Schritt 4 des Verfahrens die korrekte Termination der Transkription sicherstellen. Dies war nötig, da das Hepatitis- δ -Ribozym, das 3'-terminal zu den beiden erwähnten Schnittstellen eingesetzt worden war, keine hundertprozentige Spaltung an dieser Stelle gewährleistete (persönliche Information von Dr. Volker Thiel), und es konnte daher nicht

ausgeschlossen werden, dass eventuell verbliebene 3'-Sequenzen einen Einfluss auf die Ergebnisse des geplanten Experiments haben würden. Zum anderen darf die in Schritt 3 einzubringende heterologe Sequenz keine größeren Sequenzähnlichkeiten mit HCoV-229E oder Vacciniavirus aufweisen, um unerwünschte –also nichthomologe– Rekombinationsereignisse weitgehend auszuschließen. Die Länge der DNA-Abschnitte, an denen die angestrebte homologe Rekombination zwischen eingebrachter Plasmid-DNA bzw. PCR-Produkt und dem vacciniaviralen Genom stattfinden sollte, betrug in der Regel 700 bis 1000 bp. Falls erforderlich, konnten diese Bereiche jedoch auf weniger als 300 bp reduziert werden, ohne deren Funktionsfähigkeit bei der homologen Rekombination zu verlieren.

Projektabhängige Aspekte:

Falls in der Nachbarschaft eines zu untersuchenden Sequenzabschnitts eventuell später noch andere Veränderungen eingebracht werden sollten, so war es von Vorteil, wenn beim Einbringen des *gpt*-Gens in den Zwischenklon jene später relevanten Bereiche deletiert wurden. So konnte ein einziger Zwischenklon dann als Vorläufer für eine Vielzahl von Endklonen dienen. Der Preis für diese Strategie war jedoch, dass für die nachfolgende zweite Vacciniavirus-Rekombination (*gpt*-Negativselektion) relativ große DNA-Moleküle erzeugt und sequenziert werden mussten.

3.7.2 Herstellung geeigneter DNA-Moleküle für die homologe Rekombination mit Vacciniaviren

Für die Erzeugung des Vacciniavirus-Zwischenklons vRec8 wurde das Plasmid pGPT-1 (Hertzig et al., 2004) ausgewählt. Das *gpt*-Gen flankierend wurden die beiden PCR-Produkte Flanke1 (Primerpaar TH1 [AAAGAATTCTGTTATGCAAATGGACATCCAGGGT] + TH2 [AAACTGCAGCGTCTCGTTTGCAAATGGAGTCGTTCTCAA], entspricht HCoV-229E nts 10387-11180) und Flanke2 (Primerpaar TH3 [AAAGGATCCCGTCTCGCAGAACAATGAAATAATGCCGGGC] + TH4 [AAATCTAGATCTGTACCATTACAGGGCTCTAGT], entspricht HCoV-229E nts 11761-12569) über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und PstI bzw. BamHI und XbaI in das Plasmid eingesetzt. Das konstruierte Plasmid erhielt den Namen pRec8.

Zur Erzeugung des Endklons wurde mit den Primern mut229nsp6_down (TCAGTTTGGACTGTACAGTAGAACTTTAATGG) und mut229nsp10_up (TCGTCTACAAGCTGGCAAACAGACTGAGTTT) eine PCR durchgeführt. Als Matrize diente pRec8. Das erhaltene PCR-Produkt enthielt somit die komplette Vektorsequenz, flankiert von den HCoV-229E nts 10387-10930 und HCoV-229E nts 12092-12569. Zusätzlich wurden über die beiden Primer mut229nsp6_down und mut229nsp10_up jeweils 10 Nukleotide von HCoV-NL63 an die Termini des PCR-Produktes eingeführt. Diese 10 Nukleotide entsprachen

den HCoV-NL63 nts 10850-10859 bzw. 12001-12010. Im Anschluß zur PCR-Reaktion wurde dem Reaktionsansatz das Restriktionsenzym DpnI zugegeben, um die Matrize aus dem Ansatz zu entfernen.

Es wurde ein zweites PCR-Produkt mit dem Primerpaar mutNL63nsp7_up (TACTGTACAGTCCAAACTGACTGATTTGAAGTG) und mutNL63nsp9_down (GTTTGCCAGCTTGTAGACGAATTGTGGCAC) mit einer HCoV-NL63-cDNA als Matrize generiert, welches die HCoV-NL63 nts 10850-12010 enthielt. Durch die beiden verwendeten Primer wurden an die Termini des PCR-Produktes zusätzlich jeweils 10 Nukleotide von HCoV-229E angehängt (HCoV-229E nts 10921-10930 bzw. 12092-12101). Man beachte, dass die 20 terminalen Nukleotide eines PCR-Produktes jeweils homolog sind zu den 20 terminalen Nukleotiden des anderen PCR-Produktes und den korrekten Übergang zwischen nsp6 von HCoV-229E und nsp7 von HCoV-NL63 bzw. nsp9 von HCoV-NL63 und nsp10 von HCoV-229E enthalten. Die beiden beschriebenen PCR-Produkte wurden in einen Transformationsansatz von *E. coli* TOP10F' gegeben. Anschließend wurde ein Klon identifiziert, bei dem eine Rekombination zwischen den homologen Enden der beiden PCR-Produkte zu einem zirkulären Molekül stattgefunden hatte. Das dabei entstandene Plasmid wurde pNsp7-9NL genannt.

3.7.3 Erzeugung eines *gpt*-tragenden Vacciniavirus-Zwischenklons

Es wurden CV-1-Zellen mit dem Vacciniavirus vHCoV-inf-1 infiziert und mit dem Plasmid pRec8 transfiziert. Repliziert das Vacciniavirus vHCoV-inf-1 in Gegenwart des Plasmids pRec8, kann es zur Rekombination zwischen homologen Abschnitten der beiden DNA-Moleküle kommen. Kommt es zu einem Doppel-Crossover, so wird das *gpt*-Gen in das Genom von vHCoV-inf-1 integriert und gleichzeitig ein HCoV-229E-Sequenzbereich deletiert, der von der Wahl der HCoV-229E-Flanken im pRec8-Plasmid vorgegebenen war. In der nachfolgenden *gpt*-Positivselektion werden dann diese *gpt*-tragenden Vacciniaviren selektiert. Nach mehreren aufeinanderfolgenden Plaquereinigungen wurden dann CV-1-Zellen, die in die Näpfe einer 6-Loch-Platte ausgesät worden waren, mit verschiedenen plaquegereinigten *gpt*-positiven Vacciniavirus-Klonen infiziert und anschließend DNA aus diesen Zellen isoliert. Diese DNA wurde zum einen für die Durchführung eines Southernblots verwendet und zum anderen für die Sequenzierung des vollständigen Rekombinationsbereiches nach dessen Amplifikation mittels PCR. Darüber hinaus wurde eine sogenannte diagnostische PCR durchgeführt, die spezifisch für das Ausgangsvirus (vHCoV-inf-1) war und dessen etwaige Präsenz möglichst ausschließen sollte. Der Vacciniavirus-Klon vRec8 erfüllte bei allen drei Verfahren die gewünschten Kriterien:

(1) er zeigte im Southernblot das erwartete spezifische Bandenmuster (siehe Abbildung 3.01), trug keine unerwünschten Mutationen im Rekombinationsbereich, und eine eventuelle Verunreinigung mit dem Ausgangsvirus konnte durch eine negative PCR weitgehend ausgeschlossen werden. Nachdem der Titer bestimmt worden war, konnte vRec8 somit zur Herstellung des Vacciniavirus-Endklons vNsp7-9NL eingesetzt werden.

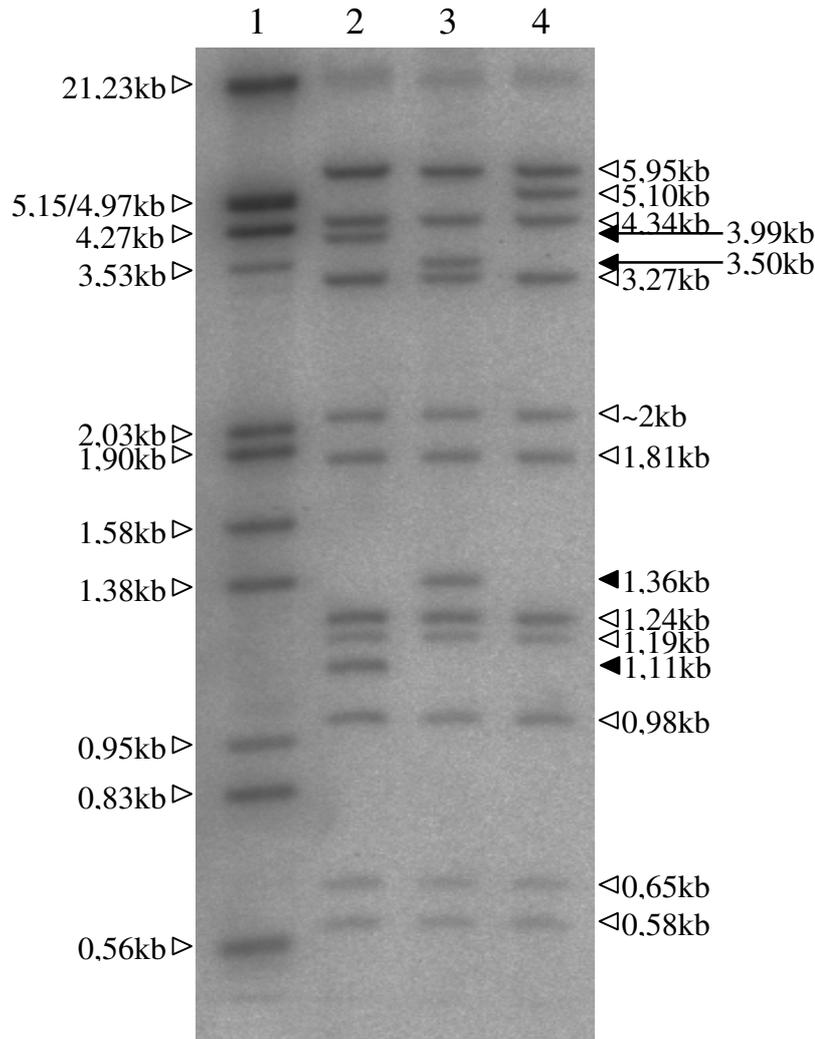


Abbildung 3.01 Southernblot

Die Abbildung zeigt die Phosphoimagerauswertung eines Southernblots. Die verwendete radioaktiv markierte Sonde war spezifisch für die vollständige HCoV-229E-cDNA-Sequenz. Auf der linken Seite sind die Fragmentgrößen des DNA-Markers mit Pfeilen gezeigt.

Auf der rechten Seite sind mit weißen Pfeilen die aus einem HindIII-Verdau resultierenden Fragmentgrößen der HCoV-229E-WT-cDNA gezeigt. Schwarze Pfeile markieren die vom WT abweichenden Fragmente der verschiedenen Vacciniavirus-Klone. Spur 1: DNA-Marker (EcoRI/HindIII-gespaltene Lambda-DNA, die mittels einer markerspezifischen Sonde detektiert wurde); Spur 2: Restriktionsspaltung der DNA des Vacciniavirus-Klons vHCoV-7-9NL; Spur 3: Restriktionsspaltung der DNA des Vacciniavirus-Klons vRec8; Spur 4: Restriktionsspaltung der DNA des Vacciniavirus-Klons mit dem wildtypischen HCoV-229E-cDNA-Insert.

3.7.4 Erzeugung des Vacciniavirus-Endklons und dessen Aufreinigung

Hierbei wurden D980R-Zellen mit vRec8 infiziert und gleichzeitig mit pNsp7-9NL transfiziert. Infolge eines Rekombinationsereignisses zwischen den HCoV-229E-spezifischen Sequenzen wurde die Sequenz des *gpt*-Gens sowie die flankierenden nsp7- bzw. nsp9-Sequenzen von HCoV-229E in vRec8 durch die nsp7-bis-nsp9-Sequenz von HCoV-NL63 ersetzt, wodurch der Vacciniavirus-Endklon vHCoV-7-9NL entstand. Dieser wurde über 3 aufeinanderfolgende Plaquereinigungen *gpt*-negativer Virusklone isoliert. Auch dieser Klon wurde mittels Southernblot und Sequenzierung des Rekombinationsbereiches charakterisiert (siehe Abbildung 3.01).

Mit vHCoV-7-9NL wurden BHK-21-Zellen in zwölf großen Glasflaschen infiziert und anschließend eine Vacciniavirus-Aufreinigung durchgeführt. Das Vacciniavirus wurde in 800 µl aufgenommen und anschließend in 4 Aliquots portioniert.

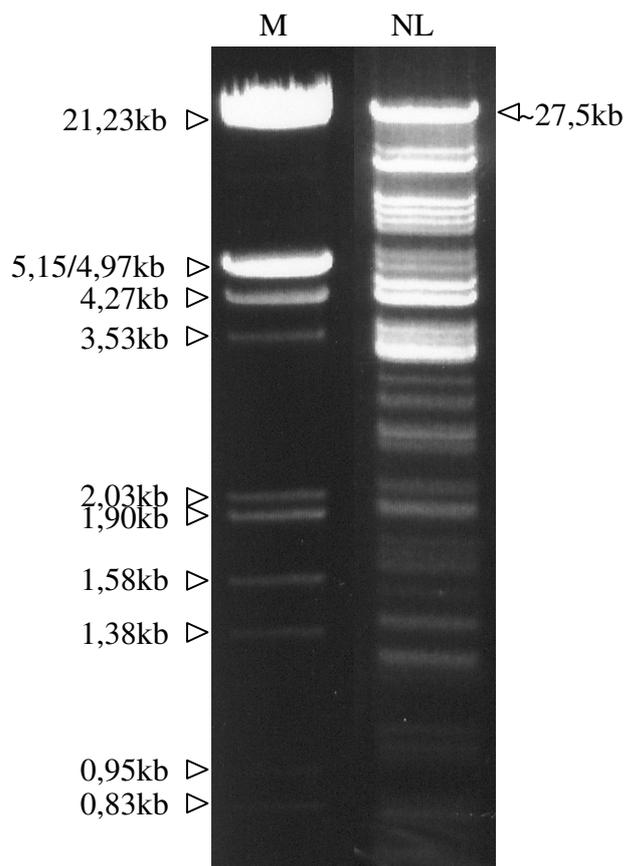


Abbildung 3.02: Gelelektrophorese der Restriktionsspaltung der vNsp7-9NL-Genom-DNA

Die Abbildung zeigt die mit EthBr angefärbte Agarose-Gelelektrophorese der resultierenden Fragmente aus der ClaI-Restriktionsspaltung der DNA des Vaccinia-Klons vNsp7-9NL. Auf der linken Seite sind die Fragmentgrößen des Lambda-DNA-Markers mit Pfeilen gezeigt. Auf der rechten Seite ist ein Hundertstel des Restriktionsansatzes aufgetragen. Spur M: DNA-Marker; Spur NL: Restriktionsspaltung der DNA des Vacciniavirus-Klons vNsp7-9NL.

3.7.5 Vorbereitung und Herstellung der RNA

Aus einem der vHCoV-7-9NL-Aliquots wurde DNA isoliert und mit ClaI gespalten (siehe Abbildung 3.02).

Anschließend diente die gesamte DNA als Matrize in einer Transkriptionsreaktion, welche eine Ausbeute von 130 µg RNA lieferte. 1 µg dieser RNA wurde in einem RNA-Agarose-Gel aufgetrennt, um die Qualität und Integrität der RNA zu überprüfen (siehe Abbildung 3.03).

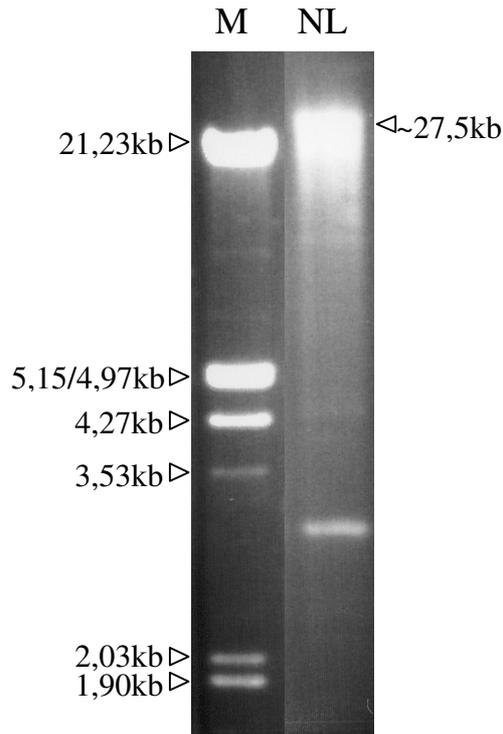


Abbildung 3.03: Gelelektrophoretische Analyse der von vNsp7-9NL-DNA transkribierten RNA.

Die Abbildung zeigt ein mit EthBr angefärbtes Agarosegel, in dem die Produkte der *In-vitro*-Transkription von vNsp7-9NL-DNA aufgetrennt wurden. Auf der linken Seite sind die Fragmentgrößen des Lambda-DNA-Markers mit Pfeilen gezeigt. Auf der rechten Seite ist mit einem Pfeil das Transkript und dessen erwartete Größe angedeutet. Die kleineren Transkripte sind Abbruchprodukte, die möglicherweise durch in der Sequenz vorhandene kryptische Transkriptionsterminatoren der T7-RNA-Polymerase entstehen. Spur M: DNA-Marker; Spur NL: transkribierte HCoV-229E-nsp7-9NL-RNA, die von vNsp7-9NL-DNA transkribiert wurde.

3.7.6 Transfektion der rekombinanten HCoV-229E-RNA genomischer Länge und Isolierung eines rekombinanten Coronavirus

Mit 15 µg der erhaltenen RNA wurden BHK-HCoV-N-Zellen transfiziert. Drei Tage später wurde poly(A)-RNA isoliert, um mittels Northern Blotting die virale RNA-Synthese dieser Mutante zu charakterisieren. Gleichzeitig wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und das erhaltene Virus auf MRC5-Zellen passagiert.

3.8 Zusammenfassung der verwendeten Primer und Klone

3.8.1 Herstellung des *gpt*-tragenden Zwischenklons vRec8

Name des <u>Vacciniaklons</u> :	<u>vRec8</u>
Substituierte nts von HCoV-229E:	11182 - 11760
Name des <u>Plasmid-Konstruktes</u> :	<u>pRec8</u>
Name des <u>Vorgänger-Vacciniaklons</u> :	<u>vHCoV-inf-1</u>

<u>Primer</u>	<u>Sequenz in 5'-3' Orientierung</u>
TH1	AAAGAATTCTGTTATGCAAATGGACATCCAGGGT
TH2	AAACTGCAGCGTCTCGTTTGCAAAATGGAGTCGTTCTCAA
TH3	AAAGGATCCCGTCTCGCAGAACAATGAAATAATGCCGGGC
TH4	AAATCTAGATCTGTACCATTACAGGGCTCTAGT

3.8.2 Substitution von nsp8 von HCoV-229E durch nsp8 von PEDV

Name des <u>Vacciniaklons</u> :	<u>vNsp8PEDV</u>
Substituierte nts von HCoV-229E:	11180 - 11764
Name des <u>Plasmid-Konstruktes</u> :	<u>pNsp8PEDV</u>
Name des <u>Vorgänger-Vacciniaklons</u> :	<u>vRec8</u>
Resultierender <u>HCoV-229E-Klon</u> :	<u>HCoV-8PEDV</u>

<u>Primer</u>	<u>Sequenz in 5'-3' Orientierung</u>
p23PEDV_downII	AAAGGTCTCTTCTGGAGCTTAACAATACGCTCACA
p23PEDV_upIII	AAAGGTCTCGGCAAAGTGTTGCATCTACTTATGTAGGT

3.8.3 Substitution von nsp8 von HCoV-229E durch nsp8 von HCoV-NL63

Name des <u>Vacciniaklons</u> :	<u>vNsp8NL</u>
Substituierte nts von HCoV-229E:	11180 - 11764
Name des <u>Plasmid-Konstruktes</u> :	<u>pNsp8NL</u>
Name des <u>Vorgänger-Vacciniaklons</u> :	<u>vRec8</u>
Resultierender <u>HCoV-229E-Klon</u> :	<u>HCoV-8NL</u>

<u>Primer</u>	<u>Sequenz in 5'-3' Orientierung</u>
BsaNsp8NL63_up	ATAGGTCTCGGCAAAGTGTTGCTTCATCATTTGTAGTATG
BsaNsp8NL63_down	TTTGGTCTCGATTGTTTTGAAGTTTAACAACACGTTAC

3.8.4 Mutagenese der Schnittstelle zwischen nsp7 und 8

Name des <u>Vacciniaklons</u> :	<u>vNsp7QA</u>
Substituierte nts von HCoV-229E:	11177 - 11178
Name des <u>Plasmid-Konstruktes</u> :	<u>pNsp7QA</u>
Name des <u>Vorgänger-Vacciniaklons</u> :	<u>vRec8</u>
Resultierender <u>HCoV-229E-Klon</u> :	<u>HCoV-7QA8</u>

3 Methoden

Bemerkungen:	Substitution der nsp7/8-M ^{PRO} -Spaltstelle: QIS --> AIS
Primer	Sequenz in 5'-3' Orientierung
mutNspQA_up	CTCCATTTTGGCAAGTGTTCATCTTCTTTTGTGG
TNI13,8K_down	TGGACGGTTTTTGTTCAGTACAAAG
mutNsp7QA_dn	ATGCAACACTTGCCAAAATGGAGTCGTTCTCAAATAAG
TNI13,6K_up	TGCTGTTGACCCAGCTGCAGCCTA

3.8.5 Mutagenese der Schnittstelle zwischen nsp8 und 9

Name des <u>Vacciniaklons:</u>	<u>vNsp8QA</u>
Substituierte nts von HCoV-229E:	11762 - 11764
Name des <u>Plasmid-Konstruktes:</u>	<u>pNsp8QA</u>
Name des <u>Vorgänger-Vacciniaklons:</u>	<u>vRec8</u>
Resultierender <u>HCoV-229E-Klon:</u>	<u>HCoV-8QA9</u>

Bemerkungen:	Substitution der nsp8/9-M ^{PRO} -Spaltstelle: QIN --> AIN
Primer	Sequenz in 5'-3' Orientierung
TH1	AAAGAATTCTGTTATGCAAATGGACATCCAGGGT
TH2	AAACTGCAGCGTCTCGTTTGCAAAAATGGAGTCGTTCTCAA
BamBsm229Ep12_up	AAAGGATCCCGTCTCACAATGAAATAATGCCGGGCAAGATG
TH4	AAATCTAGATCTGTACCATTACAGGGCTCTAGT
Bsa229Ep23_up	AAAGGTCTCGGCAAAGTGTTCATCTTCTTTTGTGG
BsaQAp23_dn	AAAGGTCTCGATTGTTGGCCAATTTAACGACACGTTTACAAGTC

3.8.6 Mutagenese der Schnittstelle zwischen nsp8 und 9

Name des <u>Vacciniaklons:</u>	<u>vNsp9NS</u>
Substituierte nts von HCoV-229E:	11765 - 11766
Name des <u>Plasmid-Konstruktes:</u>	<u>pNsp9NS</u>
Name des <u>Vorgänger-Vacciniaklons:</u>	<u>vRec8</u>
Resultierender <u>HCoV-229E-Klon:</u>	<u>HCoV-8NS9</u>

Bemerkungen:	Substitution der nsp8/9-M ^{PRO} -Spaltstelle: QIN --> QIS
Primer	Sequenz in 5'-3' Orientierung
TH1	AAAGAATTCTGTTATGCAAATGGACATCCAGGGT
TH2	AAACTGCAGCGTCTCGTTTGCAAAAATGGAGTCGTTCTCAA
BamBsm229Ep12_up	AAAGGATCCCGTCTCACAATGAAATAATGCCGGGCAAGATG
TH4	AAATCTAGATCTGTACCATTACAGGGCTCTAGT
Bsa229Ep23_up	AAAGGTCTCGGCAAAGTGTTCATCTTCTTTTGTGG
BsaNSp23_dn	AAAGGTCTCGATTGGACTGCAATTTAACGACACGTTTACAAG

3.8.7 Substitution von nsp7-8 von HCoV-229E durch nsp7-8 von HCoV-NL63

Name des <u>Vacciniaklons:</u>	<u>vNsp7-8NL</u>
Substituierte nts von HCoV-229E:	10931 - 11764
Name des <u>Plasmid-Konstruktes:</u>	<u>pNsp7-8NL</u>
Name des <u>Vorgänger-Vacciniaklons:</u>	<u>vRec8</u>
Resultierender <u>HCoV-229E-Klon:</u>	<u>HCoV-7+8NL</u>

3 Methoden

<u>Primer</u>	<u>Sequenz in 5'-3' Orientierung</u>
mut8/9up BSA_BPM	TAAACTTCAAACAATGAAATAATGCCGGGCAAG CGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAG
mut8/9down BPM_BSA	TTTCATTGTTTTGAAGTTTAAACAACACGTTTCAC CTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCG

3.8.8 Substitution von nsp8-9 von HCoV-229E durch nsp8-9 von HCoV-NL63

Name des <u>Vacciniaklons</u> :	<u>vNsp8-9NL</u>
Substituierte nts von HCoV-229E:	11764 - 12091
Name des <u>Plasmid-Konstruktes</u> :	<u>pNsp8-9NL</u>
Name des <u>Vorgänger-Vacciniaklons</u> :	<u>vRec8</u>
Resultierender <u>HCoV-229E-Klon</u> :	<u>HCoV-8+9NL</u>

Bemerkung: enthält 2 stille Mutationen an den HCoV-8+9NL nts 11369 und 11372

<u>Primer</u>	<u>Sequenz in 5'-3' Orientierung</u>
mut7/8up BSA_BPM	CATTTTGCAAAGTGTTGCTTCATCATTTGTTAG CGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAG
mut7/8down BPM_BSA	AAGCAACACTTTGCAAATGGAGTCGTTCTC CTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCG

3.8.9 Substitution von nsp7-9 von HCoV-229E durch nsp7-9 von HCoV-NL63

Name des <u>Vacciniaklons</u> :	<u>vNsp7-9NL</u>
Substituierte nts von HCoV-229E:	10931 - 12091
Name des <u>Plasmid-Konstruktes</u> :	<u>pNsp7-9NL</u>
Name des <u>Vorgänger-Vacciniaklons</u> :	<u>vRec8</u>
Resultierender <u>HCoV-229E-Klon</u> :	<u>HCoV-7-9NL</u>

<u>Primer</u>	<u>Sequenz in 5'-3' Orientierung</u>
mut229nsp10_up mut229nsp6_dn	TCGTCTACAAGCTGGCAAACAGACTGAGTTTG TCAGTTTGGACTGTACAGTAGAACTTTAATGG
mutNL63nsp7_up mutNL63nsp9_dn	TACTGTACAGTCCAACTGACTGATTTGAAGTG GTTTGCCAGCTTGTAGACGAATTGTGGCAC

3.8.10 Herstellung des *gpt*-tragenden Zwischenklons vHEL_GPT

Name des <u>Vacciniaklons</u> :	<u>vHEL_GPT</u>
Substituierte nts von HCoV-229E:	15275 - 17067
Name des <u>Plasmid-Konstruktes</u> :	<u>pHEL_GPT</u>
Name des <u>Vorgänger-Vacciniaklons</u> :	<u>vHCoV-inf-1</u>

<u>Primer</u>	<u>Sequenz in 5'-3' Orientierung</u>
XbaBsmExo_up Sac17886_dn	AAATCTAGACGTCTCTGAAAGTAGTTGTGGTTTGTTTAAG TTTGAGCTCAGCATCACCAGAAGCAACATGCTC
Xho14471_up EcoBsmPol_down	AAACTCGAGCCGAGGTTGTTTATTCAAATGGTG TTTGAATTCGTCTCGTAATACTGTAGACTTCTCATAC

3.8.11 Mutagenese von nsp13 (Bezeichnung der C/H-Reste nach Seybert et al., 2005)

Name des Vacciniaklons: vHel_C5A
Substituierte nts von HCoV-229E: 15352 - 15353
Name des Plasmid-Konstruktes: pHEL_C5A
Resultierender HCoV-229E-Klon: HCoV-C5A

Name des Vacciniaklons: vHel_C5H
Substituierte nts von HCoV-229E: 15352 - 15353
Name des Plasmid-Konstruktes: pHEL_C5H
Resultierender HCoV-229E-Klon: HCoV-C5H
Bemerkungen: enthält eine zusätzliche stille Mutation an HCoV-229E nts 16274

Name des Vacciniaklons: vHel_C6A
Substituierte nts von HCoV-229E: 15361 - 15363
Name des Plasmid-Konstruktes: pHEL_C6A
Resultierender HCoV-229E-Klon: HCoV-C6A

Name des Vacciniaklons: vHel_C6H
Substituierte nts von HCoV-229E: 15361 - 15362
Name des Plasmid-Konstruktes: pHEL_C6H
Resultierender HCoV-229E-Klon: HCoV-C6H

Name des Vacciniaklons: vHel_C10A
Substituierte nts von HCoV-229E: 15439 - 15441
Name des Plasmid-Konstruktes: pHEL_C10A
Resultierender HCoV-229E-Klon: HCoV-C10A

Name des Vacciniaklons: vHel_C10H
Substituierte nts von HCoV-229E: 15439 - 15440
Name des Plasmid-Konstruktes: pHEL_C10H
Resultierender HCoV-229E-Klon: HCoV-C10H

Name des Vacciniaklons: vHel_KA
Substituierte nts von HCoV-229E: 16141 - 16142
Name des Plasmid-Konstruktes: pHEL_KA
Resultierender HCoV-229E-Klon: HCoV-HEL-KA

Name des Vorgänger-Vacciniaklons: vHEL_GPT

<u>Primer</u>	<u>Sequenz in 5'-3' Orientierung</u>
BsaHel_up	AAAGGTCTCTATTACAAGCTGCTGGTCTTTGTGTAGTATGTG
BsaHel_down	TTTGGTCTCCTTTCAGACTGTAAATCTGTCATAGTGATTC

3.8.12 Mutagenese der Schnittstelle zwischen nsp12 und 13

Name des Vacciniaklons: vHEL AV
Substituierte nts von HCoV-229E: 15278 - 15279
Name des Plasmid-Konstruktes: pHEL AV
Name des Vorgänger-Vacciniaklons: vHEL GPT
Resultierender HCoV-229E-Klon: HCoV-12AV13

Bemerkungen: Substitution der nsp12|13-M^{PRO}-Spaltstelle: QIA --> QIV
Primer Sequenz in 5'-3' Orientierung

BsaHEL_AV_up AAAGGTCTCTATTACAAGTGGCTGGTCTTTGTGTAGTATGTGGTT
BsaHel_down TTTGGTCTCCTTCAGACTGTAAATCTGTCATAGTGATTTC

3.8.13 Herstellung des gpt-tragenden Zwischenklons vEXO GPT

Name des Vacciniaklons: vEXO GPT
Substituierte nts von HCoV-229E: 17073 - 18618
Name des Plasmid-Konstruktes: pEXO GPT
Name des Vorgänger-Vacciniaklons: vHCoV-inf-1

Primer Sequenz in 5'-3' Orientierung

JZ510 TTTTCTCGAGTGCTACTACTAAGTTAGTACCAGG
JZ511 TTTTCTGCAGCGTCTCAGACTGTAAATCTGTCATAGTGAT

JZ512 TTTTGGATCCCGTCTCAAGGTTTAgAGAAcATTGCTTTTAAcG
JZ513 TTTTGAGCTCTGGTGCAACACCATAATCAGAGCC

3.8.14 Mutagenese von nsp14

Name des Vacciniaklons: vEXO-DA+EA
Substituierte nts von HCoV-229E: 17336 - 17342
Name des Plasmid-Konstruktes: pEXO-DA+EA
Resultierender HCoV-229E-Klon: HCoV-DAEA
Bemerkungen: enthält eine zusätzliche stille Mutation an HCoV-229E nts 18057

Name des Vacciniaklons: vEXO-HA
Substituierte nts von HCoV-229E: 17866 - 17867
Name des Plasmid-Konstruktes: pEXO-HA
Resultierender HCoV-229E-Klon: HCoV-EXO-HA

Name des Vacciniaklons: vEXO-D1A
Substituierte nts von HCoV-229E: 17792
Name des Plasmid-Konstruktes: pEXO-D1A
Resultierender HCoV-229E-Klon: HCoV-EXO-D1A

Name des Vacciniaklons: vEXO-D2A
Substituierte nts von HCoV-229E: 17882
Name des Plasmid-Konstruktes: pEXO-D2A
Resultierender HCoV-229E-Klon: HCoV-EXO-D2A

3 Methoden

Name des Vacciniaklons: vEXO-NA
Substituierte nts von HCoV-229E: 17776 - 17777
Name des Plasmid-Konstruktes: pEXO-NA
Resultierender HCoV-229E-Klon: HCoV-EXO-NA

Name des Vorgänger-Vacciniaklons: vEXO_GPT

<u>Primer</u>	<u>Sequenz in 5'-3' Orientierung</u>
JZ514	TGTTGGTCTCCAGTCTGAAAGTAGTTGTGGTTTGT
JZ515	TGTTGGTCTCAACCTGTAAATTGACCTCTGTGAA

3.8.15 Mutagenese der Schnittstelle zwischen nsp13 und 14

Name des Vacciniaklons: vHEL/EXO_SV
Substituierte nts von HCoV-229E: 17068 - 17069
Name des Plasmid-Konstruktes: pHEL/EXO_SV
Name des Vorgänger-Vacciniaklons: vHEL_GPT
Resultierender HCoV-229E-Klon: HCoV-13SV14

Bemerkungen: Substitution der nsp13|14-M^{PRO}-Spaltstelle: QIS --> QIV

<u>Primer</u>	<u>Sequenz in 5'-3' Orientierung</u>
BsaHEL/EXO_SV_down	TTTGGTCTCCTTTCAACCTGTAAATCTGTCATAGTGATTC
BsaHel_up	AAAGGTCTCTATTACAAGCTGCTGGTCTTTGTGTAGTATGTG

3.8.16 Herstellung des gpt-tragenden Zwischenklons vENDO_GPT

Name des Vacciniaklons: vENDO_GPT
Substituierte nts von HCoV-229E: 18620 - 19669
Name des Plasmid-Konstruktes: pENDO_GPT
Name des Vorgänger-Vacciniaklons: vHCoV-inf-1

<u>Primer</u>	<u>Sequenz in 5'-3' Orientierung</u>
Xba_17596_s	AAATCTAGACATCTGATGTACTGGTGTGTTGTAC
BamBsm_18619_as	AAAGGATCCCGTCTCGTAAATTGACCTCTGTGAATGTCTG
PstBsm_19670_sII	AAACTGCAGCGTCTCAGAATGGAAATGCGGGTATTCTATG
Xho_20567_as	AAACTCGAGTTATTTAGTTGAGACTAAATGATTAC

3.8.17 Mutagenese von nsp15

Name des Vacciniaklons: vENDO-HA
Substituierte nts von HCoV-229E: 19369 - 19370
Name des Plasmid-Konstruktes: pENDO-HA
Resultierender HCoV-229E-Klon: HCoV-ENDO-HA

Name des Vacciniaklons: vENDO-KA
Substituierte nts von HCoV-229E: 19492 - 19493
Name des Plasmid-Konstruktes: pENDO-KA
Resultierender HCoV-229E-Klon: HCoV-ENDO-KA

3 Methoden

Name des Vacciniaklons: vENDO-DA
Substituierte nts von HCoV-229E: 19514
Name des Plasmid-Konstruktes: pENDO-DA
Resultierender HCoV-229E-Klon: HCoV-ENDO-DA

Name des Vacciniaklons: vENDO-SA
Substituierte nts von HCoV-229E: 19570
Name des Plasmid-Konstruktes: pENDO-SA
Resultierender HCoV-229E-Klon: HCoV-ENDO-SA

Name des Vorgänger-Vacciniaklons: vENDO_GPT

<u>Primer</u>	<u>Sequenz in 5'-3' Orientierung</u>
Bsa_18614_s	AAAGGTCTCATTTACAAGGTTTAGAGAACATTGCTTTTAACG
Bsa_19642_asIII	TTTGGTCTCCATTCTGCACTCTGCAACTGAGGATAGAATGTAGC

3.8.18 Mutagenese der Schnittstelle zwischen nsp14 und 15

Name des Vacciniaklons: vENDO_GV
Substituierte nts von HCoV-229E: 18619 - 19671
Name des Plasmid-Konstruktes: pGEM_GV
Name des Vorgänger-Vacciniaklons: vENDO_GPT
Resultierender HCoV-229E-Klon: HCoV-14GV15

Bemerkungen: Substitution der nsp14|15-M^{PRO}-Spaltstelle: QIG --> QIV

<u>Primer</u>	<u>Sequenz in 5'-3' Orientierung</u>
BsaGVup2	AAAGGTCTCATTTACAAGTATTAGAGAACATTGCTTTTAACGTTG
HCoV20025as	AGATTAACAAGTCAAACCTTGTC
TNI19,8k_up	ACACTCCTGCTTATGATAAACG
BamBsm_18619_as	AAAGGATCCCGTCTCGTAAATTGACCTCTGTGAATGTCTG

3.8.19 Herstellung des gpt-tragenden Zwischenklons vMTR_GPT

Name des Vacciniaklons: vMTR_GPT
Substituierte nts von HCoV-229E: 19653 - 20564
Name des Plasmid-Konstruktes: pMTR_GPT

