

**Enzymatische Aktivitäten des coronaviralen  
nichtstrukturellen Proteins 3**

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

vorgelegt von  
Ákos Putics  
aus Pécs, Ungarn

Würzburg, 2006

**Eingereicht am:**

\_\_\_\_\_

**Mitglieder der Promotionskommission:**

Vorsitzender:

Prof. Dr. Martin J. Müller

Gutachter:

Prof. Dr. Volker ter Meulen

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Jörg Hacker

**Tag des Promotionskolloquiums:**

\_\_\_\_\_

**Doktorurkunde ausgehändigt am:**

\_\_\_\_\_

## **Erklärung**

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

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

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

Würzburg, den 03.03.2006

---

Ákos Putics

# Danksagung

Herrn Prof. Dr. Volker ter Meulen möchte ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg und die Betreuung der Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Jörg Hacker gilt mein Dank für die Betreuung seitens der Biologischen Fakultät der Universität Würzburg.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Prof. Dr. John Ziebuhr für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können, für die vielen Diskussionen und guten Ratschläge, mit denen er mich während dieser Zeit unterstützt hat, nicht nur hinsichtlich der wissenschaftlichen Arbeit im Labor selbst, sondern auch bei der Präsentation meiner Forschungsergebnisse auf Symposien und Kongressen. Darüber hinaus bedanke ich mich für die sehr angenehme und motivierende Arbeitsatmosphäre im Labor.

Bei den Sprechern, Prof. Dr. Joachim Morschhäuser und Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Jörg Hacker, und allen Mitgliedern des Europäischen Graduiertenkollegs 587/2 "Gene Regulation in and by Microbial Pathogens" bedanke ich mich ganz herzlich. Die vielfältigen wissenschaftlichen Veranstaltungen und die freundschaftliche Atmosphäre im Graduiertenkolleg haben meine Arbeit vielfältig stimuliert und darüber hinaus Einblicke in spannende Forschungsfelder und Methoden der molekularen Mikrobiologie gewährt, die mein Verständnis für die infektiologische Forschung (auch außerhalb der Virologie) maßgeblich erweitert haben.

Prof. Dr. Witold Filipowicz (Friedrich-Miescher-Institut für biomedizinische Forschung, Basel, Schweiz) und Dr. Jonathan Hall (Novartis Pharma AG, Institut für biomedizinische Forschung, Basel, Schweiz) danke ich für die Bereitstellung des in den enzymologischen Untersuchungen verwendeten Substrates ADP-Ribose-1",2"-Zyklophosphat.

Herrn Dr. Volker Thiel und Herrn Prof. Dr. Stuart G. Siddell danke ich für den rekombinanten Vacciniavirusklon vHCoV-inf-1.

Ein herzliches Dankeschön geht an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Ziebuhr für die sehr freundliche Aufnahme in Deutschland, für das angenehme Arbeitsklima und für die Bereitschaft zusammenzuarbeiten, zu diskutieren und zu feiern. Ganz besonders bedanke ich mich bei Barbara Schelle und Sonja Bayer, die mir immer freundschaftlich zur Seite standen.

Katharina Hermann, Elisabeth van Elten und ganz besonders Jutta Slaby gilt mein Dank für die große Hilfe beim Bewältigen der während des Zusammenschreibens auftretenden Schwierigkeiten mit der deutschen Grammatik.

Bei allen meinen Freunden in Würzburg -ganz besonders bei Gabi, die mir auch in schwierigen Zeiten zur Seite stand- möchte ich mich für die unvergessliche Zeit in Würzburg bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner ganzen Familie, die immer für mich da sind.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Taxonomie .....	1
1.2 Struktur von Coronaviren .....	4
1.3 Coronavirusinfektionen .....	6
1.4 Organisation, Replikation und Transkription des coronaviralen Genoms.....	9
1.5 Das coronavirale Replikasegen.....	13
1.6 Das coronavirale nichtstrukturelle Protein 3.....	18
1.6.1 Domänenorganisation des coronaviralen nichtstrukturellen Proteins 3 (nsp3) .	18
1.6.2 Papain-ähnliche Proteasen .....	19
1.6.3 Die X-Domäne .....	24
1.6.4 Die Y-Domäne .....	26
<b>2. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse</b> .....	<b>28</b>
2.1 Die PL1 <sup>pro</sup> -katalysierte proteolytische Prozessierung des nichtstrukturellen Proteins 3 von TGEV und SARS-CoV .....	28
2.1.1 Die Aktivität und Substratspezifität der PL1 <sup>pro</sup> von TGEV .....	28
2.1.2 Identifizierung des nichtstrukturellen Proteins 2 (nsp2) in TGEV infizierten Zellen .....	30
2.1.3 Identifizierung der PL2 pro-Aktivität von SARS-CoV .....	32
2.2 Die coronavirale X-Domäne ist eine Appr-1"-pase-, die für die Virusreplikation in Zellkultur entbehrlich ist.....	36
2.2.1 Die konservierte X-Domäne in nsp3 von HCoV-229E ist eine hochspezifische Phosphatase, die Appr-1''-p in Appr umsetzt.....	36
2.2.2 Die Appr-1"-pase-Aktivität der coronaviralen X-Domäne ist konserviert: Identifizierung der Appr-1"-pase-Aktivität bei TGEV und SARS-CoV .....	39
2.2.3 Mutationsanalyse der HCoV-229E-X-Domäne .....	41
2.2.4 Die Appr-1"-pase-Aktivität ist für die Replikation und Transkription von HCoV-229E in Zellkultur entbehrlich .....	44
<b>3. Zusammenfassung</b> .....	<b>51</b>
<b>4. Summary</b> .....	<b>54</b>
<b>5. Literatur</b> .....	<b>56</b>
<b>6. Abkürzungen</b> .....	<b>68</b>
<b>7. Lebenslauf</b> .....	<b>70</b>
<b>8. Veröffentlichungen</b> .....	<b>71</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Taxonomie

Coronaviren wurden zum ersten Mal im Jahre 1937 von Beaudette und Hudson aus Hühnern isoliert (Beaudette & Hudson, 1937). Im Jahre 1965 wurden die ersten humanen Coronaviren von Tyrrell et al. entdeckt, die das Virus erstmals *in vitro* in einer Kultur von Flimmerepithelien humaner embryonaler Trachea kultivieren konnten (Tyrrell & Bynoe, 1965). Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Virionenstruktur zeigten, dass die Viruspartikel 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 erschienen (Almeida & Tyrrell, 1967, Berry et al., 1964). Aufgrund dieser morphologischen Eigenschaften, die sich deutlich von denen der damals bekannten Viren unterscheiden, wurden sie als eine neue Virusfamilie, die *Coronaviridae*, klassifiziert (Almeida et al., 1968). Spätere genetische Analysen des Virusgenoms bzw. des Replikationsmechanismus bestätigten diese frühere, auf morphologischen Kriterien basierende Abgrenzung der Coronaviren als eigenständige Familie. Die Familie der *Coronaviridae* besteht derzeit aus zwei Gattungen: *Coronavirus* und *Torovirus*. Im Jahre 1996 wurde durch das *International Committee for the Taxonomy of Viruses* die Familie *Coronaviridae* mit der Familie *Arteriviridae* unter einer neugeschaffenen Ordnung zusammengefasst, den *Nidovirales* (Cavanagh, 1997, Pringle, 1996). Nach der Entdeckung von Okaviren (Vetreter: *Gill-associated virus* und *Yellow head virus*) wurde die Ordnung um eine weitere (neugeschaffene) Familie, die *Roniviridae*, erweitert (Cowley et al., 2000, Sittidilokratna et al., 2002). Obwohl sich die Viren der Ordnung *Nidovirales* in ihrer Genomgröße und Virionmorphologie deutlich unterscheiden, sind ihre Genomorganisation bzw. Replikationsstrategie in vielen Aspekten ähnlich (de Vries, 1997). Das Hauptmerkmal, auf das auch der Name der Ordnung hindeutet, ist, dass alle Nidoviren in den infizierten Wirtszellen einen charakteristischen Satz von 3'-koterminalen, subgenomischen mRNAs synthetisieren,

der auch als *nested set* bezeichnet wird. Die Tabelle 1. fasst die taxonomische Einordnung der bisher bekannten Nidoviren sowie ihre Wirte zusammen.

Aufgrund serologischer Kreuzreaktivitäten und phylogenetischer Untersuchungen wurde die Familie der *Coronaviridae* in drei Gruppen (I bis III) eingeteilt (Cavanagh, 1997). Nach weiteren serologischen Untersuchungen bzw. computergestützten Sequenzanalysen coronaviraler Genome wurde die Gruppe I in zwei Untergruppen (Gruppe Ia und Ib) eingeteilt. Zur Untergruppe Ia gehört beispielsweise das *transmissible gastroenteritis virus* (TGEV), während das *Porcine epidemic diarrhea virus* (PEDV) und das Humane Coronavirus 229E (HCoV-229E) der Untergruppe Ib angehören (Gonzalez et al., 2003). Nach der Entdeckung des Virus des schweren akuten respiratorischen Syndroms (SARS-CoV) wurde die Gruppe II ebenfalls in zwei Untergruppen (IIa und IIb) geteilt. Die zuvor zur Gruppe II gehörenden Coronaviren wurden in der Untergruppe IIa zusammengefasst, während SARS-CoV, welches sich relativ früh im Laufe der Evolution von den anderen Vertretern der Gruppe II abzweigt hat, der Untergruppe IIb zugeordnet wurde (Gorbalenya et al., 2004, Snijder et al., 2003).

Nidoviren sind in der Natur weit verbreitet. Die Wirtsorganismen der zur Zeit bekannten Arteri-, Toro- und Coronaviren stammen aus höheren Klassen der Vertebraten, wie Säugetiere und Vögel, während die zur Zeit bekannten Viren aus der Familie der *Roniviridae* Arthropoden infizieren. Die Entdeckung eines neuen Coronavirus, das vor kurzem aus *Blicca bjoerkna* (Güster) isoliert wurde, erweiterte das Wirtsspektrum von Nidoviren auch auf Fische (Granzow et al., 2001). Das breite Wirtsspektrum und die genetische Vielfalt von Nidoviren deutet darauf hin, dass die für Nidoviren spezifische Genomorganisation und Replikationsstrategie (siehe unten) kein evolutionärer Sonderfall sind, sondern Charakteristika einer weitverbreiteten Gruppe von Viren mit außergewöhnlich großen RNA-Genomen darstellen. Die folgenden Abschnitte der Einleitung konzentrieren sich auf die Vorstellung der *Coronaviridae*, vor allem auf die des humanen Coronavirus 229E, des SARS-Coronavirus und des Virus der transmissiblen Gastroenteritis, welche als Modelle für die in dieser Arbeit zusammengefassten Studien coronaviraler Enzymaktivitäten dienen.



**Tabelle 1:** Die Ordnung *Nidovirales*

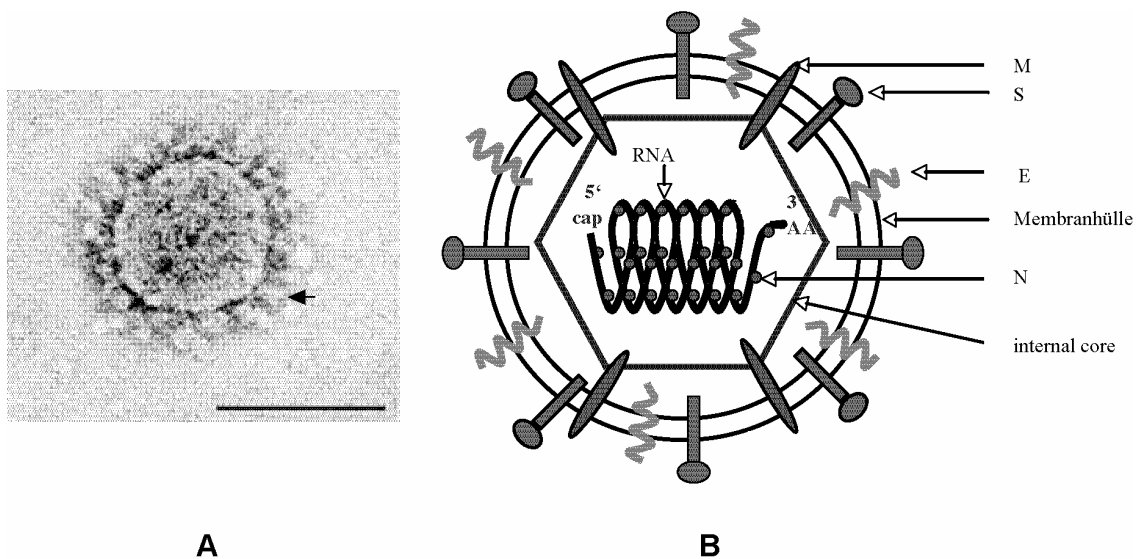
<b>Familie</b>	<b>Gattung</b>	<b>Spezies (engl.)</b>	<b>Wirt</b>
<i>Arteriviridae</i>	<i>Arterivirus</i>	<i>Equine arteritis virus</i> (EAV)	Pferd
		<i>Lactate dehydrogenase-elevating virus</i> (LDV)	Schwein
		<i>Porcine respiratory and reproductive syndrome virus</i> (PRRSV)	Schwein
		<i>Simian hemorrhagic fever virus</i> (SHFV)	Affe
<i>Coronaviridae</i>	<i>Coronavirus</i>	<b>Gruppe I</b>	
		<b>Ia</b>	
		<i>Transmissible gastroenteritis virus</i> (TGEV)	Schwein
		<i>Canine coronavirus</i> (CCV)	Hund
		<i>Feline coronavirus/ Feline infectious peritonitis virus</i> (FIPV)	Katze
		<b>Ib</b>	
		<i>Human coronavirus 229E</i> (HCoV-229E)	Mensch
		<i>Porcine epidemic diarrhea virus</i> (PEDV)	Schwein
		<i>Human Coronavirus NL63</i> (HCoV-NL63)	Mensch
		<b>Gruppe II</b>	
		<b>IIa</b>	
		<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		
<b>IIb</b>			
<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus</i> (SARS-CoV)	Mensch		
<b>Gruppe III</b>			
<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 Struktur von Coronaviren

Coronaviren sind kugelförmige, pleomorphe Virionen mit einem Durchmesser von 100-120 nm. Sie verfügen über ein 27-32 kb großes, einzelsträngiges RNA-Genom positiver Polarität, das zur Zeit das größte bekannte virale RNA Genom ist. Die virale RNA bildet mit dem Nukleokapsidprotein (N-Protein) ein helikales Nukleokapsid.

Das N-Protein ist ein Phosphoprotein von 50-60 kD Größe. Immer mehr Untersuchungen deuten darauf hin, dass das N-Protein neben seiner Funktion als Strukturprotein zusätzlich eine wichtige Rolle in der viralen RNA-Synthese spielt (Almazan et al., 2004, Schelle et al., 2005). Das Nukleokapsid ist von einer Membranhülle (engl.: *envelope*) umgeben, die von der Wirtszelle bereitgestellt wird und in die mindestens drei Proteine, das Membranprotein (M-Protein), das Hüllprotein (engl.: *envelope protein*, E-Protein) und das Oberflächenglykoprotein (engl.: *spike protein*, S-Protein), eingelagert werden. Das M-Protein ist etwa 20-30 kD groß. Sein aminoterminal Ende ist durch O-Glykosylierung von Serin- bzw. Threonin-Seitenketten modifiziert, während das carboxyterminale Ende mit dem N-Protein interagiert, wodurch das Nukleokapsid an der Innenseite der Virushülle verankert wird (Holmes, 2001). Das E-Protein (9-12 kD) 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). In jüngster Zeit wird auch eine mögliche Funktion als Viroporin diskutiert (Madan et al., 2005).

S-Proteine ragen als keulenförmiges Trimer etwa 20 nm aus der Membranoberfläche heraus, weshalb die Viruspartikel auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen wie von einer Corona umgeben erscheinen (Abb. 1). Das S-Protein ist nicht nur in der Membranhülle der Virionen vorhanden, sondern wird auch an die Oberfläche der Wirtszelle transportiert. Es ist ein multifunktionelles Protein, das für die Bindung an Virusrezeptoren verantwortlich ist, die Bildung von neutralisierenden Antikörpern induziert und die Fusion von Virus- und Zellmembranen bzw. Zellmembranen untereinander vermittelt, welches zur Ausbildung großer Zellsynzytien führen kann (Compton et al., 1993).



**Abb. 1: Struktur von Coronavirionen.** (A) Elektromikroskopische Aufnahme (Negativfärbung) einer SARS-CoV-Partikel. Der Pfeil zeigt die sogenannte Krone ("corona"), die auf der Virion-Oberfläche von S-Protein-Molekülen gebildet wird. Die schwarze Linie entspricht 100 nm. (Ksiazek et al., 2003) (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.

Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen kann auf der Virionoberfläche mancher Coronaviren, wie zum Beispiel HCoV-OC43 und BCoV) eine zusätzliche Proteinschicht beobachtet werden (Kjeldsberg, 1984, Zhang et al., 1994). Diese besteht aus einem nur bei einigen Coronaviren der Gruppe II vorhandenen Hüllmembran-Protein namens Hämagglutinin (HE), welches mit dem HE-Protein des Influenzavirus C verwandt ist und, wie auch aus seinem Namen ersichtlich ist, Erythrozyten agglutinieren kann. Das Protein ist etwa 65 kD groß und bildet ein Dimer (Holmes, 2001). Darüber hinaus wurde durch elektronenmikroskopische Untersuchungen der Viruspartikel von TGEV und MHV eine zusätzliche sphärische Proteinhülle (engl.: *core shell*) innerhalb der Hüllmembran nachgewiesen, die das Nukleokapsid der Coronaviren umschließt und aus N- und M-Proteinen besteht (Risco et al., 1996).

### 1.3 Coronavirusinfektionen

Coronaviren vermehren sich zumeist in respiratorischen bzw. gastrointestinalen Epithelien und können somit Atemwegserkrankungen und Enteritiden hervorrufen. Sie sind darüber hinaus als Verursacher weiterer Erkrankungen bei verschiedenen Tierarten bekannt, z. B. Hepatitis und Enzephalomyelitis (MHV), Nephritis (IBV) oder Peritonitis (FIPV). Gegenwärtig sind fünf humane Coronaviren beschrieben (HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, SARS-CoV und HCoV-HKU1).

HCoV-229E infiziert hauptsächlich die respiratorischen Epithelzellen der oberen Atemwege, wodurch eine typische Erkältungssymptomatik mit Husten und Schnupfen ausgelöst werden kann (Tyrrell et al., 1979). In manchen epidemiologischen Studien wird HCoV-229E für ein Drittel aller akuten viralen Atemwegserkrankungen verantwortlich gemacht (Monto & Lim, 1974, Pitkaranta et al., 1998). Die Erkrankung beginnt nach einer Inkubationszeit von ca. 2-4 Tagen und verläuft in der Regel komplikationsarm. Typische Symptome sind Unwohlsein, Kopf- und Halsschmerzen, Schüttelfrost, Husten oder Fieber (Bradburne et al., 1967). In manchen Fällen, insbesondere bei Kindern, wurden jedoch auch Komplikationen, wie eine Beteiligung des unteren Respirationstraktes (Bronchiolitis, Pneumonie) beschrieben (McIntosh et al., 1974, Myint, 1995).

HCoV-NL63 wurde erst im Jahre 2004 von van der Hoek *et al.* durch die Anwendung einer neuartigen Methode zur Virusidentifikation (VIDISCA: *virus-discovery-cDNA with amplified restriction fragment polymorphism*) bei einem sieben-Monate-alten Mädchen mit akuter Bronchiolitis entdeckt. In der Zwischenzeit konnte das Virus in mehreren Ländern, wie zum Beispiel Australien (Arden et al., 2005), Belgien (Moes et al., 2005) und Kanada (Bastien et al., 2005) isoliert werden, was eine weltweite Verbreitung dieses Erregers nahelegt. In den meisten Fällen litten die betroffenen Patienten an schwerwiegenden akuten Atemwegserkrankungen, oft auch unter Beteiligung des unteren Respirationstraktes (Bronchiolitis, Pseudo-Croup).

Ende November 2002 traten erstmals schwere atypische Pneumonien unklarer Genese (häufig auch mit tödlichem Ausgang) in der südchinesischen Provinz Guangdong auf. Diese bis dahin unbekannte Infektionskrankheit breitete sich 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). Seit Februar 2003 kam es dann zu einer raschen weltweiten Ausbreitung der Erkrankung. Am 5. Juli 2003 erklärte die WHO die Epidemie für beendet. Während der Epidemie erkrankten mehr als 8.000 Personen in rund 30 Ländern. Bei 744 Patienten verlief die Infektion tödlich. 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 klinische Symptomatik und der Verlauf von SARS sind teilweise recht unterschiedlich und hängen insbesondere vom Allgemeinzustand des Patienten, seinem Alter und eventuell vorhandenen Grunderkrankungen ab. Die Inkubationszeit von SARS beträgt 2–7 Tage. Klinisch ist SARS durch plötzlich auftretendes Fieber mit trockenem Husten, Myalgien und Atemnot bzw. Atembeschwerden gekennzeichnet. Auch leichte oder asymptomatische Verläufe nach einer Infektion sind möglich. Die Übertragung erfolgt hauptsächlich durch Tröpfcheninfektion (selten auch Schmierinfektion). Die Letalität lag bei etwa 11 %, die jedoch im höheren Lebensalter stark anstieg (Peiris et al., 2004). Bisher ist keine spezifische Therapie bekannt. Auch gibt es zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch keine zugelassene Schutzimpfung. Obwohl das SARS-CoV aus einigen Tieren, wie z. B. Zibet-Katzen (*Paguma larvata*), die auf einigen südchinesischen Märkten als kulinarische Spezialitäten verkauft werden, isoliert werden konnte, blieben lange Zeit Zweifel, ob sie das natürliche tierische Reservoir dieser Viren darstellen (Guan et al., 2003, Kan et al., 2005). Jüngste Daten legen hingegen nahe, dass Fledermäuse mit hoher Wahrscheinlichkeit das Reservoir SARS-CoV-ähnlicher Viren sind, die vermutlich den Ausgangspunkt für die Übertragung auf den Menschen darstellten. Die molekularen Grundlagen und Bedingungen für das Durchbrechen der Speziesbarriere vom Tier auf den Menschen in diesem speziellen Fall sind bisher nicht vollständig aufgeklärt, können jedoch mit einiger Sicherheit in spezifischen Mutationen im Virusgenom, insbesondere im S-Gen, sowie Deletionen in einigen akzessorischen Genen im 3'-Bereich des Genoms vermutet werden (Holmes, 2005, Kan et al., 2005, Song et al., 2005).

In der Veterinärmedizin sind Coronaviren als wichtige Erreger von Erkrankungen bei Haus- und Nutztieren seit langer Zeit bekannt. Bei TGEV gibt es Stämme (z. B. der in dieser Studie benutzte Stamm PUR46-MAD), die sowohl die Atemwege als auch den Verdauungstrakt infizieren, während andere ausschließlich die Atemwege befallen (z. B. der Stamm PTV). Mehrere Studien haben gezeigt, dass das S-Protein eine bedeutende Rolle im Zell-Tropismus der verschiedenen TGEV-Stämme spielt (Ballesteros et al., 1997, Kim et al., 2000). Obwohl prinzipielle TGEV-Infektionen bei Schweinen jeden Alters möglich sind, sieht man Verläufe mit schwerer klinischer Symptomatik nahezu ausschließlich bei jungen Ferkeln (Myint, 1995). Typische Symptome sind Erbrechen und ein schwerer wässriger Durchfall, die relativ schnell zu einer Dehydrierung führen. Die Letalität liegt bei nahezu 100% (Garwes, 1988). Durch das Zirkulieren einer natürlichen TGEV-Variante, die lediglich respiratorische Erkrankungen auslöst (Kim et al., 2000), ist in den letzten Jahren die Bedeutung dieses Erregers in der Landwirtschaft deutlich zurückgegangen.

Die Rezeptorspezifität ist von herausragender Bedeutung für die Wirtsspezifität sowie den Zell- bzw. Organtropismus eines gegebenen Virus und somit auch für die Pathogenese entsprechender Virusinfektionen. Relevante zelluläre Rezeptoren wurden bereits für zahlreiche Coronaviren identifiziert und charakterisiert. Das coronavirale S-Protein ist der entscheidende Faktor für die Rezeptorbindung. Der Rezeptor von HCoV-229E ist die humane Aminopeptidase N (hAPN) (Yeager, 1992), ein etwa 150 kD großes Zink-bindendes Glykoprotein mit Endopeptidase-Aktivität (Olsen et al., 1988). Das Protein befindet sich auf der apikalen Seite respiratorischer und intestinaler Epithelzellen, auf tubulären Nierenepithelzellen sowie auf zentralnervösen, synaptischen Verbindungen (Breslin et al., 2003, Wentworth & Holmes, 2001). Der Rezeptor von TGEV ist das entsprechende hAPN-Homolog vom Schwein, die porcine Aminopeptidase N (pAPN) (Delmas et al., 1992). Obwohl die Peptidsequenzidentität zwischen hANP und pANP bei etwa 80 % liegt, kann weder hAPN als TGEV-Rezeptor, noch pAPN als HCoV-229E-Rezeptor fungieren (Kolb et al., 1996). Der Rezeptor für SARS-CoV und HCoV-NL63 ist die Metallopeptidase ACE2 (*Angiotensin-converting enzyme 2*), ein regulatorisches Enzym der Renin-Angiotensin-Kaskade (Hofmann et al., 2005, Li et al., 2003). Ähnlich wie beim Influenza-C-Virus können einige Coronaviren der Gruppe II (teilweise neben ihren Proteinrezeptoren) auch noch 9-O-acetylierte

Sialinsäurereste für ihre Bindung an die Zelloberfläche nutzen (Vlasak et al., 1988). Die 9-O-acetylierte Sialinsäure wird vom S- bzw. dem HE-Protein erkannt. Obwohl beide Proteine 9-O-acetylierte Sialinsäure binden können, zeigten Untersuchungen mit BCoV, dass das S-Protein für die Virusinfektion essentiell ist, während das ausschließliche Vorhandensein des HE-Proteins für eine erfolgreiche Infektion nicht ausreicht (Popova & Zhang, 2002). Eine weitere Influenzavirus-ähnliche Funktion des coronaviralen HE-Proteins ist ihre sogenannte Rezeptor-zerstörende Eigenschaft (engl.: *receptor destroying function*), durch die das HE-Protein Sialinsäure abspalten kann. Es ist daher denkbar, dass (wie bei den Influenzaviren) das HE-Protein durch seine Acetylerase-Aktivität die Freisetzung von zelloberflächenassoziierten Virionen erleichtert (Smits et al., 2005).

