

Aus dem Institut für Biochemie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Hilgenfeld

Expression und Charakterisierung der SUD-Domäne des SARS-Coronavirus

Inauguraldissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von
Stefanie Tech
aus Malchin

Lübeck 2005

1. Berichterstatter: Herr Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Christian Ludwig Schmidt

2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. med. Werner Solbach

Tag der mündlichen Prüfung: 12.06.2007

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 12.06.2007

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät-

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung und Fragestellung	7
I.1 Die SARS-Epidemie 2002/03	7
I.1.1 Epidemiologie	7
I.1.2 Klinischer Verlauf	8
I.1.3 Radiologischer und histopathologischer Befund	9
I.1.4 Therapie	9
I.2 SARS-Coronavirus und Coronaviren	9
I.2.1 Entdeckung und Entstehung des SARS-Coronavirus	9
I.2.2 Coronaviren	11
I.2.3 Virusreplikation	12
I.2.4 Phylogenetische Einordnung des SARS-Coronavirus	12
I.2.5 Die genomische Struktur des SARS-Coronavirus	14
I. 3 Ausgangspunkt und Zielstellung der Arbeit	17
II. Material und Methoden	18
II.1 Molekularbiologische Methoden	18
II.1.1 Isolierung von Plasmid DNA (Midiprep)	18
II.1.2 Isolierung von Plasmid DNA (Miniprep)	18
II.1.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)	18
II.1.4 Dephosphorylierung	19
II.1.5 Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation	20
II.1.6 Restriktionsspaltung	20
II.1.7 “End Conversion” und Ligation	21
II.1.8 Transformation von <i>E.coli</i> -Zellen	21
II.1.9 Konzentrieren von DNA-Lösungen	22
II.2 Proteinpräparation und Reinigung	22
II.2.1 Testexpression von SUD Δ 1-43	22
II.2.2 Proteinexpression im präparativen Maßstab	23
II.2.3 Säulenchromatographische Reinigung des SUD-Proteins	23
II.2.3.1 Metallchelate-Affinitätschromatographie (Ni-NTA-Säule)	24
II.2.3.2 Ionenaustauschchromatographie (MonoQ-Säule)	24
II.2.3.3 Gelfiltration (Superdex TM -200)	25

II.2.3.4	Entsalzung von Proteinproben (HiTrap™Desalting-Säule)	25
II.2.4	Konzentrieren von Proteinlösungen	25
II.3	Analytische Methoden	26
II.3.1	SDS-PAGE nach Laemmli	26
II.3.2	SDS-PAGE nach Schägger und v. Jagow	26
II.3.3	Western-Blot (semi-dry-Blotting)	27
II.3.4	Proteinbestimmung (Biorad DC-Protein Assay)	27
II.3.5	Agarose-Gelelektrophorese	28
II.4	Assays zur Charakterisierung von SUDA1-43	28
II.4.1	Aktivitätstests	28
II.4.2	Enzymatisch-optische Tests mit chromogenen Substraten	30
II.4.3	Nachweis von Proteaseaktivität mit Resorufin-markiertem Casein	31
II.4.4	Einfluss organischer Lösungsmittel auf die SUD-Aktivität.....	31
II.4.5	Jodacetamid-Stabilitätstest	32
II.4.6	Abspaltung des His-Tags durch Faktor Xa	32
III.	Ergebnisse	33
III.1	Expression von SUDA1-43	33
III.2	Charakterisierung von SUDA1-43	37
III.2.1	Aktivitätstests	37
III.2.2	Nachweis von Proteaseaktivität mit Resorufin-markiertem Casein	41
III.2.3	Enzymatisch-optische Tests mit chromogenen Substraten	41
III.2.4	Abspaltung des Histidin-Tags durch Faktor Xa	42
IV.	Diskussion	43
IV.1	Expression und Reinigung von SUDA1-43	43
IV.2	Charakterisierung von SUDA1-43	43
IV.3	Ausblick	46
V.	Zusammenfassung	47
VI.	Literaturverzeichnis	48

VII. Anhang	56
VII.1 Puffer	56
VII.2 Lösungen und Färbelösungen	57
VII.3 Medien	58
VII.4 Geräte, Chemikalien, Säulen, Proteine, Enzyme, Kits und Primer	59
VII.5 Kurzschreibweise der Aminosäuren	63
VII.6 Nukleotid- und Aminosäuresequenz von pSUDA1-43 (Klon 8)	64
VIII. Danksagungen	66
IX. Lebenslauf	67

Abkürzungen

ACE II	Angiotensin-Konversionsenzym II
ADH	Antidiuretisches Hormon
AK	Antikörper
ARDS	Akutes Respiratorisches Distress-Syndrom
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BSA	Rinder-Serumalbumin
CIC	3,4-Dichloroisocoumarin
DM	Dodecylmaltosid
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
His-Tag	Histidin-Tag
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
LB	Luria-Bertoni
MCS	Multiple Klonierungsstelle
Mega 9	n-Nonanoyl-N-methylglucamid
MES	2-[N-morpholino]-ethansulfonsäure
M ^{pro}	<i>Coronavirus Main Proteinase</i>
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
NBT	Nitroblau-tetrazolium
NCS	Neugeborenes Kälberserum
nsp	<i>non-structural-protein</i>
NTA	Nitrilotriacetat
NTP	Nukleosidtriphosphat
ORF	Offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PL1 ^{pro}	<i>Papain-like proteinase 1</i>
PL2 ^{pro}	<i>Papain-like proteinase 2</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Pwo	<i>Pyrococcus woesei</i>
RNA	Ribonukleinsäure
SARS	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i> (Schweres Akutes Atemwegssyndrom)
SARS-CoV	SARS-assoziiertes Coronavirus
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SUD	<i>SARS Unique Domain</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris Buffered Saline
TCA	Trichlressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
WHO	<i>World Health Organisation</i>
YT	<i>Yeast-Tryptone</i> (Hefe-Trypton-Medium)

I. Einleitung

I.1 Die SARS-Epidemie 2002/03

I.1.1 Epidemiologie

Im November 2002 trat in der südchinesischen Provinz Guangdong erstmalig eine sich rasch ausbreitende Erkrankung auf, welche aufgrund der im Vordergrund stehenden respiratorischen Symptome als *severe acute respiratory syndrome* (SARS) bezeichnet wurde. Erstbeschreiber dieser neuen Krankheit war der italienische WHO-Wissenschaftler Carlo Urbani, welcher später selbst an der von ihm entdeckten Erkrankung verstarb.

(Reilley et al., 2003; S. H. Lee, 2003).

Die Ausbreitung von SARS in weitere Staaten, wie Kanada oder Taiwan führte dazu, dass die WHO die Erkrankung im März 2003 als globale Bedrohung einstufte (Abb. 1) (www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr23/en/print.html, Stand: 12.05.2005).

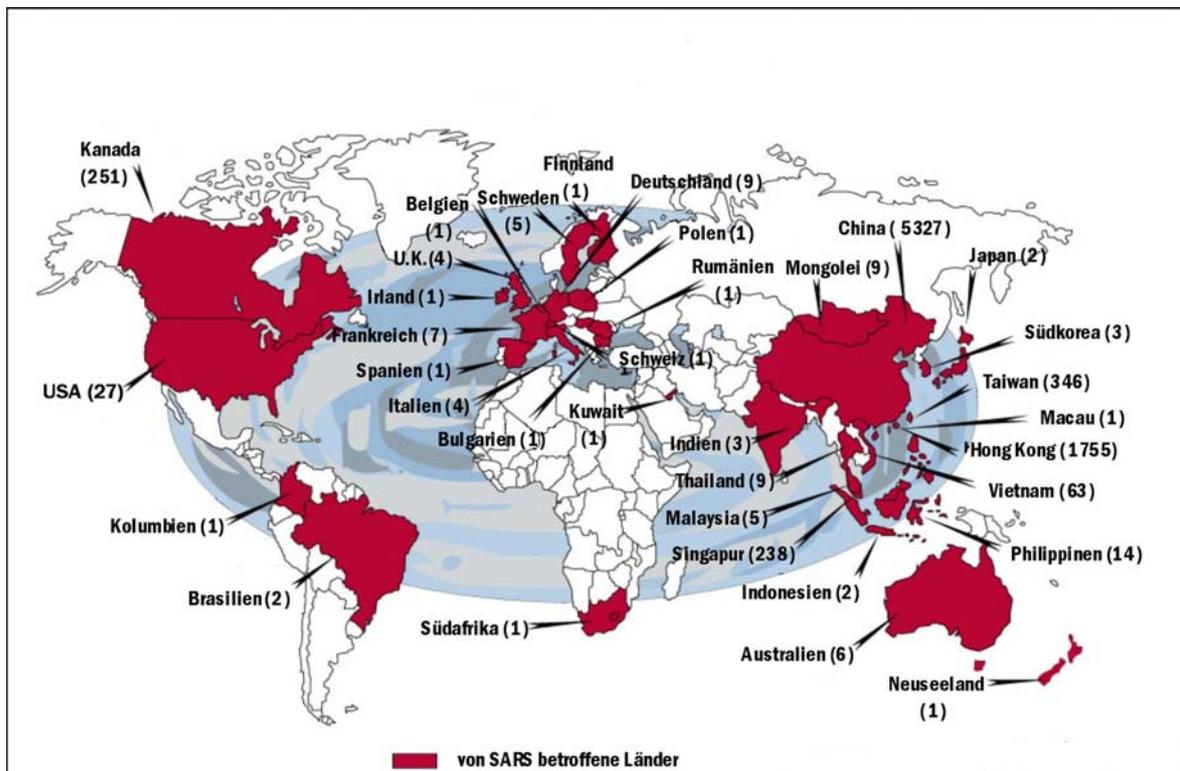


Abb. 1: Epidemiologie des *Severe Acute Respiratory Syndrome*.

Die Karte zeigt die Staaten, in denen SARS registriert wurde, sowie die jeweilige Zahl an Erkrankten (in Klammern). Stand der Daten: 31.12.2003, Gesamtzahl der Erkrankten: 8102,

Karte modifiziert von travelsante.com/upload/pictures/dossiers/sars-worldwide.jpg, Stand: 15.04.2004,

Daten der WHO (www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/print.html, Stand: 21.04.2005)

Bis zum Juli 2003 erkrankten weltweit ca. 8100 Personen in über 25 Staaten an SARS, von denen 774 starben. In den folgenden Monaten traten abgesehen von vereinzelt Fällen erkrankter Labormitarbeiter keine Neuerkrankungen mehr auf.

Zwischen dem 16. Dezember und dem 30. Januar 2004 gab es erneut vier SARS-Fälle, welche nicht laborassoziiert waren und auf Neuübertragungen von Tieren zurückgeführt werden (Peiris et al., 2004).

Seit dem wurden keine natürlich erworbenen SARS-Erkrankungen mehr registriert.

I.1.2 Klinischer Verlauf

Der klinische Verlauf von SARS variiert von leichten respiratorischen Erkrankungen bis zu schweren Pneumonien und ist typischerweise zwei- oder dreiphasig.

Erkrankte Personen entwickeln dabei nach einer Inkubationszeit von 2 bis 7 Tagen zunächst ein hohes Fieber ($> 38\text{ °C}$ für 24 h), das teilweise mit Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Gliederschmerzen, Diarrhöen und allgemeinem Krankheitsgefühl assoziiert ist. Nach einigen Tagen erfolgt dann zunächst ein Rückgang dieser Symptome.

In der zweiten Phase tritt nach weiteren 3-7 Tagen ein trockener, nicht-produktiver Husten mit Dyspnoe auf, welcher in einem Teil der Fälle eine Hypoxie zur Folge hat. Zu diesem Zeitpunkt lassen sich oft eine Erhöhung von Creatinkinase, Lactatdehydrogenase und Aspartataminotransferase im Serum nachweisen. Leukopenie und Thrombozytopenie können auftreten. Ein Großteil der Erkrankten entwickelt eine atypische Pneumonie.

Bei etwa 10 bis 20% der Patienten schreitet die Krankheit zur dritten, kritischen Phase fort, welche durch die Ausbildung eines Akuten Respiratorischen Distress Syndroms (ARDS) gekennzeichnet ist und zumeist eine künstliche Beatmung erforderlich macht (Groneberg et al., 2005; Lee et al., 2003; Tsang et al., 2003; Poutanen et al., 2003)

Die Angaben für die Mortalitätsrate schwanken abhängig u.a. vom Alter zwischen 13,2% und 43,3%, wobei der Tod durch respiratorisches Versagen aufgrund des ausgedehnten Alveolarschadens auftritt (Ding et al., 2003; Donnelly et al., 2003).

I.1.3 Radiologischer und histopathologischer Befund

Der radiologische Befund zeigt zunächst fokale Infiltrate und im Krankheitsverlauf generalisierte, fleckenförmige interstitielle Infiltrate sowie sich ausweitende Verschattungen (Peiris et al., 2004).

Als Histopathologisches Korrelat fand sich im Lungengewebe von SARS-Patienten ein progressiver diffuser Alveolarschaden mit hyalinen Membranen, mononukleären Infiltraten und Desquamation von Pneumozyten in die Alveolen (Ksiazek et al., 2003).

Veränderungen wurden außerdem im lymphatischen Milzgewebe und in Lymphknoten festgestellt. Zeichen einer systemischen Vaskulitis sowie Nekrosen und Degeneration von Parenchymzellen konnten in Herz, Lunge, Leber, Nieren, Nebennieren, Gehirn und quergestreifter Muskulatur nachgewiesen werden.

Hieraus kann geschlossen werden, dass es sich bei SARS um keine auf das Respirationssystem beschränkte, sondern um eine systemische Erkrankung handelt (Ding et al., 2004; To und Lo, 2004).

I.1.4 Therapie

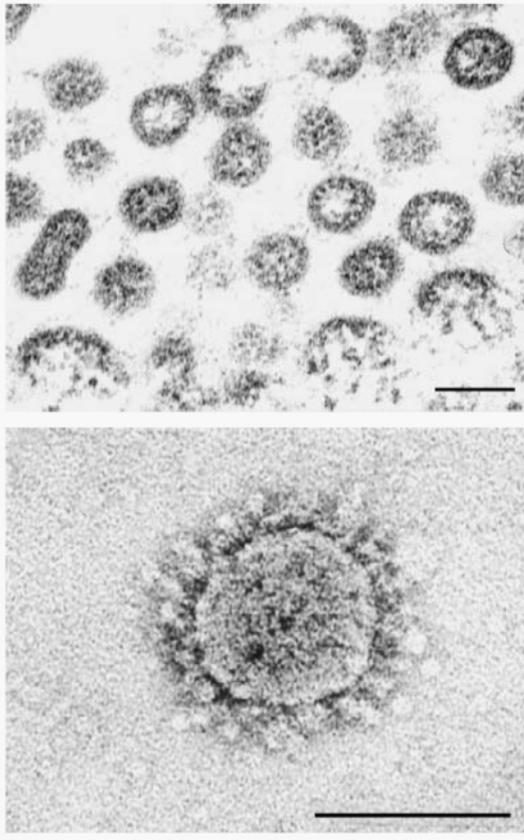
Eine den Erreger bekämpfende Therapie der Erkrankung existiert bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht, so dass man bei der Behandlung der Betroffenen auf symptomatische und intensivmedizinische Maßnahmen angewiesen ist. Die Behandlung basierte dabei auf der Verabreichung von Steroiden und Antibiotika sowie Ribavirin (Navas-Martin und Weiss, 2004). Auch eine medizinische Prophylaxe ist noch nicht erhältlich.

I.2 SARS-Coronavirus und Coronaviren

I.2.1 Entdeckung und Entstehung des SARS-Coronavirus

Der Erreger der SARS-Epidemie war zunächst unbekannt. Um die Identifikation des auslösenden Agens zu fördern, richtete die WHO ein Netzwerk von 11 internationalen Laboren ein (WHO, 2003). Im März 2003 gelang es dem „Center for Disease Control and Prevention“ in Atlanta, USA, dem Team des Virologen Malik Peiris von der Universität

Hongkong sowie dem Virologen Christian Drosten vom „Bernhard Nocht Institut für Tropenmedizin“ in Hamburg nachzuweisen, dass es sich dabei um ein bisher unbekanntes Coronavirus handelte (Ksiazek et al., 2003; Drosten et al., 2003; Peiris et al., 2003). Dieses



Coronavirus wurde als „SARS-Coronavirus“ bezeichnet. Durch die Zusammenarbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass das neue Coronavirus alle vier Koch’schen Postulate erfüllte, und somit eindeutig als Ursache der SARS-Erkrankung feststand (Fouchier et al., 2003).

Obwohl der Übertragungsweg bis heute noch nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, geht man von Tröpfcheninfektion und Aerosolen als Hauptinfektionsweg aus (Poutanen und Low, 2004; Seto et al., 2003).

Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des SARS-CoV.

Entnommen aus Ksiazek et al., 2003. Die Balken repräsentieren jeweils 100 nm.

Über die Entstehung des SARS-CoV existieren verschiedene Theorien.

Einerseits geht man davon aus, dass ein tierspezifisches Virus, dessen natürlicher Wirt allerdings unbekannt ist, mutierte, und damit die Fähigkeit entwickelte, auch Menschen zu infizieren. Diese Hypothese wird vom Nachweis eines Coronavirus in den auf chinesischen Märkten verkauften wilden Larvenrollern unterstützt, welches eine Sequenzübereinstimmung von über 99% mit dem SARS-CoV aufweist (Guan et al., 2003). Inzwischen wird davon ausgegangen, dass auf diesen Märkten (sog. „wet markets“) der Guangdong-Provinz die Transmission des SARS-CoV von Tieren auf den Menschen stattfand (Klempner und Shapiro, 2004; Peiris et al., 2004).

Andererseits könnte das SARS-Virus auch aus einem zuvor harmlosen humanen Coronavirus entstanden sein. Die Tatsache, dass nichtinfizierte Personen keinerlei Antikörper gegen das SARS-CoV aufweisen, macht dies jedoch unwahrscheinlich (Marra et al., 2003; Holmes, 2003).

I.2.2 Coronaviren

Die Gruppe der Coronaviren gehört ebenso wie die Toroviren der Familie der *Coronaviridae* an, welche zusammen mit den Familien *Arteriviridae* und *Roniviridae* die Ordnung der *Nidovirales* bildet (Holmes und Lai, 2001; Gonzáles et al., 2003).

Coronaviren sind behüllte, positivsträngige RNA-Viren mit einer durchschnittlichen Größe von 100-140 nm. Unter dem Elektronenmikroskop fällt ein schütterer Kranz (lat.: Corona) aus 15-29 nm langen keulenförmigen Projektionen auf, der durch das sehr große Oberflächenprotein (S) hervorgerufen wird (Abb. 2).

