

**Charakterisierung der Helikase- und
Endonukleaseaktivitäten des Humanen Coronavirus
229E und des SARS-Coronavirus**

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

vorgelegt von
Konstantin Ivanov
(Omsk, Russland)

Würzburg, 2005

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Prof. Dr. U. Scheer

Gutachter:

Prof. Dr. V. ter Meulen

Gutachter:

Prof. Dr. R. Gross

Tag des Promotionskolloquiums:

07.12.2005

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 08.08.2005

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

Ich danke sehr Dr. John Ziebuhr für wissenschaftliche Lehre, hilfreiche Diskussionen und finanzielle Unterstützung nach dem Ablauf der Promotionszeit.

Ich bedanke mich auch bei meinen Kollegen für freundliche Atmosphäre sowohl innerhalb als auch außerhalb des Labors.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Coronaviren	1
1.1.1	Taxonomie und Morphologie von Coronaviren	1
1.1.2	Coronavirale Genomstruktur und RNA-Synthese	3
1.1.3	Aufbau des coronaviralen Replikasegens	8
1.2	Helikasen	13
1.2.1.	Klassifikation von Helikasen aufgrund ihrer Primärstruktur	13
1.2.2.	3D-Struktur von Helikasen	15
1.2.3.	NA-Entwindungsmodelle	16
1.2.4.	Helikasen positivsträngiger RNA-Viren	17
1.3	Die „nidoviruspezifische Domäne“ im coronaviralen nsp15	20
1.4	Zielstellung der Arbeit	21
2.	Materialien und Lösungen	22
2.1	Bakterienstämme	22
2.2	Chemikalien	22
2.3	Proteine	23
2.4	Plasmid-DNAs und sonstige Nukleinsäuren	24
2.5	Geräte	24
2.6	Puffer und Lösungen	24
2.7	Medien für die Bakterienkultur	28
2.8	Oligonukleotide	28
3.	Methoden	32
3.1	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien	32
3.2	Präparation von Plasmid-DNA	32
3.3	Reinigung von DNA	33
3.3.1	Reinigung von DNA mit Diatomeen	33
3.3.2	Reinigung von Nukleinsäuren mit P6 (oder P30-)-Säulchen	33
3.3.3	Reinigung von DNA-Oligonukleotiden mit dem QIAGEN-Kit	33
3.4	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	33

3.5	Modifizierungen von DNA-Enden	34
3.5.1	Dephosphorylierung von DNA-Enden	34
3.5.2	Glätten von DNA-Enden	34
3.5.3	Phosphorylierung von NA-Enden	34
3.6	Ligation	34
3.7	PCR	35
3.8	Sequenzierung von DNA	36
3.9	Konzentrationsbestimmung	36
3.9.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	36
3.9.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	37
3.10	<i>In-vivo</i> -Rekombinations-PCR	37
3.11	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	38
3.11.1	Testexpression	38
3.11.2	Expression in einem großen Volumen	38
3.12	Aufreinigung der rekombinanten Fusionsproteine	38
3.13	Proteinexpression in Insektenzellen und Aufreinigung von Proteinen mit sechs aufeinanderfolgenden Histidinresten am C-Terminus	39
3.14	Erzeugung der Nukleinsäuresubstrate	40
3.14.1	<i>In-vitro</i> -Transkription	40
3.14.2	Erzeugung von 5'- γ - und 5'- α -[32 P]-markierten RNA-Molekülen	41
3.14.3	Anlagerung einzelsträngiger Nukleinsäuren (NAs) zur Herstellung von dsNA-Molekülen	41
3.14.4	Herstellung von einzelsträngigen DNA-Molekülen	43
3.15	Gelelektrophorese	43
3.15.1	Elektrophorese im Agarosegel	43
3.15.2	Proteinelektrophorese im Polyacrylamidgel	44
3.15.3	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in denaturierenden Polyacrylamidgelen	44
3.15.4	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in nativen Polyacrylamidgelen	45
3.15.5	Polyacrylamidgelelektrophorese zum Testen der NA-Entwindungsaktivität und RNA-5'-Triphosphatase-Aktivität von Helikasen	45
3.16	Western blot	45
3.16.1	Semi-dry-Blot	46

3.16.2	Immunfärbung	46
3.17	Analyse der enzymatischen Aktivitäten von Helikasen	46
3.17.1	Analyse der NTPase-Aktivität	46
3.17.2	Analyse der NA-Bindungsaktivität mit Hilfe der EMSA-Methode	47
3.17.3	Analyse der NA-Entwindungsaktivität	47
3.17.4	Analyse der RNA-Triphosphatase-Aktivität	47
3.18	Analyse der enzymatischen Aktivitäten von nsp15	48
3.18.1	Nukleaseaktivität	48
3.18.2	Analyse des 3'-Endes des 5'-terminalen Spaltproduktes	48
3.18.3	Analyse des 5'-Endes des 3'-terminalen Spaltungsproduktes mittels Primer-Extensionsanalyse	49
4.	Ergebnisse	50
4.1	Heterologe Expression und Aufreinigung coronaviraler Helikasen und putativer Endonukleasen	50
4.1.1	Übersicht über die in dieser Arbeit charakterisierten Proteine	50
4.1.2	Erzeugung der Plasmide zur SARS-CoV-Helikase-Expression	52
4.1.3	Expression und Aufreinigung der SARS-CoV-Helikase	52
4.1.4	Expression und Aufreinigung der HCoV-229E-Helikase	55
4.1.5	Expression und Aufreinigung der nsp15-Proteine	55
4.2	Charakterisierung der Nukleinsäure-Bindungsaktivität von HCoV- nsp13	55
4.3	Charakterisierung der Substratspezifität der HCoV- und SCoV- nsp13-assoziierten NTPase-Aktivität	59
4.4	Charakterisierung der Duplex-Entwindungsaktivität der Helikasen	62
4.4.1	Entwindungspolarität und Substratspezifität von SCoV-nsp13	62
4.4.2	Duplex-Entwindungseffizienz coronaviraler Helikasen	64
4.5	RNA-5'-Triphosphataseaktivität coronaviraler Helikasen	68
4.6	Enzymatische Aktivität der Nsp15-Proteine	71
4.6.1	Beschreibung der Proteine	71
4.6.2	Bestätigung der Nukleaseaktivität	74
4.6.3	Metallionen-Abhängigkeit der RNA-Nukleaseaktivität	77
4.6.4	Sequenzspezifität der RNA-Hydrolyse	77
4.6.5	Einfluss spezifischer Aminosäuresubstitutionen auf die Nukleaseaktivität	

von nsp15	80
4.6.6 Einfluss von RNA-Methylierungen auf die Nukleaseaktivität	81
4.6.7 Bestimmung des 3'-Endes des 5'-Spaltungsproduktes	84
5. Diskussion	86
5.1 Coronavirale Helikasen	86
5.1.1 Proteinexpression	86
5.1.2 Nukleinsäurebindungsaktivität	87
5.1.3 Nukleosidtriphosphataseaktivität	88
5.1.4 RNA/DNA-Duplex-Entwindungsaktivität	89
5.1.5 RNA-5'-Triphosphataseaktivität	89
5.2 Coronavirale nsp15-Endonuklease	90
6. Zusammenfassung	96
7. Summary	98
8. Abkürzungen	100
9. Literaturverzeichnis	102
10. Veröffentlichungen	117
11. Lebenslauf	118

1 Einleitung

1.1 Coronaviren

1.1.1 Taxonomie und Morphologie von Coronaviren

Die moderne Klassifikation der Viren stützt sich auf ihre Genomorganisation und -sequenz. Das genetische Material der Viren kann aus einzel- oder doppelsträngiger DNA oder RNA bestehen. Positivsträngige RNA-Viren bilden die größte Virusgruppe. Die mRNA-Polarität ihres RNA-Genoms ermöglicht dessen Translation durch den zellulären Translationsapparat. Die Translationsprodukte replizieren anschließend die virale RNA bzw. dienen als Strukturproteine für die Bildung neuer Viruspartikel.

Auch die Virusordnung der *Nidovirales* gehört zu den positivsträngigen RNA-Viren. Sie besteht aus drei Familien, den *Coronaviridae*, *Arteriviridae* und *Roniviridae* (Cavanagh, 1997; Cavanagh, 1993; Cowley et al., 2002). Ihr Name wurde im Jahr 1996 durch das „International Committee for the Taxonomy of Viruses“ eingeführt (Pringle, 1996). Die gemeinsame Besonderheit aller Nidoviren besteht in der Synthese eines 3'-koterminalen Satzes („nested set“, siehe detailliert in 1.1.2) subgenomischer mRNAs (Cavanagh, 1992). Die Familie *Coronaviridae* enthält zwei Genera, *Coronavirus* und *Torovirus*, die eine ähnliche Genomorganisation und Replikationsstrategie, jedoch eine unterschiedliche Morphologie und Genomgröße, besitzen (Cavanagh et al., 1993). Coronaviren verursachen beim Menschen und zahlreichen Tierarten vor allem respiratorische und gastrointestinale Erkrankungen (u. a. das schwere akute Atemwegssyndrom, SARS). Der Genus *Coronavirus* wird gegenwärtig – aufgrund von serologischen Eigenschaften und Sequenzverwandtschaften – in drei Gruppen (I, II und III) eingeteilt. Die bisher bekannten coronaviralen Spezies sind in der Tabelle 1.01 zusammengefasst.

Die Coronaviren wurden aufgrund ihrer besonderen Morphologie erstmals im Jahre 1968 als eine getrennte Virusgruppe erkannt (Tyrrell et al., 1968). Im Elektronenmikroskop erinnert ihre Struktur an den Strahlenkranz der Sonne (lat.: corona). Das typische Aussehen der ca. 100 – 120-nm-großen Viren entsteht vor allem durch einen Kranz von Oberflächenproteinen, die in die Virushülle eingelagert sind. Innerhalb des Virions befindet sich die an das Protein N (Nukleokapsidprotein) gebundene positivsträngige RNA, die mit einer Größe von 27 bis 32 kb die längste genomische RNA aller gegenwärtig bekannten RNA-Viren ist (Bournsnel et al., 1987; Lee et al., 1991; Macnaughton et al., 1978; Sturman et al., 1980). Das virale Nukleokapsid

Gruppe	Virusname (engl.)	Wirt
I	CCoV (canine coronavirus)	Hund
	FCoV (feline coronavirus)	Katze
	FIPV (feline infectious peritonitis virus)	Katze
	HCoV-229E (human coronavirus 229E)	Mensch
	HCoV-NL63 (human coronavirus NL63)	Mensch
	PRCoV (porcine respiratory coronavirus)	Schwein
	PEDV (porcine epidemic diarrhea virus)	Schwein
	RbCoV (rabbit coronavirus)	Kaninchen
	TGEV (porcine transmissible gastroenteritis virus)	Schwein
	Bat-CoV (bat coronavirus)	Fledermaus
	II	BCoV (bovine coronavirus)
CRCoV (canine respiratory coronavirus)		Hund
HCoV-OC43 (human coronavirus OC43)		Mensch
HCoV-HKU1 (human coronavirus HKU1)		Mensch
HEV (porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus)		Schwein
MHV (murine hepatitis virus)		Maus
PCoV (puffinosis coronavirus)		Sturmtaucher
RtCoV (rat coronavirus)		Ratte
SARS-CoV (severe acute respiratory syndrome coronavirus)		Mensch
SDAV (sialodacryoadenitis virus)		Ratte
HECoV (human enteric coronavirus)		Mensch
III	TCoV (turkey coronavirus)	Truthahn
	IBV (avian infectious bronchitis virus)	Huhn
	PhCoV (pheasant coronavirus)	Fasan

Tabelle 1.01 Die zurzeit entdeckten Spezies vom Genus Coronavirus.

besitzt eine helikale Symmetrie (Risco et al., 1996; Sturman et al., 1980). Es ist in mindestens zwei Coronaviren (TGEV und MHV) mit einer weiteren, aus dem M-Protein (und wahrscheinlich auch dem N-Protein) bestehenden Proteinhülle („internal core structure“) umgeben (Risco et al., 1996). Die Virusaußenhülle besteht aus einer Membran, die das Virus während der Virusknospung aus intrazellulären Membrankompartimenten erwirbt (Griffiths et al., 1992; Tooze et al., 1985). In diese Membran sind folgende Proteine eingelagert: das Oberflächenprotein S („spike protein“, ca. 20-nm-lange Strukturen auf der Virusoberfläche), das Membranprotein M („membrane protein“) und das Hüllprotein E („envelope protein“). Einige Coronaviren der Gruppe II besitzen noch ein weiteres Protein, das Hämagglutinin-Esterase-Protein HE („hemagglutinin-esterase“) (Machamer et al., 1990; Godet et al., 1992; Vennema et al., 1996). Die Struktur von Coronaviren ist schematisch in der Abbildung 1.01 dargestellt.

1.1.2 Coronavirale Genomstruktur und RNA-Synthese

Das coronavirale Genom ist eine einzelsträngige RNA positiver Polarität. Sie ist am 3'-Ende polyadenyliert und am 5'-Ende mit einer Cap-Struktur geschützt. Die coronavirale genomische RNA besteht aus 7 bis 10 Genen (siehe Abbildung 1.02). Nur das am 5'-Ende gelegene Gen 1, auch Replikase-Gen genannt, wird von der genomischen RNA translatiert. Für die Expression aller anderen Gene werden subgenomische mRNAs transkribiert, die zusammen mit der genomischen RNA einen Satz mit gemeinsamer 3'-Region bilden (englisch: „3'-terminal nested set“). Am 5'-Ende des Genoms befindet sich eine aus 65 bis 98 Nukleotiden bestehende Leadersequenz, die man auch am 5'-Ende jeder subgenomischen RNA finden kann (Lai et al., 2001; Siddell, 1995; Pasternak et al., 2001; Sawicki et al., 1998). An den 5'- und 3'-Enden des Genoms befinden sich zwei nichttranslatierte Sequenzen von etwa 200-500 Nukleotiden (5'- und 3'-UTR, englisch: „untranslated region“). Stromabwärts der 5'-UTR folgt das Replikasegen (*Rep*), das alle enzymatischen Aktivitäten kodiert, die das Virus für seine Replikation und Transkription benötigt. Die anderen Gene kodieren die Strukturproteine und einige akzessorische, virusspezifische Gene unbekannter Funktion. Die Abfolge der in allen Coronaviren existierenden Gene ist 5'-*Rep*-S-E-M-N-3' (siehe Abbildung 1.02).

Der erste Schritt des viralen Lebenszyklus ist die Bindung des Virus an die Zellmembran der Wirtszelle. Diese Bindung wird durch das S-Protein, das unterschiedliche Rezeptoren, sowohl Kohlenhydrate als auch Proteine, erkennen kann, vermittelt (Schultze et al., 1996; Williams et al., 1991; Chen et al., 1997; Benbacer et al., 1997; Yeager et al., 1992; Kuhn et al., 2004; Hemmila et al., 2004). Die Rezeptoren von HCoV-229E und SARS-CoV, deren replikative Enzyme in dieser Arbeit charakterisiert wurden, sind die Aminopeptidase N (Yeager

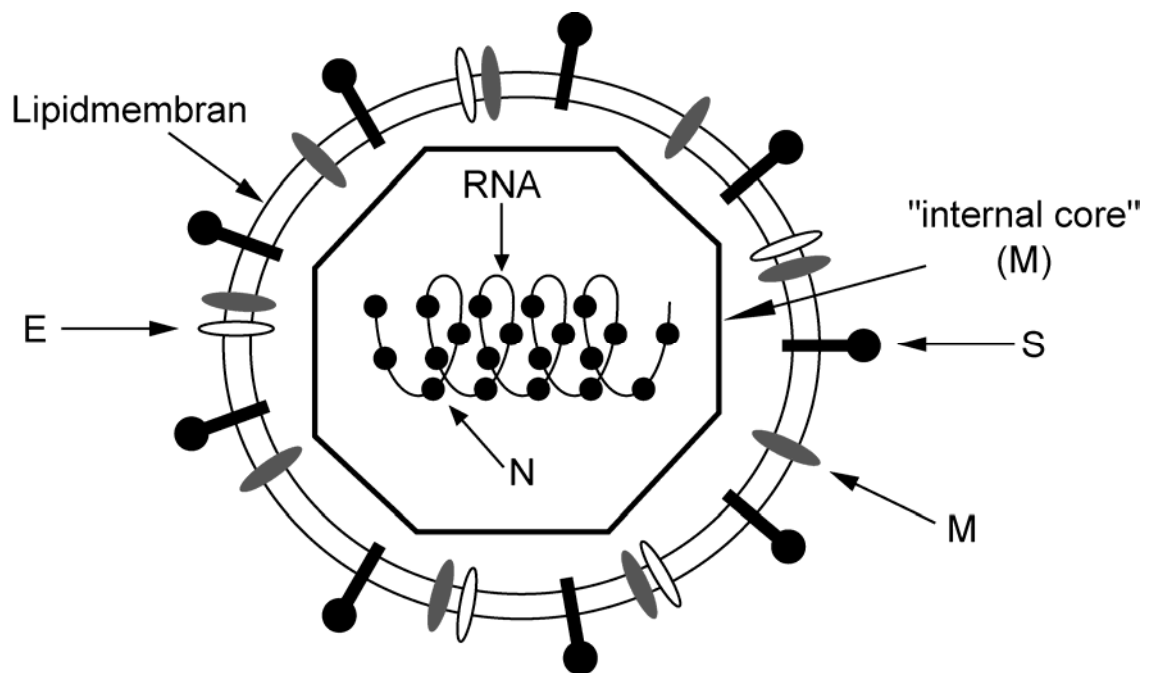


Abbildung 1.01 Schematische Darstellung der Struktur von Coronaviren am Beispiel eines Gruppe-I-Coronavirus

Die Struktur ist in Anlehnung an Lai und Holmes (2001) dargestellt. N, Nukleokapsidprotein, bildet zusammen mit dem RNA-Genom das Nukleokapsid und ist bei einigen Coronaviren an der Ausbildung einer inneren Proteinhülle beteiligt; S, Oberflächenglykoprotein, bindet an zelluläre Rezeptoren und vermittelt Fusion des Virus mit der Wirtszellmembran; M, Oberflächenprotein, bei einigen Coronaviren an der Ausbildung einer inneren Proteinhülle beteiligt; E, Hüllprotein. Die Membran wird während der Virusknospung an intrazellulären Membranen erworben. Einige Coronaviren enthalten ein zusätzliches Oberflächenprotein, HE-Protein (Hemagglutinin-Esterase), das an Sialinsäuremoleküle auf der Oberfläche der Wirtszelle bindet und diese spaltet (siehe Abschnitt 1.1.1).

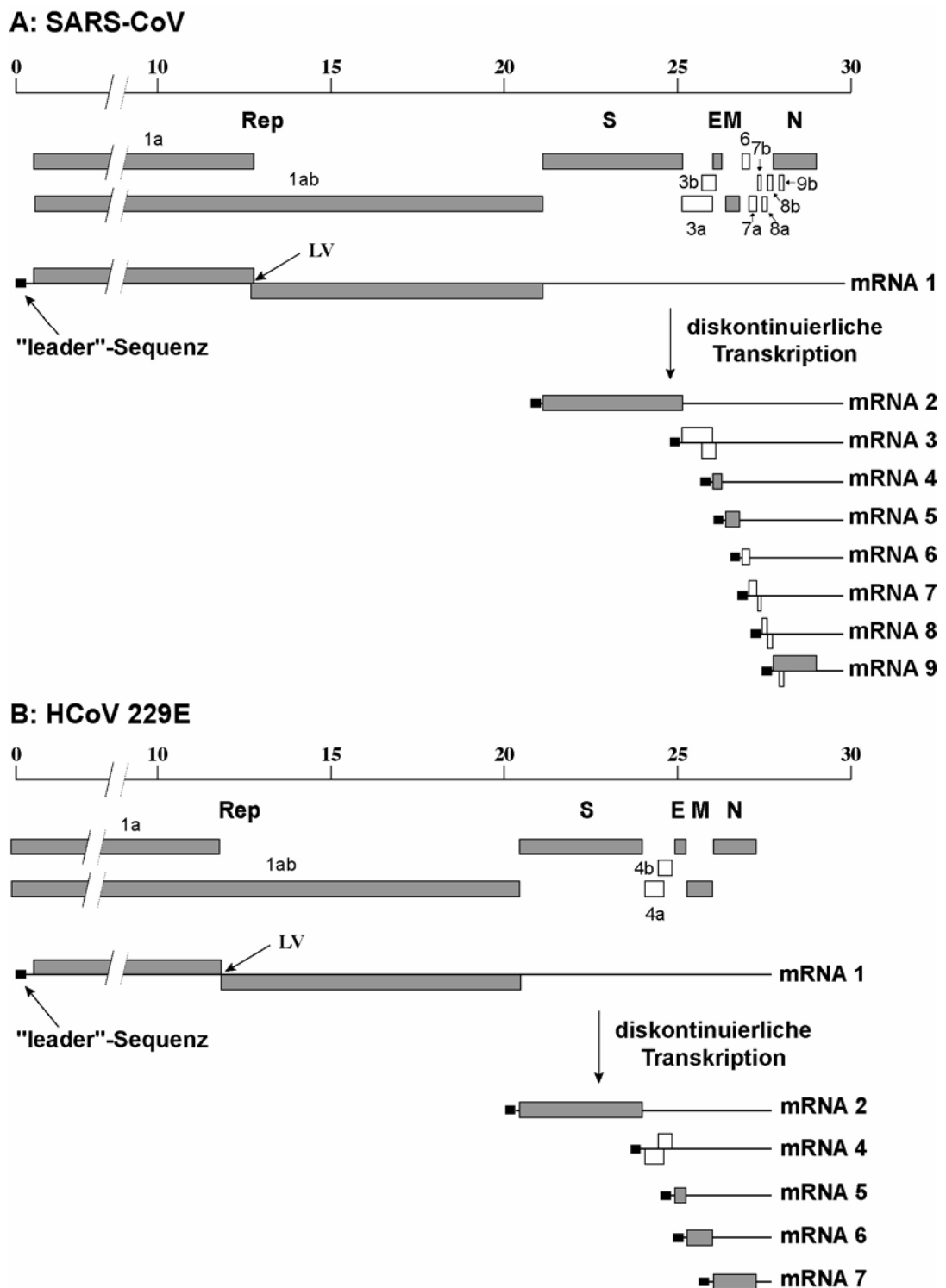


Abbildung 1.02 Genomische und subgenomische RNAs von SARS-CoV (A) und HCoV-229E (B).

Die Genomlänge (in Kilobasen) ist oben angegeben. Die offenen Leseraster sowie die von ihr kodierte Proteine (oben) sind als Rechtecke dargestellt. Die bei allen Coronaviren konservierten Gene, Rep (Replikase), S, E, M und N, sind mit grauen Rechtecken gezeigt und oben in Fettdruck gekennzeichnet. mRNA1 entspricht der genomischen RNA. Nach ihrer Freisetzung aus dem Nukleokapsid wird sie sofort translatiert. Darüber hinaus dient sie als Matrize für die Synthese negativsträngiger RNAs genomischer und subgenomischer Länge. Die genomischen RNAs (mRNA1) und subgenomischen mRNAs 2-9 (A) bzw. mRNAs 2-7 (B) bilden einen 3'-koterminalen Satz und enthalten an ihren 5'-Enden eine gemeinsame, durch diskontinuierliche Synthese erworbene "leader"-Sequenz, die mit dem 5'-Ende des Genoms übereinstimmt. LV, Leserasterverschiebung.

et al., 1992) bzw. das angiotensinkonvertierende Enzym 2 (ACE2) (Li et al., 2003, Nature). Bei denjenigen Coronaviren, die ein HE-Protein besitzen, HEV, BCoV, MHV, HCoV-OC43 und TCoV (Brian et al., 1995), kann eine Bindung (neben einer S-Protein-vermittelten Bindung an einen Proteinrezeptor) auch an die 9-O-Acetylgruppe der membranständigen Sialinsäure erfolgen (Schultze et al., 1991; Schultze et al., 1992; Vlasak et al., 1988). Es wurde jedoch gezeigt, dass das HE-Protein allein nicht für eine Infektion ausreicht (Gagneten et al., 1995; Popova und Zhang, 2002). Die Fusion des Virus erfolgt entweder mit der Zellmembran oder der endosomalen Membran und ist in der Regel pH-unabhängig.

Nach ihrer Freisetzung in der Wirtszelle wird die virale RNA translatiert. Auf diese Weise werden die vom Replikasegen kodierten Virusproteine bereitgestellt, die für die virale Transkription und Replikation erforderlich sind. Unter Virusreplikation versteht man die Neusynthese und Vervielfältigung der genomischen RNA, die anschließend für die Bildung neuer infektiöser Viruspartikel benötigt wird. Zunächst wird eine negativsträngige Kopie der genomischen RNA synthetisiert. Diese negativsträngige RNA genomischer Länge dient anschließend als Matrize für die Synthese positivsträngiger genomischer RNA (Cavanagh, 1997; de Vries et al., 1997).

Unter viraler Transkription versteht man die Synthese von mRNA-Molekülen subgenomischer Länge. Das erste, in den 1980-er Jahren entwickelte Modell der coronaviralen Transkription ging davon aus, dass die subgenomischen mRNAs direkt (und ausschließlich) von negativsträngigen Matrizen genomischer Länge synthetisiert werden. Dieses Modell basierte maßgeblich auf der Tatsache, dass negativsträngige RNAs subgenomischer Länge in virusinfizierten Zellen nicht nachgewiesen werden konnten. Das Modell beinhaltete, dass zunächst die 5'-Leadersequenz synthetisiert wird und anschließend –nach einer komplementären Basenpaarung zwischen transkriptionsregulierenden Sequenzen (TRS), die sich stromabwärts der Leadersequenz und stromaufwärts der am 3'-Ende des Genoms gelegenen Strukturgene befinden– die Synthese der stromabwärts gelegenen Strukturproteingene („body sequences“) erfolgt. Man bezeichnet dieses Modell als „leader-primed transcription model“ (Baric et al., 1983). Es ist schematisch in der Abbildung 1.03(A) gezeigt. Nach der späteren Entdeckung und Charakterisierung von negativsträngigen subgenomischen RNAs in coronavirusinfizierten Zellen (Hofmann et al., 1991; Sawicki et al., 1990; Sethna et al., 1989, 1991 und 1997) mußte das ursprüngliche Modell jedoch revidiert werden. Von besonderer Bedeutung war hierbei auch der Befund, dass die gefundenen subgenomischen Negativstränge nicht nur inaktive „Abfall“- oder Abbruchprodukte der Negativstrangsynthese darstellten, sondern dass sie transkriptionell aktiv waren, das heißt, als Matrizen bei der Synthese subgenomischer mRNAs dienen (Sawicki et al., 2001). Das neue Transkriptionsmodell wurde als „diskontinuierliche Extension negativsträngiger

A: "leader-primed" Transkriptionsmodell

B: diskontinuierliche Extension negativsträngiger RNA

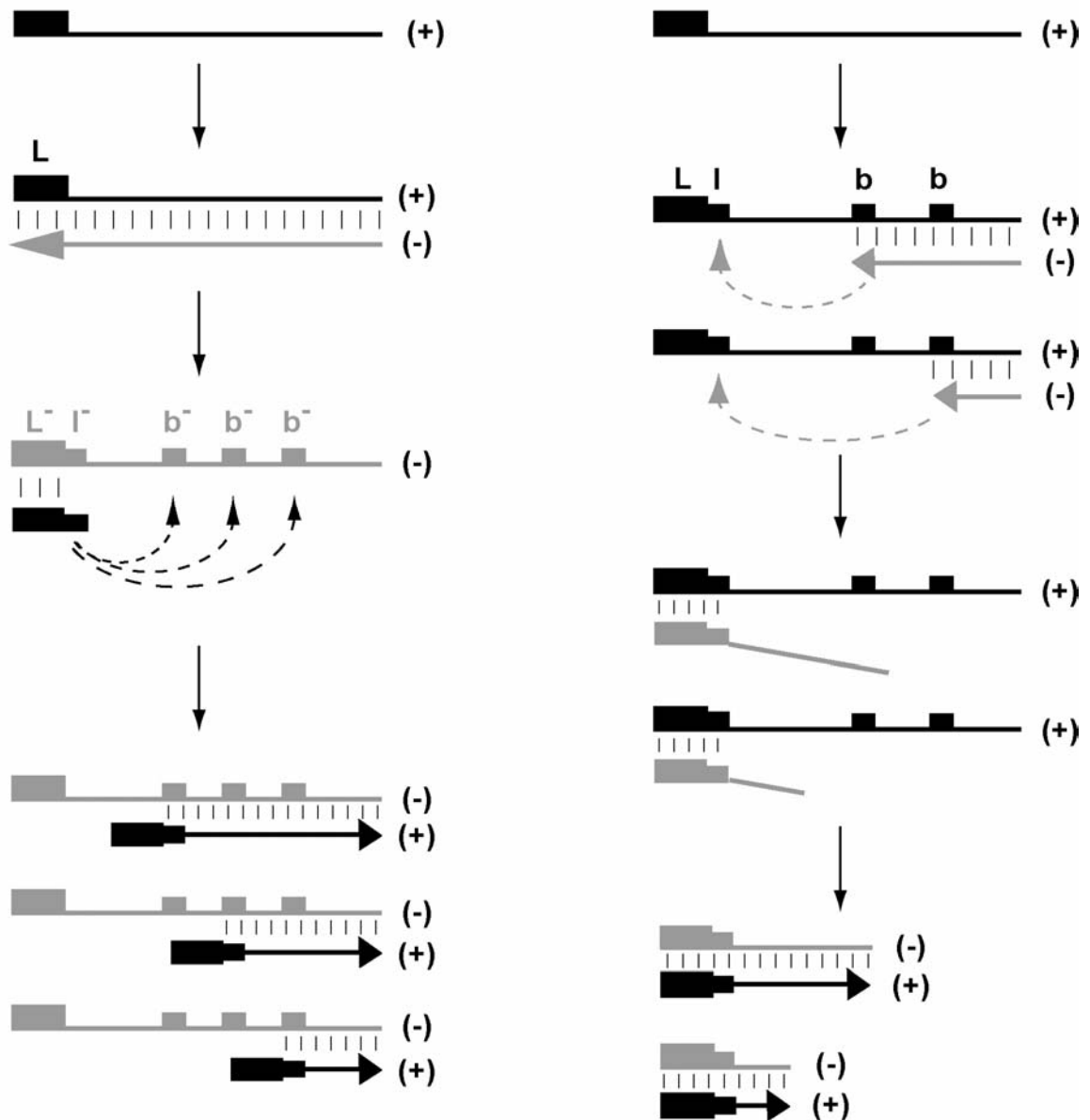


Abbildung 1.03 Coronavirale Transkriptionsmodelle.

Die Abbildung zeigt schematische Darstellungen der Transkriptionsmodelle für Coronaviren. Die RNA-Stränge positiver und negativer Polarität sind auf der rechten Seite mit (+) und (-) bezeichnet. L, "leader"-Sequenz; l, "leader"-TRS; L⁻, anti-"leader"-Sequenz (negativer Polarität); l⁻, anti-"leader"-TRS; b, "body"-TRS; b⁻, anti-"body"-TRS.

Der Abschnitt A stellt das "leader-primed transcription"-Modell dar. Dieses Modell postuliert, dass alle subgenomischen RNA-Moleküle von einem Minusstrang genomischer Länge transkribiert werden. Dabei wird zunächst die "leader"-Sequenz synthetisiert, die danach zu einem der anti-"body"-TRS-Elemente übertragen wird. Der mit einem anti-"body"-TRS hybridisierte Leader dient anschließend als Primer für die Synthese der subgenomischen RNA.

Der Abschnitt B zeigt das Modell der diskontinuierlichen Extension negativsträngiger RNAs. Im Einklang mit dem Modell wird stoppt die Synthese des Negativstranges an einem "body"-TRS-Elemente durch ein bisher nicht identifiziertes Attenuierungssignal. Der Minusstrang wird anschließend zum "leader"-TRS übertragen, und die Synthese läuft weiter. Der auf diese Weise generierte Satz von Negativsträngen subgenomischer Länge wird anschließend zur Synthese subgenomischer RNA-Moleküle verwandt.

RNA" bezeichnet (Sawicki et al., 1995 und 1998). Es postuliert, dass zunächst Negativstränge subgenomischer Länge (mit Hilfe der genomischen RNA als Matrize) synthetisiert werden, an deren 3'-Ende eine Antileader-Sequenz angefügt wird. Diese diskontinuierlich synthetisierten, subgenomischen Negativstränge dienen anschließend als Matrizen zur Synthese subgenomischer mRNAs. Beide Modelle beinhalten einen diskontinuierlichen RNA-Syntheseschritt, der die Verknüpfung der Leader- bzw. Antileadersequenzen mit den „Body“- bzw. Anti-„body“-Sequenzen ermöglicht. Sie unterscheiden sich jedoch hinsichtlich des Zeitpunktes, an dem dieser diskontinuierliche Schritt erfolgt: während der Plusstrang- oder während der Negativstrangsynthese. Darüber hinaus unterscheiden sich die Modelle hinsichtlich der Matrizen, die für die Synthese der subgenomischen mRNAs verwendet werden (negativsträngige RNAs genomischer bzw. subgenomischer Länge).

Am 3'-Ende der Leadersequenz und am 5'-Ende jedes strukturellen Genes befinden sich kurze (7 bis 10 Nukleotide lange) hochkonservierte Sequenzen, die als TAS (englisch: „transcription-associated sequence(s)“) oder TRS (englisch: „transcription-regulating sequence(s)“) bezeichnet wurden. Es wurde gezeigt, dass die TRS eine zentrale Rolle bei der diskontinuierlichen Transkription spielen (Joo und Makino, 1992; Makino und Joo, 1993; Makino et al., 1991; Zhang et al., 1994; Liao und Lai, 1994). Deletionen und Mutationen in TRS verhinderten die Transkription vollständig oder senkten sie signifikant (Liao und Lai, 1994; Zhang et al., 1994). Am besten wurde bisher die Transkription des Arterivirus EAV charakterisiert. Das EAV-Genom ist wesentlich kleiner und kann deshalb wesentlich leichter als dasjenige von Coronaviren manipuliert werden. Experimente mit genetisch manipulierten Arteriviren bewiesen die Bedeutung der Basenpaarung zwischen „leader“-TRS (positiver Strang) und „body“-anti-TRS (negativer Strang) für die diskontinuierliche mRNA-Synthese (van Dinten et al., 1997; van Marle et al., 1999). Darüber hinaus wurde am Beispiel von TGEV, einem Gruppe-I-Coronavirus, gezeigt, dass eine direkte Korrelation zwischen der Gibbs-Energie bei der Duplexbildung zwischen "leader"-TRS und "body"-anti-TRS und dem Transkriptionsniveau der entsprechenden sgRNA besteht (Sola et al., 2005; Zuniga et al., 2004).

1.1.3 Aufbau des coronaviralen Replikasegens

Das am 5'-Ende der genomischen RNA gelegene Replikasegen ist das einzige Gen, das direkt von der genomischen RNA translatiert werden kann. Die in diesem Gen kodierten Enzyme sind für die virale Transkription und Replikation verantwortlich. Für die Expression aller anderen Proteine werden hingegen subgenomische RNA-Moleküle benötigt. Mit einer Länge von ca. 20 kb nimmt das Replikasegen mehr als zwei Drittel des Genoms ein. Die ersten

Erkenntnisse zum Aufbau des coronaviralen Replikasegens wurden durch die Sequenzanalyse des IBV-Genoms erzielt (Bourne et al., 1987). Gegenwärtig kennt man die Gesamtsequenzen von neun weiteren Coronaviren, MHV (Bredenbeek et al., 1990; Lee et al., 1991; Bonilla et al., 1994), HCoV-229E (Herold et al., 1993), TGEV (Eleouet et al., 1995; Penzes et al., 2001), PEDV (Kocherhans et al., 2001), BCoV (Chouljenko et al., 2001), HCoV-NL63 (van der Hoek et al., 2004), HCoV-OC43 (Vijgen et al., 2005), HCoV-HKU1 (Woo et al., 2005) und SARS-CoV (Marra et al., 2003; Rota et al., 2003).

Das Replikasegen besteht aus zwei überlappenden offenen Leserastern (englisch: „open reading frame“; ORF), die als ORF1a und ORF1b bezeichnet werden. Für die Expression des ORF1b ist eine ribosomale Leserasterverschiebung erforderlich, die unmittelbar vor dem ORF1a-Stopkodon erfolgt (Brierley et al., 1987). Das Translationsprodukt von ORF1a ist ein 450-500 kDa großes Protein, das als Polyprotein 1a (pp1a) bezeichnet wird. Die Expression des ORF1b des Replikasegens erfordert, wie bereits erwähnt, eine ribosomale Leserasterverschiebung, die zur Translation einer C-terminal verlängerten Version von pp1a führt. Dieses Protein wird pp1ab genannt, da es sowohl vom ORF1a also auch vom ORF1b kodiert wird. Die Leserasterverschiebung wird von zwei wichtigen Elementen vermittelt. Das sind erstens eine sogenannte „slippery“-Sequenz, UUUAAC, an der die Rückwärtsverschiebung des Ribosoms um ein Nukleotid stattfindet, und eine stromabwärts gelegene, komplexe Pseudoknotenstruktur, die vermutlich die Translokation der Matrize am Ribosom verzögert und dadurch an der „slippery sequence“ einen Wechsel in das (-1)-Leseraster begünstigt (Brierley et al., 1987 und 1989; Herold und Siddell, 1993). Die Effizienz der ribosomalen Leserasterverschiebung liegt *in vitro* im Bereich von 20 bis 30 % (Herold et al., 1993). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass (in vivo) das Verhältnis zwischen einer Translationstermination am ORF1a-Stopkodon und einem Wechsel in das ORF1b-Leseraster durch zelluläre und/oder virale Faktoren (Helikase?) moduliert werden kann. Untersuchungen zur Effizienz der ribosomalen Leserasterverschiebung in vivo liegen bisher nicht vor.

Die proteolytische Prozessierung von viralen Polyproteinen durch viruskodierte Proteinasen zur Herstellung funktioneller Einheiten ist ein zentraler Bestandteil des Replikationszyklus von Coronaviren (Ziebuhr et al., 2000) sowie nahezu aller positivsträngigen RNA-Viren (Dougherty und Semler, 1993). Die coronaviralen Replikasegenprodukte, pp1a oder pp1ab, werden nach ihrer Synthese in 11 (pp1a) bzw. 15 (pp1ab) Proteine gespalten (siehe Abbildung 4). Dies erfolgt durch Proteasen, die selbst Teil dieser Polyproteine sind. Coronaviren kodieren sowohl papainähnliche Proteasen (PL^{pro}; Cysteinprotease), die im nichtstrukturellen Protein (nsp) 3 liegen, als auch eine Picornavirus-3C-ähnliche Protease (3CL^{pro}; nsp5). 3CL^{pro} ist ebenfalls eine Cysteinprotease, die jedoch die typische Struktur der Chymotrypsinfamilie von

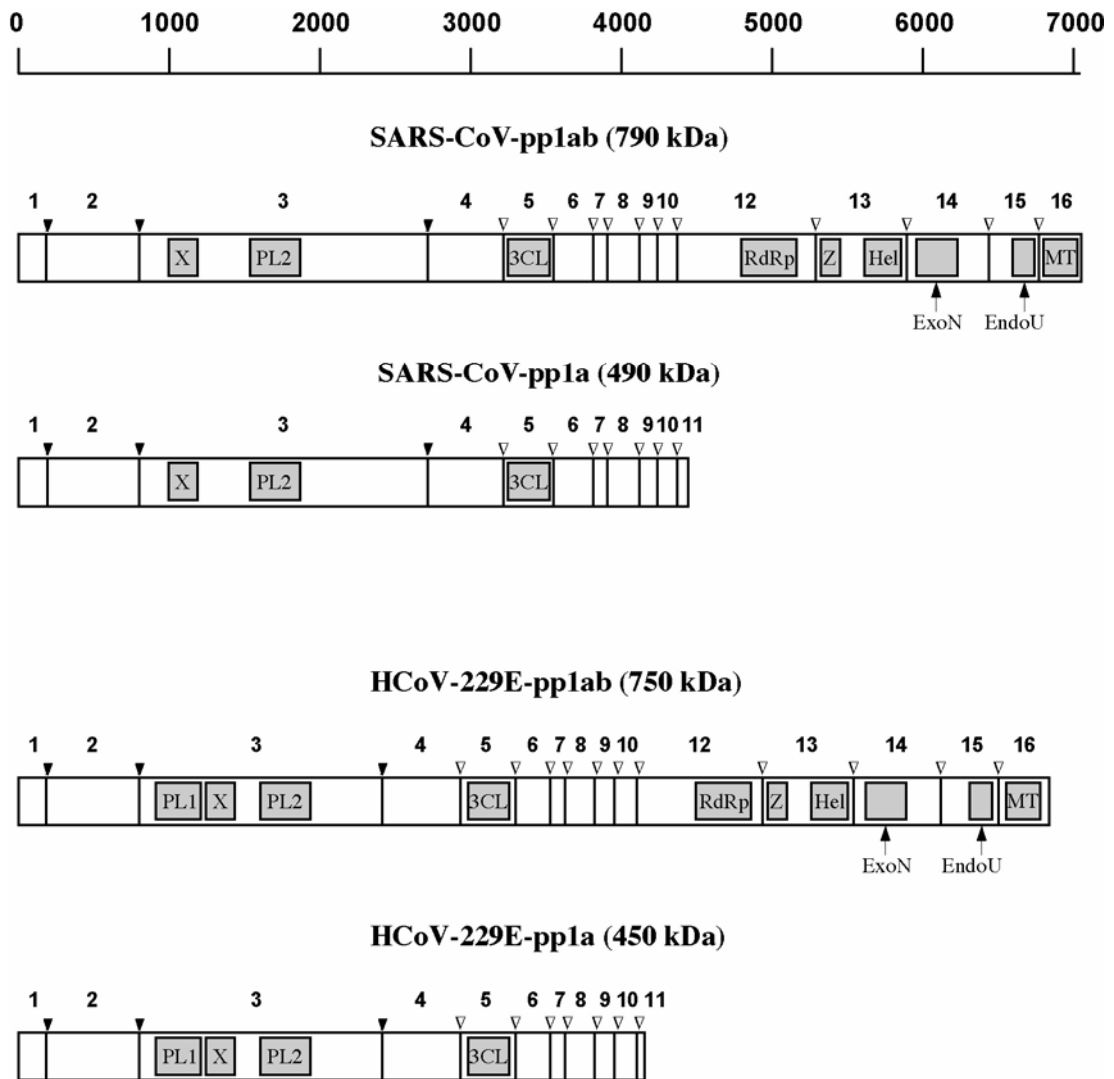


Abbildung 1.04 Translationsprodukte des coronaviralen Replikasesgens am Beispiel von HCoV-229E (Gruppe 1 des Genus) und SARS-CoV (Gruppe 2).

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der von den HCoV-229E- bzw. SARS-CoV-Replikasesgenen kodierten Polyproteine, pp1a und pp1ab. Oben ist ein Maßstab (in Aminosäureresten) gegeben. Konservierte Domänen, deren enzymatische Aktivität durch Sequenzvergleich vorhergesagt wurde oder deren Aktivitäten bereits charakterisiert worden sind, sind als graue Rechtecke gezeigt. Die (-1)-Leserasterverschiebung führt zur Synthese des größeren Produktes, pp1ab. Nsp12 wird hierbei als eine Fusion mit dem N-terminalen Anteil von Nsp11 (pp1a) translatiert. Die Polyproteine werden durch eine proteolytische Autoprozessierung mit Hilfe der viralen Proteinase, PL1^{pro}, PL2^{pro} und 3CL^{pro}, in 11 (pp1a: nsp1-nsp11) bzw. 15 (pp1ab: nsp1-nsp10 und nsp12-nsp16) Untereinheiten (sog. Nichtstrukturproteine, nsp) gespalten. Die Spaltstellen sind mit weissen (3CL^{pro}) oder schwarzen (PL1^{pro} und PL2^{pro}) Dreiecken markiert. Domänenbezeichnung: X, putative Adenosindiphosphat-Ribose-1"-Phosphatase; PL, papainähnliche Proteinase(n) (PL1^{pro} und PL2^{pro}); 3CL, Picornavirus-3C-ähnliche coronavirale Hauptproteinase (3CL^{pro}, auch M^{pro} genannt); RdRp, putative RNA-abhängige RNA-Polymerase; HEL, Helikase mit N-terminaler Zink-bindender Domäne (Z); ExoN, putative Exonuklease; EndoU, Endonuklease; MT, putative Ribose-2'-O-Methyltransferase.