Name des Vorgänger-Vacciniaklons: vHCoV-inf-1

<u>Primer</u>	<u>Sequenz in 5'-3' Orientierung</u>
JZ480	TATGAATTCTCTACTATGACGACGGTTCATGTG
JZ481	TATCTGCAGCGTCTCTAGAATGTAGCAACGGCATTATCT
JZ484	TATGGATCCCGTCTCATAAAATGTTTGTGTTTGTGCTTGTGTCATATGC
JZ485	TATGAGCTCATATTAACACCAGCAGGATAACAG

3.8.20 Insertion eines STOP-Codons zwischen nsp15 und nsp16

Name des Vacciniaklons: vMTR-STOP
 Substituierte nts von HCoV-229E: 19666 - 19668
 Name des Plasmid-Konstruktes: pMTR-STOP
 Name des Vorgänger-Vacciniaklons: vMTR_GPT
 Resultierender HCoV-229E-Klon: HCoV-ΔMTR

Primer	Sequenz in 5'-3' Orientierung
JZ489	TATGGTCTCTTTTATTTAGTTGAGACTAAATGATTAC
JZ543	AAAGGTCTCATTCTATCCTCAGTTGCAGTAAGCAGAATGGAAATGCGGGT

3.8.21 Mutagenese der Schnittstelle zwischen nsp15 und 16

Name des Vacciniaklons: vMTR-SV
 Substituierte nts von HCoV-229E: 19666 - 19667
 Name des Plasmid-Konstruktes: pMTR-SV
 Name des Vorgänger-Vacciniaklons: vMTR_GPT
 Resultierender HCoV-229E-Klon: HCoV-15SV16

Bemerkungen: Substitution der nsp15/16-M^{PRO}-Spaltstelle: QIS --> QIV

Primer	Sequenz in 5'-3' Orientierung
JZ491	AAAGGTCTCATTCTATCCTCAGTTGCAGTTGCAGAATGGAAATGCGGGT
JZ489	TATGGTCTCTTTTATTTAGTTGAGACTAAATGATTAC

3.8.22 Herstellung des HCoV-229E-Replikons unter Substitution der PL1-Schnittstelle durch TAV-2A-Sequenz, neomycin und EMCV-IRES-Element

Name des Vacciniaklons: vTNI
 Substituierte nts von HCoV-229E: 616 - 625
 Name des Plasmid-Konstruktes: pTNI
 Name des Vorgänger-Vacciniaklons: vRec2GN
 Resultierender HCoV-229E-Klon: TNI-Replikon

Primer	Sequenz in 5'-3' Orientierung
BsaNEOIRES-up Oli17	ACGTGCGGTCTCCTAACGGTTTCCCTCTAGCGGGATC CACAAGTCACAGTGGTTGG
BsaNEO-up BsaNEOIRES-down	ACGTGCGGTCTCAATGGGATCGGCCATTGAACAAGATGG ACGCTGGGTCTCCGTTAGAAGAAGTTCGTCAAGAAGGCG
240up BsaTAVneo-down	CCTTACTCGAGGTTCCGTCTCGTG ACGTGCGGTCTCACCATTGGCCCGGATTTTCCCTCCACG

3.8.23 Herstellung des gpt-tragenden Zwischenklons vTNI ENDO_GPT

Name des Vacciniaklons: vTNI ENDO_GPT
 Substituierte nts von TNI: TNI nts 18620 - 19669
 Name des Plasmid-Konstruktes: pENDO_GPT
 Name des Vorgänger-Vacciniaklons: vTNI

3 Methoden

<u>Primer</u>	<u>Sequenz in 5'-3' Orientierung</u>
Xba_17596_s	AAATCTAGACATCTGATGTACTGGTGTGTTGTAC
BamBsm_18619_as	AAAGGATCCCGTCTCGTAAATTGACCTCTGTGAATGTCTG
PstBsm_19670_sII	AAACTGCAGCGTCTCAGAATGGAAATGCGGGTATTCTATG
Xho_20567_as	AAACTCGAGTTATTTAGTTGAGACTAAATGATTAC

3.8.24 Mutagenese von nsp15 im Replikon

Name des <u>Vacciniaklons</u> :	<u>vTNI_ENDO-HA</u>
Substituierte nts von TNI:	TNI nts 20074 - 21123
Name des <u>Plasmid-Konstruktes</u> :	<u>pENDO-HA</u>
Name des <u>Vorgänger-Vacciniaklons</u> :	<u>vTNI_ENDO_GPT</u>
Resultierender <u>HCoV-229E-Klon</u> :	<u>TNI-ENDO-HA</u>

<u>Primer</u>	<u>Sequenz in 5'-3' Orientierung</u>
Bsa_18614_s	AAAGGTCTCATTTACAAGGTTTAGAGAACATTGCTTTTAACG
Bsa_19642_asIII	TTTGGTCTCCATTCTGCACTCTGCAACTGAGGATAGAATGTAGC

3.8.25 Primer zur Herstellung der Sonde für den Northern Blot

<u>Primer</u>	<u>Sequenz in 5'-3' Orientierung</u>
TNI24,3Kdown	GATAGGTCTCAAGACAAATGACTG
Oli180	CATGCCACTGTGTTGTTTGA

3.8.26 Primer zur Herstellung des Transkripts für die *In-vitro*-Translation

<u>Primer</u>	<u>Sequenz in 5'-3' Orientierung</u>
T7ACC12092up	TTTAAATACGACTCACTATAGGGTATTTACCATGGCTGGCAAACAGACTGAGTTTGTTC
13200STOPdown	TTTGATATCTTACATATAAGAATAGTATGACGTGCAG

4 Ergebnisse

4.1 Allgemeines zur Analyse der Mutanten

4.1.1 Charakterisierung von HCoV-229E-Mutanten

Die während der vorliegenden Arbeit hergestellten rekombinanten Coronaviren wurden in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten charakterisiert. Zunächst wurden die Mutanten hinsichtlich ihrer RNA-Synthese untersucht, indem polyadenylierte RNA aus drei Tage zuvor transfizierten BHK-HCoV-N-Zellen isoliert und im Northern Blot mit HCoV-229E-spezifischen Sonden charakterisiert wurde. Der entsprechende Zeitpunkt wurde als „Passage Null“ (P0) bezeichnet.

Anschließend wurde untersucht, ob die rekombinanten Viren einen kompletten Replikationszyklus durchlaufen können, also infektiöse Virionen produzieren. Hierzu wurden MRC-5-Zellen, unabhängig vom Resultat des zuvor durchgeführten Northern-Blot-Experiments, mit dem aus der Passage Null stammenden Zellkulturüberstand infiziert. Trat bei den infizierten Zellen innerhalb eines Zeitraumes von drei Wochen ein cytopathischer Effekt (CPE) auf, so wurde auf das Vorhandensein infektiöser Partikel im P0-Überstand geschlossen, und die betreffenden Viren wurden bis zu zehn weitere Male passagiert, um hochtitrige Virusstocks für deren weitere Charakterisierung zu gewinnen.

Im letzten Schritt fand dann die umfassende Charakterisierung dieser Mutanten statt. Zunächst wurde dabei die virale RNA im Northern Blot untersucht und die Mutationsstelle oder gegebenenfalls das komplette Genom sequenziert, um mögliche Unterschiede in der Nukleotidsequenz zwischen Mutante und vacciniaviralem cDNA-Klon feststellen zu können. Ergänzend wurde die Wachstumskinetik in Zellkultur bestimmt.

Auf der Basis dieser Charakterisierung wurden alle Mutanten in eine der drei folgenden großen Kategorien eingeordnet:

1) Mutanten, bei denen im Northern Blot von Passage 0 (P0) keinerlei virale RNA-Synthese nachgewiesen werden konnte und bei denen auch innerhalb von drei Wochen kein CPE in Zellkultur auftrat, wurden als replikationsdefizient bezeichnet.

2) Mutanten, bei denen im Northern Blot von P0 eine virale RNA-Synthese nachgewiesen werden konnte, jedoch innerhalb von drei Wochen kein CPE in Zellkultur auftrat bzw. zunächst ein CPE auftrat, dieser aber nach mehrfacher Passagierung verloren ging, wurden als nicht lebensfähig bezeichnet.

3) Mutanten, bei denen im Northern Blot von P0 eine virale RNA-Synthese nachgewiesen wurde und die in Zellkultur mindestens fünfmal passagiert werden konnten, wurden als lebensfähig bezeichnet. Diese Viren wurden dann näher charakterisiert.

4.1.2 Charakterisierung eines mutierten Replikon-(Rep-1)-Derivats

In einem ersten Schritt wurden drei Tage nach der Transfektion der mutierten Rep-1-RNA in BHK-21-Zellen die Auswirkungen der in die Replikon-RNA eingeführten Substitution auf dessen Replikation und Transkription untersucht. Mittels Northern Blottings wurde dabei geprüft, ob in den transfizierten Zellen Replikon-spezifische RNAs synthetisiert wurden. In einem weiteren Schritt wurden die Replikon-BHK-21-Zellen mit Geneticin selektiert. *Neo^R*-negative Zellen starben dabei relativ schnell ab. In dieser Phase wurde darüber hinaus die transkriptionelle Aktivität des Replikons anhand der Expression des *gfp*-Reportergens charakterisiert. Nach etwa 4 Wochen in Zellkultur unter permanentem Selektionsdruck wurde in der dritten Phase die polyadenylierte RNA aus den Replikonzellen isoliert und im Northern Blot untersucht. Parallel dazu wurde die Substitutionsstelle sequenziert und die *gfp*-Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie photographisch dokumentiert.

4.2 Active-site-Mutanten

Als *Active-site*-Mutanten wurden Viren bzw. Replikon-RNAs bezeichnet, die Substitutionen von bekannten oder putativen katalytischen Resten viraler Enzyme kodierten. Zur Herstellung dieser Mutanten wurde in der Regel das Kodon der entsprechenden Aminosäure durch ein Ala-Kodon ersetzt.

4.2.1 Rekombinante Coronaviren mit Substitutionen in der Helikase, nsp13

4.2.1.1 Substitution eines katalytischen Restes in der ATPase-Domäne von nsp13

Die dsRNA-Entwindungsaktivität von Helikasen erfordert Energie, die in der Regel aus der Hydrolyse von ATP gewonnen wird. Einer der für die ATPase-Aktivität essentiellen katalytischen Reste ist ein Lysin innerhalb der sogenannten Walker-A-Box (Walker et al., 1982). Die essentielle Funktion dieses Restes (Lys5284 im pp1ab) für die Aktivität der HCoV-229E-Helikase war bereits in früheren biochemischen Experimenten bestätigt worden (Seybert et al., 2000b; Ivanov & Ziebuhr 2004).

Mit der Mutante HCoV-HEL-KA wurde der Einfluss einer Substitution dieses Lysins durch Alanin auf den Replikationszyklus untersucht. Einen Northern Blot mit der RNA aus P0 zeigt

Abbildung 4.01. Da keine virale RNA detektiert und kein CPE mit dem Überstand hervorgerufen werden konnte, wurde die K5284A-Mutation als replikativ inaktivierend bezeichnet. Aus der replikativen Inaktivität von HCoV-HEL-KA kann auf eine essentielle Funktion der Helikase für die Replikation von HCoV-229E geschlossen werden.

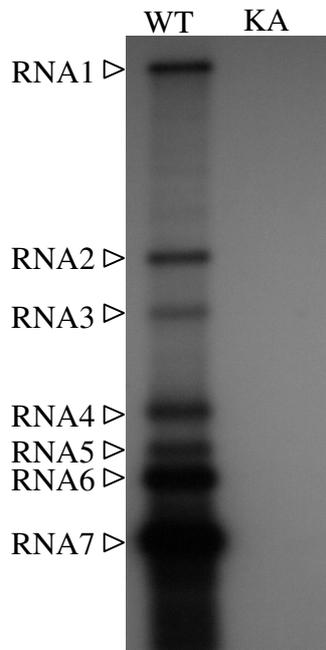


Abbildung 4.01: RNA-Synthese der Mutante HCoV-HEL-KA.

Die Abbildung zeigt die Autoradiographie eines Northern Blots zum Nachweis virusspezifischer RNAs in BHK-HCoV-N-Zellen, die mit jeweils 15 µg *in vitro* transkribierter HCoV-HEL-KA-RNA (Spur KA) oder wildtypischer HCoV-229E-RNA (Spur WT) transfiziert worden waren. Für dieses Experiment wurde 3 Tage nach der Transfektion die poly(A)-RNA aus den transfizierten Zellen isoliert, und die virale RNA wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde, die für die HCoV-229E nts 26857-27235 spezifisch war, detektiert.

4.2.1.2 Substitutionen in der Zinkbindenden Domäne (ZBD) des nsp13

Coronavirale Helikasen besitzen zusätzlich eine N-terminal zur Walker-A-Domäne gelegene weitere Domäne, die sich durch eine konservierte Abfolge von metallorientierenden Aminosäuren, wie Cysteinen und Histidinen auszeichnet. Diese Domäne wird aufgrund ihrer Eigenschaft, Zinkionen zu komplexieren, zinkbindende Domäne (ZBD) genannt. Seybert *et al.* zeigten, dass diese Aminosäuren einen entscheidenden Einfluss auf die Fähigkeit der bakteriell exprimierten Helikase hatten, ATP zu hydrolysieren und Nukleinsäuren zu entwinden (Seybert *et al.*, 2005).

Um die Bedeutung dieser Domäne im Replikationszyklus des HCoV-229E zu untersuchen, wurden drei Cysteine der ZBD zu Alanin oder Histidin mutiert. Die nachstehende Übersicht fasst die entsprechenden Mutanten zusammen.

<u>Mutante:</u>	<u>Substitution:</u>
HCoV-C5A:	C5021A
HCoV-C5H:	C5021H
HCoV-C6A:	C5024A
HCoV-C6H:	C5024H
HCoV-C10A:	C5050A
HCoV-C10H:	C5050H

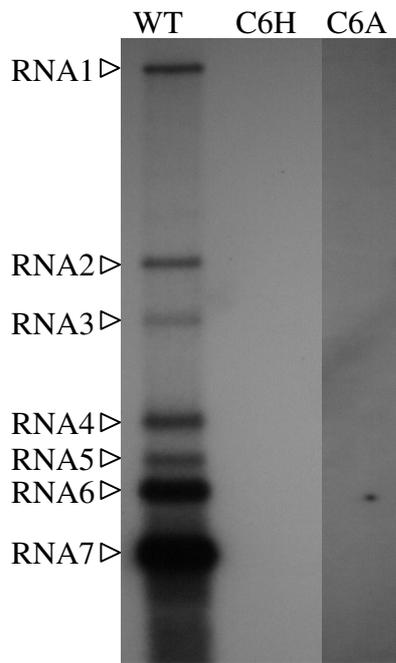


Abb.4.02a

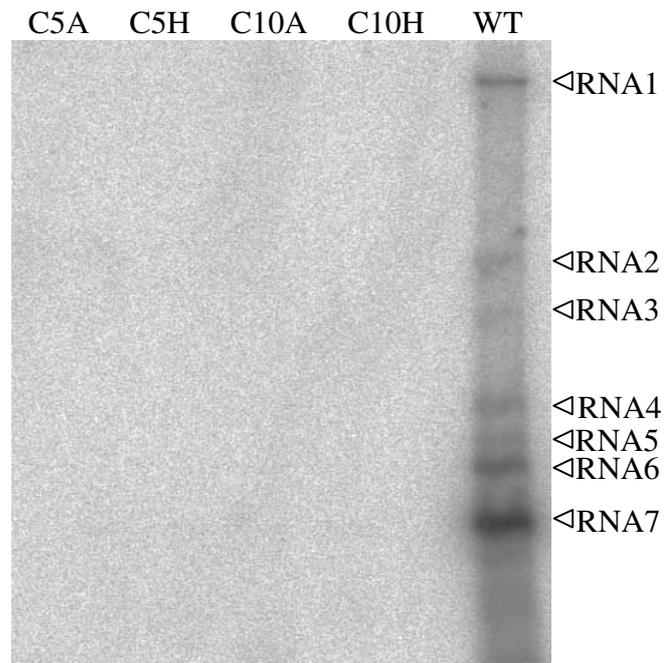


Abb. 4.02b

Abbildung 4.02 a und b: RNA-Synthese der Mutanten der ZBD von nsp13.

Die Abbildungen zeigen die Autoradiographien von Northern Blots zum Nachweis virusspezifischer RNAs in BHK-HCoV-N-Zellen, die mit jeweils 15 µg *in vitro* transkribierter RNA einer Mutante (Spur C5A: HCoV-C5A; Spur C5H: HCoV-C5H; Spur C6A: HCoV-C6A; Spur C6H: HCoV-C6H; Spur C10A: HCoV-C10A; Spur C10H: HCoV-C10H) oder des HCoV-229E Wildtyps (Spur WT) transfiziert worden waren. Für dieses Experiment wurde 3 Tage nach der Transfektion die poly(A)-RNA aus den transfizierten Zellen isoliert, und die virale RNA wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde, die für die HCoV-229E nts 26857-27235 spezifisch war, detektiert.

Wie aus den Abbildungen 4.02a und 4.02b ersichtlich ist, war durch Transfektion der Transkripte HCoV-C5A, HCoV-C5H, HCoV-C6A, HCoV-C6H, HCoV-C10A und HCoV-C10H von den jeweiligen HCoV-229E-cDNA-Klonen in BHK-HCoV229E-N-Zellen bei keiner der Mutanten eine virale RNA-Synthese induzierbar. Da mit dem Überstand ebenfalls kein CPE hervorgerufen werden konnte, wurden diese Mutanten als vollständig replikationsdefizient

bezeichnet. Dieser Phänotyp lässt in Verbindung mit den Ergebnissen aus 4.2.1.1 den Schluss zu, dass die ZBD für die coronavirale RNA-Synthese essentiell ist. Ob die beobachteten RNA-Synthese-Defekte jedoch in allen Fällen auf eine eigenständige Funktion der ZBD zurückzuführen sind ist oder lediglich indirekt durch eine Beeinträchtigung der Funktionalität der C-terminalen Helikasedomäne verursacht wurden, muss noch in weiteren Experimenten untersucht werden.

4.2.1.3 Substitutionen in der putativen *Hinge-spacer*-Region von nsp13

In einem arteriviralen revers-genetischen System konnte die kritische Rolle der unmittelbar carboxyterminal auf die ZBD folgenden Aminosäuren auf die Synthese der subgenomischen RNAs von EAV gezeigt werden. Die Region, in der sich diese Aminosäuren befanden, wurde von den Autoren *hinge spacer* genannt. Es wurde festgestellt, dass dort die Substitution eines Serins durch Prolin selektiv die transkriptionelle Aktivität unterband (van Dinten et al., 1997; van Dinten et al., 2000).

Um eine etwaige homologe Funktion dieser Helikase-Subdomäne bei Coronaviren nachzuweisen, wurden, analog zur Vorgehensweise bei EAV, drei Aminosäuren in Prolin umgewandelt. Hierdurch entstanden die folgende Mutanten:

<u>Mutante:</u>	<u>Substitution:</u>
HCoV-KP:	K5071P
HCoV-HP:	H5073P
HCoV-SP:	S5075P

Abbildung 4.03 zeigt ein Northern-Blot-Experiment zur Untersuchung der viralen RNA-Synthese, die nach Transfektion der Transkripte HCoV-HP, HCoV-KP und HCoV-SP, die von den entsprechenden mutanten HCoV-229E-cDNA-Klonen generiert wurden, in BHK-HCoV-N-Zellen induziert worden war. Der für das Arterivirus EAV nachgewiesene transkriptionsdefiziente Phänotyp konnte demnach für Coronaviren nicht beobachtet werden, was auf funktionelle und/oder strukturelle Unterschiede des auf die ZBD folgenden Segments bei corona- und arteriviralen Helikasen hindeutet.

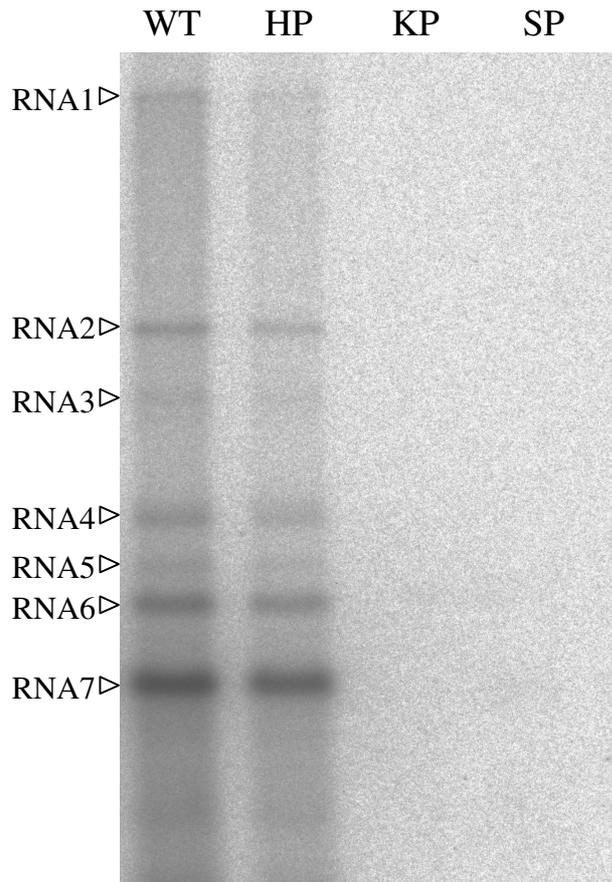


Abbildung 4.03: RNA-Synthese der Mutanten der putativen *Hinge-spacer*-Region in nsp13.

Die Abbildung zeigt die Autoradiographie eines Northern Blots zum Nachweis virusspezifischer RNAs in BHK-HCoV-N-Zellen, die mit jeweils 15 µg *in vitro* transkribierter RNA einer Mutante (Spur HP: HCoV-HP; Spur KP: HCoV-KP; Spur SP: HCoV-SP) oder des HCoV-229E-Wildtyps (Spur WT) transfiziert worden waren. Für dieses Experiment wurde 3 Tage nach der Transfektion die poly(A)-RNA aus den transfizierten Zellen isoliert, und die virale RNA wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde, die für die HCoV-229E nts 26857-27235 spezifisch war, detektiert.

Die beiden Substitutionen K5071P und S5075P inaktivierten die virale RNA-Synthese vollständig. Die überlebensfähige Mutante HCoV-HP konnte hingegen problemlos passagiert werden, und nach zehnmaliger Passage auf MRC5-Zellen wurde bestätigt, dass die Ala-zu-Pro-Substitution nach wie vor vorhanden war. Abbildung 4.04 zeigt einen Northern Blot mit dem Virus HCoV-HP in der zehnten Passage. Die Daten zeigen, dass bei dieser Mutante kein erkennbarer Defekt in der viralen RNA-Synthese auftrat.

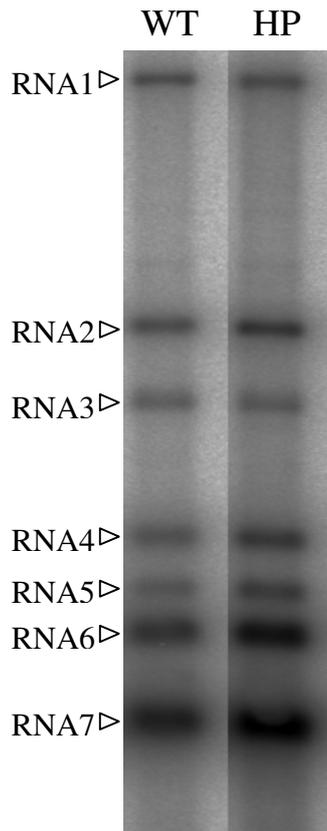


Abbildung 4.04: RNA-Synthese der Mutante HCoV-HP in Passage zehn.

Die Abbildung zeigt die Autoradiographie eines Northern Blots zum Nachweis virusspezifischer RNAs in MRC5-Zellen, die mit einer *moi* von 0,3 mit HCoV-HP (Spur HP) oder dem wildtypischen HCoV-229E (Spur WT) infiziert wurden. Die RNA-Isolation fand 24 Stunden *p.i.* statt. Die virale RNA wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde, die für die HCoV-229E nts 26857-27235 spezifisch war, detektiert.

Die Wachstumskinetik von HCoV-HP ist in Abbildung 4.05 dargestellt. Es zeigte sich, dass nach 24 Stunden 60% des wildtypischen Titers erreicht wurden.

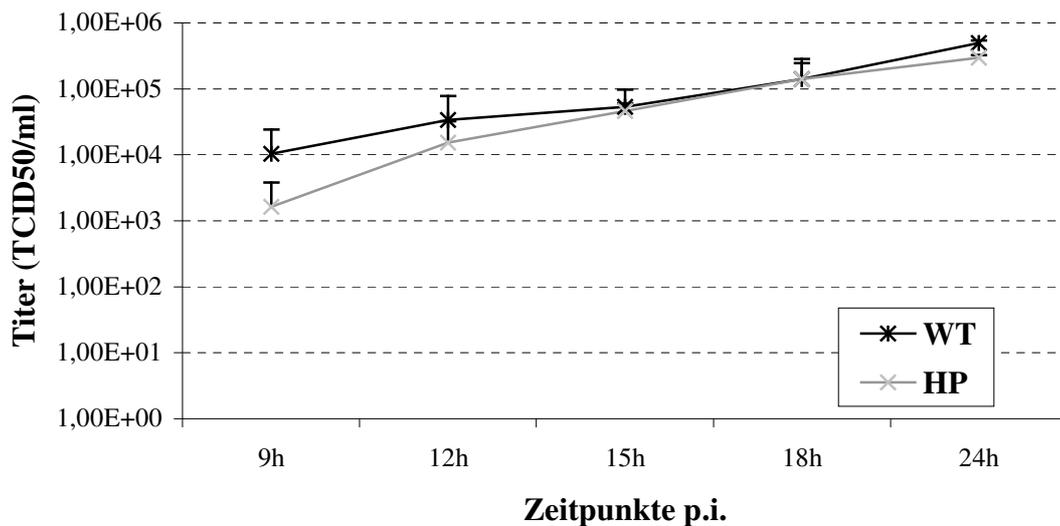


Abbildung 4.05: Wachstumskinetik von HCoV-HP.

Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung zweier Infektionsexperimente mit HCoV-HP und dem Wildtyp. Infiziert wurden MRC-5-Zellen mit einer *moi* von eins. Die Bestimmung des Titers fand mittels Endpunktverdünnung statt. Schwarz = WT; Grau = HCoV-HP. Die Balken geben die jeweilige Standardabweichung an.

4.2.2 Rekombinante Coronaviren mit Substitutionen in der Exonuklease, nsp14

Es wurde *in vitro* gezeigt, dass fünf Substitutionen von putativ katalytischen Aminosäuren im nsp14 des SCoV die Aktivität, doppel- und einzelsträngige RNA-Substrate exonukleolytisch zu prozessieren, signifikant reduzierten. Das Nichtstrukturprotein 14 konnte auf diese Weise eindeutig als virale Exoribonuklease identifiziert werden (Minskaia et al., 2006).

Um die Rolle des nsp14 im Replikationszyklus des HCoV-229E zu untersuchen, wurden die Kodons der fünf äquivalenten Reste im HCoV-229E-Genom substituiert.

<u>Mutante:</u>	<u>Substitution:</u>
HCoV-EXO-DAEA:	D5682A/E5684A
HCoV-EXO-NA:	N5829A
HCoV-EXO-D1A:	D5834A
HCoV-EXO-HA:	H5859A
HCoV-EXO-D2A:	D5864A

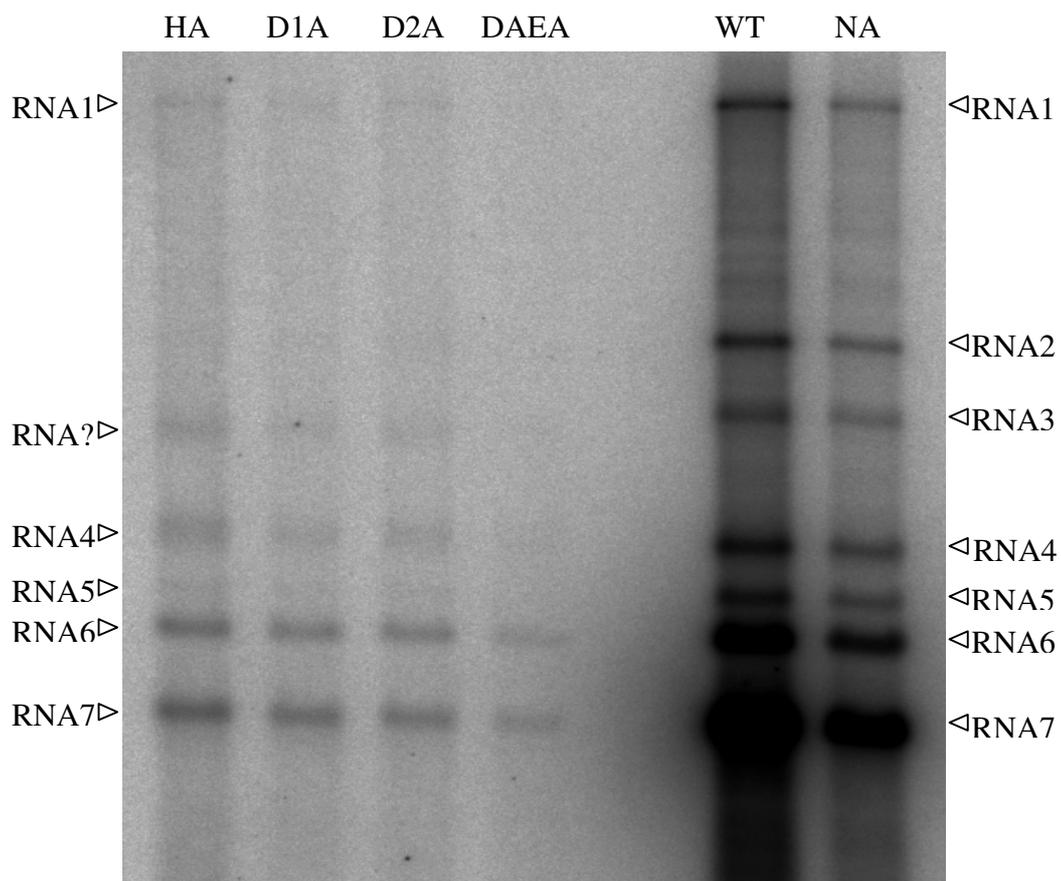


Abbildung 4.06: RNA-Synthese der nsp14-Mutanten.

Die Abbildung zeigt die Autoradiographie eines Northern Blots zum Nachweis virusspezifischer RNAs in BHK-HCoV-N-Zellen, die mit jeweils 15 μg *in vitro* transkribierter RNA eines rekombinanten HCoV-229E-cDNA-Klons (Spur HA: HCoV-EXO-HA; Spur D1A: HCoV-EXO-D1A; Spur D2A: HCoV-EXO-D2A; Spur DAEA: HCoV-EXO-DAEA) oder des HCoV-229E-Wildtyps (Spur WT) transfiziert worden waren. Für dieses Experiment wurde 3 Tage nach der Transfektion die poly(A)-RNA aus den transfizierten Zellen isoliert, und die virale RNA wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde, die für die HCoV-229E nts 26857-27235 spezifisch war, detektiert.

Der Northern Blot (siehe Abbildung 4.06) zeigt das Resultat einer Transfektion mit den rekombinanten HCoV-229E-RNAs genomischer Länge, die die entsprechenden Mutationen tragen.

Der Phänotyp der Mutanten HA, D1A, D2A und DAEA zeichnete sich durch eine insgesamt deutlich reduzierte RNA-Synthese im Vergleich zum Wildtyp aus. Darüber hinaus schienen die subgenomischen RNAs (sgRNAs) 3 und 4 eine von den entsprechenden sgRNAs des Wildtyps abweichende Größe zu besitzen, und ihr Erscheinungsbild wirkte diffuser. Die sgRNA 2 konnte auch bei Überexposition des Northern Blots nicht identifiziert werden.

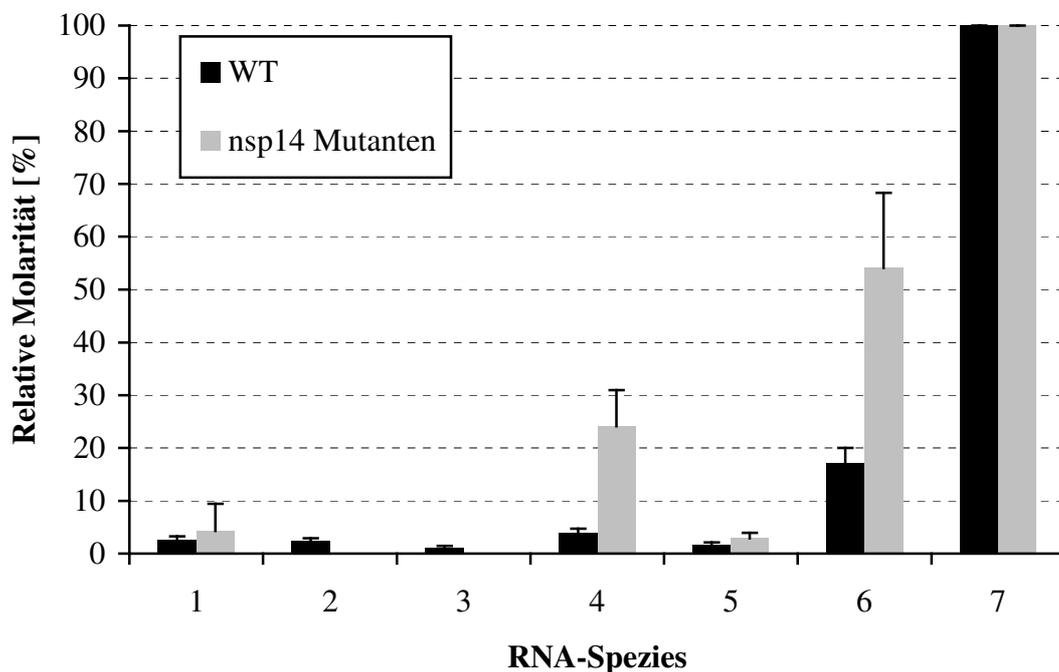


Abbildung 4.07: Relative Signalstärke der einzelnen RNA-Spezies der Mutanten von nsp14.

Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von RNA-Quantifizierungen am Phosphorimager aus mehreren Transfektionsexperimenten mit den HCoV-229E-nsp14-Mutanten HA, D1A, D2A und DAEA. Die Balken geben die jeweilige Signalstärke einer RNA-Spezies bezogen auf den Wert der jeweiligen sgRNA7 an. Die Signalstärke der sgRNA7 wurde dabei auf 100 % gesetzt. Schwarz = WT; Grau = nsp14-Mutanten. Die vertikale Linie gibt die jeweilige Standardabweichung an.

Mittels quantitativer Analyse am Phosphorimager wurden die Intensitäten der erfassbaren Banden auf mehreren Northern Blots bestimmt und mit den Intensitäten entsprechender Banden des Wildtyps verglichen. Dazu wurden die Intensitäten jeweils auf die Intensität der Bande der jeweiligen sgRNA7, welche bei allen Mutanten am zuverlässigsten quantifiziert werden konnte, normalisiert. Da der Phänotyp dieser vier Mutanten qualitativ gleich erschien, wurden die Werte

der entsprechenden RNA-Banden zu einem gemeinsamen Datensatz zusammengefasst und mit dem Wildtyp verglichen (siehe Abbildung 4.07).

Hierbei zeigte sich bei den nsp14-Mutanten, dass die relativen Intensitäten der Banden der sgRNAs deutlich von den relativen Intensitäten des Wildtyps abwichen.

Da die Intensität einer Bande proportional zur Molarität dieser Spezies von RNA-Molekülen ist, folgt, dass bei diesen vier Mutanten, neben einer teilweise abweichenden Größe, die sgRNAs auch in einem vom Wildtyp abweichenden relativen Verhältnis zueinander synthetisiert wurden.

Mit dem P0-Überstand von HA, D1A, D2A und DAEA ließ sich kein CPE in MRC5-Zellen hervorrufen. Die Mutanten wurden daher als nicht lebensfähig klassifiziert.

Die Daten zu diesen vier Mutanten zeigen, dass nsp14 eine wichtige Funktion in der viralen RNA-Synthese und möglicherweise auch anderen Teilprozessen des viralen Replikationszyklus besitzt. Neben seiner Funktion in der Replikation der genomischen RNA hat nsp14 offenbar auch eine spezifische Funktion in der Synthese viraler sgRNAs.

Die Mutante HCoV-EXO-NA hingegen zeigte, wie in Abbildung 4.06 dargestellt, eine (im Vergleich zum Wildtyp) lediglich geringfügig reduzierte RNA-Synthese. Mit dem P0-Überstand von NA ließ sich ein CPE in MRC5-Zellen hervorrufen, und nach zehn Passagen wurde mittels Sequenzanalyse bestätigt, dass die N5829A-Substitution nach wie vor vorhanden war.