Das einzelsträngige Genom der Coronaviren stellt mit einer Größe von 27,6 – 31,6 kb das größte unter den bekannten RNA-Viren dar. Das Virion ist von einer Lipidhülle umgeben, in die die Oberflächenproteine des Virus S (Spike), E (Envelope) und, bei manchen Coronaviren, HE (Hämagglutinin-Esterase) eingelagert sind. Ebenfalls in die Membran eingelagert ist das Matrixprotein M, das eine Verbindung zu dem Nukleokapsid des Virus herstellt. Das helikale Nukleokapsid wird durch das N-Protein und die genomische RNA gebildet (Abb. 3).

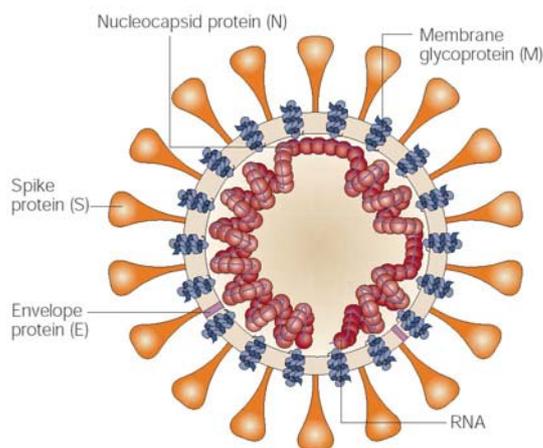


Abb. 3: Schematischer Aufbau des SARS-CoV.

Die Lipiddoppelschicht, welche das Spike-Protein, das Membran-Protein und das Envelope-Protein enthält, umschließt das helikale Nukleokapsid bestehend aus dem Nukleokapsid-Protein und der mit diesem assoziierten viralen RNA.

(Bild entnommen aus Stadler et al., 2003)

Coronaviren sind weltweit die Ursache von ca. 30% der milden und moderaten Infektionen des oberen Respirationstraktes des Menschen, sowie von teilweise schweren Infektionen des Respirationstraktes, des Gastrointestinaltraktes, der Leber und des Nervensystems bei Tieren. Das SARS-Coronavirus stellt somit das erste humane Coronavirus dar, welches auch im Menschen schwere Infektionen hervorruft. Die Übertragung erfolgt dabei durch Schmier- und Tröpfcheninfektionen (Holmes und Lai, 2001; McIntosh, 1996; Kapikian, 1975; Becker, 2003).

I.2.3 Virusreplikation

Der Vermehrungszyklus der Coronaviren ist bis heute noch nicht vollständig erforscht.

Die Infektion der Zellen erfolgt über einen Rezeptor in der Plasmamembran, an den das S-Protein andockt. Für das SARS-CoV wurde mittlerweile das *Angiotensin-Converting-Enzyme II (ACE II)* als ein funktioneller Rezeptor identifiziert (Li et al., 2003). Anschließend verschmilzt die Virushülle mit der zellulären Membran, und das Nukleokapsid wird in das Zytoplasma der Zelle freigesetzt.

Nach der Infektion einer Wirtszelle werden die am 5' Ende des Genoms gelegene ORF's mittels „ribosomal frameshift“ in zwei Polyproteine (pp1a und pp1ab) translatiert. Diese werden von 2-3 ORF1a-kodierten Proteasen (M^{pro} , $PL1^{pro}$, $PL2^{pro}$), welche durch Autolyse aus dem Polyprotein freigesetzt werden, in mehrere Nicht-Strukturproteine (nsp's) geschnitten (u.a. RNA-abhängige RNA-Polymerase und RNA Helikase). Diese Proteine sind verantwortlich für die Replikation des viralen Genoms, wozu sie einen Replikationskomplex bilden. Weiterhin generieren sie bestimmte Transkripte (subgenomische mRNA), welche für die Synthese von mRNA's und somit der viralen Proteine nötig sind (Sethna et al., 1989). Durch die Translation aller ORF's stromaufwärts von ORF1b entstehen die verschiedenen viralen Struktur- und akzessorischen Proteine wie das Spike-Protein, das Envelope-Protein, das Membran-Protein und das Nukleokapsid-Protein. Diese werden im Endoplasmatischen Retikulum der Wirtszelle mit der replizierten viralen RNA assoziiert, woraufhin das neuentstandene Virus durch den Golgi-Komplex wandert und die Zelle vermutlich mittels Exozytose verlässt (Abb. 6) (Holmes und Lai, 2001; Ziebuhr und Sidell, 1998; Snijder et al., 2003; Becker, 2003).

I.2.4 Phylogenetische Einordnung des SARS- Coronavirus

Die Einteilung der Coronaviren erfolgt nach serologischer Kreuzreaktivität und phylogenetischer Analyse der vier Strukturproteine (N, M, E und S) sowie der verschiedenen Replikase-Regionen in drei Untergruppen, wobei humanpathogene Viren in den Gruppen 1 (HCoV-229E) und 2 (HCoV-OC43) zu finden sind. Gruppe 1 und 2 enthalten weiterhin verschiedene Säugetiere befallende Viren, wohingegen Gruppe 3 nur vogelspezifische Viren umfasst (Holmes und Lai, 2001; Gorbalenya et al., 2004).

Die Analyse der Gensequenz des SARS-CoV zeigte, dass sich das neuentdeckte Virus in keine dieser drei Gruppen einordnen lässt, und so wurde zunächst vorgeschlagen, das SARS-CoV einer neuen, vierten Gruppe von Coronaviren zuzuordnen (Marra et al., 2003; Rota et al., 2003; Ksiazek et al., 2003).

Dem gegenüber steht die Hypothese von Snijder et al., welche basierend auf einer speziellen Analyse der ORF1b- Region besagt, dass die SARS-CoV-Linie eine frühe Abspaltung von Gruppe-2-Coronaviren darstellt (Abb. 4). Diese Theorie konnte von weiteren Arbeitsgruppen untermauert werden (Snijder et al., 2003; Stadler et al., 2003; Gibbs et al., 2004)

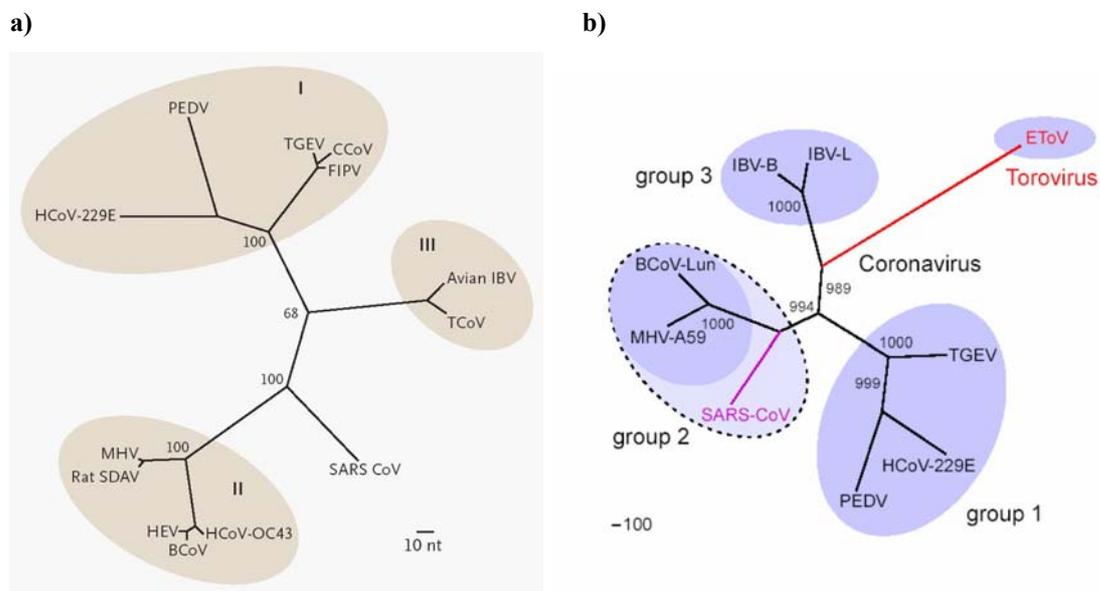


Abb. 4: Phylogenetische Einordnung des SARS-Coronavirus.

a) Von Ksiazek et al. erstellter Stammbaum, der basierend auf einer genetischen Analyse von ORF 1b die Einordnung des SARS-CoV in eine neue, vierte Gruppe von Coronaviren vorsieht (aus: Ksiazek et al.).

Gruppe 1: Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV), Human Coronavirus 229E (HCoV-229E), Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV), Canine Coronavirus (CCoV), Feline Infectious Peritonitis Virus (FIPV); Gruppe 2: Mouse Hepatitis Virus (MHV), Bovine Coronavirus (BCoV), Human Coronavirus OC43 (HCoV-OC43), Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus (HEV), Rat Sialodacryoadenitis Virus (SDAV); Gruppe 3: Turkey Coronavirus (TCoV), Avian Infectious Bronchitis Virus (IBV).

b) Phylogenetische Analyse des Coronavirus Replikase-Gens von Snijder et al., welche zur Einordnung des SARS-CoV als eine frühe Abspaltung von Gruppe 2-Coronaviren führte.

Gruppe 1: Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV), Human Coronavirus 229E (HCoV-229E), Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV); Gruppe 2: Mouse Hepatitis Virus A59 (MHV-A59), Bovine Coronavirus (BCoV-Lun); Gruppe 3: Infectious Bronchitis Virus Stämme Beaudette (IBV-B) und LX4 (IBV-L).

I.2.5 Die genomische Struktur des SARS-Coronavirus

Die Genomsequenz des SARS-CoV wurde bereits wenige Wochen nach der Identifikation des Virus aufgeklärt und unter anderen vom „Michael Smith Genome Sciences Centre“ in Vancouver und dem „Center for Disease Control and Prevention“ in Atlanta publiziert.

Es zeigte sich, dass das Genom eine Gesamtlänge von 29,727 kb hat und 14 ORF's enthält (Marra et al., 2003; Rota et al., 2003).

Der Vergleich der verschiedenen SARS-CoV-ORF's mit denen anderer Coronaviren zeigt ein analoges Muster der Gen-Anordnung mit den Replikase- und Protease-Genen (1a-1b) sowie den Spike-Protein (S), Envelope-Protein (E), Membran-Protein (M) und Nukleokapsid-Protein (N) -Genen in einer typischen Anordnung von 5' nach 3'.

ORF 1a kodiert unter anderem für die zwei viruseigenen Proteasen *3C-like cysteine proteinase* ($3CL^{pro}$ oder *Coronavirus Main Proteinase* M^{pro}) und *papain-like proteinase 2* ($PL2^{pro}$), welche die SARS-CoV-Replikase-Polyproteine (pp1a und pp1ab) in 16 Produkte schneiden. Dabei spaltet $3CL^{pro}$ wahrscheinlich an 12 und $PL2^{pro}$ an 3 Schnittstellen (Snijder et al., 2003).

Die größte Untereinheit von ORF 1a (nsp3) enthält einige bedeutende Unterschiede zu der korrespondierenden Region im Genom von Gruppe 2-Coronaviren (Abb. 5).

So findet sich einerseits kein Ortholog der *papain-like proteinase 1* ($PL1^{pro}$) im Genom des SARS-CoV, die vermutlich während der Evolution dieser Linie verloren ging. Es wird davon ausgegangen, dass ihre Funktion von $PL2^{pro}$ übernommen wird, was aufgrund der überlappenden Substratspezifität beider Proteasen plausibel erscheint (Thiel et al., 2003; Ziebuhr et al., 2001).

Weiterhin wurde unmittelbar stromaufwärts von $PL2^{pro}$, also etwa an der Position des $PL1^{pro}$ -Genes bei anderen Coronaviren, eine 375 Aminosäuren große Domäne gefunden, welche bei keinem anderen Coronavirus vorkommt und als *SARS-CoV Unique Domain* (*SUD*) bezeichnet wurde (Snijder et al., 2003). Die korrespondierende ORF1a-Region ist auch bei anderen Coronavirusgruppen sehr variabel und besteht bei einigen Coronaviren (TGEV und IBV) sogar nur aus wenigen Aminosäuren. Bis heute ist nicht bekannt, ob das SUD-Protein im Vermehrungszyklus des SARS-CoV eine Rolle spielt. Falls dies der Fall ist, könnte es an der hohen Pathogenität des SARS-CoV im Vergleich zu den anderen humanen Coronaviren beteiligt sein und aufgrund dessen ein attraktives Ziel für therapeutische Interventionen darstellen (Groneberg et al., 2005).

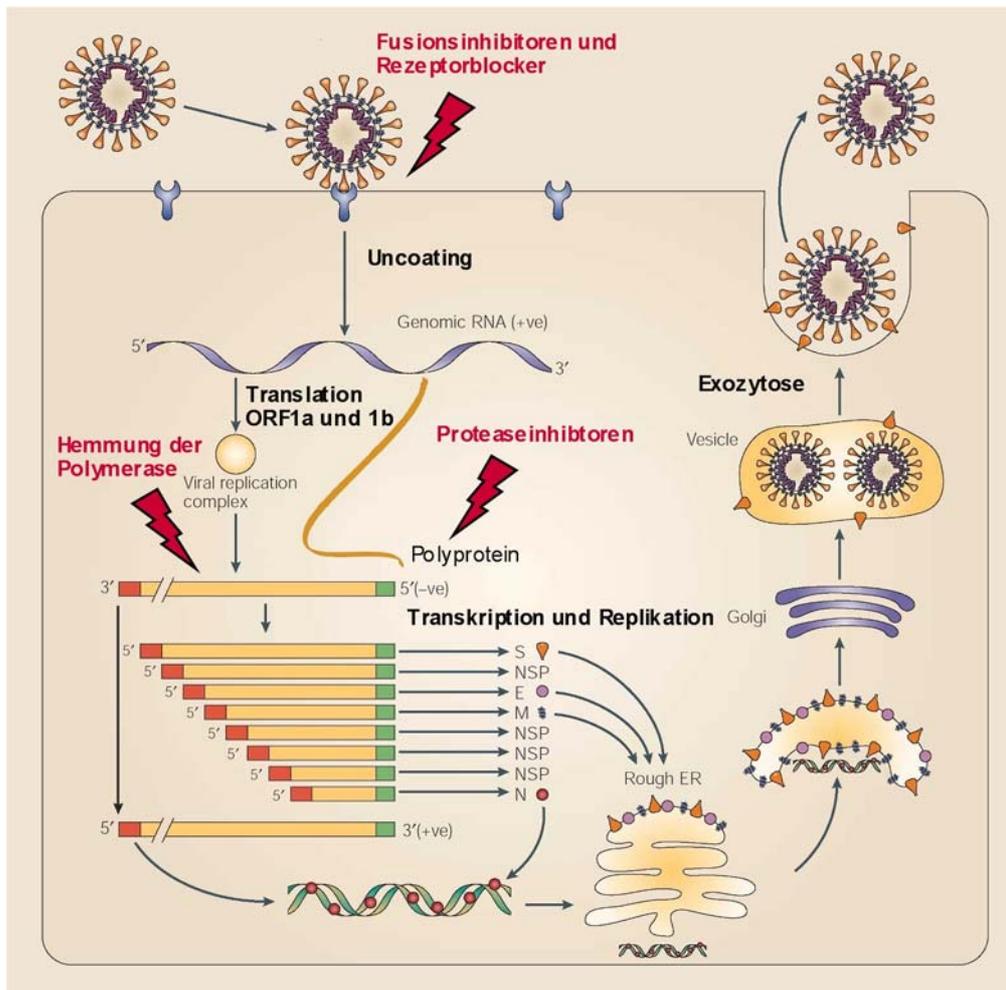


Abb. 6: Lebenszyklus des SARS-CoV mit möglichen Angriffspunkten für Medikamente.

Die Blockade des spezifischen Virusrezeptors auf der Oberfläche der Wirtszelle könnte das Eindringen des Virus verhindern. Ebenso könnte eine Blockade der rezeptor-induzierten Konformationsänderungen des S-Proteins die Fusion des Virus mit der Wirtsmembran inhibieren. Das Processing des viralen Polyproteins durch die viruseigenen Proteasen könnte durch Proteaseinhibitoren blockiert werden. Weiterhin stellt die RNA-abhängige RNA-Polymerase einen attraktiven Angriffspunkt dar, um in die virale Replikation einzugreifen. Modifiziert nach Stadler et al., 2003.

I. 3 Ausgangspunkt und Zielstellung der Arbeit

Gegenstand dieser Arbeit ist die von Snijder et al. beschriebene SUD-Domäne des SARS-CoV-Genoms, welche den Aminosäurenresten 1166 bis 1544 des ORF1 entspricht.

Das SUD-Protein war schon zuvor exprimiert worden (unpublizierte Arbeiten C. L. Schmidt), jedoch zeigte sich, dass es einer raschen Autoproteolyse unterliegt. Dabei fiel auf, dass bei der Proteolyse anscheinend ein typisches Produkt entsteht, welches ein um 43 Aminosäuren verkürztes SUD-Protein darstellt (Abb. 7).

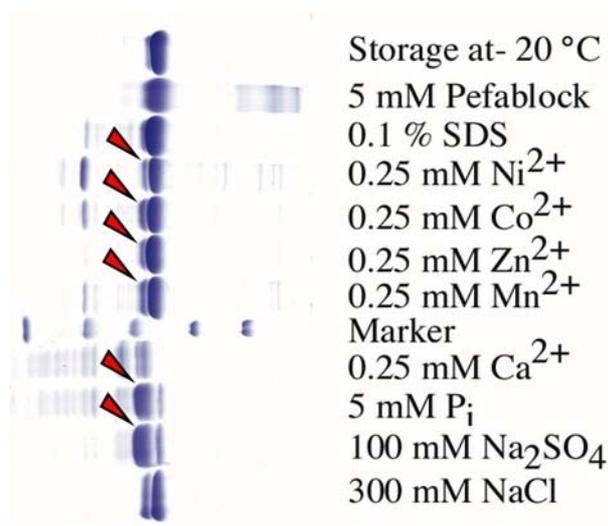


Abb. 7: Inkubation des vollständigen SUD-Proteins mit verschiedenen Zusätzen.

Der Versuch zeigt die Autoproteolyse des SUD-Proteins nach 36 h und deren Beeinflussung durch die angegebenen Komponenten. Dabei fällt die Entstehung eines charakteristischen Autoproteolyseproduktes auf (rote Pfeilspitzen), dessen rekombinante Herstellung und Charakterisierung diese Arbeit zum Ziel hatte.

Die Inkubation erfolgte bei pH 7,5 und 20 °C über 36 h in 25 mM Tris/H₂SO₄. (unpublizierte Abbildung von C. L. Schmidt)

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit bestand darin, eine diesem Proteolyseprodukt entsprechende verkürzte Form des SUD-Proteins rekombinant herzustellen. Dieses Protein entspräche den Aminosäureresten 1207 bis 1544 des ORF1. Zusätzlich sollte dieses Protein einen N-terminalen His-Tag enthalten, welcher, da er unmittelbar an die Erkennungssequenz der Faktor-Xa-Protease grenzt, abgespalten werden kann.

