

Aus dem Institut für Biochemie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Dr. h.c. Rolf Hilgenfeld

Die coronavirale X-Domäne
- Kristallographische und biochemische Untersuchungen an
viralen Homologen der Makrodomänen-Proteine -

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät -

vorgelegt von
Yvonne Piotrowski
aus Demmin

Lübeck, 2009

1. Berichterstatter/Berichterstatterin:

2. Berichterstatter/Berichterstatterin:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den

Danksagung

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. rer. nat. Dr. h.c. Rolf Hilgenfeld für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, die Arbeiten am Institut für Biochemie durchführen zu können und die wundersame Welt der Röntgenkristallographie kennen lernen zu dürfen.

Der European Commission VIZIER (LSHG-CT-2004-511960) und SEPSDA (SP22-CT-2004-003831) danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Lia van der Hoek (University of Amsterdam, Netherlands) für die Bereitstellung der cDNA-Fragmente von HCoV-NL63.

Prof. Dr. Eric J. Snijder und Linda Boomaars-van der Zanden (Leiden University Medical Center, Netherlands) danke ich für die Bereitstellung der Plasmide zur Gen-Expression der X-Domäne des HCoV-229E und des IBV.

Dr. Arie Geerlof und Dr. Paul A. Tucker (EMBL-Hamburg) gilt mein Dank für die Bereitstellung des Plasmids zur Gen-Expression der TEV-Protease.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie für ihre Hilfsbereitschaft, Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Besonders bedanken möchte ich mich dabei bei der einstigen Besetzung des Labors 126 für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die zahlreichen Diskussionen: PD Dr. Ralf Moll, Silke Schmidtke, Nele Matthes und Rajesh Ponnusamy. Dr. Jeroen R. Mesters danke ich für die Unterstützung während der Datensammlungen und Dr. Guido Hansen für die Hilfe bei der Strukturbestimmung der X-Domäne von IBV.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie, besonders meinen Eltern und meiner Schwester für das Vertrauen, das sie in mich haben und den Zuspruch, all das schaffen zu können. Ein Dank gilt auch meinem Neffen Hannes Theodor, der mich durch seine neugierigen Fragen stets nach Antworten suchen lässt.

**Holzhacken ist deshalb so beliebt,
weil man bei dieser Tätigkeit den Erfolg sofort sieht.**

- Albert Einstein -

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Viren	1
1.2 Coronaviren	1
1.2.1 Einteilung der Coronaviren	2
1.2.2 Aufbau des Viruspartikels	3
1.2.3 Pathogenese	5
1.2.4 Aufbau des coronaviralen Genoms	7
1.2.5 Die nicht-strukturellen Proteine und die Replikation/Transkription des coronaviralen Genoms	8
1.2.5.1 Die nicht-strukturellen Proteine	8
1.2.5.2 Replikation und Transkription	10
1.2.5.3 Replikations/Transkriptions-Komplexe sind durch Membranen geschützt	12
1.3 HCoV-NL63	13
1.4 Das nicht-strukturelle Protein 3 (Nsp3)	14
1.4.1 Domänen-Organisation des Nsp3	14
1.4.2 Membran-Topologie des Nsp3	16
1.5 Die X-Domäne des Nsp3	16
1.5.1 Die ADP-Ribose-1“-Monophosphatase-Aktivität	17
1.5.2 Die Makrodomänen-Faltung	19
1.6 Zielsetzung	22
2 Materialien und Methoden	23
2.1 Materialien	23
2.1.1 Oligonukleotide, Plasmide und <i>Escherichia coli</i> -Stämme	23
2.1.2 Nährmedien und Antibiotika	25
2.1.3 Puffer und Lösungen	26
2.1.4 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	30
2.1.5 Geräte	32

2.2 Methoden.....	33
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	33
2.2.1.1 Klonierung mit dem Gateway [®] -System von Invitrogen (Karlsruhe).....	33
2.2.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
2.2.1.3 Restriktionsverdau	36
2.2.1.4 Ligation.....	36
2.2.1.5 Transformation in chemisch kompetente <i>E. coli</i> -Zellen	37
2.2.1.6 Transformation in kompetente <i>E. coli</i> -Zellen von Novagen	37
2.2.1.7 Aufreinigung mit dem Wizard [®] SV Gel and PCR Clean-Up System.....	37
2.2.1.8 Aufreinigung mit dem Wizard [®] Clean-Up System	38
2.2.1.9 Plasmidpräparation mit dem QIAprep Spin Plasmid Kit	38
2.2.1.10 Agarosegelelektrophorese	39
2.2.2 Mikrobiologische Methoden	39
2.2.2.1 Übernachtskultur	39
2.2.2.2 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	39
2.2.2.3 Optimierung der Gen-Expression.....	40
2.2.2.4 Gen-Expression für die präparative Proteinreinigung.....	40
2.2.2.5 Gen-Expression der PreScission-Protease und der TEV-Protease.....	40
2.2.3 Zellaufschluss und Proteinreinigung	41
2.2.3.1 Gesamtzelllyse.....	41
2.2.3.2 Zellaufschluss mit der French Press	41
2.2.3.3 Löslichkeitstest	42
2.2.3.4 Proteinreinigung mittels GST-Affinitätschromatographie	42
2.2.3.5 Proteinreinigung mittels Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie	43
2.2.3.6 Ionenaustauschchromatographie	44
2.2.3.7 Größenausschlussfiltration	44
2.2.3.8 Abspaltung des N-terminalen His ₆ -Tag mit der TEV-Protease.....	45
2.2.3.9 Dialyse	45
2.2.4 Proteinanalytik.....	45
2.2.4.1 SDS-PAGE	45
2.2.4.2 Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE	46
2.2.4.3 Western-Blot.....	46
2.2.4.4 Western-Blot-Entwicklung.....	47
2.2.4.5 Proteinbestimmung nach Bradford.....	47

2.2.4.6 NTPase-Aktivitätstest.....	48
2.2.4.7 Zonen-Interferenz-Gelelektrophorese	48
2.2.4.8 Isothermische Titrationskalorimetrie.....	49
2.2.4.9 NAD ⁺ -Spaltungstest	50
2.2.5 Kristallisation (durch Dampfdiffusion)	50
2.2.5.1 Methode des sitzenden Tropfens (<i>sitting drop</i> , 24er Well-Format)	50
2.2.5.2 Methode des hängenden Tropfens (<i>hanging drop</i> , 48er Well-Format).....	50
2.2.5.3 Kristallisation in der 96-Well Intelli-Plate	51
2.2.5.4 Co-Kristallisation	51
2.2.5.5 <i>Soaking</i> -Experimente	51
2.2.6 Diffraktionsexperimente	51
2.2.6.1 Datensammlung und –prozessierung.....	51
2.2.6.2 Molekularer Ersatz	52
2.2.6.3 Modellbau und Verfeinerung	52
2.2.6.4 Validierung	53
2.2.6.5 Programme für die Darstellung und Analyse	53
3 Ergebnisse und Diskussion	54
3.1 Klonierung, Gen-Expression und Proteinreinigung	54
3.1.1 Die X-Domäne von HCoV-NL63 (NL63-X)	54
3.1.1.1 Klonierung und Gen-Expression	54
3.1.1.2 Löslichkeitstest von GST-NL63-X.....	56
3.1.1.3 Aufreinigung von NL63-X	57
3.1.1.4 Das NL63-X mit einem kürzeren <i>Tag</i> (NL63-Xst)	58
3.1.2 Die X-Domäne von HCoV-229E (229E-X)	60
3.1.2.1 Gen-Expression	60
3.1.2.2 Löslichkeitstest von 229E-X	60
3.1.2.3 Abspaltung des His ₆ - <i>Tag</i> von 229E-X mit der TEV-Protease	61
3.1.2.4 Aufreinigung von 229E-X	62
3.1.3 Die X-Domäne von IBV (IBV-X)	63
3.1.3.1 Gen-Expression	63
3.1.3.2 Löslichkeitstest von IBV-X	63
3.1.3.3 Abspaltung des His ₆ - <i>Tag</i> von IBV-X mit der TEV-Protease.....	64
3.1.3.4 Aufreinigung von IBV-X	65

3.2 NTPase-Aktivität und Interaktionsstudien der coronaviralen X-Domäne	66
3.2.1 NTPase-Aktivität der X-Domäne	66
3.2.2 Identifizierung von Bindungspartnern.....	66
3.2.2.1 Bindungspartner von NL63-X/NL63-Xst.....	67
3.2.2.2 Bindungspartner von 229E-X.....	69
3.2.2.3 Bindungspartner von IBV-X	70
3.2.3 Dissoziationskonstante des Komplexes aus X-Domäne und ADP-Ribose	71
3.3 Kristallisation	72
3.3.1 Kristallisation von NL63-X und NL63-Xst.....	72
3.3.2 Kristallisation von 229E-X.....	75
3.3.3 Kristallisation von IBV-X	76
3.3.4 Co-Kristallisation und <i>Soaking</i> -Experimente mit NL63-Xst	79
3.3.4.1 Co-Kristallisation mit ADP-Ribose und NAD ⁺	79
3.3.4.2 <i>Soaking</i> -Experimente mit ADP-Ribose und NAD ⁺	80
3.4 Diffraktionsmessung und Strukturaufklärung	80
3.4.1 NL63-X.....	80
3.4.2 229E-X	82
3.4.3 IBV-X.....	84
3.4.4 Komplexstrukturen mit NL63-Xst	88
3.5 Analyse der Kristallstrukturen von NL63-X, 229E-X und IBV-X	92
3.5.1 Tertiärstruktur der X-Domänen.....	92
3.5.2 Konservierte Bereiche innerhalb der X-Domänen	95
3.5.3 Vergleich der X-Domänen mit viralen und zellulären Proteinen.....	98
3.5.3.1 Datenbank-Recherche.....	98
3.5.3.2 Vergleich der Tertiärstrukturen	100
3.6 Die X-Domäne des HCoV-NL63 im Komplex mit NAD ⁺	104
3.6.1 Vergleich der Ligand-freien Struktur mit den Komplexstrukturen.....	104
3.6.2 Bindung des NAD ⁺ in der kompakten Konformation	106
3.6.3 Bindung des NAD ⁺ in der gestreckten Konformation.....	109
3.6.3.1 Das Oxocarbeniumion des ADP-Ribosyl-Restes	112
3.6.3.2 NAD ⁺ -Spaltungsaktivität des NL63-X.....	115
3.6.3.3 Mögliche Funktionen der X-Domäne als NAD ⁺ -spaltendes Enzym.....	116
3.6.3.4 Validierung der erzielten Ergebnisse.....	118

3.6.4 Vergleich mit anderen Komplexstrukturen	119
3.6.5 Mögliche Bindungstaschen im 229E-X und IBV-X.....	121
4 Zusammenfassung	127
5 Literatur	130
6 Anhang.....	141
6.1 Abbildungsverzeichnis	141
6.2 Tabellenverzeichnis.....	142
6.3 Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der Nsp3 X-Domäne	143
6.3.1 HCoV-NL63	143
6.3.2 HCoV-229E	144
6.3.3 IBV	144
6.4 Kristallisationsbedingungen	145
6.5 Ramachandran-Plots.....	146
6.6 Nikotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form, NAD ⁺)	148
6.7 Fußnoten	148

Anlagen: Veröffentlichungen
 Workshops und Konferenzen

Abkürzungen

229E-X	Nsp3 X-Domäne von HCoV-229E	engl. E-Protein	englisch <i>envelope protein</i>
ADP	Adenosindiphosphat		Hüllprotein
ADPR	ADP-Ribose	ER	endoplasmatisches Retikulum
ADP-Ribose	Adenosindiphosphat-Ribose	evtl.	eventuell
ADRP	ADP-Ribose-1“-Monophosphatase	GMP	Guanosinmonophosphat
Amp	Ampicillin	GST	Glutathion-S-Transferase
AMP		GTP	Guanosintriphosphat
	Adenosinmonophosphat	HCoV	humanes Coronavirus
<i>Aqua dest.</i>	<i>aqua destillata</i> destilliertes Wasser	HE-Protein	Hämagglutinin-Esterase-Protein
APS	Ammoniumpersulfat	IBV-X	Nsp3 X-Domäne von IBV
ASU	<i>asymmetric unit</i> asymmetrische Einheit	inkl.	inklusive
ATP	Adenosintriphosphat	IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
bp	Basenpaare	ITC	isothermische Titrationskalorimetrie
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat	Km	Kanamycin
BSA	<i>bovine serum albumin</i> Rinderserumalbumin	lat.	lateinisch
bzw.	beziehungsweise	LB	Luria Bertani
ca.	circa	mADPRT	Mono-(ADP-Ribosyl-)transferase
Cm	Chloramphenicol	MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
CM	<i>convoluted membrane</i>	M ^{pro}	<i>main protease</i> Hauptprotease
CMP	Cytidinmonophosphat	M-Protein	Membranglykoprotein
CoV	Coronavirus	mRNA	Messenger-RNA
DESY	Deutsches-Elektronen-Synchrotron	NAD ⁺	Nikotinamidadenin-dinukleotid (oxidierte Form)
d.h.	das heißt	NADH	Nikotinamidadenin-dinukleotid (reduzierte Form)
DMF	Dimethylformamid	NADP ⁺	Nikotinamidadenin-dinukleotidphosphat (oxidierte Form)
DMSO	Dimethylsulfoxid	NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
DMV	Doppelmembran-Vesikel	NL63-X	Nsp3 X-Domäne von HCoV-NL63
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> Desoxyribonukleinsäure	NL63-Xst	NL63-X mit kürzerem Tag am N-Terminus
DTT	Dithiothreitol	N-Protein	Nukleokapsidprotein
ds	<i>double-stranded</i> doppelsträngig	nsp	für das nicht-strukturelle Protein kodierende DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	Nsp	<i>non-structural protein</i> nicht-strukturelles Protein
EDO	Ethylenglykol	NTA	Nitrilotriessigsäure
EDTA	<i>ethylenediamine-tetraacetic acid</i> Ethylendiamin-tetraessigsäure	NTP	Nukleosidtriphosphat

OD ₆₆₀	optische Dichte bei 660 nm	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
OG	n-Octyl-β-D-glykopyranosid	SDS	sodium dodecyl sulfate
ORF	<i>open reading frame</i>	SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat
pADPRT	offener Leserahmen	sg mRNA	SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese
	Poly-(ADP-Ribosyl-)transferase	S-Protein	<i>subgenomic</i> mRNA
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>	ss	<i>spike protein</i>
	Polymerasekettenreaktion	SUD	Oberflächenglykoprotein
PDB	Protein-Datenbank	TCA	<i>single-stranded</i>
PEG	Polyethylenglykol	TEMED	einzelsträngig
PL ^{pro}	<i>papain-like protease</i>	TEV	SARS- <i>unique domain</i>
	Papain-ähnliche Protease	TFZ	<i>trichloroacetic acid</i>
pp1a	Polyprotein 1a	TLA	trichloressigsäure
RdRp	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>	T _m	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
	RNA-abhängige RNA-Polymerase	TMP	<i>Tobacco etch virus</i>
RFZ	<i>Z-Score</i>	tRNA	Z-Score Translationsfunktion
	Rotationsfunktion	TRS	Tartrat
RNA	<i>ribonucleic acid</i>		<i>melting temperature</i>
rpm	Ribonukleinsäure	u.a.	Schmelztemperatur
	<i>rounds per minute</i>	UMP	Thymidinmonophosphat
	Umdrehungen pro Minute	ÜN	Transfer-RNA
RT	Raumtemperatur	UTP	<i>transcription-regulatory sequence</i>
SARS	<i>severe acute respiratory syndrome</i>	UTR	transkriptionsregulierende Sequenz
	schweres akutes respiratorisches Syndrom	UV	unter anderem
		VP	Uridinmonophosphat
SARS-X	Nsp3 X-Domäne von SARS-CoV	z.B.	über Nacht
		ZIGE	Uridintriphosphat
			<i>untranslated region</i>
			nichttranslatierte Region
			Ultraviolett
			Vesikel-Paket
			zum Beispiel
			Zonen-Interferenz-Gelelektrophorese

Außerdem werden die üblichen Maßeinheiten und Codes für Aminosäuren verwendet.

1 Einleitung

1.1 Viren

Viren sind infektiöse Partikel (Virionen) und bestehen aus einem Genom, das von einer Proteinhülle eingeschlossen ist. Sie können sich nur in lebenden Zellen vermehren, welche sie infizieren, da sie keine eigenen Proteinsynthesestrukturen oder Mechanismen der Energieproduktion besitzen. Viren sind in der Lage, zelluläre Prozesse umzusteuern oder zu modifizieren und so den optimalen Ablauf ihrer Vermehrung zu gewährleisten.

Die Einteilung der Viren erfolgt hauptsächlich nach der Art des Genoms. Das virale Genom kann aus Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder Ribonukleinsäure (RNA) bestehen. Hierbei wird weiter unterschieden zwischen doppelsträngig (ds) oder einzelsträngig (ss), Positiv- oder Negativstrangorientierung, segmentiert oder kontinuierlich sowie nach Anordnung der Gene auf der Nukleinsäure. Weitere Kriterien bei der Einteilung sind die Symmetriefform der Capside und das Vorhandensein einer Membranhülle.

1.2 Coronaviren

Coronaviren gehören zusammen mit den Toroviren zur Familie der *Coronaviridae*. Diese wird mit den Familien *Arteriviridae* und *Roniviridae* in der Ordnung der *Nidovirales* zusammengefasst (Mayo & Pringle, 1998; Pringle, 1999; Cowley *et al.*, 2000). Die Viren der Ordnung *Nidovirales* unterscheiden sich zwar in ihrer Genomgröße und Virionmorphologie, weisen aber Ähnlichkeiten in ihrer Genomorganisation sowie in den Transkriptions- und Translationsstrategien auf. Der Name *Nidovirales* leitet sich ab von *nidus* (lat.: *nidus* = Nest) und deutet auf das Hauptmerkmal der Viren dieser Ordnung hin. Im Rahmen der Transkription entsteht ein für Nidoviren charakteristischer Satz 3'-koterminaler, subgenomischer mRNAs, der auch als *nested set* bezeichnet wird.

Coronaviren konnten erstmals 1937 aus Hühnern isoliert werden. Dabei handelte es sich um das *infectious bronchitis virus* (IBV). In den 40er Jahren konnten ebenfalls das *mouse hepatitis virus* (MHV) sowie das *transmissible gastroenteritis virus* (TGEV) isoliert werden. Die ersten humanen Coronaviren wurden 1965 von Tyrell & Bynoe entdeckt (Tyrell & Bynoe, 1965). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die Viruspartikel von einer Membranhülle mit eingelagerten Proteinen umgeben sind (Abbildung 1.1). Dieses Gebilde erinnert an einen Strahlenkranz um die Sonne, was den Viren die Bezeichnung

Coronaviren gab (lat.: *corona* = Strahlenkranz um die Sonne). Basierend auf diesen morphologischen Kriterien erfolgte 1968 die Klassifizierung der *Coronaviridae* als eigene Familie. Diese Abgrenzung wurde durch spätere Erkenntnisse über die Ähnlichkeiten in der Genomorganisation und im Replikationsmechanismus bestätigt. Der erste Vertreter der anderen Gattung der Familie *Coronaviridae*, ein Torovirus, wurde 1972 aus einem Pferd isoliert und Berne-Virus genannt (Weiss *et al.*, 1983).

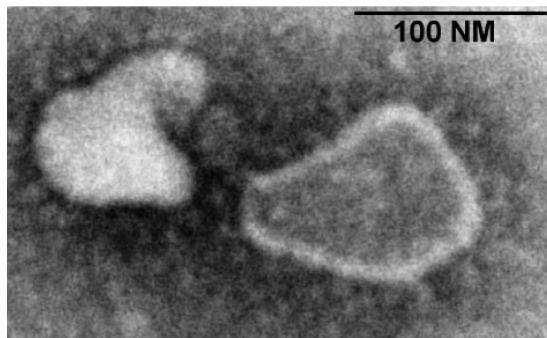


Abbildung 1.1: Elektronenmikroskopisches Bild des HCoV-NL (Fouchier *et al.*, 2004).

1.2.1 Einteilung der Coronaviren

Basierend auf serologischen und phylogenetischen Analysen werden die Coronaviren in drei Gruppen unterteilt, innerhalb derer sie weiter u.a. aufgrund ihrer Genomsequenz charakterisiert werden. Zunächst waren nur Coronaviren aus Menschen, verschiedenen Säugetieren und Vögeln bekannt, wobei die beiden Erstgenannten in die Serogruppen 1 und 2 eingeteilt wurden. Mit der Entdeckung eines Coronavirus, welches aus einem Karpfen (Güster, *Blicca bjoerkna*) isoliert wurde, erweiterte sich das Wirtsspektrum der Coronaviren auch auf Fische (Granzow *et al.*, 2001). Der Serogruppe 3 wurden Coronaviren aus Vögeln zugeordnet. Neueste Entdeckung ist ein Coronavirus, welches aus dem Beluga (Weißwal) isoliert und ebenfalls der Serogruppe 3 zugeordnet wurde (Mihindukulasuriya *et al.*, 2008). Tabelle 1.1 zeigt eine Übersicht über die Einteilung der Coronaviren mit charakteristischen Vertretern.

Tabelle 1.1: Einteilung der Coronaviren in die drei serologischen Gruppen und die Untergruppen mit charakteristischen Vertretern.

Spezies (engl.)	Abkürzung	Wirt
Gruppe 1		
A		
<i>transmissible gastroenteritis virus</i>	TGEV	Schwein
<i>canine coronavirus</i>	CCV	Hund
<i>feline coronavirus / feline infectious peritonitis virus</i>	FCoV/FIPV	Katze
B		
<i>human coronavirus 229E</i>	HCoV-229E	Mensch
<i>porcine epidemic diarrhea virus</i>	PEDV	Schwein
<i>human coronavirus NL63</i>	HCoV-NL63	Mensch
<i>bat coronavirus</i>	Bat-CoV	Fledermaus
Gruppe 2		
A		
<i>bovine coronavirus</i>	BCoV	Rind
<i>human coronavirus OC43</i>	HCoV-OC43	Mensch
<i>human coronavirus HKU1</i>	HCoV-HKU1	Mensch
<i>murine hepatitis virus</i>	MHV	Maus
<i>porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus</i>	HEV	Schwein
<i>rat coronavirus / sialodacryoadenitis virus</i>	RCV/SDAV	Ratte
B		
<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus</i>	SARS-CoV	Mensch
<i>SARS-like coronavirus</i>	SL-CoV	Fledermaus
Gruppe 3		
<i>infectious bronchitis virus</i>	IBV	Huhn
<i>turkey coronavirus</i>	TCoV	Truthahn
<i>coronavirus SW1</i>	SW1	Weißwal

1.2.2 Aufbau des Viruspartikels

Coronavirionen sind von kugelförmiger Gestalt mit einem Durchmesser von 100-160 nm. Die virale Nukleinsäure ist eine einzelsträngige RNA mit positiver Polarität und einer Größe von 27-32 kb. Sie bildet mit dem Nukleokapsidprotein (N-Protein) einen Komplex (Nukleokapsid), welcher helikal angeordnet ist und im Innern der Partikel vorliegt (Abbildung 1.2).

Das N-Protein (50-60 kDa) ist phosphoryliert und reich an basischen Aminosäureresten. Es ist mit dem viralen RNA-Genom assoziiert, interagiert aber auch über definierte Aminosäurereste mit der carboxyterminalen Domäne des Membranglykoproteins (M-Protein). Dem N-Protein wird u.a. eine wichtige Rolle bei der viralen RNA-Synthese zugeordnet (Almazán *et al.*, 2004; Schelle *et al.*, 2005). Das Nukleokapsid ist von einer Membranhülle umgeben, die von der Wirtszelle bereitgestellt wird. In diese sind mindestens drei viruskodierte Proteine eingelagert: das Oberflächenglykoprotein (engl.: *spike protein*, S-

Protein, 180-200 kDa), das Membranglykoprotein (M-Protein, 20-30 kDa) und das Hüllprotein (engl.: *envelope protein*, E-Protein, 9-12 kDa). Das M-Protein durchspannt die Membranhülle dreimal, so dass sich das carboxyterminale Ende im Innern des Viruspartikels befindet und dort, wie bereits beschrieben, mit dem N-Protein des Nukleokapsids interagiert. Nur kurze Bereiche der aminoterminalen Domäne sind auf der Oberfläche exponiert. Die Glykosylierung der aminoterminalen Domäne kann O-glykosidisch über Serin- und Threoninreste (MHV) oder N-glykosidisch über Asparaginreste (IBV, TGEV und SARS-CoV) erfolgen (Oostra *et al.*, 2006). Das M-Protein interagiert mit dem N- und S-Protein und spielt eine wichtige Rolle bei der Virus-Assemblierung. Das E-Protein ist nur in geringen Mengen in den Virionen vorhanden und ist beteiligt am Virus-*Budding*.

Das S-Protein ist ebenfalls glykosyliert. Es liegt als Dimer oder Trimer vor und bildet die keulenförmigen Ausstülpungen, die ca. 20 nm aus der Membranoberfläche herausragen und so das Viruspartikel im Elektronenmikroskop wie von einer Sonnenkorona umgeben erscheinen lassen. Durch das S-Protein erfolgt die Bindung an Virusrezeptoren auf der Zellmembran der Wirtszelle (Gallagher & Buchmeier, 2001) und wird die Bildung neutralisierender Antikörper induziert (Emery *et al.*, 2004). Weiterhin besitzt das S-Protein eine Fusionsaktivität, d.h. es vermittelt die Fusion der viralen Hüllmembran mit der Cytoplasmamembran als auch von Zellmembranen untereinander.

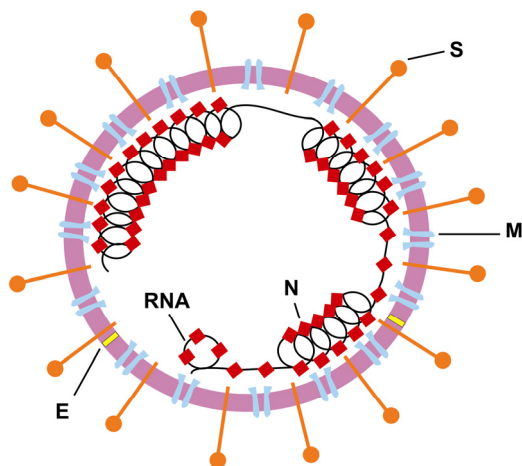


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung eines Coronavirus-Partikels. S: Oberflächenglykoprotein, M: Membranglykoprotein, N: Nukleokapsidprotein, E: Hüllprotein.