## 1.4 Organisation, Replikation und Transkription des coronaviralen Genoms

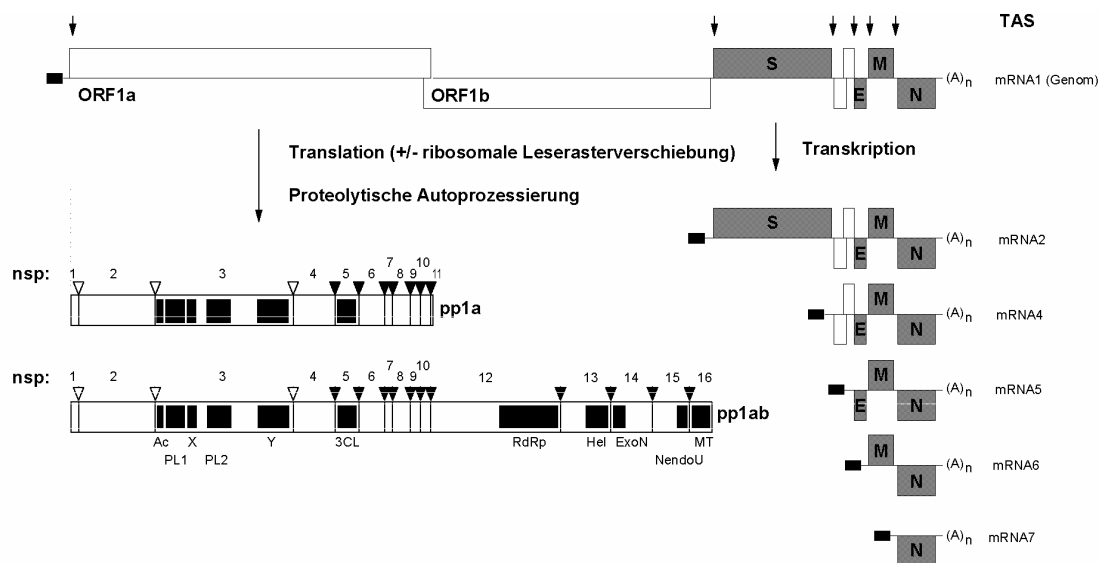
Coronaviren besitzen ein lineares, nichtsegmentiertes, einzelsträngiges RNA-Genom positiver Polarität. Komplettssequenzen wurden bisher für 10 Coronavirus-Spezies und deutlich mehr Einzelisolate (vor allem für SARS-CoV) veröffentlicht. Aus diesen Daten lassen sich folgende Grundcharakteristika coronaviraler Genome ableiten: Die Genomgrößen schwanken zwischen etwa 27 bis 32 Kilobasen. Am 5'- und 3'-Ende des Genoms befinden sich nichttranslatierte Regionen (vgl.: *untranslated regions*, UTRs) von mehreren hundert Nukleotiden (5'-UTR bzw. 3'-UTR). Diese Bereiche enthalten sogenannte cis-aktive Elemente (spezifische Nukleotidsequenzen bzw. RNA-Sekundärstrukturelemente), die für die virale RNA-Synthese essentiell sind (Brian & Baric, 2005). Im 5'-UTR befindet sich bei allen Coronaviren ein sehr kurzes offenes Leseraster (3-11 Aminosäuren), dessen genaue Funktion noch unbekannt ist, möglicherweise jedoch an der Regulation der Replikation und/oder Genexpression beteiligt sein könnte (Brian & Baric, 2005). Das 5'-Ende coronaviraler Genome besitzt wahrscheinlich die für eukaryotische mRNAs charakteristische Cap-Struktur, wobei jedoch bisher nur sehr wenige experimentelle Daten vorliegen, die diese These stützen (Lai et al., 1982). Die Genome aller derzeit bekannten Coronaviren sind an ihren 3'-

Enden polyadenyliert, und dieser 3'-poly(A)-Schwanz ist für die Virusreplikation essentiell (Spagnolo & Hogue, 2000). Darüber hinaus gibt es eine sogenannte Leadersequenz, die etwa 70-100 Nukleotide umfaßt und am 5'-Ende coronaviraler Genome liegt. Diese Leadersequenz wird unter Beteiligung sogenannter transkriptionsregulierender (oder auch -assoziierter) Sequenzen (TRS bzw. TAS) mit den kodierenden (sogenannten *body-*) Sequenzen der subgenomischen mRNAs verknüpft. Die TRS-Elemente haben eine Länge von ca. 10 Nukleotiden und sind reich an Adenin und Uracil. Sie befinden sich sowohl stromabwärts der Leadersequenz (hier als *Leader-TRS* bezeichnet) als auch unmittelbar stromaufwärts der sich im 3'-Bereich des Genoms befindenden Gene für die Struktur- und akzessorischen Proteine (Sidell et al., 2005). Das größte coronavirale Gen beansprucht etwa zwei Drittel des coronaviralen Genoms in dessen 5'-proximalem Bereich. Es wird als Replikasegen bezeichnet und besteht aus zwei offenen Leserastern (ORF): ORF1a und ORF1b. Diese beiden ORFs kodieren bis zu 16 nichtstrukturelle Proteine (nsp), die vermutlich zum größten Teil wichtige Funktionen innerhalb der Virusreplikation bzw. -transkription vermitteln. Stromabwärts vom Replikasegen sind die Gene der Strukturproteine lokalisiert. Darüber hinaus befinden sich in diesem Bereich einige gruppen- bzw. speziesspezifische Gene, die akzessorische Proteine mit größtenteils unbekanntenen Funktionen kodieren. Die Anordnung der Strukturproteine ist konserviert: 5'-S-E-M-N-3' (Brian & Baric, 2005).

Nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand erfolgt die coronavirale Replikation und Transkription der genomischen RNA ausschließlich im Zytoplasma der infizierten Zelle. Unter coronaviraler Replikation versteht man die Synthese neuer genomischer RNA, während sich der Begriff Transkription auf die RNA-abhängige Synthese des für Coronaviren (und andere Nidoviren) typischen Satzes von mRNAs subgenomischer Länge bezieht. Beide Prozesse werden von der viruskodierten RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp) katalysiert.

Nach der spezifischen Bindung des S-Proteins an ein Rezeptormolekül auf der Oberfläche der Wirtszelle und die anschließende S-Protein-vermittelte Fusion der Virus- und Zellmembranen (Gallagher & Buchmeier, 2001) wird das virale Genom freigesetzt und von den wirtszellulären Ribosomen translatiert. Das 5'-terminal gelegene Replikasegen kodiert die beiden Replikasepolyproteine pp1a und pp1ab (Abb. 2), die einer umfangreichen proteolytischen Prozessierung durch virale Proteasen unterliegen.





**Abb. 2: Aufbau der coronaviralen genomischen und subgenomischen mRNAs sowie des Replikasegens am Beispiel von HCoV-229E.** Dargestellt sind die offenen Leseraster der genomischen RNA sowie der im Rahmen der Transkription gebildete 3'-koterminale Satz subgenomischer mRNAs. Die ORFs der Strukturproteine sind grau unterlegt. Die am 5'-Ende der mRNAs gezeigten schwarzen Kästchen symbolisieren die Leadersequenzen. Die Pfeile veranschaulichen die im Genom enthaltenen transkriptionsregulierenden Sequenzen (TRS). Das aus den offenen Leserastern 1a und 1b bestehende, am 5'-Ende des Genoms gelegene Replikasegen kodiert für die Replikase-Polyproteine pp1a und pp1ab, wobei die Synthese von pp1ab eine (-1) ribosomale Leserasterverschiebung erfordert, die unmittelbar vor dem Erreichen des ORF1a-Translationsstopcodons erfolgt. Mittels autoproteolytischer Prozessierung werden beide Polyproteine in 16 nichtstrukturelle Proteine (nsp 1-16) gespalten. Die Spaltungen werden von zwei Papain-ähnlichen Proteasen (PL1 und PL2, Spaltstellen: weiße Dreiecke) und einer 3CL-Protease (3CL, Spaltstellen: schwarze Dreiecke) vermittelt. Konservierte Domänen sind schwarz markiert. S: Oberflächenglykoprotein (Spike-Protein); E: Hüllprotein (Envelope-Protein); M: Membranglykoprotein; N: Nukleokapsidprotein; 3CL: 3CL-ähnliche Protease; RdRp: RNA-abhängige RNA-Polymerase; ExoN: putative 5'-3' Exoribonuklease; NendoU: Nidovirale uridylatspezifische Endoribonuklease; MT: Ribose-2'-O-Methyltransferase; Ac: saure Domäne; PL1: papain-ähnliche Protease 1; PL2: Papain-ähnliche protease 2; X: X-Domäne (Appr-1"-pase); Y: Y-Domäne mit hydrophobem Bereich und putativem Zinkfinger.

Die in diesem Prozess freigesetzten Proteine (sog. nichtstrukturelle Proteine [nsp]) bilden zusammen mit einigen zellulären Proteinen einen Multi-Enzym-Komplex, der die virale Replikation und Transkription katalysiert und vermutlich noch andere Funktionen hat (Ziebuhr, 2005). Als mögliche zelluläre Komponenten des Replikations-/Transkriptionskomplexes wurden die folgenden Proteine identifiziert: das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein A1 (hnRNP A1), das poly(A)-bindende Protein (PABP) sowie die mitochondrielle Akonitase. Diese Proteine interagieren vermutlich mit genomischen, cis-aktiven Elementen; ihre genaue Rolle ist jedoch bisher nicht geklärt (Shi & Lai, 2005). Bei der Replikation werden zunächst negativsträngige Kopien des Genoms synthetisiert, die anschließend als Matrize für die Synthese positivsträngiger RNAs genomischer Länge dienen (Brian & Baric, 2005). Neuere MHV-Daten zeigen darüber hinaus, dass der coronavirale Replikationskomplex mit intrazellulären membranösen Strukturen, sogenannten *double membrane vesicles*, assoziiert ist, an denen die RNA-Synthese erfolgt (Gosert et al., 2002, van der Meer et al., 1999).

Im Rahmen der Transkription entsteht der für Nidoviren charakteristische Satz 3'-coterminaler subgenomischer mRNAs. Mit Ausnahme der kleinsten mRNA sind alle subgenomischen mRNAs strukturell polycistronisch, funktionell jedoch monocistronisch. Das bedeutet, dass bei jeder dieser mRNAs nur das in der sogenannten *5'-unique region* gelegene offene Leseraster, das in der nächstkleineren subgenomischen mRNAs nicht vorhanden ist, translatiert wird. Alle subgenomischen mRNAs tragen an ihrem 5'-Ende eine *Leader*-Sequenz (siehe oben), die vom 5'-Ende des Genoms stammt. Die Leadersequenz wird mit der für jede subgenomische mRNA spezifischen *Body*-Sequenz verknüpft (Sidell et al., 2005). Auch wenn der Mechanismus dieser diskontinuierlichen RNA-Synthese bisher nicht in vollem Umfang geklärt werden konnte, besteht zunehmend Übereinstimmung hinsichtlich einiger Grundprinzipien dieses Prozesses. (1) Der diskontinuierliche Schritt der subgenomischen RNA-Synthese findet wahrscheinlich nicht –wie früher angenommen (Baric et al., 1983, Baric et al., 1985, Lai et al., 1984)– während der Positivstrangsynthese statt, sondern während der Negativstrangsynthese. (2) Die Matrizen für die Synthese der Leader-enthaltenden mRNAs sind Anti-Leader-enthaltende, negativsträngige RNAs subgenomischer Länge, die in einem Prozess, der als "diskontinuierliche Extension von Minussträngen" bezeichnet wird (Sawicki &

Sawicki, 1998), diskontinuierlich synthetisiert werden. (3) Die Anfügung der Anti-Leader-Sequenz an das 3'-Ende der subgenomischen RNAs während der Minusstrangsynthese wird maßgeblich gesteuert durch die komplementäre Basenpaarung zwischen einem (*body-*) anti-TRS-Element des wachsenden (*nascent*) Negativstranges und der stromabwärts auf der Matrize gelegenen Leader-TRS-Sequenz. (4) Voraussetzung für diesen Matrizen-"Wechsel" während der Minusstrangsynthese an eine weiter stromabwärts gelegene Position, der stark an die Mechanismen des *similarity-assisted template switching* bei homologen RNA-Rekombinationsereignissen erinnert, sind (neben der Basenpaarung) vermutlich auch spezifische Wechselwirkungen zwischen Proteinen, die an das 5'-Ende des Genoms binden bzw. Teil der aktiven Minusstrang-Polymerase sind. (5) Der effiziente Transfer der Minusstrang-Polymerase an eine weit stromabwärts gelegene Matrizenposition (also die Leader-TRS) wird vermutlich durch spezifische Attenuierungssignale vermittelt, die die laufende Minusstrangsynthese (vorübergehend) zum Stehen bringen und somit den Strangtransfer begünstigen. Die 3'-Antileader-enthaltenden, diskontinuierlich produzierten, negativsträngigen subgenomischen RNAs dienen anschließend als Matrize für die (kontinuierliche) Synthese 5'-Leader-enthaltender subgenomischer mRNAs (Sawicki & Sawicki, 1990, Sawicki & Sawicki, 1998, Schaad & Baric, 1994, Zuniga et al., 2004).

## 1.5 Das coronavirale Replikasegen

Wie bereits oben dargestellt, befindet sich das Replikasegen am 5'-Ende des coronaviralen Genoms. Mit Ausnahme des nicht vom Replikasegen kodierten Nukleokapsidproteins, das nach kürzlich publizierten Daten ebenfalls an der Virusreplikation beteiligt ist (Almazan et al., 2004, Schelle et al., 2005), kodiert das Replikasegen alle für die virale Replikation und Transkription erforderlichen Funktionen (Thiel et al., 2001b). Das Gen umfasst mehr als zwei Drittel des Genoms (ca. 20 kb) und besteht aus zwei offenen Leserastern, ORF1a und ORF1b, die die

beiden Polyproteine, pp1a (450-500 kD, kodiert vom ORF1a) und pp1ab (750-800 kD, kodiert von den ORFs 1a und 1b) kodieren. Für die Expression des ORF1b-kodierten Anteils von pp1ab ist eine ribosomale Leserasterverschiebung in die -1-Position kurz vor dem Erreichen des ORF1a-Stopcodons erforderlich. Die Leserasterverschiebung wird durch eine sogenannte *slippery sequence* (5'-UUUAAAC-3') und eine quasi-helikale Pseudoknotenstruktur der viralen RNA in der Überlappungsregion der beiden ORFs vermittelt (Herold & Siddell, 1993) und findet in etwa 20-30 % aller Translationsereignisse statt (Herold et al., 1993). Da die replikativen Schlüsselenzyme, wie beispielsweise die RdRp und die Helikase, im ORF1b kodiert sind, wird deren Expressionsniveau also zwangsläufig von der Effizienz der Leserasterverschiebung reguliert. Es liegt außerdem nahe, zu vermuten, daß für die coronavirale Replikation ein spezifisches molares Verhältnis zwischen ORF1a- und ORF1b-kodierten Funktionen gegeben sein muß (Ziebuhr, 2005).

Erste Informationen über den Aufbau des coronaviralen Replikasegens wurden durch die Sequenzanalyse des Genoms von IBV erlangt (Bourne et al., 1987, Gorbalenya et al., 1989a). Durch computergestützte Sequenzanalysen des IBV-Replikasegens konnten mehrere putativ-funktionale Domänen identifiziert werden: RdRp, NTPase/Helikase (HEL), zwei Cysteinproteasen im ORF1a, ein Motiv mit Homologie zu Wachstumsfaktoren sowie eine putative metallbindende Domäne zwischen der RdRp und der Helikase (Gorbalenya et al., 1989a). Mit der zunehmenden Verfügbarkeit kompletter Coronavirussequenzen in den letzten 17 Jahren wurden die Sequenzanalysen zunehmend verfeinert und auch neue Enzymaktivitäten und konservierte Motive identifiziert (Gorbalenya et al., 1991; Ziebuhr et al., 2001; Snijder et al., 2003) (siehe Abschnitt 1.4). So zeigte sich beispielsweise, dass die Abfolge der Domänen in den coronaviralen replikativen Polyproteinen stark konserviert ist (de Vries, 1997, Gorbalenya, 2001, Ziebuhr et al., 2001). Die Sequenzen selbst sind jedoch im ORF1b-kodierten Bereich deutlich besser konserviert als im ORF1a. Einen sprunghaften Erkenntnisgewinn erbrachte die umfassende Analyse des SARS-CoV-Replikasepolyproteins (Snijder et al., 2003), bei der nicht weniger als fünf weitere RNA-prozessierende Coronavirus-Enzyme beschrieben wurden: (1) eine poly(U)-spezifische Endoribonuklease (NendoU), (2) eine 3'→5' Exonuklease (ExoN) der DEDD-Exonuklease-Superfamilie, (3) eine S-Adenosylmethionin-abhängige Ribose-2'-

O-Methyltransferase (2'-O-MT) der RrmJ-Familie, (4) eine Adenosindiphosphat-Ribose-1"-Phosphatase (Appr-1"-pase) und (5) eine zyklische Nukleotid-Phosphodiesterase (CPDase) (Snijder et al., 2003). Die konservierten NendoU-, ExoN-, 2'-O-MT- und Appr-1"-pase-Domänen sind in den Replikasepolyproteinen aller Coronavirus-Gruppen konserviert, während die mit der putativen CPDase-Aktivität assoziierende Domäne nur bei manchen Coronaviren der Gruppe II (in deren ORF2) sowie bei Toroviren (3'-Ende des ORFs 1a) identifiziert werden konnte (Draker et al., 2006, Snijder et al., 2003). Die unmittelbar benachbarte Position der ExoN (nsp14), NendoU (nsp15) und 2'-O-MT (nsp16) im coronaviralen Replikasepolyprotein legte die Vermutung nahe, dass diese Proteine im gleichen Stoffwechselweg zusammenarbeiten (Snijder et al., 2003). Darüber hinaus wurde eine interessante Parallelität zu einem zellulären Stoffwechselweg beschrieben, bei dem pre-mRNA durch die Aktivitäten von Endo- und Exonukleasen zunächst prozessiert werden und die auf diese Weise freigesetzten *small nucleolar RNAs* (snoRNAs) (Filipowicz & Pogacic, 2002) durch komplementäre Basenpaarung an bestimmte Zielsequenzen der ribosomalen RNA deren spezifische Methylierung durch ein 2'-O-MT-Homolog ermöglichen (Wang et al., 2000). Darüber hinaus wurde spekuliert, dass die (partiell) konservierten CPDase- (Culver et al., 1994) und (absolut) konservierten Appr-1"-pase-Aktivitäten (Martzen et al., 1999) aufeinanderfolgende Reaktionen bei der Prozessierung eines Nebenproduktes des zellulären pre-tRNA-Spleißens, Appr>p, katalysieren könnten. Einige dieser enzymatischen Aktivitäten konnten inzwischen auch experimentell nachgewiesen werden. Dazu zählen beispielsweise alle Proteasen sowie die HEL-, RdRP- und NendoU-Aktivitäten (Bhardwaj et al., 2004, Herold et al., 1998, Ivanov et al., 2004, Seybert et al., 2000, Ziebuhr et al., 1995, Ziebuhr et al., 2000, Ziebuhr et al., 2001).

Die für die proteolytische Prozessierung der coronaviralen Replikasepolyproteine verantwortlichen Proteasen wurden bisher am besten charakterisiert. Je nach Virusspezies gibt es in nsp3 eine oder zwei Papain-ähnliche Cysteinprotease-Domänen (PL<sup>pro</sup>), die zwei oder drei Peptidbindungen im aminproximalen Bereich der Replikasepolyproteine spalten und somit an der Freisetzung der nsp1/2/3/4-Untereinheiten des Replikations-/Transkriptionskomplexes beteiligt sind. Eine ausführliche Beschreibung der PL<sup>pro</sup>-Aktivitäten erfolgt im Abschnitt 1.6.2.

Die sogenannte Hauptprotease ( $M^{\text{pro}}$ ) befindet sich im nsp5. Im Polyprotein wird sie von zwei hydrophoben Domänen flankiert, die wahrscheinlich den viralen Replikationskomplex an zellulären Membranen verankern (Gorbalenya et al., 1989a). Aufgrund der entfernten Ähnlichkeit der Hauptprotease mit der 3C-Protease von Picornaviren wird sie häufig auch als 3C-ähnliche Protease (engl.: *3C-like protease*,  $3CL^{\text{pro}}$ ) bezeichnet. Die Hauptprotease ist, wie schon ihr Name vermuten läßt, für die Mehrzahl aller Spaltungen in den Replikasepolyproteinen verantwortlich. Sie prozessiert die coronaviralen Replikasepolyproteine an elf konservierten Spaltstellen und ist somit an der Freisetzung von insgesamt 13 Spaltprodukten beteiligt (einschließlich ihrer eigenen Freisetzung aus den Polyproteinen). Die entsprechenden inter- und intramolekularen Aktivitäten, katalytischen Reste, Substratspezifitäten usw. wurden insbesondere für die  $3CL^{\text{pro}}$ s von MHV, HCoV-229E, SARS-CoV, IBV und TGEV im Detail analysiert (Ziebuhr, 2005, Ziebuhr et al., 2000).

Erste Strukturinformationen über coronavirale Hauptproteasen wurden aus der Röntgenstrukturanalyse von Kristallen der TGEV- $3CL^{\text{pro}}$  (Anand et al., 2002) und der HCoV-229E- $3CL^{\text{pro}}$  (Anand et al., 2003) gewonnen. Diese Studien zeigten, dass coronavirale Hauptproteasen aus drei Domänen (I bis III) bestehen. Ähnlich wie auch bei den picornaviralen 3C-Proteasen bilden die Domänen I und II eine Chymotrypsin-ähnliche (*two- $\beta$ -barrel*-) Struktur aus, die aus zwölf antiparallelen  $\beta$ -Strängen gebildet wird. Sowohl im Kristall als auch in Lösung bilden coronavirale  $3CL^{\text{pro}}$ s Dimere aus, die sehr wahrscheinlich von Bedeutung für die Funktion der Protease sind (Anand et al., 2002, Anand et al., 2003, Yang et al., 2003). Im Vergleich zur picornaviralen 3C-Protease ist die coronavirale  $3CL^{\text{pro}}$  bedeutend größer, was vor allem auf eine zusätzliche C-terminale Domäne von ca. 110 Aminosäuren (Domäne III) zurückzuführen ist. Diese Domäne besteht aus 5  $\alpha$ -Helices, für die bisher keine strukturellen Verwandten gefunden werden konnten (Anand et al., 2002). Domäne III ist maßgeblich an der Dimerisation beteiligt und ihre Deletion inaktiviert die Proteasefunktion (Anand et al., 2002, Ziebuhr et al., 1997). Ein weiterer Unterschied zwischen den picornaviralen und coronaviralen Chymotrypsin-ähnlichen Proteasen liegt in den katalytischen Resten des aktiven Zentrums. Während die picornavirale 3C-Protease eine katalytische Triade (Cys-His-Asp) besitzt (Allaire et al., 1994, Mosimann et al., 1997), verfügt die coronavirale  $3CL^{\text{pro}}$  über eine katalytische Dyade (Cys-His).

Sowohl Mutationsanalysen von coronaviralen 3CL<sup>pro</sup>s als auch die Kristallstrukturen bestätigten, dass die hochkonservierten Aminosäuren Cystein und Histidin für die proteolytische Aktivität essentiell sind. Es konnte jedoch keine konservierte saure Aminosäure als Gegenstück zur dritten sauren Aminosäure der katalytischen Triade der Chymotrypsin-ähnlichen Proteasen gefunden werden (Lu & Denison, 1997, Seybert et al., 1997, Tibbles et al., 1996, Ziebuhr et al., 1997). Aufgrund ihrer essentiellen Funktion bei der Prozessierung der coronaviralen Replikasepolyproteine, ihrer konservierten und gut definierten Substratspezifität sowie der Verfügbarkeit von Kristallstrukturen von Enzym-Inhibitor-Komplexen (Anand et al., 2003, Yang et al., 2003) gilt die coronavirale 3CL<sup>pro</sup> gegenwärtig als ein überaus vielversprechendes Zielmolekül für antivirale Therapieansätze bei Coronavirusinfektionen (Anand et al., 2003, Hegyi & Ziebuhr, 2002, Hertzog et al., 2004, Yang et al., 2005).