Die Eigenschaften des verkürzten SUD-Proteins sollten insbesondere im Hinblick auf eine erhöhte Stabilität im Vergleich zur volllängen-Form und eine vorhandenen Proteaseaktivität charakterisiert werden.

Die Charakterisierung des SUD-Proteins könnte zum verbesserten Verständnis der Replikation und der Pathogenität des SARS-CoV beitragen und, da es sich um ein ausschließlich beim SARS-Virus vorkommendes Protein handelt, als Ausgangspunkt für die Entwicklung von Medikamenten gegen SARS dienen.

II. Material und Methoden

II.1 Molekularbiologische Methoden

II.1.1 Isolierung von Plasmid DNA (Midiprep)

Für die Plasmidpräparation wurden je 30 ml LB Medium beimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

Die Präparation erfolgte anschließend aus dem Zellpellet, welches durch Zentrifugation der Kulturen (29,5 ml) bei (6000 g) für 7 min gewonnen wurde.

Es wurde das „*Plasmid Midi Kit*“ der Firma Qiagen verwendet.

Das mit Ethanol gefällte und getrocknete Plasmidpellet wurde in 200 µl TE-Puffer gelöst, wovon 2 µl auf ein Agarose-Gel zur Kontrolle aufgetragen und analysiert wurden.

II.1.2 Isolierung von Plasmid DNA (Miniprep)

Hierfür wurden je 6 ml LB Medium mit Zellkulturen beimpft und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Anschließend wurden 5 ml der Kulturen für 3 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Die Präparation erfolgte aus dem erhaltenen Zellpellet unter Verwendung des „*QIAprep Spin Miniprep Kit*“ der Firma Qiagen.

Die Plasmid DNA wurde mit 50 µl EB Puffer (10 mM Tris, pH 8,5 (HCl)) eluiert. Zur Kontrolle wurden 5 µl auf einem Agarose-Gel analysiert.

II.1.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Methode der Polymerasen-Kettenreaktion wurde 1987 von K.B. Mullis entwickelt. Sie ermöglicht es, enzymatisch *in vitro* millionenfache Kopien bestimmter Nukleotidsequenzen herzustellen.

Zur Bestimmung der effektivsten PCR-Bedingungen wurde die Temperatur für das „Primer-Annealing“ (46-70 °C) und die MgSO₄-Konzentration (2, 4 und 6 mM) variiert.

Die Produkte der PCR-Reaktionen wurden im Anschluss auf einem Agarose-Gel analysiert.

Ansätze für PCR:	PCR-Puffer (MgSO ₄)	17,5 µl
	MgSO ₄	0 µl, 14 µl, 28 µl
	dNTP's	3,5 µl
	Primer sen30Xa	3,5 µl oder 1,7 µl
	Primer anti30Xa	3,5 µl oder 1,7 µl
	DNA (1 ng/ml)	3,5 µl
	<i>Pwo DNA Polymerase</i>	1,7 µl

ad 175 µl mit H₂O dest.

Diese Reaktionsmischung wurde in 6 Aliquots zu je 25µl aufgeteilt und die PCR bei verschiedenen Annealing-Temperaturen durchgeführt.

II.1.4 Dephosphorylierung

Die Behandlung von Plasmiden mit einer alkalischen Phosphatase (*Calf intestine phosphatase*, *CIP*, 1 U/µl) erfolgt nach einer Restriktionsspaltung, um Phosphatreste am 5'-Ende des Plasmids zu entfernen. Bei einer anschließenden Ligation werden somit unerwünschte re-Ligationen des leeren Vektors verhindert und die Ausbeute an erwünschten Klonen erhöht.

Um eine Konzentration von 0,5 U Phosphatase pro pmol DNA-Enden zu erhalten, wurden 28 µl der Plasmidlösung mit 2 µl Phosphatase und 10 µl Dephosphorylase-Puffer (10fach konz.) versetzt. Der Ansatz wurde mit destilliertem Wasser auf 100 µl aufgefüllt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurden weitere 2 µl der Phosphatase dem Ansatz hinzugefügt und 45 min bei 55 °C inkubiert.

Anschließend wurde die Reaktion durch das Hinzufügen von 1,2 µl 0,5 M EDTA und Erhitzen des Ansatzes auf 75 °C für 10 min gestoppt.

II.1.5 Phenol–Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation

Die Phenol–Chloroform-Extraktion ist die Standardmethode zur Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen. Dabei dissoziiert Phenol die Protein-Nukleinsäure-Komplexe in die freien Komponenten. Die Proteine werden denaturiert und lagern sich in der Interphase ab.

Zu 100 µl DNA-Lösung wurden 150 µl Phenol (TE-gesättigt, pH 7), 150 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) sowie 200 µl TE-Puffer hinzugefügt. Der Ansatz wurde sorgfältig gemischt und 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert.

Die die DNA enthaltende wässrige Phase wurde abgenommen, mit 300 µl Chloroform versetzt, gut gemischt und erneut für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde erneut abgenommen und der Vorgang wiederholt.

Im Anschluss erfolgte die Fällung der erhaltenen DNA-Lösung mit Ethanol.

Dazu wurde die Probe mit 31 µl (=1/10 Vol) 3 M Natriumacetat und mit 850 µl auf -20 °C gekühltem 100%igem Ethanol (2,5xGesamtvolumen) gemischt. Außerdem wurden 0,5 µl Glycogen hinzugefügt, um die gefällte DNA besser sichtbar zu machen.

Die DNA wurde bei -20 °C über Nacht gefällt.

Anschließend wurde die Probe 30 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde mit 1 ml 70%igem Ethanol (-20 °C) gewaschen, erneut 15 min zentrifugiert (13000 rpm, 4 °C) und 10 min bei Unterdruck getrocknet.

II.1.6 Restriktionsspaltung

Restriktionsendonukleasen sind meist bakterielle Enzyme, welche DNA an spezifischen Nukleotidsequenzen schneiden.

Die Restriktionsenzyme wurden dazu mit dem vom Hersteller angegebenen Puffer (1/10 des Gesamtvolumens), dem Plasmid und destilliertem Wasser gut gemischt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Ansätze wurden anschließend auf einem Agarose-Gel analysiert.

II.1.7 „End Conversion“ und Ligation

Bei der Ligation werden zwei lineare Nukleinsäuren durch ein Enzym (Ligase) verknüpft, welches die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen benachbarten Nukleotiden katalysiert.

Die Ligation wurde mit den Perfectly Blunt Cloning Kits der Firma Novagen durchgeführt, wobei die Vorschrift des Herstellers jedoch leicht modifiziert wurde.

Der Ansatz mit 2 µl des PCR-Produktes, 5 µl End Conversion Mix und 3 µl destilliertem Wasser wurde zunächst für 20 min bei 22 °C inkubiert. Danach erfolgte die Inaktivierung der Polynukleotidkinase durch Erhitzung des Ansatzes auf 75 °C für 5 min, und die Abkühlung im Eisbad für 2 min.

Der Ansatz wurde kurz zentrifugiert und je 1 µl des Vektors sowie 1 µl der T4-DNA-Ligase (4 U/µl) hinzugefügt. Anschließend wurde die Ligations-Reaktion für 1 h bei 22 °C inkubiert, für 10 min bei 75 °C hitzeinaktiviert, 2 min auf Eis gekühlt und erneut kurz zentrifugiert.

Ebenso wurde mit einem Kontrollansatz verfahren, der nur den Vektor, jedoch nicht das Insert enthielt.

6 µl der Ligations-Reaktion wurden auf einem Agarose-Gel analysiert.

II.1.8 Transformation von *E.coli*-Zellen

Die Transformation von Vektor-DNA in „*Nova Blue Singles Competent Cells*“ bzw. *Tuner(DE3)lacI-Zellen* erfolgte ebenfalls mit „*Perfectly Blunt Cloning Kit*“ der Firma Novagen. Für die Transformation von Vektoren in *M15(pREP4)-Zellen* wurde das „*Transformaid-Kit*“ der Firma Fermentas verwendet. Es wurde nach den Angaben des Herstellers gearbeitet.

Die transformierten Zellen wurden in definierten Volumina (10 µl und 100 µl) auf LB-Agarplatten, die die für die Selektion der Transformanden erforderlichen Antibiotika enthielten, ausgestrichen und über Nacht im Wärmeschrank (37 °C) inkubiert.

II.1.9 Konzentrieren von DNA-Lösungen

DNA-Lösungen wurden mit den „Amicon Microcon-PCR Centrifugal Filter Devices“ der Firma Millipore konzentriert. Es wurde nach der vom Hersteller mitgelieferten Beschreibung verfahren.

II.2 Proteinpräparation und Reinigung

II.2.1 Testexpression von SUDA1-43

Von den transformierten und ausplattierten *E.coli*-Stämmen (M15(pREP4) bzw. Tuner(DE3)placI) wurde zunächst je eine Kolonie mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze in 4 ml flüssiges LB-Medium überführt. Zur Selektion der plasmidhaltigen Klone wurden 100 µg/ml Carbenicillin und 25 µg/ml Kanamycin (M15(pREP4)) bzw. 100 µg/ml Carbenicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol (Tuner(DE3)placI) hinzugefügt. Diese Vorkulturen wurden über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

Je 1 ml der Kultur wurde anschließend zu 9 ml LB-Medium hinzugefügt und erneut inkubiert, bis die optische Dichte einen Wert von ca. 0,8 ($\lambda=600$ nm) erreicht hatte. Anschließend wurde die Proteinexpression durch Hinzufügen von 1 mM IPTG induziert und die Kulturen für 3 h inkubiert.

Die Menge an eingesetztem IPTG und die Induktionsdauer wurden zur Bestimmung der idealen Expressionsbedingungen variiert.

Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation der Kulturen bei 5000 rpm für 15 min. Das Zellpellet wurde in 10 ml TE-Puffer (50:1, pH 7,5) suspendiert und erneut zentrifugiert (1500 rpm, 15 min). Nach Aufnahme des Pellets in 1ml TE-Puffer wurden die Zellen mittels Ultraschall lysiert, wobei die Beschallung für je 15 s in 15 s Intervallen und im Eisbad erfolgte (Gesamtdauer: 2 min 15 s). Durch Zentrifugation (30 min, 13000 rpm, 4 °C) wurden anschließend die unlöslichen Zellbestandteile vom gelösten Protein getrennt. Die entstandenen Pellets wurden wiederum in 1ml TE-Puffer suspendiert. Zur Überprüfung der Expression wurde eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt.

II.2.2 Proteinexpression im präparativen Maßstab

Alle Medien enthielten 100 µg/ml Carbenicillin und 25 µg/ml Kanamycin.

Hierzu wurde eine Kolonie der *E.coli*-Klone (pSUDΔ1-43 in M15(pREP4)) mittels einer sterilen Pipettenspitze in 70 ml modifiziertes M9-Medium überführt. Diese Vorkultur wurde über Nacht unter Schütteln bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurden 6x 500 ml modifiziertes M9-Medium mit je 10 ml der Vorkultur angeimpft. Diese wurden wiederum bei 37 °C inkubiert bis eine optische Dichte von 0,8 ($\lambda=600$ nm) erreicht war.

Die Induktion erfolgte durch 1:1 Verdünnung der Kulturen mit YT-Medium, welches 2 mM IPTG enthielt.

Nach 3 h Schüttelinkubation bei 37 °C wurden die Kulturen 20 min bei 4 °C zentrifugiert (5000 rpm). Die Zellpellets wurden in einem Gesamtvolumen von 1 l Tris-Puffer (25 mM, pH 7,5 (HCl)) resuspendiert und erneut für 20 min zentrifugiert (5000 rpm, 4 °C).

Das so entstandene Pellet wurde in 50 ml Tris-Puffer suspendiert.

Zum Aufschluss der Zellen wurden die Proben je 5 min mit Ultraschall behandelt. Die Beschallung erfolgte gepulst, indem je 20 s in 20 s Intervallen beschallt wurde.

Die Suspensionen wurden 1 h bei 18000 rpm unter Kühlung bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Pellets in gleicher Konzentration in Tris-Puffer suspendiert.

Im Anschluss wurden die Fraktionen mit Hilfe einer SDS-PAGE nach Laemmli (10%iges Gel) analysiert.

II.2.3 Säulenchromatographische Reinigung des SUD-Proteins

Zur Reinigung des durch SUD-Proteins wurden verschiedene chromatographische Verfahren kombiniert. Die Analyse der Proteinfractionen erfolgte jeweils durch SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (10%ige Gele) und Messung der Absorbtionsspektren bei 200-900 nm.

II.2.3.1 Metallchelate-Affinitätschromatographie (Ni-NTA-Säule)

Die Auftrennung des Proteingemisches beruht auf der Bindung von Proteinen, die mehrere Histidinreste (so genannter His-Tag) enthalten, an kovalent an das Säulenmaterial gebundene Metallchelate. Nachdem die nicht gebundenen Proteine aus der Säule ausgewaschen worden sind, werden die gebundenen Proteine durch einen Imidazol-Gradienten eluiert.

In Vorbereitung wurden die aus der Proteinpräparation gewonnenen Proben sterilfiltriert. Die verwendete Nickel-NTA-Säule wurde mit dem Startpuffer 50 mM NaH₂PO₄ mit 300 mM NaCl und 10 mM Imidazol equilibriert. Die Durchflußrate betrug 1,5 ml/min bei einem Fraktionsvolumen von 1,5 ml.

Die Imidazol-Konzentration wurde zunächst in 50 min von 10 mM auf 80 mM erhöht und anschließend in 10 min auf die Endkonzentration von 500 mM erhöht.

II.2.3.2 Ionenaustauschchromatographie (MonoQ-Säule)

Hierbei werden Proteine aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial getrennt. Die Elution der an das Trägermaterial gebundenen Proteine erfolgt durch Änderung des pH-Werts des Puffers oder durch eine Erhöhung der Ionenstärke.

In Vorbereitung wurden die Proben 10 min zentrifugiert (13000 rpm, 4 °C), um eventuell ausgefallenes Protein zu entfernen.

Die verwendete MonoQ-Säule wurde mit dem Startpuffer 25 mM Tris (pH 7,5 (H₂SO₄)) equilibriert. Die Durchflußrate betrug 2 ml/min bei einem Fraktionsvolumen von 1ml.

Im Folgenden wurden die Proteine durch Erhöhung der Natriumsulfat- bzw. -chloridkonzentration von der Säule eluiert.

Folgende Gradienten wurden getestet:

MonoQ 107, 108:	0-300mM in 55min (Na ₂ SO ₄)
MonoQ 109:	0-500mM in 10min 500-1500mM in 5min (NaCl)
MonoQ 110:	0-300mM in 20min 300-500mM in 5min 500-857mM in 5min (Na ₂ SO ₄)

II.2.3.3 Gelfiltration (Superdex™-200)

Bei der Gelfiltration erfolgt die Trennung nach Masse und Form der Proteine. Das Trennmedium besteht aus porösen, quervernetzten Makromolekülen. Da nur niedermolekulare Proteine in die Poren eindringen können, werden hochmolekulare Proteine früher eluiert.

In Vorbereitung wurden die Proteinproben 10 min unter Kühlung (4 °C) bei 13000 rpm zentrifugiert. Die verwendete Superdex™-200-Säule wurde mit dem Startpuffer 25 mM Tris (pH 7,5 (H₂SO₄)) mit 200 mM NaCl equilibriert. Einige Trennungen wurden mit einem Puffer, welcher zusätzlich 0,5 mM EDTA enthielt durchgeführt. Die Durchflußrate betrug 0,5 ml/min bei einem Fraktionsvolumen von 0,5 ml.

Im Anschluss wurde unter gleichen Bedingungen ein Eichlauf mit Apoferritin (1,25 mg), ADH (1,25 mg) und Cytochrom C (1 mg) durchgeführt, um das Molekulargewicht der erhaltenen Proteinfractionen ermitteln zu können.

II.2.3.4 Entsalzung von Proteinproben (HiTrap™Desalting-Säule)

Die Proben wurden in Vorbereitung 5 min unter Kühlung zentrifugiert (13000 rpm, 4 °C). Die verwendete HiTrap™-Desalting-Säule wurde mit dem Startpuffer 25 mM Tris (pH 7,5 (H₂SO₄)) mit 0,5 M NaCl equilibriert. Die Durchflußrate betrug 1 ml/min bei einem Fraktionsvolumen von 0,5 ml.

II.2.4 Konzentrieren von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden durch Ultrafiltration mit einer Amicon Membranfiltrationszelle unter Verwendung von Membranen mit einer molekularen Ausschlussgröße von 10000 konzentriert.

II.3 Analytische Methoden

II.3.1 SDS-PAGE nach Laemmli

Die SDS-PAGE nach Laemmli eignet sich zur Auftrennung und Charakterisierung von Proteinen der Größe von 14-100 kD.

Es wurden Gele mit den Acrylamidkonzentrationen 10% und 12% verwendet.

Die zu analysierenden Proteinlösungen wurden im Verhältnis 1:3 mit Probenpuffer verdünnt, 5 min auf 95 °C erhitzt und kurz auf Eis abgekühlt. Als Marker wurde „*Protein Molecular Weight Marker*“ der Firma Fermentas verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 25 mA durchgeführt bis die Bromphenolblau-Bande den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Anschließend erfolgte die Anfärbung der Proteinbanden mit Coomassie BrilliantBlue R über Nacht. Nach dem Entfärben mit 40% Methanol und 10% Essigsäure wurden die Proteinbanden sichtbar.

II.3.2 SDS-PAGE nach Schägger und v. Jagow

Die SDS-PAGE nach Schägger und von Jagow wurde zur Auftrennung kleinerer Proteine (< 10 kD) eingesetzt. Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt (1:3), für 5 min bei 95 °C denaturiert und kurz auf Eis abgekühlt. Als Molekulargewichtsmarker wurde der „*Protein Molecular Weight Marker*“ der Firma Fermentas verwendet. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei 30 V bis die Bromphenolblau-Bande das Trenngel erreicht hatte und anschließend bei 85 V. Die Stromstärke wurde auf 30 mA begrenzt.

Die Färbung der Proteinbanden erfolgte wie oben für das Laemmli-Gel beschrieben.

Es wurden Trenngele mit einer Acrylamid-Konzentration von 18% und einem Bisacrylamidanteil von 6% verwendet. Die Sammelgele enthielten 10% Acrylamid bei einem Bisacrylamidanteil von 3%.

II.3.3 Western-Blot (semi-dry-Blotting)

Beim Protein-Blotting werden die einzelnen Komponenten einer Proteinmischung gelelektrophoretisch getrennt, ebenfalls elektrophoretisch auf eine Membran übertragen und dort mit Hilfe einer Nachweisreaktion (meist durch spezifische Antikörper) detektiert.