Serinproteasen besitzt (Gorbalenya et al., 1989a; Lee et al., 1991; Anand et al., 2002; Anand et al., 2003). Die meisten Coronaviren (z.B. MHV, HCoV-229E und TGEV) besitzen zwei papainähnliche Proteasen, PL1^{pro} und PL2^{pro}, während IBV and SARS-CoV nur *eine* PL^{pro} besitzen, die hinsichtlich ihrer Position im Polyprotein der PL2^{pro} anderer Coronaviren entspricht. Die 3CL^{pro}, die wegen ihrer zentralen Bedeutung für die coronavirale Polyproteinprozessierung auch Hauptprotease (*main protease*, M^{pro}) genannt wird, ist für ihre eigene Freisetzung aus dem Polyprotein sowie die Freisetzung der Nichtstrukturproteine nsp6 bis nsp16 verantwortlich. Die 3CL^{pro}-Spaltstellen sind hochkonserviert und ähneln den Spaltstellen anderer 3C-ähnlicher Proteinasen (Kräusslich und Wimmer, 1988). Die P1-Position des Substrates ist immer ein Glutamin, und eine kleine nichtgeladene Aminosäure (Alanin, Serin, Glycin oder Asparagin) befindet sich an der P1'-Position (Ziebuhr und Siddell, 1999; Hegyi und Ziebuhr, 2002; Fan et al., 2004). Alle Spaltstellen im N-proximalen Bereich (zwischen nsp1 bis nsp4) werden von den papainähnlichen Proteinasen (PL^{pro}) prozessiert (Ziebuhr et al., 2000; Snijder et al., 2003; Ziebuhr, 2005).

Die regulierte Freisetzung von funktionellen replikativen Einheiten aus dem Polyprotein ist ein Mechanismus, der von vielen positivsträngigen RNA-Viren benutzt wird. Diese Art der posttranslationalen Regulation der Genexpression durch proteolytische Prozessierung wurde beispielsweise für Picornaviren (Lawson und Semler, 1990), Potyviren (Dougherty und Parks, 1991) und Alphaviren (de Groot et al., 1990) nachgewiesen. Es wurde für Coronaviren auch gezeigt, dass die Kinetik und Effizienz der proteolytischen Spaltung von der Spaltstellenstruktur abhängig sind (Ziebuhr und Siddell, 1999; Hegyi und Ziebuhr, 2002; Fan et al., 2004).

Coronaviren and alle anderen Nidoviren besitzen RNA-abhängige RNA-Polymerasen der RNA-Polymerase-Superfamilie 1 (RdRp; englisch: RNA-dependent RNA polymerase; nsp12) und Helikasen der Helikase-Superfamilie 1 (HEL; nsp13) (Koonin und Dolja, 1993). Die Anordnung der beiden Domänen im Polyprotein (N-RdRp-HEL-C) unterscheidet sich von allen anderen viralen Polyproteinen, bei denen die Helikase immer N-terminal zur Polymerasedomäne liegt. Sequenzanalysen von pp1a und pp1ab führten zum Nachweis weiterer enzymatischer Domänen, die entweder einzigartig unter allen (+)RNA-Viren sind oder aber nur sehr selten bei andern (+)RNA-Viren anzutreffen sind (Gorbalenya et al., 1989a; Gorbalenya, 2001; Snijder et al., 2003). Offenbar benötigen Coronaviren und andere Nidoviren diese zusätzlichen Enzymfunktionen für die Synthese ihrer zahlreichen, Leader-enthaltenden Transkripte und für die Replikation ihrer außergewöhnlich großen RNA-Genome, während kleinere und weniger komplexe (+)RNA-Viren diese enzymatische Aktivitäten nicht benötigen. Zu diesen zusätzlichen Enzymfunktionen gehören eine putative 3'-5'-Exonuklease (ExoN, nsp14), die zur DEDD-Superfamilie gehört (Snijder et al., 2003; Zuo und Deutscher, 2001), eine Endoribonuklease

(endoU, nsp15), deren poly(U)-spezifisches Homolog im vorletzten Jahr in *Xenopus laevis* identifiziert wurde (Snijder et al., 2003; Laneve et al., 2003), eine S-Adenosylmethionin-abhängige Ribose-2'-O-Methyltransferase (MT, nsp16) (Snijder et al., 2003; Bügl et al., 2000), eine Phosphatase (Adenosindiphosphat-Ribose-1"-Phosphatase, ADRP; X-Domäne) und eine Nukleotid-Zyklophosphat-Diesterase (CPD) (Snijder et al., 2003; Martzen et al., 1999; Nasr und Filipowicz, 2000). Auch diejenigen coroviralen Proteine, die Homologe in anderen (+)RNA-Viren haben, zeigen häufig strukturelle und funktionelle Unterschiede, wie zum Beispiel die Helikase (nsp13), die in ihrem N-terminalen Anteil eine Cystein/Histidin-reiche Domäne (ZBD, Zink-bindende Domäne) enthält (Gorbalenya et al., 1989; Seybert et al., 2005), die allen anderen RNA-Virus-Helikasen fehlt, oder die 3C-ähnliche Protease, die eine zusätzliche α -helikale Domäne am C-Terminus besitzt (Anand et al., 2002, 2003).

Die benachbarte Lage der drei Replikasedomänen ExoN (nsp 14), EndoU (nsp 15) und MT (nsp 16) im C-terminalen Bereich von pp1ab spricht dafür, dass sie wahrscheinlich in einem gemeinsamen Stoffwechselweg zusammenwirken. Diese Vermutung wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass diese Enzyme Teil eines relativ stabilen IBV-pp1ab-Prozessierungsintermediates sind (Xu et al., 2001). Für diese drei vorhergesagten enzymatischen Aktivitäten gibt es eine interessante Parallele zu einem zellulären RNA-Prozessierungsweg, bei dem zelluläre homologe Proteine drei aufeinanderfolgende Schritte eines Stoffwechselweges katalysieren (Snijder et al., 2003). Es handelt sich hierbei um die Herstellung von snoRNA-Molekülen (englisch: small nucleolar RNA), die anschließend die Modifizierung (Methylierung) von ribosomalen RNA-Molekülen regulieren (Kiss, 2001; Filipowicz und Pogacic, 2002). Trotz dieser Parallele zum zellulären RNA-Metabolismus, der eine Beeinflussung zellulärer Funktionen durch viruskodierte Enzyme nahelegen könnte, besteht natürlich auch die Möglichkeit, dass diese Proteine an der Prozessierung viralen RNAs beteiligt sein könnten.

Auch für zwei andere neu identifizierte Domänen, CPD und ADRP, existieren zelluläre Homologe. Die zellulären Homologa katalysieren zwei aufeinanderfolgende Schritte der Prozessierung von Adenosindiphosphat-Ribose-1",2"-Zyklophosphat, einem Nebenprodukt des tRNA-Spleißens (Snijder et al., 2003; Culver et al., 1994; Martzen et al., 1999). Die CPD-Domäne ist aber nicht bei allen Coronaviren, wie die anderen vier Domänen, nsp14-16 und ADRP, sondern nur bei Coronaviren der Gruppe 2 (jedoch mit Ausnahme von SARS-CoV) konserviert. Es gilt daher als wenig wahrscheinlich, dass die CPD eine essentielle Funktion innerhalb der coronaviralen Replikation und Transkription besitzt.

Viele vorhergesagte enzymatische Aktivitäten von Coronaviren sind bisher nicht experimentell bestätigt worden. Der Nachweis dieser Aktivitäten und die Aufklärung ihrer Rolle im viralen Replikationszyklus verlangt die Anwendung zahlreicher biochemischer,

strukturbiologischer, zellbiologischer und revers-genetischer Methoden und steckt immer noch in ihren Anfängen. Diese Arbeit ist der biochemischen Charakterisierung zweier konservierter coronaviraler Enzyme, der Helikase (nsp 13) und der putativen Endonuklease (nsp 15), gewidmet.

1.2 Helikasen

Die Modulation der Struktur von Nucleinsäuren ist ein wichtiger Schritt in fast allen zellulären und viralen Prozessen des DNA- und RNA-Metabolismus, wie zum Beispiel der Transkription, der Translation, der Rekombination, der Prozessierung von Nucleinsäuren usw. Zentrale Komponenten innerhalb all dieser Prozesse sind DNA- und RNA-Helikasen. Diese Enzyme verwenden den Energiegewinn aus der Hydrolyse der γ -Phosphodiesterbindung eines Nucleosid-5'-triphosphates (NTP), um doppelsträngige Nucleinsäuren in ihre Einzelstränge zu trennen. In den letzten fünfzehn Jahren wurden aufgrund konservierter Sequenzmotive zahlreiche putative Helikasen identifiziert (Gorbalenya et al., 1989b; Gorbalenya und Koonin, 1993). Die vermutete NTP-Hydrolyseaktivität (NTPase-Aktivität) und NTP-abhängige Entwindungsaktivität (Helikaseaktivität) konnte jedoch nur in relativ wenigen Fällen experimentell bestätigt werden. Man vermutet, dass diese „inaktiven“ Proteine weitere Kofaktoren für ihre Aktivität benötigen, dass sie nur als Teil makromolekularer Proteinkomplexe aktiv sind, oder dass sie nur an sehr spezifischen Substraten aktiv sind. Alle bisher beschriebenen Helikasen brauchen als Kofaktoren NTP und Mg^{2+} -Ionen.

1.2.1. Klassifikation von Helikasen aufgrund ihrer Primärstruktur

Durch computergestützte Vergleiche von Helikaseprimärstrukturen wurden konservierte Sequenzmotive, die in einer bestimmten Reihenfolge angeordnet sind, identifiziert (siehe Abbildung 1.05) (zusammengefasst in Gorbalenya und Koonin, 1993; Caruthers und McKay, 2002). Nachfolgend wurden diese zahlreichen putativen Helikasen aufgrund des Ausmaßes an Sequenzähnlichkeit und der Anordnung der Helikase-Motive in drei große Superfamilien (SF1 – SF3) und zwei kleinere Familien (F4 und F5) eingruppiert (Gorbalenya et al., 1989b; Gorbalenya und Koonin, 1993; Ilyina et al., 1992). Die zu den zwei größten Superfamilien 1 und 2 gehörenden Enzyme enthalten sieben konservierte Motive. Zu diesen Gruppen gehören zahlreiche DNA- und RNA-Helikasen aus Archaea, Eubakterien, Eukaryoten und Viren mit sowohl 3'-5'- als auch 5'-3'-Entwindungsrichtungen. Die Superfamilie 3 enthält kleinere

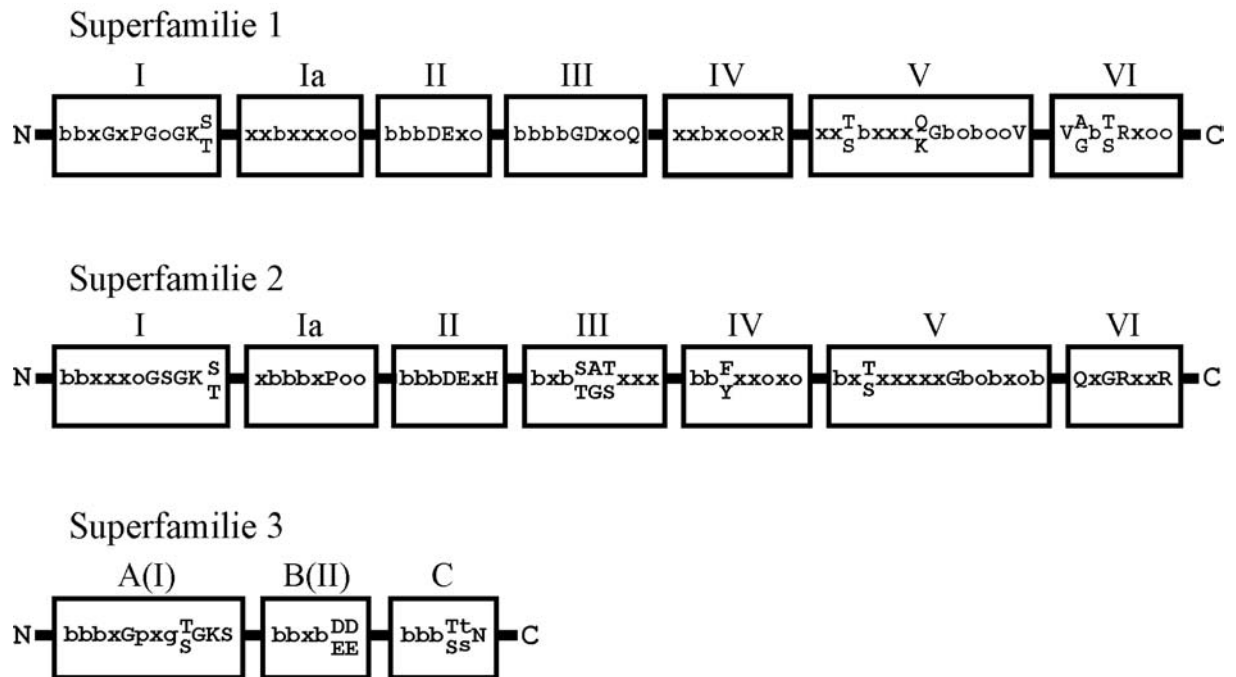


Abbildung 1.05 Konservierte Sequenzmotive der drei Helikase-Superfamilien nach Gorbalenya und Koonin (1993) sowie Hall und Matson (1999).

Dargestellt sind die konservierten Motive der Superfamilien 1 und 2 (I bis VI) bzw. der Superfamilie 3 (A, B, C). Die konservierten Aminosäuren sind in der Einbuchstabenkodierung angegeben. Die in mindestens 75% der Proteine der jeweiligen Superfamilie konservierten Aminosäuren sind als Großbuchstaben angegeben, die in mehr als der Hälfte kodierten Reste als Kleinbuchstaben. Für die übrigen Aminosäuren wurden die folgenden Symbole verwendet: b, hydrophobe Aminosäure; o, hydrophile Aminosäure; x, beliebige Aminosäure. Die Motive A und B der Superfamilie 3 entsprechen den Motiven I (Walker-A-Box) und II (Walker-B-Box), der Superfamilien 1 und 2.

Helikasen mit nur etwa 100 Aminosäureresten. Die Mitglieder dieser Superfamilie haben nur drei konservierte Motive, A, B und C (siehe Abbildung 1.05), und wurden in DNA- und RNA-Viren identifiziert.

Die Strukturanalyse eines ternären Komplexes der PcrA-Helikase, einem AMP-PNP-Molekül (5'-Adenylylimidodiphosphat; nicht hydrolysierbares ATP-Analogon) und einer partiell doppelsträngigen DNA erlaubte erstmals einen direkten Einblick in die Funktionsweise von Helikasen (Velankar et al., 1999). Alle Helikasen binden ATP (oder ein anderes NTP) und besitzen deshalb die klassische „Walker-A-Box“ (phosphatbindende Schleife, Motiv I) und „Walker-B-Box“ (Mg²⁺-bindende Asparaginsäure, Motiv II) (Walker et al., 1982), die 1982 als typische Sequenzmotive ATP-bindender Proteine entdeckt wurden. Das Motiv I besitzt die

Sequenz „GxxxxGK(T/S)“, wobei „x“ eine beliebige Aminosäure ist (Walker et al., 1982). Die Aminogruppe des Lysins bindet eine Phosphatgruppe des Magnesium-ATP- (oder -ADP-) Komplexes, während die Hydroxylgruppe des Threonins (oder Serins) das Mg^{2+} -Ion bindet. Motiv II, das von Gorbalenya und Koonin (1993) als „DExx“-Box bezeichnet wurde, bindet den Mg-ATP- bzw. Mg-ADP-Komplex durch eine elektrostatische Bindung zwischen der Carboxylgruppe der Asparaginsäure und einem Mg^{2+} -Ion und koordiniert ein Wassermolekül für die NTP-Hydrolyse (zusammengefasst in Caruthers und McKay, 2002). Die Motive Ia und IV tragen zur Bindung an Nukleinsäuresubstrate bei, indem sie Wasserstoffbrückenbindungen und Ionenbindungen mit deren Ribose-Phosphat-Gerüst ausbilden (Korolev et al., 1997; Velankar et al., 1999; Kim et al., 1998). Die Funktionen der konservierten Motive III und V sind bisher noch nicht in allen Details bekannt. Die Bindung des ATP- γ -Phosphates (Pause et al., 1993; Schwer und Meszaros, 2000) durch die Motive I und II durch Wasserstoffbrückenbindungen ist hingegen recht gut charakterisiert (zusammengefasst in Caruthers und McKay, 2002). Die Unterschiede in den Aminosäuresequenzen der Superfamilien 1 und 2 liegen vor allem in den Motiven III, V und VI (siehe Abbildung 1.05). Unterschiede in den Kristallstrukturen von Helikasen, die in An- oder Abwesenheit des NTP-Kofaktors bestimmt wurden (Yao et al., 1997 und 1999; Kim et al., 1998; Cho et al., 1998; Nakagawa et al., 1999; Story et al., 2001; Velankar et al., 1999), weisen darauf hin, dass das Motiv VI an der Konformationsänderung des Enzyms während der NTP-Hydrolyse beteiligt ist.

1.2.2. 3D-Struktur von Helikasen

Die dreidimensionalen Strukturen einiger, zu den Superfamilien 1 und 2 gehöriger Helikasen wurden durch Röntgenkristallographie aufgeklärt und führten zur Identifizierung wichtiger Funktions-Struktur-Beziehung dieser Enzyme. Helikasen enthalten zwei aus α -Helices und β -Faltblättern bestehende Hauptdomänen (α - β -Domänen I und II; RecA-ähnliche Domänen), die alle konservierten Helikasemotive (siehe 1.2.1) beinhalten. Viele Helikasen besitzen darüber hinaus noch weitere Domänen, beispielweise α -Helix-Nebendomänen. Der minimale Satz von nur zwei Hauptdomänen ist für die kleinen DEAD-Box-Helikasen aus der Superfamilie 2 (SF2) charakteristisch, was am Beispiel der eIF4A-Helikase der Hefe (Johnson und McKay, 1999; Caruthers et al., 2000) und der putativen Helikase (ORF MJ0669) aus *M.jannaschi* (Story et al., 2001) gezeigt wurde. Die größeren SF2-Helikasen, wie zum Beispiel das UvrB-Protein, das ein Bestandteil des bakteriellen UvrABC-Komplexes („excision repair system“) ist, oder die NS3-Helikase des Hepatitis-C-Virus, enthalten zusätzliche

Nebendomänen. Eine ähnliche Erweiterung der Helikasegrundstruktur durch zusätzliche Domänen wurde auch für die SF1-Helikasen PcrA aus *B. stearotherophilus* (Subramanya et al., 1996; Velankar et al., 1999) und Rep aus *E. coli* (Korolev et al., 1997) beschrieben.

Die Bindung des Nukleinsäuresubstrates erfolgt in einer Vertiefung, die von den Domänen I/II einerseits und den Nebendomänen andererseits gebildet wird. Eine weitere Vertiefung zwischen den Domänen I und II dient als Bindungstasche für den Nukleotidkofaktor (zusammengefasst in Delagoutte und von Hippel, 2002).

1.2.3. NA-Entwindungsmodelle

Die in den letzten Jahren publizierten strukturellen, biophysikalischen und biochemischen Daten ermöglichen erste Einblicke in die Funktionsweise von Helikasen, wenngleich noch zahlreiche Fragen zu klären bleiben. Es gibt jedoch einige Hypothesen zum Zusammenhang von Multimerisation und Aktivität bzw. Prozessivität, die recht gut im Einklang mit den verfügbaren biochemischen und strukturellen Daten stehen. Alle diese Hypothesen stützen sich auf die beobachteten Konformationänderungen des Enzymes während der Bindung, Hydrolyse und Freisetzung des NTP-Kofaktors, die mit unterschiedlichen NA-Bindungsaffinitäten des Proteins einhergehen (Hingorani und Patel, 1993; Jezewska und Bujalowski, 1996). Duplexentwindende Helikasen können sowohl als Monomere als auch als Di- oder Hexamere arbeiten. Diese strukturelle Vielfalt führte zu drei Modellen hinsichtlich des Mechanismus von Helikaseaktivitäten: dem „inchworm“-Modell für monomere Helikasen, dem „rolling“-Modell für dimere Helikasen und dem „ring“-Modell für hexamere Helikasen (zusammengefasst in Tanner und Linder, 2001; Singleton und Wigley, 2002; Caruthers und McKay, 2002; von Hippel und Delagoutte, 2001; Delagoutte und von Hippel, 2002). Jedes dieser Funktionsmodelle erfordert, dass die Helikase (mindestens) zwei NA-Bindungsstellen besitzt, die einzelsträngige bzw. doppelsträngige NA-Moleküle mit jeweils unterschiedlichen Konformationen und Affinitäten binden. Auf diese Weise wird (kontrolliert von der Bindung/Hydrolyse des NTP-Kofaktors) eine alternierende Bindung an einzel- bzw. doppelsträngige Bereiche des Substrats ermöglicht, die mit einer Translokation des Enzyms einhergeht und die Trennung der Stränge ermöglicht. Helikasen, die als Monomere funktionieren, müssen demzufolge mindestens zwei Nukleinsäurebindungsstellen besitzen. Man könnte das „inchworm“-Modell auch als eine Sonderform des allgemeingültigeren „rolling“-Modells auffassen, da die zweite NA-Bindungsstelle einer monomeren Helikase die Rolle des zweiten Protomers innerhalb einer dimeren Helikase (mit jeweils nur einer NA-Bindungsstelle) im Protomer übernimmt.

1.2.4. Helikasen positivsträngiger RNA-Viren

Sequenzanalysen haben zur Identifizierung von putativen Helikasen in den allermeisten positivsträngigen RNA-Viren, deren Genom größer als 5,8 kb ist, geführt. Außerdem werden Helikasen von zahlreichen dsDNA-Viren, ssDNA-Viren und einigen dsRNA-Viren kodiert (Gorbalenya und Koonin, 1989; Koonin, 1991). Neben den RNA-abhängigen RNA-Polymerasen gehören Helikasen zu den am besten konservierten Proteinen positivsträngiger RNA-Viren (Koonin und Dolja, 1993). Helikasen, für die eine NA-Duplex-Entwindungsaktivität experimentell bestätigt werden konnte, werden im folgenden als „echte“ Helikasen bezeichnet. Zahlreiche genetische und revers-genetische Daten haben gezeigt, dass viruskodierte Helikasen eine Schlüsselrolle im Lebenszyklus von positivsträngigen RNA-Viren besitzen (Kadare und Haenni, 1997). Trotzdem konnten bisher nur wenige dieser putativen Helikasen als „echte“ Helikasen, d.h. als NA-Duplex-entwindende Enzyme, identifiziert werden. Es wurde jedoch klar, dass (putative) Helikasen wichtige Funktionen im viralen Replikationszyklus besitzen. So sind sie beispielsweise an der Verpackung der genomischen RNA (Li und Baltimore, 1990; Teterina et al., 1992) und am Virustransport von Zelle zu Zelle (Rouleau et al., 1994) beteiligt. Es bleibt zu klären, ob die häufig fehlende Duplexentwindungsaktivität *in vitro* eine Folge ungeeigneter Reaktionsbedingungen und/oder ungeeigneter Substrate ist.

Die Mehrheit der Helikasen von (+)RNA-Viren gehört zur Superfamilie 1 (Tabelle 1.02). Biochemische Nachweise der NA-Entwindungsaktivität dieser SF1-Helikasen fehlen jedoch nach wie vor für die allermeisten dieser Proteine. Erst vor wenigen Jahren wurden zumindest für einige Pflanzenviren (Kalinina et al., 2002; Gomez de Cedron, 1999) und Nidoviren (Seybert et al., 2000a und 2000b) entsprechende Daten veröffentlicht.

Im Gegensatz zu ihren Duplex-Entwindungsaktivitäten wurden die vorhergesagten NTP-Hydrolyse-Aktivitäten (NTPase-Aktivitäten) für eine Reihe dieser Enzyme bestätigt. Die NTPase-Aktivität der bisher charakterisierten SF2-Helikasen ist stark von der Anwesenheit von Nukleinsäuren abhängig und kann etwa 3- bis 15-fach mit Nukleinsäuren stimuliert werden. Im Gegensatz dazu zeigen SF1- und SF3-angehörige Helikasen nur einen geringgradigen oder gar keinen Stimulationseffekt (zusammengefasst in Kadare und Haenni, 1997). Ausnahmen bilden die coronavirale (nsp13) und arterivirale (nsp10) SF1-Helikase, für die eine sehr starke (bis ca. 50-fache) Aktivierung festgestellt wurde (Seybert et al., 2000a und 2000b). Interessanterweise haben die bisher charakterisierten viralen SF2-Helikasen trotz eines deutlichen Stimulationseffekts der NTPase-Aktivität durch Nukleinsäuren auch eine hohe basale NTPase-Aktivität (in Abwesenheit von Nukleinsäuren) (Eagles et al., 1994; Lain et al., 1991; Suzich et al., 1993; Warrenner et al., 1993). Die meisten anderen zellulären DNA- und virale RNA-

SF1

Virenart	Virusfamilie	Virusgenus	Protein	nachgewiesene Helikaseaktivität	
Pflanzenviren	<i>Bromoviridae</i>	Alfamovirus	1a	nein	
		Bromovirus	1a	nein	
		Cucumovirus	1a	nein	
	<i>Flexiviridae</i>	Capillovirus	p241	nein	
		Carlavirus	p26	nein	
		Potexvirus	p180	ja (PVX)	
		<i>Closteroviridae</i>	Closterovirus	p295	nein
		<i>Tymoviridae</i>	Tymovirus	p206	nein
	-	Furovirus	p237	nein	
	-	Hordeivirus	p130	ja (PSLV, BSLV)	
	-	Idaeovirus	p190	nein	
	-	Tobamovirus	p206	nein	
-	Tobravirus	p134	nein		
Animalviren	<i>Arteriviridae</i>	Arterivirus	nsp10	ja (PRRSV, EAV)	
	<i>Coronaviridae</i>	Coronavirus	nsp13	ja (HCoV 229E)	
	<i>Hepeviridae</i>	Hepevirus	ORF-1	nein	
	<i>Togaviridae</i>	Alphavirus	nsp2	ja (SFV)	
		Rubivirus	p220	nein	

SF2

Virenart	Virusfamilie	Virusgenus	Protein	nachgewiesene Helikaseaktivität (Virus)
Pflanzenviren	<i>Potyviridae</i>	Bymovirus	p270	nein
		Potyvirus	CI	ja (TAMV, PPV)
Animalviren	<i>Flaviviridae</i>	Flavivirus	NS3	ja (WNV, YFV)
		Hepacivirus	NS3	ja (HCV)
		Pestivirus	NS3	ja (BVDV)
		HGV-Gruppe	NS3	ja (HGV)

SF3

Virenart	Virusfamilie	Virusgenus	Protein	nachgewiesene Helikaseaktivität
Pflanzenviren	<i>Comoviridae</i>	Comovirus	p58	nein
		Nepovirus	p72	nein
	<i>Sequiviridae</i>	Sequivirus	p336	nein
		Waikavirus	ORF 1	nein
Animalviren	<i>Picornaviridae</i>	Cardiovirus	2C	nein
		Aphthovirus	2C	nein
		Enterovirus	2C	nein
		Hepatovirus	2C	nein
		Rhinovirus	2C	nein
	<i>Caliciviridae</i>	[Calicivirus]*	p257	nein

Tabelle 1.02 Putative Helikasen positivsträngiger RNA-Viren sowie Helikasen mit nachgewiesener RNA-Duplexentwindungsaktivität

* - der Virusgenus ist nicht definiert

Helikasen mit NA-stimulierbaren NTPase-Aktivitäten besitzen hingegen keine nennenswerte NTP-Hydrolyse in Abwesenheit des NA-Kofaktors.

Die verfügbaren biochemischen Daten zu viralen Helikasen lassen sich wie folgt zusammenfassen: **(1)** für keine der bisher charakterisierten Enzyme der Superfamilie 3 konnte eine Duplexentwindungsaktivität gezeigt werden; **(2)** alle bisher charakterisierten SF2-Helikasen, also die NS3-Proteine von Flaviviren (DV), Pestiviren (BVDV), Hepaciviren (HCV) und Hepatitis-G-Virus (HGV) sowie die CI-Proteine von Potyviren (PPV und TaMV) besitzen eine unidirektionale 3'-5'-Entwindungsaktivität (Eagles et al., 1994; Lain et al., 1991; Warrener und Collett, 1995; Gwack et al., 1999; Benarroch et al., 2004; Gallinari et al., 1998); **(3)** die SF1-Helikasen mit bewiesener Entwindungsaktivität, also die nsp13-Proteine von Coronaviren, die nsp10-Proteine von Arteriviren und die TGBp1-Proteine von Hordeiviren und Potatovirus X (PVX), entwinden dsRNA-Substrate mit 5'-3'-Polarität (Seybert et al., 2000a und 2000b; Kalinina et al., 2002; Bautista et al., 2002). Das TGBp1-Protein kann interessanterweise auch partiell doppelsträngige RNA-Moleküle mit einem 3'-Überhang entwinden (Kalinina et al., 2002).

Die nidoviralen SF1-Helikasen besitzen eine Besonderheit, die sie von allen anderen (+)RNA-Virus-Helikasen unterscheiden. So wurde bereits im Kapitel 1.1.3 angemerkt, dass sie nicht nur eine ungewöhnliche Position im viralen Polyprotein (nämlich C-terminal zur Polymerasedomäne) einnehmen, sondern auch, dass sie in ihrem N-terminalen Bereich eine Zink-bindende Domäne (ZBD) besitzen (van Dinten et al., 1996; Heusipp et al., 1997). Die nidovirale ZBD enthält zwölf bis dreizehn konservierte Cysteine und Histidine, die eine tetraedrische Koordination von Me^{2+} -Ionen (üblicherweise Zn^{2+} -Ionen) vermitteln könnten (Gorbalenya et al., 1989). Von van Dinten et al. (2000) wurde ein Strukturmodell der nidoviralen ZBD vorgeschlagen. Das Modell postuliert, dass die ZBD aus zwei strukturellen Gruppen (sogenannten binukleären Clustern) besteht, von denen jedes sechs (bei Arteriviren sechs und sieben) Cystein- oder Histidin-Reste enthält, die jeweils zwei Zink-Ionen binden könnten. Die ZBD-Domäne spielt eine wichtige Rolle bei der viralen Transkription, Replikation und Virionbiogenese (van Dinten et al., 2000). Bakteriell exprimierte Helikase-Mutanten, die Substitutionen von konservierten Cystein- bzw. Histidinresten in der ZBD trugen, hatten stark reduzierte Helikase- und NTPase-Aktivitäten oder waren gänzlich inaktiv (Seybert et al., 2005). Es wurde außerdem gezeigt (Seybert et al., 2005), dass die Koordination von Zn^{2+} -Ionen während der Renaturierung denaturierter nidoviraler Helikasen essentiell für deren Aktivität ist, was auf eine wichtige Rolle der ZBD für die Funktionalität nidoviraler Helikasen hindeutet.

Die (putativen) SF3-Helikasen sind bisher im Vergleich zu den anderen Helikasen positivsträngiger RNA-Viren am wenigsten biochemisch charakterisiert worden. Das am besten

untersuchte Enzym dieser Superfamilie ist das 2C-Protein von Poliovirus (Familie: *Picornaviridae*, Genus: Enterovirus). Es wurde für das Protein eine bis zu 2-fach durch poly(A) stimulierbare NTPase-Aktivität und eine RNA-Bindungsaktivität bestätigt, jedoch keine Duplexentwindungsaktivität gezeigt (Rodriguez und Carrasco, 1993; Mirzayan und Wimmer, 1994; Pfister & Wimmer, 1999).

1.3 Die „nidoviruspezifische Domäne“ im coronaviralen nsp15

Erste Hinweise für eine Verwandtschaft von Corona-, Toro- und Arteriviren wurden in den Jahren 1990 und 1991 veröffentlicht (Snijder et al., 1990; Bredenbeek et al., 1990b; den Boon et al., 1991). Die phylogenetische Verwandtschaft begründete sich vor allem auf der ähnlichen strukturellen Organisation ihrer Replikase-Polyproteine, sowie Gemeinsamkeiten bei der Expression der Replikasegene (proteolytische Prozessierung der Polyproteine durch papainähnliche und 3C-ähnliche Proteasen; ribosomale Leserasterverschiebung in ein zweites ORF zur Expression der RdRp und Helikase). Außerdem wurden mehrere konservierte Domänen im C-terminalen Bereich der Replikasen von Toro-, Corona- und Arteriviren identifiziert. Einige dieser Domänen konnten der putativen RNA-Polymerase und Helikase zugeordnet werden, während eine weitere konservierte Domäne bei keinem anderen RNA-Virus nachgewiesen werden konnte, weshalb sie zunächst als nidoviruspezifische konservierte Domäne bezeichnet wurde. Es wurde zunächst vermutet, dass diese Domäne aus mehreren funktionellen Domänen besteht, da ihr mittlerer Anteil bei Arteriviren fehlt, während die terminalen Motive bei allen drei Genera konserviert waren (den Boon et al., 1991). Die Funktion blieb lange unklar, bis in den letzten Jahren eine Ähnlichkeit des N-terminalen Anteils dieser Domäne mit einer Gruppe von zellulären Proteinen gefunden wurde, von denen eines sich als Endoribonuklease erwies (Snijder et al., 2003; Laneve et al., 2003). Die enzymatische Aktivität dieses Proteins, XendoU aus *Xenopus laevis*, wurde vor kurzem biochemisch charakterisiert. Das Protein zeigte eine Spezifität für Polyuridylat-Sequenzen (Laneve et al., 2003). Die Konservierung einer putativen Endonuklease in der Replikase eines RNA-Virus war ohne Zweifel überraschend. Die Charakterisierung des entsprechenden coronaviralen Proteins, nsp15, sollte deshalb einen zweiten Schwerpunkt dieser Arbeit bilden.

1.4 Zielstellung der Arbeit

Coronaviren besitzen das größte nichtsegmentierte Genom aller RNA-Viren und nutzen eine ungewöhnliche, diskontinuierliche Synthesestrategie zur Herstellung zahlreicher mRNAs subgenomischer Länge, die die Strukturproteine des Virus und einige akzessorische Proteine unbekannter Funktion kodieren. Diese Besonderheiten des coronaviralen Lebenszyklus sind mit einem (zumindest für RNA-Viren) ungewöhnlich großen viralen Proteom verbunden, dessen überwiegender Anteil vom mehr als 20,000 Nukleotide umfassenden Replikasegen kodiert wird. Zu diesem Proteom gehören einige enzymatische Aktivitäten, die auch bei anderen RNA-Viren konserviert sind (Polymerase, Helikase, Proteasen), aber auch andere Enzyme, die entweder sehr selten oder gar nicht bei anderen Plusstrang-RNA-Viren anzutreffen sind. Ziel dieser Arbeit war die umfassende biochemische Charakterisierung von zwei coronaviralen replikativen Enzymen. Erstens sollte die SF1-Helikase des humanen Coronavirus 229E, für die bereits erste Daten zur Helikase- und NTPase-Aktivität vorlagen, umfassend biochemisch charakterisiert werden. Dazu gehörte eine Analyse der Nukleinsäurebindungsaktivitäten mit Hilfe der EMSA-Methode, die quantitative Analyse der NTPase-Aktivität in An- und Abwesenheit von Polynukleotiden und die Analyse der Effizienz und Prozessivität der Duplexentwindungsaktivität. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob diese Helikase eine RNA-5'-Triphosphataseaktivität, wie sie für einige andere (+)RNA-virale Helikasen nachgewiesen worden war, besitzt. Die Allgemeingültigkeit der für die Helikase des humanen Coronavirus 229E (HCoV-229E) gewonnenen Daten sollte durch die Charakterisierung einer weiteren coronaviralen Helikase eines Coronavirus aus einer anderen genetischen Gruppe bestätigt werden. Zu diesem Zweck sollte die Helikase von SARS-Coronavirus (SARS-CoV) exprimiert und gereinigt werden. Die enzymatischen Aktivitäten der SARS-CoV-Helikase sollten dann *in vitro* untersucht werden und mit denen der HCoV-229E-Helikase verglichen werden.

Als zweites Enzym sollte die konservierte Domäne von Nidoviren charakterisiert werden. Sequenzanalysen hatten ergeben, dass diese Domäne, die auch als "genetischer Marker" von Nidoviren bezeichnet wird, mit der vor kurzem charakterisierten poly(U)-spezifischen RNA-Endonuklease aus *Xenopus laevis* (Laneve et al., 2003) entfernt verwandt sein könnte. Die konservierte Domäne liegt im C-terminalen Anteil des coronaviralen Nichtstrukturproteins (nsp) 15. Die nsp15-Proteine von SARS-CoV und HCoV-229E sollten bakteriell exprimiert werden, und die enzymatischen Aktivitäten der gereinigten Proteine sollten *in vitro* bestätigt und biochemisch charakterisiert werden, wobei insbesondere die Substratspezifität der beiden Proteine untersucht werden sollte.

2 Materialien und Lösungen

2.1 Bakterienstämme

E. coli-K12	DH5 α	Life Technologies, Eggenstein, # 18258-012
	TB1	New England Biolabs, Schwalbach, # 801-A
	Top10F ⁷	Invitrogen, Groningen, Niederlande, # C615-00

2.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien hatten (wenn in Klammern nicht gezeigt) analytischen Reinheitsgrad.

H ₂ O (Nukleasen-frei)	Promega, Mannheim, # 17178901
Tris	Roth, Karlsruhe, # 4855.3
DTT (Dithiothreitol)	Invitrogen, Karlsruhe, # 20459 (UltraPure)
Mg(CH ₃ COO) ₂ x 4H ₂ O	Merk, Darmstadt, # A543419
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, # G-7893 (UltraPure)
Na ₂ HPO ₄	Roth, Karlsruhe, # P030.1
NaH ₂ PO ₄	Roth, Karlsruhe, # P300.1
HCl	AppliChem, Darmstadt, # UN-1789
CH ₃ COOH	AppliChem, Darmstadt, # UN-2789
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, # H-3375
Guanidinthiocyanat	Roth, Karlsruhe, # UN-2811
Diatomaceous Earth (SiO ₂)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, # D-5384
KOH	Merk, Darmstadt, # 5021
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, # E-0396 (SigmaUltra)
D(+)-Maltose-Monohydrat	AppliChem, Darmstadt, # A3891
Na-Dodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, # 4360.2
IPTG	Invitrogen, Karlsruhe, # 20552 (UltraPure)
Formamid	GIBCO Life Technologies, Karlsruhe, # BN5203 (UltraPure)
NaOH	AppliChem, Darmstadt, # R11959
KCl	Roth, Karlsruhe, # 6781.1
Zn(CH ₃ COO) ₂	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, # Z-0625

Na-Citrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	AppliChem, Darmstadt, # C6181
MnCl_2	BDH Limited Pool, England, # 10152
CaCl_2	Merk, Darmstadt, # 2382
NTP-Set	(Megascript SP6 kit) Ambion, Austin, USA, # 555
dNTP-Set	Amersham Biosciences Europe, Freiburg, # 16894 (Sequencing Grade)
ADP	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, # A-6521 (Grade IX)
AMP	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, # 112K7011 (99+ %)
AMP-PNP	
bis-Acrylamid	Roth, Karlsruhe, # 7867.1 (2x krist.)
MgCl_2	Amersham Biosciences Europe, Freiburg, # 11985 (für PCR)
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe, # 6773.1
Borsäure	Roth, Karlsruhe, # 6943.3
Harnstoff ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, # 093K0137
Polyethylenglycol (PEG)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, # P-4463 (SigmaUltra)

Die in der Arbeit verwendeten α - und γ - ^{32}P -markierten Nukleotide wurden von der Firma Amersham Biosciences Europe, Freiburg, bezogen.

2.3 Proteine

Alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs, Schwalbach, # M0290S
BSA	New England Biolabs, Schwalbach, # B9001S
Pwo-DNA-Polymerase	Roche Applied Science, Mannheim, #
Taq-DNA-Polymerase	Amersham Biosciences Europe, Freiburg, # 13610
T4-Polynukleotidkinase (PNK)	New England Biolabs, Schwalbach, # M0201S
T4-DNA Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, # EL0011
T4-RNA Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, # EL0021
T7-RNA Polymerase	(Riboprobe System T3/T7) Promega, Mannheim, # 165736
RQ1 RNase-freie DNase	(Riboprobe System T3/T7) Promega, Mannheim, # 165736
SS III Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, # 18080-044
RNasin (RNase-Inhibitor)	(Riboprobe System T3/T7) Promega, Mannheim, # 165736

2.4 Plasmid-DNAs und sonstige Nukleinsäuren

pBluescript II KS+	Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande
pMal-c2	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
poly(U) ($S_{20,w} = 5.9$)	Amersham Biosciences, Freiburg

2.5 Geräte

Zentrifuge	Sorvall RC-5C Plus (mit den Rotoren SS-34, GSA)
Mikrozentrifuge	Biofuge Pico, Kendro Laboratory Products, Rodenbach
Phosphorimager	Modell 400E; Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA
Ultraschall-Gerät	Sonifier, Modell 450; Branson, Soest, Niederlande
PCR-Geräte	DNA Thermal Cycler 480, Perkin Elmer Cetus, USA Thermocycler GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer Cetus, USA
Sequenzanalysegerät	Prism 3100, Applied Biosystems, Darmstadt

2.6 Puffer und Lösungen

CaCl ₂ -Lösung	60 mM CaCl ₂ , 10 mM Pipes pH 7, 15% (v/v) Glycerin
Puffer A ₁	20 mM Na-Phosphat pH 7.5, 1 M NaCl, 10% Glycerin, 10 mM β-Mercaptoethanol, 5 mM Imidazol, 0.5% Tween 20
Puffer A ₂	20 mM Na-Phosphat pH 7.5, 1 M NaCl, 10% Glycerin, 10 mM β-Mercaptoethanol, 15 mM Imidazol, 0.5% Tween 20
Puffer B ₂	20 mM Na-Phosphat pH 6.0, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, 10 mM β-Mercaptoethanol, 15 mM Imidazol, 0.5% Tween 20
Puffer C ₂	20 mM Na-Phosphat pH 6.0, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, 10 mM β-Mercaptoethanol, 25 mM Imidazol, 0.5% Tween 20
Puffer D ₂	20 mM Na-Phosphat pH 6.0, 300 mM NaCl, 10% Glycerin,

	10 mM β -Mercaptoethanol, 250 mM Imidazol, 0.5% Tween 20
Puffer M1	50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, 100 μ g/ml RNase A
Puffer M2	0.2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS
Puffer M3	3M KCH ₃ COO pH 5.5
Puffer M4	10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 50 % Ethanol
Puffer L6	100 ml 0.1 M Tris-HCl pH 6.4 8.8 ml 0.5 M EDTA pH 8 13.2 ml H ₂ O 2.6 ml Triton X-100 120 g Guanidinthiocyanat
Diatomeenlösung	10 g Diatomaceous silica 50 ml H ₂ O 0.5 ml HCl (37%)
PNK-Puffer A (New England Biolabs)	70 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl ₂ , 5 mM DTT
CIP-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7.9, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
T4-DNA-Ligase-Puffer (Fermentas)	40 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT, 0.5 mM ATP
RL-Puffer	50 mM HEPES-NaOH pH 8.0, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT, 5 μ M ATP
Taq-Polymerase-Puffer (Amersham)	50 mM KCl, 1.5 mM MgCl ₂ , 10 mM Tris-HCl pH 9.0

Pwo-Polymerase-Puffer (Roche)	10 mM Tris-HCl pH 8.85, 25 mM KCl, 5 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2 mM MgSO ₄
Kupfer-Tartrat-Carbonat- Lösung	2 mM CuSO ₄ , 4.3 mM Na-Tartrat, 94 mM Na ₂ CO ₃
Lowry-Reagenz A	Kupfer-Tartrat-Carbonat-Lösung mit 5% SDS und 0.8 M NaOH im Volumenverhältnis 1:2:1 mischen
Lowry-Reagenz B	1 Volumen 2 N Folin-Ciocalteu-Phenol-Lösung mit 5 Volumen H ₂ O mischen
Puffer APP	20 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT
Puffer APP2	20 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM Maltose
Puffer GF	20 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT
PBS	8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.15 g Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O, 0.2 g KH ₂ PO ₄ , mit deionisiertem Wasser auf 1 L auffüllen
Proteinprobenpuffer	2% (w/v) SDS, 10% (v/v) Glycerin, 60 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM DTT
Tris-Glycin-Puffer	25 mM Tris, 193 mM Glycin, 0.1% (w/v) SDS
Coomassie-Lösung	50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0.25% (w/v) Coomassie TM -Brilliantblue R- 250
Entfärbelösung	10% (v/v) Methanol, 5% (v/v) Essigsäure

Anlagerungspuffer	25 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl
TBE-Puffer (1x, pH 8-8.5)	88 mM Tris, 85 mM Borsäure, 10 mM EDTA
TAE-Puffer (1x, pH 8-8.5)	48.4 g Tris, 11.42 ml Essigsäure, 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) mit deionisiertem Wasser auf 1 L auffüllen
NA-Probenpuffer (nativ)	5 mM Tris-HCl pH 7.5, 10% (v/v) Glycerin, 0.02% Bromphenol Blue
NA-Probenpuffer	20% (v/v) Glycerol, 0.2% (w/v) SDS
DR-Puffer	50% (v/v) Formamid, 5 mM EDTA (pH 8.0)
Anodenpuffer 1	0.3 M Tris, 20% Methanol
Anodenpuffer 2	25 mM Tris, 20% Methanol
Kathodenpuffer	25 mM Tris, 20% Methanol, 40 mM 6-Aminohexansäure
TBST-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20
HEL1-Puffer	20 mM HEPES-KOH pH 7.4, 10% (v/v) Glycerol, 5 mM Mg(CH ₃ COO) ₂ , 2 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA
HEL2-Puffer	20 mM HEPES-KOH pH 7.4, 10% (v/v) Glycerol, 2 mM ATP, 5 mM Mg(CH ₃ COO) ₂ , 2 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA
TLC-Puffer1	Kaliumphosphat-Puffer pH 4.0 (0.13-0.4 M, abhängig von analysiertem (d)NTP)
TLC-Puffer2	0.15 M LiCl, 0.15 HCOOH, mit LiOH auf pH 3.1 eingestellt
XE-Puffer	25 mM HEPES-KOH pH 7.4, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM MnCl ₂

XE ₀ -Puffer	25 mM HEPES-KOH pH 7.4, 50 mM NaCl, 1 mM DTT
XE ₁ -Puffer	25 mM HEPES-KOH pH 7.4, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM MgCl ₂
XE ₂ -Puffer	25 mM HEPES-KOH pH 7.4, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM CaCl ₂
XE ₃ -Puffer	25 mM HEPES-KOH pH 7.4, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.5 mM ZnCl ₂
RE-Puffer	50 mM NaCl, 0.2% (w/v) SDS

2.7 Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium (-)	10 g Bactotrypton, 5 g Yeast Extract, 10 g NaCl, 0.3 ml 5M NaOH, 2 g Casaminoacid mit deionisiertem Wasser auf 1 L auffüllen autoklavieren
LB-Medium (+)	LB-Medium (-) mit 100 µg/ml Ampicillin
LB-Platten	1 L LB-Medium (-), 16 g Agar, autoklavieren, nach Abkühlung auf ca. 50°C Ampicillin zugeben (Endkonzentration: 100 µg/ml)

2.8 Oligonukleotide

Die folgende Ribooligonukleotide wurden von der Firma Eurogentec, Seraing, Belgien, synthetisiert. Die Nukleotidsequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben.

