

**Expression und Reinigung der SARS-Coronavirus-M^{pro} und
deren Co-Kristallisation mit spezifischen Inhibitoren**



DISSERTATION

**ZUR ERLANGUNG DES NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES DER
JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG**

vorgelegt von

Diplom-Biologe Martin Stempka

aus Hannover

Würzburg 2011

Eingereicht am: 04.04.2011

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Würzburg.

1. Gutachter: Prof. Dr. Tanja Schirmeister

2. Gutachter: Prof. Dr. Caroline Kisker

der Dissertation.

1. Prüfer: Prof. Dr. Tanja Schirmeister

2. Prüfer: Prof. Dr. Caroline Kisker

3. Prüfer: Prof. Dr. Christoph Sotriffer

des öffentlichen Promotionskolloquiums.

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums: 24.05.2011

Doktorurkunde ausgehändigt am:

III

Die vorliegende Dissertation wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Tanja Schirmeister von November 2006 bis Dezember 2010 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg angefertigt.

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Posterpräsentationen:

SCHILLER, M., STEMPKA, M., YE, Q., KOSSNER, M., BAUMANN, K., ZIEBUHR, J., SCHIRMEISTER, T. (2007)

Antiviral activity of SARS coronavirus main protease inhibitors.

5th General Meeting of the International Proteolysis Society, Patras, Greece.

SCHILLER, M., STEMPKA, M., YE, Q., KOSSNER, M., BAUMANN, K., ZIEBUHR, J., SCHIRMEISTER, T. (2007)

Antiviral activity of SARS coronavirus main protease inhibitors.

Chem-SyStM (Chemie-Symposium der Studierenden Mainfrankens), Würzburg.

STEMPKA, M., DIETZEL, U., KUPER, J., YE, Q., SCHNEIDER, T., KAEPLER, U., SCHMITZ, W., ZIEBUHR, J., SCHIRMEISTER, T., KISKER, C. (2009)

Expression and purification of the SARS coronavirus main protease and its co-crystallization with specific inhibitors.

5th Joint Ph.D Students Meeting of the Collaborative Research Centers SFB 630, 544, Heidelberg.

DIETZEL, U., STEMPKA, M., SCHIRMEISTER, T., KISKER, C. (2010)

Structure based drug design on cysteine proteases from *Trypanosoma brucei* and SARS coronavirus.

6th Joint Ph.D Students Meeting of the Collaborative Research Centers SFB 630, 544 and 766, Ellwangen.

IV

Während der Promotionszeit entstandene Publikationen:

MACHON, U., BUECHOLD, C., STEMPKA, M., SCHIRMEISTER, T., GELHAUS, C., LEIPPE, M., GUT, J., ROSENTHAL, P. J., KISKER, C., LEYH, M., SCHMUCK, C. (2009)

On-bead screening of a combinatorial fumaric acid derived peptide library yields antiplasmodial cysteine protease inhibitors with unusual peptide sequences.

J Med Chem **52**, 5662–5672.

BREUNING, A., DEGEL, B., SCHULZ, F., BUECHOLD, C., STEMPKA, M., MACHON, U., HEPPNER, S., GELHAUS, C., LEIPPE, M., LEYH, M., KISKER, C., RATH, J., STICH, A., GUT, J., ROSENTHAL, P. J., SCHMUCK, C., SCHIRMEISTER, T. (2010)

Michael acceptor based antiplasmodial and antitrypanosomal cysteine protease inhibitors with unusual amino acids.

J Med Chem **53**, 1951–1963.

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Promotion auf vielfältige Art und Weise unterstützt haben.

Im Besonderen bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Tanja Schirmeister für die Bereitstellung des interessanten, praxisorientierten Themas und ihr stetes Interesse am Weiterkommen meiner Arbeit sowie für ihre herausragende Betreuung. Sie ermöglichte mir eine schnelle Integration in den Arbeitskreis und ihr immerwährendes Engagement, die weiterführenden Hinweise, ihre konstruktive Kritik und Anregungen sowie die großzügige Unterstützung waren mir eine große Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Caroline Kisker ohne deren Kooperation mit Frau Prof. Dr. Tanja Schirmeister diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Desweiteren danke ich Frau Prof. Dr. Caroline Kisker für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Weiterhin danke ich folgenden Personen für ihre Unterstützung:

Prof. Dr. John Ziebuhr, Queens University, Belfast, für die Überlassung des Expressionsvektors zur Herstellung der SARS-Coronavirus-M^{pro}.

Prof. Dr. Knut Baumann, Markus Kossner und Stephanie Ludewig, TU Braunschweig, für die Zusammenarbeit am SARS-Projekt und ihre durchgeführten *docking*-Experimente zur SARS-Coronavirus-M^{pro}.

Dr. Werner Schmitz, Biozentrum, Würzburg, für seine Hilfe bei den massenspektrometrischen Messungen an der SARS-Coronavirus-M^{pro}.

Conny Heindl für die Durchführung der Enzymassays und ihre hervorragenden Kuchen, die so manche Kaffeepause bereichert haben

VI

und meiner ehemaligen Wahlpflichtpraktikantin Verena Jachmann für ihre Hilfe bei der Reinigung und Kristallisation der SARS-Coronavirus-M^{pro}.

Ein besonderer Dank gilt meinem Laborpartner Uwe Dietzel für seine stete Hilfsbereitschaft und Zusammenarbeit am SARS-Projekt. Auch möchte ich allen Diplomanden, Doktoranden und Mitarbeitern des AK Kisker für die freundliche Aufnahme in ihren Arbeitskreis und Arbeitsalltag danken.

Neben den bereits genannten danke ich allen ehemaligen und aktuellen Kollegen im AK Schirmeister, von denen viele meine Freunde geworden sind:

Alexander Breuning, Verena Buback, Dr. Christian Büchold, Dr. Björn Degel, Philipp Fey, Dr. Thomas Pfeuffer, Matthias Rappold, Caroline Schad, Roswitha Scheblein, Dr. Markus Schiller, Magdalena Schneider, Thomas Schneider, Swarna Oli, Paula Tabares, Dr. Radim Vičik, Thilo Waag, Constanze Waltenberger, Armin Welker, Hongmei Wu und Qing Ye. Auch möchte ich ihnen für die zahlreichen fachlichen wie privaten Diskussionen und Gespräche und für die - neben dem nicht immer einfachen und erfolgreichen Laboralltag - durchgeführten kulturellen Aktivitäten im weitesten Sinne herzlich danken, an denen ich teilnahm.

Dank auch an meine Assistenten-Kollegen Alexander Breuning, Dr. Tim Göbel, Caroline Schad, Dr. Markus Schiller und Thomas Schneider für die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung bei der Praktikumsbetreuung der Pharmazeuten/innen im 2. Semester, sowie an Prof. Dr. Christoph Sotriffer für die Praktikumsleitung.

Nicht zuletzt danke ich den ehemaligen Pharmaziestudenten/innen des 2. Semesters, die ich im Praktikum und im physikalisch-chemischen Großversuch betreut und im Mittelkolloquium geprüft habe und die mich somit während meiner Doktorarbeit begleiteten. Ich bin davon überzeugt, dass sie in dieser Zeit etwas dazugelernt und für ihr weiteres Leben mitgenommen haben.

VII

Der DFG sei für die gewährte finanzielle Unterstützung im Rahmen meiner Promotionszeit gedankt.

Prof. Dr. Wilhelm Conrad Röntgen danke ich für seine, nach ihm benannte, am 8. November 1895 in Würzburg entdeckte Strahlung, welche nunmehr unentbehrlich für die Strukturbestimmung von Proteinen geworden ist.

Ein großes Dankeschön geht auch an alle meine kritischen Korrekturleser.

Zum Schluss gilt ein besonderer Dank meinen Eltern, die mich während meiner Arbeit unterstützten und mir überhaupt erst dieses Studium ermöglichten.

*Allen gewidmet, von denen ich lernte.
(Günter Grass)*

*„Es ist die Geschichte – nicht der Erzähler.“
(Stephen King)*

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Proteasen	1
1.1.1 Vorkommen, Funktion und Bedeutung der Cysteinproteasen	1
1.1.2 Struktur der Cysteinproteasen am Beispiel des Papains	4
1.1.3 Katalysemechanismus der Cysteinproteasen am Beispiel des Papains.....	5
1.1.4 Inhibition von Cysteinproteasen.....	7
1.2 Coronaviren und SARS (<i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i>) –Coronavirus	8
1.2.1 Taxonomie der Coronaviren.....	8
1.2.2 Verbreitung und Struktur der Coronaviren	10
1.2.3 Coronavirusinfektionen und SARS	11
1.2.4 Infektionszyklus des SARS-Coronavirus und dessen Genomorganisation.....	13
1.2.5 Bedeutung und Struktur der SARS-Coronavirus-M ^{pro} (3CL ^{pro})	16
1.3 Zielsetzung	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Geräte	20
2.1.2 Chemikalien	21
2.1.3 Chromatographiematerialien	21
2.1.4 Enzyme.....	21
2.1.5 Medien, Lösungen und Puffer	21
2.1.6 Bakterienstämme	24
2.1.7 Vektoren	24

2.1.8 Standards und Kits	24
2.1.9 Sonstige Materialien.....	25
2.1.10 Software	25
2.2 Methoden.....	26
2.2.1 Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden.....	26
<i>2.2.1.1 Anzucht von Bakterienkulturen</i>	<i>26</i>
<i>2.2.1.2 Lagerung der Bakterienkulturen</i>	<i>26</i>
<i>2.2.1.3 Messung des Bakterienwachstums</i>	<i>26</i>
<i>2.2.1.4 Herstellung chemisch kompetenter Zellen</i>	<i>26</i>
<i>2.2.1.5 Transformation in E. coli</i>	<i>26</i>
<i>2.2.1.6 Plasmid-DNA-Isolierung aus E. coli.....</i>	<i>27</i>
<i>2.2.1.7 DNA-Quantifizierung</i>	<i>27</i>
<i>2.2.1.8 Expression von rekombinanten Proteinen in E. coli.....</i>	<i>27</i>
<i>2.2.1.9 Aufschluss von E. coli-Zellen</i>	<i>28</i>
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden	28
<i>2.2.2.1 Protein-Quantifizierung</i>	<i>28</i>
<i>2.2.2.2 Proteinnachweis mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....</i>	<i>28</i>
<i>2.2.2.3 Färbung mit Coomassie-Blau R-250.....</i>	<i>29</i>
<i>2.2.2.4 Konzentrierung von Proteinen mittels Ultrafiltration.....</i>	<i>29</i>
<i>2.2.2.5 Nickel-NTA-Affinitätschromatographie</i>	<i>30</i>
<i>2.2.2.6 Gelfiltration.....</i>	<i>31</i>
<i>2.2.2.7 ESI (Elektrospray-Ionisation)-Massenspektrometrie und Bromcyanspaltung</i>	<i>32</i>
<i>2.2.2.8 FRET-Assay zur Bestimmung der Hemmung der SARS-CoV-M^{pro}</i>	<i>33</i>

2.2.3 Kristallisation von Proteinen.....	34
2.2.3.1 Prinzip und Durchführung der Proteinkristallisation.....	34
2.2.3.2 Co-Kristallisation von Proteinen und Tränken der Kristalle (soaking).....	37
2.2.3.3 Seeding.....	37
2.2.3.4 Aufnahme von Röntgenbeugungsdaten.....	38
2.2.3.5 Aufnahme kristallographischer Datensätze mittels Synchrotronbestrahlung.....	39
2.2.3.6 Grundlagen der kristallographischen Datenauswertung.....	39
2.2.3.7 Molekularer Ersatz.....	40
2.2.3.8 Ermittlung von R-Faktoren.....	41
2.2.3.9 Datenauswertung, Strukturlösung, Modellbau und Verfeinerung.....	42
3 Ergebnisse.....	43
3.1 Expression und chromatographische Reinigung der SARS-CoV-M^{pro}.....	43
3.1.1 Expression der SARS-CoV-M ^{pro}	43
3.1.2 Chromatographische Reinigung der SARS-CoV-M ^{pro}	44
3.1.2.1 Ni-NTA-Affinitätschromatographie.....	44
3.1.2.2 Gelfiltration.....	45
3.2 Massenspektrometrische Untersuchungen zur SARS-CoV-M^{pro}.....	47
3.2.1 Massenspektrum der SARS-CoV-M ^{pro}	47
3.2.2 Bindungsverhalten der einzelnen Inhibitoren an die SARS-CoV-M ^{pro}	48
3.2.3 Bromcyan-Verdau der mit UK-VI-1g inkubierten SARS-CoV-M ^{pro}	55
3.3 Kristallisation der SARS-CoV-M^{pro}.....	56
3.3.1 Apoprotein-Kristallisation der SARS-CoV-M ^{pro}	56
3.3.2 Co-Kristallisation der SARS-CoV-M ^{pro} mit spezifischen Inhibitoren.....	60

3.3.2.1 Co-Kristallisation und Strukturanalyse der SARS-CoV-M ^{pro} mit TS174	60
3.3.2.2 Co-Kristallisation und Strukturanalyse der SARS-CoV-M ^{pro} mit IISBT	62
4 Diskussion	67
4.1 Reinigung der SARS-CoV-M^{pro} und weiterführende ESI-MS-Experimente	67
4.1.1 Reinigung der SARS-CoV-M ^{pro}	67
4.1.2 ESI-MS-Experimente	68
4.2 Co-Kristallisation der SARS-CoV-M^{pro} mit spezifischen Inhibitoren	77
4.2.1 Co-Kristallisation und Strukturanalyse der SARS-CoV-M ^{pro} mit TS174	77
4.2.2 Co-Kristallisation und Strukturanalyse der SARS-CoV-M ^{pro} mit IISBT	78
4.3 Ausblick	84
5 Zusammenfassung	85
6 Summary	88
7 Literaturverzeichnis	91
8 Anhang	104
8.1 Abkürzungsverzeichnis und Einheiten.....	104
8.2 Proteinmarker	106
8.3 Vektorkarte.....	106
8.4 Inhibitorenliste	107
9 Veröffentlichungen	110

1 Einleitung

1.1 Proteasen

Bei Proteasen handelt es sich um Enzyme, welche die Spaltung von Peptidbindungen katalysieren. Entsprechend IUBMB- (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) oder EC- (*Enzyme Commission number*) System gehören sie zu der Gruppe der Hydrolasen (EC 3.4).

Eine weiterführende Unterteilung erfolgt nach der Position der jeweiligen Spaltstelle des Peptids, welches als Substrat dient, in Endopeptidasen (EC 3.4.11-19) und Exopeptidasen (EC 3.4.21-99). Innerhalb dieser Untergruppen wiederum teilt man die Proteasen je nach Mechanismus der Katalyse in Aspartat-, Cystein-, Metallo-, Serin- und Threoninproteasen ein.

Ein neben der oben genannten Einteilung verwendetes System (MEROPS, Rawlings *et al.*, 2004) fasst Enzyme zu Familien zusammen, die aufgrund ähnlicher Aminosäuresequenz als weitgehend homolog eingestuft werden können. Somit gehören Familien, welche sich genetisch aus einem Ur-Protein entwickelt haben, zu einem sogenannten Clan, der dann nach einem Prototyp-Enzym benannt wird. Familien eines Clans ähneln sich bezüglich der Tertiär- bzw. Quartärstrukturen (Rawlings *et al.*, 1993). Jeder Clan erhält als Bezeichnung zwei Buchstaben: der erste bezeichnet den jeweiligen Katalysemechanismus (z.B. C für Cystein), der zweite wird fortlaufend vergeben. Die Cysteinproteasen werden in der MEROPS-System-Datenbank^{*)} in zehn Clans unterteilt. Dem Papain-Clan (Clan CA) gehören die meisten der bekannten Cysteinproteasen an.

1.1.1 Vorkommen, Funktion und Bedeutung der Cysteinproteasen

Cysteinproteasen sind sowohl bei Eukaryonten (Pflanzen, Pilze, Protozoen und Tiere) als auch bei Prokaryonten und Viren weit verbreitet. Wichtige Cysteinproteasen, die als Angriffspunkte für Arzneistoffe in Frage kommen, zeigt Tabelle 1.1.

Im menschlichen Organismus sind sie an vielen wichtigen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt und nehmen somit eine bedeutende Stellung ein, die über die bisher angenommene hinausgeht, welche nur einen allgemeinen unspezifischen Proteinabbau in Betracht zieht. Viele der humanen Cysteinproteasen gehören zum Clan CA.

^{*)} URL: <http://www.merops.sanger.ac.uk/>

1 Einleitung

Dieser wird in die Familie C1, die lysosomalen Cathepsine und die Familie C2, die cytoplasmatischen Calpaine unterteilt.

Tab. 1.1: Wichtige Cysteinproteasen als pharmazeutische Targets nach Clans und Familien geordnet.

Clan	Fam.	Protease	aktives Zentrum	Spezifität des Enzyms	Herkunft
CA	C1	Papain		S2: lipophil	<i>Carica papaya</i>
		Cathepsin B		S2: Arg	<i>Homo sapiens</i>
		TbCatB		S2': Pro	<i>Trypanosoma brucei</i>
		Cathepsin L, S, K, P,...		S2: lipophil	<i>Homo sapiens</i>
		Falcipain 1, 2a/b, 3		S2: Arg	<i>Plasmodium falciparum</i>
		Rhodesain		S2: lipophil	<i>T. b. rhodesiense</i>
		Cruzain	Cys ⁻ , HisH ⁺	S2: lipophil	<i>Trypanosoma cruzi</i>
	C2	Calpain 2		S2: Tyr, Met, Leu, Val, Arg	<i>Homo sapiens</i>
	C10	Streptopain		S2: lipophil	<i>Streptococcus pyogenes</i>
	C47	Staphopain A + B		S2: lipophil	<i>S. aureus</i>
CD	C11	Clostripain	Cys ⁻ , HisH ⁺	S1: Arg	<i>Clostridium histolyticum</i>
	C14	Caspase 1 (ICE)		S1: Asp	<i>Homo sapiens</i>
CL	C60	Sortase	Cys, His, Arg	LPXT G	<i>S. aureus</i>
PA	C3A-G	Picornain 3C (Chymotrypsin-ähnliche Faltung)	Cys, His	Gln Gly	Hepatitis A-Virus, humanes Poliovirus Typ 1
		C30	TGEV-M ^{pro}	Cys, His	LQ A
		SARS-CoV-M ^{pro}		LQ A	humanes SARS-Coronavirus

SARS-CoV-M^{pro}: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Hauptprotease; ||: Spaltstelle im Peptid; TGEV-M^{pro}: Transmissible Gastroenteritis Virus Hauptprotease; *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*; *T. b.*: *Trypanosoma brucei*.

Bei einer Fehlregulation der Expression und einer erhöhten katalytischen Aktivität dieser Enzyme kann es zum Abbau von körpereigenen Strukturen kommen. Eine wichtige Rolle

1 Einleitung

spielen hierbei z.B. die lysosomalen Cathepsine. Im Tumorgewebe konnte man eine erhöhte Cathepsin B-Expression und –Sekretion feststellen und deshalb geht man davon aus, dass Cathepsin B eine wichtige Bedeutung bei der Metastasierung hat (Frosch *et al.*, 1999).

Cysteinproteasen werden auch von Parasiten genutzt, um in die Wirtszelle einzudringen und sich dort zu vermehren. Weiterhin schützen solche Proteasen den Parasiten vor der Immunantwort des Wirtes. Bei Plasmodien, den Erregern der Malaria, dienen die sogenannten Falcipaine dazu, das menschliche Hämoglobin abzubauen.

Eine Auswahl an wichtigen humanen und parasitären Cysteinproteasen und zugehörige physiologische und pathophysiologische Bedeutungen sind in Tabelle 1.2 zusammengefasst (Otto *et al.*, 1997; Brömme *et al.*, 2002; Lecaille *et al.*, 2002; Leung-Toung *et al.*, 2002; Turk *et al.*, 2000).

Tab. 1.2: Humane und parasitäre Cysteinproteasen und ihre physiologischen und pathophysiologischen Bedeutungen.

Beteiligte(s) Enzym(e)	Physiologische Funktion	Pathophysiologischer Zustand
Humane Enzyme		
Cathepsin B + L	unspezifischer Proteinabbau, Endo- und Exopeptidaseaktivität (nur CB), TNF- α -vermittelte Apoptose von Hepatozyten, Hormonreifung	Tumorinvasion und Metastasierung, muskuläre Dystrophie, chronische Entzündungen
Cathepsin K (B + L)	Knochenresorption in Osteoklasten, Knorpelabbau in Gelenkfibroblasten	Beteiligung an Osteoporose, Beteiligung an Rheumatoider Arthritis
Cathepsin S + F + V	Abbau von Proteinen bei der Antigenpräsentation	Asthma, Autoimmunerkrankungen
Cathepsin S + K	Elastin-Abbau	Begünstigung der Arteriosklerose
Calpaine, Caspasen	Apoptose	Schlaganfall, Herzinfarkt, Katarakt, Alzheimer
Parasitäre Cysteinproteasen		
Protozoen		
Falcipaine 1-3 (<i>Plasmodium spec.</i>)		Malaria
Cruzipain (<i>Trypanosoma cruzi</i>)		Chagas-Krankheit
Rhodesain (<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>)		Afrikanische Schlafkrankheit
CPA, CPB (CL-like), CPC (CB-like) (<i>Leishmania spec.</i>)		Leishmaniose
23 Cysteinproteasen (<i>Trichomonas vaginalis</i>)		Trichomoniasis
Amoebapain, Histolysin (<i>Entamoeba histolytica</i>)		Amöbenruhr
Plathelminthen (Plattwürmer)		
SmCL1, SmCL2 (CL-like), Sm31(CB-like) (<i>Schistosoma spec.</i>)		Bilharziose
Nematoden (Rundwürmer)		
Cathepsin L-like: TCCP1 (<i>Toxocara canis</i>)		Toxokariose

1.1.2 Struktur der Cysteinproteasen am Beispiel des Papains

Papain ist ein Enzym, das in einer hohen Konzentration in der noch grünlichen Schale und den Kernen der Obstfrucht Papaya vorkommt und auch aus ihr gewonnen werden kann (Konno *et al.*, 2004). Die Proteinstruktur des Papains wurde als eine der ersten im Jahr 1968 aufgeklärt und somit stellte es einen Prototyp für die Erforschung des Katalysemechanismus von Cysteinproteasen dar (Drenth *et al.*, 1968); seine vollständige Aminosäuresequenz wurde schließlich 1969 entschlüsselt.

Wie alle Cysteinproteasen wird auch das Papain, gehörig zum Clan CA, zunächst als Präproenzym translatiert. Das Signal-Peptid, das dafür verantwortlich ist, dass dieses Protein in das Endoplasmatische Retikulum transportiert wird, hat eine Länge von 10 bis 20 Aminosäuren und wird erst nach erfolgter Einschleusung im Endoplasmatischen Retikulum abgespalten. Für die Stabilität des Proteins, die korrekte Faltung des aktiven Zentrums und den Transport in das endosomale-lysosomale Kompartiment ist die Prodomäne von großer Bedeutung (Brömme *et al.*, 2002). Bei der überwiegenden Anzahl der Cysteinproteasen besitzt sie eine Größe von 95 bis 110 Aminosäuren. Außerdem hat die Prodomäne die Aufgabe, die katalytische Domäne der Protease zu hemmen, bevor das Enzym den Zielort erreicht hat. Zur Inhibition der katalytischen Aktivität bindet die Propeptdikette in entgegengesetzter Orientierung zur Bindung des eigentlichen Substrats in den Bindungsspalt. Wenn die Prodomäne abgespalten wird, bleibt die katalytische Domäne übrig, welche eine Größe von 220 bis 260 Aminosäuren hat.

In Abbildung 1.1 ist die dreidimensionale Struktur des Papains als Vertreter der Cysteinproteasen des Clans CA, Familie C1 wiedergegeben. Das Enzym besteht aus zwei Domänen, einer L- und einer R-Domäne, die an der Oberseite einen V-förmigen Spalt bilden, welcher das aktive Zentrum enthält und in den das Substrat gebunden wird. Die linke Domäne (L-Domäne) enthält das Cys25 der katalytischen Diade. Cys25 befindet sich am Ende einer α -Helix, die aus ca. 30 Aminosäuren besteht. Die rechte Domäne (R-Domäne) besitzt das katalytisch aktive His159 (Turk *et al.*, 2003).

1 Einleitung

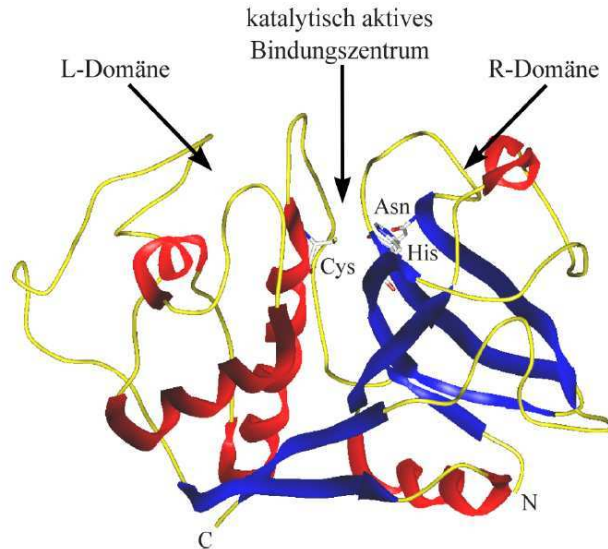
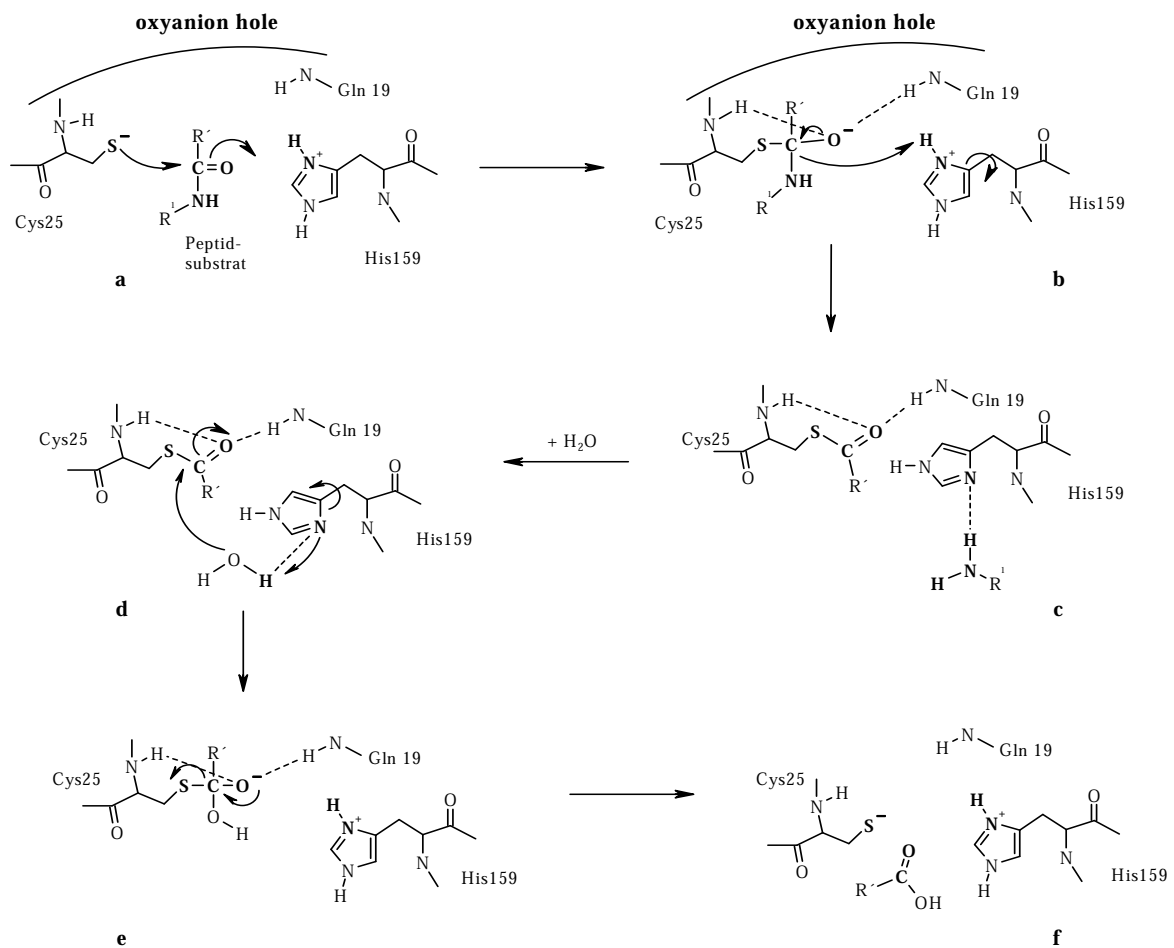


Abb. 1.1: Tertiärstruktur des Papains (verändert, nach Kamphuis *et al.*, 1984).

1.1.3 Katalysemechanismus der Cysteinproteasen am Beispiel des Papains

Nachfolgend ist der vollständige Katalysemechanismus des Papains als Modellenzym für „Papain-Like“-Cysteinproteasen dargestellt (verändert, nach: Dissertation, Käßler, 2004):



1 Einleitung

Das aktive Zentrum aller Cysteinproteasen ist konserviert. Es besteht, wie oben schon erwähnt, aus Cys25 und His159 (Papain-Nummerierung). Desweiteren ist auch Asn175 – jedoch indirekt – an der Katalyse beteiligt (Lecaille *et al.*, 2002).

Die katalytische Diade wird durch eine Wasserstoffbrückenbindung zu Asn175 stabilisiert.

Im ersten Schritt der Katalyse kommt es zum nucleophilen Angriff des Thiolats an das Carboxyl-Kohlenstoffatom der zu spaltenden Peptidbindung (**a**).

Es entsteht somit eine negativ geladene, tetrahedrale, intermediäre Verbindung (**b**), die durch eine Tasche (auch „*oxyanion hole*“ genannt) aus Wasserstoffbrückendonatoren des Proteinrückgrates (beim Papain durch die Seitenkette von Gln19 und benachbarter Aminosäuren) stabilisiert wird.

Ausgehend von diesem tetrahedralen Zwischenprodukt wird ein acyliertes Enzym (Thioester) gebildet (**c**) und gleichzeitig die peptidische Bindung des Substrats gespalten.

Nun wird die acylierte Thiolgruppe der Cysteinprotease mittels Wasser hydrolysiert, wobei das Histidin als Base fungiert (**d**).

Letztlich erhält man durch die Abspaltung der Carboxyl-Funktion von der Thiolgruppe des Enzyms die regenerierte Cysteinprotease (**e+f**) (Otto *et al.*, 1997).

Das pH-Optimum vieler lysosomaler Cysteinproteasen befindet sich im sauren Bereich, im neutralen und schwach basischen Milieu hingegen werden sie schnell inaktiviert (Turk *et al.*, 1993).

Nach einer von Schechter und Berger aufgestellten Nomenklatur (Schechter *et al.*, 1967) werden die Aminosäuren des Substrats von der Spaltstelle aus in Richtung des N-Terminus als P1, P2, P3... usw., die in Richtung des C-Terminus als P1', P2', P3'... usw. bezeichnet.

Die Bindungstaschen - genannt „*subsites*“ - auf der Enzymseite werden je nach den Aminosäuren des Substrats, mit denen sie eine Bindung eingehen, analog als S1, S2... bzw. als S1', S2'... usw. gekennzeichnet. Diese Terminologie ist in Abbildung 1.2 dargestellt:

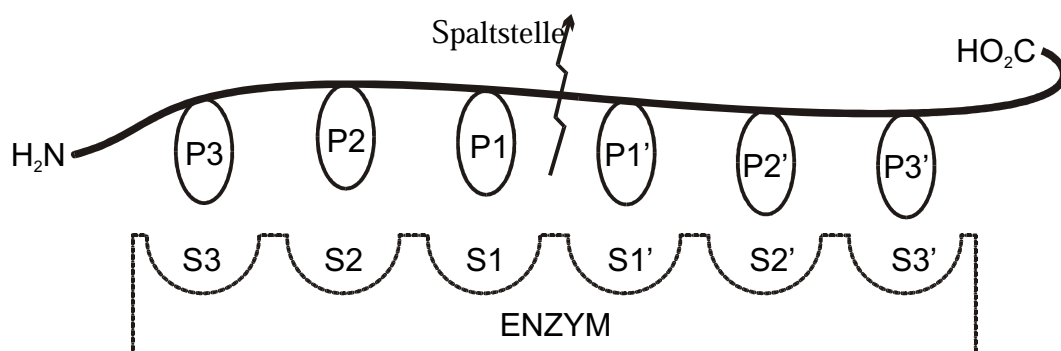


Abb. 1.2: Nomenklatur nach Schechter und Berger (verändert, nach Schechter *et al.*, 1967).

1.1.4 Inhibition von Cysteinproteasen

Im Allgemeinen unterscheidet man bei den Hemmstoffen der Cysteinproteasen zwischen den nicht-kovalenten und den kovalenten Inhibitoren. Es gibt nur wenige bekannte nicht-kovalente Inhibitoren wie z.B. die Gruppe der Peptidsulfone und Sulfonsäure-Derivate (Palmer *et al.*, 1996; Klaus *et al.*, 1996).

Kovalente, peptidische Inhibitoren, sowie die erst kürzlich gefundenen Pyrrol-Derivate und Triazinnitrile (siehe Abbildung 1.3) werden im Aufbau an das Substrat angepasst, um eine hohe Bindungsaffinität an das Enzym zu erreichen (Langolf *et al.*, 2011; Ehmke *et al.*, 2011). Zusätzlich ist für kovalente Inhibitoren eine sogenannte reaktive Kopfgruppe („warhead“) erforderlich. Die Peptidkette des Inhibitors dient als Erkennungssequenz und ahmt normalerweise das Substrat nach. Somit ist es möglich, die reaktive Kopfgruppe in das aktive Zentrum einzuschleusen. Ein Problem bei dieser Strategie stellt die große Ähnlichkeit der Inhibitor-Peptidkette mit der des Substratpeptids dar. Es kann somit leicht zu hydrolytischen Spaltungen des Peptids kommen und damit auch zu einer geringeren Bioverfügbarkeit. Daher versucht man ein abgewandeltes Peptidrückgrat zu synthetisieren, das Änderungen in der Aminosäuresequenz oder atypische Aminosäuren enthält, so dass man schließlich zu sogenannten Peptidomimetika gelangt.

Der elektrophile „warhead“, die reaktive Kopfgruppe, hat die Aufgabe, die Thiol-Funktion des aktiven Zentrums der Cysteinprotease zu blockieren und das Enzym zu inhibieren.

Bei kovalenten Inhibitoren von Cysteinproteasen unterscheidet man weiterhin irreversibel und reversibel hemmende Substanzen. Wenn man Aldehyde, Ketone, Nitrile oder α -Ketosäuren als reaktive Kopfgruppe einsetzt, kommt es zur Bildung eines Halbacetals-, -ketals bzw. Imidats und damit zu einer reversiblen Hemmung.

Bei der Inhibition der Protease durch Fluormethyl- oder Diazomethylketone, Epoxysuccinate, Aziridine, Acyloxymethylketone oder *O*-Acylhydroxamate kommt es zur Alkylierung oder Acylierung des Enzyms und somit zur irreversiblen Hemmung (Powers *et al.*, 2002).

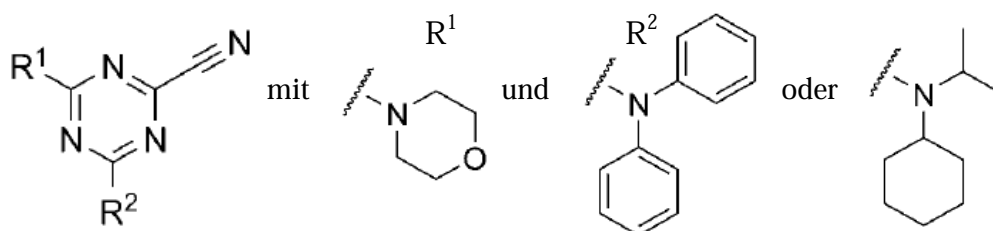


Abb. 1.3: Beispiele zweier Triazinnitrile als neue Inhibitoren von Cysteinproteasen (verändert, nach Ehmke *et al.*, 2011).

1.2 Coronaviren und SARS (*Severe Acute Respiratory Syndrome*) –Coronavirus

1.2.1 Taxonomie der Coronaviren

Die Isolierung von Coronaviren gelang erstmalig aus Hühnern 1937 durch Beaudette und Hudson (Beaudette und Hudson, 1937). Die ersten menschlichen Coronaviren wurden dann im Jahre 1965 von Tyrrell *et al.* entdeckt, die die Viren erstmals *in vitro* in einer Kultur von Flimmerepithelien humaner embryonaler Trachea kultivieren konnten (Tyrrell und Bynoe, 1965). Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Viruspartikel zeigte sich, dass sie von einer mit Proteinen assoziierten Membranhülle umgeben sind, durch die sie wie von einem „Strahlenkranz der Sonne“ (lat.: *corona* - sichtbarer Strahlenkranz der Sonne bei totaler Sonnenfinsternis) umgeben zu sein schienen (Almeida und Tyrrell, 1967; Berry *et al.*, 1964). Infolge dieser charakteristischen morphologischen Eigenschaft, welche sich eindeutig von den damals bekannten Viren abhob, fasste man sie zu einer neuen Virusfamilie mit dem Namen *Coronaviridae* zusammen (Almeida *et al.*, 1968). Die Familie der *Coronaviridae* umfasst nunmehr zwei Gattungen, *Coronavirus* und *Torovirus*. Im Jahr 1996 wurde durch das *International Committee for the Taxonomy of Viruses* diese Familie zusammen mit der Familie *Arteriviridae* in die Ordnung *Nidovirales* eingebunden (Cavanagh, 1997; Pringle, 1996). Als die sogenannten Okaviren mit den Vertretern *Gill-associated virus* und *Yellow head virus* entdeckt wurden, kam es zur Erweiterung der Ordnung um eine neuerschaffene Familie, der *Roniviridae* (Cowley *et al.*, 2000; Sittidilokratna *et al.*, 2002). Die Genomgröße und Virionmorphologie der Viren unterscheiden sich innerhalb der Ordnung *Nidovirales* zwar deutlich, dennoch ähneln sich ihre Vertreter bezüglich ihrer Genomorganisation und der Art der Replikation in vielen Gesichtspunkten (de Vries, 1997). Ein wichtiges Merkmal, worauf der Name der Ordnung hinweist, ist, dass alle Nidoviren im infizierten Wirt einen für sie charakteristischen Satz von 3'-coterminalen, subgenomischen mRNAs synthetisieren. Dieser Satz wird „*nested set*“ genannt.

In Tabelle 1.3 ist die taxonomische Klassifizierung der bisher bekannten Nidoviren und ihrer Wirte zusammenfassend dargestellt:

1 Einleitung

Tab. 1.3: Die Ordnung *Nidovirales* (verändert, nach: Dissertation, Putics, 2006).

Familie	Gattung	Spezies (englische Bezeichnung)	Wirt
<i>Arteriviridae</i>	<i>Arterivirus</i>	<i>Equine arteritis virus</i> (EAV)	Pferd
		<i>Lactate dehydrogenase-elevating virus</i> (LDV)	Schwein
		<i>Porcine respiratory and reproductive syndrome virus</i> (PRRSV)	Schwein
		<i>Simian hemorrhagic fever virus</i> (SHFV)	Affe
<i>Coronaviridae</i>	<i>Coronavirus</i>	Gruppe I	
		Ia	
		<i>Transmissible gastroenteritis virus</i> (TGEV)	Schwein
		<i>Canine coronavirus</i> (CCV)	Hund
		<i>Feline coronavirus/ Feline infectious peritonitis virus</i> (FIPV)	Katze
		Ib	
		<i>Human coronavirus 229E</i> (HCoV-229E)	Mensch
		<i>Porcine epidemic diarrhea virus</i> (PEDV)	Schwein
		<i>Human coronavirus NL63</i> (HCoV-NL63)	Mensch
		Gruppe II	
		IIa	
		<i>Bovine coronavirus</i> (BCoV)	Rind
		<i>Human coronavirus OC43</i> (HCoV-OC43)	Mensch
		<i>Human coronavirus HKU-1</i> (HCoV-HKU1)	Mensch
		<i>Murine hepatitis virus</i> (MHV)	Maus
<i>Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus</i> (HEV)	Schwein		
<i>Rat coronavirus/ Sialodacryoadenitis virus</i> (RCV)	Ratte		
IIb			
<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus</i> (SARS-CoV)	Mensch		
Gruppe III			
<i>Infectious bronchitis virus</i> (IBV)	Huhn		
<i>Turkey coronavirus</i> (TCoV)	Truthahn		
	<i>Torovirus</i>	<i>Equine torovirus/ Berne virus</i> (EToV)	Pferd
		<i>Bovine torovirus/ Breda virus</i> (BToV)	Rind
<i>Roniviridae</i>	<i>Okavirus</i>	<i>Yellow head virus</i> (YHV)	Garnele
		<i>Gill-associated virus</i> (GAV)	Garnele

1.2.2 Verbreitung und Struktur der Coronaviren

Nidoviren kommen in der Natur sehr häufig vor und sind weit verbreitet. Wirte der Arteri-, Toro- und Coronaviren stammen aus höheren Klassen der Wirbeltiere, wie Säugetiere und Vögel. Viren aus der Familie der *Roniviridae* hingegen befallen Arthropoden. Kürzlich wurde ein neues Coronavirus, welches aus *Blicca bjoerkna* (Güster) isoliert werden konnte, entdeckt und erweitert somit das Wirtsspektrum der Nidoviren, wodurch auch Fische als potentielle Wirte der Coronaviren in Frage kommen (Granzow *et al.*, 2001).

In den folgenden Abschnitten der Einleitung wird die Struktur der *Coronaviridae*, insbesondere die des SARS-Coronavirus, mit dem sich diese Arbeit beschäftigt, näher erläutert.

Bei den Coronaviren handelt es sich um kugelförmige, vielgestaltige Virionen, die einen Durchmesser von 100 bis 120 nm haben. Sie besitzen eine 27 bis 32 kb große, einzelsträngige RNA positiver Polarität. Das coronavirale RNA-Genom bildet zusammen mit dem Nukleokapsidprotein (N-Protein) ein Nukleokapsid mit helikaler Symmetrie. Immer mehr Untersuchungen deuten darauf hin, dass das N-Protein neben seiner Funktion als Strukturprotein auch eine wichtige Stellung in der viralen RNA-Synthese einnimmt (Almazan *et al.*, 2004; Schelle *et al.*, 2005). Das Nukleokapsid ist von einer Membranhülle (engl.: *envelope*) ummantelt, die von der Wirtszelle stammt und in die wenigstens drei weitere Proteine, das Membranprotein (M-Protein), das Hüllprotein (engl.: *envelope protein*, E-Protein) und das Oberflächenglykoprotein (engl.: *spike protein*, S-Protein) eingebettet sind (Ksiazek *et al.*, 2003). Das aminoternale Ende des M-Proteins ist durch O-Glykosylierung von Serin- bzw. Threonin-Seitenketten modifiziert, wobei das carboxyterminale Ende mit dem N-Protein interagiert, wodurch dann das Nukleokapsid an der Innenseite der Virushülle verankert wird (Holmes, 2001). Das E-Protein kommt in kleinen Mengen in den Virionen vor und ist zusammen mit dem M-Protein für das Ausknospen in den Golgi-Apparat (engl.: *virus budding*) verantwortlich (Holmes, 2001). Eine Funktion als mögliches Viroporin wird ebenfalls diskutiert (Madan *et al.*, 2005). S-Proteine entspringen als trommelschlegelförmige Trimere der Virusmembranoberfläche und somit kann man auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen eine *Corona* erahnen (siehe Abbildung 1.4). Das S-Protein existiert nicht nur in der Membranhülle der Coronaviren, sondern wird darüber hinaus auch an die Oberfläche der Wirtszelle transportiert. Es ist ein multifunktionelles Protein, welches der Bindung an Virusrezeptoren dient, die wiederum die Bildung von neutralisierenden Antikörpern induziert und die Fusion von Virus- und Zellmembranen bzw. Zellmembranen untereinander vermittelt,

was zu einer Entstehung großer sogenannter Zellsynzytien führen kann (Compton *et al.*, 1993).