Die coronavirale Helikase befindet sich im nsp13 und gehört zur Helikase-Superfamilie 1 (Gorbalenya et al., 1989a, Gorbalenya et al., 1989b). Biochemische Studien haben gezeigt, dass coronavirale Helikasen vielfältige Funktionen vermitteln können. Dazu zählen: eine 5'→3'-Duplex-Entwindungsaktivität (Ivanov & Ziebuhr, 2004, Seybert et al., 2000), eine Nukleosidtriphosphatase-Aktivität, durch die das Enzym seinen Energiebedarf für die Helikase-Aktivität decken kann (Ivanov et al., 2004, Ivanov & Ziebuhr, 2004, Seybert et al., 2000, Seybert & Ziebuhr, 2001), und eine RNA-5'-Triphosphatase-Aktivität, die möglicherweise die erste Reaktion innerhalb der 5'-Cap-Synthese an den viralen RNAs katalysieren könnte (Ivanov et al., 2004, Ivanov & Ziebuhr, 2004). Am aminoterminalen Ende des coronaviralen nsp13 befindet sich eine Zn<sup>2+</sup>-bindende, Cys/His-reiche Domäne, die bei allen Nidoviren konserviert ist und daher als ein genetischer Marker von Nidoviren gelten kann (Gorbalenya et al., 1989a, Gorbalenya, 2001, Seybert et al., 2005). Biochemische und Mutagenese-Daten legen nahe, dass die Zn<sup>2+</sup>-bindende N-terminale Domäne essentiell für die verschiedenen enzymatischen Aktivitäten der C-terminalen Helikase-Domäne ist und damit indirekt auch deren Funktionen innerhalb der viralen Replikation und Transkription steuert (Seybert et al., 2005).

Die für das nsp15 vorhergesagte Endonuklease-Aktivität wurde kürzlich durch biochemische Daten bestätigt. Die Charakterisierung der in *E. coli* exprimierten nsp15-Proteine von SARS-CoV, IBV und HCoV- 229E (Bhardwaj et al., 2004, Ivanov et al.,

2004) ergaben, dass das Enzym sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige RNA in einer  $Mn^{2+}$ -Ionen-abhängigen Reaktion spalten kann. Die Spaltung erfolgt spezifisch an Uridylatresten und hinterläßt Moleküle mit 2'-3'-Zyklophosphat-Enden.

## 1.6 Das coronavirale nichtstrukturelle Protein 3

### 1.6.1 Domänenorganisation des coronaviralen nichtstrukturellen Proteins 3 (nsp3)

Das coronavirale nichtstrukturelle Protein 3 (nsp3) ist das größte coronavirale replikative Protein (ca. 180 bis 210 kD). Die im nsp3 enthaltenen PL<sup>pro</sup>-Domänen vermitteln die proteolytische Freisetzung des Proteins aus den Prekursor-Polyproteinen pp1a und pp1ab. Sequenzanalysen ergaben nur eine geringe Konservierung von nsp3-Sequenzen innerhalb der Coronaviren. (Gorbalenya et al., 1991, Herold et al., 1993, Lee et al., 1991). Dennoch konnten einige Gemeinsamkeiten identifiziert werden (Ziebuhr et al., 2001). Dazu gehört, dass alle coronaviralen nsp3 an ihren carboxy- bzw. aminoterminalen Enden von PL<sup>pro</sup>-Schnittstellen flankiert sind und eine konservierte Subdomänen-Organisation besitzen (Ziebuhr et al., 2001). Fünf konservierte Domänen wurden identifiziert: eine saure Domäne (Ac), zwei Papain-ähnliche Proteasen (PL1<sup>pro</sup> und PL2<sup>pro</sup>) sowie zwei weitere konservierte Domänen, die als X- bzw. Y-Domäne bezeichnet wurden. Die Subdomänen-Organisation von nsp3 legt nahe, dass nsp3 ein multifunktionelles Protein ist. Sequenzvergleiche von BCoV-Isolaten aus zwei verschiedenen Organen eines erkrankten Rindes ergaben darüber hinaus, dass (neben einer Reihe von Mutationen im S-Protein) nichtsynonyme Mutationen im nsp3 für die phänotypischen Unterschiede der beiden Stämme verantwortlich sein könnten, was als Hinweis auf eine Rolle des Proteins oder einzelner Subdomänen als Pathogenitätsfaktoren gedeutet wurde (Chouljenko et al., 2001). Darüber hinaus wurde für das nsp1 von EAV, eine Protease, die mit den beiden in nsp3 vorhandenen PL<sup>pro</sup>s verwandt ist, gezeigt, dass sie eine Funktion als Transkriptionsfaktor innerhalb der subgenomischen RNA-Synthese von Arterviren besitzt. Diese Funktion wird allerdings



nicht durch ihre proteolytische Aktivität, sondern durch einen aminoterminalen Zinkfinger vermittelt (Tijms et al., 2001). Zudem konnte gezeigt werden, dass nsp1 in EAV-infizierten Zellen einen Kofaktor der zellulären Transkription (p100) binden kann (Tijms & Snijder, 2003). Ähnliche transkriptionsassoziierte Funktionen sind auch für die coronaviralen PL<sup>pro</sup>s denkbar, insbesondere auch deshalb, weil diese ebenfalls Zinkfingerstrukturen besitzen (siehe unten).

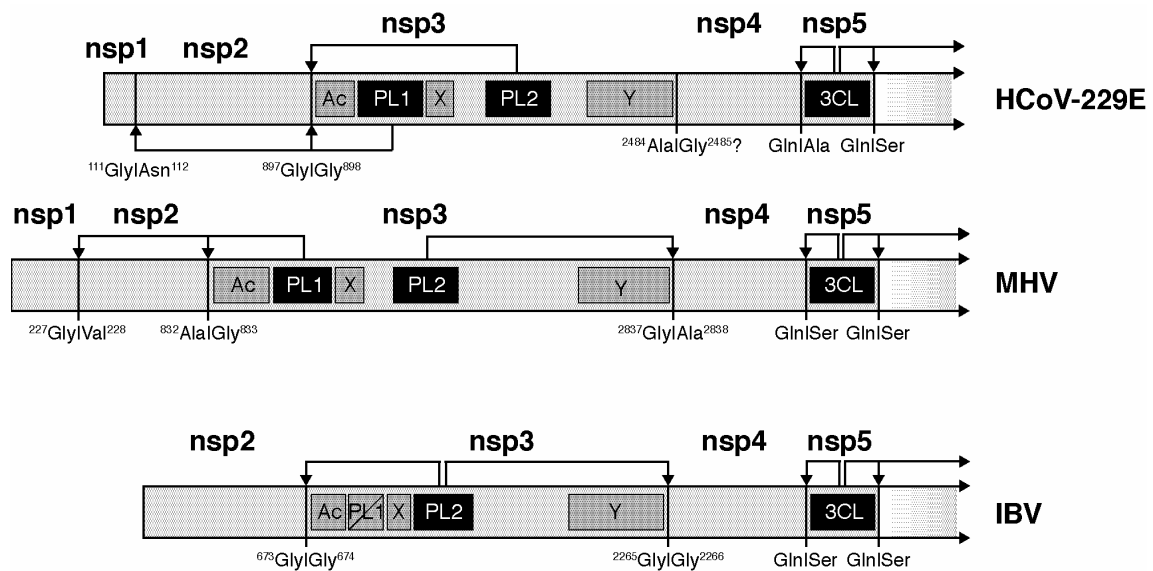
Die N-terminale, ca. 150-240 Aminosäurereste umfassende nsp3-Domäne ist reich an Glutamat- und Aspartatresten und wird deshalb als saure Domäne bezeichnet. Ihre Funktion ist nicht bekannt (Ziebuhr et al., 2001). Die weiteren vier Domänen werden in den folgenden Abschnitten (1.6.2-1.6.4) vorgestellt.

### 1.6.2 Papain-ähnliche Proteasen

Die Papain-ähnliche Proteasen 1 (PL1<sup>pro</sup>) und 2 (PL2<sup>pro</sup>) befinden sich im aminoterminalen und zentralen Bereich von nsp3. Sie spalten den aminoproximalen Bereich der coronaviralen Replikasepolyproteine pp1a und pp1ab an zwei oder drei Stellen und sind somit an der Freisetzung von nsp1 bis nsp4 beteiligt. Der Carboxyl-Terminus von nsp4 wird hingegen durch die Hauptprotease prozessiert. Die PL<sup>pro</sup>-vermittelten Spaltungen (Spaltstellen, Spaltprodukte, beteiligte Proteasen) waren zu Beginn der Arbeit (in unterschiedlichem Umfang) für MHV, HCoV-229E und IBV charakterisiert worden. Die verfügbaren Daten sind in der Abb. 3 zusammengefasst.

Die proteolytische Prozessierung des coronaviralen Replikasepolyproteins wurde zuerst bei MHV durch die Identifizierung des N-terminalen Spaltproduktes (nsp1) nachgewiesen (Denison & Perlman, 1987, Denison & Perlman, 1986, Soe et al., 1987). Das nsp1 wird durch eine PL1<sup>pro</sup>-vermittelte-Spaltung (Baker et al., 1989, Gorbalenya et al., 1991), die zwischen den Aminosäuren Gly<sup>247</sup> und Val<sup>248</sup> im Replikasepolyprotein erfolgt, freigesetzt (Dong & Baker, 1994, Hughes et al., 1995). *In-vivo*-Experimente mit Virusmutanten, die Mutationen an der Schnittstelle nsp1|nsp2 trugen, zeigten, dass die Spaltung an dieser Stelle für die Virusreplikation *in vitro* nicht essentiell ist. Die Spaltung dieser Peptidbindung steigerte jedoch sowohl die virale

RNA-Synthese als auch die Bildung infektiöser Virionen (Denison et al., 2004). Darüber hinaus katalysiert die PL1<sup>pro</sup> eine weitere Spaltung (nsp2|nsp3) im Replikasepolyprotein, die zwischen den Aminosäuren Ala<sup>832</sup> und Gly<sup>833</sup> erfolgt (Bonilla et al., 1997, Bonilla et al., 1995b). Die dritte Spaltstelle (nsp3|nsp4) am carboxyterminalen Ende von nsp3 wird hingegen von der PL2<sup>pro</sup> prozessiert. (Kanjahaluethai & Baker, 2000, Kanjahaluethai & Baker, 2001).



**Abb. 3: Multi-Domänen-Organisation von nsp3 und Prozessierung der N-terminalen Regionen der Polyproteine pp1a und pp1ab von IBV, MHV und HCoV-229E.** Gezeigt sind die Proteasen PL1<sup>pro</sup>, PL2<sup>pro</sup> und 3CL<sup>pro</sup> (schwarz unterlegt) sowie deren Spaltstellen und die Prozessierungsprodukte im N-terminalen Bereich der Polyproteine pp1a und pp1ab. Die an den jeweiligen Spaltungen beteiligten Proteasen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Für die genaue Lokalisation der Schnittstellen sind die Positionen P1 und P1' angegeben. Vorhersagte, aber nicht experimentell charakterisierte Schnittstellen sind mit einem Fragezeichen gekennzeichnet. Als grau unterlegte Rechtecke sind weitere Domänen im coronaviralen nsp3 dargestellt. Bei IBV ist die PL1<sup>pro</sup>-Domäne durchgestrichen, da die Domäne bei diesem Virus keine proteolytische Aktivität besitzt. Ac: saure Domäne; PL1: Papain-ähnliche Protease 1; PL2: Papain-ähnliche protease 2; X: X-Domäne (Appr-1"-pase); Y: Y-Domäne mit hydrophobem Bereich und putativem Zinkfinger; 3CL: 3C-ähnliche Protease

Auch HCoV-229E kodiert zwei proteolytisch aktive Papain-ähnliche Proteasen. Ähnlich wie bei MHV spaltet die PL1<sup>pro</sup> das Replikasepolyprotein an den Positionen nsp1|nsp2 (<sup>111</sup>Gly|Asn<sup>112</sup>) und nsp2|nsp3 (<sup>897</sup>Gly|Gly<sup>898</sup>). Dies führt zur Freisetzung der Spaltprodukte nsp1 und nsp2 (Herold et al., 1998, Ziebuhr et al., 2001). Darüber hinaus wurde bei HCoV-229E gezeigt, dass die Spaltstelle nsp2|nsp3 sowohl von der PL1<sup>pro</sup> als auch von der PL2<sup>pro</sup> prozessiert werden kann.

Es wurde außerdem gezeigt, dass PL1<sup>pro</sup> diese Schnittstelle weniger effizient spaltet als PL2<sup>pro</sup> und dass die PL1<sup>pro</sup>-Aktivität an dieser Spaltstelle von einer nichtproteolytischen Aktivität der PL2<sup>pro</sup> unterdrückt werden kann (Ziebuhr et al., 2001). Diese Daten, aber auch frühere MHV-Daten (Teng et al., 1999) deuten darauf hin, dass die Konservierung von zwei paralogen Papain-ähnlichen Proteasen nicht nur eine effizientere Prozessierung spezifischer Spaltstellen ermöglicht, sondern auch eine weitere Regulationsebene schafft, auf der die Aktivitäten der beiden nsp3-Proteasen im Sinne einer optimalen Virusreplikation gesteuert werden können (Ziebuhr et al., 2000, Ziebuhr et al., 2001).

Im Gegensatz zu MHV und HCoV-229E kodiert IBV nur eine einzige proteolytisch aktive Papain-ähnliche Protease, die aufgrund ihrer Position im Replikasepolyprotein als Homolog der PL2<sup>pro</sup>s anderer Coronaviren angesehen wird. Interessanterweise besitzt IBV jedoch eine weitere, stromaufwärts gelegene PL<sup>pro</sup>-Domäne, die aber keine proteolytische Aktivität besitzt. Vermutlich hat die PL1<sup>pro</sup> von IBV ihre katalytische Aktivität durch Mutationen im aktiven Zentrum im Laufe der Evolution verloren. Die Tatsache jedoch, dass die IBV-PL1<sup>pro</sup>-Domäne nicht komplett deletiert wurde, deutet darauf hin, dass sie eine weitere (nichtproteolytische) Funktion haben könnte (Ziebuhr et al., 2001). Die IBV-PL2<sup>pro</sup> spaltet das Replikasepolyprotein an zwei Stellen, was zur Freisetzung dreier Produkte, nämlich nsp2 (Lim & Liu, 1998, Liu et al., 1995), nsp3 und nsp4 (Lim et al., 2000) führt. Die Spaltung nsp2|nsp3 erfolgt zwischen den Aminosäuren Gly<sup>673</sup> und Gly<sup>674</sup> (Lim & Liu, 1998), während die Spaltung nsp3|nsp4 zwischen Gly<sup>2265</sup> und Gly<sup>2266</sup> stattfindet (Lim et al., 2000). IBV besitzt im Gegensatz zu allen anderen Coronaviren kein Prozessierungsprodukt, das den bei anderen Coronaviren vorhandenen nsp1-Produkten entsprechen würde. Aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit bezeichnet man deshalb das aminoternale IBV-pp1a/pp1ab-Prozessierungsprodukt als nsp2.

Die Ergebnisse von Sequenzanalysen coronaviraler Papain-ähnlicher Proteasen können wie folgt zusammengefasst werden. Coronavirale PL<sup>pro</sup>s haben relativ wenig Ähnlichkeit mit anderen zellulären und viralen Papain-(ähnlichen) Cysteinproteasen, wie z. B. der pflanzlichen Protease Papain selbst (dem Prototyp dieser Familie von Cysteinproteasen), der L-pro Potease (*leader protease*) von FMDV (*foot-and-mouth-disease virus*) und der NS-Protease (*nonstructural protease*) von Rubiviren und Alphaviren (Gorbalenya et al., 1991, Lee et al., 1991). Außer der konservierten katalytischen Dyade, die aus einer Cystein- und einer Histidin-Seitenkette besteht, konnten nur sehr wenige absolut konservierte Aminosäuren bei coronaviralen Papain-ähnlichen Proteasen identifiziert werden (Herold et al., 1999, Mondal & Cardona, 2004, Penzes et al., 2001). Ein interessantes Merkmal ist jedoch, dass die meisten Coronaviren zwei Papain-ähnliche Proteasen kodieren. Evolutionär gesehen sind diese beiden Papain-ähnlichen Proteasen wahrscheinlich durch Genduplikation entstanden und können daher als Paraloge bezeichnet werden. Bei der Analyse phylogenetischer Stammbäume coronaviraler PL<sup>pro</sup>s stellte sich heraus, dass die Genduplikation vermutlich bereits bei einem Vorläufer der heutigen Coronaviren stattfand und die weitere Evolution der beiden paralogen Papain-ähnlichen Proteasen (zumindest bei einigen Coronavirus-Spezies) unter dem Selektionsdruck eines gemeinsamen Substrates verlaufen sein muss (Ziebuhr et al., 2001), wie es für HCoV-229E an Hand der überlappenden Substratspezifität der beiden PL<sup>pro</sup>-Domänen an der nsp2|nsp3-Spaltstelle beschrieben wurde (Ziebuhr, 2005, Ziebuhr et al., 2001).

Direkte Informationen zur Struktur der coronaviralen Papain-ähnlichen Protease gibt es bisher nicht. Es wurde jedoch ein Modell, das auf der Basis bioinformatischer und biochemischer Methoden gewonnen wurde, publiziert (Herold et al., 1999). Das Modell sagt voraus, dass coronavirale PL<sup>pro</sup>s die für die zellulären PL<sup>pro</sup>s typische Struktur besitzen, also eine  $\alpha$ -helikale Domäne und eine  $\beta$ -Faltblatt-Domäne, zwischen denen sich das aktive Zentrum befindet. Im Gegensatz zu den zellulären Homologen sind diese beiden Domänen jedoch durch eine zusätzliche Domäne verknüpft, die einen Zinkfinger einschließt und deren Struktur Ähnlichkeit mit der nukleinsäurebindenden Domäne des humanen transkriptionalen Elongationsfaktors (TFIIS) haben könnte. Die vorhergesagte Struktur dieser zusätzlichen coronaviralen Domäne (eine sogenannte *Zinc ribbon*-Struktur), enthält wahrscheinlich 3 antiparallele  $\beta$ -Stränge und eine (vier

konservierte Cysteinreste beinhaltende) Zinkfinger-Struktur. HCoV-229E-PL1<sup>pro</sup>-Daten bestätigten, dass die PL1<sup>pro</sup> mittels dieser Cys-Reste Zn<sup>2+</sup>-Ionen bindet. Dieses Proteinsegment spielt demnach eine wichtige strukturelle Rolle und ist somit indirekt an der katalytischen Aktivität der PL<sup>pro</sup> beteiligt (Herold et al., 1999). Es ist bisher jedoch nicht klar, wie die postulierte *Zinc-ribbon*-Struktur die proteolytische Aktivität im Detail moduliert. Es wurde auch spekuliert, dass coronavirale PL<sup>pro</sup>-Domänen über ihre zinkbindenden Domänen mit anderen Proteinen bzw. Nukleinsäuren interagieren könnten, wodurch andere zelluläre oder virale Mechanismen (z. B. die virale Replikation und Transkription) reguliert werden könnten (Herold et al., 1999). Diese Vermutungen werden auch durch Daten über das nsp1 von EAV aus der Familie der *Arteriviridae* unterstützt (Tijms et al., 2001). So enthält das EAV-nsp1 eine (mit den coronaviralen PL<sup>pro</sup>s verwandte) PL<sup>pro</sup>-Domäne, die ebenfalls einen Zinkfinger besitzt. Die EAV-Daten zeigten, dass das EAV-nsp1 für die virale Transkription essentiell (für die Replikation hingegen entbehrlich) ist und dass es der aminoternale Zinkfinger ist, der diese esentielle Funktion in der viralen Transkription vermittelt. Das EAV-nsp1 besitzt also neben seiner proteolytischen Funktion auch eine Funktion als Transkriptionsfaktor, der die die Synthese subgenomischer RNAs trans-aktivieren kann (Tijms et al., 2001).

Das putative katalytische Zentrum der coronaviralen Papain-ähnlichen Proteasen besteht aus zwei Aminosäuren, einem Cystein und einem Histidin. Diese sind in den coronaviralen PL<sup>pro</sup>s sowie ihren viralen und zellulären Homologen konserviert und bilden eine katalytische Dyade (Baker et al., 1993, Bonilla et al., 1995a, Herold et al., 1998, Kanjanahaluethai & Baker, 2000, Lim & Liu, 1998).

Die Charakterisierung der PL<sup>pro</sup>-Schnittstellen lieferte wichtige Daten über die Substratspezifität der coronaviralen Papain-ähnlichen Proteasen. Die Analyse der PL1<sup>pro</sup> von MHV (Bonilla et al., 1997, Dong & Baker, 1994, Hughes et al., 1995) und von HCoV-229E (Herold et al., 1998) legte den Schluss nahe, dass (1) die P1-Position die wichtigste Determinante der Substraterkennung ist – sie muss entweder von Ala oder Gly besetzt sein, wobei Gly gegenüber Ala bevorzugt wird, (2) basische Aminosäuren (Lys, Arg) an den Positionen P2 und P5 an der Substraterkennung beteiligt sind, (3) an der Position P1' kleine ungeladene Aminosäuren bevorzugt werden, (4) die Positionen P3, P4, P2' und P3' vermutlich nicht kritisch für die Substratspezifität sind, da dort viele

Substitutionen toleriert wurden (Ziebuhr et al., 2000). Weitere Informationen über die Substratspezifität coronaviraler PL<sup>pro</sup>s lieferten die Daten über die MHV-PL2<sup>pro</sup>. Hierbei zeigte sich, dass Gly an der P1-Position für die Spaltung absolut essentiell ist. Außerdem waren die Positionen P2 und P6 von großer Bedeutung für MHV-PL2<sup>pro</sup>-vermittelte Spaltungen (Kanjanaaluethai & Baker, 2000).

### 1.6.3 Die X-Domäne

Sequenzanalysen und -vergleiche der die coronaviralen Papain-ähnlichen Proteasen flankierenden Peptidsequenzen führten vor etwa 15 Jahren zur Entdeckung einer Domäne, die bei Coronaviren, animalen Alphaviren, Rubiviren und Hepatitis-E-Virus konserviert ist. Aufgrund ihrer damals unbekanntem Funktion wurde sie als "X-Domäne" bezeichnet (Gorbalenya et al., 1991). Neuere Studien zeigten, dass (innerhalb der Nidoviren) die X-Domäne lediglich bei Coronaviren und Toroviren (Snijder et al., 2003, Draker et al., 2005), nicht jedoch bei den *Arteriviridae* und *Roniviridae* konserviert ist (Snijder et al., 2003). Die coronavirale X-Domäne wird im nsp3 von den beiden PL1<sup>pro</sup>- und PL2<sup>pro</sup>-Domänen flankiert. Bei SARS-CoV und IBV, die entweder nur *eine* oder nur eine *aktive* Papain-ähnliche Protease, nämlich PL2<sup>pro</sup>, besitzen, befindet sich die X-Domäne aminoproximal zur PL2<sup>pro</sup>. Auch die X-Domänen von Alphaviren, Rubiviren und Hepatitis-E-Virus sind Subdomänen viraler nichtstruktureller Proteine. Dazu gehören beispielsweise das nsP3 des Sindbis-Virus (Strauss et al., 1984), nsP3 des O'Nyong-Nyong-Virus (Lanciotti et al., 1998), nsP3 des Ross-River-Virus (Shirako & Yamaguchi, 2000), P150 des Rubellavirus (Dominguez et al., 1990), und das nsP3 des Semliki-Forest-Virus (Tuittila et al., 2000). Interessanterweise gibt es auch zahlreiche Homologe in verschiedenen zellulären Systemen (Allen et al., 2003). Zu diesen Homologen gehört beispielsweise auch die carboxyterminale Nicht-Histon-Domäne der humanen Histon-Protein-Variante "macroH2A". Aus diesem Grund werden die Proteine dieser Proteinfamilie oft auch als Makrodomänen (engl.: *macro domains*) bezeichnet (Allen et al., 2003). MacroH2A ist im Chromatin des beim weiblichen Geschlecht inaktivierten X-Chromosoms besonders

angereichert, und es wurde daher spekuliert, dass es an dessen transkriptionellem *silencing* beteiligt sein könnte (Costanzi & Pehrson, 1998, Perche et al., 2000). Seine genaue Rolle ist jedoch bisher nicht bekannt. Es gibt zur Zeit etwa 300 Makrodomänen-Proteine in der SMART Datenbank (Kumaran et al., 2005). Diese kommen in positivsträngigen RNA-Viren, Archeae sowie in Pilzen, Pflanzen und Tieren vor. Die weite (aber nicht ubiquitäre) Verbreitung von Makrodomänen in verschiedenen biologischen Systemen deutet darauf hin, dass diese Proteine an einem zentralen (gegenwärtig jedoch unbekanntem) zellulären Mechanismus beteiligt sein müssen (Allen et al., 2003).

Zu Beginn dieser Arbeit gab es nur sehr begrenzte Informationen über diese Proteinfamilie. Die einzige verwertbare Erkenntnis über mögliche Funktionen dieser Domäne hatte sich aus einer Studie zur Suche nach Proteinen, die am tRNA-Splicing bei Hefen beteiligt sein könnten, ergeben (Martzen et al., 1999). In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Makrodomäne YBR022w aus *S. cerevisiae* das Substrat ADP-Ribose-1"-Phosphat (Appr-1"-p) prozessieren kann. Das Molekül Appr-1"-p ist ein Nebenprodukt des tRNA-Splicings bei Eukaryonten (Culver et al., 1994, Genschik et al., 1997). Im ersten Schritt des tRNA-Splicings wird durch eine Endoribonuklease ein Intron aus der prä-tRNA herausgeschnitten. Die dabei entstandenen tRNA-Exon-Fragmente werden anschließend durch eine tRNA-Ligase wieder verknüpft, wobei an der Ligationsstelle unter anderem auch eine 2'-Phosphat-Gruppe entsteht (Phizicky & Greer, 1993, Phizicky et al., 1986, Schwartz et al., 1983). Diese Gruppe wird anschließend durch eine Phosphotransferase und weitere Kofaktoren entfernt, wodurch Nikotinamid und ADP-Ribose-1",2"-Zyklophosphat (Appr>p) als Nebenprodukte entstehen (Culver et al., 1993, Genschik et al., 1997). Appr>p wird anschließend durch eine zyklische Nukleotid-Phosphodiesterase (CPDase) in Appr-1"-p umgesetzt (Culver et al., 1994, Genschik et al., 1997), welches wiederum von YBR022w prozessiert werden kann. Zu Beginn dieser Arbeit gab es noch keine Informationen darüber, ob – neben dem Protein YBR022w – auch andere Makrodomänen Appr-1"-p prozessieren können.