Name	Sequenz
m1	CGCAGUUA
m2	CGCAGUU
m3	CGCAGU
m4	CGCAG
m5	CGCA
JZR 2	CGCAGUGAGCUCCUAAUCGCCC
JZR 3	CGCAGUUAGCUCCUAAUCGCCC
JZR 8	GGGCGAUUAGGAGCUAACUGCG
JZR 9	2'-O-methyliertes JZR 8

Die folgenden Desoxyribooligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen, Karlsruhe, synthetisiert (Reinheitsgrad: entsalzt). Die Nukleotidsequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben. Alle Nukleotide trugen keine Modifikationen mit Ausnahme der 5'-biotinylierten Oligonukleotide, bio1+ und bio2-, und waren am 5'-Ende nicht phosphoryliert.

Name	Sequenz	Anwendung
bio1+	(Biotin)-ACTTAAGTACCTTATCTATCTACA	ssDNA-Herstellung
bio2-	TTAGTAAAGGCCTCTAGGATGTT-(Biotin)	ssDNA-Herstellung
c2b21	GGGATGTGCTGCAAGGCGATT	Sequenzierung
D1	CGAGCACCGCTGCGGCTGCACC	Helikase-Aktivität
D2	GGTGCAGCCGCAGCGGTGCTCG-(T) ₃₀	Helikase-Aktivität
D3	(T) ₃₀ -CGAGCACCGCTGCGGCTGCACC	Helikase-Aktivität
DR	GGTGCAGCCGCAGCGGTGCTCG	Helikase-Aktivität
JZ 425	GCTGTAGGTGCTTGTGTATTGTGC	Klonierung
JZ 426	AAAAC TGCAGTTATTGTAATGTAGCCAC- -ATTGCGACGTGG	Klonierung
JZ 435	CGCTCAAAGCCACTGAGGAAACATT	Sequenzierungsprimer
JZ 436	GTAAGAGTCATTTTGCCATCGGACT	Sequenzierungsprimer
JZ 437	TCCTTGGA ACTTGTCGCCGTTGTCC	Sequenzierungsprimer

JZ 440	TGGTACTGGTGCAGTCATTTTGCCATC- -GGACTT	<i>in vivo</i> -Rekombinations-PCR
JZ 441	CAAAATGACTCGCACCAGTACCAGGTG- -GTCCTTGG	<i>in vivo</i> -Rekombinations-PCR
ki 1+	ACTTAAGTACCTTATCTATCTACA	PCR-Primer
ki 8+	TAATACGACTCACTATAGGGACTTAAG- -TACCTTATCTATCTACA	ssDNA-Herstellung
ki 9-	TAATACGACTCACTATAGGGAAGTTCA- -AAGACTTAAGCCAGTCT	PCR-Primer
ki 10+	TAATACGACTCACTATAGGGAAGTTCAA- -AGACTTAAGCCAGTCT	ssDNA-Herstellung
ki 10-	(T) ₁₅ -TGTGTATCCATATCGAAACCGTTCC	ssDNA-Herstellung
ki 19-	AAAGATGCCGGCCATAGCAAAAAT	ssDNA-Herstellung
ki 37	AATAATACGACTCACTATAGACTTAAG	<i>in vitro</i> -Transkription
ki 38	CTTAAGTCTATAGTGAGTCGTATTATT	<i>in vitro</i> -Transkription
ki 41	AATAATACGACTCACTATAGACTTAAGT- -ACC	<i>in vitro</i> -Transkription
ki 42	GGTACTTAAGTCTATAGTGAGTCGTATT- -ATT	<i>in vitro</i> -Transkription
ki 53	AATAATACGACTCACTATAGGGAAAAAAA	<i>in vitro</i> -Transkription
ki 54	TTTTTTTCCCTATAGTGAGTCGTATTATT	<i>in vitro</i> -Transkription
ki 89	GGGCGATTAGGAGC	Reverse Transkription
ki 90	GGGCGATTAGGAGCT	Reverse Transkription
ki 76	CAGGCCATTAGGAACAGTTACTGG	PCR-Primer
ki 77	AATAATACGACTCACTATAGGGCAGGCC- -ATTAGGAACAGTTACTGG	PCR-Primer
L1-	TTTAGTAAAGGCCTCTAGGATGTT	ssDNA-Herstellung
L6-	ACATCAAATTCCTCCAAAAGGTAA	ssDNA-Herstellung
L7+	GATGCTGGAGTCGTAGTGTAATTG	PCR-Primer
mal24E	GGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCC	Sequenzierungsprimer
Oli69	TCTTCAGCATCTTTTACTTTC	<i>in vivo</i> -Rekombinations-PCR
Oli70	GAAAGTAAAAGATGCTGAAGA	<i>in vivo</i> -Rekombinations-PCR
R2a	CACTCCC-(T) ₁₅ -AAA	Klonierung/Konstruktion
R2b	TTT-(A) ₁₅ -GGGAGTGAGCT	Klonierung/Konstruktion

R2c	CGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGAG- -TGAGCTCCAATTCGCCCCGGG	Klonierung/Konstruktion
R2d	CGCGCCCCGGGCGAATTGGAGCTCACTCC- -CTATAGTGAGTCGTATTACG	Klonierung/Konstruktion

3 Methoden

3.1 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Kompetente *E. coli* wurden mit Hilfe der auf Calciumchlorid beruhenden Methode nach Dagert und Ehrlich (1979) präpariert. Dafür wurden 200 ml LB-Medium mit 0.2 ml Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0.375 bei 595 nm kultiviert. Danach wurde die Bakterienkultur auf 4 x 50 ml verteilt und abzentrifugiert (Hettich-Zentrifuge, 3000 UpM, 10 min, 4°C). Das gesamte Bakterienpellet wurde in 20 ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (Hettich-Zentrifuge, 3000 UpM, 10 min, 4°C) wurde das Pellet in 5 ml kalter CaCl₂-Lösung resuspendiert, in 200-µl-Portionen verteilt und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurde eine 200-µl-Portion der kompetenten Bakterien mit der vorbereiteten DNA [entweder 1-5 ng Ligationsprodukt (siehe 3.6) oder 2 x 100 ng *in-vivo*-Rekombinations-PCR-Produkte (siehe 3.10)] vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien einem Hitzeschock (90 sec bei 42°C) ausgesetzt und danach auf Eis für 2 bis 3 min abgekühlt. 800 µl LB-Medium (ohne Antibiotikum) wurden mit den transformierten Bakterien (200 µl) gemischt und für 45-60 min bei 37°C geschüttelt. Nach dieser Inkubation wurden die Bakterien kurz abzentrifugiert (Biofuge-Microzentrifuge, 5000 rpm, 2 min bei Raumtemperatur), in etwa 100-µl-Volumen resuspendiert, auf eine LB-Platte (mit 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und übernacht bei 37°C gezüchtet.

3.2 Präparation von Plasmid-DNA

5 ml LB-Medium(+) wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und übernacht bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien von 1.5 ml Kultur wurden abzentrifugiert (Biofuge-Microzentrifuge, 7000 rpm, 5 min bei Raumtemperatur) und das Pellet wurde in 150 µl Puffer M1 aufgenommen. 150 µl Puffer M2 (Lyse) und danach 150 µl Puffer M3 (Neutralisation) wurden unter vorsichtigem Mischen zugegeben. Das Lysat wurde zentrifugiert (Biofuge-Microzentrifuge, 13000 rpm, 10 min bei Raumtemperatur) und der Überstand wurde abgenommen und mit 900 µl Puffer L6 und 50 µl Diatomeenlösung gemischt. Die Mischung wurde 5 min unter mehrmaligem vorsichtigem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend durch eine Säule mit Filtereinsatz gesaugt. Die auf diese Weise gesammelten Silikapartikel mit gebundener DNA

wurden mit 3 ml Puffer M4 gewaschen und durch eine Zentrifugation (Biofuge-Microzentrifuge, 10000 rpm, 30 sec) getrocknet. Die gebundene DNA wurde anschließend mit 50 µl H₂O eluiert.

3.3 Reinigung von DNA

3.3.1 Reinigung von DNA mit Diatomeen

Die DNA-Lösung von 0.5 bis zu 5 kbp wurde mit Hilfe von Diatomeen gereinigt. Die DNA-Lösung wurde zuerst bis zu einem Gesamtvolumen von 100µl mit H₂O (DNase-frei) verdünnt. Danach wurden 200 µl Puffer L6 und anschließend 50 µl Diatomeen-Lösung zugegeben. Die Silikapartikel wurden späterhin (wie in 3.2 beschrieben) filtriert, gewaschen, und die DNA wurde eluiert.

3.3.2 Reinigung von Nukleinsäuren mit P6 (oder P30-)-Säulchen

Die Methode wurde für die Aufreinigung der Nukleinsäuren von mehr als 30 Nukleotiden nach bestimmten enzymatischen Modifikationen (z. B. Phosphorylierung, Spaltung mit Restriktionsenzymen usw.) verwendet. Die Reinigung wurde mit Hilfe von Microspin-P6(P30)-Säulchen (Bio-Rad) nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

3.3.3 Reinigung von DNA-Oligonukleotiden mit dem QIAGEN-Kit

Nach der radioaktiven Markierung wurden manche DNA-Oligonukleotide mit Hilfe eines QIAGEN-Kits (Nucleotide Removal kit) gereinigt. Die Reinigung von einigen PCR-Fragmenten wurde mit einem anderen QIAGEN-Kit (PCR Purification kit) durchgeführt. Die im QIAGEN-Handbuch beschriebene Methode wurde exakt befolgt.

3.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen wurde im analytischen und präparativen Maßstab durchgeführt. Dafür wurden 2 U Enzym zur Spaltung von 1 µg PCR-Produkt und 5 U Enzym zur Spaltung von 1 µg Plasmid-DNA verwendet. Das Reaktionsgemisch wurde für 30 min bis 3 Stunden bei den vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen inkubiert.

3.5 Modifizierungen von DNA-Enden

3.5.1 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Die Entfernung der Phosphatgruppe am 5'-Ende von DNA wurde mit Hilfe von alkalischer Phosphatase durchgeführt. 1 U Enzym wurde für die Dephosphorylierung von 1 µg DNA verwendet. Die Reaktion dauerte 30 min bei 37°C und wurde entweder im Phosphatasepuffer oder in einem Restriktionspuffer durchgeführt.

3.5.2 Glätten von DNA-Enden

Sowohl überstehende als auch zurückliegende 3'-Enden von DNA-Fragmenten wurden mit Hilfe von T4-DNA-Polymerase geglättet. Der Reaktionsansatz (50 µl) enthielt bis 1 µg DNA, 5 µl 10x T4-DNA-Polymerase-Puffer, 2 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP) und 10 U T4-DNA-Polymerase. Das Gemisch wurde für 20 min bei 37°C inkubiert.

3.5.3 Phosphorylierung von NA-Enden

Die Reaktion wurde mit Hilfe von T4-PNK durchgeführt. Für die Phosphorylierung der PCR-Produkte zur Insertion in dephosphorylierte Vektor-DNA wurden 1 µl 100 mM ATP und 1 µl (10 U) T4-PNK dem 50-µl-Reaktionsansatz (siehe 3.5.2) zugegeben und das Gemisch wurde für weitere 20 min bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde anschließend wie unter 3.3 beschrieben gereinigt.

Für die Phosphorylierung von NA-5'-Enden zur radioaktiven Markierung wurde ein 20-µl-Reaktionsansatz verwendet. Der Ansatz enthielt 0.1-5 µM Nukleinsäure, 1x PNK-Puffer A (New England Biolabs), 1-2 µM ATP, 5-20 µCi γ -[³²P]-ATP (3000 Ci/mmol) und 10 U PNK und wurde für 60 min bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde anschließend wie in 3.3 beschrieben gereinigt.

3.6 Ligation

Dephosphorylierte Vektor-DNA (10-20 ng) und das zu klonierende DNA-Fragment wurden im molaren Verhältnis von 1:5 (bei klebrigen Enden) bis zu 1:20 (bei glatten Enden) eingesetzt. Ein Reaktionsansatz (20 µl) enthielt 2 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer (Fermentas), 2 µl 50% PEG, 1 µl (5 Weiss U) T4-DNA-Ligase und die benötigte Menge von Vektor- und Insert-DNA. Die Reaktion wurde übernacht bei 18°C durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend ohne weitere Behandlung für die Transformation kompetenter Bakterien eingesetzt.

3.7 PCR

Die PCR-Reaktionen wurden im 100-µl-Ansatz durchgeführt. Ein typisches Reaktionsgemisch enthielt 2-10 ng DNA-Matrize, je 150 nM Up- und Down-Primer, je 300 µM dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 10 µl 10x Taq-Polymerase-Puffer (Amersham), 1 µl (5 U) Taq-Polymerase. Für die hochpräzise Amplifizierung einiger DNA-Fragmente wurde Pwo-Polymerase statt Taq-Polymerase verwendet. In diesem Fall wurde der 10x Taq-Polymerase-Puffer durch 10x Pwo-Polymerase-Puffer (Roche) ersetzt. Das Reaktionsgemisch wurde zuerst 2 min bei 94°C erhitzt und die DNA wurde in 30-35 Zyklen amplifiziert. Ein Zyklus bestand aus Denaturierung (40 sec bei 94°C), Anlagerung (40 sec; 42 bis 56°C abhängig vom Primerpaar) und Verlängerung (72°C; 1 min für je 1 kb). Wenn Pwo-Polymerase verwendet wurde, wurde die Verlängerungszeit verdoppelt. Abschließend wurde noch ein Verlängerungsschritt (10 min bei 72°C) durchgeführt und das Reaktionsgemisch wurde bis zu seiner weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel (siehe 3.14.1) analysiert und mit Hilfe von Diatomeen oder QIAGEN-Kit (siehe 3.3) gereinigt. Durch PCR erzeugte DNA-Fragmente sind in der nachfolgenden Tabelle beschrieben.

PCR-Fragment	Up-primer*	Down-primer*	Entsprechender Bereich des HCoV-229E-Genoms
DNA 8	ki 8+	ki 8-	1 - 2 520 (+ 5'-T7-Promotor)
PCR-8	ki 8+	bio2-	1 - 1 000 (+ 5'-T7-Promotor)
PCR-8(-)	ki 1+	ki 9-	1 - 2 520 (+ 3'-T7-Promotor)
PCR-10	ki 10+	ki 10-	24 781 - 27 292 (+ 5'-T7-Promotor)
PCR-11	ki 11+	ki 11-	24 781 - 27 292 (+ 3'-T7-Promotor)

PCR-12	ki 8+	L6-	1 - 600 (+ 5'-T7-Promotor)
PCR-19	bio1+	ki 19-	1 - 100
PCR-76	ki 8+	ki 76	1 - 300 (+ 5'-T7-Promotor)
PCR-77	L7+	ki 77	101 - 300 (+ 3'-T7-Promotor)
dsDNA 8/L1 (und PCR-L1)	ki 8+	L1-	1 - 1 000 (+ 5'-T7-Promotor)
PCR-L2	ki 1+	L2-	1 - 1 000 (+ 3'-T7-Promotor)

* - Die Primer-Sequenzen sind im Abschnitt 2.8 angegeben

3.8 Sequenzierung von DNA

Für die Sequenzierung der in das Plasmid pMalc2 klonierten Sequenzen wurde die zu analysierende Sequenz zunächst durch eine PCR mit mal24E- und c2b21-Primer amplifiziert. Das erhaltene DNA-Fragment enthielt die eingeführte Insertion, flankiert von etwa 50-60 Basenpaaren. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit Hilfe des „BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“-Gemisches (Applied Biosystems), das aus dNTPs, fluoreszenzmarkierten ddNTPs, Reaktionspuffer und einer DNA-Polymerase bestand, durchgeführt. Der Reaktionsansatz von 5 µl enthielt 3.2 µl gereinigtes PCR-Produkt, 0.8 µl 10µM-Primer und 1 µl „BigDye™“-Gemisch. Die Reaktion wurde in 25 Zyklen in einem „Thermocycler GeneAmp PCR System 9600“-Gerät (Applied Biosystems) durchgeführt. Ein Zyklus bestand aus 10 sec bei 96°C (Denaturierung), 5 sec bei 50°C (Anlagerung) und 3 min 30 sec bei 60°C (Verlängerung). Anschließend wurden die Produkte der Sequenzreaktion durch eine Ethanolpräzipitation gereinigt und mittels Kapillarelektrophorese in einem „ABI PRISM System 310“-Gerät analysiert. Die Analyse der Nukleotidsequenz wurde mit dem „SeqMan“-Programm durchgeführt.

3.9 Konzentrationsbestimmung

3.9.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde durch Absorptionsmessung bei 260 nm und 280 nm mit Hilfe des Spektrofotometers (Eppendorf) bestimmt. Zur Konzentrationsberechnung

wurden nachfolgende Werte genommen: 1 OD₂₆₀ entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA oder 40 µg/ml RNA. Die Konzentrationen von Oligonukleotiden wurden aus den vom Hersteller gegebenen Extinktionskoeffizienten berechnet.

3.9.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration von Proteinen wurde mit Hilfe der Lowry-Metode (Lowry et al., 1951) berechnet. Zur Kalibrierung wurden Verdünnungen von BSA verwendet. 2, 5, 10, 20, 50 und 100 µg BSA und 1-5 µl des zu vermessenden Proteins wurden in 1 ml H₂O gelöst (als Nullwert wurde 1 ml Wasser ohne Protein genommen). Zu jeder Lösung wurde 1 ml Lowry-Reagenz A gegeben und das Gemisch wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde Lowry-Reagenz B (0.5 ml) zugegeben, und das Gemisch wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption der vorbereiteten Proben wurde mit einem Spektrofotometer (ULTROSPEC PLUS, Pharmacia Biotech) bei 750 nm gemessen. Die Auswertung wurde mit der „Cricket Graph Software“ durchgeführt.

3.10 *In-vivo*-Rekombinations-PCR

Zur Einführung spezifischer Mutationen in Plasmid-DNA wurde die *In-vivo*-Rekombinationsmethode (Yao et al., 1992) benutzt. Zuerst wurden zwei überlappende PCR-Produkte von dem mutagenisierenden Plasmid amplifiziert. Die Primer der PCR-Reaktionen wurden so ausgewählt, dass die Enden der amplifizierten Plasmidanteile um etwa 20 Basenpaare überlappten, so dass sie *in vivo* (in *E. coli*) eine homologe Rekombination vermitteln konnten. Als Primer wurden in der ersten PCR-Reaktion der mutagenene A-Primer sowie der Oli70-Primer verwendet. In der zweiten PCR-Reaktion wurden der Oli69-Primer und der mutagene B-Primer verwendet. Die mutagenen A- und B-Primer sowie die im Bereich des Ampicillings liegenden Oli70- und Oli69-Primer waren komplementär zueinander. Nach der PCR (siehe 3.7) wurde jeder Ansatz mit 5U des Restriktionsenzym (*DpnI*), das nur methylierte DNA spalten kann, für 30 min bei 37°C behandelt, um die Plasmid-Matrize zu spalten. Die gereinigten PCR-Produkte (siehe 3.3) wurden im molaren Verhältnis von 1:1 zur Transformation (siehe 3.1) kompetenter Bakterienzellen (entweder *E. coli* Top10F' oder *E. coli* DH5α) benutzt. In den Bakterien wurden dann durch homologe Rekombination vollständige Plasmide rekonstituiert. Nur die Bakterien, die wiederhergestellte Plasmide trugen, hatten ein funktionelles Ampicillinresistenzgen und konnten sich auf LB-Platten mit Ampicillin vermehren. Die Plasmid-

DNAs der erhaltenen Klone wurden durch Restriktionsanalyse (siehe 3.4) und Sequenzierung (siehe 3.8) zur Bestätigung der eingeführten Mutation und zum Ausschluss unbeabsichtigter Mutationen untersucht.

3.11 Proteinexpression in *E. coli*

3.11.1 Testexpression

Für die Proteinexpression mit Hilfe der aus *pMal*TM-c2 abgeleiteten Expressionsplasmide wurden *E.coli*-TB1-Zellen verwendet. Nach der Transformation, Ausplattierung und Übernachtzüchtung (siehe 3.1) wurde eine Zellkolonie in 3-4 ml LB-Medium(+) bei 37°C bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 0.5-0.6 geschüttelt. Für eine Testexpression wurde die Bakterienkultur auf zwei Röhrchen verteilt und die Proteinexpression in einer der beiden Kulturen durch IPTG-Zugabe (Endkonzentration von 1 mM) induziert. Beide Kulturen wurden dann für weitere 3 Stunden bei Raumtemperatur (ca. 22°C) geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien von 50 µl jeder Zellsuspension abzentrifugiert (Mikrozentrifuge, 10000 rpm, 5 min) und in 20 µl Proteinprobenpuffer (3x) gelöst. Die Proben wurden 3-4 min bei 94°C erhitzt und in einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Die nichtinduzierte Bakterienkultur wurde später zur Proteinexpression in einem grösseren Kulturvolumen genutzt.

3.11.2 Expression in einem grossen Volumen

Zur Proteinexpression wurden 200 µl Zellsuspension von dem nicht induzierten Anteil der Testexpression mit 250 ml LB-Medium(+) gemischt und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 0.6 gezüchtet. Danach wurde IPTG zur Induktion der Proteinexpression bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und die Bakterien wurden für weitere 4 Stunden bei 20°C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge, GSA-Rotor, 6000 rpm, 10 min) und bei -20°C bis zur Proteinreinigung gelagert.

3.12 Aufreinigung der rekombinanten Fusionsproteine

Alle Schritte der Reinigung wurden auf Eis oder im Kältelabor (+7°C) durchgeführt. Das Pellet von *E.coli*-TB1-Zellen (1-3 g abhängig von dem Zellkulturvolumen) wurde in dem Puffer APP resuspendiert (10-15 ml Puffer pro 1 g Zellen). Anschließend wurde zur Zellsuspension eine Mischung von im Puffer APP verdünnten Proteaseninhibitoren ("Protease Inhibitor Cocktail Complete", Roche) zugegeben. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier, Stufe 6, Ausstoß 55%, 3 x 20 Impulse). Nach der Lyse wurden unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (SS-34-Rotor, 14000 rpm, 30 min). Der Überstand wurde 30 min mit vorgewaschenem (2 x 20 ml PBS und 2 x 20 ml Puffer APP) AmyloseTM-Säulenmaterial inkubiert (1 ml Säulenmaterial pro 1 g Zellen). Das Gemisch aus Säulenmaterial und Überstand wurde anschließend in eine Säule überführt und der Durchfluss wurde verworfen. Nach dem dreimaligen Waschen mit Puffer APP (je 10 Volumen des Säulenmaterials) wurde das MBP-Fusionsprotein mit dem Puffer APP2 (3 x je 2 Volumen des Säulenmaterials) von der Säule eluiert. Das eluierte Protein wurde durch eine Gelfiltration weitergereinigt.

Die Gelfiltration wurde mit dem Puffer GF mittels eines FPLC-Systems (Pharmacia Biotech) und einer vorgepackten Säule (HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade, Pharmacia Biotech) ausgeführt. Die gesammelten Fraktionen wurden anschließend in einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Die Zielprotein-enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt und durch die Zentrifugation in einer Konzentrierungszelle (Centricon YM-3, Millipore Corporation, USA) konzentriert (SS-34-Rotor, 6000 g). Die Proteinlösung wurde aliquotiert und bei -70°C gelagert. Für die Experimente wurde jeweils eine frische Portion des Proteins aufgetaut und während der Experimente für maximal 3 Tage bei +4°C zwischengelagert. Innerhalb dieser Lagerungsfrist wurde keine Aktivitätsverringering festgestellt.

3.13 Proteinexpression in Insektenzellen und Aufreinigung von Proteinen mit sechs aufeinanderfolgenden Histidinresten am C-Terminus

High-FiveTM-Insektenzellen wurden mit rekombinanten Baculoviren, vBac-Hel oder vBac-Hel_KA (Seybert et al., 2000a), mit einer m.o.i. von fünf pro Zelle infiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen sedimentiert (1000 rpm, 5 min, 4°C, Hettich-Zentrifuge), zweimal mit PBS gewaschen und in Puffer A₁ (1.25 ml pro 10⁷ Zellen), der zusätzlich 10 µM Leupeptin enthielt, resuspendiert. Alle nachfolgenden Reinigungsschritte wurden auf Eis oder in einem Kühlraum (6°C) durchgeführt. Die Zellen wurden durch zweimaliges Auftauen und Einfrieren in

flüssigem Stickstoff lysiert und die DNA durch viermaliges Aufziehen in eine Kanüle (18-gauge Durchmesser) geschert. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt (SS-34-Rotor, 14000 rpm, 30 min, 4°C) und der Überstand mit 200 µl Ni-NTATM-Agarose-Matrix inkubiert, die zuvor mit Puffer A₁ äquilibriert wurde. Nach 60 min wurde das Gemisch in eine Säule überführt und der Durchfluss wurde verworfen. Unspezifisch an die Matrix gebundene Proteine wurden durch aufeinanderfolgendes Waschen mit den Puffern A₁, A₂, B₂ und C₂ entfernt. Die ansteigende Imidazol-Konzentration der Puffer A₂, B₂ und C₂ und der erniedrigte pH-Wert der Puffer B₂ und C₂ führten zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine. Das rekombinante, histidingekoppelte Protein wurde in Puffer D₂ eluiert. Das eluierte Protein wurde anschließend wie im Abschnitt 3.12 beschrieben konzentriert, aliquotiert und bei -70°C gelagert.

3.14 Erzeugung der Nukleinsäuresubstrate

3.14.1 *In-vitro*-Transkription

Einige radioaktiv markierte RNA-Substrate wurden durch In-vitro-Transkription mit Hilfe der T7- oder T3-RNA-Polymerase synthetisiert. Als DNA-Matrizen dienten in diesen Reaktionen dsDNA-Moleküle, die durch PCR amplifiziert worden waren und an ihrem 5'-Ende eine T7- oder T3-Promotorsequenz enthielten. Ein Reaktionsansatz (40 µl) enthielt 1 x Transkriptionspuffer (T3 bzw. T7), 20 U RNasin, 2.5 mM ATP, 2.5 mM GTP, 2.5 mM UTP, 2.5 mM CTP, 100-300 ng DNA-Matrize, 20 µCi α-[³²P]-CTP (800 Ci/mmol) und 40-80 U T7- oder T3-RNA-Polymerase. Das Gemisch wurde 90 min bei 37°C inkubiert. Um die DNA-Matrize zu hydrolysieren, wurde anschließend RQ1-DNase I (RNase-frei, 5 U) zugegeben, und das Reaktionsgemisch wurde für weitere 20 min bei 37°C inkubiert. Die synthetisierte RNA wurde mit Hilfe des "Nucleotide Removal Kits" (QIAGEN) nach den Angaben des Herstellers gereinigt.

Die RNA-Moleküle RNA-Eco und RNA-Xho, die zur Herstellung der doppelsträngigen 5'-RNA4 verwendet werden sollten, wurden entweder von *EcoRV*- oder von *XhoI*-linearisierter pBluescript II KS(+)-Plasmid-DNA transkribiert.

Die RNA-Moleküle RNA-Dra und RNA-Sma, die zur Herstellung der doppelsträngigen 3'-RNA2 verwendet werden sollten, wurden entweder von *DraI*-linearisierter pBS-R2ab Plasmid-DNA oder von *SmaI*-linearisierter pBS-R2cd-Plasmid-DNA mit Hilfe von T7-RNA-Polymerase transkribiert. Die beiden Plasmide waren wie folgt hergestellt worden. Zur

Herstellung der pBS-R2ab-DNA wurden die Oligonukleotide R2a und R2b im molaren Verhältnis von 1:1 (siehe 3.13.3) angelagert, mit T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert (siehe 3.5.3) und mit *SacI/EcoRV*-linearisierter pBluescript II KS(+)-DNA ligiert (siehe 3.6). Zur Erzeugung der pBS-R2cd-DNA wurden die Oligonukleotide R2c und R2d im molaren Verhältnis von 1:1 angelagert, phosphoryliert und mit *BssHII*-linearisierter pBluescript II KS(+)-DNA ligiert.

Die Transkription der RNAs 8, 8(-), 10, 11, 12, 76, 77, L1 bzw. L2 erfolgte von den entsprechenden PCR-Produkten DNA 8, PCR-8(-), -10, -11, -12, -76, -77, -L1 bzw. -L2 (siehe 3.7). Die RNAs 37, 41 und 53 zur Untersuchung der RNA-Triphosphataseaktivität wurden von den dsDNA-Matrizen, DNA-37, -41 und -53, die durch eine Anlagerung von synthetischen Oligonukleotiden (siehe 3.13.3) hergestellt wurden, transkribiert.

3.14.2 Erzeugung von 5'- γ - und 5'- α -[32 P]-markierten RNA-Molekülen

Für die Analyse der RNA-5'-Triphosphatase-Aktivität der Helikasen wurden die 5'- γ -[32 P]-markierten RNA53 (5'-GGGAAAAA-3'), RNA37 (5'-GACUUAAG-3') und RNA41 (5'-GACUUAAGUACC-3') und die 5'- α -[32 P]-markierte RNA53 *in vitro* transkribiert. Für die Erzeugung der γ -[32 P]-markierten RNA-Moleküle wurde ein Reaktionsgemisch (siehe 3.13.1) verwendet, das γ -[32 P]-GTP statt α -[32 P]-CTP enthielt. Für die Transkription der 5'- α -[32 P]-markierten RNA53 wurde α -[32 P]-CTP im Reaktionsansatz (siehe 3.13.1) durch α -[32 P]-GTP ersetzt. Die dsDNA-Matrizen für die Transkription wurden durch Anlagerung (siehe 3.13.3) der DNA-Oligonukleotide ki37 und ki38 (RNA37), ki41 und ki42 (RNA41) bzw. ki53 und ki54 (RNA53), die alle eine T7-Promotorsequenz enthielten, hergestellt.

3.14.3 Anlagerung einzelsträngiger Nukleinsäuren (NAs) zur Herstellung von dsNA-Molekülen

Der Reaktionsansatz enthielt ein Paar der komplett oder partiell komplementären ssNA-Moleküle (jeweils mindestens 1 μ M konzentriert) in einem 1 x Anlagerungspuffer (siehe 2.7). Zur Herstellung nichtmarkierter Nukleinsäuren wurden die ssNA-Stränge in einem molaren Verhältnis von 1:1 verwendet. Für die Anlagerung radioaktiv markierter Nukleinsäuren wurde ein 50%-iger Überschuss des nichtmarkierten Stranges verwendet. Das Gemisch wurde für 2 min auf 94°C erhitzt und langsam (über eine Zeit von etwa 30 min) auf Raumtemperatur abgekühlt.

Auf diese Weise wurden die in den folgenden Tabellen beschriebenen doppelsträngigen NA-Moleküle hergestellt.

dsDNA	Oligonukleotid oder ssNA ^a (nicht markiert)	Oligonukleotid oder ssNA ^a (mit [³² P] markiert ^b)
DNA-5',3'	D2	D3
DNA-3'	D2	D1
DNA-5'	D3	DR
DNA-0	DR	D1
DNA1	ssDNA 8	ssDNA 19
DNA 1020/100*	ssDNA 1020	ssDNA 100
DNA 1020/Ava*	ssDNA 1020	ssDNA-Ava
DNA 1020/Fsp*	ssDNA 1020	ssDNA-Fsp
DNA 1020/Nde*	ssDNA 1020	ssDNA-Nde
DNA-37	ki 37	ki 38
DNA-41	ki 41	ki 42
DNA-53	ki 53	ki 54
RNA1	RNA 76	RNA 77
5'-RNA4	RNA-Xho	RNA-Eco
3'-RNA2	RNA-Dra	RNA-Sma
dsRNA2	JZR 8	JZR 2
dsRNA3	JZR 8	JZR 3
dsRNA9	JZR 8	JZR 9
dsRNA8	RNA 8	RNA 8(-)
dsRNA10	RNA 10	RNA 11
dsRNA L1/L2	RNA L1	RNA L2

^a - Die Herstellung von ssDNA ist in Abschnitt 3.14.5 beschrieben, die Herstellung von ssRNA ist im Abschnitt 3.14.1 beschrieben

^b - RNA-Moleküle wurden in Anwesenheit von α -[³²P]-CTP synthetisiert (3.14.1); DNA-Moleküle und die RNA-Oligonukleotide JZR2, JZR3, JZR9 wurden am 5'-Ende mit Hilfe von T4-Polynukleotidkinase radioaktiv markiert (3.5.3)

3.14.4 Herstellung von einzelsträngigen DNA-Molekülen

Zur Herstellung der einzelsträngigen DNA-Moleküle ssDNA8 und ssDNA19 wurden zuerst zwei PCR-Produkte, PCR-8 und PCR-19, amplifiziert. In beiden Reaktionen wurde eine vollständige HCoV-229E-cDNA-Kopie (kloniert in Vacciniavirus; Thiel et al., 2001) als Matrize verwendet. Für die PCR-8 wurde das Primerpaar ki8+/bio2- genutzt. Die PCR-19 wurde mit dem Primerpaar bio1+/ki19- durchgeführt. Die Oligonukleotide bio1+ und bio2- trugen am 5'-Ende eine Biotin-Gruppe. Die PCR-Produkte wurden auf Streptavidin-gekoppelten Magnetpartikeln (Streptavidin Dynabeads, Dynal) immobilisiert. Nach der Trennung der beiden Stränge in 0.15 M NaOH wurden die ssDNA-Stränge, die keinen Biotin enthielten, wurden nach der Methode des Herstellers aus dem Überstand gereinigt.

Die einzelsträngige DNA1020 wurde mit dem gleichen Protokoll hergestellt. In diesem Fall wurde jedoch ein PCR-Produkt, das mit den Primern ki8+ und bio2- und der HCoV-229E-cDNA-Kopie als Matrize hergestellt worden war, genutzt. Zur Erzeugung der ssDNA100 wurde das PCR-Primerpaar, bio1+ und L1-, verwendet.

Die ssDNA-Moleküle, ssDNA-Ava, ssDNA-Fsp und ssDNA-Nde, wurden mit Hilfe eines weiteren PCR-Produkts (Primerpaar, bio1+ und L6-, HCoV-229E-cDNA-Matrize) hergestellt. Dieses PCR-Produkt wurde für die weiteren Experimente entweder mit *AvaI*-, *FspI*- oder *NdeI*-Restriktase gespalten und die entsprechenden ssDNAs wurden mit dem gleichen Protokoll, wie oben beschrieben, erzeugt.

3.15 Gelelektrophorese

3.15.1 Elektrophorese im Agarosegel

Zur elektrophoretischen Analyse von langen NA-Fragmenten wurden 1-2.5%-ige Agarosegele in 0.5 x TBE- oder 1 x TAE-Puffer verwendet. Die benötigte Menge der Agarose wurde in 90 ml deionisiertem Wasser erhitzt und geschmolzen. Nach der Abkühlung auf ca. 70°C wurden 10 ml Puffer (5x TBE oder 10x TAE) und, wenn es nötig war (für die Analyse der nicht radioaktivmarkierten NA-Moleküle), 50 µl Ethidiumbromidlösung (1 mg/ml) zugegeben. Die Lösung wurde anschließend in eine horizontale Gelkammer gegossen. Als Laufpuffer wurden wiederum 0.5 x TBE- oder 1 x TAE-Puffer verwendet. Die NA-enthaltenden Proben wurden mit 1/4 Volumen des 5x NA-Probenpuffers (nativ) vermischt, auf das Gel aufgetragen

und in einem elektrischen Feld von 8 V/cm in einer horizontalen Elektrophoresekammer aufgetrennt. Die NA-Banden wurden unter UV-Licht (Wellenlänge, 254 nm) oder durch Autoradiographie, wenn die Nukleinsäuren radioaktiv markiert waren, sichtbar gemacht. Gel- und Laufpuffer für die Analyse der RNA enthielten in manchen Experimenten zusätzlich 0.1% (w/v) SDS.

3.15.2 Proteinelektrophorese im Polyacrylamidgel

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

Komponente	Sammelgel (5%)	Trenngel (12%)
30% (w/v) Acrylamid (ml)	1.00	4.00
2% (w/v) Bisacrylamid (ml)	0.50	0.70
1 M Tris-HCl pH 8.8 (ml)	-	3.30
1 M Tris-HCl pH 6.8 (ml)	0.75	-
10% (w/v) SDS (ml)	0.06	0.10
H ₂ O	3.63	1.80
10% (w/v) Ammoniumpersulfat (ml)	0.04	0.06
TEMED (ml)	0.02	0.03

Diese Mischungen wurden für 8x10-cm-große Gele verwendet. Als Laufpuffer wurde Tris-Glycin-Puffer verwendet. Proteinproben wurden mit 1/3 Volumen Proteinprobenpuffer (4x) vermischt und für 3 min bei 94°C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte in einer vertikalen Elektrophoresekammer mit einer Stromstärke von 18 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.

3.15.3 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in denaturierenden Polyacrylamidgelen

Die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren unter denaturierenden Bedingungen erfolgte in Harnstoff-haltigen Polyacrylamidgelen. Die Gellösungen (12 ml) enthielten eine 10-20%-ige Mischung von Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis von 19:1, 0.5 x TBE-Puffer und 7 M Harnstoff. Die Gelpolymerisation wurde durch Zugabe von 50 µl 10% Ammoniumpersulfat und 20 µl TEMED gestartet. Die zu analysierenden Proben wurden mit dem gleichen Volumen DR-Puffer (2x) vermischt und für 1 min auf 94°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in einer vertikalen Elektrophoresekammer bei 200 V in einem 1-mm-dicken Gel. Die in unter diesen Bedingungen analysierten Nukleinsäuren waren radioaktiv markiert und wurden deshalb mittels Autoradiographie sichtbar gemacht.

3.15.4 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in nativen Polyacrylamidgelen

Zur Feststellung der NA-Bindungsaktivität der Helikasen wurde eine EMSA-Methode verwendet. Die Reaktionsprodukte wurden dabei in einem nativen Polyacrylamidgel getrennt. Die Gellösungen (12 ml) enthielten eine 4.5-10%-ige Mischung von Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis von 30:1 in 0.3 x TBE-Puffer. Durch Zugabe von 50 µl 10% Ammoniumpersulfat und 20 µl TEMED wurde die Polymerisation des Gels (1 mm dick) ausgelöst. Die Elektrophorese erfolgte in einer vertikalen Elektrophoresekammer bei 5 V/cm bei +8°C. Die Positionen der NA-Banden wurden durch Autoradiographie festgestellt und die Menge der Radioaktivität in jeder Bande wurde mittels eines Phosphorimagersystems quantifiziert.

3.15.5 Polyacrylamidgelelektrophorese zum Testen der NA-Entwindungsaktivität und RNA-5'-Triphosphatase-Aktivität von Helikasen

Die Gellösung (12 ml) enthielt eine 6-10%-ige Mischung von Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis von 30:1 und 0.1% (w/v) SDS in 0.5 x TBE-Puffer. Das Gel wurde, wie in 3.14.4 beschrieben, gegossen, und die Elektrophorese erfolgte bei 12 V/cm bei Raumtemperatur. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte mittels Autoradiographie.

3.16 Western blot

3.16.1 Semi-dry-Blot

Zur nachfolgenden Analyse mittels Immunfärbung wurden Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran überführt. In die Transferkammer wurde zuerst auf der der Anode zugewandten Seite ein in Anodenpuffer 1 getränktes Filterpapier luftblasenfrei eingelegt. Es folgten ein in Anodenpuffer 2 getränktes Filterpapier, die mit Wasser benässte Nitrocellulosemembran, das Gel und zwei in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere. Danach wurde die Kathodenplatte der Transferkammer aufgesetzt. Der Transfer wurde für 40 min bei einer Stromstärke von 2.5 mA pro cm² Gelfläche durchgeführt. Zur Kontrolle des Transfers und zum Anzeichnen der Positionen der Markerproteine wurde das Gel für 1 min mit Ponceau-S-Lösung gefärbt und anschließend mit Wasser entfärbt. Um unspezifische Bindungen während der Immunfärbung zu reduzieren, wurde die Nitrocellulosemembran 2 Stunden bei Raumtemperatur in 1% (w/v) Magermilchpulver geschwenkt.

3.16.2 Immunfärbung

Nach dem Blockieren wurde die Membran dreimal für je 5 min in TBST gewaschen. Der monoklonale Primärantikörper wurde 1:200 in TBST verdünnt und für 180 min bei Raumtemperatur mit der Membran inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 10 min mit TBST gewaschen und für 60 min mit dem 1:10 000 verdünnten Alkalische-Phosphatase-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBST wurde die Membran mit frisch hergestellter Substratlösung gefärbt. Die Farbreaktion wurde mit PBS, das 20 mM EDTA enthielt, gestoppt, und die Membran wurde zwischen Filterpapieren getrocknet.