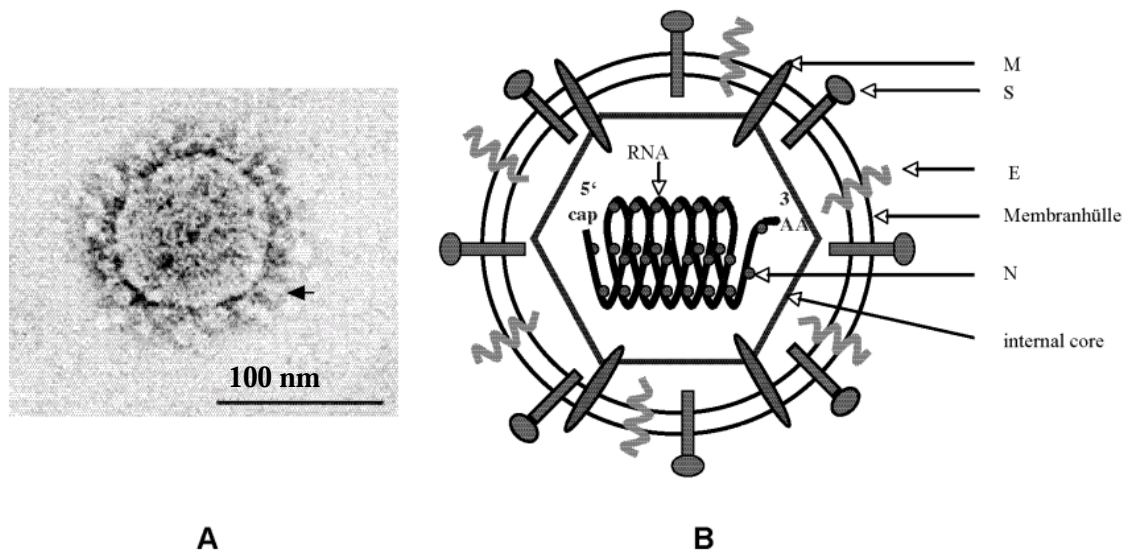


Abb. 1.4: Struktur der Coronavirionen (verändert, nach Ksiazek *et al.*, 2003).

(A) Elektromikroskopische Aufnahme (Negativfärbung) eines SARS-CoV-Partikels. Der Pfeil zeigt die sogenannte Krone (*corona*), die auf der Virion-Oberfläche von S-Protein-Molekülen gebildet wird. (B) Schematische Darstellung der Struktur von Coronaviren. M: Membranprotein (ein glykosyliertes Transmembranprotein); S: Oberflächenglykoprotein (auch *spike*-Protein genannt); E: Hüllprotein (mögliches "Viroporin"); N: Nukleokapsidprotein; cap: Cap-Struktur am 5'-Ende des viralen Genoms; AA: Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende des viralen Genoms.

1.2.3 Coronavirusinfektionen und SARS

Coronaviren vermehren sich meistens in respiratorischen Epithelien (Flimmerepithelien von Nase, Trachea und Alveolen) und führen anschließend zu Erkrankungen der Atemwege. Sie verursachen ebenfalls andere Infektionen bei verschiedenen Tierarten. So lösen Coronaviren z.B. Hepatitis und Enzephalomyelitis (MHV), Nephritis (IBV) oder Peritonitis (FIPV) aus. Bisher wurden fünf humanpathogene Vertreter der Coronaviren beschrieben (HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, SARS-CoV und HCoV-HKU1).

Ende November 2002 traten erstmals schwere atypische Pneumonien unklarer Entstehung in der südchinesischen Provinz Guangdong auf. Diese neuartige Infektionskrankheit breitete sich weiter zunächst über Südchina nach Vietnam und Hongkong aus. Sie wurde als "Schweres akutes respiratorisches Syndrom" (SARS) bezeichnet (Drosten *et al.*, 2003; Fouchier *et al.*, 2003; Ksiazek *et al.*, 2003; Kuiken *et al.*, 2003; Peiris *et al.*, 2003; Ziebuhr, 2003). Ab Februar 2003 kam es zu einer schnellen, globalen Verbreitung der Krankheit. Im Juli 2003 wurde durch die WHO verkündet, die Epidemie sei beendet. Im Laufe der gefährlichen

Epidemie erkrankten über 8000 Menschen in ungefähr 30 Ländern. 744 Patienten starben durch SARS. Die am stärksten betroffenen Länder bzw. Regionen waren China, Hongkong, Taiwan, Singapur, Hanoi in Vietnam und Toronto in Kanada (Berger *et al.*, 2004; Ziebuhr, 2003). Die Inkubationszeit von SARS liegt in der Regel bei zwei bis sieben Tagen. Symptome von SARS sind plötzlich auftretendes Fieber, trockener Husten und Kurzatmigkeit (Rota *et al.*, 2003). Die Erregerübertragung kommt vorwiegend durch Tröpfcheninfektion zustande. Die Letalität lag bei etwa 11 Prozent, die jedoch im höheren Lebensalter stark anstieg (Peiris *et al.*, 2004). Bislang gibt es weder eine spezifische wirksame Behandlung der Krankheit, noch gibt es eine zugelassene Schutzimpfung, die einer Infektion vorbeugt. Die einzige Therapie erfolgte durch eine Kombination von Ribavirin[®], Oseltamir[®] und Antibiotika als Schutz vor bakteriellen Superinfektionen (Lee *et al.*, 2003; Peiris *et al.*, 2003). Eine zusätzliche Kortikosteroid-Behandlung diente der Immunsuppression, da die Lungenschäden zumindest teilweise auf der übermäßigen Freisetzung proinflammatorischer Zytokine beruhten (Nicholls *et al.*, 2003). *In vitro*-Studien zeigten, dass Interferon- α im Gegensatz zum Nukleosidanalogen Ribavirin[®] eine inhibierende Wirkung auf das Wachstum des SARS-Coronavirus (SARS-CoV) besitzt (Cinatl *et al.*, 2003; Leong *et al.*, 2004).

Obwohl das SARS-CoV aus einigen Tieren, wie z.B. Zibet-Katzen (*Paguma larvata*), isoliert werden konnte, blieb lange Zeit unklar, ob sie auch wirklich das natürliche tierische Reservoir dieser Viren sind (Guan *et al.*, 2003; Kan *et al.*, 2005). Andere Daten zeigen, dass Fledermäuse mit großer Wahrscheinlichkeit das Reservoir SARS-CoV-ähnlicher Viren sind, die somit als Überträger auf den Menschen gelten können (Tong *et al.*, 2009). Die molekularen Grundlagen und Bedingungen für das Durchbrechen der Speziesbarriere vom Tier auf den Menschen in diesem Spezialfall sind bisher noch nicht vollständig aufgeklärt; man kann aber mit ziemlicher Sicherheit in spezifischen Mutationen im Virusgenom, insbesondere im S-Gen, sowie Deletionen in einigen akzessorischen Genen im 3'-Bereich des Genoms die Ursache dafür sehen (Holmes, 2005; Kan *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2005).

Die Zuordnung des SARS-CoV zu den Serogruppen der Coronaviren wird immer noch diskutiert. Aufgrund seiner genetischen Verschiedenheit gegenüber den anderen Gruppen wurde es zunächst als erster Vertreter einer neuen vierten Serogruppe klassifiziert.

Neuere Ergebnisse bezüglich spezieller SARS-CoV-Gene hingegen lassen eine Verwandtschaft mit der Serogruppe II erkennen (siehe Abbildung 1.5) (Eickmann *et al.*, 2003; Snijder *et al.*, 2003).

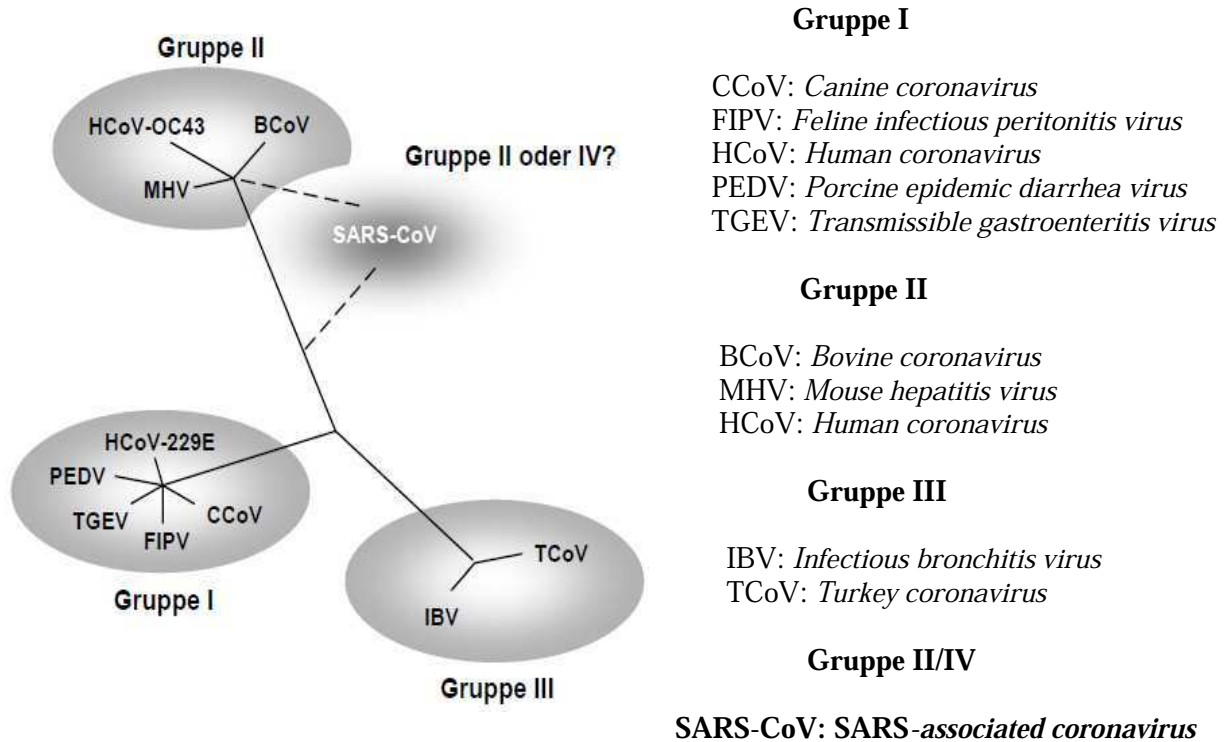


Abb. 1.5: Phylogenie der Coronaviren (verändert, nach Groneberg *et al.*, 2005).

1.2.4 Infektionszyklus des SARS-Coronavirus und dessen Genomorganisation

Der virale Lebenszyklus des SARS-Coronavirus beginnt mit der Bindung des Virus an die Zellmembran der Wirtszelle. Dieser Andockmechanismus wird durch das S-Protein, das verschiedene 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).

Der Rezeptor, an dem das S-Protein des SARS-Coronavirus andockt, ist das *angiotensin converting enzyme 2* (ACE2) (Li *et al.*, 2003). Durch die Interaktion des S-Proteins mit ACE2 kommt es zur Fusion der Virusmembran mit der zellulären Membran und damit zur Freisetzung der viralen ssRNA. ACE2 wird auf Pneumozyten in der Lunge, Enterozyten im Dünndarm und auf Epithelzellen in den Nieren exprimiert. Das Expressionsmuster von ACE2 wechselwirkt mit der Organ-Pathologie in Patienten, die an SARS erkrankt sind. Dieses glykolisierte Membranprotein gehört zu den Carboxypeptidasen und spielt zusammen mit ACE1 als Teil des Renin/Angiotensin-Systems (RAS) bei der Balance des Blutdrucks und der Aufrechterhaltung physiologischer Salz- und Flüssigkeitskonzentrationen eine Rolle (Hofmann und Pöhlmann, 2004; Hamming *et al.*, 2004; Kuba *et al.*, 2010).

Nach der Freisetzung des ca. 30 kb großen RNA-Genoms positiver Polarität in das Zytoplasma der infizierten Zelle übernimmt die zelluläre Translationsmaschinerie zunächst

die Synthese von Proteinen, die für die virale Replikation und Transkription essentiell sind. Der erste offene Leserahmen (engl.: *open reading frame* = ORF) 1a des RNA-Genoms kodiert für ein ca. 4400 Aminosäuren großes Polyprotein pp1a. In 20 bis 30 Prozent der Translationsvorgänge induziert eine Pseudoknotenstruktur der viralen RNA und eine sogenannte „*slippery sequence*“ eine ribosomale Leserasterverschiebung kurz oberhalb des ORF1a Stopp-Kodons. Die zusätzliche Translation des ORF1b führt zur Synthese des ca. 7000 Aminosäure großen Polyproteins pp1a/b (Ziebuhr *et al.*, 2000; Ziebuhr *et al.*, 2001). Die aus der Prozessierung der Polyproteine pp1a und pp1a/b – mithilfe unter anderem der SARS-CoV-Hauptprotease (SARS-CoV-M^{pro}), mit der sich diese Arbeit befasst - hervorgehenden viralen Proteine, wie z.B. Proteasen, Helikasen und die RNA-abhängige RNA-Polymerase, lagern sich an zelluläre Membranen an (engl.: *double-membraned vesicles* = DMV) und konstituieren den Replikase-Transkriptase-Komplex (Ziebuhr, 2005). Sowohl die Replikation des viralen Genoms als auch die Transkription subgenomischer mRNAs wird durch die Aktivität dieses Komplexes gesteuert (Thiel *et al.*, 2003). Die subgenomischen mRNAs besitzen identische 5'- und 3'-Enden und sind das Ergebnis der für die Coronaviren charakteristischen diskontinuierlichen Transkriptionsstrategie (Siddell, 1995). Die Polymerase wird dabei aufgrund der Anwesenheit von transkriptionsregulierenden Sequenzen am jeweiligen 5'-Ende gesteuert. Von den unterschiedlich langen subgenomischen mRNAs wird jeweils nur der erste ORF des 5'-Endes in ein Protein translatiert (Siddell, 1995; Snijder *et al.*, 2003). Nach der Synthese einer ausreichenden Anzahl an Genom-Kopien und viralen Proteinen kommt es im Zytoplasma der infizierten Zelle zur Bildung des helikalen Nukleokapsids. Das Zusammenkommen aller viralen Strukturproteine mit dem Nukleokapsid und der Zusammenbau neuer Viren (engl.: *assembling*) erfolgt an intrazellulären Membranen im ER-Golgi-intermediären Kompartiment (ERGIC; Klumperman *et al.*, 1994; Tooze *et al.*, 1984). Nach der Entstehung neuer Viren im ERGIC gelangen diese in den Golgi-Komplex, in dem es zu weiteren Reifungs- und Modifizierungsschritten der Virionen kommt (Risco *et al.*, 1998; Tooze *et al.*, 1987). Danach werden die Viruspartikel durch einen vesikulären Transport zur Plasmamembran geleitet. Durch die Fusion der mit Virionen beladenen Vesikel mit der Plasmamembran gelangen die Viruspartikel in den extrazellulären Raum und sind in der Lage, neue, benachbarte Zellen zu infizieren.

Der Infektionszyklus des SARS-Coronavirus ist zusammenfassend nochmals in Abbildung 1.6 dargestellt, die Organisation des Genoms in Abbildung 1.7:

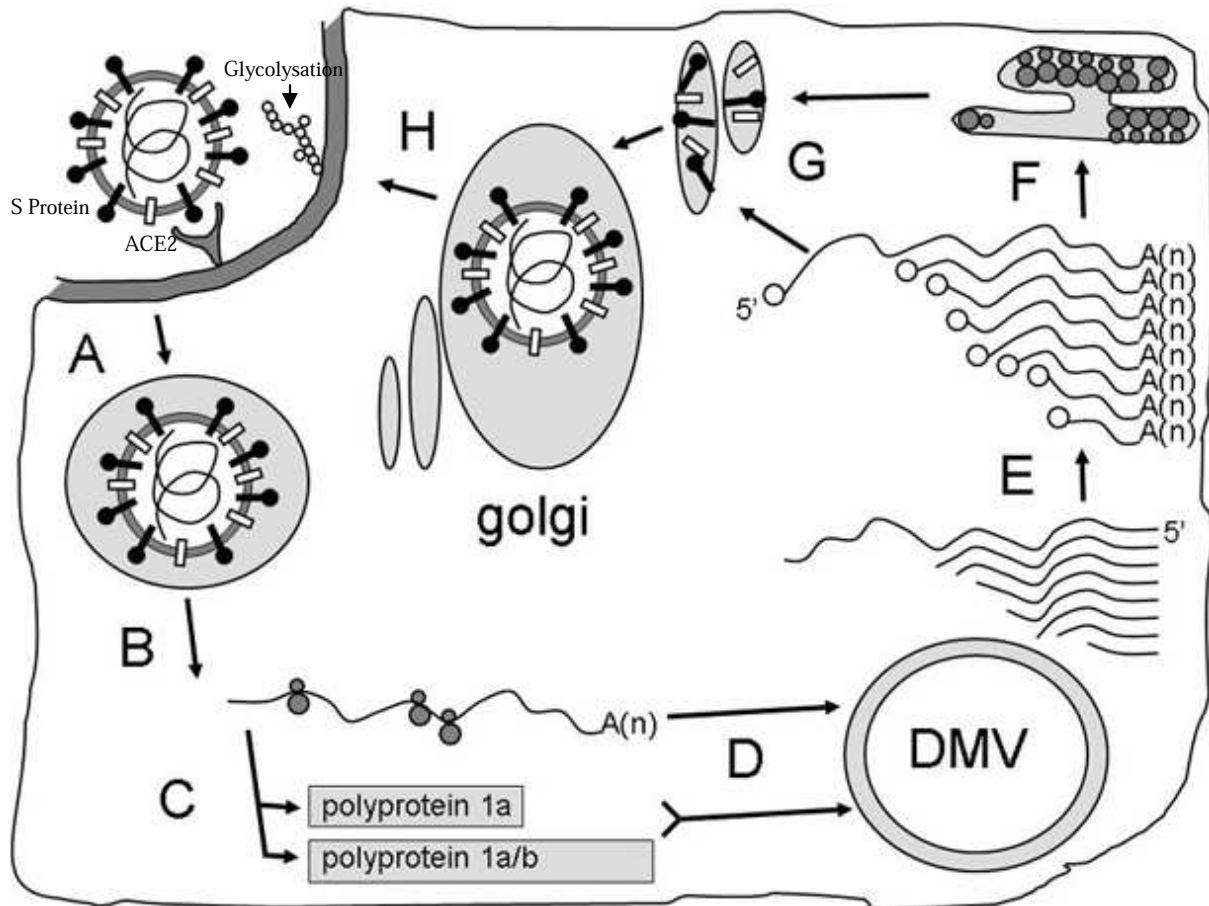


Abb. 1.6: Lebenszyklus des SARS-Coronavirus (verändert, nach Plant *et al.*, 2008).

- (A) Einschleusung des Virus durch S-Protein-Rezeptor-Interaktion
- (B) Freisetzung der viralen ssRNA
- (C) Erste Phase der Translation, resultierend in der Produktion zweier Polyproteine
- (D) Die Polyproteine werden (u.a. durch katalytische Aktivität der SARS-CoV-M^{PPO}) prozessiert und bilden DMV's (*double-membraned vesicles*)
- (E) Replikation des viralen Genoms und Bildung subgenomischer mRNAs
- (F) Zweite Phase der Translation, resultierend in Proteinen, die durch subgenomische mRNAs kodiert werden
- (G) Neue genomische RNA wird in das Nukleokapsid verpackt; Prozessierung der Strukturproteine in den ERGIC's (ER-Golgi-intermediäre Kompartimente)
- (H) Ausschleusen der neuen viralen Partikel mittels Exozytose

1 Einleitung

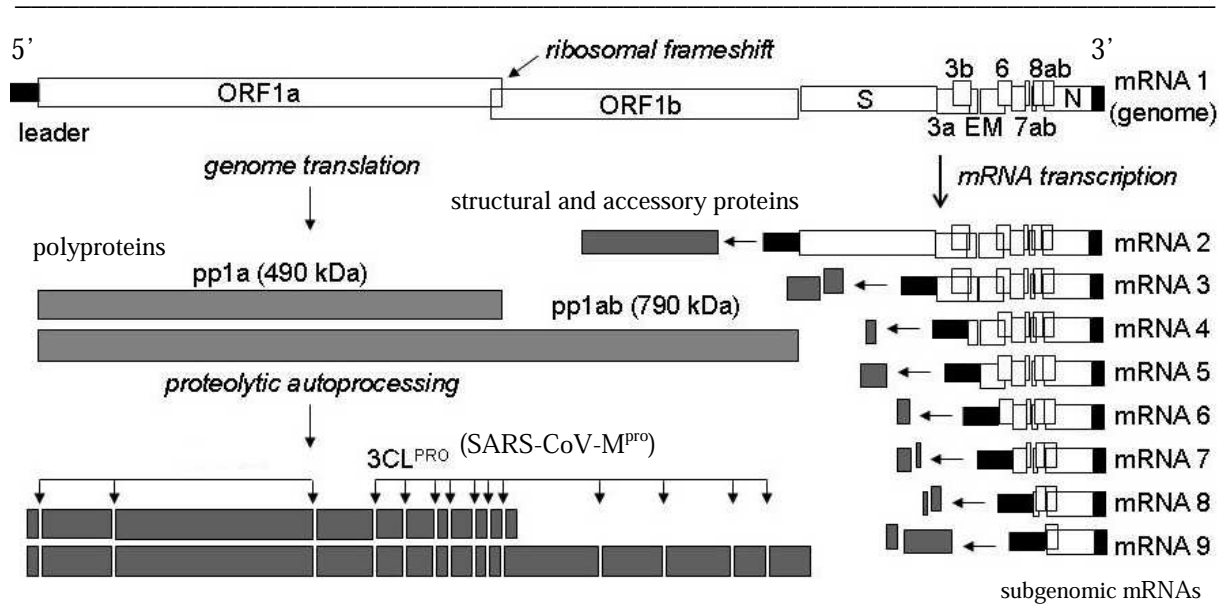


Abb. 1.7: Organisation des SARS-Coronavirus-Genoms (verändert, nach Plant *et al.*, 2008).

Wie in Abbildung 1.7 erkennbar, existieren 9 Haupt-ORFs im SARS-Coronavirus-Genom. Der erste ORF ist in zwei überlappende Teile (ORF1a und ORF1b) unterteilt und macht etwa 2/3 des Genoms aus. Zusätzlich zur gesamten genomischen RNA tauchen ebenfalls subgenomische mRNAs auf. Diese subgenomischen mRNAs besitzen dieselbe 5'-orientierte nicht-kodierende Region (schwarze Balken) wie die genomische RNA. Die zwei Polyproteine werden von der genomischen RNA kodiert. Diese werden anschließend in funktionsfähige Einheiten prozessiert und zwar in nsp1 bis nsp16 (engl.: *non-structural proteins* = nsp). Die zusätzlichen Proteine und Strukturproteine (kürzere graue Balken) werden von den subgenomischen mRNAs kodiert und translatiert.

1.2.5 Bedeutung und Struktur der SARS-Coronavirus-M^{PRO} (3CL^{PRO})

Die SARS-Coronavirus-M^{PRO} spielt eine bedeutende Rolle im Lebenszyklus des SARS-Virus. Sie ist eine 33,8 kDa große Protease, besteht aus 306 Aminosäuren und prozessiert während der Transkription des Virus-Genoms zwei vorerst größere Replikase-Vorläufer-Polyproteine, genannt pp1a (490 kDa) und pp1a/b (790 kDa), in die aktiven Replikase-Proteine, die ihrerseits schließlich Bestandteile des essentiellen Replikase-Komplexes darstellen (vgl. auch Abbildungen 1.6 und 1.7). Die regulierte, geordnete Freisetzung von funktionellen replikativen Einheiten aus Polyproteinen ist ein Mechanismus, der von vielen positivsträngigen RNA-Viren angewandt wird. Diese Art der posttranslationalen Regulation der Genexpression durch proteolytische Prozessierung konnte auch für Picornaviren (Lawson

und Semler, 1990), Potyviren (Dougherty und Parks, 1991) und Alphaviren (de Groot *et al.*, 1990) nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde für Coronaviren auch gezeigt, dass Geschwindigkeit und Effektivität der jeweiligen proteolytischen Spaltung von der Spaltstellenstruktur abhängig sind (Ziebuhr und Siddell, 1999; Hegyi und Ziebuhr, 2002; Fan *et al.*, 2004).

Die Protease spaltet das virale Replikase-Polyprotein an insgesamt 11 Schnittstellen und setzt auf diese Weise alle wichtigen Proteine für eine Replikation des Virus frei. Zuerst wird intrinsisch die Protease selbst freigesetzt. Die bevorzugte Spaltstelle der SARS-CoV-M^{pro} am Peptid besteht aus der Aminosäuresequenz Leu-Gln↓(Ser,Ala,Gly) (Yang *et al.*, 2003; Hegyi *et al.*, 2002). Bei der SARS-Coronavirus-M^{pro} handelt es sich um eine Cysteinprotease mit einer katalytischen Diade, bestehend aus einem Cystein (C145) und Histidin (H41). Dieses Enzym liegt ab einer Konzentration von 1 mg/mL in Lösung und in Proteinkristallen vorwiegend als aktives Homodimer vor. Die zwei Protomere werden in je drei Domänen unterteilt. Die Domänen I und II haben mit anderen coronaviralen chymotrypsin-ähnlichen Proteasen eine antiparallele β -Faltblatt-Struktur gemein. Das katalytische Zentrum befindet sich in einer Spalte zwischen den Domänen I und II. Domäne III besteht aus fünf α -helicalen Bereichen, die einen kugelförmigen Cluster formen (siehe Abbildung 1.8). Aufgrund der Wechselwirkung der Domäne III des einen Protomers mit dem zweiten Protomer spielt diese Domäne höchstwahrscheinlich eine besondere Rolle bei der Dimer-Bildung der Protease (Chou *et al.*, 2004).

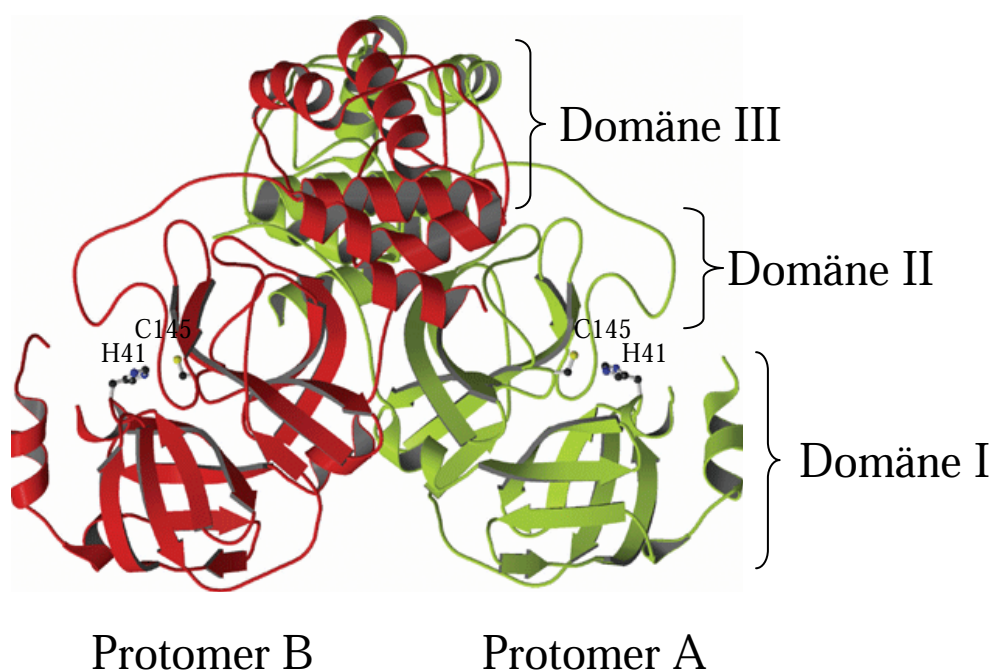


Abb. 1.8: Struktur der SARS-Coronavirus-M^{pro} (verändert, nach Yang *et al.*, 2003).

In der MEROPS-Datenbank wird die SARS-CoV-M^{pro} zusammen mit anderen Proteasen positivsträngiger RNA-Viren in die Familie C30 (Clan PA(C)) zusammengefasst. Die MEROPS-Klassifizierung der SARS-CoV-M^{pro} im gemischten Clan PA kann man auf die strukturelle Verwandtschaft mit der Serinprotease Chymotrypsin (Stammprotease des Clans PA) zurückführen. So ist es sehr wahrscheinlich, dass sich beide Proteasen ausgehend von einem gemeinsamen Urtyp entwickelten und die katalytische Aktivität dennoch beibehalten wurde, obwohl Serin durch Cystein im aktiven Zentrum ausgetauscht wurde.

Aufgrund dieser Tatsache und der Ähnlichkeit der SARS-CoV-M^{pro} mit den schon seit längerer Zeit bekannten 3C-Proteasen der *Picornaviridae* (Familie C3), werden die Synonyme „*Chymotrypsin-like protease*“ oder „*3C-like protease*“ (3CL^{pro}) in der Literatur ebenfalls für die SARS-CoV-M^{pro} verwandt. Der Unterschied der SARS-CoV-M^{pro} zu den 3C-Proteasen anderer RNA-Viren, bei denen die Proteolyse des Substrats über die katalytische Triade Cys-His-Asp(Glu) verläuft, ist, wie oben erwähnt, eine katalytische Diade Cys(145)-His(41). Hierbei wird die eigentliche dritte Position einer Triade (Asp(Glu) bei 3C-Proteasen anderer RNA-Viren) durch ein Wassermolekül besetzt, welches dann Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminosäuren His und Asp eingeht (Barrett *et al.*, 2004; Anand *et al.*, 2003).

1.3 Zielsetzung

Die 33,8 kDa große SARS-CoV-M^{pro} ist für das SARS-Virus essentiell für seine weitere Vermehrung im Wirtsorganismus, da diese Cysteinprotease die viralen Vorläuferproteine pp1a und pp1a/b katalytisch prozessiert und damit letzten Endes zu funktionsfähigen Enzymen umsetzt. Dazu gehören z.B. die RNA-abhängige RNA-Polymerase und die Helikase, aber auch weitere akzessorische und nicht-strukturelle Proteine, deren Aufgabe bislang noch nicht völlig geklärt ist. Die genannten prozessierten Proteine stellen ihrerseits einen wichtigen Bestandteil des im Laufe des Reproduktionszyklus gebildeten Replikasekomplexes dar.

Aufgrund dieses enormen Stellenwertes der SARS-CoV-M^{pro} kann sie als interessantes Zielobjekt für Inhibitoren dienen, welche die katalytische Aktivität herabsetzen oder aber die Protease komplett hemmen sollen und damit auch die Reproduktion des Virus im Wirt verhindern.

In dieser Arbeit sollte die SARS-CoV-M^{pro} zunächst rekombinant in Bakterienzellen überexprimiert und anschließend chromatographisch aufgereinigt werden.

Die Apoprotein-Kristallisation des hochreinen, aufkonzentrierten Proteins und dessen Co-Kristallisation mit entsprechenden, spezifischen, zuvor synthetisierten und in fluorimetrischen Enzym-Inhibitions-Assays getesteten Protease-Inhibitoren, sollte reproduzierbar zum Erhalt von Protein-Einkristallen hoher Qualität führen, welche zur Untersuchung mittels Röntgenbeugung und nachfolgender hochauflösender Strukturaufklärung erforderlich sind.

Durch diese röntgendiffraktometrischen Untersuchungen der in Frage kommenden Co-Kristalle und dem Zusammenspiel mit massenspektrometrischen Analysen, die unter anderem eine kovalente oder aber nicht-kovalente Wechselwirkung der Inhibitoren mit der SARS-CoV-M^{pro} beweisen können, waren schließlich Einblicke in das Bindungsverhalten dieser potentiellen Hemmstoffe im katalytischen Zentrum der Protease zu verschaffen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Typenbezeichnung	Firma
Autoklav	Systec V-150	Systec
Elektrophoresekammer	Mini-Protean 3	Bio-Rad
FPLC	ÄKTA purifier mit Fraktionator Frac-950	Amersham/GE Healthcare
Gelfiltrationssäule	HiLoad 26/60 Superdex [®] 200 prep grade	Amersham/GE Healthcare
Geltrockner	GelAir Dryer	Bio-Rad
Heizblock	Rotilabo Block-Heater 250	Roth
Inkubator	Klein-Brutschrank B 15	Heraeus
Kryoschlaufen		Hampton Research
Magnetrührer	MR 3002	Heidolph
Massenspektrometer	APEX-II	Bruker Daltonics
Mikroskope		Zeiss und Leica
Peristaltikpumpe		GE Healthcare
pH-Meter		Schott Instruments
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf
Pipetten		Rainin
Pipettierhilfe	Easypet	Eppendorf
Röntgengenerator	MicroMax [™] -007 HF	Rigaku
Rotoren	JA 25.50 JLA 8.1000 A-4-81 F-45-24-11	Beckman Coulter und Eppendorf
Säulen für die Affinitätschromatographie	Econo-Column 1,5 x 15 cm Econo-Column 2,5 x 20 cm	Bio-Rad
Schüttelinkubator	ISF-1-W und LT-W	Kühner
Schwenktisch	TL-10	Heidolph
Spannungsquelle zur Elektrophorese	PowerPac HC [™]	Bio-Rad
Thermomixer		Eppendorf
Ultraschall-Homogenisator/Sonifikator	Labsonic P	Sartorius Stedim Biotech

UV/Vis-Spektrophotometer	8453	Agilent
Vakuum-Membranpumpen	Laboport	KNF Neuberger
Vortex	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waagen	XS 105 Dual Range XS 6002S Dual Range	Mettler Toledo
Zelldisruptor 0,75 KW		Constant Systems
Zentrifugen	Avanti J-26 XP Centrifuge 5415D Centrifuge 5810R	Beckman Coulter und Eppendorf

2.1.2 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Sigma und Fluka in höchster Reinheitsstufe bezogen.

2.1.3 Chromatographiematerialien

Material	Firma
Ni-NTA Agarose Beads	Qiagen
Superdex [®] 200	Amersham / GE Healthcare

2.1.4 Enzyme

Enzym	Firma
Trypsin	Roth
Glu-C	Roche

2.1.5 Medien, Lösungen und Puffer

Medien

Das Autoklavieren der Medien und Lösungen für die Bakterienkultivierung erfolgte für 20 Minuten bei 120 °C.

LB-Medium	10 g/L Trypton
	5 g/L Hefeextrakt
	10 g/L NaCl

2 Material und Methoden

LB-Agar	LB-Medium + 15 g/L Bakto-Agar
---------	----------------------------------

SOC-Medium	20 g/L Trypton
	5 g/L Hefeextrakt
	2,5 mL 1 M KCl
	10 mL 1 M MgCl ₂
	10 mL 1 M MgSO ₄
	2 mL 1 M NaCl
	10 mL 40% (w/v) Glucoselösung*
	ad 1000 mL dH ₂ O *getrennt autoklavieren, dann mischen

Stammlösungen

IPTG	238 mg/mL in dH ₂ O
Ampicillin (Na-Salz)	100 mg/mL in dH ₂ O

Die Stammlösungen wurden sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

Puffer und Lösungen zur SDS-Gelelektrophorese

SDS-Probenpuffer	375 mM Tris-HCl (pH 6,8)
	5% (v/v) β-Mercaptoethanol
	6% (w/v) Natriumdodecylsulfat
	0,03% (w/v) Bromphenolblau
	30% (v/v) Glycerol

4x Lower Tris-Puffer	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
	4% (w/v) Natriumdodecylsulfat

4x Upper Tris-Puffer	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
	4% (w/v) Natriumdodecylsulfat

Trenngel (15%)	3,75 mL 4x Lower Tris-Puffer
	7,5 mL 30% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid
	75 µL 10% (w/v) Ammoniumpersulfat
	7,5 µL TEMED
	ad 15 mL dH ₂ O

2 Material und Methoden

Sammelgel (5%)	2,5 mL 4x Upper Tris-Puffer
	1,6 mL
	30% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid
	50 µL 10% (w/v) Ammoniumpersulfat
	5 µL TEMED
	ad 10 mL dH ₂ O

SDS-Elektrophoresepuffer	25 mM Tris-HCl (pH 8,3)
	250 mM Glycin
	0,1% (w/v) Natriumdodecylsulfat

Lösungen zur Färbung mit Coomassie-Blau R-250

Coomassie-Färbelösung	0,1% (w/v) Coomassie-Blau R-250
	50% (v/v) Methanol
	10% (v/v) Essigsäure

Coomassie-Entfärbelösung	10% (v/v) Methanol
	10% (v/v) Essigsäure

Puffer zur Proteinaufreinigung

Nickel-NTA-Aufreinigung:

Lyse-/Resuspensionspuffer	20 mM Tris-HCl (pH 8,0)
	200 mM NaCl
	10 mM β-Mercaptoethanol

Waschpuffer	20 mM Tris-HCl (pH 8,0)
	200 mM NaCl
	10 mM Imidazol

Elutionspuffer I	20 mM Tris-HCl (pH 8,0)
	200 mM NaCl
	25 mM Imidazol

Elutionspuffer II	20 mM Tris-HCl (pH 8,0)
	200 mM NaCl
	100 mM Imidazol

Elutionspuffer III	20 mM Tris-HCl (pH 8,0)
	200 mM NaCl
	500 mM Imidazol

Gelfiltration:

Puffer zur Gelfiltration	20 mM Tris-HCl (pH 8,0)
	200 mM NaCl
	1 mM DTT
	1 mM EDTA

Proteinlagerung:

Lagerungspuffer/Protein	10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
	1 mM DTT
	1 mM EDTA

2.1.6 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Herkunft
DH5 α	F ⁻ ϕ 80 lacZ Δ M15 recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 (rk ⁻ mk ⁺) supE44 relA1 deoR Δ (lacZYA-argF) U169	Clontech Labs
BL21 (DE3)	F ⁻ ompT hsdS _b (rb ⁻ mb ⁻) gal dcm [DE3]*	Novagen

*DE3 ist ein λ -Phage, der lysogen in *E. coli* vorliegt.
Er trägt das T7-Polymerase-Gen unter lacUV5-Kontrolle.

2.1.7 Vektoren

Bezeichnung	Verwendung und Eigenschaften	Herkunft
pMal-c2	Expression in <i>E. coli</i> unter Kontrolle eines tac-Promotors N-terminale Fusion mit Maltose-Bindeprotein (MBP) Faktor Xa-Proteaseschnittstelle Ampicillin-Resistenz	New England Biolabs

2.1.8 Standards und Kits

Standards	Firma
Proteinmarker Page Ruler ^{1M} Prestained Protein Ladder	Fermentas

Kits	Firma
Nucleobond [®] AX PC 500	Macherey-Nagel

2.1.9 Sonstige Materialien

Material	Firma
Cellulose-Membranfilter RC 58, 0,2 µm	Whatman
Deckgläschen, silikonisiert	Jena Bioscience
Dialyseschläuche ZelluTrans (MWCO 8-10000)	Roth
Filterpapier, 3 mm	Bio-Rad
Impfösen	Hartenstein
Konzentratoren Centricon Plus-20 und Microcon (MWCO 10000 und 30000)	Millipore
Kristallisationsplatten 24-well	Crystalgen
Kryoröhrchen 1 mL	Roth
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen	Rainin
PVDF-Membran	Roth
Quarzküvetten Ultra-Micro für UV/Vis-Spektroskopie	Agilent
Röhrchen, steril, 15 und 50 mL	Sarstedt
Silikonfett	Bayer
Spritzen	B.Braun
Spritzenfilter Rotilabo, 0,22 µm und 0,45 µm	Roth
UV-Küvetten	Eppendorf
ZipTip [®] -Pipettenspitzen	Millipore

2.1.10 Software

Gerätesoftware	Gerät	Firma
Unicorn	FPLC	Amersham/GE Healthcare
UV-visible ChemStation	UV/Vis Spektrometer	Agilent
XMASS/XTOF software	Massenspektrometer	Bruker
Programm oder Webserver	Beschreibung	Referenz / Webseite
Coot	3D-Visualisierung und Modellierung	Emsley <i>et al.</i> , 2004
Mosflm	Datenreduktion bei Röntgenbeugung	Leslie <i>et al.</i> , 1992
Phaser	Strukturlösung durch Molekularen Ersatz	McCoy <i>et al.</i> , 2007
Protparam	Berechnung grundlegender Eigenschaften eines Proteins	http://www.expasy.ch/tools/protparam.html
PyMOL	3D-Visualisierung von Molekülen	http://pymol.sourceforge.net/
Refmac	Strukturverfeinerung	Murshudov <i>et al.</i> , 1997
Scala	Skalieren von Röntgenbeugungsdaten	Evans <i>et al.</i> , 2005
Swiss-PDB Viewer	3D-Visualisierung und Bearbeitung von Molekülen	http://expasy.org/spdbv/text/download.html
XDS	Datenreduktion bei Röntgenbeugung	Kabsch <i>et al.</i> , 1993

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Anzucht von Bakterienkulturen

Um Bakterienkulturen zu erhalten und zu kultivieren, wurden die Zellen (*E. coli*-Stämme DH5 α und BL21 (DE3)) in einerseits komplexen Flüssigmedien (LB-Medium) und andererseits auf festen Agarmedien (LB-Agar) herangezüchtet. Flüssigkulturen wurden bei 37 °C im Schüttelinkubator, die festen Agarkulturen bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.1.2 Lagerung der Bakterienkulturen

Die Lagerung der Bakterienstämme erfolgte in Form von Glycerolkulturen. Dazu wurden 800 μ L einer Übernachtskultur mit 270 μ L autoklavierter 60%iger (v/v) Glycerol-Lösung in einem sterilen Kryoröhrchen gut gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Von diesen Glycerolkulturen konnte man mit einer Impföse leicht erneut Agarplatten beimpfen.

2.2.1.3 Messung des Bakterienwachstums

Um das Zellwachstum der Bakterien zu beobachten, wurde bei der jeweiligen Bakterienkultur die Absorption (optische Dichte, OD) gegenüber einer unbeimpften Nährlösung im Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Zellkulturen, die eine OD von über 0,4 zeigten, wurden so verdünnt, dass die Messwerte innerhalb des linearen Bereiches des Lambert-Beerschen Gesetzes fielen.

2.2.1.4 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Da *E. coli* wie die meisten Bakterienarten nicht von Natur aus fähig ist, Fremd-DNA aus der Umgebung aufzunehmen (Chen und Dubnau, 2004), wurden Zellen der verschiedenen *E. coli*-Stämme zunächst chemisch kompetent gemacht (Sambrook *et al.*, 2001).

Diese kompetenten Bakterienkulturen wurden freundlicherweise von Frau Silvia Scheuring hergestellt und zur Verfügung gestellt.