Die Kristallstruktur des Proteins AF1521 aus *Archaeoglobus fulgidus* lieferte erste strukturelle Informationen über Makrodomänen (Allen et al., 2003). AF1521 ist ein relativ kompaktes Protein, das aus einer einzigen Domäne besteht, die von sieben  $\beta$ -

Faltblättern und fünf  $\alpha$ -Helices gebildet wird. In der Kristallstruktur zeigte sich eine Vertiefung auf der Proteinoberfläche, in der ein Puffermolekül [3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid, MES] aus dem Kristallisationspuffer identifiziert wurde. Aminosäurereste, die sich in räumlicher Nähe zu diesem Molekül befanden bzw. es mittels Wasserstoffbrückenbindungen kontaktierten, erwiesen sich als konserviert in anderen Makrodomänen, was die Vermutung nahelegte, dass das Puffermolekül den natürlichen Liganden imitiert und somit die Lage des aktiven Zentrums markiert. Zu diesen konservierten Aminosäuren gehörten (1) eine Glycin-reiche Sequenz, die Teil einer Schleife zwischen dem  $\beta$ -Faltblatt #3 und der  $\alpha$ -Helix #1 ist, (2) zwei Asn-Reste im  $\beta$ -Strang #3 und (3) Aminosäuren zwischen dem  $\beta$ -Strang #6 und der  $\alpha$ -Helix #4 (Allen et al., 2003). Der zentrale Teil des Proteins AF1521 –einschließlich des putativen aktiven Zentrums– zeigte entfernte strukturelle Ähnlichkeiten zu einigen Proteinen aus der Superfamilie der P-loop-enthaltenden Nukleotidtriphosphatase (z. B. RecA oder F1-ATPase) (Allen et al., 2003). Diese Proteinfamilie ist bereits gut charakterisiert (Leipe et al., 2002). So enthalten diese Nukleotidtriphosphatasen eine sogenannte P-Schleife, die mit dem Triphosphat des Substrates interagiert. In der Kristallstruktur von AF1521 konnte eine ähnliche Schleifenstruktur, die ein unter den Makrodomänen gut konserviertes Motiv, GDIT, enthält, zwischen dem  $\beta$ -Faltblatt #2 und einer  $3_{10}$ -Helix identifiziert werden. Darüber hinaus wurde in der AF1521-Struktur ein weiteres unter den Makrodomänen konserviertes Motiv im  $\beta$ -Faltblatt #5 identifiziert, das dem Walker-B-Motiv von Nukleotidtriphosphatasen ähnelt. Es ist an der Katalyse bei P-Loop-enthaltenden Nukleotidtriphosphatasen beteiligt.

Aufgrund der Sequenzverwandtschaft mit Makrodomänenproteinen, unter anderem dem Hefeprotein YBR002w, war für die konservierte coronavirale X-Domäne eine Appr-1"-pase-Aktivität vorhergesagt, jedoch nicht experimentell bestätigt worden (Snijder 2003).

### 1.6.4 Die Y-Domäne

Die Y-Domäne umfaßt etwa 450-490 Aminosäuren und ist bei allen Coronaviren konserviert. Sie enthält zwei hydrophobe Bereiche, und in ihrem aminoterminalen



Anteil finden sich elf konservierte Cys/His-Reste. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde vermutet, dass die Y-Domäne an der Verankerung von nsp3 oder auch anderen pp1a/pp1ab-Bereichen an intrazellulären Membranen beteiligt ist und dass sie  $Zn^{2+}$  oder andere Metallionen bindet (Ziebuhr et al., 2001). Durch Immunfluoreszenzmikroskopie wurde darüber hinaus gezeigt, dass nsp3 (oder einer seiner Vorläuferproteine) in MHV-infizierten Zellen perinukleär lokalisiert und mit vesikulären Membranstrukturen assoziiert ist (Bi et al., 1998).

## 2. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

### 2.1 Die PL1<sup>Pro</sup>-katalysierte proteolytische Prozessierung des nichtstrukturellen Proteins 3 von TGEV und SARS-CoV

#### \*2.1.1 Die Aktivität und Substratspezifität der PL1<sup>Pro</sup> von TGEV<sup>\*,5</sup>

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, war die PL<sup>Pro</sup>-vermittelte Prozessierung des coronaviralen nsp3 zu Beginn der Arbeit bereits für MHV, IBV und HCoV-229E charakterisiert worden. Diese Daten hatten ergeben, dass –trotz des geringen Konservierungsgrades des aminoproximalen Bereiches der Polyproteine pp1a/pp1ab– bestimmte funktionelle Domänen bei allen Coronaviren konserviert sind (Ziebuhr et al., 2001). Unterschiede zwischen diesen Viren hatten sich jedoch sowohl hinsichtlich der Anzahl als auch der Funktion dieser PL<sup>Pro</sup>-Domänen ergeben. Um ein noch besseres Verständnis der konservierten und nichtkonservierten Eigenschaften und Funktionen coronaviraler PL<sup>Pro</sup>-Domänen zu gewinnen, sollten die beiden bei TGEV konservierten PL<sup>Pro</sup>-Domänen (PL1<sup>Pro</sup> und PL2<sup>Pro</sup>) näher untersucht werden (Eleouet et al., 1995, Penzes et al., 2001). Ein besonderer Schwerpunkt der Arbeit lag dabei auf der Charakterisierung der durch die PL1<sup>Pro</sup> vermittelten proteolytischen Prozessierung des aminoterminalen Endes von TGEV-nsp3.

Es wurde zunächst die kodierende Sequenz der TGEV-pp1a/pp1ab-Reste Thr<sup>785</sup> bis Gln<sup>1335</sup> *in vitro* in einem Retikulozytenlysat translatiert. Dieses Protein (785–1335 [WT]) enthält den aminoproximalen Bereich des TGEV-nsp3 und enthält auch die putative PL1<sup>Pro</sup>, die saure Domäne sowie die vorhergesagte PL1<sup>Pro</sup>-Schnittstelle <sup>878</sup>GG|G<sup>880</sup>. Gly<sup>880</sup> war der vermutete Aminoterminus von nsp3. Als Negativkontrolle in diesem *In-vitro*-Translationsexperiment wurde ein Protein exprimiert, bei dem durch ortsspezifische Mutagenese das Kodon des putativen katalytischen Cys<sup>1093</sup>-Restes gegen ein Ala-Kodon ausgetauscht worden war. Nach der Translation der beiden Proteine in

---

\* Bemerkung: Die hier angegebene Nummer verweist auf die im Teil 8 („Veröffentlichungen“) angefügten Publikationen, die die im gegebenen Abschnitt zusammengefassten Daten enthalten.

Gegenwart von [<sup>35</sup>S]-markiertem L-Methionin wurden die Translationsprodukte in SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert. Die Expression der Wildtyp-Sequenz ergab zwei Produkte von 68 kD und 10 kD, während die Expression des im vermuteten aktiven Zentrum veränderten Proteins lediglich *ein* Produkt ergab. Die Daten zeigen, daß die exprimierte Sequenz die vermutete sequenzspezifische proteolytische Aktivität besitzt und daß man diese Aktivität durch Substitution des putativen nukleophilen Cys<sup>1093</sup>-Restes blockieren kann. Letzteres Ergebnis schließt eine Beteiligung von (eventuell vorhandenen) Proteasen im Retikulozytenlysat als Ursache der beobachteten proteolytischen Aktivität weitgehend aus und zeigt die essentielle (vermutlich katalytische) Rolle des Cys-Restes 1093 im TGEV-Replikase-Polyprotein.

Überraschenderweise unterschied sich das im SDS-Gel ermittelte Molekulargewicht des größeren Spaltproduktes jedoch signifikant von dem berechneten Molekulargewicht, legt man eine Spaltung an der vorhergesagten Position zugrunde. Um zu klären, ob die unerwartete Größe des Spaltproduktes auf eine Spaltung an einer anderen (als der erwarteten) Stelle oder aber auf ein abweichendes Laufverhalten im SDS-Polyacrylamid-Gel zurückzuführen ist, wurden Proteine (785–879 und 880–1335) in zwei getrennten Reaktionen translatiert, die den N-terminalen und C-terminalen Produkten bei einer Spaltung des Proteins 785–1335 (Thr<sup>785</sup>-Gly<sup>879</sup>) an der vorhergesagten Spaltstelle entsprachen. Anschließend wurden diese zusammen mit den bei der autoproteolytischen Prozessierung entstehenden Spaltprodukten mittels SDS-PAGE Seite an Seite im gleichen Gel analysiert. Die beiden Proteine wanderten im Gel auf exakt der gleichen Position wie auch die beiden autoproteolytischen Prozessierungsprodukte, woraus geschlossen werden konnte, dass die Spaltung (wie vorhergesagt) wahrscheinlich innerhalb der Sequenz <sup>878</sup>GG|G<sup>880</sup> erfolgt und dass das 68-kD-große Spaltprodukt (das offenbar ein nicht seiner Größe entsprechendes Laufverhalten in SDS-Gelen besitzt) das carboxyterminale Spaltprodukt darstellt.

Einen weiteren starken Hinweis für eine Spaltung innerhalb der Sequenz <sup>878</sup>GG|G<sup>880</sup> lieferte die Analyse eines weiteren 785–1335-Derivats, bei dem die drei pp1a/pp1ab-Gly-Reste 878, 879 und 880 der vermuteten Spaltstelle durch Alanin ersetzt wurden. Es zeigte sich nämlich hierbei, dass diese Substitution die proteolytische Prozessierung dieses Proteins vollständig blockierte. Um absolute Sicherheit

hinsichtlich der von der PL1<sup>pro</sup> gespaltenen Peptidbindung zu erlangen, wurde schließlich noch eine N-terminale Radiosequenzierung des C-terminalen Spaltproduktes durchgeführt. Um die für eine solche Edman-Analyse erforderliche spezifische Aktivität im zu analysierenden Protein zu erzeugen, wurde ein weiteres Derivat des 785–1335-Proteins translatiert (785-1335\_V884M/V890M), bei dem zwei C-terminal zur putativen Spaltstelle gelegene Val-Reste (Val<sup>884</sup> und Val<sup>890</sup>) gegen Met-Reste ausgetauscht wurden, die eine spezifische Markierung dieser Reste mittels [<sup>35</sup>S]-L-Methionin ermöglichen sollten. Nachdem gezeigt werden konnte, dass diese Substitutionen zu keiner Änderung der Aktivität und Spezifität des Testproteins führte, wurde der N-Terminus des C-terminalen Spaltproduktes nach seiner Auftrennung im SDS-Polyacrylamid-Gel und anschließendem Transfer auf eine PVDF-Membran mittels Edman-Degradation und Szintillationsmessung der in den einzelnen Abbauschritten entstehenden PTH-Aminosäuren analysiert. Übereinstimmend mit den vorherigen Ergebnissen ergab die Sequenzierung, dass die PL1<sup>pro</sup> die Peptidbindung zwischen den Aminosäuren Gly<sup>879</sup> und Gly<sup>880</sup> in den TGEV-Polyproteinen pp1a/pp1ab spaltet.

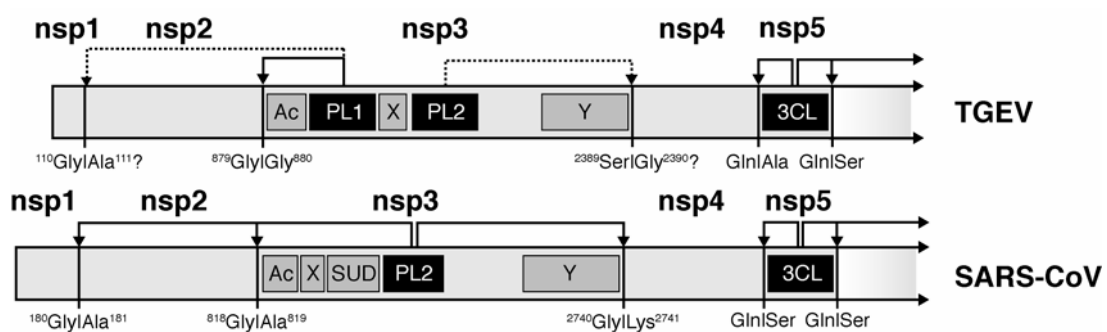
### 2.1.2 Identifizierung des nichtstrukturellen Proteins 2 (nsp2) in TGEV-infizierten Zellen<sup>5</sup>

Die oben beschriebene Identifizierung der PL1<sup>pro</sup>-Schnittstelle <sup>879</sup>G|G<sup>880</sup> und die Vorhersage einer weiteren Schnittstelle, <sup>110</sup>G|A<sup>111</sup>, im aminoterminalen Bereich des TGEV-Replikasepolyproteins (Ziebuhr et al., 2001) legten die Vermutung nahe, dass das TGEV-nsp2 die pp1a/pp1ab-Aminosäurereste Ala<sup>111</sup> bis Gly<sup>879</sup> umfaßt. Um diese Vorhersage experimentell zu bestätigen, wurde versucht, die Expression von nsp2 in TGEV-infizierten Zellen nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Peptidsequenz von Lys<sup>526</sup> bis Asp<sup>713</sup> der TGEV-Polyproteine pp1a/pp1ab als maltosebindendes Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und anschließend mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Dieses bakteriell exprimierte Protein wurde für die Immunisierung von Kaninchen verwendet, um ein Antiserum namens T3 zu erzeugen, das für die oben beschriebene Sequenz des TGEV-nsp2 spezifisch war und

somit für die geplanten Immunpräzipitationsexperimente verwendet werden konnte. Es wurden ST-Zellen (Schweinehodenzellen) mit TGEV infiziert bzw. scheininfiziert und 8 Stunden nach der Infektion für 3 Stunden mit [<sup>35</sup>S]-L-Methionin metabolisch markiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und das Lysat entweder direkt oder nach einer Immunpräzipitation mit dem Antiserum T3 durch SDS-PAGE analysiert. Es zeigte sich, dass das Antiserum T3 spezifisch ein Protein mit einer scheinbaren Molekularmasse von ~85 kD aus TGEV-infizierten Zellen präzipitierte. Das ~85-kD-Protein wurde hingegen nicht von dem zugehörigen Präimmenserum präzipitiert und konnte auch in den scheininfizierten Zellen nicht nachgewiesen werden. Die Molekularmasse dieses Proteins entsprach der berechneten Molekularmasse für nsp2 (wenn diese unter der Annahme erfolgte, dass das Protein durch PL1<sup>pro</sup>-vermittelte Spaltungen der Peptidbindungen <sup>110</sup>G|A<sup>111</sup> und <sup>879</sup>G|G<sup>880</sup> erfolgt). Diese Daten deuten stark darauf hin, dass die TGEV-Polyproteine pp1a/pp1ab in infizierten Zellen tatsächlich an den Spaltstellen <sup>110</sup>G|A<sup>111</sup> und <sup>879</sup>G|G<sup>880</sup> prozessiert werden, wodurch dann nsp1 und nsp2 freigesetzt werden. Das N-terminale Prozessierungsprodukt nsp1 bleibt jedoch noch in infizierten Zellen nachzuweisen.

Durch vorherige Sequenzvergleiche des TGEV-Genoms mit den genomischen Sequenzen anderer Coronaviren wurden zahlreiche im coronaviralen Replikasegen konservierte Funktionen identifiziert (Eleouet et al., 1995, Penzes et al., 2001). Von diesen Funktionen wurde bisher jedoch nur die im nsp5 gelegene Hauptprotease von TGEV in struktureller und biochemischer Hinsicht ausführlich charakterisiert (Anand et al., 2002, Hegyi & Ziebuhr, 2002). Darüber hinaus gab es keinerlei Daten zu anderen replikativen Proteinen von TGEV. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb die Aktivität und Substratspezifität der im nsp3 lokalisierten PL1<sup>pro</sup> von TGEV untersucht. Auf der Grundlage der in dieser Arbeit gewonnenen Daten sowie der über die PL<sup>pro</sup>-vermittelte Prozessierung der Polyproteine pp1a/pp1ab von HCoV-229E, MHV und IBV publizierten Daten (Ziebuhr et al., 2000) lässt sich ein Schema für die proteolytische Prozessierung des aminoterminalen Bereichs der TGEV-Polyproteine pp1a/pp1ab ableiten (Abb. 4). Das Modell zeigt, dass PL1<sup>pro</sup> zwischen Gly<sup>879</sup> und Gly<sup>880</sup> spaltet, um den C-Terminus von nsp2 und den N-terminus von nsp3 freizusetzen. Außerdem deutet das Molekulargewicht des in TGEV-infizierten Zellen nachgewiesenen Proteins nsp2 darauf hin, dass – wie vorhergesagt (Ziebuhr et al., 2001)

– eine proteolytische Spaltung zwischen den Aminosäuren Gly<sup>110</sup> und Ala<sup>111</sup> (nsp1|nsp2) stattfindet. Da die äquivalente Spaltung bei HCoV-229E und MHV von der PL1<sup>pro</sup> katalysiert wird, ist es sehr wahrscheinlich, daß diese Spaltung auch bei TGEV von der PL1<sup>pro</sup> katalysiert wird. Aufgrund der relativ nahen Verwandtschaft zwischen den beiden Gruppe-I-Coronaviren HCoV-229E und TGEV und der sehr ähnlichen Domänenstruktur ihrer nsp3-Produkte (Ziebuhr et al., 2001) liegt es nahe, zu spekulieren, dass die Spaltstelle nsp2|nsp3 nicht nur von der PL1<sup>pro</sup>, sondern auch von der PL2<sup>pro</sup> prozessiert werden kann. Diese Hypothese muß jedoch noch durch weitere Experimente bestätigt werden. Gleiches gilt für die putative PL2<sup>pro</sup>-Spaltstelle nsp3|nsp4, die vermutlich zwischen den Aminosäureresten Ser<sup>2389</sup> und Gly<sup>2390</sup> liegt. Eine weitere interessante Fragestellung wäre es, zu untersuchen, ob die beim HCoV-229E gezeigte Unterdrückung der PL1<sup>pro</sup>-Aktivität durch PL2<sup>pro</sup> an der nsp2|nsp3-Spaltstelle (Ziebuhr et al., 2001) auch bei TGEV auftritt, was ein starke Evidenz für dessen biologische Bedeutung (z. B. einen Mechanismus zur Regulation coronaviraler Proteaseaktivitäten) darstellen würde.



**Abb. 4: Die proteolytische Prozessierung der aminoterminalen Region der Polyproteine pp1a und pp1ab von TGEV und SARS-CoV.** Pfeile mit durchgezogenen Linien stellen die Prozessierung an bereits identifizierten Schnittstellen dar, wohingegen gestrichelte Pfeile auf vorhergesagte Schnittstellen hindeuten. Die Positionen P1 und P1' der Schnittstellen sowie deren durch autoproteolytische Prozessierung entstandenen Produkte (nsp) sind dargestellt. Vorhergesagte Schnittstellen sind durch ein Fragezeichen gekennzeichnet. Die autoproteolytisch aktiven Enzyme sind schwarz unterlegt, weitere Domänen in grau. Abkürzungen: Ac: saure Domäne; PL1: Papain-ähnliche Protease 1; PL2: Papain-ähnliche protease 2; X: X-Domäne (Appr-1''-pase); Y: Y-Domäne mit hydrophobem Bereich und putativem Zinkfinger; 3CL: 3C-ähnliche Protease

### 2.1.3 Identifizierung der PL2<sup>pro</sup>-Aktivität von SARS-CoV<sup>1</sup>

Die rasche Ausbreitung des 2003 erstmals aufgetretenen SARS-Coronavirus, das mit einer hohen Mortalität und Kontagiosität assoziiert war, veranlaßte zahlreiche Laboratorien weltweit, die Eigenschaften dieses Virus umfassend zu charakterisieren. Durch Sequenzvergleiche des SARS-CoV-Replikasegens mit den entsprechenden Genen der bereits bekannten Coronaviren wurde auch die proteolytische Prozessierung des Replikasepolyproteins sowie mögliche Prozessierungsspaltstellen und -produkte vorhergesagt (Snijder et al., 2003, Thiel et al., 2003). Interessanterweise konnte im SARS-CoV-Replikasepolyprotein (im Gegensatz zu allen bisher bekannten Coronavirus-Polyproteinen) nur eine einzige Papain-ähnliche Protease vorhergesagt werden, die den aminoproximalen Bereich des Replikasepolyproteins vermutlich an drei Stellen spalten kann. Aufgrund ihrer Position innerhalb von nsp3 (carboxyproximal zur sogenannten X-Domäne) wurde die bei SARS-CoV gefundene Papain-ähnliche Protease, wie auch bei allen anderen Coronaviren, PL2<sup>pro</sup> genannt (Snijder et al., 2003). Außerdem wurde aminoterminal zur PL2<sup>pro</sup>-Domäne eine neue, nur bei SARS-CoV konservierte Domäne unbekannter Funktion entdeckt, die als SUD (engl.: *SARS-CoV unique domain*) bezeichnet wurde (Snijder et al., 2003).

In dieser Arbeit sollte die proteolytische Aktivität der SARS-CoV-PL2<sup>pro</sup> verifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde die Peptidsequenz Lys<sup>737</sup>-Ser<sup>1858</sup> der SARS-CoV-pp1a/pp1ab exprimiert. Dieses Protein enthält einen Anteil, der aminoterminal zur vermuteten nsp2|nsp3-Spaltstelle (<sup>818</sup>G|A<sup>819</sup>) lag, sowie die Ac-, X-, SUD- und PL2<sup>pro</sup>-Domänen. Als Negativ-Kontrolle wurde eine mutierte Version des wildtypischen Proteins erzeugt, bei der das putative katalytische Cys<sup>1651</sup> der PL2<sup>pro</sup> durch Ala ersetzt war. Diese beiden Proteine wurden in einem Kaninchenretikulozytenlysat in Gegenwart von [<sup>35</sup>S]-L-Methionin translatiert und anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt. Wir hatten erwartet, dass das translatierte Protein (berechnete Molekularmasse: 125 kD) an der Schnittstelle <sup>818</sup>G|A<sup>819</sup> gespalten wird, wodurch zwei Proteine erzeugt würden, die 115 kD und 9 kD groß sind. Die Ergebnisse zeigten, dass neben dem (ungespaltenen) Volle-Länge-Protein von 125 kD ein weiteres Protein von etwa 115 kD entstanden war. Das kleinere der beiden erwarteten Spaltprodukte von etwa 9 kDa konnte hingegen nicht überzeugend nachgewiesen werden. Dies ist wahrscheinlich auf die Tatsache

zurückzuführen, dass dieses Spaltprodukt nur zwei Methioninreste enthält und somit eine geringe spezifische Aktivität besitzt. Bei der erzeugten Mutante konnte hingegen, wie erwartet, keine Spaltung beobachtet werden. Diese Daten zeigen, dass die SARS-CoV-PL2<sup>pro</sup>-Domäne proteolytisch aktiv ist und sie die Polyproteine pp1a und pp1ab zwischen den Aminosäuren Gly<sup>818</sup> und Ala<sup>819</sup> (oder an Resten in deren unmittelbarer Nähe) autoproteolytisch spaltet. Die Aminosäure Cys<sup>1651</sup> erwies sich als essentiell für die proteolytische Aktivität, was ihre vorhergesagte katalytische Funktion unterstützt.

Darüber hinaus wurde ein computergestützter Sequenzvergleich der PL<sup>pro</sup>-Spaltstellen von SARS-CoV, HCoV-229E und IBV durchgeführt. Die Daten zeigten, dass die Sequenzen der SARS-CoV-PL2<sup>pro</sup>-Spaltstellen, ähnlich denen der IBV-PL2<sup>pro</sup>, stärker konserviert sind als die äquivalenten Spaltstellen der PL1<sup>pro</sup> bzw. PL2<sup>pro</sup> von HCoV-229E. Die Tatsache, dass die HCoV-229E-PL<sup>pro</sup>-Spaltstellen weniger konserviert sind, steht vermutlich damit im Zusammenhang, dass die HCoV-229E-PL1<sup>pro</sup> und -PL2<sup>pro</sup> eine überlappende Substratspezifität besitzen (Ziebuhr et al., 2001) und ihre Evolution durch die Notwendigkeit zur Konservierung dieser überlappenden Spezifität getrieben wurde. Die PL2<sup>pro</sup>-Domänen von SARS-CoV und IBV, die, im Gegensatz zu HCoV-229E, nur eine einzige (aktive) Papain-ähnliche Protease besitzen, waren diesem Selektionsdruck nicht ausgesetzt und konnten somit eine klar definierte Spezifität für eine an allen Spaltstellen konservierte Peptidsequenz entwickeln.