3.17 Analyse der enzymatischen Aktivitäten von Helikasen

3.17.1 Analyse der NTPase-Aktivität

Das bakteriell exprimierte MBP-Fusionsprotein (siehe 4.1.3 und 4.1.4), SCoV-nsp13 (10 nM), bzw. die in Insektenzellen exprimierte HCoV-229E-Helikase, HCoV-nsp13 (0.7 nM), wurde bei 20°C für 2 bis 15 min mit unterschiedlichen Konzentrationen von NTP oder dNTP in Reaktionspuffer (1x HEL1-Puffer) inkubiert. Die Ansätze enthielten außerdem 50 nM des jeweils

entsprechenden α -[^{32}P]- $(\text{d})\text{NTPs}$ (400 Ci/mmol, Amersham). Die Gesamt- $(\text{d})\text{NTP}$ -Konzentrationen lagen im Bereich von 0.5 bis 10 μM . Die Reaktion erfolgte in Abwesenheit von Polynukleotidkofaktoren oder in Anwesenheit von 100 nM Poly(U). In letzterem Fall lagen die NTP-Konzentrationen im Bereich von 50-500 μM . Als Kontrollproteine wurden mit dem gleichen Protokoll die gereinigten SCoV- bzw. HCoV-nsp13_KA (siehe 4.1.3-4.1.4) verwendet. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration von 100 mM) gestoppt. Die Reaktionsprodukte wurden anschließend auf eine Polyethylenimin-Cellulose-F-Platte (PEI-Platte) aufgetragen und mittels Dünnschichtchromatographie in TLC-Puffer1 getrennt. Danach wurde die PEI-Platte getrocknet und autoradiographiert. Der Substratumsatz wurde mittels Phosphorimager und ImageQuant-Software quantifiziert. Die kinetischen Konstanten wurden in der graphischen Darstellung nach Hofstee et al. (1959) und mit Hilfe der CricketGraph-Software ausgewertet.

3.17.2 Analyse der NA-Bindungsaktivität mit Hilfe der EMSA-Methode

Das zu analysierende [^{32}P]-markierte Nukleinsäurefragment (2 nM) wurde in HEL1-Puffer mit unterschiedlichen Konzentrationen (5 nM bis zu 100 nM) des Enzyms (HCoV-nsp13 bzw. HCoV-nsp13_KA) gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden anschließend in einem nativen Acrylamid- oder Agarosegel getrennt und mittels Autoradiographie analysiert.

3.17.3 Analyse der NA-Entwindungsaktivität

Die Standardreaktion enthielt 14 nM SARS-nsp13 bzw. 28 nM SARS-nsp13_KA oder 3 nM HCoV-nsp13 bzw. 3 nM HCoV-nsp13_KA sowie 10 nM DNA- bzw. RNA-Substrat. Als Puffer wurde in diesen Experimenten HEL2-Puffer verwendet. Nach einer Inkubation für 30 min bei 30°C wurde die Reaktion mit dem gleichen Volumen NA-Probenpuffer gemischt und die Reaktionsprodukte wurden in einem 4.5-10%-igen nativen Polyacrylamidgel oder in einem Agarosegel getrennt. Die NA-Banden wurden durch Autoradiographie lokalisiert.

3.17.4 Analyse der RNA-Triphosphatase-Aktivität

Die Proteine SARS- und HCoV-nsp13 (bzw. die davon abgeleiteten Kontrollproteine -nsp13_KA) wurden jeweils für 5-60 min bei 30°C mit einem RNA-Substrat (RNA37, RNA41

oder RNA53) in HEL1-Puffer inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration von 100 mM) gestoppt. Die Reaktionsprodukte wurden durch Dünnschichtchromatographie auf einer PEI-Platte in TLC-Puffer² oder Elektrophorese in einem SDS-enthaltigen 8%-igen Polyacrylamidgel (3.14.5) getrennt und mittels Autoradiographie und Phosphorimager lokalisiert und quantifiziert.

3.18 Analyse der enzymatischen Aktivitäten von nsp15

3.18.1 Nukleaseaktivität

Das Reaktionsgemisch enthielt 300 nM MBP-nsp15 (wildtypisches Protein oder Mutante). Als Substrate wurden verwendet: 10 nM eines 1 kb(p)-NA-Substrats, 50 nM eines radioaktiv markierten RNA-Oligonukleotids oder 500 nM eines nichtmarkierten RNA-Oligonukleotid. Die Reaktionen erfolgten in einem der folgenden 1x Reaktionspuffer: XE₀ (ohne Me²⁺), XE₁ (Mg²⁺), XE₂ (Ca²⁺), XE₃ (Zn²⁺) oder XE (Mn²⁺). Die Reaktion dauerte 5 bis 60 min bei 37°C und wurde durch Zugabe des gleichen Volumens 2x DR-Puffer gestoppt. Die Trennung und Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte in einem 8%- oder 20%-igen SDS-Polyacrylamidgel oder in einem Harnstoff-haltigen Polyacrylamidgel mit nachfolgender Autoradiographie.

3.18.2 Analyse des 3'-Endes des 5'-terminalen Spaltproduktes

Das 5'-terminale Produkt der Nukleasespaltung (siehe 3.17.1; 20 µl Reaktionsansatz) der nichtmarkierten RNA (dsRNA2/8) wurde durch Elektrophorese in einem 20%-igen Harnstoff-Polyacrylamidgel und nachfolgende Elution in RE-Puffer (3.5 Stunden bei 8°C) isoliert. Anschließend wurde das RNA-Fragment mit Ethanol präzipitiert, getrocknet und in 10 mM Tris-HCl pH 8.0 gelöst. Die RNA-Lösung wurde auf drei Portionen verteilt. Die erste Portion wurde in PNK-Puffer A für 30 min bei 37°C und 5 min bei 94°C inkubiert. Die zweite Portion wurde unter Zugabe von 5 U PNK in PNK-Puffer A für 30 min bei 37°C und 5 min bei 94°C inkubiert. Die dritte Portion wurde unter Zugabe von 5 U CIP in CIP-Puffer für 30 min bei 37°C und 5 min bei 94°C inkubiert. Danach wurden die Reaktionsprodukte mit Ethanol präzipitiert. Die Reaktionsprodukte wurden anschließend mit 1 µM 5'-[³²P]-pCp (3000 Ci/mmol, Amersham) mit Hilfe von T4-RNA-Ligase in RL-Puffer ligiert. Die in einem 20%-igen denaturierenden Polyacrylamidgel getrennten Ligationsprodukte wurden mittels Autoradiographie lokalisiert.

3.18.3 Analyse des 5'-Endes des 3'-terminalen Spaltungsproduktes mittels Primer-Extensionsanalyse

Das 3'-terminale Produkt der Nukleasespaltung (siehe 3.17.1; 30 µl Reaktionsansatz) einer nichtmarkierten RNA (entweder dsRNA2 oder dsRNA3) wurde, wie in 3.17.2 für das 5'-Produkt beschrieben, gereinigt und gelöst. Das gereinigte RNA-Fragment wurde anschließend mit einem 3-fachen Überschuss von entweder 5'-[³²P]-DNA14 (ki 89) oder -DNA15 (ki 90) in Erststrang-Puffer (Invitrogen) unter Zugabe von 5 mM DTT und NTPs (je 1 mM) angelagert. Dem Ansatz wurde anschließend 200 U reverse Transkriptase (RNaseH-freie Superscript III, Invitrogen) zugegeben, und das Reaktionsgemisch wurde für 30 min bei 40°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit DR-Puffer gestoppt, und die Reaktionsprodukte wurden in einem 20%-igen denaturierenden Polyacrylamidgel getrennt und anschließend autoradiographiert.

4 Ergebnisse

4.1 Heterologe Expression und Aufreinigung coronaviraler Helikasen und putativer Endonukleasen

4.1.1 Übersicht über die in dieser Arbeit charakterisierten Proteine

Für die Herstellung des rekombinanten Plasmids zur Expression der SARS-Coronavirus-Helikase wurde dessen kodierende Sequenz in das Plasmid *pMal*TM-c2 (New England Biolabs) eingesetzt. Das exprimierte Protein, das als SCoV-nsp13 bezeichnet wurde, ist ein Fusionsprotein mit dem maltosebindenden Protein (MBP) von *E. coli* (siehe 4.1.2). Das MBP-Helikase-Fusionsprotein wurde affinitätschromatographisch gereinigt (AmyloseTM-Resin, NEB, siehe Abschnitt 4.1.3).

Die Plasmid-DNAs zur Expression der anderen in dieser Arbeit untersuchten Proteine, also der HCoV-229E-Helikase (weiter im Text als HCoV-nsp13 bezeichnet) sowie der HCoV-229E- und SARS-CoV-nsp15-Proteine (putative Endonukleasen (siehe 1.1.3), weiter im Text als HCoV-nsp15 und SCoV-nsp15 bezeichnet), wurden von Dr. John Ziebuhr zur Verfügung gestellt. Alle hier charakterisierten Proteine sind in der Tabelle 4.01 zusammengefasst.

Die Aminosäuresequenz von HCoV-nsp13 umfaßt die gesamte HCoV-229E-nsp13-Sequenz (Heusipp et al., 1997) mit Ausnahme der beiden N-terminalen Alanin-Reste. An seinem N-Terminus enthält das Protein außerdem eine aus 32 Aminosäuren bestehende Sequenz, die auch 6 Histidinreste einschließt. Das wildtypische Protein, HCoV-nsp13, sowie ein entsprechendes Kontrollprotein, HCoV-nsp13_KA, das einen Aminosäureaustausch von Lysin (pp1ab-5284) zu Alanin im „Walker A“-Motiv enthielt, wurden in HighFiveTM-Insektenzellen mit Hilfe der in unserem Labor erzeugten rekombinanten Baculovirus-Vektoren vBac-HEL und vBac-HEL_KA (Seybert et al., 2000a) exprimiert und mit Hilfe einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie (Ni-NTATM-Agarose, QIAGEN) gereinigt (siehe Abschnitt 4.1.4). Die nsp15-Proteine von HCoV-229E (pp1ab-Reste Gly6111-Gln6458) und SARS-CoV (pp1ab-Reste Ser6430-Gln6775) sowie eine Reihe davon abgeleiteter Proteine mit spezifischen Substitutionen (siehe Tabelle 4.01) wurden als MBP-Fusionen bakteriell exprimiert und mittels Amylose-Affinitätschromatographie (AmyloseTM-Resin, NEB) gereinigt (siehe Abschnitt 4.1.5).

Enzymtyp	Virus	Proteinname	Eingeführte Mutation (Position)	Eingeführte Substitution in pp1ab	Fusion mit
Helikase	HCoV-229E	HCoV-nsp13	-	Wildtyp	His-tag ¹ (N-terminal)
Helikase	HCoV-229E	HCoV-nsp13_KA	AAA → GCA (16141)	K5284A	His-tag ¹ (N-terminal)
Helikase	SARS-CoV	SCoV-nsp13	-	Wildtyp	MBP ² (N-terminal)
Helikase	SARS-CoV	SCoV-nsp13_KA	AAG → GCG (17028)	K5589A	MBP ² (N-terminal)
Endonuklease	HCoV-229E	HCoV-nsp15	-	Wildtyp	MBP ² (N-terminal)
Endonuklease	HCoV-229E	HCoV-nsp15_mut	CAC → GCC (19369)	H6360A	MBP ² (N-terminal)
Endonuklease	HCoV-229E	HCoV-nsp15_mut2	CAC → GCC (19324)	H6345A	MBP ² (N-terminal)
Endonuklease	HCoV-229E	HCoV-nsp15_mut3	GAT → GCT (19513)	D6408A	MBP ² (N-terminal)
Endonuklease	HCoV-229E	HCoV-nsp15_mut4	ACT → GCT (19504)	T6405A	MBP ² (N-terminal)
Endonuklease	HCoV-229E	HCoV-nsp15_mut5	TCC → GCC (19570)	S6427A	MBP ² (N-terminal)
Endonuklease	HCoV-229E	HCoV-nsp15_mut6	AAG → GCG (19492)	K6401A	MBP ² (N-terminal)
Endonuklease	HCoV-229E	HCoV-nsp15_mut7	GAC → GCC (19594)	D6435A	MBP ² (N-terminal)
Endonuklease	SARS-CoV	SCoV-nsp15	-	Wildtyp	MBP ² (N-terminal)
Endonuklease	SARS-CoV	SCoV-nsp15_mut	CAT → GCT (20295)	H6678A	MBP ² (N-terminal)

Tabelle 4.01 In der Arbeit charakterisierte Proteine.

1 – eine Fusion mit sechs konsekutiven Histidinresten

2 – eine Fusion mit Maltose-bindendem Protein

4.1.2 Erzeugung der Plasmide zur SARS-CoV-Helikase-Expression

Zur Expression der SARS-coronaviralen Helikase (weiter als SCoV-nsp13 bezeichnet) wurde das *pMal*TM-c2-Plasmid (New England Biolabs) verwendet (Abbildung 4.01).

Die zu klonierende SARS-CoV-Sequenz, also die Nukleotide 16167 bis 17969 des SARS-CoV-Genoms (Stamm Frankfurt 1, GenBank AY291315), wurde mittels PCR amplifiziert (Up-Primer – JZ 425, Down-Primer – JZ 426). Als Matrize wurde die SARS-CoV-cDNA 411 (von Dr. John Ziebuhr gestellt) verwendet. Anschließend wurden 3'-Überhänge mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase entfernt und die 5'-Enden mittels T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert. Abschließend wurde das Fragment mit *Pst*I-Restriktionsendonuklease behandelt. Das *pMal*TM-c2-Plasmid wurde im Bereich der Polylinkersequenz mit den *Xmn*I- und *Pst*I-Restriktionsendonukleasen gespalten. Die beiden DNA-Fragmente wurden mittels T4-DNA-Ligase ligiert und das Ligationsprodukt wurde zur Transformation von *E.coli*-DH5 α -Zellen verwendet. Positive Klone wurden durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung identifiziert. Das erzeugte Plasmid wurde als pMal-sHEL bezeichnet.

Zur Herstellung des Plasmids für die Expression von SCoV-nsp13_KA, einem Kontrollprotein, das einen Lysin-5589-Alanin-Austausch im Walker-A-Motiv trug, wurde die *in-vivo*-Rekombinations-PCR-Methode verwendet (siehe 3.10). Als mutagene A- und B-Primer dienten die Oligonukleotide JZ 441 bzw. JZ 440. Die Mutation im pMal-sHEL_KA-Plasmid wurde durch Sequenzierung bestätigt (Abbildung 4.02).

4.1.3 Expression und Aufreinigung der SARS-CoV-Helikase

Die mit dem pMal-sHEL- bzw. pMal-sHEL_KA-Plasmid transformierten *E.coli*-TB1-Zellen wurden in 200 ml LB-Medium, wie in 3.11 beschrieben, kultiviert und mittels IPTG induziert. Die exprimierten MBP-Fusionsproteine, SCoV-nsp13 und SCoV-nsp13_KA, wurden durch Affinitätschromatographie (AmyloseTM-Resin, siehe 3.12) und nachfolgende Gel-Filtration (siehe 3.12) gereinigt. Die Abbildung 4.03 illustriert die Proteinexpression und Reinigung anhand ausgewählter Fraktionen aus den einzelnen Reinigungsschritten, die in einem zwölfprozentigen SDS-Polyacrylamidgel analysiert wurden.

Die beobachtete elektrophoretische Mobilität der gereinigten Proteine entsprach gut der errechneten molekularen Masse des Fusionsproteins von 108 kDa. Außerdem wurde die Identität des gereinigten Proteins mit einem SARS-CoV-Helikase-spezifischen Peptidantiserum zweifelsfrei bestätigt (Abb. 4.03). Aus 200 ml Kulturvolumen konnten ca. 1,3 mg von jedem der

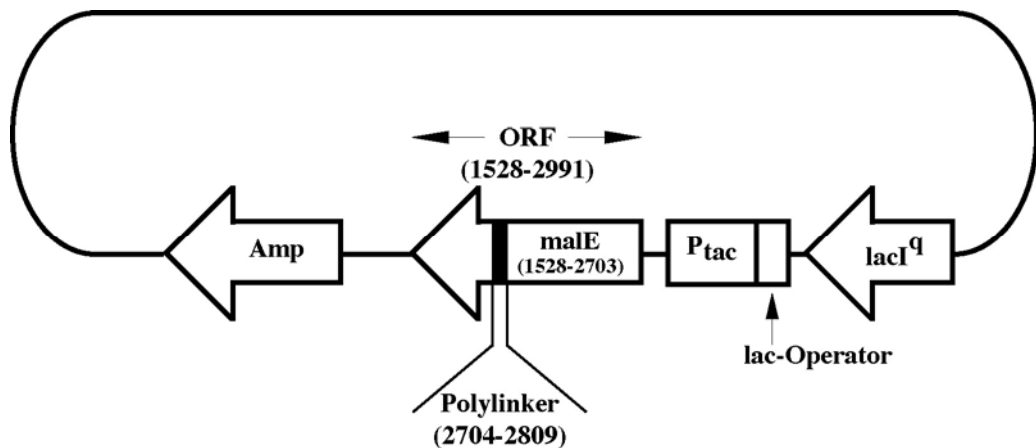


Abbildung 4.01 Schematische Darstellung des zur Klonierung verwendeten pMal-c2-Plasmids.

Der Nukleotidbereich des zur Klonierung verwendeten offenen Leserasters, von 1528 bis 2991, (englisch: open reading frame, ORF) ist in Klammern gezeigt. Die Insertion der coronaviralen Sequenz erfolgte innerhalb der Polylinker-Sequenz (2704-2809). ORF trägt in seinem N-terminalen Bereich die *malE*-Gensequenz (1528-2703), die das Maltose-bindende Protein (MBP) kodiert. Das heterologe Protein wird somit als MBP-Fusionsprotein exprimiert. Die Transkription des ORFs steht unter der Kontrolle des P_{tac}-Promotors. Der Promotor wird durch die Bindung des *lacI*^q-Genproduktes an den *lac*-Operator kontrolliert. Das *Amp*-Gen vermittelt eine Resistenz gegenüber Ampicillin.

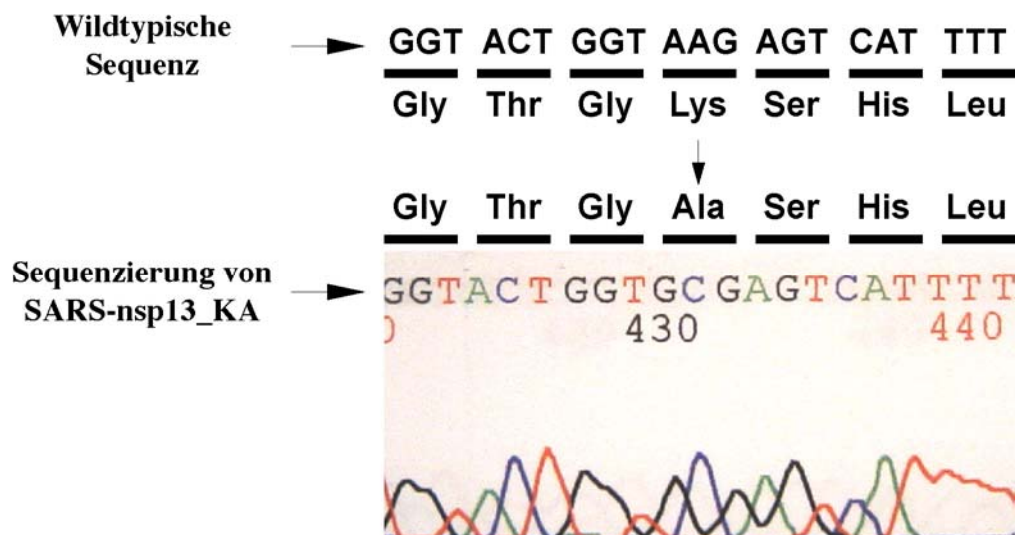


Abbildung 4.02 Sequenzdaten im Bereich der eingeführten Mutation.

Die Sequenzierung erfolgte mit dem Oligonukleotid JZ435. Das Lysin-Kodon (AAG) der wildtypischen Sequenz (oben gezeigt) wurde zu einem Alanin-Kodon (GCG) verändert.

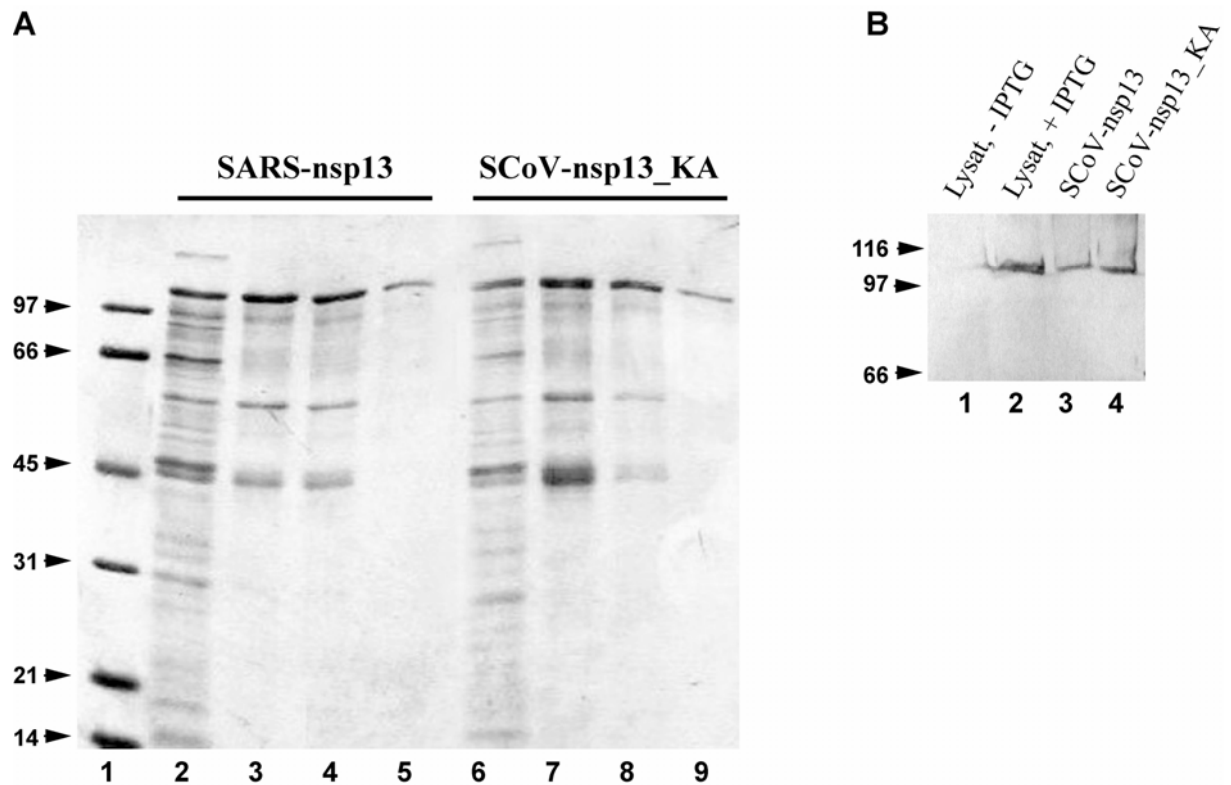


Abbildung 4.03 Aufreinigung der Proteine SCoV-nsp13 und SCoV-nsp13_KA aus *E.coli* TB1.

Das Bild A zeigt eine elektrophoretische Trennung repräsentativer Fraktionen der Proteinreinigung in einem mit Coomassie-Brilliant-Blau R250 gefärbten 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel. Spuren: 1, Proteinmolekulargewichtsmarker, die molaren Massen sind in kDa auf der linken Seite angegeben; 2, Gesamtlisat aus mit pMal-sHEL transformierten, IPTG-induzierten Bakterien; 3 und 4, durch Amylose-Affinitätschromatographie gereinigtes SCoV-nsp13; 5, durch nachfolgende Gelfiltration gereinigtes SCoV-nsp13; 6, Gesamtlisat aus mit pMal-sHEL_KA transformierten, IPTG-induzierten Bakterien; 7 und 8, durch Amylose-Affinitätschromatographie gereinigtes SCoV-nsp13_KA; 9, durch nachfolgende Gelfiltration gereinigtes SCoV-nsp13_KA.

Der Abschnitt B zeigt eine Western-Blot-Analyse mit einem SCoV-nsp13-spezifischen Antiserum, das die C-terminalen Reste, H₂N-KKLQFTSLEIPRRNVATLQ-COOH, des nsp13 erkennt. Analysiert wurden Gesamtlisat aus mit pMal-sHEL transformierten nichtinduzierten Bakterien (Spur 1), Gesamtlisat aus mit pMal-sHEL transformierten und mit IPTG-induzierten Bakterien (Spur 2), gereinigtes SCoV-nsp13 (Spur 3) und gereinigtes SCoV-nsp13_KA (Spur 4). Die Positionen der Markerproteine sind in kDa auf der linken Seite angegeben.

beiden Proteine gereinigt werden. Die gereinigten Proteine wurden aliquotiert, auf Trockeneis eingefroren und bei -70°C gelagert.

4.1.4 Expression und Aufreinigung der HCoV-229E-Helikase

Die wildtypische HCoV-229E-Helikase (HCoV-nsp13) und das davon abgeleitete substituierte (inaktive) Kontrollprotein (HCoV-nsp13_KA; siehe Tabelle 4.01) wurden in eukaryotischen Zellen (High-FiveTM-Insektenzellen) als eine Fusion mit sechs aufeinanderfolgenden Histidinresten im N-terminalen Bereich exprimiert (siehe Abschnitt 3.13). Die durch eine Affinitätschromatographie (Ni-NTATM-Agarose) gereinigten Proteine wurden konzentriert (siehe Abschnitt 3.12), aliquotiert und bei -70°C gelagert. Die Abbildung 4.04 zeigt die Qualität der gereinigten Proteine, die im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel sauber erschienen. Die Mobilität der Proteine in einem zwölfprozentigen Acrylamidgel entsprach der errechneten molekularen Masse der Proteine von 67 kDa (Abbildung 4.04).

4.1.5 Expression und Aufreinigung der nsp15-Proteine

Die auf der Basis des pMal-c2-Plasmids (NEB; siehe Abbildung 4.01) erzeugten Plasmide zur Expression rekombinanter coronaviraler nsp15-Proteine wurden von Dr. John Ziebuhr zur Verfügung gestellt. Die wildtypischen HCoV- und SCoV-nsp15-Proteine sowie eine Reihe von davon abgeleiteten Proteinen mit einzelnen Aminosäuresubstitutionen (Tabelle 4.01) wurden, wie in dieser Tabelle dargestellt, als N-terminale MBP-Fusionen bakteriell (*E.coli* TB1) exprimiert. Die Fusionsproteine wurden nach dem gleichen Protokoll wie die SARS-Coronavirus-Helikase (siehe Abschnitte 3.12 und 4.1.3) mittels Affinitätschromatographie (AmyloseTM-Resin, siehe 3.12) und einer nachfolgenden Gel-Filtration (siehe 3.12) gereinigt, anschließend konzentriert und bei -80°C gelagert. Die gereinigten Proteine erschienen elektrophoretisch sauber, und ihre elektrophoretische Mobilität entsprach der errechneten molekularen Masse von ca. 81 kDa (siehe Abbildung 4.05).

4.2 Charakterisierung der Nukleinsäure-Bindungsaktivität von HCoV-nsp13

Es wurde für viele Helikasen gezeigt, dass ihre NTP- und NA-Bindungsaktivitäten miteinander gekoppelt sind (siehe 1.2). Auch die NTP-Hydrolyse-Aktivität des HCoV-nsp13

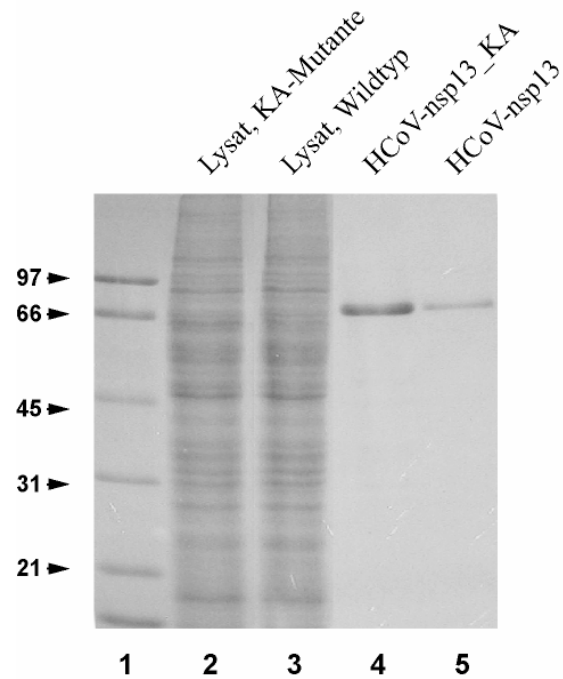


Abbildung 4.04 Aufreinigung der HCoV-229E-Helikase.

Die Abbildung zeigt eine elektrophoretische Trennung der Reinigungsprodukte in einem mit Coomassie-Brilliant-Blau R250 gefärbten 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine wurden aus mit rekombinanten Bakuloviren infizierten Insektenzellen mittels einer Ni-NTA-Agarose-Affinitätschromatographie als N-terminale Fusionen mit sechs konsekutiven Histidinresten gereinigt. Spuren: 1, Proteinmolekulargewichtsmarker, die molaren Massen sind in kDa auf der linken Seite angegeben; 2, Gesamtlisat aus mit vBac-HEL_KA infizierten HighFiveTM-Insektenzellen; 3, Gesamtlisat aus mit vBac-HEL infizierten HighFiveTM-Insektenzellen; 4, durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigtes HCoV-nsp13_KA; 5, durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigtes HCoV-nsp13.

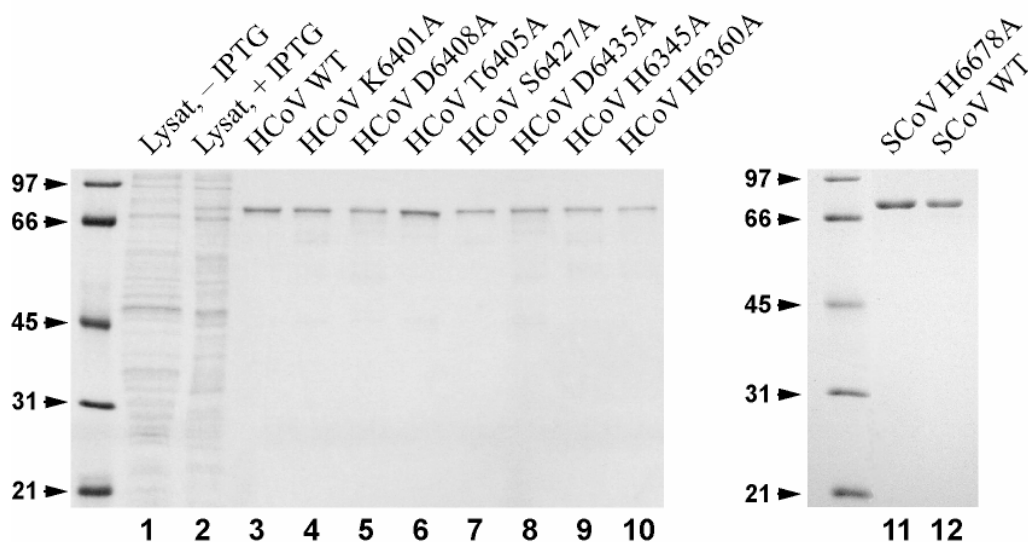


Abbildung 4.05 Aufreinigung bakteriell exprimierter coronavirusaler nsp15-Proteine.

Die bakteriell exprimierten MBP-nsp15-Fusionsproteine wurden durch Amylose-Affinitätschromatographie und nachfolgende Gelfiltration gereinigt. Die Abbildung zeigt eine elektrophoretische Auftrennung der gereinigten Proteine (Coomassie-Brilliantblau-R250-gefärbtes, 12%-iges SDS-Polyacrylamidgel). Proteinmolekulargewichtsmarker sind auf der linken Seite angegeben. Spuren: 1, Gesamtlisat aus nichtinduzierten Bakterien; 2, Gesamtlisat aus mit 1 mM IPTG induzierten Bakterien; 3, gereinigtes wildtypisches HCoV-229E-nsp15; 4-10, gereinigte HCoV-229E-nsp15-Proteine mit spezifischen Aminosäuresubstitutionen (oben angegeben); 11, gereinigtes SARS-CoV-nsp15-H6678A-Protein; 12, gereinigtes wildtypisches SARS-CoV-nsp15-Protein.

wird durch unterschiedliche Polynukleotide wesentlich aktiviert (Seybert et al., 2000a). Darüber hinaus deuteten frühere Daten darauf hin, dass die HCoV-229E-Helikase Substrate mit oligo(T) oder oligo(A)-Überhängen besser entwindet als solche mit oligo(G)-Überhängen (Seybert et al., 2000a). Um die Spezifität der Helikase für bestimmte NA-Substrate näher zu untersuchen, wurde die NA-Bindungsaktivität des Proteins mit Hilfe der EMSA-Methode (englisch: electrophoretic mobility shift assay) charakterisiert. Die Methode stützt sich auf den Unterschied der elektrophoretischen Mobilität zwischen dem freien bzw. proteingebundenen Nukleinsäuresubstrat. Nach dem Eintritt des Komplexes in das Gel bleibt der Nukleinsäure-Protein-Komplex stabil, da die Diffusion eines dissoziierten Protein-Nukleinsäure-Komplexes aus dem „gel cage“ wesentlich langsamer erfolgt als eine Reassoziierung dieses Komplexes (Cann, 1989). Auf der Grundlage der Reaktionsformel 1 ergibt sich die Dissoziationskonstantengleichung in Formel 2, wobei [E], [S] und [ES] die Gleichgewichtskonzentrationen des Enzyms, des Substrates (Nukleinsäure) und des Enzym-Substrat-Komplexes sind.



$$K_d = [E] \times [S] / [ES] \quad (2)$$

Wenn die Anfangskonzentrationen im Verhältnis $[S]_0 \ll [E]_0 \sim K_d$ stehen, kann die Formel 2 wie folgt dargestellt werden (Formel 3).

$$K_d \approx [E]_0 \times [S] / [ES] \quad (3)$$

Daraus folgt, dass die Anfangskonzentration des Enzyms, bei der die Hälfte des Substrates gebunden ist (nämlich $[S] = [ES]$), gleich der Dissoziationskonstante ist. Diese Schlussfolgerung gilt uneingeschränkt für Substrate, die nur eine Proteinbindungsstelle enthalten. In Fällen, in denen mehrere Proteinmoleküle mit einem Substrat binden können (z. B. bei der Bindung von unspezifisch bindenden Proteinen an längere Nukleinsäuresubstrate), dient K_{50} statt K_d als Gradmesser der Bindungsaffinität. Es muß jedoch betont werden, dass die K_{50} (bei der Bestimmung des proteingebundenen Anteils der Substratfraktion) alle entstandenen Enzym-Substrat-Komplexe (auch solche, die von mehreren Proteinen gebunden wurden) einbezieht. Auf der Grundlage dieser Methode wurden K_{50} -Werte für die HCoV-229E-Helikase bestimmt, die im Bereich von 10 bis 50 nM für DNA- und RNA-Substrate lagen (siehe als Beispiel die Abbildung 4.06).

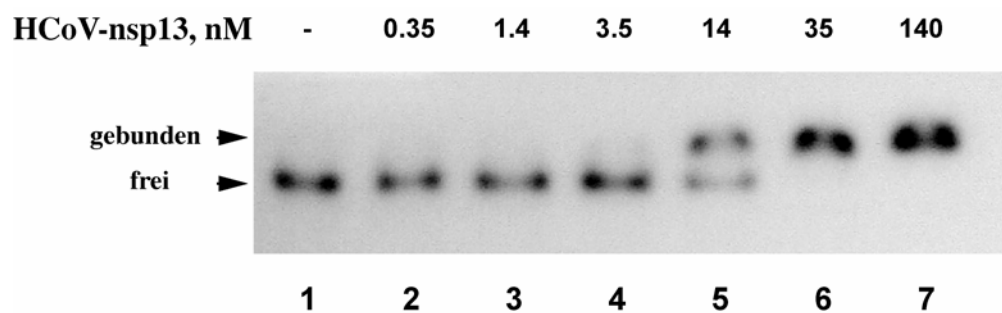


Abbildung 4.06 Bestimmung des K_{50} -Wertes der Nukleinsäurebindungsaktivität von HCoV-nsp13 mittels EMSA-Methode.

DNA8 wurde mit ansteigenden Konzentrationen von HCoV-nsp13 inkubiert. Gezeigt ist eine Autoradiographie des nativen Polyacrylamidgels, in dem die Produkte aufgetrennt wurden. Die Enzymkonzentration, bei der die Hälfte des Nukleinsäuresubstrates gebunden ist (Spur 5), entspricht dem K_{50} -Wert (14 nM). Spuren: 1, DNA-Substrat in Abwesenheit des Enzyms; 2, Inkubation mit 0.35 nM HCoV-nsp13; 3, Inkubation mit 1.4 nM HCoV-nsp13; 4, Inkubation mit 3.5 nM HCoV-nsp13; 5, Inkubation mit 14 nM HCoV-nsp13; 6, Inkubation mit 35 nM HCoV-nsp13; 7, Inkubation mit 140 nM HCoV-nsp13.

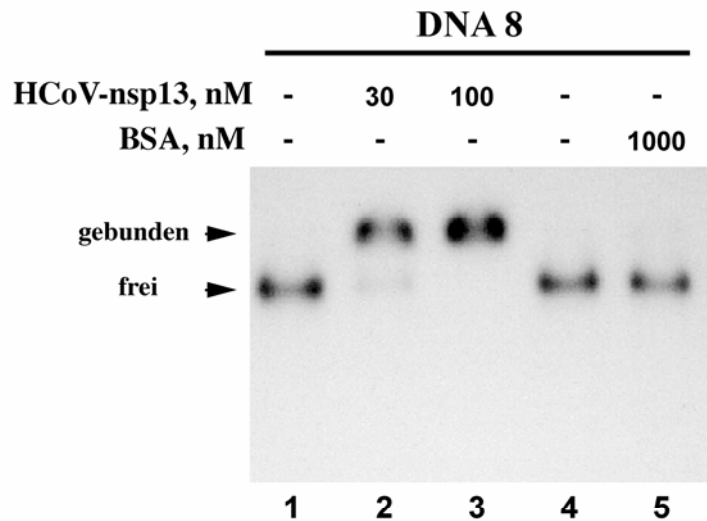
Ebenso wurden die Bindungsaffinitäten des Enzyms gegenüber unterschiedlichen Nukleinsäuresubstraten mit Hilfe der EMSA-Methode verglichen. Ein Vergleich der ermittelten K_{50} -Werte von *in-vitro*-transkribierten RNAs, die in ihrer Gesamtheit das gesamte HCoV-229E-Genom (sowohl Plusstrang als auch Minusstrang) abdeckten, ergab keine signifikanten Unterschiede (Daten nicht gezeigt). Es wurde daher geschlossen, dass die coronavirale Helikase wahrscheinlich keine spezifischen RNA-Sequenzen oder -Strukturen in der viralen genomischen RNA oder ihrer negativsträngigen Kopie erkennt. Auch wurde keine Präferenz der Helikasebindung für einzel- gegenüber doppelsträngiger RNA oder DNA festgestellt (siehe Abbildung 4.07).

In einem nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die NA-Bindung der Helikase durch NTPs beeinflusst werden kann. Auch diese Frage wurde mittels EMSA-Experimenten untersucht. Das Enzym wurde zu diesem Zweck mit unterschiedlichen Nukleinsäuren in Ab- und Anwesenheit der Nukleotide AMP-PNP (nicht hydrolysierbares Analogon von ATP), ADP und ATP inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsprodukte in einem nativen Polyacrylamidgel getrennt. Überraschenderweise zeigte HCoV-nsp13 keinen Unterschied in seiner NA-Bindungsaffinität in Ab- und Anwesenheit dieser Nukleotidkofaktoren (Abbildung 4.08).

4.3 Charakterisierung der Substratspezifität der HCoV- und SCoV-nsp13-assoziierten NTPase-Aktivität

Für die Translokation entlang einzelsträngiger Nukleinsäuremoleküle und die Trennung der NA-Stränge benötigen Helikasen Energie, die sie aus der Spaltung von NTP gewinnen. Die NTPase-Aktivität ist deswegen eine obligatorische Funktion einer jeden Helikase. NTPase-Aktivitäten wurden bereits für einige nidovirale Helikasen nachgewiesen. So wurde gezeigt, dass diese Enzyme ATP, GTP (EAV-nsp10 und HCoV-nsp13) und, im Fall der PRRSV-Helikase (*Arteriviridae*), auch CTP und UTP als Energiequelle verwenden können (Seybert et al., 2000a; Seybert und Ziebuhr, 2001; Bautista et al., 2002). Zunächst wurde die NTPase-Aktivität der putativen Helikase des im Jahre 2003 neuentdeckten Coronavirus SARS-CoV untersucht. Das bakteriell exprimierte Enzym SCoV-nsp13 sowie das Kontrollprotein SCoV-nsp13_KA wurden zu diesem Zweck mit α - ^{32}P -markiertem ATP inkubiert, und die Reaktionsprodukte wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie getrennt (Abbildung 4.09). Der R_f (englisch: retardation faktor) des im Falle des Wildtyp-Proteins beobachteten Reaktionsproduktes entsprach der Mobilität von Adenosindiphosphat (Daten nicht gezeigt), was auf eine spezifische Hydrolyse der

A



B

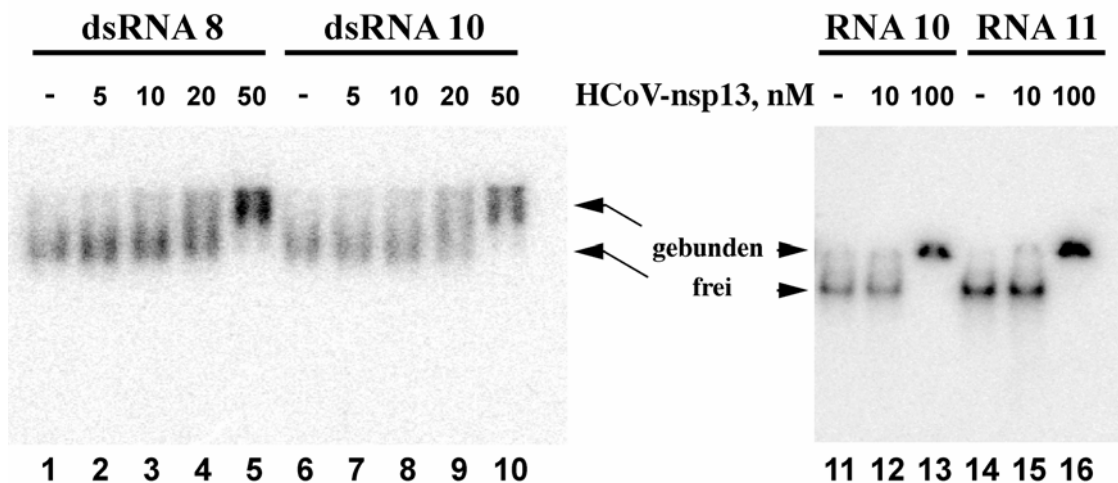


Abbildung 4.07 Nukleinsäurebindungsaktivität der HCoV-229E-Helikase.

Die untersuchten DNA- (Abschnitt A) und RNA-Moleküle (Abschnitt B) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des Enzyms inkubiert, und die Reaktionsprodukte wurden in 4%-igen nativen Polyacrylamidgelen getrennt und autoradiographiert. Die DNA 8 (Abschnitt A) ist ein mittels PCR amplifiziertes 2.5-kb-großes DNA-Fragment, das der 5'-Region des HCoV-229E-Genoms entspricht. Die RNA 10 (Abschnitt B, Spuren 11-13) ist eine *in-vitro*-transkribierte 2.5-kb-große RNA, deren Sequenz dem 3'-Ende-Fragment des HCoV-229E-Genoms entspricht. Die RNA 11 (Abschnitt B, Spuren 14-16) ist eine 2.5-kb-RNA, die komplementär zur RNA10 ist. Die dsRNA8 und dsRNA10 (Abschnitt B, Spuren 1-10) sind doppelsträngige RNA-Moleküle (2.5-kb-lang), die den 5'- und 3'-Enden des HCoV-229E-Genoms entsprechen. Das Laufverhalten der mit dem Protein gebundenen bzw. nichtgebundenen Nukleinsäuren sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Abschnitt A. DNA-Bindungsaktivität von HCoV-nsp13 im Vergleich mit BSA. Spuren: 1 und 4, DNA8 in Abwesenheit des Enzyms; 3, Inkubation mit 30 nM HCoV-nsp13; 4, Inkubation mit 100 nM HCoV-nsp13; 5, Inkubation mit 1000 nM BSA.