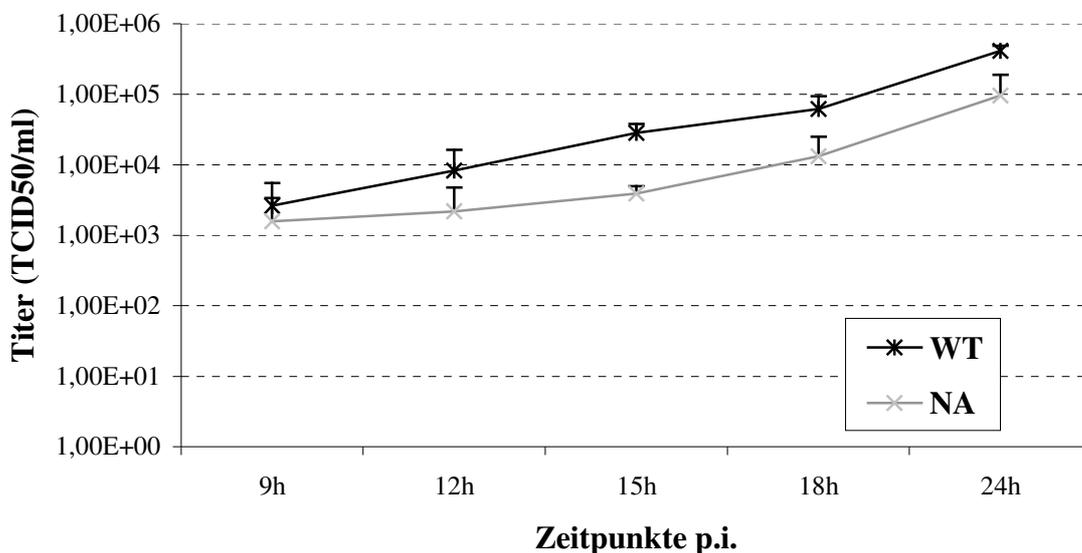


Abbildung 4.08: Wachstumskinetik von HCoV-EXO-NA.

Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung zweier Infektionsexperimente mit HCoV-EXO-NA im Vergleich zum Wildtyp. Infiziert wurden MRC-5-Zellen mit einer *moi* von eins. Die Bestimmung des Titers fand mittels Endpunktverdünnung statt. Schwarz = WT; Grau = HCoV-EXO-NA. Die Balken geben die jeweilige Standardabweichung an.

Daraufhin wurde die Wachstumskinetik und die RNA-Synthese dieses Virus näher untersucht. Hierbei zeigte sich, dass der Virustiter im Zellkulturüberstand von HCoV-EXO-NA im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert war (siehe Abbildung 4.08), wohingegen die RNA-Synthese nicht erkennbar betroffen war (siehe Abbildung 4.09)

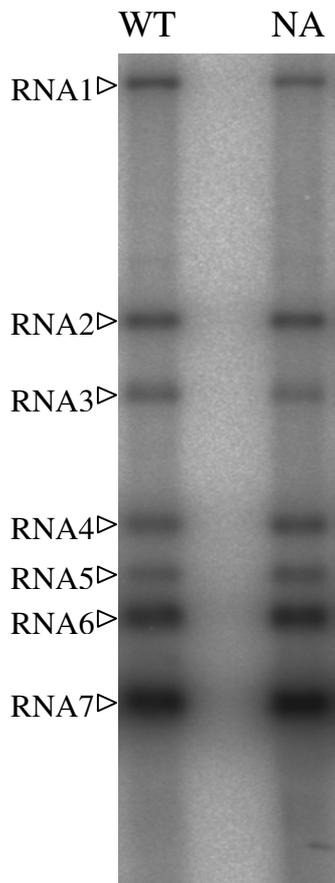


Abbildung 4.09: RNA-Synthese der Mutante HCoV-EXO-NA in Passage zehn.

Die Abbildung zeigt die Autoradiographie eines Northern Blots zum Nachweis virusspezifischer RNAs in MRC5-Zellen, die mit einer *moi* von 0,3 mit HCoV-EXO-NA (Spur NA) oder dem wildtypischen HCoV-229E (Spur WT) infiziert wurden. Die RNA-Isolation fand 24 Stunden *p.i.* statt. Die virale RNA wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde, die für die HCoV-229E nts 26857-27235 spezifisch war, detektiert.

4.2.3 Rekombinante Coronaviren mit Substitutionen in der Endonuklease, nsp15

Es konnte gezeigt werden, dass das coronavirale nsp15 *in vitro* einzel- und doppelsträngige RNA-Substrate endonukleolytisch prozessiert. Da das Enzym spezifisch für Uridylate ist und bei allen Nidoviren, jedoch keinem anderen RNA-Virus, konserviert ist, wurde nsp15 als nidovirale uridylatspezifische Endoribonuklease (NendoU) bezeichnet. *In vitro* reduzierten Substitutionen von konservierten, putativ katalytischen Resten die enzymatische Aktivität (S6427A) oder unterbanden sie sogar vollständig (H6360A, K6401A, D6408A) (Ivanov et al., 2004a). Um die Rolle des nsp15 im Replikationszyklus von HCoV-229E zu untersuchen, wurden diese vier Substitutionen in das HCoV-229E eingeführt:

<u>Mutante:</u>	<u>Substitution:</u>
HCoV-ENDO-HA:	H6360A
HCoV-ENDO-KA:	K6401A
HCoV-ENDO-DA:	D6408A
HCoV-ENDO-SA:	S6427A

Abbildung 4.10 zeigt einen Northern Blot mit der isolierten poly(A)-RNA aus BHK-HCoV-N-Zellen, die mit den Transkripten HCoV-ENDO-DA, HCoV-ENDO-KA, HCoV-ENDO-HA und HCoV-ENDO-SA von den jeweiligen mutanten HCoV-229E-cDNA-Klonen transfiziert worden waren. Die Mutante HCoV-ENDO-DA zeigt keine RNA-Synthese und rief keinen CPE bei MRC5-Zellen hervor. Sie konnte demnach als replikativ inaktive Mutante bezeichnet werden.

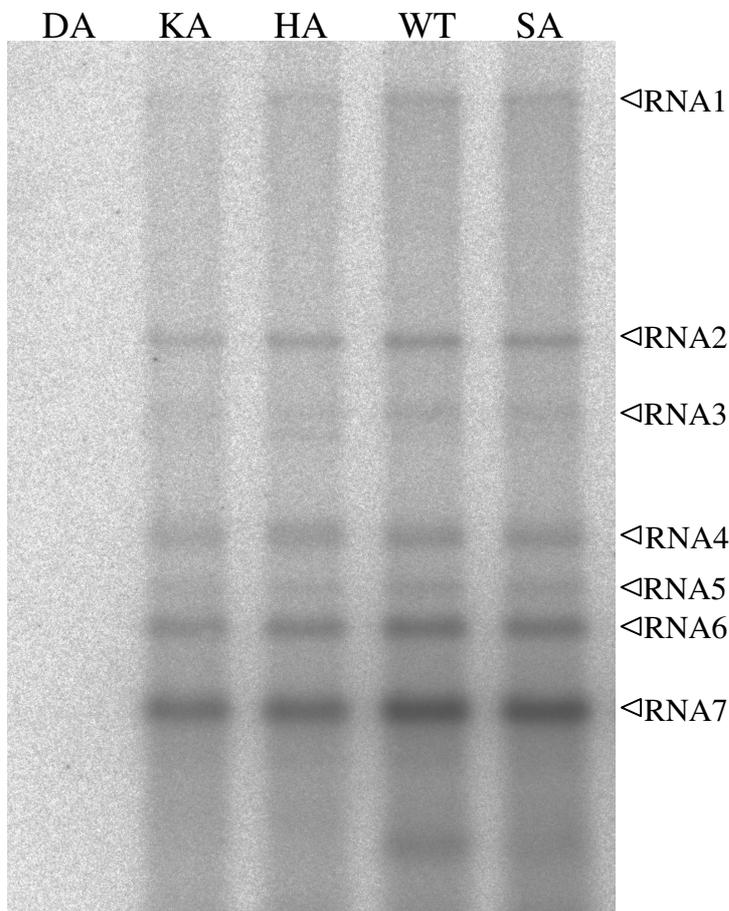


Abbildung 4.10: RNA-Synthese der nsp15-Mutanten.

Die Abbildung zeigt die Autoradiographie eines Northern Blots zum Nachweis virusspezifischer RNAs in BHK-HCoV-N-Zellen, die mit jeweils 15 μg *in vitro* transkribierter RNA einer Mutante (Spur DA: HCoV-ENDO-DA; Spur KA: HCoV-ENDO-KA; Spur HA: HCoV-ENDO-HA; Spur SA: HCoV-ENDO-SA) oder des HCoV-229E-Wildtyps (Spur WT) transfiziert worden waren. Für dieses Experiment wurde 3 Tage nach der Transfektion die poly(A)-RNA aus den transfizierten Zellen isoliert, und die virale RNA wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde, die für die HCoV-229E nts 26857-27235 spezifisch war, detektiert.

Zwei andere Mutanten (HCoV-ENDO-HA und HCoV-ENDO-KA) zeigten eine geringfügige Beeinträchtigung der RNA-Synthese, während für HCoV-ENDO-SA keine erkennbare Beeinträchtigung der RNA-Synthese festgestellt werden konnte. Alle drei Mutanten riefen in

MRC5-Zellen einen CPE hervor, wobei jedoch eine mehrmalige Passagierung nur bei HCoV-ENDO-SA gelang. Nach zehn Passagen konnte die eingeführte Ala-zu-Ser-Substitution mittels Sequenzanalyse nachgewiesen werden. Abbildung 4.11 zeigt einen Northern Blot, bei dem die virale RNA aus einer Infektion mit derselben *moi* des HCoV-ENDO-SA und des Wildtyps analysiert wurde.

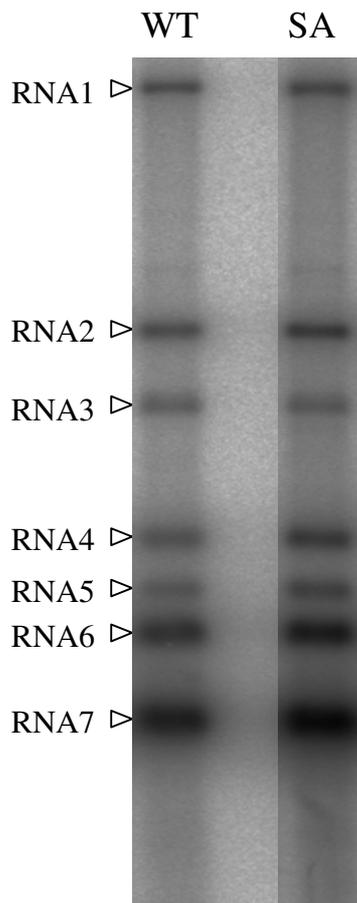


Abbildung 4.11: RNA-Synthese der Mutante HCoV-ENDO-SA in Passage zehn.

Die Abbildung zeigt die Autoradiographie eines Northern Blots zum Nachweis virusspezifischer RNAs in MRC5-Zellen, die mit einer *moi* von 0,3 mit HCoV-ENDO-SA (Spur SA) oder dem wildtypischen HCoV-229E (Spur WT) infiziert wurden. Die RNA-Isolation fand 24 Stunden *p.i.* statt. Die virale RNA wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde, die für die HCoV-229E nts 26857-27235 spezifisch war, detektiert.

Bei der Bestimmung der Wachstumskinetik (siehe Abbildung 4.12) zeigte HCoV-ENDO-SA 24 Stunden *p.i.* einen Titer von circa 60 % des Wildtyps. HCoV-ENDO-SA wurde demnach als lebensfähige Mutante klassifiziert.

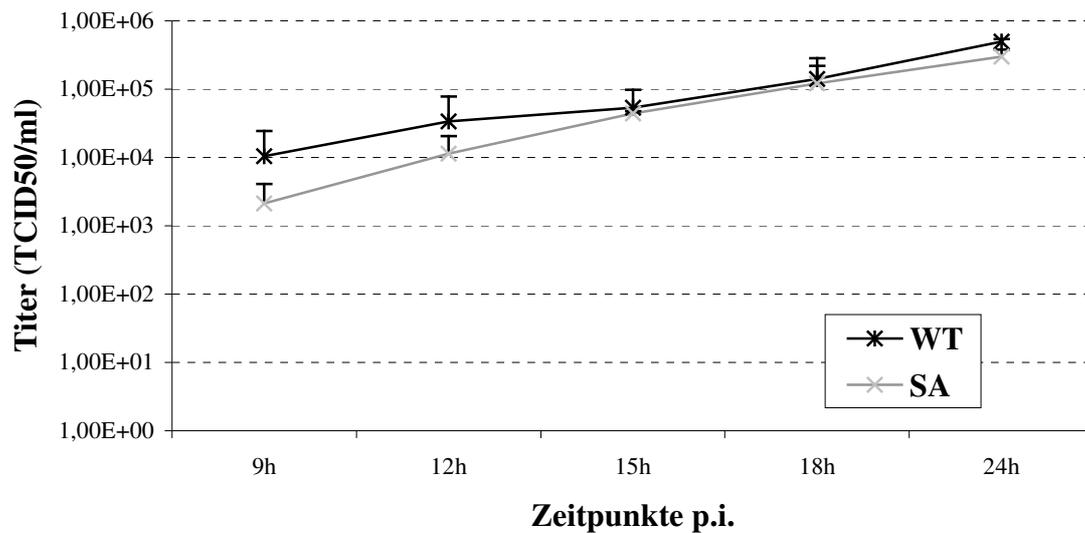


Abbildung 4.12: Wachstumskinetik von HCoV-ENDO-SA.

Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung zweier Infektionsexperimente mit HCoV-EXO-NA im Vergleich zum Wildtyp. Infiziert wurden MRC-5-Zellen mit einer *moi* von eins. Die Bestimmung des Titers fand mittels Endpunktverdünnung statt. Schwarz = WT; Grau = HCoV-ENDO-SA. Die Balken geben die jeweilige Standardabweichung an

Bei den Mutanten HA und KA gelang keine Passagierung über eine dritte Passage hinaus. Es konnte bei höheren Passagen kein CPE mehr beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde lediglich eine Passage auf MRC5 durchgeführt, wobei der resultierende Überstand einen Titer von 12000 (HCoV-ENDO-HA) bzw. 3160 (HCoV-ENDO-KA) Partikeln pro Milliliter aufwies. Mit diesem Überstand wurden MRC5 dann mit einer *moi* von 0,005 infiziert und die Wachstumskinetik über 96 Stunden bestimmt (siehe Abbildung 4.13). Mit rund einem Prozent des wildtypischen Titers erwies sich das Wachstum der beiden Mutanten als drastisch reduziert. HCoV-ENDO-KA und HCoV-ENDO-HA wurden demnach als nicht dauerhaft lebensfähig klassifiziert.

Obwohl die angesprochenen biochemischen Ergebnisse von Ivanov *et al.* (2004) in Verbindung mit den in dieser Arbeit gewonnenen revers-genetischen Daten keine klare Schlußfolgerung auf die exakte Funktion von nsp15 während der Replikation von HCoV-229E zulassen, weisen die beobachteten Phänotypen auf eine bedeutende Rolle von nsp15 im Replikationszyklus hin.

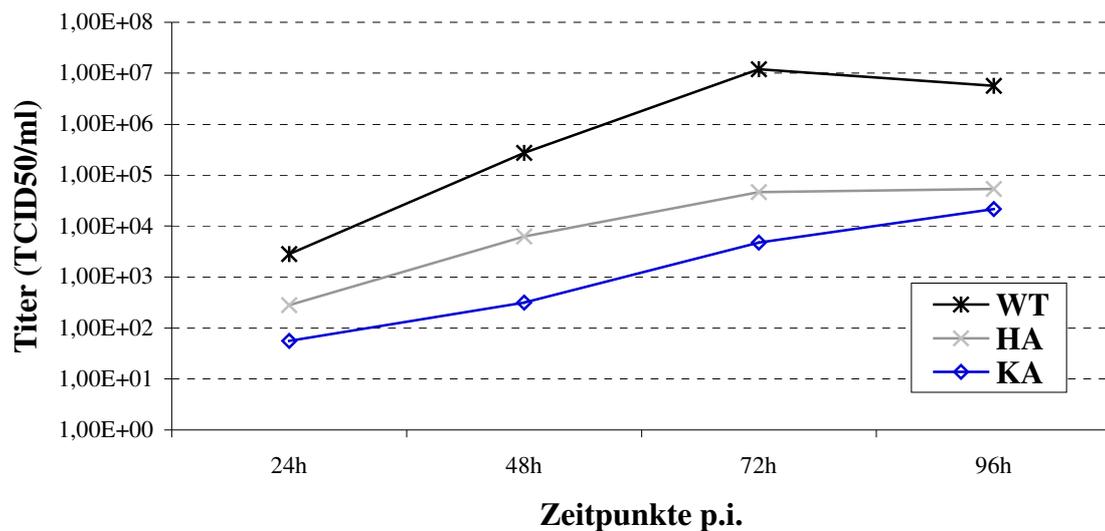


Abbildung 4.13: Wachstumskinetik von HCoV-ENDO-HA und HCoV-ENDO-KA.

Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines Infektionsexperiments mit HCoV-ENDO-HA und HCoV-ENDO-KA und dem Wildtyp. Infiziert wurden MRC-5-Zellen mit einer *moi* von 0,005. Die Bestimmung des Titers fand mittels Endpunktverdünnung statt. Schwarz = WT; Grau = HCoV-ENDO-HA; Blau = HCoV-ENDO-KA.

4.2.4 Deletion der putativen Methyltransferase, nsp16

Das Nichtstrukturprotein 16 der Coronaviren zeigt Homologien zu zellulären Ribose-2'-O-Methyltransferasen (Snijder et al., 2003). Der experimentelle Nachweis einer mit nsp16 assoziierten Methyltransferase-Aktivität oder gar der dafür verantwortlichen katalytischen Reste steht jedoch noch aus. Aus diesem Grund wurde zur Untersuchung der Bedeutung dieses Proteins während der Replikation die Expression von nsp16 unterbunden, indem das erste Codon des nsp16 durch ein STOP-Codon ersetzt wurde. Durch diese Vorgehensweise der Deletion blieben mögliche RNA-Struktur-Elemente im Leseraster von nsp16 unberührt. Die resultierende Mutante wurde HCoV- Δ MTR genannt:

<u>Mutante:</u>	<u>Substitution:</u>
HCoV- Δ MTR	S6459STOP

Wie aus Abbildung 4.14 ersichtlich, konnte keine virale RNA-Synthese mittels des transfizierten Transkripts vom HCoV-229E-cDNA-Klon vHCoV- Δ MTR induziert werden. Dies lässt den Schluß zu, dass das Nichtstrukturproteins 16 eine essentielle Rolle in der viralen RNA-Synthese besitzt.

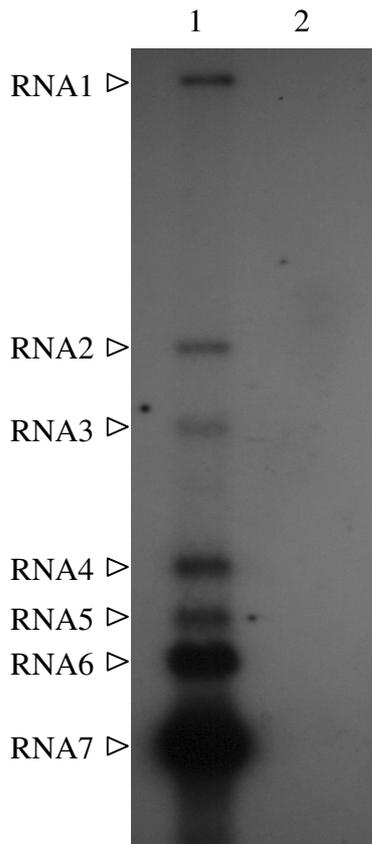


Abbildung 4.14: RNA-Synthese von HCoV- Δ MTR

Die Abbildung zeigt die Autoradiographie eines Northern Blots zum Nachweis virusspezifischer RNAs in BHK-HCoV-N-Zellen, die mit jeweils 15 μg *in vitro* transkribierter RNA der Mutante HCoV- Δ MTR (Spur 2) oder des HCoV-229E-Wildtyps (Spur 1) transfiziert worden waren. Für dieses Experiment wurde 3 Tage nach der Transfektion die poly(A)-RNA aus den transfizierten Zellen isoliert, und die virale RNA wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde, die für die HCoV-229E nts 26857-27235 spezifisch war, detektiert.

4.3 Rekombinante Coronaviren mit Substitutionen in M^{PRO}-Schnittstellen

Die Hauptprotease M^{PRO} (nsp5) ist hauptverantwortlich für die proteolytische Prozessierung der beiden großen Polyproteine. Die Spaltstelle der M^{PRO} ist im Wesentlichen durch das Aminosäuremotiv LQ|X definiert, wobei die Spaltung carboxyterminal des Glutamins stattfindet und X in der Regel für ein Serin, Alanin oder Glycin steht (Ziebuhr et al., 1998; Ziebuhr & Siddell 1999; Ziebuhr et al., 2000; Hegyi & Ziebuhr 2002). Aus früheren biochemischen Daten war geschlossen worden, dass die Freisetzung der replikations- und transkriptionsrelevanten viralen Proteine wahrscheinlich einer strengen zeitlichen Regulation unterliegt, wobei die jeweilige Aminosäuresequenz an der Schnittstelle die Effizienz ihrer proteolytischen Spaltung maßgeblich bestimmt (Hegyi & Ziebuhr 2002; Anand et al., 2003). Entsprechende Experimente, die postulierten Auswirkungen einer verlangsamt ablaufenden Prozessierung bestimmter pp1a/pp1ab-M^{PRO}-Schnittstellen auf die virale Replikation zu bestätigen, sind jedoch bisher nicht durchgeführt worden, da die dafür erforderlichen revers-genetischen Systeme für Coronaviren erst seit kurzem verfügbar sind.

4.3.1 Mutierte Schnittstellen im ORF1a-kodierten Bereich von pp1a/ pp1ab

Um die Konsequenzen einer zeitlich gestörten Regulation der pp1a/ pp1ab-Prozessierung (im ORF1a-kodierten Anteil dieser Proteine) auf den viralen Replikationszyklus zu untersuchen, wurden folgende rekombinante Coronaviren hergestellt:

<u>Mutante:</u>	<u>Substitution:</u>
HCoV-7QA8	Q3629A
HCoV-8QA9	Q3824A
HCoV-8NS9	N3825S

Laut Zhai et al. bilden nsp7 und nsp8 einen hexadekameren Superkomplex (Zhai et al., 2005). Bei der Mutante HCoV-7QA8 wurde das Erkennungsmotiv LQ|S in LA|S verändert, wodurch keine Spaltung mehr stattfinden kann und daher mit hoher Wahrscheinlichkeit die Ausbildung des Superkomplexes unterbunden wird.

Abbildung 4.15 zeigt einen Northern Blot mit der isolierten RNA aus BHK-HCoV-N-Zellen, die mit dem Transkript von dem mutanten HCoV-229E-cDNA-Klon vHCoV-7QA8 transfiziert wurden. Die Daten zeigen, dass die Unterbindung der nsp7/8-Spaltung in der Mutante HCoV-7QA8 die virale RNA-Synthese vollständig blockiert. Offenbar ist die Spaltung dieser Schnittstelle für die Ausbildung eines funktionellen Replikationskomplexes essentiell. Die Daten stehen im Einklang mit der Vorstellung, dass die Ausbildung des oben erwähnten hexadekameren nsp7-8-Superkomplexes die vorherige M^{PRO}-vermittelte Spaltung der diese Proteine flankierenden Schnittstellen voraussetzt.

Abweichend vom typischen, konservierten Erkennungsmotiv LQ|S,A lautet die Spaltstelle zwischen nsp8 und nsp9 bei allen bekannten Coronaviren LQ|N. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Motiv zwar von der M^{PRO} als Substrat erkannt wird, aber die Effizienz der Spaltung *in vitro* deutlich geringer ist (Hegyí und Ziebuhr 2002). Als Grundlage für die Untersuchung dieser Spaltstelle wurden zwei Arbeitshypothesen aufgestellt:

Die Notwendigkeit für die Konservierung des Erkennungsmotives LQ|N könnte einerseits durch eine essentielle Funktion eines verzögert gespaltenen nsp8-nsp9-Intermediates bedingt sein. Auf der anderen Seite könnte auch eine funktionell oder strukturell essentielle Rolle eines Asparaginrestes am Aminoterminus von nsp9 für die Konservierung dieses Motivs verantwortlich sein.

Um die erste Hypothese zu überprüfen, wurde eine HCoV-229E-RNA genomischer Länge (HCoV-8QA9) generiert, bei der das Erkennungsmotiv zwischen nsp8 und nsp9 durch LA|N substituiert wurde, um die Prozessierung dieser Spaltstelle auszuschalten (bzw. drastisch zu

reduzieren). Um die zweite Hypothese zu untersuchen, wurde bei der Mutante HCoV-8NS9 die ursprüngliche LQ|N-Schnittstelle durch das kanonische Erkennungsmotiv LQ|S ersetzt. Abbildung 4.15 zeigt die RNA-Synthese, die mit den transfizierten Transkripten 8QA9 und 8NS9 induziert werden konnte. Während sich HCoV-8QA9 als replikativ inaktiv erwies, konnte für HCoV-8NS9 eine RNA-Synthese auf wildtypischem Niveau nachgewiesen werden.

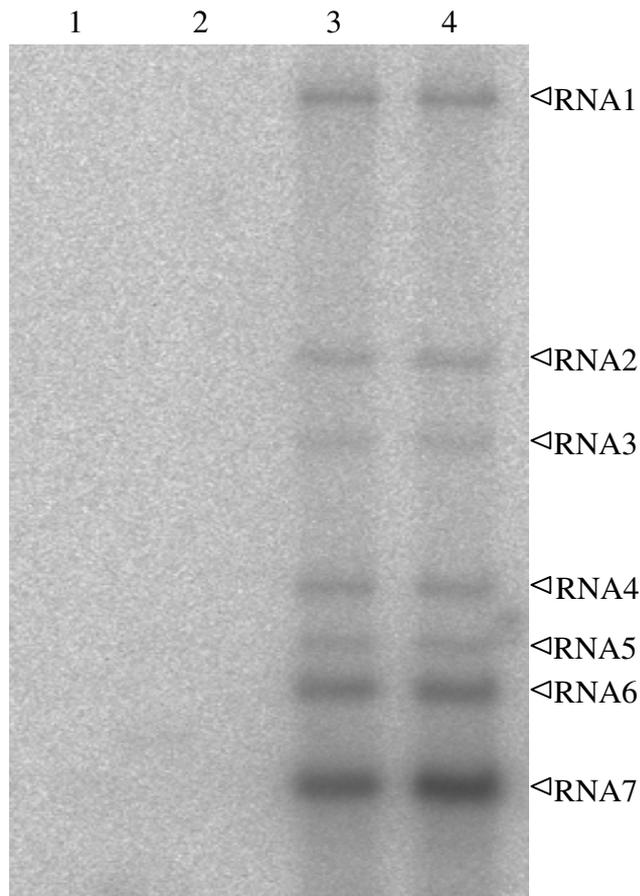


Abbildung 4.15: RNA-Synthese der pp1a-M^{PRO}-Spaltstellen-Mutanten.

Die Abbildung zeigt die Autoradiographie eines Northern Blots zum Nachweis virusspezifischer RNAs in BHK-HCoV-N-Zellen, die mit jeweils 15 µg *in vitro* transkribierter RNA einer Mutante (Spur 1: HCoV-7QA8; Spur 2: HCoV-8QA9; Spur 3: HCoV-8NS9) oder des HCoV-229E-Wildtyps (Spur 4) transfiziert worden waren. Für dieses Experiment wurde 3 Tage nach der Transfektion die poly(A)-RNA aus den transfizierten Zellen isoliert, und die virale RNA wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde, die für die HCoV-229E nts 26857-27235 spezifisch war, detektiert.

Mit dem Transfektionsüberstand von HCoV-8NS9 konnte ein CPE in MRC-5-Zellen hervorgerufen werden. Auch nach acht Passagen konnte die eingeführte Asn-zu-Ser-Substitution mittels Sequenzanalyse bestätigt werden. Die Analyse der Wachstumskinetik zeigte 24 Stunden *p.i.* einen Titer auf wildtypischem Niveau (siehe Abbildung 4.16). Mittels Northern Blottings wurde darüber hinaus bestätigt, dass das in Zellkultur passagierte HCoV-8NS9-Virus eine RNA-Synthese aufwies, die sich nicht erkennbar vom Wildtyp unterschied (Abb. 4.17).

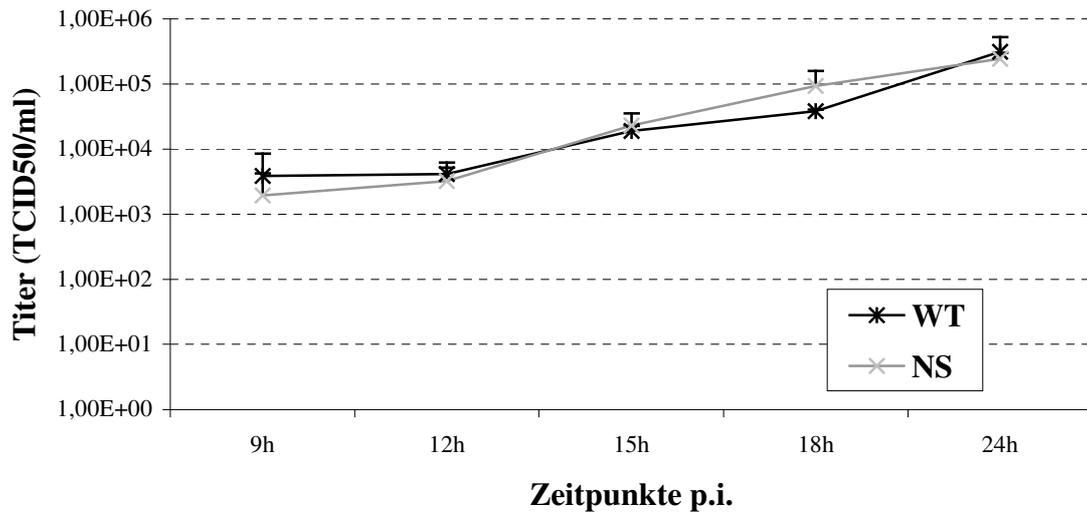


Abbildung 4.16: Wachstumskinetik von HCoV-8NS9.

Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung zweier Infektionsexperimente mit HCoV-8NS9 (NS) und dem Wildtyp. Infiziert wurden MRC-5-Zellen mit einer *moi* von eins. Die Bestimmung des Titers fand mittels Endpunktverdünnung statt. Schwarz = WT; Grau = HCoV-8NS9. Die Balken geben die jeweilige Standardabweichung an.

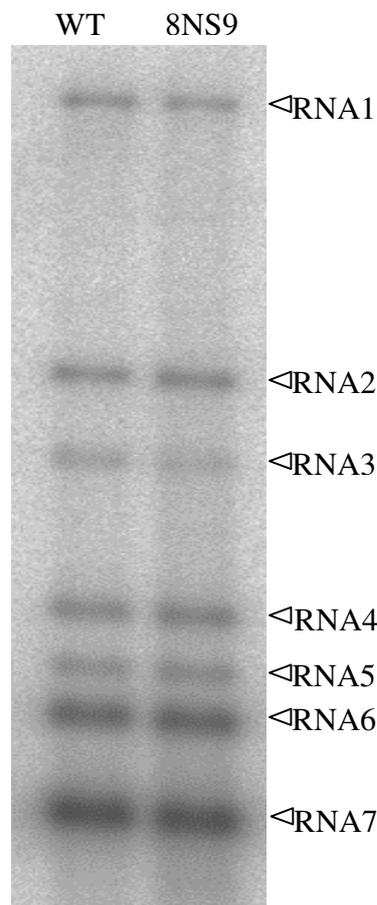


Abbildung 4.17: RNA-Synthese der Mutante HCoV-8NS9 in Passage zehn.

Die Abbildung zeigt die Autoradiographie eines Northern Blots zum Nachweis virusspezifischer RNAs in MRC5-Zellen, die mit einer *moi* von 0,3 mit HCoV-8NS9 (Spur NS) oder dem wildtypischen HCoV-229E (Spur WT) infiziert wurden. Die RNA-Isolation fand 24 Stunden *p.i.* statt. Die virale RNA wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde, die für die HCoV-229E nts 26857-27235 spezifisch war, detektiert.

Die Tatsache, dass die beiden Mutanten HCoV-7QA8 und HCoV-8QA9 keine RNA-Syntheseaktivität besaßen, lässt darauf schließen, dass eine unzureichende Assemblierung des erwähnten nsp7-8-Superkomplexes durch eine stark verzögerte oder gar vollständig blockierte Prozessierung der N- und C-terminalen nsp8-Spaltstellen nicht toleriert wird. Dies wiederum lässt auf eine essentielle Funktion des nsp7-8-Komplexes in der viralen Replikation schließen, wie sie von Zhai et al. anhand von Strukturdaten postuliert worden war (Zhai et al., 2005).

Die Ursache für die Konservierung einer nichtkanonischen Spaltstelle zwischen nsp8 und nsp9 konnte hingegen mit den beiden Mutanten HCoV-8QA9 und HCoV-8NS9 nicht überzeugend geklärt werden.

4.3.2 Mutierte Schnittstellen im ORF1b-kodierten Bereich von pp1ab

Um die möglichen Auswirkungen von weniger effektiv prozessierten Spaltstellen im ORF1b-kodierten pp1ab-Bereich auf die Virusreplikation zu untersuchen, wurden folgende rekombinante Coronaviren hergestellt:

<u>Mutante:</u>	<u>Substitution:</u>
HCoV-12AV13	A4996V
HCoV-13SV14	S5593V
HCoV-14GV15	G6111V
HCoV-15SV16	S6459V

Bei allen vier Mutanten wurde die Aminosäure an der P1'-Position der jeweiligen M^{PRO}-Schnittstelle durch Valin substituiert. Wie zuvor beschrieben, zeichnet sich die P1'-Position des kanonischen Erkennungsmotivs der M^{PRO} durch das Vorhandensein kleiner aliphatischer Aminosäuren, meist Alanin, Glycin oder Serin, aus. Die Kristallstruktur der M^{PRO} lässt jedoch die Schlussfolgerung zu, dass die Seitenkette von Valin etwas zu groß für die S1'-Bindetasche ist (Anand et al., 2002; Anand et al., 2003). Die Valinmutanten sollten demnach eine erkennbar herabgesetzte Prozessierungseffizienz an diesen Spaltstellen aufweisen.

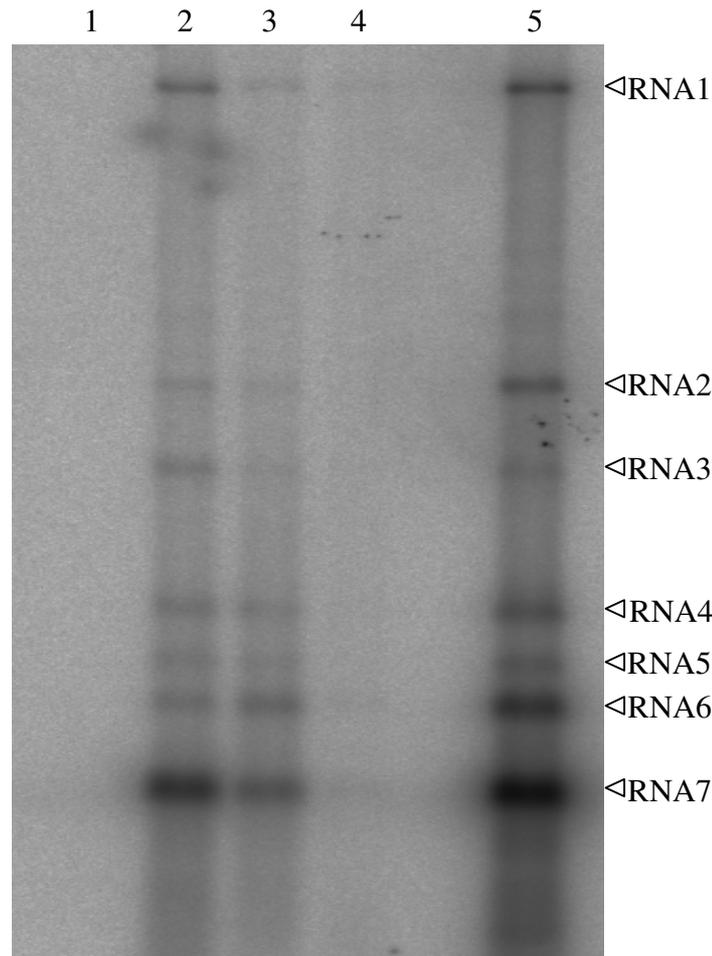


Abbildung 4.18: RNA-Synthese der M^{PRO}-Spaltstellen-Mutanten im ORF1b-kodierten Protein.

Die Abbildung zeigt die Autoradiographie eines Northern Blots zum Nachweis virusspezifischer RNAs in BHK-HCoV-N-Zellen, die mit jeweils 15 µg *in vitro* transkribierter RNA einer Mutante (Spur 1: HCoV-12AV13; Spur 2: HCoV-13SV14; Spur 3: HCoV-14GV15; Spur 4: HCoV-15SV16) oder des HCoV-229E-Wildtyps (Spur 5) transfiziert worden waren. Für dieses Experiment wurde 3 Tage nach der Transfektion die poly(A)-RNA aus den transfizierten Zellen isoliert, und die virale RNA wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde, die für die HCoV-229E nts 26857-27235 spezifisch war, detektiert.