2.2.1.5 Transformation in *E. coli*

Um die *E. coli*-Zellen zu transformieren, also DNA aufnehmen zu lassen, wurden 50 μ L chemisch kompetenten Zellen 50 ng Plasmid-DNA zugesetzt und der Ansatz 5 Minuten auf Eis inkubiert. Dann erfolgte bei 42 °C im Wasserbad ein Hitzeschock für 2 Minuten. Danach

wurde der Ansatz für 5 Minuten auf Eis abgekühlt, 950 μL SOC-Medium (ohne Antibiotikum) zur Regeneration und Ausprägung der Antibiotikumresistenz der Zellen hinzugegeben und anschließend die Zellen bei 37 °C 1 Stunde im Thermomixer unter Schütteln inkubiert. 50 μL der Zellen wurden auf Selektionsmedium (LB-Agar + Ampicillin (Antibiotikum als Selektionsmarker / 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank gehalten.

2.2.1.6 Plasmid-DNA-Isolierung aus *E. coli*

Der Maxipräparations-Kit Nucleobond[®]AX diente zur Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterienzellen. Die Aufreinigung wurde mit spezifischen Säulen (Nucleobond[®]AX 500) erreicht. Diese Säulen bestehen aus einer Silicatmatrix, an der spezifisch DNA binden kann und die Proteine und Verunreinigungen passieren lässt. Am Ende wird die gereinigte DNA wieder von der Säulenmatrix gelöst.

Hierzu wurden die mit dem gewünschten Plasmid transformierten Zellen in 200 mL LB-Medium + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin von einer Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze angeimpft und im Schüttelinkubator bei 37 °C über Nacht herangezüchtet.

Die Bakterienkultur wurde zentrifugiert (Rotor A-4-81, 4 000 \times g, 15 min, 4 °C) und mit dem Zellpellet nach Anweisungen des Nucleobond[®]AX-Kits weiterverfahren. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde in sterilem, demineralisiertem Wasser aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

2.2.1.7 DNA-Quantifizierung

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte über die optische Dichte, wobei die DNA in einem entsprechenden Verhältnis mit demineralisiertem Wasser verdünnt und danach die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren, ermittelt wurde (Sambrook *et al.*, 1989).

Eine OD_{260} von 1,0 entspricht bei einer proteinfreien dsDNA-Lösung einem DNA-Gehalt von ca. 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Die DNA-Messungen erfolgten mit einem UV/Vis-Spektrophotometer.

2.2.1.8 Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli*

Die *E. coli*-Zellen (Stamm BL21 (DE3)), welche die SARS-CoV-M^{pro} exprimieren sollten, wurden bei 37 °C über Nacht im Schüttelinkubator in 100 mL LB-Medium mit 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin als Selektionsmarker angezogen.

Diese Vorkultur wurde dann verwendet, um 10 L Hauptkultur, bestehend aus LB-Medium mit ebenfalls 50 µg/mL Ampicillin anzuimpfen. Hierzu wurden jeweils 25 mL Vorkultur zu 2,5 L Hauptkultur gegeben. Die Kultur wurde dann weiter bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 im Schüttelinkubator gehalten. Bei diesem Wachstumsstadium der Zellen wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM Endkonzentration an IPTG induziert und die Inkubationstemperatur auf 23 °C herabgesenkt. Nach 18 Stunden wurden die Zellen mittels Zentrifugation geerntet (Rotor JLA 8.1000, 6 000 × g, 15 min, 4 °C) und die erhaltenen Zellpellets (10 Liter Kultur, aliquotiert in zwei sterile 50 mL-Röhrchen) entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.1.9 Aufschluss von *E. coli*-Zellen

Zur Lyse der Zellen wurden die aliquotierten Zellpellets in jeweils 50 mL Lyse-/Resuspensionspuffer aufgenommen und vollständig resuspendiert. Als die Zellsuspension frei von sichtbaren Klümpchen und Eiskristallen war, erfolgte der Zellaufschluss mittels 1-2 Durchgängen durch einen Zelldisruptor bei einem Druck von 1 kBar und 4 °C, nachdem vorher durch einen Ultraschall-Homogenisator mit Schwingsonde die Suspension vollständig homogenisiert wurde. Bei der Homogenisierung wurde mit 10 × 10 Pulsen bei 100% Amplitude und 0,5 Zyklen gearbeitet. Nach dem Zellaufschluss wurde das erhaltene Lysat abzentrifugiert (Rotor JA 25.50, 30 000 × g, 45 min, 4 °C), um lösliche von unlöslichen Bestandteilen zu trennen. Der lösliche Überstand konnte anschließend für weitere Aufreinigungsschritte verwendet werden.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Protein-Quantifizierung

Die Konzentration von Proteinen wurde analog der von Nukleinsäuren im UV/Vis-Spektrophotometer bestimmt (siehe Kapitel 2.2.1.7). Aufgrund der Absorption von Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten bei 280 nm lässt sich mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes die Konzentration von Proteinlösungen bestimmen. Hierbei diente der entsprechende Proteinpuffer als Referenz.

Der molare Absorptionskoeffizient ϵ (in 1 / M × cm) wurde mit Hilfe des Programms Protparam (Gasteiger *et al.*, 2005) aus der Aminosäuresequenz berechnet.

2.2.2.2 Proteinnachweis mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels SDS-PAGE (Lämmli *et al.*, 1970) lassen sich Proteine und deren Molekulargewichte

in einem SDS-Gel nachweisen. Die Auftrennung der einzelnen zu untersuchenden Proteine erfolgt allein aufgrund der unterschiedlichen Molekulargewichte, da durch Zusatz von SDS alle Proteine einen negativen Ladungsüberschuss erhalten.

Die Auftrennung geschieht in einer vernetzten Matrix aus Polyacrylamid. Durch die Verwendung eines diskontinuierlichen Gelsystems mit Trenn- und Sammelgel mit unterschiedlichen pH-Werten wird eine Konzentrierung der Probe und somit eine höhere Auflösung der Trennung erzielt.

Die SDS-PAGE wurde in Gelen mit einer Dicke von 0,75-1 mm in einer vertikalen Elektrophoresekammer durchgeführt, wobei die Konzentration des Acrylamids im Trenngel 15% (w/v) und im Sammelgel 5% (w/v) betrug. 10 µL Probe wurden dann vor dem Auftragen auf das Gel mit 2 µL 5fach-konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt und 10 Minuten bei 96 °C erhitzt. Parallel zu den Proben wurde ein Proteingrößenstandard auf das Gel aufgetragen; bei den einzelnen Proben wurden jeweils 8 µL, bei dem Standard 5 µL aufgetragen. Der Probenpuffer enthielt unter anderem β-Mercaptoethanol, ein reduzierendes Agens, das Disulfidbrücken spaltet. Die Elektrophorese dauerte 45 Minuten bei einer Spannung von 200 Volt.

2.2.2.3 Färbung mit Coomassie-Blau R-250

Mit dieser Methode lassen sich Proteinmengen im Mikrogrammbereich nachweisen. Coomassie-Blau wurde ursprünglich als Wollfarbstoff entwickelt. Dieser Farbstoff lagert sich an basische Aminosäurereste an. Proteine mit vielen Lysin- und Argininresten werden deshalb etwas stärker gefärbt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 15 Minuten in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und dann in Entfärbelösung inkubiert, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Nach Äquilibration in demineralisiertem Wasser wurde es luftblasenfrei zwischen zwei Cellophanfolien gespannt und mit warmer Luft 2 Stunden für die Aufbewahrung getrocknet.

2.2.2.4 Konzentrierung von Proteinen mittels Ultrafiltration

Proteinlösungen lassen sich aufkonzentrieren, indem durch Überdruck, Vakuum oder Zentrifugation Salze und Wasser der Lösung durch eine Membran mit bestimmter Ausschlussgröße hindurchgepresst werden. Diese Membran enthält Poren unterschiedlicher Größe an Unter- und Oberseite und kann aus verschiedenen Materialien wie Cellulose, PES oder PVDF bestehen. Es kommt somit zur Anreicherung von Molekülen oberhalb der Ausschlussgröße im oberen Teil der Membran.

Zum Konzentrieren wurden Centricon Plus-20 Konzentratoren entsprechend der Vorschrift des Herstellers verwendet. Die Konzentrierung erreichte man durch mehrere Zentrifugationszyklen (Rotor A-4-81, $4\,000 \times g$, verschiedene Zeiten, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$).

2.2.2.5 Nickel-NTA-Affinitätschromatographie

Bei der Affinitätschromatographie macht man sich die Bindungseigenschaften von Proteinen mit deren Bindungspartnern zunutze. Sie nutzt vorhandene Eigenschaften eines Proteins aus, spezifisch und reversibel an einen geeigneten Liganden zu binden, der an einer Säulenmatrix immobilisiert wurde. Das in dieser Arbeit exprimierte Protein ist ein Fusionsprotein aus dem maltosebindenden Protein (MBP) von *E. coli* und der SARS-CoV-M^{pro}. Am N-Terminus der Protease sind jedoch fünf weitere Reste vorhanden (so dass die komplette N-terminale SARS-CoV-M^{pro}-Spaltstelle existiert, die dann auch von der Protease autoproteolytisch prozessiert wird) und am C-Terminus sind die beiden „letzten“ Aminosäuren (Reste 305 und 306) deletiert und durch einen Hexahistidin-*tag* ersetzt. Das exprimierte Fusionsprotein spaltet das MBP, welches die Löslichkeit des Proteins erhöht, selbst ab, und das C-terminale Spaltprodukt lässt sich somit leicht mittels Nickel-NTA-Affinitätschromatographie aufreinigen. Dieses weit verbreitete Aufreinigungssystem nutzt die hohe Affinität von Histidin für Nickel-Ionen aus. Als Säulenmaterial fungiert Nickel-NTA-Agarose, die eine charakteristische grüne Färbung aufweist, solange genügend Ni^{2+} -Ionen daran gebunden sind und die Säule unbeladen ist.

Die folgende Abbildung zeigt das Prinzip der Nickel-NTA-Affinitätschromatographie:

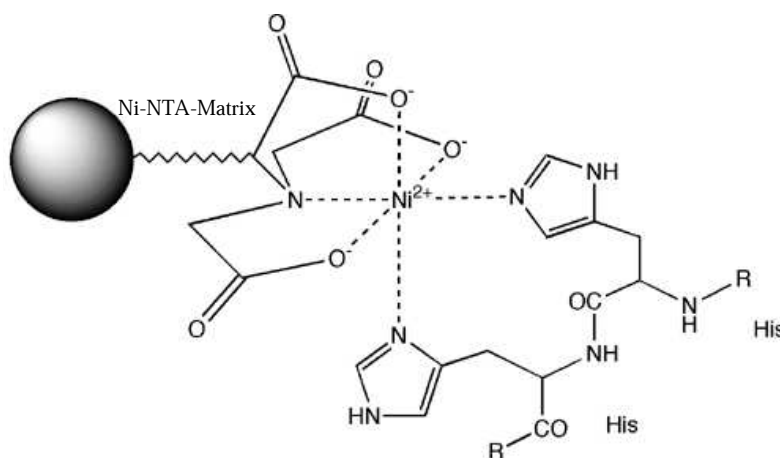


Abb. 2.1: Interaktionen zwischen benachbarten Histidin-Resten und der Nickel-NTA-Matrix.

NTA bindet Metallionen wesentlich stabiler als andere bekannte Chelatbildner (verändert, nach: <http://biotechnology.tistory.com/22>).

Die Nickel-NTA-Aufreinigung diente als erster Reinigungsschritt und wurde bei 4 °C durchgeführt.

Hierzu wurden 100 mL löslicher Überstand, die man nach dem Aufschluss der Zellen erhalten hatte 1:1 mit Waschpuffer verdünnt und mit einer Geschwindigkeit von 1 mL/min auf die vorher mit Waschpuffer mit 5fachem Säulenvolumen äquilibrierte Säulenmatrix (Säulenvolumen: 2,5 mL) aufgetragen. Um unspezifisch gebundenes Protein von der Säule zu entfernen, wurde diese nun in 5 Zyklen mit 5fachem Säulenvolumen mit Waschpuffer gewaschen. Der Waschpuffer enthielt 10 mM Imidazol, das ebenso wie Histidin an die Nickel-Ionen bindet und in geringen Konzentrationen die Elution derjenigen Proteine, die durch verteilte, ungepaarte Histidine an die Matrix gebunden sind, bewirkt. Durch eine hohe Imidazolkonzentration ließ sich dann das eigentliche Protein mittels Elutionspuffer eluieren. Hierbei verwendete man jeweils 2 Zyklen 4fachen Säulenvolumens des jeweiligen Elutionspuffers (25 mM bis 500 mM Imidazol) und sammelte die einzelnen Fraktionen, um sie danach mit SDS-PAGE auf Quantität und Qualität zu untersuchen.

2.2.2.6 Gelfiltration

Die Gelfiltration ist eine geeignete Methode der Chromatographie zur Reinigung und Trennung von Proteinen (Enzyme, Plasmaproteine). Hierbei besteht die stationäre Phase aus gequollenen Gelkörnern und die Trennung erfolgt nach der Teilchengröße. Große Teilchen wandern mit der Flüssigkeit ungehindert zwischen den Gelkörnern hindurch, kleine Teilchen werden in den Poren zurückgehalten und erscheinen zuletzt im Eluat. Als Säulenmatrix wurde Superdex[®] verwandt, eine Substanz, bei der Dextranketten kovalent mit einer stark vernetzten Agarosematrix verknüpft sind.

Die Gelfiltrationssäule wurde zunächst mit 400 mL des entsprechenden, entgasten Gelfiltrationspuffers bei einer Flussrate von 1-2 mL/min äquilibriert. Das Auftragen der zuvor eingeeengten Proteinprobe erfolgte mit Hilfe eines 5 oder 10 mL *sample loops*. Bei einer Flussrate von 1 mL/min wurde danach die Gelfiltration bei 4 °C durchgeführt und das Eluat in 4 mL-Fraktionen gesammelt. Durch eine kontinuierliche photometrische Messung bei 260 und 280 nm wurden die Laufzeiten der einzelnen Proteinpeaks ermittelt und eine eventuelle DNA-Kontamination detektiert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

2.2.2.7 ESI (Elektrospray-Ionisation)-Massenspektrometrie und Bromcyanspaltung

Die Massenspektrometrie ist eine Methode zur Bestimmung des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses m/z von Teilchen. Hierfür wird die zu analysierende Substanz in die Gasphase überführt, ionisiert und die Ionen durch ein elektrisches Feld beschleunigt. Diese ionisierten Teilchen werden anschließend im sogenannten Analysator nach m/z -Verhältnis getrennt. Somit lassen sich Proteine und Peptide und deren Modifikationen (z.B. durch Inhibitoren) analytisch nach unterschiedlichen Massen detektieren.

Besonders geeignet für größere Moleküle wie Proteine ist die ESI-gekoppelte Massenspektrometrie (ESI-MS). Bei der Elektrospray-Ionisation wird eine Analytlösung durch eine Metallkapillare geführt, an deren Ende eine Spannung angelegt ist. Durch die Spannung kommt es dann zur Entstehung eines elektrischen Feldes zwischen der Kapillare und einer Gegenelektrode. Das elektrische Feld durchdringt dabei die Analytlösung und in ihr befindliche Ionen bewegen sich elektrophoretisch in Richtung Gegenelektrode. Dadurch bildet sich am Ende der Kapillare ein Überschuss gleichartig geladener Ionen, die sich gegenseitig abstoßen und schließlich als feines Aerosol (ca. 10 μm Tropfengröße) aus der Kapillare entweichen. Ein Trägergas (Stickstoff) wird verwendet, um eine Vernebelung der Analytlösung, aber auch eine Verdampfung des benutzten Lösungsmittels zu fördern. Für die Probenvorbereitung wurde die SARS-CoV-M^{pro} in einer Konzentration von 1 mg/mL mit dem jeweiligen Proteaseinhibitor, welcher in 100% (v/v) DMSO gelöst war, bei Raumtemperatur 45 Minuten unter leichtem Schwenken inkubiert (Endkonzentration: 5% (v/v) DMSO). Hierbei entsprach das molare Verhältnis Enzym zu Inhibitor 1:100, um einen Überschuss an Inhibitor zu erhalten. Nach der Inkubation wurden die einzelnen Proben abzentrifugiert (Rotor F-45-24-11, 16 000 \times g, 15 min, 4 °C), um nicht gebundenen Inhibitor sowie möglicherweise ausgefallenes Protein abzutrennen. Anschließend wurde eine Dialyse der Proben über Nacht gegen demineralisiertes Wasser durchgeführt, um eine vollständige Entsalzung zu erreichen. Bei kleinen Probenvolumina wurden hierzu ZipTip[®]-Pipettenspitzen, die nach dem Prinzip einer Entsalzungssäule arbeiten, nach Herstellerangaben verwendet.

Proteine und Polypeptide lassen sich in einer hochspezifischen und nahezu quantitativ verlaufenden Reaktion mit Bromcyan spalten (siehe Abbildung 2.2). Um die kovalente Bindung eines Inhibitors an spezifische Peptidbereiche des Enzyms nachzuweisen, wurde ein Bromcyan-Verdau mit anschließendem Trypsin-Verdau der Protease angesetzt und die entstehenden Peptide massenspektrometrisch untersucht. Bromcyan spaltet Proteine spezifisch C-terminal nach der Aminosäure Methionin. Trypsin ist eine Serinprotease und spaltet nach den Aminosäuren Lysin und Arginin.

Hierfür wurden 10 µg Protease mit 3 µL 1 M BrCN-Lösung in Acetonitril unter Argon im Dunkeln bei Raumtemperatur für 6 Stunden inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 250 µL demineralisiertem Wasser gestoppt. Der anschließende Trypsin-Verdau wurde nach Herstellerangaben angesetzt.

Die resultierenden Peptide wurden mittels C₁₈-ZipTip[®]-Pipettenspitzen (nach der Standard-Methode von Millipore) isoliert und in 30 µL MeOH/dH₂O/AcOH (49/49/2, v/v/v) gelöst.

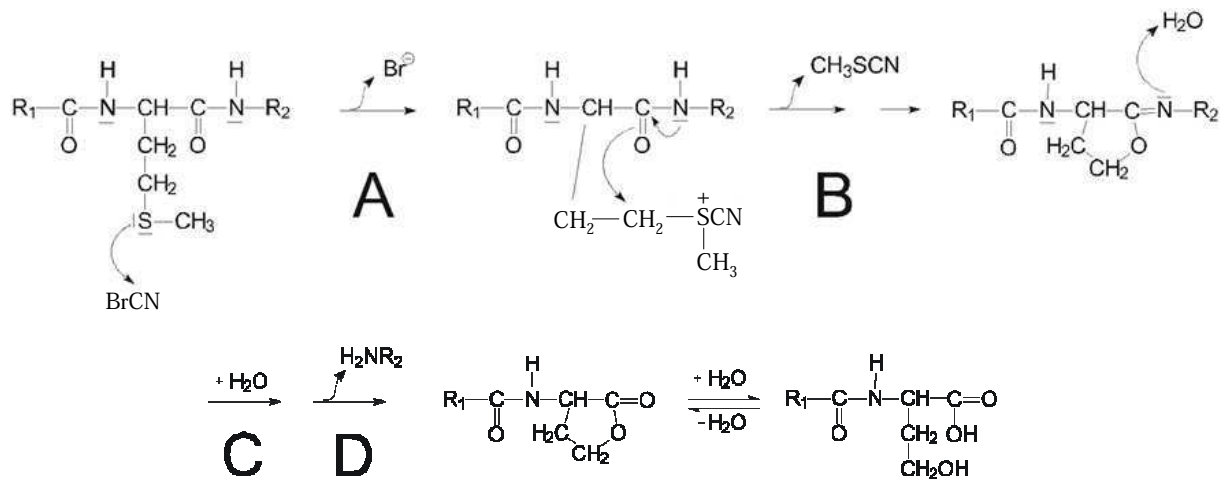


Abb. 2.2: Bromcyanspaltung. Der erste Reaktionsschritt (A) ist ein nucleophiler Angriff des Methioninschwefelatoms am Kohlenstoffatom von Bromcyan, wodurch es zur Bildung eines Sulfonium-Ions kommt. Unter Freisetzung von Methylthiocyanat (B) wird ein Iminolacton gebildet. Die Hydrolyse (C) des Iminolactons führt unter Spaltung der Peptidbindung (D) zum Homoserinlacton, das in wässriger Lösung mit Homoserin im Gleichgewicht steht (verändert, nach: Dissertation, Krätzner, 2001).

2.2.2.8 FRET-Assay zur Bestimmung der Hemmung der SARS-CoV-M^{pro}

Die Quantifizierung der Hemmung der SARS-CoV-M^{pro} durch den jeweiligen potentiellen Inhibitor erfolgte über einen FRET-Assay (FRET = *fluorescence resonance energy transfer*). Bei dieser Methode wird ein Substrat verwendet, das an einem Ende einen Fluoreszenz-Donor und am anderen Ende einen Fluoreszenz-Akzeptor trägt. Der Akzeptor absorbiert bei derselben Wellenlänge, bei der der Donor fluoresziert. Im intakten Substrat befinden sich beide Gruppen in einem definierten Abstand zueinander, wodurch es zum „inneren“ *quenching* kommt. Eine Spaltung des Substrats durch das Enzym führt zur Aufhebung des *quenching*-Abstandes und somit zur Fluoreszenz durch den Fluoreszenz-Donor. Es gilt: je mehr Substrat gespalten wird, desto höher ist die Fluoreszenz (siehe Abbildung 2.3). Dieser Assay wurde ebenfalls für die allgemeine Aktivitätsermittlung des exprimierten und aufgereinigten Enzyms verwandt.

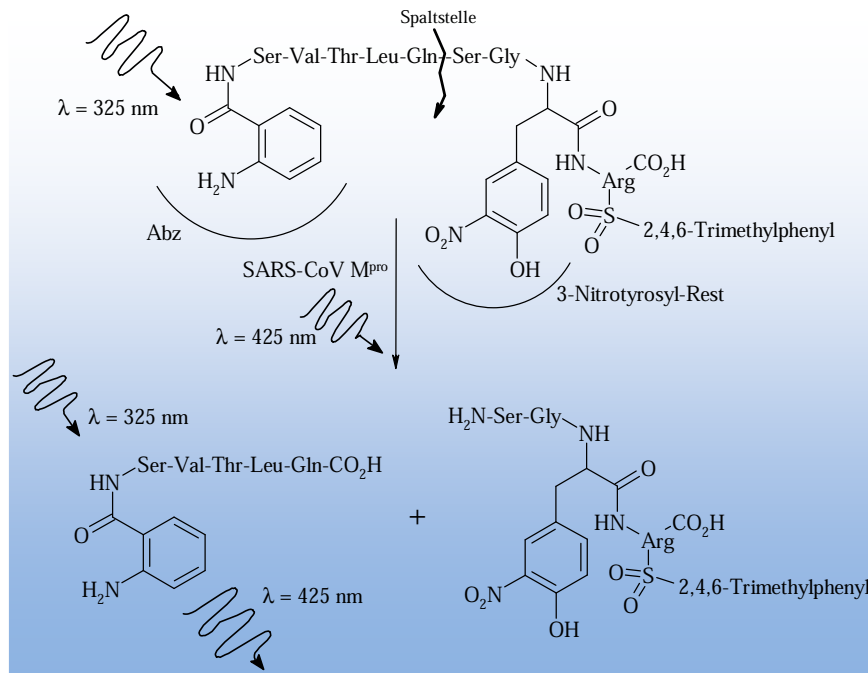


Abb. 2.3: Prinzip des FRET-Assays zur Bestimmung der Hemmung der SARS-CoV-M^{pro} (verändert, nach: Dissertation, Käßler, 2004).

2.2.3 Kristallisation von Proteinen

2.2.3.1 Prinzip und Durchführung der Proteinkristallisation

Seit dem Beginn der Proteinbiochemie wird die Kristallisation für die Isolierung und Reinigung von Proteinen verwendet. So gelang es James Batcheller Sumner im Jahre 1926 das erste Enzym namens Urease zu kristallisieren, wofür er 1946 den Nobelpreis erhielt (Sumner, 1926). Für die Analyse der Proteinstruktur hingegen wurde sie erst viel später entdeckt und perfektioniert. Für biochemische Zwecke genügen normalerweise schlecht gewachsene Mikrokristalle. Wenn man jedoch molekulare Strukturen bestimmen möchte, benötigt man Einzelkristalle von hoher Qualität und ausreichender Größe.

Eine Grundvoraussetzung zur Entstehung solcher Kristalle ist eine sehr reine Proteinlösung (> 95%). Damit eine Kristallisation beginnen kann, ist eine Übersättigung der Lösung notwendig, also ein thermodynamisches Ungleichgewicht, das den Ausschluss von Proteinmolekülen aus der Lösung beschleunigt. Hierfür spielen alle Faktoren eine Rolle, die die Löslichkeit eines Proteins herabsetzen können, wie z.B. der pH-Wert, die Fällungsmittelkonzentration, die Temperatur und die Ionenstärke.

Die folgende Abbildung zeigt die Löslichkeitskurve von Proteinen:

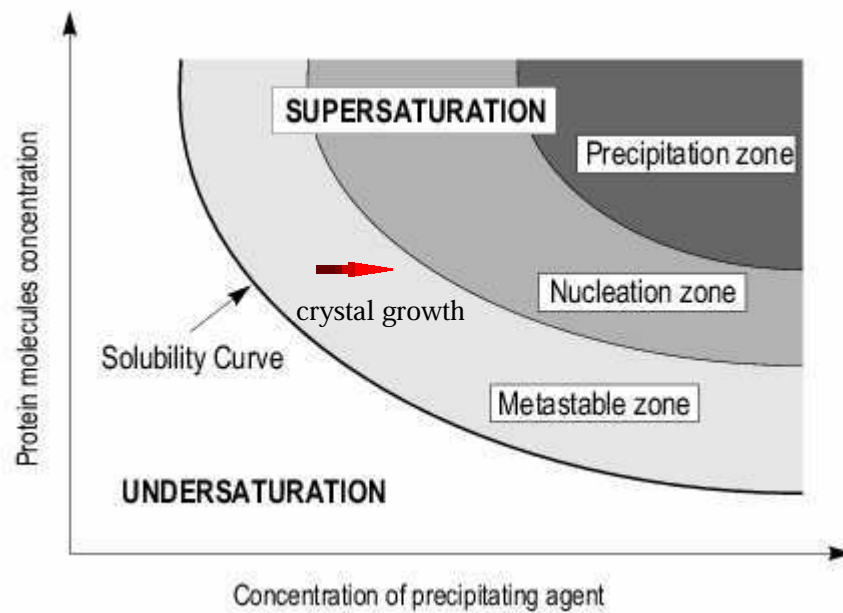


Abb. 2.4: Löslichkeitskurve von Proteinen (verändert, nach Ducruix und Giegé, 1992).

Man unterscheidet generell zwei Phasen des Kristallisationsprozesses, die Nukleation (Keimbildung) und das Kristallwachstum. Zur Nukleation ist eine stärkere Übersättigung nötig, die für das Wachstum der Kristalle aber ungünstig ist, da hier bevorzugt viele kleinere Kristalle entstehen. Die Bildung von Kristallisationskeimen führt zu einer Verringerung der Proteinkonzentration und die Lösung erreicht den metastabilen Bereich (siehe Abbildung 2.4). Dort findet keine Nukleation mehr statt und die Kristalle können somit wachsen.

Die verbreitetste Technik zur Kristallisation von Proteinen ist die Dampfdiffusion, weil damit leicht eine große Anzahl von verschiedenen Bedingungen untersucht werden kann. Sie wird oft als *hanging drop*- oder aber auch als *sitting drop*-Verfahren angewendet (siehe Abbildung 2.5). Bei diesen Methoden wird ein bestimmtes Volumen Proteinlösung mit einem bestimmten Volumen Reserviorlösung gemischt, die ein Fällungsmittel und andere Additive enthält. Dieser Tropfen wird dann in einem luftdicht verschlossenen Raum einem sehr viel größeren Volumen an Reserviorlösung gegenübergestellt. Aufgrund der geringeren Fällungsmittelkonzentration im Proteintropfen tritt ein Transport von Wassermolekülen über die Gasphase in den Raum in Richtung Reserviorlösung ein. Die Konzentration im Tropfen nimmt zu und die Löslichkeitsgrenze des Proteins wird somit überschritten. Die Proteinmoleküle werden aus der Lösung verdrängt und lagern sich zwangsläufig zusammen. Bei diesem Prozess entsteht im günstigsten Fall eine periodische Anordnung, ein Kristall.

In folgender Abbildung werden *hanging drop*- und *sitting drop*-Verfahren näher erläutert:

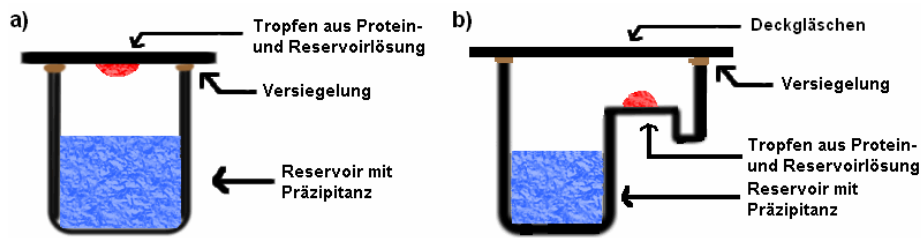


Abb. 2.5: Proteinkristallisation nach dem a) *hanging drop*- und b) *sitting drop*-Verfahren (verändert, nach:

<http://www.bio.davidson.edu/courses/MolBio/MolStudents/spring2003/Kogoy/protein.html>).

Alle Kristallisationsansätze wurden in *24-well* Platten nach der *hanging drop*-Methode durchgeführt. Dabei wurde 1 μL Proteinlösung mit derselben Menge an Reservoirolösung gemischt und gegen ein Reservoir von 500 μL äquilibriert. Die Deckgläschen, auf die die Tropfen pipettiert wurden, waren silikonisiert, um ein Verlaufen des Tropfens zu verhindern. Mit Silikonfett oder schwerem Paraffinöl wurde der Spalt zwischen Deckglas und *well* dann luftdicht verschlossen.

Der Status der Kristallisation wurde täglich unter dem Mikroskop verfolgt.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die genauen Zusammensetzungen der durchgeführten Kristallisationsansätze:

Tab. 2.1: Übersicht der Zusammensetzungen der durchgeführten Kristallisationsansätze.

Kristallisationsansatz	Zusammensetzung des Screens	Prot. Konz.	Temp.
Ansatz 1	0,1 M MES-Puffer (pH 6,0-7,0) 2-18% (w/v) PEG 8000 0,3 M-0,95 M Ammoniumsulfat	5 mg/mL	18 °C
Ansatz 2 ^{*)}	0,1 M MES-Puffer (pH 6,0) 6-8% (w/v) PEG 6000 5% (v/v) DMSO 1 mM DTT	8 mg/mL	18 °C
Ansatz nach Goetz <i>et al.</i> , 2007	0,1 M MES-Puffer (pH 6,0) 10% (w/v) PEG 6000 0,15 M NaCl 10% (v/v) Glycerol 5% (v/v) DMSO 0,014 M β -Mercaptoethanol	8 mg/mL	18 °C
Ansatz nach Hsu <i>et al.</i> , 2005	1 M Na-Malonat-Puffer (pH 7,0) 4% (v/v) Isopropanol	8 mg/mL	18 °C
Ansatz nach Xu <i>et al.</i> , 2005	0,1 M MES-Puffer (pH 6,5) 0,6 M Ammoniumsulfat	8 mg/mL	18 °C

^{*)} Ansatz mit optimalen Bedingungen für ein Kristallwachstum des Apoproteins und für Co-Kristalle.

2.2.3.2 Co-Kristallisation von Proteinen und Tränken der Kristalle (*soaking*)

Um die spezifische Bindung des jeweiligen Inhibitors an die SARS-CoV-M^{pro} zu bewirken und anschließend den Komplex zu analysieren, benötigt man Einzelkristalle von optimaler Größe und Qualität des erwünschten Protein-Inhibitor-Komplexes.

Hierzu wurde analog zu der Probenvorbereitung für die ESI-MS-Messungen verfahren (siehe Kapitel 2.2.2.7), aber keine Dialyse durchgeführt. Anstelle einer Proteinkonzentration von 1 mg/mL, die für eine spektrometrische Messung vollkommen ausreicht, wurde mit einer Konzentration von 8 mg/mL für ein optimales Kristallwachstum gearbeitet. Da die einzelnen Inhibitoren in DMSO gelöst waren und somit auch im Inkubationsansatz DMSO vorhanden war (Endkonzentration: 5% (v/v) DMSO), wurde im Kristallisationsscreen, der das vielversprechendste Kristallwachstum des Apoproteins lieferte und auch zur Co-Kristallisation herangezogen wurde, auf die Zugabe von DMSO verzichtet. In Tabelle 2.1 zeigt Ansatz 2 die optimalen Bedingungen für ein Kristallwachstum des Apoproteins und für Co-Kristalle.

Beim *soaking* wurden schon gewachsene Apoprotein-Kristalle oder Co-Kristalle in einen Tropfen Reservoirlösung überführt, in dem der jeweilige Inhibitor gelöst war (*soaking*-Lösung: Reservoirlösung ohne DTT mit 1 mM TCEP und 2 mM Inhibitor). Außerdem enthielt die Kryolösung ebenfalls den entsprechenden Inhibitor (30% (w/v) PEG 400 in 0,1 M MES-Puffer (pH 6,0), 1 mM TCEP und 2 mM Inhibitor).

Aufgrund der möglichen verlangsamten Diffusion des Inhibitors durch die Flüssigkeitskanäle des Kristalls, wurde bis zu 36 Stunden im hängenden Tropfen inkubiert, um eine optimale Besetzung des Enzyms zu erreichen. Bei den *soaking*-Experimenten wurde anstelle des oben angegebenen MES-Puffers (pH 6,0) mit HEPES-Puffer (pH 7,6) gearbeitet, um möglichst bei beiden Protomeren des SARS-CoV-M^{pro}-Dimers den katalytisch aktiven Zustand herbeizuführen (Tan *et al.*, 2005).

2.2.3.3 *Seeding*

Seeding kann eingesetzt werden, um das Wachstum sowie die Ordnung von Kristallen zu verbessern. Man kann zwischen *macro*- und *micro-seeding* unterscheiden. Beim *macro-seeding* werden kleinere Einkristalle in Kristallisationsansätze überführt, welche frische Proteinlösung enthalten. Damit soll die Wachstumsphase der Kristalle ausgedehnt werden, um größere Einkristalle zu erhalten. In *micro-seeding*-Experimenten werden zuerst Kristalle zerstört. Die daraus resultierenden Kristallsplitter werden danach als Kristallisationskeime in frisch angesetzte Kristallisationsexperimente überführt.

In dieser Arbeit wurde *micro-seeding* eingesetzt, um Kristalle der SARS-CoV-M^{pro} verlässlich, in hoher Anzahl und auch schneller zu reproduzieren.

Einkristalle wurden aus einem Kristallisationsansatz entnommen und mit einer Pipettenspitze zertrümmert. Anschließend wurden die Splitter in 100 μL MES-Puffer (pH 6,0) aufgenommen und die Lösung kurz mittels Vortex gemischt. Diese Keime konnten nun mittels eines Katzenschnurrhaares oder Pferdehaares (Pony: „*Little Joe*“) in frisch präparierte Kristallisationsansätze überführt werden (*streak-seeding*).

Die Anlagerung von Molekülen an einen bereits gebildeten Kristall wird, im Gegensatz zur Kristallneubildung, thermodynamisch begünstigt. Das Wachstum der bestehenden Kristallisationskeime wird bevorzugt, während die Kristallneubildung unterdrückt wird. Bei Anwendung dieser Methode zur Reproduktion und Verbesserung der Co-Kristallbildung mit Hilfe von Apoprotein-Kristallsplittern spricht man von *cross-seeding*.

2.2.3.4 Aufnahme von Röntgenbeugungsdaten

Die Messanordnung zur Röntgenbeugung besteht aus einer Röntgenstrahlungsquelle sowie einem Detektor zur Messung der gebeugten Röntgenstrahlen. Die Wellenlänge eines Röntgengenerators mit Kupferanode beträgt 1,54 Å und damit dessen höchstmögliche Auflösung 0,77 Å. Noch höhere Auflösungen sind mit der Röntgenstrahlung an Synchrotronen erreichbar.

Trifft ein Röntgenstrahl auf einen Kristall, durchquert der größte Teil den Kristall ohne große Veränderung. Der elektrische Feldvektor eines Teils der Strahlung versetzt jedoch Elektronen der Kristallatome in Schwingung. Die Röntgenstrahlung wird somit absorbiert und in gleicher Frequenz in alle Richtungen wieder abgegeben. Durch die regelmäßige räumliche Anordnung der einzelnen Atome im Kristall kommt es zu Interferenzen. Viele dieser sich überlagernden Wellen löschen sich gegenseitig aus. Wenn nun zwei Wellenberge aufeinandertreffen, resultiert daraus eine gebeugte Welle, deren Richtung vom jeweiligen Kristallgitter abhängt. Unter Einbeziehung der Fourier-Transformation kann man aus den gebeugten Röntgenstrahlen die exakte Position der Atome in der Einheitszelle des Kristalls bestimmen.

Durch Röntgenbeugung wurde untersucht, ob es sich bei den gewachsenen Kristallen um Salz- oder Proteinkristalle handelte, und später bei Vorlage eines optimalen Kristalls ein vollständiger dreidimensionaler Datensatz aufgenommen, der dann zur Röntgenstrukturanalyse verwendet wurde. Dafür wurde der Kristall in eine von der Größe her passenden Kryoschleife aufgenommen und in flüssigem Stickstoff bei $-195\text{ }^{\circ}\text{C}$ schockgefroren. Um dabei die Bildung von Eiskristallen auszuschließen, wurde der Kristall 30 Sekunden in einer Kryolösung (30% (w/v) PEG 400 in 0,1 M MES-Puffer (pH 6,0)) inkubiert. Die Schleife mit dem Kristall

wurde mit Hilfe eines magnetischen Sockels auf dem Goniometer befestigt und optimal zum Drehachsenzentrum hin ausgerichtet. Verdunstungskälte durch einen kontinuierlichen Strom flüssigen Stickstoffs aus einer Düse verhinderte das Auftauen des Kristalls. Durch das Einfrieren der Kristalle werden diese unempfindlicher gegen Strahlungsschäden, da es nur zu einer sehr langsamen Diffusion gebildeter Radikale kommt.

2.2.3.5 Aufnahme kristallographischer Datensätze mittels Synchrotronbestrahlung

Will man vollständige und vor allem hochauflösende Datensätze aufnehmen, so ist die Intensität, aber auch die Qualität der Röntgenstrahlung des Drehanodengenerators bzw. das Beugungsverhalten der Kristalle nicht immer ausreichend. Um höher aufgelöste Beugungsdaten zu erhalten, wurden in Frage kommende eingefrorene Kristalle an der *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF) in Grenoble und am Synchrotron in Berlin (Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung m.b.H./BESSY) vermessen.

Die verwendete Synchrotronstrahlung bietet einige Vorteile gegenüber der üblichen Röntgenstrahlung. Die Synchrotronstrahlung besteht aus elektromagnetischen Wellen, die tangential zu der Flugbahn von Elektronen bzw. Positronen abgegeben werden, wenn diese im Hochvakuum auf einer Kreisbahn bis nahe an die Lichtgeschwindigkeit beschleunigt werden. Die Wellenlänge des zur Messung verwendeten Lichts lässt sich aus der polychromatischen Strahlung mittels Monochromator variieren. Die resultierende Strahlung ist um einige Größenordnungen intensiver als bei den herkömmlichen Drehanodengeneratoren und somit lassen sich auch sehr kleine Kristalle, aber auch weniger gut streuende Kristalle vermessen.

Die Datensätze der vorliegenden Proteinkristalle, die man auch zur Strukturlösung heranzog, wurden ausschließlich mit dem *in-house* Röntgengenerator MicroMaxTM-007 HF der Firma Rigaku/MSK aufgenommen.

2.2.3.6 Grundlagen der kristallographischen Datenauswertung

Die Richtung eines, an einem Proteinkristall gebeugten Röntgenstrahls, ist abhängig von dem Kristallgitter. Entsprechend dieser Beziehung gilt das Braggsche Gesetz (Formel 1):

Formel 1: Braggsches Gesetz

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \Theta$$

λ : Wellenlänge, d : Abstand der Gitterebenen, Θ : Glanzwinkel, n : Beugungsordnung

Die Beugung der Röntgenstrahlen mit der Wellenlänge λ und dem Winkel Θ an einem Kristall wird hierbei als eine Reflexion an einer imaginären Ebenenschar aus parallelen Ebenen beschrieben, welche den Abstand d voneinander haben.

Der mathematische Zusammenhang zwischen den Positionen der einzelnen Atome in der Einheitszelle des Kristallgitters und den diffraktierten Röntgenstrahlen, den sogenannten Struktur Faktoren ($F(hkl)$), ist eine Fourier-Transformation (Formel 2):

Formel 2: Inverse Fourier-Transformation

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F(hkl) e^{[-2\pi i(hx+ky+lz)]}$$

Durch die Streuung der Röntgenstrahlen an der Elektronenhülle der Atome ergibt die Röntgenstrukturanalyse nicht direkt die genauen Atomkoordinaten, die den Positionen der Atomkerne entsprechen, sondern eine dreidimensionale Verteilung der Elektronen der Atome, welche man als Elektronendichte bezeichnet. Die Elektronendichte ρ an jedem Punkt (x, y, z) im Kristall lässt sich aus der Strukturfaktoramplitude $F(hkl)$, die proportional zur Quadratwurzel der gemessenen Intensität I für den Reflex (hkl) ist, der dazugehörigen Phase $\varphi(hkl)$ und dem Volumen V der Kristallzelle, berechnen (Formel 2 und Formel 3).

Die am Proteinkristall gebeugten Röntgenstrahlen werden mit Hilfe eines Flächenzählers (z.B. einer *Image plate* oder eines CCD Detektors) detektiert, was dazu führt, dass nur die Amplitude der Wellen (Betrag des Struktur factors) gemessen wird, wodurch die Information über die Phasen der Wellen (φ in Formel 3) verloren geht. Diese wichtige Information braucht man aber, um aus den Intensitäten auf die Struktur Faktoren zu schließen. Dieses Phänomen nennt man in der Kristallographie das Phasenproblem.

Formel 3: Berechnung der Struktur Faktoren

$$I(hkl) \sim |F(hkl)|^2$$

$$F(hkl) = |F(hkl)| e^{i\varphi(hkl)}$$

I(hkl): Intensität der Streuwelle, F(hkl): Strukturfaktor

2.2.3.7 Molekularer Ersatz

Wie in obigem Kapitel erklärt, können aus den erhaltenen Reflexen lediglich die Amplituden der Struktur Faktoren berechnet werden. Um die Elektronendichte über die Fourier-

Transformation zu berechnen, muss man aber ebenso die zu den Strukturfaktoren gehörenden Phasen bestimmen. Das Phasenproblem kann durch direkte Methoden, multi-Wellenlängen anomale Diffraktion (MAD), singulären oder multiplen isomorphen Ersatz (SIR (*single isomorphous replacement*) und MIR (*multiple isomorphous replacement*)), oder aber durch molekularen Ersatz (MR (*molecular replacement*)) gelöst werden. In dieser Arbeit wurde für die Strukturlösung der SARS-CoV-M^{pro} im Komplex mit Inhibitoren der molekulare Ersatz (MR) verwendet.