Abschnitt B. dsRNA- und ssRNA-Bindungsaktivitäten von HCoV-nsp13. Spuren: 1, 6, 11 und 14, RNA-Moleküle in Abwesenheit des Enzyms; 2 bis 5, 7 bis 10, 12, 13, 15 und 16, Inkubation der RNA-Moleküle mit den oben angegebenen Konzentrationen von HCoV-nsp13.

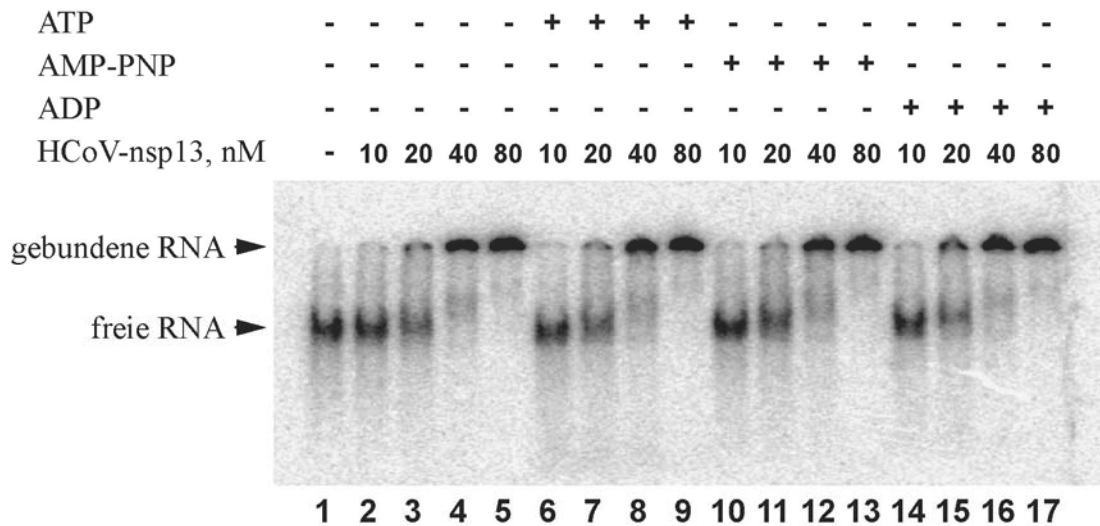


Abbildung 4.08 Einfluss von Nucleotiden auf die Nucleinsäurebindungsaktivität von HCoV-nsp13.

Die Abbildung zeigt eine Autoradiographie einer elektrophoretischen Trennung von 5'-[³²P]-markierter 600-nt-langer RNA12 (siehe Abschnitt 3.14.1), die mit unterschiedlichen Konzentrationen von HCoV-nsp13 in Abwesenheit von Nucleotiden (Spuren 2-5) und in Anwesenheit von ATP (Spuren 6-9), AMP-PNP (Spuren 10-13) oder ADP (Spuren 14-17) inkubiert wurde. Das Laufverhalten der freien bzw. proteingebundenen RNA ist auf der linken Seite angegeben. Spuren: 1, RNA12 (3 nM) ohne Protein; 2, 6, 10 und 14, Inkubation der RNA (3 nM) mit 10 nM HCoV-nsp13; 3, 7, 11 und 15, Inkubation der RNA (3 nM) mit 20 nM HCoV-nsp13; 4, 8, 12 und 16, Inkubation der RNA (3 nM) mit 40 nM HCoV-nsp13; 5, 9, 13 und 17, Inkubation der RNA (3 nM) mit 80 nM HCoV-nsp13.

S-CoV-nsp13	-	-	+	+
S-CoV-nsp13_KA	-	+	-	-
Poly(U)	-	-	-	+

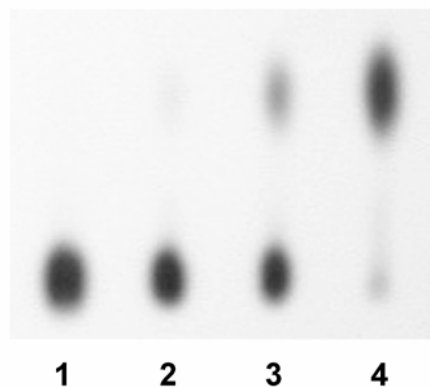


Abbildung 4.09 Analyse der ATPase-Aktivität von S-CoV-nsp13.

Die Abbildung zeigt die Autoradiographie einer dünnschichtchromatographischen Trennung der Reaktionsprodukte. 5'-α-[³²P]-markiertes ATP (10 μM, 0.8 Ci/mmol) wurde mit 0.5 μM S-CoV-nsp13 oder S-CoV-nsp13_KA inkubiert. Spuren: 1, ATP im Reaktionspuffer ohne Enzym; 2, Inkubation mit S-CoV-nsp13_KA; 3, Inkubation mit S-CoV-nsp13 in Abwesenheit von Poly(U); 4, Inkubation mit S-CoV-nsp13 in Anwesenheit von 0.4 μM poly(U).

Bindung zwischen dem γ - und β -Phosphat des ATP hinweist. Die Aktivität wurde durch Anwesenheit von Poly(U)-Molekülen deutlich verstärkt, was auf eine aktivitätssteigernde Konformationsänderung im Molekül infolge der NA-Bindung hinweist. Das Kontrollprotein, SARS-nsp13_KA, zeigt (wie erwartet) keine erkennbare NTPase-Aktivität.

Um die Spezifität coronaviraler Helikasen gegenüber bestimmten NTP-Kofaktoren zu bestimmen, wurden die Bindungsaffinitäten (K_m ; Tabellen 4.02 und 4.03) und Hydrolysegeschwindigkeiten (k_{cat} ; Tabellen 4.02 und 4.03) der beiden Helikasen, SCoV-nsp13 und HCoV-nsp13, gegenüber verschiedenen NTP-Molekülen miteinander verglichen. In Abwesenheit von Polynukleotiden zeigten die beiden Enzyme eine vergleichbare katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m) für alle acht Nucleosidtriphosphate (Tabelle 4.02 und 4.03). Die K_m -Werte lagen für alle acht (d)NTPs im mikromolaren Bereich. Es zeigte sich jedoch eine leichte Präferenz von SCoV-nsp13 und HCoV-nsp13 für ATP, GTP und dATP. Der Vergleich der NTPase-Aktivität von HCoV-nsp13 in Ab- und Anwesenheit von Poly(U) (Tabelle 4.03) zeigte, dass, trotz ungefähr 100-facher Erhöhung der Hydrolysegeschwindigkeit, die katalytische Effizienz nur etwa 3-fach verstärkt wurde. Diese Daten sprechen dafür, dass die signifikante Hydrolysebeschleunigung infolge der Polynukleotidbindung des Enzyms mit einer Verringerung der NTP-Bindungsaffinität einhergeht.

4.4 Charakterisierung der Duplex-Entwindungsaktivität der Helikasen

4.4.1 Entwindungspolarität und Substratspezifität von SCoV-nsp13

Fast alle Helikasen benötigen für ihre Duplex-Entwindungsaktivität ein Nucleinsäuresubstrat, das einen Bereich einzelsträngiger RNA bzw. DNA am 3'- oder 5'-Ende ihres ansonsten doppelsträngigen RNA- bzw. DNA-Substrates besitzt. In diesem Bereich erfolgt dann die initiale Bindung des Proteins an das Substrat. Anschließend bewegt sich das Protein in einer 3'-5'- oder 5'-3'-Richtung entlang des anfänglich gebundenen Nucleinsäurestranges. Die Abhängigkeit einer Helikase von einem bestimmten (3'- oder 5'-) Überhang am partiell doppelsträngigen NA-Substrat gibt Auskunft darüber, ob diese Helikase sich in 3'-5'- oder 5'-3'-Richtung entlang des gebundenen Einzelstranges bewegt: 3'-5'-Helikasen benötigen ein ungepaartes 3'-Ende für die Bindung und Initiation der Entwindungsreaktion, während 5'-3'-Helikasen ein ungepaartes 5'-Ende für die Bindung und Initiation der Entwindungsreaktion

Nukleotid	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat} / K_m ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
ATP	1.23 ± 0.12	2.3 ± 0.2	1.87
UTP	3.40 ± 0.07	1.5 ± 0.3	0.44
GTP	0.82 ± 0.05	1.5 ± 0.2	1.83
CTP	1.37 ± 0.05	1.3 ± 0.3	0.95
dATP	1.14 ± 0.04	1.5 ± 0.1	1.32
dTTP	3.01 ± 0.70	0.6 ± 0.1	0.20
dGTP	0.88 ± 0.12	0.6 ± 0.1	0.68
dCTP	2.86 ± 0.45	0.9 ± 0.1	0.31

Tabelle 4.02 Analyse der Substratspezifität der NTPase-Aktivität von SCoV-nsp13.

Die Bestimmung der kinetischen Konstanten erfolgte nach Hofstee et al. (1959) wie im Abschnitt 3.17.1 beschrieben. Die Standardreaktion enthielt 10 nM Enzym und (d)NTP in unterschiedlichen Konzentrationen (von 0.5 bis 10 μM).

Nukleotid [\pm Poly(U)]	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat} / K_m ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
ATP[-]	2.18 ± 0.07	1.85 ± 0.03	0.85
UTP[-]	4.35 ± 0.01	1.31 ± 0.01	0.30
GTP[-]	2.90 ± 0.05	1.67 ± 0.10	0.58
CTP[-]	7.23 ± 0.24	3.08 ± 0.08	0.43
ATP[+]	100 ± 9	215 ± 5	2.15
UTP[+]	188 ± 8	162 ± 2	0.86
GTP[+]	140 ± 5	212 ± 3	1.51
CTP[+]	290 ± 17	213 ± 15	0.73
dATP[-]	1.62 ± 0.01	1.38 ± 0.07	0.85
dTTP[-]	2.11 ± 0.06	0.26 ± 0.01	0.12
dGTP[-]	1.30 ± 0.04	0.59 ± 0.01	0.45
dCTP[-]	7.34 ± 1.90	2.59 ± 0.32	0.35

Tabelle 4.03 Analyse der Substratspezifität der NTPase-Aktivität von HCoV-nsp13.

Die kinetischen Konstanten der (d)NTP-Hydrolyse wurden nach Hofstee et al. (1959), wie im Abschnitt 3.17.1 beschrieben, bestimmt. Die Standardreaktion in Abwesenheit von Poly(U) enthielt 0.7 nM HCoV-nsp13 und (d)NTP in unterschiedlichen Konzentrationen (von 0.5 bis 10 μM). Wenn die Reaktion in Anwesenheit von 100 nM Poly(U) durchgeführt wurde, wurden NTP-Konzentrationen im Bereich von 80 bis 300 μM verwendet.

benötigen. Es wurde deshalb die Fähigkeit von SCoV-nsp13 getestet, partiell doppelsträngige NA-Substrate (mit verschiedenen Überhängen) zu entwinden. Das Enzym wurde mit den entsprechenden Nukleinsäuren in einem Mg^{2+} - und ATP-enthaltenden Puffer (siehe 3.17.3) inkubiert, und die Reaktionsprodukte wurden anschließend in einem SDS-Polyacrylamidgel getrennt. Die Anwesenheit von 0.1%-SDS im Gel unterdrückt die Bindung des Proteins an Nukleinsäure, während doppelsträngige NA-Strukturen unter diesen Bedingungen stabil bleiben. Die Abbildung 4.10 zeigt die Autoradiographie eines repräsentativen Experimentes. Es konnte gezeigt werden, dass die SARS-CoV-Helikase nicht nur dsRNA- (Abbildung 4.10, A) sondern auch dsDNA-Substrate (Abbildung 4.10, B) entwindet. Die DNA-Entwindungsaktivität des Proteins spielt jedoch wahrscheinlich keine biologische Rolle, da Coronaviren ausschließlich im Zytoplasma der infizierten Zelle replizieren. Die vorhandene DNA-Helikase-Aktivität sollte jedoch die Entwicklung einfacher und robuster (DNA-basierter) Testsysteme, wie sie für High-throughput-Ansätze zur Suche nach Enzyminhibitoren wünschenswert sind, erheblich erleichtern, da DNA-Substrate eine deutlich bessere Stabilität besitzen und einfacher synthetisiert werden können. Die Abbildung 4.10 zeigt darüber hinaus, dass nur 5'-Überhang-enthaltende RNA- (Abbildung 4.10, A; Spur 3) und DNA-Moleküle (Abbildung 4.10, B; Spuren 4 und 12) von SCoV-nsp13 entwunden werden können. Diese Daten bestätigen, dass das Enzym seine Substrate in 5'-3'-Richtung entwindet, wie das bereits für einige andere SF1-Helikasen positivsträngiger RNA-Viren beschrieben wurde (Seybert et al., 2000a, b) (siehe 1.2.5).

4.4.2 Duplex-Entwindungseffizienz coronaviraler Helikasen

Die Mehrheit der bisher charakterisierten (+)RNA-viralen RNA-Helikasen zeigen *in vitro* eine sehr niedrige Entwindungsprozessivität. Ausnahmen davon sind das NS3-Protein von HCV, das TGBp1-Protein von PSLV (einem Pflanzenvirus) und nsp10 des Arterivirus PRRSV. In dieser Arbeit wurde die NA-Entwindungseffizienz für SCoV-nsp13 und HCoV-nsp13 untersucht. Es wurden sowohl RNA- als auch DNA-Substrate verwendet. Die verwendeten Substrate besaßen relativ lange doppelsträngige Bereiche (zwischen 100 und 474 bp) und wurden, wie in 3.14 beschrieben, hergestellt. Die Reaktionsprodukte wurden in geeigneten SDS-Polyacrylamid- oder SDS-Agarosegelen aufgetrennt und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht (Abbildungen 4.08 und 4.09). Beide Enzyme zeigten in den Experimenten eine hohe Entwindungseffizienz sowohl mit RNA- (Abbildung 4.11(B), Spur 3; Abbildung 4.12(B), Spur 3) als auch mit DNA-Substraten (Abbildung 4.11(A), Spuren 3, 8, 13 und 18; Abbildung 4.12(B), Spur 3). Die Daten unterstützen eine mögliche Funktion der coronaviralen nsp13-

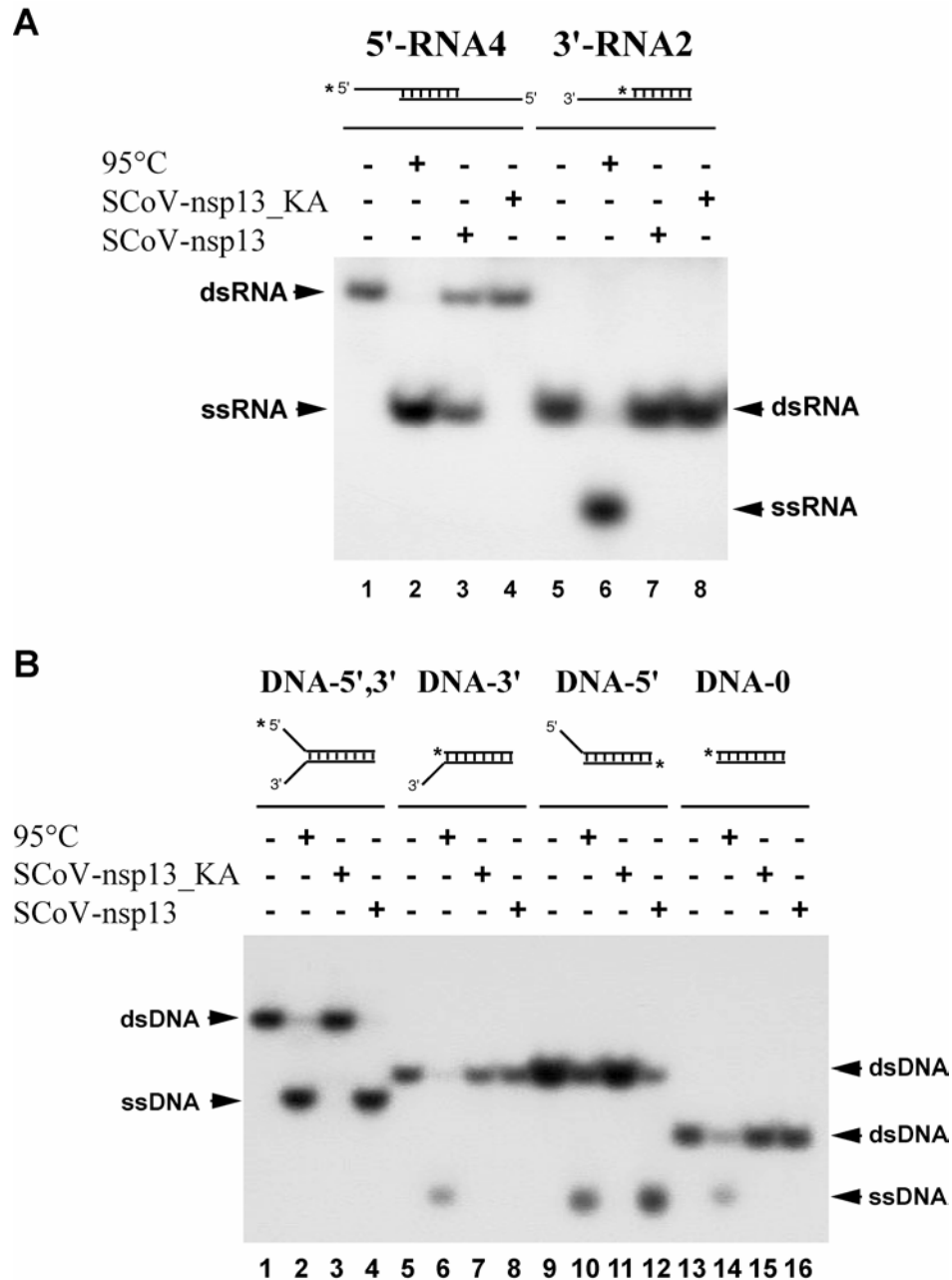


Abbildung 4.10 Polarität der RNA- und DNA-Duplexentwindungsaktivität von SCoV-nsp13.

Die Substratstrukturen sind oben in schematischer Form gezeigt. Der 5'-[³²P]-markierte Strang des Substrats ist mit einem Stern gekennzeichnet. Das Laufverhalten von nichtentwundenen (dsRNA oder dsDNA) bzw. entwundenen (ssRNA oder ssDNA) NA-Molekülen ist mit Pfeilen auf beiden Seiten gekennzeichnet.

Der Abschnitt A zeigt die Autoradiographie einer elektrophoretischen Trennung der RNA-Entwindungsreaktionsprodukte in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel. Spuren: 1 und 5, dsRNA-Substrat ohne Enzym; 2 und 6, hitzedenaturiertes RNA-Substrat; 3 und 7, Reaktion mit SCoV-nsp13; 4 und 8, Reaktion mit SCoV-nsp13_KA.

Der Abschnitt B zeigt die Autoradiographie einer elektrophoretischen Trennung der DNA-Entwindungsreaktionsprodukte. Spuren: 1, 5, 9 und 13, dsDNA-Substrat ohne Enzym; 2, 6, 10 und 14, hitzedenaturiertes DNA-Substrat; 3, 7, 11 und 15, Reaktion mit SCoV-nsp13_KA; 4, 8, 12 und 16, Reaktion mit SCoV-nsp13.

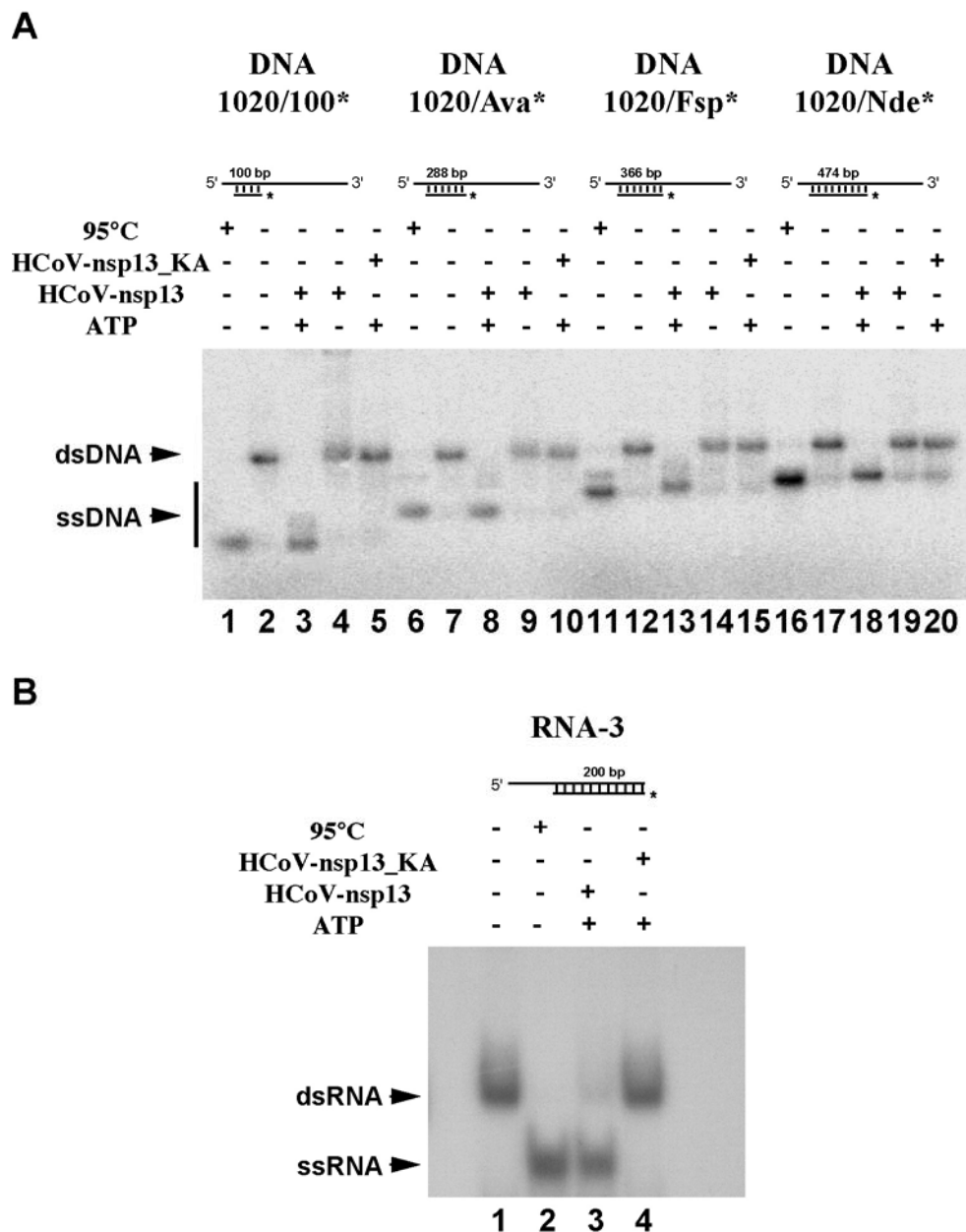


Abbildung 4.11 Effektive Entwindung partiell doppelsträngiger DNA- (A) und RNA-Substrate (B) durch HCoV-nsp13.

Die Substratstrukturen sind schematisch gezeigt. Die radioaktiv markierten Stränge der Substrate sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die Laufverhalten der doppelsträngigen Substrate und einzelsträngigen Reaktionsprodukte sind mit Pfeilen auf der linken Seite gekennzeichnet.

Der Abschnitt A zeigt die Autoradiographie der elektrophoretisch in einem 2%-igem Agarosegel getrennten Produkte der DNA-Entwindung. Spuren: 1, 6, 11 und 16, durch Erhitzen denaturiertes DNA-Substrat; 2, 7, 12 und 17, DNA-Substrat in Reaktionspuffer ohne Enzym; 3, 8, 13 und 18, Reaktion mit HCoV-nsp13 in Anwesenheit von ATP; 4, 9, 14 und 19, Reaktion mit HCoV-nsp13 in Abwesenheit von ATP; 5, 10, 15 und 20, Inkubation mit HCoV-nsp13_KA.

Der Abschnitt B zeigt die Autoradiographie der elektrophoretisch in einem 6%-igem Polyacrylamidgel getrennten Produkte der RNA-Entwindung. Spuren: 1, dsRNA-Substrat in Reaktionspuffer ohne Enzym; 2, durch Erhitzen denaturiertes RNA-Substrat; 3, Reaktion mit wildtypischem HCoV-nsp13; 4, Inkubation mit HCoV-nsp13_KA.

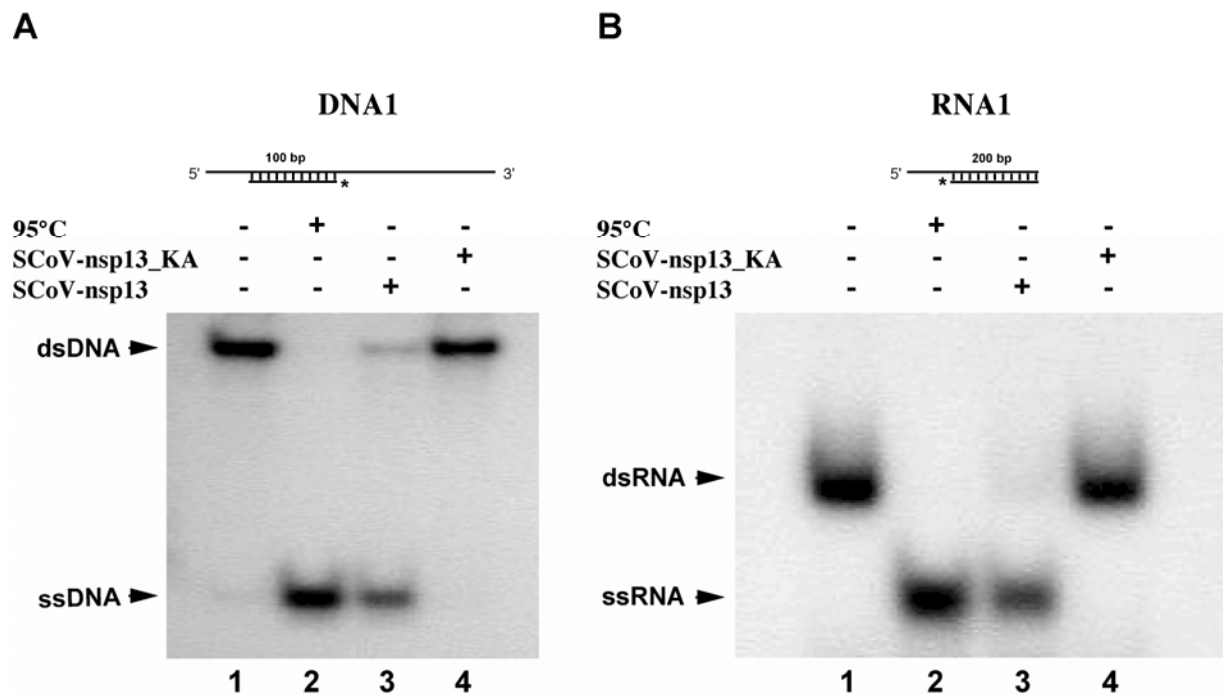


Abbildung 4.12 Effektive Entwindung partiell doppelsträngiger DNA- (A) und RNA-Substrate (B) durch SCoV-nsp13.

Die Substratstrukturen sind oben schematisch gezeigt. [³²P]-markierte Stränge sind mit einem Stern gekennzeichnet. Das Laufverhalten der doppelsträngigen Substrate sowie der einzelsträngigen Reaktionsprodukte ist mit Pfeilen auf der linken Seite gekennzeichnet.

Der Abschnitt A zeigt die Autoradiographie der elektrophoretisch in einem 4,5%-igen Polyacrylamidgel getrennten Produkte der DNA-Entwindung. Der Abschnitt B zeigt die Autoradiographie der elektrophoretisch in einem 5%-igen Polyacrylamidgel getrennten Produkte der RNA-Entwindung. Spuren (in jedem Abschnitt): 1, Inkubation in Reaktionspuffer ohne Enzym; 2, durch Erhitzen denaturiertes Substrat; 3, Reaktion mit wildtypischem SCoV-nsp13; 4, Reaktion mit SCoV-nsp13_KA.

Proteine als „replikative“ Helikasen, d.h., Proteinen, die effektiv doppelsträngige RNA-Strukturen in replikativen Intermediaten trennen können, um eine einzelsträngige Matrize für die RNA-Polymerase bereitzustellen.

4.5 RNA-5'-Triphosphataseaktivität coronaviraler Helikasen

Coronavirale genomische und subgenomische RNA-Moleküle sind am 5'-Ende mit einer Cap-Struktur geschützt (Lai et al., 1982; Lai und Stohlman, 1981). Die zelluläre Cap-Synthese erfolgt in drei Schritten. Das 5'- γ -Phosphat eines neusynthetisierten RNA-Moleküls muss zuerst mit Hilfe einer RNA-5'-Triphosphatase abgespalten werden. Eine Guanylyltransferase überträgt anschließend ein GMP-Molekül in reverser Orientierung an das diphosphorylierte 5'-Ende der RNA. Das Guanin am 5'-Ende wird anschließend an Position methyliert. Die so entstandene Struktur bezeichnet man als Cap-0. Durch weitere Methylierungen an den Ribose-2'-OH-Positionen des ersten bzw. der ersten beiden Nukleotide können sogenannte Cap-1- oder Cap-2-Strukturen entstehen. Die für diesen Prozess benötigten enzymatischen Aktivitäten konnten bisher nicht im Coronavirusgenom identifiziert werden. Daraus wurde geschlossen, dass Coronaviren entweder zelluläre Proteine für das 5'-Capping ihrer RNAs nutzen oder aber, dass andere virale Proteine, die sich funktionell und strukturell von den entsprechenden zellulären Enzymen unterscheiden, diese Aktivitäten übernehmen. Wir prüften in diesem Zusammenhang die Fähigkeit coronaviraler Helikasen, das 5'- γ -Phosphat der RNA zu spalten. Anlass für diese Experimente war die Beobachtung, dass SCoV- und HCoV-nsp13 keine nennenswerte Substratspezifität bei der NTP-Hydrolyse gezeigt hatten. Diese mangelnde Spezifität könnte sich möglicherweise auch auf das 5'-Ende einer RNA erstrecken. Die wildtypischen coronaviralen Helikasen sowie die zugehörigen KA-Mutanten wurden mit 5'- γ -[32 P]-markierten RNA-Molekülen inkubiert, und die erhaltenen Reaktionsprodukte wurden mittels Dünnschichtchromatographie getrennt. Die Abbildung 4.13 zeigt die Autoradiographien der getrennten Produkte von SCoV- und HCoV-nsp13-vermittelten Reaktionen.

Beide wildtypischen Proteine spalteten das 5'-Phosphat vom RNA-Substrat, während die beiden Kontrollproteine (KA-Mutanten) völlig inaktiv waren. Diese Daten bestätigen die RNA-5'-Triphosphataseaktivität des nsp13. Die Tatsache, dass die beiden KA-Proteine völlig inaktiv waren, legen darüber hinaus nahe, dass auch dieses Substrat im aktiven Zentrum der NTPase gebunden und hydrolysiert wird. Diese Hypothese wurde durch weitere Experimente gestützt, die zeigten, dass die Zugabe von ATP, ADP und AMP-PNP die RNA-5'-Triphosphataseaktivität hemmt (Abbildungen 4.14 und 4.15).

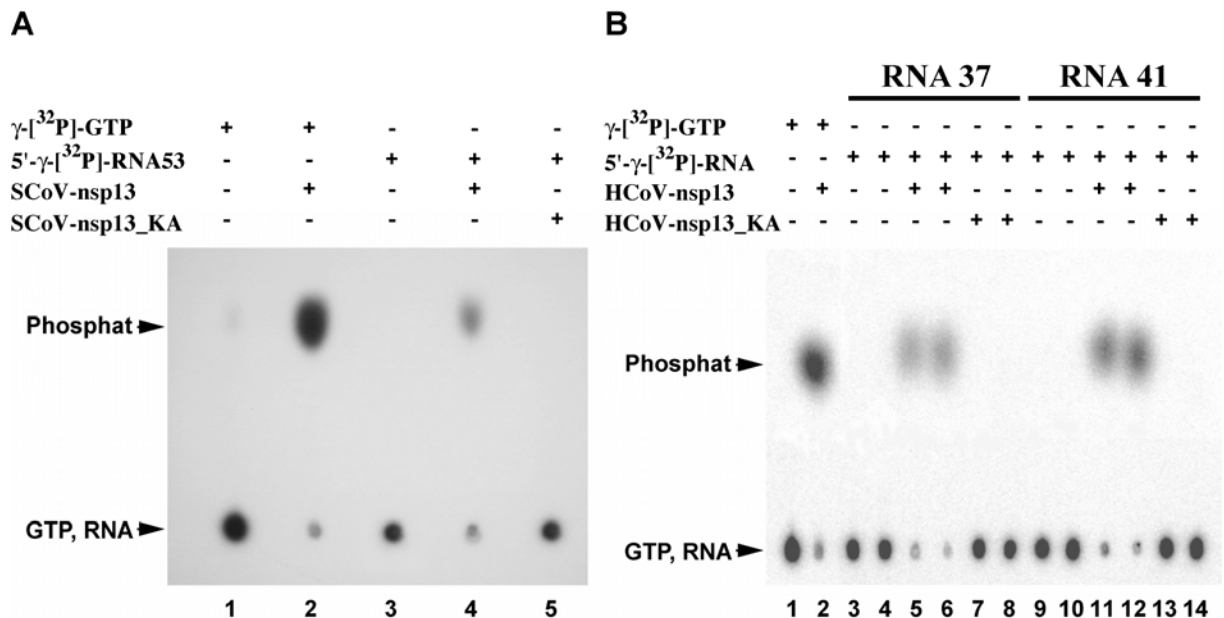


Abbildung 4.13 Analyse der RNA-5'-Triphosphataseaktivitäten coronaviraler Helikasen (SCoV- und HCoV-nsp13) mittels Dünnschichtchromatographie.

Die Abbildung zeigt die Autoradiographie dünn-schichtchromatographisch getrennter Reaktionsprodukte. Als Markerreaktion wurde die Inkubation des Enzyms mit γ - ^{32}P -GTP (Spuren 1 und 2) verwendet. Als Substrat für SCoV-nsp13 (Abschnitt A) diente 5'- γ - ^{32}P -markierte RNA53 (5'-GGGAAAAAAA-3'). Als Substrat für HCoV-nsp13 (Abschnitt B) dienten 5'- γ - ^{32}P -markierte RNA37 (5'-GACUUAAG-3') und RNA41 (5'-GACUUAAGUACC-3').

(A) Spuren: 1, γ - ^{32}P -GTP ohne Protein; 2, Inkubation von γ - ^{32}P -GTP mit SCoV-nsp13 (GTPase-Aktivität); 3, 5'- γ - ^{32}P -RNA53 ohne Protein; 4, Inkubation von 5'- γ - ^{32}P -RNA53 mit SCoV-nsp13; 5, Inkubation von 5'- γ - ^{32}P -RNA53 mit SCoV-nsp13_KA.

(B) Spuren: 1, Inkubation von γ - ^{32}P -GTP in Reaktionspuffer für 60 min ohne Protein; 2, Inkubation von γ - ^{32}P -GTP für 60 min mit HCoV-nsp13 (GTPase-Aktivität); 3 und 4, Inkubation von 5'- γ - ^{32}P -RNA37 in Reaktionspuffer für 30 und 60 min ohne Protein; 5 und 6, Inkubation von 5'- γ - ^{32}P -RNA37 für 30 und 60 min mit HCoV-nsp13; 7 und 8, Inkubation von 5'- γ - ^{32}P -RNA37 für 30 und 60 min mit HCoV-nsp13_KA; 9 und 10, Inkubation von 5'- γ - ^{32}P -RNA41 in Reaktionspuffer für 30 und 60 min ohne Protein; 11 und 12, Inkubation von 5'- γ - ^{32}P -RNA41 für 30 und 60 min mit HCoV-nsp13; 13 und 14, Inkubation von 5'- γ - ^{32}P -RNA41 für 30 und 60 min mit HCoV-nsp13_KA.

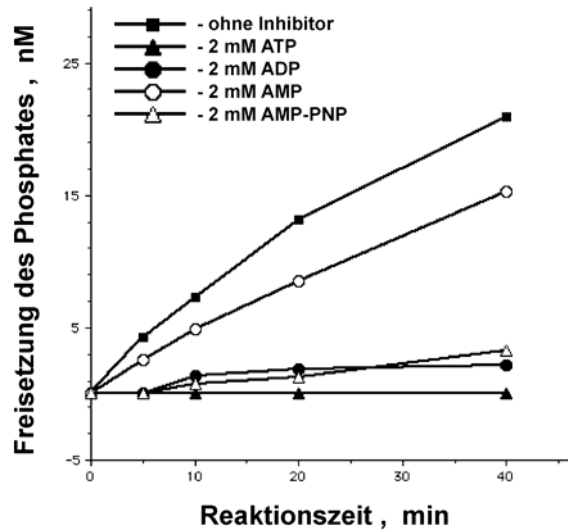


Abbildung 4.14 Einfluss von Nucleotiden auf die RNA-5'-Triphosphataseaktivität der SCoV-nsp13.

Die Abbildung zeigt die zeitabhängige, SCoV-nsp13-vermittelte Freisetzung von $[^{32}\text{P}]$ -Phosphat aus 5'- γ - $[^{32}\text{P}]$ -markierter RNA53 (5'-GGGAAAAAAA-3') in Gegenwart von AMP, ADP, ATP bzw. einem nichthydrolysierbaren ATP-Analogon (AMP-PNP).

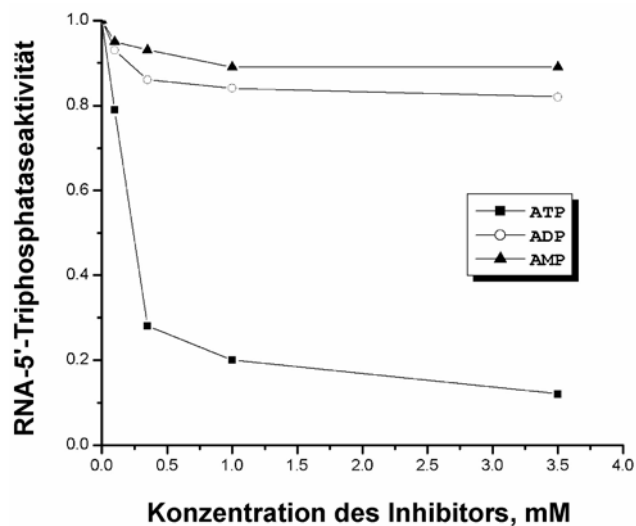


Abbildung 4.15 Inhibitorischer Effekt ansteigender Nucleotidkonzentrationen auf die RNA-5'-Triphosphataseaktivität von HCoV-nsp13.

Die Abbildung zeigt eine graphische Darstellung der inhibitorischen Effekte unterschiedlicher Konzentrationen von AMP, ADP bzw. ATP auf die RNA-5'-Triphosphataseaktivität von HCoV-nsp13. Die enzymatische Aktivität in Abwesenheit der Inhibitoren wurde auf 1.0 gesetzt, und alle anderen Aktivitäten wurden zu diesem Wert ins Verhältnis gesetzt.

Unter den in dieser Dünnschichtchromatographie verwendeten Bedingungen verbleiben die RNA-Moleküle sowie die Nukleotidtriphosphate an der Startposition und können deswegen nicht unterschieden werden. Um die (theoretische) Möglichkeit auszuschließen, dass die RNA-Substrate während der Reaktion degradiert worden waren und das dabei eventuell freigesetzte γ - $[^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ als Substrat für die NTPase-Aktivität der Helikase hätte dienen können, wurden die Reaktionsprodukte auch in einem Polyacrylamidgel getrennt und analysiert (Abbildung 4.16). Die Kinetik der Reaktion bewies zweifelsfrei, dass die Freisetzung des 5'- γ -Phosphates direkt aus der „Volle-Länge-RNA“ erfolgt, da keinerlei kürzere RNA-Intermediate identifiziert wurden, die auf eine Degradation des RNA-Substrates hätten schließen lassen können.

Die Freisetzung des 5'-Phosphates von einem RNA-Molekül, das am 5'-Ende eine Triphosphatgruppe trägt, kann nicht nur mittels einer RNA-5'-Triphosphatase- sondern auch einer allgemeinen 5'-Phosphohydrolaseaktivität erfolgen, die sich nicht auf die γ - β -Phosphatbindung beschränkt, sondern auch die anderen beiden Phosphate hydrolysiert. Um diese Aktivitäten voneinander abzugrenzen, wurden zwei RNA-Substrate produziert, die das radioaktiv markierte 5'-Phosphat in der α - oder γ -Position trugen. Die 5'- γ - und 5'- α - $[^{32}\text{P}]$ -markierten RNA-Moleküle wurden mit SCoV- und HCoV-nsp13 inkubiert, und die Reaktionsprodukte wurden mittels Dünnschichtchromatographie getrennt und autoradiographiert (Abbildung 4.17). Das Fehlen von radioaktiv markierten Hydrolyseprodukten im Falle der α - $[^{32}\text{P}]$ -markierten RNA unterscheidet die RNA-5'-Triphosphataseaktivität der beiden coronaviralen Proteine (Abbildung 4.17, Spuren 2 und 6) von einer allgemeinen Phosphohydrolaseaktivität, wie sie beispielsweise von der aus Kalbsdarm isolierten alkalischen Phosphatase (CIP; englisch: calf intestine phosphatase) vermittelt wird (Abbildung 4.17, Spuren 4 und 8). Es kann geschlossen werden, dass coronavirale Helikasen eine RNA-5'-Triphosphataseaktivität besitzen, die spezifisch für die γ - β -Phosphatbindung des 5'-terminalen Triphosphates ist.

4.6 Enzymatische Aktivität der Nsp15-Proteine

4.6.1 Beschreibung der Proteine

Die nsp15-Proteine befinden sich im C-terminalen Bereich der coronaviralen Replikasepolyproteine und werden, wie auch die oben beschriebenen nsp13-Helikasen, von der ORF1a-kodierten 3C-ähnlichen Protease an flankierenden Q|S,G-Spaltstellen aus dem Polyprotein freigesetzt. Im C-terminalen Bereich von nsp15 befindet sich die sogenannte nidoviruspezifische Domäne, die auch als "genetischer Marker" von Nidoviren bezeichnet wird,

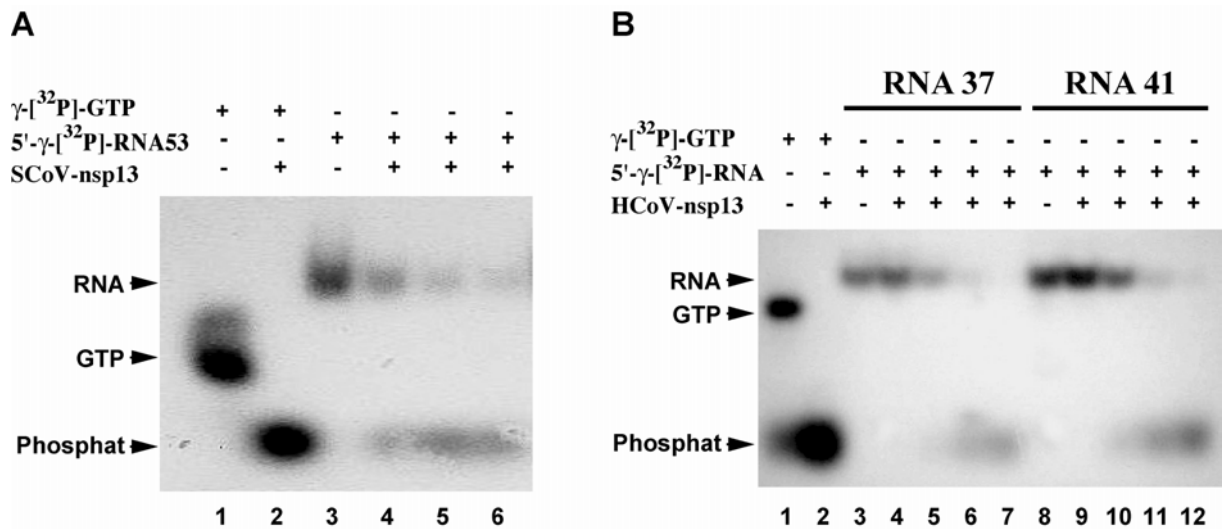


Abbildung 4.16 Elektrophoretische Analyse der RNA-5'-Triphosphataseaktivität von SCoV-nsp13 (A) und HCoV-nsp13 (B).