Neben der in dieser Arbeit nachgewiesenen PL2<sup>pro</sup>-Spaltstelle nsp2|nsp3 gelang es Harcourt et al. in einer späteren Studie, zwei weitere vorhergesagte Spaltstellen von nsp1|nsp2 bzw. nsp3|nsp4 mittels eines Trans-Spaltungs-Assays zu verifizieren (Harcourt et al., 2004). Diese Daten bestätigten die hier gezeigten Ergebnisse und Vorhersagen in vollem Umfang. Interessanterweise konnte die proteolytische Aktivität von PL2<sup>pro</sup> an der Spaltstelle nsp3|nsp4 nur dann nachgewiesen werden, wenn eine C-terminale hydrophobe Domäne koexprimiert wurde. Für diese hydrophobe Domäne konnte gezeigt werden, dass sie für die Verankerung an Membranen verantwortlich ist. Man nimmt deshalb an, dass nsp3 durch diese hydrophobe Domäne an Membranstrukturen der infizierten Zelle verankert wird (Harcourt et al., 2004). Die Substitution von Cystein<sup>1651</sup> zu Alanin führte auch in dieser späteren Studie zu den gleichen (wie den hier vorgestellten) Ergebnissen. Darüber hinaus konnten jedoch auch



noch weitere Spaltprodukte der Replikasepolyproteine, nämlich nsp1, nsp2 und nsp3, in SARS-CoV-infizierten Zellen nachgewiesen werden (Harcourt et al., 2004).

Inzwischen wurde die proteolytische Aktivität von SARS-CoV-PL2<sup>pro</sup>, die mittels rekombinanter Baculoviren in Insektenzellen exprimiert wurde, ausführlich charakterisiert (Han et al., 2005). Insbesondere konnte auch (mittels geeigneter Peptidsubstrate) die Spezifität der SARS-CoV-PL2<sup>pro</sup> für die vorhergesagten Spaltstellen, <sup>180</sup>Gly/Ala<sup>181</sup>, <sup>818</sup>Gly/Ala<sup>819</sup> und <sup>2740</sup>Gly/Lys<sup>2741</sup>, bestätigt werden. Von besonderer Wichtigkeit für eine effiziente Spaltung erwiesen sich die Positionen P1, P4 und P6 im Substrat (Han et al., 2005). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der putativ katalytische His<sup>1812</sup>-Rest zusammen mit dem in dieser Arbeit untersuchten katalytischen Cys<sup>1651</sup>-Rest vermutlich eine katalytische Dyade ausbildet, wie sie für Papain-ähnliche Cysteinproteasen typisch ist (Han et al., 2005). Aufgrund weiterer Sequenzvergleiche der Papain-ähnlichen Protease PL2<sup>pro</sup> von SARS-CoV und 16 weiteren Coronavirus-PL<sup>pro</sup>s wurde diese Dyade zu einer möglichen katalytischen Triade (Cys<sup>1651</sup>-His<sup>1812</sup>-Asp<sup>1826</sup>) erweitert (Barretto et al., 2005), deren funktionelle Relevanz jedoch noch in weiteren Experimenten bestätigt werden muss. Ähnlich wie alle anderen Coronavirus-PL<sup>pro</sup>s (Herold et al., 1999) verfügt auch die SARS-CoV-PL2<sup>pro</sup> über eine Zink-bindende Domäne, welche essentiell für die proteolytische Aktivität der Protease ist, wie mittels Mutationsanalyse bestätigt werden konnte (Barretto et al., 2005).

Überraschenderweise zeigten kürzlich veröffentlichte Daten, dass die SARS-CoV-PL2<sup>pro</sup> neben ihrer virusprotein-spezifischen, proteolytischen Aktivität auch eine deubiquitinierende Aktivität besitzt (Barretto et al., 2005, Lindner et al., 2005). Ubiquitin-spezifische Proteasen gehören zur Familie der Cysteinproteasen und entfernen sowohl Ubiquitin als auch Ubiquitin-ähnliche Polypeptide (engl.: *ubiquitin-like modifier*, Ubl ) von Proteinen (Kurepa et al., 2003). Durch ihre Deubiquitinierungsfunktion spielen diese Enzyme eine wichtige Rolle bei der Regulation der Modifikation von Proteinen und können somit auch die Regulation zellulärer Reaktionswege beeinflussen. Die in *E. coli* exprimierte SARS-CoV-PL2<sup>pro</sup> konnte das Substrat Ub-AMC (engl.: *ubiquitin-7-amino-4-methylcoumarin*) sowie verzweigte Polyubiquitin-Ketten und das Ubiquitin-ähnliche Polypeptid (Ubl) hydrolysieren (Lindner et al., 2005). Studien mittels ortsspezifischer Mutagenese

ergaben, dass die SARS-CoV-PL2<sup>pro</sup> eine klare Präferenz für Peptide mit der Konsensus-Sequenz LXGG besitzt. Dieses Sequenzmotiv wird auch von zellulären deubiquitinierenden Enzymen erkannt (Barretto et al., 2005). Schließlich konnte die deubiquitinierende Aktivität der SARS-CoV-PL2<sup>pro</sup> auch durch einen spezifischen Inhibitor deubiquitinierender Enzyme (Ubiquitinaldehyd) inaktiviert werden (Lindner et al., 2005).

Die Ubiquitinierung zellulärer Proteine hat eine wichtige regulatorische Funktion in der Zelle (Amerik & Hochstrasser, 2004). Es ist auch bekannt, dass Interferone die Modifikation zellulärer Proteine mittels Ubl induzieren können und dass diese Proteinmodifikation zur natürlichen Immunität gegenüber Viren beiträgt (Ritchie et al., 2004). Es wurde daher spekuliert, dass die SARS-PL2<sup>pro</sup> durch ihre Fähigkeit, Ubl abspalten zu können, diesem Interferon-induzierten Prozess entgegenwirken könnte. Diese mögliche regulative Funktion der PL<sup>pro</sup> innerhalb der Wirtszelle in einer für das Virus günstigen Weise bleibt jedoch noch im Detail zu untersuchen (Lindner et al., 2005, Sulea et al., 2005).

## **2.2 Die coronavirale X-Domäne ist eine Appr-1''-pase-, die für die Virusreplikation in Zellkultur entbehrlich ist**

### **2.2.1 Die konservierte X-Domäne in nsp3 von HCoV-229E ist eine hochspezifische Phosphatase, die Appr-1''-p in Appr umsetzt<sup>3,4</sup>**

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die enzymatische Aktivität einer weiteren Domäne im coronaviralen nsp3, der sogenannten X-Domäne, untersucht werden. Dafür wurde HCoV-229E als Modellvirus verwendet. Für die Auswahl von HCoV-229E sprach, dass im Labor ein gut etabliertes revers-genetisches System für HCoV-229E (Thiel et al., 2001a) zur Verfügung stand, welches nach der (geplanten) *In-vitro*-Analyse der HCoV-229E-X-Domäne auch eine Charakterisierung im Kontext einer Virusinfektion von Zellen in Kultur ermöglichte.

X-Domänen sind auch bei einigen anderen positivsträngigen RNA Viren, wie Hepatitis-E-Virus, Rubellavirus und Alphaviren konserviert (Gorbalenya et al., 1991). Darüber hinaus wurden homologe Proteine in vielen zellulären Systemen, beispielsweise in Hefen, Bakterien, Pflanzen und Säugetieren identifiziert. Zu diesen Homologen gehört beispielsweise auch die carboxyterminale Nicht-Histon-Domäne der humanen Histon-Protein-Variante „macroH2A“, weshalb diese Proteinfamilie oftmals auch als Makrodomän-Familie bezeichnet wird (Allen et al., 2003). Trotz ihrer weiten Verbreitung waren diese Proteine zu Beginn dieser Arbeit in funktioneller oder struktureller Hinsicht kaum untersucht worden. Die einzige verfügbare Information zur möglichen enzymatischen Aktivität der viralen X-Domäne lieferten Daten von Martzen et al., die zeigten, dass das Makrodomänen-Homolog Poa1p (früher YBR022w) aus *S. cerevisiae* Appr-1"-p prozessieren kann (Martzen et al., 1999). Eine weitergehende Analyse der katalysierten Reaktion und des entstehenden Prozessierungsproduktes wurde jedoch zu diesem Zeitpunkt nicht erfolgt (Martzen et al., 1999).

Aufgrund der Sequenzverwandtschaft mit Poa1p und anderen Proteinen dieser Familie wurde für die coronavirale X-Domäne eine Appr-1"-pase-Aktivität vorhergesagt (Snjider 2003). Um die Appr-1"-pase-Aktivität experimentell nachzuweisen, wurden die HCoV-229E-pp1a/pp1ab-Reste Glu<sup>1265</sup> bis Val<sup>1436</sup> (also die X-Domäne mit den von uns vermuteten Domänengrenzen) als Fusionsprotein mit dem maltosebindenden Protein in *E. coli* überexprimiert. Unsere Vorhersagen zu den möglichen Grenzen der X-Domäne in den Polyproteinen pp1a/pp1ab wurden durch Sequenzvergleiche mit anderen coronaviralen X-Domänen (Ziebuhr et al., 2001) sowie weiteren zellulären Homologen, wie dem AF1521-Protein aus *A. fulgidus* und dem YMX7-Protein aus *S. cerevisiae*, gestützt. Das in *E. coli* exprimierte Fusionsprotein wurde durch Affinitätschromatographie aufgereinigt und anschließend mit der Endoprotease Xa gespalten, um die X-Domäne aus dem Fusionsprotein freizusetzen. Darüber hinaus wurde als Negativ-Kontrolle eine mutierte Form der X-Domäne exprimiert, bei der zwei hochkonservierte Asn-Reste, Asn<sup>1302</sup> und Asn<sup>1305</sup>, gegen Alanin ausgetauscht worden waren. Zur Analyse der Appr-1"-pase-Aktivität wurden die bakteriell exprimierten X-Domänen mit dem Substrat Appr-1"-p inkubiert, das durch Behandlung von chemisch synthetisiertem Appr-1"-p mit zyklischer Phosphodiesterase (aus *Arabidopsis thaliana*) hergestellt worden war. Die Analyse der Reaktionsgemische

mittels Dünnschichtchromatographie ergab bei der Reaktion mit der rekombinant hergestellten X-Domäne ein Produkt, das mit der als Markernukleotid eingesetzten ADP-Ribose (Appr) komigrierte. Dasselbe Produkt entstand auch bei der Inkubation mit einer unspezifischen Phosphohydrolase, nämlich der alkalischen Phosphatase aus Kalbsdarm (engl.: *calf intestine phosphatase*, CIP), die in diesem Experiment aufgrund ihrer breiten Substratspezifität als Positiv-Kontrolle verwendet wurde. Keine Prozessierungsaktivität konnte hingegen für die Asn<sup>1302</sup>-Asn<sup>1305</sup>-Doppelmutante beobachtet werden. Diese Daten zeigten, dass das Substrat Appr-1"-p zu Appr dephosphoryliert wurde und dass diese Reaktion von der X-Domäne (nicht jedoch einer eventuell im gereinigten Protein vorhandenen bakteriellen [Rest-] Aktivität) katalysiert wurde. Zur weiteren Bestätigung der chemischen Identität des Reaktionsproduktes wurde dieses mittels unterschiedlicher Dünnschichtchromatographieverfahren (in unterschiedlichen Trennmedien und Lösungsmitteln) analysiert. Die erhaltenen Daten ergaben eindeutig, dass das von der X-Domäne umgesetzte Reaktionsprodukt Appr ist. Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die HCoV-229E-X-Domäne eine Phosphoesterase ist, die Appr-1"-p zu Appr dephosphorylieren kann.

Aus den gewonnenen Ergebnissen ergab sich die Frage, ob die coronavirale X-Domäne spezifisch für das Substrat Appr-1"-p ist oder ob sie noch andere, strukturell ähnliche Substrate hydrolysieren kann. Als mögliche Substrate wurden zunächst verschiedene Nucleosidphosphatderivate, wie 5'-AMP, 3'-AMP, 2'-AMP, ADP und ATP getestet. Die wildtypische X-Domäne bzw. die Positiv-Kontrolle CIP wurde jeweils mit einem der Nucleotidphosphate inkubiert und das Reaktionsgemisch anschließend mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Während CIP alle diese Moleküle dephosphorylierte, konnte in Reaktionen mit der coronaviralen X-Domäne keinerlei Aktivität nachgewiesen werden. In einem weiteren Experiment wurden  $\alpha$ -NAD,  $\beta$ -NAD,  $\alpha$ -NADP und  $\beta$ -NADP getestet. Obwohl auch diese Moleküle die Grundstruktur Appr enthalten, wurde keines dieser Moleküle von der X-Domäne prozessiert. Diese Daten legten daher den Schluss nahe, dass die HCoV-229E-X-Domäne hochspezifisch für Appr-1"-p ist.

Die Daten liefern eine erste biochemische Evidenz für die enzymatische Aktivität der coronaviralen X-Domäne. Es bleibt zu klären, ob die zahlreichen verwandten (zellulären und viralen) Proteine ebenfalls diese Aktivität und Spezifität

besitzen. Wie die kürzlich veröffentlichten Daten von Karras et al. zeigen, haben jedoch zumindest einige dieser Proteine eine solche Aktivität, so zum Beispiel das AF1521-Protein aus *A. fulgidus* (Karras et al., 2005). Übereinstimmend mit unseren Daten wurde auch in dieser Studie das Prozessierungsprodukt als Appr-1"-p bestimmt. Darüber hinaus zeigten kalorimetrische Untersuchungen, dass das Protein AF1521, ähnlich wie die HCoV-229E-X-Domäne in unseren Experimenten, eine ausgeprägte Spezifität für Appr-1"-p besitzt. Neben der distalen Ribose und der Diphosphat-Gruppe erwies sich auch die Adenin-Base als entscheidender Faktor für die spezifische Bindung. Vor kurzem wurde eine weitere Studie von Shull *et al.* veröffentlicht, in der die Appr-1"-pase-Aktivität des X-Domänen-Homologs Poa1p charakterisiert wurde (Shull et al., 2005). Die biochemischen Eigenschaften des Hefe-Proteins Poa1p waren denen der HCoV-229E-X-Domäne sehr ähnlich. So verlief die von Poa1p katalysierte Appr-1"-pase-Reaktion relativ langsam mit einer katalytischen Konstante ( $k_{\text{cat}}$ ) von etwa  $1,7 \text{ min}^{-1}$ . Auch für die HCoV-229E-X-Domäne hatten wir (unter den in unserem Experiment verwendeten Reaktionsbedingungen) lediglich eine  $k_{\text{cat}}$  von  $\sim 20 \text{ min}^{-1}$  erhalten. Poa1p erwies sich als ebenso hochspezifisch für das Substrat Appr-1"-p wie es die HCoV-229E-X-Domäne und AF1521 waren, so dass man spekulieren kann, dass die Fähigkeit zur hochspezifischen Bindung und Dephosphorylierung des Substrats Appr-1"-p eine konservierte Aktivität dieser Proteinfamilie ist.

### **2.2.2 Die Appr-1"-pase-Aktivität der coronaviralen X-Domäne ist konserviert: Identifizierung der Appr-1"-pase-Aktivität bei TGEV<sup>5</sup> und SARS-CoV<sup>3,4</sup>**

Die am wenigsten konservierte Region coronaviraler Replikasepolyproteine ist ihr N-terminaler Bereich (de Vries, 1997). Die coronavirale X-Domäne selbst ist jedoch absolut konserviert, auch wenn sich die sie flankierenden nsp3-Sequenzen bei den verschiedenen Coronaviren beträchtlich voneinander unterscheiden. Bei TGEV und HCoV-229E befindet sich die X-Domäne zwischen den zwei Papain-ähnlichen Proteasen, wobei das zwischen der X-Domäne und der PL2<sup>pro</sup> gelegene Segment bei HCoV-229E deutlich länger ist als bei TGEV (Ziebuhr et al., 2001). So trennen bei

HCoV-229E ca. 160 Aminosäurereste die X-Domäne von der PL2<sup>pro</sup>, während es bei TGEV nur etwa 10 Reste sind. Die Subdomänenstruktur des equivalenten Bereiches im nsp3 von SARS-CoV ist wiederum anders, da dieses Virus (siehe oben) nur eine einzige PL<sup>pro</sup>-Domäne (PL2<sup>pro</sup>) kodiert, die sich stromabwärts der X-Domäne befindet. Stromabwärts der X-Domäne befindet sich außerdem die bereits erwähnte SUD-Domäne, die spezifisch für SARS-CoV ist (Snijder et al., 2003). Um zu untersuchen, ob trotz dieser Unterschiede die enzymatische Aktivität der X-Domäne in der Evolution von Coronaviren konserviert worden ist, sollten die Appr-1"-pase-Aktivitäten der X-Domänen zweier weiterer Coronaviren, nämlich TGEV (Coronavirusgruppe I) und SARS-CoV (Gruppe II), überprüft werden.

Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden pp1a/pp1ab-Sequenzen (Glu<sup>1312</sup>-Ser<sup>1486</sup> für TGEV und Glu<sup>1000</sup>-Lys<sup>1173</sup> für SARS-CoV) als MBP-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert, mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt und anschließend mit Faktor Xa gespalten. Die Analyse der Appr-1"-pase-Aktivität erfolgte mittels des bereits für die Charakterisierung der HCoV-229E-X-Domäne verwendeten dünnschichtchromatographischen Verfahrens (Putics et al., 2005). Als Positiv-Kontrolle wurde die bereits getestete HCoV-229E-X-Domäne verwendet, während das in *E. coli* exprimierte maltosebindende Protein als Negativ-Kontrolle diente. Die erhaltenen Daten zeigten, dass sowohl die SARS-CoV-X-Domäne als auch die TGEV-X-Domäne das Substrat Appr-1"-p zu Appr dephosphorylierten, während keine Aktivität für die Negativ-Kontrolle festgestellt wurde. Unter den verwendeten Reaktionsbedingungen unterschied sich die Aktivität der SARS-CoV-X-Domäne nicht von der der HCoV-229E-X-Domäne. Die TGEV-X-Domäne wies hingegen eine reduzierte Appr-1"-pase-Aktivität auf. Eine mögliche Ursache für diese verminderte Aktivität könnte die Auswahl der für die Expression gewählten Domänengrenzen sein. Um dies ausschließen zu können, wurden drei weitere Versionen der TGEV-X-Domäne exprimiert, die an ihren amino- und carboxyterminalen Enden um wenige Reste verlängert waren. Die mit diesen Proteinen erhaltenen Daten zeigen, dass die Appr-1"-pase-Aktivität entscheidend von den flankierenden Peptidsequenzen der X-Domäne abhängt. Verlängerte man beispielsweise die ursprünglich charakterisierte Sequenz der X-Domäne (Glu<sup>1312</sup>-Ser<sup>1486</sup>), die unter den gewählten Versuchsbedingungen das Substrat Appr-1"-p nur partiell hydrolysierte, an ihrem Aminoterminus um lediglich 8 Reste, erhöhte sich die

enzymatische Aktivität, so dass das Substrat unter gleichen Reaktionsbedingungen komplett dephosphoryliert wurde. Weitere Verlängerungen am Aminoterminus führten jedoch überraschenderweise zu einem vollständigen Verlust der Appr-1"-pase-Aktivität. Diese Daten deuten darauf hin, dass die TGEV-X-Domäne in den Polyproteinen pp1a/pp1ab zwischen den Aminosäuren Asp<sup>1320</sup> und Ser<sup>1486</sup> lokalisiert ist und die strukturelle Integrität der aminoterminalen Sekundärstrukturelemente der Domäne essentiell für ihre enzymatische Aktivität sind.

Die gewonnenen Daten lassen vermuten, dass die Appr-1"-pase-Aktivität eine konservierte Funktion aller *Coronaviridae* ist. Die Daten zeigen jedoch auch, dass die Aktivitäten der X-Domäne erheblich von den flankierenden nsp3-Sequenzen (und möglicherweise auch anderen Komponenten der Replikasepolyproteine) beeinflusst bzw. reguliert werden können. Auch für die PL2<sup>pro</sup> von HCoV-229E war bereits früher gezeigt worden, dass sie die Aktivität einer anderen nsp3-Subdomäne (PL1<sup>pro</sup>) beeinflussen kann (Ziebuhr et al., 2001). Die Daten unterstützen somit die Hypothese, dass funktionelle Kooperationen zwischen einzelnen nsp3-Subdomänen bestehen, die deren Aktivitäten regulieren und kontrollieren. Die strukturellen Voraussetzungen dieser Interaktionen und ihre biologischen Implikationen bleiben noch zu untersuchen.

### 2.2.3 Mutationsanalyse der HCoV-229E-X-Domäne<sup>3</sup>

Um einen ersten Einblick zu gewinnen, welche Aminosäuren für die enzymatische Aktivität der coronaviralen X-Domäne essentiell sind, wurde eine Mutationsanalyse hochkonservierter Aminosäurereste im putativen aktiven Zentrum der HCoV-229E-X-Domäne durchgeführt. Die Grundlage für die getroffene Auswahl der zu substituierenden Aminosäuren bildete ein Sequenzvergleich zwischen der HCoV-229E-X-Domäne und den homologen Proteinen AF1521 aus *A. fulgidus* und YMX7 aus *S. cerevisiae*. In diesem Sequenzvergleich konnten einige konservierte Bereiche identifiziert werden, die (wie man in der AF1521-Kristallstruktur erkennen konnte) zum überwiegenden Teil die Ränder einer Spalte auf der Moleküloberfläche auskleideten (Allen et al., 2003). In dieser Vertiefung war ein Molekül „3-(N-

Morpholino)propanesulfonic acid“ (MES) aus dem Kristallisationspuffer gebunden. Diese beiden Befunde legten die Vermutung nahe, dass das Puffermolekül den natürlichen Liganden imitiert und somit das aktive Zentrum des Proteins markiert. Zu den konservierten Aminosäuren in diesem putativen aktiven Zentrum gehörten unter anderem zwei Asn-Reste im  $\beta$ -Faltblatt #3 der AF1521-Struktur sowie ein Histidinrest, gefolgt von drei konservierten Glycinen, in einem Loop zwischen dem  $\beta$ -Faltblatt #3 und der  $\alpha$ -Helix #1 (Allen et al., 2003). Auch letztere Aminosäurereste waren bei unseren Sequenzvergleichen als konserviert identifiziert worden. Diese Beobachtungen ließen vermuten, dass die äquivalenten HCoV-229E-Reste, also die pp1a/pp1ab-Reste Asn<sup>1302</sup>, Asn<sup>1305</sup>, His<sup>1310</sup>, Gly<sup>1312</sup> und Gly<sup>1313</sup>, essentiell für die enzymatische Aktivität des Proteins sein müssten. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden geeignete Mutationen in das verwendete bakterielle Expressionsplasmid eingefügt, die dann HCoV-229E-X-Domänen mit spezifischen Substitutionen der oben aufgezählten Reste kodierten. Als Kontrolle wurde auch ein nichtkonservierter Asn-Rest (Asn<sup>1293</sup>), der außerhalb des vermuteten aktiven Zentrum der X-Domäne lag, gegen Ala ausgetauscht. Die Mutationen wurden durch ortsspezifische, PCR-vermittelte Mutagenese erzeugt. Die Proteine wurden (wie auch die wildtypische X-Domäne) als Fusionsproteine mit dem maltosebindenden Protein in *E. coli* exprimiert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Um semiquantitative Aussagen über die Aktivität der einzelnen Proteine treffen zu können, wurden gleiche Proteinkonzentrationen für alle Versuchsansätze verwendet.

Die Substitutionen von Asn<sup>1302</sup> und Asn<sup>1305</sup> zu Ala und die von His<sup>1310</sup> zu Leu führten in unseren Experimenten zu einem völligen Verlust der enzymatischen Aktivität der X-Domäne. Das Kontrollprotein (in dem eine nichtkonservierte Aminosäure, Asn<sup>1293</sup>, durch Ala ersetzt worden war) blieb hingegen aktiv. Diese Ergebnisse zeigen, dass die HCoV-229E-pp1a/pp1ab-Reste Asn<sup>1302</sup>, Asn<sup>1305</sup> und His<sup>1310</sup> essentiell für die Appr-1"-pase-Aktivität der X-Domäne sind. Da diese Aminosäurereste zu den am besten konservierten Aminosäuren sowohl bei den coronaviralen X-Domänen als auch ihren zellulären Homologen gehören, liegt es nahe, zu postulieren, dass diese Reste eine Schlüsselfunktion innerhalb der Substratbindung und/oder der Katalyse haben. Die vor kurzem publizierte Kristallstruktur des mit Appr kokristallisierten X-Domänen-Homologes AF1521 unterstützt diese These (Karras et al., 2005). Diese Kristallstruktur



zeigte auch, dass zahlreiche Aminosäuren im Protein AF1521, unter anderem die Aminosäure Asn<sup>34</sup>, die der substituierten Aminosäure Asn<sup>1305</sup> in der HCoV-229E-X-Domäne entspricht, spezifisch mit der distalen Ribose von Appr interagiert. Darüber hinaus reduzierte die Substitution des AF1521-Restes Asn<sup>34</sup> (das dem HCoV-229E-pp1a/pp1ab-Rest Asn<sup>1305</sup> entspricht) deutlich die Fähigkeit des Proteins, Appr zu binden. Auch diese strukturellen Informationen zu einem zellulären X-Domänen-Homolog unterstützen also unsere Aussage, dass die Aminosäure Asn<sup>1305</sup> der HCoV-229E-X-Domäne eine essentielle Funktion für die enzymatische Aktivität hat. Die Bedeutung dieses Restes wird darüber hinaus von einer kürzlich erschienenen Arbeit unterstützt, in der auf der Basis der Kristallstruktur von YMX7 im Komplex mit Appr ein möglicher Reaktionsmechanismus vorgeschlagen wird (Kumaran et al., 2005). Auch bei diesem Modell kommt einem Asn-Rest (YMX7-Asn<sup>80</sup>), der dem Asn<sup>1305</sup>-Rest in der HCoV-229E-X-Domäne entspricht, zusammen mit zwei weiteren Aminosäuren (Asp<sup>90</sup> und His<sup>145</sup>) eine katalytische Schlüsselfunktion zu. Die Tatsache, dass die beiden letzteren Reste sowohl in den coronaviralen X-Domänen als auch ihren zellulären Homologen nur zum Teil konserviert sind, zeigt jedoch, dass weitere Experimente erforderlich sind, um zu beweisen, dass diese Reste (wie in dieser Studie postuliert) eine katalytische Triade ausbilden.