Proteintransfer

Der Western-Blot erfolgte im Anschluss an eine SDS-Gelelektrophorese. Es wurde eine PVDF-Membran verwendet, welche zuvor 3 s in Methanol p.a., 5 min in destilliertem Wasser und schließlich im Transferpuffer (10 mM CAPS, 10% Methanol p.a., pH 11 (NaOH)) geschwenkt wurde. Das Blotting wurde mit einer Blotapparatur der Firma Hoeffer für 20 min bei 35 mA durchgeführt. Im Anschluss daran wurde die Membran für 1 min mit Ponceau-S-Lösung (0,2% Ponceau S, 3% Trichloressigsäure) gefärbt, um die Proteinübertragung zu kontrollieren. Der den Marker enthaltende Membranteil wurde abgetrennt und später mit Coomassie R angefärbt.

Antikörperbindung und Nachweisreaktion

Um eine unspezifische Bindung der Nachweisreagenzien zu verhindern, wurde die Membran 30 min mit *Newborn Calf Serum* (5% in TBS) abgesättigt. Die Bindung des Erstantikörpers (Tetra His-Tag-AK in NCS 1:3000) wurde über Nacht durchgeführt. Im Folgenden wurde die Membran 30 min in NCS gewaschen. Als Zweitantikörper wurde Anti-Mouse-IgG konjugiert mit alkalischer Phosphatase (in NCS 1:10000) verwendet, wobei die Antikörperbindung über 1,5 h erfolgte. Anschließend wurde die Membran gewaschen (10 min NCS, 30 min TBS/Triton, 5 min TBS und 5 min TNM).

Für die Nachweisreaktion wurde die Membran im Farbreagenz (NBT und BCIP je 1:1000 in TNM) geschwenkt, bis sich die Banden deutlich hervorhoben. Die Färbereaktion wurde durch Inkubation der Membran in 0,1 M EDTA-Lösung (pH 7,0) gestoppt.

II.3.4 Proteinbestimmung (Biorad DC-Protein Assay)

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen erfolgte modifiziert nach Lowry et al..

Als Standard wurden 0, 5, 10, 15, 20 bzw. 25 µl BSA der Konzentration 1,03 mg/ml eingesetzt. Die Ansätze wurden, ebenso wie die die verschiedenen Proteinmengen (z.B. 1 µl und 2 µl) enthaltenden Ansätze, mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25 µl ergänzt. Im Anschluss wurde den Ansätzen je 125 µl Reagenz A' und nach gründlicher Durchmischung je 1 ml Reagenz B hinzugefügt. Die Ansätze wurden erneut gut gemischt und 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption bei 750 nm.

II.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 0,8%ige Agarose-Gele verwendet.

Die Agarose wurde in 30 ml TAE-Puffer gelöst, in der Mikrowelle zweimal aufgekocht und im Anschluss 4 min bei 90 W erhitzt. Weiterhin wurde der Gellösung Ethidiumbromid hinzugefügt (1,5 µl 1%ige Lösung auf 30 ml), so dass die DNA-Fragmente später unter UV-Licht nachgewiesen werden konnten.

Vor der Elektrophorese wurde den DNA-Proben (< 15 µl) 2-3 µl Gelbeladepuffer hinzugefügt. Es wurden je 10 µl des „*MassRuler DNA Ladder Mix*“ als Marker eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei einer Stromstärke von 25 mA und höchstens 100 V Spannung. Nach einer Laufstrecke von ca. 0,5 cm wurde die Stromstärke auf 35 mA erhöht. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet.

II.4 Assays zur Charakterisierung von SUDΔ1-43

II.4.1 Aktivitätstests

Zur Charakterisierung der Eigenschaften von SUDΔ1-43 und zum Nachweis eventuell vorhandener Proteaseaktivität wurden Aktivitätstests durchgeführt.

Dazu wurde SUDΔ1-43 zusammen mit den zu testenden Substraten, Aktivatoren und Proteaseinhibitoren inkubiert, welche bei entsprechenden Versuchen mit dem unverkürzten SUD-Protein einen Effekt auf dessen Aktivität gezeigt hatten.

Des Weiteren wurden auch der pH-Wert (5,5; 6,5; 7,5; 8,5) und die NaCl-Konzentration (50, 100, 200 und 400 mM) der Ansätze variiert.

Verwendete Substrate: - β -Casein (0,2-0,6 mg/ml)

- κ -Casein (0,6 mg/ml)

- oxidierte β -Kette von Insulin (0,15-0,6 mg/ml)

- Insulin-Zink-Komplex (0,375 und 0,1875 mg/ml)

- Aprotinin (0,125 und 0,0625 mg/ml)

- chromogene Substrate 1-7 (s. 4.2.)

Proteaseinhibitoren: - Pefabloc (5 mM)

- PMSF (4 mM und 1 mM)

- CIC (0,2 mM)

- PefablocPlus (5 mM)

- Jodacetamid (5 mM)

Aktivatoren: - Ca^{2+} (0,5 oder 1 mM)

- Co^{2+} (0,25 oder 1 mM)

- SO_4^{2-} (100 mM)

- PO_4^{3-} (5 mM)

Als Puffer wurden 25 mM Tris (pH 7,5 und 8,5 (H_2SO_4)) bzw. 25 mM MES (pH 5,5 und 6,5 (NaOH)) eingesetzt. Weiterhin wurden Kontrollansätze, welche kein Protein oder keinen der Zusätze enthielten pipettiert.

Sofort nach dem Zusammenpipettieren der Ansätze wurden diese in 3-6 gleichgroße Volumina aufgeteilt. Jeweils eines der Aliquots wurde unverzüglich eingefroren, während die restlichen Ansätze bei 37 °C inkubiert und nach festgesetzten Zeitpunkten (z.B. 4 h und 24 h) ebenfalls eingefroren wurden. Das Einfrieren der Proben erfolgte in flüssigem Stickstoff, um ein möglichst synchrones und zeitgenaues Abstoppen der Reaktionen zu erreichen. Die Analyse der verschiedenen Ansätze erfolgte durch SDS-PAGE nach Laemmli oder Schägger und v. Jagow.

II.4.2 Enzymatisch-optische Tests mit chromogenen Substraten

Um die Proteaseaktivität von SUDΔ1-43 photometrisch nachzuweisen, wurden verschiedene Peptidanaloga verwendet, welche jeweils eine Nitroanilid-Gruppe enthielten. Eine Hydrolyse dieser Peptidanaloga durch Proteasen führt zur Freisetzung des Nitroanilids und somit zu einer Extinktionsänderung bei 405 nm (Abb. 8).

Substrate: 1. Glycin p-Nitroanilid

2. L-Lysin p-Nitroanilid Dihydrobromid
3. Ac-Lys- p-Nitroanilid-HCl
4. H-Val-Leu-Lys- p-Nitroanilid-2HCl
5. N-p-Tosyl-Gly-Pro-Lys 4-Nitroanilid-Acetat Salz
6. 4-Nitrophenyl Acetat
7. Nitroacetanilid

Die Ansätze enthielten jeweils das Enzym (5-22 µl/500 µl), 0,5 mM Substrat und 25 mM Tris (pH 7,5 (H₂SO₄)). Des Weiteren wurden Versuche bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen (50, 100 und 200 mM), mit Proteaseinhibitoren (1mM PMSF, 10 mM Glycyl-Glycin), Aktivatoren (0,25 mM Kobalt oder Calcium), sowie Detergenzien (2 bzw. 10 mM Mega 9, 0,2 bzw. 1 mM Dodecylmaltosid) durchgeführt.

Als Negativkontrollen dienten Ansätze, welche jeweils nur das Enzym oder nur das Substrat enthielten.

Die Ansätze wurden bei 37 °C oder bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion bei 405 nm alle 30 min gemessen.

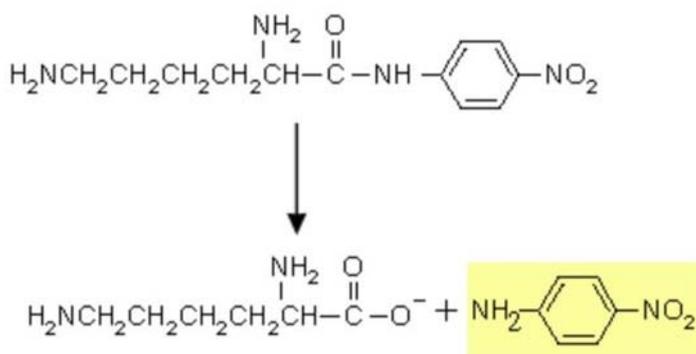


Abb. 8: Reaktionsprinzip des enzymatisch-optischen Tests am Beispiel von Substrat 2.

Das gelb unterlegte Nitroanilid, welches durch Proteasen vom Substrat abgespalten wird, führt zu einer Extinktionsänderung bei 405 nm.

II.4.3 Nachweis von Proteaseaktivität mit Resorufin-markiertem Casein

Resorufin-markiertes Casein (Universelles Proteasen-Substrat, Firma: Roche) ist ein generelles Substrat für Proteasen, welches sich besonders zum Nachweis geringer Protease-Aktivitäten eignet. Die Protease setzt dabei Resofurin-markierte Peptide frei, welche nach TCA-Fällung des nicht gespaltenen Proteins über die Extinktion bei 574 nm nachgewiesen werden können.

Die Vorgehensweise wurde nach der mitgelieferten Vorschrift des Herstellers leicht modifiziert.

Die Ansätze enthielten jeweils: 50 µl des Caseins (4 mg/ml),

10-50 µl Enzym-Lösung (auf 200 µl),

50 µl 100 mM Tris (pH 7,5 (HCl)) und

100 mM NaCl.

Das Volumen wurde mit destilliertem H₂O auf 200 µl ergänzt. Zur Kontrolle diente ein Leerwert, welcher kein Enzym enthielt.

Die Proben wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert, woraufhin die Reaktion durch Zugabe von je 480 µl 5%iger Trichloressigsäure (in H₂O) gestoppt wurde. Anschließend wurden die Proben nochmals 10 min bei 37 °C inkubiert und 5 min zentrifugiert (13000 rpm).

Zu 400 µl der Überstände wurden je 600 µl 0,5 M Tris (pH 8,8 (HCl)) hinzugegeben und die Extinktion bei 574 nm gemessen.

II.4.4 Einfluss organischer Lösungsmittel auf die SUD-Aktivität

Da der Proteaseinhibitor PMSF in Ethanol gelöst wurde, enthielten einige Ansätze für die Aktivitätstests und Enzymatische-optischen Tests Ethanol in möglicherweise relevanten Konzentrationen. Daher wurde es notwendig, einen Effekt von Ethanol auf SUD Δ 1-43 und β -Casein auszuschließen.

Es wurden Ansätze pipettiert, welche 0,36 mg/ml SUD-Lösung, 0,27 mg/l β -Casein, 100 bzw. 200 mM NaCl, sowie 0-6% Ethanol enthielten. Die Ansätze wurden mit 25 mM Tris (pH 7,5 (H₂SO₄)) auf 25µl ergänzt.

Nach einer Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden die Ansätze auf einem 10%igen Gel durch SDS-PAGE nach Laemmli analysiert.

II.4.5 Jodacetamid-Stabilitätstest

Bei Jodacetamid handelt es sich um einen Proteaseinhibitor, welcher Cystein- und Histidin-Reste modifiziert. Um einen Effekt dieses Inhibitors auf SUD Δ 1-43 nachzuweisen, wurde das Protein zusammen mit Jodacetamid inkubiert. Jodacetamid wurde dabei in Konzentrationen von 0,1 bis 10 mM eingesetzt. Weiterhin enthielten die Ansätze 0,1 M NaCl und 25 mM Tris (pH 7,5 (H₂SO₄)).

Nachdem ein Kontrollansatz ohne Jodacetamid sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren wurde, erfolgte die Inkubation der übrigen Ansätze über Nacht bei 37 °C.

Die Analyse erfolgte durch eine SDS-PAGE nach Laemmli auf einem 10%igen Gel.

II.4.6 Abspaltung des His-Tags durch Faktor Xa

Faktor Xa ist eine Protease des Blutgerinnungssystems, welche Proteine nach der spezifischen Erkennungssequenz „Ile-Glu/Asp-Gly-Arg↓“ schneidet und somit in der Gerinnungskaskade Thrombin aus Prothrombin freisetzt. Da SUD Δ 1-43 ebenfalls diese Erkennungssequenz zwischen dem His-Tag und dem eigentlichen SUD-Protein enthält, ist es möglich, die Histidin-Reste mit Hilfe des Faktor Xa vom SUD-Protein abzuspalten.

Für diesen Versuch wurde die eingesetzte Menge an Faktor Xa so gewählt, dass sie genau 1% (w/w) bzw. 10% des eingesetzten SUD Δ 1-43 ausmachte.

Die Reaktionsansätze enthielten 0,154mg/ml SUD-Lösung sowie 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ und 25 mM Tris (pH 7,5 (HCl)). Sie wurden bei 4 °C und 23 °C inkubiert, wobei nach festgesetzten Zeitpunkten jeweils 15 μ l in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden.

Die Analyse der Ansätze erfolgte durch eine SDS-PAGE nach Laemmli auf einem 12%igen Gel. Zur Kontrolle wurde auch eine nur den Faktor Xa enthaltende Probe auf das Gel aufgetragen.

III. Ergebnisse

III.1 Expression von SUD Δ 1-43

Ausgangspunkt für die Expression war die in einem Plasmid (petBlue2-Vektor) enthaltene unverkürzte SUD-Domäne, die den Aminosäuren 1166-1544 des ORF1 des SARS-CoV entspricht. Das Plasmid wurde zur Vervielfältigung in *Nova Blue Singles Competent Cells* transformiert. Nach der anschließenden Plasmidisolierung wurde der Erfolg der Vermehrung durch eine Restriktionsspaltung mit BamHI und PvuI bestätigt.

In Vorbereitung auf die folgende Amplifikation des SUD-Genes mittels PCR wurde das Plasmid mit der Restriktionsendonuklease HinII inkubiert. Diese schneidet den Vektor an der Erkennungssequenz GR'CGYC, welche dreifach im Vektor, jedoch nicht im Insert vorkommt. Im Folgenden wurde die PCR mit den Primern sen30Xa und anti30Xa durchgeführt. Als optimale Bedingungen erwiesen sich bei 30 PCR-Zyklen eine Magnesiumsulfat-Konzentration von 4 mM und eine Annealing-Temperatur von 71 °C. Die Wahl der Primer hatte weiterhin zur Folge, dass nicht das vollständige SUD-Gen, sondern ein verkürztes Gen vervielfältigt wurde. Da das von dieser DNA-Sequenz kodierte Protein gegenüber dem ursprünglichen SUD-Protein um 43 Aminosäuren verkürzt ist (Aminosäuren 1207-1544 von ORF1), wurde es mit SUD Δ 1-43 bezeichnet.

Anschließend erfolgte die Ligation des PCR-Produktes in den Vektor pQE30Xa (Abb. 9). Der Vektor wurde dazu zunächst mit Eco147I geschnitten und nach der Dephosphoryllierung und Phenolextraktion mit Ethanol gefällt. Das Ligationsprodukt wurde als pSUD Δ 1-43 bezeichnet und zur Vervielfältigung in *Nova Blue Singles Competent Cells* transformiert.

Im Anschluss an die folgende Plasmidisolierung wurde eine Restriktionsspaltung des pSUD Δ 1-43 mit HindIII und SacI durchgeführt. Dadurch konnte bestätigt werden, dass zwei der zwölf hergestellten Klone (#8 und #10) das Insert in der richtigen Orientierung enthielten (Abb. 10). Die Sequenzanalyse ergab in Übereinstimmung hiermit, dass beide Klone die erwartete Sequenz enthielten, wobei Klon 10 jedoch nicht vollständig sequenziert werden konnte. Die Sequenzierung erfolgte dabei durch die Firma MWG Biotech Ebersberg.

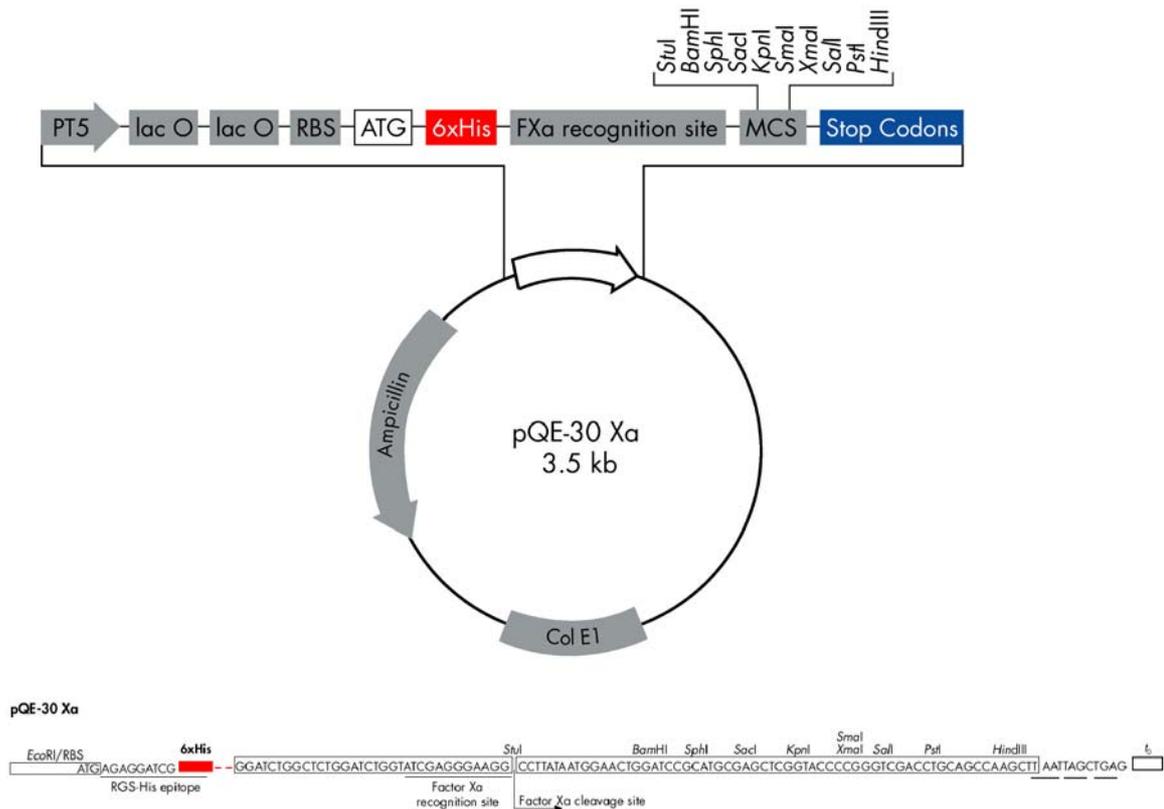


Abb. 9: Vektorkarte und „multicloning site“ des Plasmids pQE30Xa.