Bei diesem Verfahren werden die Koordinaten einer bereits bekannten Struktur, die wenigstens eine 25%ige Sequenzidentität mit der unbekannt Struktur aufweist, herangezogen. Aus diesen Koordinaten kann man daraufhin die Strukturfaktoramplituden (F_{calc}) und die Phasen (φ_{calc}) für das Modell berechnen. Aus den Modellphasen und den gemessenen Strukturfaktoramplituden (F_{obs}) resultiert eine Elektronendichtekarte der neuen Kristallstruktur. Das bereits bekannte Strukturmodell muss jedoch zuerst genau in die neue Kristallzelle eingepasst werden, weil die Raumgruppe und Orientierung des Proteinmoleküls in der bekannten und der neuen, unbekannt Kristallstruktur unterschiedlich sind. Hierzu wird die Pattersonfunktion (Patterson, 1934) verwendet. Dabei werden zwei Pattersonfunktionen berechnet, und zwar einerseits die des Suchmodells und andererseits die der experimentell bestimmten Daten. Dann werden diejenigen Rotationswinkel berechnet, bei denen sich die beiden Pattersonfunktionen am meisten ähneln, d.h. die Rotationsfunktion ein Maximum besitzt. Nun wird das Suchmodell entsprechend der Lösung der Rotationsfunktion gedreht und dabei schrittweise durch die Kristallzelle translatiert, wobei es nach jedem Schritt zu der Berechnung einer Korrelation zu den experimentellen Strukturfaktoramplituden kommt (Translationsfunktion). Wenn das Suchmodell schließlich in die neue Kristallzelle eingepasst worden ist, kann eine Elektronendichtekarte ermittelt werden.

2.2.3.8 Ermittlung von R-Faktoren

Ein Maß dafür und somit ein Qualitätskriterium, wie gut ein Modell mit den gemessenen Daten übereinstimmt, ist der sogenannte R-Faktor. Dieser wird anhand von Formel 4 berechnet. Man ermittelt die mittlere Abweichung zwischen beobachteten (F_{obs}) und aus dem Modell berechneten Strukturfaktoren (F_{calc}).

Formel 4: Berechnung des R-Faktors

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left| |F_{obs}| - k |F_{calc}| \right|}{\sum_{hkl} |F_{obs}|}$$

Der R-Faktor beruht auf Daten, die selbst verändert werden und ist damit nicht objektiv. Als verlässlicheres Kriterium kann man den sogenannten freien R-Faktor (R_{free}) angeben, für dessen Berechnung 5-10% der Reflexe zufällig ausgewählt und dann von der Verfeinerung ausgeschlossen werden (Brünger, 1992).

2.2.3.9 Datenauswertung, Strukturlösung, Modellbau und Verfeinerung

Nach der Röntgenbestrahlung des Proteinkristalls und dem Erhalt von Reflexintensitäten wurden zur Auswertung der erhaltenen Daten mehrere kristallographische Programme verwendet. Zur anfänglichen Datenreduktion wurde mit Mosflm (Indexierung und Integrierung; Leslie *et al.*, 1992) sowie Scala (Skalierung; Evans *et al.*, 2005) gearbeitet oder aber mit XDS (Indexierung, Integrierung und Skalierung; Kabsch *et al.*, 1993).

Die Struktur des Komplexes von Enzym mit Inhibitor wurde durch Molekularen Ersatz mit dem Programm Phaser (McCoy *et al.*, 2007) gelöst.

Die atomaren Modelle wurden mit dem Programm Coot (Emsley *et al.*, 2004) bearbeitet. Die Verfeinerungen der Atomkoordinaten erfolgte mit der Software Refmac (Murshudov *et al.*, 1997). Zur grafischen Wiedergabe der Strukturdaten wurde mit dem Programm PyMol gearbeitet.

Die Röntgenstrukturanalysen wurden freundlicherweise von Herrn Dipl.-Biol. Uwe Dietzel (Rudolf-Virchow-Zentrum, Würzburg) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Expression und chromatographische Reinigung der SARS-CoV-M^{pro}

3.1.1 Expression der SARS-CoV-M^{pro}

Die SARS-CoV-M^{pro} wurde wie in Kapitel 2.2.1.8 beschrieben exprimiert und lysierte Zellen anschließend mittels SDS-PAGE auf Expressionserfolg bezüglich der gewünschten Protease analysiert.

Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis der 18-Stunden-Inkubation der induzierten *E. coli*-Zellen (2) bzw. die Expression beim Zeitpunkt 0 vor der Induktion (1):

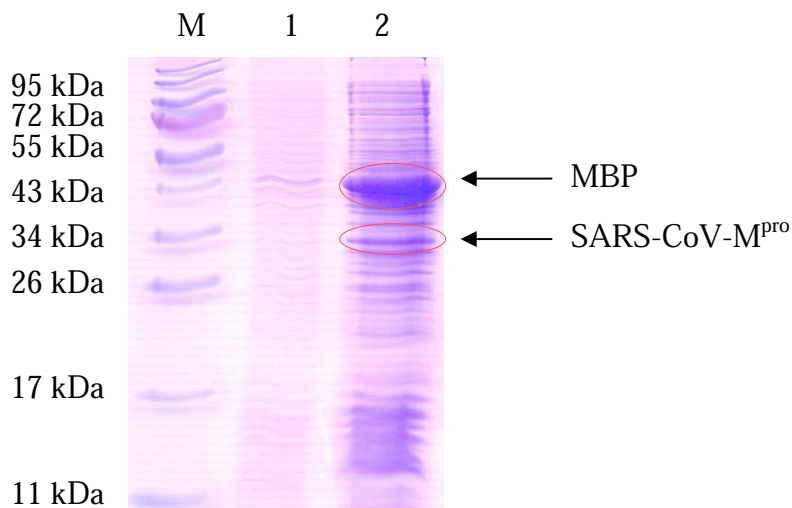


Abb. 3.1: SDS-PAGE nach 18-Stunden-Inkubation der induzierten *E. coli*-Zellen.

M: Marker; 1: Expression nach „0“ Stunden (basale Expression); 2: Expression nach 18 Stunden.

Wie aus obiger Abbildung ersichtlich, kam es auch bei fehlender Induktion durch normales Zellwachstum zur Expression des MBP und damit, auch wenn nicht visuell erkennbar, zu einer Expression der SARS-CoV-M^{pro}, da beide vorab zwangsläufig als Fusionsprotein gemeinsam exprimiert wurden.

Nach 18 Stunden konnte man deutlich einen Zuwachs an MBP- (ca. 42 kDa) und SARS-CoV-M^{pro}-Expression (ca. 34 kDa) anhand von Proteinbanden verzeichnen.

3.1.2 Chromatographische Reinigung der SARS-CoV-M^{pro}

3.1.2.1 Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Durch die Ni-NTA-Affinitätschromatographie war es möglich, mit einer ansteigenden Imidazolkonzentration die Protease ohne hohe Kontamination durch Fremdproteine zu eluieren (siehe Kapitel 2.2.2.5).

Die nachfolgende Abbildung verdeutlicht den Erfolg dieses Reinigungsschrittes:

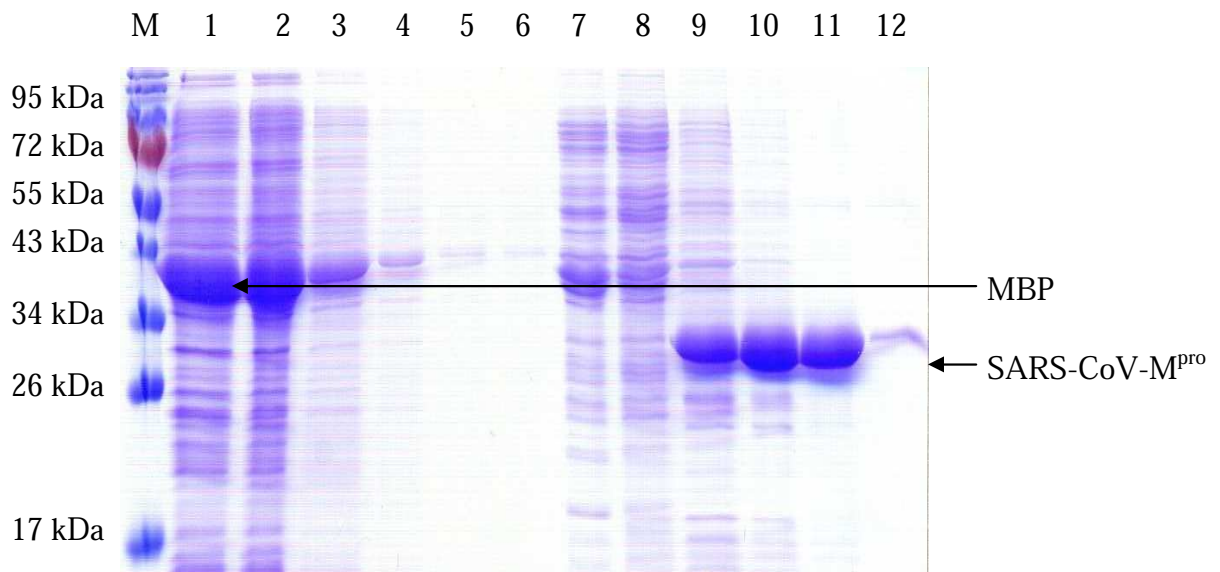


Abb. 3.2: SDS-PAGE nach Reinigung der SARS-CoV-M^{pro} nach Ni-NTA-Affinitätschromatographie.

M: Marker; 1: Säulendurchfluss; 2-6: Waschschrirte; 7-8: Elution mit 25 mM Imidazol; 9-10: Elution mit 100 mM Imidazol; 11-12: Elution mit 500 mM Imidazol.

Das Ergebnis dieser Säulenchromatographie zeigt eine sehr gute Reinigung der SARS-CoV-M^{pro} (ca. 34 kDa).

Das MBP mit der Größe von ca. 42 kDa, welches autokatalytisch durch die Protease nach der Expression abgespalten wird, wurde im Durchfluss (1) und den anfänglichen Waschfraktionen (2-6) detektiert, nicht aber in den Elutionsfraktionen mit 100 mM und 500 mM Imidazol (9-12). Die Elution mit 25 mM Imidazol (7-8) kann noch als zusätzlicher Waschschrirte angesehen werden, da viel Fremdprotein vom eigentlichen Enzym abgetrennt wurde und anscheinend noch vorhandene, letzte unspezifische Bindungen von Proteinen an die Säule gelöst wurden.

Die Elutionsfraktionen, die den Banden 9-12 entsprachen, wurden vereint, über Nacht zur Entfernung des Imidazols bei 4 °C dialysiert und anschließend für die Gelfiltration als nächsten Reinigungsschritt durch Einengung vorbereitet.

3.1.2.2 Gelfiltration

Als zweiter Aufreinigungsschritt wurde mittels einer ÄKTA-Chromatographiestation eine Gelfiltration durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.2.6).

Die untenstehende Abbildung zeigt das zugehörige Elutionsprofil:

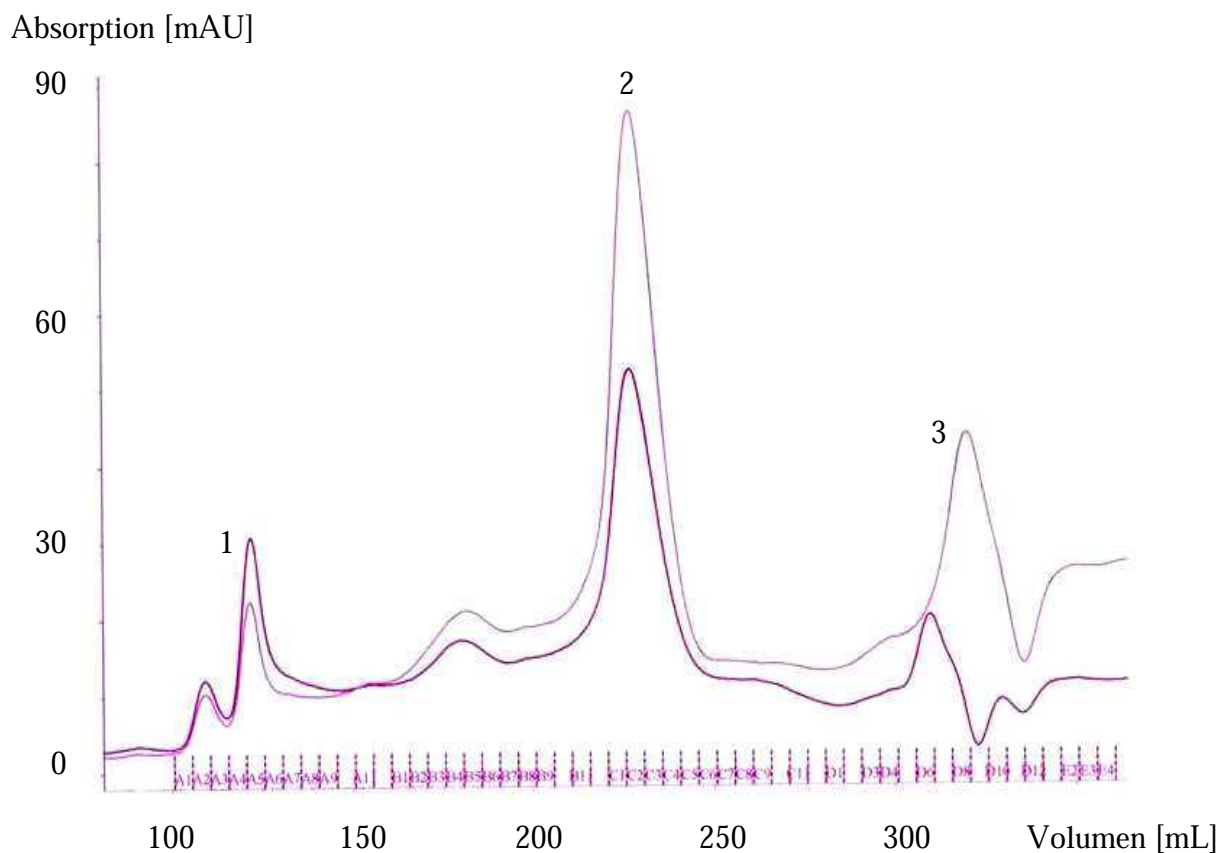


Abb. 3.3: Elutionsprofil der Gelfiltration der SARS-CoV-M^{pro} mittels Superdex[®] 200 26/60. hellviolett: Absorption bei 280 nm; dunkelviolett: Absorption bei 260 nm.

Die den Peaks 1 und 3 entsprechenden Elutionsfraktionen enthielten kein im SDS-Gel nachweisbares Protein. Die SARS-CoV-M^{pro} eluierte im zweiten Peak, auch erkennbar durch die Schärfe und Symmetrie, in hoher Reinheit.

Nach SDS-PAGE der in Frage kommenden Fraktionen in diesem Peakbereich konnte der finale Reinigungserfolg bewiesen werden, was die untenstehende Abbildung verdeutlicht:

3 Ergebnisse

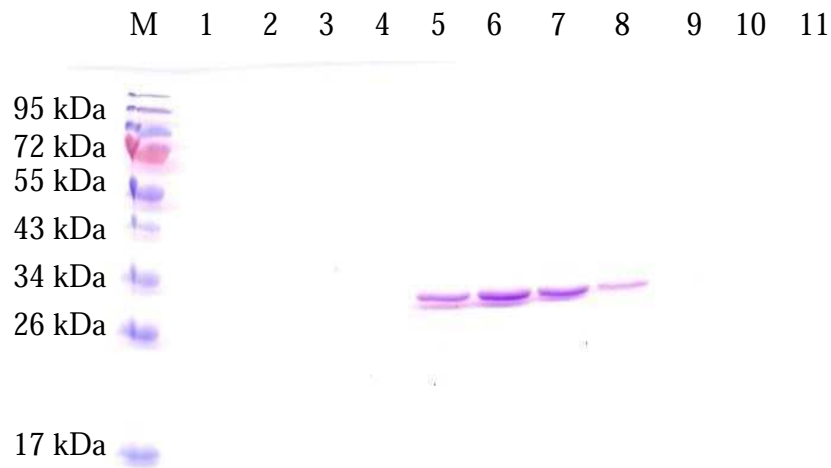


Abb. 3.4: SDS-PAGE nach Reinigung der SARS-CoV-M^{pro} nach der Gelfiltration.
M: Marker; 1-4: Peak 1; 9-11: Peak 3; 5-8: Peak 2 (gereinigte SARS-CoV-M^{pro}).

Wie aus obiger Abbildung ersichtlich, konnte ein sehr guter Reinigungserfolg durch Gelfiltration erreicht werden. Die vier Fraktionen, die das reine Enzym enthielten (5-8), wurden vereinigt, auf eine Konzentration von 8 mg/mL eingengt und dabei gleichzeitig in den Lagerungspuffer umgepuffert. Die erhaltene Proteinkonzentration genügte für erste massenspektrometrische Versuche und für die Proteinkristallisation. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden durch *upscaling* der Proteinexpression größere Ausbeuten an der SARS-CoV-M^{pro} erhalten.

3.2 Massenspektrometrische Untersuchungen zur SARS-CoV-M^{pro}

3.2.1 Massenspektrum der SARS-CoV-M^{pro}

Massenspektrometrische Versuche ließen Rückschlüsse auf das Bindungsverhalten der in Frage kommenden Inhibitoren der SARS-CoV-M^{pro} zu (siehe Kapitel 2.2.2.7 und Kapitel 8.4). Damit konnte eindeutig bewiesen werden, ob ein Inhibitor kovalent an das Enzym bindet oder nicht.

Das folgende Massenspektrum zeigt die unbehandelten SARS-CoV-M^{pro}-Monomere in verschiedenen positiven Ladungszuständen nach Elektrospray-Ionisation:

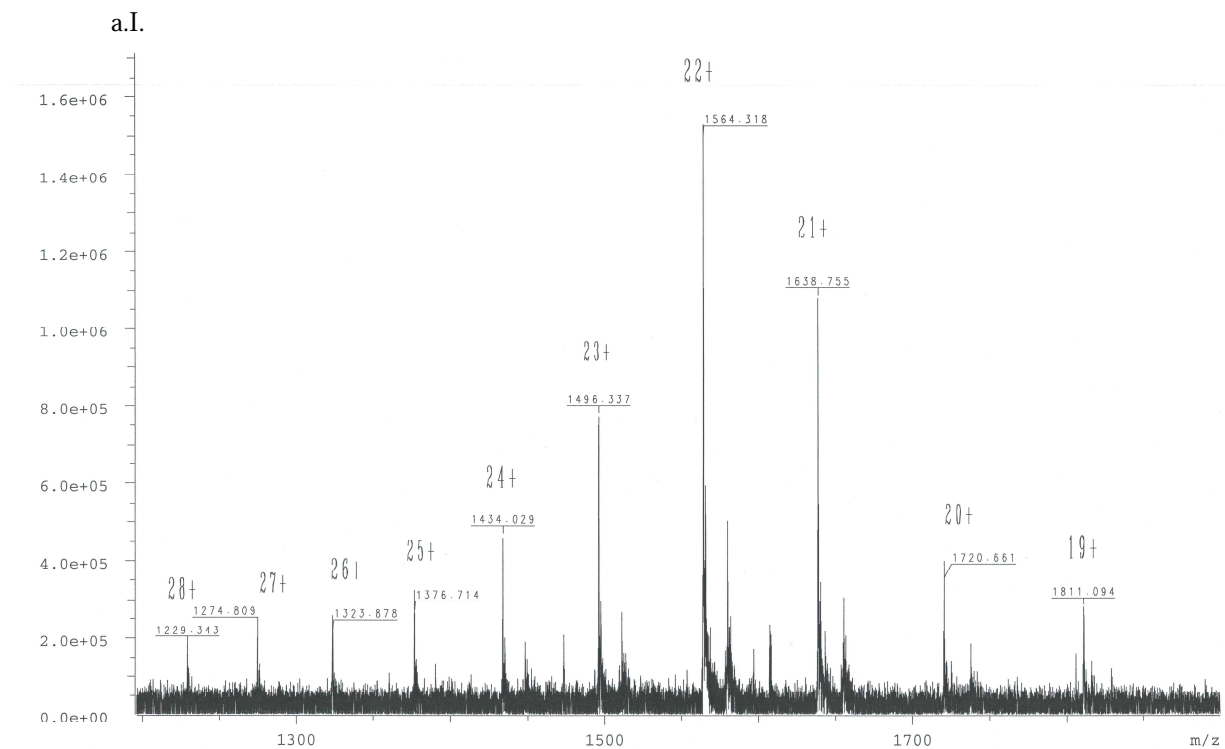


Abb. 3.5: ESI-Massenspektrum der SARS-CoV-M^{pro}. Gezeigt sind verschiedene Ladungszustände des Enzyms.

Das erhaltene Massenspektrum verdeutlicht ebenfalls, dass die Protease in einem hohen Reinheitsgrad vorlag. Bei den wenigen Verunreinigungen, die sich in kleineren Nebenpeaks bemerkbar machten, handelte es sich wahrscheinlich um Salze, Addukte an die Protease oder andere Substanzen, die nicht komplett durch die Dialyse-Vorbehandlung entfernt wurden.

Über den Betrag der Ladung der einzelnen Masse-zu-Ladung-Hauptpeaks lässt sich jeweils die Masse der Protease von ca. 34 kDa berechnen.

Im folgenden Spektrum ist ein Ladungszustand der Protease vergrößert dargestellt. Kommt es zu Veränderungen dieses Spektrums (Referenzspektrum), wie z.B. Peakverschiebungen oder Entstehung von neuen Peaks, bei mit Inhibitoren behandeltem Enzym, kann man kovalente Bindungen des Inhibitors an das Protein nachweisen.

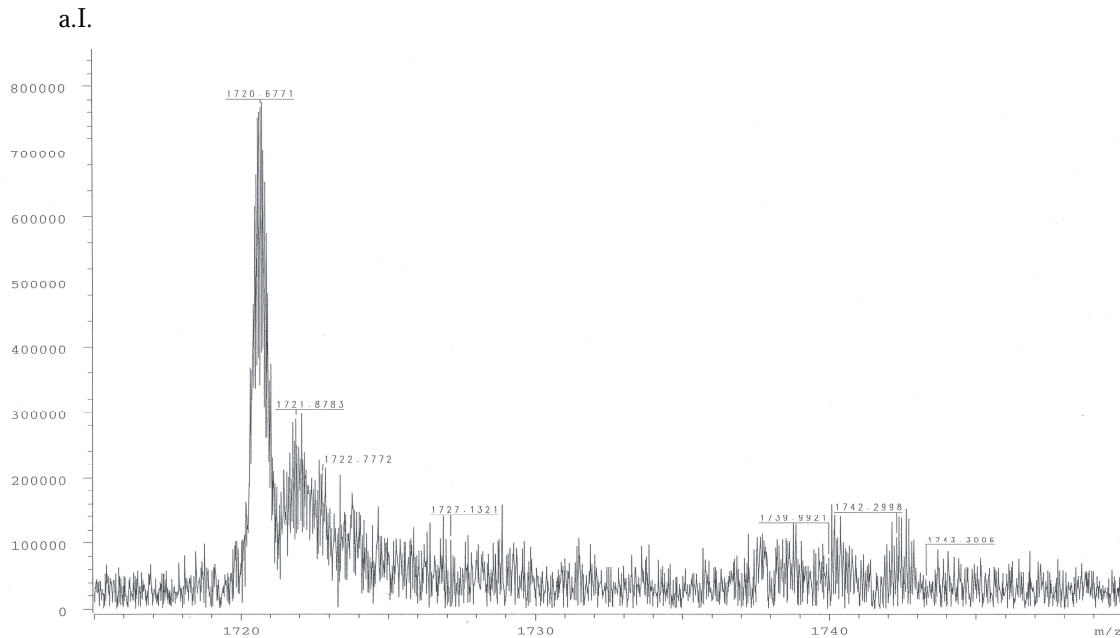


Abb. 3.6: ESI-Massenspektrum der SARS-CoV-M^{pro}. Vergrößert gezeigt ist der 20⁺-Ladungszustand des Enzyms.

3.2.2 Bindungsverhalten der einzelnen Inhibitoren an die SARS-CoV-M^{pro}

Die Inhibitoren **AB69**, **YQ28**, **Lit8**, **Lit10**, **T1**, **TS174** und **IISBT** (Strukturformeln: siehe Kapitel 8.4) zeigten keine irreversible Bindung an die Protease. Hier entsprachen die gemessenen Spektren der mit den Hemmstoffen inkubierten SARS-CoV-M^{pro} den jeweiligen Referenzspektren, welche immer zusätzlich mitgemessen wurden. Somit konnte man von einem reversiblen, bzw. kovalent-reversiblen Hemmmechanismus bezüglich dieser Inhibitoren ausgehen. Bei letztgenanntem Mechanismus wird ein gebundener Inhibitor bei der Probenvorbehandlung durch den Dialyseprozess, oder aber durch die Ionisation während der ESI-Massenspektrometrie wieder von der Protease entfernt; nachfolgend werden die Inhibitoren vorgestellt, die eine irreversible Bindung an das Enzym eingehen.

ESI-Massenspektren von Inhibitoren inkubiert zusammen mit der SARS-CoV-M^{pro}

Bei den untenstehenden Abbildungen handelt es sich jeweils einmal um das Referenzspektrum der SARS-CoV-M^{pro} und einmal um das erhaltene ESI-Massenspektrum des mit den Inhibitoren behandelten Enzyms:

Lit1:

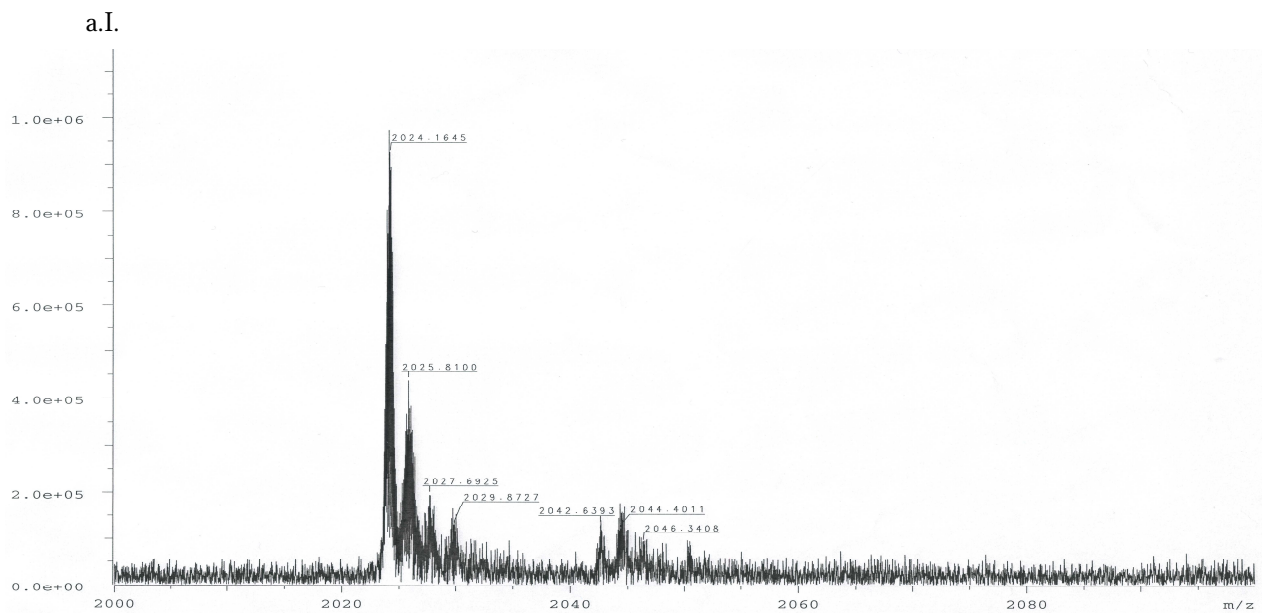


Abb. 3.7: ESI-Massenspektrum der SARS-CoV-M^{pro}. Vergrößert gezeigt ist der 17⁺-Ladungszustand des Enzyms.

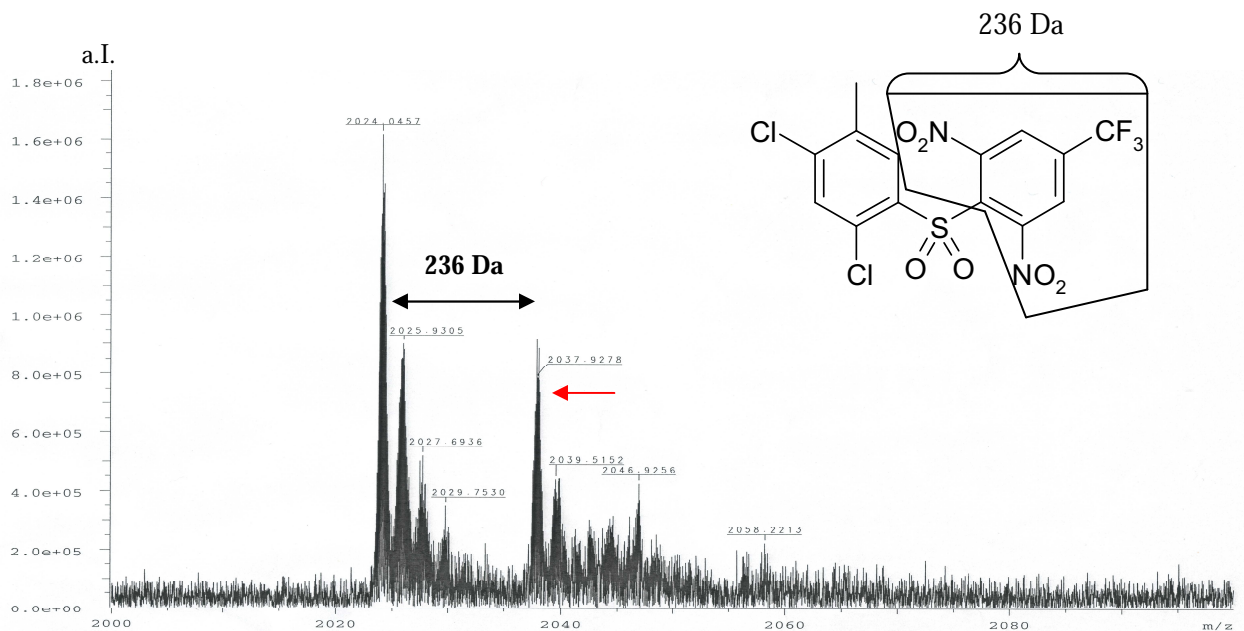


Abb. 3.8: ESI-Massenspektrum der SARS-CoV-M^{pro}, inkubiert mit **Lit1**. Vergrößert gezeigt ist der 17⁺-Ladungszustand des Enzyms. Der rote Pfeil kennzeichnet den Enzym-Inhibitor-Komplex.

TS48:

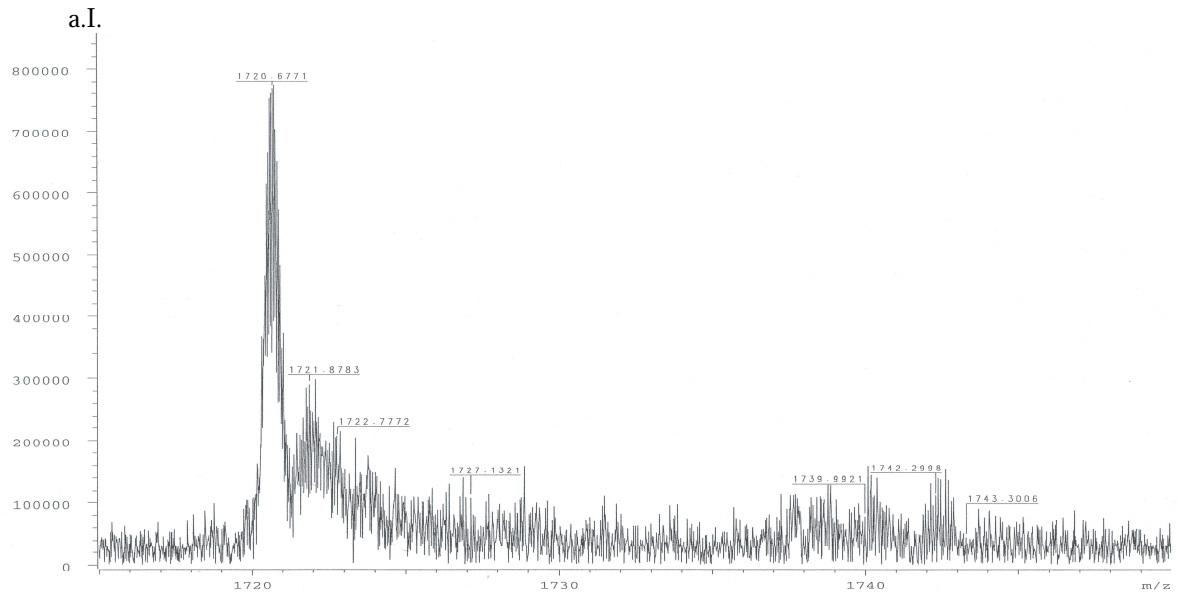


Abb. 3.9: ESI-Massenspektrum der SARS-CoV-M^{pro}. Vergrößert gezeigt ist der 20⁺-Ladungszustand des Enzyms.

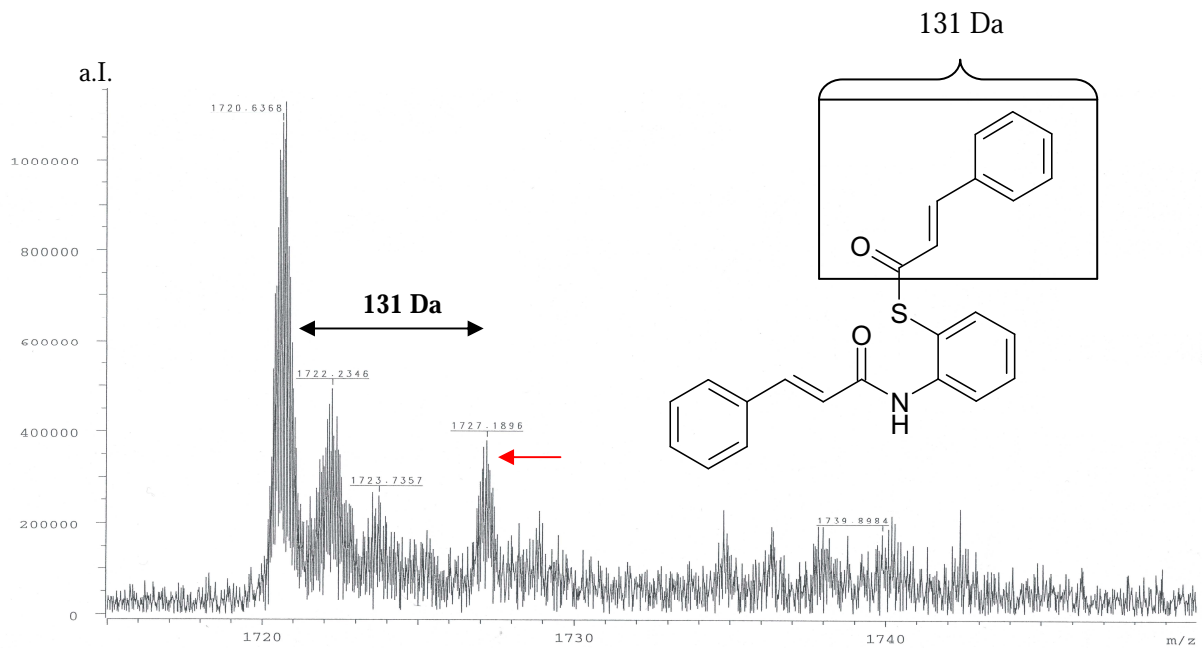


Abb. 3.10: ESI-Massenspektrum der SARS-CoV-M^{pro}, inkubiert mit **TS48**. Vergrößert gezeigt ist der 20⁺-Ladungszustand des Enzyms. Der rote Pfeil kennzeichnet den Enzym-Inhibitor-Komplex.

Wie aus obiger Abbildung und der Struktur von **TS48** ersichtlich, besteht dieser unter anderem aus zwei gleichen Molekülbausteinen und damit aus zwei Bausteinen gleicher

3 Ergebnisse

molarer Masse. Durch ein weiteres ESI-MS-Experiment konnte allerdings belegt werden, dass obiger, markierter Baustein, irreversibel an das Enzym bindet (siehe Abbildung 3.11).

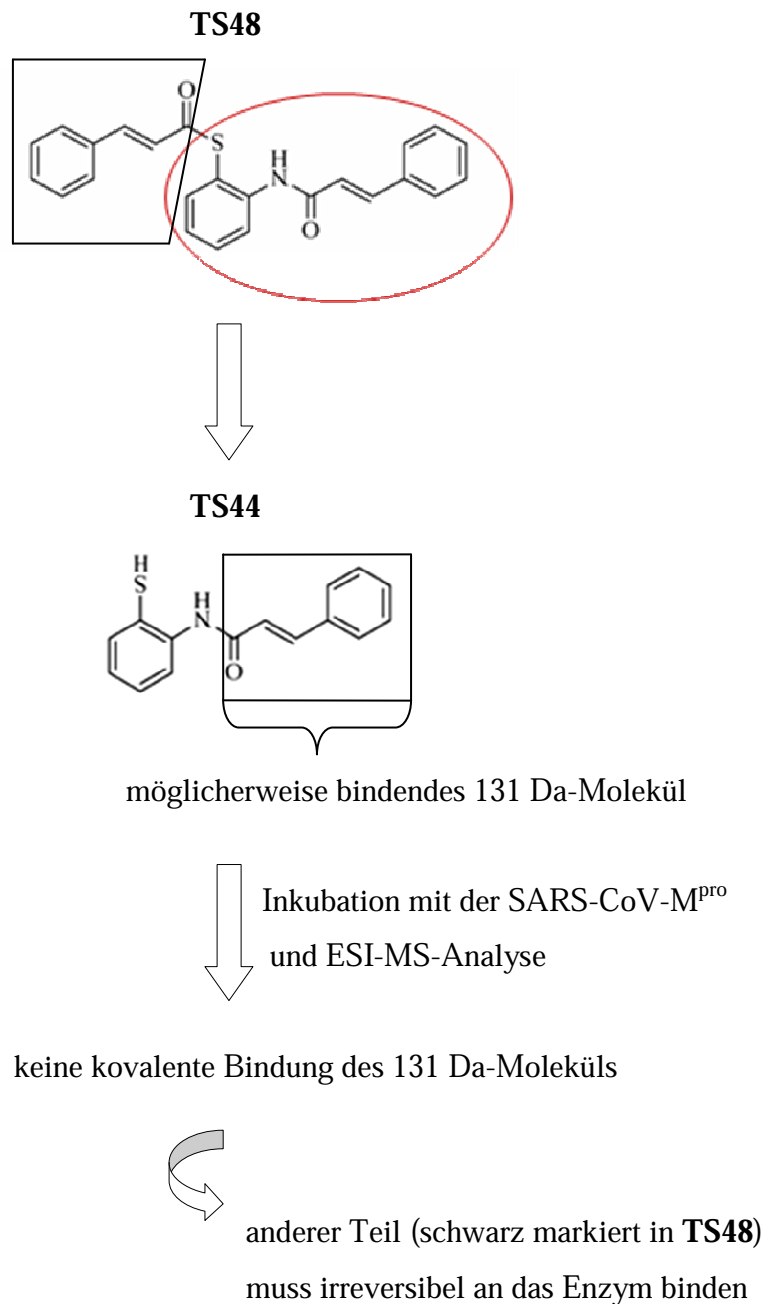


Abb. 3.11: Schema des Experiments zur Überprüfung, welcher der beiden in Frage kommenden Molekülbausteine von **TS48** kovalent an die SARS-CoV-M^{pro} bindet. Es wurde ein Molekül synthetisiert (**TS44**), welches einen potentiell bindenden Molekülteil von **TS48** enthält (rot markiert in **TS48**).

Die Synthese wurde freundlicherweise von Herrn Dipl.-Chem. Thomas Schneider durchgeführt.

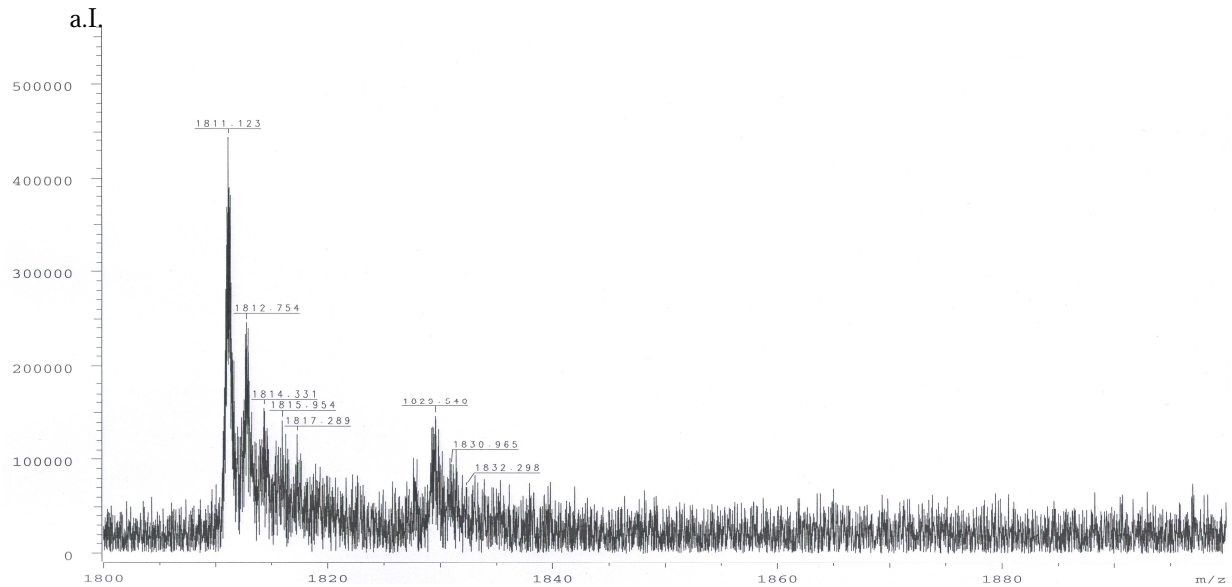
MH211A:

Abb. 3.12: ESI-Massenspektrum der SARS-CoV-M^{pro}. Vergrößert gezeigt ist der 19⁺-Ladungszustand des Enzyms.