Bei einigen Coronaviren der Gruppe 2 (z.B. HCoV-OC43, MHV, BCoV, HCoV-HKU1) gibt es ein viertes, mit der Membran assoziiertes Protein, das Hämagglutinin-Esterase-Protein (HE-Protein), welches zum Hämagglutinin des Influenzavirus C

Sequenzhomologie zeigt. Das HE-Protein (65 kDa) ist glykosyliert und bildet über Disulfidbrücken ein Dimer. Es bindet Neuraminsäurederivate und weist eine hämagglutinierende und Esterase-Aktivität auf (Vlasak *et al.*, 1988).

1.2.3 Pathogenese

Die meisten Coronaviren sind als Erreger von Atemwegs- oder Darminfektionen bekannt. Sie vermehren sich dabei in den Epithelzellen des Respirationstrakts bzw. des Darms und verursachen so Atemwegserkrankungen oder Enteritiden. Die Virusreplikation kann aber auch in Makrophagen, Hepatozyten, Neuronen, Gliazellen, Endothelzellen, Lymphozyten, im Nierenepithel, im Urogenitaltrakt und/oder Myokard erfolgen. Coronaviren können somit weitere Erkrankungen wie Hepatitis (Leberentzündung), Peritonitis (Bauchfellentzündung) und Nephritis (Nierenentzündung) verursachen.

Beim Menschen verursachen Coronaviren hauptsächlich Erkrankungen der oberen und unteren Atemwege. Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten humanpathogener Coronaviren und Enteritiden ist noch nicht vollständig geklärt (Vabret *et al.*, 2003). HCoV-229E und HCoV-OC43 gelten neben den Rhinoviren als häufigste Erreger für respiratorische Infekte, die eine typische Erkältung mit Husten und Schnupfen verursachen. Sie werden für 20-30% aller Erkältungskrankheiten des Menschen verantwortlich gemacht. Auffällig dabei ist das saisonabhängige Auftreten der Erkrankungen, alle zwei bis drei Jahre gegen Ende der Winterperiode oder zu Frühlingsanfang (Vabret *et al.*, 2003).

Ende des Jahres 2002 trat eine Häufung atypischer respiratorischer Erkrankungen unbekannter Ursache in der südchinesischen Provinz Guangdong auf. Die Infektionskrankheit breitete sich über einzelne infizierte Personen weiter aus bis nach Hongkong, Vietnam, Singapur und Kanada, wo es in Toronto zu größeren Ausbrüchen der Erkrankung kam. Im März 2003 wurde die Erkrankung erstmalig als "schweres akutes respiratorisches Syndrom" (SARS) bezeichnet. Als Erreger der Infektionskrankheit wurde ein neues Coronavirus identifiziert, das SARS-CoV (Peiris *et al.*, 2003; Drosten *et al.*, 2003; Ksiazek *et al.*, 2003). Im Juli 2003 wurde die Epidemie für beendet erklärt. Nach Angaben der WHO (*World Health Organization*) erkrankten ca. 8000 Menschen an der Infektion, in ca. 774 Fällen mit tödlichem Ausgang. Die Übertragung des SARS-CoV erfolgt durch Tröpfcheninfektion. Die Letalität der Erkrankung liegt bei durchschnittlich 10%. Je nach Lebensalter beträgt sie 1% (<24 Jahre) über 15% (45-64 Jahre) bis 50% (>65 Jahre). Eine spezifische Therapie zur Behandlung der Erkrankung ist derzeit nicht vorhanden. Die Herkunft des SARS-CoV ist

noch nicht geklärt. Aus Wildtieren, welche auf südchinesischen Märkten als Delikatesse verkauft wurden, konnten SARS-Coronaviren isoliert werden. So galten z.B. Larvenroller, eine in Süd- und Südostasien verbreitete Art der Schleichkatzen, zunächst als das natürliche Reservoir der Viren (Guan *et al.*, 2003; Kan *et al.*, 2005). Neuere Daten zeigen aber, dass Fledermäuse höchstwahrscheinlich das Reservoir SARS-CoV-ähnlicher Viren sind (Li *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Shi & Hu, 2008). SARS-Coronaviren infizieren anders als die meisten anderen Coronaviren nicht nur eine Tierart oder nahe verwandte Arten, sondern sind in einer Reihe von Säugetieren zu finden (Roberts *et al.*, 2005) und haben dabei sogar die Speziesbarriere vom Tier auf den Menschen durchbrochen.

Bei Tieren kommt es nach einer Infektion mit Coronaviren ebenfalls zu Pneumonien und/oder Enteritiden. Die meist epidemische Erkrankung erfolgt in jeweils einer Tierart oder innerhalb einer Gruppe nahe verwandter Spezies. Besonders in der Viehzucht verursachen die coronaviralen Infektionen von Nutztieren beträchtliche ökonomische Schäden. Neben akuten Gastroenteritiden bei Rindern, Schweinen und Hunden verursachen Coronaviren auch fatale Erkrankungen wie Peritonitis (Bauchfellentzündung) bei Katzen (FIPV) oder Leberentzündungen bei Nagetieren (MHV).

Coronaviren zeigen eine ausgeprägte Wirtsspezifität. Coronavirale S-Proteine binden spezifisch an Rezeptorproteine auf der Zellmembran der Wirtszelle und induzieren so die Fusion der viralen Hülle mit der Zellmembran. Das S-Protein des HCoV-229E, TGEV und FIPV, Coronaviren der Gruppe 1, interagiert mit der Aminopeptidase N (APN) des jeweiligen Wirtes, welche sich auf der apikalen Seite respiratorischer und intestinaler Epithelzellen, auf tubulären Nierenepithelzellen und auf zentralnervösen, synaptischen Verbindungen befindet (Shapiro *et al.*, 1991; Benbacer *et al.*, 1997; Wentworth & Holmes, 2001; Breslin *et al.*, 2003). Die Aminopeptidase N aus dem Schwein zeigt 80% Sequenzidentität zu der des Menschen, trotzdem können die APNs nicht als Rezeptorproteine für das jeweils andere Virus fungieren (HCoV-229E bzw. TGEV). Die APN der Katze hingegen kann auch von HCoV-229E und TGEV erkannt werden. Dies lässt vermuten, dass ein Coronavirus aus der Katze der Vorfahr der Coronaviren der Gruppe 1 war und sich die S-Proteine von HCoV-229E und TGEV angepasst haben, um die entsprechenden APNs binden zu können. Das S-Protein des SARS-CoV bindet an den Rezeptor ACE2 (*Angiotensin-converting enzyme 2*), eine Metallopeptidase, die sich u.a. in der Lunge, im Herzen und in der Niere befindet. MHV nutzt Isoformen des CE-Antigens (*carcinogenic embryonic antigen*) als zelluläre Rezeptoren, welche sich u.a. in der Leber und im Gastrointestinaltrakt befinden. Bei Coronaviren der Gruppe 2 (z.B. BCoV, HCoV-OC43) kann neben einer durch das S-Protein vermittelte

Bindung an einen Proteinrezeptor auch eine Bindung des HE-Proteins an die 9-O-Acetylgruppe der membranständigen Sialinsäure erfolgen (Vlasak *et al.*, 1988; Schultze & Herrler, 1992). Diese Interaktion ist für die Infektion der Zelle jedoch nicht ausreichend (Popova & Zhang, 2002).

1.2.4 Aufbau des coronaviralen Genoms

Coronaviren besitzen unter allen derzeit bekannten RNA-haltigen Viren das größte Genom mit ca. 27-32 kb (Snijder *et al.*, 2003). Abbildung 1.3 zeigt eine schematische Darstellung des coronaviralen Genoms. Die einzelsträngige RNA ist am 5'-Ende mit einer Cap-Struktur versehen und ist am 3'-Ende polyadenyliert. Des Weiteren besitzt sie eine Positivstrangorientierung, wodurch die genomische RNA direkt als mRNA für die Translation genutzt werden kann. Am 5'-Ende des Genoms folgt der Cap-Struktur die sogenannte Leader-Sequenz von ca. 65-98 Nukleotiden und eine nichttranslatierte Region (engl.: *untranslated region*, 5'-UTR) von ca. 200-400 Nukleotiden. Solch eine nichttranslatierte Region ist auch am 3'-Ende der (+)-Strang-RNA zu finden (3'-UTR). Sie besitzt eine Größe von ca. 200-500 Nukleotiden und ist vor dem Poly(A)-Schwanz positioniert. Der Poly(A)-Schwanz besitzt innerhalb der Coronaviren eine unterschiedliche Länge. Die UTRs spielen eine Rolle in Replikation und Transkription der viralen RNA (Hsue *et al.*, 2000).

Die 5'-UTR und die 3'-UTR flankieren die offenen Leserahmen (engl.: *open reading frames*, ORFs) des Genoms. Auf den ersten zwei Dritteln befindet sich das Gen 1 (ca. 20-22 kb), das sogenannte Replikasegen. Es besteht aus den zwei überlappenden ORF1a und ORF1b. Diese kodieren für die nicht-strukturellen Proteine (engl.: *non-structural proteins*, Nsps), welche eine wichtige Rolle in der Virusreplikation und -transkription der Coronaviren spielen. Das verbleibende Drittel bis zum 3'-Ende enthält die ORFs, die für die vier strukturellen Proteine kodieren, welche für den Aufbau des Virus notwendig und in allen Coronaviren in der Reihenfolge 5'-S-E-M-N-3' vorhanden sind. Weiterhin befinden sich in diesem Bereich kleine Leserahmen, deren Anzahl und Aufbau innerhalb der Coronaviren variiert und die für meist sehr kleine Nichtstrukturproteine (akzessorische Proteine) unbekannter Funktion kodieren (Abbildung 1.3). Das Gen für das HE-Protein (HEV, BCoV, MHV, HCoV-OC43) befindet sich ebenfalls in diesem Bereich.

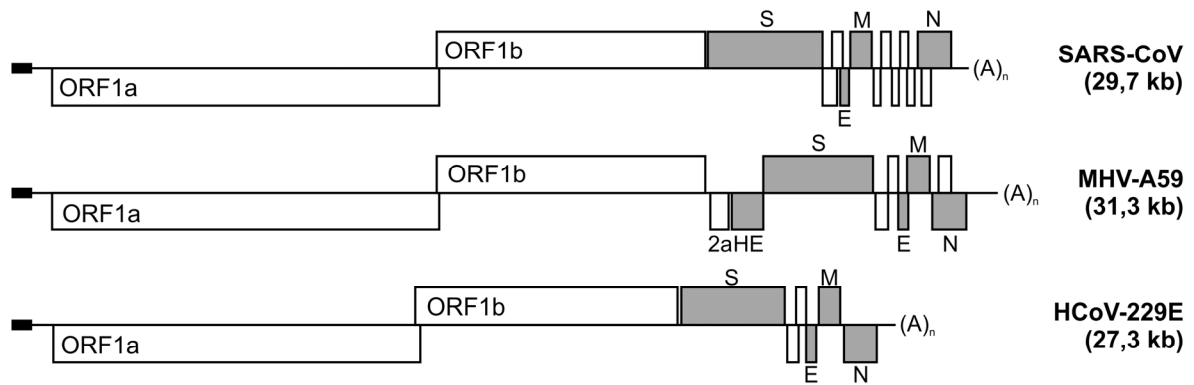


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Genoms der Coronaviren. Die schwarzen Kästchen am 5'-Ende der genomischen RNA stellen die Leader-Sequenz dar. ORF1a und ORF1b des Replikasegens sind gekennzeichnet. Im letzten Drittel des Genoms sind die ORFs der Strukturproteine grau unterlegt (S: Oberflächenglykoprotein, M: Membranglykoprotein, N: Nukleokapsidprotein, E: Hüllprotein, HE: Hämagglutinin-Esterase-Protein) und die ORFs der akzessorischen Proteine (z.B. 2a im MHV) weiß.

1.2.5 Die nicht-strukturellen Proteine und die Replikation/Transkription des coronaviralen Genoms

1.2.5.1 Die nicht-strukturellen Proteine

Die Infektion einer Wirtszelle durch Coronaviren beginnt mit der spezifischen Bindung der coronaviralen S-Proteine an Rezeptormoleküle auf der Oberfläche der Zielzelle. Die anschließend durch das S-Protein vermittelte Fusion der viralen Hüllmembran mit der Zellmembran ermöglicht die Penetration des Virus in die Wirtszelle. Die folgende Freisetzung der viralen RNA aus dem Nukleokapsid (*uncoating*) ins Zytoplasma ist ein bis jetzt noch ungeklärter Prozess. Nach Freigabe des viralen Genoms erfolgt die Translation des ORF1a und des ORF1b durch die Ribosomen der Wirtszelle.

Durch Translation des ORF1a erfolgt die Synthese des Polyproteins 1a (pp1a, 450-500 kDa). Das 3'-Ende des ORF1a und das 5'-Ende des ORF1b überlappen um ca. 43-75 Nukleotide miteinander (Brierley *et al.*, 1987). Durch einen (-1)-Leserastersprung kurz vor Erreichen des Stopcodons im ORF1a erfolgt die Translation bis zum Ende des ORF1b und somit die Synthese des pp1ab (750-800 kDa). Der (-1)-Leserastersprung wird durch eine *slippery*-Sequenz (5'-UUUAAAC-3') und eine Pseudoknotenstruktur der viralen RNA vermittelt (Brierley *et al.*, 1989; Herold & Siddell, 1993) und geschieht in 20-30% der Translationsereignisse (Herold *et al.*, 1993). Ohne eine Leserasterverschiebung erfolgt keine Translation des ORF1b (Abbildung 1.4).

Das Polyprotein 1a wird 3-5 mal mehr produziert als das Polyprotein 1ab (Dos Ramos *et al.*, 2004). Die beiden Polyproteine werden durch viruskodierte Proteasen in bis zu 16 nicht-strukturelle Proteine (Nsps) gespalten (Abbildung 1.4). Nsp1-11, kodiert durch ORF1a, werden aus dem pp1a und pp1ab freigesetzt, Nsp12-16, da sie durch ORF1b kodiert werden, nur aus pp1ab.

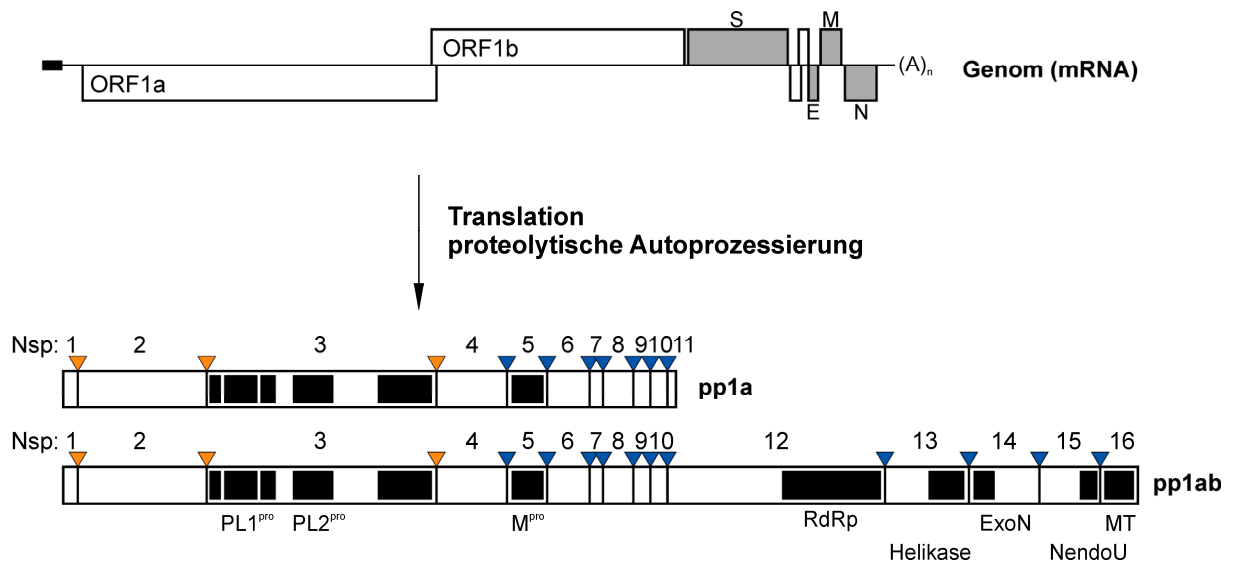


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Anordnung der nicht-strukturellen Proteine in pp1a und pp1ab. Die Spaltstellen der zwei Papain-ähnlichen Proteasen (PL1^{pro}, PL2^{pro}) sind durch orange Dreiecke, die der Hauptprotease (M^{pro}, 3CL^{pro}) durch blaue Dreiecke gekennzeichnet. Konservierte Domänen sind schwarz markiert. RdRp: RNA-abhängige RNA-Polymerase; ExoN: Exonuklease; NendoU: Endoribonuklease; MT: 2'-O-Methyltransferase.

Die meisten nicht-strukturellen Proteine besitzen enzymatische Funktionen, die für die Virusreplikation und -transkription essentiell sind. Die Gesamtheit der aus den zwei Polyproteinen freigesetzten Nsps wird daher als Replikations/Transkriptions-Komplex (RT-Komplex) bezeichnet. Interessanterweise konnten den Produkten des ORF1b durch computergestützte Analysen putative Funktionen zugeordnet und teilweise auch experimentell bestätigt werden, die in Verbindung mit der RNA-Polymerisation bzw. -prozessierung stehen: RNA-abhängige RNA-Polymerase (Nsp12; Cheng *et al.*, 2005), Helikase (Nsp13; Ivanov *et al.*, 2004; Ivanov & Ziebuhr, 2004), 3'→5' Exonuklease und N7-G-Methyltransferase (Nsp14; Minskaia *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2009), poly(U)-spezifische Endoribonuklease (Nsp15; Bhardwaj *et al.*, 2004) und 2'-O-Methyltransferase (Nsp16; Decroly *et al.*, 2008).

Die Funktion und Bedeutung der Nsp1-11 für die Coronaviren ist nur teilweise bekannt. Nsp1 und Nsp2 variieren innerhalb der Coronaviren am stärksten. Im IBV fehlt das

Nsp1 gänzlich. Genaue Funktionen konnten für die beiden Nsps noch nicht bestimmt werden. Für das Nsp2 von MHV und SARS-CoV wurde gezeigt, dass dieses Protein für die Virusreplikation entbehrlich ist (Graham *et al.*, 2005). Das Nsp1 von SARS-CoV unterdrückt die Gen-Expression im Wirt durch Abbau der mRNA. Es ist daher wahrscheinlich stark an der Virulenz des SARS-CoV beteiligt (Narayanan *et al.*, 2008). Das Nsp3 ist ein Multi-Domänen-Protein. Es enthält unter anderem die zwei Papain-ähnlichen Proteasen (engl.: *papain-like proteases*, PL1^{pro}, PL2^{pro}), die an der proteolytischen Spaltung des pp1a und pp1ab beteiligt sind. Sie spalten zwischen Nsp1[↓]Nsp2, Nsp2[↓]Nsp3 und Nsp3[↓]Nsp4 (Ziebuhr *et al.*, 2000; Snijder *et al.*, 2003). Die proteolytische Prozessierung des verbleibenden Polyproteins erfolgt durch die Hauptprotease (engl.: *main protease*, M^{pro}), welche sich im Nsp5 befindet. Diese wurde zunächst aufgrund ihrer entfernten Ähnlichkeit zur 3C-Protease von Picornaviren als 3CL^{pro} bezeichnet (*3C-like protease*). Die Freisetzung der M^{pro} selbst aus den Polyproteinen erfolgt durch Autoproteolyse. Die M^{pro} konnte bezüglich der Aktivität und der Proteinstruktur bereits sehr gut analysiert werden (Ziebuhr *et al.*, 2000; Anand *et al.*, 2002, 2003). Das Nsp3 enthält neben den genannten Proteasen noch weitere Domänen, von denen der X-Domäne eine Phosphatase-Aktivität zugeordnet wird (Putics *et al.*, 2005; siehe Abschnitt 1.4 und 1.5). Für das Nsp8 konnte ebenfalls eine Aktivität als RNA-abhängige RNA-Polymerase nachgewiesen werden (Imbert *et al.*, 2006). Das Nsp7 bildet in der Kristallstruktur mit dem Nsp8 ein zylindrisches Hexadekamer, welches Nukleinsäuren bindet und vermutlich einen Einfluss auf die Aktivität der RdRp hat (Zhai *et al.*, 2005). Das Nsp9 ist ein Nukleinsäure-bindendes Protein und liegt als Dimer vor, wobei das SARS-CoV-Nsp9 und das HCoV-229E-Nsp9 eine unterschiedliche Dimerisierung zeigen (Sutton *et al.*, 2004; Egloff *et al.*, 2004; Ponnusamy *et al.*, 2008). Das Nsp10 kann ebenfalls Nukleinsäuren binden, beinhaltet zwei Zink-Finger-Domänen und ist vermutlich in der Prozessierung der Polyproteine involviert (Matthes *et al.*, 2006; Donaldson *et al.*, 2007).

1.2.5.2 Replikation und Transkription

Die Replikation und Transkription der genomischen RNA, katalysiert durch die viruskodierte RdRp (Nsp12), erfolgt im Zytoplasma der infizierten Wirtszelle unter Beteiligung intrazellulärer Membranstrukturen. Näheres dazu folgt im nächsten Abschnitt. Nach Penetration des Virus in die Wirtszelle und Produktion des Replikase/Transkriptions-Komplexes (vorheriger Abschnitt) erfolgt die Umschreibung des Plusstrang-RNA-Genoms in einen Negativstrang durch die RdRp. Der Negativstrang dient zum einen als Matrize für die

Synthese von neuen Plusstrang-RNA-Genomen (Replikation), zum anderen ist er Ausgangspunkt für die Synthese des für Nidoviren charakteristischen Satzes (*nested set*) an subgenomischen mRNAs (Transkription, Abbildung 1.5).

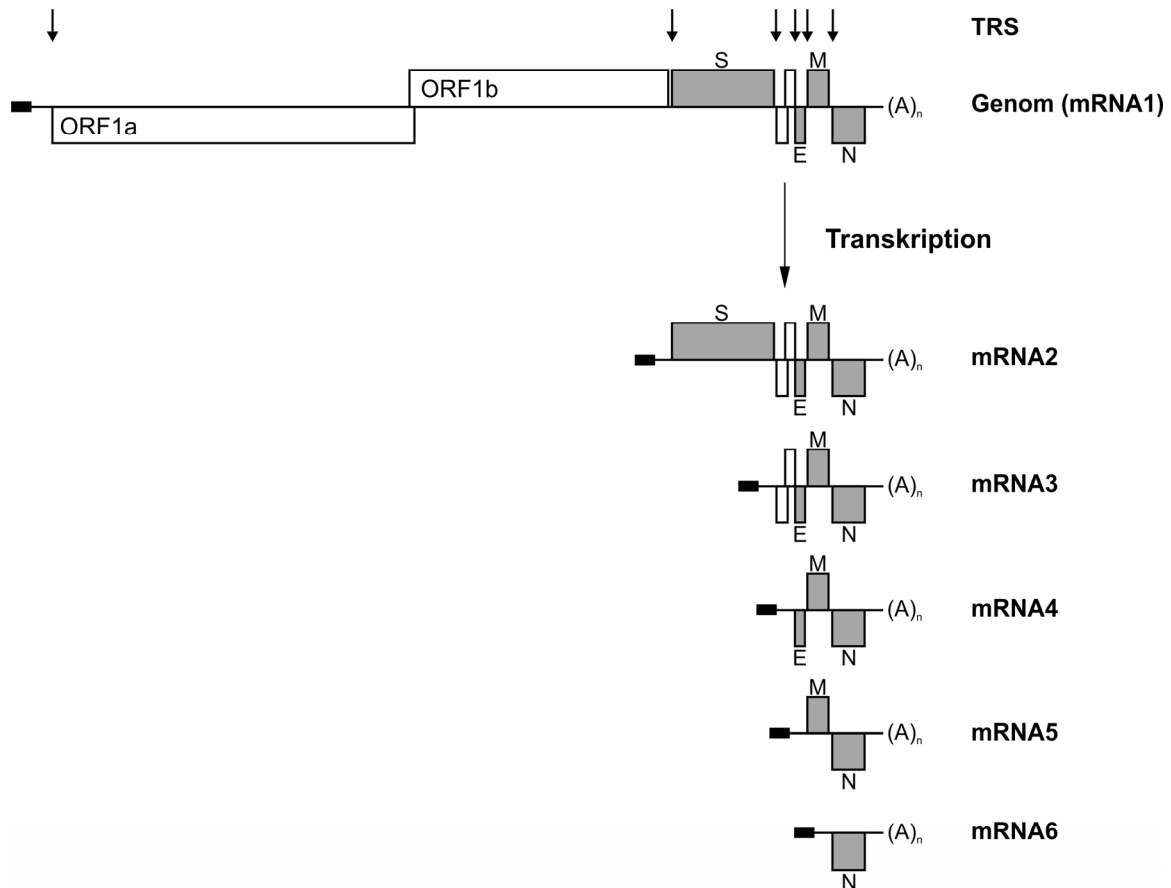


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der subgenomischen mRNAs. Die schwarzen Kästchen am 5'-Ende der genomischen RNA stellen die Leader-Sequenz dar. Die Positionen der transkriptionsregulierenden Sequenzen (TRSs) sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

Die subgenomischen mRNAs (sg mRNAs) kodieren für die strukturellen Proteine des Coronavirus. Sie sind am 5'-Ende mit einer Cap-Struktur versehen und haben ein einheitliches polyadenyliertes 3'-Ende. Jede sg mRNA, mit Ausnahme der kleinsten, besteht aus mehreren ORFs (strukturell polycistronisch), wobei die 3'-Enden jeweils identisch sind. Translatiert wird jedoch nur der 5'-gelegene ORF, welcher in der nächst kleineren sg mRNA nicht mehr vorhanden ist (funktionell monocistronisch). Alle sg mRNAs besitzen zudem an ihrem 5'-Ende eine Leader-Sequenz, die vom 5'-Ende der genomischen RNA stammt.