Zur Klonierung wurde der Vektor mit der Restriktionsendonuklease Eco147I (entspricht StuI) geschnitten, dessen Schnittstelle sich innerhalb der *Multiple Cloning Site (MCS)* befindet. Die Faktor Xa-Erkennungssequenz ermöglicht eine Abtrennung des His-Tags vom SUD-Protein. Weiterhin enthält der Vektor eine Kodierungssequenz für β -Lactamase, welche ein selektives Wachstum von pQE30Xa enthaltenden Bakterien ermöglicht.

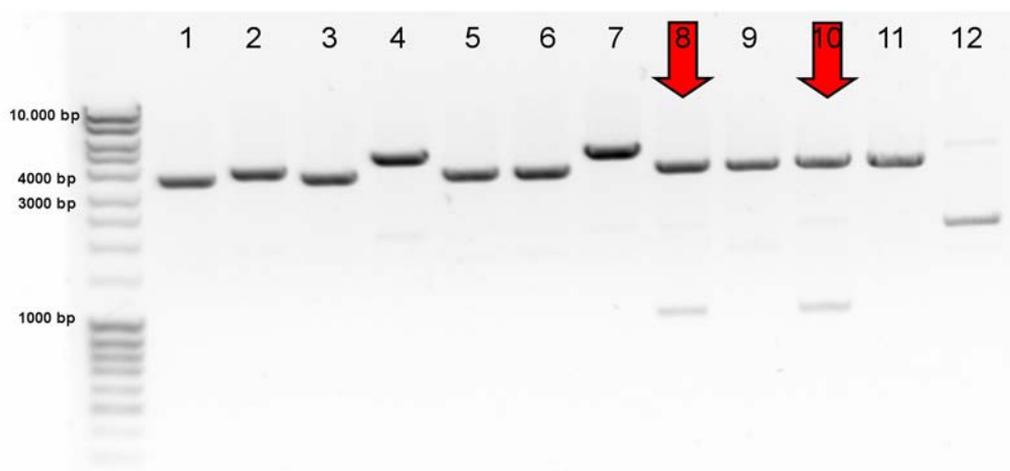


Abb. 10: Restriktionsspaltung von pSUDA1-43 durch HindIII.

Die bei korrekter Orientierung des Inserts im Vektor zu erwartenden Schnittprodukte (3545 und 981 bp) waren nur für die Klone 8 und 10 nachweisbar. Diese wurden somit für die Testexpressionen eingesetzt. Agarose-Gelelektrophorese (0,8% Agarose), ca. 100 ng/ μ l DNA pro Bande (geschätzt nach Intensität)

Beide Klone wurden zur Expression in M15(pREP4)-Zellen transformiert. Durch die zunächst durchgeführten Testexpressionen konnten als ideale Expressionsbedingungen eine IPTG-Konzentration von 2 mM und 3 h Expressionszeit ermittelt werden. Weiterhin zeigte die Analyse durch SDS-PAGE nach Laemmli und einen Western-Blot mit Anti-His-Tag-Antikörpern, dass das gewünschte Protein (SUD Δ 1-43) exprimiert wurde (Abb. 11).



Abb. 11: Westernblot.

Westernblot verschiedener SUD Δ 1-43 Klone mit Anti-His-Tag-Antikörpern. Es zeigte sich, dass Klon 8 das SUD-Protein mit der erwarteten Größe von 39 kD exprimiert.

Zur Kontrolle wurde eine Expression mit dem pQE30Xa-Vektor ohne Insert durchgeführt (Bahn „pQE30Xa“). Ebenso wie bei Klon 10 wurde hier kein SUD-Protein nachgewiesen.

Im Anschluss an die folgenden Expressionen größerer Proteinmengen wurden verschiedene Chromatographieverfahren zur Aufreinigung der Proteinlösungen durchgeführt. Der erste Reinigungsschritt bestand dabei stets in der Affinitätschromatographie mit einer Nickel-NTA-Säule, woran zunächst eine Ionenaustauschersäule (MonoQ) angeschlossen wurde. In späteren Präparationen erfolgte als zweiter Schritt die Entsalzung der Probe auf einer HiTrapTMDesalting-Säule, woraufhin sich jedoch ein weißer Niederschlag in den proteinhaltigen Fraktionen bildete. Es gelang, das Protein in NaCl-Konzentrationen von 0,5 bzw. 1 M wieder zu lösen. Dies zeigt, dass SUD Δ 1-43 in salzfreien Lösungen ausfällt.

Mit der anschließend durchgeführten Gelfiltration (SuperdexTM200) konnte das Molekulargewicht des erhaltenen Proteins mit 45 kD bestimmt werden. Da dies im Bereich des tatsächlichen Molekulargewichts von 39,9868 kD liegt, kann angenommen werden, dass SUD Δ 1-43 als Monomer vorliegt, wohingegen das unverkürzte SUD-Protein Oligomere bildete (Abb. 13).

Durch die gewählten aufeinander folgenden Chromatographieschritte konnte ein sehr guter Reinheitsgrad der SUD-Lösungen erreicht werden (Abb. 12).

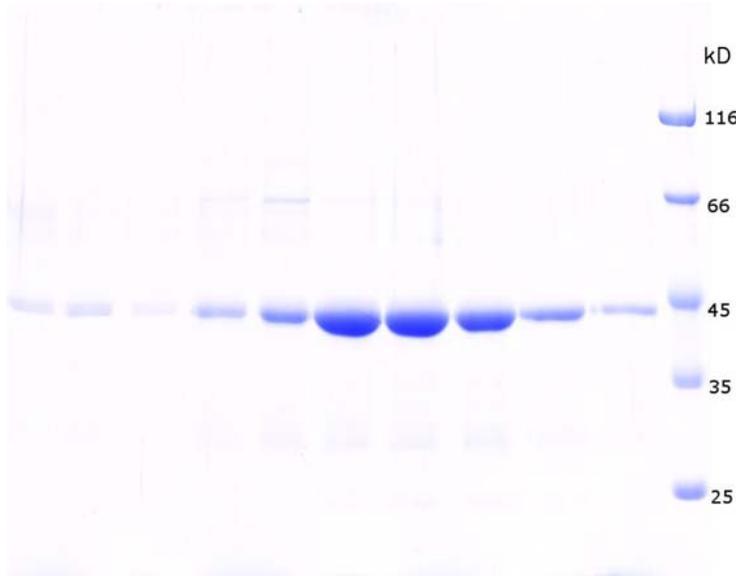


Abb. 12: SUDA1-43-Fractionen nach Aufreinigung durch verschiedene chromatographische Verfahren.

Das Gel zeigt die proteinhaltigen Fraktionen nach der Gelfiltration mit einer Superdex™200-Säule. Zuvor erfolgte bereits die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie (Ni-NTA-Säule) und die Entsalzung durch eine HiTrap™-Desalting-Säule.

Die Ansätze wurden durch SDS-PAGE nach Laemmli (10% Acrylamid) analysiert, pro Bande wurden je 5 µl aus den Fraktionen aufgetragen.

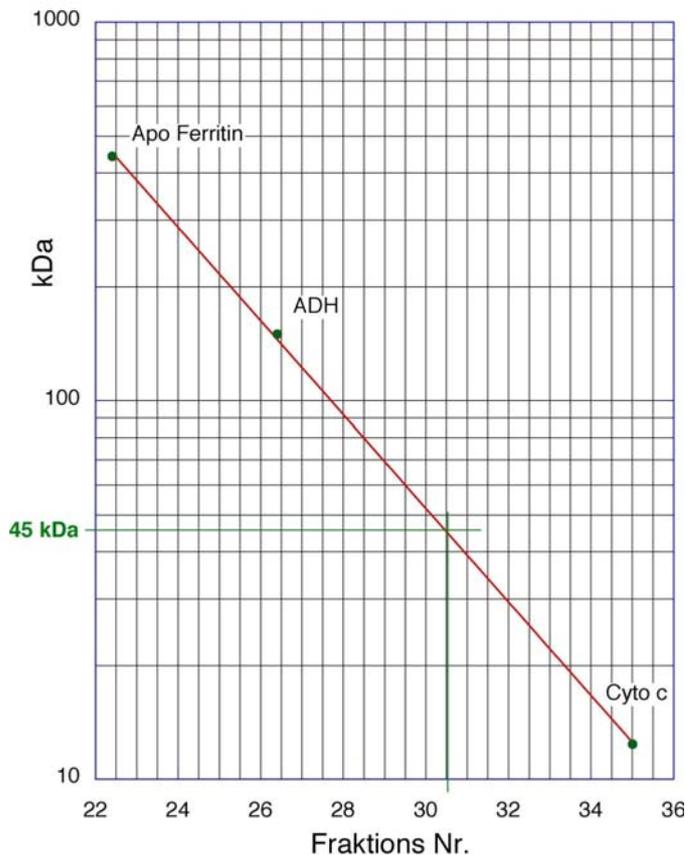


Abb. 13: Eichkurve nach Gelfiltration von SUDA1-43.

Der Eichlauf wurde mit 1,25 mg Apoferritin (443 kD), 1,25 mg ADH (150 kD) und 1 mg Cytochrom C (12 kD) durchgeführt. Für das SUD-Protein (Fraktionen 30 – 32) ergibt sich aus der Kurve ein Molekulargewicht von ca. 45 kD.

III.2 Charakterisierung von SUD Δ 1-43

III.2.1 Aktivitätstests

Autoproteolyse und Substratabbau

Die Inkubation des SUD-Proteins bei 37 °C über 24 h zeigte, dass das verkürzte SUD ebenso wie die volllängen-Form eine hohe Autoproteolyseaktivität aufweist. In Abhängigkeit von der jeweiligen Präparation war nach 6-24 h Inkubation bei 37 °C kein SUD Δ 1-43 mehr in den Ansätzen nachweisbar bzw. zeigte sich eine deutliche Abnahme des SUD-Proteins (Abb. 14).

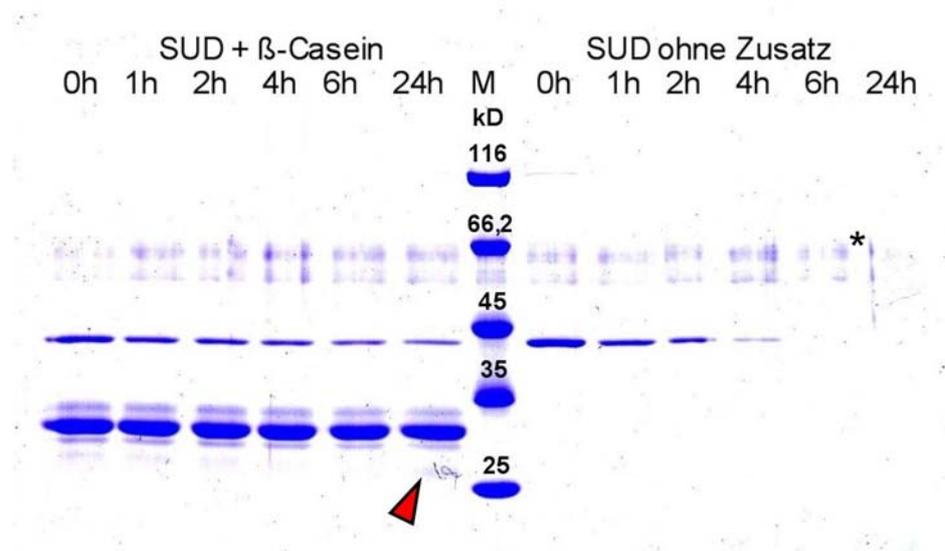


Abb. 14: Autoproteolyse von SUD Δ 1-43.

Vergleich der Autoproteolyse von SUD Δ 1-43 (39 kD) mit und ohne Zusatz von 0,15 mg/ml β -Casein. Ohne Zusatz ist bereits nach 6 h keine SUD Δ 1-43-Bande mehr sichtbar. Durch β -Casein wird das SUD-Protein stabilisiert und des Weiteren ist nach 24 h ein Abbauprodukt des β -Caseins zu erkennen (rote Pfeilspitze). Die Inkubation erfolgte in 25 mM Tris (HCl) bei 37 °C, pH 7,5, 0,15 mg/ml β -Casein, 0,4 mg/ml SUD Δ 1-43. Die Ansätze wurden durch SDS-PAGE nach Laemmli (10% Acrylamid) analysiert. Bei den mit „*“ gekennzeichneten Banden handelt es sich um eine Kontamination aus dem Probenpuffer der SDS-PAGE.

Es gelang, das SUD-Protein durch Zugabe des vermuteten Substrats β -Casein zu stabilisieren, und einen Abbau des β -Caseins durch SUD Δ 1-43 reproduzierbar nachzuweisen. Dieser zeigte sich in einer deutlichen Abnahme der β -Casein-Bande und dem Auftreten von Abbauprodukten des β -Caseins im Laufe der Inkubation (Abb. 14 und

15). Diese Versuchsreihen zeigen folglich eine deutliche Proteaseaktivität des SUD-Proteins.

Eine entsprechende Beobachtung konnte in geringem Umfang noch für das κ -Casein gemacht werden, wohingegen nach Inkubation von SUD Δ 1-43 mit Insulin-Zink-Komplex, Aprotinin und der oxidierten β -Kette des Insulins weder eine Abnahme der Substratkonzentration noch ein Auftreten von Abbaubanden gezeigt werden konnte (Abb. 16).

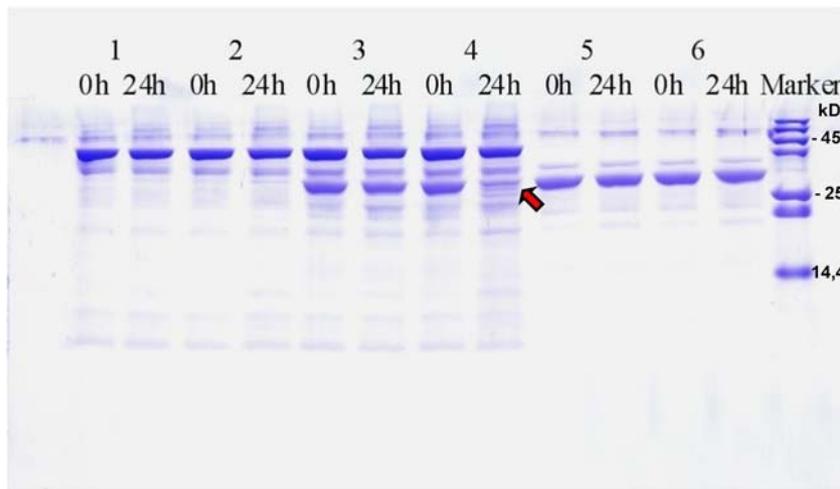


Abb. 15: Abbau von β -Casein.

Ansatz 1: SUD Δ 1-43
 Ansatz 2: SUD Δ 1-43 + Ca²⁺
 Ansatz 3: SUD Δ 1-43 + β -Casein
 Ansatz 4: SUD Δ 1-43 + β -Casein + Ca²⁺
 Ansatz 5: β -Casein
 Ansatz 6: β -Casein + Ca²⁺

Dieser Versuch zeigt deutlich das Auftreten von Abbauprodukten des β -Caseins bei Inkubation mit SUD Δ 1-43 (Ansatz 3 und 4) gegenüber den nur β -Casein bzw. nur SUD Δ 1-43 enthaltenden Ansätzen (1, 2, 5 und 6). Durch die Zugabe von Calciumionen wird ein vermehrter Abbau bewirkt (Ansatz 4, Pfeil). Die Inkubation erfolgte in 25 mM Tris (H₂SO₄) bei 37 °C und pH 7,5, 200 mM NaCl, 0,27 mg/ml β -Casein, 1 mM CaCl₂, 0,23 mg/ml SUD Δ 1-43. Die Ansätze wurden durch SDS-PAGE nach Schägger und v. Jagow (18% Acrylamid, 6% Bisacrylamid) analysiert.

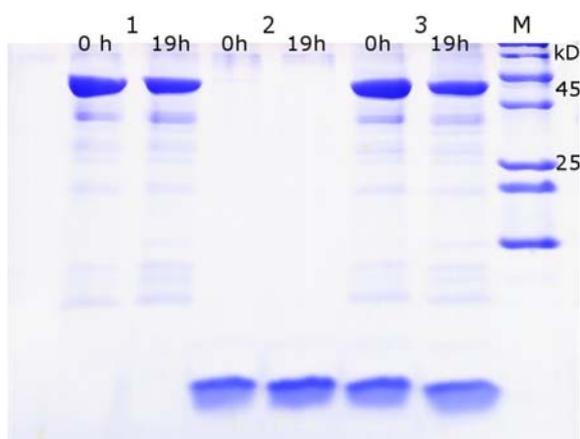


Abb. 16: Inkubation von SUD Δ 1-43 mit Insulin

Ansatz 1: SUD Δ 1-43
 Ansatz 2: Insulin (oxidierte β -Kette)
 Ansatz 3: SUD Δ 1-43 + Insulin (oxidierte β -Kette)

Der Versuch zeigt nach 19 h keinen nachweisbaren Abbau von Insulin durch SUD Δ 1-43. Dieses wird somit von SUD Δ 1-43 nicht gespalten. Die Inkubation erfolgte in 25 mM Tris (HCl) bei 37°C und pH 7,5, 200 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0,625 mg/ml Insulin (oxidierte β -Kette), 0,23 mg/ml SUD Δ 1-43. Die Ansätze wurden durch SDS-PAGE nach Schägger und v. Jagow (18% Acrylamid, 6% Bisacrylamid) analysiert.

Effekt von Proteaseinhibitoren

Die Proteaseinhibitoren Jodacetamid, Pefabloc, Pefabloc-Plus und CIC wirkten sich nicht nachweisbar auf die Aktivität von SUD Δ 1-43 aus. Lediglich mit PMSF konnte eine höhere Stabilität des SUD-Proteins nach 4 h nachgewiesen werden (Abb. 17). Ein Zustandekommen dieses Effektes durch Ethanol konnte ausgeschlossen werden.

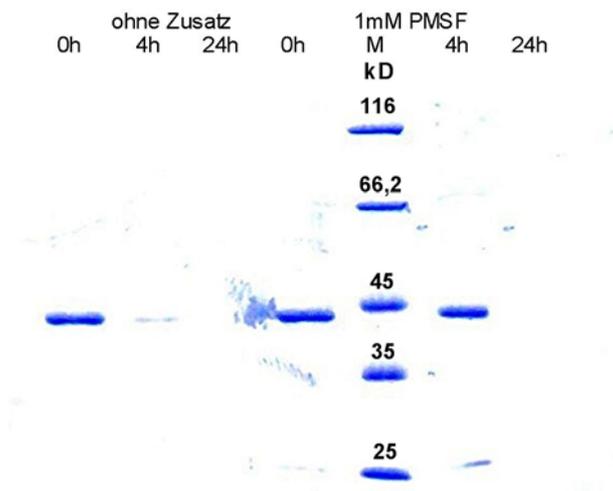


Abb. 17: Effekt von PMSF auf die Autoproteolyse von SUD Δ 1-43.