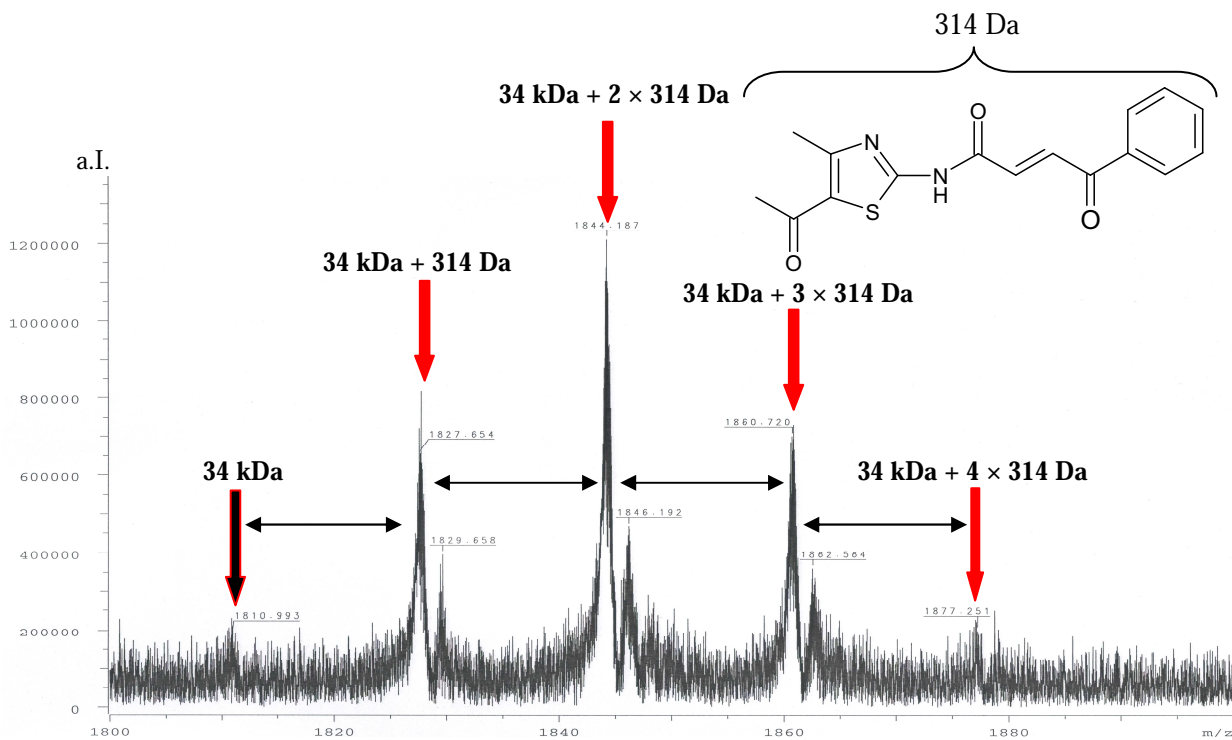


Abb. 3.13: ESI-Massenspektrum der SARS-CoV-M^{pro}, inkubiert mit MH211A. Vergrößert gezeigt ist der 19⁺-Ladungszustand des Enzyms. Die roten Pfeile kennzeichnen den jeweiligen Enzym-Inhibitor-Komplex, der schwarze Pfeil kennzeichnet die nicht-komplexierte Protease.

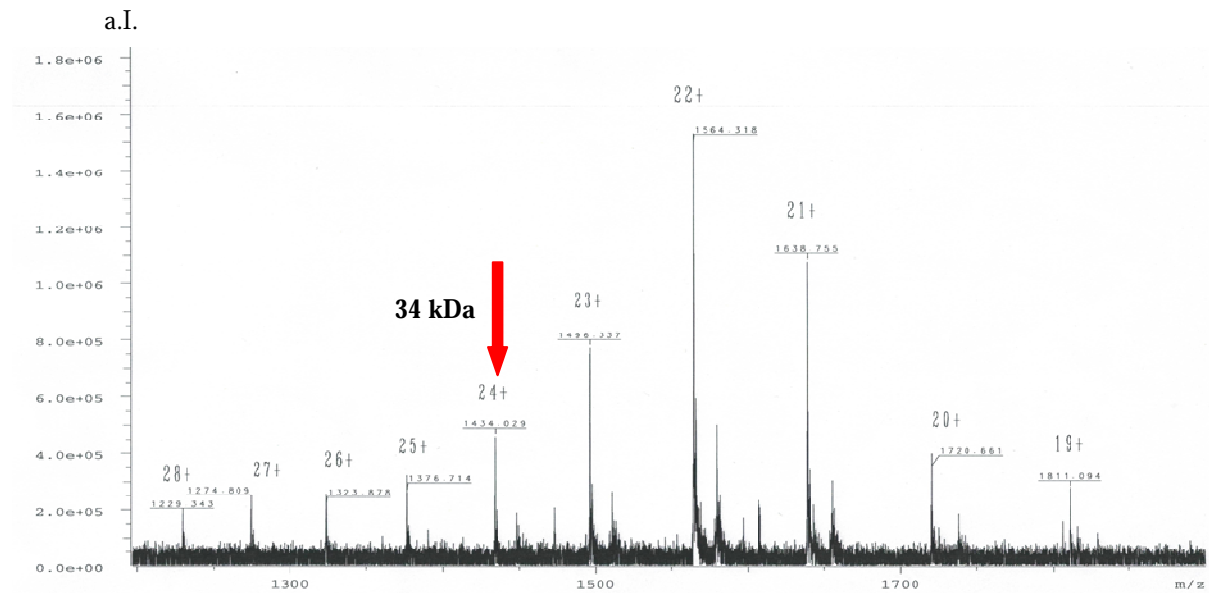
UK-VI-1g:

Abb. 3.14: ESI-Massenspektrum der SARS-CoV-M^{pro}. Gezeigt sind verschiedene Ladungszustände der Hauptpeaks der SARS-CoV-M^{pro}. Als Beispiel ist der 24⁺-Ladungszustand mit einem roten Pfeil markiert.

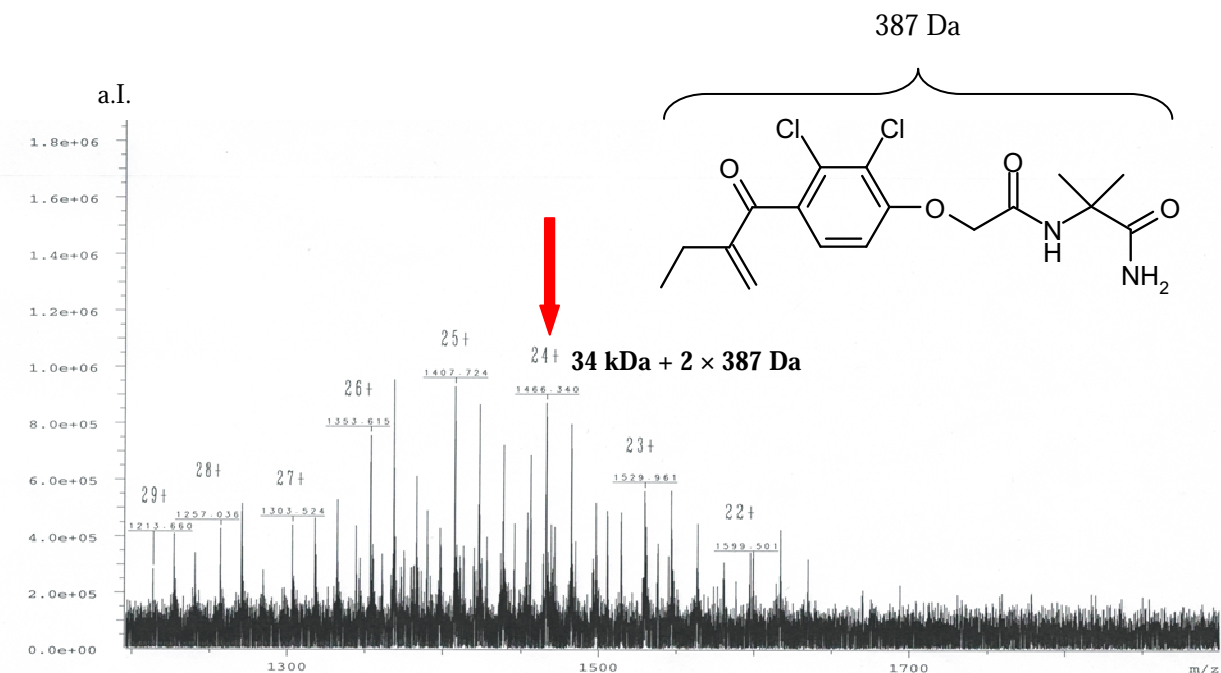


Abb. 3.15: ESI-Massenspektrum der SARS-CoV-M^{pro}, inkubiert mit UK-VI-1g. Gezeigt sind verschiedene Ladungszustände der Hauptpeaks der SARS-CoV-M^{pro}. Als Beispiel für die Hauptpeakverschiebung ist wiederum der 24⁺-Ladungszustand mit einem roten Pfeil markiert.

Bei der massenspektrometrischen Untersuchung zum Inhibitor **Lit1** ließ sich erkennen, dass lediglich die „rechte Hälfte“ des Arylsulfons, und somit der 236 Da große 2,6-Dinitro-4-trifluoromethyl-phenyl-Rest irreversibel an das Enzym-Monomer gebunden hatte (siehe Abbildung 3.8).

Bezüglich des Inhibitors **TS48** und der SARS-CoV-M^{pro} konnte - wie oben schon erwähnt - eine irreversible Bindung des 131 Da großen Zimtsäure-Thioester-Restes bewiesen werden (siehe Abbildung 3.10).

Das in der Abbildung 3.13 gezeigte MS-Experiment verdeutlicht, dass eine bis zu viermalige irreversible Bindung von **MH211A** pro Enzym-Monomer stattgefunden hatte. Dieser Sachverhalt wurde durch die Hauptpeakverschiebung der Protease bestätigt. Desweiteren fällt auf, dass nur noch ein geringer Prozentsatz an unbehandelter Protease im Reaktionsansatz vorlag, was z.B. bei den Versuchen mit den Inhibitoren **Lit1** und **TS48** nicht der Fall war. Bei der Inkubation mit Inhibitor **Lit1** betrug das Verhältnis zwischen nicht-modifizierter und gebundener Protease 1:2, beim Experiment mit **TS48** lag ca. nur ein Drittel des Enzyms an den Inhibitor gebunden vor.

Im Falle von **MH211A** lagen einfache und dreifache Bindung zum Enzym-Monomer in etwa gleichem Verhältnis vor, was an ähnlichen Peakintensitäten anschaulich wurde. Am stärksten war die zweifache irreversible Bindung des Inhibitors vertreten, am schwächsten die vierfache Bindung, welche der Peakintensität der noch vorhandenen nicht-modifizierten Protease entsprach.

Ein weiteres durchgeführtes MS-Experiment mit einem anderen Inhibitor der SARS-CoV-M^{pro} zeigte eine ausschließlich zweimalige irreversible Bindung des ebenfalls kompletten **UK-VI-1g** pro Enzym-Monomer. Auch hier befand sich so gut wie keine nicht-modifizierte Protease mehr im Inkubationsansatz (siehe Abbildung 3.15).

3.2.3 Bromcyan-Verdau der mit **UK-VI-1g** inkubierten SARS-CoV-M^{PRO}

Durch Bromcyan/Trypsin-Doppelverdau konnte man Peptidbereiche der SARS-CoV-M^{PRO} massenspektrometrisch nachweisen, an die der Inhibitor **UK-VI-1g** kovalent gebunden hatte. Die folgende Abbildung veranschaulicht das Ergebnis dieses Verdaus:

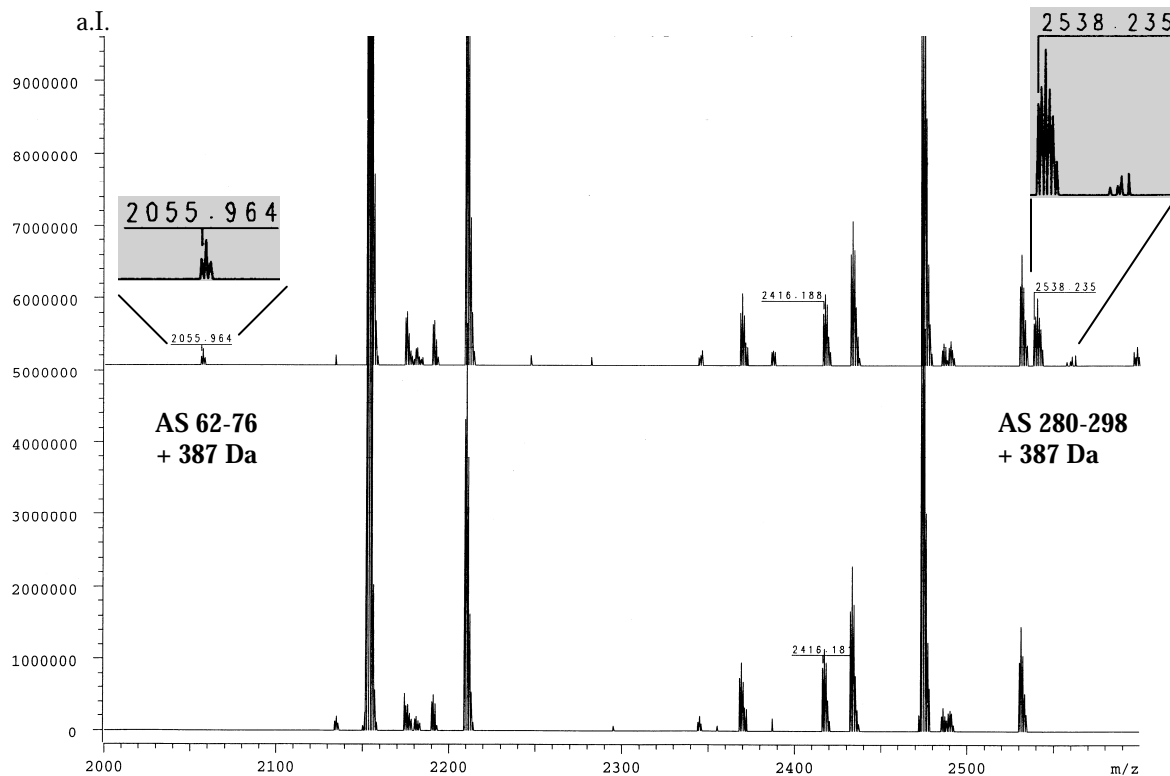


Abb. 3.16: ESI-Massenspektrum der unbehandelten und mit **UK-VI-1g** inkubierten SARS-CoV-M^{PRO} nach anschließendem Bromcyan/Trypsin-Doppelverdau. Als Inlay sind jeweils die beiden entscheidenden neu auftauchenden Peaks vergrößert dargestellt.

oben: **mit UK-VI-1g inkubierte** und verdaute SARS-CoV-M^{PRO}.

unten: **unbehandelte** und verdaute SARS-CoV-M^{PRO}.

Aus dem Massenspektrum wird deutlich, dass an zwei Peptidbruchstücken des Enzyms eine kovalente Bindung von **UK-VI-1g** erfolgte und zwar einmal zwischen den Aminosäuren 62 bis 76 und einmal im Bereich zwischen den Aminosäuren 280 bis 298. Keiner dieser beiden Peptidbereiche liegt allerdings im Bereich des aktiven Zentrums, sondern eher an der Peripherie des Enzyms, bzw. im Falle des Peptids, das durch die Aminosäuren 280 bis 298 abgedeckt wird, in der Nähe des C-Terminus der SARS-CoV-M^{PRO}.

Nach röntgendiffraktometrischen Experimenten konnte jedoch nur eine Ansammlung von größeren, dem Inhibitor ähnlichen Elektronendichten an der Oberfläche des Enzyms nachgewiesen werden.

3.3 Kristallisation der SARS-CoV-M^{PRO}

3.3.1 Apoprotein-Kristallisation der SARS-CoV-M^{PRO}

Um die Fähigkeit der exprimierten und gereinigten SARS-CoV-M^{PRO} zur Kristallbildung zu untersuchen, wurden Kristallisationsansätze aus der Literatur, aber auch selbst erstellte und modifizierte Bedingungen zur Kristallbildung herangezogen (siehe Kapitel 2.2.3.1).

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen Ergebnisse der einzelnen durchgeführten Kristallisationsscreens zur Bildung von SARS-CoV-M^{PRO}-Apoprotein-Kristallen:

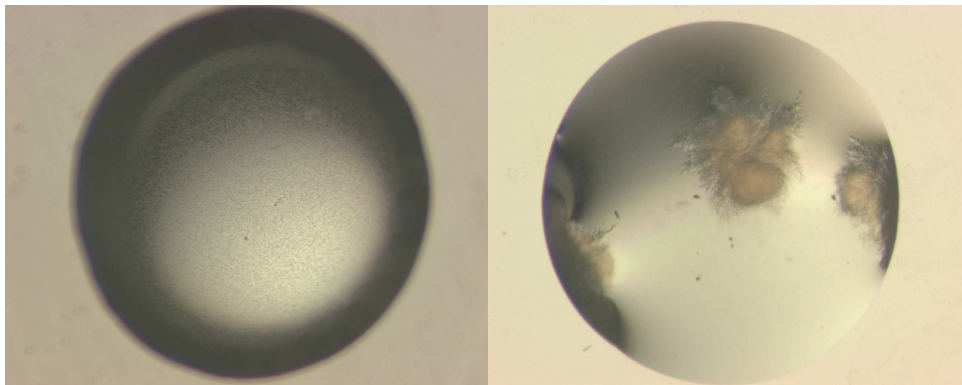


Abb. 3.17: SARS-CoV-M^{PRO}-Apoprotein-Kristallisationstropfen.

Bedingung: 0,1 M MES-Puffer (pH 6,0); 10% PEG 6000; 0,15 M NaCl

10% Glycerol; 5% DMSO; 0,014 M β -Mercaptoethanol.

Proteinkonzentration: 8 mg/mL; Temperatur: 18 °C; Wachstumszeit: 2-5 Tage.

Wie aus obigen Bildern leicht zu ersehen ist, kam es bei diesem Kristallisationsansatz zu keinerlei Proteinkristallwachstum. Es wurde lediglich leichtes (linkes Bild) bzw. grobes Proteinpräzipitat (rechtes Bild) erhalten. Dieses Auftreten von ausgefallenem Protein könnte vielleicht auf die zu hohe PEG-Konzentration zurückzuführen sein, da in der später erwähnten optimalen Bedingung zum SARS-CoV-M^{PRO}-Kristallwachstum nur noch die Hälfte dieser PEG-Konzentration zum Einsatz kam. Wahrscheinlich lag es nicht an der Proteinkonzentration, da diese bei beiden Ansätzen 8 mg/mL entsprach.

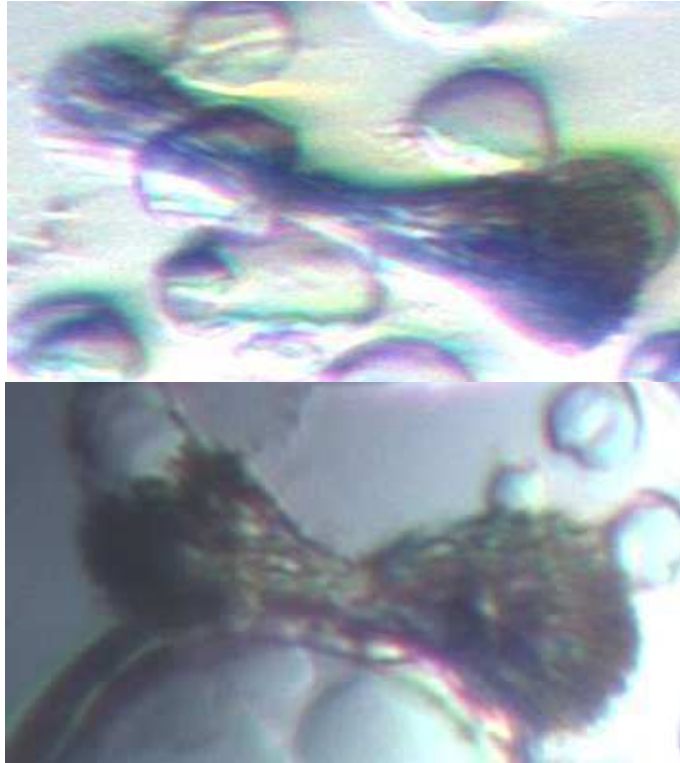


Abb. 3.18: SARS-CoV-M^{pro}-Apoprotein-Kristallisationstropfen.

Bedingung: 0,1 M MES-Puffer (pH 6,0-7,0);

2-18% PEG 8000; 0,3 M-0,95 M Ammoniumsulfat.

Proteinkonzentration: 5 mg/mL; Temperatur: 18 °C;

Wachstumszeit: 2-5 Tage.

Die Abbildung 3.18 zeigt erhaltene Proteinkristallnadeln, die sogenannte *cluster* bildeten, die eine keulenförmige Gestalt aufwiesen. Desweiteren lag eine stark auffallende Phasentrennung vor, erkennbar durch Tröpfchenbildung, die aber nicht immer unvermeidbar ist. Proteinkristallnadeln als solche sind nicht optimal für weitere kristallographische Untersuchungen und auch schwerer zu handhaben, können aber dennoch als Impfkristalle bei der ebenfalls angewendeten *streak-seeding*-Methode in anderen Kristallisationsansätzen dienen.

3 Ergebnisse

Die folgenden beiden Abbildungen zeigen weitere gewachsene Kristallformen der SARS-CoV-M^{pro}. Im ersten Fall wurden seeigelähnliche *fuzz balls* (siehe Abbildung 3.19), in einem weiteren Ansatz blütenähnliche *rod clusters* erhalten (siehe Abbildung 3.20).

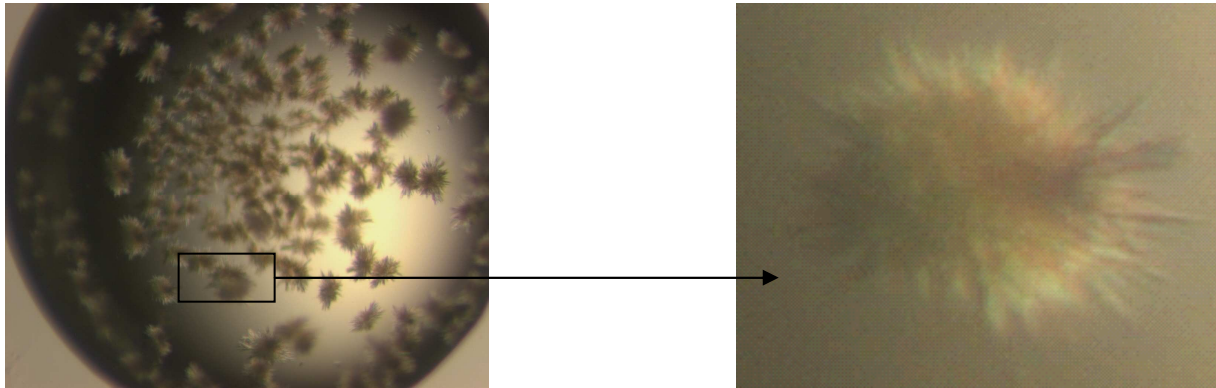


Abb. 3.19: SARS-CoV-M^{pro}-Apoprotein-Kristallisationstropfen; gesamter Tropfen: links, vergrößerter Ausschnitt: rechts.

Bedingung: 1 M Na-Malonat-Puffer (pH 7,0); 4% Isopropanol.

Proteinkonzentration: 8 mg/mL; Temperatur: 18 °C; Wachstumszeit: 2-5 Tage.

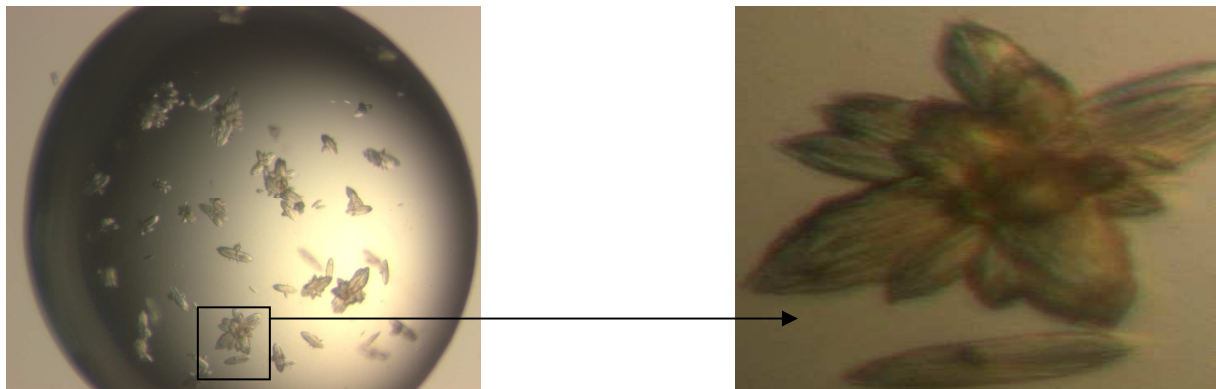


Abb. 3.20: SARS-CoV-M^{pro}-Apoprotein-Kristallisationstropfen; gesamter Tropfen: links, vergrößerter Ausschnitt: rechts.

Bedingung: 0,1 M MES-Puffer (pH 6,5); 6-8% PEG 6000.

Proteinkonzentration: 8 mg/mL; Temperatur: 18 °C; Wachstumszeit: 2-5 Tage.

Einzelkristalle der SARS-CoV-M^{pro}

Durch Optimierung der Kristallisationsbedingungen wurden schließlich Einzelkristalle der SARS-CoV-M^{pro} erhalten (siehe Abbildung 3.21).

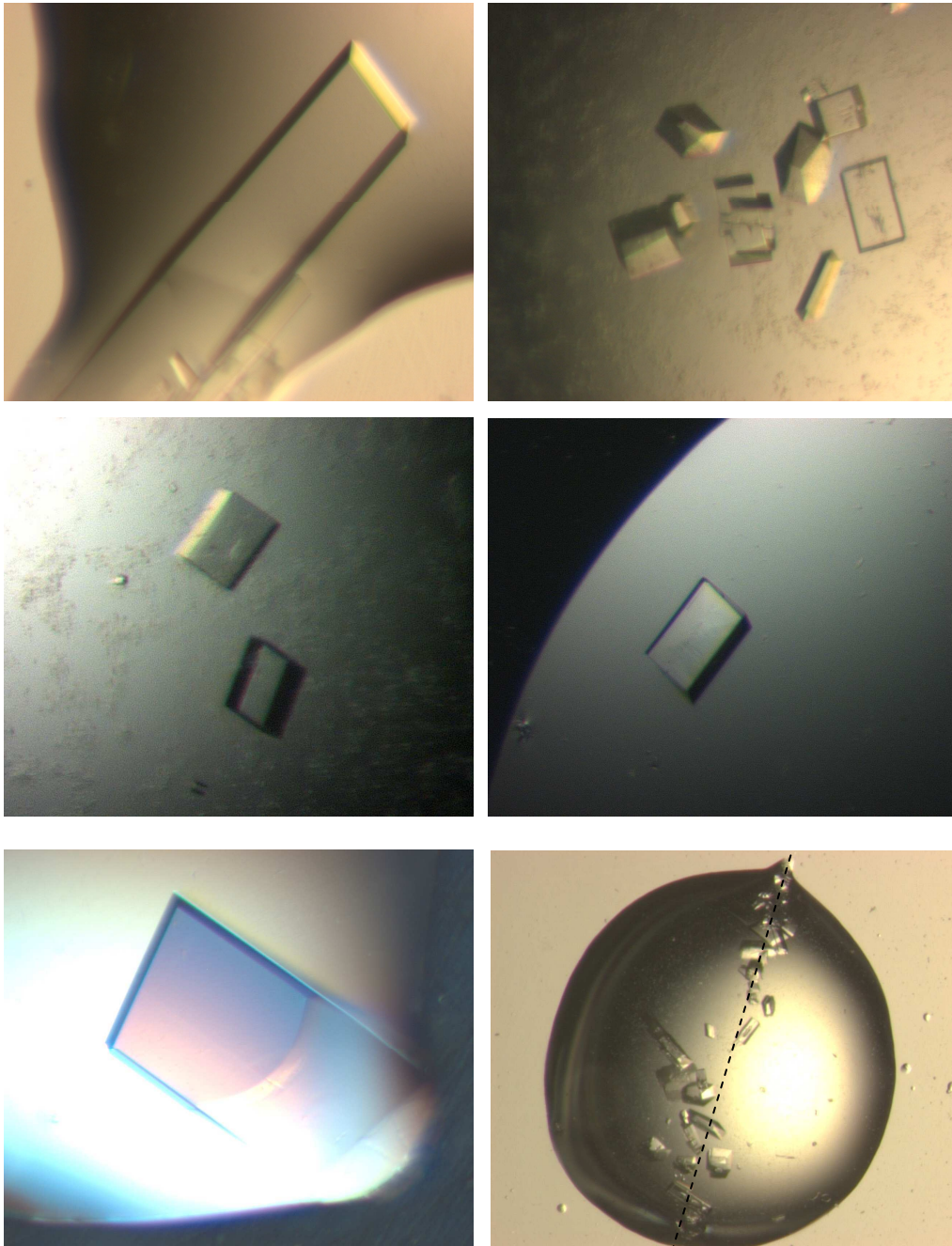


Abb. 3.21: SARS-CoV-M^{pro}-Apoprotein-Kristallisationstropfen.

Bedingung: 0,1 M MES-Puffer (pH 6,0); 6-8% PEG 6000; 5% DMSO; 1 mM DTT.

Proteinkonzentration: 8 mg/mL; Temperatur: 18 °C; Wachstumszeit: 2-5 Tage.

unten rechts: Kristallneubildung im äquilibrierten Tropfen entlang der *streak-seeding*-Linie. Das Auflösungs-Limit der Kristalle bei Beugung betrug bis zu 1,92 Å.

3.3.2 Co-Kristallisation der SARS-CoV-M^{pro} mit spezifischen Inhibitoren

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Co-Kristallisation der SARS-CoV-M^{pro} mit spezifischen Inhibitoren zusammengefasst. Die Kristallisationsbedingung, welche zu Co-Kristallen und deren Strukturlösung führte, entsprach, wie oben erwähnt, der Apoprotein-Kristallisationsbedingung. Die entstandenen Co-Kristalle wurden vor der nachfolgenden Messung und dem Einfrierprozess zusätzlich mit dem jeweiligen Inhibitor bis zu 36 Stunden im hängenden Tropfen inkubiert, was einem nachträglichen *soaking* entspricht (*soaking*-Lösung: Reservoirlösung ohne DTT mit 1 mM TCEP und 2 mM Inhibitor). Außerdem enthielt ebenfalls die Kryolösung den entsprechenden Inhibitor (30% (w/v) PEG 400 in 0,1 M MES-Puffer (pH 6,0), 1 mM TCEP und 2 mM Inhibitor).

3.3.2.1 Co-Kristallisation und Strukturanalyse der SARS-CoV-M^{pro} mit **TS174**



Abb. 3.22: SARS-CoV-M^{pro}-**TS174**-Co-Kristalle.
Bedingung: 0,1 M MES-Puffer (pH 6,0);
6-8% PEG 6000; 5% DMSO; 1 mM DTT.
Proteinkonzentration: 8 mg/mL; Temperatur: 18 °C;
Wachstumszeit: 2-5 Tage.

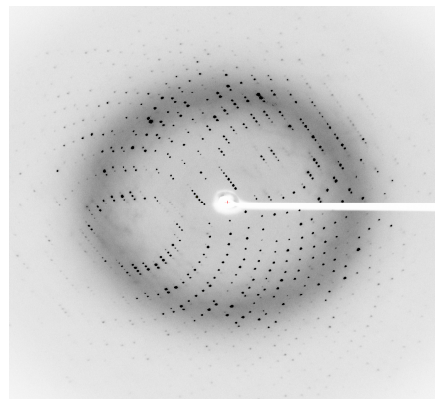


Abb. 3.23: Diffraktionsmuster des
SARS-CoV-M^{pro}-**TS174**-Co-Kristalls,
der zur Strukturanalyse herangezogen
wurde (Bestrahlungsdauer: 5 min/Bild).

Nach Co-Kristallisation des Inhibitors **TS174** und dem Erhalt von nahezu kubischen Co-Kristallen (siehe Abbildung 3.22) ließ sich zwar eine Bindung des Hemmstoffes im aktiven Zentrum der Protease nachweisen, eine eindeutige Lage allerdings konnte auch nach Verfeinerung, aufgrund von nicht eindeutiger Elektronendichte, nicht erkannt werden. So ließen sich drei verschiedene potentielle Orientierungen des Hemmstoffmoleküls herleiten. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen jeweils diese drei möglichen Lagen von **TS174** in der *active site* der SARS-CoV-M^{pro}:

Erste mögliche Orientierung von TS174:

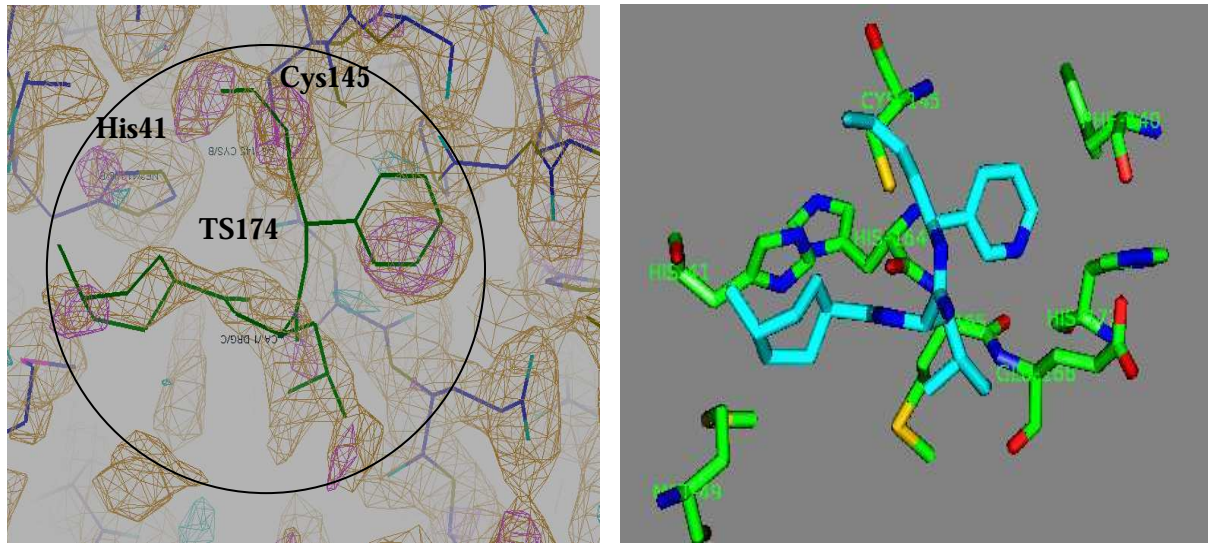


Abb. 3.24: Erste mögliche Orientierung von **TS174** im aktiven Zentrum der SARS-CoV-M^{pro}.

Links: Elektronendichten von **TS174** und der angrenzenden Aminosäurenreste des aktiven Zentrums der SARS-CoV-M^{pro}.

Rechts: 3D-Ansicht der Lage von **TS174** (blau) im aktiven Zentrum der SARS-CoV-M^{pro}.

Zweite mögliche Orientierung von TS174:

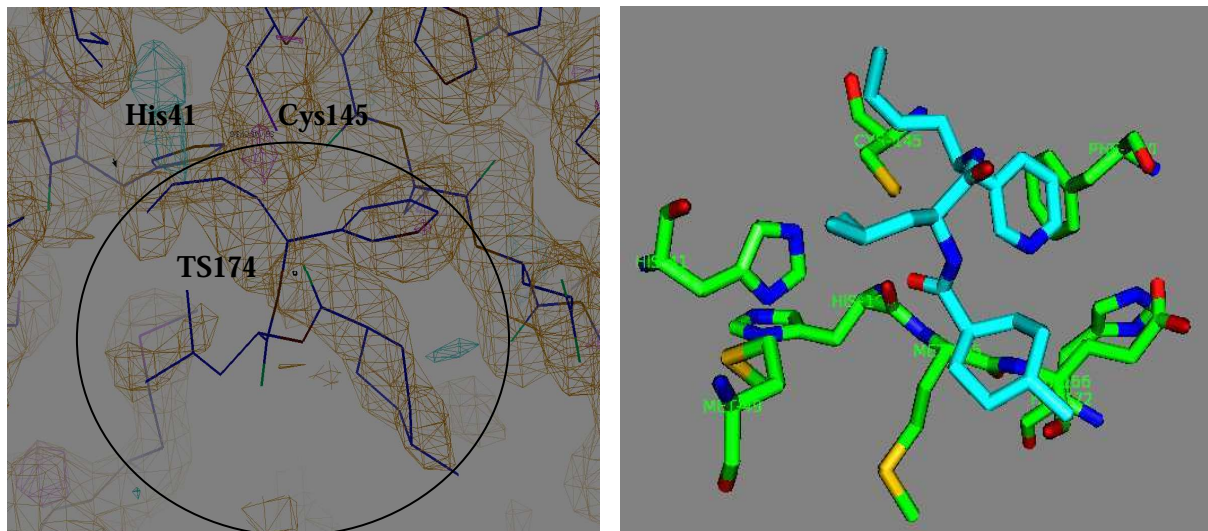


Abb. 3.25: Zweite mögliche Orientierung von **TS174** im aktiven Zentrum der SARS-CoV-M^{pro}.

Links: Elektronendichten von **TS174** und der angrenzenden Aminosäurenreste des aktiven Zentrums der SARS-CoV-M^{pro}.

Rechts: 3D-Ansicht der Lage von **TS174** (blau) im aktiven Zentrum der SARS-CoV-M^{pro}.

Dritte mögliche Orientierung von TS174:

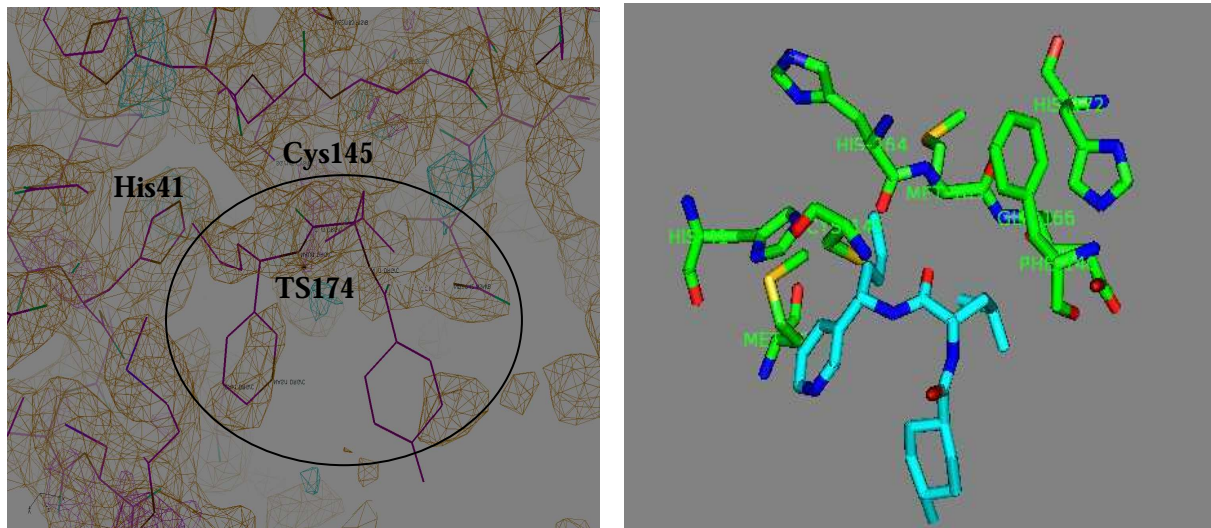


Abb. 3.26: Dritte mögliche Orientierung von **TS174** im aktiven Zentrum der SARS-CoV-M^{pro}.

Links: Elektronendichten von **TS174** und der angrenzenden Aminosäurenreste des aktiven Zentrums der SARS-CoV-M^{pro}.

Rechts: 3D-Ansicht der Lage von **TS174** (blau) im aktiven Zentrum der SARS-CoV-M^{pro}.

3.3.2.2 Co-Kristallisation und Strukturanalyse der SARS-CoV-M^{pro} mit **IISBT**

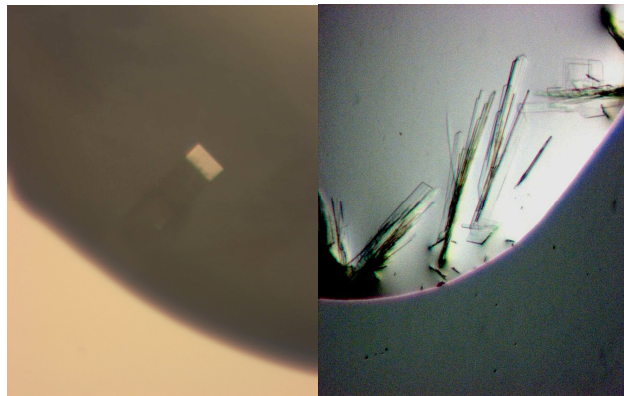


Abb. 3.27: SARS-CoV-M^{pro}-**IISBT**-Co-Kristalle.

Bedingung: 0,1 M MES-Puffer (pH 6,0);

6-8% PEG 6000; 5% DMSO; 1 mM DTT.

Proteinkonzentration: 8 mg/mL; Temperatur: 18 °C;

Wachstumszeit: 2-5 Tage.

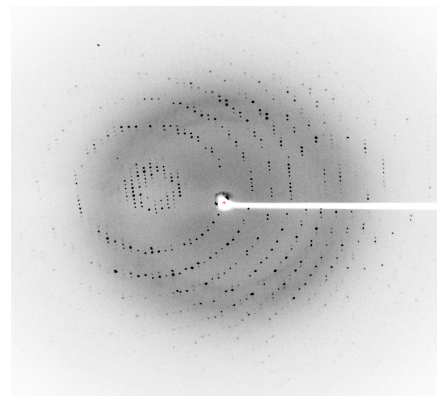


Abb. 3.28: Diffraktionsmuster des

SARS-CoV-M^{pro}-**IISBT**-Co-Kristalls,

der zur Strukturanalyse herangezogen

wurde (Bestrahlungsdauer: 5 min/Bild).

Wie aus obiger Abbildung ersichtlich, wurden zwei verschiedene Co-Kristallformen des SARS-CoV-M^{pro}-**IISBT**-Komplexes erhalten. Die linke Hälfte der Abbildung 3.27 zeigt einen, aus der Grenzfläche des Kristallisationstropfen wachsenden quaderförmigen Kristall,

die rechte Hälfte der Abbildung 3.27 veranschaulicht Co-Kristallnadeln, die ebenfalls bevorzugt aus dem Tropfenrand entstehen, welche aber wegen schwierigerer weiterer Handhabung nicht zur Strukturanalyse herangezogen wurden.

Die nachfolgende Tabelle zeigt alle wichtigen Informationen bezüglich der Auswertung der Datensammlung nach der röntgendiffraktometrischen Untersuchung des SARS-CoV-M^{pro}-**IISBT**-Co-Kristalls und des SARS-CoV-M^{pro}-**TS174**-Co-Kristalls, sowie Daten, die während der Verfeinerung erhalten wurden:

Tab. 3.1: Datensammlung und Verfeinerungsstatistik nach röntgendiffraktometrischer Analyse des SARS-CoV-M^{pro}-**IISBT**-Co-Kristalls und des SARS-CoV-M^{pro}-**TS174**-Co-Kristalls.