Es wurde lange diskutiert, ob die diskontinuierliche Transkription während der Plusstrang- oder der Negativstrang-Synthese stattfindet. Nach dem derzeitigen Kenntnisstand wird die letztere Möglichkeit favorisiert. Am 5'-Ende der genomischen RNA befindet sich,

wie bereits erwähnt, eine Leader-Sequenz von ca. 65-98 Nukleotiden. Stromaufwärts der sich im 3'-Bereich des Genoms befindlichen Gene für die Struktur- und die akzessorischen Proteine befinden sich die sogenannten transkriptionsregulierenden Sequenzen (engl.: *transcription-regulatory sequences*, TRSs). Das 3'-Ende der Leader-Sequenz und die TRSs sind in 7-18 Nukleotiden identisch (sogenannte Kern-Sequenz, engl.: *core sequence*). Diese Kernsequenzen sind reich an Adenin und Uracil, variieren aber innerhalb der Coronaviren, z.B. UCUAAAC für MHV und ACCAAC für SARS-CoV (Thiel *et al.*, 2003; Hussain *et al.*, 2005). Erreicht der Negativstrang während der Synthese durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase eine TRS auf der genomischen RNA, wird diese komplementär synthetisiert und die gesamte Sequenz kann sich sprunghaft an das 3'-Ende der Leader-Sequenz im Genom durch komplementäre Basenpaarung anlagern und die Synthese des Negativstranges wird fortgesetzt. Die daraus entstehenden negativ-strängigen mRNAs subgenomischer Länge dienen als Matrize für die Synthese der sg mRNAs mit der 5'-Leader-Sequenz.

1.2.5.3 Replikations/Transkriptions-Komplexe sind durch Membranen geschützt

RNA-Viren mit Plusstrangorientierung induzieren nach Eintritt in die Wirtszelle die Bildung von zytoplasmatischen Membranstrukturen. Die Gebilde haben dabei mehrere Funktionen. Zum einen erfolgt dadurch die Anreicherung viraler Makromoleküle, was unter anderem durch Koordination der einzelnen Schritte die Replikation des viralen Genoms ermöglicht, zum anderen wird die Einleitung der Abwehrmechanismen der Wirtszelle verzögert, da die RNA-Zwischenprodukte von diesen abgeschirmt sind.

Ursprung der Membranen können verschiedene zelluläre Kompartimente sein. Die Virus-Familien *Picornaviridae*, *Flaviviridae* und *Bromoviridae* nutzen das endoplasmatische Retikulum (ER), *Togaviridae* verwenden Endosomen und Lysosomen. Peroxisomen und Chloroplasten stellen die Quelle für Vertreter der *Tombusviridae* dar und die Familie der *Nodaviridae* verwendet Mitochondrien (Prentice *et al.*, 2004). Welcher zellulärer Bestandteil von den Vertretern der *Coronaviridae* für die Bildung der Membranstrukturen genutzt wird, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt. Höchstwahrscheinlich ist das endoplasmatische Retikulum der Membranlieferant in dieser Familie (Snijder *et al.*, 2006; van Hemert *et al.*, 2008).

Nach dem Eindringen des Virus in die Wirtszelle erfolgt die Bildung von Doppelmembran-Vesikeln (DMVs) (Pedersen *et al.*, 1999). Neueste Ergebnisse zeigen für SARS-CoV und MHV, dass diese DMVs nicht isolierte Partikel in der Zelle, sondern

Bestandteil eines einzigartigen retikular-vesikulären Netzwerkes veränderter Membranen des ER sind. Weiterer Bestandteil dieses Netzwerkes sind die so genannten *convoluted membranes* (CMs) (Knoops *et al.*, 2008). Diese Autoren zeigten außerdem, dass sich Einheiten des viralen Replikasekomplexes an den CMs konzentrieren, während sich im Innern der DMVs vermutlich virale dsRNA befindet. Die DMVs zeigen keine Verbindung zwischen ihrem Innern und dem Zytosol, sind aber untereinander über die äußere Membran miteinander verbunden. Kurz nach Beginn der Infektion sind die DMVs über das gesamte Zytoplasma verteilt, konzentrieren sich im weiteren Verlauf der Infektion im Bereich um den Zellkern und ordnen sich zu einem späteren Zeitpunkt in so genannten Vesikel-Paketen (VPs) an. Diese enthalten des Weiteren vollständige Virionen (Knoops *et al.*, 2008). Das Zusammenspiel der DMVs, CMs und VPs, u.a. der Import von Nukleotiden in die DMVs und der Export viraler RNA-Produkte, für die Translation ist noch nicht bekannt.

1.3 HCoV-NL63

Thema dieser Arbeit war hauptsächlich die Nsp3 X-Domäne aus dem humanen Coronavirus NL63. Das HCoV-NL63 wurde von zwei niederländischen Forschergruppen unabhängig voneinander zur gleichen Zeit identifiziert. Fouchier *et al.* (2004) isolierten das Virus aus einer aus 1988 stammenden Probe eines acht Monate alten Jungen, der an einer Lungenentzündung erkrankt war, und nannten es HCoV-NL. Die Probe, aus der das HCoV-NL63 von van der Hoek *et al.* (2004) isoliert wurde, stammte von einem Kind im Alter von 7 Monaten. Im Januar 2003 wurde es mit Schnupfen, Bindehautentzündung und Fieber ins Krankenhaus eingeliefert. Röntgenaufnahmen des Brustkorbes zeigten Merkmale einer Bronchitis, doch diagnostische Tests einer nasopharyngealen Probe auf verschiedene Viren, wie z.B. Adenovirus, Influenzavirus A und B, HCoV-229E und HCoV-OC43, blieben negativ. Mittels der neuartigen VIDISCA-Methode (*virus discovery based on cDNA-amplified restriction fragment-length polymorphism*; Pyrc *et al.*, 2008), wurde das Virus identifiziert und als neues Coronavirus erkannt. Beide Gruppen fanden das Virus in weiteren Proben, wobei hier ebenfalls eine Zirkulation hauptsächlich in den Wintermonaten zu sehen war. Infektionen mit HCoV-NL63 konnten in mehreren Ländern, wie z.B. Frankreich (Vabret *et al.*, 2005), Japan (Suzuki *et al.*, 2005), Kanada (Bastien *et al.*, 2005) und China (Chiu *et al.*, 2005) beobachtet werden, was eine weltweite Verbreitung des Virus zeigt.

Infektionen mit HCoV-NL63 können zu schwerwiegenden akuten Atemwegserkrankungen vor allem bei Kindern im ersten Lebensjahr und bei immunsupprimierten Erwachsenen führen (van der Hoek *et al.*, 2004). Des Weiteren wird

vermutet, dass HCoV-NL63 am Krupp (Krupphusten) beteiligt ist (van der Hoek *et al.*, 2005), wohingegen ein Zusammenhang von HCoV-NL63-Infektionen mit der Kawasaki-Krankheit nicht bestätigt werden konnte (Esper *et al.*, 2005). Obwohl das HCoV-NL63 erst vor wenigen Jahren identifiziert wurde, zeigen molekulare Analysen, dass es sich vermutlich im 11. Jahrhundert von seinem nächsten Verwandten, dem HCoV-229E, abgezweigt hat und seit dem in der menschlichen Bevölkerung zirkuliert (Pyrce *et al.*, 2006).

Wie durch eine phylogenetische Analyse der ORF 1a, 1b und der S-, M-, N-Gene ermittelt wurde, ist das HCoV-NL63 der Gruppe 1 der Coronaviren zuzuordnen. Mit dem aus derselben Gruppe stammendem HCoV-229E hat es die größte Identität von 65% (auf Nukleotidbasis), speziell im ORF 1a, 1b und im S-Gen (van der Hoek *et al.*, 2004). Die S-Gene von HCoV-NL63 und HCoV-229E haben eine Sequenzidentität von 56% (van der Hoek *et al.*, 2004). Dennoch bindet das S-Protein von HCoV-NL63 nicht wie das S-Protein anderer Coronaviren der Gruppe 1 an die Aminopeptidase N, sondern nutzt wie das SARS-CoV den ACE2-Rezeptor (Hofmann *et al.*, 2005), hier allerdings eine andere Bindungsregion.

Das Genom des HCoV-NL63 ist aus 27553 Nukleotiden aufgebaut. Neben dem charakteristischen Aufbau für Coronaviren (Abschnitt 1.2.4) besitzt das HCoV-NL63 einen ORF3, welcher zwischen den Genen des S- und E-Proteins lokalisiert ist. Weiterhin besonders ist die zusätzliche Sequenz von 537 Nukleotiden im 5'-Bereich des S-Gens, entsprechen zusätzlichen 179 Aminosäureresten im S-Protein. Ein weiteres charakteristisches Merkmal für das HCoV-NL63 ist der GC-Gehalt des Plusstrang-RNA-Genoms. Mit 34% liegt dieser unter dem durchschnittlichen GC-Gehalt von 37-42% und ist somit der niedrigste unter allen derzeit bekannten Coronaviren (Pyrce *et al.*, 2004).

1.4 Das nicht-strukturelle Protein 3 (Nsp3)

1.4.1 Domänen-Organisation des Nsp3

Mit ca. 180-210 kDa ist das nicht-strukturelle Protein 3 der Coronaviren das größte Spaltprodukt von pp1a und pp1ab. Das Nsp3 ist aus nicht weniger als fünf Domänen aufgebaut, welche innerhalb der Coronaviren weitestgehend konserviert sind (Abbildung 1.6, Beispiel: HCoV-229E und MHV). Am N-Terminus von Nsp3 befindet sich die saure Domäne (engl.: *acidic domain*, Ac, ~150-240 Aminosäurereste). Das häufige Auftreten der sauren Asp- und Glu-Reste gab ihr den Namen (Ziebuhr *et al.*, 2001). Stromabwärts der sauren Domäne befindet sich die erste der zwei Papain-ähnlichen Proteasen (PL1^{pro}) des Nsp3. Diese grenzt an den N-Terminus der X-Domäne, während sich die PL2^{pro} an deren C-terminalem

Ende befindet. Stromabwärts der PL2^{pro} und am C-terminalen Ende des Nsp3 befindet sich die Y-Domäne. Diese umfasst ~450-490 Aminosäurereste und ist somit die größte konservierte Region innerhalb des Nsp3. In den ersten ~180 Aminosäureresten der Y-Domäne befinden sich 11 konservierte Cys/His-Reste (Ziebuhr *et al.*, 2001). Weiterhin enthält sie mehrere hydrophobe Bereiche, durch die eine Verankerung des Nsp3 und der Polyproteine in der Membran möglich ist (Oostra *et al.*, 2008).

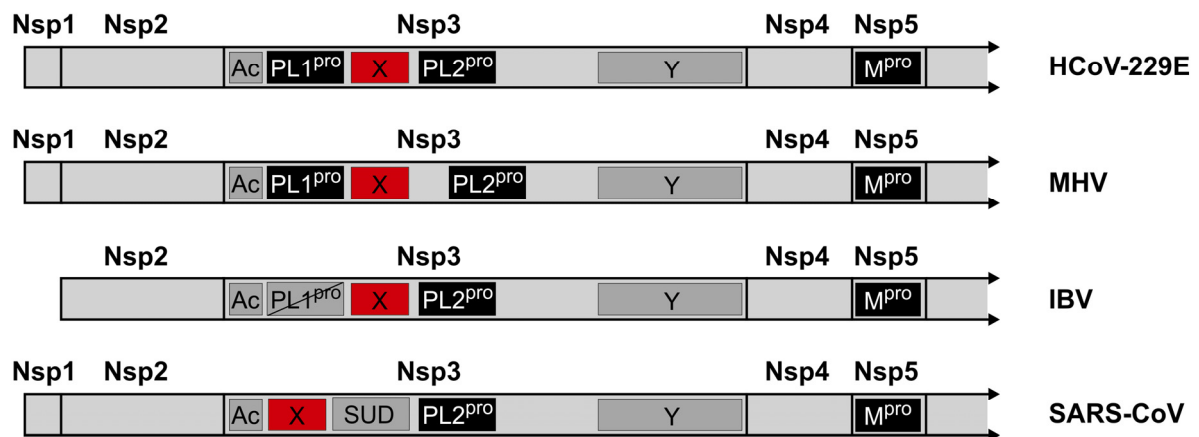


Abbildung 1.6: Multi-Domänen-Organisation des Nsp3. Ac: saure Domäne, PL1^{pro}: Papain-ähnliche Protease 1, X: X-Domäne, SUD: SARS-unique domain, PL2^{pro}: Papain-ähnliche Protease 2, Y: Y-Domäne.

Wie in Abbildung 1.6 zu erkennen ist, gibt es Abweichungen von der oben beschriebenen Multi-Domänen-Organisation des Nsp3 innerhalb der Coronaviren. Das nicht-strukturelle Protein 3 von IBV besitzt grundlegend den dargestellten Aufbau aus saurer Domäne, PL1^{pro}, X-Domäne, PL2^{pro} und Y-Domäne, doch besitzt die PL1^{pro} in diesem Fall keine enzymatische Aktivität (Ziebuhr *et al.*, 2001). Das Nsp3 von SARS-CoV besitzt wie alle anderen Coronaviren am N-Terminus eine saure Domäne und am C-Terminus eine Y-Domäne. Stromaufwärts der Y-Domäne befindet sich auch hier eine Domäne, die der PL2^{pro} zuzuordnen ist. Im Gegensatz zu anderen Coronaviren (mit Ausnahme von IBV) besitzt SARS-CoV nur diese eine Papain-ähnliche Protease. Der sauren Domäne folgt im SARS-CoV Nsp3 direkt die X-Domäne. Diese umschließt mit der stromabwärts gelegenen PL2^{pro} eine Domäne, welche einzig im Nsp3 des SARS-CoV und einigen SARS-ähnlichen CoVs aus Fledermäusen zu finden ist und somit als SARS-unique domain (SUD) bezeichnet wird (Snijder *et al.*, 2003).

1.4.2 Membran-Topologie des Nsp3

Die nicht-strukturellen Proteine 3, 4 und 6 (Nsp3, Nsp4, Nsp6) besitzen mehrere Transmembran-Regionen. Alle drei Nsps werden vom ORF1a kodiert. Im pp1ab-Teil, welcher durch den ORF1b kodiert wird, sind keine die Membran durchspannenden Regionen vorhanden. Neben der Aufgabe der Membranverankerung wird vermutet, dass sie auch für die Bildung der Membranstrukturen, wie sie zuvor beschrieben wurden (Abschnitt 1.2.5.3), verantwortlich sind. So konnte für das verwandte EAV (*equine arteritis virus*), ein Arterivirus, gezeigt werden, dass eine Co-Expression von Nsp2 und Nsp3 (entsprechen Nsp3 und Nsp4 der Coronaviren) für die Bildung von DMVs ausreichend ist (Snijder *et al.*, 2001). Mutation im Nsp4 von MHV und dem entsprechenden Nsp3 von EAV hingegen beeinträchtigen diese (Clementz *et al.*, 2008; Posthuma *et al.*, 2008). Für das Nsp4 wurden vier Transmembranregionen vorhergesagt und diese konnten auch experimentell bestätigt werden (Oostra *et al.*, 2008). Die Anzahl der Transmembranregionen im Nsp3 und Nsp6 wurde mit drei und sieben vorhergesagt. Dies würde bedeuten, dass die Proteasen des Nsp3 und das Nsp5 (M^{pro}) von einigen ihrer Zielsequenzen durch die Lipiddoppelmembran getrennt wären. Nach Oostra *et al.* (2008) durchspannen nur zwei der drei Transmembranregionen des Nsp3 die Doppelmembran. Im Falle des Nsp6 sind es sechs der sieben Transmembranregionen. Daraus resultiert, dass sich beim Nsp3 und Nsp6 die Termini auf der zytosolischen Seite befinden (Oostra *et al.*, 2008).

1.5 Die X-Domäne des Nsp3

In der Ordnung der Nidovirales ist die X-Domäne bei Vertretern der Familie *Coronaviridae* zu finden, nicht aber innerhalb der *Arteriviridae* und *Roniviridae* (Snijder *et al.*, 2003). Neben den Coronaviren enthalten auch andere Plusstrang-Viren wie die Alpha- und Rubiviren aus der Familie der *Togaviridae* und Hepatitis-E-Viren aus der Familie der *Hepeviridae* Homologe der X-Domäne (Gorbalenya *et al.*, 1991; Koonin *et al.*, 1992), was auf eine wichtige Funktion der X-Domäne im viralen Lebenszyklus schließen lässt. Die X-Domäne der Coronaviren umfasst ~170 Aminosäurereste. Zum Zeitpunkt der Identifizierung dieser Region im Nsp3 bei den Coronaviren durch Gorbalenya *et al.* (1991) gab die Durchsuchung der Swiss-Prot-Datenbank keinen Hinweis auf eine mögliche Funktion dieser Domäne, daher die Bezeichnung als X-Domäne.

1.5.1 Die ADP-Ribose-1“-Monophosphatase-Aktivität

Sequenzvergleiche, die nach der Benennung als X-Domäne (Gorbalenya *et al.*, 1991) durchgeführt wurden, zeigten Übereinstimmungen mit zellulären Proteinen aus Pro- und Eukaryonten (Snijder *et al.*, 2003; Abbildung 1.7).

TGEV/1-140	1	-----LEPDVIVNAANGDLKHMGGVARAIDV	26
FIPV/1-136	1	-----KVSFYQGGDLVDLINFLEPDVLVNAANGDLRHVGGVARAIDV	41
HCoV-229E/1-165	1	---EKLNAFLVHDNVAFYQGGDVTVVNGVDFDFIVNAANENLAHGGGLAKALDV	51
HCoV-NL63/1-164	1	-----KPFVYKKNVYFYLGDISHLVNCSFDFVNAANENLLHGGGVARAIDV	48
HCoV-OC43/1-155	1	-----VKGDIKIVSKLVKAEVVVNPANGHMAHGGGVAKAIAV	37
MHV_A59/1-166	1	-----VKGDVIKVVRLVNAEIVVNPANGRMAHAGAVAGAAIAE	37
SARS-CoV_Tor2/1-175	1	-PVNQFTGYLKLTDNVAIKCVDIVKEAQSANPMVIVNAANIHLKHGGGVAGALNK	54
IBV_Beaudette/1-172	1	PATCEKPKFLEYKTCVGDLTVVIAKALDEFKEFCIVNAANEHMTHGSGVAKAIAID	55
TCov/1-156	1	-----GDLTVVIAKALDEFKEFCIVNAANEHMTSHGGGVAKAIAID	39
AF1521/1-178	1	-----DITLKLQAQDITQYPAKAIVNAANKRLEHGGGVAYAAIAK	39
Er58/1-168	1	-----RIHVVQGDITKLAVDVIIVNAANPSLXGGGGVDGAIHR	37
Poa1p/1-168	1	-----NITYVKGNI LKPKSYARILIHSCNCGSWGGGIAIYQLAL	39
TGEV/1-140	27	FTG-----GKLTERSKDYLLKKNKSIAPEGNAVFFEN---VIEHLSVLNAVGP	71
FIPV/1-136	42	FTG-----GKLTKRSKEYLKKSSKAIAPGNAVLFEN---VLEHLSVLNAVGP	86
HCoV-229E/1-165	52	YTK-----GKLQRLSKEHIGLAGKVKVGTGVMVE---CDSLRI FNVVGP	94
HCoV-NL63/1-164	49	LTE-----GQLQSLSKDYISSNGPLKVGAGVMLE---CEKFNFVNVVGP	91
HCoV-OC43/1-155	38	AAG-----QQFVKETDMVKSKGVCACTDCYVSTG---GKLCKTVLNVVGP	82
MHV_A59/1-166	38	KAG-----SAFIKETSDMVKAQGVQVGEYESAG---GKLCKVVLNIVGP	82
SARS-CoV_Tor2/1-175	55	ATN-----GAMQKESDDYIKLNGPLTVGGSCLLSG---HNLAKKCLHVVGP	99
IBV_Beaudette/1-172	56	FCG-----LDFVEYCEDYVKKHGPQQR--LVTPSF---VKGICQVNNVVG	98
TCov/1-156	40	FCG-----PDFVEYCEDYVKKHGPQQR--LVTPSF---VKGICQVNNVVG	82
AF1521/1-178	40	ACAGDAGLYTEISKAMREQFGRDYIDHGEVVVTPAMNLEERGIKYVFHTVGP	94
Er58/1-168	38	AAG-----PALLDACLKVRQQQGDCTGHAVITLAG---DLPKAVVHTVGP	83
Poa1p/1-168	40	RYP-----KAEKDYVEVCEKYGSNLLGKCLLPS---YENSDDLICCLFTSS	84
TGEV/1-140	72	GD---SRVEAKLCNVYK-AIAKCEGKILT---PLISVGIFNVRLLETSLQCL	118
FIPV/1-136	87	GD---SRVEGKLCNVYK-AIAKCDGKILT---PLISVGIFKVKLEVSLQCL	133
HCoV-229E/1-165	95	G---KHERDLLIKAYN-TINNEQGTPLT---PILSCGIFGIKLETSLLEVLD	140
HCoV-NL63/1-164	92	G---KHEHSLLEAYN-SILFENGIPLM---PLLSCGIFGVRIENSLKALF	137
HCoV-OC43/1-155	83	RTQG-KQSYVLLERVYK-HLNNY-DCVVT---TLISAGIFSVPSDVS	130
MHV_A59/1-166	83	RGHG-KQCYSLLERAYQ-HINKD-DNVVT---TLISAGIFSVPTDVS	130
SARS-CoV_Tor2/1-175	100	NA---GEDIQLLKAAYE-NFNSQ-DILLA---PLLSCGIFGAKPLQSLQVC	145
IBV_Beaudette/1-172	99	GD---NNLHEKLVAAAYKNVLDGVVNVV---PVLSLGIFGVDFKMSIDAM	146
TCov/1-156	83	GD---SNLREKLVAAAYKKVLDGVFNVV---PVLSSGIFGVDFKMSIDAM	140
AF1521/1-178	95	SGMWSEELKEKLYKAF LGPLEKAEEMGVESIAFPVAVSAGIYGCDLEKVV	139
Er58/1-168	84	RGGE-QNEDQLLQDAYLNSRLVAANSYTSVAFPAISTGVYGYPRAAAAE	137
Poa1p/1-168	85	GGG---SHGEKQSLNYSYTKLALDKLKTFFREAKDKTRTSSEDSIGDYLN	137
TGEV/1-140	119	VNDRGLNVFVYTDQERQTIENF-----	140
FIPV/1-136	134	VTD-----	136
HCoV-229E/1-165	141	CNTKEVKVFVYTDTEVCKVKDFVSG-----	165
HCoV-NL63/1-164	138	DINKPLQVFVYSSNEEQAVLKFLDGLD-----	164
HCoV-OC43/1-155	131	AKKQVVLVSNNQEDFDLISKQITA-----	155
MHV_A59/1-166	131	VTKNVILVSNNQDDFDVIEKQVTSVAGTKALS	166
SARS-CoV_Tor2/1-175	146	VRTQVYIAVNDKALYEQVVMYD-LDNLKPRV----	175
IBV_Beaudette/1-172	147	FEGCTIRVLLFSLSQEHIDYFDVTCK-----	172
TCov/1-156	131	FDGCDIRVLLFSLSQEHIIDYFNATCK-----	156
AF1521/1-178	150	VKNFKGSVAVKEVALVIYDRKSAEVALKVF-----	178
Er58/1-168	138	VSEF ITRHALPEQVYFVCYDEENAHLYERLL----	168
Poa1p/1-168	138	YKLEMPQINSGIFGVPWKETERVLEEFSGDM----	168

Abbildung 1.7: Sequenz-Alignment der X-Domäne des Nsp3 mit ausgewählten Vertretern jeder Gruppe der Coronaviren und zellulären Proteinen. Gruppe 1a: TGEV, FIPV; Gruppe 1b: HCoV-229E, HCoV-NL63; Gruppe 2a: HCoV-OC43, MHV (Stamm A59); Gruppe 2b: SARS-CoV (Stamm Tor2); Gruppe 3: IBV (Stamm Beaudette), TCov; AF1521: Protein aus *Archaeoglobus fulgidus*; Er58: Protein aus *Escherichia coli*; Poa1p: Protein aus *Saccharomyces cerevisiae*.

Eine relativ geringe Sequenzidentität besteht zwischen den coronaviralen X-Domänen und dem Produkt des ORF YBR022w (Poa1p) aus *Saccharomyces cerevisiae* (Abbildung 1.7). Poa1p wurde als eine Phosphoesterase identifiziert, welche im Rahmen der tRNA-Prozessierung die Reaktion von ADP-Ribose-1“-Phosphat zu ADP-Ribose katalysiert (Martzen *et al.*, 1999). Dabei zeigt das Enzym eine hohe Spezifität für das Substrat ADP-Ribose-1“-Phosphat, katalysiert die Reaktion aber nur sehr langsam ($k_{\text{cat}} = 1,7 \text{ min}^{-1}$; Shull *et al.*, 2005). Die coronaviralen X-Domänen zeigen deutlich mehr Übereinstimmungen in den Aminosäureresten mit dem Protein Er58 aus *Escherichia coli* und dem Protein AF1521 aus dem thermophilen Organismus *Archaeoglobus fulgidus* (Abbildung 1.7). Über das Er58 ist aus der Literatur kaum etwas bekannt und auch die Funktion des AF1521 ist noch nicht geklärt, jedoch konnte für letzteres eine Aktivität als ADP-Ribose-1“-Monophosphatase (ADRP) gezeigt werden (Karras *et al.*, 2005).

Die enzymatische Aktivität als ADP-Ribose-1“-Monophosphatase ist auch bei der X-Domäne von HCoV-229E und TGEV (Gruppe 1) und von SARS-CoV (Gruppe 2) vorhanden, was durch Inkubation des Proteins mit ADP-Ribose-1“-Phosphat und Detektion des Produktes ADP-Ribose nach Dünnschichtchromatographie bestätigt werden konnte (Putics *et al.*, 2005, 2006; Egloff *et al.*, 2006). Wie Poa1p besitzt auch die X-Domäne des HCoV-229E eine hohe Spezifität für ADP-Ribose-1“-Phosphat. Andere Nukleotide wie AMP, ADP und ATP werden vom viralen Protein nicht umgesetzt (Putics *et al.*, 2005). Die Autoren zeigten durch Einführung von Punktmutationen in der X-Domäne des HCoV-229E, dass Asn1302, Asn1305 und His1310 (Nummerierung der Reste basierend auf dem pp1a, nach Abbildung 1.7 Asn33, Asn36 bzw. His41) die ADRP-Aktivität aufheben, während die Mutation von Gly1311 (entspricht Gly42 in Abbildung 1.7) und Gly1312 (entspricht Gly43 in Abbildung 1.7) die enzymatische Aktivität lediglich reduziert. Die X-Domäne des SARS-CoV verliert ebenfalls durch Mutation des Asn41 (Asn39 in Abbildung 1.7), welches Asn1305 von HCoV-229E entspricht, die ADRP-Aktivität (Egloff *et al.*, 2006).

Wie bereits erwähnt, ist ADP-Ribose-1“-Phosphat ein Nebenprodukt bei der Prozessierung der tRNA in Eukaryonten. Es entsteht durch Umsetzung von ADP-Ribose-1“,2“-Zyklophosphat durch eine zyklische Nukleotid-Phosphodiesterase (CPD, Culver *et al.*, 1994). Eine CPD-Domäne konnte auch bei Coronaviren identifiziert werden, jedoch ist diese Domäne nicht bei allen Coronaviren konserviert (Snijder *et al.*, 2003). Sie ist nur bei Coronaviren der Gruppe 2 (mit Ausnahme des SARS-CoV) zu finden.