Abbildung 4.18 zeigt einen Northern Blot mit der isolierten RNA aus BHK-HCoV-N-Zellen, die mit den Transkripten HCoV-12AV13, HCoV-13SV14, HCoV-14GV15 und HCoV-15SV16, die von den entsprechenden mutanten HCoV-229E-cDNA-Klonen generiert worden waren, transfiziert wurden. Für HCoV-12AV13 konnte keine RNA-Synthese nachgewiesen werden. HCoV-13SV14, HCoV-14GV15 und HCoV-15SV16 zeigten hingegen eine signifikante, wenn auch reduzierte, RNA-Synthese, wobei jedoch bei den weiter C-terminal gelegenen pp1ab-Spaltstellen die negativen Auswirkungen auf die RNA-Synthese deutlich zunahm. Der Phänotyp des Virus HCoV-13SV14 wies neben einer reduzierten Gesamt-RNA-Synthese ein untypisches Mengenverhältnis zwischen sgRNA6 und sgRNA7 auf (Abbildung 4.19).

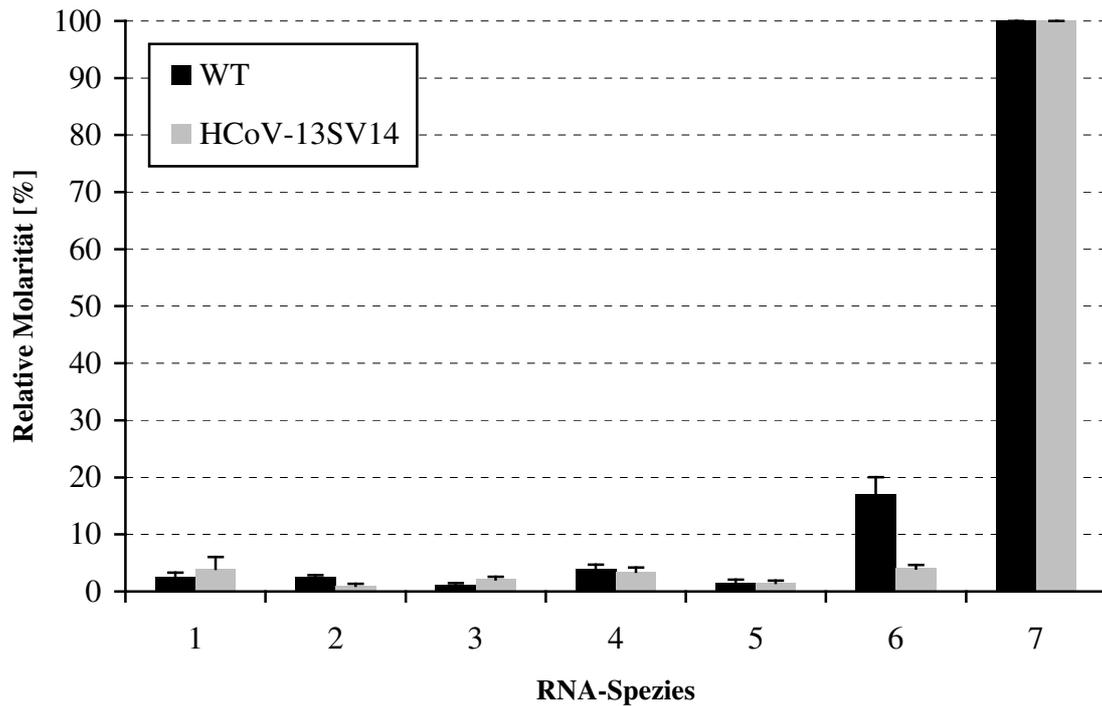


Abbildung 4.19: Relative Signalstärke der einzelnen der RNA-Spezies bei HCoV-13SV14.

Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von RNA-Quantifizierungen am Phosphorimager aus mehreren Transfektionsexperimenten mit der Mutante HCoV-13SV14 oder dem WT. Die Balken geben die jeweilige Signalstärke einer RNA-Spezies bezogen auf den Wert der jeweiligen sgRNA7 an. Der Wert für sgRNA7 wurde auf 100 % gesetzt. Schwarz = WT; Grau = HCoV-13SV14. Die vertikale Linie gibt die jeweilige Standardabweichung an.

Mit keinem der P0-Zellkultur-Überstände der Viren HCoV-13SV14, HCoV-14GV15 und HCoV-15SV16 konnte ein CPE in MRC-5-Zellen hervorgerufen werden. Ein Northern-Blot-Experiment mit poly(A)-RNA aus diesen MRC-5-Zellen zeigte bei HCoV-13SV14 eine sehr geringe und bei HCoV-14GV15 (Abbildung 4.20a) sowie HCoV-15SV16 (4.20b) keine RNA-Synthese, weshalb HCoV-14GV15 als nicht überlebensfähig und HCoV-14GV15 und HCoV-15SV16 als nicht lebensfähig eingestuft wurden.

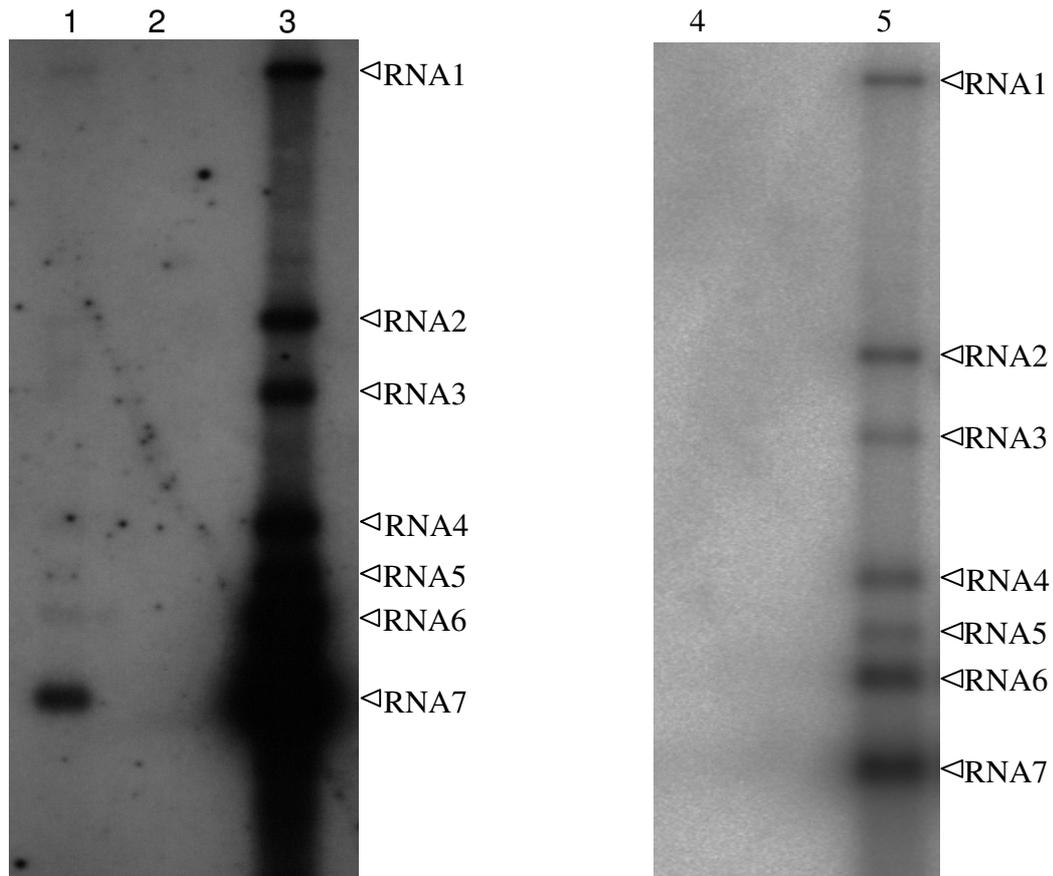


Abb. 4.20a

Abb. 4.20b

Abbildung 4.20a und 4.20b: RNA-Synthese der Mutanten HCoV-13SV14, HCoV-14GV15 und HCoV-15SV16 in der ersten Passage.

Die Abbildungen zeigen die Autoradiographie von Northern Blots zum Nachweis virusspezifischer RNAs in MRC5-Zellen, die mit einem Milliliter des Transfektionsüberstandes der jeweiligen Mutanten (Spur 1: HCoV-13SV14; Spur 2: HCoV-14GV15; Spur 4: HCoV15SV16) oder mit dem HCoV-229E-Wildtyp (Spuren 3 und 5) infiziert wurden. Die RNA-Isolation fand 24 Stunden *p.i.* statt. Die virale RNA wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde, die für die HCoV-229E nts 26857-27235 spezifisch war, detektiert.

4.4 Das HCoV-229E-Replikonsystem

Als Replikon bezeichnet man eine intrazelluläre RNA, die in der Lage ist, sich selbstständig zu replizieren, da sie alle für die Replikation notwendigen Gene und Strukturelemente besitzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein auf HCoV-229E basierendes Replikon hergestellt und über mehrere Monate hinweg in BHK-21-Zellen kultiviert.

4.4.1 Herstellung

Zur Herstellung des Replikons wurde fast der gesamte für die verschiedenen Strukturproteine kodierende Bereich (HCoV-229E nts 20569-25653) durch das Reportergen *gfp* substituiert. Die Expression von *gfp* wurde durch das *upstream* verbliebene TRS-Element des früheren

Leserasters des S-Gens sichergestellt. Das für das N-Protein kodierende Leseraster wurde erhalten, da es für eine effiziente HCoV-229E-Replikation erforderlich ist (Thiel et al., 2001b; Schelle et al., 2005).

Um diejenigen Zellen selektieren zu können, in denen die virale RNA stabil repliziert, wurde zwischen den Nichtstrukturproteinen 1 und 2 ein Neomycin-Resistenzgen eingefügt. Dieses wurde zusätzlich von einer sogenannten TaV-2A-Sequenz und einem EMCV-IRES-Element flankiert. Die Abfolge TaV-*neo*^R-IRES ersetzte die drei Glycine am Carboxyterminus des nsp1 (HCoV-229E nts 617-625), so dass die Erkennungssequenz für eine Spaltung durch PL1- und PL2-Proteasen verloren ging.

Die nsp1-nsp2-Schnittstelle wurde als Insertionsstelle für die Fremdsequenz ausgewählt, da *neo*^R innerhalb der Replikaseregion platziert werden sollte und Vorversuche gezeigt hatten, dass diese Region zusätzliche Sequenzen toleriert (nicht gezeigt).

Die TaV-2A-Sequenz stammt aus dem *Thosea-asigna-Virus* und kodiert für ein kurzes Peptid, das an seinem C-Terminus ein Glycin-Prolin-Dipeptid autoproteolytisch spaltet. Möglicherweise kommt es stattdessen auch zu einer Translationstermination und -reinitiation, die jedoch im Ergebnis einer Proteolyse der Glycin-Prolin-Peptidbindung gleichkommt (Donnelly et al., 2001).

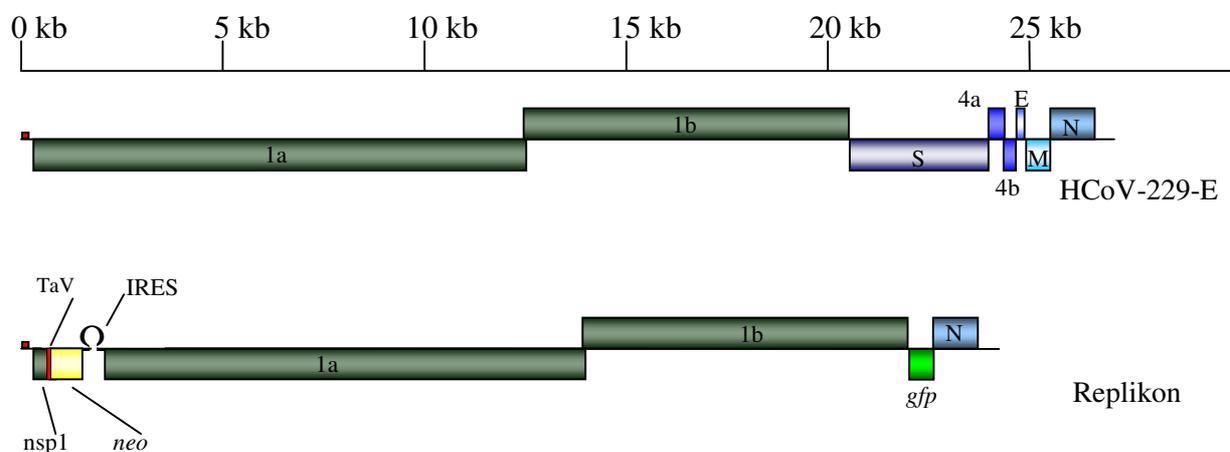


Abbildung 4.21 Strukturelle Organisation des Replikons

Abbildung 4.21 zeigt schematisch die Struktur des Replikons im Vergleich zum Genom des HCoV-229E. Die Orientierung verläuft in 5'→3'-Richtung. ORFs sind als Balken mit ihren jeweiligen Namen dargestellt. Zwischen ORF1a und ORF1b befindet sich das *frameshift*-Element. Am 5'-Ende jeder RNA befindet sich der Leader (rotes Rechteck).

Die Abfolge von „TaV-Sequenz“, *neo*^R und IRES-Element stellt die Expression des Neomycin-Resistenzgens sicher, indem die am AUG-Startkodon begonnene Translation des ORF1a über die „TaV-Sequenz“ und *neo*^R fortgesetzt wird und schließlich am STOP-Kodon von *neo*^R terminiert. Dabei entsteht ein nsp1-TaV-Fusionsprotein und das durch die TaV-Aktivität N-

terminal gespaltene *neo*-Genprodukt mit einem zusätzlichen Prolin vor seinem aminoterminalen Methionin. Die Translation der Replikase, beginnend mit einem zusätzlich eingefügten Methionin am Aminoterminus von *nsp2*, wird hingegen durch das EMCV-IRES-Element sichergestellt (siehe Abbildung 4.21).

4.4.2 Analyse

Drei Tage nach der Transfektion wurden die sogenannten Replikonzellen, in denen die Replikon-RNA (Rep-1) replizierte, mit verschiedenen Konzentrationen an Geneticin selektiert. Dabei zeigte sich, dass 400 µg Geneticin pro Milliliter Medium eine hinreichende Konzentration zur Selektion der Zellen darstellte. Vier Tage nach der Transfektion waren erste schwach grün leuchtende Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop zu beobachten und zwei Wochen nach der Transfektion konnten einzelne Klone aus den entstandenen Zellkolonien isoliert werden.

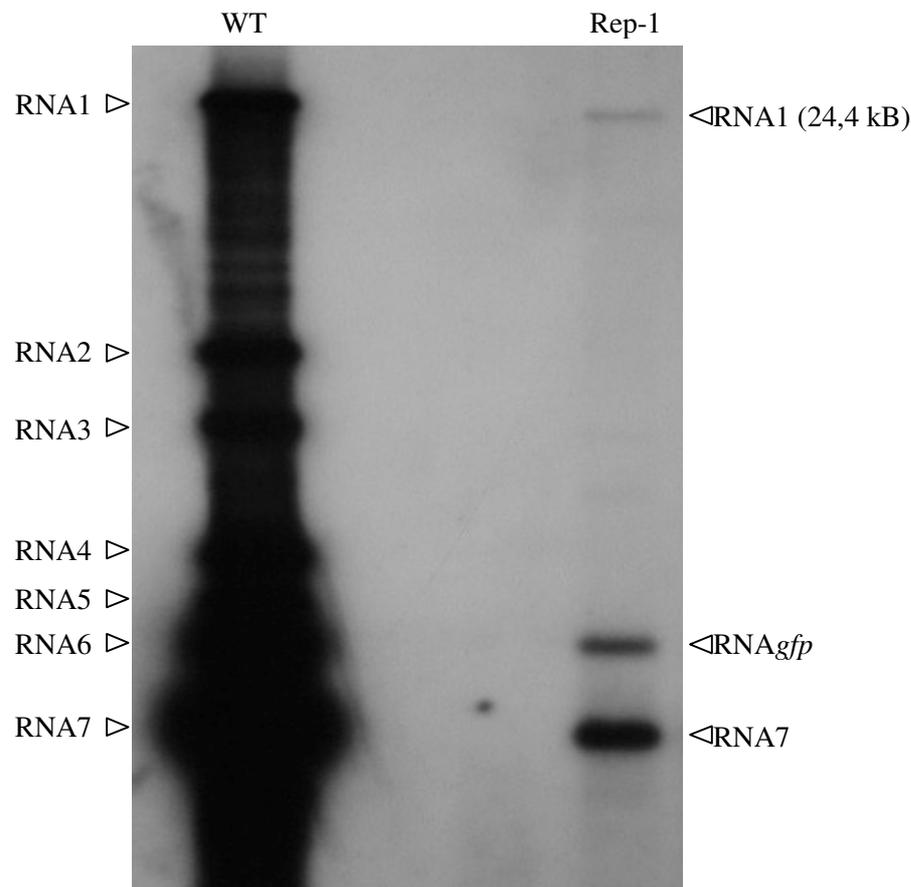


Abbildung 4.22: Synthese Replikon-spezifischer RNAs.

Die Abbildung zeigt die Autoradiographie eines Northern Blots zum Nachweis replikonspezifischer RNAs in Replikon-Zellen, die einen Monat kultiviert worden waren (Spur Rep-1), oder poly(A)-RNA aus MRC5-Zellen, die mit HCoV-229E infiziert worden waren (Spur WT). RNA1 = das jeweilige Genom (bzw. Volle-Länge-RNA); RNA_{gfp} = *gfp*-mRNA. Die virale RNA wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde, die für die HCoV-229E nts 26857-27235 spezifisch war, detektiert.

Abbildung 4.22 zeigt einen Northern Blot mit der isolierten RNA aus einem Klon der replikontragenden Zellen BHK-Rep1 nach einem Monat in Kultur. Es sind die drei RNA-Spezies Rep1-RNA, *gfp*-mRNA und die HCoV-229E-sgRNA7 (N-mRNA) zu erkennen.

Die Expression von *gfp* wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie bestätigt (Abbildung 4.23).

Die BHK-Rep1-Zellen konnten nach 2 Monaten in Kultur in flüssigem Stickstoff eingelagert und anschließend wieder in Kultur gebracht werden, ohne dass ein Verlust der Replikon-RNA oder der *gfp*-Expression auftrat.

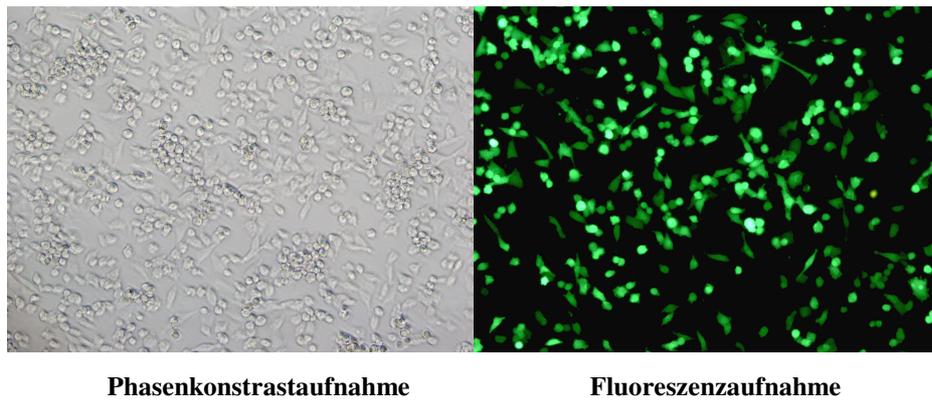


Abbildung 4.23: *gfp*-Expression des Replikons.

Die Abbildungen zeigen eine Phasenkontrast- und eine Fluoreszenzaufnahme der Replikonzellen.

HCoV-229E nts	Replikon nts	Nukleotidaustausch	Aminosäuresubstitution	Betroffene Domäne
536	536	C → A	P → T	nsp1
1897	3350	A → G	-	nsp2
26572	23661	U → C	V → A	N-Gen

Abbildung 4.24: Übersicht über die Mutationen, die nach zwei Monaten in Kultur im kodierenden Bereich eines Replikonklones identifiziert wurden.

„-“ bedeutet, dass die Mutationen entweder keinen Einfluss auf die resultierende Aminosäuresequenz hatten, also still waren

Nach zwei Monaten in Zellkultur wurde von einem der Replikon-Klone poly(A)-RNA isoliert und die kodierenden Bereiche der entsprechenden cDNA komplett sequenziert. Dabei konnten drei Mutationen identifiziert werden, die in dem verwendeten Vacciniavirusklon vTNI nicht vorhanden gewesen waren. Es befand sich jeweils eine Mutation in nsp1, nsp2 und im N-Gen (siehe Abbildung 4.24).

Mittels des gezeigten Replikonsystems konnte der Beweis erbracht werden, dass es möglich ist, ein Replikon auf der Basis von HCoV-229E herzustellen, das über längere Zeit in Zellen kultiviert werden kann. Die mögliche biologische Relevanz der gefundenen Mutationen bleibt noch zu untersuchen.

4.4.3 Anwendung des Replikons

Wie im Kapitel 4.2.3. beschrieben, erwies sich die Mutante HCoV-ENDO-HA als nicht überlebensfähig, obwohl direkt nach der Transfektion eine RNA-Synthese auf annähernd wildtypischem Niveau stattfand.

Um die Frage zu beantworten, ob der Defekt erst spät im Replikationszyklus relevant wird, wurde ein Replikon mit derselben Mutation in nsp15 hergestellt:

<u>Mutante:</u>	<u>Substitution (Position im pp1ab von HCoV-229E):</u>
TNI-ENDO-HA:	H6360A

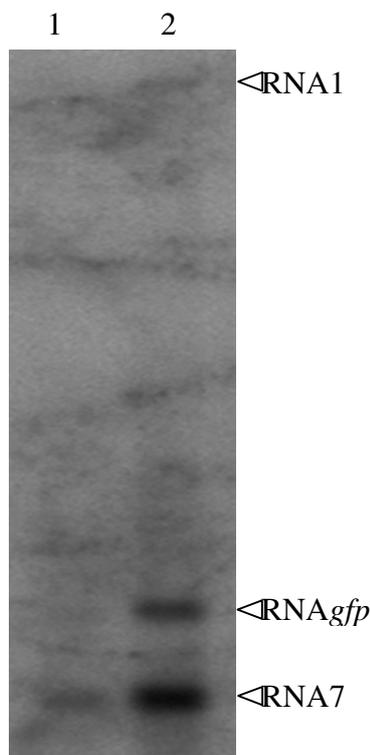
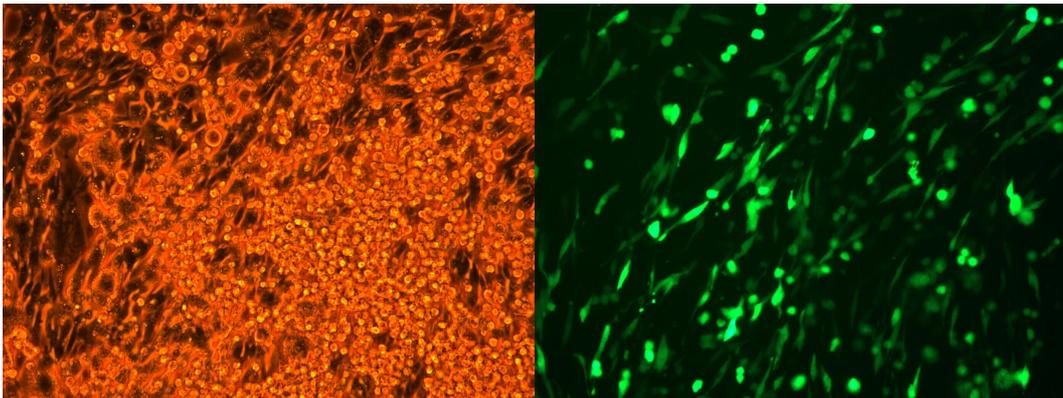


Abbildung 4.25: RNA-Synthese von Rep-1_ENDO-HA-RNA in P0.

Die Abbildung zeigt die Autoradiographie eines Northern Blots zum Nachweis replikonspezifischer RNAs in BHK-21-Zellen, die mit 15 µg transkribierter RNA von TNI-ENDO-HA (Spur 1) oder wildtypischer Rep-1-RNA (Spur 2) transfiziert wurden. RNA1 = "Genom" (Volle-Länge-Rep-1-RNA); RNAgfp = *gfp*-mRNA. Die virale RNA wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde, die für die HCoV-229E nts 26857-27235 spezifisch war, detektiert.

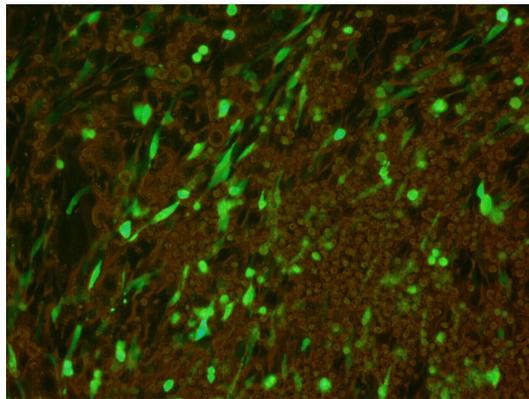
Abbildung 4.25 zeigt einen Northern Blot mit der zum Zeitpunkt P0 isolierten RNA des Replikons TNI-ENDO-HA. Die RNA-Synthese von TNI-ENDO-HA erwies sich als deutlich reduziert im Vergleich zum wildtypischen Replikon.

Abbildung 4.26 zeigt Aufnahmen, die von der Replikonmutante Rep-1_ENDO-HA unter dem Fluoreszenzmikroskop gemacht wurden und eine Expression des Reportergens *gfp* nachwiesen.



4.26a Phasenkontrastaufnahme

4.26b Fluoreszenzaufnahme



4.26c Überlagerung

Abbildung 4.26 a, b, c: *gfp*-Expression des Replikons.

Die Abbildung zeigt Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen der Replikonzellen Rep-1_ENDO-HA. Darunter ist die Überlagerung der beiden Aufnahmen gezeigt.

Nach eineinhalb Monaten in Zellkultur wurde die polyadenylierte RNA aus den Replikonzellen Rep-1_ENDO-HA isoliert und mittels Northern Blottings analysiert (Abbildung 4.27). Parallel dazu wurde die Mutationsstelle sequenziert. Es zeigte sich, dass die Mutation H6758A stabil vorhanden war.

Die Lebensfähigkeit des Replikon Rep-1_ENDO-HA legt die Vermutung nahe, dass *nsp15* keine essentielle Funktion innerhalb der viralen RNA-Synthese besitzt.

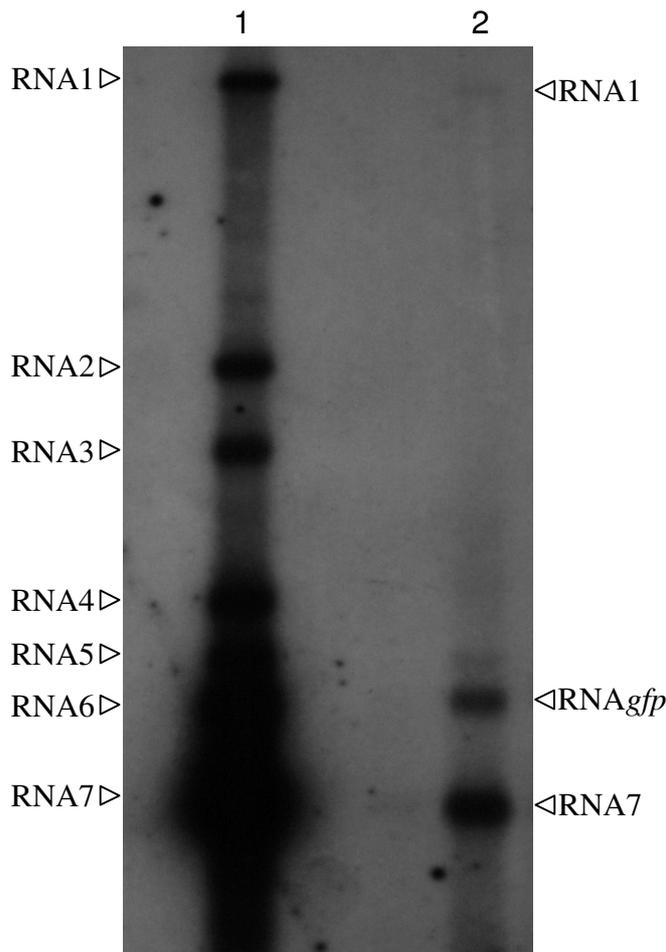


Abbildung 4.27: RNA-Synthese des Replikons Rep-1_ENDO-HA.

Die Abbildung zeigt die Autoradiographie eines Northern Blots zum Nachweis HCoV-229E-spezifischer RNAs in Rep-1-ENDO-HA-Replikon-Zellen, die einen Monat kultiviert wurden (Spur 2), oder MRC5-Zellen, die mit HCoV-229E infiziert wurden (Spur 1). RNA1 = das jeweilige "Genom" (Volle-Länge-RNA); RNA_{gfp} = *gfp*-mRNA. Die virale RNA wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde, die für die HCoV-229E nts 26857-27235 spezifisch war, detektiert.

4.5 Chimäre Viren

Bei den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten chimären Viren wurden nichtstrukturelle Proteine von HCoV-229E durch das oder die homologe(n) Protein(e) der beiden nahe verwandten Coronaviren PEDV-CV777 oder HCoV-NL63 substituiert. Das langfristige Hauptziel der Experimente mit chimären Viren war dabei, adaptive Mutationen festzustellen, über die Rückschlüsse auf jeweilige Interaktionspartner gezogen werden könnten.

4.5.1 Substitution von nsp8

Mit Hilfe der beiden folgenden rekombinanten Coronaviren sollte die Funktion des nsp8 im Replikationszyklus untersucht werden.

Mutante:

HCoV-8PEDV:

HCoV-8NL:

Substitution:

nsp8 von PEDV

nsp8 von HCoV-NL63

Abbildung 4.28 zeigt einen Northern Blot mit der isolierten RNA aus BHK-HCoV-N-Zellen, die mit den Transkripten HCoV-8PEDV (Spur 2) und HCoV-8NL (Spur 3), die von den jeweiligen mutanten HCoV-229E-cDNA-Klonen generiert worden waren, transfiziert wurden. Die Daten zeigten, dass in beiden Fällen keine RNA-Synthese stattgefunden hatte.

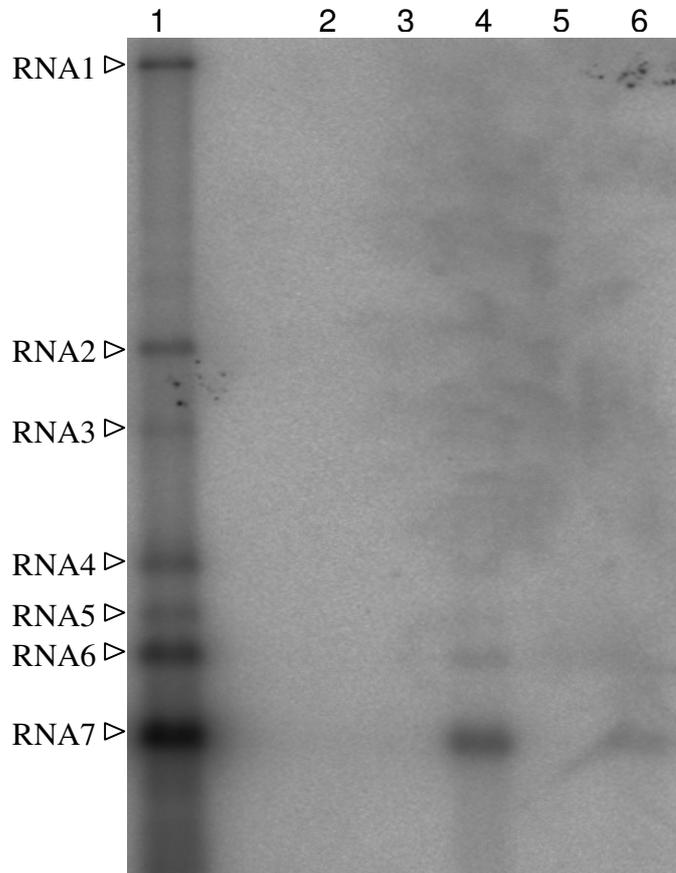


Abbildung 4.28: RNA-Synthese verschiedener nsp7/8/9-Chimären in P0.

Die Abbildung zeigt die Autoradiographie eines Northern Blots zum Nachweis virusspezifischer RNAs in BHK-HCoV-N-Zellen, die mit jeweils 15 µg *in vitro* transkribierter RNA einer Mutante (Spur 2: HCoV-8PEDV; Spur 3: HCoV-8NL; Spur 4: HCoV-7+8NL; Spur 5: HCoV-8+9NL; Spur 6: HCoV-7-9NL) oder des HCoV-229E-Wildtyps (Spur 1) transfiziert worden waren. Für dieses Experiment wurde 3 Tage nach der Transfektion die poly(A)-RNA aus den transfizierten Zellen isoliert, und die virale RNA wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde, die für die HCoV-229E nts 26857-27235 spezifisch war, detektiert.

4.5.2 Substitution von nsp7-9

Nachdem die funktionelle Substitution des nsp8 durch die homologen Proteine aus PEDV-CV777 und HCoV-NL63 nicht möglich war, wurde der zu substituierende Abschnitt auf die beiden flankierenden Proteine nsp7 und nsp9 erweitert, da neuere Strukturdaten Interaktionen des nsp8 mit den Nichtstrukturproteinen 7 und 9 nachgewiesen hatten (Sutton et al., 2004; Zhai et al., 2005).

Mutante:

HCoV-7-9NL:

Substitution:

nsp7-9 von HCoV-NL63

Mittels Northern Blottings (siehe Abbildung 4.28) konnte gezeigt werden, dass die Transfektion des Transkripts HCoV-7-9NL zu einer viralen RNA-Synthese auf sehr niedrigem Niveau führt (Spur 6). Diese Syntheseaktivität lag deutlich unter der des Wildtyps (Spur 1). Mit dem Überstand von P0 ließ sich ein CPE in MRC-5-Zellen hervorrufen. Sobald dieser CPE beobachtet werden konnte, wurde mit dem Zellkulturüberstand eine Verdünnungsreihe angelegt, durch die insgesamt 12 Virusklone isoliert werden konnten, die dann zwei bis fünf weitere Male auf MRC-5-Zellen passagiert wurden, bevor sie näher charakterisiert wurden.

Diese 12 Klone wurden aus drei unterschiedlichen Transfektionsexperimenten isoliert, wobei die Klone der Serie A und B aus der Transfektion 1, die Klone der Serie C aus der Transfektion 2 und die Klone der Serie D aus der Transfektion 3 stammten.

Die Genome der Klone A1, A2, A3, B2, B3, C1, C2, C3, D1, D2, D3 und D4 wurden bis auf die 5'-terminalen 25 Nukleotide komplett sequenziert. Bei den Klonen HCoV-7-9NL B2 und C3 wurden darüber hinaus auch diese 25 fehlenden Nukleotide mittels 5'-RACE bestimmt.

Das Ergebnis der Sequenzanalyse ist in Abbildung 4.29 tabellarisch dargestellt. Die Klone A1 und A2 erwiesen sich als identisch und „Klon D4“ war offenbar ein Gemisch aus mehreren Klonen. Insgesamt standen demnach also nur zehn Klone zur Untersuchung der RNA-Synthese und Wachstumskinetik zur Verfügung. Von der Population D4 wurden anschließend noch 3 Einzelklone isoliert und die zuvor nicht eindeutigen Bereiche erneut sequenziert (siehe Abbildung 4.31). Zur grafischen Darstellung der Sequenzierungsdaten wurde die Abbildung 4.30 erstellt.

Klon	HCoV-229E nts	Nukleotid- austausch	Aminosäure- substitution	Betroffenes Protein
A1/A2	9924	C→U	A→V	nsp5
	11001	C→U	A→V	nsp7 NL
	16765	G→A	V→I	nsp13
A3	5272	U→G	D→E	nsp3
	9924	C→U	A→V	nsp5
	11001	C→U	A→V	nsp7 NL
	16765	G→A	V→I	nsp13
	19006	U→G	S→A	nsp15
B2	12525	C→U	S→F -	nsp11 nsp12
	15640	C→U	L→F	nsp13
	17013	C→A	D→E	nsp13
B3	8404	U→A	N→K	nsp4
	16328	A→C	N→T	nsp13
C1	12525	C→U	S→F -	nsp11 nsp12
	16192	G→U	V→L	nsp13
	21402	C→U	T→I	S
C2	16192	G→U	V→L	nsp13
	21402	C→U	T→I	S
C3	11610	A→C	D→A	nsp8 NL
	15196	G→U	T→A	nsp12
	16192	G→U	V→L	nsp13
	21402	C→U	T→I	S
	27002	U→C	-	3'-NTR
D1	12522	A→G	E→G -	nsp11 nsp12
	16108	A→G	I→V	nsp13
D2	10835	U→G	L→V	nsp6
	26484	C→U	P→S	N
D3	11133	U→C	L→P	nsp7 NL
D4	12525!	C→C/A/T	S→T -	nsp11 nsp12
	13808	C→U	T→I	nsp12
	16722!	G→G/U	Q→H	nsp13
	16793!	C→C/U	T→I	nsp13
	21960!	A→A/C	D→A	S

Abbildung 4.29: Mutationen der isolierten HCoV-7-9NL-Klone

Die Abbildung zeigt tabellarisch das Resultat der Sequenzierung der 12 Klone von HCoV-7-9NL. Aufgeführt wurden die jeweils bei den Klonen gefunden Mutationen. „-“ bedeutet, dass die Mutationen entweder keinen Einfluss auf die resultierende Aminosäuresequenz hatten, also still waren, oder sich die Mutation im nichttranslatierten Bereich befand. Ein Suffix „NL“ bedeutet, dass sich der Nukleotidaustausch in einer von HCoV-NL63 codierten Domäne befindet. „!“ bedeutet, dass an der betreffenden Stelle keine eindeutige Nukleotidzuordnung getroffen werden konnte, es sich folglich nicht um einen Einzelklon, sondern um eine koexistierende Mischung aus mehreren Virusklonen handelt.