	SARS-CoV-M ^{pro} - IISBT -Co-Kristall	SARS-CoV-M ^{pro} - TS174 -Co-Kristall
Datensammlung		
Raumgruppe	C2	P2 ₁
Elementarzellparameter		
<i>a, b, c</i> (Å)	108,7, 81,3, 53,2	52,1, 97,5, 67,6
<i>α, β, γ</i> (°)	90,0, 104,8, 90,0	90,0, 103,6, 90,0
Auflösungsbereich (Å)	19-2,30 (2,35-2,30)	55-2,26 (2,39-2,26)
Vollständigkeit (%)	98,3 (90,5)	100,0 (100,0)
R _{sym}	0,060 (0,555)	0,076 (0,351)
R _{meas}	0,068 (0,684)	- ^{*)}
R _{mrgd-F}	0,151 (0,990)	- ^{*)}
<I / σI>	13,4 (2,1)	10,6 (3,1)
Redundanz	3,1 (2,8)	3,7 (3,6)
Verfeinerung		
Auflösungsbereich (Å)	19-2,30	55-2,26
Reflexe	18588	29100
R _{cryst} / R _{free}	0,17 / 0,21	0,20 / 0,25
Anzahl der Atome		
Protein/Co-Faktoren/Ionen	2465	4889
Inhibitor	22	29
Wasser	76	144
Standardabweichungen (rmsd)		
Bindungslängen (Å)	0,023	0,019
Bindungswinkel (°)	1,99	1,74
Ramachandran-Statistiken (%)	96,7/3,3/0,0	99,7/2,7/0,3

Die Zahlen in Klammern beziehen sich auf die Daten aus der Schale mit der höchsten Auflösung.

<I / σI> gibt die durchschnittliche Intensität der Reflexe geteilt durch ihre Standardabweichung an.

$$R_{\text{sym}} = \frac{\sum_h \sum_i |I(h, i) - \langle I(h) \rangle|}{\sum_h \sum_i I(h, i)}$$

R_{cryst} = Σ ||F_o - F_c|| / F_o wobei F_o und F_c die beobachteten und berechneten Strukturaktoren sind.

R_{meas} und R_{mrgd-F} sind ein Maß für die Qualität der reduzierten Amplituden und wurden nach

Diederichs und Karplus berechnet (Diederichs und Karplus, 1997).

Die Ramachandran-Statistiken zeigen die Fraktionen der Reste in den favorisierten, erlaubten und nicht erlaubten Regionen des Ramachandran-Diagramms an (Davis *et al.*, 2007/MolProbity).

*) R_{meas} und $R_{\text{mrgd-F}}$ sind Werte, die durch das Programmpaket XDS berechnet werden, für dieses Programm spezifisch sind und mit dem die Strukturdaten zum SARS-CoV-M^{pro}-**IISBT**-Co-Kristall ausgewertet wurden. Diese Werte entfallen bei der Strukturanalyse durch die Einzelprogramme Mosflm und Scala, mit denen die Strukturdaten zum SARS-CoV-M^{pro}-**TS174**-Co-Kristall ausgewertet wurden.

Unter Zuhilfenahme der in Kapitel 2.2.3.9 erwähnten Programme zur Datenauswertung, konnte schließlich nach Modellbau und mehreren Verfeinerungsschritten die Struktur des SARS-CoV-M^{pro}-**IISBT**-Komplexes gelöst werden. Die folgenden Abbildungen zeigen einmal die initiale Differenzelektronendichte von **IISBT** im aktiven Zentrum der SARS-CoV-M^{pro} (Abbildung 3.29) und außerdem die anomale Dichte des Iod-Atoms von **IISBT**, durch die das Vorhandensein des Inhibitors eindeutig belegt wurde (Abbildung 3.30):

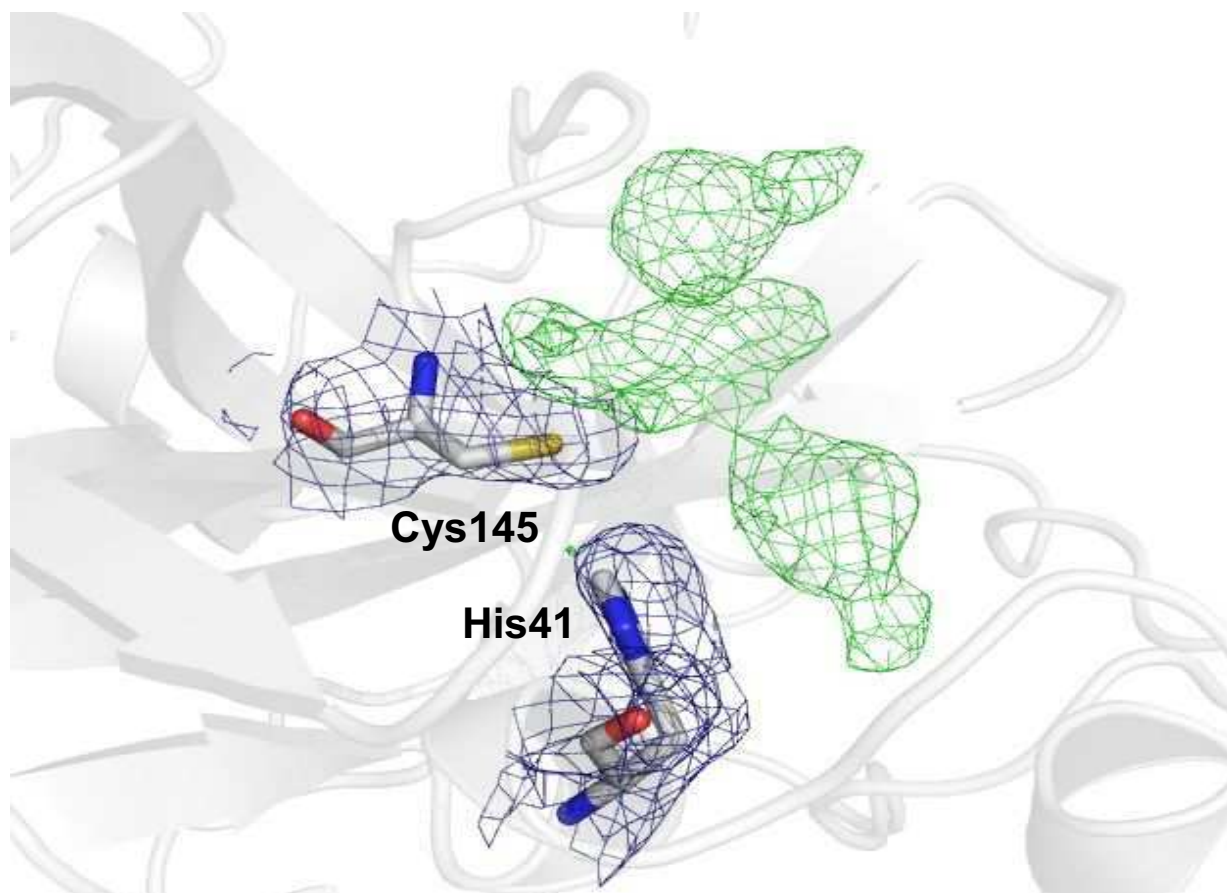


Abb. 3.29: Initiale Differenzelektronendichte (grün) von **IISBT** im aktiven Zentrum der SARS-CoV-M^{pro} (blau), konturiert bei 2,5 σ .

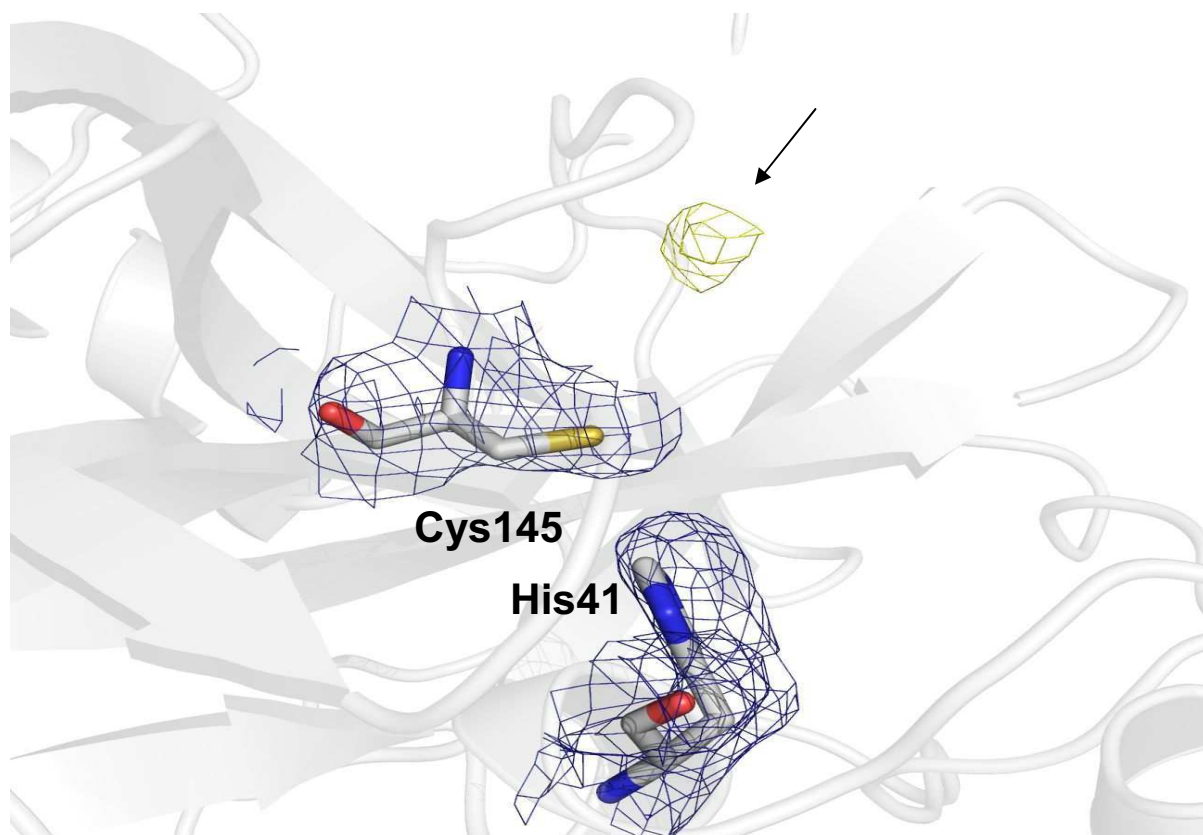


Abb. 3.30: Anomale Dichte (gelb) des Iod-Atoms im aktiven Zentrum der SARS-CoV-M^{pro} (blau), konturiert bei 3,0 σ .

Anhand obiger beider Abbildungen lässt sich zweifelsfrei – durch die Differenzelektronendichte und das anomale Signal des Iod-Atoms von **IISBT** – eine kovalente Bindung des Iod-Isatin-Derivats an das *active site*-Cystein nachweisen, auch wenn die Elektronendichte an Teilen des Isatin-Grundgerüsts und des Benzothiophen-Restes nicht ganz vollständig ausgeprägt ist.

Am reagierenden C-Atom von **IISBT** kommt es räumlich gesehen zu einer tetraedrischen Anordnung der Bindung zum Cys145. Außerdem werden durch Heraufsetzen der Konturierungsstärke der Elektronendichten nur noch stark streuende Atomorte, begründet durch die freien Elektronenpaare des Iod-Atoms, detektiert.

Die nachfolgende zweigeteilte Abbildung zeigt zwei, aufgrund der Lage des Iod-Atoms, leicht voneinander abweichende mögliche Orientierungen des Inhibitormoleküls im aktiven Zentrum der SARS-CoV-M^{pro}:

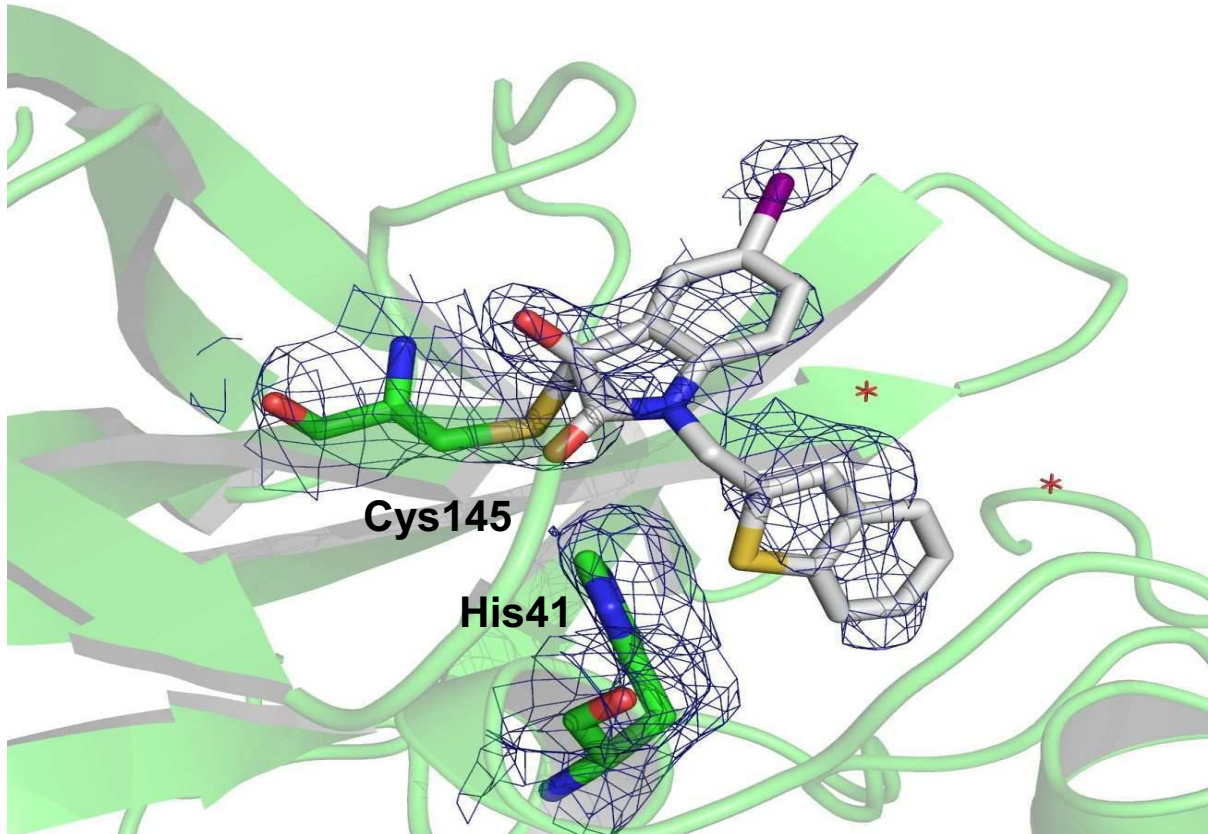
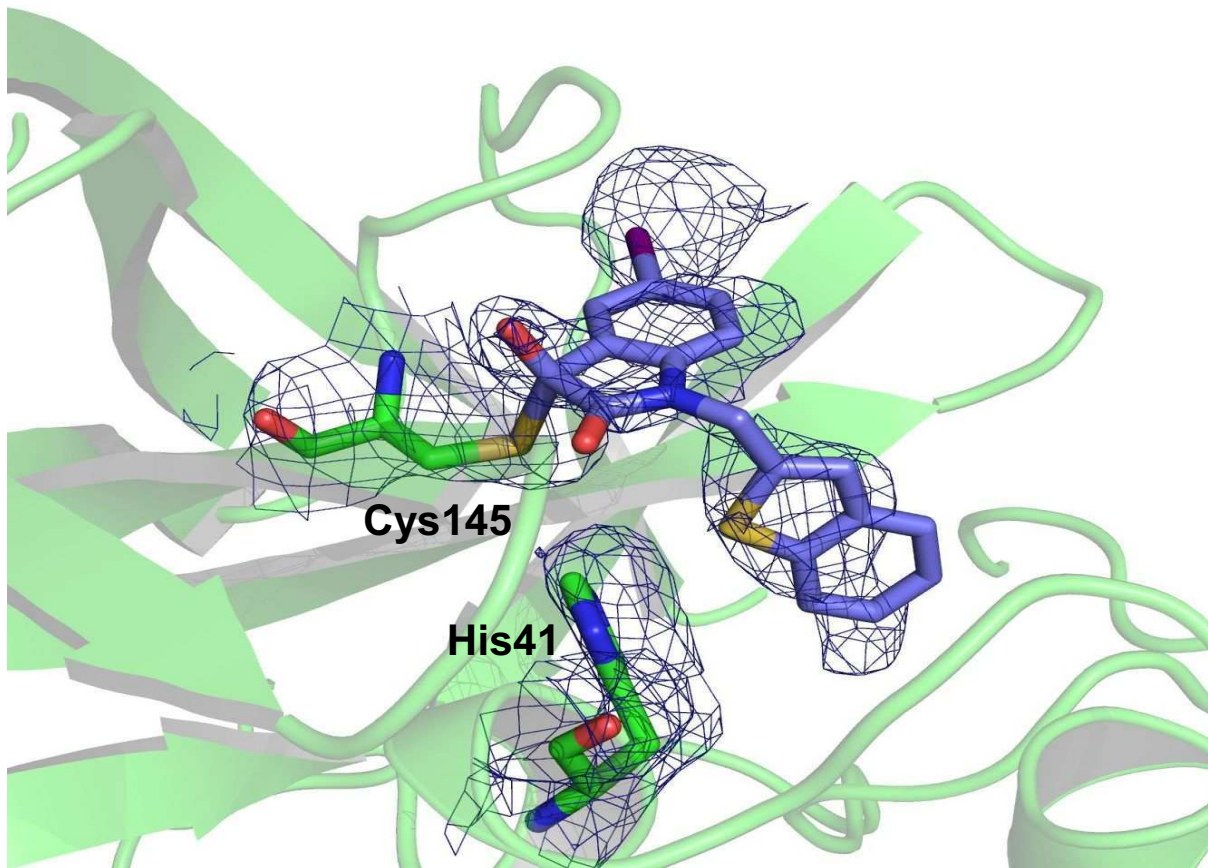


Abb. 3.31: Zwei leicht unterschiedliche Lagen von **IISBT** im aktiven Zentrum der SARS-CoV-M^{PRO} (blau); beide zeigen einen kovalenten Bindungsmodus des Inhibitormoleküls.

4 Diskussion

Seit dem Ausbruch von SARS stellt die SARS-CoV-M^{pro} - das Schlüsselenzym für die Virusvermehrung im Wirtsorganismus - nach der Strukturaufklärung eine Zielstruktur für die Entwicklung antiviraler Wirkstoffe dar. So wurde zum Beispiel von Yang *et al.* erstmalig eine Struktur der SARS-CoV-M^{pro} im Komplex mit einem Hexapeptidylchloromethylketon (*pdb-accession code*: 1uk4) als Substratanalogon gelöst (Yang *et al.*, 2003). Auch andere Ansätze für mögliche SARS-CoV-M^{pro}-Inhibitoren folgten; so sind auch α,β -ungesättigte Ester (Michael-Systeme), Anilide und Phenylsulfone Hemmstoffe dieses wichtigen Enzyms (Paasche *et al.*, 2010; Shie *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2006). Aber auch Naturstoffe, wie Terpenoide, Lignanoide und Polyphenole zeigen antivirale Wirkung (Wen *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2005).

4.1 Reinigung der SARS-CoV-M^{pro} und weiterführende ESI-MS-Experimente

4.1.1 Reinigung der SARS-CoV-M^{pro}

In dieser Arbeit wurde die SARS-CoV-M^{pro} exprimiert, aufgereinigt und schließlich ohne Abtrennung des His₆-Affinitäts-*tag* nach der Reinigung mit Inhibitoren co-kristallisiert. Die Beibehaltung des *tag* ersparte Kosten, weitere Arbeitsschritte und verringerte damit den Zeitaufwand der Aufarbeitung und vermied außerdem einen erhöhten Proteinverlust, der bei einer weiteren chromatographischen Auftrennung unvermeidbar gewesen wäre.

Grum-Tokars *et al.* erreichten hingegen keine Kristallisation der His₆-*tag*-SARS-CoV-M^{pro}, weder als Apoprotein, noch im Komplex mit Inhibitoren, auch nicht nach exzessiv durchgeführten Kristallisationsansätzen. („*We also tested the influence of the (His)6-tag on the crystallization of SARS-CoV 3CLpro. We were unable to crystallize the apoenzyme or covalently modified enzyme from over 1000 crystallization conditions attempted.*“ (Grum-Tokars *et al.*, 2008)).

Hsu *et al.* führten zwar ebenfalls unter anderem erfolgreich Kristallisationsversuche mit der SARS-CoV-M^{pro} mit C-terminalen His₆-Affinitäts-*tags* durch, jedoch gelang keine Co-Kristallisation der Protease mit spezifischen Inhibitoren, sondern nur die Kristallisation des Apoproteins mit dessen Struktur der Dimerisierungsprozess der SARS-CoV-M^{pro} untersucht wurde (Hsu *et al.*, 2005).

Durch eine genetisch kodierte, intrinsische autokatalytische Selbstabspaltung des MBP-*tag*, der während der Expression der SARS-CoV-M^{pro} zu einer verbesserten Löslichkeit des Enzyms im Zytoplasma und zur Verhinderung von *inclusion bodies* eingesetzt wurde, entfiel ebenfalls die aufwändige Entfernung dieses mit ca. 42 kDa recht großen Proteins. Dieses Protein hätte sich höchstwahrscheinlich bei der Kristallisation als störend herausgestellt. Darüber hinaus reichte eine zweimalige Nickel-NTA-Affinitätschromatographie aus, um hochreines, zur Kristallisation einsetzbares Protein in ausreichender Menge, innerhalb zweier Tage nach der eigentlichen Proteinexpression zu erhalten. Somit entfielen weitere, aufwändige Chromatographieschritte, wie z.B. die anfänglich verwendete Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration), oder aber eine eventuell notwendige abschließende Ionenaustauschchromatographie. Das so gereinigte Enzym konnte auch nach einem Jahr bei einer Lagerung von -80 °C ohne Probleme kristallisiert werden, und es konnten nach diesem Zeitraum ebenfalls immer noch sehr gute ESI-MS-Untersuchungen mit der Protease durchgeführt werden, was für eine hohe Stabilität und Reinheit der Protease spricht.

4.1.2 ESI-MS-Experimente

Mit Hilfe der ESI-Massenspektrometrie wurde die gereinigte SARS-CoV-M^{pro} eindeutig als diese identifiziert, so dass weitere Untersuchungen bezüglich des Bindungsverhaltens der potentiellen Inhibitoren durchgeführt werden konnten. Diese Methode vereinfacht die nachfolgende Strukturaufklärung mittels Röntgendiffraktion erheblich, da im Vorfeld schon eine meist zuverlässige Aussage getroffen werden kann, ob, in welcher Form (komplett oder lediglich Teile des Inhibitors / kovalent oder nicht-kovalent) oder sogar an welcher Stelle der Inhibitor an die Protease gebunden vorliegt.

Hinsichtlich des Inhibitors **Lit1** aus der Klasse der Phenylsulfone zeigte sich eine kovalente Bindung des 2,6-Dinitro-4-trifluoromethyl-phenyl-Restes dieses Inhibitors an die SARS-CoV-M^{pro} (siehe Kapitel 3.2.2; Abbildung 3.8). Hierbei geht man nach erfolgter Spaltung des Phenylsulfons von einer nucleophilen aromatischen Substitutionsreaktion der aktivierten, mehrfach substituierten Molekülhälfte (linker aromatischer Ring in Abbildung 4.1) mit dem Cystein im katalytischen Zentrum aus, die die Bildung einer Sulfinsäure nach sich zieht. Der hypothetische Reaktionsmechanismus von **Lit1** wird in nachfolgender Abbildung verdeutlicht:



Abb. 4.1: Reaktionsmechanismus der Bindung von **Lit1** an die SARS-CoV-M^{pro} (verändert, nach Kossner *et al.*, unveröffentlicht).

Um die in Abbildung 4.1 postulierte Reaktion des Inhibitors zu untermauern und eine kovalente Bindung von **Lit1** zu beweisen, wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Knut Baumann in Braunschweig weitere Experimente durchgeführt. So wurden ein Reaktionsansatz von **Lit1** und DTT mittels HPLC aufgetrennt (siehe Abbildung 4.2) und anschließend die Reaktionsprodukte durch NMR und MS analysiert. Durch diese analytischen Untersuchungsmethoden konnte die Bildung der erwarteten Reaktionsprodukte, nämlich die entstehende Sulfinsäure bzw. das DTT-Addukt, bestätigt werden. Diese Befunde widersprechen dem Ergebnis von Lu *et al.*, die von einer reversiblen Bindung vom kompletten **Lit1** aufgrund einer Röntgenstruktur (*pdb-accession code: 2gz7*) ausgehen (Lu *et al.*, 2006).

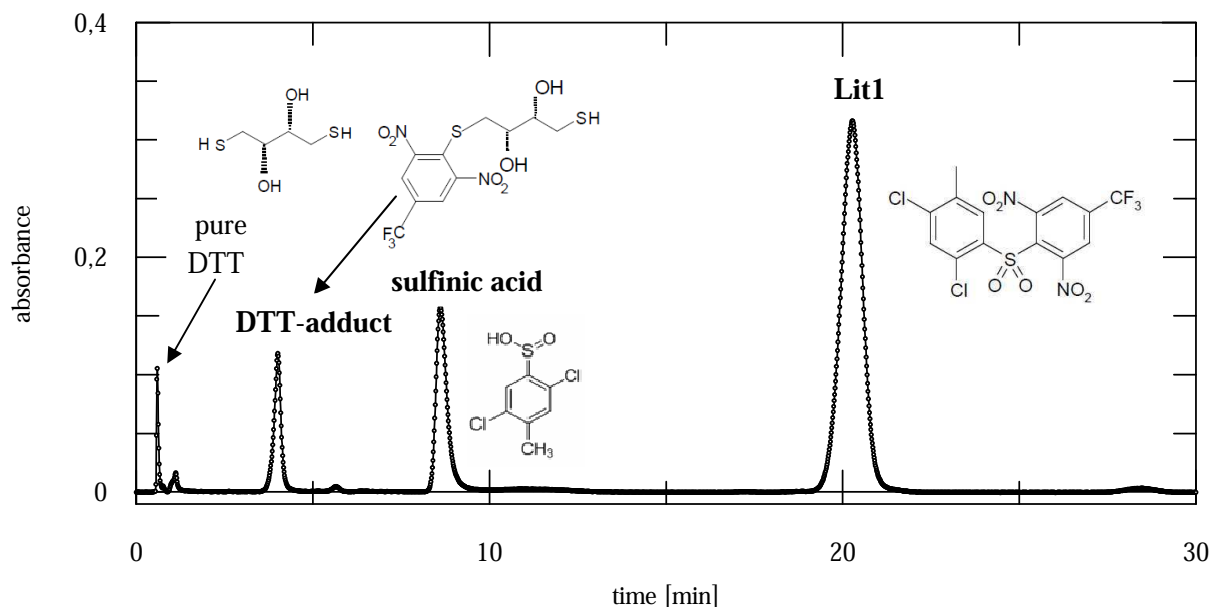


Abb. 4.2: HPLC-UV-Chromatogramm des Reaktionsansatzes von **Lit1** mit DTT (verändert, nach Kossner *et al.*, unveröffentlicht).

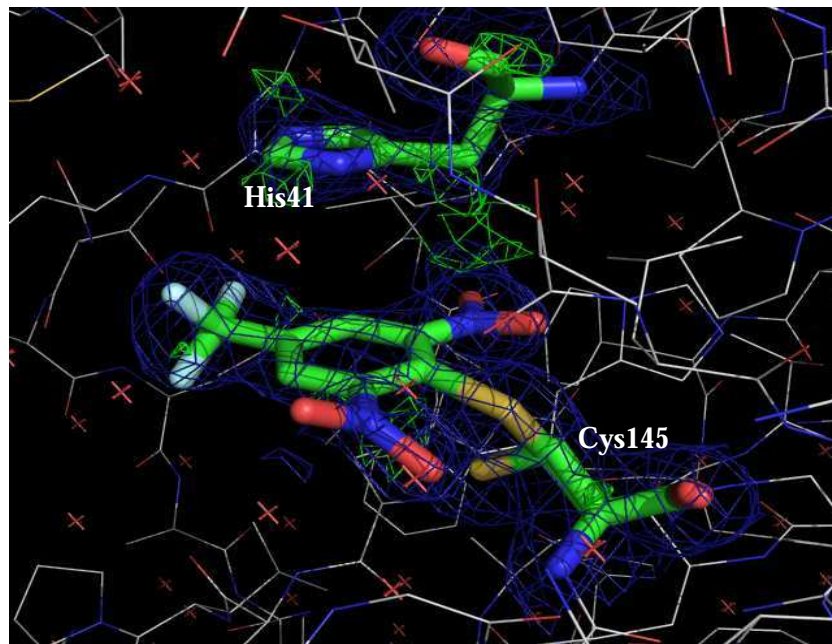


Abb. 4.4: Elektronendichte des bindenden Fragments von **Lit1** im aktiven Zentrum der SARS-CoV-M^{pro} nach Modellierung und Berechnung ohne den zweiten Aromaten. Es wird eine kovalente Bindung zum Cystein-Rest (zwei alternative Konformationen) deutlich (verändert, nach berechneten Daten von Dipl.-Biol. Uwe Dietzel).

Ein weiteres Indiz für eine kovalente, irreversible Bindung von **Lit1** wurde anhand von Enzymkinetikexperimenten gefunden. In Abbildung 4.5 wird die zeitabhängige Hemmung der SARS-CoV-M^{pro} durch unterschiedliche **Lit1**-Konzentrationen (0-100 μ M) veranschaulicht. Bei Abwesenheit des Inhibitors kommt es zu einem linearen Anstieg der Fluoreszenz, die durch die hydrolytische Spaltung des fluorogenen Substrats durch die Protease entsteht (vgl. auch Kapitel 2.2.2.8; Abbildung 2.3). Eine Erhöhung der Inhibitorkonzentration führt zu einem zunehmenden Abflachen der Umsatz-Zeit-Kurve, d.h. es liegt eine zeitabhängige Hemmung vor. Diese ist typisch für kovalente, irreversible Inhibitoren.

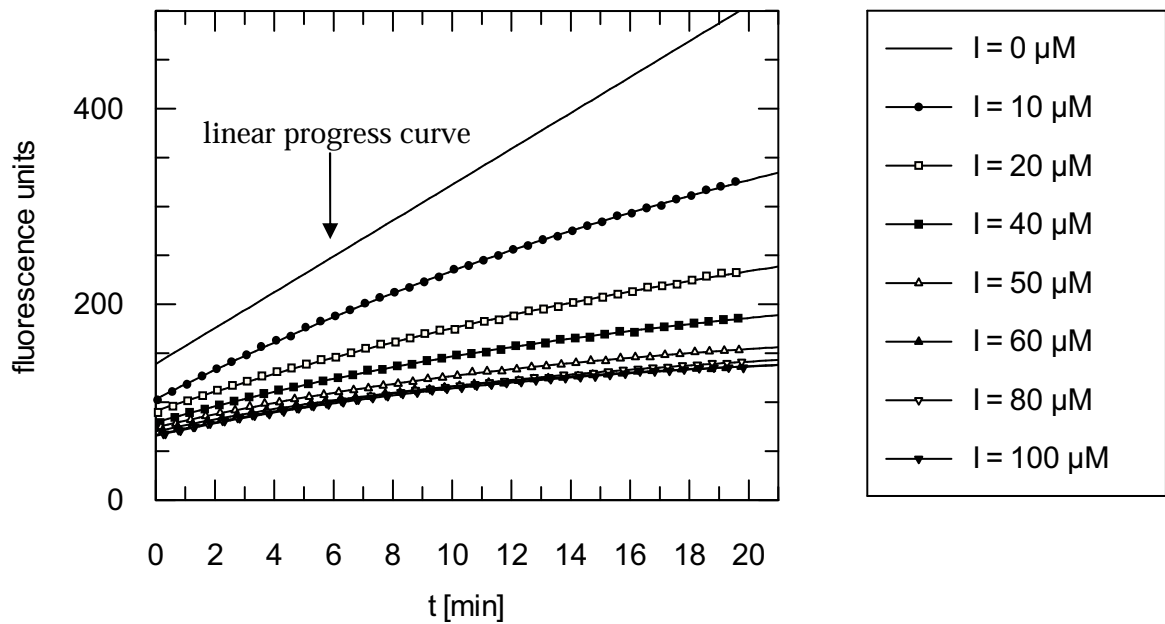


Abb. 4.5: Substratumsatz durch die SARS-CoV-M^{pro} pro Zeit in Abwesenheit (InhibitorKonzentration: 0 μM) und Anwesenheit von **Lit1** (InhibitorKonzentration: 10-100 μM) (verändert, nach Ludewig *et al.*, 2010).

Für irreversible Inhibitoren kann dann folgender Zwei-Schritt-Inhibitionsmechanismus bezüglich des Enzyms angenommen werden:



E: Enzym; **I:** Inhibitormolekül (**Lit1**)

K_i [M]: Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes EI

k_i [min^{-1}]: Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung der Bildung des inaktivierten Enzyms E-I

Sofern Inhibitor und Substrat im Überschuss bezüglich des Enzyms vorliegen, kommt es zu einer Produktbildung nach *steady-state*-Bedingungen. Dies entspricht einer Kinetik pseudoerster Ordnung: Die Zunahme des Produktes nimmt bei einem vorliegenden irreversiblen Inhibitor pro Zeiteinheit exponentiell ab, wobei man sich schließlich der Produktkonzentration $[\text{P}]_\infty$ nähert. Die Produktzunahme wird in folgender Gleichung beschrieben:

Gleichung 1:

$$P_t = P_\infty \cdot (1 - e^{-k_{obs} \cdot t})$$

k_{obs} : Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung

Aus obigem Umsatz-Zeit-Diagramm (siehe Abbildung 4.5) kann man durch Anpassen der Umsatz-Zeit-Kurven an die Gleichung 1 durch nicht-lineare Regressionsanalyse die k_{obs} -Werte bestimmen. Es ergibt sich bei den verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen [I] jeweils der entsprechende k_{obs} -Wert. Diese k_{obs} -Werte werden dann mit folgender Gleichung gegen die dazugehörigen Inhibitor-Konzentrationen [I] gefittet:

Gleichung 2:

$$k_{obs} = \frac{k_i \cdot [I]}{(K_i + [I])}$$

Man erhält die Hemmkonstanten k_i und K_{iapp} (siehe Abbildung 4.6). Bei dem in der Abbildung unter anderem angegebenen K_{iapp} -Wert handelt es sich lediglich um die sogenannte apparente Dissoziationskonstante, da bei allen Berechnungen nur die Reaktion des Enzyms mit Inhibitor betrachtet wird. Im durchgeführten Assay ist aber zusätzlich das Substrat anwesend, welches mit dem Inhibitor um die Bindung im aktiven Zentrum des Enzyms konkurriert. Der wirkliche K_i -Wert kann mittels Division durch den Term $(1 + [S]/K_m)$ in Gleichung 3 ermittelt werden.

Gleichung 3:

$$K_{iapp} = K_i \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right)$$

S: Substrat

K_m : Michaelis-Menten-Konstante

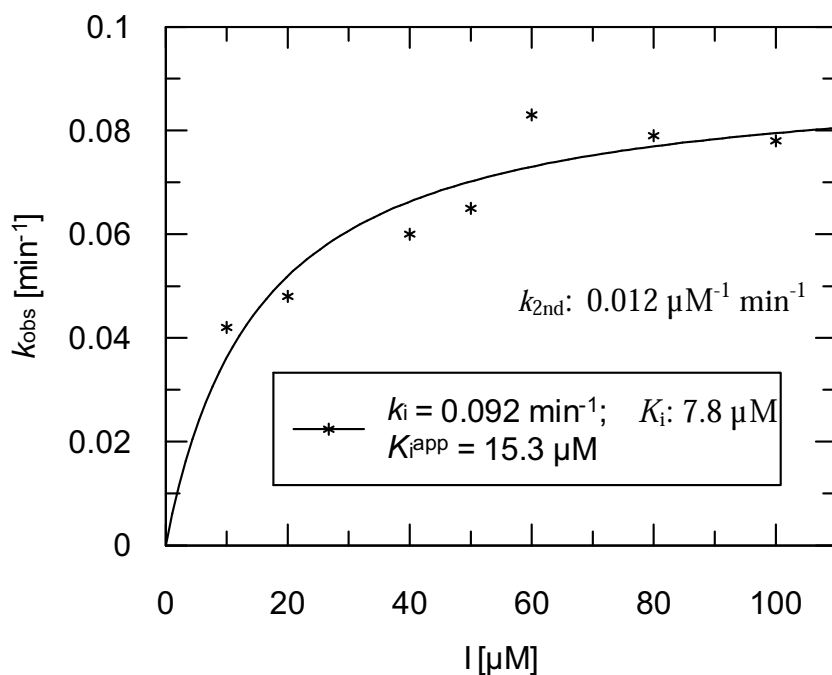


Abb. 4.6: Auftragung der k_{obs} -Werte über die **Lit1**-Konzentrationen und Angabe der ermittelten Kinetik-Parameter. $k_{2\text{nd}}$ ist die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung der Inaktivierung ($k_{2\text{nd}}=k_i/K_i$) (verändert, nach Ludewig *et al.*, 2010).

Es gelang nicht, den Inhibitor **Lit1** mit der SARS-CoV-M^{pro} zusammen im Komplex zu kristallisieren und die Ergebnisse von Lu *et al.* zusätzlich mit einer Kristallstruktur zu widerlegen. Ein möglicher Grund hierfür könnte in der DMSO-Zugabe liegen, wie auch bei den Co-Kristallisationsversuchen mit einigen anderen Inhibitoren. DMSO ist als Additiv-Substanz zur Kristallisation der SARS-CoV-M^{pro} notwendig und übt Einfluss auf die Löslichkeit des Inhibitors und des Proteins aus. So kann der bereits gebundene Inhibitor durch dieses Lösungsmittel wieder aus dem aktiven Zentrum verdrängt bzw. abgespalten werden oder der Inhibitor wird zu stark durch DMSO abgeschirmt und ist somit bezüglich einer Reaktion mit der Protease nicht ausreichend verfügbar. So sprechen z.B. Tan *et al.* von Problemen, die bei der Bindung von in DMSO gelösten Inhibitoren an die SARS-CoV-M^{pro} auftraten (Tan *et al.*, 2005).

Bei dem Inhibitor **TS48**, als Beispiel eines Vertreters der SARS-CoV-M^{pro}-Inhibitoren mit Michael-System, konnte ebenfalls mittels ESI-MS eine kovalente Bindung an das Enzym nachgewiesen werden. Es entsteht ein Acyl-Enzym durch die Bindung des Zimtsäure-

Thioester-Restes an die Protease (siehe Kapitel 3.2.2; Abbildung 3.10). Interessanterweise besteht der Inhibitor aus zwei Molekülbausteinen mit gleicher Masse, wodurch anfangs nicht eindeutig bewiesen werden konnte, welches Fragment des Inhibitors an die Protease gebunden hatte. Mithilfe eines weiteren Experimentes (siehe Kapitel 3.2.2; Abbildung 3.11) konnte anschließend jedoch gezeigt werden, welches Fragment mit der Protease reagiert hat und dass es tatsächlich zu einer Spaltung des Thioesters kommt, wobei ein Acyl-Enzym entsteht; auch aus chemisch-synthetischer Sicht ist die Reaktion des labilen Thioesters naheliegender als eine Acylierung durch den Amid-Bestandteil von **TS48**. Die nachfolgende Abbildung zeigt den Reaktionsmechanismus zur Bildung des Acyl-Enzyms:

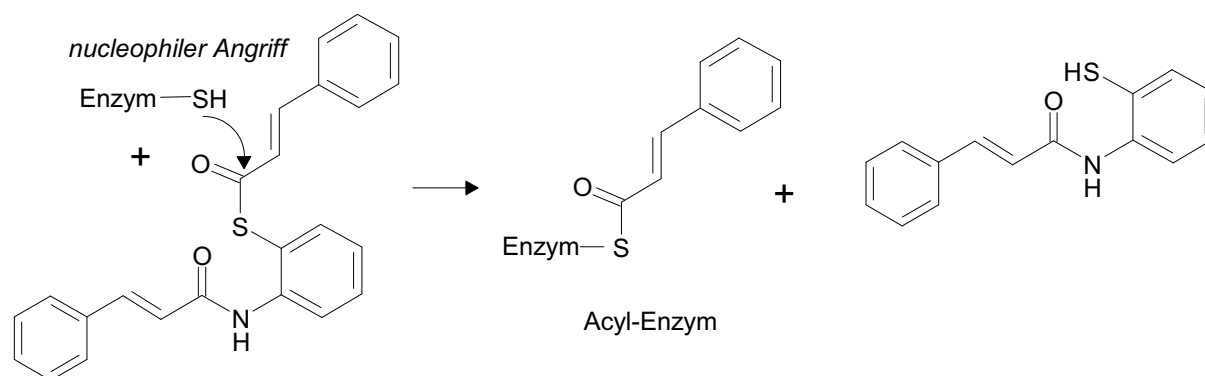


Abb. 4.7: Reaktionsmechanismus zur Bildung des Acyl-Enzyms, das durch nucleophilen Angriff des Cysteinschwefelatoms am Thioester gebildet wird.

Sowohl **Lit1** als auch **TS48** binden im Verhältnis 1:1 an die Protease. Bei beiden Inhibitoren ist davon auszugehen, dass sie an das aktive Zentrum der SARS-CoV-M^{pro} binden. Die Besonderheit dieser beiden verwendeten Inhibitoren liegt in der Tatsache, dass nach Inkubation mit der Protease neben dem gehemmten immer auch noch ein gewisser Prozentsatz unverändertes und somit aktives Enzym vorlag. Diese nicht vollständige Umsetzung bzw. Reaktion des Inhibitors mit der Protease wurde bei den zwei weiteren, durch ESI-MS analysierten Inhibitoren **MH211A** und **UK-VI-1g** nicht beobachtet. Hier fand eindeutig eine nahezu vollständige Umsetzung statt, was auch den stärkeren inhibitorischen Aktivitäten der Substanzen entspricht.

Als einen weiteren Vertreter der SARS-CoV-M^{pro}-Inhibitorengruppe mit einem Michael-System wurde der Inhibitor **MH211A** massenspektrometrisch untersucht. Eine kovalente

Bindung von **MH211A** pro Enzym-Monomer in den Verhältnissen 1:1, 1:2, 1:3 und 1:4 wurde nachgewiesen (siehe Kapitel 3.2.2; Abbildung 3.13). Im Gegensatz zu **Lit1** und **TS48** bindet im Falle von **MH211A** das komplette Molekül an die Protease und nicht nur ein Fragment des Inhibitors. Das Auftreten der mehrmaligen Bindung zeigt, dass **MH211A** ein unspezifischer Inhibitor ist.

Der Hemmstoff **UK-VI-1g**, der ein Etacrynsäurederivat darstellt, bindet laut ESI-MS-Experiment ausschließlich im Verhältnis 1:2 pro Enzym-Monomer (siehe Kapitel 3.2.2; Abbildung 3.15). Auch hier liegt eine kovalente Bindung des ganzen Inhibitors vor. Die nachstehende Abbildung zeigt das Ergebnis von im Arbeitskreis von Prof. Dr. Knut Baumann in Braunschweig durchgeführten *docking*-Experimenten mit **UK-VI-1g** und gibt eine mögliche Position des Moleküls im aktiven Zentrum der SARS-CoV-M^{pro} wieder:

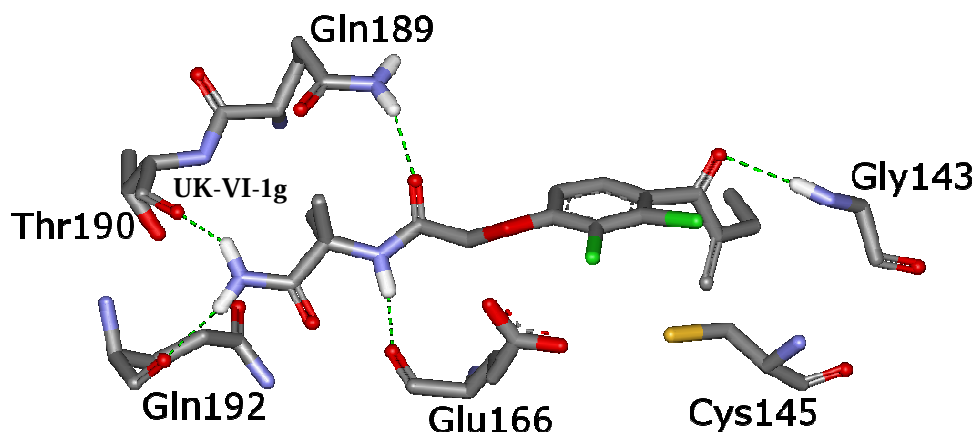


Abb. 4.8: Postulierte Lage von **UK-VI-1g** im aktiven Zentrum der SARS-CoV-M^{pro}. Grüne gestrichelte Linien: Wasserstoffbrückenbindungen (verändert, nach: Dissertation, Käßler, 2004).