Durch Zusatz von 1 mM PMSF konnte in diesem Versuch eine Stabilisierung von SUD Δ 1-43 erreicht werden. Während ohne Zusatz nach 4 h nur noch eine sehr schwache Proteinbande erkennbar ist, ist nach derselben Zeit mit PMSF kaum eine Abnahme von SUD Δ 1-43 sichtbar.

Die Inkubation erfolgte in 25 mM Tris (HCl) bei 37 °C und pH 7,5, ca. 0,4 mg/ml SUD Δ 1-43 (geschätzt nach Bandenintensität).

Die Ansätze wurden durch SDS-PAGE nach Laemmli (10% Acrylamid) analysiert.

Effekt von Ionen als Aktivatoren

Ein aktivierender Effekt durch Zugabe verschiedener Ionen zeigte sich an deutlichsten bei Ca²⁺ sowie weniger deutlich bei Co²⁺, was mit den am unverkürzten SUD-Protein gemachten Beobachtungen übereinstimmt. Die Zugabe dieser Aktivatoren zum Inkubationsansatz bewirkte einen deutlich beschleunigten Abbau des β -Caseins im Vergleich zum Leeransatz (Abb. 15). Dahingegen scheinen Phosphat- und Sulfationen keinen Effekt auf SUD Δ 1-43 zu besitzen.

Einfluss von pH-Wert und NaCl-Konzentration

Die Proteaseaktivität des SUD-Proteins konnte über den gesamten untersuchten pH-Bereich (pH 5,5-8,5) nachgewiesen werden. Es zeigte sich weiterhin, dass bei hohen pH-Werten (pH 8,5 und 7,5) eine geringere Autoproteolyseaktivität und ein vermehrter Abbau des β -Caseins vorhanden waren, als bei niedrigeren Werten (pH 6,5 und 5,5). SUD Δ 1-43 kann folglich durch höhere pH-Werte stabilisiert werden (Abb. 18).

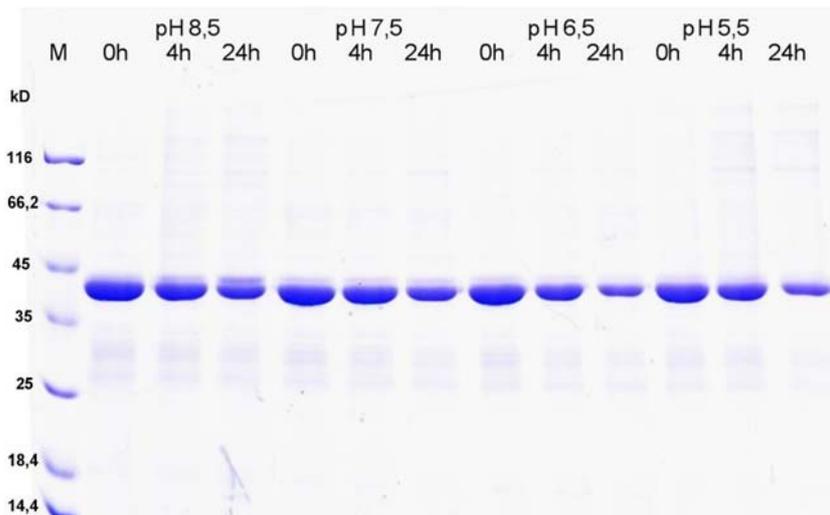
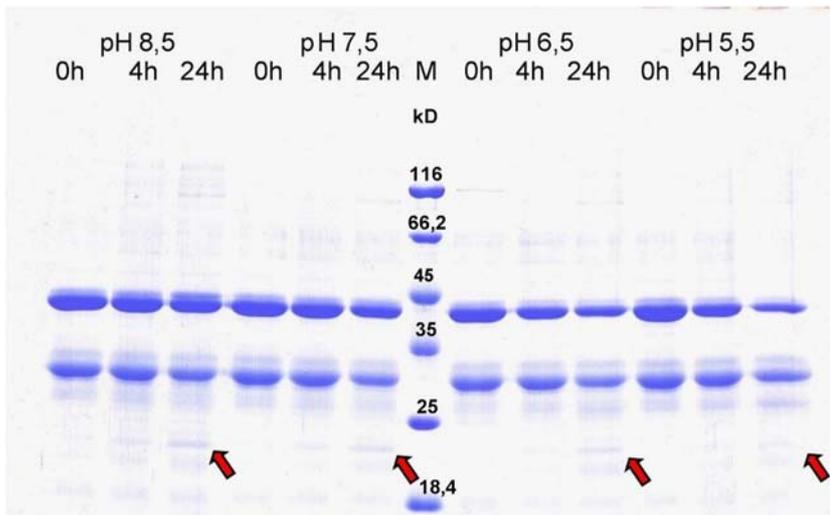


Abb. 18: Aktivität von SUDΔ1-43 bei verschiedenen pH-Werten.

a) Das obere Gel zeigt die abnehmende Stabilität von SUDΔ1-43 bei abnehmendem pH-Wert. Nach 24 h Inkubation ist die Autoproteolyse des SUD-Proteins bei pH 5,5 deutlich fortgeschrittener als bei pH 8,5.



b) Dieser Versuch zeigt den vermehrten Substratabbau bei höheren pH-Werten, welcher sich im Auftreten von Abbaubanden des β -Caseins (Pfeile) äußert.

Die Inkubation erfolgte in 25 mM Tris (HCl) bzw. 25 mM MES bei 37 °C, 200 mM NaCl, 0,27 mg/ml β -Casein, 0,462 mg/ml SUDΔ1-43 in a) und 0,231 mg/ml SUDΔ1-43 in b). Die Ansätze wurden durch SDS-PAGE nach Laemmli (12% Acrylamid) analysiert.

Die verschiedenen getesteten Salzkonzentrationen von 50-200 mM zeigten einen vermehrten Substratabbau bei hohen Salzkonzentrationen, wohingegen niedrige Salzkonzentrationen eine Stabilisierung des SUDΔ1-43 bewirkten (Abb. 19).

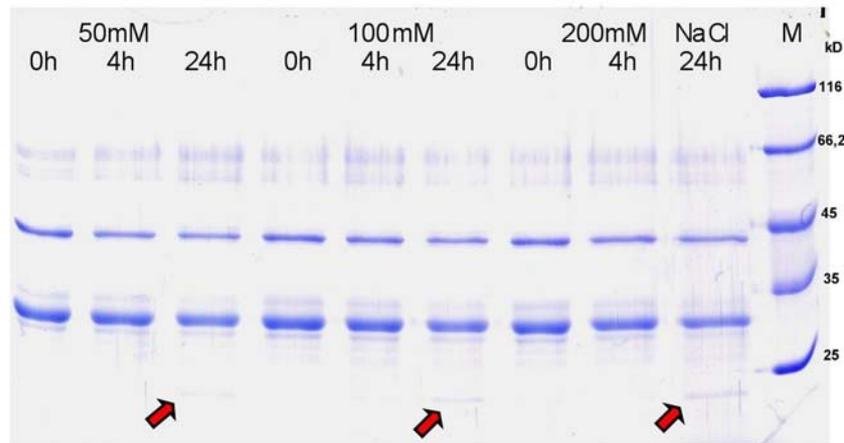


Abb. 19: Effekt verschiedener NaCl-Konzentrationen auf die Aktivität von SUDA1-43.

Nach 24 h zeigt sich bei Inkubation mit 200 mM NaCl ein deutlich vermehrter Substratabbau (Pfeile) im Vergleich zu den niedrigen Salzkonzentrationen.

Die Inkubation erfolgte in 25 mM Tris (H_2SO_4) bei 37 °C und pH 7,5, 0,2 mg/ml β -Casein, ca. 0,2 mg/ml SUDA1-43 (geschätzt nach Bandenintensität), 4 mM PMSF. Die Ansätze wurden durch SDS-PAGE nach Laemmli (10% Acrylamid) analysiert.

III.2.2 Nachweis von Proteaseaktivität mit Resorufin-markiertem Casein

Es zeigte sich nach 24 h keine Extinktionszunahme in den Proben gegenüber dem Leerwert, was darauf schließen lässt, dass das Resorufin-markierte Casein von SUDA1-43 nicht gespalten wird. Es konnte folglich mit diesem Versuch keine Proteaseaktivität des SUD-Proteins nachgewiesen werden.

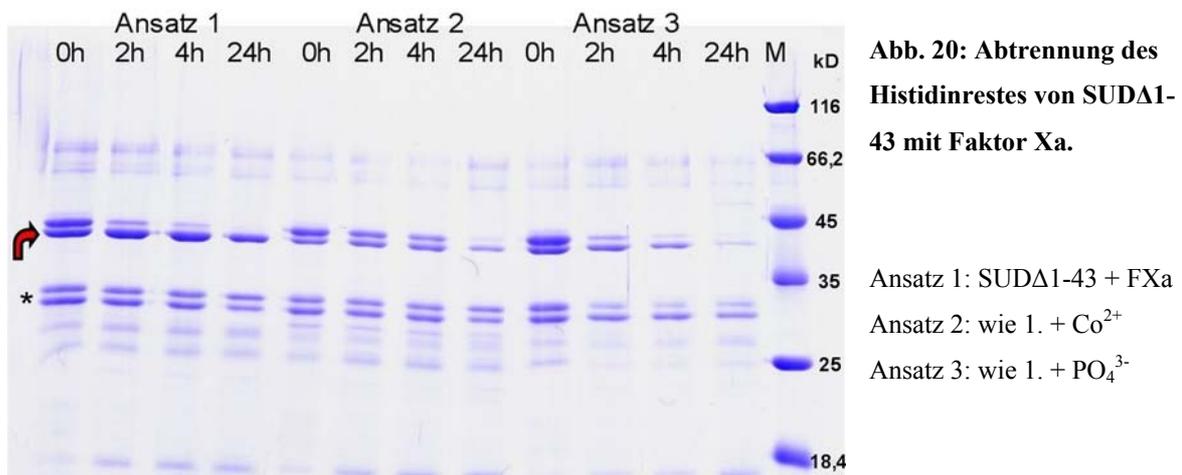
III.2.3 Enzymatisch-optische Tests mit chromogenen Substraten

Eine Extinktionszunahme, die durch die Abspaltung der Nitroanilide hervorgerufen werden sollte, zeigte sich zwar zunächst bei einigen der Substrate, jedoch waren diese Effekte meist klein (< 40 mOD) und nicht reproduzierbar. Da die Proben weiterhin eine nach ca. 1 h einsetzende Trübung aufwiesen, welche auch durch den Zusatz der Detergenzien DM und Mega 9 nicht verhindert werden konnte, ist anzunehmen, dass die zunächst beobachteten Effekte auf diesen Artefakten beruhen. Die getesteten Substrate werden folglich nicht von SUDA1-43 gespalten.

III.2.4 Abspaltung des Histidin-Tags durch Faktor Xa

Die Inkubation von SUD Δ 1-43 mit Faktor Xa sollte zur Abspaltung der Histidinreste vom SUD-Protein und somit zur Entstehung eines Proteins von 37,669 kD führen.

Die Analyse auf einem Laemmli-Gel zeigte sowohl bei 4 °C als auch bei 23 °C Inkubationstemperatur Banden im Bereich des erwarteten Reaktionsproduktes. Überraschenderweise trat diese Bande schon in den sofort nach Zugabe des Faktor Xa gestoppten Ansätzen auf. Nach 24 h Reaktionszeit konnte eine deutliche Abnahme des SUD Δ 1-43, jedoch auch des entstandenen Reaktionsproduktes beobachtet werden, welches somit ebenso sehr instabil ist. Die Zugabe von Kobalt- und Phosphationen zum Reaktionsansatz bewirkte einen beschleunigten Abbau beider SUD-Formen (Abb. 20).



Der Versuch zeigt das Auftreten des Reaktionsproduktes (SUD Δ 1-43 ohne His-Tag, roter Pfeil) sofort nach Zugabe von Faktor Xa. Beide SUD-Formen sind über 24 h instabil. Dieser Effekt wurde durch Zusatz von Kobalt- und Phosphationen verstärkt. Bei den mit „*“ gekennzeichneten Banden handelt es sich um weitere Spaltprodukte von Faktor Xa. Die Inkubation erfolgte in 25 mM Tris (HCl) bei 23 °C und pH 7,5, 0,1 M NaCl, 2 mM CaCl₂, 0,25 mM CoSO₄, 5 mM NaH₂PO₄, 19 µg/ml Faktor Xa, 154 µg/ml SUD Δ 1-43. Die Ansätze wurden durch SDS-PAGE nach Laemmli (12% Acrylamid) analysiert.

IV. Diskussion

IV.1 Expression und Reinigung von SUD Δ 1-43

Die SUD-Domäne ist eine ausschließlich im Polyprotein des SARS-CoV vorkommende Sequenz, deren Bedeutung für dessen Replikation und Pathogenität bis heute unklar ist (Snijder et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit gelang es, eine um 43 Aminosäuren verkürzte Form dieser Domäne zu in *E. coli* herzustellen und aufzureinigen. Der für die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie erforderliche N-terminale Histidin₆-Tag konnte im Anschluss erfolgreich durch die Faktor-Xa-Protease abgespalten werden. Das SUD-Protein war dabei jedoch nur unmittelbar nach Reaktionsbeginn nachweisbar und wies eine hohe Instabilität auf, so dass angenommen werden muss, dass die Autoproteolyse des SUD-Proteins durch die Abspaltung des His-Tags beschleunigt wird, oder dass das SUD-Protein durch den Faktor Xa unspezifisch gespalten wird. Die Erzeugung eines stabilen SUD-Proteins ohne artifizielle Sequenzanteile für weitere Analysen ist daher mit dieser Methode nicht erreichbar.

IV.2 Charakterisierung von SUD Δ 1-43

Die Funktion und Eigenschaften des SUD-Proteins sind derzeit unbekannt.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Aktivitätstests konnte gezeigt werden, dass das SUD-Protein Proteaseaktivität aufweist. Dies gelang am deutlichsten mit dem Substrat β -Casein, welches reproduzierbar von SUD Δ 1-43 gespalten wurde und zeigte sich außerdem in der hohen Autoproteolyserate des SUD-Proteins.

In weiteren Aktivitätstests fanden sich keine zusätzlichen Hinweise auf eine Proteaseaktivität des SUD-Proteins. Dies könnte auf eine sehr enge Substratspezifität des SUD-Proteins hindeuten, da zwar das β -Casein gespalten wurde, nicht jedoch andere Proteine wie Insulin oder Aprotinin.

Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in der Struktur des β -Caseins. Aufgrund des Fehlens von Cysteinresten und somit auch von Disulfidbrücken im β -Casein ist dieses im Vergleich zu den anderen getesteten Proteinen leichter zu entfalten. Dieses könnte die Proteolyse des β -Caseins vereinfachen.

Da Aprotinin zwar ein Protein, zugleich aber auch ein Inhibitor verschiedener Proteasen wie z.B. Trypsin, Cathepsin, Plasmin und Kallikrein ist, wäre weiterhin eine Inhibition des SUD-Proteins durch Aprotinin denkbar.

Beim Versuch, die Proteaseaktivität mit Resufurin-markiertem Casein nachzuweisen, könnte die Aktivität von SUD Δ 1-43 außerdem durch den gebundenen Farbstoff gehemmt worden sein.

Das in dieser Arbeit exprimierte verkürzte SUD-Protein wies im Vergleich mit dem unverkürzten SUD keine verminderte Autoproteolyserate auf. Durch die Variation von pH-Wert und NaCl-Konzentration konnte die Stabilität jedoch beeinflusst werden. Bei pH-Werten im Bereich von 7-8 (intrazellulärer pH: ca. 7,1) verringerte sich dabei die Autoproteolyserate und die Proteaseaktivität nahm zu, wohingegen bei niedrigen pH-Werten die Enzymaktivität abnahm. SUD verhält sich also in dieser Hinsicht wie eine typische Protease mit einem definierten pH-Optimum. Die verstärkte Autoproteolyse bei niedrigen pH-Werten ist z.B. durch eine Destabilisierung des Enzyms erklärbar.

Auch die Beeinflussbarkeit der Aktivität durch Metallionen als Co-Faktoren stellt eine typische Eigenschaft von Proteasen dar. Für das SUD-Protein konnte dies vor allem mit Calciumionen gezeigt werden.

Die Serin- und Cystein-Proteaseinhibitoren Pefabloc, PMSF, CIC und Jodacetamid scheinen die Aktivität des SUD-Proteins nicht oder nur geringfügig zu beeinflussen. Ein Vorhandensein von Serin und Cystein im Aktiven Zentrum des SUD-Proteins ist diesen Ergebnissen nach unwahrscheinlich.

Die Beobachtung, dass SUD Δ 1-43 in salzfreier Lösung ausfällt, könnte darauf hinweisen, dass das SUD-Protein *in vivo* nicht frei im Zytosol vorliegt, sondern an Membranen assoziiert ist.

Während der Anfertigung dieser Arbeit wurde eine massenspektroskopische Analyse des volllängen-SUD-Proteins durchgeführt. An der vermuteten ersten Autolysestelle im N-terminalen Teil des SUD-Proteins fiel dabei ein vermehrtes Vorkommen von Lysinresten auf. Dies deutete darauf hin, dass die Schnittstelle des SUD-Proteins Lysin an Position P1 enthalten könnte. Diese Annahme konnte jedoch in Versuchen mit chromogenen Substraten, welche jeweils Lysin an der Position P1 enthielten, nicht bestätigt werden. Da eine Proteolyse dieser Substrate nicht nachgewiesen werden konnte, erscheint das

Vorkommen von Lysin an der Position P1 der SUD-Schnittstelle fraglich. Möglicherweise erkennt SUD aber auch eine komplexere Sequenz, so dass die Aminosäuren an weiteren Positionen (P2, P3) essentiell sein könnten. Im Extremfall könnten die Ergebnisse der Aktivitätstests sogar darauf hinweisen, dass die Interpretation der massenspektroskopischen Analyse falsch ist, und die Autoproteolysestelle nicht wie vermutet im lysinreichen N-terminalen, sondern im C-terminalen Teil des SUD-Proteins liegt. Allerdings muss in Betracht gezogen werden, dass das Nitroanilid, welches jeweils an P' vorlag, die Aktivität negativ beeinflusst haben könnte.