Die Funktion der Nsp3 X-Domäne als ADP-Ribose-1“-Monophosphatase ist dennoch fraglich. Die Replikation der Coronaviren erfolgt im Zytoplasma. Das tRNA-Splicing findet

dagegen im Zellkern statt. Ein Eintritt der Nsp3 X-Domäne in den Zellkern, welcher das Substrat ADP-Ribose-1“-Phosphat für die ADRP-Aktivität enthält, ist derzeit nicht bekannt. Des Weiteren wird während der Replikation der Coronaviren kein ADP-Ribose-1“-Phosphat gebildet, welches als Substrat von der X-Domäne genutzt werden könnte (Egloff *et al.*, 2006). Für die Virus-Replikation in der Zellkultur ist die ADRP-Aktivität ebenfalls nicht essentiell, was für das HCoV-229E gezeigt wurde (Putics *et al.*, 2005).

1.5.2 Die Makrodomänen-Faltung

Mit der Kristallstruktur der SARS-CoV X-Domäne (PDB 2ACF) veröffentlichten Saikatendu *et al.* (2005) die erste Struktur dieser konservierten Domäne des coronaviralen nicht-strukturellen Protein 3 (Abbildung 1.8a). Die Proteinstruktur setzt sich zusammen aus einem zentralen β -Faltblatt, bestehend aus sieben β -Strängen, welches auf beiden Seiten von jeweils drei α -Helices umgeben ist, und zeigt damit strukturelle Ähnlichkeit zu Proteinen mit der sogenannten Makrodomänen-Faltung (engl.: *macrodomain*).

Die Bezeichnung “Makrodomäne“ geht zurück auf die Histon-Variante mH2A. Neben den fünf Histontypen H1, H2A, H2B, H3 und H4, welche für die Verpackung der DNA im Chromatin zuständig sind, wurden zahlreiche Histon-Varianten identifiziert. Diese Proteine besitzen eine zentrale Domäne, die den genannten fünf Histontypen ähnelt, jedoch weisen sie Unterschiede in den N- und C-Termini auf. Die größte Histon-Variante stellt das mH2A dar (m = makro). Der aminoterminal Bereich von mH2A ähnelt in seiner Sequenz dem Histon H2A. Zusätzlich besitzt dieses Protein jedoch eine weitere Domäne (Nicht-Histon-Domäne, ~25 kDa; Ladurner, 2003), die etwa zwei Drittel des gesamten Proteins einnimmt (Abbildung 1.8b). Die Histon-Variante mH2A kommt aufgrund alternativen Splicings in zwei Isoformen vor, mH2A1.1 und mH2A1.2, und ist vermutlich in der Gen-Repression und Proliferation involviert. Die Makrodomänen der beiden Isoformen unterscheiden sich in der Fähigkeit, Metabolite des NAD^+ zu binden. Die mH2A1.1-Makrodomäne ist z.B. in der Lage, ADP-Ribose zu binden, die mH2A1.2-Makrodomäne nicht (Kustatscher *et al.*, 2005).

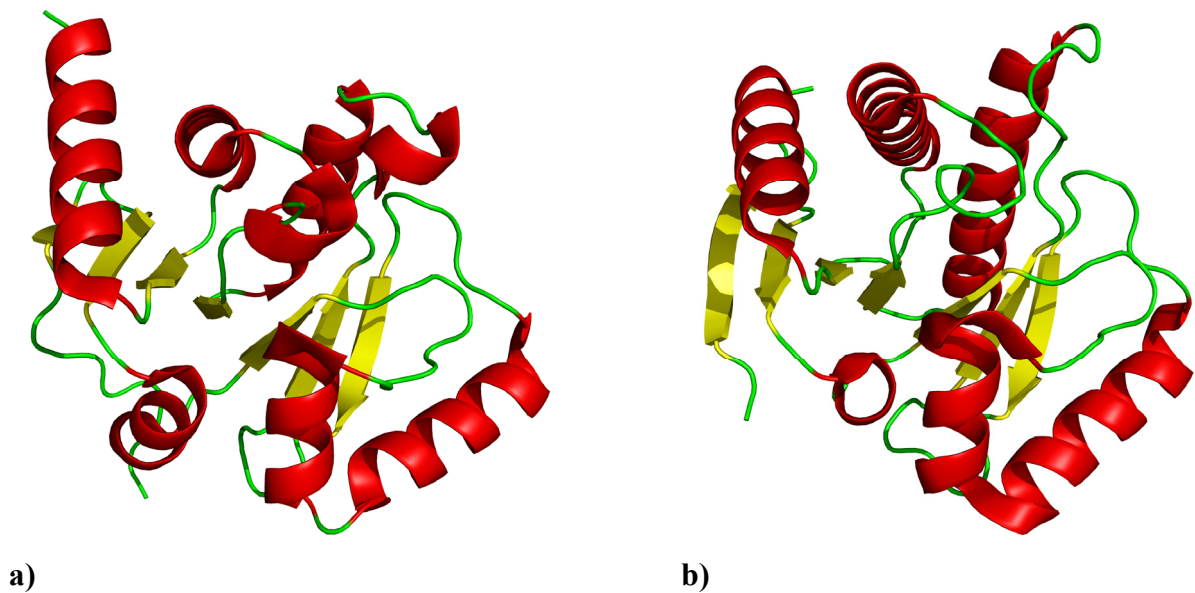


Abbildung 1.8: a) Struktur der Nsp3 X-Domäne des SARS-CoV (PDB 2ACF; Saikatendu *et al.*, 2005); b) Struktur der mH2A1.1-Makrodomäne (PDB 2FXK; Kustatscher *et al.*, 2005). Die β -Stränge sind gelb, die α -Helices rot und die Loops grün dargestellt.

Die Makrodomänen-Faltung bezeichnet grundlegend ein zentrales β -Faltblatt eingebettet zwischen drei α -Helices auf jeder Seite. Makrodomänen sind weit verbreitet. Sie sind sie in einer Vielzahl von Proteinen von Archaea, Bakterien und Eukaryonten (Pehrson & Fuji, 1998) zu finden und kommen dabei als einzelne Domäne oder in mehreren Kopien vor (Allen *et al.*, 2003). Beispiele sind das Protein AF1521 aus *Archaeoglobus fulgidus* (PDB 1HJZ; Allen *et al.*, 2003), für welches auch schon eine Aktivität als ADP-Ribose-1“-Monophosphatase gezeigt wurde (Abschnitt 1.5.1). Auch die Struktur des Proteins YMX7 aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (PDB 1NJR; Kumaran *et al.*, 2005) zeigt eine Makrodomänen-Faltung, die ADRP-Aktivität konnte jedoch noch nicht experimentell bestätigt werden. Für das Protein AF1521 (PDB 2BFQ; Karras *et al.*, 2005), das Protein YMX7 (PDB 1TXZ; Kumaran *et al.*, 2005) und die Nsp3 X-Domäne des SARS-CoV (PDB 2FAV; Egloff *et al.*, 2006) konnte die Kristallstruktur auch im Komplex mit ADP-Ribose bestimmt werden (Abbildung 1.9), dem Produkt der vermeintlichen ADRP-Aktivität. Eine genaue Beschreibung der Bindung des Liganden erfolgt im Ergebnis- und Diskussionsteil (Kapitel 3).

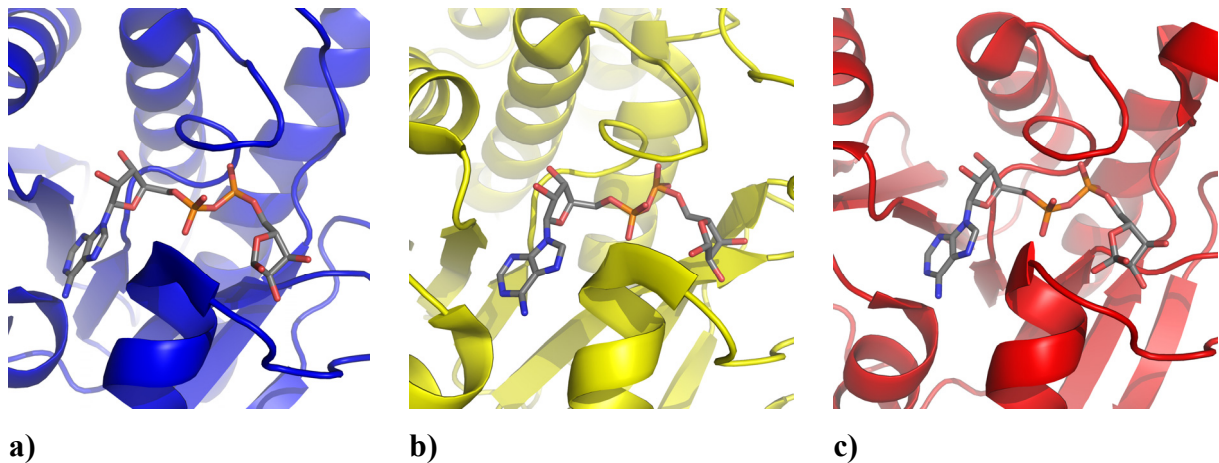


Abbildung 1.9: Struktur verschiedener Makrodomänen-Proteine im Komplex mit ADP-Ribose. a) AF1521 aus *Archaeoglobus fulgidus* (PDB 2BFQ; Karras *et al.*, 2005); b) YMX7 aus *Saccharomyces cerevisiae* (PDB 1TXZ; Kumaran *et al.*, 2005); c) Nsp3 X-Domäne von SARS-CoV (PDB 2FAV; Egloff *et al.*, 2006). Stab-Darstellung des Liganden: C-Atome sind grau, O-Atome sind rot, N-Atome sind blau, P-Atome sind orange dargestellt.

Makrodomänen werden unter anderem in Verbindung mit der Poly-(ADP-Ribosyl)ierung durch Poly-(ADP-Ribose-)Polymerasen gebracht (Hassa *et al.*, 2006). Poly-(ADP-Ribosyl)ierung wird hauptsächlich in Eukaryonten gefunden. Das am besten charakterisierte Protein ist die Poly(ADP-Ribose-)Polymerase 1 (PARP-1). Die Aktivität der PARP-1 umfasst die Spaltung von NAD^+ , die Übertragung des resultierenden ADP-Ribosyl-Restes auf ein Akzeptorprotein (auf einen Glu- oder Asp-Rest) sowie die Verlängerung der Poly(ADP-Ribose-)Kette an der 2'-Position der vorherigen ADP-Ribose-Einheit und die Verzweigung der Kette (ca. alle 20-25 Einheiten) an der 3"-Position (Kameshita *et al.*, 1984; Ziegler, 2000). PARP-1 ist an der Regulation von Prozessen wie z.B. der Transkription, der Gen-Expression und der Apoptose beteiligt. Die Übertragung von nur einer ADP-Ribose-Einheit erfolgt u.a. durch bakterielle Toxine. Ein Beispiel ist das Diphtherietoxin, ein Exotoxin aus *Corynebacterium diphtheriae*, welches den ADP-Ribosyl-Rest des NAD^+ auf einen modifizierten His-Rest (Diphthamid) des Elongationsfaktors 2 (eEF-2) überträgt. Dadurch kommt die Translation und somit die Proteinbiosynthese zum Erliegen (Collier, 1975; Ziegler, 2000). Für die SARS-CoV X-Domäne und das Protein AF1521 konnte bereits eine Bindung an Poly-(ADP-Ribose) gezeigt werden (Karras *et al.*, 2005; Egloff *et al.*, 2006).

Die bisherigen Erkenntnisse lassen vermuten, dass die X-Domäne des Nsp3 eher an Virus-Wirt-Interaktionen als direkt an der Replikation/Transkription des viralen Genoms beteiligt ist.

1.6 Zielsetzung

Coronaviren sind bei Mensch und Tier weit verbreitet. Während sie bei Tieren schon lange als Ursache lebensbedrohlicher Krankheiten bekannt sind, führt beim Menschen eine Infektion mit humanen Coronaviren meist nur zu relativ harmlosen Erkrankungen der oberen und unteren Atemwege. Der Ausbruch des schweren akuten respiratorischen Syndroms Ende des Jahres 2002 in China, verursacht durch SARS-CoV, zeigte jedoch, dass Coronaviren auch für den Menschen eine letale Bedrohung darstellen können. Um eine neue Coronavirus-Epidemie zu vermeiden und auch die ökonomischen Schäden durch Coronavirus-Infektionen bei Nutztieren zu reduzieren, sind antivirale Wirkstoffe dringend notwendig.

Das Nsp3 ist das größte Spaltprodukt der Polyproteine 1a und 1ab. Die Papain-ähnlichen Proteasen dieses Multi-Domänen-Proteins konnten bereits gut charakterisiert werden. Der X-Domäne des Nsp3 konnte zwar eine Aktivität als ADRP zugeordnet werden, jedoch ist die Funktion dieser für das Coronavirus noch nicht klar. Des Weiteren zeigt die Kristallstruktur der X-Domäne von SARS-CoV eine Makrodomänen-Faltung (Saikatendu *et al.*, 2005), wie sie auch bei Proteinen aus Pro- und Eukaryonten zu finden ist. Die genaue Funktion ist hier ebenfalls unbekannt. Dies macht die coronavirale X-Domäne zu einem interessanten Forschungsprojekt.

Ziel dieser Arbeit war die Strukturaufklärung der Nsp3 X-Domäne von HCoV-NL63, HCoV-229E und IBV durch Röntgenkristallographie. Durch systematische Analyse der Strukturen sollten Gemeinsamkeiten und Unterschiede der X-Domäne von Coronaviren der Gruppe 1 (HCoV-NL63, HCoV-229E), der Gruppe 2 (SARS-CoV, Saikatendu *et al.*, 2005; Egloff *et al.*, 2006) und der Gruppe 3 (IBV) aufgezeigt werden. Ein Vergleich zu strukturell ähnlichen Proteinen aus Pro- und Eukaryonten sollte ebenfalls durchgeführt werden. Biochemische Untersuchungen sollten Informationen über die Interaktion der coronaviralen X-Domäne mit ADP-Ribose und die ADRP-Aktivität liefern. Zusätzlich sollten weitere mögliche Interaktionspartner identifiziert werden. Mögliche Komplexstrukturen sollten die Interaktionen der X-Domäne mit dem Liganden strukturell charakterisieren.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Oligonukleotide, Plasmide und *Escherichia coli*-Stämme

Die verwendeten Oligonukleotide, Plasmide und *Escherichia coli*-Stämme sind in Tabelle 2.1, 2.2 bzw. 2.3 aufgelistet. Alle Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Martinsried) bezogen.

Tabelle 2.1: Verwendete Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
<i>Primer für die Klonierung von nsp3-X in pGEX-6P-1</i>	
nsp3_forward	CCC TGG GGA TCC AAA CCT TTT GCT GTA TAT AAA
nsp3_reverse	CCC GGC GAA TTC TTA ATC TAA ACC ATC TAA AAA
<i>Oligonukleotide für die Zonen-Interferenz-Gelelektrophorese (ZIGE)</i>	
ssDNA	
1 (54mer)	AAA TTG GGA TCC AGT GGT CTT AAG AAA ATG GTA AAC CCA TCT GGT TGT GTT GAG
2 (27mer)	CTA TTG TAA ATT AGT TTC AAT AAA AAT
3 (42mer)	CCC TTC GAA TTC TCT GGT CTT CGC AAG ATG GCA CAA CCA TCT
4 (28mer)	CAC CAG TCT TGA AAA TAT AGC ATT TAA T
5 (27mer)	CTA CTG CAA CTG TGG ATA AAA AGT GGA
6 (39mer)	CCC TTG GAA TTC TCA TTG TAA ATT AGT TTC AAT AAA AAT
7 (36mer)	CTA TTT AGT TGA GAC TAA ATG ATT ACT AAA ACC ACC
8 (36mer)	GGG CCC CTG GGA TCC TCT GGT CTT AAG AAA ATG GCA
9 (36mer)	GGG CCC GGA TCC TCT AGC CAG GTT TGT GGC TTG TTT
10 (28mer)	CAC CTC TAG CCA GGT TTG TGG CTT GTT T
dsDNA	
11mer	GAC AGG ATG TG
16mer	CCG AAA AGG TCA TGC G
24mer	AGG CCC GAA AAG GTC ATG CGA CAT
30mer	ACGGCAGGCCCGAAAAGGTCATGCGACATA

Tabelle 2.2: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Kurzbeschreibung	Hersteller
pENTR TM /D-TOPO [®]	- <i>attL1</i> - und <i>attL2</i> -Sequenz (engl.: <i>attachment</i>) - TOPO [®] -Erkennungssequenzen - Kanamycin-Resistenzgen	Invitrogen (Karlsruhe)
pEXP1-DEST TM	- <i>attR1</i> - und <i>attR2</i> -Sequenz - Sequenz kodierend für N-terminalen His ₆ -Tag, inkl. Enterokinase-Spaltstelle - Ampicillin-Resistenzgen	Invitrogen (Karlsruhe)
pGEX-DEST7	- <i>attR1</i> - und <i>attR2</i> -Sequenz - Sequenz kodierend für N-terminalen GST-Tag, inkl. PreScission-Protease-Spaltstelle - Ampicillin-Resistenzgen	*
pGEX-6P-1	- Sequenz kodierend für N-terminalen GST-Tag, inkl. PreScission-Protease-Spaltstelle - Ampicillin-Resistenzgen	eigene Plasmidsammlung
pET-M11	- Sequenz kodierend für N-terminalen His ₆ -Tag, inkl. TEV-Protease-Spaltstelle - Kanamycin-Resistenzgen	*

* Das Plasmid pGEX-DEST7 wurde von Silke Schmidtke unter Anleitung von PD Dr. Ralf Moll im Institut für Biochemie konstruiert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Das Plasmid pET-M11 mit dem Insert kodierend für die X-Domäne des HCoV-229E bzw. des IBV wurde von Prof. Dr. Eric J. Snijder (Molecular Virology, Department of Medical Microbiology, Center of Infectious Diseases, Leiden University Medical Center, Leiden, Netherlands) im Rahmen des VIZIER-Projektes zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2.3: Verwendete *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Hersteller
<i>One Shot</i> [®] TOP10 chemisch kompetente <i>E. coli</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
DH5α	eigene Stammsammlung
BL21 (DE3) Gold	eigene Stammsammlung
BL21 (DE3) pLysS	eigene Stammsammlung
BL21 (DE3)	Novagen (Darmstadt)
Tuner (DE3) pLacI	Novagen (Darmstadt)

2.1.2 Nährmedien und Antibiotika

S.O.C.-Medium (Invitrogen, Karlsruhe)

2 % (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂,
10 mM MgSO₄, 20 mM Glukose

1x TY

15,5 g 2x TY-Broth (Invitrogen, Karlsruhe), *ad* 1 l *Aqua dest.*; autoklaviert (20 min, 121 °C)

LB-Medium (Luria Bertani-Medium)

0,5% (m/v) Hefeextrakt, 1% (m/v) Trypton, 1% (m/v) NaCl in *Aqua dest.*; autoklaviert
(20 min, 121 °C)

1x TY-Agarplatten

15,5 g 2x TY-Broth (Invitrogen, Karlsruhe), 16 g Agar Agar, *ad* 1 l *Aqua dest.*;
autoklaviert (20 min, 121 °C)

Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml)

1 g Ampicillin, 5 ml *Aqua dest.*, 5 ml Glycerin (99,5%); steril filtriert; Lagerung bei –20 °C; Endkonzentration: 100 µg/ml Nährmedium

Kanamycin-Stammlösung (50 mg/ml)

0,5 g Kanamycin, 5 ml *Aqua dest.*, 5 ml Glycerin (99,5%); steril filtriert; Lagerung bei –20 °C; Endkonzentration: 50 µg/ml Nährmedium

Chloramphenicol-Stammlösung (34 mg/ml)

340 mg Chloramphenicol, 10 ml Ethanol; steril filtriert, Lagerung bei –20 °C;
Endkonzentration: 34 µg/ml Nährmedium

2.1.3 Puffer und Lösungen

Elektrophoresen

Agarosegelelektrophorese

0,7–1,5%iges Agarosegel

0,7-1,5% (m/v) Agarose, in 1x TAE-Puffer; in der Mikrowelle erhitzt

Agarosegelprobenpuffer “dünn”

5% (v/v) Glycerin, 0,125 mM EDTA, in 1x TAE-Puffer, Spatelspitze

Bromphenolblau (für ca. 10 ml)

Agarosegelprobenpuffer “dick“

50% (v/v) Glycerin, 0,125 mM EDTA, in 1x TAE-Puffer, Spatelspitze

Bromphenolblau (für ca. 10 ml)

TAE-Puffer (10x)

400 mM Tris pH 8,4, 400 mM Essigsäure, 20 mM EDTA

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Laemmli A

30% (w/v) Acrylamid-, Bisacrylamid-Lösung im Verhältnis 37,5:1

Laemmli B

18,15 g Tris, *ad* 100 ml *Aqua dest.*, pH 8,8 mit HCl

Laemmli C

10 g SDS, *ad* 100 ml *Aqua dest.*

Laemmli D

3 g Tris, *ad* 50 ml *Aqua dest.*, pH 6,8 mit HCl

0,1% (w/v) SDS-Lösung

100 mg SDS, *ad* 100 ml *Aqua dest.*

2x Laemmli-Probenpuffer

1,5 ml Laemmli D, 2 ml Laemmli C, 2 ml Glycerol 87% (w/v), 3,1 ml *Aqua dest.*,

0,2 ml Bromphenolblau 1% (w/v), kurz vor Verwendung Zugabe von 1/10 (v/v) β -Mercaptoethanol

Minigel-Laufpuffer

1 g SDS, 3 g Tris, 14,4 g Glycin, *ad* 1 l *Aqua dest.*

Coomassie-Färbelösung

0,01% (w/v) Brilliant Blue R 250, 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure

Coomassie-Entfärbelösung

40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure

Western-Blot

2x Blotpuffer

28,8 g Glycin, 6 g Tris, 0,75 g SDS, *ad* 1 l *Aqua dest.*

Benutzungsverdünnung

1x Blotpuffer inkl. 20% (v/v) Methanol

Ponceau S-Lösung

0,2% (w/v) Ponceau S, 0,3% (w/v) Trichloressigsäure

TBS-Puffer

10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5

Blocking-Puffer

3% (w/v) BSA in TBS-Puffer

TBS-Tween/Triton-Puffer

20 mM Tris pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20, 0,2% (v/v) Triton-X-100

Puffer A

100 mM Tris pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂

BCIP-Stammlösung

25 mg/ml in DMF

NBT-Stammlösung

50 mg/ml in 70% (v/v) DMF

Färbelösung

10 ml Puffer A, 44 µl NBT-Stammlösung, 33 µl BCIP-Stammlösung

Zonen-Interferenz-Gelelektrophorese

1%iges Agarosegel

0,4 g Agarose in 40 ml 1x TBE, pH 8,3; in der Mikrowelle erhitzt

Probenpuffer

100% (v/v) DMSO, Spatelspitze Bromphenolblau (für 10 ml)

TBE-Puffer (1x)

1,08 g Tris, 0,55 g Borsäure, 0,093 g EDTA, *ad* 100 ml *Aqua dest.*, pH 8,3

Denaturierungslösung

3,5% (w/v) α -Sulfosalicylsäure, 10% (w/v) Trichloressigsäure

Waschlösung, Coomassie-Entfärbelösung

8% (v/v) Essigsäure, 15% (v/v) Ethanol

Coomassie-Färbelösung

0,25% (w/v) Brilliant Blue R 250, 15% (v/v) Ethanol, 8% (v/v) Essigsäure, 10% (v/v) Methanol

ProteinreinigungLöslichkeitstest

GST-Fusionsprotein Grundpuffer 1

50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0

GST-Fusionsprotein Grundpuffer 2

1x PBS-Puffer (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,3)

N-terminaler His₆-Tag Grundpuffer 1

50 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 8,0

N-terminaler His₆-Tag Grundpuffer 2

20 mM Natriumphosphat, 500 mM NaCl, pH 7,4

Zusätze

1% (v/v) Tween 20; 1% (v/v) Triton X-100; 2 mM EDTA; 10% (v/v) Glycerol; 5 mM DTT; 0,1% (v/v) n-Octyl-β-D-glykopyranosid (OG); 0,17 mM Dodecylmaltosid

HCoV-NL63 Nsp3-X bzw. Nsp3-Xst (NL63-X bzw. NL63-Xst)

Lysepuffer

1x PBS-Puffer (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,3), 1% (v/v) Triton X-100

1x PBS-Puffer

140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,3

Spaltpuffer PreScission-Protease

50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,5

Elutionspuffer GST-Affinitätschromatographie

50 mM Tris, 20 mM L-Glutathion reduziert, pH 8,0

Waschpuffer/Elutionspuffer Ionenaustauschchromatographie

20 mM Bis-Tris, 20 mM NaCl/1 M NaCl, 1 mM DTT, pH 6,8

Größenausschlussfiltration

10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,5

HCoV-229E Nsp3-X (229E-X)

Lysepuffer

50 mM Tris, 300 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, pH 8,0

Waschpuffer/Elutionspuffer Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

50 mM Tris, 300 mM NaCl, 20 mM/500 mM Imidazol, 10% (v/v) Glycerol, pH 8,0

Größenausschlussfiltration

10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,5

IBV Nsp3-X (IBV-X)

Lysepuffer

50 mM Tris, 300 mM NaCl, 0,25% (v/v) Triton X-100, pH 8,0

Waschpuffer/Elutionspuffer Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

50 mM Tris, 300 mM NaCl, 20 mM/500 mM Imidazol, pH 8,0

Größenausschlussfiltration

10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,5

PreScission Protease

1x PBS-Puffer GST-Affinitätschromatographie

140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,3

Elutionspuffer GST-Affinitätschromatographie

50 mM Tris, 20 mM Glutathion reduziert, pH 8,0

Dialysepuffer/Spaltpuffer

50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7,5

TEV-Protease

Lysepuffer

50 mM Tris, 200 mM NaCl, 40 µg DNase I

Waschpuffer 1/ Waschpuffer 2 Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

50 mM Tris, 300 mM NaCl, 1 mM β-Mercaptoethanol, 20% (v/v) Glycerol, 20 mM/

50 mM Imidazol

Elutionspuffer Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

50 mM Tris, 300 mM NaCl, 1 mM β-Mercaptoethanol, 20% (v/v) Glycerol, 300 mM Imidazol

Lagerungspuffer

50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 50% (v/v) Glycerol, pH 8,0

Spaltpuffer TEV-Protease

50 mM Tris, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 8,0

Sonstige Puffer und Lösungen

Restriktionsverdau

TE-Puffer

10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0

2.1.4 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die Chemikalien bzw. Biochemikalien wurden bezogen von Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Promega (Mannheim), Fermentas (St. Leon-Rot) und Gerbu (Gaiberg). Spezielle Chemikalien bzw. Biochemikalien sind in Tabelle 2.4 und Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 2.5 aufgelistet.