Nach diesem postulierten Bindungsmodus ergeben sich insgesamt fünf Wasserstoffbrücken ausgehend von Gln189, Thr190, Gln192, Glu166 und Gly143. Der Abstand zwischen dem *active site*-Cystein (Cys145) und dem Kohlenstoffatom der Doppelbindung beträgt 3,48 Å und ist eigentlich zu groß, um eine kovalente Bindung auszubilden.

Durch einen Bromcyan/Trypsin-Doppolverdau der mit **UK-VI-1g** inkubierten SARS-CoV-M^{pro} war es möglich, diejenigen Peptidbereiche zu bestimmen, an welche der Inhibitor gebunden hatte (siehe Kapitel 3.2.3; Abbildung 3.16). Die gefundenen Bereiche (AS 62-76 und AS 280-298) befinden sich allerdings nicht im Bereich des aktiven Zentrums der SARS-CoV-M^{pro}, sondern an der Peripherie des Enzyms bzw. am C-Terminus.

Die Resultate des ESI-MS-Experimentes und des Doppolverdaus sprechen daher gegen einen, wie in Abbildung 4.8 postulierten Bindungsmechanismus und deuten ebenfalls auf eine

Unspezifität des Inhibitors hin. Allerdings befinden sich die Aminosäuren Serin und Threonin in den detektierten Peptiden. Hier könnte analog zu einer nucleophilen Addition des Cysteinschwefelatoms an den Inhibitor eine Reaktion mit der OH-Gruppe des Serins oder Threonins stattgefunden haben.

Auch nach Röntgendiffraktion einiger SARS-CoV-M^{pro}-UK-VI-1g-Co-Kristalle wurden an der Oberfläche des Enzyms verteilte, dem Inhibitor sehr ähnliche, Elektronendichten entdeckt, die jedoch aufgrund fehlender ausreichender Auflösung nicht mehr verfeinert werden konnten. Dieser Befund spricht zusätzlich für eine unspezifische Bindung von UK-VI-1g an die SARS-CoV-M^{pro}.

4.2 Co-Kristallisation der SARS-CoV-M^{pro} mit spezifischen Inhibitoren

4.2.1 Co-Kristallisation und Strukturanalyse der SARS-CoV-M^{pro} mit TS174

Durch *docking*-Experimente, durchgeführt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Knut Baumann in Braunschweig, wurde vorab ein reversibler Bindungsmechanismus von TS174, einem Leucinamid-Derivat, an die SARS-CoV-M^{pro} postuliert, bei dem der Pyridin-Rest in der S1-Tasche des aktiven Zentrums bindet und mit seinem N-Atom eine Wasserstoffbrücke ausbilden kann. Der Leucin-Rest kommt danach in der S2-Tasche zu liegen und der But-2-en-4-yl-Rest befindet sich in der S1'-Tasche (siehe Abbildung 4.9).

Die ESI-MS-Messungen bestätigten eine nicht-kovalente Bindung des verwendeten Inhibitors. Durch Co-Kristallisationsversuche konnte keine eindeutige Lage des Hemmstoffes bewiesen werden; erschwerend hinzu kommt die Tatsache, dass es sich bei dem Inhibitor TS 174 um ein Diastereomergemisch aus vier Verbindungen handelt, die an der Bindung im katalytischen Zentrum der SARS-CoV-M^{pro} beteiligt sein können.

Mit Hilfe von MD-Simulationen und vorliegenden kristallographischen Strukturdaten, aus denen drei mögliche unterschiedliche Lagen des Inhibitors hervorgehen (siehe Kapitel 3.3.2.1; Abbildungen 3.24-3.26), sollte untersucht werden, welches Isomer von TS174 an die Protease gebunden hatte und welche Orientierung dieses besitzt.

Wenn man das *docking*-Experiment mit allen drei experimentell bestimmten möglichen Lagen des Inhibitors im aktiven Zentrum der SARS-CoV-M^{pro} vergleicht, wird deutlich, dass die erste Möglichkeit der TS174-Bindung (siehe Kapitel 3.3.2.1; Abbildung 3.24) in der *active site* der Protease mit dem *docking* am besten übereinstimmt.

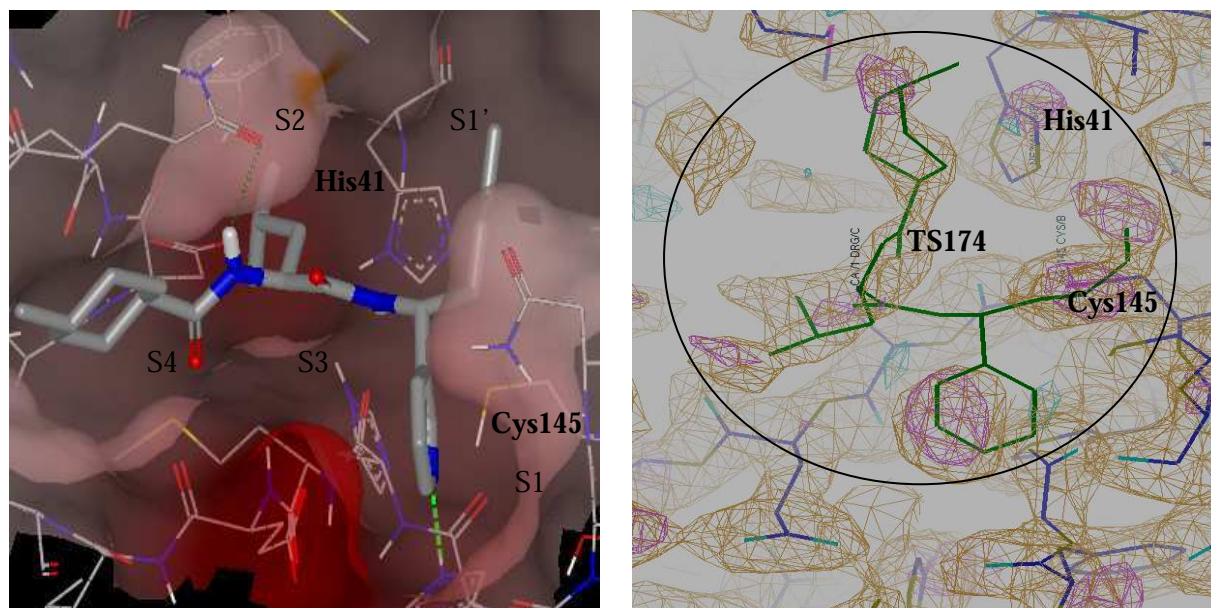


Abb. 4.9: links: *Docking*-Experiment zur Lage von **TS174** (graues Molekül) im aktiven Zentrum der SARS-CoV-M^{pro}. Grüne gestrichelte Linien: Wasserstoffbrückenbindungen. S1: S1-Tasche; S1': S1'-Tasche; S2: S2-Tasche; S3: S3-Tasche; S4: S4-Tasche; rechts: Lage von **TS174** im aktiven Zentrum der SARS-CoV-M^{pro} nach Einpassung des Inhibitors in die Elektronendichte nach Röntgenstrukturanalyse.

4.2.2 Co-Kristallisation und Strukturanalyse der SARS-CoV-M^{pro} mit **IISBT**

Isatin (2,3-Dioxindol) und seine Derivate zeigen cytostatische und antibakterielle Aktivität, sie hemmen z.B. aber auch die Replikation von HI-Viren und können somit als antivirale Wirkstoffe eingesetzt werden. Bei Zellkulturen, die mit dem SARS-Coronavirus infiziert waren, wurde ebenfalls eine antivirale Aktivität nach Behandlung mit Isatin-Derivaten beobachtet (Selvam *et al.*, 2008).

Der in dieser Arbeit getestete SARS-CoV-M^{pro}-Inhibitor **IISBT** zeigte in durchgeführten Inhibitionsstudien eine gute Hemmung im niederen mikromolaren Konzentrationsbereich (IC_{50} : 0,95 μ M) (Chen *et al.*, 2005).

Die IC_{50} -Werte von **IISBT** für andere Proteasen hingegen, wie z.B. Papain (Cysteinprotease), Trypsin oder Chymotrypsin (Serinproteasen), lagen bei höheren mikromolaren Inhibitorkonzentrationen bis hin zum millimolaren Bereich, was für eine hohe Spezifität von **IISBT** zur SARS-CoV-M^{pro} und deshalb für eine selektive Hemmung spricht (Chen *et al.*, 2005).

Die ESI-MS-Untersuchungen mit **IISBT** als einen Vertreter der Isatine lassen auf den ersten Blick den Schluss zu, dass dieser Inhibitor nicht-kovalent an die Protease bindet. Zhou *et al.* kamen mit Hilfe von MALDI-Experimenten zum gleichen Ergebnis (Zhou *et al.*, 2006). Bei Enzymassays mit dem Inhibitor **IISBT** und der SARS-CoV-M^{pro} wurde allerdings bei der Anwesenheit von höheren DTT-Konzentrationen eine reduzierte inhibitorische Aktivität beobachtet, was wiederum ein charakteristisches Merkmal für kovalent bindende Hemmstoffe ist, die mit Cystein-Resten des Enzyms reagieren.

Zur Bestätigung eines kovalent-reversiblen Bindungsmechanismus von **IISBT** wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Knut Baumann in Braunschweig Dialyse-Experimente durchgeführt, die eine Regeneration der SARS-CoV-M^{pro} nach erfolgter Inkubation von **IISBT** zeigten (Kossner *et al.*, unveröffentlicht).

Die Abbildung 4.10 zeigt das Ansteigen der Aktivität des Enzyms nach einem Dialyseprozess von 120 Minuten. Dies spricht für eine Wiederablösung des Inhibitors vom Enzym und damit für eine Reaktivierung der Protease.

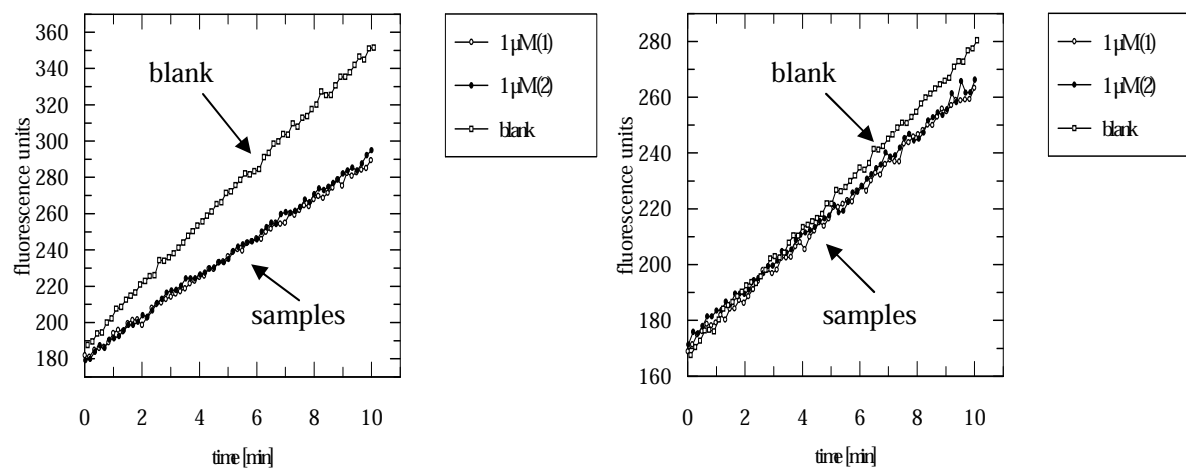


Abb. 4.10: Umsatz-Zeit-Kurven der Substrathydrolyse durch die SARS-CoV-M^{pro} in Dialyse-Experimenten. Links: Hemmung des Enzyms durch **IISBT**; rechts: Reaktivierung des Enzyms nach Dialyse (verändert, nach Kossner *et al.*, unveröffentlicht).

Endgültige Gewissheit darüber, ob der Inhibitor **IISBT** kovalent oder nicht-kovalent an die SARS-CoV-M^{pro} bindet, konnte nur durch eine entsprechende röntgendiffraktometrische Lösung der Struktur des gebildeten Komplexes erlangt werden. Durch die anomale Streuung des Iod-Atoms konnte schon vorab bewiesen werden, dass der Inhibitor im aktiven Zentrum der Protease vorliegt. Die Röntgenstrukturdaten zeigten schließlich, dass der Inhibitor **IISBT** eine kovalente Bindung mit dem *active site*-Cystein (Cys145) bildet. Damit konnte erstmals

eindeutig ein kovalent-reversibler Bindungsmodus eines Isatin-Derivats an die SARS-CoV-M^{pro} gezeigt und strukturanalytisch belegt werden.

Einen anderen reversiblen Bindungsmodus desselben Inhibitors an die SARS-CoV-M^{pro} postulierten Chen *et al.* In diesem Fall kommt es zu einer reversiblen nicht-kovalenten Bindung des entsprechenden Inhibitors, die alleinig auf Wasserstoffbrückenbindungen beruht (Chen *et al.*, 2005). Die Abbildung 4.11 zeigt diesen Bindungsmodus, der durch *docking* des Inhibitors an die SARS-CoV-M^{pro} postuliert wird. Laut diesem *docking*-Ergebnis kommt es bei der Bindung des Iod-Isatin-Derivats im aktiven Zentrum der Protease zu einer Bindung des Isatin-Grundgerüsts in die hydrophile S1-Tasche, die, als Teil der Domäne II, nahe dem *active site*-Cystein lokalisiert ist; der Benzothiophen-Rest des Inhibitors befindet sich in der hydrophoben S2-Tasche in der Nähe der katalytischen Diade zwischen Domäne I und II. Die Carbonylgruppe des Isatins und die NH-Gruppen von Cys145, Gly143 und Ser144 sind über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verknüpft.

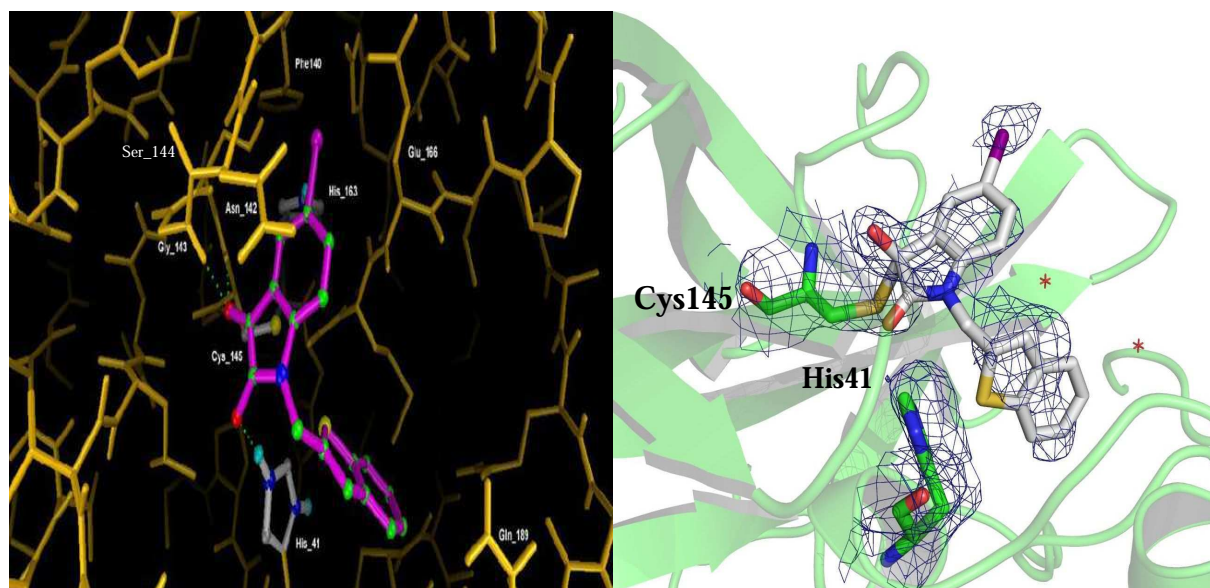


Abb. 4.11: links: *Docking*-Experiment zur Lage des Isatin-Derivats **IISBT** im aktiven Zentrum der SARS-CoV-M^{pro}. Grüne gestrichelte Linien: Wasserstoffbrückenbindungen (verändert, nach Chen *et al.*, 2005); rechts: Lage von **IISBT** im aktiven Zentrum der SARS-CoV-M^{pro} nach Einpassung des Inhibitors in die Elektronendichte nach Röntgenstrukturanalyse.

In dieser Hinsicht stimmt das *molecular modelling* von Chen *et al.* mit der in der vorliegenden Arbeit röntgenkristallographisch bestimmten Struktur des **IISBT**-SARS-CoV-M^{pro}-

Komplexes in Bezug auf die Orientierung von **IISBT** in der *active site* der Protease überein (siehe Kapitel 3.3.2.2; Abbildung 3.31), allerdings mit dem Unterschied, dass experimentell eine kovalente Bindung zwischen dem Carbonyl-C2-Atom des **IISBT**-Isatin-Grundkörpers und dem Schwefelatom des Cys145 der SARS-CoV-M^{pro} nachgewiesen wurde. Hierbei bildet sich – analog zu einer nucleophilen Addition eines Thiols an eine Carbonylgruppe – letztlich ein Thiohalbketal, so dass das Carbonyl-C2-Atom nun nicht mehr sp^2 -, sondern sp^3 -hybridisiert ist (siehe Abbildung 4.12). Einhergehend mit *ab initio* quantenchemischen Kalkulationen wurde dieser Reaktionsmechanismus von Isatin-Derivaten schon bei der rhinoviralen 3C-Protease in Betracht gezogen, wobei man die Reaktion mehrerer substituierter Isatine mit Methylmercaptan als Thiol simulierte (Webber *et al.*, 1996).

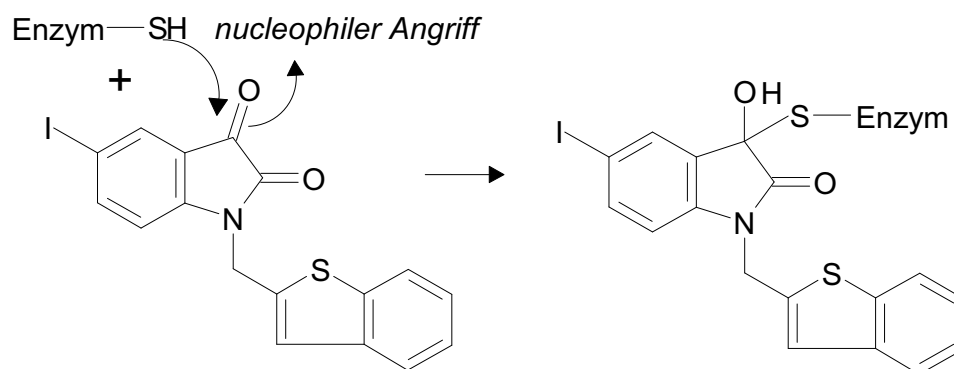
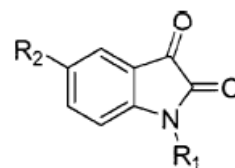
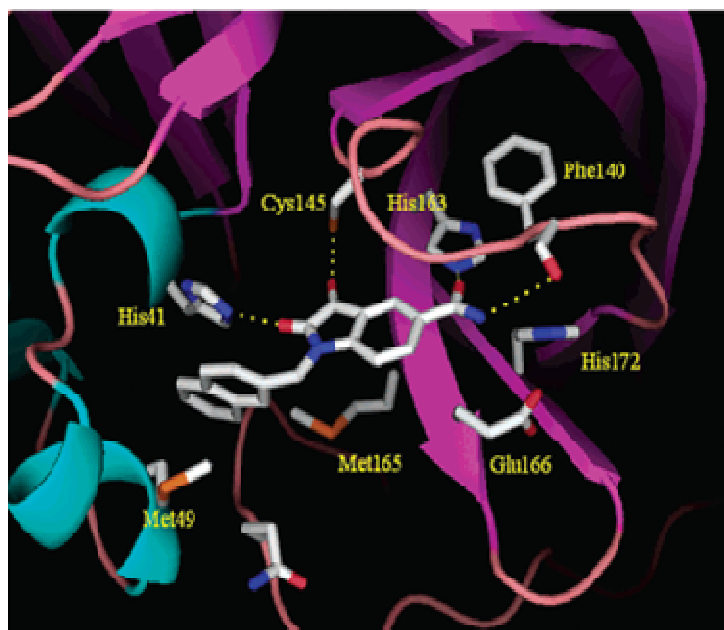


Abb. 4.12: Reaktionsmechanismus zur Bildung eines Thiohalbketals. Es kommt zu einem nucleophilen Angriff des Cysteinschwefelatoms im aktiven Zentrum der SARS-CoV-M^{pro} am Carbonyl-C2-Atom von **IISBT**.

Ein weiterer nicht-kovalenter Bindungsmechanismus, der von Zhou *et al.* nach *docking*-Experimenten eines ähnlichen Isatin-Derivats an die SARS-CoV-M^{pro} postuliert wurde (siehe Abbildung 4.13), konnte ebenfalls widerlegt werden. Wie in dieser Abbildung veranschaulicht, sollen hier laut durchgeführten *docking*-Studien der Carboxamid-Rest am C5-Atom Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäureresten Phe140 und His163, sowie die Sauerstoffatome am C2- bzw. C3-Atom zur katalytischen Diade ausbilden. Der Naphthyl-Ring des Inhibitors liegt in diesem Modell in der hydrophoben S2-Tasche, die von den Aminosäureresten Met49 und Met165 gebildet wird. Dies ist analog zur Orientierung des Benzothiophen von **IISBT**.



R1: $\beta\text{-C}_{10}\text{H}_7\text{CH}_2$

R2: CONH_2

Abb. 4.13: *Docking*-Experiment zur Lage eines Isatin-Derivats (Strukturformel: rechts) im aktiven Zentrum der SARS-CoV-M^{pro}. Gelbe gestrichelte Linien: Wasserstoffbrückenbindungen (verändert, nach Zhou *et al.*, 2006).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die gelöste Kristallstruktur des **IISBT**-SARS-CoV-M^{pro}-Komplexes zwei, auf *molecular modelling* bzw. *docking*-Studien basierende Bindungsmodi von Isatin-Derivaten mit der SARS-CoV-M^{pro} widerlegt werden konnten.

Zudem ähnelt der in dieser Arbeit nachgewiesene kovalent-reversible Bindungsmechanismus von **IISBT** dem vom Webber *et al.* aufgrund von *molecular modelling* vermuteten Bindungsmodus verschiedener Isatin-Derivate an die rhinovirale 3C-Protease, der letztlich auch durch eine entsprechende Kristallstruktur belegt wurde (Webber *et al.*, 1996).

Die beiden leicht unterschiedlichen möglichen Orientierungen von **IISBT** hinsichtlich der Lage des Iod-Atoms (siehe Kapitel 3.3.2.2; Abbildung 3.31) ergeben sich vermutlich durch zwei nebeneinander existierende, leicht differierende Lagen, die der Inhibitor im aktiven Zentrum der Protease einnimmt. Die insgesamt eher schwache Elektronendichte für den Inhibitor deutet darauf hin, dass eine unzureichende Besetzung der *active site* der SARS-CoV-M^{pro} durch den Inhibitor vorliegt, oder aber wie bereits erwähnt, mehrere leicht unterschiedliche Positionen des Inhibitors vorliegen.

Die ungenügende Besetzung dieses Inhibitors lässt sich möglicherweise auf dessen geringe Wasserlöslichkeit und die damit verbundene geringere Verfügbarkeit während der Inkubation, die für eine nachweisbare Bindung an das Enzym notwendig ist, zurückführen. Vergleichbare

Probleme ergaben sich auch mit dem Inhibitor **TS174**, bei dem in vorliegender Strukturanalyse drei verschiedene Orientierungen im katalytischen Zentrum der SARS-CoV-M^{pro} abgeleitet wurden.

Weitere Faktoren, die einen Einfluss auf die Bindungsaffinität der Inhibitoren zur Protease ausüben, sind Reagenzien wie z.B. DTT, das als Reduktionsmittel während der Enzym-Inhibitor-Inkubation, aber auch im Kristallisationsansatz gegenwärtig ist. So wurde bei Enzymassays mit dem Inhibitor **IISBT** gezeigt, dass die prozentuale Hemmung der SARS-CoV-M^{pro} bei einer Inhibitorkonzentration von 20 μ M von 95% (ohne DTT-Zugabe) auf 69% (mit 700 μ M DTT-Zugabe) sinkt. Diese Erniedrigung der inhibitorischen Aktivität lässt sich vermutlich auf das Abfangen von **IISBT** mit DTT zurückführen (Kossner *et al.*, unveröffentlicht). Aufgrund dessen wurden bereits gewachsene **IISBT**-SARS-CoV-M^{pro}-Co-Kristalle nochmals mit einer speziellen *soaking*-Lösung ohne DTT, aber mit TCEP und Inhibitor inkubiert (siehe Kapitel 2.2.3.2). Durch diesen Vorgang wurde einerseits erreicht, dass eine erhöhte Inhibitorkonzentration vorliegt und andererseits dass noch vorhandenes reaktives DTT durch TCEP verdrängt werden konnte. TCEP als Reduktionsmittel hat im Vergleich zu DTT den Vorteil, dass es stabiler, gleichzeitig aber auch weniger reaktiv bezüglich potentieller Reaktionspartner ist. Die nochmalige Inhibitorzugabe könnte zu den beiden leicht unterschiedlichen beobachteten Lagen des Inhibitors im aktiven Zentrum führen.

4.3 Ausblick

Das Problem, das sich vor allem bei der Co-Kristallisation der SARS-CoV-M^{pro} mit den Inhibitoren **UK-VI-1g** und **TS174** im Hinblick auf eindeutig zuzuordnende Strukturen ergab, liegt vermutlich in einer unzureichenden Bindung des jeweiligen Inhibitors begründet. Ursachen könnten die ungenügende Löslichkeit der Inhibitoren, oder aber auch ihre unspezifische Bindung sein.

Die Synthese von besser löslichen Inhibitoren, die gleichzeitig eine höhere Affinität zur SARS-CoV-M^{pro} aufweisen, wäre daher eine gute Voraussetzung für bessere röntgen-diffraktometrische Strukturanalysen.

Im Zusammenspiel mit ESI-MS-Analysen, die sehr erfolgreich und reproduzierbar mit der SARS-CoV-M^{pro} und entsprechenden Inhibitoren durchgeführt werden können, aber auch durch MALDI-Experimente, Enzymaktivitätsmessungen und Dialyse-Versuche wird zudem eine Voraussage der Bindungseigenschaften und -mechanismen erleichtert. Auch computergestützte Simulationen, wie z.B. MD-Berechnungen oder *docking*-Experimente, leisten ihren Beitrag zu möglichen Strukturlösungen.

Eine Möglichkeit kovalent-reversible Enzym-Inhibitor-Komplexe (Bindung von **IISBT** an die SARS-CoV-M^{pro}) bzw. deren Zwischenstufen nachweisen zu können, würden evtl. spezielle ESI-MS-Analysen mit einer schonenden Ionisierung während des ESI-Prozesses und die Verwendung von nicht-denaturierenden Lösungsmitteln bieten. Durch die übliche ESI-MS-Messung wird nämlich ein entstandener Komplex zwischen der SARS-CoV-M^{pro} und dem Inhibitormolekül zerstört bzw. es kommt wieder zu einer Dissoziation in Enzym und Inhibitor.

Die vorliegenden Ergebnisse zur SARS-CoV-M^{pro} und deren Hemmung durch verschiedene Inhibitoren können bei der Suche nach weiteren Inhibitoren von Cysteinproteasen, insbesondere von Chymotrypsin-ähnlichen Proteasen, dienlich sein und leisten damit Beitrag zum *structure-based drug design*.

5 Zusammenfassung

Bei SARS („Schweres akutes respiratorisches Syndrom“) handelt es sich um eine Infektionskrankheit des Menschen, welche im November 2002 erstmalig auftrat. Als Erreger dieser Krankheit wurde das SARS-assoziierte Coronavirus identifiziert. Dessen viruseigene Reproduktionsmaschinerie wird vor allem durch die katalytische Aktivität einer Cysteinprotease, der SARS-Coronavirus-Hauptprotease (SARS-CoV-M^{pro}), und die damit verbundene Prozessierung von viralen Polyproteinen, aufrechterhalten. Diese Schlüsselfunktion der SARS-CoV-M^{pro} macht sie zu einem vielversprechenden Zielobjekt bei der Entwicklung von spezifischen Inhibitoren für diese Protease, welche somit eine Vermehrung des Virus verhindern.

In dieser Arbeit wurde die SARS-CoV-M^{pro} mit optimierten Methoden exprimiert und gereinigt. Mit der Methode der ESI-MS-Analyse konnte ein kovalentes, irreversibles Bindungsverhalten verschiedener Inhibitoren gezeigt werden und erstmals auch die Bindung von Fragmenten von Inhibitormolekülen an die Protease. So zeigten die SARS-CoV-M^{pro}-Inhibitoren **MH211A** und **UK-VI-1g** (siehe Abbildungen 5.1 und 5.2) eine kovalente Bindung des kompletten Moleküls pro Enzym-Monomer: überraschenderweise hatten bis zu vier Moleküle **MH211A** bzw. zwei Moleküle **UK-VI-1g** an ein Proteasemolekül gebunden. Die Bindung von **UK-VI-1g** an die Protease wurde an zwei Peptiden im Bereich von den Aminosäuren 62 bis 76 bzw. 280 bis 298 nachgewiesen, wobei beide nicht in der Nähe der *active site* lokalisiert sind.

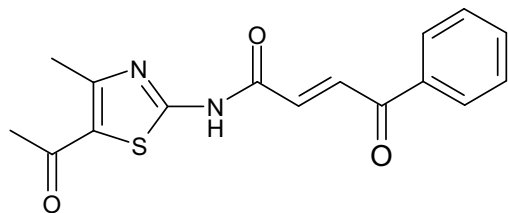


Abb. 5.1: Inhibitor **MH211A**

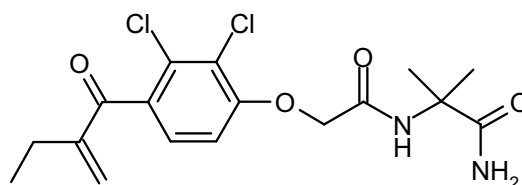
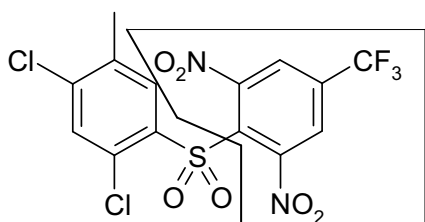
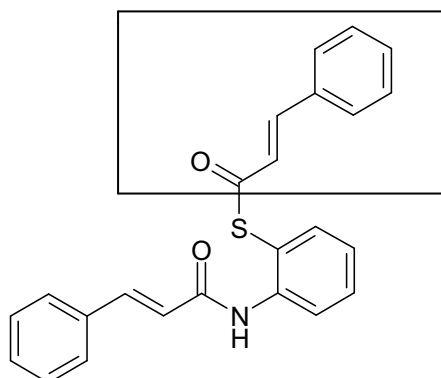
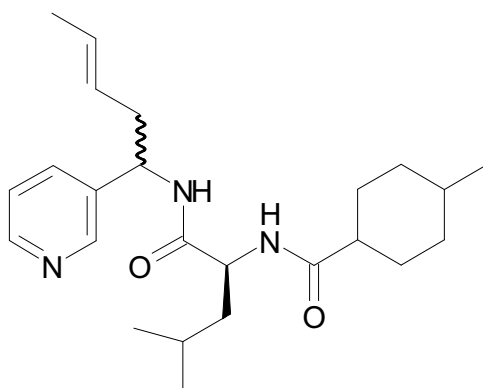


Abb. 5.2: Inhibitor **UK-VI-1g**

Im Falle des Inhibitors **Lit1** (siehe Abbildung 5.3) bindet der 2,6-Dinitro-4-trifluoromethylphenyl-Rest, bei **TS48** (siehe Abbildung 5.4) das Zimtsäure-Thioester-Fragment kovalent an jedes Monomer im dimeren Enzym.

Abb. 5.3: Inhibitor **Lit1**Abb. 5.4: Inhibitor **TS48**

Die SARS-CoV-M^{pro} wurde erstmals ohne Abtrennung des C-terminalen His-tag mit spezifischen Inhibitoren co-kristallisiert. Drei mögliche Orientierungen des Inhibitors **TS174** (siehe Abbildung 5.5) wurden in der *active site* der Protease identifiziert. Aufgrund der schwachen Elektronendichte des Inhibitors konnten diese nicht weiter untersucht werden.

Abb. 5.5: Inhibitor **TS174**

Das Iod-Isatin-Derivat **IISBT** wurde ebenfalls mit der SARS-CoV-M^{pro} zusammen co-kristallisiert und es konnte erstmalig eine kovalente Bindung eines Isatin-Derivats an die SARS-CoV-M^{pro} (siehe Abbildung 5.6) anhand einer Röntgenstruktur klar gezeigt werden.

Diese Struktur zeigte dann, dass früher veröffentlichte molekulare *docking*-Studien, die eine nicht-kovalente Bindung von **IISBT** und anderen Isatin-Derivaten veranschaulichen, nochmal überdacht werden sollten (Chen *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2006).

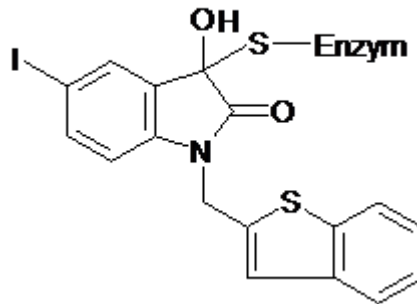


Abb. 5.6: Inhibitor **IISBT** gebunden an die SARS-CoV-M^{pro}.

Basierend auf einer ESI-MS-Analyse und früheren Ergebnissen von MALDI- und Dialyse-Experimenten, kann man sicher annehmen, dass **IISBT** in einer kombinierten kovalent-reversiblen Art und Weise an die SARS-CoV-M^{pro} bindet.

6 Summary

SARS („severe acute respiratory syndrome”), a respiratory disease in humans, appeared in November 2002 for the first time. The causative agent of this disease is the SARS-associated coronavirus. Its replication machinery is maintained by the catalytic activity of a cysteine protease, named SARS coronavirus main protease (SARS-CoV-M^{pro}) that processes the virus derived polyproteins. Based on this key role the SARS-CoV-M^{pro} is an attractive target for the development of specific inhibitors against this protease thereby inhibiting the reproduction of the virus.

In this work, the SARS-CoV-M^{pro} was expressed and purified by optimized methods. Through ESI-MS analysis an irreversible covalent interaction of various inhibitors was detected but also for the first time the binding of fragments of the inhibitors to the protease. Accordingly the SARS-CoV-M^{pro} inhibitors **MH211A** and **UK-VI-1g** (see figures 6.1 and 6.2) displayed a covalent binding of the complete molecule to the enzyme monomer: surprisingly up to four molecules of **MH211A** and two molecules of **UK-VI-1g** respectively bound to one protease molecule. The interaction of **UK-VI-1g** with the protease was detected for two peptides ranging from amino acids 62 to 76 and 280 to 298 both of which are not located near the active site.

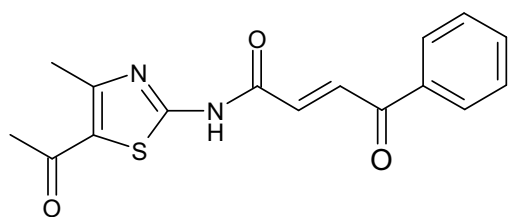


Fig. 6.1: Inhibitor **MH211A**

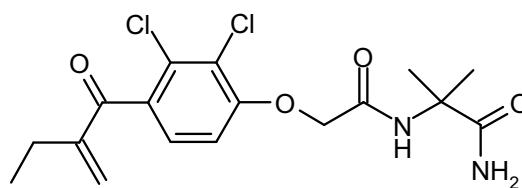
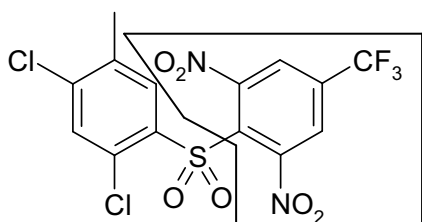
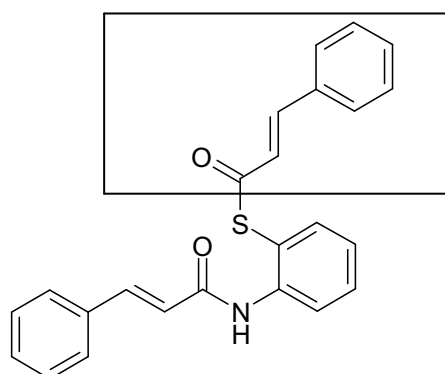
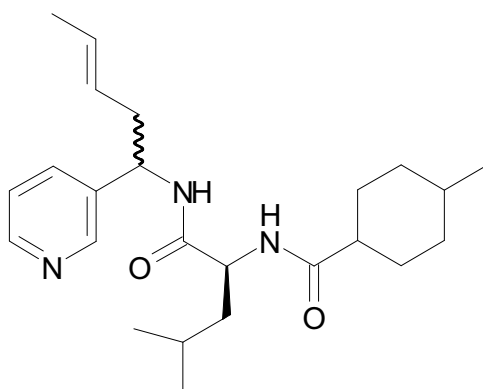


Fig. 6.2: Inhibitor **UK-VI-1g**

In case of inhibitor **Lit1** (see figure 6.3) the 2,5-dinitro-4-trifluoromethylphenyl-fragment and in **TS48** (see figure 6.4) the cinnamic acid-thioester-fragment binds covalently to each monomer in the dimeric enzyme.

Fig. 6.3: Inhibitor **Lit1**Fig. 6.4: Inhibitor **TS48**

For the first time the SARS-CoV-M^{pro} was co-crystallized with specific inhibitors without cleaving the C-terminal His-tag. Three possible orientations of the inhibitor **TS174** (see figure 6.5) were identified in the active site of the protease. They could not be further resolved due to the weak electron density for the inhibitor.

Fig. 6.5: Inhibitor **TS174**

The iodoisatin derivative **IISBT** was co-crystallized with SARS-CoV-M^{pro} as well and a covalent binding mechanism of an isatin derivative to the SARS-CoV-M^{pro} was clearly shown (see figure 6.6) for the first time in an X-ray structure. This structure then indicates that the

previously published molecular docking studies demonstrating a noncovalent binding mode of **IISBT** and other isatin derivatives should be reconsidered (Chen *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2006).

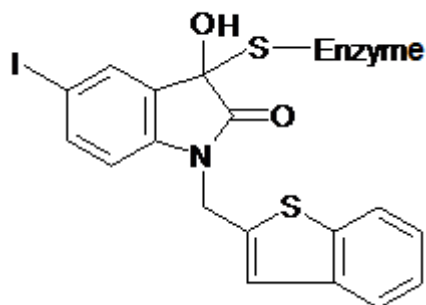


Fig. 6.6: Inhibitor **IISBT** bound to the SARS-CoV-M^{pro}.

Based on an ESI-MS analysis and previous results of MALDI and dialysis experiments it is safe to assume that **IISBT** binds to the SARS-CoV-M^{pro} in a combined covalent reversible manner.

7 Literaturverzeichnis

ALMAZAN, F., GALAN, C., ENJUANES, L. (2004)

The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication.

J Virol **78**, 12683–12688.

ALMEIDA, J. D., TYRRELL, D. A. (1967)

The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture.

J Gen Virol **1**, 175–178.

ALMEIDA, J. D., BERRY, D. M., CUNNINGHAM, C. M., HAMRE, D., HOFSTAD, M. S., MALLUCCI, L., MCINTOSH, K., TYRRELL, D. A. (1968)

Coronaviruses.

Nature **220**, 650.

ANAND, K., ZIEBUHR, J., WADHWANI, P., MESTERS, J. R., HILGENFELD, R. (2003)

Coronavirus main proteinase (3CL^{pro}) structure: basis for design of anti-SARS drugs.

Science **300**, 1763–1767.

BARRETT, A. J., RAWLINGS, N. D., WOESSNER, J. F. (2004)

Handbook of proteolytic enzymes.

Vol. 2, 2nd Edition, Elsevier Academic Press, Amsterdam, Boston, Heidelberg.

BEAUDETTE, F. R., HUDSON, C. B. (1937)

Cultivation of the virus of infectious bronchitis.

J Am Vet Med Assoc **90**, 51–60.

BENBACER, L., KUT, E., BESNARDEAU, L., LAUDE, H., DELMAS, B. (1997)

Interspecies aminope N chimeras reveal species-specific receptor recognition by canine coronavirus, feline inperitonitis virus, and transmissible gastroenteritis virus.

J Virol **71**, 734–737.

BERGER, A., DROSTEN, C., DOERR, H. W., STURMER, M., PREISER, W. (2004)

Severe acute respiratory syndrome (SARS) – paradigm of an emerging viral infection.

J Clin Virol **29**, 13–22.

BERRY, D. M., CRUICKSHANK, J. G., CHU, H. P., WELLS, R. J. (1964)

The structure of infectious bronchitis virus.

Virology **23**, 403–407.

BROEMME, D., KALETA, J. (2002)

Thiol-dependent cathepsins: pathophysiological implications and recent advances in inhibitor design.

Curr Pharm Des **8**, 1639–1658.

BRUENGER, A. T. (1992)

Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures.

Nature **355**, 472–475.

CAVANAGH, D. (1997)

Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae.
Arch Virol **142**, 629–633.

CHEN D. S., ASANAKA, M., CHEN, F. S., SHIVELY, J. E., LAI, M. M. (1997)

Human carcinoembryonic antigen and biliary glycoprotein can serve as mouse hepatitis virus receptors.
J Virol **71**, 1688–1691.

CHEN, D. S., DUBNAU, D. (2004)

DNA uptake during bacterial transformation.
Nat Rev Microbiol **2**, 241–249.

CHEN, C. N., LIN, C. P. C., HUANG, K. K., CHEN, W. C., HSIEH, H. P., LIANG, P. H., HSU, J. T. A. (2005)

Inhibition of SARS-CoV 3C-like protease activity by theaflavin-3,3'-digallate (TF3).
Evid Based Complement Alternat Med **2**, 209–215.

CHEN, L. R., WANG, Y. C., LIN, Y. W., CHOU, S. Y., CHEN, S. F., LIU, L. T., WU, Y. T., KUO, C. J., CHEN, T. S. S., JUANG, S. H. (2005)

Synthesis and evaluation of isatin derivatives as effective SARS coronavirus 3CL protease inhibitors.
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **15**, 3058–3062.