4 Ergebnisse

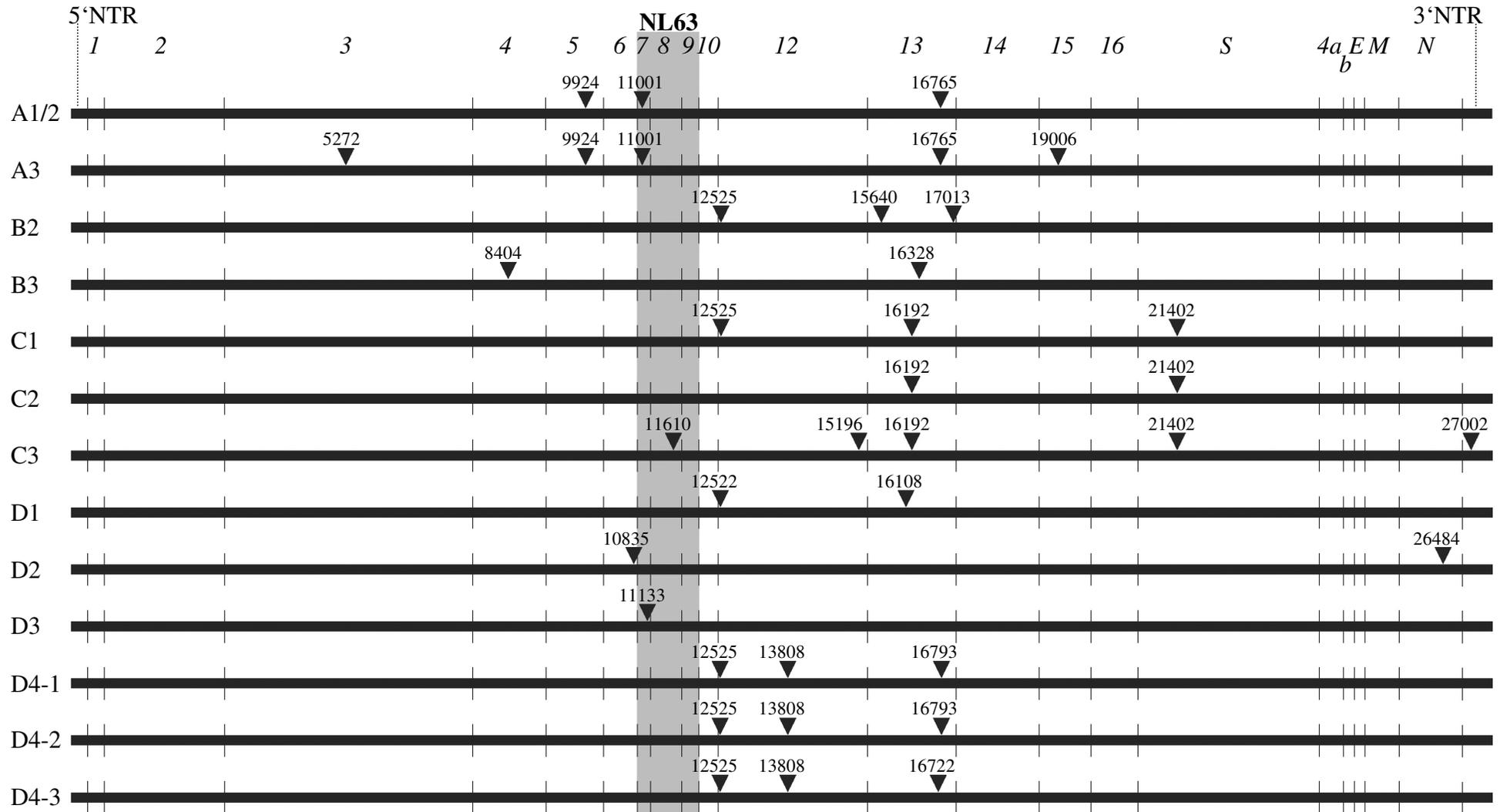


Abbildung 4.30: Grafische Darstellung der Mutationen, die in den Klonen von HCoV-7-9NL gefunden wurden

Die waagrechten Balken symbolisieren das jeweilige Genom. Die Dreiecke weisen auf die jeweilige Mutationsstelle und das mutierte Nukleotid hin. Die senkrechten Striche geben die Grenzen der dazwischenliegenden Proteine an. Die Namen der Proteine bzw. der Spaltprodukte von pp1ab sind kursiv angegeben. 5' bzw. 3' NTR steht für den 5'- bzw. 3'-nichttranslatierten Bereich. Der von HCoV-NL63 stammende Bereich ist grau unterlegt.

Klon	HCoV-229-E nts	Nukleotid- austausch	Aminosäure- austausch	Betroffene Domäne
D4-1	12525	C→A	S→T -	nsp11 nsp12
	13808	C→U	T→I	nsp12
	16793	C→U	T→I	nsp13
D4-2	12525	C→U	S→T -	nsp11 nsp12
	13808	C→U	T→I	nsp12
	16793	C→U	T→I	nsp13
D4-3	12525	C→A	S→T -	nsp11 nsp12
	13808	C→U	T→I	nsp12
	16722	G→U	Q→H	nsp13

Abbildung 4.31: Sequenzanalyse von drei HCoV-7-9NL-Klonen aus der Population D4

Die Abbildung zeigt tabellarisch das Resultat der Sequenzierung von drei Einzelklonen aus der HCoV-7-9NL-Population D4. Aufgeführt wurden die jeweils bei den Klonen gefundenen Mutationen. „-“ bedeutet, dass die Mutation still war, also keinen Einfluss auf die resultierende Aminosäuresequenz hatte.

Abbildung 4.32 zeigt einen Northern Blot mit der isolierten poly(A)-RNA aus einem Infektionsexperiment, bei dem MRC-5-Zellen mit einer *moi* von 0,3 infiziert worden waren. Die beobachtete RNA-Syntheseleistung reichte dabei von deutlich reduziert (Klon C1) bis nicht erkennbar beeinflusst (Klon A3, B3, D3).

Wie den Abbildungen 4.33 bis 4.42 zu entnehmen ist, war der Titer aller untersuchten Klone von HCoV-7-9NL im Vergleich zum Wildtyp um rund eine Zehnerpotenz reduziert.

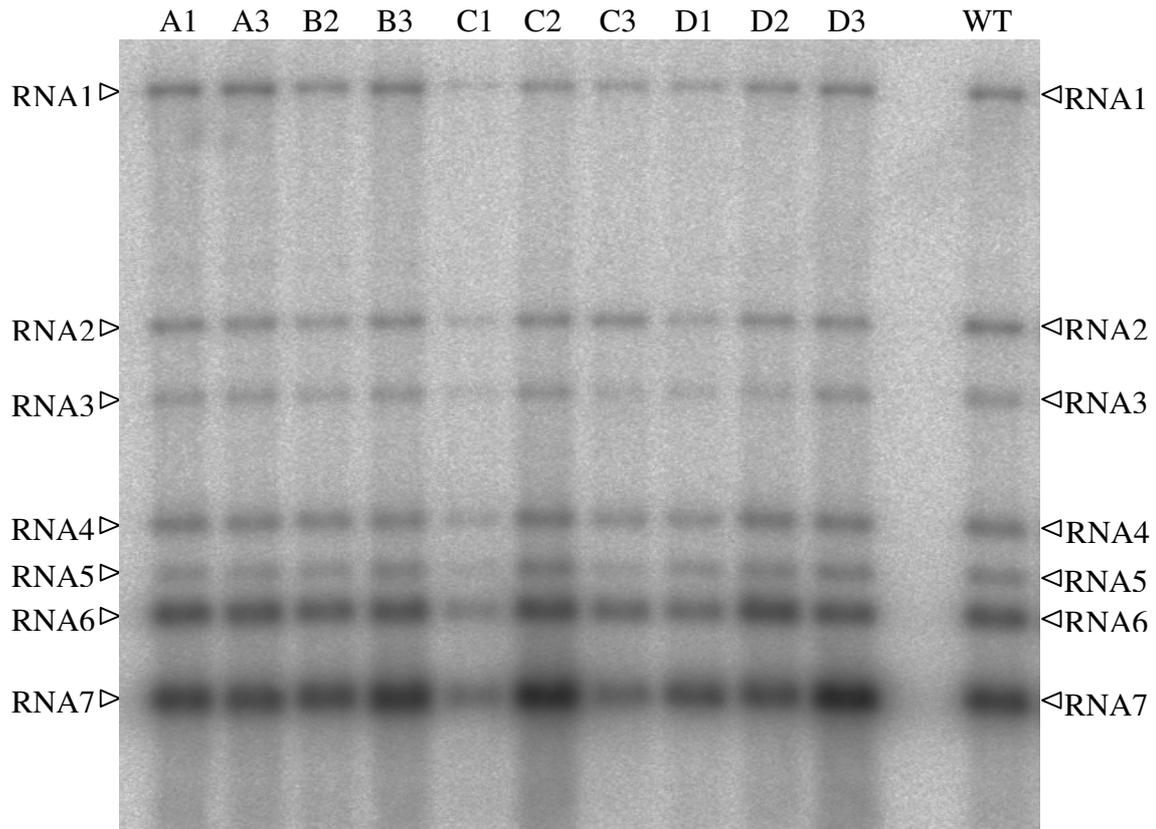


Abbildung 4.32: RNA-Synthese der Klone von HCoV-7-9NL

Die Abbildung zeigt die Autoradiographie eines Northern Blots zum Nachweis virusspezifischer RNAs in MRC5-Zellen, die mit einer *moi* von 0,3 mit den chimären Viren (die Bezeichnung der Spuren bezieht sich auf den jeweiligen Klon von HCoV-7-9NL) oder dem wildtypischen HCoV-229E (Spur WT) infiziert wurden. Die RNA-Isolation fand 24 Stunden *p.i.* statt. Die virale RNA wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde, die für die HCoV-229E nts 26857-27235 spezifisch war, detektiert.

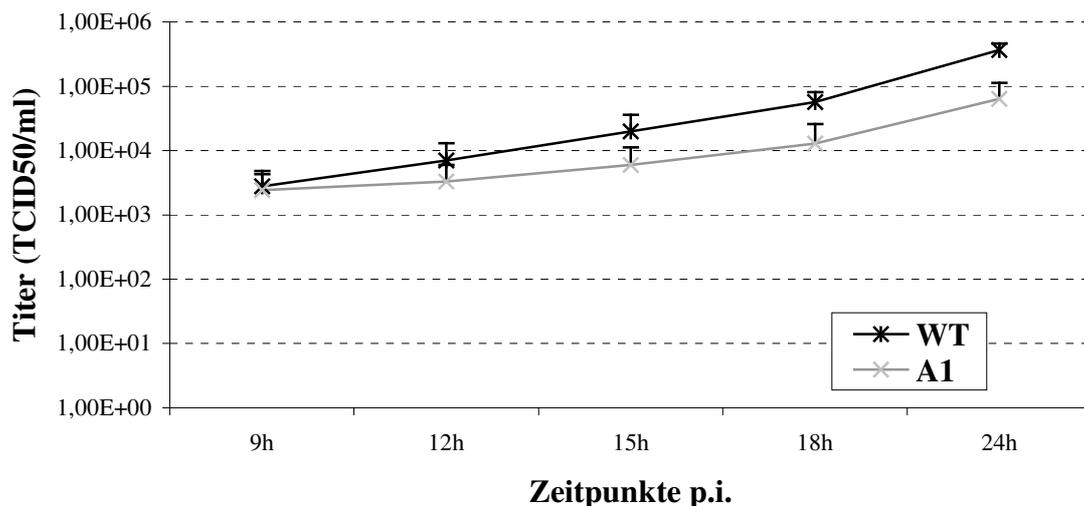


Abbildung 4.33: Wachstumskinetik von HCoV-7-9NL A1.

Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung zweier Infektionsexperimente mit HCoV-7-9NL A1 und dem Wildtyp. Infiziert wurden MRC-5-Zellen mit einer *moi* von eins. Die Bestimmung des Titers fand mittels Endpunktverdünnung statt. Schwarz = WT; Grau = HCoV-7-9NL A1. Die Balken geben die jeweilige Standardabweichung an.

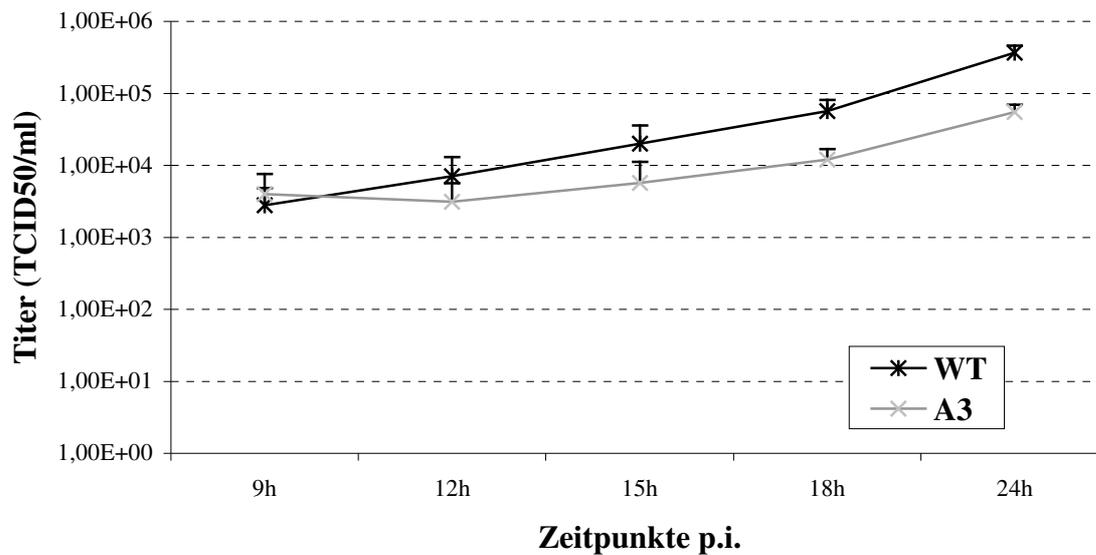


Abbildung 4.34: Wachstumskinetik von HCoV-7-9NL A3.

Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung zweier Infektionsexperimente mit HCoV-7-9NL A3 und dem Wildtyp. Infiziert wurden MRC-5-Zellen mit einer *moi* von eins. Die Bestimmung des Titers fand mittels Endpunktverdünnung statt. Schwarz = WT; Grau = HCoV-7-9NL A3. Die Balken geben die jeweilige Standardabweichung an.

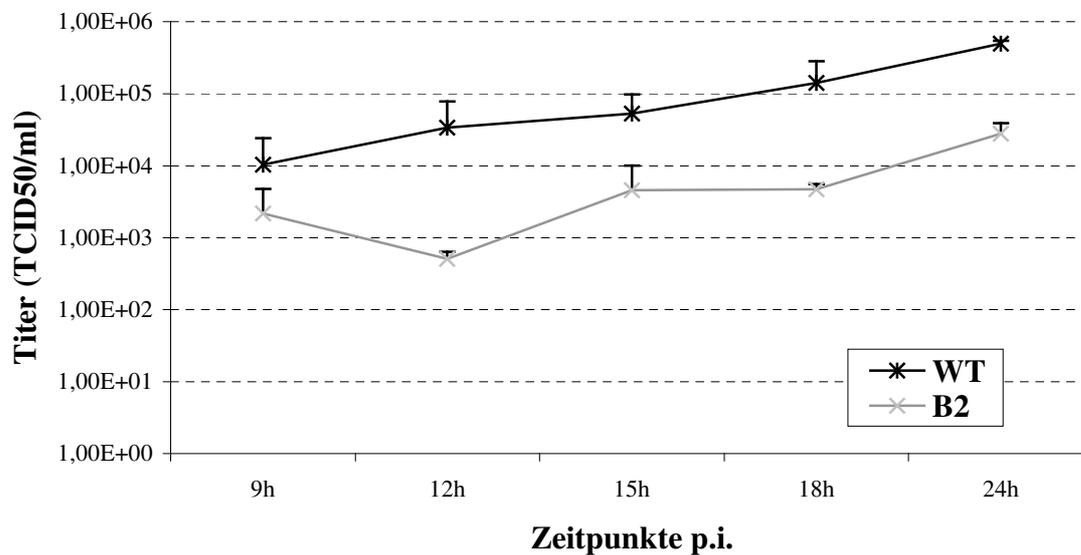


Abbildung 3.35: Wachstumskinetik von HCoV-7-9NL B2.

Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung zweier Infektionsexperimente mit HCoV-7-9NL B2 und dem Wildtyp. Infiziert wurden MRC-5-Zellen mit einer *moi* von eins. Die Bestimmung des Titers fand mittels Endpunktverdünnung statt. Schwarz = WT; Grau = HCoV-7-9NL B2. Die Balken geben die jeweilige Standardabweichung an.

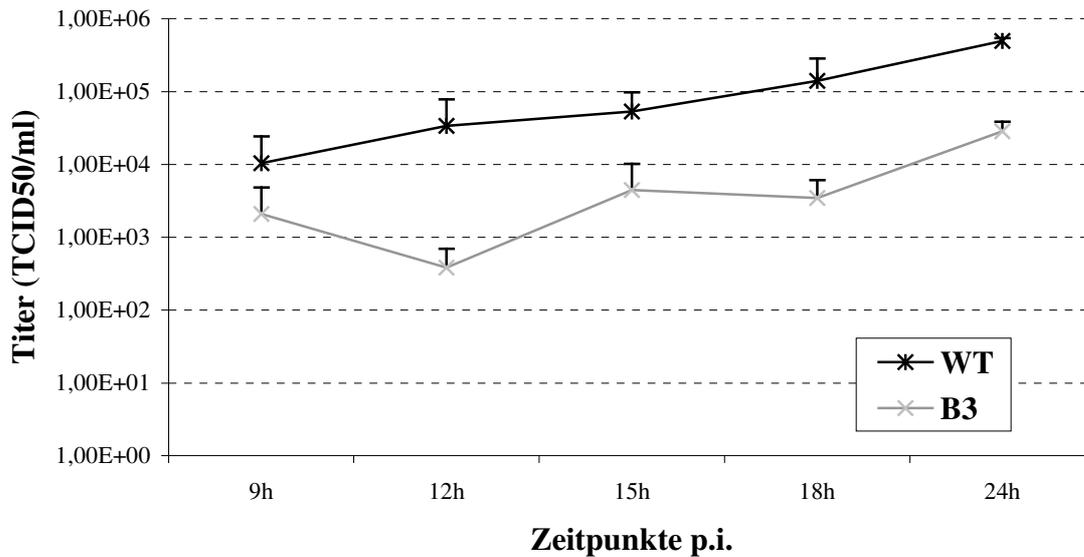


Abbildung 4.36: Wachstumskinetik von HCoV-7-9NL B3.

Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung zweier Infektionsexperimente mit HCoV-7-9NL B3 und dem Wildtyp. Infiziert wurden MRC-5-Zellen mit einer *moi* von eins. Die Bestimmung des Titers fand mittels Endpunktverdünnung statt. Schwarz = WT; Grau = HCoV-7-9NL B3. Die Balken geben die jeweilige Standardabweichung an.

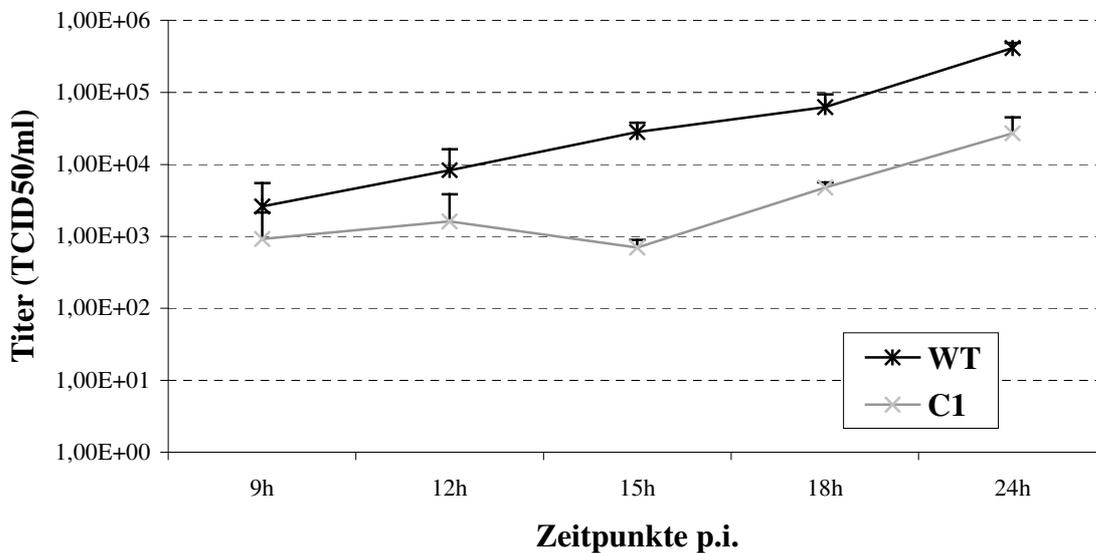


Abbildung 4.37: Wachstumskinetik von HCoV-7-9NL C1.

Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung zweier Infektionsexperimente mit HCoV-7-9NL C1 und dem Wildtyp. Infiziert wurden MRC-5-Zellen mit einer *moi* von eins. Die Bestimmung des Titers fand mittels Endpunktverdünnung statt. Schwarz = WT; Grau = HCoV-7-9NL C1. Die Balken geben die jeweilige Standardabweichung an.

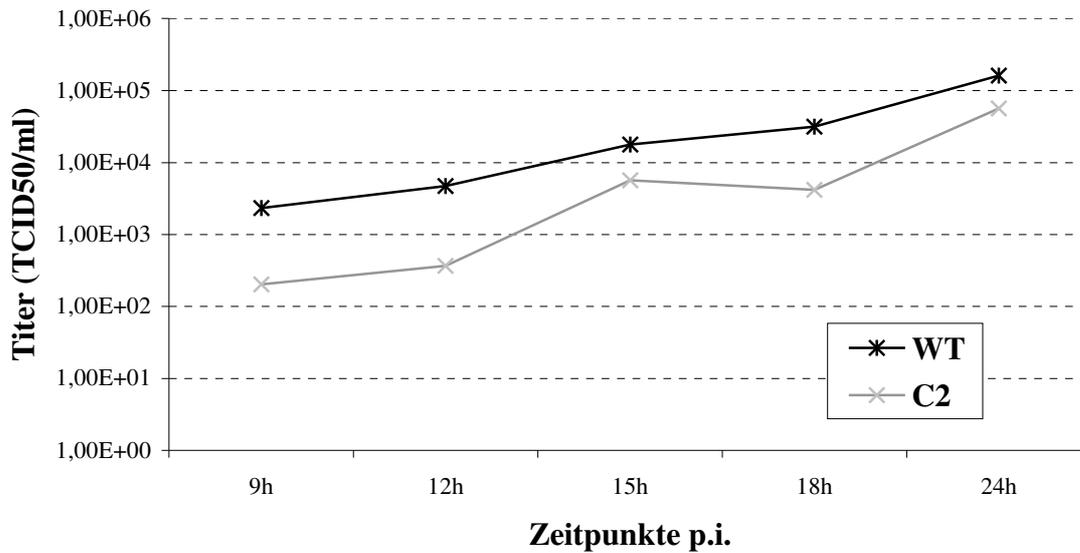


Abbildung 3.38: Wachstumskinetik von HCoV-7-9NL C2.

Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines Infektionsexperiments mit HCoV-7-9NL C2 und dem Wildtyp. Infiziert wurden MRC-5-Zellen mit einer *moi* von eins. Die Bestimmung des Titers fand mittels Endpunktverdünnung statt. Schwarz = WT; Grau = HCoV-7-9NL C1.

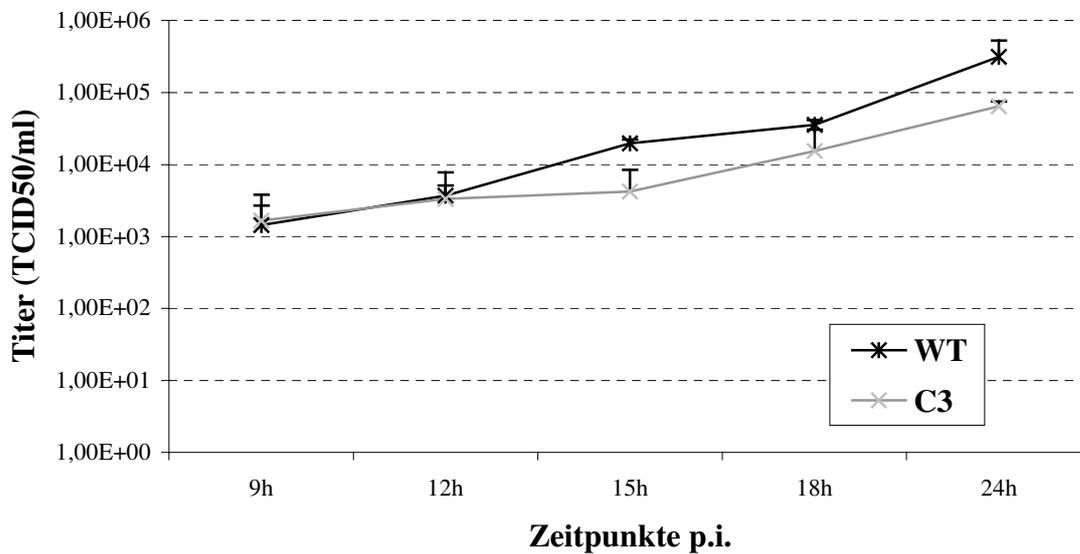


Abbildung 4.39: Wachstumskinetik von HCoV-7-9NL C3.

Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung zweier Infektionsexperimente mit HCoV-7-9NL C3 und dem Wildtyp. Infiziert wurden MRC-5-Zellen mit einer *moi* von eins. Die Bestimmung des Titers fand mittels Endpunktverdünnung statt. Schwarz = WT; Grau = HCoV-7-9NL C3. Die Balken geben die jeweilige Standardabweichung an.

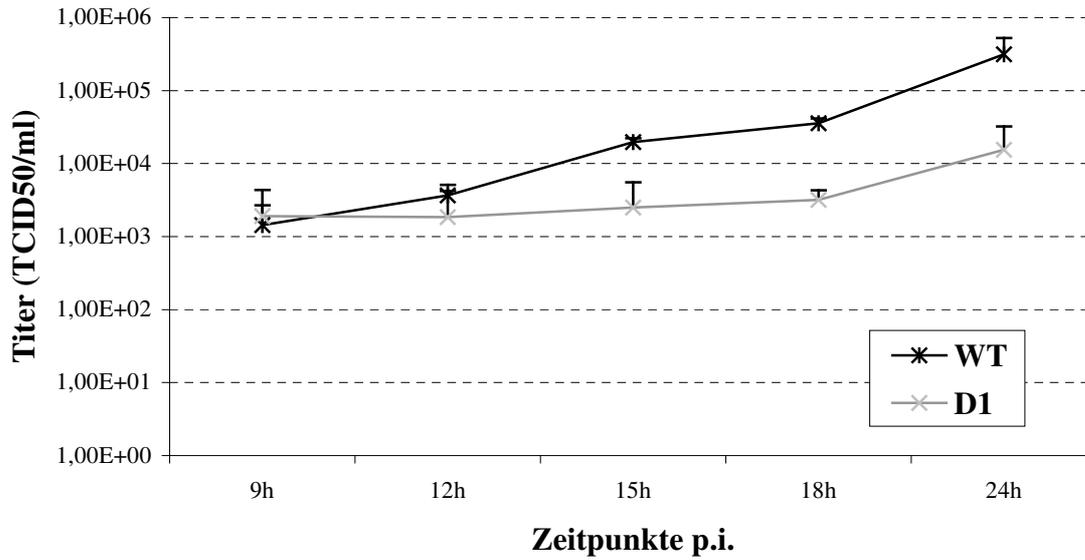


Abbildung 4.40: Wachstumskinetik von HCoV-7-9NL D1.

Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung zweier Infektionsexperimente mit HCoV-7-9NL D1 und dem Wildtyp. Infiziert wurden MRC-5-Zellen mit einer *moi* von eins. Die Bestimmung des Titers fand mittels Endpunktverdünnung statt. Schwarz = WT; Grau = HCoV-7-9NL D1. Die Balken geben die jeweilige Standardabweichung an.

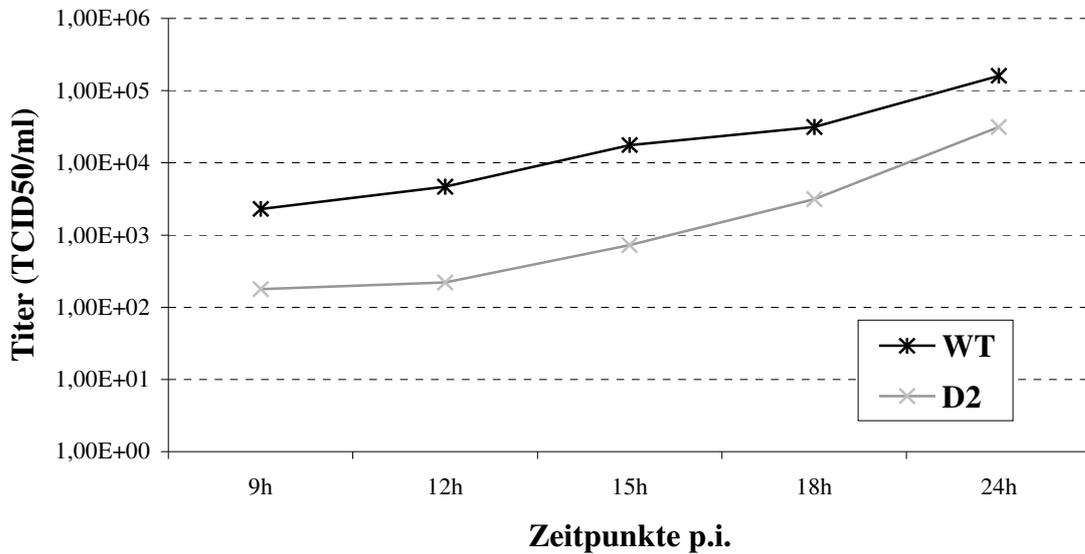


Abbildung 4.41: Wachstumskinetik von HCoV-7-9NL D2.

Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines Infektionsexperiments mit HCoV-7-9NL D2 und dem Wildtyp. Infiziert wurden MRC-5-Zellen mit einer *moi* von eins. Die Bestimmung des Titers fand mittels Endpunktverdünnung statt. Schwarz = WT; Grau = HCoV-7-9NL D2.

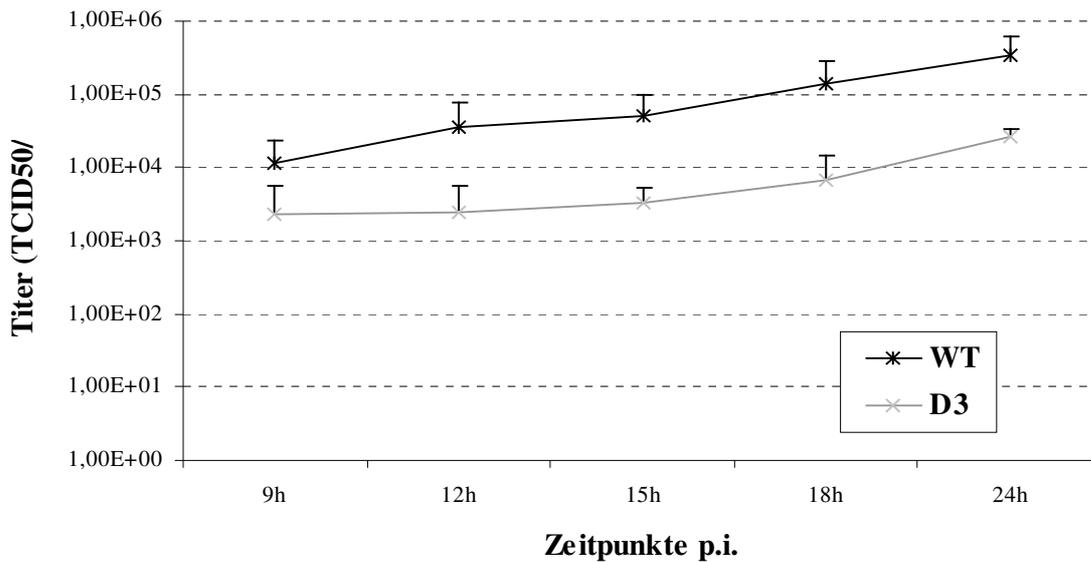


Abbildung 4.42: Wachstumskinetik von HCoV-7-9NL D3.

Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung zweier Infektionsexperimente mit HCoV-7-9NL D3 und dem Wildtyp. Infiziert wurden MRC-5-Zellen mit einer *moi* von eins. Die Bestimmung des Titers fand mittels Endpunktverdünnung statt. Schwarz = WT; Grau = HCoV-7-9NL D3. Die Balken geben die jeweilige Standardabweichung an.

Die Mutationen an den Nukleotiden 12522 und 12525 der Klone D1 bzw. B2, C1, D4-1, D4-2 und D4-3 liegen in dem Sequenzabschnitt, der sich zwischen der *slippery sequence* und der 3'-gelegenen Pseudoknotenstruktur von HCoV-229E befindet. An der *slippery sequence* findet die -1 Leserasterverschiebung von ORF1a nach ORF1b statt (Herold et al., 1993). Um einen möglichen Einfluss dieser Mutationen auf die Rate der Leserasterverschiebung zu untersuchen, wurden die Nukleotide 12092 - 13200 mittels RT-PCR amplifiziert, wobei der 5'-Primer die Sequenz des T7-Promotors enthielt, und anschließend mit Hilfe der T7-Polymerase transkribiert. Die generierten Transkripte wurden *in vitro* mittels eines Retikulocytenlysats in Gegenwart von [³⁵S]-Methionin translatiert und die Produkte dieser *In-vitro*-Translation auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe Abbildung 4.43)

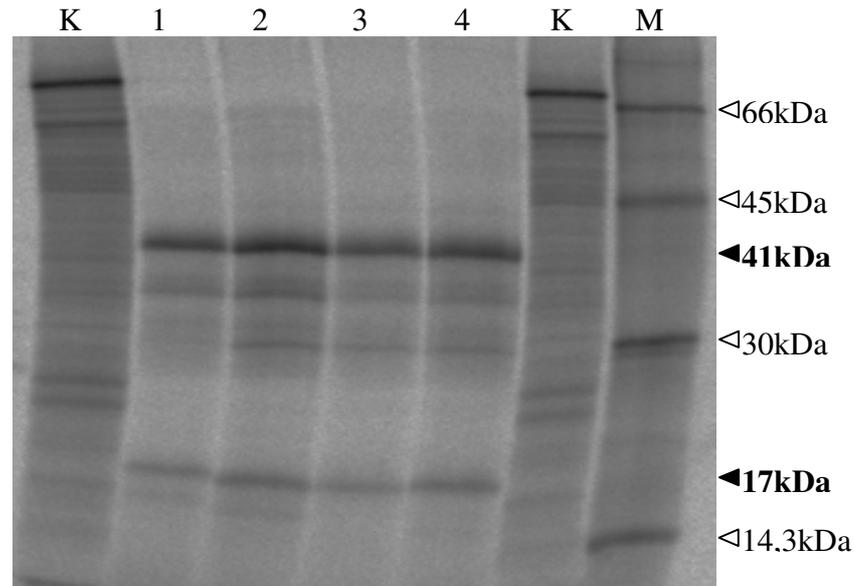


Abbildung 4.43: Polyacrylamidgel mit den *In-vitro*-Translationsprodukten

Die Abbildung zeigt die autoradiographische Auswertung eines 17 %-igen Polyacrylamidgels auf dem die Produkte der *In-vitro*-Translation aufgetragen wurden (Spuren K: *In-vitro*-Translation mit einer vom Hersteller mitgelieferten Kontroll-RNA; Spur 1: HCoV7-9NL D4-1/3; Spur 2: HCoV7-9NL D1; Spur 3: HCoV7-9NL B2; Spur 4: WT). Weiße Pfeile geben die Größe der Markerproteine an. Schwarze Pfeile geben die Größe der relevanten *In-vitro*-Translationsprodukte an. Die Translation des 17-kDa-Proteins terminiert am ORF1a-Stopkodon (keine Leserasterverschiebung), während die Translation des 41-kDa-Proteins –kurz vor Erreichen des ORF1a-Stopkodons– eine ribosomale Leserasterverschiebung in den ORF1b einschließt.