Den vorliegenden Ergebnissen nach könnte das SUD-Protein eine dritte, neuartige Protease des SARS-CoV darstellen, welche an der Prozessierung des Replikase-Polyproteins im Replikationszyklus des SARS-CoV beteiligt wäre. Da dem SARS-CoV im Vergleich zu den meisten anderen Coronaviren eine Protease (PL1^{pro}) fehlt, wäre denkbar, dass das SUD-Protein die Funktion der fehlenden PL1^{pro} ersetzt. Allerdings weist die SUD-Domäne keinerlei Homologien zur PL1^{pro} oder einer anderen bekannten Protease auf. Da PL1^{pro} und PL2^{pro} überlappende Schnittstellen im Polyprotein besitzen (meist mit Gly an P1 und/oder P1'), wird zum jetzigen Zeitpunkt davon ausgegangen, dass PL2^{pro} die Funktion von PL1^{pro} weitestgehend mit übernimmt und das Replikasepolyprotein an 3 Stellen schneidet (Snijder et al., 2003). Ziebuhr et al. zeigten allerdings auch, dass die Aktivität der PL^{pro}s des *Human Coronavirus 229E* und des *Mouse Hepatitis Virus* von der Anwesenheit der jeweils anderen Domäne abhängig ist. So wurde *in vitro* die Effizienz der PL2^{pro} durch PL1^{pro} deutlich erhöht, und deren Fehlen würde somit einen erheblichen Nachteil für das SARS-CoV bedeuten. Eine Funktion des SUD-Proteins könnte darin liegen, diesen Effizienzverlust auszugleichen. Da die Aktivität der PL1^{pro} des *Human Coronavirus 229E* gering ist und durch die Anwesenheit von PL2^{pro} gehemmt wird (Ziebuhr et al., 2001), besteht auch die Möglichkeit, dass SUD eine ausschließlich regulatorische Funktion ausübt und der *in vitro* beobachteten Proteaseaktivität keine Bedeutung für die *in vivo* Prozessierung des SARS-CoV Polyproteins zukommt.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass das SUD-Protein ein bisher noch nicht identifiziertes Substrat in der Wirtszelle spaltet und so die Vermehrung des Virus oder dessen Verbreitung im Gewebe unterstützt.

IV.3 Ausblick

Da die SUD-Domäne ausschließlich im Genom des SARS-CoV vorkommt, wird angenommen, dass sie neben anderen einzigartigen Merkmalen an der erhöhten Pathogenität des SARS-CoV im Vergleich zu anderen humanpathogenen Coronaviren beteiligt sein könnte. Daher stellt das SUD-Protein einen attraktiven Ansatzpunkt für die Entwicklung von Anti-SARS-Medikamenten dar. Voraussetzung dafür ist eine genaue Analyse der Struktur und Funktion des SUD-Proteins durch Kristallisation und anschließende Röntgen-Strukturanalyse. Dieses wird jedoch zurzeit noch durch die erhebliche Instabilität des SUD-Proteins erschwert. Weiterhin könnte die Charakterisierung der Proteaseaktivität des SUD-Proteins Hinweise auf mögliche Substrate und somit die Funktion von SUD bei der Replikation des SARS-Coronavirus ergeben. Durch Co-Kristallisation und Bindungsstudien von SUD mit PL2^{pro} und anderen Domänen des SARS-CoV Polyproteins ließen sich mögliche regulatorische Effekte von SUD untersuchen.

V. Zusammenfassung

Das SARS-assoziierte Coronavirus (SARS-CoV) ist der Erreger des im November 2002 erstmalig registrierten *Severe Acute Respiratory Syndromes*, an welchem bis zum Juli 2004 weltweit 8096 Menschen erkrankten. Da das SARS-CoV im Vergleich zu den bisher bekannten Coronaviren einige genomische Besonderheiten aufweist, wurde es der tiefsten Verzweigung der Gruppe 2 der Coronaviren zugeordnet. Unter anderem findet sich im SARS-CoV-Genom eine 375 Aminosäuren große Domäne, welche, da sie bei keinem anderen Coronavirus vorkommt, als *SARS Unique Domaine (SUD)* bezeichnet wurde (Snijder et al., 2003). Die Funktion des entsprechenden Proteins und seine Bedeutung für die hohe Pathogenität des SARS-CoV sind bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es, eine um 43 Aminosäuren verkürzte Form des SUD-Proteins (SUD Δ 1-43) rekombinant herzustellen und chromatographisch zu reinigen. Durch die verschiedenen durchgeführten Aktivitätstest konnte gezeigt werden, dass SUD Δ 1-43 einer raschen Autoproteolyse unterliegt und β -Casein reproduzierbar abbaut. Diese proteolytische Aktivität konnte durch Metallionen (v.a. Ca^{2+}), sowie die Veränderung von pH-Wert und NaCl-Konzentration beeinflusst werden. Weiterhin zeigte sich eine schwache Beeinflussbarkeit durch den Serin-Proteaseinhibitor PMSF. Da in weiteren Assays keine Proteaseaktivität des SUD-Proteins nachweisbar war, muss von einer engen Substratspezifität ausgegangen werden.

Die beschriebenen Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass das SUD-Protein eine dritte, neuartige Protease des SARS-CoV darstellt. Es könnte somit an der Prozessierung des im Replikationszyklus gebildeten Polyproteins beteiligt sein, oder ein bisher noch nicht identifiziertes Substrat in der Wirtszelle spalten.

Die weitere Analyse der proteolytischen Aktivität des SUD-Proteins könnte zum besseren Verständnis der Replikation und der Pathogenität des SARS-CoV beitragen. Weiterhin stellt das SUD-Protein einen attraktiven Ansatzpunkt für die Entwicklung von hochspezifischen Anti-SARS-Medikamenten dar, die bei einem erneuten Ausbruch eine wirksame Behandlung der Erkrankung ermöglichen würden.

VI. Literaturverzeichnis

Anand K., Ziebuhr J., Wadhwani P., Mesters J. R., Hilgenfeld R. (2003). Coronavirus Main Protease (3CLpro) structure: Basis for design of anti-SARS drugs. *Science* **300**, 1763-1767

Becker S. (2003) Das SARS-Coronavirus: Entdeckungsgeschichte und Molekularbiologie. *ImpfDialog* **3/2003**, 136-142

Ding Y., He L., Zhang Q., Huang Z., Che X., Hou J., Wang H., Shen H., Qiu L., Li Z., Geng J., Cai J., Han H., Li X., Kang W., Weng D., Liang P., Jiang S. (2004). Organ distribution of severe acute respiratory syndrome (SARS) associated coronavirus (SARS-CoV) in SARS patients: implications for pathogenesis and virus transmission pathways. *J Pathol* **203**, 622-630

Ding Y., Wang H., Shen H., Li Z., Geng J., Han H., Cai J., Li X., Kang W., Weng D., Lu Y., Wu D., He L., Yao K. (2003). The clinical pathology of severe acute respiratory syndrome (SARS): A report from China. *J Pathol* **200**, 282-289

Donnelly C. A., Ghani A. C., Leung G.M., Hedley A. J., Fraser C., Riley S., Abu-Raddad L. J., Ho L.-M., Thach T.-Q., Chau P., Chan K.-P., Lam T.-H., Tse L.-Y., Tsang T., Liu S.-H., Kong J. H. B., Lau E. M. C., Ferguson N. M., Anderson R. M. (2003). Epidemiological determinants of spread of causal agent of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *Lancet* **361**, 1761-1766

Drosten C., Gunther S., Preiser W., van der Werf S., Brodt H. R., Becker S., Rabenau H., Panning M., Kolesnikova L., Fouchier R. A. M., 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. M. E., Schmitz H., Doerr H. W. (2003). Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* **348**, 1967-1976

Fouchier R. A. M., Kuiken T., Schutten M., van Amerongen G., van Doornum G. J. J., van den Hoogen B. G., Peiris M., Lim W., Stöhr K., Osterhaus A. D. M. E. (2003). Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature* **423**, 240

Gibbs A. J., Gibbs M. J., Armstrong J. S. (2004). The phylogeny of SARS coronavirus. *Arch Virol* **149**, 621-624

González 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**, 2207-2235

Gorbalenya A. E., Snijder E. J., Spaan W. J. M. (2004). Severe acute respiratory syndrome coronavirus phylogeny: toward consensus. *J Virol* **78**, 7863-7866

Groneberg D. A., Hilgenfeld R., Zabel P. (2005). Molecular mechanisms of severe acute respiratory syndrome (SARS). *Respir Res* **6**, 8-23

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. M., Poon L. L. M. (2003). Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science* **302**, 276-278

Holmes K. V. (2003). SARS coronavirus: a new challenge for prevention and therapy. *J Clin Invest* **111**, 1605-1609

Holmes K. V. und Lai M. M. C. (2001). *Coronaviridae*: The viruses and their replication. In *Fields Virology* (Hrsg. Knipe D. M. & Howley P. M.), 3. Aufl., S. 1075-1093, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia

Jenwitheesuk E. und Samudrala R. (2003). Identifying inhibitors of the SARS coronavirus proteinase. (2003) *Bioorg Med Chem Lett* **13**, 3989-3992

Kapikian A. Z. (1975). The coronaviruses. *Dev Biol Stand* **28**, 42-64

Klempner M. S. and Shapiro D. S. (2004). Crossing the species barrier – One small step to man, One giant leap to mankind. *N Engl J Med* **350**, 1171-1172

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., Humphrey C. D., Shieh W., Guarner J., Paddock C. D., Rota P., Fields B., DeRisi J., Yang J., Cox N., Hughes J. M., LeDuc J. W., Bellini W. J., Anderson L. J. and the SARS Working Group (2003). A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* **348**, 1953-1966

Lee N., Hui D., Wu A., Chan P., Cameron P., Joynt G. M., Ahuja A., Yung M. Y., Leung C. B., To K. F., Lui S. F., Szeto C. C., Chung S., Sung J. J. Y. (2003). A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* **348**, 1986-1994

Lee S. H. (2003). The SARS epidemic in Hong Kong. *J Epidemiol Community Health* **57**, 652-654

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**, 450-454

Marra M. A., Jones S. J., Astell C. R., Holt R.A., Brooks-Wilson A., Butterfield Y. S., Khattra J., Asano J. K., Barber S. A., Chan S. Y., Cloutier A., Coughlin S. M., Freeman D., Girn N., Griffith O. L., Leach S. R., Mayo M., McDonald H., Montgomery S. B., Pandoh P. K., Petrescu A. S., Robertson A. G., Schein J. E., Siddiqui A., Smailus D. E., Stott J. M., Yang G. S., Plummer F., Andonov A., Artsob H., Bastien N., Bernard K., Booth T. F., Bowness D., Czub M., Drebot M., Fernando L., Flick R., Garbutt M., Gray M., Grolla A., Jones S., Feldmann H., Meyers A., Kubani A., Li Y., Normand S., Stroher U., Tipples G. A., Tyler S., Vogrig R., Ward D., Watson B., Brunham R. C., Kraiden M., Petric M., Skowronski D. M., Upton C., Roper R. L. (2003). The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* **300**, 1399-1404

McIntosh K. (1996). Coronaviruses. In *Fields Virology* (Hrsg. Knipe D. M. & Howley P. M.), 3. Aufl., S. 1095-1103, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia

Navas-Martín S. und Weiss S. R. (2004). Coronavirus replication and pathogenesis: Implications for the recent outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS), and the challenge for vaccine development. *J Neurovirol* **10**, 75-85

Peiris J. S. M., Lai S. T., Poon L. L. M., Guan Y., Yam L. Y. C., Lim W., Nicholls J., Yee W. K. S., Yan W. W., Cheung M. T., Cheng V. C. C., Chan K. H., Tsang D. N. C., Yung R. W. H., Ng T. K., Yuen K. Y. and SARS study group (2003). Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* **361**, 1319-1325

Peiris J. S.M., Guan Y., Yuen K. Y. (2004). Severe acute respiratory syndrome. *Nat Med* **10**, 88-97

Poutanen S. M. und Low D. E. (2004). Severe acute respiratory syndrome: an update. *Curr Opin Infect Dis* **17**, 287-294

Poutanen S. M., Low D. E., Henry B., Finkelstein S., Rose D., Green K., Tellier R., Draker R., Adachi D., Ayers M., Chan A. K., Skowronski D. M., Salit I., Simor A. E., Slutsky A. S., Doyle P. W., Krajden M., Petric M., Brunham R. C., McGeer A. J., (2003). Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *N Engl J Med* **348**, 1995-2005

Reilley B., Van Herp M., Sermand D., Dentico N. (2003). SARS and Carlo Urbani. *N Engl J Med* **348**, 1951-1952

Rota P. A., Oberste, M. S., Monroe S. S., Nix W. A., Campagnoli R., Icenogle J. P., Penarada S., Bankamp B., Maher K., Chen M. H., Tong S., Tamin A., Lowe L., Frace M., DeRisi J. L., Chen Q., Wang D., Erdmann D. D., Peret T. C., Burns C., Ksiazek T. G., Rollin P. E., Sanchez A., Liffick S., Holloway B., Limor J., McCaustland K., Olsen-Rasmussen M., Fouchier R., Gunther S., Osterhaus A. D., Drosten C., Pallansch M. A., Anderson L. J., Bellini W. J. (2003) Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* **300**, 1394-1399

Sethna P. B., Hung S.-L., Brian D A. (1989). Coronavirus subgenomic minus-strand RNAs and the potential for mRNA replicons. *Proc Natl Acad Sci* **86**, 5626-5630

Seto W. H., Tsang D., Yung R. W. H., Ching T. Y., Ng T. K., Ho M., Peiris J. S. M. and Advisors of Expert SARS group of Hospital Authority (2003). Effectiveness of precautions against droplets and contact in prevention of nosocomial transmission of severe acute respiratory syndrome (SARS). *Lancet* **361**, 1519-1520

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

Stadler K., Masignani V., Eickmann M., Becker S., Abrignani S., Klenk H.-D., Rappuoli R. (2003). SARS - Beginning to understand a new virus. *Nat Rev Microbiol* **1**, 209-218

Thiel V., Ivanov K. A., Putics A., Hertzog T., Schelle B., Bayer S., Weißbrich B., Snijder E., Rabenau H., Doerr H. W., Gorbalenya A. E., Ziebuhr J. (2003). Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J Gen Virol* **84**, 2305-2315

To K. und Lo A.W. (2004). Exploring the pathogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS): the tissue distribution of the coronavirus (SARS-CoV) and its putative receptor, angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2). *J Pathol* **203**, 740-743

Tsang K. W., Ho P. L., Ooi G. C., Yee W. K., Wang T., Chan-Yeung M., Lam W. K., Seto W. H., Yam L. Y., Cheung T. M., Wong P. C., Lam B., Ip M. S., Chan J., Yuen K. Y., Lai K. N. (2003). A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* **348**, 1977-1985

World Health Organization Multicentre Collaborative Network for Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Diagnosis (2003). A multicentre collaboration to investigate the cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* **361**, 1730-1733

Xu X., Liu Y., Weiss S., Arnold E., Sarafianos S. G., Ding J. (2003). Molecular model of SARS coronavirus polymerase: implications for biochemical functions and drug design.

Nucleic Acids Res **31**, 7117-7130

Yamamoto N., Yang R., Yoshinaka Y., Amari S., Nakano T., Cinatl J., Rabenau H., Doerr H. W., Hunsmann G., Otaka A., Tamamura H., Fujii N., Yamamoto N. (2004).

HIV protease inhibitor nelfinavir inhibits replication of SARS-associated coronavirus.

Biochem Biophys Res Comm **318**, 719-725

Yi L., Li Z., Yuan K., Qu X., Chen J., Wang G., Zhang H., Luo H., Zhu L., Jiang P., Chen L., Shen Y., Luo M., Zuo G., Hu J., Duan D., Nie Y., Shi X., Wang W., Han Y., Li T., Liu Y., Ding M., Deng H., Xu X. (2004). Small molecules blocking the entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus into host cells. *J Virol* **78**, 11334-11339

Ziebuhr J. und Sidell S. G. (1998). Processing of the human coronavirus 229E replicase polyproteins by the virus-encoded 3C-like proteinase: Identification of proteolytic products and cleavage sites common to pp1a and pp1b. *J Virol* **73**, 177-185

Ziebuhr J., Thiel V., Gorbalenya A. E. (2001). The autocatalytic release of a putative RNA virus transcription factor from its polyprotein precursor involves two paralogous papain-like proteases that cleave the same peptide bond. *J Biol Chem* **276**, 33220-33232

Eigene Veröffentlichungen

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits im Rahmen der „*International Conference on SARS – one year after the first outbreak*“ (8. – 11.05.04, Lübeck) als Poster veröffentlicht. Ein Abstract ist nachfolgend wiedergegeben.

Evidence for protease activity of the SARS Unique Domain (SUD)

Stefanie Tech, Christian L. Schmidt, Doris Mutschall, Silke Schmidtke, Ralf Moll, John Ziebuhr^{§)}, Parvesh Wadhvani^{#)}, Anne S. Ulrich^{#)}, and Rolf Hilgenfeld

Institute of Biochemistry, University of Lübeck, Lübeck, Germany.

^{§)} Institute of Virology and Immunology, University of Würzburg, Würzburg, Germany.

^{#)} Institute for Organic Chemistry, University Karlsruhe, Karlsruhe, Germany.

The analysis of the genome of the SARS coronavirus revealed a unique sequence element, the so-called SARS unique domain (SUD, Snijder *et al.* 2003). Despite extensive database searches, no significant similarities, or conserved sequence motives were detectable. To elucidate the function of this part of the polyprotein, we constructed clones for the expression of residues 1166 to 1544 (full length version) and 1207 to 1544 (Δ 1-43 version), fused to N- or C- terminal histidine tags in *E. coli*. The recombinant proteins were purified by metal affinity- and ion exchange- chromatography.

Size exclusion chromatography revealed the presence of two oligomeric states of the full-length SUD protein: A form with a native molecular mass of 120 kD, representing a dimer or a trimer, and a form with a mass of 250 kD, potentially being a pentamer or hexamer.

Both forms of SUD are fairly unstable and subject to rapid proteolysis. The full-length form reproducibly formed detectable intermediates, hinting at a function as a processing protease. This putative autoproteolytic activity was influenced by several components as demonstrated in Figure 1 and showed a weak sensitivity to serine protease inhibitors such as Pefablock. Both forms of the recombinant SUD proteins showed anomalies in the UV / Vis spectrum suggesting the presence of a cofactor. In the case of the Δ 1-43 protein, the

apo- and holo-forms could be separated, enabling us to calculate the absorbance spectrum of the co-factor (figure 2).

In summary, there is substantial evidence for a function of the SUD protein as a third, novel protease of the SARS coronavirus.