Tabelle 2.4: Spezielle Chemikalien bzw. Biochemikalien.

Chemikalie bzw. Biochemikalie	Hersteller
Acetophenon	Merck (Darmstadt)
ADP-Ribose (ADPR)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Antibiotika	
Ampicillin	Gerbu (Gaiberg)
Chloramphenicol	Gerbu (Gaiberg)
Kanamycin	Gerbu (Gaiberg)
Antikörper	
Anti-Maus-IgG-Alkalische Phosphatase Konjugat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Tetra-His-Antikörper	Qiagen (Hilden)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt)
Dithiothreitol (DTT)	Gerbu (Gaiberg)
Dodecylmaltosid 99%	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ethylenglykol 99,8%	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
L-Glutathion, reduziert 99%	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Glycerol 99,5%	Gerbu (Gaiberg)
Hefeextrakt	BD (Heidelberg)
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Gerbu (Gaiberg)
Lysozym	Gerbu (Gaiberg)
2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD)	Fluka (Buchs, Schweiz)

Chemikalie bzw. Biochemikalie	Hersteller
β -NAD ⁺	Fermentas (St. Leon-Rot)
NADH	Roche (Karlsruhe)
NADP ⁺	Roche (Karlsruhe)
Nitroblau-Tetrazoliumsaz (NBT)	Gerbü (Gaiberg)
n-Octyl- β -D-glykopyranosid (OG)	Bachem (Bubendorf, Schweiz)
Polyethylenglykol (PEG)	Fluka (Buchs, Schweiz), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Serva (Heidelberg)
Ponceau S	Serva (Heidelberg)
Triton X-100	Gerbü (Gaiberg)
tRNA aus <i>E. coli</i> MRE 600	Roche (Mannheim)
Tween 20	Serva (Heidelberg)

Tabelle 2.5: Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Amicon-Rührzelle, Modell 8003 und 8010	Millipore (Schwalbach)
Chromatographische Säulen	
HisTrap™ FF 5 ml	GE Healthcare (München)
GSTrap™ FF 5 ml	GE Healthcare (München)
HiTrap QF 1 ml	GE Healthcare (München)
HiLoad™ 16/60 Superdex™ 75 prep grade	GE Healthcare (München)
Cryo-Loops	Hampton Research (Laguna Niguel, USA)
Crystal Clear Sealing Tape (Duck™)	Henkel (Düsseldorf)
Crystallization Basic and Extension Kit for Proteins	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Deckgläschen, Ø 12 mm und 22 mm	Hampton Research (Laguna Niguel, USA)
Dialyseschläuche Spectra/Por®	Spectrum Laboratories (Rancho Dominguez, USA)
Gel-Blotting Papier	Schleicher & Schuell (Dassel)
Kits	
QIAprep Spin Plasmid Kit	Qiagen (Hilden)
Wizard® Clean-Up System	Promega (Mannheim)
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega (Mannheim)

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Kristallisationsplatten	
sitzender Tropfen (24er Well-Format)	Hampton Research (Laguna Niguel, USA)
hängender Tropfen (48er Well-Format)	Hampton Research (Laguna Niguel, USA)
96-Well Intelli-Plate	Art Robbins Instruments (Sunnyvale, USA)
Nitrocellulose-Transfer-Membran	Schleicher & Schuell (Dassel)
Sterilfilter Filtropur S, Ø 0,2 µm und 0,45 µm	Sarstedt (Nümbrecht)
Ultrafiltrationsmembran für Amicon-Rührzelle, Typen: PLBC 3000, PLCC 5000 (Ø 25 mm)	Millipore (Schwalbach)
UV-Küvetten	Sarstedt (Nümbrecht)
UVetten	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)

2.1.5 Geräte

Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 2.6 aufgelistet.

Tabelle 2.6: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
ÄKTAprime™ plus	GE Healthcare (Freiburg)
Agarosegel-Laufapparatur	
Mini-Sub® Cell GT	Bio-Rad (München)
Wide Mini-Sub® Cell GT	Bio-Rad (München)
Filteranlage Simplicity 185	Millipore (Schwalbach)
Inkubator innova 4230	New Brunswick Scientific (Edison, USA)
Laborwaage und Analysenwaage	Sartorius (Göttingen)
Mighty Small SE 245 Dual Gel Caster	Hoefer (San Francisco, USA)
Mighty Small II SE 250 Elektrophorese-Kammer	Hoefer (San Francisco, USA)
Mikroskop SZX12	Olympus (Tokio, Japan)
Peristaltikpumpe Econo Pump	Bio-Rad (München)
pH-Meter Titrator TR156	Schott Geräte (Hofheim)

Gerät	Hersteller
Phoenix-Roboter	Art Robbins Instruments (Sunnyvale, USA)
Röntgendiffraktometrie	
Cryostream Cooler	Oxford Cryosystems (Oxford, UK)
Xcalibur PX Ultra	Oxford Diffraction (Abingdon, UK)
Sterilbank	Nuaire (Plymouth, USA)
Thermocycler T Gradient	Biometra (Göttingen)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Trockenschrank	Thermo Scientific (Waltham, USA)
UV/VIS-Spektrophotometer	
Cary 50 Conc	Varian (Palo Alto, USA)
Ultraspec 3100 pro	GE Healthcare (Freiburg)
Varioklav	H+P Labortechnik (Oberschleißheim)
VP-ITC Instrument	Microcal, (Milton Keynes, UK)
Western-Blot Semi-Phor™	Hoefer (San Francisco, USA)
Zellaufschluss	
French® Pressure Cell Press	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Sonifier Cell Disruptor B15	Branson (Danbury, USA)
Zentrifugen	
Biofuge Fresco	Heraeus (Hanau)
RC-5B plus Zentrifuge	DuPont Sorvall (Newton, USA)
Ultrazentrifuge Centrikon T-2070	Kontron (Zürich, Schweiz)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Klonierung mit dem Gateway®-System von Invitrogen (Karlsruhe)

Im ersten Schritt wurde in der TOPO®-Reaktion das zu exprimierende Gen in den linearisierten Vektor pENTR™/D-TOPO® kloniert (pENTR™/D-TOPO® *Cloning Kit*). Dieser ist an den Enden über eine kovalente Bindung des 3'-Phosphatrestes mit dem Tyrosylrest (Tyr274) der Topoisomerase I des *Vaccinia*-Virus verknüpft. Das Gen wurde durch Angriff der Phospho-Tyrosyl-Bindung in den Vektor eingebaut. Die vier zusätzlichen Basen (CACC) am 5'-Ende des Gens sollten den Einbau dessen in der korrekten Orientierung gewährleisten.

Für die Klonierung des Gens mit CACC-Überhang am 5'-Ende in den pENTR™/D-TOPO®-Vektor wurde folgender Ansatz pipettiert:

DNA (CACC-Überhang am 5'-Ende)	0,5-4 µl (2-15 ng)
Salzlösung	1 µl
<i>Aqua dest.</i>	<i>ad</i> 5 µl
pENTR™/D-TOPO®	1 µl

Der Ansatz wurde vorsichtig vermischt, 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Vom Ansatz der TOPO®-Klonierungsreaktion wurden 2 µl in 50 µl *One Shot*® TOP10 chemisch kompetente *E. coli*-Zellen gegeben und dieser Ansatz für 25 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 30 s. Es folgte die Zugabe von 250 µl S.O.C.-Medium und die Inkubation für 1 h bei 37 °C und 200 rpm. Auf vorgewärmte (37 °C) 1x TY/Kanamycin (Km)-Agarplatten wurden 80 bzw. 160 µl der Zellkultur ausplattiert und die Platten über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Von mehreren Klonen wurde jeweils eine Übernachtskultur angesetzt (Abschnitt 2.2.2.1) und am nächsten Tag eine Plasmidisolierung vorgenommen (Abschnitt 2.2.1.9). Zur Überprüfung des Einbaus des Gens in den Vektor wurde anschließend eine Restriktionsanalyse mit der Endonuklease *HincII* (Abschnitt 2.2.1.3) und zur Auftrennung der Fragmente eine Agarosegelelektrophorese (Abschnitt 2.2.1.10) durchgeführt. Konstrukte, die nach der Restriktionsanalyse im Agarosegel die richtigen Fragmentgrößen zeigten, wurden für die folgende LR-Rekombinationsreaktion (Clonase-Reaktion) eingesetzt.

Ausgangspunkt für die LR-Rekombinationsreaktion war das Konstrukt aus der TOPO®-Klonierungsreaktion (*entry clone*). Es erfolgte eine enzymkatalysierte Rekombinationsreaktion zwischen den *attL*-Sequenzen des pENTR™/D-TOPO® und den *attR*-Sequenzen des Expressionsvektors. Zur Erzeugung eines Expressionskonstruktes wurde folgender Ansatz bei RT pipettiert und gemischt:

<i>entry clone</i> (150 ng/µl)	2 µl
Expressionsvektor (150 ng/µl)	2 µl
5x LR Clonase™-Reaktionspuffer	4 µl
TE-Puffer	8 µl

Nach Zugabe von 4 µl Gateway® LR Clonase™-Enzymmix wurde der Ansatz erneut vorsichtig gemischt und für 1 h bei 25 °C inkubiert. Durch Zugabe von 2 µl Proteinase K und Inkubation für 10 min bei 37 °C wurde die LR-Rekombinationsreaktion gestoppt. Für die Transformation wurde vom Ansatz der LR-Rekombinationsreaktion 1 µl in 50 µl chemisch kompetente *E. coli* DH5α-Zellen pipettiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzschock erfolgte bei 42 °C für 30 s. Nach Zugabe von 450 µl S.O.C.-Medium wurde die Zellkultur für 1 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Auf vorgewärmte (37 °C) 1x TY-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum wurden 20 bzw. 100 µl der Zellkultur ausplattiert und die Platten über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Von mehreren Klonen wurde jeweils eine Übernachtskultur für die Plasmidisolierung (Abschnitt 2.2.2.1 und 2.2.1.9) angesetzt. Der korrekte Einbau des Gens in den Expressionsvektor wurde zunächst durch Restriktionsanalyse mit den Endonukleasen *NdeI* und *HincII* (Abschnitt 2.2.1.3) und anschließender Agarosegelelektrophorese (Abschnitt 2.2.1.10) überprüft. Konstrukte mit übereinstimmendem Fragmentmuster im Agarosegel wurden zur Sequenzierung bei MWG Biotech (Martinsried) eingeschickt.

2.2.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die PCR wurde die AccuPrime™ *Pfx* DNA-Polymerase und der AccuPrime™ *Pfx*-Reaktionsmix von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Es wurde folgender Ansatz pipettiert und das in Tabelle 2.7 dargestellte Temperaturprogramm verwendet:

Primer <i>forward</i>	0,3 µM
Primer <i>reverse</i>	0,3 µM
DNA	20-50 ng
AccuPrime™ <i>Pfx</i> Reaktionsmix (10x)	5 µl
AccuPrime™ <i>Pfx</i> DNA-Polymerase (2,5 U/µl)	0,5 µl
<i>Aqua dest.</i>	<i>ad</i> 50 µl

Tabelle 2.7: Temperaturprogramm für die PCR.

Schritt	Denaturierung	Annealing	Extension
1	95 °C, 2 min		
2 (29 x)	95 °C, 20 s	58 °C, 30 s	68 °C, 1 min
3	95 °C, 1 min 30 s	58 °C, 50 s	68 °C, 2 min

Die PCR wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft und der Ansatz mit dem Wizard[®] SV *Gel and PCR Clean-Up System* von Promega aufgereinigt (Abschnitt 2.2.1.7).

2.2.1.3 Restriktionsverdau

Für den Verdau wurde folgender Ansatz pipettiert:

Reaktionspuffer (10x)	2 µl
Restriktionsendonuklease	10 U
DNA	1 µg
<i>Aqua dest.</i>	<i>ad 20 µl</i>

Bei einem Doppelverdau wurde jede Restriktionsendonuklease mit 10 Units (U) eingesetzt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Restriktionsendonukleasen wurden von Fermentas (St. Leon-Rot) und die Reaktionspuffer von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Erfolgte der Restriktionsverdau zur Analyse von Klonen (richtiger Einbau der DNA in den Vektor) wurde anschließend eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Wurde der Restriktionsverdau als Teilschritt der traditionellen Klonierung verwendet, schlossen sich nach der Inkubation die Hitzeinaktivierung der Restriktionsendonuklease bei 65 °C für 15 min und die Aufreinigung mit dem Wizard[®] *DNA Clean-Up System* von Promega (Mannheim, Abschnitt 2.2.1.8) an.

2.2.1.4 Ligation

Für die Ligation von DNA in den entsprechenden Vektor wurde das *Rapid DNA Ligation Kit* von Roche (Mannheim) verwendet. Folgender Ansatz wurde pipettiert:

Vektor:Insert	1:5 (molares Verhältnis, ≤ 200 ng)
<i>Aqua dest.</i>	<i>ad</i> 8 μ l
DNA Dilution Buffer (5x)	2 μ l
T4 DNA Ligation Buffer (2x)	10 μ l
T4 DNA Ligase (5 U/ μ l)	1 μ l

Der Ansatz wurde für 30 min bei RT inkubiert und anschließend in chemisch kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert (Abschnitt 2.2.1.5).

2.2.1.5 Transformation in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen

100 ng Plasmid-DNA wurden mit 200 μ l chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen (Abschnitt 2.2.2.2) gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden einem Hitzeschock bei 42 °C für 30-45 s unterzogen und anschließend erfolgte die Zugabe von 2 ml 1x TY-Medium, welchem 100 mM MgCl₂ und 250 mM Glukose zugesetzt waren. Es wurde 1 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Die Kultur wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 16000 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 100 μ l Medium resuspendiert und auf 1x TY-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.6 Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen von Novagen

100 ng Plasmid-DNA wurden mit 20 μ l kompetente *E. coli*-Zellen gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 30 s erfolgte die Zugabe von 80 μ l S.O.C.-Medium. Die Kultur wurde 1 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Anschließend wurden die 100 μ l Kultur auf 1x TY-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.7 Aufreinigung mit dem Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System

Zu der aufzureinigenden DNA-Lösung wurde ein gleiches Volumen an Membranbindepuffer gegeben. Diese Lösung wurde in eine SV-Minisäule, die auf einem Reaktionsgefäß aufgesteckt war, überführt und für 1 min bei RT inkubiert. Es wurde für 1 min bei 16000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurde die Säule mit 700 μ l Membranwaschlösung gewaschen. Nach Zentrifugation (1 min, 16000 x g) wurde

erneut der Durchlauf verworfen und der Waschschrift mit 500 µl Membranwaschlösung und Zentrifugation für 5 min bei 16000 x g wiederholt. Der Durchlauf wurde verworfen und erneut für 1 min bei 16000 x g zentrifugiert. Die SV-Minisäule wurde auf ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesteckt. Durch Zugabe von 50 µl Nuklease-freiem Wasser, Inkubation für 1 min bei RT und Zentrifugation für 1 min bei 16000 x g wurde die aufgereinigte DNA eluiert und konnte bei -20 °C gelagert werden.

2.2.1.8 Aufreinigung mit dem Wizard® Clean-Up System

Zur Aufreinigung wurde das Volumen des Restriktionsansatzes mit sterilem *Aqua dest.* auf 50 µl aufgefüllt. Danach wurden 1 ml Wizard® DNA Clean-Up Resin hinzugefügt und die Lösungen durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Mittels einer Spritze wurde die Lösung durch eine Minisäule gedrückt. Die Säule wurde auf gleiche Weise mit 2 ml 80% (v/v) Isopropanol gewaschen. Die Minisäule wurde anschließend auf ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesteckt und bei 16000 x g für 2 min zentrifugiert. Nach Überführen der Minisäule auf ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurde die DNA mit 50 µl vorgewärmten (65 °C) *Aqua dest.* durch Inkubation bei RT für 1 min und Zentrifugation bei 10000 x g für 20 s eluiert. Die aufgereinigte DNA konnte bei -20 °C gelagert werden.

2.2.1.9 Plasmidpräparation mit dem QIAprep Spin Plasmid Kit

Von der entsprechenden Übernachtskultur (Abschnitt 2.2.2.1) wurden 3 ml für 10 min bei 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Es wurden 250 µl Lysisbuffer P2 zugegeben und die Lösungen vorsichtig durch vier- bis sechsmaliges Schwenken des Reaktionsgefäßes vermischt. Danach wurden 350 µl Puffer N3 zugegeben und der Inhalt sofort, aber wiederum vorsichtig, durch vier- bis sechsmaliges Schwenken gemischt. Es wurde für 10 min bei 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine QIAprep Spin Säule überführt, die zuvor auf ein 2 ml-Reaktionsgefäß gesteckt wurde. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 1 min bei 16000 x g. Der Durchlauf wurde verworfen. Es wurden 750 µl Puffer PE auf die Säule gegeben und erneut für 1 min bei 16000 x g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und wiederum wurde für 1 min bei 16000 x g zentrifugiert. Nachdem die Säule auf ein neues Reaktionsgefäß gesteckt worden ist, erfolgte die Zugabe von 50 µl sterilem, destilliertem Wasser. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 1 min wurde 1 min bei 16000 x g zentrifugiert. Der Durchlauf enthielt die Plasmid-DNA, die bei -20 °C gelagert werden konnte.

2.2.1.10 Agarosegelelektrophorese

Die handwarme 0,7-1,5%ige Agaroselösung wurde mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 1 µg/ml) und in ein Flachbett mit eingesetztem Probenaschenkamm gegossen. Das polymerisierte Gel wurde mit dem Flachbett in die Elektrophoresekammer gesetzt, mit 1x TAE-Puffer überschichtet und mit den DNA-Proben (1 Volumen DNA-Lösung + 1 Volumen Auftragspuffer “dünn“ bzw. 1/10 Volumen Auftragspuffer “dick“) beladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 60 V (kleines Agarosegel [8-10 Proben]) bzw. 90 V (großes Agarosegel [10-24 Proben]) bis die Bromphenolblau-Bande das Gel durchlaufen hatte. Die Auswertung der Ethidiumbromid-gefärbten DNA-Banden erfolgte auf dem UV-Leuchttisch (254 nm). Als Längenstandard wurde der 1 kb DNA *Ladder* von *New England Biolabs* (NEB, Schwalbach) verwendet.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Übernachtskultur

Zur Anzucht von Übernachtskulturen wurden je 3 ml 1x TY-Medium in sterilen Reagenzgläsern bei Bedarf mit Antibiotikum (z.B. Ampicillin, Kanamycin) versetzt und mittels steriler Zahnstocher oder Pipettenspitzen je nach Bedarf mit Einzel- oder Mischkolonien von Agarplatten angeimpft. Anschließend wurden die Reagenzgläser über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert.

2.2.2.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurde zunächst eine Übernachtskultur des *E. coli*-Stammes mit 2 ml 1x TY-Medium, 20 mM MgCl₂ und 50 mM Glukose angesetzt (Abschnitt 2.2.2.1). Die Hauptkultur (100 ml 1x TY-Medium + 20 mM MgCl₂ + 50 mM Glukose) wurde 0,5%ig mit der Übernachtskultur angeimpft und ~3 h bei 37 °C und 150 rpm inkubiert (OD₅₄₆ ~0,4-0,5). Die Zellen wurden für 10 min auf Eis gestellt und anschließend zentrifugiert (15 min, 4 °C, 6000 x g). Das Pellet wurde vorsichtig in 50 ml TCM (10 mM Tris, 100 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂) resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 4 °C, 4300 x g) wurde das Pellet in 10 ml 80% (v/v) TCM inklusive 20% Glycerin resuspendiert, in 500 µl-Volumina aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

2.2.2.3 Optimierung der Gen-Expression

Die Kultivierung zur Optimierung der Gen-Expression erfolgte im 40 ml-Maßstab mit verschiedenen *E. coli*-Stämmen. Das Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurde 1:100 mit der Übernachtskultur (Abschnitt 2.2.2.1) angeimpft und bei 180 rpm und 37 °C inkubiert. Variiert wurden der Startpunkt der Induktion ($OD_{660} = 0,5$, $OD_{660} = 1,0$), die Temperatur während der Expression (20 °C, 37 °C) und die Zeit der Inkubation (2 h bis über Nacht). In regelmäßigen Zeitabständen wurden 1 ml-Proben genommen und für die Analyse mittels SDS-PAGE (Abschnitt 2.2.4.1) vorbereitet. Zur Vergleichbarkeit wurde das aufzutragende Probenvolumen so angepasst, dass die Proben nach Induktion den gleichen OD_{660} -Wert aufwiesen, wie die Probe, welche vor Induktion der Gen-Expression der Kultur entnommen wurde.

2.2.2.4 Gen-Expression für die präparative Proteinreinigung

Zur Expression im großen Maßstab wurde die Kultivierung in einem 5 l-Kolben mit 2 l Medium und entsprechendem Antibiotikum durchgeführt. Angeimpft wurde in einem 1:100-Verhältnis mit der Übernachtskultur (Abschnitt 2.2.2.1). Bei 120 rpm und 37 °C wurde die Kultur bis zur optimalen OD_{660} inkubiert und anschließend mit IPTG die Gen-Expression induziert. Die Parameter wie Temperatur und Inkubationszeit wurden den optimalen Bedingungen entsprechend den Beobachtungen aus der Optimierung der Gen-Expression (Abschnitt 2.2.2.3) und dem Löslichkeitstest (Abschnitt 2.2.3.3) angepasst. Die Expression wurde durch Zentrifugation (5000 x g, 15 min) beendet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in ≤ 50 ml Medium resuspendiert und in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 5200 x g für 15 min wurde erneut der Überstand verworfen und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.2.5 Gen-Expression der PreScission-Protease und der TEV-Protease

Das Plasmid pGEX-6P-1 mit dem Gen für die PreScission-Protease stammte aus der eigenen Plasmidsammlung des Instituts für Biochemie. Die Expression der PreScission-Protease als Fusionsprotein mit N-terminalem GST-Tag erfolgte in BL21 (DE3) pLysS-Zellen. Die Zellen wurden in 1x TY/Amp-Medium (37 °C, 120 rpm) bis zu einer $OD_{660} \sim 0,6$ inkubiert. Nach Induktion mit 1 mM IPTG erfolgte die Expression für 5 h bei 30 °C und 120 rpm.

Das Plasmid pET-24d(+) mit dem Gen für die TEV-Protease wurde von Dr. Arie Geerlof und Dr. Paul A. Tucker (EMBL-Hamburg) zur Verfügung gestellt. Die Expression der TEV-Protease mit N-terminalem His₆-Tag erfolgte in BL21 pLysS (DE3)-Zellen. Die Zellen wurden in LB/Km/Cm-Medium (37 °C, 170 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ ~0,6 inkubiert. Nach Induktion mit 0,2 mM IPTG erfolgte die Expression über Nacht bei 20 °C und 170 rpm.

2.2.3 Zellaufschluss und Proteinreinigung

2.2.3.1 Gesamtzelllyse

Für die Analyse der Gen-Expression wurden Gesamtzelllysate von Proben vor und nach der Induktion mit IPTG bereit. Dazu wurde das Zellpellet in 50 µl Laemmli D resuspendiert. Nach Zugabe von 25 µl 3% (w/v) SDS-Lösung (in Laemmli D) wurden die Proben für 15 min geschüttelt und anschließend für 10 min bei 95 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 16000 x g, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und mittels SDS-PAGE (Abschnitt 2.2.4.1) analysiert.

2.2.3.2 Zellaufschluss mit der French Press

Das Zellpellet einer 1 bzw. 2 l-Kultivierung wurde im entsprechenden Lysepuffer resuspendiert. Das Volumen des Lysepuffers berechnete sich wie folgt:

$$\text{Volumen Lysepuffer [l]} = \frac{\text{OD}_{660} \times \text{Volumen Kultur [l]}}{100}$$

Nach Zugabe von Lysozym (10 mg/1 l Kultivierungsvolumen) und eines Proteaseinhibitor-Cocktails (*Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail* von Roche, Mannheim; 1 Tablette/50 ml Lysepuffer) wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss unter Druck erfolgte mit der *French[®] Pressure Cell Press* bei 1300 psi und wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Der Überstand mit dem löslichen Protein wurde von den Zelltrümmern durch Ultrazentrifugation (150.000 x g, 1 h, 4 °C) getrennt. Nach Filtration (Ø 0,45 µm) konnte der Überstand für die Affinitätschromatographie verwendet werden.

2.2.3.3 Löslichkeitstest

Um einen optimalen Puffer (Lysepuffer) für die Proteinextraktion zu finden, wurden im Löslichkeitstest verschiedene Pufferbedingungen getestet. Der hier angewendete Löslichkeitstest (*solubility screen*) basiert auf der Publikation von Lindwall *et al.* (2000). Bei der Wahl der verschiedenen Pufferbedingungen wurde darauf geachtet, dass diese auch mit dem folgenden Aufreinigungssystem des entsprechenden Proteins (Ni²⁺-NTA-, GST-Affinitätschromatographie) kompatibel waren.

Das Pellet aus einer 500 ml-Kultivierung wurde in 30 ml Waschpuffer (10 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) resuspendiert und à 1 ml auf 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt. Nach Zentrifugation (16000 x g, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und die aliquotierten Zellpellets wurden in je 1 ml des zu testenden Puffers resuspendiert (Abschnitt 2.1.3). Es folgte die Zugabe von jeweils 10 µl Lysozymbelösung (15 mg/ml) und eine Inkubation auf Eis für 10 min. Der weitere Aufschluss der Zellen erfolgte durch Ultraschallbehandlung für 1 min (*output control* 4, % *duty cycle* 50). Nach Zentrifugation (16000 x g, 30 min, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Mittels SDS-PAGE (Abschnitt 2.2.4.1) wurden die Überstände und gegebenenfalls die Pellets analysiert. Als Kontrolle diente das Gesamtzelllysate einer Probe nach Induktion der Gen-Expression (Abschnitt 2.2.3.1).