Bei der autoradiographischen Auswertung (siehe Abbildung 4.44) mittels Phosphorimaging wurde die Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 17 kDa, die dem ungeschifteten (also dem am ORF1a-Stopkodon terminierten) Produkt entsprach, und die Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 41 kDa, die dem geschifteten Produkt entsprach, einbezogen. Die unterschiedliche Anzahl von Methioninresten in den beiden Proteinen wurde bei der Berechnung entsprechend berücksichtigt. Der prozentuale Anteil des 41-kDa-Proteins an der Gesamtmenge der translatierten Proteine (also 17 kDa plus 41 kDa) ist die sogenannte Leserasterverschiebungsrates. Eine Rate von 50 % (bezogen auf alle Translationsereignisse) bedeutet somit, dass es –statistisch gesehen– bei jeder 2. Translation vor dem Erreichen des Stopkodons zu einer Verschiebung des ribosomalen Leserasters kommt, wie dies beispielsweise beim Wildtyp annähernd der Fall ist (Abb. 4.44).

Die Auswertung der entsprechenden Banden ergab für HCoV-7-9NL-B2 eine Leserasterverschiebungsrates von etwa 65 %, für HCoV-7-9NL-D1 und HCoV-7-9NL-D4-1 von rund 70 %. Daraus ergibt sich, dass alle gefundenen Mutationen im Bereich der HCoV-229E-Nukleotide 12522–12525 zu einer –im Vergleich zum Wildtyp– relativen Überproduktion von

pp1ab gegenüber pp1a führen. Anders ausgedrückt, das in der Wildtypsituation bestehende Verhältnis zwischen ORF1a-kodierten und ORF1b-kodierten Prozessierungsprodukten (nsps) wird von etwas mehr als 2 : 1 (Wildtyp) auf etwa 1,5 : 1 (Mutanten) reduziert.

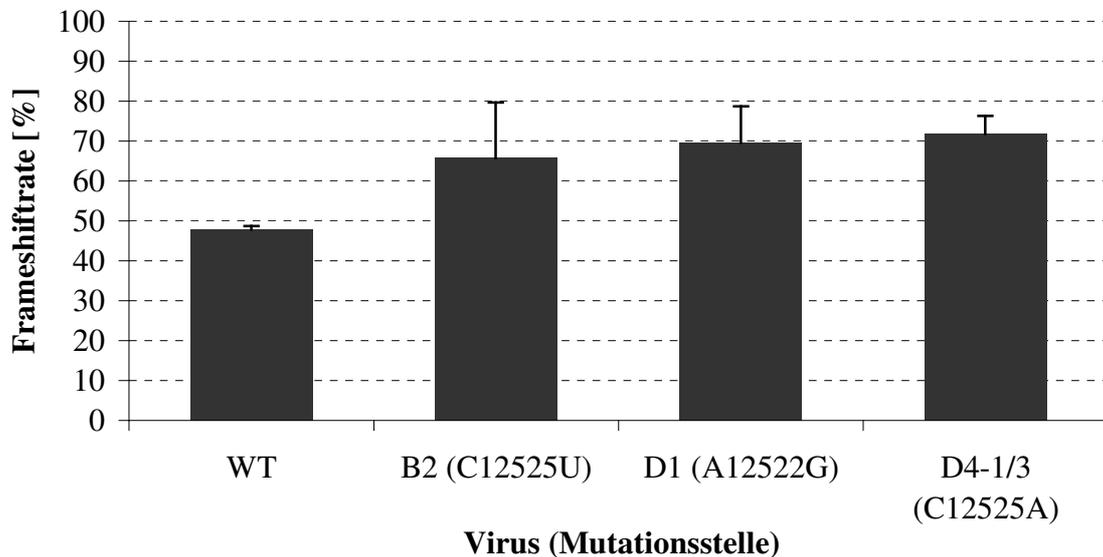


Abbildung 4.44: Quantifizierung der Leserasterverschiebungsrate

Die Abbildung zeigt die Auswertung einer Quantifizierung mittels Phosphorimaging der beiden Produkte des *In-vitro*-Translationsexperimentes. Die Ergebnisse wurden aus drei unabhängigen *In-vitro*-Translationsexperimenten gewonnen. Die Angaben (in Prozent) geben die prozentuale Rate (in Prozent aller Translationsereignisse) an, bei der es zu einer ribosomalen Leserasterverschiebung während der Translation kommt. Die für das Experiment verwendeten RNAs, die von den HCoV-7-9-Klonen B2, D1 und D4-1/3 gewonnen wurden, sind entsprechend gekennzeichnet. Die in den drei HCoV-7-9-Klonen vorhandenen Mutationen unmittelbar 3'-terminal zur *slippery sequence* sind angegeben. WT, Wildtyp. Die Standardabweichungen aus den drei Experimenten sind mittels senkrechter Striche über den jeweiligen Balken angegeben.

5.3.1 Substitution von nsp7+8 bzw. nsp8+9

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Transfektion von HCoV-7-9NL-Transkripten in einen produktiven Replikationszyklus mündet, in dessen weiterem Verlauf adaptive Mutationen erworben werden, wurde im weiteren versucht, herauszufinden, warum die Transfektion mit den weiter oben beschriebenen HCoV-8NL-Transkripten nicht produktiv verlaufen war. Insbesondere sollte die Frage beantwortet werden, ob möglicherweise eines der benachbarten Proteine von nsp8 zwingend von derselben Spezies stammen muss, damit ein produktiver Replikationszyklus starten kann. Wenn möglich, sollte darüber hinaus geklärt werden, welches (oder welche) der Proteine die adaptiven Mutationen induziert hatten, die bei den lebensfähigen HCoV-7-9NL-Klonen gefunden worden waren (siehe oben). Zur Beantwortung dieser Fragen wurden die folgenden beiden chimären Coronavirus-RNAs hergestellt.

<u>Mutante:</u>	<u>Substitution:</u>
HCoV-7+8NL:	nsp7+8 von HCoV-NL-63
HCoV-8+9NL:	nsp8+9 von HCoV-NL-63

Der Northern Blot in der Abbildung 4.28 zeigt das Ergebnis eines Experimentes, bei dem die Transkripte HCoV-8+9NL (Spur 5) und HCoV-7+8NL (Spur 4) in BHK-HCoV-N-Zellen transfiziert wurden. HCoV-8+9NL führte zu keiner nachweisbaren RNA-Synthese, während HCoV-7+8NL eine klar erkennbare, wenn auch reduzierte, virale RNA-Syntheseaktivität induzierte. HCoV-8+9NL wurde deshalb als replikationsdefizient eingestuft, während HCoV-7+8NL weiter passagiert wurde. Nach zwei Passagen wurden mittels Endpunkttitration insgesamt vier Klone 7+8 I, 7+8 II, 7+8 III, 7+8 IV isoliert, die drei weitere Male auf MRC-5-Zellen passagiert wurden, bevor sie charakterisiert wurden. Diese vier Klone stammten aus demselben Transfektionsexperiment.

Abbildung 4.45 zeigt tabellarisch das Ergebnis der vollständigen (mit Ausnahme der 5'-terminalen Nukleotide des Genoms) Sequenzierung dieser vier Klone von HCoV-7+8NL.

Klon	HCoV-229E nts	Nukleotid-austausch	Aminosäure-substitution	Betroffenes Protein
I	8905	C→U	-	nsp4
	13768	G→A	D→N	nsp12
	22972	A→C	-	S
II	13392	C→U	-	nsp12
	13768	G→A	D→N	nsp12
	22972	A→C	-	S
III	13768	G→A	D→N	nsp12
	22972	A→C	-	S
IV	15154	A→C	N→H	nsp12

Abbildung 4.45: Mutationen der HCoV-7+8NL-Klone

Die Abbildung zeigt tabellarisch das Resultat der Sequenzierung der vier Klone von HCoV-7+8NL. Aufgeführt wurden die jeweils bei den Klonen gefundenen Mutationen. „-“ bedeutet, dass die Mutation still war, also keinen Einfluss auf die resultierende Aminosäuresequenz hatte.

Darüber hinaus wurden die Nukleotide 10738 – 17147 von vier weiteren Isolaten (V, VI, VII, VIII) von HCoV-7+8NL aus einem weiteren Transfektionsexperiment bestimmt (siehe Abbildung 4.46). Dieser Sequenzabschnitt umfasst den kodierenden Bereich der Nichtstrukturproteine 7 – 13.

Isolat	HCoV-229E nts	Nukleotid-austausch	Aminosäure-substitution	Betroffenes Protein
V	16841	T→C	V→A	nsp13
VI	16841	T→C	V→A	nsp13
VII	16841	T→C	V→A	nsp13
VIII	11211	T→C	S→F	nsp8 NL

Abbildung 4.46: Mutation der HCoV7+8NL-Isolate V - VIII

Die Abbildung zeigt tabellarisch das Resultat der Sequenzierung vier weiterer Isolate von HCoV-7+8NL. Aufgeführt wurden die jeweils bei den Isolaten gefunden Mutationen. Ein Suffix „NL“ bedeutet, dass sich der Nukleotidaustausch in einer von HCoV-NL63 kodierten Domäne befindet.

Abbildung 4.47 zeigt einen Northern Blot mit der isolierten RNA aus einem Infektionsexperiment, bei dem MRC-5-Zellen mit einer *moi* von 0,3 infiziert wurden.

Es zeigte sich, dass die RNA-Synthese der Klone HCoV-7+8NL I, II, III auf wildtypischem Niveau stattgefunden hatte. Eine Ausnahme bildete Klon HCoV-7+8NL IV, dessen RNA-Synthese reduziert war.

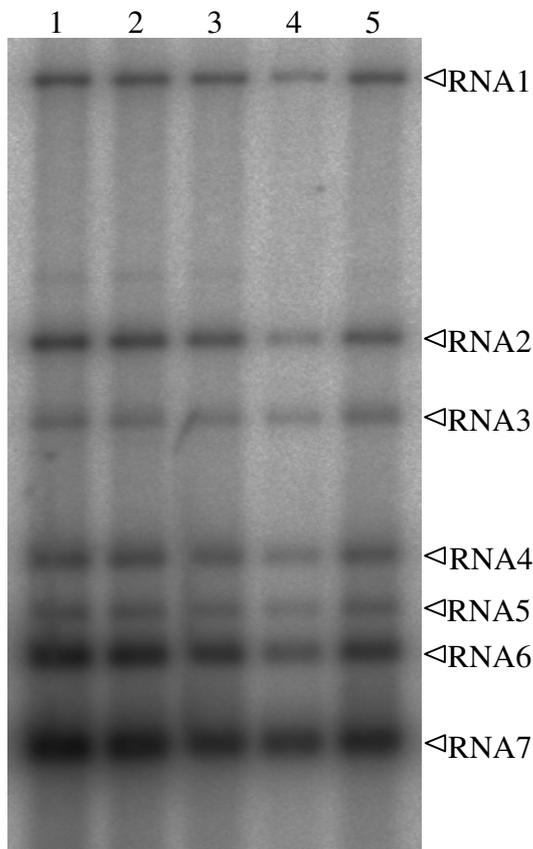


Abbildung 4.47: RNA-Synthese der Klone I, II, III, IV von HCoV-7+8NL

Die Abbildung zeigt die Autoradiographie eines Northern Blots zum Nachweis virusspezifischer RNAs in MRC5-Zellen, die mit einer *moi* von 0,3 mit den chimären Viren (Spur 1: HCoV-7+8NL I; Spur 2: HCoV-7+8NL II; Spur 3: HCoV-7+8NL III; Spur 4: HCoV-7+8NL IV) oder dem wildtypischen HCoV-229E (Spur 5) infiziert wurden. Die RNA-Isolation fand 24 Stunden *p.i.* statt. Die virale RNA wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde, die für die HCoV-229E nts 26857-27235 spezifisch war, detektiert.

Die Wachstumskinetik der vier Klone I, II, III und IV von HCoV-7+8NL ist in Abbildung 4.48 dargestellt. Nach 24 Stunden wies das Wachstum von HCoV-7+8NL I, II und III etwa 40 % und das Wachstum von HCoV-7+8NL IV 10 % des wildtypischen Wertes auf.

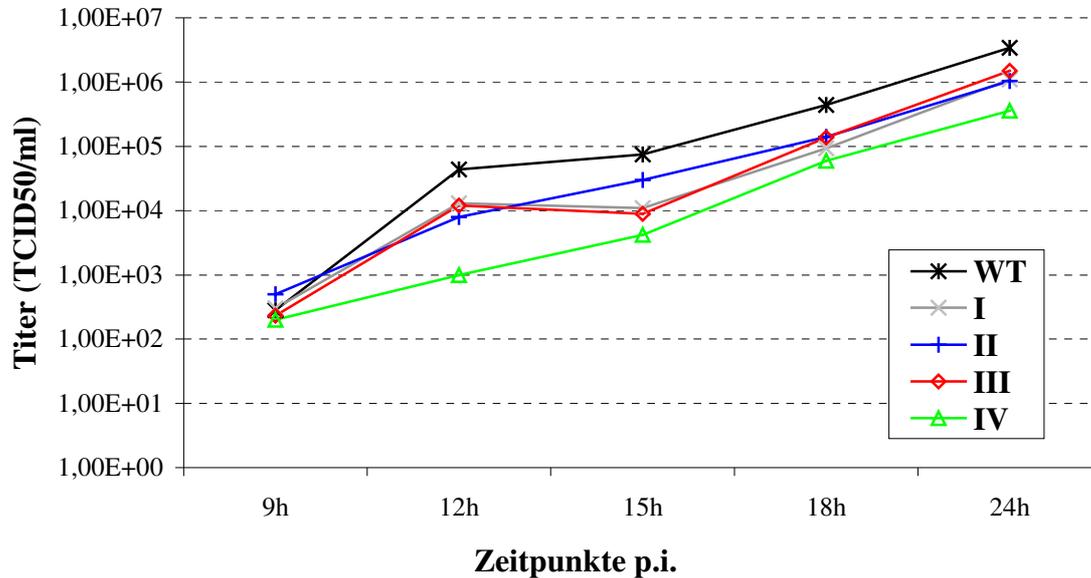


Abbildung 4.48: Wachstumskinetik der Klone von HCoV-7+8NL

Die Abbildung zeigt ein Infektionsexperiment mit den Klonen von HCoV-7+8NL I, II, III, IV und dem Wildtyp. Infiziert wurden MRC-5-Zellen mit einem *moi* von eins. Die Bestimmung des Titers fand mittels Endpunktverdünnung statt. Schwarz = WT; Grau = HCoV-7+8NL I; Blau = HCoV-7+8NL II; Rot = HCoV-7+8NL III; Grün = HCoV-7+8NL IV.

Die Ergebnisse der Experimente mit HCoV-8+9NL und HCoV-7+8NL sowie die weiter oben dargestellten Daten zu den HCoV-8NL und HCoV-7-9NL-Chimären zeigen, dass eine Substitution von *nsp8* sowie eine gleichzeitige Substitution von *nsp8* und *9* die Funktion der viralen Replikase inaktiviert, während die gleichzeitige Substitution von *nsp7* und *8* die Funktion der viralen Replikase auf einem für die virale RNA-Synthese ausreichenden Niveau sicherstellt. Bestehende funktionelle Defekte können in diesem Fall offenbar anschließend durch den Erwerb adaptiver Mutationen in anderen Proteinen des Replikationskomplexes partiell kompensiert werden. Die Daten stützen die Strukturdaten von Zhai et al. (2005) und lassen darauf schließen, dass ein funktionsfähiger *nsp7-8*-Superkomplex ein entscheidender Kofaktor für die RNA-Synthese von HCoV-229E ist. Darüber hinaus legen die Daten nahe, dass *nsp7* und *8* (nicht jedoch *nsp9*) die in den lebensfähigen HCoV-7-9NL-Klonen beobachteten adaptiven Mutationen induziert haben. Das gehäufte Auftreten von adaptiven Mutationen in *nsp12* und *13* deutet schließlich auch auf mögliche Interaktionen zwischen *nsp7/8* und *nsp12/13* hin (siehe Diskussion).

5 Diskussion

5.1 Die Helikase von HCoV-229E, nsp13

Das nidovirale Nichtstrukturprotein 13 ist eine aus zwei Domänen bestehende Helikase. Es besitzt neben der eigentlichen Helikasedomäne eine zinkbindende Domäne (ZBD), die den N-terminalen Bereich des Proteins einnimmt (Gorbalenya et al., 1989b; Gorbalenya et al., 1989a; Seybert et al., 2005). Diese beiden Domänen werden bei den *Arteriviridae* durch eine als *hinge spacer* (engl.: *hinge* = Scharnier; *spacer* = Abstandshalter) bezeichnete Region voneinander getrennt (van Dinten et al., 2000). Bei der Familie der *Arteriviridae* konnte eine essentielle Rolle der Helikase bei der Replikation und Transkription gezeigt werden (van Dinten et al., 2000; Seybert et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe eines revers-genetischen Systems für HCoV-229E die Funktion der Helikase im coronaviralen Replikationszyklus untersucht.

5.1.1 Mutagenese der ATPase-Domäne

Mittels der Mutante HCoV-HEL-KA wurde gezeigt, dass eine Substitution des Lysins an Position 5284 (pp1ab 5284) die Virusreplikation inaktiviert. Dieses zum sogenannten Walker-A-Motiv (Walker et al., 1982) gehörende Lysin ist essentiell für die ATPase- und dsRNA-Entwindungsaktivität der coronaviralen Helikase *in vitro* (Seybert et al., 2000a; Seybert et al., 2005). Daraus kann geschlossen werden, dass eine aktive Helikase eine essentielle Rolle im Replikationszyklus von Coronaviren spielt. Die zentrale Rolle der Helikase im Replikationszyklus kann auf die Ordnung der *Nidovirales* erweitert werden, wenn man die Ergebnisse aus dem revers-genetischen System von EAV, einem Arterivirus, mit einbezieht, wo die Substitution des äquivalenten Lysinrestes ebenfalls die RNA-Synthese komplett ausschaltete (Seybert et al., 2005).

5.1.2 Mutagenese der ZBD

Die Transfektion der Transkripte HCoV-C5A (C5021A), HCoV-C5H (C5021H), HCoV-C6A (C5024A), HCoV-C6H (C5024H), HCoV-C10A (C5050A) und HCoV-C10H (C5050H) in BHK-HCoV-N-Zellen mündete in keinem der Fälle in einen produktiven Replikationszyklus.

In vitro wurde von Seybert *et al.* (2005) gezeigt, dass die Substitutionen C5021A, C5021H, C5024A die ATPase-Aktivität von nsp13 ausschalten. Die Substitutionen C5050A und C5050H führten hingegen zu einer Reduktion der ATPase-Aktivität um weniger als 50 %, und die

Substitution C5024H führte sogar zu einer signifikant gesteigerten ATPase-Aktivität (Seybert et al., 2005). Vor diesem Hintergrund erscheint es überraschend, dass alle eingeführten Mutationen die virale RNA-Synthese von HCoV-229E komplett blockierten. Die Daten legen nahe, dass die angesprochenen biochemischen Assays nur unzureichend in der Lage sind, bestehende feine Unterschiede in der Funktionalität der ZBD zu identifizieren, die möglicherweise nur während der coronaviralen RNA-Synthese, nicht jedoch in artefiziellen *In-vitro*-Assays, von Bedeutung sind. Die replikative Inaktivität der Mutante HCoV-C6H (C5024H) weist darüber hinaus darauf hin, dass die Aktivität der Helikase exakt reguliert ist, da offenbar auch eine hyperaktive Helikase einen Replikationsdefekt verursachen kann. In jedem Fall weisen diese Mutanten aber die essentielle Bedeutung der ZBD im Replikationszyklus von Coronaviren zweifelsfrei nach. Ähnliche Beobachtungen sind auch für Arteriviren beschrieben worden (van Dinten et al., 2000). So hatten beispielweise Substitutionen in der ZBD von EAV in zahlreichen (aber nicht allen) Fällen zu einem RNA-Synthese-defizienten Phänotyp geführt (van Dinten et al., 2000; Seybert et al., 2005). Bei HCoV-229E war dies sogar bei allen durchgeführten Substitutionen der Fall. Damit kann die essentielle Rolle der ZBD und, in einem umfassenderen Sinne, auch der Helikase in der viralen Replikation auf die gesamte Ordnung der *Nidovirales* erweitert werden.

Es fallen jedoch auch Unterschiede zwischen den Ergebnissen aus beiden revers-genetischen Systemen ins Auge, da bei EAV Substitutionen in der ZBD, die die biochemische ATPase-Aktivität nicht völlig ausschalteten, zumeist einen lebensfähigen Phänotyp, wenn auch mit reduziertem Titer, zur Folge hatten (Seybert et al., 2005). Hierfür bieten sich zwei Erklärungsmodelle an. Zum einen sind die Aminosäuresequenzen der Arterivirus- und Coronavirushelikasen nur relativ schlecht konserviert, was mit geringgradigen funktionellen Unterschieden einhergehen könnte. Zum anderen könnten auch die unterschiedlichen Genomgrößen der beiden Virusfamilien unterschiedliche Anforderungen an die Funktionalität der Helikase stellen. Mit etwa 30 kb besitzen Coronaviren die größten Genome unter den RNA-Viren, wohingegen das Genom von Arteriviren lediglich knapp 13 kb groß ist. Da es bei Plusstrang-RNA-Viren eine Korrelation zwischen Genomgröße und der Anwesenheit von Helikasedomänen im Genom gibt (Gorbalenya & Koonin 1989), könnten in der Tat bei Coronaviren (mit ihren riesigen RNA-Genomen) bereits geringfügige Funktionsdefekte der Helikase schwerwiegende Konsequenzen für die Virusreplikation haben, während solche partiellen Funktionsdefekte bei den deutlich kleineren Arteriviren besser toleriert werden.

5.1.3 Mutagenese der putativen *Hinge-spacer*-Region

Bei EAV führten bestimmte Substitutionen innerhalb der *Hinge-spacer*-Region zu einer nahezu vollständigen Blockade der Transkription, während die Replikation kaum beeinträchtigt wurde (van Dinten et al., 2000). Mit den drei Mutanten HCoV-KP (K5071P), HCoV-HP (H5073P), HCoV-SP (S5075P) wurde in dieser Arbeit erfolglos versucht, diesen spezifischen Transkriptionsdefekt auch bei einem Coronavirus zu erzeugen. Der Konservierungsgrad der putativen *Hinge-spacer*-Regionen von Arteri- und Coronaviren ist offenbar zu gering, um aus den verfügbaren EAV-Daten zuverlässige Vorhersagen über mögliche äquivalente Reste bei HCoV-229E treffen zu können. Es sollte in diesem Zusammenhang auch daran erinnert werden, dass dieser besondere Phänotyp bei EAV nur bei extrem wenigen Substitutionen von bereits zuvor als kritisch identifizierten Resten zielgerichtet erzeugt werden konnte (van Dinten et al., 2000). Während HCoV-KP und HCoV-SP keine Replikation aufwiesen, war HCoV-HP lebensfähig und wurde nach zehn Passagen charakterisiert. Die H5073P-Substitution konnte in dieser Passage mittels Sequenzanalyse nachgewiesen werden. Das Wachstum von HCoV-HP war mit rund 60 % des wildtypischen Titers jedoch reduziert. Die Daten belegen erneut die funktionelle Bedeutung der ZBD und der sich C-terminal daran anschließenden Domäne. Hinweise für eine distinkte Funktion der coronaviralen Helikase in der Transkription ergeben sich jedoch (im Gegensatz zu EAV) aus diesen Experimenten bisher nicht.

5.2 Mutagenese der Exonuklease, nsp14 (ExoN)

Für das Nichtstrukturprotein 14 von SCoV konnte vor kurzem die vorhergesagte Exonukleaseaktivität bestätigt werden. (Minskaia et al., 2006). Zur Untersuchung der Rolle des nsp14 während der Replikation wurden die homologen Substitutionen in das HCoV-229E eingeführt und die Mutanten HCoV-EXO-DAEA (D5682A/E5684A), HCoV-EXO-NA (N5829A), HCoV-EXO-D1A (D5834A), HCoV-EXO-HA (H5859A) und HCoV-EXO-D2A (D5864A) hergestellt. Mittels quantitativer und qualitativer Northern-Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass die rekombinanten Viren HCoV-EXO-DAEA, HCoV-EXO-D1A, HCoV-EXO-HA und HCoV-EXO-D2A eine reduzierte RNA-Syntheseleistung sowie ein vom Wildtyp abweichendes Synthesemuster der sgRNAs aufwiesen. Die molaren Verhältnisse zwischen den sgRNAs waren verschoben und die sgRNAs 3 und 4 zeigten sowohl eine aberrante Größe wie auch eine auffallende Diffusität im Northern Blot, was auf leichte Größenunterschiede (unterschiedliche 5'- oder 3'-Enden?) innerhalb dieser RNA-Spezies schließen lässt. Da alle diese Mutanten nicht lebensfähig waren, konnte keine weitere molekulare Charakterisierung der

entsprechenden Phänotypen durchgeführt werden. Die erhaltenen Ergebnisse belegen zweifelsfrei die Beteiligung des Nichtstrukturproteins 14 an der Replikation als auch der Synthese der subgenomischen RNAs.

Im Gegensatz zu den oben aufgeführten Mutanten zeigte das rekombinante Virus HCoV-EXO-NA im Northern Blot einen Phänotyp mit nur geringfügig reduzierter Gesamt-RNA-Syntheseleistung. HCoV-EXO-NA war lebensfähig und konnte nach zehn Passagen charakterisiert werden. Die N5829A-Mutation war zu diesem Zeitpunkt nach wie vor vorhanden. Allerdings fiel bei der Analyse der Wachstumskinetik ein Defekt auf, da 24 Stunden nach der Infektion der Titer von HCoV-EXO-NA im Vergleich zum Wildtyp um circa zwei Drittel reduziert war. Die Ursache für diese Unterschiede zwischen den beiden beobachteten Phänotypen von HCoV-EXO-DAEA, HCoV-EXO-D1A, HCoV-EXO-HA und HCoV-EXO-D2A einerseits und HCoV-EXO-NA andererseits ist gegenwärtig nicht klar. Auch die von Minskaia *et al.* (Minskaia et al., 2006) gewonnenen Daten bieten keinen überzeugenden Erklärungsansatz, da alle der *in vitro* exprimierten und analysierten rekombinanten Proteine schwere und in ihrem Umfang vergleichbare Defekte aufgewiesen hatten. So besaßen die als MBP-Fusionsproteine exprimierten SCoV-nsp14-Domänen mit den Substitutionen D5682A/E5684A und H5859A lediglich eine geringgradige Restaktivität, während N5829A, D5834A und D5864A nahezu vollständig inaktiviert waren. Die bisherigen biochemischen Untersuchungen zur SCoV-Exonuklease können somit nur wenig zum Verständnis der Funktion des homologen Proteins im Replikationszyklus von HCoV-229E beitragen. Es bleibt zu untersuchen, ob diese Diskrepanz auf funktionelle und/oder strukturelle Unterschiede zwischen den Exonukleasen von SCoV und HCoV-229E zurückzuführen sind oder aber weitere Untersuchungen und Erkenntnisse zur Substratspezifität dieser Enzyme erforderlich sind, um die entsprechenden *In-vitro*-Assays so zu verbessern, dass zukünftige biochemische Daten besser mit den Virus-Mutagenese-Daten in Übereinstimmung gebracht werden können.

5.3 Mutagenese der Endonuklease, nsp15 (NendoU)

Das coronavirale Nichtstrukturprotein 15 (nsp15) kodiert für ein Protein mit Endonukleaseaktivität (Bhardwaj et al., 2004; Ivanov et al., 2004a; Guarino et al., 2005; Posthuma et al., 2006). Zur Untersuchung der Rolle des nsp15 im Replikationszyklus wurden folgende vier Mutanten hergestellt: HCoV-ENDO-HA (H6360A), HCoV-ENDO-DA (D6408A), HCoV-ENDO-SA (S6427A) und HCoV-ENDO-KA (K6401A). Während bei der Substitution D6408A nach der Transfektion mit dem entsprechenden Transkript keine virale RNA-Synthese

nachweisbar war, initiierten alle anderen mutierten Transkripte eine virale RNA-Synthese in den transfizierten Zellen, und es wurde deshalb versucht, die Viren zu passagieren. Dabei zeigte sich, dass es nicht möglich war, mit dem Zellkulturüberstand der rekombinanten Viren HCoV-ENDO-KA und HCoV-ENDO-HA einen cytopathischen Effekt (CPE) bei MRC-5-Zellen über einen Zeitraum von mehr als drei Passagen hervorzurufen. Aus diesem Grund wurde bei der Bestimmung der Wachstumskinetik dieser beiden Mutanten der Zellkulturüberstand der Passage 1 verwendet. Dabei zeigten sich nach 96 Stunden *p.i.* mit rund drei Prozent des wildtypischen Titers deutliche Defekte in der Fähigkeit, infektiöse Virionen zu produzieren. Die dritte Mutante, HCoV-ENDO-SA, erwies sich hingegen nach zehn Passagen in Zellkultur mit 60 % des wildtypischen Titers 24 Stunden *p.i.* als nur geringfügig in ihrem Wachstum beeinflusst. Die entsprechende Substitution S6427A konnte mittels Sequenzanalyse in der zehnten Passage als stabil nachgewiesen werden. Diese Daten befinden sich in guter Übereinstimmung mit früheren *In-vitro*-Daten, die gezeigt hatten, dass ein bakteriell exprimiertes Protein mit dieser Substitution eine kaum beeinträchtigte Nuklease-Aktivität hatte, wie man es für einen außerhalb des aktiven Zentrums gelegenen Rest auch erwarten kann. Die Substitution wurde in dieser Studie lediglich als Kontrolle verwendet.

Die gewonnenen revers-genetischen Daten und die bereits früher gewonnenen *In-vitro*-Daten zur nukleolytischen Aktivität von bakteriell exprimierten HCoV-229E-nsp15-Proteinen mit den gleichen Substitutionen (Ivanov et al., 2004a) waren jedoch nicht in jedem Fall problemlos in Übereinstimmung zu bringen. Zunächst hatte die Beobachtung, dass die Substitution D6408A die Aktivität des Proteins *in vitro* blockierte und nach der Transfektion der entsprechenden mutierten RNA keine virale RNA-Synthese nachweisbar war, zur Schlußfolgerung geführt, dass nsp15 eine replikative Endoribonuklease ist. Es zeigte sich jedoch dann in späteren Experimenten, dass die beiden *Active-site*-Substitutionen K6401A und H6360A, die (wie auch D6408) *in vitro* zu einem inaktiven Protein geführt hatten, eine signifikante RNA-Synthese in Passage 0 ermöglichten, was klar gegen die früher postulierte essentielle Rolle der Nukleaseaktivität bei der viralen RNA-Synthese sprach, auch wenn sich später zeigte, dass diese Endonuklease-defizienten Viren nicht über mehrere Passagen vermehrt werden können. Für diese zunächst überraschende Beobachtung, die im Gegensatz zu den früheren Ergebnissen der D6408-Substitution zu stehen schien, bieten jüngste Strukturdaten eine mögliche Erklärung (Ricagno et al., 2006). Sie zeigen nämlich, dass Asp-6408, im Gegensatz zu den Lysin-6401- und Histidin-6360-Resten, außerhalb des katalytischen Zentrums liegt und möglicherweise für die strukturelle Integrität des Proteins essentiell ist (Ricagno et al., 2006). Es ist daher denkbar, dass die D6408A-Substitution die Struktur und Funktion von nsp15 und damit vielleicht auch die

Gesamtstruktur des Replikasekomplexes beeinträchtigen könnte, was den inaktivierenden Effekt der D6408A-Substitution auf die RNA-Synthese problemlos erklären würde. Die ursprüngliche Vermutung, dass NendoU für die virale RNA-Synthese essentiell ist (Ivanov et al., 2004a), muss daher deutlich eingeschränkt werden. Offenbar ist die volle nukleolytische Aktivität dieser Domäne nicht essentiell für die virale RNA-Synthese, sondern für einen späteren (bisher nicht bekannten) Schritt im viralen Lebenszyklus, der für die effiziente Produktion infektiöser Virionen benötigt wird. Ähnliche Beobachtungen wurden vor kurzem auch für entsprechende Substitutionen in der EAV-Endonuklease gemacht (Posthuma et al., 2006). Auch hier erzeugte der Austausch des Aspartats, das der D6408A-Substitution in HCoV-229E entspricht, einen replikationsdefizienten Phänotyp. Arterivirale Mutanten mit äquivalenten Substitutionen zu HCoV-ENDO-HA, HCoV-ENDO-KA und HCoV-ENDO-SA zeigten hingegen – ähnlich wie in dieser Arbeit für HCoV-229E beschrieben – eine RNA-Synthese, die sich nur wenig vom Wildtyp unterschied. Mittels Plaque-Assays, die (im Gegensatz zu HCoV-229E) für EAV möglich sind, wurde jedoch gezeigt, dass EAV-Mutanten mit Substitutionen, die den Substitutionen von HCoV-ENDO-HA und HCoV-ENDO-KA entsprachen, nur sehr kleine Plaques bilden (*small plaque phenotype*) und 1000- bis 10000-fach reduzierte Virustiter hatten. In sehr guter Übereinstimmung mit der HCoV-ENDO-SA-Mutante, bildete die entsprechende Ser-zu-Ala-Mutante von EAV mittelgroße Plaques und hatte einen lediglich zehnfach reduzierten Titer (Posthuma et al., 2006). Die Phänotypen dieser nidoviralen NendoU-Mutanten entsprechen sich also insofern, als der Replikationsdefekt von DA über HA und KA zu SA abnimmt, was für eine ähnliche Rolle der NendoU im Replikationszyklus dieser Nidoviren spricht. Im arteriviralen System wurde darüber hinaus eine geringfügige Reduktion der Synthese der sgRNAs bei den lebensfähigen NendoU-Mutanten festgestellt (Posthuma et al., 2006). Diese Beobachtung konnte bei den coronaviralen nsp15-Mutanten nicht gemacht werden. Die NendoU könnte demnach eine weitere Funktion im Replikationszyklus von Arteriviren zu besitzen, die sie bei Coronaviren möglicherweise nicht besitzt. Die gegenwärtig verfügbaren HCoV-229E- und EAV-Daten deuten also darauf hin, dass die endonukleolytische Aktivität dieses Proteins eine wichtige, wenn auch nicht essentielle, Rolle in der viralen RNA-Synthese spielt, dass das Protein jedoch darüber hinaus andere zentrale Funktionen in einem späteren Schritt des nidoviralen Replikationszyklus besitzt, die in weiteren Studien untersucht werden müssen.

5.4 Deletion der putativen Methyltransferase, nsp16

Das Nichtstrukturprotein am Carboxyterminus des pp1ab, nsp16 ist eine putative Ribose-2'-O-Methyltransferase (Snijder et al., 2003). Da für die revers-genetische Charakterisierung keine experimentellen biochemischen Informationen vorlagen, wurde zur Beantwortung der Frage, inwieweit nsp16 einen für die Replikation des HCoV-229E notwendigen Faktor darstellt, die Expression von nsp16 durch Einführung eines Translationsstopkodons unmittelbar *upstream* der kodierenden Sequenz von nsp16 ausgeschaltet. Im Gegensatz zu einer vollständigen Deletion dieser Domäne wurde auf diese Weise die RNA-Struktur nicht (oder nur minimal) verändert. Da nsp16 darüber hinaus die am C-Terminus von pp1ab gelegene Domäne bildet, wurde die Expression aller anderen pp1ab-Produkte von der Einführung dieses Stopkodons nicht beeinträchtigt. Die Transfektion der HCoV- Δ MTR-RNA führte zu keiner nachweisbaren viralen RNA-Synthese, was die essentielle Funktion dieses Proteins klar demonstriert. Es kann gegenwärtig nur spekuliert werden, wo der genaue Defekt bei dieser Mutante liegt; es liegt jedoch nahe, zu vermuten, dass entweder Ribose-2'-O-Methylierungen im Sinne einer Cap1- oder Cap2-Modifizierung am 5'-Ende des Genoms oder zumindest die Bindung von nsp16 an eine 5'-Cap0-Struktur einen essentiellen Schritt in der viralen RNA-Synthese darstellt.

Versucht man, die Informationen, die durch die revers-genetischen Studien an den Nichtstrukturproteinen 13, 14, 15 und 16 erlangt wurden, im Zusammenhang der coronaviralen Replikation zu deuten, so kann festgehalten werden, dass alle genannten Proteine eine Funktion bei der viralen RNA-Synthese besitzen. Im Falle der Exonuklease, nsp14, war diese Funktion von eminenter Bedeutung, im Falle der Helikase, nsp13, und der putativen Methyltransferase, nsp16, sogar von essentieller Bedeutung. Für die Exonuklease ergaben sich darüber hinaus auch erste Hinweise für eine Beteiligung des Enzyms an der Transkription von sgRNAs. Dieser Befund ist insofern überraschend, da Arteriviren, die ebenfalls einen umfangreichen Satz 5'- und 3'-coterminaler sgRNAs synthetisieren, keine Exonuklease kodieren. Die Daten könnten somit darauf hinweisen, dass es in einigen molekularen Details Unterschiede in der Enzymologie der Synthese von sgRNAs zwischen den verschiedenen Nidovirus-Familien gibt.

Die Bedeutung der Endonuklease, nsp15, kann aus den HCoV-229E-Mutagenese-Daten nicht eindeutig bewertet werden, ihre Funktion scheint jedoch weniger für die virale RNA-Synthese selbst als vielmehr für die effiziente Produktion infektiöser Virionen von Bedeutung zu sein. Im Kapitel 5.6 wird diese Thematik mit weiteren Informationen aus dem HCoV-229E-Replikonsystem erneut aufgegriffen und ausführlicher diskutiert.