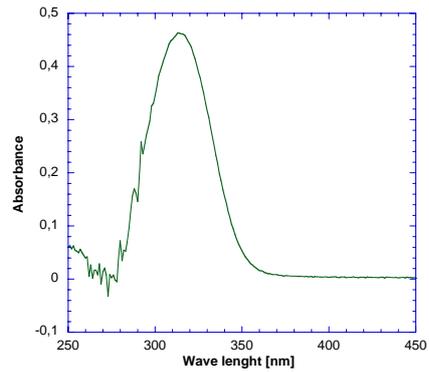
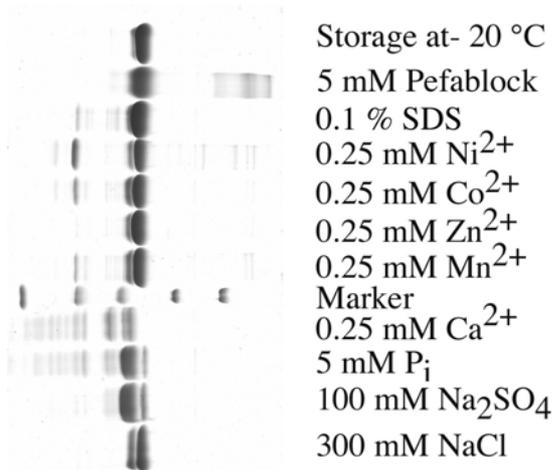


Figure 1: Influence of different compounds on the autoproteolytic activity of the SUD protein. The protein was incubated for 36 hours at 20° C in 25 mM Tris / H₂SO₄ with the indicated additions.

Figure 2: UV / Vis spectrum of the SUD co-factor as calculated from the spectra of the apo- and holo-enzyme.

Snijder *et al.* (2003) JMB, 331, 991 – 1004.

VII. Anhang

VII.1 Puffer

Elektrophoresepuffer für SDS-PAGE nach Laemmli pro 1l:

3 g Tris } pH 8,3
14,4 g Glycin
1 g SDS

Elektrophoresepuffer für SDS-PAGE nach Schägger und v. Jagow

Anodenpuffer: 0,2 M Tris pH 8,9 (HCl)

Kathodenpuffer: 0,1 M Tris } pH 8,25
0,1 M Tricin
0,1% SDS

Gelbeladepuffer

0,25% Bromphenolblau

(Agarose-Gelelektrophorese)

15% Ficoll (Typ 400, Pharmacia) in H₂O

PCR-Puffer (Roche)

100 mM Tris (HCl), pH 8,85 (20 °C)
250 mM KCl
50 mM (NH₄)₂SO₄
20 mM MgSO₄

Probenpuffer für SDS-PAGE (3x konz.):

0,5 ml H₂O dest.
1,5 ml Tris 0,5 M pH 6,8
2,4 ml Glycerin 100%
2,4 ml SDS 10%
0,6 ml β-Mercaptoethanol
0,6 ml 0,27% Bromphenolblau in Ethanol

TAE

40 mM Tris-Acetat
1 mM EDTA
pH 8,5

<u>TBS (Tris buffered saline):</u>	10 mM Tris pH 7,4 (HCl) 140 mM NaCl 0,05% Azid
<u>TBS/Triton:</u>	0,5% Triton X-100 in TBS
<u>TE</u>	1 mM EDTA 10 mM Tris (HCl) pH 7,5
<u>TNM:</u>	0,1 M Tris pH 9,5 (HCl), 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl ₂
<u>Transferpuffer für Western Blot:</u>	10 mM CAPS, 10% Methanol p.a., pH 11 (NaOH)

VII.2 Lösungen und Färbelösungen

<u>BCIP-Lösung</u>	50 mg/ml in DMF (-20 °C)
<u>Coomassie Brilliant Blue R-Färbelösung</u>	0,1% Coomassie Brilliant Blue R 40% Methanol 10% Essigsäure
<u>Entfärber</u>	40% Methanol 10% Essigsäure
<u>Farbreagenz Für AK-Detektion</u>	NBT 1:1000 und BCIP 1:1000 in TBS
<u>NBT-Lösung</u>	75 mg/ml in 70% DMF (-20 °C)

<u>NCS-Lösung</u>	5% in TBS	
<u>Poncaeu-S-Lösung</u>	0,2% Ponceau S	
	3% Trichloressigsäure	

VII.3 Medien

<u>LB-Agarplatten</u> pro 0,5 l	5 g Trypton	
	2,5 g Hefeextrakt	} pH 7,0
	5 g NaCl	
	7,5 g Agar	
	ad 500 ml mit H ₂ O dest.	

<u>LB-Medium</u> pro 0,5 l:	5 g Trypton	
	2,5 g Hefeextrakt	} pH 7,0
	5 g NaCl	
	ad 500 ml mit H ₂ O dest.	

modifiziertes M9-Medium

<u>(1/4 Hefe)</u> pro 1l:	100 ml 10x M9 Salts	
	1 ml MgSO ₄ (1 M)	
	1 ml CaCl ₂ (0,1 M)	
	1 ml Thiamin (1 M)	
	10 ml 20% Glucose	
	1 ml Prolin (20 ng/ml)	
	12,5 ml Hefeextrakt	
	ad 1 l mit H ₂ O dest.	

<u>10 x M9 Salts</u> pro 1l:	60 g Na ₂ HPO ₄	
	30 g KH ₂ PO ₄	} pH 7,4
	10 g NH ₄ Cl	
	5 g NaCl	
	ad 1 l mit H ₂ O dest.	

Chemikalien	Firmen
β-Mercaptoethanol	Merck
Acrylamid-Lösung	Roth
Agar	Gerbu
Agarose	Serva
BCIP	Gerbu
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck
Carbenicillin	Gerbu
Chloroform	Merck
dNTP's	Boehringer
Dodecylmaltosid (n-Dodecyl-beta-D- maltopyranosid)	Gerbu
EDTA	Gerbu
Essigsäure (CH ₃ COOH)	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Merck
Glucose	Merck
Glycerin	Merck
Glycogen	Roche
Hefeextrakt	Becton, Dickinson & Co.
Imidazol	Merck
IPTG	Fluka
Kanamycin	Gerbu
Kobaltsulfat (CoSO ₄)	Merck
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck
MassRuler DNA Ladder Mix	Fermentas
Mega 9 (n-Nonanoyl-N-methylglucamid)	ICN Biochemicals
MES	Gerbu
Natriumchlorid(NaCl)	Merck
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck
Natriumhydroxyd (NaOH)	J. T. Baker
Natriumsulfat (Na ₂ SO ₄)	Merck
Natriumacetat	Merck
NBT	Gerbu
NCS	Seromed
Phenol	Merck
Ponceau S	Serva
Salzsäure (HCl)	Merck
SDS	Serva
Thiamin	Serva
Trichloressigsäure	Roth
Tricin (N-(Tris-(hydroxymethyl)-methyl)-glycin	Gerbu
Tris	Gerbu
Triton X	Serva
Trypton	Difco

Alle nicht einzeln genannten Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

Säulen	Firmen
HiTrap™Desalting-Säule MonoQ Ni-NTA-Säule Superdex™-200	Amersham Biosciences Pharmacia Biotech Amersham Biosciences Pharmacia Biotech

Proteine und Enzyme	Firmen
BSA Calf intestine phosphatase 1U/μl (und Dephosphorylase-Puffer) CIC Cytochrom C Insulin-Zink-Komplex (26 U/mg) FaktorXa Glycyl-Glycin Pefabloc PefablocPlus PMSF Prolin Protein Molecular Weight Marker Pwo DNA Polymerase T4-DNA-Ligase Tetra His-Tag-Antikörper Universelles Proteasen-Substrat	Serva Boehringer Roche Boehringer Serva Biolabs Merck Roche Roche Roche Roche Fluka Fermentas Roche Novagen Qiagen Roche

Alle nicht einzeln genannten Proteine und Enzyme wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

Chromogene Substrate	Firmen
1. Glycin p-Nitroanilid 2. L-Lysin p-Nitroanilid Dihydrobromid 3. Ac-Lys- p-Nitroanilid-HCl 4. H-Val-Leu-Lys-- p-Nitroanilid-2HCl 5. N-p-Tosyl-Gly-Pro-Lys 4-Nitroanilid-Acetat Salz 6. 4-Nitrophenyl Acetat 7. Nitroacetanilid	Sigma Sigma Bachem Bachem Sigma Sigma Fluka

Restriktionsenzyme	Firmen
BamHI (und Puffer B) PvuI (und Puffer R+) Eco147I (und Puffer B+) SacI (und Puffer A) HindIII (und Puffer B) EcoRV (und Puffer B)	Boehringer Boehringer Fermentas Boehringer Boehringer Boehringer

Kits	Firmen
Perfectly Blunt Cloning Kit (enthält: Nova Blue Singles Competent Cells Tuner(DE3)placI End Conversion Mix SOC-Medium) Qiaprep Spin Miniprep Kit Transformaid-Kit Plasmid Midi Kit	Novagen Qiagen Fermentas Qiagen

Primerbezeichnungen	Sequenzen	Firmen
Primer sen30Xa	AAAATTAAGGCCTGCATTGATGAGG	MWG
Primer anti30Xa	TTATGTCTTAACCTCCCGCAG	MWG

Der Vektor pQE30Xa sowie die M15(pre4)-Zellen wurden von Dr. Deiwick zur Verfügung gestellt.

VII.5 Kurzschreibweise der Aminosäuren

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

VII.6 Nukleotid- und Aminosäuresequenz von pSUDA1-43 (Klon 8)

Nukleotidsequenz von pSUDA1-43 (Klon 8) mit kodierendem Bereich und
Aminosäuresequenz der SUD-Domäne:

	TT	TAT	TTG	CTT	TGT	GAG	CGG	ATA	ACA	ATT	ATA	ATA	GAT	TCA	ATT	GTG	AGC	GGA	TAA
				11			20			29			38			47			56
													Met	Arg	Gly	Ser	His	His	His
CAA	TTT	CAC	ACA	GAA	TTC	ATT	AAA	GAG	GAG	AAA	TTA	ACT	ATG	AGA	GGA	TCG	CAT	CAC	CAT
	65			74				83			92		101			110			
His	His	His	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ile	Glu	Gly	Arg	Lys	Ile	Lys	Ala	Cys	Ile
CAC	CAT	CAC	GGA	TCT	GGC	TCT	GGA	TCT	GGT	ATC	GAG	GGA	AGG	AAA	ATT	AAG	GCC	TGC	ATT
	125			134				143			152		161			170			
Asp	Glu	Val	Thr	Thr	Thr	Leu	Glu	Glu	Thr	Lys	Phe	Leu	Thr	Asn	Lys	Leu	Leu	Leu	Phe
GAT	GAG	GTT	ACC	ACA	ACA	CTG	GAA	GAA	ACT	AAG	TTT	CTT	ACC	AAT	AAG	TTA	CTC	TTG	TTT
	185			194				203			212			221		230			
Ala	Asp	Ile	Asn	Gly	Lys	Leu	Tyr	His	Asp	Ser	Gln	Asn	Met	Leu	Arg	Gly	Glu	Asp	Met
GCT	GAT	ATC	AAT	GGT	AAG	CTT	TAC	CAT	GAT	TCT	CAG	AAC	ATG	CTT	AGA	GGT	GAA	GAT	ATG
	245			254				263			272		281			290			
Ser	Phe	Leu	Glu	Lys	Asp	Ala	Pro	Tyr	Met	Val	Gly	Asp	Val	Ile	Thr	Ser	Gly	Asp	Ile
TCT	TTC	CTT	GAG	AAG	GAT	GCA	CCT	TAC	ATG	GTA	GGT	GAT	GTT	ATC	ACT	AGT	GGT	GAT	ATC
	305			314				323			332			341			350		
Thr	Cys	Val	Val	Ile	Pro	Ser	Lys	Lys	Ala	Gly	Gly	Thr	Thr	Glu	Met	Leu	Ser	Arg	Ala
ACT	TGT	GTT	GTA	ATA	CCC	TCC	AAA	AAG	GCT	GGT	GGC	ACT	ACT	GAG	ATG	CTC	TCA	AGA	GCT
	365			374				383			392			401		410			
Leu	Lys	Lys	Val	Pro	Val	Asp	Glu	Tyr	Ile	Thr	Thr	Tyr	Pro	Gly	Gln	Gly	Cys	Ala	Gly
TTG	AAG	AAA	GTA	CCA	GTT	GAT	GAG	TAT	ATA	ACC	ACG	TAC	CCT	GGA	CAA	GGA	TGT	GCT	GGT
	425			434				443			452			461		470			
Tyr	Thr	Leu	Glu	Glu	Ala	Lys	Thr	Ala	Leu	Lys	Lys	Cys	Lys	Ser	Ala	Phe	Tyr	Val	Leu
TAT	ACA	CTT	GAG	GAA	GCT	AAG	ACT	GCT	CTT	AAG	AAA	TGC	AAA	TCT	GCA	TTT	TAT	GTA	CTA
	485			494				503			512			521		530			
Pro	Ser	Glu	Ala	Pro	Asn	Ala	Lys	Glu	Glu	Ile	Leu	Gly	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Leu	Arg
CCT	TCA	GAA	GCA	CCT	AAT	GCT	AAG	GAA	GAG	ATT	CTA	GGA	ACT	GTA	TCC	TGG	AAT	TTG	AGA
	545			554				563			572			581		590			
Glu	Met	Leu	Ala	His	Ala	Glu	Glu	Thr	Arg	Lys	Leu	Met	Pro	Ile	Cys	Met	Asp	Val	Arg
GAA	ATG	CTT	GCT	CAT	GCT	GAA	GAG	ACA	AGA	AAA	TTA	ATG	CCT	ATA	TGC	ATG	GAT	GTT	AGA
	605			614				623			632			641		650			
Ala	Ile	Met	Ala	Thr	Ile	Gln	Arg	Lys	Tyr	Lys	Gly	Ile	Lys	Ile	Gln	Glu	Gly	Ile	Val
GCC	ATA	ATG	GCA	ACC	ATC	CAA	CGT	AAG	TAT	AAA	GGA	ATT	AAA	ATT	CAA	GAG	GGC	ATC	GTT
	665			674				683			692			701		710			
Asp	Tyr	Gly	Val	Arg	Phe	Phe	Phe	Tyr	Thr	Ser	Lys	Glu	Pro	Val	Ala	Ser	Ile	Ile	Thr
GAC	TAT	GGT	GTC	CGA	TTC	TTC	TTT	TAT	ACT	AGT	AAA	GAG	CCT	GTA	GCT	TCT	ATT	ATT	ACG
	725			734				743			752			761		770			
Lys	Leu	Asn	Ser	Leu	Asn	Glu	Pro	Leu	Val	Thr	Met	Pro	Ile	Gly	Tyr	Val	Thr	His	Gly
AAG	CTG	AAC	TCT	CTA	AAT	GAG	CCG	CTT	GTC	ACA	ATG	CCA	ATT	GGT	TAT	GTG	ACA	CAT	GGT
	785			794				803			812			821		830			
Phe	Asn	Leu	Glu	Glu	Ala	Ala	Arg	Cys	Met	Arg	Ser	Leu	Arg	Ala	Pro	Ala	Val	Val	Ser
TTT	AAT	CTT	GAA	GAG	GCT	GCG	CGC	TGT	ATG	CGT	TCT	CTT	AGA	GCT	CCT	GCC	GTA	GTG	TCA
	845			854				863			872			881		890			
Val	Ser	Ser	Pro	Asp	Ala	Val	Thr	Thr	Tyr	Asn	Gly	Tyr	Leu	Thr	Ser	Ser	Ser	Lys	Thr
GTA	TCA	TCA	CCA	GAT	GCT	GTT	ACT	ACA	TAT	AAT	GGA	TAC	CTC	ACT	TCG	TCA	TCA	AAG	ACA
	905			914				923			932			941		950			
Ser	Glu	Glu	His	Phe	Val	Glu	Thr	Val	Ser	Leu	Ala	Gly	Ser	Tyr	Arg	Asp	Trp	Ser	Tyr
TCT	GAG	GAG	CAC	TTT	GTA	GAA	ACA	GTT	TCT	TTG	GCT	GGC	TCT	TAC	AGA	GAT	TGG	TCC	TAT

	965		974		983		992		1001		1010								
Ser	Gly	Gln	Arg	Thr	Glu	Leu	Gly	Val	Glu	Phe	Leu	Lys	Arg	Gly	Asp	Lys	Ile	Val	Tyr
TCA	GGA	CAG	CGT	ACA	GAG	CTA	GGT	GTT	GAA	TTT	CTT	AAG	CGT	GGT	GAC	AAA	ATT	GTG	TAC
	1025			1034			1043		1052			1061			1070				
His	Thr	Leu	Glu	Ser	Pro	Val	Glu	Phe	His	Leu	Asp	Gly	Glu	Val	Leu	Ser	Leu	Asp	Lys
CAC	ACT	CTG	GAG	AGC	CCC	GTC	GAG	TTT	CAT	CTT	GAC	GGT	GAG	GTT	CTT	TCA	CTT	GAC	AAA
	1085			1094			1103		1112			1121			1130				
Leu	Lys	Ser	Leu	Leu	Ser	Leu	Arg	Glu	Val	Lys	Thr								
CTA	AAG	AGT	CTC	TTA	TCC	CTG	CGG	GAG	GTT	AAG	ACA	TAA	CCT	TGT	AAT	GGA	ACT	GGA	TCC
	1145			1154			1163		1172			1181			1190				
GCA	TGC	GAG	CTC	GGT	ACC	CCG	GGT	CGA	CCT	GCA	GCC	AAG	CTA	A					
	1205			1214			1223		1232										

VIII. Danksagungen

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Personen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ganz besonders danke ich folgenden Personen:

Herrn Prof. Dr. Rolf Hilgenfeld für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und das Überlassen des Materials.

Meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Christian L. Schmidt möchte ich besonders herzlich danken für die freundliche Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit sowie die vielen Ratschläge und geduldigen Erklärungen. Ich habe sehr gerne bei ihm gearbeitet.

Herrn Prof. Dr. med. W. Solbach aus der medizinischen Fakultät, der freundlicherweise das Zweitreferat der Dissertation übernahm.

Frau Doris Mutschall für ihre freundliche Hilfe und die gute Zusammenarbeit.

Herrn Walter Verheyen und allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, für ihre Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima.

Meiner Familie danke ich für die finanzielle, vor allem aber für die ideelle Unterstützung.

IX. Lebenslauf

Name: Stefanie Tech
Geburtsdatum: 10. 12. 1981
Geburtsort: Malchin
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1988-1992 Grundschule in Schwerin
1992-2000 Gymnasium in Schwerin
Abschluss: Abitur im Juni 2000

Hochschulausbildung:

seit 2000 Immatrikulation an der Universität zu Lübeck im Fach Humanmedizin
08/2002: Physikum
08/2003: 1. Staatsexamen

Oktober 2003 – August 2004:

Anfertigung der Dissertation „Expression und Charakterisierung der SUD-Domäne des SARS-Coronavirus“ im Institut für Biochemie der Universität Lübeck bei Herrn Priv. Doz. Dr. rer. nat. C. L. Schmidt