Im Gegensatz zu den bisher vorgestellten (substituierten) Derivaten der HCoV-229E-X-Domäne, führten Substitutionen der Aminosäuren Gly<sup>1312</sup> und Gly<sup>1313</sup> lediglich zu einer Minderung (nicht jedoch zu einem Verlust) der Appr-1"-pase-Aktivität. Für die Aminosäuren Gly<sup>1312</sup> und Gly<sup>1313</sup> wurde aufgrund der zu Beginn der Arbeit zur Verfügung stehenden Kristallstruktur von AF1521 (Allen et al., 2003) vorhergesagt, dass diese eher an der Substratbindung als an der Katalyse beteiligt sein könnten. Um dieses zu überprüfen, wurden die beiden Gly-Reste jeweils durch Ala und Val ersetzt. Da Val eine größere (und verzweigte) Seitenkette besitzt, war erwartet worden, dass die Substitution von Gly durch Val schwerwiegendere strukturelle Konsequenzen hat als die entsprechende Substitution durch Ala. Diese Hypothese fanden wir bestätigt. Es zeigte sich nämlich, dass Substitution mit Val zu einem vollständigen Aktivitätsverlust der Proteine führten, während Substitutionen mit Ala zu Proteinen mit signifikanten Restaktivitäten führten. Diese Daten stützen die Vermutung, dass die Aminosäuren Gly<sup>1312</sup> und Gly<sup>1313</sup> eher an der Substratbindung als an der Katalyse beteiligt sind. Diese

Hypothese steht im Einklang mit den oben beschriebenen Strukturinformationen über YMX7 (Kumaran et al., 2005) und AF1521 (Karras et al., 2005). So zeigte die YMX7-Struktur, dass die YMX7-Gly<sup>87</sup>- und Gly<sup>88</sup>-Reste, die den von uns substituierten HCoV-229E-pp1a/pp1ab-Resten Gly<sup>1312</sup> und Gly<sup>1313</sup> entsprechen, einen Teil einer Schleifenstruktur bilden, die wahrscheinlich an der Stabilisierung der Substratbindung beteiligt ist (Kumaran et al., 2005). Übereinstimmend mit diesen Daten konnte auch in der AF1521-Struktur eine stabilisierende Wasserstoffbrückenbindung zwischen Appr und Atomen der Hauptkette eines Glycinrestes, das dem Gly<sup>1312</sup> bei HCoV-229E entspricht, beobachtet werden (Karras et al., 2005).

#### **2.2.4 Die Appr-1"-pase-Aktivität ist für die Replikation und Transkription von HCoV-229E in Zellkultur entbehrlich<sup>3</sup>**

Die Konservierung der X-Domäne bei allen Coronaviren, aber auch einigen anderen positivsträngigen RNA Viren, legte die Vermutung nahe, dass dieses Protein eine wichtige Funktion im viralen Lebenszyklus erfüllt. Um nun zu untersuchen, ob die mit der X-Domäne assoziierte Appr-1"-pase-Aktivität für die coronavirale Replikation und/oder Transkription essentiell ist bzw. andere wichtige Funktionen im viralen Lebenszyklus hat, wurden zwei mutierte Versionen der genomischen RNA von HCoV-229E erzeugt, die spezifische Aminosäuresubstitutionen in der X-Domäne kodierten. Es wurden die HCoV-229E-pp1a/pp1ab-Asn<sup>1305</sup>- und Asn<sup>1293</sup>-Reste jeweils gegen Ala ausgetauscht. Die Substitution von Asn<sup>1305</sup> wurde gewählt, weil dieser Rest sowohl bei allen Coronaviren als auch deren zellulären Homologen konserviert ist und die entsprechende Substitution die Appr-1"-pase-Aktivität in unserem *In-vitro*-Assay blockiert hatte. Die Mutagenese des Kodons des nichtkonservierten Asn<sup>1293</sup>-Restes zu einem Ala-Kodon diente uns hingegen als wichtige ("Positiv-") Kontrolle für eine Asn-Substitution, da dieser Austausch in unserem *In-vitro*-Assay keinerlei Auswirkungen auf die enzymatische Aktivität des Proteins gezeigt hatte. Die Mutagenese des coronaviralen Genoms erfolgte mit Hilfe revers-genetischer Methoden unter Verwendung eines Vacciniavirusklons, der eine vollständige cDNA-Kopie des HCoV-

229E-Genoms als Insert enthielt (Thiel et al., 2001a). Mit Hilfe dieses Vacciniavirusklons wurde die vollständige HCoV-229E-Genomsequenz (als cDNA-Kopie) bzw. die davon abgeleiteten mutierten Versionen des HCoV-229E-Genoms propagiert und amplifiziert und anschließend die aus diesen Viren gereinigten Genom-DNAs als Matrizen für die nachfolgende *In-vitro*-Transkription der viralen Volle-Länge-RNAs verwendet. Nach der Transfektion dieser *in vitro* erzeugten, viralen RNAs in BHK-21(N)-Zellen [das sind HCoV-229E-N-Protein-exprimierende *baby hamster kidney (BHK)* Zellen (Hertzog et al., 2004)], wurde die virale RNA-Synthese in den transfizierten Zellen mittels Northern-Hybridisierung analysiert. Überraschenderweise zeigten sich in diesen Experimenten keine Unterschiede hinsichtlich der von der wildtypischen Volle-Länge-RNA initiierten RNA-Synthese gegenüber der von RNAs mit Kodonsubstitutionen in der X-Domäne vermittelten viralen RNA-Synthese. In allen drei Fällen konnten problemlos infektiöse Viren isoliert werden, die in MRC-5-Zellen passagiert wurden, um genügend Material für die genauere Charakterisierung der erzeugten Viren zur Verfügung zu haben. Mit Hilfe der auf diese Weise erhaltenen konzentrierten Virusüberstände wurden MRC-5 Zellen mit dem wildtypischen Virus bzw. den davon abgeleiteten Mutanten bei gleicher MOI (engl.: *multiplicity of infection*) infiziert. Anschließend wurde die virale RNA-Synthese mittels Northern-Hybridisierung analysiert und der Virustiter im Zellkulturüberstand bestimmt. In Übereinstimmung mit dem oben beschriebenen Ergebnis unterschied sich die virale RNA-Syntese der Virusmutanten auch in diesem Experiment (in MRC-5-Zellen) nicht von der des wildtypischen Virus. Auch hinsichtlich des Virustiters konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Diese Daten zeigen, dass die in die HCoV-229E-X-Domäne eingeführten Mutationen, zumindest *in vitro*, keine erkennbaren Auswirkungen auf die Virusreplikation und -transkription und auf die Menge freigesetzter infektiöser Virionen hatten.

Um mögliche Auswirkungen der X-Domänen-Mutationen auf die virale Wachstumskinetik zu untersuchen, wurden MRC-5 Zellen mit dem Wildtyp-Virus und der HCoV-229E-Mutante mit der inaktiven X-Domäne (Asn<sup>1305</sup> zu Ala) bei gleicher MOI infiziert und der Virustiter im Zellkulturüberstand über die Zeit bestimmt. Auch die so erhaltenen Wachstumskurven zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante.

In einem abschließenden Experiment wurde außerdem die Stabilität der eingeführten Mutationen überprüft. Zu diesem Zweck wurden die Viren sechsmal auf MRC-5 Zellen passagiert, und anschließend wurde die kodierende Sequenz der X-Domäne durch RT-PCR amplifiziert und sequenziert. Die Sequenzdaten zeigten, dass die eingeführten Mutationen nach wie vor vorhanden waren. Darüber hinaus konnten keine weiteren Mutationen innerhalb der X-Domäne nachgewiesen werden. Da sich die Virustiter der Mutante bei den früheren und späteren Passagen voneinander nicht unterschieden, kann man davon ausgehen, dass auch außerhalb der X-Domäne keine kompensatorischen Mutationen entstanden waren, die zur Wiederherstellung der ursprünglichen (wildtypischen) Wachstumskinetik hätten beitragen können. Die Tatsache, dass sich die eingeführten Mutationen auch nach sechs Passagen als stabil erwiesen, legt die Vermutung nahe, dass unter den verwendeten *In-vitro*-Bedingungen kein starker Selektionsdruck vorhanden war, der eine Reversion und anschließende Selektion von Viren mit wiederhergestellter Appr-1"-pase-Aktivität begünstigt hätte.

Die Tatsache, dass die Appr-1"-pase-Aktivität der X-Domäne für die HCoV-229E-Replikation in Zellkultur nicht benötigt wird, ist ein äußerst interessantes Ergebnis dieser Arbeit. Bisher gibt es bei Coronaviren kein anderes Beispiel dafür, dass eine bei allen Coronaviren konservierte enzymatische Aktivität ohne erkennbare (*In-vitro*-) Defekte ausgeschaltet werden kann. Die Daten belegen damit erstmals, dass Coronavirus-Replikasogene auch nichtessentielle Funktionen kodieren, die möglicherweise nur unter bestimmten (noch zu bestimmenden) Bedingungen benötigt werden. Ähnliche Ergebnisse wurden kürzlich auch für MHV beschrieben, wenngleich es sich in diesem Fall wahrscheinlich nicht um konservierte Enzymaktivitäten handelt. So wurde gezeigt, dass sowohl das nsp2 von MHV als auch das nsp2 von SARS-CoV für die Replikation des jeweiligen Virus in Zellkultur entbehrlich sind (Graham et al., 2005). Daten über die Virulenz dieser Viren *in vivo* liegen jedoch bisher nicht vor. Die Notwendigkeit solcher *In-vivo*-Untersuchungen für die Beurteilung der Fitness und Virulenz von Virusmutanten zeigt sich an einer anderen MHV-Studie, in der gezeigt werden konnte, dass Punktmutationen in der kodierenden Sequenz von nsp14, die *in vitro* keine signifikanten Auswirkungen auf die Virusreplikation hatten, in der Maus (also dem natürlichen Wirt) attenuiert waren (Sperry et al., 2005). Ähnliche Effekte sind auch für die HCoV-229E-X-Domänen-Mutante nicht auszuschließen. Da es bisher

jedoch kein geeignetes Tiermodell für HCoV-229E gibt, sollten entsprechende Experimente mit entsprechenden animalen Coronaviren, für die revers-genetische Systeme zur Verfügung stehen (z.B. TGEV, MHV, IBV), durchgeführt werden.

Der Befund, dass alle drei getesteten coronaviralen X-Domänen Appr-1"-pase-Aktivitäten besaßen, lässt darauf schließen, dass die Phosphoesterase-Aktivität der X-Domäne wahrscheinlich eine bei allen Coronaviren konservierte Enzymaktivität ist. Die Tatsache, dass X-Domänen-Homologe auch bei einigen anderen positivsträngigen RNA-Viren konserviert sind (Gorbalenya et al., 1991), lässt vermuten, dass diese Aktivität einen (bisher unbekannt) Selektionsvorteil für bestimmte Viren mit sich bringt. Da diese anderen Viren, z. B. Alphaviren, jedoch deutlich kleinere Genome als Coronaviren besitzen, gilt es als eher unwahrscheinlich, dass die Aktivität der X-Domäne einen Selektionsvorteil bei der Replikation großer Genome vermittelt. Wie bereits oben angedeutet, könnte die Aktivität am ehesten im Rahmen einer natürlichen Infektion benötigt werden; vielleicht auch dort nur unter bestimmten Bedingungen, z.B. in bestimmten Zelltypen. Eine solche nichtessentielle, aber (unter definierten Bedingungen) möglicherweise für das Virus vorteilhafte Aktivität könnte auch die CPDase (zyklische Phosphodiesterase) vermitteln, die nur bei einigen wenigen Coronaviren und bei Toroviren konserviert ist und deren Deletion aus dem MHV-Genom keine erkennbaren Effekte auf die Virusreplikation *in vitro* hat (Schwarz et al., 1990). Die Verwandtschaft corona- bzw. toroviraler und zellulärer CPDasen (Culver et al., 1994, Genschik et al., 1997, Nasr & Filipowicz, 2000) legt nahe, dass auch die viralen CPDasen in der Lage sind, Appr>p in Appr-1"-p umzusetzen, welches dann in der Folge durch die Appr-1"-pase-Aktivität der X-Domäne zu Appr umgewandelt werden könnte (Snijder et al., 2003). Auch im Fall der CPDase hatte sich gezeigt, dass Punktmutationen in der putativen CPDase keine Auswirkungen auf die Virusreplikation in Zellkultur hatten, jedoch die Virulenz des Virus im Wirtsorganismus deutlich attenuierten (Sperry et al., 2005). Die Daten aus dieser Arbeit und früheren Studien führen also zu folgenden Schlußfolgerungen und Hypothesen: (1) die CPDase und die Appr-1"-pase katalysieren vermutlich zwei aufeinanderfolgende Reaktionen im gleichen Stoffwechselweg, (2) beide Aktivitäten sind für die Virusreplikation in Zellkultur entbehrlich, (3) beide Enzyme üben möglicherweise regulatorische Funktionen aus, die nur im infizierten Wirt unter bestimmten Bedingungen wichtig oder gar essentiell sind

und (4) das Konservierungsmuster der beiden Aktivitäten legt nahe, dass die Aktivität der X-Domäne von größerer Bedeutung in diesem Stoffwechselweg ist als diejenige der CPDase.

Eine weitere interessante Parallele lässt sich auch zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und den publizierten Daten über *S.-cerevisiae*-Mutanten, die kein Poa1p mehr exprimieren konnten, feststellen. So konnten Shull et al. (2005) zeigen, dass trotz der Tatsache, dass Poa1p ca. 90 % des zellulären Appr-1"-p-Pools prozessiert, Poa1p-Deletionsmutanten keine Defekte im Zellwachstum aufwiesen, obwohl nach wie vor große Mengen an Appr-1"-p in den Hefemutanten gebildet wurden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde spekuliert, dass die Appr-1"-pase *in vivo* eher eine regulatorische als eine essentielle Funktion erfüllt (Shull et al., 2005). Darüber hinaus spricht auch die ausgeprägte Substratspezifität von Poa1p, die in gleicher Weise auch für die coronaviralen Appr-1"-pasen gilt (siehe oben), eher für eine regulatorische als eine metabolische Funktion. Solch eine ausgeprägte Spezifität ist typisch für sogenannte regulatorische Phosphatasen, wie z.B. die Fructose-2,6-bisphosphatase (Pilkis et al., 1985), während die zahlreichen sauren und alkalischen metabolischen Phosphatasen ein deutlich breiteres Spektrum an Substraten umsetzen können (Heppel et al., 1962, Neumann, 1968, Nigam et al., 1959). Weitere Evidenzen für eine eher regulatorische als essentielle, metabolische Funktion der Appr-1"-pase und ihres Prekursormoleküls Appr>p lieferten auch Daten von Hefe-Mutanten, in denen das Gen der Hefe-tRNA-Ligase gegen die T4-RNA-Ligase 1 und Polynukleotidkinase/-phosphatase ausgetauscht wurde. Auch diese Substitutionen hatten keinen Effekt auf das Zellwachstum oder die Lebensfähigkeit der Hefemutanten, obwohl in diesen Zellen kein Appr>p oder Appr-1"-p mehr produziert werden konnte (Schwer et al., 2004), woraus geschlossen wurde, dass die beiden Moleküle keine essentielle Funktion für die Zelle vermitteln.

In diesem Zusammenhang lohnt es sich auch, zu erwähnen, dass es zahlreiche regulatorische Mechanismen in der Zelle gibt, bei denen Appr oder Appr-Derivate gebildet oder verbraucht werden. Einige dieser Moleküle haben wichtige regulatorische Funktionen. So sind beispielsweise die strukturell verwandten Moleküle cAppr (zyklische Adenosin-Diphosphoribose) und NAADP (Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotidphosphat) Schlüsselmoleküle bei der Regulation der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung (Galione & Churchill, 2002, Yamasaki et al., 2005). Außerdem ist die

regulatorische Bedeutung der ADP-Ribosylierung als einer Form der posttranslationalen Modifikation von Proteinen seit langem bekannt. Die ADP-Ribosylierung erfolgt entweder durch eine kovalente Verknüpfung von monomerem Appr oder von Poly-(ADP-Ribose) (PAR) mit spezifischen Aminosäureresten dieser Proteine. PAR wird unter Verbrauch von NAD<sup>+</sup> durch die Familie der Poly-(ADP-Ribosyl)-Polymerasen (PARP) synthetisiert. PAR-Polymere sind in der Zelle nur sehr kurzfristig nachweisbar. Sie werden innerhalb kurzer Zeit durch das Enzym Poly-(ADP-Ribose)-Glykohydrolase (PARG) zu Appr abgebaut. Poly-ADP-Ribosylierungen sind an der Regulation wichtiger zellulärer Prozesse, wie z. B. der DNA-Reparatur, der transkriptionellen Aktivierung bzw. Repression und der Kontrolle der Genomstabilität beteiligt (D'Amours et al., 1999, Dantzer et al., 1999, Ladurner, 2003, Tulin et al., 2002). Im Gegensatz dazu gibt es deutlich weniger Informationen zur Bedeutung von Protein-mono-ADP-Ribosylierungen. Die Mono-ADP-Ribosylierung wird von der zellulären ADP-Ribosyltransferase katalysiert und spielt eine Rolle in zellulären Signalprozessen und im Metabolismus der Zelle (Corda & Di Girolamo, 2003).

Die Tatsache, dass einige Makrodomänenproteine (einschließlich AF1521 und Poa1p) mit hoher Affinität Appr binden können (Karras et al., 2005) läßt es daher als möglich erscheinen, dass diese Appr-1"-pasen, einschließlich der coronaviralen X-Domäne, den Metabolismus von Appr-1"-p, Appr oder Poly-ADP-Ribose oder anderer verwandter Moleküle regulieren und/oder modulieren können. Dies könnte unter spezifischen Bedingungen zelluläre Funktionen beeinflussen und auch für das Virus von Vorteil sein. Außerdem ist es denkbar, dass diese Proteine durch die Bindung von Appr und/oder PARP bzw. die Bindung von mono- oder Poly-ADP-ribosylierten Proteinen ihre regulatorische Funktionen ausüben.

Aufgrund einer möglichen Beteiligung von nsp3-Subdomänen (PL2<sup>pro</sup> [siehe Abschnitt 2.1.3] und X-Domäne) an regulatorischen Prozessen der Zelle erscheint es möglich, dass nsp3 Funktionen vermittelt, die sich unter bestimmten Bedingungen günstig auf die Virusreplikation auswirken. Ob dabei Protease- und Appr-1"-pase-Aktivitäten zusammenwirken, ist gegenwärtig nicht klar. Da jedoch auch bei Alphaviren die X-Domäne in unmittelbarer Nachbarschaft einer papainähnlichen Proteaseaktivität (im gleichen Prozessierungsprodukt) liegt, kann eine solche Möglichkeit nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Die 5'-proximale Position im

ORF1a des coronaviralen Replikasegens stellt in jedem Fall sicher, dass beide (PL<sup>pro</sup>- und X-) Domänen sehr früh im viralen Lebenszyklus translatiert werden und somit ihre vermutete Funktion innerhalb der Wirtszelle frühzeitig ausüben können. Es wäre sicher auch eine sehr interessante Fragestellung, herauszufinden, ob die hypothetische Beteiligung der PL2<sup>pro</sup>-Domäne an der Interferon-Antwort der Wirtszelle (Lindner et al., 2005, Sulea et al., 2005) im Zusammenhang mit möglichen Funktionen der X-Domäne steht. Ob die X-Domäne an den durch Interferon ausgelösten Mechanismen beteiligt ist, könnte unter Verwendung der in dieser Arbeit erzeugten Mutanten relativ leicht untersucht werden.

Um mögliche Effekte der coronaviralen X-Domäne auf den Metabolismus der Wirtszelle oder gar die Folgen dieser vermuteten Effekte für die Virusreplikation zu untersuchen, könnte beispielsweise die X-Domäne oder das gesamte nsp3 in eukaryotischen Zellen kontrolliert überexprimiert werden und die Auswirkungen dieser Überexpression auf das Transkriptom bzw. Proteom der Zelle untersucht werden. Auch Transkriptom-Proteom-Analysen von Zellen, die mit HCoV-229E-X-Domänen-Mutanten infiziert wurden, wären sicher sehr aufschlussreich. Eine weitere interessante Frage wäre, ob die Appr-1"-pase-Aktivität nur in bestimmten Zelltypen funktionell bedeutsam ist. Zu diesem Zweck könnten die erzeugten X-Domänen-Mutanten hinsichtlich ihrer Replikationseigenschaften in verschiedenen Zelllinien charakterisiert werden. Auch die Erzeugung und Charakterisierung einer Coronavirus-Mutante mit einer Deletion der kompletten X-Domäne wäre sicher ein lohnendes Projekt, um funktionell bedeutsame Bindeeigenschaften von den katalytischen Eigenschaften der X-Domäne besser abgrenzen zu können. Neben diesen *In-vitro*-Studien erscheint jedoch die Charakterisierung von X-Domänen-Mutanten von MHV (oder anderer animaler Coronaviren) und die umfassende Charakterisierung der Pathogenese dieser Mutanten im natürlichen Wirt ein unverzichtbarer Bestandteil zukünftiger Studien zu sein, ohne die die biologische Bedeutung dieser (*in vitro*) nichtessentiellen viralen Aktivität wohl nicht in ihrem vollen Umfang zu verstehen sein wird.



### 3. Zusammenfassung

Coronaviren können sowohl den Menschen als auch zahlreiche Tierspezies infizieren und verursachen vor allem respiratorische und enterale Erkrankungen. Die Replikation des etwa 27-32 kb großen, einzelsträngigen RNA-Genoms positiver Polarität und die Synthese zahlreicher subgenomischer RNAs erfolgt durch einen Multi-Enzym-Komplex, der bis zu 16 virale nichtstrukturelle Proteine (nsp) und einige zelluläre Proteine umfaßt. Die einzelnen nichtstrukturellen Proteine werden durch proteolytische Prozessierung der vom Replikasegen kodierten Vorläufer-Polyproteine (pp1a/pp1ab) unter Beteiligung viraler Proteasen freigesetzt. Das größte replikative Protein, nsp3, befindet sich im aminoterminalen Bereich der Polyproteine pp1a/pp1ab. Trotz des geringen Konservierungsgrades dieser Region wurden bestimmte funktionelle Domänen, die in allen coronaviralen nsp3 konserviert sind, identifiziert. Dazu gehören: eine saure Domäne, zwei Papain-ähnliche Proteasen (PL1<sup>pro</sup> und PL2<sup>pro</sup>) sowie zwei weitere konservierte Domänen (X- bzw. Y-Domäne). Frühere Studien konzentrierten sich vor allem auf die PL<sup>pro</sup>-Domänen, während die Funktionen der anderen nsp3-Domänen bisher nicht untersucht wurden. Um weitere Einblicke in die nsp3-vermittelten Aktivitäten und ihre Funktionen im coronaviralen Lebenszyklus zu gewinnen, wurden im Rahmen dieser Arbeit die enzymatischen Aktivitäten von zwei nsp3-Domänen, PL<sup>pro</sup> und X, näher charakterisiert.

Coronavirale Papain-ähnliche Proteasen spalten den aminoproximalen Bereich der Polyproteine pp1a/pp1ab und sind somit an der Freisetzung von nsp1, nsp2 und nsp3 beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wurde die durch die PL<sup>pro</sup> vermittelte proteolytische Prozessierung des N-terminalen Endes von nsp3 bei TGEV und SARS-CoV analysiert. Übereinstimmend mit früheren Vorhersagen ergaben *In-vitro*-Translationsexperimente und Proteinsequenzierungen, dass die TGEV-PL1<sup>pro</sup> die Peptidbindung zwischen Gly<sup>879</sup> und Gly<sup>880</sup> spaltet, wodurch das aminoternale Ende von nsp3 bzw. das carboxyterminale Ende von nsp2 freigesetzt werden. Diese Schnittstelle entspricht bei SARS-CoV der Sequenz Gly<sup>818</sup>|Ala<sup>819</sup>, die jedoch bei diesem Virus von der PL2<sup>pro</sup> prozessiert wird. Mutationsanalysen ergaben weiterhin, dass die Reste Cys<sup>1093</sup> (TGEV-PL1<sup>pro</sup>) und Cys<sup>1651</sup> (SARS-CoV-PL2<sup>pro</sup>) für die proteolytische Aktivität essentiell sind.