Die Abbildung zeigt die Autoradiographie elektrophoretisch getrennter Reaktionsprodukte. Als Kontrollreaktion wurde die Inkubation des Enzyms mit γ -[³²P]-GTP (Spuren 1 und 2 in jedem Abschnitt) verwendet. Als Substrat für SCoV-nsp13 (Abschnitt A) diente 5'- γ -[³²P]-markierte RNA53 (5'-GGGAAAAAAAA-3'). Als Substrat für HCoV-nsp13 (Abschnitt B) dienten 5'- γ -[³²P]-markierte RNA37 (5'-GACUUAAG-3'; Spuren 3-7) und RNA41 (5'-GACUUAAGUACC-3'; Spuren 8-12).

(A) Spuren: 1, γ -[³²P]-GTP ohne Protein; 2, Inkubation von γ -[³²P]-GTP mit SCoV-nsp13 (GTPase-Aktivität); 3, 5'- γ -[³²P]-RNA53 ohne Protein; 4, 5 und 6, Inkubation von 5'- γ -[³²P]-RNA53 mit SCoV-nsp13 für 10, 30 bzw. 60 min. (B) Spuren: 1, Inkubation von γ -[³²P]-GTP in Reaktionspuffer für 60 min ohne Protein; 2, Inkubation von γ -[³²P]-GTP für 60 min mit HCoV-nsp13 (GTPase-Aktivität); 3 und 8, Inkubation von 5'- γ -[³²P]-RNA37 und -RNA41 in Reaktionspuffer für 60 min ohne Protein; 4 und 9, Inkubation von 5'- γ -[³²P]-RNA37 und -RNA41 für 5 min mit HCoV-nsp13; 5 und 10, Inkubation von 5'- γ -[³²P]-RNA37 und -RNA41 für 10 min mit HCoV-nsp13; 6 und 11, Inkubation von 5'- γ -[³²P]-RNA37 und -RNA41 für 30 min mit HCoV-nsp13; 7 und 12, Inkubation von 5'- γ -[³²P]-RNA37 und -RNA41 für 60 min mit HCoV-nsp13.

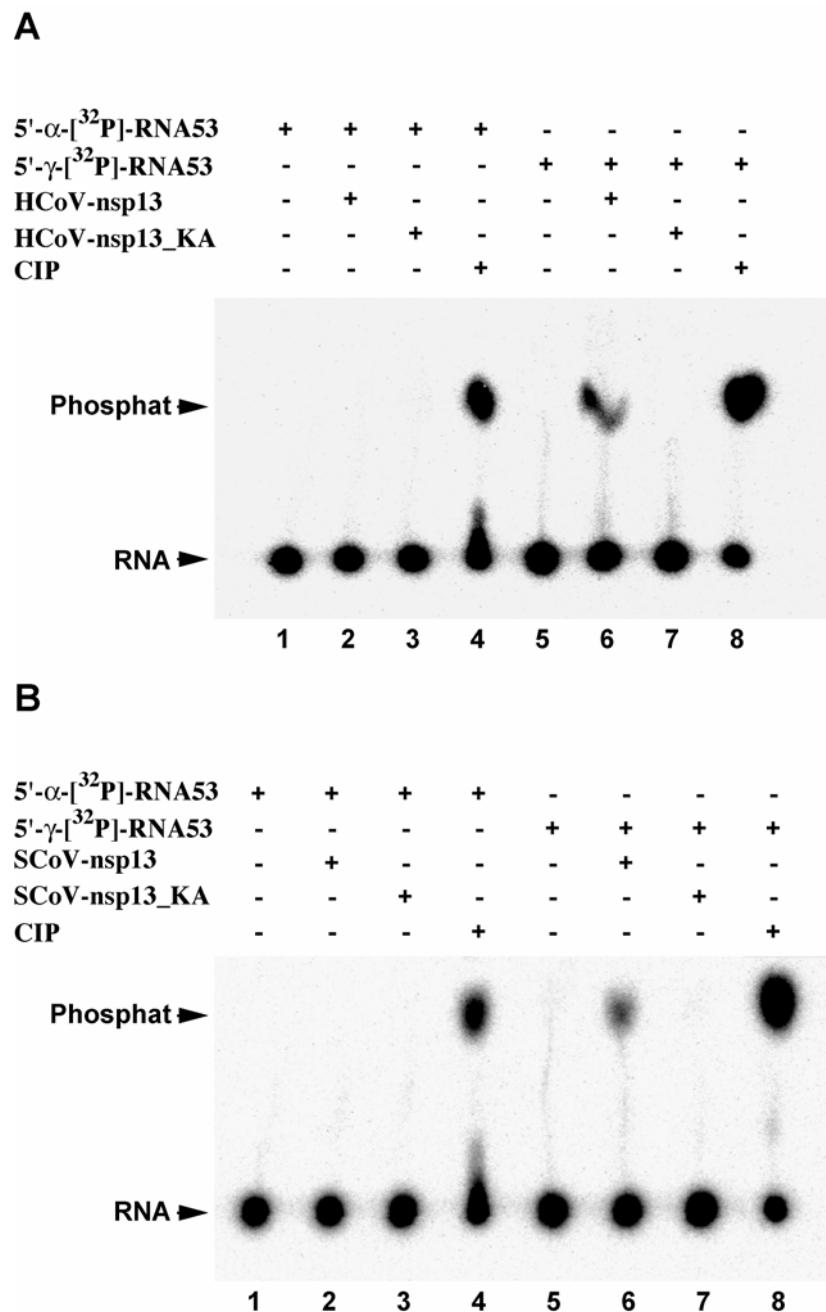


Abbildung 4.17 Freisetzung des Phosphates aus α - bzw. γ -[32 P]-markiertem RNA-Substrat durch HCoV- (A) und SCoV-nsp13-vermittelte (B) RNA-5'-Triphosphataseaktivität.

Die Abbildung zeigt Autoradiographien von mit Hilfe einer Dünnschichtchromatographie getrennten Reaktionsprodukten. Die α - (Spuren 1–4) und γ -[32 P]-markierte (Spuren 5–8) RNA53 wurde mit Helikasen (Spuren 2, 3, 6 und 7) oder CIP (Spuren 4 und 8) inkubiert. Die Laufverhalten der RNA-Substrate und des in der Reaktion freigesetzten Phosphates ist mit Pfeilen auf der linken Seite markiert. Spuren (in jedem Abschnitt): 1 und 5, RNA 53 in Reaktionspuffer ohne Protein; 2 und 6, Inkubation mit wildtypischem HCoV- (Abschnitt A) oder SCoV-nsp13 (Abschnitt B); 3 und 7, Inkubation mit HCoV- (Abschnitt A) oder SCoV-nsp13_KA (Abschnitt B); 4 und 8, Kontrollreaktion mit CIP.

da sie bei allen Nidoviren (jedoch keinem anderen Virus) konserviert ist. Wie bereits in der Einleitung dargestellt, ist die nidoviruspezifische Domäne verwandt mit einer erst vor kurzem charakterisierten poly(U)-spezifischen RNA-Endonuklease aus *Xenopus laevis*, die als XendoU bezeichnet wird (Laneve et al., 2003; Snijder et al., 2003). Bakteriell exprimierte Formen des nsp15 der beiden humanen Coronaviren HCoV-229E und SARS-CoV wurden verwendet, um die Aktivitäten der nidoviruspezifischen Domäne in Coronaviren zu untersuchen. Neben den wildtypischen Sequenzen wurden wiederum Proteine mit spezifischen Aminosäuresubstitutionen exprimiert, die bereits weiter oben beschrieben wurden (Tabelle 4.01 und Abschnitt 4.1.5). Nach Freisetzung der Proteine durch die virale 3C-ähnliche Protease umfaßt das HCoV-229E-nsp15 348 Aminosäurereste (pp1ab Gly6111 bis Gln6458), während das SARS-CoV-nsp15 346 Reste umfaßt (pp1ab Ser6430 bis Gln6775). Details zu den in dieser Arbeit substituierten, konservierten Aminosäuren in den nsp15-Proteinen von HCoV-229E und SARS-CoV können aus der Abbildung 4.18 entnommen werden.

4.6.2 Bestätigung der Nukleaseaktivität

Um die Nukleaseaktivität von SARS-CoV- und HCoV-nsp15 nachzuweisen, wurden die Proteine mit unterschiedlichen einzel- und doppelsträngigen NA-Substraten in einem Mn^{2+} -haltigen Puffer (Puffer-XE) inkubiert. Die elektrophoretische Analyse der Reaktionsprodukte ist in der Abbildung 4.19 gezeigt. Beide Enzyme hydrolysierten sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige RNA-Substrate (Spuren 3, 5, 8 und 10). Es wurde hingegen keine entsprechende RNA-Hydrolyse in Reaktionen mit Kontrollproteinen beobachtet, bei denen konservierte Histidinreste substituiert worden waren: HCoV-nsp15_mut (His-6360-Ala, Abbildung 4.14) und SCoV-nsp15_mut (His-6678-Ala, Abbildung 4.18) (Abbildung 4.19, Spuren 2, 4, 7 und 9). Diese beiden Proteine wurden auch in allen weiteren Experimenten als Negativkontrollen verwendet. DNA-Substrate wurden von den wildtypischen nsp15-Proteinen nicht hydrolysiert (Abbildung 4.19, Spuren 11-20). Interessanterweise wurden dsRNA-Substrate deutlich effizienter und spezifischer gespalten als die entsprechenden ssRNA-Substrate mit gleicher Sequenz. Zusammengefasst bestätigen die Daten zeifelsfrei die Nukleaseaktivität der coronaviralen nsp15-Proteine, und die Präferenz für doppelsträngige gegenüber einzelsträngigen Substraten läßt vermuten, dass die biologisch relevanten Substrate wahrscheinlich doppelsträngig sind.

A

```

HCoV-nsp15:MBP-GLENIAFNVVNKGSGFVGADGELPVAISGDKVFVRDGNLDFVFNKTSLEPTNIAFELFAK 60
SCoV-nsp15:MBP-SLENVAYNVVNKGHFDGHAGEAPVSIINNAVYTKVDGIDVEIFENKTTLPVNVAFELWAK

HCoV-nsp15:      *      *      *      *      *      120
RKVGLTPPLSILKNLGVVATYKFVLWDYEAERPLTSFTKSVCGYTDFAEDVCTCYDNSIQ
SCoV-nsp15:      *      *      *      *      *
RNIKPVPEIKILNNLGVDIAANTVIWDYKREAPAHVSTIGVCTMTDIAKKPTESACSSLT

HCoV-nsp15:      *      *      *      *      *      180
GSYERFTLSTNAVLFSATAVKTGGKSLPAIKLNFNGMLNGNAIATVKSEDGNIKNINWVY
SCoV-nsp15:      *      *      *      *      *
VLFDRVVEGQVDLFRNARNGLVITEGSVKGLTPSKGPAQASVNGVTLIGESVKTQFNFK

HCoV-nsp15:      *      *      *      *      *      240
VRKDGKVPVDHYDGFYTGQRNLQDFLPRSTMEEDFLNMDIGVFIQKYGLEDFNFEHVYVYGD
SCoV-nsp15:      *      *      *      *      *
KVDGIIQQLPETYFTQSRDLEDFKPRSQMETDFLELAMDEFIQRYKLEGYAFEHIVYVYGD

HCoV-nsp15:      *      *      *      *      *      300
VSKTTLGGLHLLISQVRLSKMGILKAEFVAASDITLKCCTVTYLNDPSSKTVCTYMDLL
SCoV-nsp15:      *      *      *      *      *
SHGQLGGLHLMIGLAKRSQDSPLKLEDFIPMDSTVKNYFITDAQTGSSKCVCSVIDLLLD

HCoV-nsp15:      *      *      *      *
LDDFVSVLKSLLDLTVVSKVHEVIIDNKPRWMLWCKDNAVATFYPQLQ : 348
SCoV-nsp15:      *      *      *      *
DFVEI IKSQDLSVISKVVKVTIDYAEISFMLWCKDGHVETFPYKQLQ : 346

```

B

```

Xlaev      XendoU : GFEHV FVGESKRGQEMMGLHNWVQFYLQEKRNID : 193
HCoV-229E nsp15 : NFEHV VYGDVSK-TTLGGLHLLISQVRLSKMGILK : 6375
SARS-CoV  nsp15 : AFEHIVYGD FSH-GQLGGLHLMIGLAKRSQ-DSPL : 6692
           ▲                               ▲

Xlaev      XendoU : YKGYVARQNKSRPDEDDQVLNLQFNWKEMVKPVGS : 228
HCoV-229E nsp15 : AEEFVAAS-----DITLKCCTVTYLNDPSSKTVCT : 6405
SARS-CoV  nsp15 : KLEDFIPM-----DSTVKNYFITDAQTGSSKCVCS : 6722
           ▲                               ▲

Xlaev      XendoU : ----- : -
HCoV-229E nsp15 : YMDLLLDDFVSVLKSLLDLTVVSKVHEVIID : 6435
SARS-CoV  nsp15 : VIDLLLDDFVEI IKSQDLSVISKVVKVTID : 6752
           ▲                               ▲

```

Abbildung 4.18 Die in der Arbeit untersuchten putativen Endonukleasen, HCoV- und SCoV-nsp15.

Der Abschnitt A zeigt die klonierten Aminosäuresequenzen aus HCoV-229E- (348 Aminosäuren) und SARS-CoV-pplab (346 Aminosäuren), die als Fusionen mit Maltose-bindendem Protein (MBP) exprimiert und affinitätschromatographisch gereinigt wurden.

Der Abschnitt B zeigt einen Sequenzvergleich des C-terminalen Bereiches von HCoV- und SCoV-nsp15 mit einem zellulären Homolog, dem XendoU-Protein aus *Xenopus laevis*. Die Aminosäurenummerierung der coronaviralen Proteine entspricht ihren Positionen im viralen Polyprotein-1ab. Die sowohl in XendoU als auch in den nsp15-Proteinen konservierten Aminosäuren sind grün unterlegt. Partiiell konservierte Aminosäuren sind gelb unterlegt. Aminosäurereste, die in dieser Arbeit durch Alanin ersetzt wurden, sind mit Pfeilen gekennzeichnet (schwarz – HCoV-229E, weiss – SARS-CoV).

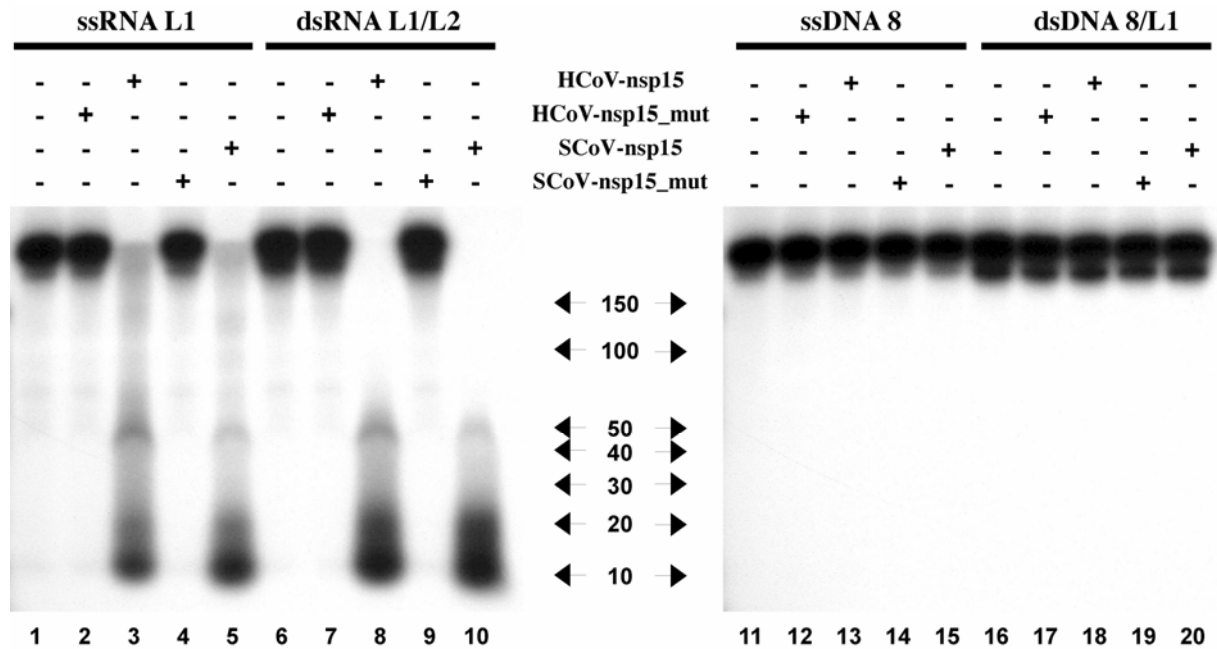


Abbildung 4.19 RNA-Spezifität der HCoV- und SCoV-nsp15-vermittelten Nukleaseaktivität.

RNA- (Spuren 1-10) und DNA-Substrate (Spuren 11-20) wurden mit wildtypischen und mutierten Formen von HCoV- bzw. SCoV-nsp15 inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden anschließend in einem 8%-igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und autoradiographiert. Die Positionen von Marker-RNAs sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die verwendeten NA-Substrate, einzelsträngige RNA L1 (Spuren 1-5), doppelsträngige RNA L1/L2 (Spuren 6-10), einzelsträngige DNA 8 (Spuren 11-15) und doppelsträngige DNA 8/L1 (Spuren 16-20), sind 1 kb (kbp) lang und entsprechen dem 5'-Bereich des HCoV-229E-Genoms. Spuren: 1, 6, 11 und 20, Inkubation in Reaktionspuffer ohne Protein; 2, 7, 12 und 17, Inkubation mit HCoV-nsp15_mut; 3, 8, 13 und 18, Inkubation mit wildtypischem HCoV-nsp15; 4, 9, 14 und 19, Inkubation mit SCoV-nsp15_mut; 5, 10, 15 und 20, Inkubation mit wildtypischem SCoV-nsp15.

4.6.3 Metallionen-Abhängigkeit der RNA-Nukleaseaktivität

Das eukaryotische Homolog des coronaviralen nsp15-Proteins, XendoU, hatte eine ungewöhnliche Mn^{2+} -Abhängigkeit seiner Nukleaseaktivität gezeigt. Wir verglichen daher die Effizienz der RNA-Hydrolyse durch SARS-CoV- und HCoV-nsp15 in Abhängigkeit von verschiedenen Me^{2+} -Ionen. Die Abbildung 4.20 zeigt die Trennung der Reaktionsprodukte der RNA-Inkubation mit SARS-CoV-nsp15 in einem denaturierenden Polyacrylamidgel. Die Daten (Abbildung 4.20) zeigen, dass Mn^{2+} -Ion der beste Kofaktor der nsp15-vermittelten Nukleaseaktivität ist (Abbildung 4.20, Spuren 1-3). Auch in Anwesenheit von Mg^{2+} - (Abbildung 4.20, Spuren 4-6) und Ca^{2+} -Ionen (Abbildung 4.20, Spuren 7-9) konnte Nukleaseaktivität nachgewiesen werden, die jedoch deutlich geringer war als in Gegenwart von Mn^{2+} -Ionen. Die beobachtete Mn^{2+} -Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität coronaviraler nsp15-Endoribonukleasen unterstützt die Vermutung, dass diese coronaviralen Proteine und die XendoU-Nuklease von *Xenopus laevis* der gleichen Proteinfamilie angehören.

4.6.4 Sequenzspezifität der RNA-Hydrolyse

Die Inkubation von SCoV-nsp15 und HCoV-nsp15 mit unterschiedlichen *in vitro*-transkribierten RNA-Molekülen (Daten nicht gezeigt) führte uns zu dem Schluss, dass Uridylat-enthaltende RNAs, genauso wie im Fall des XendoU-Homologs, die besten Substrate darstellten. Die nsp15-Enzyme zeigten aber (im Gegensatz zum XendoU-Protein) keine klare Präferenz für Poly(U)- oder Oligo(U)-enthaltende Substrate. Darüber hinaus wurden synthetische RNA-Oligonukleotide, die Uridylate in unterschiedlichem Sequenzkontext enthielten, verwendet, so zum Beispiel die 5'-[^{32}P]-markierten RNA2 und RNA3 (Abbildung 4.21(A)). Es stellte sich schließlich heraus, dass die am besten von den nsp15-Proteinen gespalteten Substrate die Sequenz 5'-GU-3' beinhalteten (siehe Abbildung 4.21(A), RNA2, Spuren 6-10). Die Mobilität der 5'-markierten Spaltprodukte wies auf eine Spaltung zwischen Guanidin und Uridin in der RNA2 hin. RNA3, die eine 5'-GUU-3'-Sequenz enthielt, wurde hingegen nicht nur zwischen G und U gespalten, sondern auch (und mit höherer Effizienz) zwischen den beiden U-Resten (Abbildung 4.21(A), Spuren 16-20). Die Hydrolyse von dsRNA-Substraten war wesentlich effektiver und spezifischer (Abbildung 4.21(A), Spuren 6-10, 16-20) als die von ssRNA-Substraten mit gleicher Sequenz. Die weniger ausgeprägte Spezifität zeigte sich vor allem darin, dass die RNA an allen in der Sequenz vorhandenen Uridylat-Resten hydrolysiert wurde

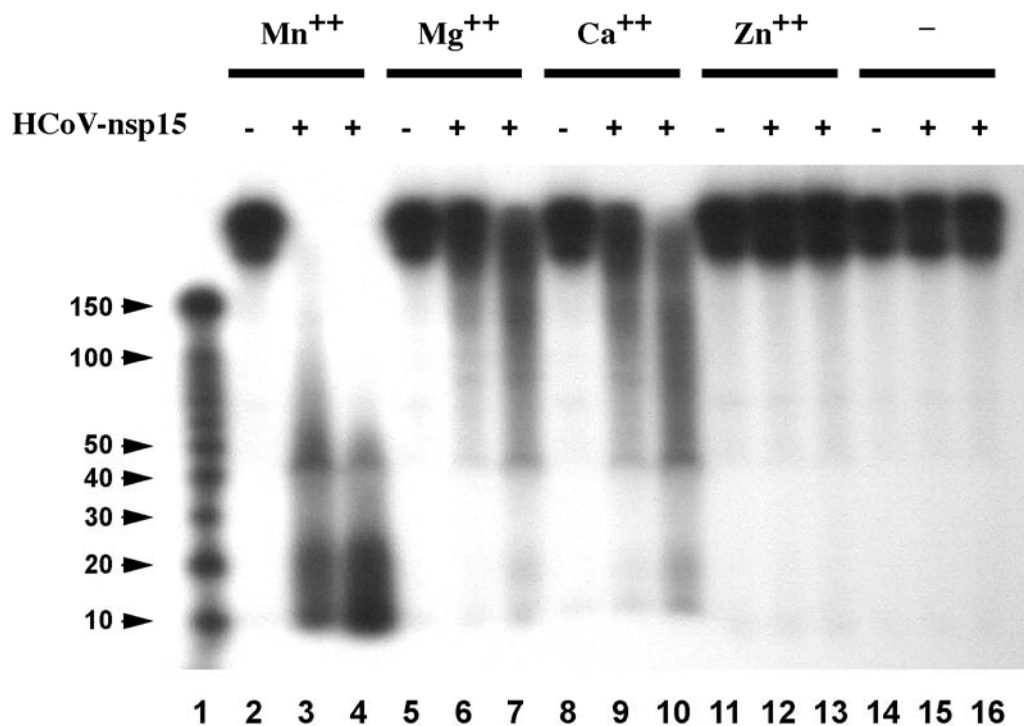


Abbildung 4.20 Abhängigkeit der nsp15-vermittelten Nukleaseaktivität von Metallionen.

Die Abbildung zeigt eine Autoradiographie elektrophoretisch getrennter Reaktionsprodukte. Als Substrat wurde in diesem Experiment die einzelsträngige 1-kb-lange RNA L1 verwendet. Die Größen von Marker-RNAs (Spur 1) sind auf der linken Seite angegeben. Die RNA wurde mit wildtypischem HCoV-nsp15 in Reaktionspuffern inkubiert, die sich lediglich hinsichtlich der darin enthaltenen Me^{2+} -Ionen (oben angegeben) unterschieden. Einer der verwendeten Reaktionspuffer (Spuren 14-16) enthielt keine Me^{2+} -Ionen. Spuren: 1, Marker-RNA; 2, 5, 8, 11 und 14, Inkubation in Reaktionspuffer ohne Protein; 3, 6, 9, 12 und 15, Inkubation für 5 min mit HCoV-nsp15; 4, 7, 10, 13 und 16, Inkubation für 20 min mit HCoV-nsp15.

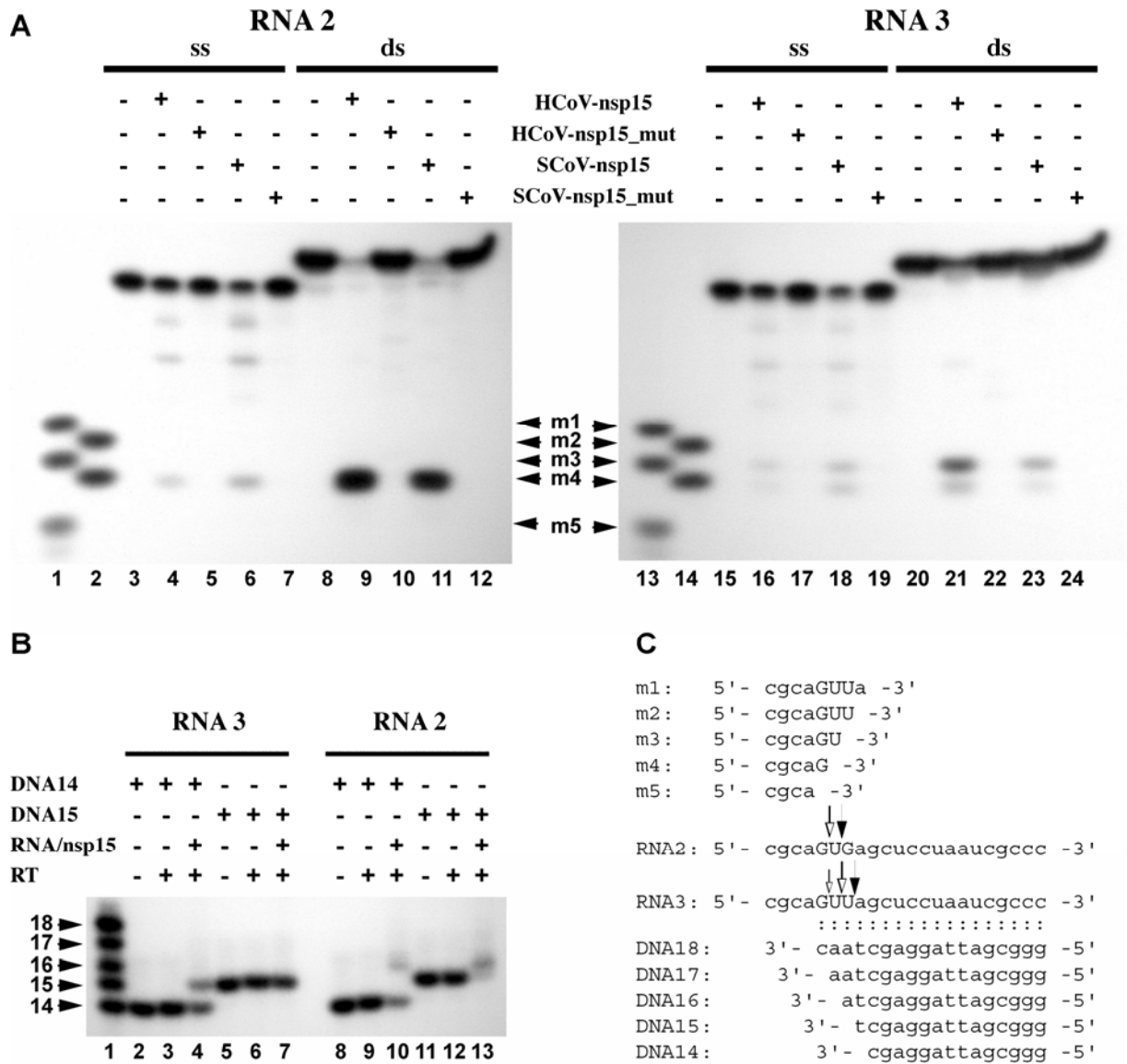


Abbildung 4.21 Substratspezifität coronaviraler Endonukleasen (HCoV- und SCoV-nsp15)
 Der Abschnitt A zeigt Autoradiographien der in denaturierenden 20%-igen Harnstoff-Polyacrylamidgelen getrennten Reaktionsprodukte nach der Inkubation von 5'-[³²P]-markierter ssRNA2 (Spuren 3-7), dsRNA2 (Spuren 8-12), ssRNA3 (Spuren 15-19) und dsRNA3 (Spuren 20-24) mit wildtypischen und mutierten Formen coronaviraler nsp15-Proteine. Als Marker-RNA (Spuren 1, 2, 13 und 14) wurden die 5'-[³²P]-markierten synthetischen Ribooligonukleotide m1-m5 verwendet. Die Sequenzen der im Versuch verwendeten RNA-Moleküle sind im Abschnitt C gezeigt. Spuren: 1 und 13, Marker-RNAs m1, m3 und m5; 2 und 14, Marker-RNAs m2 und m4; 3, 8, 15 und 20, Inkubation von RNA-Substraten ohne Protein; 4, 9, 16 und 21, Inkubation mit wildtypischem HCoV-nsp15; 5, 10, 17 und 22, Inkubation mit HCoV-nsp15_mut; 6, 11, 18 und 23, Inkubation mit wildtypischem SCoV-nsp15; 7, 12, 19 und 24, Inkubation mit SCoV-nsp15_mut.
 Der Abschnitt B zeigt die Autoradiographie eines denaturierenden 20%-igen Harnstoff-Polyacrylamidgels, in dem die Produkte einer reversen Transkription, bei der die 5'-[³²P]-markierten DNAs 14 und 15 als Primer verwendet wurden, aufgetrennt wurden. Die Gel-gereinigten 3'-Produkte der nsp15-vermittelten Spaltung der RNA3 (Spuren 4 und 7) und RNA2 (Spuren 10 und 13) wurden mit DNA14 (Spuren 4 und 10) bzw. DNA15 (Spuren 7 und 13) hybridisiert und anschließend mit reverser Transkriptase (RT) inkubiert. Spuren: 1, 5'-[³²P]-markierte DNAs 14-18, deren Sequenzen im Abschnitt C gezeigt sind; 2 und 8, DNA14 ohne RNA und RT; 3 und 9, DNA14 mit RT ohne RNA-Matrize; 4 und 10, DNA14 mit RT und RNA-Matrize; 5 und 11, DNA15 ohne RNA und RT; 6 und 12, DNA15 mit RT ohne RNA-Matrize; 7 und 13, DNA15 mit RT und RNA-Matrize.

(Abbildung 4.21(A), Spuren 1-5, 11-15), während die dsRNA lediglich an der GU(U)-Sequenz gespalten worden war.

Zur eindeutigen Bestimmung der Spaltstelle wurde eine Primer-Extensions-Analyse des 3'-Spaltproduktes durchgeführt (Abbildung 4.21(B)). Im ersten Schritt dieses Experiments wurden die nichtmarkierten dsRNAs 2 und 3 mit nsp15 in XE-Puffer inkubiert. Anschließend wurde ein Überschuss von 5'-[³²P]-markiertem DNA14- bzw. DNA15-Oligonukleotid, die komplementär zum 3'-Ende der RNA-Substrate waren, mit den Reaktionsprodukten hybridisiert (siehe Abbildung 4.21(C)). Die angelagerten DNA-Primer wurden anschließend mittels reverser Transkriptase verlängert. Die Mobilität der Transkriptionsprodukte im Polyacrylamidgel zeigte, dass nicht nur 5'-terminal (siehe oben), sondern auch 3'-terminal des zweiten bzw. dritten Nukleotids in den Sequenzen 5'-GU-3'- (Abbildung 4.21(B), Spuren 3 und 6) bzw. 5'-GUU-3'- (Abbildung 4.21(B), Spuren 9 und 12) eine sehr effektive Spaltung erfolgt sein musste. Wie erwartet erfolgte in Abwesenheit der RNA-Matrize keine Verlängerung der eingesetzten markierten DNA-Primer (Abbildung 4.21(B), Spuren 2, 5, 8 und 11).

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die bevorzugte Erkennungssequenz von SCoV- und HCoV-nsp15 5'-GU(U)-3' ist und die Spaltung sowohl stromaufwärts (Abbildung 4.21(C), weiße Pfeile) als auch stromabwärts der in diesen Sequenzen enthaltenen U-Reste erfolgt (Abbildung 4.21(C), schwarze Pfeile).

4.6.5 Einfluss spezifischer Aminosäuresubstitutionen auf die Nukleaseaktivität von nsp15

Die Funktion einzelner konservierter Aminosäurereste in der C-terminalen Domäne von nsp15 wurde charakterisiert, indem die *in vitro*-Nukleaseaktivitäten von nsp15-Derivaten mit spezifischen Substitutionen einzelner Reste (Abbildung 4.18) bestimmt wurden. Die jeweiligen Proteine wurden unter den gleichen Bedingungen exprimiert und gereinigt wie das Wildtyp-Protein. Die Abbildung 4.22 zeigt die elektrophoretische Trennung der Reaktionsprodukte in

(zur Abbildung 4.21)

Der Abschnitt C zeigt die Sequenzen der in den Experimenten aus Abschnitt A und B verwendeten RNA- und DNA-Oligonukleotide. Die DNAs 14-18 sind komplementär zum 3'-Bereich der RNAs 2 und 3. Mit schwarzen Pfeilen sind die Spaltpositionen gekennzeichnet, wie sie mit Hilfe der reversen Transkription (*primer extension*) bestimmt worden waren (Abschnitt B). Mit weißen Pfeilen sind die Spaltpositionen bezeichnet, wie sie sich aus der Spaltung von 5'-[³²P]-markierten RNA-Substraten und der Komigration mit Marker-RNAs ergeben hatten (Abschnitt A). Der kleinere weiße Pfeil bedeutet eine niedrigere Effizienz der Spaltung.

einem denaturierenden Polyacrylamidgel. Die Substitutionen von Resten, die sowohl bei XendoU als auch bei allen nidoviralen endoU-Proteinen (nsp15) konserviert sind, führten in allen Fällen zum Verlust der enzymatischen Aktivität (Abbildung 4.22, Spuren 2, 3, 7 und 10). Dazu gehörten: His-6345, His-6360 und Lys-6401 von HCoV-nsp15 sowie His-6678 von SARS-CoV-nsp15 (das dem His-6360 von HCoV-229E entspricht). Auch Substitutionen der beiden bei allen Nidoviren konservierten Reste Asp-6408 und Asp-6435 (im HCoV-229E nsp15) führten zu einem vollständigen Aktivitätsverlust in dem hier verwendeten Test. Die Substitutionen von zwei weiteren Aminosäuren, Ser-6427 und Thr-6405, die weniger stark konserviert sind, führten hingegen nur zu einem relativ geringen Abfall der Aktivität (Abbildung 4.22, Spuren 5 und 6). Diese Daten bestätigen, dass die beobachteten Nukleaseaktivitäten von den bakteriell exprimierten, coronaviralen nsp15-Proteinen vermittelt sein müssen und nicht durch Verunreinigungen mit bakteriellen Nukleasen bedingt sein können. Darüber hinaus lassen sie den Schluss zu, dass die drei in der XendoU/Nidovirus-EndoU-Familie konservierten Aminosäuren, His-6345, His-6360 und Lys-6401 (lt. HCoV-229E-Nummerierung) für die enzymatische Aktivität essentiell sind.

4.6.6 Einfluss von RNA-Methylierungen auf die Nukleaseaktivität

Die Konservierung einer (putativen) 2'-O-Ribose-Methyltransferase-Domäne (MT) in den Replikase-Polyproteinen aller Coronaviren weist auf eine essentielle Rolle von Ribose-Methylierungen innerhalb der viralen Replikation hin. Die Tatsache, dass die MT unmittelbar C-terminal zur Endoribonuklease im Polyprotein gelegen ist, legte die Vermutung nahe, dass die Aktivitäten beider Proteine eng verknüpft sein könnten. Es wurde deshalb die Frage gestellt, ob durch Ribose-2'-O-Methylierungen die Aktivität der Endoribonuklease gegenüber bestimmten Substraten beeinflusst wird. Beide in dieser Arbeit charakterisierten Endonukleasen, HCoV- und SCoV-nsp15, sowie die dazugehörigen Kontrollproteine, HCoV- und SCoV-nsp15_mut (siehe 4.6.2), wurden mit den 5'-[³²P]-markierten dsRNAs 3 bzw. 9 inkubiert. Die beiden markierten RNAs waren jeweils mit einer vollständig komplementären RNA, die nicht markiert war, hybridisiert worden. RNA3 und RNA9 besaßen genau die gleiche Sequenz, unterschieden sich jedoch hinsichtlich des Substituenten an der 2'-Position der Ribose (dsRNA3: 2'-OH, dsRNA9: 2'-O-CH₃). Die Autoradiographie der elektrophoretisch getrennten Reaktionsprodukte ist in der Abbildung 4.23 dargestellt. Im Gegensatz zur dsRNA3 (Spuren 1-5) wurde die dsRNA9 nicht gespalten (Spuren 6-10). Das Ergebnis zeigt, dass die 2'-Hydroxylgruppe für die nsp15-

vermittelte RNA-Hydrolyse essentiell ist. Die Daten befinden sich im Einklang mit der Tatsache, dass DNA (im Gegensatz zu RNA) kein Substrat der coronaviralen Endonuklease ist.

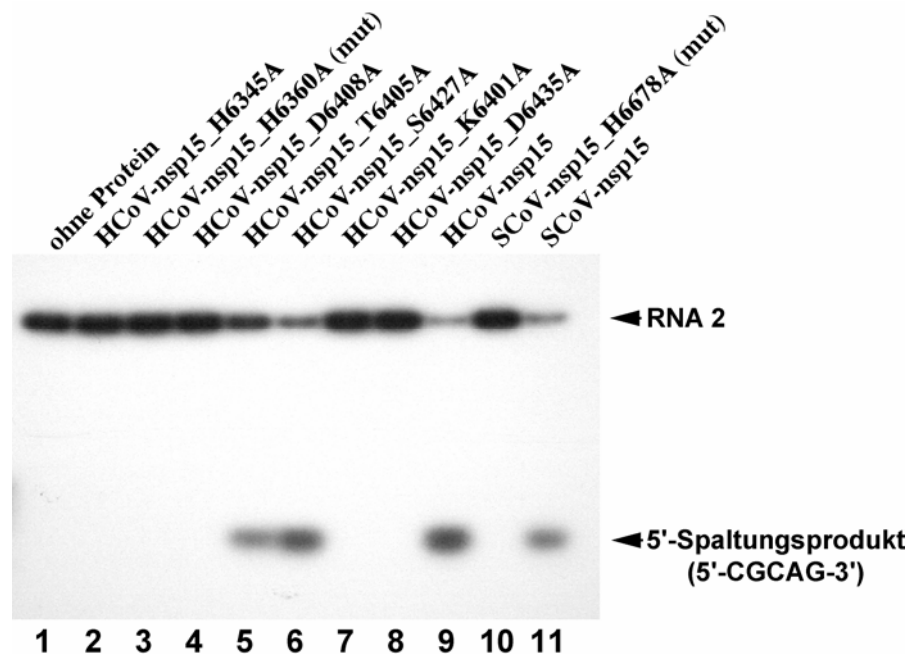


Abbildung 4.22 Einfluss spezifischer Aminosäuresubstitutionen auf die RNA-Endonukleaseaktivität von HCoV- und SCoV-nsp15.

Die Abbildung zeigt die Autoradiographie eines denaturierenden 20%-igen Harnstoff-Polyacrylamidgels. In diesem Gel wurden die Produkte, die nach einer Inkubation der 5'-³²P]-markierten dsRNA2 mit wildtypischen bzw. mutierten Formen von HCoV- (Spuren 2-9) bzw. SCoV-nsp15 (Spuren 10 und 11) entstanden waren, getrennt. Spuren: 1, Inkubation von dsRNA2 in Reaktionspuffer ohne Protein; 2-11, Inkubation von dsRNA2 mit den oben angegebenen Proteinen.

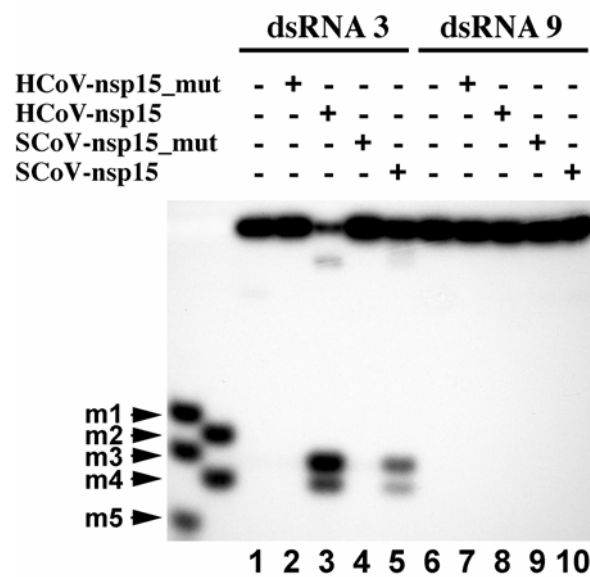


Abbildung 4.23 Einfluss einer RNA-Ribose-2'-O-Methylierung auf die nsp15-vermittelte RNA-Endonukleaseaktivität.

Die Abbildung zeigt die Autoradiographie eines denaturierenden 20%-igen Harnstoff-Polyacrylamidgels. Im Gel wurden die Produkte der 5'-[³²P]-markierten RNA-Substrate dsRNA3 (Spuren 1-5) und 2'-O-methylierte dsRNA9 (Spuren 6-10) nach einer Inkubation mit wildtypischen bzw. mutierten Formen coronaviraler nsp15-Proteine getrennt. Die als Marker verwendeten 5'-[³²P]-markierten Ribooligonukleotide m1-m5 sind auf der linken Seite mit Pfeilen gekennzeichnet. Spuren: 1 und 6, Inkubation der RNA-Substrate in Reaktionspuffer ohne Protein; 2 und 7, Inkubation mit HCoV-nsp15_mut; 3 und 8, Inkubation mit wildtypischem HCoV-nsp15; 4 und 9, Inkubation mit SCoV-nsp15_mut; 5 und 10, Inkubation mit wildtypischem SCoV-nsp15.

4.6.7 Bestimmung des 3'-Endes des 5'-Spaltungsproduktes

Die Analyse des 3'-Endes des 5'-terminalen Spaltungsproduktes erfolgte durch eine T4-RNA-Ligase-Reaktion. Das Enzym katalysiert (in Anwesenheit von ATP) die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen 5'-Monophosphat-enthaltenden RNA-Enden mit 3'-OH-enthaltenden RNA-Enden. Nukleolytische Aktivitäten können prinzipiell drei verschiedene 3'-RNA-Termini generieren: 3'-Hydroxyl, 3'-Phosphat oder 2',3'-Zyklophosphat. Das verwendete 5'-[³²P]-markierte 5',3'-Citidindiphosphat (*pCp) kann also nur dann an das 3'-Ende einer nukleolytisch gespaltenen RNA ligiert werden, wenn diese Spaltung eine freie 3'-OH-Gruppe hinterlassen hat.