5.5 Mutagenisierte M^{PRO}-Schnittstellen

Die Hauptprotease M^{PRO} ist hauptverantwortlich für die Prozessierung der beiden Polyproteine pp1a und pp1ab. Die verfügbaren Daten lassen vermuten, dass die Spaltung an den unterschiedlichen Schnittstellen streng reguliert ist, sei es durch den Zeitpunkt der Spaltung, die die Stabilität bestimmter Prozessierungsintermediate bestimmt, oder durch die zeitliche Abfolge bestimmter Spaltungen im Replikationszyklus (Ziebuhr et al., 2000; Anand et al., 2003). Zur Untersuchung möglicher Effekte auf den Replikationszyklus durch Eingriffe in diese postulierte Feinregulation der proteolytischen Prozessierung der Replikase-Polyproteine wurden Mutationen im ORF1b vorgenommen, die zu Substitutionen an definierten M^{PRO}-Schnittstellen führten. Die Mehrzahl dieser Substitutionen sollte die Spaltung nicht völlig unterbinden, sondern lediglich die Geschwindigkeit der Spaltung verringern. Dies wurde in der Regel durch Substitution des P1'-Restes (Alanin, Serin, Glycin) durch einen etwas größeren Rest, nämlich Valin, erreicht, der (lt. vorliegender Strukturdaten) nicht oder nur schlecht von der relativ kleinen S1'-Tasche der M^{PRO} aufgenommen werden kann.

5.5.1 Mutierte Schnittstellen im ORF1a-kodierten Bereich von pp1a/ pp1ab

Die nsp8-nsp9-Schnittstelle weicht bei allen Coronaviren mit ihrem LQIN-Erkennungsmotiv vom kanonischen LQIS-Motiv ab. Biochemisch konnte gezeigt werden, dass dieses Motiv zwar von der M^{PRO} als Substrat erkannt wird, aber die Effizienz der Spaltung deutlich geringer als bei anderen Spaltstellen ist (Hegyí & Ziebuhr 2002). Als möglicher Grund für die Konservierung dieser nicht-kanonischen Schnittstelle wäre zum einen denkbar, dass ein ungespaltenes oder verzögert gespaltenes nsp8-nsp9-Intermediat für eine bestimmte Funktion im viralen Replikationszyklus benötigt wird. Andererseits könnte auch der Asparaginrest am N-Terminus von nsp9 eine bestimmte Funktion besitzen, die so wichtig ist, dass eine verzögerte Prozessierung dieser Spaltstelle zur Aufrechterhaltung der Asparaginfunktionalität vom Virus toleriert wird.

Zur Untersuchung dieser beiden Hypothesen wurden die Mutanten HCoV-8QA9 und HCoV-8NS9 hergestellt. Bei HCoV-8NS9 wurde das aminoternale Asparagin des nsp9 durch ein Serin substituiert, wodurch das kanonische Motiv, wie man es an anderen M^{PRO}-Schnittstellen findet, wiederhergestellt wurde. Es zeigte sich, dass HCoV-8NS9 ein lebensfähiges Virus mit nahezu wildtypischem Wachstum ist. Auch nach zehnfacher Passagierung fand sich die Substitution N3825S nach wie vor im Genom wieder. Der im wesentlichen wildtypische Phänotyp des rekombinanten Virus HCoV-8NS9 schließt im Hinblick auf die Konservierung der

nicht-kanonischen nsp8-nsp9-Spaltstelle die Notwendigkeit eines Asparaginrests am Aminoterminus des nsp9 als Ursache für dieses Motiv *in vitro* aus. Es besteht jedoch die theoretische Möglichkeit, dass das aminoterminale Asparagin von nsp9 seine Bedeutung nur *in vivo*, also im infizierten Wirt, entfaltet. Da es gegenwärtig jedoch kein geeignetes Tiermodell für HCoV-229E-Infektionen gibt, könnte diese Möglichkeit nur durch die Charakterisierung entsprechender Mutanten animaler Coronaviren, wie z.B. MHV, näher untersucht werden.

Bei der zweiten Mutante, HCoV-8QA9, wurde das konservierte Glutamin an der P1-Position der M^{PRO}-Spaltstelle durch Alanin substituiert, wodurch die M^{PRO}-Spaltung ausgeschaltet wird, da das P1-Glutamin essentiell für die Substratbindung ist. Auf diese Weise würde also ein stabiles nsp8-nsp9-Fusionsprotein entstehen. Die Mutante HCoV-8QA9 erwies sich als replikationsdefizient. Dieser Befund zeigt, dass die Prozessierung (wenn vielleicht auch ineffizient) der nsp8/9-Spaltstelle essentiell ist. Selbst wenn ein stabiles nsp8-9-Intermediat von Bedeutung wäre, ist dieses Intermediat offenbar weniger wichtig als die vollständige Prozessierung von nsp8. Dies wird auch durch die Daten zur nsp7/8-Spaltstelle gestützt. In diesem Fall wurde das carboxyterminale Glutamin von nsp7 durch ein Alanin substituiert. Hierdurch sollte die Spaltung zwischen nsp7 und nsp8 verhindert werden. Die Beobachtung, dass die Mutante HCoV-7QA8 replikationsdefizient war, lässt den Schluss zu, dass eine nsp7-nsp8-Spaltung ebenfalls essentiell für die Replikation ist. Die kürzlich publizierte Arbeit von Zhai *et al.* (2005) bietet eine naheliegende Erklärung für die Replikationsdefizienz der Mutanten HCoV-7QA8 und HCoV-8QA9. Dort wurde nämlich gezeigt, dass die beiden coronaviralen Nichtstrukturproteine 7 und 8 einen hexadekameren Superkomplex aus jeweils 8 nsp7- und nsp8-Molekülen bilden (Zhai et al., 2005). Eine korrekte Spaltung an den nsp7-nsp8- und nsp8-nsp9-M^{PRO}-Schnittstellen erscheint somit für die Ausbildung dieses Komplexes unerlässlich. Somit weisen die beiden Mutanten HCoV-7QA8 und HCoV-8QA9 auf eine elementare Rolle dieses Superkomplexes bei der viralen Replikation hin, die auch durch die Charakterisierung chimärer Coronaviren gestützt wird (siehe weiter unten).

5.5.2 Mutierte Schnittstellen im ORF1b-kodierten Bereich von pp1ab

Um die Auswirkungen mutierter Schnittstellen im ORF1b-kodierten pp1ab-Bereich auf die Replikation zu untersuchen, wurden vier HCoV-229E-RNAs hergestellt, bei denen das jeweilige Kodon an der P1'-Position der M^{PRO}-Spaltstelle durch das eines Valins substituiert wurde: HCoV-12AV13, HCoV-13SV14, HCoV-14GV15 und HCoV-15SV16. Wie bereits oben ausgeführt, legt die Kristallstruktur der HCoV-229E-M^{PRO} die Vermutung nahe, dass ein Valin an der P1'-Position die Effizienz der Spaltung an dieser Schnittstelle deutlich herabsetzen würde

(Anand et al., 2002; Anand et al., 2003). Die Daten zeigten, dass HCoV-12AV13 replikationsdefizient war. Die anderen drei Mutanten zeigten eine umso stärkere Reduktion der RNA-Synthese, je weiter carboxyterminal die betroffene Schnittstelle im pp1ab lag. Keine der vier Mutanten war jedoch lebensfähig. Lediglich bei HCoV-13SV14 war in der ersten Passage eine RNA-Synthese auf niedrigem Niveau nachweisbar. Ein CPE konnte hingegen bei diesen Zellen nicht beobachtet werden.

Eine nähere Charakterisierung des Phänotyps des rekombinanten Virus HCoV-13SV14 im Stadium P0 ergab, dass das molare Verhältnis zwischen den subgenomischen RNAs 6 und 7 vom wildtypischen Verhältnis abwich. Es liegt nahe, zu spekulieren, dass die hier erzeugte ineffiziente Spaltung zwischen nsp13 und nsp14 die Funktionalität der Helikase (nsp13) oder der Exonuklease (nsp14) oder beider Proteine negativ beeinflusst und somit den beobachteten Defekt ausgelöst hat. Diese Hypothese wird auch durch andere Mutanten von nsp14 (diese Studie) und nsp13 (bzw. dessen Äquivalent in EAV – nsp10) gestützt. Für beide Proteine war eine spezifische Rolle in der Synthese der subgenomischen RNAs postuliert worden (van Dinten et al., 2000; Minskaia et al., 2006).

Ein Vergleich der M^{PRO}-Schnittstellen verschiedener Coronaviren zeigt, dass die nsp13-nsp14-Spaltstelle die am geringsten konservierte ORF1b-kodierte Spaltstelle ist. So zeichnet sich beispielweise die nsp13-nsp14-Schnittstelle von HCoV-NL63 durch ein Histidin an der P1-Position aus, was bisher bei keiner anderen Coronavirus-M^{PRO}-Spaltstelle beobachtet wurde. Auch besitzt MHV ein Cystein an der P1'-Position. Diese Daten deuten auf eine weniger effizient verlaufende Prozessierung dieser Spaltstelle hin, so dass offenbar auch andere Substitutionen, die zu einer verzögerten Prozessierung führen, an dieser Stelle toleriert werden. Die nur geringfügig beeinträchtigte RNA-Synthese der Mutante HCoV-13SV14 im Vergleich zur Syntheseleistung der anderen Schnittstellenmutanten unterstützt diese Hypothese.

5.6 Das HCoV-229E-Replikonsystem

Als Replikon bezeichnet man eine in Zellen sich selbst replizierende RNA, die von einem RNA-Virus-Genom abgeleitet wurde. Diese RNA kodiert alle notwendigen viralen Proteinfunktionen für ihre eigene Replikation, kodiert jedoch keine oder nur einen Teil der viralen Strukturproteine, so dass keine infektiösen Partikel gebildet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein auf HCoV-229E basierendes Replikon hergestellt, das stabil in BHK-21-Zellen replizierte (Hertzog et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass innerhalb von zwei Monaten nur sehr wenige Veränderungen in der kodierenden Sequenz auftraten. Diese Beobachtungen lassen vermuten,

dass für eine stabile Koexistenz der viralen RNA und der Wirtszelle nur wenige Mutationen im viralen Genom entweder zulässig oder aber erforderlich sind.

Für das Replikonsystem sind eine Reihe von Anwendungen in praktischer und wissenschaftlicher Hinsicht denkbar. Besonders interessant ist die Möglichkeit der Herstellung eines Replikonsystems für SCoV zur Charakterisierung der viralen Replikase. Da mangels Strukturproteinen keine infektiösen viralen Partikel produziert werden können, bestünde keine Gefährdung des Personals, und Arbeiten mit einem SCoV-Replikon könnten auf niedrigerer Sicherheitsebene durchgeführt werden, als sie für infektiöses SCoV erforderlich sind. Darüber hinaus bieten die Replikonzellen ein praktisches System zum *Screening* nach coronaviralen Replikationshemmern, da sich aufgrund des Reportergens *gfp* die Auswertung entsprechender Versuche einfach gestaltet (Hertzog et al., 2004).

In dieser Arbeit wurde das Replikonsystem eingesetzt, um einen Defekt, den die H6360A-Substitution im Virus verursachte, intensiver zu untersuchen. Direkt nach der Transfektion war zwar die RNA-Synthese reduziert, aber die TNI-ENDO-HA-RNA konnte über einen Monat in Zellkultur gehalten werden, ohne dass sich dabei die Sequenz des rekombinanten Nichtstrukturproteins 15 veränderte. Die Replikationseffizienz reichte offenbar aus, um den Selektionsmarker in ausreichender Menge für eine Geneticin-Selektion zu exprimieren. Im viralen System war die RNA-Synthese ebenfalls klar nachweisbar, die Titer waren jedoch gering und nach drei Passagierungen des Virus war kein CPE mehr nachweisbar. Die Experimente mit der lebensfähigen Replikonmutante TNI-ENDO-HA und dem HCoV-ENDO-HA-Virus lassen den Schluss zu, dass der durch die nsp15-Substitution ausgelöste Defekt erst relativ spät im viralen Infektionszyklus voll zum Tragen kommt. Ganz ähnlich wurden auch die Ergebnisse für die äquivalente H6360A-Substitution in der Endonuklease von EAV interpretiert, und es wurde postuliert, dass das Enzym eine Rolle in einem Prozess spielt, der der viralen RNA-Synthese nachgeschaltet ist, wie z.B. dem *Assembly* der Virionen (Posthuma et al., 2006).

5.7 Chimäre Viren

Eine Chimäre ist ein Virus, dessen Genom Sequenzabschnitte eines anderen Virus beinhaltet. Die bisher hergestellten chimären Coronaviren enthielten diese Fremdsequenzen jedoch lediglich im Bereich der Strukturgene. Dabei wurden mit Hilfe geeigneter Zellen, die durch entsprechende Rezeptoren auf ihrer Oberfläche eine Infektion mit Viren ermöglichten, die ein an diesen Rezeptor bindendes S-Protein kodierten, rekombinante Viren hergestellt bzw. selektiert, die spezifische Punktmutationen, Deletionen oder Gen-Substitutionen im S-Gen oder angrenzenden

Bereichen trugen (Peng et al., 1995; Lavi et al., 1998a; Lavi et al., 1998b; Phillips et al., 1999; Kuo et al., 2000; Phillips et al., 2001; Popova & Zhang 2002).

In Rahmen dieser Arbeit wurden chimäre Coronaviren hergestellt, bei denen die genetische Information eines anderen Coronavirus die homologe Information im Replikasegen des HCoV-229E substituierte. Dieser Ansatz wurde vor allem zur Untersuchung der Nichtstrukturproteine nsp7, nsp8 und nsp9 gewählt, da für diese Proteine zu Beginn der Arbeit keine Kenntnisse über die Funktion und Struktur dieser Proteine oder die Bedeutung einzelner Reste vorlagen. Den theoretischen Hintergrund dieses Ansatzes bildete die Überlegung, dass in einer chimären Replikase das homologe Protein zwar sicher dieselbe Funktion im Replikationszyklus ausübt, aber etwaige Wechselwirkungen mit anderen Proteinen oder RNA-Elementen suboptimal erfolgen würden und somit zu adaptiven Mutationen Anlass geben würden, die interessante Informationen liefern könnten.

In der ersten Phase des Experiments sollte zunächst festgestellt werden, inwieweit das homologe Fremdprotein im Kontext des chimären Virus in der Lage war, die Rolle des wildtypischen Proteins im Replikationszyklus zu übernehmen. Eventuell auftretende partielle Replikationsdefekte sollten dann erste Rückschlüsse auf die Bedeutung dieses Proteins bei bestimmten Teilprozessen der Virusreplikation ermöglichen. Abhängig vom Ergebnis der ersten Versuchsphase wurde anschließend versucht, Adaptationen auf Sequenzebene zu identifizieren, die durch das Fremdprotein im Laufe der Passagierung replikationskompetenter chimärer Viren ausgelöst wurden, um die Replikationsfähigkeit des Virus zu verbessern bzw. vollständig wiederherzustellen. Aus diesen Informationen sollten dann Schlussfolgerungen auf mögliche Interaktionspartner des jeweiligen Proteins gezogen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Substitution des nsp8 durch das entsprechende Homolog der Viren PEDV-CV777 oder HCoV-NL63 die Fähigkeit von HCoV-8PEDV bzw. HCoV-8NL unterband, RNA-Synthese zu betreiben. Das bedeutet, dass das nsp8 von PEDV-CV777 bzw. HCoV-NL64 nicht in der Lage war, die Rolle des wildtypischen, also von HCoV-229E abstammenden, Nichtstrukturproteins 8 im Kontext von HCoV-229E zu übernehmen.

Bezüglich der Bedeutung von nsp8 im coronaviralen Replikationszyklus bestätigt diese Beobachtung die in Kapitel 5.5.1 gezogene Schlussfolgerung, dass nsp8 bzw. der hexadekamere Komplex aus acht nsp7- und nsp8-Molekülen, der von Zhai *et al.* beschrieben wurde (Zhai et al., 2005), eine essentielle Rolle im coronaviralen Replikationszyklus spielen. Darüber hinaus konnte aus der Arbeit von Zhai *et al.* gefolgert werden, dass die beobachtete Replikationsdefizienz dieser beiden nsp8-Chimären wahrscheinlich in einer unzureichenden Fähigkeit des Fremdproteins zur Interaktion mit dem wildtypischen nsp7, wie sie für die

Ausbildung des nsp7-nsp8-Superkomplexes erforderlich ist, begründet war (Zhai et al., 2005). Darüber hinaus könnten jedoch auch andere Interaktionsdefekte des Fremdproteins, zum Beispiel mit nsp9 (Sutton et al., 2004), für die funktionellen Defekte der chimären Replikase verantwortlich sein.

Diese Hypothese wurde mittels weiterer Mutanten überprüft, bei denen der „chimäre Bereich“ (also der Bereich mit Fremdsequenzen) erweitert wurde. Neben nsp8 allein wurden dabei entweder nsp7 (HCoV-7+8NL), nsp9 (HCoV-8+9NL) oder nsp7 und nsp9 (HCoV-7-9NL) mit den homologen Sequenzen aus HCoV-NL63 ersetzt. Es zeigte sich, dass eine gleichzeitige Substitution der Proteine nsp8 und nsp9 nicht zu einer Wiederherstellung der viralen Replikation führte (HCoV-8+9NL), wohingegen Chimären, bei denen nsp7 und nsp8 (HCoV-7+8NL) bzw. nsp7 bis nsp9 (HCoV-7-9NL) durch die entsprechenden Proteine von HCoV-NL63 substituiert waren, zu einer schwachen RNA-Synthese befähigt waren. Dies lässt den Schluss zu, dass eine nichtfunktionelle nsp7-nsp8-Interaktion der entscheidende Faktor für die Replikationsdefizienz der beiden nsp8-Chimären war. Um diese Schlussfolgerung noch weiter zu stützen, müsste jedoch noch gezeigt werden, dass eine alleinige Substitution von nsp7 genauso letal ist wie es der Austausch von nsp8 war.

Die schwache RNA-Synthese im Stadium P0 des chimären Virus HCoV-7+8NL im Vergleich zum Wildtyp lässt darüber hinaus die Schlussfolgerung zu, dass ein funktioneller nsp7-nsp8-Komplex zwar für die Replikation notwendig ist, aber neben dieser Interaktion noch weitere Wechselwirkungen der beiden Einzelproteine oder des gesamten nsp7-nsp8-Komplexes mit anderen Komponenten der Replikationsmaschinerie eine wichtige Rolle spielen. Es ist relativ unwahrscheinlich, dass nsp9 der hierfür verantwortliche Interaktionspartner ist, da die Chimäre, bei der die Nichtstrukturproteine 7 bis 9 substituiert waren (HCoV-7-9NL), ebenfalls einen schweren Defekt in der RNA-Synthese aufwies, der mit dem des HCoV-7+8NL-Virus vergleichbar war.

Da HCoV-7-9NL und HCoV-7+8NL begrenzt replikationsfähig waren, konnten 13 unterschiedliche Klone der Chimäre HCoV-7-9NL und mindestens 6 unterschiedliche Klone der Chimäre HCoV-7+8NL isoliert und charakterisiert werden. Mittels Northern Blottings konnte gezeigt werden, dass die RNA-Synthese aller Klone deutlich stärker war als direkt nach der Transfektion. Diese Zunahme der RNA-Syntheseleistung ließ den Schluss zu, dass während der Passagierung der chimären Viren in Zellkultur adaptive Mutationen erworben worden waren, weshalb die Sequenz dieser Klone bestimmt wurde. Die Sequenzanalyse der Klone von HCoV-7-9NL und HCoV-7+8NL ergab, dass tatsächlich alle Klone weitere Mutationen erworben hatten (siehe Tabellen 4.29, 4.30 und 4.31 und Abbildung 4.45), was auf einen starken Selektionsdruck

zur Optimierung der nsp7-8(-9)-Funktion und damit auch der RNA-Syntheseleistung schließen lässt.

Von den 13 unterschiedlichen Klonen des Virus HCoV-7-9NL erwarben zehn Klone sechs unterschiedliche Mutationen in der Helikasedomäne des nsp13. Der Klon B2 hatte zwei Mutationen in nsp13 erworben, die sich von den oben genannten sechs Mutationen unterschieden. Die Tatsache, dass eine Mutation in der Helikasedomäne von nsp13 auch bei drei Isolaten von HCoV-7+8NL gefunden wurde, legt die Schlussfolgerung nahe, dass die HCoV-NL63-nsp7-nsp8-Proteine für diese adaptiven Mutationen verantwortlich waren. Zum einen könnte diese Anpassung durch eine direkte Protein-Protein-Interaktion des nsp7-nsp8-Komplexes mit nsp13 zustande kommen. Zum anderen könnte ein durch den HCoV-NL63-nsp7-nsp8-Komplex verursachter, gegenwärtig noch unbekannter Defekt während der Replikation über eine Modifikation der nsp13-assoziierten Helikaseaktivität oder -spezifität kompensiert werden.

Ähnliche Schlussfolgerungen sind für die RNA-abhängige RNA Polymerase (nsp12) möglich, da bei vier Klonen von HCoV-7-9NL sowie bei vier Klonen von HCoV-7+8NL insgesamt 4 unterschiedliche, nichtsynonyme Mutationen auftraten. Auch diese adaptiven Mutationen lassen sich sowohl durch eine direkte Protein-Protein-Interaktion des nsp7-nsp8-Komplexes mit nsp12, wie auch durch eine notwendige kompensatorische Veränderung der Polymeraseaktivität oder -spezifität erklären.

Beide Erklärungsversuche zu möglichen funktionellen Hintergründen der gefundenen adaptiven Mutationen in den Nichtstrukturproteinen 12 und 13 passen zu der Beobachtung, dass nsp7, nsp8 und nsp9 mit der Hauptprotease (nsp5), der Polymerase (nsp12) und der Helikase (nsp13) perinukleär co-lokalisieren und auch co-immunpräzipitiert werden können (Bost et al., 2000; Brockway et al., 2003). Diese Co-immunpräzipitation kann sowohl als Hinweis auf eine direkte Interaktion der beteiligten Proteine interpretiert werden, als auch als Beleg für einen gemeinsamen *Pathway*, an dem all diese Proteine beteiligt sind. Zur Stützung dieser Hypothese könnte eventuell auch die gefundene Mutation in der Hauptprotease herangezogen werden. Da jedoch nur eine einzige Mutation bei lediglich drei Klonen gefunden wurde, sollte diese Beobachtung nicht überinterpretiert werden. Weitere Experimente sind sicher erforderlich, um eine mögliche Beteiligung der Hauptprotease an diesen komplexen Proteinwechselwirkungen zu bestätigen.

In den Nichtstrukturproteinen 7 und 8 wurden ebenfalls adaptive Mutationen gefunden. Drei Klone von HCoV-7-9NL zeigten zwei unterschiedliche Mutationen im nsp7 und eine Mutation im nsp8, und ein Isolat von HCoV-7+8NL zeigte eine Mutation im nsp8. Da beide Proteine aus

HCoV-NL63 stammten, ist es wahrscheinlich, dass diese Mutationen Adaptationen sind, die Interaktionen mit anderen Proteinen oder Aktivitäten optimieren oder mögliche Interaktionen mit RNA-Elementen des HCoV-229E verbessern. Die individuellen molekularen Hintergründe dieser Anpassungen bleiben in weiteren Experimenten zu untersuchen.

Sechs der 13 Klone von HCoV-7-9NL hatten drei Mutationen im Bereich der HCoV-229E Nukleotide 12522-12525. An Position 12522 fand sich nur bei einem Klon eine Mutation, während an Position 12525 bei fünf Klonen eine Sequenzveränderung nachgewiesen werden konnte. Von diesen fünf Klonen wiesen drei einen Basenaustausch von Cytosin zu Uracil und die beiden anderen einen Austausch von Cytosin zu Adenosin auf.

Alle Mutationen im genannten Sequenzabschnitt waren nur im ORF1a mit einem Aminosäureaustausch im nsp11 verbunden, im ORF1b blieben sie hingegen still, und die Aminosäuresequenz des nsp12 veränderte sich nicht. Die Mutationen fanden sich zwischen der „*slippery sequence*“, an der die -1 Leserasterverschiebung stattfindet, und dem „*stem1*“, also dem Beginn der RNA-Pseudoknotenstruktur (Brierley et al., 1987; Brierley et al., 1989; Herold et al., 1993). Mittels *In-vitro*-Translationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass alle drei gefundenen Mutationen die Effizienz der Leserasterverschiebung beeinflussten. So wiesen die Mutanten *in vitro* im Vergleich zum Wildtyp eine gesteigerte Verschiebungsrate auf, was auf einen erhöhten Anteil von Produkten des ORF1b gegenüber den Produkten des ORF1a schließen lässt. Die höhere Anzahl an 1b-Produkten könnte möglicherweise einen von den chimären Nichtstrukturproteinen 7 und 8 verursachten Defekt (zum Beispiel niedrigaffine Wechselwirkungen) kompensieren. Da die individuelle Bedeutung der Nukleotide zwischen der *slippery sequence* und dem *stem1* nicht bekannt ist, können jedoch gegenwärtig keine Rückschlüsse auf den Mechanismus gezogen werden, der zur Steigerung der Rasterverschiebungsrate führte.

Zusammenfassend legen die Daten aus der Sequenzanalyse und den *In-vitro*-Translationsexperimenten eine indirekte (funktionelle) oder direkte (strukturelle) Interaktion der beiden Nichtstrukturproteine 7 und 8 mit den für die Replikation hauptverantwortlichen Proteinen 12 und 13 nahe.

Es konnte jedoch bei der Sequenzanalyse des Klons D2 festgestellt werden, dass eine Rekonstitution der RNA-Synthese-Effizienz offensichtlich auch auf andere Art und Weise erfolgen kann. Der Klon D2 erwarb zwei Mutationen, von denen sich eine im nsp6, welches eine Membrandomäne enthält, und eine im N-Gen befand. Es bleibt unklar, auf welcher Ebene dieses Virus seine Replikationskompetenz optimiert hat. Einen möglichen Ansatzpunkt könnte die

Beobachtung darstellen, dass auch das N-Protein an der RNA-Replikation von HCoV-229E beteiligt ist (Schelle et al., 2005).

Die Charakterisierung der Wachstumskinetik der passagierten Klone zeigte, dass 24 Stunden *p.i.* die Virustiter bei etwa zehn (HCoV-7-9NL) bis 30 Prozent (HCoV-7+8NL) des wildtypischen Titers lagen, d.h. dass alle erworbenen adaptiven Mutationen nicht in der Lage waren, den wildtypischen Phänotyp wieder vollständig herzustellen.

In dieser Arbeit wurde erstmals das revers-genetische System von HCoV-229E zu einer umfassenden funktionellen Analyse des viralen Replikationskomplexes genutzt. Es wurden interessante Einblicke in die Funktionen einzelner Proteine, mögliche Wechselwirkungen der Replikase-Subkomponenten untereinander und die M^{PRO}-kontrollierte Regulation Aktivität des Replikationskomplexes gewonnen. So wurde die Rolle der Nichtstrukturproteine 13, 14, 15 und 16, die eine biochemisch nachgewiesene oder vermutete enzymatische Funktion besitzen, im Zellkulturmodell näher untersucht und die bisherigen Daten aus *In-vitro*-Experimenten überprüft. Darüber hinaus konnten die Einblicke in die Funktionen des nidoviralen Replikationskomplexes, die bisher hauptsächlich durch Arbeiten mit dem revers-genetischen System von EAV gewonnen worden waren, auf die Coronaviren erweitert werden. Zum anderen wurde mittels Substitutionen von M^{PRO}-Schnittstellen die eminente Bedeutung der posttranslationalen Regulation der Expression replikativer Proteine herausgearbeitet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde darüber hinaus ein auf dem HCoV-229E basierendes Replikon hergestellt, das –wie hier an einem Beispiel gezeigt wurde– genutzt werden kann, um nichtreplikative Defekte von Virusmutanten näher zu charakterisieren. Darüber hinaus bietet das Replikonsystem einige Vorteile praktischer Art, wie zum Beispiel ein hohes Maß an Biosicherheit und einfache Auswertung der Genexpression mittels Reportergenen.

Das Hauptgewicht dieser Arbeit lag auf der Charakterisierung chimärer Viren, bei denen eines oder mehrere Proteine der nsp7-nsp8-nsp9-Triade gegen das entsprechende Protein von HCoV-NL63 ausgetauscht wurde(n). Es wurden bei Klonen dieser HCoV-229E/ NL63-Chimären eine Reihe von adaptiven Mutationen in anderen replikationsrelevanten Proteinen von HCoV-229E identifiziert, die eine funktionelle oder strukturelle Interaktion sehr wahrscheinlich machen. Mittels weiterer noch herzustellender Chimären, wie z.B. eines Austausches von nsp13 mit und ohne gleichzeitigem Austausch von nsp7 bis nsp9, könnten die relevanten Interaktionen weiter eingegrenzt und charakterisiert werden. Andererseits bieten natürlich diese revers-genetischen Befunde außerordentlich interessante Ansatzpunkte für weitergehende biochemische Studien,

insbesondere auch hinsichtlich möglicher Protein-Protein-Wechselwirkungen und Kofaktorfunktionen von Enzymaktivitäten.

Zum anderen wurden einige Mutationen in dem Bereich des Genoms festgestellt, an dem die ribosomale Leserasterverschiebung stattfindet. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Bedeutung dieser Mutationen in der Modifikation der translationellen Regulation lag, die die molaren Verhältnisse zwischen den beiden großen Polypeptiden pp1a und pp1ab bestimmt. Wiewohl die Bedeutung der Anzahl der Nukleotide zwischen der *slippery sequence* und dem Beginn der RNA-Pseudoknotenstruktur zum einen (Naphthine et al., 1999) und der Mechanismus der Verschiebung zum anderen (Plant et al., 2003; Namy et al., 2006) bekannt sind, so existieren bisher keine Erkenntnisse über die Bedeutung individueller Nukleotide zwischen den genannten Elementen. Die vorliegende Arbeit könnte Hinweise auf noch unberücksichtigte Faktoren im Ablauf der Leserasterverschiebung geben, die durch eine umfassende funktionelle Analyse dieser Nukleotide aufgeklärt werden könnten.

Die Daten dieser Arbeit bieten somit vielfältige Ansatzpunkte für weitergehende revers-genetische und biochemische Studien zur weiteren Aufklärung der Struktur und Funktionsweise des coronaviralen Replikationskomplexes, der nicht nur Virusgenome von einzigartiger Größe replizieren muss, sondern auch in der Lage ist, zahlreiche subgenomische RNAs in einem ungewöhnlichen Syntheseprozess zu generieren. Darüber hinaus besitzt dieser Komplex auch Funktionen, die offenbar nicht unmittelbar für die virale RNA-Synthese benötigt sind, jedoch andere zentrale Funktionen im viralen Lebenszyklus vermitteln. Die Größe und Komplexität des coronaviralen Genoms und die vielfältigen Regulationsebenen seiner Expression lassen erwarten, dass das Studium der molekularen Grundlagen der coronaviralen Replikation interessante Einblicke in den Metabolismus großer viraler RNA-Moleküle gewähren wird, für dessen Verständnis sicher eine Vielzahl weiterer revers-genetischer, biochemischer und struktureller Studien erforderlich sind.

6 Zusammenfassung

Coronaviren besitzen mit etwa 30 kb das größte Genom aller bisher bekannten RNA-Viren. Die Synthese der subgenomischen RNAs findet durch einen einzigartigen Mechanismus, die sog. diskontinuierliche Transkription, statt. Diese beiden Besonderheiten erfordern einen leistungsfähigen Replikationskomplex, der sich aus den Prozessierungsprodukten der Polyproteine 1a und 1ab und einigen zellulären Proteinen zusammensetzt. Die Aktivitäten und die Expression der beteiligten Proteine werden auf co- und posttranslationeller Ebene reguliert. Dazu gehört eine ribosomale Leserasterverschiebung, die das Verhältnis zwischen den ORF1a- und ORF1b-kodierten Proteinen festlegt, sowie eine umfangreiche proteolytische Prozessierung durch virale Proteasen. Während die hochkonservierten ORF1b-kodierten Proteine vor allem RNA-synthetisierende und -prozessierende Funktionen besitzen, übernehmen die weniger konservierten ORF1a-kodierten Proteine vor allem organisierende oder regulierende Funktionen. So sind sie beispielsweise maßgeblich an der intrazellulären Lokalisation, strukturellen Organisation und proteolytischen Regulation des Replikationskomplexes beteiligt und haben darüber hinaus nichtessentielle Aufgaben, die möglicherweise bei spezifischen Interaktionen des Virus mit seinem Wirt von Bedeutung sind. Die meisten der bisher charakterisierten ORF1b-kodierten Proteine besitzen essentielle Enzymfunktionen im viralen RNA-Metabolismus. Einige dieser Enzyme, wie die NendoU oder ExoN, sind spezifisch für die *Nidovirales* oder nur bestimmte Nidovirusfamilien.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels eines revers-genetischen Ansatzes versucht, die Funktion und Bedeutung verschiedener viraler Proteine im Replikationszyklus von HCoV-229E zu untersuchen. Dazu wurden Transkripte von HCoV-229E-cDNAs genomischer Länge, in die entsprechende Substitutionen eingeführt worden waren, in Zellen transfiziert und anschließend analysiert, inwieweit eine virale RNA-Synthese stattfand. Sofern sich infektiöse Viren im Zellkulturüberstand befanden, wurde diese näher charakterisiert, insbesondere um mögliche Defekte in der Virusreplikation und Veränderungen in der Sequenz zu identifizieren.

Es wurde gezeigt, dass die Nichtstrukturproteine 13, 14, 15 und 16 wichtige Funktionen innerhalb der viralen RNA-Synthese besitzen, wobei die Aktivitäten von nsp13 und nsp16 essentiell waren. Als besonders kritisch erwiesen sich auch die zinkbindenden Reste der N-terminalen Subdomäne (ZBD) des Nichtstrukturproteins 13. Das Nichtstrukturprotein 14 besitzt ebenfalls eine zentrale Rolle innerhalb der viralen RNA-Synthese und scheint darüber hinaus an der Synthese der subgenomischen RNAs beteiligt zu sein. Die Bedeutung von nsp15 für die

Lebensfähigkeit von HCoV-229E konnte anhand entsprechender Mutanten zweifelsfrei nachgewiesen werden, wobei die maßgeblichen Defekte wohl nicht ausschließlich in der RNA-Synthese, sondern eher in einem späteren Schritt des Replikationszyklus zu suchen sind.

Mittels verschiedener Mutanten, die Substitutionen an Spaltstellen der M^{PRO} trugen, konnte die essentielle Bedeutung der posttranslationalen Regulation der Replikaseaktivität durch die Hauptprotease gezeigt werden. In den allermeisten Fällen führten Mutationen, die die Spaltungseffizienz reduzierten, zu einem Abfall in der RNA-Synthese und lebensfähige Viren konnten nicht isoliert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Replikon auf der Basis des HCoV-229E hergestellt, das über Monate in Zellkultur gehalten und dessen Reporterexpression durch Fluoreszenz-Mikroskopie beobachtet werden konnte. Es zeigte sich, dass für eine dauerhafte Koexistenz von Wirtszelle und Replikon-RNA nur wenige Veränderungen im viralen Genom notwendig waren. Mit Hilfe eines mutierten Derivats dieses Replikons gelang es, den Defekt einer viralen nsp15-Mutante näher zu charakterisieren.

Der Hauptteil der Arbeit widmete sich der Charakterisierung von chimären HCoV-229E-Klonen, deren Nichtstrukturproteine 7 und 8 bzw. 7 bis 9 gegen die entsprechenden Proteine des HCoV-NL63 ausgetauscht wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die Nichtstrukturproteine 7 und 8 von derselben Spezies stammen müssen, damit RNA-Synthese stattfindet, was auf eine essentielle Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen schließen ließ. Die Identifizierung und Analyse adaptiver Mutationen in allen hier untersuchten chimären Klonen zeigte, dass offenbar neben der nsp7-nsp8-Interaktion noch weitere Interaktionen dieser Proteine mit anderen Proteinen, wie zum Beispiel nsp12 und nsp13, auf funktioneller und/oder struktureller Ebene von Bedeutung sind. Darüber hinaus ließen eine Reihe von Mutationen im Bereich des Leserasterverschiebungselements darauf schließen, dass sich bei diesen Viren die Leserasterverschiebungsraten geändert haben könnten. Diese Hypothese konnte durch *In-vitro*-Translationsexperimente bestätigt werden. Es zeigte sich, dass durch diese Mutationen die Leserasterverschiebungsraten von 50 % in der wildtypischen Situation auf 65 - 70 % angehoben wurde. Diese relative Überexpression von ORF1b-Proteinen scheint zur Kompensation funktioneller Defekte, die durch die Fremdproteine nsp7 und nsp8 verursacht wurden, beizutragen. Obwohl bei den meisten chimären Klonen eine RNA-Synthese auf nahezu wildtypischem Niveau beobachtet werden konnte, wiesen Reduktionen im Virustiter um 60 - 90 % auf verbliebene funktionelle Defekte im Replikationszyklus dieser Viren hin.