CHOU, C. Y., CHANG, H. C., HSU, W. C., LIN, T. Z., LIN, C. H., CHANG, G. G. (2004)
Quaternary structure of the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus main protease.

Biochemistry **43**, 14958–14970.

CINATL, J., MORGENSTERN, B., BAUER, G., CHANDRA, P., RABENAU, H., DOERR, H. W. (2003)

Treatment of SARS with human interferons.
Lancet **362**, 293–294.

COMPTON, S. R., BARTHOLD, S. W., SMITH, A. L. (1993)

The cellular and molecular pathogenesis of coronaviruses.
Lab Anim Sci **43**, 15–28.

COWLEY, J. A., DIMMOCK, C. M., SPANN, K. M., WALKER, P. J. (2000)

Gill-associated virus of penaeus monodon prawns: an invertebrate virus with ORF1a and ORF1b genes related to arteri- and coronaviruses.
J Gen Virol **81**, 1473–1484.

DAVIS, I. W., LEAVER-FAY, A., CHEN, V. B., BLOCK, J. N., KAPRAL, G. J., WANG, X., MURRAY, L. W., ARENDALL III, SNOEYINK, J., RICHARDSON, J. S., RICHARDSON, D. C. (2007)

MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids.
Nucleic Acids Res **35**, 375–383.

- DE GROOT, R. J., HARDY, W. R., SHIRAKO, Y., STRAUSS, J. H. (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, A. A. F., HORZINEK, M. C., ROTTIER, P. J. M., DE GROOT, R. J. (1997)
The genome organization of the nidovirales: similarities and differences between arteri-, toro- and coronaviruses.
Seminars in Virology **8**, 33–47.
- DIEDERICHS, K., KARPLUS, P. A. (1997)
Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography.
Nat Struct Biol **4**, 269–275.
- DOUGHERTY, W. G., PARKS, T. D. (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.
- DRENTH, J., JANSONIUS, J. N., KOEKOEK, R., SWEN, H. M., WOLTHERS, B. G. (1968)
Structure of papain.
Nature **218**, 929–932.
- DROSTEN, C., GUNTHER, S., PREISER, W., VAN DER WERF, S., BRODT, H. R., BECKER, S., RABENAU, H., PANNING, M., KOLESNIKOVA, L., FOUCHIER, R. A., BERGER, A., BURGUIERE, A. M., CINATL, J., EICKMANN, M., ESCRIOU, N., GRYWNA, K., KRAMME, S., MANUGUERRA, J. C., MULLER, S., RICKERTS, V., STURMER, M., VIETH, S., KLENK, H. D., OSTERHAUS, A. D., SCHMITZ, H., DOERR, H. W. (2003)
Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome.
N Engl J Med **348**, 1967–1976.
- DUCRUIX, A., GIEGE, R. (1992)
Crystallization of nucleic acids and proteins. A practical approach.
Oxford University Press, New York.
- EHMKE, V., HEINDL, C., ROTTMANN, M., FREYMOND, C., SCHWEIZER, W. B., BRUN, R., STICH, A., SCHIRMEISTER, T., DIEDERICH, F. (2011)
Potent and selective inhibition of cysteine proteases from *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma brucei*.
Chem Med Chem **6**, 273–278.
- EICKMANN, M., BECKER, S., KLENK, H. D., DOERR, H. W., STADLER, K., CENSINI, S., GUIDOTTI, S., MASIGNANI, V., SCARSELLI, M., MORA, M., DONATI, C., HAN, J. H., SONG, H. C., ABRIGNANI, S., COVACCI, A., RAPPUOLI, R. (2003)
Phylogeny of the SARS coronavirus.
Science **302**, 1504–1505.

- EMSLEY, P., COWTAN, K. (2004)
Coot: model-building tools for molecular graphics.
Acta Cryst **60**, 2126–2132.
- EVANS, P. R. (2005)
Scaling and assessment of data quality.
Acta Cryst **62**, 72–82.
- 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.
- FOUCHIER, R. A., KUIKEN, T., SCHUTTEN, M., VAN AMERONGEN, G., VAN DOORNUM, G. J., VAN DEN HOOGEN, B. G., PEIRIS, M., LIM, W., STOHR, K., OSTERHAUS, A. D. (2003)
Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus.
Nature **423**, 240.
- FROSCHE, B. A., BERQUIN, I., EMMERT-BUCK, M. R., MOIN, K., SLOANE, B. F. (1999)
Molecular regulation, membrane association and secretion of tumor cathepsin B.
Apmis **107**, 28–37.
- GASTEIGER, E., HOOGLAND, C., GATTIKER, A., DUVAUD, S., WILKINS, M. R., APPEL, R. D., BAIROCH, A. (2005)
Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server.
The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press, 571–607.
- GOETZ, D. H., CHOE, Y., HANSELL, E., CHEN, Y. T., MCDOWELL, M., JONSSON, C. B., ROUSH, W. R., MCKERROW, J., CRAIK, C. S. (2007)
Substrate specificity profiling and identification of a new class of inhibitor for the major protease of the SARS coronavirus.
Biochemistry **46**, 8744–8752.
- GRANZOW, H., WEILAND, F., FICHTNER, D., SCHUTZE, H., KARGER, A., MUNDT, E., DRESENKAMP, B., MARTIN, P., METTENLEITER, T. C. (2001)
Identification and ultrastructural characterization of a novel virus from fish.
J Gen Virol **82**, 2849–2859.
- GRONEBERG, D. A., HILGENFELD, R., ZABEL, P. (2005)
Molecular mechanisms of severe acute respiratory syndrome (SARS).
Respir Res **2005**, 6–8.
- GRUM-TOKARS, V., RATIA, K., BEGAYE, A., BAKER, S. C., MESECAR, A. D. (2008)
Evaluating the 3C-like protease activity of SARS-Coronavirus: Recommendations for standardized assays for drug discovery.
Virus Research **133**, 63–73.

GUAN, Y., ZHENG, B. J., HE, Y. Q., LIU, X. L., ZHUANG, Z. X., CHEUNG, C. L., LUO, S. W., LI, P. H., ZHANG, L. J., GUAN, Y. J., BUTT, K. M., WONG, K. L., CHAN, K. W., LIM, W., SHORTRIDGE, K. F., YUEN, K. Y., PEIRIS, J. S., POON, L. L. (2003)

Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China.

Science **302**, 276–278.

HAMMING, I., TIMENS, W., BULTHUIS, M. L. C., LELY, A. T., NAVIS, G. J., VAN GOOR, H. (2004)

Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step for understanding SARS pathogenesis.

J Pathol **203**, 631–637.

HEGYI, 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, K. V., BEAUCHEMIN, N. (2004)

Ceacam1a^{-/-} mice are completely resistant to infection by murine coronavirus mouse hepatitis virus A59.

J Virol **78**, 10156–10165.

HOFMANN, H., POEHLMANN, S. (2004)

Cellular entry of the SARS coronavirus.

Trends in Microbiology **12**, 466–472.

HOLMES, K. V. (2001)

Coronaviruses.

Field's Virology 4th edn., Edited New York: Lippincott Williams & Wilkins, 1187–1205.

HOLMES, K. V. (2005)

Structural biology. Adaptation of SARS coronavirus to humans.

Science **309**, 1822–1823.

HSU, M. F., KUO, C. J., CHANG, H. C., CHOU, C. C., KO, T. P., SHR, H. L., CHANG, G. G., WANG, A. H. J., LIANG, P. H. (2005)

Mechanism of the maturation process of SARS-CoV 3CL-protease.

J Biol Chem **280**, 31257–31266.

KABSCH, W. (1993)

Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants.

J Appl Cryst **26**, 795–800.

KAEPPLER, U. (2004)

Dissertation: Synthese und Testung Nichtpeptidischer Cystein-Protease-Inhibitoren - Etacrynsäure als Leitstruktur.

- KAMPHUIS, I. G., KALK, K. H., SWARTE, M. B., DRENTH, J. (1984)
Structure of papain refined at 1,65 Å resolution.
J Mol Biol **179**, 233–256.
- KAN, B., WANG, M., JING, H., XU, H., JIANG, X., YAN, M., LIANG, W., ZHENG, H., WAN, K., LIU, Q., CUI, B., XU, Y., ZHANG, E., WANG, H., YE, J., LI, G., LI, M., CUI, Z., QI, X., CHEN, K., DU, L., GAO, K., ZHAO, Y. T., ZOU, X. Z., FENG, Y. J., GAO, Y. F., HAI, R., YU, D., GUAN, Y., XU, J. (2005)
Molecular evolution analysis and geographic investigation of severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in palm civets at an animal market and on farms.
J Virol **79**, 11892–11900.
- KAO, R. Y., TSUI, W. H. W., LEE, T. S. W., TANNER, J. A., WATT, R. M., HUANG, J. D., HU, L., CHEN, G., CHEN, Z., ZHANG, L., HE, T., CHAN, K. H., TSE, H., TO, A. P. C., NG, L. W. Y., WONG, B. C. W., TSOI, H. W., YANG, D., HO, D. D., YUEN, K. Y. (2004)
Identification of novel small-molecule inhibitors of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus by chemical genetics.
Chem Biol **11**, 1293–1299.
- KLAUS, J. T., RASNICK, D., PALMER, J. T., KUO, E. Y.-L. (1996)
Preparation of ethylenediamine-derived reversible cysteine protease inhibitors.
PCT Int Appl WO 9640737, 79 pp.
- KLUMPERMAN, J., LOCKER, J. K., MEIJER, A., HORZINEK, M. C., GEUZE, H. J., ROTTIER, P. J. (1994)
Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding.
J Virol **68**, 6523–6534.
- KONNO, K., HIRAYAMA, C., NAKAMURA, M. (2004)
Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex.
Plant J **3**, 370–378.
- KOSSNER, M., LUDEWIG, S., DIETZEL, U., STEMPKA, M., SCHNEIDER, T., KISKER, C., SCHIRMEISTER, T., BAUMANN, K.
Hit validation of published SARS-CoV-M^{pro} inhibitors.
noch nicht eingereicht.
- KRAETZNER, R. (2001)
Dissertation: Strukturelle Untersuchungen an Varianten des Ecballium elaterium Trypsin Inhibitors-II (EETI-II).
- KSIAZEK, T. G., ERDMAN, D., GOLDSMITH, C. S., ZAKI, S. R., PERET, T., EMERY, S., TONG, S., URBANI, C., COMER, J. A., LIM, W., ROLLIN, P. E., DOWELL, S. F., LING, A. E., HUMPHREY, C. D., SHIEH, W. J., GUARNER, J., PADDOCK, C. D., ROTA, P., FIELDS, B., DERISI, J., YANG, J. Y., COX, N., HUGHES, J. M., LEDUC, J. W., BELLINI, W. J., ANDERSON, L. J. (2003)
A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome.
N Engl J Med **348**, 1953–1966.

- KUBA, K., IMAI, Y., OHTO-NAKANISHI, T., PENNINGER, J. M. (2010)
Trilogy of ACE2: a peptidase in the renin-angiotensin system, a SARS receptor, and a partner for amino acid transporters.
Pharmacol Ther **128**, 119–128.
- KUHN, J. H., LI, W., CHOE, H., FARZAN, M. (2004)
Angiotensin-converting enzyme 2: a functional receptor for SARS coronavirus.
Cell Mol Life Sci **61**, 2738–2743.
- KUIKEN, T., FOUCHIER, R. A., SCHUTTEN, M., RIMMELZWAAN, G. F., VAN AMERONGEN, G., VAN RIEL, D., LAMAN, J. D., DE JONG, T., VAN DOORNUM, G., LIM, W., LING, A. E., CHAN, P. K., TAM, J. S., ZAMBON, M. C., GOPAL, R., DROSTEN, C., VAN DER WERF, S., ESCRIOU, N., MANUGUERRA, J. C., STOHR, K., PEIRIS, J. S., OSTERHAUS, A. D. (2003)
Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome.
Lancet **362**, 263–270.
- LAEMMLI, U. K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature **227**, 680–685.
- LANGOLF, S., MACHON, U., SICKING, W., SCHIRMEISTER, T., BUECHOLD, C., GELHAUS, C., ROSENTHAL, P. J., SCHMUCK, C. (2011)
Development of novel antitrypanosomal and antiplasmodial nonpeptide cysteine protease inhibitors on the basis of N-protected guanidinium furan and pyrrole building blocks.
J Med Chem, eingereicht.
- LAWSON, M. A., SEMLER, B. L. (1990)
Picornavirus protein processing - enzymes, substrates and genetic regulation.
Curr Top Microbiol Immunol **161**, 49–87.
- LECAILLE, F., KALETA, J., BROEMME, D. (2002)
Human and parasitic papain-like cysteine proteases: Their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design.
Chem Rev **102**, 4459–4488.
- LEE, N., HUI, D., WU, A., CHAN, P., CAMERON, P., JOYNT, G. M., AHUJA, A., YUNG, M. Y., LEUNG, C. B., TO, K. F., LUI, S. F., SZETO, C. C., CHUNG, S., SUNG, J. J. (2003)
A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong.
N Engl J Med **348**, 1986–1994.
- LEONG, H. N., ANG, B., EARNEST, A., TEOH, C., XU, W., LEO, Y. S. (2004)
Investigational use of ribavirin in the treatment of severe acute respiratory syndrome.
Trop Med Int Health **9**, 923–927.
- LESLIE, A. G. W. (1992)
Joint CCP4 + ESF-EAMCB.
Newsletter on protein crystallography **26**.

- LEUNG-TOUNG, R., LI, W., TAM, T. F., KARIMIAN, K. (2002)
Thiol-dependent enzymes and their inhibitors: a review.
Curr Med Chem **9**, 979–1002.
- LI, W., MOORE M. J., VASILIEVA, N., SUI, J., WONG, S. K., BERNE, M. A.,
SOMASUNDARAN, M., SULLIVAN, J. L., LUZURIAGA, K., GREENOUGH, T. C.
(2003)
Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus.
Nature **426**, 450–454.
- LU, I. L., MAHINDROO, N., LIANG, P. H., PENG, Y. H., KUO, C. J., TSAI, K. C., HSIEH,
H. P., CHAO, Y. S., WU, S. Y. (2006)
Structure-based drug design and structural biology study of novel nonpeptide inhibitors of
severe acute respiratory syndrome main protease.
J Med Chem **49**, 5154–5161.
- LUDEWIG, S., KOSSNER, M., SCHILLER, M., BAUMANN, K., SCHIRMEISTER, T.
(2010)
Enzyme kinetics and hit validation in fluorimetric protease assays.
Curr Med Chem **10**, 368–382.
- MADAN, V., GARCIA, MDE J., SANZ, M. A., CARRASCO, L. (2005)
Viroporin activity of murine hepatitis virus E protein.
FEBS Lett **579**, 3607–3612.
- MCCOY, A. J., GROSSE-KUNSTLEVE, R. W., ADAMS, P. D., WINN, M. D., STORONI,
L. C., READ, R. J. (2007)
Phaser crystallographic software.
J Appl Cryst **40**, 658–674.
- MUKHERJEE, P., DESAI, P., ROSS, L., WHITE, E. L., AVERY, M. A. (2008)
Structure-based virtual screening against SARS-3CL(pro) to identify novel non-peptidic hits.
Bioorg Med Chem **16**, 4138–4149.
- MURSHUDOV, G. N., VAGIN, A. A., DODSON, E. J. (1997)
Refinement of macromolecular structures by the Maximum-Likelihood method.
Acta Cryst **53**, 240–255.
- NICHOLLS, J. M., POON, L. L., LEE, K. C., NG, W. F., LAI, S. T., LEUNG, C. Y., CHU,
C. M., HUI, P. K., MAK, K. L., LIM, W., YAN, K. W., CHAN, K. H., TSANG, N. C.,
GUAN, Y., YUEN, K. Y., PEIRIS, J. S. (2003)
Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome.
Lancet **361**, 1773–1778.
- OTTO, H., SCHIRMEISTER, T. (1997)
Cysteine proteases and their inhibitors.
Chem Rev **97**, 133–171.

- PAASCHE, A., SCHILLER, M., SCHIRMEISTER, T., ENGELS, B. (2010)
Mechanistic study of the reaction of thiol-containing enzymes with α,β -unsaturated carbonyl substrates by computation and chemoassays.
Chem Med Chem **5**, 869–880.
- PALMER, J. T., RASNICK, D., KLAUS, J. L. (1996)
Preparation of peptide analogues as reversible cysteine protease inhibitors.
PCT Int Appl WO **9630353**, 92 pp.
- PATTERSON, A. L. (1934)
A Fourier Series method for the determination of the components of interatomic distances in crystals.
Phys Rev **46**, 372–376.
- PEIRIS, J. S., YUEN, K. Y., OSTERHAUS, A. D., STOHR, K. (2003)
The severe acute respiratory syndrome.
N Engl J Med **349**, 2431–2441.
- PEIRIS, J. S., GUAN, Y., YUEN, K. Y. (2004)
The severe acute respiratory syndrome.
Nat Med **10**, 88–97.
- PLANT, E. P., DINMAN, J. D. (2008)
The role of programmed-1 ribosomal frameshifting in coronavirus propagation.
Frontiers in Bioscience **13**, 4873–4881.
- POWERS, J. C., ASGIAN, J. L., EKICI, O. D., JAMES, K. E. (2002)
Irreversible inhibitors of serine, cysteine and threonine proteases.
Chem Rev **102**, 4639–4750.
- PRINGLE, C. R. (1996)
Virus taxonomy 1996 - a bulletin from the Xth International Congress of Virology in Jerusalem.
Arch Virol **141**, 2251–2256.
- PUTICS, A. (2006)
Dissertation: Enzymatische Aktivitäten des coronaviralen nichtstrukturellen Proteins 3.
- RAWLINGS, N. D., BARRETT, A. J. (1993)
Evolutionary families of peptidases.
Biochem J **290**, 205–218.
- RAWLINGS, N. D., TOLLE, D. P., BARRETT, A. J. (2004)
MEROPS: the peptidase database.
Nucleic Acids Res **32**, 160–164.
- RISCO, C., MUNTION, M., ENJUANES, L., CARRASCOSA, J. L. (1998)
Two types of virus-related particles are found during transmissible gastroenteritis virus morphogenesis.
J Virol **72**, 4022–4031.

ROTA, P. A., OBERSTE, M. S., MONROE, S. S., NIX, W. A., CAMPAGNOLI, R., ICENOGLE, J. P., PENARANDA, S., BANKAMP, B., MAHER, K., CHEN, M. H., TONG, S., TAMIN, A., LOWE, L., FRACE, M., DERISI, J. L., CHEN, Q., WANG, D., ERDMAN, D. D., PERET, T. C. T., BURNS, C., KSIAZEK, T. G., ROLLIN, P. E., SANCHEZ, A., LIFFICK, S., HOLLOWAY, B., LIMOR, J., MCCAUSTLAND, K., OLSEN-RASMUSSEN, M., FOUCHIER, R., GUENTHER, S., OSTERHAUS, A. D. M. E., DROSTEN, C., PALLANSCH, M. A., ANDERSON, L. J., BELLINI, W. J. (2003)
Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome.
Science **300**, 1394–1398.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E., MANIATIS, T. (1989)
Molecular Cloning - A laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SAMBROOK, J., MANIATIS, T., RUSSEL, D. W. (2001)
Molecular Cloning - A laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SCHECHTER, I., BERGER, A. (1967)
On the size of the active site in proteases. I. Papain.
Biochem Biophys Res Commun **27**, 157–162.

SHELLE, B., KARL, N., LUDEWIG, B., SIDDELL, S. G., THIEL, V. (2005)
Selective replication of coronavirus genomes that express nucleocapsid protein.
J Virol **79**, 6620–6630.

SCHULTZE, B., KREMPL, C., BALLESTEROS, M. L., 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.

SELVAM, P., MURGESH, N., CHANDRAMOHAN, M., DE CLERCQ, E., KEYAERTS, E., VIJGEN, L., MAES, P., NEYTS, J., RANST, M. V. (2008)
In vitro antiviral activity of some novel isatin derivatives against HCV and SARS-CoV viruses.
J Pharm Sci **70**, 91–94.

SHIE, J. J., FANG, J. M., KUO, C. J., KUO, T. H., LIANG, P. H., HUANG, H. J., YANG, W. B., LIN, C. H., CHEN, J. L., WU, Y. T., WONG, C. H. (2005)
Discovery of potent anilide inhibitors against the severe acute respiratory syndrome 3CL protease.
J Med Chem **48**, 4469–4473.

SIDDELL, S. (1995)
The Coronaviridae.
New York: Plenum Press

- SITTIDILOKRATNA, N., HODGSON, R. A., COWLEY, J. A., JITRAPAKDEE, S., BOONSAENG, V., PANYIM, S., WALKER, P. J. (2002)
Complete ORF1b-gene sequence indicates yellow head virus is an invertebrate nidovirus.
Dis Aquat Organ **50**, 87–93.
- SNIJDER E. J., BREDENBEEK, P. J., DOBBE, J. C., THIEL, V., ZIEBUHR, J., POON, L. L. M., GUAN, Y., ROZANOV, M., SPAAN, W. J. M., GORBALENYA, A. E. (2003)
Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage.
J Mol Biol **331**, 991–1004.
- SONG, H. D., TU, C. C., ZHANG, G. W., WANG, S. Y., ZHENG, K., LEI, L. C., CHEN, Q. X., GAO, Y. W., ZHOU, H. Q., XIANG, H., ZHENG, H. J., CHERN, S. W., CHENG, F., PAN, C. M., XUAN, H., CHEN, S. J., LUO, H. M., ZHOU, D. H., LIU, Y. F., HE, J. F., QIN, P. Z., LI, L. H., REN, Y. Q., LIANG, W. J., YU, Y. D., ANDERSON, L., WANG, M., XU, R. H., WU, X. W., ZHENG, H. Y., CHEN, J. D., LIANG, G., GAO, Y., LIAO, M., FANG, L., JIANG, L. Y., LI, H., CHEN, F., DI, B., HE, L. J., LIN, J. Y., TONG, S., KONG, X., DU, L., HAO, P., TANG, H., BERNINI, A., YU, X. J., SPIGA, O., GUO, Z. M., PAN, H. Y., HE, W. Z., MANUGUERRA, J. C., FONTANET, A., DANCHIN, A., NICCOLAI, N., LI, Y. X., WU, C. I., ZHAO, G. P. (2005)
Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human.
Proc Natl Acad Sci USA **102**, 2430–2435.
- SUMNER, J. B. (1926)
The isolation and crystallization of the enzyme urease.
Biol Chem **69**, 435–441.
- TAN, J., VERSCHUEREN, K. H. G., ANAND, K., SHEN, J., YANG, M., XU, Y., RAO, Z., BIGALKE, J., HEISEN, B., MESTERS, J. R., CHEN, K., SHEN, X., JIANG, H., HILGENFELD, R. (2005)
pH-dependent conformational flexibility of the SARS-CoV main proteinase (M^{pro}) dimer: Molecular dynamics simulations and multiple x-ray structure analyses.
J Mol Biol **354**, 25–40.
- THIEL, V., IVANOV, K. A., PUTICS, A., HERTZIG, T., SCHELLE, B., BAYER, S., WEISSBRICH, B., SNIJDER, E. J., RABENAU, H., DOERR, H. W., GORBALENYA, A. E., ZIEBUHR, J. (2003)
Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression.
J Gen Virol **84**, 2305–2315.
- TONG, S., CONRARDY, C., RUONE, S., KUZMIN, I. V., GUO, X., TAO, Y., NIEZGODA, M., HAYNES, L., AGWANDA, B., BREIMAN, R. F., ANDERSON, L. J., RUPPRECHT, E. (2009).
Detection of novel SARS-like and other coronaviruses in bats from Kenya.
Emerging Infectious Diseases **15**, 482–485.
- TOOZE, J., TOOZE, S. A., WARREN, G. (1984)
Replication of coronavirus MHV-A59 in sac-cells: determination of the first site of budding of progeny virions.
Eur J Cell Biol **33**, 281–293.

- TOOZE, J., TOOZE, S. A., FULLER, S. D. (1987)
Sorting of progeny coronavirus from condensed secretory proteins at the exit from the trans-Golgi network of AtT20 cells.
J Cell Biol **105**, 1215–1226.
- TURK, B., DOLENC, I., TURK, V., BIETH, J. G. (1993)
Kinetics of the pH-induced inactivation of human cathepsin L.
Biochemistry **32**, 375–380.
- TURK, B., TURK, D., TURK, V. (2000)
Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers.
Biochem Biophys Acta, Prot. struct. mol. enzymol. **1477**, 98–111.
- TURK, D., GUNCAR, G. (2003)
Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets.
Acta Cryst **59**, 203–213.
- TYRRELL, D. A., BYNOE, M. L. (1965)
Cultivation of a novel type of common-cold virus in organ cultures.
Br Med J **5448**, 1467–1470.
- WEBBER, S. E., TIKHE, J., WORLAND, S. T., FUHRMAN, S. A., HENDRICKSON, T. F., MATTHEWS, D. A., LOVE, R. A., PATICK, A. K., MEADOR, J. W., FERRE, R. A., BROWN, E. L., DELISLE, D. M., FORD, C. E., BINFORD, S. L. (1996)
Design, synthesis and evaluation of nonpeptidic inhibitors of human rhinovirus 3C protease.
J Med Chem **39**, 5072–5082.
- WEN, C. C., KUO, Y. H., JAN, J. T., LIANG, P. H., WANG, S. Y., LIU, H. G., C. K., LEE, CHANG, S. T., KUO, C. J., LEE, S. S., HOU, C. C., HSIAO, P. W., S. C., CHIEN, SHYUR, L. F., YANG, N. S. (2007)
Specific plant terpenoids and lignoids possess potent antiviral activities against severe acute respiratory syndrome coronavirus.
J Med Chem **50**, 4087–4095.
- WILLIAMS, R. K., JIANG, G. S., HOLMES, K. V. (1991)
Receptor for mouse hepatitis virus is a member of the carcinoembryonic antigen family of glycoproteins.
Proc Natl Acad Sci USA **88**, 5533–5536.
- XU, T., OOI, A., LEE, H. C., WILMOUTH, R., LIU, D. X., LESCAR, J. (2005)
Structure of the SARS coronavirus main proteinase as an active C₂ crystallographic dimer.
Acta Cryst **61**, 964–966.
- YANG, Q., CHEN, L., HE, X., GAO, Z., SHEN, X., BAI, D. (2008)
Design and synthesis of cinanserin analogs as severe acute respiratory syndrome coronavirus 3C-like-protease inhibitors.
Chem Pharm Bull **56**, 1400–1405.

YANG, H. T., YANG, M. J., DING, Y., LIU, Y. W., LOU, Z. Y., ZHOU, Z., SUN, L., MO, L. J., YE, S., PANG, H., GAO, G. F., ANAND, K., BARTLAM, M., HILGENFELD, R., RAO, Z. H. (2003)

The crystal structures of severe acute respiratory syndrome virus main protease and its complex with an inhibitor.

Proc Natl Acad Sci USA **100**, 13190–13195.

YEAGER, C. L., ASHMUN, R. A., WILLIAMS, R. K., CARDELLICHIO, C. B., SHAPIRO, L. H., LOOK, A. T., HOLMES, K. V. (1992)

Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E.

Nature **357**, 420–422.

ZHOU, L., LIU, Y., ZHANG, W., WEI, P., HUANG, C., PEI, J., YUAN, Y., LAI, L. (2006)

Isatin compounds as noncovalent SARS coronavirus 3C-like protease inhibitors.

J Med Chem **49**, 3440–3443.

ZIEBUHR, J., SIDDELL, S. G. (1999)

Processing of the human coronavirus 229E replicase polyproteins by the virus-encoded 3C-like-protease: identification of proteolytic products and cleavage sites common to pp1a and pp1ab.

J Virol **73**, 177–185.

ZIEBUHR, J., SNIJDER, E. J., GORBALENYA, A. E. (2000)

Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales.

J Gen Virol **81**, 853–879.

ZIEBUHR, J., THIEL, V., GORBALENYA, A. E. (2001)

The autocatalytic release of a putative RNA virus transcription factor from its polyprotein precursor involves two paralogous papain-like proteases that cleave the same peptide bond.

J Biol Chem **276**, 33220–33232.

ZIEBUHR, J. (2003)

SARS – unprecedented global response to a newly emerging disease.

Int J Med Microbiol **293**, 229–231.

ZIEBUHR, J. (2005)

The coronavirus replicase.

Curr Top Microbiol Immunol **287**, 57–94.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis und Einheiten

Å	Ångström ($\equiv 0,1 \text{ nm}$)
AcOH	Essigsäure
a.I.	<i>absolute intensity</i>
Ala / A	Alanin
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
bp	<i>base pairs</i>
BrCN	Bromcyan
CCD	<i>charge coupled devices</i>
Cys	Cystein
dH ₂ O	demineralisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dsDNA	<i>double-stranded deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FPLC	<i>fast-performance liquid chromatography</i>
Gln / Q	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly / G	Glycin
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
KCl	Kaliumchlorid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	<i>lysogeny broth</i>
Leu / L	Leucin
mAU	<i>milli absorption units</i>
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption/ionization</i>
MD	<i>molecular dynamics</i>
MeOH	Methanol
MEROPS	Proteasendatenbank
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
Met	Methionin
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
mRNA	<i>messenger RNA</i>

8 Anhang

MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
m/z	Masse/Ladung
NaCl	Natriumchlorid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NTA	<i>nitrilotriacetic acid</i>
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
pdb	<i>protein data bank</i>
PEG	Polyethylenglykol
PES	Polyethersulfon
Phe	Phenylalanin
Pro / P	Prolin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rmsd	<i>root mean square deviation</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
Ser	Serin
SOB	<i>super optimal broth</i>
SOC	SOB-Medium mit 20 mM Glucose
ssRNA	<i>single-stranded ribonucleic acid</i>
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)-phosphin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
Thr / T	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
UV/Vis	<i>ultraviolet/visible</i>
Val	Valin
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
σ	Sigma \equiv Maß für die Intensität der Elektronendichte

8.2 Proteinmarker

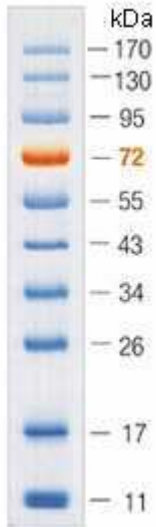


Abb. 8.1: Proteinmarker Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (Referenz: Fermentas).

8.3 Vektorkarte

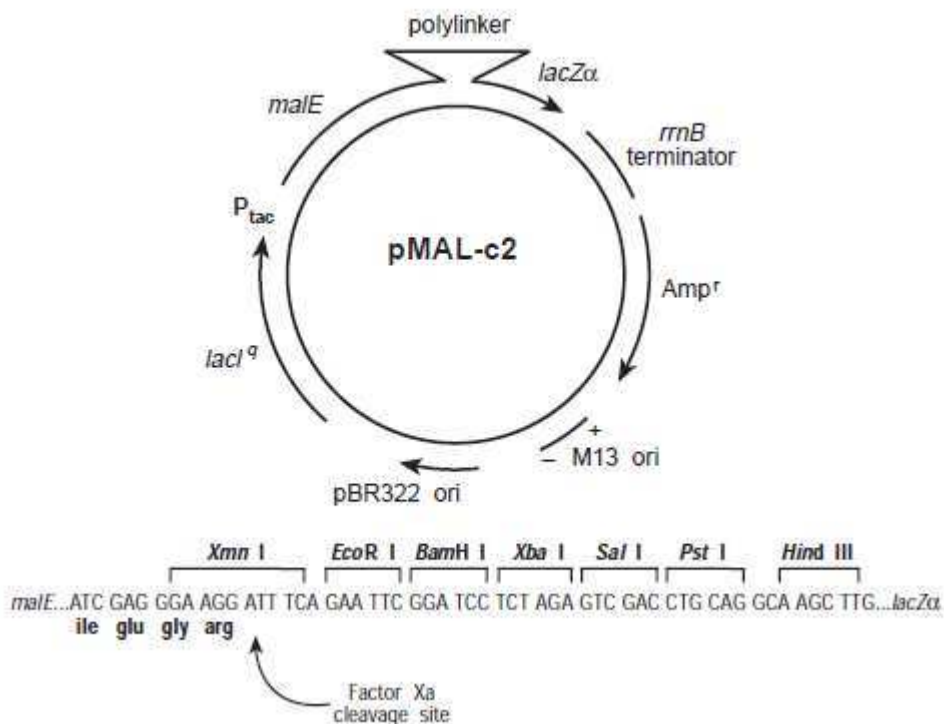
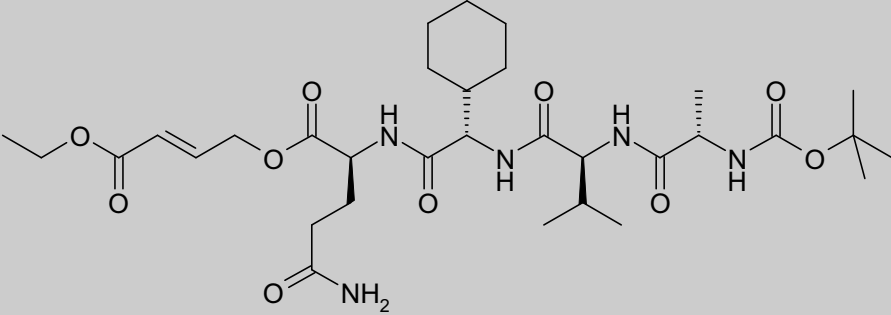
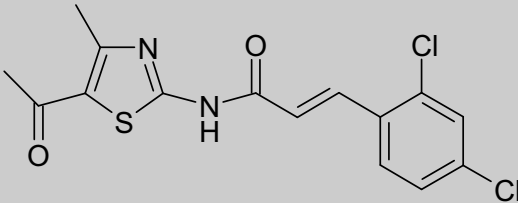
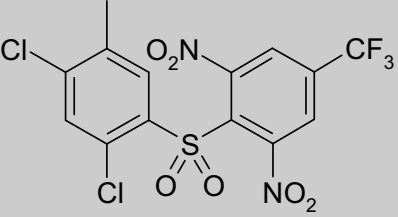
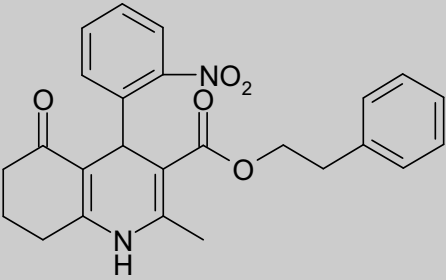
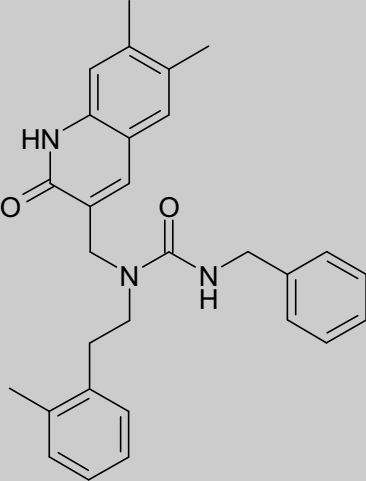
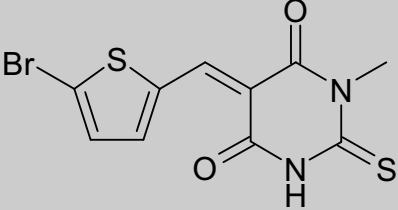
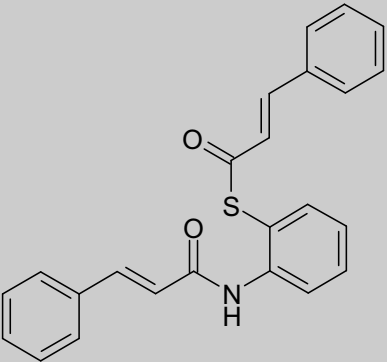
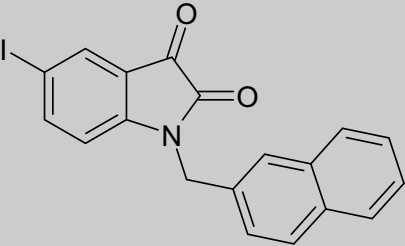
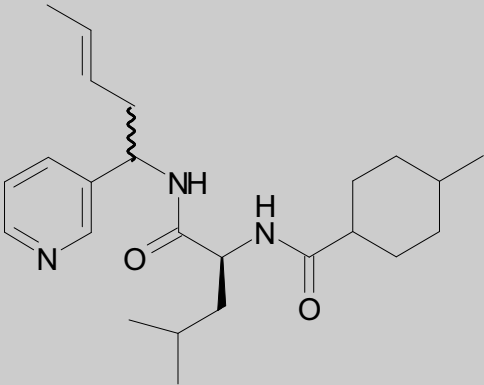
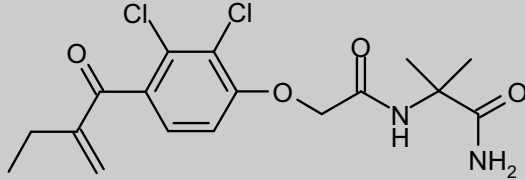
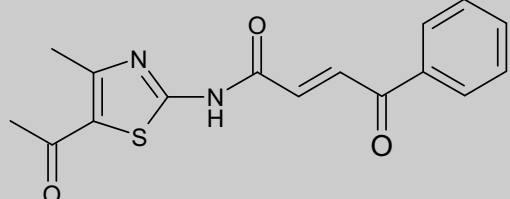


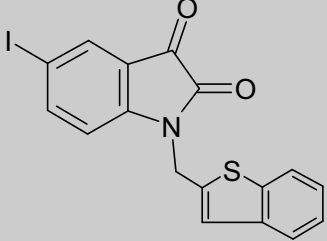
Abb. 8.2: Vektorkarte des pMal-c2-Vektors (6646 bp) (Referenz: New England Biolabs).

Insert: kodierende Sequenz der AS Ser3236 bis AS Thr3544 des pp1a/pp1b des SARS-CoV (strain Frankfurt 1); kloniert in die Xmn I site des Plasmids und mit 6 His-Codons sowie einem Translationsstopcodon.

8.4 Inhibitorenliste

Inhibitor	Strukturformel (Referenz)
AB69	 <p data-bbox="1043 748 1362 779">(Dipl.-Chem. A. Breuning)</p>
YQ28	 <p data-bbox="1123 972 1362 1003">(Dipl.-Chem. Q. Ye)</p>
Lit1	 <p data-bbox="1219 1218 1362 1249">(Maybridge)</p>
Lit8	 <p data-bbox="1155 1523 1362 1554">(Kao <i>et al.</i>, 2004)</p>
Lit10	 <p data-bbox="1075 2033 1362 2065">(Mukherjee <i>et al.</i>, 2008)</p>

T1	 <p>(Specs (AM-879/40861505))</p>
TS48	 <p>(Yang <i>et al.</i>, 2008) (synthetisiert von Dipl.-Chem. T. Schneider)</p>
TS96	 <p>(Dipl.-Chem. T. Schneider)</p>
TS174	 <p>(Dipl.-Chem. T. Schneider)</p>
UK-VI-1g	 <p>(Dr. U. Kappler)</p>
MH211A	 <p>(Dipl.-Chem. M. Herb)</p>

IISBT	 <p>(Chen <i>et al.</i>, 2005) (synthetisiert von Dipl.-Chem. T. Schneider und Apothekerin S. Ludewig)</p>
--------------	---

9 Veröffentlichungen

Posterpräsentationen:

SCHILLER, M., STEMPKA, M., YE, Q., KOSSNER, M., BAUMANN, K., ZIEBUHR, J., SCHIRMEISTER, T. (2007)

Antiviral activity of SARS coronavirus main protease inhibitors.

5th General Meeting of the International Proteolysis Society, Patras, Greece.

SCHILLER, M., STEMPKA, M., YE, Q., KOSSNER, M., BAUMANN, K., ZIEBUHR, J., SCHIRMEISTER, T. (2007)

Antiviral activity of SARS coronavirus main protease inhibitors.

Chem-SyStM (Chemie-Symposium der Studierenden Mainfrankens), Würzburg.

STEMPKA, M., DIETZEL, U., KUPER, J., YE, Q., SCHNEIDER, T., KAEPLER, U., SCHMITZ, W., ZIEBUHR, J., SCHIRMEISTER, T., KISKER, C. (2009)

Expression and purification of the SARS coronavirus main protease and its co-crystallization with specific inhibitors.

5th Joint Ph.D Students Meeting of the Collaborative Research Centers SFB 630, 544, Heidelberg.

DIETZEL, U., STEMPKA, M., SCHIRMEISTER, T., KISKER, C. (2010)

Structure based drug design on cysteine proteases from *Trypanosoma brucei* and SARS coronavirus.

6th Joint Ph.D Students Meeting of the Collaborative Research Centers SFB 630, 544 and 766, Ellwangen.

Publikationen:

MACHON, U., BUECHOLD, C., STEMPKA, M., SCHIRMEISTER, T., GELHAUS, C., LEIPPE, M., GUT, J., ROSENTHAL, P. J., KISKER, C., LEYH, M., SCHMUCK, C. (2009)

On-bead screening of a combinatorial fumaric acid derived peptide library yields antiplasmodial cysteine protease inhibitors with unusual peptide sequences.

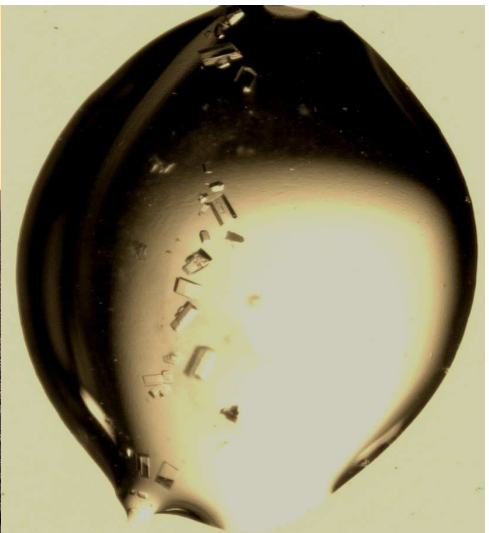
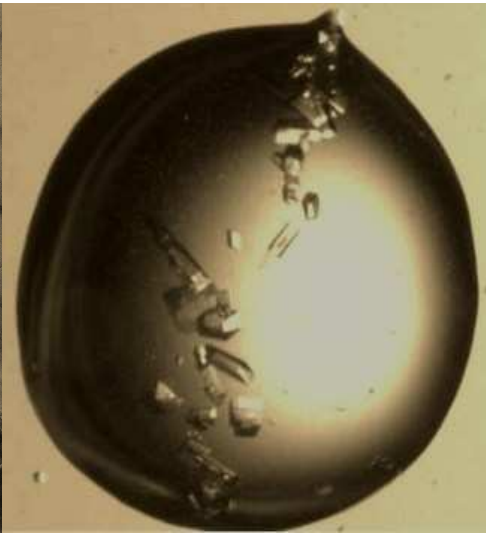
J Med Chem **52**, 5662–5672.

BREUNING, A., DEGEL, B., SCHULZ, F., BUECHOLD, C., STEMPKA, M., MACHON, U., HEPPNER, S., GELHAUS, C., LEIPPE, M., LEYH, M., KISKER, C., RATH, J., STICH, A., GUT, J., ROSENTHAL, P. J., SCHMUCK, C., SCHIRMEISTER, T. (2010)

Michael acceptor based antiplasmodial and antitrypanosomal cysteine protease inhibitors with unusual amino acids.

J Med Chem **53**, 1951–1963.

Außerordentliche Danksagungen



(nach: <https://reich-chemistry.wikispaces.com/Fall.2008.MMA.Rowe.Timeline>)