Diese Daten stützen Vorhersagen zu möglichen katalytischen (nukleophilen) Funktionen dieser beiden Reste. Darüber hinaus wurde das stromaufwärts gelegene nsp2 in TGEV-infizierten Zellen identifiziert. Diese Daten, zusammen mit vorherigen Studien, legen den Schluss nahe, dass die Coronavirus-PL<sup>pro</sup>-vermittelte proteolytische Prozessierung – trotz der geringen Konservierung des Polyproteinsubstrates und bestehender Unterschiede hinsichtlich der Anzahl konservierter PL<sup>pro</sup>-Domänen – weitgehend konserviert ist.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die enzymatische Aktivität einer weiteren konservierten Domäne im coronaviralen nsp3, der sogenannten X-Domäne, untersucht werden. Für diese Domäne war eine ADP-Ribose-1"-Monophosphatase-Aktivität (Appr-1"-pase) vorhergesagt worden. Um die Eigenschaften dieser Proteine näher zu bestimmen und möglicherweise existierende Gemeinsamkeiten zwischen coronaviralen Enzymen, die den viralen Lebenszyklus steuern und/oder kontrollieren, zu identifizieren, wurden die X-Domänen von drei verschiedenen Coronaviren, HCoV-229E, TGEV und SARS-CoV, die unterschiedlichen serologischen Coronavirus-Gruppen angehören, *in vitro* untersucht und miteinander verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass bakteriell (*E.coli*-) exprimierte X-Domänen aller drei untersuchten Viren ADP-Ribose-1"-Phosphat, ein Nebenprodukt des zellulären tRNA-Splicings, zu ADP-Ribose dephosphorylieren können. Diese Daten beweisen zweifelsfrei die Appr-1"-pase-Aktivität coronaviraler X-Domänen und lassen vermuten, dass diese Aktivität bei allen Coronaviren konserviert ist. Weitere Untersuchungen zur Substratspezifität und zu möglichen katalytischen Resten des Enzyms wurden mit Hilfe bakteriell exprimierter, mutierter Formen der HCoV-229E-X-Domäne durchgeführt. Die gewonnenen Daten legen die Vermutung nahe, dass die Phosphohydrolaseaktivität hochspezifisch für das Substrat Appr-1"-p ist und die HCoV-229E-pp1a/pp1ab-Reste Asn<sup>1302</sup>, Asn<sup>1305</sup>, His<sup>1310</sup>, Gly<sup>1312</sup> und Gly<sup>1313</sup> an der Ausbildung des aktiven Zentrum des Enzyms beteiligt sind. Abschließend wurde die Funktion der Appr-1"-pase-Aktivität mit Hilfe einer HCoV-229E-Mutante, in der die Appr-1"-pase-Aktivität durch ortsspezifische Mutagenese ausgeschaltet wurde, in Zellkultur analysiert. Überraschenderweise hatte die Mutation keine nachweisbare Auswirkung auf die virale RNA-Synthese oder den Virustiter, und sie erwies sich auch nach sechs Passagen in Zellkultur als stabil. Die Tatsache, dass die Appr-1"-pase-Aktivität für die Replikation und Transkription von HCoV-229E

entbehrlich ist, zeigt, dass Coronavirus-Replikasene auch nichtessentielle Funktionen kodieren, die möglicherweise akzessorische und/oder regulatorische Funktionen besitzen und nur unter bestimmten Bedingungen (z.B. im infizierten Wirt) einen Selektionsvorteil bieten bzw. essentiell sind. Weitere Studien sind erforderlich, um die biologische Funktion der X-Domäne im Detail zu bestimmen.

## 4. Summary

Coronaviruses infect humans and a broad range of animal species and are mainly associated with respiratory and enteric diseases. Replication of the single-stranded, positive-sense RNA genome of 27-32 kb and production of an extensive set of subgenome-length RNAs (viral transcription) are mediated by a huge multienzyme complex which contains several cellular proteins and up to 16 viral nonstructural proteins (nsp) that are released by viral proteases from the replicase gene-encoded polyprotein precursors, pp1a and pp1ab. The largest coronaviral replicative processing product, nsp3, resides in the N-terminal part of polyproteins pp1a and pp1ab. Despite the generally low conservation of this protein among coronaviruses, several domains could be identified in nsp3 that are conserved in all coronaviruses. These include an acidic domain, one or two papain-like proteases (PL1<sup>pro</sup> and PL2<sup>pro</sup>), and two additional domains designated X and Y. Previous studies on nsp3 focused mainly on the characterisation of the PL<sup>pro</sup> activities while the functions of other nsp3-domains have not been addressed in any detail. To gain more insight into nsp3-encoded activities and their functions in the coronaviral life cycle, two nsp3-associated enzymatic activities, PL<sup>pro</sup> and X, were characterized in this work.

Coronaviral papain-like proteases process the N-proximal part of polyproteins pp1a/pp1ab, thus producing nsp1, nsp2 and nsp3. In this study, the PL<sup>pro</sup>-mediated cleavage at the N-terminal end of nsp3 was analyzed for TGEV and SARS-CoV. Consistent with previous predictions, *in vitro* translation experiments and protein sequencing revealed that the TGEV-PL1<sup>pro</sup> cleaves the polyproteins pp1a/pp1ab at <sup>879</sup>Gly|Gly<sup>880</sup>, releasing the carboxyl- and amino-terminal ends of nsp2 and nsp3, respectively. The corresponding cleavage site in the pp1a/pp1ab of SARS-CoV was shown to be processed by PL2<sup>pro</sup> at <sup>818</sup>Gly|Ala<sup>819</sup>. A mutational analysis showed that the residues Cys<sup>1093</sup> (TGEV PL1<sup>pro</sup>) and Cys<sup>1651</sup> (SARS-CoV PL2<sup>pro</sup>) are essential for proteolytic activity, confirming previous predictions on their catalytic (nucleophilic) functions. Consistent with the *in vitro* cleavage data, the upstream processing product, nsp2, could be identified in TGEV-infected cells. The data, together with previous

studies, suggest that coronaviral PL<sup>pro</sup>-mediated proteolytic cleavages –despite the low conservation of the polyprotein substrate and even variation in the number of catalytically active PL<sup>pro</sup> domains– occur in a largely conserved manner.

The second part of this work was devoted to identifying and characterising the ADP-ribose-1"-monophosphatase (Appr-1"-pase) activity predicted to be associated with another conserved nsp3-subdomain called X. To characterise the features and identify possibly existing common properties among the enzymes that mediate and/or regulate the coronavirus life cycle, the activities of X domains from three coronaviruses, HCoV-229E, TGEV and SARS-CoV, which belong to different coronavirus serogroups, were investigated *in vitro* and compared with each other. By using *E. coli*-expressed forms of these three viral X domains, it could be demonstrated that all these proteins are able to dephosphorylate ADP-ribose-1"-phosphate, a side product of cellular tRNA splicing, to produce ADP-ribose. The data unambiguously establish the Appr-1"-pase activity of coronaviral X domains and suggest that the activity is conserved in all coronaviruses. Further studies into the substrate specificity and possible active-site residues, which were done by using mutant forms of the bacterially expressed HCoV-229E X domain, led us to suggest that the phosphohydrolase activity is highly specific for the substrate Appr-1"-p and predict that the replicase polyprotein residues, Asn<sup>1302</sup>, Asn<sup>1305</sup>, His<sup>1310</sup>, Gly<sup>1312</sup>, and Gly<sup>1313</sup>, are part of the enzyme's active site. Finally, effects on viral RNA synthesis and virus reproduction were studied by using an Appr-1"-pase-deficient HCoV-229E mutant. Surprisingly, neither viral RNA synthesis nor virus titer was found to be affected and no reversion to the wild-type sequence was detected when the mutant virus was passaged in cell culture. Taken together, the data suggest that coronavirus replicase genes also encode non-essential functions. Although being dispensable in tissue culture, such accessory and/or regulatory functions might be a selective advantage or even prove to be essential for viral replication in the infected host. The biological significance of this novel enzymatic activity remains to be identified.

## 5. Literatur

- Allaire, M., Chernaia, M. M., Malcolm, B. A. & James, M. N. (1994). Picornaviral 3C cysteine proteinases have a fold similar to chymotrypsin-like serine proteinases. *Nature* **369**, 72-6.
- Allen, M. D., Buckle, A. M., Cordell, S. C., Lowe, J. & Bycroft, M. (2003). The crystal structure of AF1521 a protein from *Archaeoglobus fulgidus* with homology to the non-histone domain of macroH2A. *J Mol Biol* **330**, 503-11.
- Almazan, F., Galan, C. & Enjuanes, L. (2004). The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *J Virol* **78**, 12683-8.
- 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.
- 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**, 175-8.
- Amerik, A. Y. & Hochstrasser, M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1695**, 189-207.
- Anand, K., Palm, G. J., Mesters, J. R., Siddell, S. G., Ziebuhr, J. & Hilgenfeld, R. (2002). Structure of coronavirus main proteinase reveals combination of a chymotrypsin fold with an extra alpha-helical domain. *Embo J* **21**, 3213-24.
- Anand, K., Ziebuhr, J., Wadhwani, P., Mesters, J. R. & Hilgenfeld, R. (2003). Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs. *Science* **300**, 1763-7.
- Arden, K. E., Nissen, M. D., Sloots, T. P. & Mackay, I. M. (2005). New human coronavirus, HCoV-NL63, associated with severe lower respiratory tract disease in Australia. *J Med Virol* **75**, 455-62.
- Baker, S. C., Shieh, C. K., Soe, L. H., Chang, M. F., Vannier, D. M. & Lai, M. M. (1989). Identification of a domain required for autoproteolytic cleavage of murine coronavirus gene A polyprotein. *J Virol* **63**, 3693-9.
- Baker, S. C., Yokomori, K., Dong, S., Carlisle, R., Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V. & Lai, M. M. (1993). Identification of the catalytic sites of a papain-like cysteine proteinase of murine coronavirus. *J Virol* **67**, 6056-63.
- Ballesteros, M. L., Sanchez, C. M. & Enjuanes, L. (1997). Two amino acid changes at the N-terminus of transmissible gastroenteritis coronavirus spike protein result in the loss of enteric tropism. *Virology* **227**, 378-88.
- Baric, R. S., Stohlman, S. A. & Lai, M. M. (1983). Characterization of replicative intermediate RNA of mouse hepatitis virus: presence of leader RNA sequences on nascent chains. *J Virol* **48**, 633-40.
- Baric, R. S., Stohlman, S. A., Razavi, M. K. & Lai, M. M. (1985). Characterization of leader-related small RNAs in coronavirus-infected cells: further evidence for leader-primed mechanism of transcription. *Virus Res* **3**, 19-33.
- Barretto, N., Jukneliene, D., Ratia, K., Chen, Z., Mesecar, A. D. & Baker, S. C. (2005). The papain-like protease of severe acute respiratory syndrome coronavirus has deubiquitinating activity. *J Virol* **79**, 15189-98.

- Bastien, N., Anderson, K., Hart, L., Van Caesele, P., Brandt, K., Milley, D., Hatchette, T., Weiss, E. C. & Li, Y. (2005). Human coronavirus NL63 infection in Canada. *J Infect Dis* **191**, 503-6.
- Beaudette, F. R. & Hudson, C. B. (1937). Cultivation of the virus of infectious bronchitis. *J Am Vet Med Assoc* **90**, 51-60.
- 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**, 403-7.
- Bhardwaj, K., Guarino, L. & Kao, C. C. (2004). The severe acute respiratory syndrome coronavirus Nsp15 protein is an endoribonuclease that prefers manganese as a cofactor. *J Virol* **78**, 12218-24.
- Bi, W., Pinon, J. D., Hughes, S., Bonilla, P. J., Holmes, K. V., Weiss, S. R. & Leibowitz, J. L. (1998). Localization of mouse hepatitis virus open reading frame 1A derived proteins. *J Neurovirol* **4**, 594-605.
- Bonilla, P. J., Hughes, S. A., Pinon, J. D. & Weiss, S. R. (1995a). Characterization of the leader papain-like proteinase of MHV-A59: identification of a new in vitro cleavage site. *Virology* **209**, 489-97.
- Bonilla, P. J., Hughes, S. A. & Weiss, S. R. (1997). Characterization of a second cleavage site and demonstration of activity in trans by the papain-like proteinase of the murine coronavirus mouse hepatitis virus strain A59. *J Virol* **71**, 900-9.
- Bonilla, P. J., Pinon, J. L., Hughes, S. & Weiss, S. R. (1995b). Characterization of the leader papain-like protease of MHV-A59. *Adv Exp Med Biol* **380**, 423-30.
- Bournsnel, M. E., Brown, T. D., Foulds, I. J., Green, P. F., Tomley, F. M. & Binns, M. M. (1987). Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. *J Gen Virol* **68 (Pt 1)**, 57-77.
- Bradburne, A. F., Bynoe, M. L. & Tyrrell, D. A. (1967). Effects of a "new" human respiratory virus in volunteers. *Br Med J* **3**, 767-9.
- Breslin, J. J., Mork, I., Smith, M. K., Vogel, L. K., Hemmila, E. M., Bonavia, A., Talbot, P. J., Sjostrom, H., Noren, O. & Holmes, K. V. (2003). Human coronavirus 229E: receptor binding domain and neutralization by soluble receptor at 37 degrees C. *J Virol* **77**, 4435-8.
- Brian, D. A. & Baric, R. S. (2005). Coronavirus genome structure and replication. *Curr Top Microbiol Immunol* **287**, 1-30.
- Cavanagh, D. (1997). Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol* **142**, 629-33.
- Chouljenko, V. N., Lin, X. Q., Storz, J., Kousoulas, K. G. & Gorbalenya, A. E. (2001). Comparison of genomic and predicted amino acid sequences of respiratory and enteric bovine coronaviruses isolated from the same animal with fatal shipping pneumonia. *J Gen Virol* **82**, 2927-33.
- Compton, S. R., Barthold, S. W. & Smith, A. L. (1993). The cellular and molecular pathogenesis of coronaviruses. *Lab Anim Sci* **43**, 15-28.
- Corda, D. & Di Girolamo, M. (2003). Functional aspects of protein mono-ADP-ribosylation. *Embo J* **22**, 1953-8.
- Costanzi, C. & Pehrson, J. R. (1998). Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* **393**, 599-601.

- 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**, 1473-84.
- Culver, G. M., Consaul, S. A., Tycowski, K. T., Filipowicz, W. & Phizicky, E. M. (1994). tRNA splicing in yeast and wheat germ. A cyclic phosphodiesterase implicated in the metabolism of ADP-ribose 1",2"-cyclic phosphate. *J Biol Chem* **269**, 24928-34.
- Culver, G. M., McCraith, S. M., Zillmann, M., Kierzek, R., Michaud, N., LaReau, R. D., Turner, D. H. & Phizicky, E. M. (1993). An NAD derivative produced during transfer RNA splicing: ADP-ribose 1"-2" cyclic phosphate. *Science* **261**, 206-8.
- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I. & Poirier, G. G. (1999). Poly(ADP-ribose)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* **342 (Pt 2)**, 249-68.
- Dantzer, F., Schreiber, V., Niedergang, C., Trucco, C., Flatter, E., De La Rubia, G., Oliver, J., Rolli, V., Menissier-de Murcia, J. & de Murcia, G. (1999). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair. *Biochimie* **81**, 69-75.
- 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.
- Delmas, B., Gelfi, J., L'Haridon, R., Vogel, L. K., Sjostrom, H., Noren, O. & Laude, H. (1992). Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature* **357**, 417-20.
- Denison, M. & Perlman, S. (1987). Identification of putative polymerase gene product in cells infected with murine coronavirus A59. *Virology* **157**, 565-8.
- Denison, M. R. & Perlman, S. (1986). Translation and processing of mouse hepatitis virus virion RNA in a cell-free system. *J Virol* **60**, 12-8.
- Denison, M. R., Yount, B., Brockway, S. M., Graham, R. L., Sims, A. C., Lu, X. & Baric, R. S. (2004). Cleavage between replicase proteins p28 and p65 of mouse hepatitis virus is not required for virus replication. *J Virol* **78**, 5957-65.
- Dominguez, G., Wang, C. Y. & Frey, T. K. (1990). Sequence of the genome RNA of rubella virus: evidence for genetic rearrangement during togavirus evolution. *Virology* **177**, 225-38.
- Dong, S. & Baker, S. C. (1994). Determinants of the p28 cleavage site recognized by the first papain-like cysteine proteinase of murine coronavirus. *Virology* **204**, 541-9.
- Draker, R., Roper, R. L., Petric, M. & Tellier, R. (2006). The complete sequence of the bovine torovirus genome. *Virus Res* **115**, 56-68.
- Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H. R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R. A., Berger, A., Burguiere, A. M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J. C., Muller, S., Rickerts, V., Sturmer, M., Vieth, S., Klenk, H. D., Osterhaus, A. D., Schmitz, H. & Doerr, H. W. (2003). Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* **348**, 1967-76.
- Eleouet, J. F., Rasschaert, D., Lambert, P., Levy, L., Vende, P. & Laude, H. (1995). Complete sequence (20 kilobases) of the polyprotein-encoding gene 1 of transmissible gastroenteritis virus. *Virology* **206**, 817-22.
- Filipowicz, W. & Pogacic, V. (2002). Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 319-27.



- 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.
- Galione, A. & Churchill, G. C. (2002). Interactions between calcium release pathways: multiple messengers and multiple stores. *Cell Calcium* **32**, 343-54.
- Gallagher, T. M. & Buchmeier, M. J. (2001). Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. *Virology* **279**, 371-4.
- Garwes, D. J. (1988). Transmissible gastroenteritis. *Vet Rec* **122**, 462-3.
- Genschik, P., Hall, J. & Filipowicz, W. (1997). Cloning and characterization of the Arabidopsis cyclic phosphodiesterase which hydrolyzes ADP-ribose 1",2"-cyclic phosphate and nucleoside 2',3'-cyclic phosphates. *J Biol Chem* **272**, 13211-9.
- Gonzalez, J. M., Gomez-Puertas, P., Cavanagh, D., Gorbalenya, A. E. & Enjuanes, L. (2003). A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae. *Arch Virol* **148**, 2207-35.
- Gorbalenya, A. E. (2001). Big nidovirus genome. When count and order of domains matter. *Adv Exp Med Biol* **494**, 1-17.
- Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., Donchenko, A. P. & Blinov, V. M. (1989a). Coronavirus genome: prediction of putative functional domains in the non-structural polyprotein by comparative amino acid sequence analysis. *Nucleic Acids Res* **17**, 4847-61.
- Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., Donchenko, A. P. & Blinov, V. M. (1989b). Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res* **17**, 4713-30.
- Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V. & Lai, M. M. (1991). Putative papain-related thiol proteases of positive-strand RNA viruses. Identification of rubi- and aphthovirus proteases and delineation of a novel conserved domain associated with proteases of rubi-, alpha- and coronaviruses. *FEBS Lett* **288**, 201-5.
- Gorbalenya, A. E., Snijder, E. J. & Spaan, W. J. (2004). Severe acute respiratory syndrome coronavirus phylogeny: toward consensus. *J Virol* **78**, 7863-6.
- Gosert, R., Kanjanahaluethai, A., Egger, D., Bienz, K. & Baker, S. C. (2002). RNA replication of mouse hepatitis virus takes place at double-membrane vesicles. *J Virol* **76**, 3697-708.
- Graham, R. L., Sims, A. C., Brockway, S. M., Baric, R. S. & Denison, M. R. (2005). The nsp2 replicase proteins of murine hepatitis virus and severe acute respiratory syndrome coronavirus are dispensable for viral replication. *J Virol* **79**, 13399-411.
- 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**, 2849-59.
- 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**, 276-8.
- Han, Y. S., Chang, G. G., Juo, C. G., Lee, H. J., Yeh, S. H., Hsu, J. T. & Chen, X. (2005). Papain-like protease 2 (PLP2) from severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV): expression, purification, characterization, and inhibition. *Biochemistry* **44**, 10349-59.

- Harcourt, B. H., Jukneliene, D., Kanjanahaluethai, A., Bechill, J., Severson, K. M., Smith, C. M., Rota, P. A. & Baker, S. C. (2004). Identification of severe acute respiratory syndrome coronavirus replicase products and characterization of papain-like protease activity. *J Virol* **78**, 13600-12.
- Hegyí, A. & Ziebuhr, J. (2002). Conservation of substrate specificities among coronavirus main proteases. *J Gen Virol* **83**, 595-9.
- Heppel, L. A., Harkness, D. R. & Hilmoé, R. J. (1962). A study of the substrate specificity and other properties of the alkaline phosphatase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **237**, 841-6.
- Herold, J., Gorbalenya, A. E., Thiel, V., Schelle, B. & Siddell, S. G. (1998). Proteolytic processing at the amino terminus of human coronavirus 229E gene 1-encoded polyproteins: identification of a papain-like proteinase and its substrate. *J Virol* **72**, 910-8.
- Herold, J., Raabe, T., Schelle-Prinz, B. & Siddell, S. G. (1993). Nucleotide sequence of the human coronavirus 229E RNA polymerase locus. *Virology* **195**, 680-91.
- Herold, J. & Siddell, S. G. (1993). An 'elaborated' pseudoknot is required for high frequency frameshifting during translation of HCV 229E polymerase mRNA. *Nucleic Acids Res* **21**, 5838-42.
- Herold, J., Siddell, S. G. & Gorbalenya, A. E. (1999). A human RNA viral cysteine proteinase that depends upon a unique Zn<sup>2+</sup>-binding finger connecting the two domains of a papain-like fold. *J Biol Chem* **274**, 14918-25.
- Hertzig, T., Scandella, E., Schelle, B., Ziebuhr, J., Siddell, S. G., Ludewig, B. & Thiel, V. (2004). Rapid identification of coronavirus replicase inhibitors using a selectable replicon RNA. *J Gen Virol* **85**, 1717-25.
- Hofmann, H., Pyrc, K., van der Hoek, L., Geier, M., Berkhout, B. & Pohlmann, S. (2005). Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7988-93.
- Holmes, K. V. (2001). Coronaviruses. In *Field's Virology*, 4 edn, pp. 1187-1205. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. New York: Lippincott Williams & Wilkins.
- Holmes, K. V. (2005). Structural biology. Adaptation of SARS coronavirus to humans. *Science* **309**, 1822-3.
- Hughes, S. A., Bonilla, P. J. & Weiss, S. R. (1995). Identification of the murine coronavirus p28 cleavage site. *J Virol* **69**, 809-13.
- Ivanov, K. A., Hertzig, T., Rozanov, M., Bayer, S., Thiel, V., Gorbalenya, A. E. & Ziebuhr, J. (2004). Major genetic marker of nidoviruses encodes a replicative endoribonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12694-9.
- Ivanov, K. A. & Ziebuhr, J. (2004). Human coronavirus 229E nonstructural protein 13: characterization of duplex-unwinding, nucleoside triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities. *J Virol* **78**, 7833-8.
- 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**, 11892-900.
- Kanjanahaluethai, A. & Baker, S. C. (2000). Identification of mouse hepatitis virus papain-like proteinase 2 activity. *J Virol* **74**, 7911-21.

- Kanjanahaluethai, A. & Baker, S. C. (2001). Processing of the replicase of murine coronavirus: papain-like proteinase 2 (PLP2) acts to generate p150 and p44. *Adv Exp Med Biol* **494**, 267-73.
- Karras, G. I., Kustatscher, G., Buhecha, H. R., Allen, M. D., Pugieux, C., Sait, F., Bycroft, M. & Ladurner, A. G. (2005). The macro domain is an ADP-ribose binding module. *Embo J* **24**, 1911-20.
- Kim, L., Hayes, J., Lewis, P., Parwani, A. V., Chang, K. O. & Saif, L. J. (2000). Molecular characterization and pathogenesis of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus (PRCV) field isolates co-circulating in a swine herd. *Arch Virol* **145**, 1133-47.
- Kjeldsberg, E. (1984). Demonstration of 7-nm projections on human and avian coronaviruses. *Ultrastruct Pathol* **7**, 201-5.
- Kolb, A. F., Maile, J., Heister, A. & Siddell, S. G. (1996). Characterization of functional domains in the human coronavirus HCV 229E receptor. *J Gen Virol* **77 (Pt 10)**, 2515-21.
- 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**, 1953-66.
- 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**, 263-70.
- Kumaran, D., Eswaramoorthy, S., Studier, F. W. & Swaminathan, S. (2005). Structure and mechanism of ADP-ribose-1"-monophosphatase (Appr-1"-pase), a ubiquitous cellular processing enzyme. *Protein Sci* **14**, 719-26.
- Kurepa, J., Walker, J. M., Smalle, J., Gosink, M. M., Davis, S. J., Durham, T. L., Sung, D. Y. & Vierstra, R. D. (2003). The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in Arabidopsis. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress. *J Biol Chem* **278**, 6862-72.
- Ladurner, A. G. (2003). Inactivating chromosomes: a macro domain that minimizes transcription. *Mol Cell* **12**, 1-3.
- Lai, M. M., Baric, R. S., Brayton, P. R. & Stohlman, S. A. (1984). Characterization of leader RNA sequences on the virion and mRNAs of mouse hepatitis virus, a cytoplasmic RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 3626-30.
- Lai, M. M., Patton, C. D. & Stohlman, S. A. (1982). Further characterization of mRNA's of mouse hepatitis virus: presence of common 5'-end nucleotides. *J Virol* **41**, 557-65.
- Lanciotti, R. S., Ludwig, M. L., Rwaguma, E. B., Lutwama, J. J., Kram, T. M., Karabatsos, N., Cropp, B. C. & Miller, B. R. (1998). Emergence of epidemic O'nyong-nyong fever in Uganda after a 35-year absence: genetic characterization of the virus. *Virology* **252**, 258-68.