Um zu untersuchen, ob die Spaltung zur Bildung einer 3'-OH-Gruppe geführt hat, wurde die dsRNA2 mit HCoV-nsp15 inkubiert. Das 5'-terminale Spaltprodukt wurde anschließend gereinigt (siehe Methoden) und direkt für die Ligationsreaktion mit *pCp eingesetzt. In zwei Parallelansätzen wurde das Spaltprodukt vor dieser Ligationsreaktion entweder mit CIP oder mit PNK behandelt und erst anschließend mit *pCp ligiert. Die Enzyme CIP und PNK unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität: Während PNK sowohl 3'-Phosphat- als auch 2',3'-Zyklophosphat-Gruppen abspaltet, kann CIP nur 3'-Phosphat, jedoch keine 2',3'-Zyklophosphat spalten. Abbildung 4.24 zeigt die Autoradiographie der elektrophoretisch getrennten Ligationsprodukte. Als Kontrollreaktion diente eine Ligation der RNA m4, die eine 3'-OH-Gruppe besitzt, mit *pCp (Abbildung 4.24, Spur 1). Es zeigte sich, dass nur das mit PNK behandelte Spaltprodukt, nicht jedoch das unbehandelte oder CIP-behandelte Spaltprodukt (Abbildung 4.24), mit *pCp ligiert werden konnte. Diese Daten legen nahe, dass die 3'-Enden der 5'-terminalen Spaltprodukte von nsp15-vermittelten Spaltungen eine 2',3'-Zyklophosphat-Gruppe enthalten.

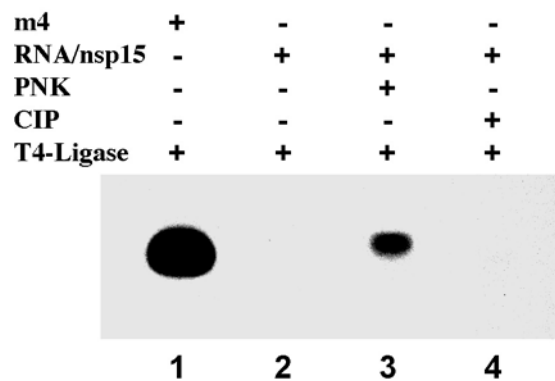


Abbildung 4.24 Ligation des 5'-terminalen Spaltproduktes einer nsp15-vermittelten Nukleolyse mit radioaktiv markiertem pCp.

Die Abbildung zeigt die Autoradiographie eines denaturierenden 20%-igen Harnstoff-Polyacrylamidgels. Im Gel wurden 5'-[³²P]-pCp-Ligationsprodukte getrennt. Als Kontrolle wurde das Produkt einer Ligation des synthetischen Ribooligonukleotids m4 mit pCp analysiert (Spur 1). Spuren 2-4, pCp-Ligation mit dem elektrophoretisch gereinigten 5'-terminalen Produkt der nsp15-vermittelten RNA2-Spaltung ohne weitere Vorbehandlung (Spur 2), nach einer Vorbehandlung mit PNK (Spur 3) bzw. nach einer Vorbehandlung mit CIP. Im Gegensatz zu CIP, die ein Phosphat an der 3'-Position entfernen kann, besitzt PNK die Fähigkeit, sowohl ein 3'-Phosphat als auch ein 2',3'-Zyklophosphat zu entfernen.

5 Diskussion

5.1 Coronavirale Helikasen

Helikasen sind an nahezu allen Prozessen des DNA- und RNA-Metabolismus beteiligt. Ihre vielfältigen Aktivitäten in zellulären Systemen wurden in ausgezeichneten Übersichtsartikeln umfassend diskutiert (siehe z.B. Caruthers und McKay, 2002; Tanner und Linder, 2001). Helikasen sind vor allem auch wichtige Bestandteile von makromolekularen Proteinkomplexen, die (im Rahmen verschiedenster zellulärer Prozesse) die Struktur von Nukleinsäuren modulieren. Die Anwesenheit putativer Helikasen in den Replikationskomplexen fast aller positivsträngigen RNA-Viren und die durch genetische und revers-genetische Daten bewiesene Bedeutung dieser Enzyme für den Replikationszyklus dieser Viren unterstreicht die zentrale Stellung von Helikasen auch im Metabolismus RNA-viraler Genome. Bisher gibt es nur außerordentlich wenige biochemische Studien zu den enzymatischen Aktivitäten und Substratspezifitäten viraler Helikasen, so dass deren genaue Funktion bei der Replikation (und Transkription) von positivsträngigen RNA-Viren nach wie vor relativ wenig verstanden ist. Die vorliegende Arbeit hatte daher zum Ziel, genauere Einblicke in die biochemischen Eigenschaften coronaviraler Helikasen zu gewinnen.

Es wurde bereits früher gezeigt, dass die HCoV-229E-Helikase eine durch unterschiedliche Polynukleotide stimulierte ATPase- und GTPase-Aktivität besitzt und partiell doppelsträngige DNA- und RNA-Substrate in 5'-3'-Richtung entwinden kann (Seybert et al, 2000a; Seybert und Ziebuhr, 2001). Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse ermöglichen eine Verallgemeinerung der früheren Daten, da der Nachweis gelang, dass auch eine Helikase einer anderen Coronavirusgruppe (nämlich der SARS-CoV-Helikase) extrem ähnliche biochemische Eigenschaften besitzt. Die enzymatischen Aktivitäten wurden in dieser Arbeit für beide Proteine umfassend charakterisiert, und eine RNA-5'-Triphosphataseaktivität wurde erstmals für coronavirale Helikasen nachgewiesen.

5.1.1 Proteinexpression

Wir untersuchten in der vorliegenden Arbeit zunächst die beiden typischen enzymatischen Aktivitäten von „echten“, das heißt, duplexentwindenden Helikasen, nämlich die (i) Bindung und Entwindung von Nukleinsäuresubstraten und (ii) die Hydrolyse von Nukleosidtriphosphaten.

Für diese Studie wurden zwei verschiedene coronavirale Proteine genutzt, HCoV- und SARS-CoV-nsp13. Die beiden Proteine wurden in geeigneten Expressionssystemen rekombinant hergestellt. Während HCoV-nsp13 in Insektenzellen mittels baculoviraler Vektoren unter der Kontrolle des starken Polyhedrinpromotors exprimiert wurde, wurde die SARS-CoV-Helikase als Fusionprotein in *Escherichia coli* exprimiert. Das HCoV-229E-Protein zeigte eine deutlich höhere Aktivität als das bakteriell exprimierte SARS-CoV-Protein. Es bleibt zu untersuchen, ob diese Unterschiede auf die Proteine selbst oder aber auf Unterschiede in der posttranslationalen Modifizierung bzw. Unterschieden in der Faltung von His- gegenüber MBP-Fusionsproteinen zurückzuführen sind.

5.1.2 Nukleinsäurebindungsaktivität

Die Untersuchung der Spezifität von HCoV-nsp13 für unterschiedliche NA-Substrate, die hier mit Hilfe der EMSA-Methode (*electrophoretic mobility shift assay*) erfolgte, ergab eine sehr hohe Affinität für alle getesteten Substrate, die im nanomolaren Bereich lag. Solch eine hochaffine NA-Bindung ist typisch für Enzyme, die effektiv und prozessiv mit NA-Substraten interagieren können, wie z.B. Polymerasen oder RPA-Protein (Patrick et al., 2005; Starcevic et al., 2005; Nevinskii, 2004). Überraschenderweise war die NA-Bindungsaffinität der Helikase gleich hoch gegenüber einzel- und doppelsträngigen Substraten, was ungewöhnlich für die allermeisten Helikasen ist. Mit seltenen Ausnahmen, wie zum Beispiel den RecBCD-, SV40-T-Antigen- und RuvB-Proteinen, besitzen die meisten zellulären Helikasen eine deutlich höhere Affinität für ssNA-Substrate als für dsNA-Substrate (Übersicht siehe in Delagoutte und von Hippel, 2002).

Es ist spekuliert worden, dass die für RNA-Viren außergewöhnliche Größe des coronaviralen Genoms besondere Anforderungen an die Präzision der Replikation stellt und auch besondere Strategien für die Expression der zahlreichen, 3'-terminal gelegenen Gene erfordert, wie sie möglicherweise mit der besonderen Art der diskontinuierlichen Transkription Leader-enthaltender subgenomischer mRNAs gegeben ist. Die Besonderheiten der coronaviralen RNA-Synthese korrelieren mit einer für RNA-Viren ungewöhnlichen Komplexität der Replikationsmaschinerie, die neben einigen zellulären Proteinen eine Vielzahl viraler Proteine enthält, von denen einige ausschließlich bei Coronaviren und ihren nächsten Nidovirusverwandten (nicht jedoch bei anderen RNA-Viren) anzutreffen sind. Darüber hinaus haben auch die am besten konservierten Komponenten der Replikase, wie zum Beispiel die virale Helikase (nsp13) und die Hauptprotease strukturelle und biochemische Besonderheiten,

die sie klar von den bei anderen Viren vorhandenen Homologen abgrenzen (Anand et al., 2002, 2003, Ziebuhr 2005).

Zu diesen Unterschieden gehört auch die Anwesenheit einer Zink-bindenden Domäne (ZBD) im N-terminalen Bereich der coronaviralen Helikase (Gorbalenya et al., 1989, Seybert et al., 2005). Zink-bindende Domänen sind relativ häufig bei NA-bindenden Proteinen anzutreffen und normalerweise für die Bindung an andere Proteine oder an Nucleinsäuren verantwortlich (siehe z.B. Hetfeld et al., 2005; Krepiy et al., 2004; Umemura et al., 2004). Die Regel, die aus allgemein akzeptierten Mechanismen der Helikasenwirkung folgt (zum Übersicht siehe Abschnitt 1.2.3), lautet, dass die funktionelle Einheit jeder Helikase mindestens zwei NA-bindende Domänen enthalten muss. Die coronaviralen nsp13-Proteine haben auf diese Weise einen minimalen Satz der Nucleinsäure-bindenden Domänen (ZBD und Helikasenmotive) um als Monomere in dsNA-Entwindung zu wirken. Diese Vermutung wird auch mit in der Arbeit erzeugten Daten über die Unabhängigkeit der NA-Bindungsaktivität von Anwesenheit des Nucleotidtriphosphates unterstützt, weil die Nucleotidtriphosphate für die Helikasen, die als Multimere wirken, als ein Signal zur Multimerisation dienen (Jezewska und Bujalowski, 1996; Hingorani und Patel, 1996) und dadurch ihre NA-Bindungsaktivität deutlich erhöhen.

5.1.3 Nucleosidtriphosphataseaktivität

Die in den RNA- und DNA-Bindungsstudien gewonnenen Daten zeigen, dass coronavirale Helikasen offenbar keine ausgeprägte Spezifität für Ribose (gegenüber Desoxyribose) besitzen. Gleiches gilt auch für den Nucleosidtriphosphat-Kofaktor. Alle acht „gängigen“ Nucleotide, dATP, dTTP, dGTP, dCTP, ATP, UTP, GTP, CTP, wurden von den Helikasen von SARS-CoV und HCoV-229E mit ähnlicher Effizienz hydrolysiert. Solch eine niedrige Spezifität für den Nucleotid-Kofaktor war auch bei einigen anderen Virushelikase-assoziierten NTPase-Aktivitäten beobachtet worden (Bautista et al., 2002; Morgenstern et al., 1997; Warrenner und Collett, 1995). Man kann daher vermuten, dass die mangelnde Spezifität für einen bestimmten Nucleotidkofaktor eine allgemeingültige Besonderheit der von RNA-Viren kodierten Helikasen ist. Die biologische Signifikanz dieser Eigenschaft viraler Helikasen ist gegenwärtig nicht klar. Es könnte jedoch spekuliert werden, dass es ein Nachteil wäre, wenn durch eine hochspezifische NTP-abhängige Helikaseaktivität während der maximalen viralen RNA-Synthese, bei der in der infizierten Zelle ein enormer Bedarf an NTPs besteht, der intrazelluläre Pool eines bestimmten Nucleotids depletiert würde.

5.1.4 RNA/DNA-Duplex-Entwindungsaktivität

In dieser Arbeit konnte eine Duplexentwindungsaktivität auch für das SCoV-nsp13 bestätigt werden. Wie bereits früher für die HCoV-nsp13-Helikase gezeigt, benötigte diese Helikase für die Entwindungsaktivität die Anwesenheit eines 5'-Überhangs an dem ansonsten doppelsträngigen Nukleinsäuresubstrat. Die Helikase bindet offenbar an diesen einzelsträngigen Bereich in einer bestimmten Orientierung und trennt das doppelsträngige Substrat durch eine gezielte Translokation der Helikase in 5'-3'-Richtung.

Beide coronaviralen Helikasen zeigten in dieser Studie eine hohe dsNA-Entwindungsprozessivität, was auf eine mögliche Rolle als „replikative“ Helikase hinweist. Mit anderen Worten, die Helikase könnte für die effektive Trennung von doppelsträngigen replikativen Intermediaten während der Replikation des viralen Genoms verantwortlich sein. Eine ähnlich effektive Entwindung langer doppelsträngiger RNA-Bereiche wurde auch für die arterivirale Helikase aus PRRSV gezeigt (Bautista et al., 2002), und sie kann deshalb als eine allgemeine Eigenschaft nidoviraler Helikasen angesehen werden. Die Helikaseaktivität der coronaviralen nsp13-Proteine kann nicht zwischen RNA und DNA unterscheiden. Duplexe beider Nukleinsäuretypen werden außerordentlich effektiv getrennt. Eine solche Unspezifität zeigte bisher unter den Helikasen positivsträngiger RNA-Viren nur das NS3-Protein von Hepatitis-C-Virus. Auch dieses Enzym agiert mit hoher Prozessivität und entwindet DNA-Substrate sogar besser als RNA-Substrate. Aus diesem Grund wurde spekuliert, dass NS3 auch den DNA-Stoffwechsel der Zelle beeinflussen könnte (Pang et al., 2002). Unsere eigenen Daten zur Lokalisation der nsp13-Helikase in der virusinfizierten Zelle sprechen jedoch eher dafür, dass die beobachtete Aktivität gegenüber doppelsträngiger DNA keine biologische Bedeutung hat. So haben Immunfluoreszenzstudien gezeigt, dass die Helikase von SARS-CoV und MHV ausschließlich an zytoplasmatischen Membranen (nicht jedoch im Kern) der infizierten Zelle zu finden ist (Ivanov et al., 2004b; Denison et al., 1999).

5.1.5 RNA-5'-Triphosphataseaktivität

Neben den beiden typischen Aktivitäten von Helikasen, also (i) NA-Bindung und – Duplexentwindung sowie (ii) NTP-Bindung und -Hydrolyse, wurde von uns eine dritte (RNA-5'-Triphosphatase-) Aktivität entdeckt. Die coronavirale RNA ist mit einer Cap-Struktur am 5'-Ende geschützt (Lai et al., 1982), und die neuentdeckte katalytische Aktivität könnte den ersten

Schritt der RNA-Capping-Reaktion katalysieren. Solch eine RNA-5'-Triphosphataseaktivität ist bisher nicht für Nidovirushelikasen beschrieben worden. Es gibt jedoch Hinweise für diese Aktivität bei einigen anderen RNA-Virus-Helikasen (Wengler und Wengler, 1993; Bisailon und Lemay, 1997; Li et al., 2001; Vasiljeva et al., 2000). Die Beobachtung spricht dafür, dass RNA-Viren, die keine eigene RNA-5'-Triphosphatase kodieren, diese essentielle Aktivität mittels ihrer Helikase gewährleisten. Welche viralen (oder auch zellulären) Proteine hingegen die beiden anderen, für das Capping erforderlichen Guanylyltransferase- und Methyltransferase-Aktivitäten vermitteln, ist gegenwärtig nicht klar. Die Überführung einer Cap0-Struktur in Cap1- oder Cap2-Strukturen könnte durch die 2'-O-Methyltransferase-Aktivität des coronaviralen nsp16 vermittelt werden. Der biochemische Beweis für die vorhergesagte Methyltransferase-Aktivität von nsp16 steht jedoch noch aus.

Die Charakterisierung der nsp13-Aktivitäten von Viren unterschiedlicher genetischer Gruppen von Coronaviren (Gruppe I: HCoV-229E, Gruppe II: SARS-CoV) ergab vergleichbare biochemische Eigenschaften. Daraus lässt sich ableiten, dass, trotz geringer Sequenzidentität, die Schlüsselfunktionen coronaviraler Replikase-Subdomänen konserviert sind.

5.2 Coronavirale nsp15-Endonuklease

Die coronavirale Replikase enthält neben den für die meisten RNA-Viren typischen Enzymen, wie Proteasen (nsp3 und nsp5), RNA-abhängige RNA-Polymerase (nsp12) und Helikase (nsp13), noch mindestens vier weitere, bei allen Coronaviren konservierte Enzyme, die entweder extrem selten oder gar nicht von anderen positivsträngigen RNA-Viren kodiert werden (Snijder et al., 2003). Dazu gehören eine putative ADP-Ribose-1"-Phosphatase (Appr-1"-pase), die Teil des nsp3 ist, sowie drei weitere Proteine aus dem C-terminalen Bereich des pp1ab, für die im Jahre 2003 Exonuklease- (ExoN, nsp14), Endonuklease- (EndoU, nsp15) bzw. Ribose-2'-O-Methyltransferaseaktivitäten (nsp16) vorhergesagt worden sind. Die Funktion der nsp14-16-Proteine im viralen Replikationszyklus sind bisher nicht charakterisiert worden. Die Verwandtschaft dieser Proteine mit (einigen bereits besser charakterisierten) zellulären Homologen legen jedoch Funktionen für die viralen Proteine bei der Prozessierung und Nutzung kleiner viraler (oder zellulärer) RNAs nahe, wie sie für die Prozesse der snoRNA-Synthese und Methylierung ribosomaler RNA in der Zelle beschrieben worden sind.

Der Nachweis und die initiale Charakterisierung der nsp15-vermittelten RNA-Endonukleaseaktivität stellen einen wichtigen Schritt bei der Aufklärung der Enzymologie der coronaviralen RNA-Synthese dar. Auch wenn noch viele Details dieser Aktivität aufzuklären bleiben, sind mit dem hier etablierten nsp15-Expressionssystem in *Escherichia coli* wichtige Voraussetzungen für die umfassende funktionelle und strukturelle Charakterisierung dieser Aktivität geschaffen worden. Die coronavirale Endoribonuklease ist neben dem pestiviralen E^{ms}-Protein (Hausmann et al., 2004) erst die zweite in positivsträngigen RNA-Viren gefundene endoribonukleolytische Aktivität. Das E^{ms}-Protein ist spezifisch für Pestiviren und wurde in den nahe verwandten Hepaci- und Flaviviren nicht gefunden. Offenbar hat dieses Protein eine Funktion in der Pathogenese von Pestiviren, jedoch nicht in der RNA-Replikation selbst. Im Gegensatz dazu ist die coronavirale EndoU-Domäne in allen Familien der Ordnung *Nidovirales* konserviert, und unsere revers-genetischen Daten haben gezeigt, dass die Substitution eines der konservierten nsp15-Reste, Asp-6408, im HCoV-229E-Genom zu einem vollständigen Verlust der viralen RNA-Synthese führt (Ivanov et al., 2004). Da die gleiche Substitution die Endonukleasefunktion in vitro inaktiviert hatte, kann geschlossen werden, dass die nsp15-Aktivität für die coronavirale RNA-Synthese essentiell ist.

Die nsp15-vermittelte Endonukleaseaktivität wurde in dieser Arbeit am Beispiel von zwei Coronaviren, HCoV-229E und SARS-CoV, bestätigt. Die relativ hohe Sequenzähnlichkeit von coronaviralen EndoU-Domänen ließ ähnliche biochemische Eigenschaften für alle coronaviralen nsp15-Proteine vermuten, was durch unsere Experimente bestätigt wurde. Die Daten zeigen darüber hinaus, dass auch eine funktionelle Verwandtschaft mit einem homologen zellulären Protein, dem XendoU-Protein aus *Xenopus laevis*, besteht. So ist all diesen Proteinen gemein, dass sie Mn²⁺-Ion als Kofaktor für ihre Aktivität benötigen. Andere Me²⁺-Ionen unterstützen die Aktivität deutlich schlechter oder gar nicht. Die coronaviralen EndoU-Proteine und das zelluläre XendoU verwenden wahrscheinlich auch eine ähnliche Chemie bei der RNA-Hydrolyse, die in allen Fällen zu Reaktionsprodukten mit 2', 3'-Zyklophosphat-Enden führt. Schließlich ist auch die Substratspezifität ähnlich. Die nsp15-Proteine, genauso wie XendoU, besitzen eine Spezifität für Uridylate in einzelsträngigen RNA-Substraten. Bei ssRNA-Substraten spielte der Sequenzkontext der Uridylate keine wichtige Rolle für die Effizienz der Spaltung durch die coronaviralen nsp15-Enzyme. Doppelsträngige RNA-Substrate wurden von nsp15 deutlich effizienter, aber auch spezifischer gespalten. Diese Daten lassen vermuten (beweisen das jedoch nicht), dass dsRNA-Moleküle möglicherweise die biologisch relevanten Substrate coronaviraler Endoribonukleasen darstellen. Beide nsp15-Proteine (von HCoV-229E und SARS-CoV) hydrolysierten doppelsträngige RNA-Substrate 5'- und 3'-terminal der Uridylat-Reste der 5'-

GUU-3'-Sequenz. Die erhaltenen Daten, insbesondere die Primer-Extensionsexperimente und der Vergleich der 5'-markierten Spaltprodukte mit 5'-markierten Kontroll-RNAs, lassen vermuten, dass das Protein sehr effektiv 3'-terminal des letzten Uridin-Restes der GUU-Sequenz spaltet und nahezu zeitgleich auch 5'-terminal des 3'-terminalen U-Restes spaltet. Die Spaltung am „mittleren“ Rest der GUU-Sequenz erfolgt hingegen weniger effizient. So wurde zwischen den beiden U-Resten bei der dsRNA3-Spaltung deutlich besser gespalten (Abbildung 4.17, a) als zwischen dem G- und U-Rest der GUU-Sequenz. Die Daten wären auch mit der Vorstellung vereinbar, dass der 3'-terminale U-Rest durch zwei gleichzeitige oder extrem kurz aufeinanderfolgende Spaltungen aus der Sequenz exzidiert wird. Eine andere Möglichkeit wäre, dass das Enzym 5'-terminal eines der beiden U-Reste spaltet und die am 5'-Ende des 3'-terminalen Spaltproduktes verbliebenen 1 oder 2 U-Reste dann extrem effektiv entfernt würden.

Da in dieser Studie nur eine begrenzte Auswahl an RNA-Substraten getestet wurde, können noch keine endgültigen Aussagen zur Sequenzspezifität coronaviraler nsp15-Proteine getroffen werden. Auch waren die meisten der in dieser Arbeit verwendeten synthetischen RNA-Substrate relativ kurz (i.d.R. nur 22 Nukleotide). Bei dieser Substratgröße spielt die relative Position der Spaltstelle innerhalb des Substrates (in der Mitte oder nahe am 5'- oder 3'-Ende des Substrates) möglicherweise eine wichtige Rolle, da sie die Substratbindung des Enzyms beeinflussen könnte. Auch wenn die Substratspezifität in weiteren Experimenten noch näher charakterisiert und zusätzlich abgesichert werden muss, ist die hier beschriebene Sequenzspezifität aus folgendem Grund bemerkenswert. Wie bereits im Abschnitt 1.1.2 ausgeführt, ist der Mechanismus der diskontinuierlichen Transkription abhängig von sogenannten TRS-Elementen, die sich stromaufwärts der am 3'-Ende des coronaviralen Genoms gelegenen ORFs befinden. Die Minusstrangsynthese läuft bis zu einer dieser "body"-TRS. Danach wird die neusynthetisierte anti-"body"-TRS von ihrer Matrize (also der "body"-TRS) getrennt und bindet durch komplementäre Basenpaarung an die stromaufwärts gelegene "leader"-TRS. Anschließend wird dann die Antileader-Sequenz angefügt (siehe Abbildung 3.03, Abschnitt B). Im Bereich der TRS-Elemente wurden bisher keine konservierten RNA-Sekundärstrukturen identifiziert, die als Attenuierungssignale der Minusstrangsynthese dienen könnten. Man kann deshalb davon ausgehen, dass die Minusstrangsynthese wahrscheinlich nicht exakt nach dem Kopieren des TRS-Elementes gestoppt wird, sondern dass der wachsende Minusstrang noch um einige Nukleotide verlängert wird, bevor die Synthese abbricht. Wenn dies tatsächlich der Fall wäre, würde (nach der Bindung des Minusstranges an die "leader"-TRS) ein nichtkomplementärer Bereich am 3'-Ende verbleiben, der entfernt werden müsste, bevor die authentische Kopie der "leader"-Sequenz synthetisiert werden kann. An genau diesem Punkt der (diskontinuierlichen)

Minusstrangsynthese könnte die Endonukleaseaktivität von nsp15 ins Spiel kommen. So ist es beispielsweise denkbar, dass die Entfernung der nichtkomplementären Sequenz am 3'-Ende des Minusstrangs durch eine nsp15-vermittelte Spaltung innerhalb der 5'-GUU-3'-Sequenz, die bei allen nidoviralen anti-TRS-Elementen konserviert ist, erfolgt. Weitere Experimente sind, wie oben ausgeführt, erforderlich, um dieses Modell zu stützen und weiterzuentwickeln.

Hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Spaltprodukte mit 3'- oder 5'-Phosphatgruppen herzustellen, unterscheidet man zwei Klassen von Ribonukleasen (RNasen) (siehe Übersicht von Saida et al., 2003). Zu den 3'-RNasen gehören beispielsweise die Familien der Barnase (Mauguen et al., 1982), RNase A (Beintema und Kleineidam, 1998; Zhang 2002), RNasen T1 (Yoshida, 2001) und T2 (Deshpande und Shankar, 2002; Irie und Ohgi, 2001). Die bislang charakterisierten 3'-RNasen wirken als bifunktionelle Säure-Base-Katalysatoren, bei denen die Säurekatalyse immer durch Histidin-Reste und die Basekatalyse durch Histidin- oder Glutamat-Reste vermittelt wird. Unsere Daten bestätigten die Wichtigkeit von Histidin-Resten (H6345 und H6360 in HCoV-nsp15; H6678 in SCoV-nsp15) und einem Aspartat-Rest (D6435 in HCoV-nsp15), der in der Katalyse als Säure dienen könnte, für die nsp15-vermittelte Endonukleaseaktivität. Es wurde jedoch für die Vertreter dieser 3'-RNasen gezeigt, dass sie zwar 2',3'-Zyklophosphat-Produkte herstellen, diese dann aber weiter zum 3'-Phosphat hydrolysieren (Cuchillo et al., 1993). Im Gegensatz dazu wurden von uns nur 2',3'-Zyklophosphat-Produkte der nsp15-vermittelten Hydrolyse nachgewiesen. Das lässt vermuten, dass die coronaviralen EndoU-Enzyme und das eng verwandte zelluläre XendoU-Enzym, für das ebenso kein 3'-Phosphat am Spaltprodukt gefunden wurde (Laneve et al., 2003), einen eigenen, etwas abweichenden Reaktionsmechanismus entwickelt haben.

Die koordinierte Expression von Proteinen, die im gleichen Stoffwechselweg zusammenarbeiten, ist ein wichtiges biologisches Grundprinzip, das in der Zelle durch vielfältige Regulationsmechanismen sichergestellt werden kann. Auch virale Polyproteine bieten die Möglichkeit einer solchen koordinierten Expression, da die einzelnen Proteine Teil des gleichen Vorläuferproteins sind. Häufig sorgen bestimmte Subdomänen für die Verankerung dieser Polyproteine an intrazelluläre Membranen, an denen die einzelnen Subdomänen in räumlich konzentrierter Form zusammenwirken können, während Proteasen, die ebenfalls Teil dieser Multi-Domänen-Proteine sind, die Einzelfunktionen der Subdomänen durch deren zeitlich koordinierte Freisetzung präzise steuern können. Im coronaviralen Replikase-Polyprotein, pp1ab, ist die Endonukleasedomäne (nsp15) von zwei anderen putativen Enzymen (ExoN und MT) flankiert, die Teil der Proteine nsp14 und nsp16 sind und im Verlauf der Infektion durch 3CL^{pro}-

vermittelte Proteolyse von nsp15 getrennt werden (Abbildung 1.04). Die unmittelbar benachbarte Position dieser drei Enzyme im viralen Polyprotein und die mögliche (Fein-) Regulation ihrer Aktivitäten durch 3CL^{pro}-vermittelte Proteolyse unterstützt die Hypothese, dass die drei Aktivitäten eng zusammenwirken bzw. dass ihre Aktivitäten sich gegenseitig modulieren oder regulieren. In diesem Zusammenhang ist deshalb die Beobachtung von besonderem Interesse, dass eine Methylierung an der 2'-O-Position der Ribose die nsp15-Endonukleaseaktivität vollständig blockiert (siehe Abschnitt 4.6.7). Wie bereits im Abschnitt 4.6.8 dargestellt, ist offenbar die Anwesenheit einer 2'-O-Methylgruppe mit der Ausbildung des bei der Hydrolyse entstehenden 2',3'-Zyklophosphates unvereinbar. Es liegt deshalb nahe, zu spekulieren, dass die putative Methyltransferase die Endonukleaseaktivität des nsp15-Proteins reguliert. In Prokaryonten sind Endonukleasen, die 3'-Phosphat- und 2',3'-Zyklophosphat-Spaltungsprodukten generieren, häufig auch am Abbau zellulärer RNAs beteiligt (zusammengefasst in Kennell, 2002). Es kann als sicher gelten, dass die virale RNA-Polymerase (RdRp) RNA-Moleküle mit einem 2',3'-Zyklophosphat (also die Produkte der nsp15-vermittelten Spaltung), nicht für eine Kettenverlängerung verwenden kann. Das Zyklophosphat muss zuerst von einer Phosphotransferase oder -esterase entfernt werden. Die notwendige Entfernung des (gesamten) 3'-terminalen Nukleotides mit seiner 2', 3'-Zyklophosphatgruppe könnte jedoch auch die (putative) coronavirale Exonuklease (ExoN) übernehmen. Solch ein Mechanismus existiert beispielweise auch in Prokaryonten, wo die RNase II die von der Pyd-N-Endonuklease generierten 2', 3'-Zyklophosphat-Spaltprodukte prozessiert (zusammengefasst in Kennell, 2002).

Als Substrate für die genannten ORF1b-kodierten Aktivitäten kommen sowohl virale als auch zelluläre RNAs in Frage. So könnten –neben einer Beteiligung dieser Enzyme an der viralen Replikation und diskontinuierlichen Transkription– auch zelluläre RNAs, insbesondere ribosomale RNAs, als Zielmoleküle in Frage kommen. Diese Vermutung gründet sich vor allem auf die Tatsache, dass zelluläre Homologe dieser drei Proteine, ExoN, EndoU und MT, an der snoRNA-gesteuerten Methylierung ribosomaler RNA beteiligt sind (siehe Abbildung 5.01). Bei diesem Prozess werden zunächst sogenannte snoRNA-Moleküle erzeugt und prozessiert, die mittels komplementärer Basenpaarung an ribosomale RNA binden und damit das Signal zu einer spezifischen rRNA-Methylierung liefern. Alle drei an diesem Prozess beteiligten Proteine sind bei allen Coronaviren konserviert und könnten daher entweder mit zellulären Stoffwechselwegen (zum Nutzen der Virusreplikation) interferieren oder aber ähnliche Mechanismen nutzen, um spezifische virale RNAs zu prozessieren oder zu modifizieren. Zur Überprüfung dieser Hypothesen müssten sowohl zelluläre als auch virale RNAs hinsichtlich ihres

Methylierungsstatus analysiert werden bzw. Virusmutanten mit spezifischen Substitutionen in den genannten Enzymen charakterisiert werden.

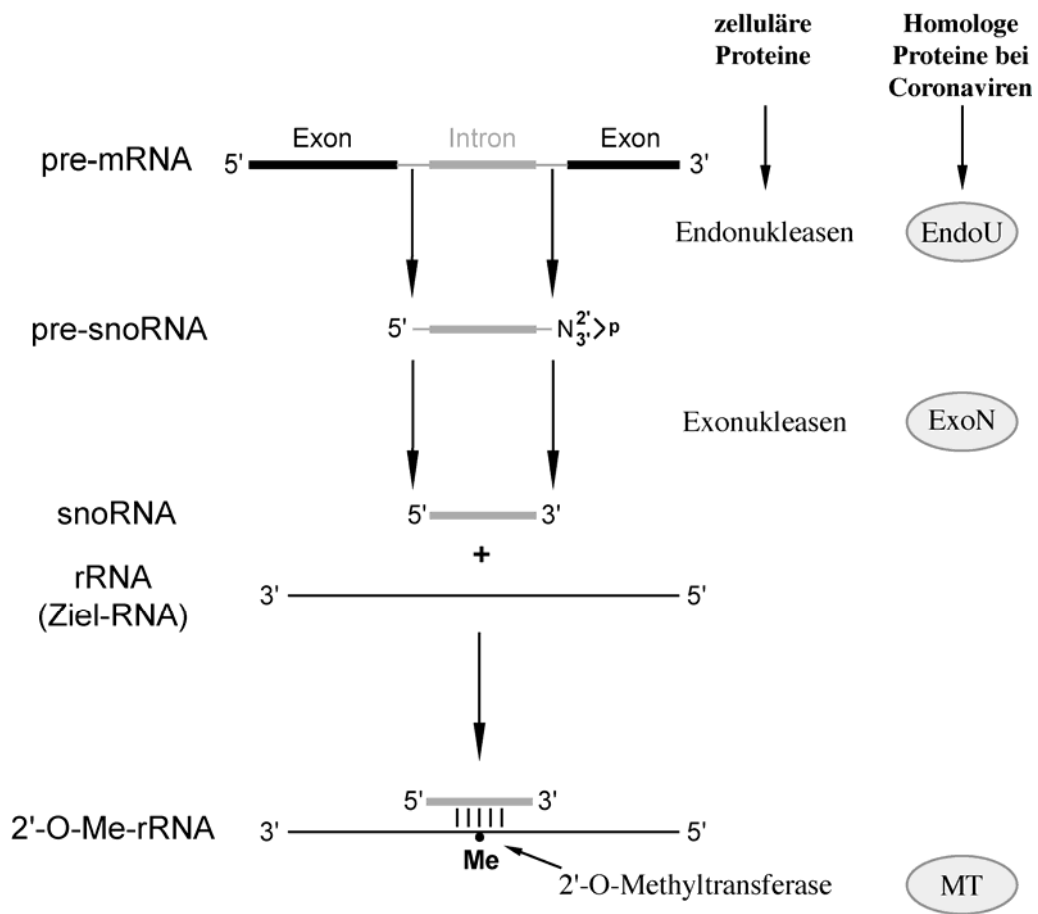


Abbildung 5.01 Die zellulären Homologe der coronaviralen Proteine führen eine RNA-Prozessierung aus.

Schematische Darstellung der Erzeugung von snoRNA-Molekülen (englisch: small nucleolar RNA), die als wichtige Signalmoleküle bei der Methylierung ribosomaler RNA dienen, aus Intronen von zellulärer pre-mRNA. Die Reaktionen werden von zellulären Endo- und Exonukleasen sowie 2'-O-Methyltransferasen katalysiert. Homologe Aktivitäten von Coronaviren sind auf der rechten Seite in grauen Ellipsen gekennzeichnet.

6 Zusammenfassung

Humane Coronaviren sind wichtige Pathogene, die vor allem mit respiratorischen (z.B. SARS) und enteralen Erkrankungen assoziiert sind. Coronaviren besitzen das größte gegenwärtig bekannte RNA-Genom aller Viren (ca. 30 Kilobasen). Die Replikation des Genoms und die Synthese zahlreicher subgenomischer RNAs, die die viralen Strukturproteine und einige akzessorische, vermutlich virulenzassoziierte, Proteine kodieren, erfolgt durch die virale Replikase. Die coronavirale Replikase ist ein Multienzym-Komplex, der durch die proteolytische Prozessierung großer Vorläuferproteine (Polyproteine pp1a und pp1ab) entsteht und 16 virale Nichtstrukturproteine (nsp), aber auch einige zelluläre Proteine, beinhaltet. Obwohl die Charakterisierung der Funktionen der einzelnen Proteine und das Verständnis der molekularen Grundlagen der coronaviralen Replikation noch in ihren Anfängen stecken, ist bereits jetzt klar, dass die an der Replikation beteiligten Mechanismen deutlich komplexer sind als bei den meisten anderen RNA-Viren. Man hofft, dass aus der Untersuchung der einzelnen an der Replikation beteiligten Proteine Erkenntnisse zu den Besonderheiten des Lebenszyklus dieser ungewöhnlich großen RNA-Viren abgeleitet werden können und dass sich daraus auch Ansatzpunkte für die Entwicklung von Inhibitoren einzelner Proteine/Enzyme ergeben, die für eine zukünftige antivirale Therapie genutzt werden könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei enzymatische Aktivitäten von Coronaviren, eine Helikase und eine Endonuklease, die Teil der coronaviralen Nichtstrukturproteine nsp13 bzw. nsp15 sind, *in vitro* untersucht. Zur Etablierung allgemeingültiger Prinzipien coronaviraler Enzymaktivitäten wurden die homologen Proteine von HCoV-229E und SARS-CoV, also von Vertretern unterschiedlicher serologischer und genetischer Coronavirus-Gruppen, parallel untersucht und ihre Eigenschaften miteinander verglichen. Die nsp13-Helikase des SARS-Coronavirus wurde als bakterielles Fusionsprotein exprimiert, und die nsp13-Helikase des humanen Coronavirus 229E wurde in Insektenzellen mittels baculoviraler Vektoren exprimiert. Beide Proteine zeigten Polynukleotid-stimulierbare NTPase- und 5'-3'-Helikase-Aktivitäten. Darüber hinaus besaßen sie vergleichbare Hydrolyseaktivitäten gegenüber den 8 getesteten Ribo- und Desoxyribonukleosidtriphosphaten. Die Anwesenheit von poly(U) führte zu einer 3-fachen Erhöhung der katalytischen Effizienz (k_{cat}/K_m) und einer etwa 100-fachen Steigerung der Hydrolysegeschwindigkeit (k_{cat}). Es wurde am Beispiel von HCoV-229E-nsp13 gezeigt, dass Nucleinsäuresubstrate mit hoher Affinität ($K_{50} \approx 10^{-8}$ M), jedoch ohne erkennbare Präferenz für einzel- oder doppelsträngige DNA- oder RNA-Substrate gebunden werden. Solch eine feste

Bindung ist typisch für Enzyme, die prozessiv mit Nukleinsäuren interagieren. Sie korreliert darüber hinaus mit der beobachteten effizienten Entwindung (Trennung) von RNA- und DNA-Duplexen mit langen, doppelsträngigen Bereichen von 500 Basenpaaren und mehr. Dies legt eine Funktion als replikative Helikase nahe, wie sie beispielweise bei der effektiven Entwindung doppelsträngiger replikativer Intermediate benötigt werden könnte. In dieser Arbeit wurde darüber hinaus eine neue enzymatische Aktivität coronaviraler Helikasen entdeckt. Die gefundene RNA-5'-Triphosphatase-Aktivität nutzt das aktive Zentrum der NTPase-Aktivität und katalysiert wahrscheinlich die erste Reaktion innerhalb der Synthese der Cap-Struktur am 5'-Ende viraler RNAs. Die sehr ähnlichen biochemischen Eigenschaften der HCoV-229E- und SARS-CoV-Helikasen lassen vermuten, dass die Enzymologie der viralen RNA-Synthese (trotz relativ geringer Sequenzidentität der beteiligten Enzyme) unter den Vertretern unterschiedlicher Gruppen von Coronaviren konserviert ist.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der biochemischen Charakterisierung des Nichtstrukturproteins nsp15, für das eine Endonuklease-Aktivität vorhergesagt worden war. Auch in diesem Fall wurden die entsprechenden Proteine von HCoV-229E und SARS-CoV charakterisiert. Beide (bakteriell exprimierten) Enzyme zeigten identische enzymatische Eigenschaften. *In-vitro*-Experimente bestätigten, dass diese Proteine eine Mn^{2+} -abhängige RNA- (jedoch nicht DNA-) Endonukleaseaktivität besitzen. Sie spalten doppelsträngige RNA deutlich effektiver und spezifischer als einzelsträngige RNA. Die Enzyme spalten an Uridylat-Resten und erzeugen Produkte mit 2', 3'-Zyklophosphat-Enden. Bei doppelsträngigen RNA-Substraten wurde eine Spezifität für 5'-GU(U)-3' gefunden. Die Tatsache, dass diese Sequenz in den nidoviralen transkriptionsregulierenden Sequenzen (TRS) der Minusstränge konserviert ist und auch die Endonuklease bei allen Nidoviren konserviert ist, unterstützt die Hypothese, dass die Endonukleaseaktivität eine spezifische Funktion innerhalb der coronaviralen (nidoviralen) diskontinuierlichen Transkription besitzt.

7 Summary

Human coronaviruses are important pathogens that are mainly associated with respiratory (e.g. SARS) and enteric diseases. With genome sizes of about 30 kilobases, coronaviruses are the largest RNA viruses currently known. The replication of the genome RNA and the synthesis of multiple subgenomic (sg) RNAs, which encode structural and accessory (probably virulence-associated) proteins, is mediated by the viral replicase. The coronaviral replicase is a multi-enzyme complex, which is produced from viral precursor polyproteins (pp1a and pp1ab) that are autoproteolytically processed into 16 nonstructural proteins (nsp). It also involves several cellular proteins. Although the functional characterization of most of these proteins and, more generally, the understanding of the molecular mechanisms involved in coronavirus replication are still at an early stage, it is already clear that these mechanisms are much more complex than those used by most other RNA viruses. The investigation of the proteins involved in virus replication is anticipated to result in a better understanding of the specific features of the replication cycle of these unusually large RNA viruses, potentially providing novel approaches to the development of enzyme (protein) inhibitors that, in the long run, may be developed into drugs suitable for antiviral therapy.

In this work, two coronavirus enzymatic activities, a helicase and an endonuclease, residing in the coronavirus nonstructural proteins nsp13 and nsp15, respectively, were investigated *in vitro*. In order to establish potentially existing common principles of coronavirus enzymatic activities, the homologous proteins of HCoV-229E and SARS-CoV, which belong to different serological and genetic coronavirus groups, were studied in parallel and their properties were compared with each other. The SARS-CoV helicase was expressed in bacteria as a fusion protein and the helicase of HCoV-229E was expressed in insect cells using baculovirus vectors. Both proteins were shown to have polynucleotide-stimulated NTPase and 5'-to-3' helicase activities. Furthermore, they had comparable hydrolysis activities with all eight (natural) ribo- and deoxyribonucleoside triphosphates. The presence of poly(U) led to a 3-fold increase of the catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) and an about 100-fold acceleration of the hydrolysis rate (k_{cat}). Using HCoV-229E nsp13 as an example, it was shown that the coronavirus helicase has a high binding affinity for nucleic acids ($K_{50} \approx 10^{-8}$ M). No preference for single-stranded (ss) versus double-stranded (ds) substrates could be established for this protein. Such a tight binding is typical for enzymes acting highly processively on nucleic acids (e.g., polymerases). Furthermore, coronavirus helicases proved to be able to unwind long RNA and DNA duplexes (of 500 bp and

more) highly effectively. Together, these data support the idea that coronavirus nsp13s are “replicative helicases” that are involved in the unwinding of long double-stranded replicative intermediates. In this study, yet another enzymatic activity, namely an RNA-5'-triphosphatase activity, was established for coronaviral helicases. The activity, which employs the NTPase active site, probably mediates the first step in the formation of the 5'-cap structures present on coronaviral RNAs. The HCoV-229E and SARS-CoV helicases were found to have very similar biochemical features, suggesting that, despite the relatively low sequence identity among these enzymes, the enzymology involved in viral RNA synthesis is well conserved among members of different coronavirus groups.