2.2.3.4 Proteinreinigung mittels GST-Affinitätschromatographie

Der Überstand mit dem löslichen Protein wurde nach Zellaufschluss (Abschnitt 2.2.3.2) mit einer Peristaltikpumpe und einer Flussrate von 0,5 ml/min auf eine GSTrap™ FF 5 ml-Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 1x PBS-Puffer bei 2 ml/min gewaschen bis die OD₂₈₀ des Durchflusses sich der OD₂₈₀ des reinen 1x PBS-Puffers annäherte. Zur Abspaltung des GST-Fusionsproteins mit der PreScission-Protease wurde die Säule anschließend mit 30 ml Spaltpuffer bei 2 ml/min gewaschen. Mit einer 5 ml-Spritze wurde die PreScission-Protease-Lösung (50 µl, 10 mg/ml) in 5 ml Spaltpuffer auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde an beiden Enden verschlossen und über Nacht bei 4 °C gelagert. Die Aufreinigung nach der Abspaltung erfolgte an der ÄKTAprime™ plus-Anlage. Durch Waschen der Säule mit Spaltpuffer bei 0,5 ml/min und 0,5 ml-Fraktionen wurde das geschnittene Protein eluiert. Die dabei auf der Säule verbliebene PreScission-Protease als GST-Fusionsprotein, sowie die vom eluierten Protein geschnittene GST-Domäne wurden durch Elutionspuffer bei einer Flussrate von 2 ml/min und 2 ml-Fraktionen von der Säule gelöst. Mittels eines UV-Detektors

wurde der Verlauf bei OD₂₈₀ verfolgt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE analysiert und die Fraktionen, die das Protein enthielten, wurden vereint und für weitere Aufreinigungsschritte verwendet, z.B. Größenausschlussfiltration (Abschnitt 2.2.3.7).

Aufreinigung der PreScission-Protease

Die Aufreinigung der PreScission-Protease (~46 kDa), welche für die Abspaltung des GST-Tags verwendet wurde, erfolgte ebenfalls durch GST-Affinitätschromatographie. Die Elution von der Säule erfolgte mit 50 mM Tris, 20 mM Glutathion reduziert, pH 8,0. Das Protein wurde anschließend in 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7,5 dialysiert. Nach Konzentrierung auf ~10 mg/ml mit einer Amicon-Rührzelle wurde die Proteinlösung à 50 µl aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.3.5 Proteinreinigung mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

Der Überstand mit dem löslichen Protein wurde nach Zellaufschluss (Abschnitt 2.2.3.2) mit einer Peristaltikpumpe und einer Flussrate von 1 ml/min auf eine HisTrap™ FF 5 ml-Säule aufgetragen und diese danach an eine ÄKTAprime™ plus-Anlage angeschlossen. Der UV-Detektor wurde zuvor mit Waschpuffer auf Null abgeglichen. Die Säule wurde mit Waschpuffer bei 2 ml/min gewaschen bis sich die OD₂₈₀ der Basislinie annäherte. Das Protein wurde von der Säule eluiert durch Anwendung eines Lineargradienten. Dieser verlief mit einer Flussrate von 1 ml/min über 50 ml und stieg dabei von 30% Elutionspuffer auf 100% Elutionspuffer. Es wurden 2 ml-Fraktionen gesammelt und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert. Die Proben, die das Protein enthielten, wurden vereint und für weitere Aufreinigungsschritte oder Abspaltung des His₆-Tags verwendet (Abschnitt 2.2.3.8).

Aufreinigung der TEV-Protease

Dem Überstand mit dem löslichen Protein wurde nach Zellaufschluss (siehe Abschnitt 2.2.3.2) Imidazol in einer Endkonzentration von 10 mM zugesetzt. Mit einer Peristaltikpumpe und einer Flussrate von 1 ml/min wurde die Lösung auf eine HisTrap™ FF 5 ml-Säule aufgetragen und diese danach an eine ÄKTAprime™ plus-Anlage angeschlossen. Der UV-Detektor wurde zuvor mit Waschpuffer 1 auf Null abgeglichen. Die Säule wurde mit Waschpuffer 1 bei einer Flussrate von 2 ml/min gewaschen bis sich die OD₂₈₀ der Basislinie annäherte. Anschließend wurde Waschpuffer 2 mit denselben Einstellungen verwendet. Das Protein wurde bei einer Flussrate von 1 ml/min mit Elutionspuffer von der Säule eluiert. Es

wurden 2 ml- Fraktionen und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert. Die Proben, die das Protein enthielten (~27 kDa), wurden vereint und über Nacht bei 4 °C in den Lagerungspuffer dialysiert. Die Proteinlösung wurde in einer Amicon-Rührzelle auf 3 mg/ml aufkonzentriert und à 50 µl bei -70 °C gelagert.

2.2.3.6 Ionenaustauschchromatographie

Nach Dialyse der Proteinlösung in den Waschpuffer für die Ionenaustauschchromatographie wurde diese an der ÄKTAprime™ plus-Anlage auf eine HiTrap QF 1 ml-Säule mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Die Säule wurde mit Waschpuffer bei 1 ml/min gewaschen bis sich die OD₂₈₀ der Basislinie (Nullabgleich mit Waschpuffer) annäherte. Das Protein wurde unter Anwendung eines Lineargradienten eluiert. Dieser verlief bei einer Flussrate von 1 ml/min über 30 ml und stieg von 0% Elutionspuffer auf 100% Elutionspuffer. Es wurden 2 ml-Fractionen gesammelt und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Proben, die das Protein enthielten, wurden vereint und gegen 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,5 dialysiert.

2.2.3.7 Größenausschlussfiltration

Die Größenausschlussfiltration wurde als weiterer Aufreinigungsschritt nach der Affinitätschromatographie und gleichzeitig zur Umpufferung der Proteinlösung verwendet. Es wurde die HiLoad™ 16/60 Superdex™ 75 prep grade-Säule verwendet und über die ÄKTAprime™ plus-Anlage betrieben. Die Proteinlösung wurde über einen 5 ml-Loop auf die zuvor mit dem entsprechenden Puffer equilibrierten Säule geladen. Die Größenausschlussfiltration erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml/min. Die Proben wurden für 120 ml in 2 ml-Fractionen gesammelt und mittels SDS-PAGE analysiert.

Zur Kalibrierung der Superdex™ 75-Säule wurden mehrere Markerproteine einzeln und im Gemisch auf die Säule aufgetragen. Die Größenausschlussfiltration erfolgte analog zu den Proteinreinigungen. Für die Kalibrierung wurden die folgenden Markerproteine verwendet: Cytochrom c (12,5 kDa), Myoglobin (17,8 kDa), Carboanhydrase (29,5 kDa), Ovalbumin (45,0 kDa), Rinderserumalbumin (66 kDa) und Dextranblau (> 200 kDa, für die Bestimmung des Totvolumens der Säule).

2.2.3.8 Abspaltung des N-terminalen His₆-Tag mit der TEV-Protease

Die Abspaltung des N-terminalen His₆-Tag mit der TEV-Protease wurde zunächst im kleinen Maßstab unter verschiedenen Bedingungen getestet. Die Proteinlösung wurde nach der Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie (Abschnitt 2.2.3.5) durch Dialyse oder Größenausschlussfiltration in den Spaltpuffer der TEV-Protease umgepuffert (Abschnitt 2.2.3.7). In einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurden die TEV-Protease und die Proteinlösung in einem molaren Verhältnis von 1:20, 1:50 und 1:100 (Protease : Protein) bei einem Volumen von 50-70 µl gemischt und die Ansätze bei 20 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben genommen und diese einer SDS-PAGE- und Western-Blot-Analyse unterzogen.

Für die präparative Proteinreinigung wurden die Bedingungen, unter denen der His₆-Tag in ausreichendem Maße vom Protein abgespalten werden konnte, auf den größeren Maßstab übertragen. Das Gemisch wurde anschließend über die Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie (Abschnitt 2.2.3.5) aufgereinigt, wobei das vom His₆-Tag gespaltene Protein nicht mehr an die Matrix gebunden hat und somit mit dem Waschpuffer von der Säule eluiert wurde, während der His₆-Tag und die mit einem His₆-Tag versehene TEV-Protease auf der Säule verblieben und erst durch Elutionspuffer mit Imidazol von der Säule eluiert werden konnten.

2.2.3.9 Dialyse

Zur Umpufferung wurde die Proteinlösung in einen Dialyseschlauch, der am unteren Ende mit einer Klammer verschlossen war, pipettiert. Der Schlauch wurde anschließend auch am oberen Ende mit einer Klammer versehen. Unter Rühren erfolgte die Dialyse in einem Liter des neuen Puffers über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Morgen wurde die Proteinlösung vorsichtig aus dem Dialyseschlauch pipettiert und zentrifugiert (5200 x g, 15 min, 4 °C).

2.2.4 Proteinanalytik

2.2.4.1 SDS-PAGE

Die angewendete SDS-PAGE basiert auf der Methode nach Laemmli (Laemmli *et al.*, 1970). Zunächst wurde das Trenngel (Tabelle 2.8) angesetzt und zwischen eine Glas- und eine Aluminiumoxidplatte, die durch einen 0,75 mm Abstandshalter getrennt und in einer Hoefer[®] Mighty Small SE 245 Dual Gel Caster-Anlage befestigt waren, gegossen. Die Lösung wurde mit 0,1% (w/v) SDS-Lösung überschichtet. Nach Polymerisation für 30 min wurde die 0,1%

(w/v) SDS-Lösung dekantiert. Die Lösung für das Sammelgel (Tabelle 2.8) wurde auf das polymerisierte Trenngel gegossen und der Probenkamm mit der entsprechenden Anzahl an Geltaschen eingesetzt. Nach 30 min Polymerisation wurde das Gel mit den Platten in eine Hoefer[®] Mighty Small II SE 250 Gelkammer eingespannt und diese mit Laufpuffer versetzt. Als Marker wurde der *unstained protein molecular weight marker* von Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Die Proben wurden entsprechend dem Fassungsvermögen der Geltaschen 1:1 mit 2x Laemmli-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Nach Zentrifugation (16000 x g, 1 min, RT) wurden die Proben in die Geltaschen aufgetragen und die Proteine durch Anlegen von 20 mA (pro Gel) für eine Stunde im Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Tabelle 2.8: Zusammensetzung für 2 Gele der SDS-PAGE.

Lösung	Sammelgel 6%	Trenngel 15%	Trenngel 17%
Laemmli A	1 ml	5,56 ml	6,3 ml
Laemmli B	---	2,76 ml	2,76 ml
Laemmli C	50 µl	111 µl	111 µl
Laemmli D	1,25 ml	---	---
H ₂ O	2,65 ml	2,56 ml	1,82 ml
TEMED	5 µl	6,6 µl	6,6 µl
APS (10% (w/v))	50 µl	111 µl	111 µl

2.2.4.2 Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE

Das Gel wurde nach der elektrophoretischen Auftrennung in Coomassie-Färbelösung für 30 min inkubiert. Anschließend wurde das Gel bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes in Coomassie-Entfärbelösung inkubiert.

2.2.4.3 Western-Blot

Die Nitrocellulose-Transfer-Membran (7 x 9 cm) und sechs Gel-Blotting-Papiere (je 7 x 9 cm) wurden in der Benutzungsverdünnung des Blotpuffers equilibriert. Dann wurden zunächst drei Gel-Blotting-Papiere in die Blotkammer Semiphor[™] gelegt und darauf die Nitrocellulose-Transfer-Membran. Auf diese wurde anschließend das SDS-Polyacrylamidgel nach SDS-PAGE transferiert. Das Gel musste luftblasenfrei auf der Nitrocellulose-Transfer-Membran aufliegen. Zum Schluss wurden die drei verbliebenen Gel-Blotting-Papiere auf das

Gel gelegt. Für 1 h bei 35 mA (pro Gel) wurden die Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf die Membran übertragen. Zur Markierung der Markerproteine wurde die Membran anschließend für wenige Minuten in der Ponceau S-Lösung inkubiert und die Banden mit einem Kugelschreiber nachgezogen. Die Membran wurde anschließend mit *Aqua dest.* entfärbt.

2.2.4.4 Western-Blot-Entwicklung

Nach dem Übertragen der Proteine auf die Nitrocellulose-Transfer-Membran wurde diese zweimal für 10 min mit je 20 ml TBS-Puffer gewaschen. Die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch Inkubation der Membran in 20 ml Blocking-Puffer für 1 h. Anschließend wurde die Membran in 20 ml einer 1:5000 Verdünnung des Tetra-His-Antikörpers in Blocking-Puffer über Nacht oder mindestens für 2 h inkubiert und wiederum zweimal mit je 10 ml TBS/Tween/Triton-Puffer für 10 min gewaschen. Nach dem Waschen mit 20 ml TBS-Puffer für 10 min erfolgte die Inkubation in 20 ml einer 1:10000 Verdünnung des 2. Antikörpers (Anti-Maus-IgG-Alkalische Phosphatase Konjugat) in Blocking-Puffer für 1 h. Anschließend wurde die Membran viermal mit je 20 ml TBS/Tween/Triton-Puffer gewaschen. Die Färbereaktion wurde durch Zugabe von 10 ml Färbelösung gestartet. Nach ca. 5 min wurde die Reaktion durch Waschen der Membran mit *Aqua dest.* beendet.

2.2.4.5 Proteinbestimmung nach Bradford

1 Teil Bradford-Lösung (Bio-Rad, München) wurde mit 4 Teilen *Aqua dest.* verdünnt. Für jeden Ansatz wurden 625 µl verdünnte Bradford-Lösung, 400 µl *Aqua dest.* und 10 µl Probe bzw. Proteinstandard (200-1000 µg/ml BSA [Gerbü, Gaiberg]) gemischt und im UV-Spektrophotometer die Absorption bei 595 nm gemessen. Als Probe für den Nullwert und zum Herstellen der Probe bzw. des Proteinstandards wurde *Aqua dest.* verwendet. Es wurde eine 2-fach-Bestimmung durchgeführt. Aus den bekannten Konzentrationen und den gemessenen Absorptionen des Proteinstandards wurde eine Kalibriergerade erstellt, mit Hilfe derer über die gemessene Absorption die Konzentration der Probe ermittelt wurde.

2.2.4.6 NTPase-Aktivitätstest

Der Reaktionspuffer für den NTPase-Test setzte sich zusammen aus 50 mM Tris pH 8,5, 50 mM KCl und 2,5 mM MgCl_2 . Die Reaktionen wurden in einem 250 μl -Volumen angesetzt und enthielten jeweils 5 μM Enzymlösung, 2 mM Substratlösung, 2 mM NaH_2PO_4 und 2,5 mM Pyrophosphat (Fluka, Buchs, Schweiz). Diese Ansätze wurden für 15 min bei RT inkubiert und anschließend mit 100 μl 20% (w/v) TCA versetzt. Nach Inkubation für 2 min bei RT wurden die Proben zentrifugiert (5 min, 16000 x g). Vom Überstand wurden 250 μl mit 500 μl *Aqua dest.* gemischt. Es folgte die Zugabe von 100 μl 2,5% (w/v) Ammoniummolybdat $(\text{NH}_4)_2(\text{MoO}_4)$, 100 μl 2,5 M H_2SO_4 und 50 μl Reduktionslösung (1,2 g Na_2SO_3 , 10,9 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 0,2 g Metol [N-Methyl-4-amino-phenolsulfat] in 100 ml). Die Proben wurden für 20 min bei RT inkubiert und anschließend die Absorption bei 578 nm gemessen.

2.2.4.7 Zonen-Interferenz-Gelelektrophorese

Die angewendete Zonen-Interferenz-Gelelektrophorese (ZIGE) basiert auf der Methode von Abrahams *et al.* (1988) und diente der Untersuchung von Protein-Ligand-Interaktionen. Abbildung 2.1 zeigt das Prinzip der Zonen-Interferenz-Gelelektrophorese.

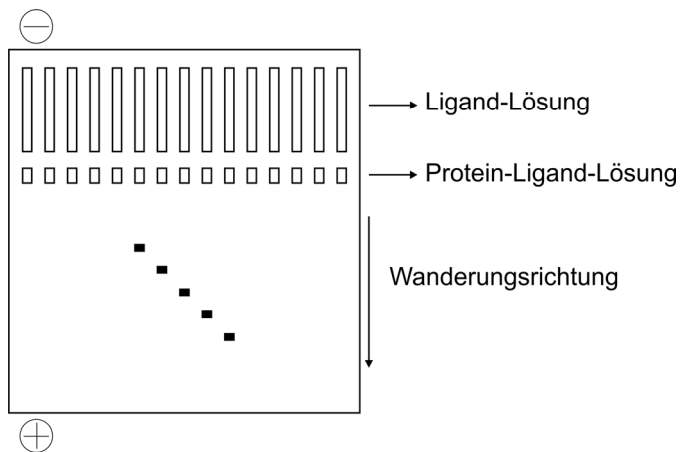


Abbildung 2.1: Darstellung eines Agarosegels mit großen und kleinen Probenfächern und Prinzip der Zonen-Interferenz-Gelelektrophorese.

Das zu untersuchende Protein ($\text{pI} < 8,3$) war beim pH-Wert des verwendeten Puffers (pH 8,3) negativ geladen und wanderte im elektrischen Feld Richtung Anode. Eine Interaktion des Proteins mit einem Liganden wie z.B. DNA zeigte sich dadurch, dass das Protein im Vergleich zur Negativ-Probe (ohne Zusatz eines Liganden) näher an der Anode detektiert wurde.

Die handwarme 1%ige Agaroselösung (40 ml) wurde in ein Flachbett (7 x 8 cm) gegossen und der Probenkamm anschließend vorsichtig positioniert. Nach der Polymerisation wurde der Probenkamm vorsichtig entfernt, das Flachbett mit dem Gel in die Elektrophoresekammer gesetzt und mit 0,5x TBE-Puffer überschichtet. In die großen Taschen wurden 100 µl Ligandlösung mit der entsprechenden Konzentration und 10% DMSO/Bromphenolblau pipettiert. In die kleinen Taschen wurden 10 µl bestehend aus Proteinlösung (meist 10 µM) mit der Ligandenlösung (Konzentration entsprechend der Ligandenlösung für die großen Taschen) und 10% DMSO/Bromphenolblau pipettiert. Die Lösung aus Protein und Ligand (vor Zugabe des DMSO/Bromphenolblau) wurde zuvor für 30 min bei RT inkubiert. Die Elektrophorese wurde bei 100 mA für 1 h bei 4 °C durchgeführt. Anschließend wurde das Gel für 10 min in der Denaturierungslösung und für weitere 10 min in der Waschlösung bei RT inkubiert. Die Färbung der Proteine erfolgte durch Inkubation in der Coomassie-Färbelösung für 10 min bei RT. Das Gel wurde zum Schluss in der Coomassie-Entfärbelösung bei RT entfärbt.

2.2.4.8 Isothermische Titrationskalorimetrie

Mit Hilfe der isothermischen Titrationskalorimetrie (ITC) ist es möglich, die Wärme hochsensitiv zu messen, die aufgrund der Wechselwirkung zweier Komponenten aufgenommen oder abgegeben wird. Daraus kann u.a. die Dissoziationskonstante (K_D) ermittelt werden. Die Konzentration der Protein- und der Liganden-Lösung und die Anzahl der Injektionen der verschiedenen Messungen sind in Tabelle 2.9 aufgeführt. Zur Verdünnung der einzelnen Proben wurde der in Tabelle 2.9 angegebene Puffer verwendet.

Tabelle 2.9: Parameter für die verschiedenen ITC-Experimente.

Nsp3 X-Domäne von	HCoV-NL63	HCoV-229E	IBV
Konzentration			
Protein	25 µM	33 µM	50 µM
ADP-Ribose	1 mM	1,5 mM	700 µM
Injektionen	25 à 10 µl	25 à 10 µl	30 à 9 µl
Puffer	20 mM Tris, 100	20 mM Tris, 100	TBE-Puffer
	mM NaCl, 10 mM	mM NaCl, 10 mM	pH 8,3
	MgCl ₂ , 1 mM DTT	MgCl ₂ , 1 mM DTT	
	pH 7,5	pH 7,5	

Die isothermische Titrationskalorimetrie wurde bei 25 °C mit dem VP-ITC-Instrument durchgeführt. Die Proben und Puffer wurden vor der Messung vollständig entgast. Sukzessiv erfolgte die Injektion der ADP-Ribose-Lösung in die Proteinlösung. Die gemessenen Daten wurden mit der VP-ITC Software Origin 7.0 ausgewertet.

2.2.4.9 NAD⁺-Spaltungstest

Der NAD⁺-Spaltungstest wurde im 25 µl-Ansatz durchgeführt. Dieser setzte sich zusammen aus 18 µl Puffer, 4,5 µl Proteinlösung (Endkonzentration 50 µM) und 2,5 µl NAD⁺ (Endkonzentration 1 mM). Die Reaktion wurde bei zwei pH-Werten durchgeführt. Die Puffer setzten sich zusammen aus 50 mM MES pH 6,5 bzw. 50 mM HEPES pH 7,0 und 50 mM NaCl. Die Ansätze wurden über Nacht bei 20 °C bzw. für 5 h bei 30 °C inkubiert.

Die Umsetzung des NAD⁺ wurde durch Absorptionsmessung überprüft. Während der Reaktion nicht umgesetztes NAD⁺ wurde chemisch modifiziert und dessen Absorption bei 378 nm gemessen (Putt & Hergenrother, 2004). Dazu wurden nach der Inkubation jeweils 10 µl eines Ansatzes mit 40 µl Puffer gemischt. Es folgte die Zugabe von 20 µl 2 M KOH und 20 µl Acetophenon (20% (v/v) in Ethanol). Der Ansatz wurde 10 min bei 4 °C inkubiert. Nach Zugabe von 90 µl 88% (v/v) Ameisensäure wurde für 5 min bei 110 °C inkubiert und nach dem Abkühlen die Absorption bei 378 nm gemessen.

2.2.5 Kristallisation (durch Dampfdiffusion)

2.2.5.1 Methode des sitzenden Tropfens (*sitting drop*, 24er Well-Format)

Für jeden Kristallisationsansatz, d.h. pro Vertiefung (Well) wurden 500 µl Reservoirlösung in die Vertiefung pipettiert. Auf den in der Vertiefung befindlichen Sockel wurden 1 µl der Proteinlösung und darauf 1 µl der Reservoirlösung pipettiert. Zum Schluss wurde die Kristallisationsplatte mit durchsichtiger Klebefolie (*Crystal Clear Sealing Tape*) verschlossen und bei 12 °C gelagert.

2.2.5.2 Methode des hängenden Tropfens (*hanging drop*, 48er Well-Format)

In die Vertiefung wurden 250 µl Reservoirlösung pipettiert. Auf dem Deckgläschen wurden 1 µl Proteinlösung und darauf 1 µl Reservoirlösung pipettiert. Das Deckgläschen wurde mit einer Pinzette um 180° gedreht und vorsichtig auf die mit Silikon-Salbe umrandete

Vertiefung mit dem Tropfen nach unten zeigend (hängend) gesetzt. Durch leichtes Andrücken wurde der Kristallisationsansatz luftdicht verschlossen. Die Kristallisationsplatte wurde bei 12 °C gelagert.

2.2.5.3 Kristallisation in der 96-Well Intelli-Plate

Die Kristallisation in der 96-well Intelli-Plate (sitzender Tropfen) wurde mit dem Pipettier-Roboter Phoenix durchgeführt. In die Vertiefung wurden 0,85 µl Reservoirlösung pipettiert. Auf den Sockel wurden zunächst 0,27 µl Reservoirlösung und anschließend 0,26 µl Proteinlösung gegeben. Die Kristallisationsplatte wurde mit durchsichtiger Klebefolie (*Crystal Clear Sealing Tape*) verschlossen und bei 12 °C gelagert.

2.2.5.4 Co-Kristallisation

Bei der Co-Kristallisation wurde die Proteinlösung vor der Kristallisation mit der Liganden-Lösung versetzt und für 30 min bei 20 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Kristallisation wie in Abschnitt 2.2.5.1-2.2.5.3 beschrieben.

2.2.5.5 Soaking-Experimente

Das *Soaking* (Tränken) des Liganden in den Proteinkristall wurde auf zwei verschiedene Weisen durchgeführt. Zum einen wurde der Kristall in einen frischen Tropfen aus Reservoirlösung und Liganden-Lösung transferiert und das Deckgläschen auf eine neue Vertiefung mit frischer Reservoirlösung gesetzt. Zum anderen erfolgte die Zugabe der Liganden-Lösung direkt zum Tropfen mit den Kristallen. Die Endkonzentration des Liganden im Tropfen lag jeweils bei 5 mM und 20 mM. Nach 2 und 5 h Inkubation bei RT bzw. 12 °C wurden die Kristalle wenige Sekunden in der Cryoschutzlösung inkubiert und bis zur Vermessung an der Beamline in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.6 **Diffraktionsexperimente**

2.2.6.1 Datensammlung und –prozessierung

Im Institut für Biochemie wurde die Streuung der Kristalle zunächst mit dem Xcalibur PX Ultra getestet. Die Datensätze für die X-Domäne des HCoV-NL63 und des IBV wurden

an der Beamline X13 (Marresearch CCD-Detektor [mar165], Universität Hamburg – Universität zu Lübeck – EMBL) am DESY (Deutsches Elektronen-Synchrotron) in Hamburg bei einer Wellenlänge von 0,808 Å und bei einer Temperatur von 100 K aufgenommen. Für die X-Domäne des HCoV-229E und die Komplexstrukturen der HCoV-NL63 X-Domäne erfolgte die Datensammlung an der Beamline I911 am MaxLab in Lund (Marresearch CCD-Detektor [mar165]), Schweden, bei einer Wellenlänge von 1,04 Å und bei 100 K. Die Daten für das IBV-X85 wurden prozessiert, reduziert und skaliert mit DENZO/SCALEPACK (HKL suite; Otwinowski & Minor, 1997). Die restlichen Datensätze (NL63-X, 229E-X, IBV-X56, Komplexstrukturen) wurden mit MOSFLM prozessiert (Leslie, 1992) und mit SCALA skaliert (CCP4, 1994).

2.2.6.2 Molekularer Ersatz

Die Bestimmung der Kristallstrukturen erfolgte durch molekularen Ersatz. Die einzelnen Strukturen, die als Modell verwendet wurden, sind im Ergebnis- und Diskussionsteil erwähnt. Generell wurden die Modelle für den molekularen Ersatz angepasst. Nicht-konservierte Aminosäurereste wurden mit CHAINSAW (CCP4, 1994) bis auf die C_γ-Atome verkürzt oder in Ala- bzw. Ser-Reste umgewandelt. Größere Loop-Regionen wurden mit COOT (Emsley & Cowtan, 2004) manuell entfernt. Für den molekularen Ersatz wurde das Programm PHASER und teilweise MOLREP verwendet (CCP4, 1994).