- Lee, H. J., Shieh, C. K., Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., La Monica, N., Tuler, J., Bagdzhadzhyan, A. & Lai, M. M. (1991). The complete sequence (22 kilobases) of murine coronavirus gene 1 encoding the putative proteases and RNA polymerase. *Virology* **180**, 567-82.
- Leipe, D. D., Wolf, Y. I., Koonin, E. V. & Aravind, L. (2002). Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J Mol Biol* **317**, 41-72.
- 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., Choe, H. & Farzan, M. (2003). Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* **426**, 450-4.
- Lim, K. P. & Liu, D. X. (1998). Characterization of the two overlapping papain-like proteinase domains encoded in gene 1 of the coronavirus infectious bronchitis virus and determination of the C-terminal cleavage site of an 87-kDa protein. *Virology* **245**, 303-12.
- Lim, K. P., Ng, L. F. & Liu, D. X. (2000). Identification of a novel cleavage activity of the first papain-like proteinase domain encoded by open reading frame 1a of the coronavirus Avian infectious bronchitis virus and characterization of the cleavage products. *J Virol* **74**, 1674-85.
- Lindner, H. A., Fotouhi-Ardakani, N., Lytvyn, V., Lachance, P., Sulea, T. & Menard, R. (2005). The papain-like protease from the severe acute respiratory syndrome coronavirus is a deubiquitinating enzyme. *J Virol* **79**, 15199-208.
- Liu, D. X., Tibbles, K. W., Cavanagh, D., Brown, T. D. & Brierley, I. (1995). Identification, expression, and processing of an 87-kDa polypeptide encoded by ORF 1a of the coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology* **208**, 48-57.
- Lu, Y. & Denison, M. R. (1997). Determinants of mouse hepatitis virus 3C-like proteinase activity. *Virology* **230**, 335-42.
- Madan, V., Garcia Mde, J., Sanz, M. A. & Carrasco, L. (2005). Viroporin activity of murine hepatitis virus E protein. *FEBS Lett* **579**, 3607-12.
- Martzen, M. R., McCraith, S. M., Spinelli, S. L., Torres, F. M., Fields, S., Grayhack, E. J. & Phizicky, E. M. (1999). A biochemical genomics approach for identifying genes by the activity of their products. *Science* **286**, 1153-5.
- McIntosh, K., Chao, R. K., Krause, H. E., Wasil, R., Mocega, H. E. & Mufson, M. A. (1974). Coronavirus infection in acute lower respiratory tract disease of infants. *J Infect Dis* **130**, 502-7.
- Moes, E., Vijgen, L., Keyaerts, E., Zlateva, K., Li, S., Maes, P., Pyrc, K., Berkhout, B., van der Hoek, L. & Van Ranst, M. (2005). A novel pancoronavirus RT-PCR assay: frequent detection of human coronavirus NL63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium. *BMC Infect Dis* **5**, 6.
- Mondal, S. P. & Cardona, C. J. (2004). Comparison of four regions in the replicase gene of heterologous infectious bronchitis virus strains. *Virology* **324**, 238-48.
- Monto, A. S. & Lim, S. K. (1974). The Tecumseh study of respiratory illness. VI. Frequency of and relationship between outbreaks of coronavirus infection. *J Infect Dis* **129**, 271-6.
- Mosimann, S. C., Cherney, M. M., Sia, S., Plotch, S. & James, M. N. (1997). Refined X-ray crystallographic structure of the poliovirus 3C gene product. *J Mol Biol* **273**, 1032-47.

- Myint, S. H. (1995). Human coronavirus infections. In *The Coronaviridae*, pp. 389-401. Edited by S. G. Sidell. New York: Plenum Press.
- Nasr, F. & Filipowicz, W. (2000). Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* cyclic nucleotide phosphodiesterase involved in the metabolism of ADP-ribose 1",2"-cyclic phosphate. *Nucleic Acids Res* **28**, 1676-83.
- Neumann, H. (1968). Substrate selectivity in the action of alkaline and acid phosphatases. *J Biol Chem* **243**, 4671-6.
- Nigam, V. N., Davidson, H. M. & Fishman, W. H. (1959). Kinetics of hydrolysis of the orthophosphate monoesters of phenol, p-nitrophenol, and glycerol by human prostatic acid phosphatase. *J Biol Chem* **234**, 1550-4.
- Olsen, J., Cowell, G. M., Konigshofer, E., Danielsen, E. M., Moller, J., Laustsen, L., Hansen, O. C., Welinder, K. G., Engberg, J., Hunziker, W. & et al. (1988). Complete amino acid sequence of human intestinal aminopeptidase N as deduced from cloned cDNA. *FEBS Lett* **238**, 307-14.
- Peiris, J. S., Guan, Y. & Yuen, K. Y. (2004). Severe acute respiratory syndrome. *Nat Med* **10**, S88-97.
- Peiris, J. S., Yuen, K. Y., Osterhaus, A. D. & Stohr, K. (2003). The severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* **349**, 2431-41.
- Penzes, Z., Gonzalez, J. M., Calvo, E., Izeta, A., Smerdou, C., Mendez, A., Sanchez, C. M., Sola, I., Almazan, F. & Enjuanes, L. (2001). Complete genome sequence of transmissible gastroenteritis coronavirus PUR46-MAD clone and evolution of the purdue virus cluster. *Virus Genes* **23**, 105-18.
- Perche, P. Y., Vourc'h, C., Konecny, L., Souchier, C., Robert-Nicoud, M., Dimitrov, S. & Khochbin, S. (2000). Higher concentrations of histone macroH2A in the Barr body are correlated with higher nucleosome density. *Curr Biol* **10**, 1531-4.
- Phizicky, E. M. & Greer, C. L. (1993). Pre-tRNA splicing: variation on a theme or exception to the rule? *Trends Biochem Sci* **18**, 31-4.
- Phizicky, E. M., Schwartz, R. C. & Abelson, J. (1986). *Saccharomyces cerevisiae* tRNA ligase. Purification of the protein and isolation of the structural gene. *J Biol Chem* **261**, 2978-86.
- Pilkis, S. J., Pilkis, J., el-Maghrabi, M. R. & Claus, T. H. (1985). The sugar phosphate specificity of rat hepatic 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J Biol Chem* **260**, 7551-6.
- Pitkaranta, A., Virolainen, A., Jero, J., Arruda, E. & Hayden, F. G. (1998). Detection of rhinovirus, respiratory syncytial virus, and coronavirus infections in acute otitis media by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Pediatrics* **102**, 291-5.
- Popova, R. & Zhang, X. (2002). The spike but not the hemagglutinin/esterase protein of bovine coronavirus is necessary and sufficient for viral infection. *Virology* **294**, 222-36.
- Pringle, C. R. (1996). Virus taxonomy 1996 - a bulletin from the Xth International Congress of Virology in Jerusalem. *Arch Virol* **141**, 2251-6.
- Putics, A., Filipowicz, W., Hall, J., Gorbalenya, A. E. & Ziebuhr, J. (2005). ADP-ribose-1"-monophosphatase: a conserved coronavirus enzyme that is dispensable for viral replication in tissue culture. *J Virol* **79**, 12721-31.
- Risco, C., Anton, I. M., Enjuanes, L. & Carrascosa, J. L. (1996). The transmissible gastroenteritis coronavirus contains a spherical core shell consisting of M and N proteins. *J Virol* **70**, 4773-7.

- Ritchie, K. J., Hahn, C. S., Kim, K. I., Yan, M., Rosario, D., Li, L., de la Torre, J. C. & Zhang, D. E. (2004). Role of ISG15 protease UBP43 (USP18) in innate immunity to viral infection. *Nat Med* **10**, 1374-8.
- Sawicki, S. G. & Sawicki, D. L. (1990). Coronavirus transcription: subgenomic mouse hepatitis virus replicative intermediates function in RNA synthesis. *J Virol* **64**, 1050-6.
- Sawicki, S. G. & Sawicki, D. L. (1998). A new model for coronavirus transcription. *Adv Exp Med Biol* **440**, 215-9.
- Schaad, M. C. & Baric, R. S. (1994). Genetics of mouse hepatitis virus transcription: evidence that subgenomic negative strands are functional templates. *J Virol* **68**, 8169-79.
- Schelle, B., Karl, N., Ludewig, B., Siddell, S. G. & Thiel, V. (2005). Selective replication of coronavirus genomes that express nucleocapsid protein. *J Virol* **79**, 6620-30.
- Schwartz, R. C., Greer, C. L., Gegenheimer, P. & Abelson, J. (1983). Enzymatic mechanism of an RNA ligase from wheat germ. *J Biol Chem* **258**, 8374-83.
- Schwarz, B., Routledge, E. & Siddell, S. G. (1990). Murine coronavirus nonstructural protein ns2 is not essential for virus replication in transformed cells. *J Virol* **64**, 4784-91.
- Schwer, B., Sawaya, R., Ho, C. K. & Shuman, S. (2004). Portability and fidelity of RNA-repair systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2788-93.
- Seybert, A., Hegyi, A., Siddell, S. G. & Ziebuhr, J. (2000). The human coronavirus 229E superfamily 1 helicase has RNA and DNA duplex-unwinding activities with 5'-to-3' polarity. *Rna* **6**, 1056-68.
- Seybert, A., Posthuma, C. C., van Dinten, L. C., Snijder, E. J., Gorbalenya, A. E. & Ziebuhr, J. (2005). A complex zinc finger controls the enzymatic activities of nidovirus helicases. *J Virol* **79**, 696-704.
- Seybert, A. & Ziebuhr, J. (2001). Guanosine triphosphatase activity of the human coronavirus helicase. *Adv Exp Med Biol* **494**, 255-60.
- Seybert, A., Ziebuhr, J. & Siddell, S. G. (1997). Expression and characterization of a recombinant murine coronavirus 3C-like proteinase. *J Gen Virol* **78** (Pt 1), 71-5.
- Shi, S. T. & Lai, M. M. (2005). Viral and cellular proteins involved in coronavirus replication. *Curr Top Microbiol Immunol* **287**, 95-131.
- Shirako, Y. & Yamaguchi, Y. (2000). Genome structure of Sagiyama virus and its relatedness to other alphaviruses. *J Gen Virol* **81**, 1353-60.
- Shull, N. P., Spinelli, S. L. & Phizicky, E. M. (2005). A highly specific phosphatase that acts on ADP-ribose 1"-phosphate, a metabolite of tRNA splicing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **33**, 650-60.
- Sidell, S. G., Ziebuhr, J. & Snijder, E. J. (2005). Coronaviruses, toroviruss and arteriviruses. In *Virology*, 10 edn, pp. 823-857. Edited by B. W. J. Mahy & V. ter Meulen: Hodder Arnold.
- 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.
- Smits, S. L., Gerwig, G. J., van Vliet, A. L., Lissenberg, A., Briza, P., Kamerling, J. P., Vlasak, R. & de Groot, R. J. (2005). Nidovirus sialate-O-acetylsterases: evolution

- and substrate specificity of coronaviral and toroviral receptor-destroying enzymes. *J Biol Chem* **280**, 6933-41.
- Snijder, E. J., Bredenbeek, P. J., Dobbe, J. C., Thiel, V., Ziebuhr, J., Poon, L. L., Guan, Y., Rozanov, M., Spaan, W. J. & Gorbalenya, A. E. (2003). Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J Mol Biol* **331**, 991-1004.
- Soe, L. H., Shieh, C. K., Baker, S. C., Chang, M. F. & Lai, M. M. (1987). Sequence and translation of the murine coronavirus 5'-end genomic RNA reveals the N-terminal structure of the putative RNA polymerase. *J Virol* **61**, 3968-76.
- 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 U S A* **102**, 2430-5.
- Spagnolo, J. F. & Hogue, B. G. (2000). Host protein interactions with the 3' end of bovine coronavirus RNA and the requirement of the poly(A) tail for coronavirus defective genome replication. *J Virol* **74**, 5053-65.
- Sperry, S. M., Kazi, L., Graham, R. L., Baric, R. S., Weiss, S. R. & Denison, M. R. (2005). Single-amino-acid substitutions in open reading frame (ORF) 1b-nsp14 and ORF 2a proteins of the coronavirus mouse hepatitis virus are attenuating in mice. *J Virol* **79**, 3391-400.
- Strauss, E. G., Rice, C. M. & Strauss, J. H. (1984). Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of Sindbis virus. *Virology* **133**, 92-110.
- Sulea, T., Lindner, H. A., Purisima, E. O. & Menard, R. (2005). Deubiquitination, a new function of the severe acute respiratory syndrome coronavirus papain-like protease? *J Virol* **79**, 4550-1.
- Teng, H., Pinon, J. D. & Weiss, S. R. (1999). Expression of murine coronavirus recombinant papain-like proteinase: efficient cleavage is dependent on the lengths of both the substrate and the proteinase polypeptides. *J Virol* **73**, 2658-66.
- Thiel, V., Herold, J., Schelle, B. & Siddell, S. G. (2001a). Infectious RNA transcribed in vitro from a cDNA copy of the human coronavirus genome cloned in vaccinia virus. *J Gen Virol* **82**, 1273-81.
- Thiel, V., Herold, J., Schelle, B. & Siddell, S. G. (2001b). Viral replicase gene products suffice for coronavirus discontinuous transcription. *J Virol* **75**, 6676-81.
- Thiel, V., Ivanov, K. A., Putics, A., Hertzog, 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**, 2305-15.
- Tibbles, K. W., Brierley, I., Cavanagh, D. & Brown, T. D. (1996). Characterization in vitro of an autocatalytic processing activity associated with the predicted 3C-like proteinase domain of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. *J Virol* **70**, 1923-30.

- Tijms, M. A. & Snijder, E. J. (2003). Equine arteritis virus non-structural protein 1, an essential factor for viral subgenomic mRNA synthesis, interacts with the cellular transcription co-factor p100. *J Gen Virol* **84**, 2317-22.
- Tijms, M. A., van Dinten, L. C., Gorbalenya, A. E. & Snijder, E. J. (2001). A zinc finger-containing papain-like protease couples subgenomic mRNA synthesis to genome translation in a positive-stranded RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1889-94.
- Tuittila, M. T., Santagati, M. G., Roytta, M., Maatta, J. A. & Hinkkanen, A. E. (2000). Replicase complex genes of Semliki Forest virus confer lethal neurovirulence. *J Virol* **74**, 4579-89.
- Tulin, A., Stewart, D. & Spradling, A. C. (2002). The Drosophila heterochromatic gene encoding poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) is required to modulate chromatin structure during development. *Genes Dev* **16**, 2108-19.
- Tyrrell, D. A. & Bynoe, M. L. (1965). Cultivation Of A Novel Type Of Common-Cold Virus In Organ Cultures. *Br Med J* **5448**, 1467-70.
- Tyrrell, D. A., Mika-Johnson, M., Phillips, G., Douglas, W. H. & Chapple, P. J. (1979). Infection of cultured human type II pneumocytes with certain respiratory viruses. *Infect Immun* **26**, 621-9.
- van der Meer, Y., Snijder, E. J., Dobbe, J. C., Schleich, S., Denison, M. R., Spaan, W. J. & Locker, J. K. (1999). Localization of mouse hepatitis virus nonstructural proteins and RNA synthesis indicates a role for late endosomes in viral replication. *J Virol* **73**, 7641-57.
- Vlasak, R., Luytjes, W., Spaan, W. & Palese, P. (1988). Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 4526-9.
- Wang, H., Boisvert, D., Kim, K. K., Kim, R. & Kim, S. H. (2000). Crystal structure of a fibrillar homologue from *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile, at 1.6 Å resolution. *Embo J* **19**, 317-23.
- Wentworth, D. E. & Holmes, K. V. (2001). Molecular determinants of species specificity in the coronavirus receptor aminopeptidase N (CD13): influence of N-linked glycosylation. *J Virol* **75**, 9741-52.
- Yamasaki, M., Thomas, J. M., Churchill, G. C., Garnham, C., Lewis, A. M., Cancela, J. M., Patel, S. & Galione, A. (2005). Role of NAADP and cADPR in the induction and maintenance of agonist-evoked Ca<sup>2+</sup> spiking in mouse pancreatic acinar cells. *Curr Biol* **15**, 874-8.
- Yang, H., Xie, W., Xue, X., Yang, K., Ma, J., Liang, W., Zhao, Q., Zhou, Z., Pei, D., Ziebuhr, J., Hilgenfeld, R., Yuen, K. Y., Wong, L., Gao, G., Chen, S., Chen, Z., Ma, D., Bartlam, M. & Rao, Z. (2005). Design of wide-spectrum inhibitors targeting coronavirus main proteases. *PLoS Biol* **3**, e324.
- Yang, H., Yang, M., Ding, Y., Liu, Y., Lou, Z., Zhou, Z., Sun, L., Mo, L., Ye, S., Pang, H., Gao, G. F., Anand, K., Bartlam, M., Hilgenfeld, R. & Rao, Z. (2003). The crystal structures of severe acute respiratory syndrome virus main protease and its complex with an inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13190-5.
- Yeager, C. L., Ashmun, R. A., Williams, R. K., Cardellicchio, 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.



- Zhang, X. M., Herbst, W., Kousoulas, K. G. & Storz, J. (1994). Biological and genetic characterization of a hemagglutinating coronavirus isolated from a diarrhoeic child. *J Med Virol* **44**, 152-61.
- Ziebuhr, J. (2003). SARS--unprecedented global response to a newly emerging disease. *Int J Med Microbiol* **293**, 229-31.
- Ziebuhr, J. (2005). The coronavirus replicase. *Curr Top Microbiol Immunol* **287**, 57-94.
- Ziebuhr, J., Herold, J. & Siddell, S. G. (1995). Characterization of a human coronavirus (strain 229E) 3C-like proteinase activity. *J Virol* **69**, 4331-8.
- Ziebuhr, J., Heusipp, G. & Siddell, S. G. (1997). Biosynthesis, purification, and characterization of the human coronavirus 229E 3C-like proteinase. *J Virol* **71**, 3992-7.
- Ziebuhr, J., Snijder, E. J. & Gorbalenya, A. E. (2000). Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *J Gen Virol* **81**, 853-79.
- Ziebuhr, J., Thiel, V. & Gorbalenya, A. E. (2001). The autocatalytic release of a putative RNA virus transcription factor from its polyprotein precursor involves two paralogous papain-like proteases that cleave the same peptide bond. *J Biol Chem* **276**, 33220-32.
- Zuniga, S., Sola, I., Alonso, S. & Enjuanes, L. (2004). Sequence motifs involved in the regulation of discontinuous coronavirus subgenomic RNA synthesis. *J Virol* **78**, 980-94.

## 6. Abkürzungen

Appr	ADP-Ribose
Appr-1"-p	ADP-ribose-1"-Phosphat
Appr>p	ADP-Ribose-1",2"-Zyklophosphat
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
AMP	Adenosin-5'-Monophosphat
5'-AMP	Adenosin-5'-Monophosphat
3'-AMP	Adenosin-3'-Monophosphat
2'-AMP	Adenosin-2'-Monophosphat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bzw.	beziehungsweise
BHK-21(N)	HCoV-229E-N-Protein-exprimierende <i>Baby-hamster-kidney</i> -Zellen
cAppr	zyklische Adenosin-Diphosphoribose
cDNA	engl.: <i>complementary DNA</i>
3CL <sup>pro</sup>	3C-ähnliche Protease
BCoV	engl.: <i>bovine coronavirus</i>
CPD	zyklische Phosphodiesterase
CIP	engl.: <i>calf intestine phosphatase</i> (alkalische Phosphatase aus Kalbsdarm)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E-Protein	engl.: <i>envelope protein</i>
FIPV	engl.: <i>feline infectious peritonitis virus</i>
HCoV-229E	Humanes Coronavirus 229E
HE-Protein	Hämagglutinin
HEL	Helikase
IBV	engl.: <i>infectious bronchitis virus</i>
$k_{\text{cat}}$	katalytische Konstante
kD	Kilodalton
MBP	maltosebindendes Protein
MHV	engl.: <i>mouse hepatitis virus</i>
MRC-5	humane embryonale Lungenfibroblasten
2'-O-MT	Ribose-2'-O-Methyltransferase
M-Protein	Membranprotein
mRNA	messenger RNA
MOI	engl.: <i>multiplicity of infection</i>
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
$\alpha$ -NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
N-Protein	Nukleokapsidprotein
nsp	nichtstrukturelles Protein
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
ORF	offenes Leseraster (engl.: <i>open reading frame</i> )
p.i.	engl.: <i>postinfection</i>
PAR	Poly-(ADP-Ribose)
PARG	Poly-(ADP-Ribose)-Glykohydrolase

PARP	Poly-(ADP-Ribosyl)-Polymerase
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i>
PEDV	engl.: <i>porcine epidemic diarrhea virus</i>
PL <sup>pro</sup>	Papain-ähnliche Protease
PL1 <sup>pro</sup>	Papain-ähnliche Protease 1
PL2 <sup>pro</sup>	Papain-ähnliche Protease 2
p	Protein
pp	Polyprotein
RNA	Ribonukleinsäure
RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase
RP-HPLC	engl.: <i>reversed-phase high-performance liquid chromatography</i>
SARS-CoV	Coronavirus des Schwere Akuten Respiratorischen Syndroms
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
S-Protein	Oberflächenglykoprotein
Stat1	engl.: <i>signal transducer and activator of transcription 1</i>
SUD	engl.: <i>SARS-CoV unique domain</i>
TAS	transkriptionsassoziierte Sequenz
TGEV	engl.: <i>transmissible gastroenteritis virus</i>
tRNA	transfer-RNA
Ubl	engl.: <i>ubiquitin-like modifier</i>
UTR	nichttranslatierte Region
z. B.	zum Beispiel
XendoU	poly(U)-spezifische Endoribonuklease

Aminosäuren werden im Ein- oder im Drei-Buchstaben-Code angegeben

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

## 7. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Ákos Putics
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	ungarisch
Geburtsdatum	15.06.1977
Geburtsort	Pécs, Ungarn

### Schulausbildung

1983-1991	Grundschule, Pécs, Ungarn
1991-1995	Leówey Klára Gymnasium, Pécs, Ungarn Abschluß: Abitur mit „sehr gut“

### Studium

1995-2001	Universität Szeged, Szeged, Ungarn Fach: Biologie Abschluß: Diplombiologe mit der Spezialisierung für Biochemie und Mikrobiologie (Note „sehr gut“) Diplomarbeit: Interferon-Induktion in Leukozyten durch <i>Chlamydia pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> und <i>S. saprophyticus</i>
-----------	--

### Promotion

10/2001-12/2005	am Institut für Virologie und Immunbiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Wissenschaftliche Betreuung der Arbeit: Prof. Dr. V. ter Meulen und Priv.-Doz. Dr. J. Ziebuhr (beide Medizinische Fakultät) sowie Prof. Dr. Dr. h. c. mult. J. Hacker (Biologische Fakultät)
10/2001-10/2002	Wissenschaftlicher Angestellter der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
11/2002-10/2005	Stipendiat der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des internationalen Graduiertenkollegs 587/2 "Gene Regulation in and by Microbial Pathogens", Würzburg, Germany – Umeå, Sweden
11/2005-12/2005	Wissenschaftlicher Angestellter der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

## 8. Veröffentlichungen

1. Thiel, V., Ivanov, K. A., Putics, A., Hertzog, 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 Virology* 84, 2305-2315.
2. Putics, A., Ivanov, K. A., Hertzog, T., Gorbalenya, A. E. & Ziebuhr, J. (2005). Novel targets for anti-SARS therapy: coronavirus-encoded RNA-processing enzymes. *Nova Acta Leopoldina* 344, 211-219.
3. Putics, A., Filipowicz, W., Hall, J., Gorbalenya, A. E. & Ziebuhr, J. (2005). ADP-ribose-1"-monophosphatase: a conserved coronavirus enzyme that is dispensable for viral replication in tissue culture. *J Virol* 79, 12721-31.
4. Putics, A., Slaby, J., Filipowicz, W., Gorbalenya, A. E. & Ziebuhr, J. ADP-ribose-1"-phosphatase activities of the human coronavirus 229E and SARS coronavirus X domains. *Adv Exp Med Biol* (in press)
5. Putics, A., Gorbalenya, A. E. & Ziebuhr, J. (2006) Identification of protease and ADP-ribose-1"-monophosphatase activities associated with transmissible gastroenteritis virus non-structural protein 3. *J Gen Virology* 87, 651-656.
6. Egloff, M. P., Malet, H., Putics, A., Heinonen, M., Dutartre, H., Frangeul, A., Gruez, A., Ziebuhr, J., Ahola, T., & Canard, B., (2006) Structural and functional analysis of viral macro domains involved in ADP-ribose binding suggests a link to poly-ADP ribose signaling pathways. (submitted)
7. Putics, A., Slaby, J. & Ziebuhr, J.: Identification of putative active-site residues of the human coronavirus 229E ADP-ribose-1"-monophosphatase. (in preparation)

**1.**

**Mechanisms and enzymes involved in SARS  
coronavirus genome expression**

Thiel, V., Ivanov, K. A., Putics, A., Hertzog, T., Schelle, B., Bayer, S., Weissbrich, B.,  
Snijder, E. J., Rabenau, H., Doerr, H. W., Gorbalenya, A. E. & Ziebuhr, J.

*J Gen Virology* 84, 2305-2315. (2003)

2.

**Novel targets for anti-SARS therapy: coronavirus-  
encoded RNA-processing enzymes**

Putics, A., Ivanov, K. A., Hertzog, T., Gorbalenya, A. E. & Ziebuhr, J.

*Nova Acta Leopoldina* 344, 211-219. (2005)

### 3.

## **ADP-ribose-1''-monophosphatase: a conserved coronavirus enzyme that is dispensable for viral replication in tissue culture**

Putics, A., Filipowicz, W., Hall, J., Gorbalenya, A. E. & Ziebuhr, J.

*J Virol* 79, 12721-31. (2005)



**4.**

**ADP-ribose -1"-phosphatase activities of the human coronavirus 229E and SARS coronavirus X domains**

Putics, A., Slaby, J., Filipowicz, W., Gorbalenya, A. E. & Ziebuhr, J.

*Adv Exp Med Biol* (in press)

5.

**Identification of protease and ADP-ribose-1''-  
monophosphatase activities associated with  
transmissible gastroenteritis virus non-structural  
protein 3**

Putics, A., Gorbalenya, A. E. & Ziebuhr, J.

*J Gen Virology* 87, 651-656. (2006)