7 Summary

With genome sizes of about 30 kb, coronaviruses have the largest genomes of all known RNA viruses. The synthesis of subgenomic RNAs employs a unique mechanism called discontinuous transcription. These two specific features require a powerful replication complex which is comprised of the proteolytic processing products of the polyproteins 1a and 1ab and several cellular proteins. The activities and the expression of the viral proteins are co- and posttranslationally regulated. This regulation involves ribosomal frameshifting, which determines the molar ratio between ORF1a- and ORF1b-encoded proteins, as well as extensive proteolytic processing by viral proteases. The highly conserved proteins encoded by ORF1b are mainly associated with RNA synthesis and RNA processing functions, whereas the less conserved proteins encoded by ORF1a generally serve structural and regulatory functions. Thus, for example, they play a key role in the intracellular localization, structural organization and proteolytic regulation of the replication complex. Furthermore, they mediate nonessential functions, which might be involved in specific virus-host interactions. Most of the previously characterized ORF1b-encoded proteins have essential enzymatic functions in viral RNA metabolism. Some of these enzymes, e.g. NendoU and ExoN, are only conserved in the *Nidovirales* or specific nidovirus families .

In this study, the functions and biological roles of several viral proteins in the replication cycle of HCoV-229E were studied using a reverse-genetics approach. For this purpose, in vitro transcripts carrying specific mutations, which were produced from genome-length HCoV-229E-cDNAs, were transfected into cells and viral RNA synthesis was analyzed. If infectious virus was present in the tissue culture supernatant, it was studied in more detail to identify potential growth defects as well as mutations.

The study revealed that nonstructural proteins 13 to 16 have important functions in viral RNA synthesis, with the activities of nsp13 and nsp16 being essential. Thus, for example, the study demonstrates the critical importance of the N-terminal zinc-binding residues of nsp13. Furthermore, nsp14 was shown to be involved in viral RNA replication and, most likely, in a specific step in subgenomic RNA synthesis. Furthermore, it was established that the activity of nsp15 is required for viral reproduction. The major defects observed for HCoV-229E nsp15 mutants appeared to be mainly associated with a late step in the viral life cycle rather than viral RNA synthesis itself.

Using a set of mutants with M^{PRO} cleavage site substitutions, the essential importance of the M^{PRO}-mediated posttranslational regulation of the replicase activity was demonstrated. In most cases, mutations that reduced the cleavage efficiency at specific M^{PRO} cleavage sites caused a decline of RNA synthesis and viable viruses could not be isolated.

In this study, a replicon that was based on HCoV-229E was generated. The replicon could be propagated in cultured cells over several months and the expression of a reporter gene could be monitored by fluorescence microscopy. The data showed that the replicon RNA only acquired a very small number of mutations to be able to coexist with its host cell. Using a mutant derivative of the replicon RNA, the functional defect that had previously been observed in an HCoV-229E nsp15 mutant was further characterized.

The main focus of the study was the characterization of chimeric HCoV-229E isolates, whose nonstructural proteins 7 and 8 or 7 to 9 were substituted with the corresponding proteins from HCoV-NL63. The data revealed that only nonstructural proteins 7 and 8 that were derived from the same species were capable of initiating RNA synthesis, indicating critical interactions between these two proteins. The identification and analysis of adaptive mutations that all these chimeric viruses acquired after repeated passaging in tissue culture strongly suggests that, besides interactions between nsp7 and nsp8, the two proteins are engaged in additional structural and/or functional interactions with other proteins, particularly with nsp12 and nsp13. Furthermore, mutations close to the ribosomal frameshift element were identified, suggesting that the frameshift efficiency may have been changed in these viruses. This hypothesis was supported by *in vitro* translation data, which showed that these mutations increased the frameshifting rate from 50 % in the wild-type situation to about 65 – 70 %. It seems reasonable to suggest that the resulting relative overexpression of ORF1b-encoded proteins compensates some of the functional defects caused by the HCoV-NL63 nonstructural proteins 7 and 8. Even though most of these chimeric viruses synthesized RNAs at near wild-type levels, reduced virus titers by 60 – 90 % suggest that, despite the acquisition of adaptive mutations, functional defects had remained in these viruses.

8 Abkürzungen

6-TG	6-Thioguanin
A	Adenin
Abb.	Abbildung
b	Basen
BHK	engl.: Baby Hamster Kidney
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cm	Zentimeter
Da	Dalton
dNTP	2'-Desoxynukleosid -5'-Triphosphat
ddNTP	2'3'-Didesoxynukleosid-5'-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
EthBr	Ethidiumbromid
G	Guanin
g	Gramm
GFP	grünfluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunde
HCoV	humanes Coronavirus
k	Kilo
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LB	Luria Broth

8 Abkürzungen

M	Molar
MBq	Megabecquerel
m	milli
max.	maximal
mg	Milligramm
MHV	engl.: Mouse hepatitis virus
min	Minute
mm	Millimeter
MPA	Mycophenolsäure
mRNA	Messenger-RNA
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
nm	Nanometer
nts	Nukleotide
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PEDV	Porcine Epidemic Diarrhea Virus
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	engl.: Unit (Einheit)
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
[v/v]	engl.: volume per volume
W	Watt
[w/v]	engl.: weight per volume

8 Abkürzungen

<u>Aminosäuren</u>	<u>1- Buchstaben-Code</u>	<u>3-Buchstaben-Code</u>
Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Asparaginsäure	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamin	Q	Gln
Glutaminsäure	E	Glu
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val

9 Literaturverzeichnis

Anand, K., Palm, G. J., Mesters, J. R., Siddell, S. G., Ziebuhr, J. & Hilgenfeld, R. (2002). Structure of coronavirus main proteinase reveals combination of a chymotrypsin fold with an extra alpha-helical domain. *Embo J* **21**(13): 3213-24.

Anand, K., Ziebuhr, J., Wadhwani, P., Mesters, J. R. & Hilgenfeld, R. (2003). Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs. *Science* **300**(5626): 1763-7.

Barrette-Ng, I. H., Ng, K. K., Mark, B. L., Van Aken, D., Cherney, M. M., Garen, C., Kolodenco, Y., Gorbalenya, A. E., Snijder, E. J. & James, M. N. (2002). Structure of arterivirus nsp4. The smallest chymotrypsin-like proteinase with an alpha/beta C-terminal extension and alternate conformations of the oxyanion hole. *J Biol Chem* **277**(42): 39960-6.

Beaudette, F. R. & Hudson, C. B. (1937). Cultivation of the virus of infectious bronchitis. *J Am Vet Med Assoc* **90**: 51-60.

Bhardwaj, K., Guarino, L. & Kao, C. C. (2004). The severe acute respiratory syndrome coronavirus Nsp15 protein is an endoribonuclease that prefers manganese as a cofactor. *J Virol* **78**(22): 12218-24.

Bost, A. G., Carnahan, R. H., Lu, X. T. & Denison, M. R. (2000). Four proteins processed from the replicase gene polyprotein of mouse hepatitis virus colocalize in the cell periphery and adjacent to sites of virion assembly. *J Virol* **74**(7): 3379-87.

Brian, D. A. & Baric, R. S. (2005). Coronavirus genome structure and replication. *Curr Top Microbiol Immunol* **287**: 1-30.

Brierley, I., Bournnell, M. E., Binns, M. M., Bilimoria, B., Blok, V. C., Brown, T. D. & Inglis, S. C. (1987). An efficient ribosomal frame-shifting signal in the polymerase-encoding region of the coronavirus IBV. *Embo J* **6**(12): 3779-85.

Brierley, I., Digard, P. & Inglis, S. C. (1989). Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudoknot. *Cell* **57**(4): 537-47.

Brockway, S. M., Clay, C. T., Lu, X. T. & Denison, M. R. (2003). Characterization of the expression, intracellular localization, and replication complex association of the putative mouse hepatitis virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* **77**(19): 10515-27.

Bugl, H., Fauman, E. B., Staker, B. L., Zheng, F., Kushner, S. R., Saper, M. A., Bardwell, J. C. & Jakob, U. (2000). RNA methylation under heat shock control. *Mol Cell* **6**(2): 349-60.

Cavanagh, D. (1997). Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol* **142**(3): 629-33.

Cavanagh, D., Brian, D. A., Brinton, M. A., Enjuanes, L., Holmes, K. V., Horzinek, M. C., Lai, M. M., Laude, H., Plogemann, P. G. & Siddell, S. G. (1993). The Coronaviridae now comprises two genera, coronavirus and torovirus: report of the Coronaviridae Study Group. *Adv Exp Med Biol* **342**: 255-7.

Chen, S., Chen, L., Tan, J., Chen, J., Du, L., Sun, T., Shen, J., Chen, K., Jiang, H. & Shen, X. (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 3C-like proteinase N terminus is indispensable for proteolytic activity but not for enzyme dimerization. Biochemical and thermodynamic investigation in conjunction with molecular dynamics simulations. *J Biol Chem* **280**(1): 164-73.

Cheng, A., Zhang, W., Xie, Y., Jiang, W., Arnold, E., Sarafianos, S. G. & Ding, J. (2005). Expression, purification, and characterization of SARS coronavirus RNA polymerase. *Virology* **335**(2): 165-76.

Compton, S. R., Barthold, S. W. & Smith, A. L. (1993). The cellular and molecular pathogenesis of coronaviruses. *Lab Anim Sci* **43**(1): 15-28.

Cowley, J. A., Dimmock, C. M., Spann, K. M. & Walker, P. J. (2000). Gill-associated virus of *Penaeus monodon* prawns: an invertebrate virus with ORF1a and ORF1b genes related to arteri- and coronaviruses. *J Gen Virol* **81**(Pt 6): 1473-84.

Culver, G. M., Consaul, S. A., Tycowski, K. T., Filipowicz, W. & Phizicky, E. M. (1994). tRNA splicing in yeast and wheat germ. A cyclic phosphodiesterase implicated in the metabolism of ADP-ribose 1",2"-cyclic phosphate. *J Biol Chem* **269**(40): 24928-34.

Dagert, M. & Ehrlich, S. D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**(1): 23-8.

de Haan, C. A. & Rottier, P. J. (2005). Molecular interactions in the assembly of coronaviruses. *Adv Virus Res* **64**: 165-230.

Dobson, A. P. (2005). Virology. What links bats to emerging infectious diseases? *Science* **310**(5748): 628-9.

Donnelly, M. L., Hughes, L. E., Luke, G., Mendoza, H., ten Dam, E., Gani, D. & Ryan, M. D. (2001). The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring '2A-like' sequences. *J Gen Virol* **82**(Pt 5): 1027-41.

Draker, R., Roper, R. L., Petric, M. & Tellier, R. (2006). The complete sequence of the bovine torovirus genome. *Virus Res* **115**(1): 56-68.

Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H. R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R. A., Berger, A., Burguiere, A. M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J. C., Muller, S., Rickerts, V., Sturmer, M., Vieth, S., Klenk, H. D., Osterhaus, A. D., Schmitz, H. & Doerr, H. W. (2003). Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* **348**(20): 1967-76.

- Egloff, M. P., Ferron, F., Campanacci, V., Longhi, S., Rancurel, C., Dutartre, H., Snijder, E. J., Gorbalenya, A. E., Cambillau, C. & Canard, B.** (2004). The severe acute respiratory syndrome-coronavirus replicative protein nsp9 is a single-stranded RNA-binding subunit unique in the RNA virus world. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(11): 3792-6.
- Filipowicz, W. & Pogacic, V.** (2002). Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol* **14**(3): 319-27.
- Fouchier, R. A., Hartwig, N. G., Bestebroer, T. M., Niemeyer, B., de Jong, J. C., Simon, J. H. & Osterhaus, A. D.** (2004). A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(16): 6212-6.
- Gorbalenya, A. E. & Koonin, E. V.** (1989). Viral proteins containing the purine NTP-binding sequence pattern. *Nucleic Acids Res* **17**(21): 8413-40.
- Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., Donchenko, A. P. & Blinov, V. M.** (1989a). Coronavirus genome: prediction of putative functional domains in the non-structural polyprotein by comparative amino acid sequence analysis. *Nucleic Acids Res* **17**(12): 4847-61.
- Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., Donchenko, A. P. & Blinov, V. M.** (1989b). Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res* **17**(12): 4713-30.
- Gosert, R., Kanjanahaluethai, A., Egger, D., Bienz, K. & Baker, S. C.** (2002). RNA replication of mouse hepatitis virus takes place at double-membrane vesicles. *J Virol* **76**(8): 3697-708.
- Griffiths, G. & Rottier, P.** (1992). Cell biology of viruses that assemble along the biosynthetic pathway. *Semin Cell Biol* **3**(5): 367-81.
- Guarino, L. A., Bhardwaj, K., Dong, W., Sun, J., Holzenburg, A. & Kao, C.** (2005). Mutational analysis of the SARS virus Nsp15 endoribonuclease: identification of residues affecting hexamer formation. *J Mol Biol* **353**(5): 1106-17.
- Hampton, T.** (2005). Bats may be SARS reservoir. *Jama* **294**(18): 2291.
- Hamre, D. & Procknow, J. J.** (1966). A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc Soc Exp Biol Med* **121**(1): 190-3.
- Hegy, A. & Ziebuhr, J.** (2002). Conservation of substrate specificities among coronavirus main proteases. *J Gen Virol* **83**(Pt 3): 595-9.
- Herold, J., Gorbalenya, A. E., Thiel, V., Schelle, B. & Siddell, S. G.** (1998a). Proteolytic processing at the amino terminus of human coronavirus 229E gene 1-encoded polyproteins: identification of a papain-like proteinase and its substrate. *J Virol* **72**(2): 910-8.
- Herold, J., Raabe, T., Schelle-Prinz, B. & Siddell, S. G.** (1993). Nucleotide sequence of the human coronavirus 229E RNA polymerase locus. *Virology* **195**(2): 680-91.

- Herold, J. & Siddell, S. G.** (1993). An 'elaborated' pseudoknot is required for high frequency frameshifting during translation of HCV 229E polymerase mRNA. *Nucleic Acids Res* **21**(25): 5838-42.
- Herold, J., Thiel, V. & Siddell, S. G.** (1998b). Characterization of a papain-like cysteine-proteinase encoded by gene 1 of the human coronavirus HCV 229E. *Adv Exp Med Biol* **440**: 141-7.
- Hertzog, T., Scandella, E., Schelle, B., Ziebuhr, J., Siddell, S. G., Ludewig, B. & Thiel, V.** (2004). Rapid identification of coronavirus replicase inhibitors using a selectable replicon RNA. *J Gen Virol* **85**(Pt 6): 1717-25.
- Heusipp, G., Harms, U., Siddell, S. G. & Ziebuhr, J.** (1997). Identification of an ATPase activity associated with a 71-kilodalton polypeptide encoded in gene 1 of the human coronavirus 229E. *J Virol* **71**(7): 5631-4.
- Ivanov, K. A., Hertzog, T., Rozanov, M., Bayer, S., Thiel, V., Gorbalenya, A. E. & Ziebuhr, J.** (2004a). Major genetic marker of nidoviruses encodes a replicative endoribonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(34): 12694-9.
- Ivanov, K. A., Thiel, V., Dobbe, J. C., van der Meer, Y., Snijder, E. J. & Ziebuhr, J.** (2004b). Multiple enzymatic activities associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus helicase. *J Virol* **78**(11): 5619-32.
- Ivanov, K. A. & Ziebuhr, J.** (2004). Human coronavirus 229E nonstructural protein 13: characterization of duplex-unwinding, nucleoside triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities. *J Virol* **78**(14): 7833-8.
- Kerr, S. M. & Smith, G. L.** (1991). Vaccinia virus DNA ligase is nonessential for virus replication: recovery of plasmids from virus-infected cells. *Virology* **180**(2): 625-32.
- Kiss, T.** (2001). Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *Embo J* **20**(14): 3617-22.
- Kocherhans, R., Bridgen, A., Ackermann, M. & Tobler, K.** (2001). Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence. *Virus Genes* **23**(2): 137-44.
- Koonin, E. V. & Dolja, V. V.** (1993). Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **28**(5): 375-430.
- Kuo, L., Godeke, G. J., Raamsman, M. J., Masters, P. S. & Rottier, P. J.** (2000). Retargeting of coronavirus by substitution of the spike glycoprotein ectodomain: crossing the host cell species barrier. *J Virol* **74**(3): 1393-406.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lai, M. M. & Cavanagh, D.** (1997). The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* **48**: 1-100.

- Lai, M. M., Patton, C. D. & Stohlman, S. A.** (1982). Further characterization of mRNA's of mouse hepatitis virus: presence of common 5'-end nucleotides. *J Virol* **41**(2): 557-65.
- Laneve, P., Altieri, F., Fiori, M. E., Scaloni, A., Bozzoni, I. & Caffarelli, E.** (2003). Purification, cloning, and characterization of XendoU, a novel endoribonuclease involved in processing of intron-encoded small nucleolar RNAs in *Xenopus laevis*. *J Biol Chem* **278**(15): 13026-32.
- Lau, S. K., Woo, P. C., Li, K. S., Huang, Y., Tsoi, H. W., Wong, B. H., Wong, S. S., Leung, S. Y., Chan, K. H. & Yuen, K. Y.** (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(39): 14040-5.
- Lavi, E., Haluskey, J. A. & Masters, P. S.** (1998a). The pathogenesis of MHV nucleocapsid gene chimeric viruses. *Adv Exp Med Biol* **440**: 537-41.
- Lavi, E., Kuo, L., Haluskey, J. A. & Masters, P. S.** (1998b). Targeted recombination between MHV-2 and MHV-A59 to study neurotropic determinants of MHV. *Adv Exp Med Biol* **440**: 543-7.
- Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J. H., Wang, H., Crameri, G., Hu, Z., Zhang, H., Zhang, J., McEachern, J., Field, H., Daszak, P., Eaton, B. T., Zhang, S. & Wang, L. F.** (2005). Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* **310**(5748): 676-9.
- Li, Z. F., Hu, Y., Zhan, H. C., Yun, X. X., Du, Y. P., Ke, X. M., Yu, D. X., Li, J. D., Dai, Y. C., Chen, Q. & Yu, S. Y.** (2006). [An epidemiological investigation of bats carrying SARS-CoV in Guangzhou and its vicinity]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* **26**(7): 949-53.
- Martzen, M. R., McCraith, S. M., Spinelli, S. L., Torres, F. M., Fields, S., Grayhack, E. J. & Phizicky, E. M.** (1999). A biochemical genomics approach for identifying genes by the activity of their products. *Science* **286**(5442): 1153-5.
- Minskaia, E., Hertzog, T., Gorbalenya, A. E., Campanacci, V., Cambillau, C., Canard, B. & Ziebuhr, J.** (2006). Discovery of an RNA virus 3'->5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(13): 5108-13.
- Namy, O., Moran, S. J., Stuart, D. I., Gilbert, R. J. & Brierley, I.** (2006). A mechanical explanation of RNA pseudoknot function in programmed ribosomal frameshifting. *Nature* **441**(7090): 244-7.
- Naphine, S., Liphardt, J., Bloys, A., Routledge, S. & Brierley, I.** (1999). The role of RNA pseudoknot stem 1 length in the promotion of efficient -1 ribosomal frameshifting. *J Mol Biol* **288**(3): 305-20.
- Ng, L. F. & Liu, D. X.** (2000). Further characterization of the coronavirus infectious bronchitis virus 3C-like proteinase and determination of a new cleavage site. *Virology* **272**(1): 27-39.
- Normile, D.** (2005). Virology. Researchers tie deadly SARS virus to bats. *Science* **309**(5744): 2154-5.

- Nuttall, P. A. & Harrap, K. A.** (1982). Isolation of a coronavirus during studies on puffinosis, a disease of the Manx shearwater (*Puffinus puffinus*). *Arch Virol* **73**(1): 1-13.
- Peiris, J. S., Guan, Y. & Yuen, K. Y.** (2004). Severe acute respiratory syndrome. *Nat Med* **10**(12 Suppl): S88-97.
- Peiris, J. S., Lai, S. T., Poon, L. L., Guan, Y., Yam, L. Y., Lim, W., Nicholls, J., Yee, W. K., Yan, W. W., Cheung, M. T., Cheng, V. C., Chan, K. H., Tsang, D. N., Yung, R. W., Ng, T. K. & Yuen, K. Y.** (2003a). Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* **361**(9366): 1319-25.
- Peiris, J. S., Yuen, K. Y., Osterhaus, A. D. & Stohr, K.** (2003b). The severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* **349**(25): 2431-41.
- Peng, D., Koetzner, C. A., McMahon, T., Zhu, Y. & Masters, P. S.** (1995). Construction of murine coronavirus mutants containing interspecies chimeric nucleocapsid proteins. *J Virol* **69**(9): 5475-84.
- Peti, W., Johnson, M. A., Herrmann, T., Neuman, B. W., Buchmeier, M. J., Nelson, M., Joseph, J., Page, R., Stevens, R. C., Kuhn, P. & Wuthrich, K.** (2005). Structural genomics of the severe acute respiratory syndrome coronavirus: nuclear magnetic resonance structure of the protein nsP7. *J Virol* **79**(20): 12905-13.
- Phillips, J. J., Chua, M., Seo, S. H. & Weiss, S. R.** (2001). Multiple regions of the murine coronavirus spike glycoprotein influence neurovirulence. *J Neurovirol* **7**(5): 421-31.
- Phillips, J. J., Chua, M. M., Lavi, E. & Weiss, S. R.** (1999). Pathogenesis of chimeric MHV4/MHV-A59 recombinant viruses: the murine coronavirus spike protein is a major determinant of neurovirulence. *J Virol* **73**(9): 7752-60.
- Plant, E. P., Jacobs, K. L., Harger, J. W., Meskauskas, A., Jacobs, J. L., Baxter, J. L., Petrov, A. N. & Dinman, J. D.** (2003). The 9-A solution: how mRNA pseudoknots promote efficient programmed -1 ribosomal frameshifting. *Rna* **9**(2): 168-74.
- Poon, L. L., Chu, D. K., Chan, K. H., Wong, O. K., Ellis, T. M., Leung, Y. H., Lau, S. K., Woo, P. C., Suen, K. Y., Yuen, K. Y., Guan, Y. & Peiris, J. S.** (2005). Identification of a novel coronavirus in bats. *J Virol* **79**(4): 2001-9.
- Popova, R. & Zhang, X.** (2002). The spike but not the hemagglutinin/esterase protein of bovine coronavirus is necessary and sufficient for viral infection. *Virology* **294**(1): 222-36.
- Posthuma, C. C., Nedialkova, D. D., Zevenhoven-Dobbe, J. C., Blokhuis, J. H., Gorbalenya, A. E. & Snijder, E. J.** (2006). Site-Directed Mutagenesis of the Nidovirus Replicative Endoribonuclease NendoU Exerts Pleiotropic Effects on the Arterivirus Life Cycle. *J Virol* **80**(4): 1653-61.
- Pringle, C. R.** (1996). Virus taxonomy 1996 - a bulletin from the Xth International Congress of Virology in Jerusalem. *Arch Virol* **141**(11): 2251-6.

- Putics, A., Filipowicz, W., Hall, J., Gorbalenya, A. E. & Ziebuhr, J.** (2005). ADP-ribose-1"-monophosphatase: a conserved coronavirus enzyme that is dispensable for viral replication in tissue culture. *J Virol* **79**(20): 12721-31.
- Putics, A., Gorbalenya, A. E. & Ziebuhr, J.** (2006). Identification of protease and ADP-ribose 1"-monophosphatase activities associated with transmissible gastroenteritis virus non-structural protein 3. *J Gen Virol* **87**(Pt 3): 651-6.
- Pyrce, K., Jebbink, M. F., Berkhout, B. & van der Hoek, L.** (2004). Genome structure and transcriptional regulation of human coronavirus NL63. *Virol J* **1**: 7.
- Ricagno, S., Egloff, M. P., Ulferts, R., Coutard, B., Nurizzo, D., Campanacci, V., Cambillau, C., Ziebuhr, J. & Canard, B.** (2006). Crystal structure and mechanistic determinants of SARS coronavirus nonstructural protein 15 define an endoribonuclease family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(32): 11892-11897.
- Risco, C., Anton, I. M., Enjuanes, L. & Carrascosa, J. L.** (1996). The transmissible gastroenteritis coronavirus contains a spherical core shell consisting of M and N proteins. *J Virol* **70**(7): 4773-7.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-7.
- Sawicki, S. G. & Sawicki, D. L.** (1998). A new model for coronavirus transcription. *Adv Exp Med Biol* **440**: 215-9.
- Schelle, B., Karl, N., Ludewig, B., Siddell, S. G. & Thiel, V.** (2005). Selective replication of coronavirus genomes that express nucleocapsid protein. *J Virol* **79**(11): 6620-30.
- Seybert, A., Hegyi, A., Siddell, S. G. & Ziebuhr, J.** (2000a). The human coronavirus 229E superfamily 1 helicase has RNA and DNA duplex-unwinding activities with 5'-to-3' polarity. *Rna* **6**(7): 1056-68.
- Seybert, A., Posthuma, C. C., van Dinten, L. C., Snijder, E. J., Gorbalenya, A. E. & Ziebuhr, J.** (2005). A complex zinc finger controls the enzymatic activities of nidovirus helicases. *J Virol* **79**(2): 696-704.
- Seybert, A., van Dinten, L. C., Snijder, E. J. & Ziebuhr, J.** (2000b). Biochemical characterization of the equine arteritis virus helicase suggests a close functional relationship between arterivirus and coronavirus helicases. *J Virol* **74**(20): 9586-93.
- Shi, J., Wei, Z. & Song, J.** (2004). Dissection study on the severe acute respiratory syndrome 3C-like protease reveals the critical role of the extra domain in dimerization of the enzyme: defining the extra domain as a new target for design of highly specific protease inhibitors. *J Biol Chem* **279**(23): 24765-73.
- Shi, S. T. & Lai, M. M.** (2005). Viral and cellular proteins involved in coronavirus replication. *Curr Top Microbiol Immunol* **287**: 95-131.

Siddell, S. G., Ziebuhr, J. & Snijder, E. J. (2005). Coronaviruses, Toroviruses and Arteriviruses. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. B. W. J. Mahy, V. t. Meulens, S. P. Borriello et al. London, F. Cox et al.: pp. 823-856.

Sims, A. C., Ostermann, J. & Denison, M. R. (2000). Mouse hepatitis virus replicase proteins associate with two distinct populations of intracellular membranes. *J Virol* **74**(12): 5647-54.

Snijder, E. J., Bredenbeek, P. J., Dobbe, J. C., Thiel, V., Ziebuhr, J., Poon, L. L., Guan, Y., Rozanov, M., Spaan, W. J. & Gorbalenya, A. E. (2003). Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J Mol Biol* **331**(5): 991-1004.

Snijder, E. J., den Boon, J. A., Bredenbeek, P. J., Horzinek, M. C., Rijnbrand, R. & Spaan, W. J. (1990). The carboxyl-terminal part of the putative Berne virus polymerase is expressed by ribosomal frameshifting and contains sequence motifs which indicate that toro- and coronaviruses are evolutionarily related. *Nucleic Acids Res* **18**(15): 4535-42.

Snijder, E. J., Wassenaar, A. L., van Dinten, L. C., Spaan, W. J. & Gorbalenya, A. E. (1996). The arterivirus nsp4 protease is the prototype of a novel group of chymotrypsin-like enzymes, the 3C-like serine proteases. *J Biol Chem* **271**(9): 4864-71.

Sola, I., Moreno, J. L., Zuniga, S., Alonso, S. & Enjuanes, L. (2005). Role of nucleotides immediately flanking the transcription-regulating sequence core in coronavirus subgenomic mRNA synthesis. *J Virol* **79**(4): 2506-16.

Spaan, W., Delius, H., Skinner, M., Armstrong, J., Rottier, P., Smeekens, S., van der Zeijst, B. A. & Siddell, S. G. (1983). Coronavirus mRNA synthesis involves fusion of non-contiguous sequences. *Embo J* **2**(10): 1839-44.

Sutton, G., Fry, E., Carter, L., Sainsbury, S., Walter, T., Nettleship, J., Berrow, N., Owens, R., Gilbert, R., Davidson, A., Siddell, S., Poon, L. L., Diprose, J., Alderton, D., Walsh, M., Grimes, J. M. & Stuart, D. I. (2004). The nsp9 replicase protein of SARS-coronavirus, structure and functional insights. *Structure* **12**(2): 341-53.

Tang, X. C., Zhang, J. X., Zhang, S. Y., Wang, P., Fan, X. H., Li, L. F., Li, G., Dong, B. Q., Liu, W., Cheung, C. L., Xu, K. M., Song, W. J., Vijaykrishna, D., Poon, L. L., Peiris, J. S., Smith, G. J., Chen, H. & Guan, Y. (2006). Prevalence and genetic diversity of coronaviruses in bats from China. *J Virol* **80**(15): 7481-90.

Thiel, V., Herold, J., Schelle, B. & Siddell, S. G. (2001a). Infectious RNA transcribed in vitro from a cDNA copy of the human coronavirus genome cloned in vaccinia virus. *J Gen Virol* **82**(Pt 6): 1273-81.

Thiel, V., Herold, J., Schelle, B. & Siddell, S. G. (2001b). Viral replicase gene products suffice for coronavirus discontinuous transcription. *J Virol* **75**(14): 6676-81.

Tijms, M. A., van Dinten, L. C., Gorbalenya, A. E. & Snijder, E. J. (2001). A zinc finger-containing papain-like protease couples subgenomic mRNA synthesis to genome translation in a positive-stranded RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4): 1889-94.

- Tooze, J. & Tooze, S. A.** (1985). Infection of AtT20 murine pituitary tumour cells by mouse hepatitis virus strain A59: virus budding is restricted to the Golgi region. *Eur J Cell Biol* **37**: 203-12.
- Tyrrell, D. A., Mika-Johnson, M., Phillips, G., Douglas, W. H. & Chapple, P. J.** (1979). Infection of cultured human type II pneumonocytes with certain respiratory viruses. *Infect Immun* **26**(2): 621-9.
- Vabret, A., Mourez, T., Gouarin, S., Petitjean, J. & Freymuth, F.** (2003). An outbreak of coronavirus OC43 respiratory infection in Normandy, France. *Clin Infect Dis* **36**(8): 985-9.
- van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M. F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R. J., Wolthers, K. C., Wertheim-van Dillen, P. M., Kaandorp, J., Spaargaren, J. & Berkhout, B.** (2004). Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* **10**(4): 368-73.
- van der Meer, Y., Snijder, E. J., Dobbe, J. C., Schleich, S., Denison, M. R., Spaan, W. J. & Locker, J. K.** (1999). Localization of mouse hepatitis virus nonstructural proteins and RNA synthesis indicates a role for late endosomes in viral replication. *J Virol* **73**(9): 7641-57.
- van Dinten, L. C., den Boon, J. A., Wassenaar, A. L., Spaan, W. J. & Snijder, E. J.** (1997). An infectious arterivirus cDNA clone: identification of a replicase point mutation that abolishes discontinuous mRNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(3): 991-6.
- van Dinten, L. C., van Tol, H., Gorbalenya, A. E. & Snijder, E. J.** (2000). The predicted metal-binding region of the arterivirus helicase protein is involved in subgenomic mRNA synthesis, genome replication, and virion biogenesis. *J Virol* **74**(11): 5213-23.
- van Vliet, A. L., Smits, S. L., Rottier, P. J. & de Groot, R. J.** (2002). Discontinuous and non-discontinuous subgenomic RNA transcription in a nidovirus. *Embo J* **21**(23): 6571-80.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. & Gay, N. J.** (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* **1**(8): 945-51.
- Wang, H., Boisvert, D., Kim, K. K., Kim, R. & Kim, S. H.** (2000). Crystal structure of a fibrillar homologue from *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile, at 1.6 Å resolution. *Embo J* **19**(3): 317-23.
- Woo, P. C., Lau, S. K., Chu, C. M., Chan, K. H., Tsoi, H. W., Huang, Y., Wong, B. H., Poon, R. W., Cai, J. J., Luk, W. K., Poon, L. L., Wong, S. S., Guan, Y., Peiris, J. S. & Yuen, K. Y.** (2005). Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* **79**(2): 884-95.
- Woo, P. C., Lau, S. K., Li, K. S., Poon, R. W., Wong, B. H., Tsoi, H. W., Yip, B. C., Huang, Y., Chan, K. H. & Yuen, K. Y.** (2006). Molecular diversity of coronaviruses in bats. *Virology* **351**(1): 180-7.

- Yang, H., Xie, W., Xue, X., Yang, K., Ma, J., Liang, W., Zhao, Q., Zhou, Z., Pei, D., Ziebuhr, J., Hilgenfeld, R., Yuen, K. Y., Wong, L., Gao, G., Chen, S., Chen, Z., Ma, D., Bartlam, M. & Rao, Z.** (2005). Design of wide-spectrum inhibitors targeting coronavirus main proteases. *PLoS Biol* **3**(10): e324.
- Yao, Z., Jones, D. H. & Grose, C.** (1992). Site-directed mutagenesis of herpesvirus glycoprotein phosphorylation sites by recombination polymerase chain reaction. *PCR Methods Appl* **1**(3): 205-7.
- Zhai, Y., Sun, F., Li, X., Pang, H., Xu, X., Bartlam, M. & Rao, Z.** (2005). Insights into SARS-CoV transcription and replication from the structure of the nsp7-nsp8 hexadecamer. *Nat Struct Mol Biol.*
- Zhang, X. & Lai, M. M.** (1995a). Interactions between the cytoplasmic proteins and the intergenic (promoter) sequence of mouse hepatitis virus RNA: correlation with the amounts of subgenomic mRNA transcribed. *J Virol* **69**(3): 1637-44.
- Zhang, X. M. & Lai, M. M.** (1995b). Regulation of coronavirus RNA transcription is likely mediated by protein-RNA interactions. *Adv Exp Med Biol* **380**: 515-21.
- Ziebuhr, J., Bayer, S., Cowley, J. A. & Gorbalenya, A. E.** (2003). The 3C-like proteinase of an invertebrate nidovirus links coronavirus and potyvirus homologs. *J Virol* **77**(2): 1415-26.
- Ziebuhr, J., Herold, J. & Siddell, S. G.** (1995). Characterization of a human coronavirus (strain 229E) 3C-like proteinase activity. *J Virol* **69**(7): 4331-8.
- Ziebuhr, J., Heusipp, G., Seybert, A. & Siddell, S. G.** (1998). Substrate specificity of the human coronavirus 229E 3C-like proteinase. *Adv Exp Med Biol* **440**: 115-20.
- Ziebuhr, J. & Siddell, S. G.** (1999). Processing of the human coronavirus 229E replicase polyproteins by the virus-encoded 3C-like proteinase: identification of proteolytic products and cleavage sites common to pp1a and pp1ab. *J Virol* **73**(1): 177-85.
- Ziebuhr, J., Snijder, E. J. & Gorbalenya, A. E.** (2000). Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *J Gen Virol* **81**(Pt 4): 853-79.
- Ziebuhr, J., Thiel, V. & Gorbalenya, A. E.** (2001). The autocatalytic release of a putative RNA virus transcription factor from its polyprotein precursor involves two paralogous papain-like proteases that cleave the same peptide bond. *J Biol Chem* **276**(35): 33220-32.
- Zuniga, S., Sola, I., Alonso, S. & Enjuanes, L.** (2004). Sequence motifs involved in the regulation of discontinuous coronavirus subgenomic RNA synthesis. *J Virol* **78**(2): 980-94.

10 Veröffentlichungen

Hertzig, T., Scandella, E., Schelle, B., Ziebuhr, J., Siddell, S. G., Ludewig, B. & Thiel, V. (2004). Rapid identification of coronavirus replicase inhibitors using a selectable replicon RNA. *J Gen Virol* **85**(Pt 6): 1717-25.

Ivanov, K. A., **Hertzig, T.**, Rozanov, M., Bayer, S., Thiel, V., Gorbalenya, A. E. & Ziebuhr, J. (2004). Major genetic marker of nidoviruses encodes a replicative endoribonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(34): 12694-9.

Minskaia, E., **Hertzig, T.**, Gorbalenya, A. E., Campanacci, V., Cambillau, C., Canard, B. & Ziebuhr, J. (2006). Discovery of an RNA virus 3'->5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(13): 5108-13.

Putics, A., Ivanov, K. A., **Hertzig, T.**, Gorbalenya, A. E. & Ziebuhr, J. (2005). Novel targets for anti-SARS therapy: coronavirus-encoded RNA-processing enzymes. *Nova Acta Leopoldina* **92**: 211-219.

Thiel, V., Ivanov, K. A., Putics, A., **Hertzig, T.**, Schelle, B., Bayer, S., Weissbrich, B., Snijder, E. J., Rabenau, H., Doerr, H. W., Gorbalenya, A. E. & Ziebuhr, J. (2003). Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J Gen Virol* **84**(Pt 9): 2305-15.

11 Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Tobias Hertzig
Geburtsdatum: 31.07.1974
Geburtsort: Würzburg
Familienstand: verheiratet, zwei Kinder
Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHULBILDUNG

1980 – 1984 Grundschule Eisingen
1984 – 1985 Hauptschule Eisingen/ Waldbrunn
1985 – 1995 Riemenschneider-Gymnasium Würzburg
Abschluss: Abitur

STUDIUM

1995 – 2001 Studium der Biologie an der Universität Würzburg
Thema der Diplomarbeit: Analyse der Interaktion von *Listeria monocytogenes* mit humanen Endothelzellen
Abschluss: Diplombiologie univ.

ARBEITSVERHÄLTNISSE

2002 techn. Hilfsangestellter der Uniklinik Würzburg
Seit 2003 Doktorand, Universität Würzburg, Institut für Virologie und Immunbiologie, Arbeitsgruppe von PD Dr. John Ziebuhr
Thema der Doktorarbeit: Funktionelle Charakterisierung des coronaviralen Replikationskomplexes