2.2.6.3 Modellbau und Verfeinerung

Für den Modellbau wurde das Programm COOT (Emsley & Cowtan, 2004) verwendet. Entsprechend den Elektronendichtekarten wurden die Aminosäurereste eingebaut. Die Verfeinerung erfolgte mit REFMAC (CCP4, 1994; Murshudov *et al.*, 1997). Nach mehreren Zyklen manuellen Modellbaus und Verfeinerung wurden auch die Wassermoleküle bzw. Liganden wie Ethylenglykol und Kalium-, Natrium-Tartrat in die entsprechende Elektronendichtekarte manuell eingebaut und mit REFMAC verfeinert. Die Bibliotheks-Datei für das NAD⁺ wurde mit dem Programm SKETCHER (CCP4, 1994) erstellt. Das Nukleotid wurde erst in den letzten Schritten des Modellbaus in die Elektronendichte eingepasst. Teilweise wurde das Modell durch das automatische Programm ARP/wARP gebaut (Lamzin & Wilson, 1993).

2.2.6.4 Validierung

Während des Modellbaus wurden die geometrischen Parameter mit dem Programm COOT analysiert (z.B. Ramachandran-Plot, Rotamer-Analyse). Weiterhin erfolgte die Validierung anhand der Elektronendichtekarten und der *R*-Faktoren. Nach dem Modellbau und der Verfeinerung wurde zur Kontrolle der Übereinstimmung des Modells mit den gemessenen Daten das Programm SFCHECK und zur Überprüfung der stereochemischen Parameter das Programm PROCHECK verwendet (CCP4, 1994).

2.2.6.5 Programme für die Darstellung und Analyse

Die Programme für die Darstellung und Analyse sind in Tabelle 2.10 aufgelistet.

Tabelle 2.10: Verwendete Programme für die Darstellung und Analyse der Strukturen.

Programm	Verwendung
ALIGN (Cohen, 1997)	Struktur-Alignments
APBS (Baker <i>et al.</i> , 2001)	Darstellung des elektrostatischen Oberflächenpotentials
CONTACT (CCP4, 1994)	Analyse intra- und intermolekularer Kontakte
DALI Lite v.3 (Holm <i>et al.</i> , 2008)	Strukturvergleiche
DSSP (Kabsch & Sander, 1983)	Bestimmung der Sekundärstruktur
Ligplot (Wallace <i>et al.</i> , 1995)	Darstellung der Protein-Ligand-Kontakte
MATTHEWS_COEF (CCP4, 1997)	Berechnung des Matthews-Koeffizienten
PYMOL (DeLano, 2002)	Darstellung der Strukturen, Erzeugung von Abbildungen

Für die Analyse und Darstellung der Primärstruktur wurden die Programme FFAS03 (Jaroszewski *et al.*, 2005; Alignment von zwei Sequenzen), CLUSTALW (Larkin *et al.*, 2007; multiples Sequenz-Alignment) und ESPript (Gouet *et al.*, 1999; Darstellung von Sequenz-Alignments mit Zuordnung der Sekundärstrukturelemente) verwendet.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Klonierung, Gen-Expression und Proteinreinigung

Die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der Nsp3 X-Domänen sind im Anhang 6.3 angegeben.

3.1.1 Die X-Domäne von HCoV-NL63 (NL63-X)

3.1.1.1 Klonierung und Gen-Expression

NL63-X mit N-terminalem His₆-Tag

Die cDNA der X-Domäne des nicht-strukturellen Protein 3 (nsp3-X) wurde von Prof. Dr. Lia van der Hoek (Department of Retrovirology, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, Netherlands) zur Verfügung gestellt. Das zu klonierende Insert war am 5'-Ende mit einem CACC-Überhang modifiziert und am 3'-Ende mit einem TAG-Triplet versehen, das für drei aufeinander folgende Stopcodons kodiert. Die Klonierung erfolgte mit dem Gateway[®]-System von Invitrogen (Abschnitt 2.2.1.1). In der TOPO[®]-Reaktion wurde das Insert in den Vektor pENTRTM/D-TOPO[®] kloniert (*entry clone*). Zur Überprüfung der Reaktion wurde ein Doppelverdau und anschließend eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Der in der TOPO[®]-Reaktion generierte *entry clone* wurde für die folgende LR-Rekombinationsreaktion eingesetzt. Dabei wurde das Insert aus dem pENTRTM/D-TOPO[®]-Vektor in den Expressionsvektor pEXP1-DESTTM kloniert. Die Sequenzierung bei MWG Biotech (Martinsried) bestätigte den korrekten Einbau des Gens in den Vektor pEXP1-DESTTM.

Aufgrund der für die LR-Rekombinationsreaktion benötigten *att*-Sequenzen und der für den His₆-Tag kodierenden Sequenz kommt es nach Gen-Expression mit dem Vektor pEXP1-DESTTM zu 49 zusätzlichen Aminosäureresten am N-Terminus des Proteins.

Die Gen-Expression von nsp3-X wurde zunächst in *E. coli* BL21 (DE3) Gold nach Induktion mit 1 mM IPTG bei 20 °C und 37 °C für 6 h getestet (Abschnitt 2.2.2.3). Nach SDS-PAGE konnte ein Bande detektiert und durch Western-Blot bestätigt werden, die der erwarteten Größe von 23,3 kDa entsprach (Abbildung 3.1). Die Bande für NL63-X mit N-terminalem His₆-Tag war bei 20 °C (Bahn 3) im Vergleich zu 37 °C (Bahn 2) schwächer ausgeprägt. Geringe Expression war bereits vor Induktion mit IPTG vorhanden (Bahn 1).

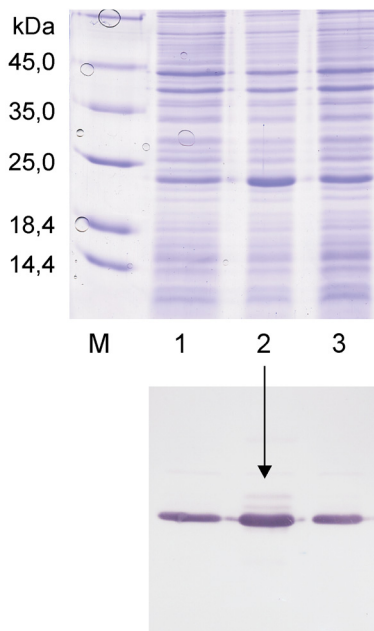


Abbildung 3.1: Gen-Expression von nsp3-X mit N-terminalem His₆-Tag in *E. coli* BL21 (DE3) Gold. Oben: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; unten: Western-Blot; M: Marker, 1: vor Induktion, 2: nach Induktion bei 37 °C, 3: nach Induktion bei 20 °C.

Die Expression des nsp3-X mit N-terminalem His₆-Tag wurde in Zusammenarbeit mit Stephanie Glaser als Bestandteil ihrer Bachelor-Arbeit weiter untersucht. Aus mehreren Versuchen wurden die Expressionsbedingungen auf eine Induktion mit 0,5 mM IPTG bei OD₆₆₀ = 1,0 und einer anschließenden Kultivierung für 4-6 h bei 37 °C festgelegt. Ein erster Löslichkeitstest mit 30 Puffern (Lindwall *et al.*, 2000) zeigte nur schwache Löslichkeit des Proteins im Vergleich zum Gesamtzelllysat. Erst nach Variation der Zusammensetzung konnte bei einem Puffer (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 1% (v/v) Tween 20, pH 7,5) im Western-Blot eine spezifische Bande der X-Domäne zugeordnet werden. Nach Proteinreinigung mittels Ni²⁺-NTA-Affinitäts- und Anionenaustauschchromatographie konnte die Proteinlösung im Durchschnitt nur auf 0,6 mg/ml konzentriert werden (Glaser, 2005).

NL63-X mit N-terminalem GST-Tag

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Expression eines Gens als Fusionsprotein dessen Löslichkeit erhöhen kann (Smyth *et al.*, 2003). Da der *entry clone* (nsp3-X + pENTRTM/D-TOPO[®]) aus dem vorangegangenen Klonierungsexperiment schon vorhanden war, musste nur die LR-Rekombinationsreaktion durchgeführt werden (Abschnitt 2.2.1.1), um das nsp3-X in den Vektor pGEX-DEST7 zu überführen. Der Vektor pGEX-DEST7 enthält die *att*-Sequenzen und ist somit kompatibel mit dem Gateway[®]-System.

Das Protein wird nach Induktion mit einem N-terminalen GST-Tag produziert, welcher mit der PreScission-Protease abgeschnitten werden kann. Am N-Terminus des

Proteins verbleiben nach Abspaltung des GST-Tags 20 zusätzliche Aminosäurereste (GPLGSTSLYKKAGSAAAPFT).

Der korrekte Einbau des Gens in den Expressionsvektor pGEX-DEST7 nach der LR-Rekombinationsreaktion wurde durch eine Restriktionsanalyse überprüft und durch Sequenzierung (MWG Biotech, Martinsried) bestätigt. Für eine erste Analyse der Produktion des NL63-X mit N-terminalem GST-Tag (GST-NL63-X) in *E. coli* BL21 (DE3) wurden verschiedene Expressionsbedingungen getestet (Abschnitt 2.2.2.3). Abbildung 3.2 zeigt das Beispiel für die Induktion mit 0,5 mM IPTG ($OD_{660} = 0,5$) und Expression bei 20 °C für 4 h. In den Zelllysaten nach Induktion konnte nach der SDS-PAGE eine Bande nahe der 45 kDa-Markerbande detektiert werden, die nicht im Zelllysat vor Induktion zu beobachten war. Die erwartete Molmasse war 46,2 kDa.

Für die weitere Arbeit wurde die Gen-Expression der X-Domäne von HCoV-NL63 in *E. coli* BL21 (DE3) bei $OD_{660} = 0,5$ mit 0,5 mM IPTG induziert und für 20 °C für 4-5 h durchgeführt.

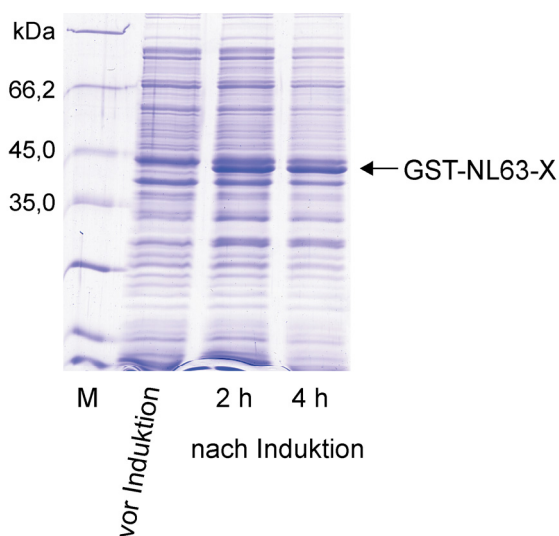


Abbildung 3.2: Gen-Expression der X-Domäne von HCoV-NL63 mit N-terminalem GST-Tag (GST-NL63-X) bei 20 °C für 4 h. Dargestellt sind die Zelllysate vor und nach Induktion mit 0,5 mM IPTG ($OD_{660} = 0,5$). M: Marker.

3.1.1.2 Löslichkeitstest von GST-NL63-X

Zur optimalen Aufreinigung des NL63-X wurde zunächst ein Löslichkeitstest durchgeführt (Abschnitt 2.2.3.3). Dabei wurden zwei verschiedene Grundpuffer verwendet (Abschnitt 2.1.3), denen unterschiedliche Zusätze zugesetzt waren. Nach Zellaufschluss durch Ultraschallbehandlung wurde der zytosolische Überstand auf lösliches Protein untersucht. Zum Vergleich der Proteinmenge diente das Gesamtzelllysat einer Probe nach Aufbereitung unter denaturierenden Bedingungen (Abschnitt 2.2.3.1). Wie aus Abbildung 3.3 ersichtlich, war das GST-NL63-X in den acht getesteten Puffern gut löslich.

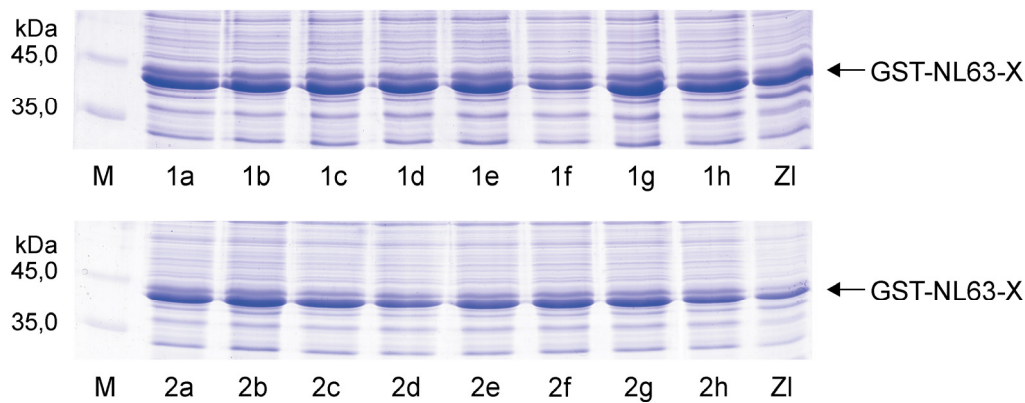


Abbildung 3.3: Löslichkeitstest von NL63-X als GST-Fusionsprotein. Oben: Grundpuffer 1 (50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0); unten: Grundpuffer 2 (1x PBS); Zusätze: a = 1% (v/v) Tween 20, b = 1% (v/v) Triton X-100, c = 2 mM EDTA, d = 10% (v/v) Glycerol, e = ohne Zusatz, f = 5 mM DTT, g = 0,1% (w/v) n-Octyl- β -D-glykopyranosid (OG), h = 0,17 mM Dodecylmaltosid; ZI: Probe nach Induktion (Gesamtzelllysate); M: Marker.

Bei Verwendung von Grundpuffer 1 (50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0) zeigten sich bei allen Ansätzen Banden nach der SDS-PAGE, die dem GST-NL63-X zuzuordnen sind. In Ansatz 1f (Zusatz von DTT) war die Bande im Vergleich zu den anderen Ansätzen nicht so intensiv ausgeprägt, dennoch war das Protein auch in diesem Puffer gut löslich (Abbildung 3.3). Die Unterschiede in der Löslichkeit waren bei Verwendung von Grundpuffer 2 (1x PBS) deutlicher. Intensive Banden zeigten sich in den Ansätzen mit Tween 20 (2a), Triton X-100 (2b), EDTA (2c), DTT (2f) und n-Octyl- β -D-glykopyranosid (OG, 2g).

Der Lysepuffer für das GST-NL63-X setzte sich im Folgenden zusammen aus 1x PBS-Puffer und 1% (v/v) Triton X-100.

3.1.1.3 Aufreinigung von NL63-X

Das GST-NL63-X-Fusionsprotein wurde mittels GST-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Dafür wurde das Pellet einer 1 l-Kultivierung verwendet. Abbildung 3.4a zeigt Proben aus den einzelnen Stufen der Aufreinigung. Nach Zellaufschluss mit der French Press war das Protein in größerer Menge löslich und konnte im zytosolischen Überstand detektiert werden (Abbildung 3.4a: Überstand UZ). Geringe Mengen an Protein konnten nicht gelöst werden und befanden sich somit im Pellet (Abbildung 3.4a: Pellet UZ). Die Kapazität der GSTrap™ FF 5 ml-Säule reichte nicht aus, um das gesamte Protein zu binden, so dass ein Teil dessen im Durchlauf zu finden war (Abbildung 3.4a: Durchlauf). Die Abspaltung des GST-

Tags vom NL63-X mit der PreScission-Protease erfolgte direkt auf der GSTrap™ FF 5 ml-Säule (Abschnitt 2.2.3.4). Abbildung 3.4b zeigt das Elutionsprofil nach der proteolytischen Spaltung. Die Bahnen 2-7 zeigen, dass das NL63-X mit geringen Verunreinigungen von der GSTrap™ FF 5 ml-Säule eluiert wurde (19,9 kDa). Der noch an der Säule gebundene GST-*Tag* und ungespaltenes Fusionsprotein wurden durch Zugabe von Elutionspuffer von der Säule eluiert (Bahn 9 in Abbildung 3.4).

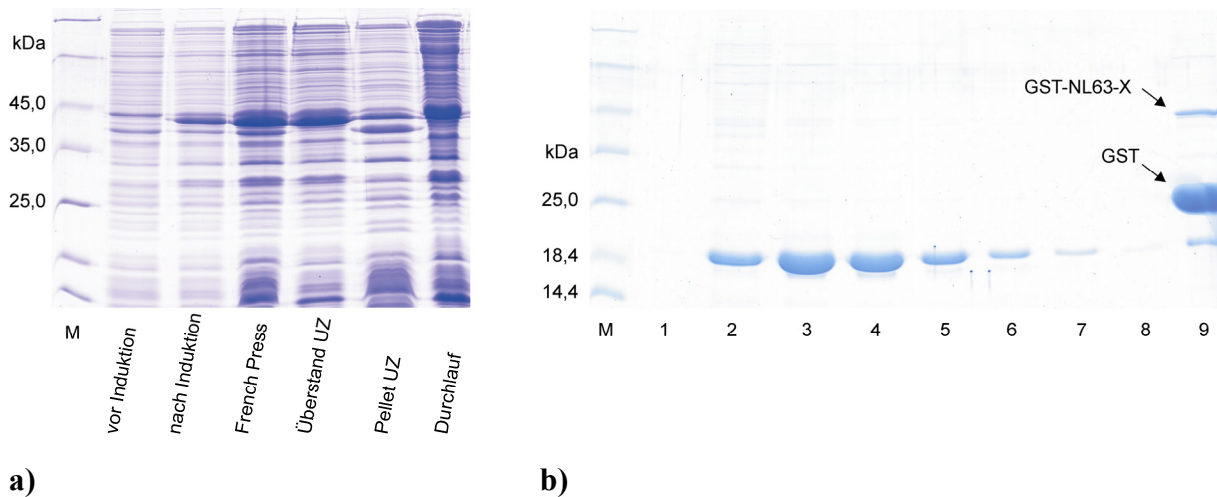


Abbildung 3.4: Aufreinigung mittels GST-Affinitätschromatographie von NL63-X mit Abspaltung des GST-*Tags* auf der Säule. a) Proben aus der Kultivierung und den einzelnen Stufen der Aufreinigung, UZ = Ultrazentrifugation; b) Proben nach Spaltung mit PreScission-Protease, 1-8: Elution mit Spaltspuffer, 9: Elution mit Elutionspuffer; M: Marker.

Im zweiten Aufreinigungsschritt wurde das NL63-X durch Anionenaustauschchromatographie mit einer HiTrap QF 1 ml-Säule (Abschnitt 2.2.3.6) von restlichen Verunreinigungen getrennt. Die relativ reine Proteinlösung wurde gegen 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,5 dialysiert und auf ~100 µl eingengt (Abbildung 3.5). Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode und lag im Durchschnitt bei 7,0 mg/ml.

3.1.1.4 Das NL63-X mit einem kürzeren *Tag* (NL63-Xst)

Das nsp3-X-Gen von HCoV-NL63 wurde nach der konventionellen Methode erneut in den Vektor pGEX-6P-1 über die *Bam*HI/*Eco*RI-Schnittstelle kloniert. Dieser Vektor besitzt wie der pGEX-DEST7 eine Sequenz, die für den GST-*Tag* und für die Schnittstelle der PreScission-Protease kodiert. Nach Produktion des Fusionsproteins und Abspaltung des GST-

Tags durch die PreScission-Protease befinden sich im Gegensatz zur Expression mit dem Vektor pGEX-DEST7 nicht 20, sondern nur fünf zusätzliche Aminosäurereste (GPLGS) am N-Terminus des NL63-X. Dieses wird im Folgenden als NL63-Xst (st = *short tag*) bezeichnet. Hintergrund der Umklonierung war die Kristallisation (Co-Kristallisation und *Soaking*) der X-Domäne von HCoV-NL63 mit möglichen Liganden. Ein negativer Einfluss der zusätzlichen Aminosäurereste auf die Bindung eines Liganden im Kristall sollte durch Verwendung des neuen Konstruktes gering gehalten werden.

Als Startmaterial für die PCR diente der *entry clone* aus TOPO[®]-Reaktion (nsp3-X + pENTRTM/D-TOPO[®], Abschnitt 3.1.1.1). Die Primer sind in Tabelle 2.1 aufgelistet. Nach der PCR erfolgte die Restriktion, Ligation und Transformation in *E. coli* DH5 α (Abschnitt 2.2.1.2-2.2.1.5). Nach Restriktionsanalyse und Sequenzierung (MWG Biotech, Martinsried) konnte der korrekte Einbau des Gens in den Expressionsvektor pGEX-6P-1 bestätigt werden.

Die Proteinproduktion wurde unter gleichen Bedingungen durchgeführt wie mit dem Vektor pGEX-DEST7 (*E. coli* BL21 (DE3), Induktion mit 0,5 mM IPTG bei OD₆₆₀ = 0,5, Expression bei 20 °C für 4-5 h). Die Aufreinigung des NL63-Xst erfolgte ähnlich wie bereits für das NL63-X beschrieben (Abschnitt 3.1.1.3). Nach der GST-Affinitätschromatographie, inkl. Spaltung mit der PreScission-Protease, wurde hier jedoch auf die Anionenaustauschchromatographie verzichtet. Stattdessen wurde die Proteinlösung weiter durch Größenausschlussfiltration aufgereinigt. Dabei erfolgte gleichzeitig der Pufferwechsel zu 10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,5. Durch diese Änderung konnte auf zwei Dialysedurchgänge verzichtet und die Aufreinigung des NL63-Xst zeitlich von vier auf zwei Tage verkürzt werden. Aus dem Elutionsvolumen der Größenausschlussfiltration konnte für das NL63-Xst eine molare Masse von 19,2 kDa ermittelt werden. Diese weicht nur geringfügig vom erwarteten Wert von 18,4 kDa ab. Das Protein lag somit als Monomer in der Lösung vor. Die Reinheit der Proteinlösung war vergleichbar mit der des NL63-X (Abbildung 3.5). Die Konzentration der Proteinlösung wurde nach der Bradford-Methode bestimmt und betrug im Durchschnitt 5,9 mg/ml.

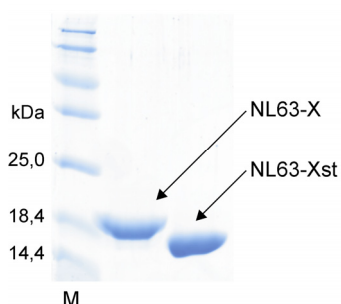


Abbildung 3.5: Proben von NL63-X (19,9 kDa) und NL63-Xst (18,4 kDa) am Ende der Proteinreinigung. Aufgetragen wurden 4 μ g bzw. 5 μ g des Proteins. M: Marker.

3.1.2 Die X-Domäne von HCoV-229E (229E-X)

3.1.2.1 Gen-Expression

Für die Gen-Expression der Nsp3 X-Domäne von HCoV-229E wurde der Vektor pET-M11 verwendet. Die Klonierung und Bereitstellung des Konstruktes erfolgte durch Prof. Dr. Eric J. Snijder (Molecular Virology Laboratory – Department of Medical Microbiology, Leiden University Medical Center, Leiden, Netherlands). Die Expression der X-Domäne erfolgt mit einem N-terminalen His₆-Tag inkl. einer Erkennungssequenz für die Protease aus dem *tobacco etch virus* (TEV-Protease). Die zusätzliche Sequenz am N-Terminus umfasst 28 Aminosäurereste (MKHHHHHHHPMSDYDIPTTENLYFQ[↓]GAMA). Nach Abspaltung mit der TEV-Protease verbleiben vier Aminosäurereste (GAMA) am N-Terminus der X-Domäne.

In Anlehnung an die Ergebnisse des NL63-X wurde die Gen-Expression in *E. coli* BL21 (DE3) durchgeführt. Dabei wurde den Zellen bei einer OD₆₆₀ von ~0,5 zur Induktion 0,5 mM IPTG zugesetzt. Die Proteinproduktion erfolgte bei 20 °C für 4 ½ h.

3.1.2.2 Löslichkeitstest von 229E-X

Für den Löslichkeitstest wurde nur der Grundpuffer 1 (50 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 8,0) verwendet (Abschnitt 2.1.3). Abbildung 3.6 zeigt das Ergebnis nach der SDS-PAGE. Bei allen Ansätzen konnte eine Bande für die X-Domäne mit N-terminalem His₆-Tag (His₆-229E-X, 21,3 kDa) im Gel detektiert werden. Zur Bestätigung wurde ein Western-Blot durchgeführt (Abbildung 3.6). Das Protein zeigte eine höhere Löslichkeit bei Zusatz von Glycerol (d), DTT (e), OG (f) und Dodecylmaltosid (g).

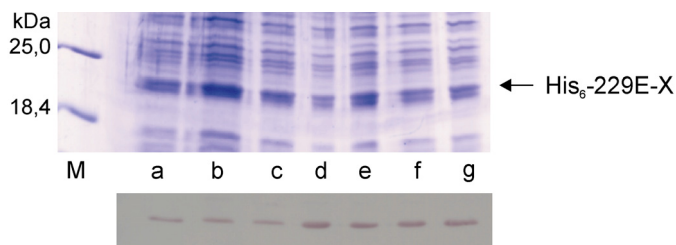


Abbildung 3.6: Löslichkeitstest von 229E-X mit N-terminalem His₆-Tag (His₆-229E-X). Oben: SDS-PAGE, unten: Western-Blot; Grundpuffer: 50 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 8,0; Zusätze: a = ohne Zusatz, b = 1% (v/v) Tween 20, c = 1% (v/v) Triton X-100, d = 10% (v/v) Glycerol, e = 5 mM DTT, f = 0,1% (w/v) OG, g = 0,17 mM Dodecylmaltosid.

Für die weitere Arbeit wurde die Gen-Expression der X-Domäne von HCoV-229E in *E. coli* BL21 (DE3) nach Induktion mit 0,5 mM IPTG ($OD_{660} = 0,5$) bei 20 °C für 4-5 h durchgeführt. Der Zellaufschluss erfolgte in 50 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8,0 unter Zusatz von 10% (v/v) Glycerol.

3.1.2.3 Abspaltung des His₆-Tag von 229E-X mit der TEV-Protease

Die proteolytische Spaltung des His₆-229E-X wurde zunächst im kleinen Maßstab durchgeführt (Abschnitt 2.2.3.8). Die X-Domäne und die TEV-Protease wurden dazu im molaren Verhältnis von 1:20, 1:40 und 1:100 (Protease : X-Domäne) bei 20 °C inkubiert. Bereits nach 2 h Inkubation zeigte sich in allen Proben leichtes Präzipitat und nach Inkubation über Nacht eine starke Trübung. Abbildung 3.7 zeigt das Ergebnis nach SDS-PAGE und Western-Blot.