The second part of the study was devoted to the biochemical characterization of coronavirus nsp15, a protein with predicted endonuclease activity. Also in this case, the homologous proteins from HCoV-229E and SARS-CoV were studied in parallel. Bacterially expressed forms of both enzymes showed essentially identical enzymatic properties. *In vitro* experiments confirmed that nsp15 possesses a Mn^{2+} -dependent RNA (but not DNA) endonuclease activity. The proteins cleaved double-stranded RNAs much more effectively and specifically than ssRNA substrates. Cleavage was shown to occur at uridylates, generating products with 2',3'-cyclophosphates. In the case of dsRNA substrates, nsp15 was confirmed to be specific for 5'-GU(U)-3' sequences. The fact that (i) the GUU sequence is conserved among the negative-strand complements of coronavirus transcription-regulating sequences and (ii) the endonuclease domain is conserved among all nidoviruses supports the hypothesis that the endonuclease activity has a specific function in coronavirus (nidovirus) discontinuous transcription.

7 Abkürzungen

μ	Mikro-
3CL ^{pro}	Engl.: 3C like proteinase
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
AMP	Adenosin-5'-Monophosphat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
(k)bp	(Kilo-) Basenpaar
ca.	circa
CIP	Engl.: calf intestine phosphatase
DNA	Engl.: deoxyribonucleic acid
ds	Engl.: double stranded
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMSA	Engl.: electrophoretic mobility shift assay
ExoN	Exonuklease
HEL	Helikase
kb	Kilobase
K_d	Dissoziationskonstante
K_m	Michaelis Konstante
k_{cat}	katalytische Konstante
kDa	Kilodalton
LB	Engl.: luria broth
M	Mol / Liter
MBP	Maltose-bindendes Protein
Me	Metall
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimol / Liter
Mn	Mangan
mRNA	Engl.: matrix ribonucleic acid
MT	Methyltransferase
NA	Engl.: nucleic acid
ng	Nanogramm

nM	Nanomol / Liter
nsp	Engl.: non-structural protein
nt	Nukleotid
(d)NTP	(Desoxi-) Nukleosid-5'-Triphosphat
ORF	Engl.: open reading frame
PCR	Engl.: polymerase chain reaction
PL ^{pro}	Engl.: papaine like proteinase
PNK	Polynukleotidkinase
pp	Engl.: polyprotein
RdRp	Engl.: RNA dependent RNA polymerase
RNA	Engl.: ribonucleic acid
rpm	Engl.: rounds per minute
rRNA	Engl.: ribosome ribonucleic acid
sec	Sekunde
SF	Superfamilie
sgRNA	Engl.: subgenomic ribonucleic acid
snoRNA	Engl.: small nucleolar ribonucleic acid
ss	Engl.: single stranded
TAS	Engl.: trancription associated sequence
TGB	Engl.: tripple gene block
TLC	Engl.: thin layer chromatography
TRS	Engl.: trancription regulating sequence
U	Engl.: unit
usw.	und so weiter
z. B.	zum Beispiel
ZBD	Zink-bindende Domäne
Zn	Zink

8 Literaturverzeichnis

- Ali JA, Lohman TM. (1997)** Kinetic measurement of the step size of DNA unwinding by *Escherichia coli* UvrD helicase. *Science*, **275**: 377-380
- Anand K, Palm GJ, Mesters JR, Siddell SG, 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**: 3213-3224
- Anand K, Ziebuhr J, Wadhvani P, Mesters JR, Hilgenfeld R. (2003)** Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs. *Science*, **300**: 1763-1767
- Beintema JJ, Kleineidam RG. (1998)** The ribonuclease A superfamily: general discussion. *Cell. Mol. Life Sci.*, **54**: 825-832
- Baric RS, Stohlman SA, Lai MM. (1983)** Characterization of replicative intermediate RNA of mouse hepatitis virus: presence of leader RNA sequences on nascent chains. *J. Virol.*, **48**: 633-640
- Bautista EM, Faaberg KS, Mickelson D, McGruder ED. (2002)** Functional properties of the predicted helicase of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology*, **298**: 258-270
- Benarroch D, Selisko B, Locatelli GA, Maga G, Romette JL, Canard B. (2004)** The RNA helicase, nucleotide 5'-triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities of Dengue virus protein NS3 are Mg²⁺-dependent and require a functional Walker B motif in the helicase catalytic core. *Virology*, **328**: 208-218
- Benbaccer L, Kut E, Besnardeau L, Laude H, Delmas B. (1997)** Interspecies aminopeptidase-N chimeras reveal species-specific receptor recognition by canine coronavirus, feline infectious peritonitis virus, and transmissible gastroenteritis virus. *J. Virol.*, **71**: 734-737
- Bisaillon M, Lemay G. (1997)** Characterization of the reovirus lambda1 protein RNA 5'-triphosphatase activity. *J. Biol. Chem.*, **272**: 29954-29957
- Bonilla PJ, Gorbalenya AE, Weiss SR. (1994)** Mouse hepatitis virus strain A59 RNA polymerase gene ORF 1a: heterogeneity among MHV strains. *Virology*, **198**: 736-740
- Bournsnel ME, Brown TD, Foulds IJ, Green PF, Tomley FM, Binns MM. (1987)** Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. *J. Gen. Virol.*, **68**: 57-77
- Bredenbeek PJ, Pachuk CJ, Noten AF, Charite J, Luytjes W, Weiss SR, Spaan WJ. (1990a)** The primary structure and expression of the second open reading frame of the polymerase gene of the coronavirus MHV-A59; a highly conserved polymerase is expressed by an efficient ribosomal frameshifting mechanism. *Nucleic Acids Res.*, **18**: 1825-1832
- Bredenbeek PJ, Snijder EJ, Noten FH, den Boon JA, Schaaper WM, Horzinek MC, Spaan WJ. (1990b)** The polymerase gene of corona- and toroviruses: evidence for an evolutionary relationship. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **276**: 307-316

- Brian DA, Hogue BG, Kienzle TE. (1995)** The coronavirus hemagglutinin esterase protein. In: Siddell SG. (ed.) *The Coronaviridae*, New York: Plenum Press: 165-179
- Brierley I, Bournnell ME, Binns MM, Bilimoria B, Blok VC, Brown TD, Inglis SC. (1987)** An efficient ribosomal frame-shifting signal in the polymerase-encoding region of the coronavirus IBV. *EMBO J.*, **6**: 3779-3785
- Brierley I, Digard P, Inglis SC. (1989)** Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudoknot. *Cell*, **57**: 537-547
- Bügl H, Fauman EB, Staker BL, Zheng F, Kushner SR, Saper MA, Bardwell JC, Jakob U. (2000)** RNA methylation under heat shock control. *Mol. Cell.*, **6**: 349-360
- Burgess BR, Richardson JP. (2001a)** RNA passes through the hole of the protein hexamer in the complex with the Escherichia coli Rho factor. *J. Biol. Chem.*, **276**: 4182-4189
- Burgess BR, Richardson JP. (2001b)** Transcription factor Rho does not require a free end to act as an RNA-DNA helicase on an RNA. *J. Biol. Chem.*, **276**: 17106-17110
- Cann JR. (1989)** Phenomenological theory of gel electrophoresis of protein-nucleic acid complexes. *J. Biol. Chem.*, **264**: 17032-17040
- Cannistraro VJ, Kennell D. (1993)** The 5' ends of RNA oligonucleotides in Escherichia coli and mRNA degradation. *Eur. J. Biochem.*, **213**: 285-293
- Caruthers JM, Johnson ER, McKay DB. (2000)** Crystal structure of yeast initiation factor 4A, a DEAD-box RNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**: 13080-13085
- Caruthers JM, McKay DB. (2002)** Helicase structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12**: 123-133
- Cavanagh D. (1992)** Recent advances in avian virology. *Br. Vet. J.*, **48**: 199-222
- Cavanagh D, Brian DA, Brinton MA, Enjuanes L, Holmes KV, Horzinek MC, Lai MM, Laude H, Plagemann PG, Siddell SG, et al. (1993)** The Coronaviridae now comprises two genera, coronavirus and torovirus: report of the Coronaviridae Study Group. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **342**: 255-257
- Cavanagh D. (1997)** Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch. Virol.*, **142**: 629-633
- Chen DS, Asanaka M, Chen FS, Shively JE, Lai MM. (1997)** Human carcinoembryonic antigen and biliary glycoprotein can serve as mouse hepatitis virus receptors. *J. Virol.*, **71**: 1688-1691
- Cho HS, Ha NC, Kang LW, Chung KM, Back SH, Jang SK, Oh BH. (1998)** Crystal structure of RNA helicase from genotype 1b hepatitis C virus. A feasible mechanism of unwinding duplex RNA. *J. Biol. Chem.*, **273**: 15045-15052
- Chouljenko VN, Lin XQ, Storz J, Kousoulas KG, Gorbalenya AE. (2001)** Comparison of genomic and predicted amino acid sequences of respiratory and enteric bovine coronaviruses isolated from the same animal with fatal shipping pneumonia. *J. Gen. Virol.*, **82**: 2927-2933

Cowley JA, Walker PJ. (2002) The complete genome sequence of gill-associated virus of *Penaeus monodon* prawns indicates a gene organisation unique among nidoviruses. *Arch. Virol.*, **147**: 1977-1987

Crotty S, Maag D, Arnold JJ, Zhong W, Lau JY, Hong Z, Andino R, Cameron CE. (2000) The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat. Med.*, **6**: 1375-1379

Cuchillo CM, Pares X, Guasch A, Barman T, Travers F, Nogues MV. (1993) The role of 2',3'-cyclic phosphodiesterases in the bovine pancreatic ribonuclease A catalysed cleavage of RNA: intermediates or products? *FEBS Lett.*, **333**: 207-210

Culver GM, Consaul SA, Tycowski KT, Filipowicz W, Phizicky EM. (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**: 24928-24934

Dagert M, Ehrlich SD. (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene*, **6**: 23-28

de Groot RJ, Hardy WR, Shirako Y, Strauss JH. (1990) Cleavage-site preferences of Sindbis virus polyproteins containing the non-structural proteinase. Evidence for temporal regulation of polyprotein processing in vivo. *EMBO J.*, **9**: 2631-2638

de Vries AAF, Horzinek MC, Rottier PJ, de Groot RJ. (1997) The genome organization of the nidovirales: similarities and differences between arteri-, toro- and coronaviruses. *Semin. Virol.*, **8**: 33-47

Delagoutte E, von Hippel PH. (2002) Helicase mechanisms and the coupling of helicases within macromolecular machines. Part I: Structures and properties of isolated helicases. *Q. Rev. Biophys.*, **35**: 431-478

den Boon JA, Snijder EJ, Chirnside ED, de Vries AA, Horzinek MC, Spaan WJ. (1991) Equine arteritis virus is not a togavirus but belongs to the coronaviruslike superfamily. *J. Virol.*, **65**: 2910-2920

Denison MR, Spaan WJ, van der Meer Y, Gibson CA, Sims AC, Prentice E, Lu XT. (1999) The putative helicase of the coronavirus mouse hepatitis virus is processed from the replicase gene polyprotein and localizes in complexes that are active in viral RNA synthesis. *J. Virol.*, **73**: 6862-6871

Deshpande RA, Shankar V. (2002) Ribonucleases from T2 family. *Crit. Rev. Microbiol.*, **28**: 79-122

Dougherty WG, Parks TD. (1991) Post-translational processing of the tobacco etch virus 49-kDa small nuclear inclusion polyprotein: identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains. *Virology*, **183**: 449-456

Dougherty WG, Semler BL. (1993) Expression of virus-encoded proteinases: functional and structural similarities with cellular enzymes. *Microbiol. Rev.*, **57**: 781-822

- Eagles RM, Balmori-Melian E, Beck DL, Gardner RC, Forster RL. (1994)** Characterization of NTPase, RNA-binding and RNA-helicase activities of the cytoplasmic inclusion protein of tamarillo mosaic potyvirus. *Eur. J. Biochem.*, **224**: 677-684
- Egelman EH, Yu X, Wild R, Hingorani MM, Patel SS. (1995)** Bacteriophage T7 helicase/primase proteins form rings around single-stranded DNA that suggest a general structure for hexameric helicases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 3869-3873
- Eleouet JF, Rasschaert D, Lambert P, Levy L, Vende P, Laude H. (1995)** Complete sequence (20 kilobases) of the polyprotein-encoding gene 1 of transmissible gastroenteritis virus. *Virology*, **206**: 817-822
- Fan K, Wei P, Feng Q, Chen S, Huang C, Ma L, Lai B, Pei J, Liu Y, Chen J, Lai L. (2004)** Biosynthesis, purification, and substrate specificity of severe acute respiratory syndrome coronavirus 3C-like proteinase. *J. Biol. Chem.*, **279**: 1637-1642
- Filipowicz W, Pogacic V. (2002)** Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **14**: 319-327
- Fry DC, Kuby SA, Mildvan AS. (1986)** ATP-binding site of adenylate kinase: mechanistic implications of its homology with ras-encoded p21, F1-ATPase, and other nucleotide-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 907-911
- Gagnetten S, Gout O, Dubois-Dalcq M, Rottier P, Rossen J, Holmes KV. (1995)** Interaction of mouse hepatitis virus (MHV) spike glycoprotein with receptor glycoprotein MHVR is required for infection with an MHV strain that expresses the hemagglutinin-esterase glycoprotein. *J. Virol.*, **69**: 889-895
- Godet M, L'Haridon R, Vautherot JF, Laude H. (1992)** TGEV corona virus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions. *Virology*, **188**: 666-675
- Gomez de Cedron M, Ehsani N, Mikkola ML, Garcia JA, Kaariainen L. (1999)** RNA helicase activity of Semliki Forest virus replicase protein NSP2. *FEBS Lett.*, **448**: 19-22
- Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, Blinov VM. (1988a)** A conserved NTP-motif in putative helicases. *Nature*, **333**: 22
- Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, Blinov VM. (1988b)** A novel superfamily of nucleoside triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination. *FEBS Lett.*, **235**: 16-24
- Gorbalenya AE, Koonin EV. (1989)** Viral proteins containing the purine NTP-binding sequence pattern. *Nucleic Acids Res.*, **17**: 8413-8440
- Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, Blinov VM. (1989)** Coronavirus genome: prediction of putative functional domains in the non-structural polyprotein by comparative amino acid sequence analysis. *Nucleic Acids Res.*, **17**: 4847-4861
- Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, Blinov VM. (1989b)** Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res.*, **17**: 4713-4730

Gorbalenya AE, Koonin EV. (1993) Helicases: amino acid sequence comparison and structure-function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **3**: 419-429

Gorbalenya AE. (2001) Big nidovirus genome. When count and order of domains matter. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **494**: 1-17

Griffiths G, Rottier P. (1992) Cell biology of viruses that assemble along the biosynthetic pathway. *Semin. Cell. Biol.*, **3**: 367-381

Gwack Y, Yoo H, Song I, Choe J, Han JH. (1999) RNA-Stimulated ATPase and RNA helicase activities and RNA binding domain of hepatitis G virus nonstructural protein 3. *J. Virol.*, **73**: 2909-2915

Hall MC, Matson SW. (1999) Helicase motifs: the engine that powers DNA unwinding. *Mol. Microbiol.*, **34**: 867-877

Hausmann Y, Roman-Sosa G, Thiel HJ, Rumenapf T. (2004) Classical swine fever virus glycoprotein E rns is an endoribonuclease with an unusual base specificity. *J. Virol.*, **78**: 5507-5512

Hegy A, Ziebuhr J. (2002) Conservation of substrate specificities among coronavirus main proteases. *J. Gen. Virol.*, **83**: 595-599

Hemmila E, Turbide C, Olson M, Jothy S, Holmes KV, Beauchemin N. (2004) Ceacam1a^{-/-} mice are completely resistant to infection by murine coronavirus mouse hepatitis virus A59. *J. Virol.*, **78**: 10156-10165

Herold J, Raabe T, Schelle-Prinz B, Siddell SG. (1993) Nucleotide sequence of the human coronavirus 229E RNA polymerase locus. *Virology*, **195**: 680-691

Herold J, Siddell SG. (1993) An 'elaborated' pseudoknot is required for high frequency frameshifting during translation of HCV 229E polymerase mRNA. *Nucleic Acids Res.*, **21**: 5838-5842

Hetfeld B, Helfrich A, Kapelari B, Scheel H, Hofmann K, Guterman A, Glickman M, Schade R, Kloetzel P, Dubiel W. (2005) The zinc finger of the CSN-associated deubiquitinating enzyme USP15 is essential to rescue the E3 ligase Rbx1. *Curr. Biol.*, **15**: 1217-1221

Heusipp G, Harms U, Siddell SG, 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**: 5631-5634

Hingorani MM, Patel SS. (1993) Interactions of bacteriophage T7 DNA primase/helicase protein with single-stranded and double-stranded DNAs. *Biochemistry*, **32**: 12478-12487

Hingorani MM, Patel SS. (1996) Cooperative interactions of nucleotide ligands are linked to oligomerization and DNA binding in bacteriophage T7 gene 4 helicases. *Biochemistry*, **35**: 2218-2228

Hofmann MA, Brain DA. (1991) The 5' end of coronavirus minus-strand RNAs contains a short poly(U) tract. *J. Virol.*, **65**: 6331-6333

Hofstee BH, Dixon M, Webb EC. (1959) Non-inverted versus inverted plots in enzyme kinetics. *Nature*, **184**: 1296-1298

Ilyina TV, Gorbalenya AE, Koonin EV. (1992) Organization and evolution of bacterial and bacteriophage primase-helicase systems. *J. Mol. Evol.*, **34**: 351-357

Irie M, Ohgi K. (2001) Ribonuclease T2. *Methods Enzymol.*, **341**: 42-55

Ivanov KA, Hertzog T, Rozanov M, Bayer S, Thiel V, Gorbalenya AE, Ziebuhr J. (2004) Major genetic marker of nidoviruses encodes a replicative endoribonuclease. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, **101**: 12694-12699

Ivanov KA, Thiel V, Dobbe JC, van der Meer Y, Snijder EJ, Ziebuhr J. (2004b) Multiple enzymatic activities associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus helicase. *J. Virol.*, **78**: 5619-5632

Jezewska MJ, Bujalowski W. (1996) Global conformational transitions in Escherichia coli primary replicative helicase DnaB protein induced by ATP, ADP, and single-stranded DNA binding. Multiple conformational states of the helicase hexamer. *J. Biol. Chem.*, **271**: 4261-4265

Jezewska MJ, Kim US, Bujalowski W. (1996) Interactions of Escherichia coli primary replicative helicase DnaB protein with nucleotide cofactors. *Biophys. J.*, **71**: 2075-2086

Jiang B, Monroe SS, Koonin EV, Stine SE, Glass RI. (1993) RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 10539-10543

Johnson ER, McKay DB. (1999) Crystallographic structure of the amino terminal domain of yeast initiation factor 4A, a representative DEAD-box RNA helicase. *RNA*, **5**: 1526-1534

Joo M, Makino S. (1992) Mutagenic analysis of the coronavirus intergenic consensus sequence. *J. Virol.*, **66**: 6330-6337

Kalinina NO, Rakitina DV, Solovyev AG, Schiemann J, Morozov SY. (2002) RNA helicase activity of the plant virus movement proteins encoded by the first gene of the triple gene block. *Virology*, **296**: 321-329

Kennell D. (2002) Processing endoribonucleases and mRNA degradation in bacteria. *J. Bacteriol.*, **184**: 4645-4657

Kim JL, Morgenstern KA, Griffith JP, Dwyer MD, Thomson JA, Murcko MA, Lin C, Caron PR. (1998) Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure*, **6**: 89-100

Kim DE, Patel SS. (1999) The mechanism of ATP hydrolysis at the noncatalytic sites of the transcription termination factor Rho. *J. Biol. Chem.*, **274**: 32667-32671

Kim DE, Shigesada K, Patel SS. (1999) Transcription termination factor Rho contains three noncatalytic nucleotide binding sites. *J. Biol. Chem.*, **274**: 11623-11628

- Kiss T. (2001)** Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *EMBO J.*, **20**: 3617-3622
- Kocherhans R, Bridgen A, Ackermann M, Tobler K. (2001)** Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence. *Virus Genes*, **23**: 137-144
- Kooi C, Cervin M, Anderson R. (1991)** Differentiation of acid-pH-dependent and -nondependent entry pathways for mouse hepatitis virus. *Virology*, **180**: 108-119
- Korolev S, Hsieh J, Gauss GH, Lohman TM, Waksman G. (1997)** Major domain swiveling revealed by the crystal structures of complexes of E. coli Rep helicase bound to single-stranded DNA and ADP. *Cell*, **90**: 635-647
- Koonin EV. (1991)** Similarities in RNA helicases. *Nature*, **352**: 290
- Koonin EV, Dolja VV. (1993)** Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **28**: 375-430
- Kräusslich HG, Wimmer E. (1988)** Viral proteinases. *Annu. Rev. Biochem.*, **57**: 701-754
- Krepkiy D, Forsterling FH, Petering DH. (2004)** Interaction of Cd²⁺ with Zn finger 3 of transcription factor IIIA: structures and binding to cognate DNA. *Chem. Res. Toxicol.*, **17**: 863-870
- Kuhn JH, Li W, Choe H, Farzan M. (2004)** Angiotensin-converting enzyme 2: a functional receptor for SARS coronavirus. *Cell. Mol. Life Sci.*, **61**: 2738-2743
- Laemmli UK. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685
- Lai MMC, Holmes KV. (2001)** *Coronaviridae*: the viruses and their replication. In *Fields Virology*, 4th edition, 1163-1185. Edited by D.M. Knipe and P.M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Lai MM, Patton CD, Stohlman SA. (1982)** Further characterization of mRNA's of mouse hepatitis virus: presence of common 5'-end nucleotides. *J. Virol.*, **41**: 557-565
- Lai MM, Stohlman SA. (1981)** Genome structure of mouse hepatitis virus: comparative analysis by oligonucleotide mapping. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **142**: 69-82
- Lain S, Riechmann JL, Garcia JA. (1991)** RNA helicase: a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucleic Acids Res.*, **18**: 7003-7006
- Laneve P, Altieri F, Fiori ME, 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**: 13026-13032
- Lawson MA, Semler BL. (1990)** Picornavirus protein processing - enzymes, substrates, and genetic regulation. *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, **161**: 49-87

- Lee HJ, Shieh CK, Gorbalenya AE, Koonin EV, La Monica N, Tuler J, Bagdzhadzhyan A, Lai MM. (1991)** The complete sequence (22 kilobases) of murine coronavirus gene 1 encoding the putative proteases and RNA polymerase. *Virology*, **180**: 567-82
- Li JP, Baltimore D. (1990)** An intragenic revertant of a poliovirus 2C mutant has an uncoating defect. *J. Virol.*, **64**: 1102-1107
- Li YI, Shih TW, Hsu YH, Han YT, Huang YL, Meng M. (2001)** The helicase-like domain of plant potexvirus replicase participates in formation of RNA 5' cap structure by exhibiting RNA 5'-triphosphatase activity. *J. Virol.*, **75**: 12114-12120
- Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TC. (2003)** Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, **426**: 450-454
- Liao CL, Lai MM. (1994)** Requirement of the 5'-end genomic sequence as an upstream cis-acting element for coronavirus subgenomic mRNA transcription. *J. Virol.*, **68**: 4727-4737
- Lohman TM. (1992)** Escherichia coli DNA helicases: mechanisms of DNA unwinding. *Mol. Microbiol.*, **6**: 5-14
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randell RJ. (1951)** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275
- Lucius AL, Vindigni A, Gregorian R, Ali JA, Taylor AF, Smith GR, Lohman TM. (2002)** DNA unwinding step-size of E. coli RecBCD helicase determined from single turnover chemical quenched-flow kinetic studies. *J. Mol. Biol.*, **324**: 409-428
- Machamer CE, Mentone SA, Rose JK, Farquhar MG. (1990)** The E1 glycoprotein of an avian coronavirus is targeted to the cis Golgi complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**:6944-6948
- Macnaughton MR, Madge MH. (1978)** The genome of human coronavirus strain 229E. *J. Gen. Virol.*, **39**: 497-504
- Makino S, Joo M. (1993)** Effect of intergenic consensus sequence flanking sequences on coronavirus transcription. *J. Virol.*, **67**: 3304-3311
- Makino S, Joo M, Makino JK. (1991)** A system for study of coronavirus mRNA synthesis: a regulated, expressed subgenomic defective interfering RNA results from intergenic site insertion. *J. Virol.*, **65**: 6031-6041
- Marra MA, Jones SJ, Astell CR, Holt RA, Brooks-Wilson A, Butterfield YS, Khattri J, Asano JK, Barber SA, Chan SY, Cloutier A, Coughlin SM, Freeman D, Girn N, Griffith OL, Leach SR, Mayo M, McDonald H, Montgomery SB, Pandoh PK, Petrescu AS, Robertson AG, Schein JE, Siddiqui A, Smailus DE, Stott JM, Yang GS, Plummer F, Andonov A, Artsob H, Bastien N, Bernard K, Booth TF, Bowness D, Czub M, Drebot M, Fernando L, Flick R, Garbutt M, Gray M, Grolla A, Jones S, Feldmann H, Meyers A, Kabani A, Li Y, Normand S, Stroher U, Tipples GA, Tyler S, Vogrig R, Ward D, Watson B, Brunham RC, Krajdén M, Petric M, Skowronski DM, Upton C, Roper RL. (2003)** The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science*, **300**: 1399-1404

Martzen MR, McCraith SM, Spinelli SL, Torres FM, Fields S, Grayhack EJ, Phizicky EM. (1999) A biochemical genomics approach for identifying genes by the activity of their products. *Science*, **286**: 1153-1155

Matson SW. (1991) DNA helicases of *Escherichia coli*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **40**: 289-326

Mauguen Y, Hartley RW, Dodson EJ, Dodson GG, Bricogne G, Chothia C, Jack A. (1982) Molecular structure of a new family of ribonucleases. *Nature*, **297**: 162-164

Mirzayan C, Wimmer E. (1994) Biochemical studies on poliovirus polypeptide 2C: evidence for ATPase activity. *Virology*, **199**: 176-187

Morgenstern KA, Landro JA, Hsiao K, Lin C, Gu Y, Su MS, Thomson JA. (1997) Polynucleotide modulation of the protease, nucleoside triphosphatase, and helicase activities of a hepatitis C virus NS3-NS4A complex isolated from transfected COS cells. *J. Virol.*, **71**: 3767-3775

Nakagawa N, Sugahara M, Masui R, Kato R, Fukuyama K, Kuramitsu S. (1999) Crystal structure of *Thermus thermophilus* HB8 UvrB protein, a key enzyme of nucleotide excision repair. *J. Biochem. (Tokyo)*, **126**: 986-990

Nashimoto M. (1995) Conversion of mammalian tRNA 3' processing endoribonuclease to four-base-recognizing RNA cutters. *Nucleic Acids Res.*, **23**: 3642-3647

Nasr F, Filipowicz W. (2000) Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* cyclic nucleotide phosphodiesterase involved in the metabolism of ADP-ribose 1",2"-cyclic phosphate. *Nucleic Acids Res.*, **28**: 1676-1683

Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL, Koonin EV. (1999) AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.*, **9**: 27-43

Nevinskii GA. (2004) The role of weak specific and nonspecific interactions in recognition and conversation by enzymes of long DNA. *Mol. Biol. (Mosk)*, **38**: 756-785

Nieden zu T, Roleke D, Bains G, Scherzinger E, Saenger W. (2001) Crystal structure of the hexameric replicative helicase RepA of plasmid RSF1010. *J. Mol. Biol.*, **306**: 479-487

Pang PS, Jankowsky E, Planet PJ, Pyle AM. (2002) The hepatitis C viral NS3 protein is a processive DNA helicase with cofactor enhanced RNA unwinding. *EMBO J.*, **21**: 1168-1176

Pasternak AO, van den Born E, Spaan WJ, Snijder EJ. (2001) Sequence requirements for RNA strand transfer during nidovirus discontinuous subgenomic RNA synthesis. *EMBO J.*, **20**: 7220-7228

Patrick SM, Oakley GG, Dixon K, Turchi JJ. (2005) DNA damage induced hyperphosphorylation of replication protein A. 2. Characterization of DNA binding activity, protein interactions, and activity in DNA replication and repair. *Biochemistry*, **44**: 8438-8448

- Pause A, Methot N, Sonenberg N. (1993)** The HRIGRXXXR region of the DEAD box RNA helicase eukaryotic translation initiation factor 4A is required for RNA binding and ATP hydrolysis. *Mol. Cell. Biol.*, **13**: 6789-6798
- Penzes Z, Gonzalez JM, Calvo E, Izeta A, Smerdou C, Mendez A, Sanchez CM, Sola I, Almazan F, Enjuanes L. (2001)** Complete genome sequence of transmissible gastroenteritis coronavirus PUR46-MAD clone and evolution of the purdue virus cluster. *Virus Genes*, **23**: 105-118
- Pfister T, Wimmer E. (1999)** Characterization of the nucleoside triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by which guanidine inhibits poliovirus replication. *J. Biol. Chem.*, **274**: 6992-7001
- 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**: 222-236
- Pringle CR. (1996)** Virus taxonomy 1996 – a bulletin from the Xth International Congress of Virology in Jerusalem. *Arch. Virol.*, **141**: 2251-2256
- Raj SM, Liu F. (2003)** Engineering of RNase P ribozyme for gene-targeting applications. *Gene*, **313**: 59-69
- Richardson JP. (1982)** Activation of rho protein ATPase requires simultaneous interaction at two kinds of nucleic acid-binding sites. *J. Biol. Chem.*, **257**: 5760-5766
- Risco C, Anton IM, Enjuanes L, Carrascosa JL. (1996)** The transmissible gastroenteritis coronavirus contains a spherical core shell consisting of M and N proteins. *J. Virol.*, **70**: 4773-4777
- Rodriguez PL, Carrasco L. (1993)** Poliovirus protein 2C has ATPase and GTPase activities. *J. Biol. Chem.*, **268**: 8105-8110
- Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, Nix WA, Campagnoli R, Icenogle JP, Penaranda S, Bankamp B, Maher K, Chen MH, Tong S, Tamin A, Lowe L, Frace M, DeRisi JL, Chen Q, Wang D, Erdman DD, Peret TC, Burns C, Ksiazek TG, Rollin PE, Sanchez A, Liffick S, Holloway B, Limor J, McCaustland K, Olsen-Rasmussen M, Fouchier R, Gunther S, Osterhaus AD, Drosten C, Pallansch MA, Anderson LJ, Bellini WJ. (2003)** Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science*, **300**: 1394-1399
- Rouleau M, Smith RJ, Bancroft JB, Mackie GA. (1994)** Purification, properties, and subcellular localization of foxtail mosaic potexvirus 26-kDa protein. *Virology*, **204**: 254-265
- Saida F, Uzan M, Bontems F. (2003)** The phage T4 restriction endoribonuclease RegB: a cyclizing enzyme that requires two histidines to be fully active. *Nucleic Acids Res.*, **31**: 2751-2758
- Sawaya MR, Guo S, Tabor S, Richardson CC, Ellenberger T. (1999)** Crystal structure of the helicase domain from the replicative helicase-primase of bacteriophage T7. *Cell*, **99**: 167-177
- Sawicki D, Wang T, Sawicki S. (2001)** The RNA structures engaged in replication and transcription of the A59 strain of mouse hepatitis virus. *J. Gen. Virol.*, **82**: 385-396

- Sawicki SG, Sawicki DL. (1990)** Coronavirus transcription: subgenomic mouse hepatitis virus replicative intermediates function in RNA synthesis. *J. Virol.*, **64**: 1050-1056
- Sawicki SG, Sawicki DL. (1995)** Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenome-length negative strands. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **380**: 499-506. Review.
- Sawicki SG, Sawicki DL. (1998)** A new model for coronavirus transcription. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **440**: 215-219
- Schultze B, Wahn K, Klenk HD, Herrler G. (1991)** Isolated HE-protein from hemagglutinating encephalomyelitis virus and bovine coronavirus has receptor-destroying and receptor-binding activity. *Virology*, **180**: 221-228
- Schultze B, Herrler G. (1992)** Bovine coronavirus uses N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid as a receptor determinant to initiate the infection of cultured cells. *J. Gen. Virol.*, **73**: 901-906
- Schultze B, Krempl C, Ballesteros ML, Shaw L, Schauer R, Enjuanes L, Herrler G (1996)** Transmissible gastroenteritis coronavirus, but not the related porcine respiratory coronavirus, has a sialic acid (N-glycolylneuraminic acid) binding activity. *J. Virol.*, **70**: 5634-5637
- Schein CH, Noteborn MHM. (1988)** Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Biotechnology*, **6**: 291-294
- Schwer B, Meszaros T. (2000)** RNA helicase dynamics in pre-mRNA splicing. *EMBO J.*, **19**: 6582-6591
- Sethna PB, Hung SL, Brian DA. (1989)** Coronavirus subgenomic minus-strand RNAs and the potential for mRNA replicons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 5626-5630
- Sethna PB, Hofmann MA, Brian DA. (1991)** Minus-strand copies of replicating coronavirus mRNAs contain antileaders. *J. Virol.*, **65**: 320-325
- Sethna PB, Brian DA. (1997)** Coronavirus genomic and subgenomic minus-strand RNAs copartition in membrane-protected replication complexes. *J. Virol.*, **71**: 7744-7749
- Seybert A, Hegyi A, Siddell SG, Ziebuhr J. (2000a)** The human coronavirus 229E superfamily 1 helicase has RNA and DNA duplex-unwinding activities with 5'-to-3' polarity. *RNA*, **6**: 1056-1068
- Seybert A, Posthuma CC, van Dinten LC, Snijder EJ, Gorbalenya AE, Ziebuhr J. (2005)** A complex zinc finger controls the enzymatic activities of nidovirus helicases. *J. Virol.*, **79**: 696-704
- Seybert A, van Dinten LC, Snijder EJ, Ziebuhr J. (2000b)** Biochemical characterization of the equine arteritis virus helicase suggests a close functional relationship between arterivirus and coronavirus helicases. *J. Virol.*, **74**: 9586-9593
- Seybert A, Ziebuhr J. (2001)** Guanosine triphosphatase activity of the human coronavirus helicase. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **494**: 255-260
- Siddell SG. (1995)** *The Coronaviridae*. New York: Plenum Press.

- Singleton MR, Sawaya MR, Ellenberger T, Wigley DB. (2000)** Crystal structure of T7 gene 4 ring helicase indicates a mechanism for sequential hydrolysis of nucleotides. *Cell*, **101**: 589-600
- Singleton MR, Wigley DB. (2002)** Modularity and specialization in superfamily 1 and 2 helicases. *J. Bacteriol.*, **184**: 1819-1826
- Snijder EJ, Bredenbeek PJ, Dobbe JC, Thiel V, Ziebuhr J, Poon LL, Guan Y, Rozanov M, Spaan WJ, Gorbalenya AE. (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**: 991-1004
- Snijder EJ, den Boon JA, Bredenbeek PJ, Horzinek MC, Rijnbrand R, Spaan WJ. (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**: 4535-4542
- Sola I, Moreno JL, 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**: 2506-2516
- Story RM, Li H, Abelson JN. (2001)** Crystal structure of a DEAD box protein from the hyperthermophile *Methanococcus jannaschii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**: 1465-1470
- Stracevic D., Dalal S., Jaeger J., Sweasy JB. (2005)** The hydrophobic hinge region of rat DNA polymerase beta is critical for substrate binding pocket geometry. *J. Biol. Chem.*, **280**: 28388-28393
- Sturman LS, Holmes KV, Behnke J. (1980)** Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. *J. Virol.*, **33**: 449-462
- Subramanya HS, Bird LE, Brannigan JA, Wigley DB. (1996)** Crystal structure of a DExx box DNA helicase. *Nature*, **384**: 379-383
- Suzich JA, Tamura JK, Palmer-Hill F, Warrenner P, Grakoui A, Rice CM, Feinstone SM, Collett MS. (1993)** Hepatitis C virus NS3 protein polynucleotide-stimulated nucleoside triphosphatase and comparison with the related pestivirus and flavivirus enzymes. *J. Virol.*, **67**: 6152-6158
- Tanner NK, Linder P. (2001)** DExD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions. *Mol. Cell.*, **8**: 251-262
- Teterina NL, Kean KM, Gorbalenya AE, Agol VI, Girard M. (1992)** Analysis of the functional significance of amino acid residues in the putative NTP-binding pattern of the poliovirus 2C protein. *J. Gen. Virol.*, **73**: 1977-1986
- Tooze J, Tooze SA. (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**: 203-212
- Tyrell DA, Almeida JD, Berry DM, Cunningham CH, Hamre D, Hofstad MS, Mallucci L, McIntosh K. (1968)** Coronaviruses. *Nature (London)*, **220**: 650

- Umemura Y, Ishiduka T, Yamamoto R, Esaka M. (2004)** The Dof domain, a zinc finger DNA-binding domain conserved only in higher plants, truly functions as a Cys2/Cys2 Zn finger domain. *Plant J.*, **37**: 741-749
- Umezu K, Nakayama K, Nakayama H. (1990)** Escherichia coli RecQ protein is a DNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 5363-5367
- van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, Wertheim-van Dillen PM, Kaandorp J, Spaargaren J, Berkhout B. (2004)** Identification of a new human coronavirus. *Nat. Med.*, **10**: 368-373
- van Dinten LC, den Boon JA, Wassenaar AL, Spaan WJ, Snijder EJ. (1997)** An infectious arterivirus cDNA clone: identification of a replicase point mutation that abolishes discontinuous mRNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 991-996
- van Dinten LC, van Tol H, Gorbalenya AE, Snijder EJ. (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**: 5213-5223
- van Dinten LC, Wassenaar AL, Gorbalenya AE, Spaan WJ, Snijder EJ. (1996)** Processing of the equine arteritis virus replicase ORF1b protein: identification of cleavage products containing the putative viral polymerase and helicase domains. *J. Virol.*, **70**: 6625-6633
- van Marle G, Dobbe JC, Gultyaev AP, Luytjes W, Spaan WJ, Snijder EJ. (1999)** Arterivirus discontinuous mRNA transcription is guided by base pairing between sense and antisense transcription-regulating sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 12056-12061
- Vasiljeva L, Merits A, Auvinen P, Kaariainen L. (2000)** Identification of a novel function of the alphavirus capping apparatus. RNA 5'-triphosphatase activity of Nsp2. *J. Biol. Chem.*, **275**: 17281-17287
- Velankar SS, Soutanas P, Dillingham MS, Subramanya HS, Wigley DB. (1999)** Crystal structures of complexes of PcrA DNA helicase with a DNA substrate indicate an inchworm mechanism. *Cell*, **97**: 75-84
- Vennema H, Godeke GJ, Rossen JW, Voorhout WF, Horzinek MC, Opstelten DJ, Rottier PJ. (1996)** Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *EMBO J.*, **15**: 2020-2028
- Vijgen L, Keyaerts E, Moes E, Thoelen I, Wollants E, Lemey P, Vandamme AM, Van Ranst M. (2005)** Complete genomic sequence of human coronavirus OC43: molecular clock analysis suggests a relatively recent zoonotic coronavirus transmission event. *J. Virol.*, **79**: 1595-1604
- Vlasak R, Luytjes W, Spaan W, Palese P. (1988)** Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 4526-4529
- von Hippel PH, Delagoutte E. (2001)** A general model for nucleic acid helicases and their "coupling" within macromolecular machines. *Cell*, **104**: 177-190

- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. (1982)** Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.*, **1**: 945-951
- Warrener P, Collett MS. (1995)** Pestivirus NS3 (p80) protein possesses RNA helicase activity. *J. Virol.*, **69**: 1720-1726
- Warrener P, Tamura JK, Collett MS. (1993)** RNA-stimulated NTPase activity associated with yellow fever virus NS3 protein expressed in bacteria. *J. Virol.*, **67**: 989-996
- Wengler G, Wengler G. (1993)** The NS 3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity. *Virology*, **197**: 265-273
- Williams RK, Jiang GS, Holmes KV. (1991)** Receptor for mouse hepatitis virus is a member of the carcinoembryonic antigen family of glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 5533-5536
- Wong I, Chao KL, Bujalowski W, Lohman TM. (1992)** DNA-induced dimerization of the Escherichia coli rep helicase. Allosteric effects of single-stranded and duplex DNA. *J. Biol. Chem.*, **267**: 7596-7610
- Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, Wong BH, Poon RW, Cai JJ, Luk WK, Poon LL, Wong SS, Guan Y, Peiris JS, Yuen KY. (2005)** Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J. Virol.*, **79**: 884-895
- Xu HY, Lim KP, Shen S, Liu DX. (2001)** Further identification and characterization of novel intermediate and mature cleavage products released from the ORF 1b region of the avian coronavirus infectious bronchitis virus 1a/1b polyprotein. *Virology*, **288**: 212-222
- Yao N, Hesson T, Cable M, Hong Z, Kwong AD, Le HV, Weber PC. (1997)** Structure of the hepatitis C virus RNA helicase domain. *Nat. Struct. Biol.*, **4**: 463-467
- Yao N, Reichert P, Taremi SS, Prosis WW, Weber PC. (1999)** Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase. *Structure Fold Des.*, **7**: 1353-1363
- Yeager CL, Ashmun RA, Williams RK, Cardellicchio CB, Shapiro LH, Look AT, Holmes KV. (1992)** Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature*, **357**: 420-422
- Yoshida H. (2001)** The ribonuclease T1 family. *Methods Enzymol.*, **341**: 28-41
- Zhang J, Dyer KD, Rosenberg HF. (2002)** RNase 8, a novel RNase A superfamily ribonuclease expressed uniquely in placenta. *Nucleic Acids Res.*, **30**: 1169-1175
- Zhang X, Liao CL, Lai MM. (1994)** Coronavirus leader RNA regulates and initiates subgenomic mRNA transcription both in trans and in cis. *J. Virol.*, **68**: 4738-4746

Ziebuhr J, Siddell SG. (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**: 177-185

Ziebuhr J. (2005) The coronavirus replicase. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **287**: 57-94

Ziebuhr J, Snijder EJ, Gorbalenya AE. (2000) Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *J. Gen. Virol.*, **81**: 853-879

Zuniga S, Sola I, Alonso S, Enjuanes L. (2004) Sequence motifs involved in the regulation of discontinuous coronavirus subgenomic RNA synthesis. *J. Virol.*, **78**: 980-994

Zuo Y, Deutscher MP. (2001) Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Res.*, **29**: 1017-1026

10 Veröffentlichungen

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

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

Ivanov KA, 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.

Ivanov KA, Thiel V, Dobbe JC, van der Meer Y, Snijder EJ, Ziebuhr J. (2004) Multiple enzymatic activities associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus helicase. *J Virol*, 78(11):5619-32.

Thiel V, **Ivanov KA**, Putics A, Hertzog T, Schelle B, Bayer S, Weissbrich B, Snijder EJ, Rabenau H, Doerr HW, Gorbalenya AE, Ziebuhr J. (2003) Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J Gen Virol*, 84(9):2305-15.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Konstantin Ivanov
Geburtsdatum: 24.03.1970
Geburtsort: Omsk
Geburtsland: Rußland
Staatsangehörigkeit: russisch

Ausbildung:

seit 2001 Universität Würzburg, Biologische Fakultät,
Institut für Virologie und Immunbiologie,
Würzburg, Deutschland
Doktorand

1987 - 1994 Universität Novosibirsk, Naturwissenschaftliche Fakultät,
Biochemische Abteilung,
Novosibirsk, Rußland
Diplomthema: Modellsysteme für DNA-Reparaturenzyme
Grad: Diplom-Chemiker

1985 - 1987 Physikalisch-Mathematisches Gymnasium Nr.165
an der Universität Novosibirsk
Novosibirsk, Rußland
Abschlusszeugnis

1980 - 1985 Sekundarschule Nr.11, Omsk, Rußland
Abschlusszeugnis

1977 - 1980 Grundschule Nr.11, Omsk, Rußland
Abschlusszeugnis

Arbeitsverhältnisse:

seit 2001 **Doktorand**, Universität Würzburg, Biologische Fakultät,
Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg, Deutschland
Arbeitsgruppe von PD Dr. John Ziebuhr

1998 - 2001 **Junior Research Scientist**, Institut für Biochemie, Sibirische
Abteilung der Russischen Wissenschafts-Akademie,
Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Olga I. Lavrik
Thema: DNA-bindungsaktivität der Phe-tRNA-Synthetase aus *T. thermophilus*

1994 - 1997 **Junior Research Scientist**, Institut für Biochemie, Sibirische
Abteilung der Russischen Wissenschafts-Akademie,
Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Georgy A. Nevinsky
Thema: Modellsysteme für die biochemische Charakterisierung von DNA-
Reparaturenzyme