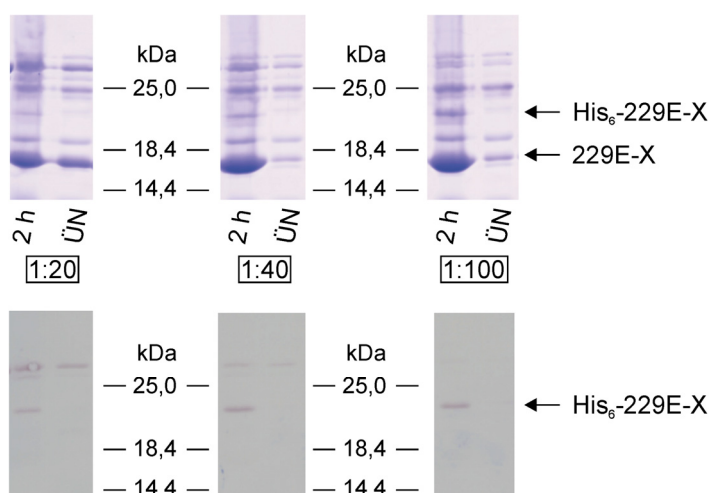


Abbildung 3.7: Proteolytische Spaltung des His₆-229E-X mit der TEV-Protease. Oben: SDS-PAGE, unten: Western-Blot. Banden, die dem 229E-X mit und ohne His₆-Tag entsprechen, sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. ÜN: über Nacht, M: Marker.

In den Proben nach 2 h Inkubation konnten Banden für das 229E-X mit und ohne His₆-Tag (21,3 kDa bzw. 18,8 kDa) detektiert werden. In den Proben nach Inkubation über Nacht konnte im Western-Blot keine Bande für His₆-229E-X beobachtet werden. Eine Bande für das His₆-Tag-freie 229E-X war nach SDS-PAGE erkennbar. Die Bande war jedoch aufgrund der starken Präzipitation deutlich schwächer ausgeprägt als nach 2 h Inkubation (trotz gleicher Volumina beim Probenauftrag). Eine Wiederholung des Versuchs mit einem molaren Verhältnis von 1:40 und Inkubation über Nacht bei 4 °C zeigte ebenfalls starkes Präzipitat im Spaltansatz.

3.1.2.4 Aufreinigung von 229E-X

Die erste Aufreinigung der HCoV-229E X-Domäne beinhaltete die Abspaltung des His₆-Tags mit der TEV-Protease (1:40-Verhältnis, 4 °C, über Nacht). Auch hier war die Bildung von Präzipitat zu beobachten (Abschnitt 3.1.2.3). Die Proteinlösung konnte am Ende der Aufbereitung lediglich auf 1,8 mg/ml konzentriert werden. Aufgrund der Instabilität der Proteinlösung wurde daher auf eine proteolytische Spaltung des His₆-229E-X verzichtet. Die Aufreinigung erfolgte somit mit der Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie und dem Pellet einer 1 l-Kultivierung. Nach Vereinigung der Proben aus der Elution von der HisTrap™ FF 5 ml-Säule befanden sich noch mehrere Verunreinigungen in der Proteinlösung (Abbildung 3.8). Diese konnten durch Größenausschlussfiltration (Umpufferung in 10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,5) entfernt und die X-Domäne von HCoV-229E in hoher Reinheit gewonnen werden. Durch Größenausschlussfiltration konnte für das Protein eine molare Masse von 21,7 kDa ermittelt werden (erwarteter Wert 21,3 kDa). Das Protein lag somit als Monomer in der Lösung vor. Die Proteinlösung konnte auf 10,0 mg/ml – 17,2 mg/ml konzentriert werden.

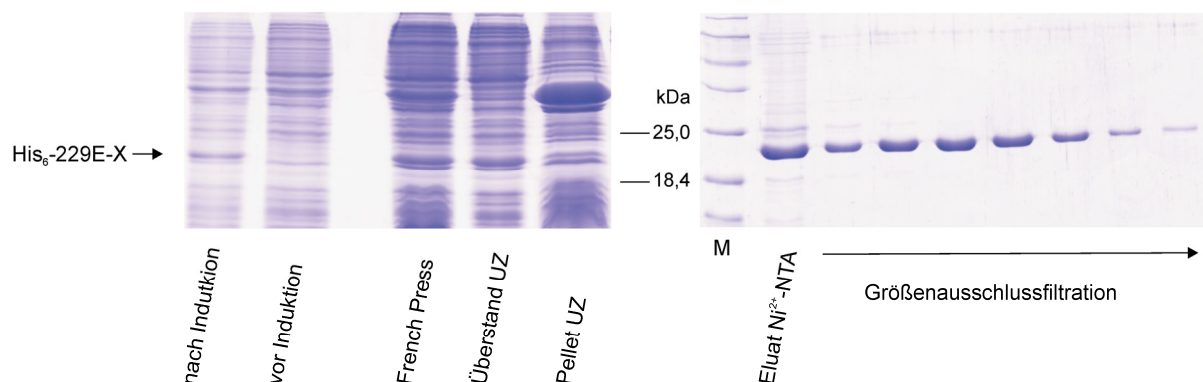


Abbildung 3.8: Aufreinigung von 229E-X mit N-terminalem His₆-Tag (21,3 kDa). Links: Gesamtzelllysats nach und vor Induktion, Proben nach Zellaufschluss und Ultrazentrifugation (UZ); rechts: Proben nach Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie und Größenausschlussfiltration. M: Marker.

Im Gegensatz zum NL63-X bzw. NL63-Xst zeigte sich bei der X-Domäne von HCoV-229E bereits nach einem Tag Lagerung bei 4 °C Präzipitatbildung. Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Zentrifugation (16000 x g, 4 °C, 10 min) zeigte eine Abnahme von 17 mg/ml auf 15 mg/ml nach 72 h und auf 11 mg/ml nach 96 h Lagerung bei 4 °C. Es musste somit eine zügige Verarbeitung der aufgereinigten Proteinlösung erfolgen. Für die gesamten

Experimente wurde die Nsp3 X-Domäne des HCoV-229E mit N-terminalem His₆-Tag eingesetzt. Zur Vereinfachung wird jedoch trotzdem die Abkürzung 229E-X verwendet.

3.1.3 Die X-Domäne von IBV (IBV-X)

3.1.3.1 Gen-Expression

Wie beim 229E-X so wurde auch das Gen für die X-Domäne des IBV in den Vektor pET-M11 kloniert und von Prof. Dr. Eric J. Snijder (Molecular Virology Laboratory – Department of Medical Microbiology, Leiden University Medical Center, Leiden, Netherlands) zur Verfügung gestellt. Die Proteinproduktion erfolgte somit ebenfalls mit einem N-terminalen His₆-Tag und der Spaltstelle für die TEV-Protease (MKHHHHHPMSDYDIPTTENLYFQ↓GAMA).

Zur Gen-Expression wurde das Plasmid in *E. coli* BL21 (DE3)- und Tuner (DE3) pLacI-Zellen transformiert. In Anlehnung an die Produktion des NL63-X und 229E-X erfolgte die Induktion mit 0,5 mM IPTG bei OD₆₆₀ von ~0,5 und die Expression wurde bei 20 °C für 4 h durchgeführt. In beiden *E. coli*-Stämmen konnte eine ähnliche Proteinproduktion nach SDS-PAGE detektiert werden.

3.1.3.2 Löslichkeitstest von IBV-X

Nach Gen-Expression in *E. coli* BL21 (DE3) und Tuner (DE3) pLacI wurde ein Löslichkeitstest durchgeführt (Abschnitt 2.2.3.3). Das Ergebnis nach SDS-PAGE ist in Abbildung 3.9 zu sehen.

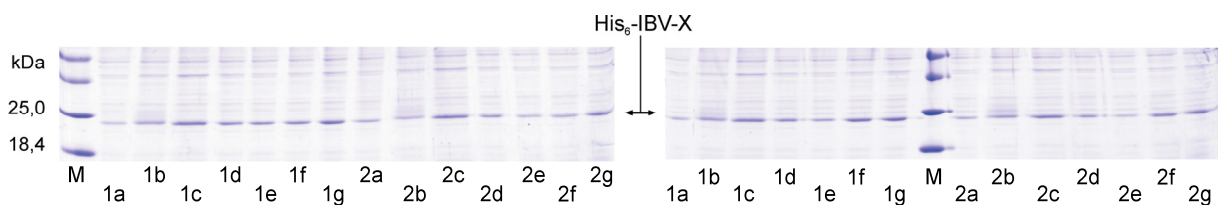


Abbildung 3.9: Löslichkeitstest von IBV-X mit N-terminalem His₆-Tag (His₆-IBV-X, 22,4 kDa). Links: nach Gen-Expression in *E. coli* BL21 (DE3); rechts: nach Gen-Expression in *E. coli* Tuner pLacI (DE3); Grundpuffer 1: 50 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 8,0; Grundpuffer 2: 20 mM N-Phosphat, 500 mM NaCl, pH 7,4; Zusätze: a = ohne Zusatz, b = 1% (v/v) Tween 20, c = 1% (v/v) Triton X-100, d = 10% (v/v) Glycerol, e = 5 mM DTT, f = 0,1% (w/v) OG, g = 0,17 mM Dodecylmaltosid; M: Marker.

In allen Proben konnte eine Bande mit der erwarteten Molmasse von 22,4 kDa für das IBV-X mit terminalem His₆-Tag (His₆-IBV-X) detektiert werden. Unabhängig vom verwendeten *E. coli*-Stamm während der Expression und dem Grundpuffer war die Löslichkeit des Proteins am besten unter Zusatz von Triton X-100 (c), Glycerol (d), n-Octyl- β -D-glykopyranosid (OG, f) und Dodecylmaltosid (g). Beim Vergleich der *E. coli*-Stämme in Bezug auf die Löslichkeit des Proteins war die Ausbeute bei der Expression mit BL21 (DE3) höher als mit Tuner (DE3) pLacI. Bei den Proben unter Verwendung von Grundpuffer 1 (50 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 8,0) waren die Banden für das His₆-IBV-X geringfügig intensiver gefärbt.

Für die weitere Arbeit wurde die Gen-Expression in *E. coli* BL21 (DE3) bei OD₆₆₀ = 0,5 mit 0,5 mM IPTG induziert und bei 20 °C für 4-5 h durchgeführt. Der Zellaufschluss mit der French Press erfolgte in 50 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8,0 unter Zusatz von 0,25% (v/v) Triton X-100.

3.1.3.3 Abspaltung des His₆-Tag von IBV-X mit der TEV-Protease

Die Abspaltung des His₆-Tags mit der TEV-Protease wurde im kleinen Maßstab getestet (Abschnitt 2.2.3.8). Dabei wurde das His₆-IBV-X mit der TEV-Protease im molaren Verhältnis von 1:20, 1:50 und 1:100 (Protease : X-Domäne) bei 20 °C inkubiert. Zur Überprüfung der proteolytischen Spaltung wurde ein Western-Blot durchgeführt (Abbildung 3.10).

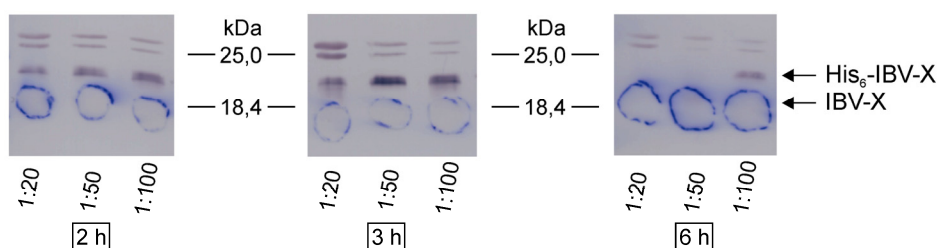


Abbildung 3.10: Proteolytische Spaltung des His₆-IBV-X mit der TEV-Protease. Die bräunlich-rot-gefärbten Banden bei 22,4 kDa repräsentieren das IBV-X mit N-terminalem His₆-Tag (His₆-IBV-X). Die Kreise zeigen die Positionen des IBV-X (19,4 kDa) nach der Abspaltung. Diese wurden aufgrund des fehlenden His₆-Tags im Western-Blot nicht angefärbt und wurden daher nach Färbung mit Ponceau S-Lösung sichtbar gemacht und mit einem Kugelschreiber umrandet. Die bräunlich-rot-gefärbte Doppelbande in Höhe der 25 kDa-Markerbande stammt von der TEV-Protease mit N-terminalem His₆-Tag.

Die proteolytische Spaltung des His₆-IBV-X war nach 2 bzw. 3 h Inkubation noch nicht vollständig. Bei einem molaren Verhältnis von 1:20 und 1:50 ist nach 6 h Inkubation keine Bande auf Höhe des ungespaltenen Proteins (22,4 kDa) zu erkennen. Lediglich beim 1:100-Ansatz war die Abspaltung noch nicht vollständig, wie in Abbildung 3.10 ersichtlich.

Zur Abspaltung des His₆-Tags während der Aufreinigung der IBV X-Domäne wurde die Proteinlösung im Folgenden mit der TEV-Protease im molaren Verhältnis von 1:40 für 13 h bei 20 °C inkubiert.

3.1.3.4 Aufreinigung von IBV-X

Die Aufreinigung der IBV X-Domäne erfolgte mit der Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie und dem Pellet einer 1 l-Kultivierung. Wie aus Abbildung 3.11a ersichtlich, war fast die gesamte Proteinmenge löslich und befand sich nach Ultrazentrifugation im zytosolischen Überstand (22,4 kDa). Nur ein geringer Teil verblieb im Pellet. Nach der Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie wurden die Fraktionen, die das Protein enthielten, vereint und mittels Größenausschlussfiltration weiter aufgereinigt. Gleichzeitig wurde ein Pufferwechsel zu 50 mM Tris, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 8,0 für die folgende Abspaltung des His₆-Tags vorgenommen. Die Proteinlösung wurde mit TEV-Protease im molaren Verhältnis von 1:40 bei 20 °C für 13 h inkubiert. Durch erneute Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie wurde die His₆-Tag-freie IBV X-Domäne (19,4 kDa) vom His₆-Tag und der TEV-Protease getrennt. Im letzten Aufreinigungsschritt, einer weiteren Größenausschlussfiltration, wurde das Protein in 10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,5 umgepuffert. Aus dem Elutionsvolumen der Größenausschlussfiltration konnte eine molare Masse von 20,4 kDa ermittelt werden (erwarteter Wert 19,4 kDa). Das Protein lag somit als Monomer in der Lösung vor.

Abbildung 3.11b zeigt Proben aus den einzelnen Stufen der Aufreinigung. In der letzten Bahn (Proteinlösung nach der letzten Größenausschlussfiltration) ist zu erkennen, dass das Protein mit hoher Reinheit aufbereitet werden konnte. Die Konzentration der Proteinlösung wurde mit der Bradford-Methode bestimmt und lag bei 11,6 mg/ml – 31,0 mg/ml.

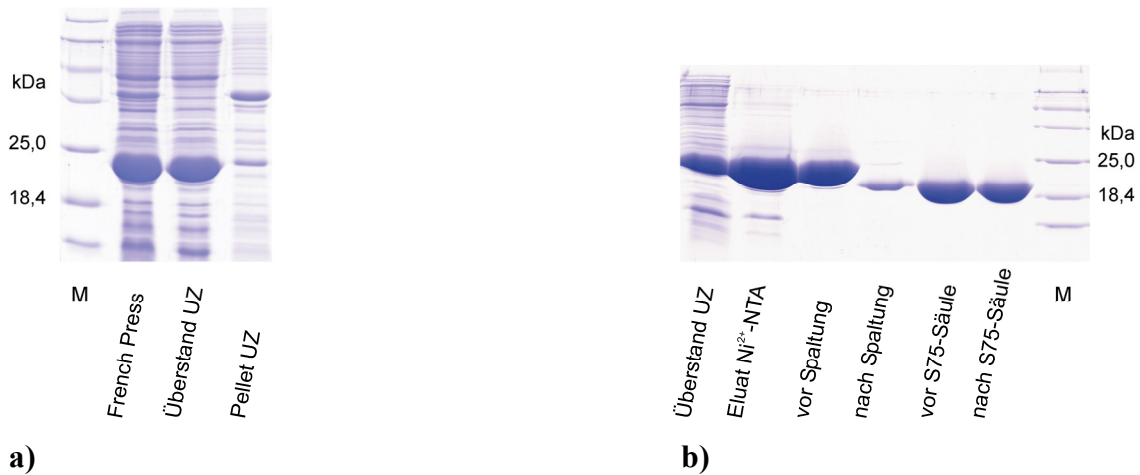


Abbildung 3.11: Aufreinigung des IBV-X. a) Proben nach Zellaufschluss und Ultrazentrifugation (UZ); b) Proben nach Ultrazentrifugation (UZ), Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie, Abspaltung des His_6 -Tags und der letzten Größenausschlussfiltration; M: Marker.

3.2 NTPase-Aktivität und Interaktionsstudien der coronaviralen X-Domäne

3.2.1 NTPase-Aktivität der X-Domäne

Das Substrat ADP-Ribose-1 ϵ -Phosphat war leider nicht kommerziell erhältlich und auch auf anderem Wege nicht zugänglich. Somit konnten die hier bearbeiteten X-Domänen nicht auf ADRP-Aktivität getestet werden.

Im NTPase-Assay wurden Pyrophosphat, ATP, GTP, UTP und ADP mit NL63-X (teilweise auch mit 229E-X [PP, ATP]) inkubiert und über die Messung an freiem Phosphat auf eine mögliche Phosphatase-Aktivität untersucht (Abschnitt 2.2.4.6). Die Absorptionswerte der Proben mit Protein und Substrat waren etwa gleich denen der Negativkontrolle (Probe mit Substrat, aber ohne Protein). Eine Phosphatase-Aktivität der X-Domäne von HCoV-NL63 und von HCoV-229E konnte mit den hier getesteten Substraten somit nicht nachgewiesen werden. Dies ist in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen für die X-Domäne des HCoV-229E (Putics *et al.*, 2005). Putics *et al.* zeigten, dass das Protein eine hohe Spezifität für ADP-Ribose-1 ϵ -Phosphat besitzt und andere Nukleotide wie AMP, ADP und ATP nicht umgesetzt werden.

3.2.2 Identifizierung von Bindungspartnern

In Hinblick auf die ADP-Ribose-1 ϵ -Monophosphatase-Aktivität der coronaviralen X-Domäne (Putics *et al.*, 2005, 2006; Saikatendu *et al.*, 2005; Egloff *et al.*, 2006) wurde die

Wechselwirkung von NL63-X, 229E-X und IBV-X mit ADP-Ribose, dem Produkt der Reaktion, und anderen zur Verfügung stehenden Molekülen mittels der Zonen-Interferenz-Gelelektrophorese (ZIGE, Abschnitt 2.2.4.7) untersucht. Das hier angewendete Verfahren basiert auf der Methode von Abrahams *et al.* (1988). Es ermöglicht die Untersuchung von Interaktionen auch bei geringer Affinität des Proteins zum Liganden.

3.2.2.1 Bindungspartner von NL63-X/NL63-Xst

Abbildung 3.12 zeigt den Einfluss von verschiedenen Nukleotiden inkl. ADP-Ribose (ADPR) auf die Wanderung von NL63-Xst im ZIGE-Experiment.

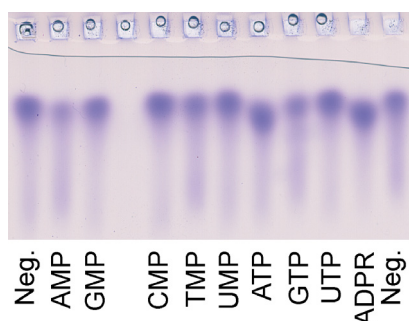


Abbildung 3.12: ZIGE-Experiment zur Untersuchung der Wechselwirkung von NL63-Xst mit verschiedenen Nukleotiden. Proteinkonzentration: 10 μ M; Ligandenkonzentration: 1 mM; ADPR: ADP-Ribose, Neg.: Negativ-Probe.

Der Negativ-Probe wurde Wasser anstelle einer Ligandenlösung zugesetzt. Die Bahn dieser Probe dient somit als Referenz und repräsentiert die Wanderung des Ligand-freien Proteins. Beim Vergleich der Proben zur Referenz ist eine Verschiebung des Proteins besonders bei ATP und ADP-Ribose erkennbar. Bei den Nucleosidmonophosphaten zeigte AMP einen geringen Einfluss auf das Protein. GMP, CMP, TMP und UMP befanden sich auf gleicher Höhe mit der Negativ-Probe. Von den Nucleosidtriphosphaten war eine Verschiebung bei Zusatz des bereits erwähnten ATP zu sehen, mit geringem Abstand zur Referenz auch bei GTP, nicht aber bei UTP.

In einem weiteren ZIGE-Experiment wurden die zur ADP-Ribose strukturell ähnlichen Moleküle NAD^+ , NADH und NADP^+ getestet. Bei der jeweils höheren Konzentration des Liganden konnte eine Verschiebung des Proteins in Anwesenheit von NAD^+ und NADH beobachtet werden, wobei NADH in etwa dem gleichen Maße auf die Wanderung des Proteins wirkte wie ADP-Ribose (Abbildung 3.13). Mit NADP^+ zeigte sich auch bei Einsatz der höheren Konzentration keine Verschiebung des Proteins, wie sie bei NAD^+ und NADH zu sehen war.

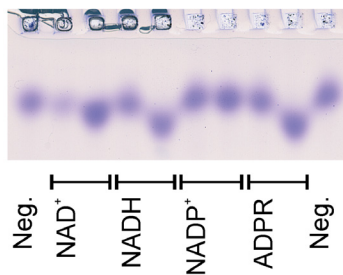
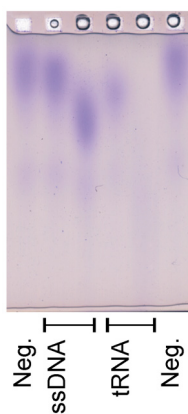


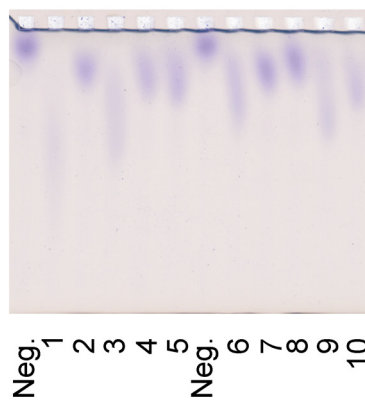
Abbildung 3.13: ZIGE zur Untersuchung der Wechselwirkung von NL63-Xst mit NAD⁺, NADH, NADP⁺ und ADP-Ribose. Proteinkonzentration: 10 μ M; Ligandenkonzentration: jeweils 100 μ M und 1 mM; ADPR: ADP-Ribose, Neg.: Negativ-Probe.

Weiterhin untersucht wurde die Auswirkung auf die Wanderung des Proteins nach Zugabe von Nukleinsäuren. Abbildung 3.14a zeigt, dass sowohl ssDNA als auch tRNA (*E.coli* MRE 600, Roche, Mannheim) eine Verschiebung des Proteins im Vergleich zur Referenz (Negativ-Probe) weiter in Richtung Anode bewirkten. In Anwesenheit von 64 μ M tRNA konnte nach Färbung des Agarosegels kein definierter Protein-Spot, sondern lediglich ein leichter Schmier bis zum Ende des Gels detektiert werden.

Durch Verwendung von DNA-Primern unterschiedlicher Zusammensetzung sollte die Spezifität der Wechselwirkung von NL63-X mit ssDNA näher untersucht werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.14b dargestellt und die Zusammensetzung der DNA-Primer ist unter Materialien und Methoden (Tabelle 2.1) aufgelistet. Die DNA-Primer wurden zufällig ausgewählt (aus den PCR-Versuchen anderer Experimente) und variierten in der Anzahl (27mer bis 54mer) und Abfolge der Nukleotide.



a)



b)

Abbildung 3.14: ZIGE zur Untersuchung der Wechselwirkung von NL63-X mit a) ssDNA und tRNA (*E. coli*); b) ssDNA (Nukleotidsequenz der Proben 1-10 siehe Tabelle 2.1). Proteinkonzentration: 10 μ M, Ligandenkonzentration: a) jeweils 8 μ M und 64 μ M, b) 64 μ M; Neg.: Negativ-Probe.

Die verschiedenen DNA-Primer hatten einen unterschiedlich starken Einfluss auf die Wanderung des Proteins im ZIGE-Experiment. Nach Analyse der Primer (Anzahl, Zusammensetzung) und Vergleich mit der entstandenen Verschiebung des Proteins im Agarosegel konnte nicht auf ein spezifisches Muster für die Wechselwirkung geschlossen werden.

Die Zugabe von dsDNA (Nukleotidsequenz siehe Tabelle 2.1) hatte dagegen keinen erkennbaren Einfluss auf die Wanderung des Proteins (Abbildung 3.15).

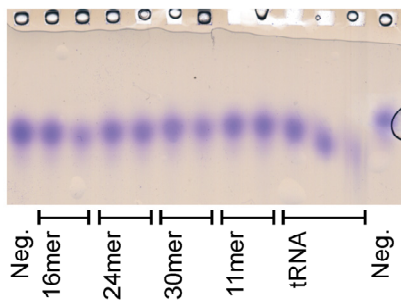


Abbildung 3.15: ZIGE zur Untersuchung der Wechselwirkung von NL63-Xst mit dsDNA (Nukleotidsequenz siehe Tabelle 2.1). Proteinkonzentration: 10 μM , Ligandenkonzentration jeweils: 8 μM und 64 μM ; Neg.: Negativ-Probe.

3.2.2.2 Bindungspartner von 229E-X

Die Auswertung des ZIGE-Experimentes von 229E-X gestaltete sich aufgrund der Instabilität des Proteins etwas schwieriger. Abbildung 3.16 zeigt das Agarosegel nach der Elektrophorese.

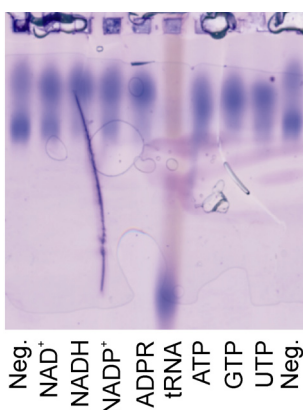


Abbildung 3.16: ZIGE zur Untersuchung der Wechselwirkung von 229E-X mit Nukleotiden und tRNA (*E. coli*). Proteinkonzentration: 10 μM , Ligandenkonzentration: 1 mM (Nukleotide) bzw. 32 μM (tRNA); Neg.: Negativ-Probe.

Eine geringe Verschiebung des Proteins war bei Anwesenheit von NAD^+ und ADP-Ribose zu erkennen. Anders als beim homologen Protein NL63-X zeigte sich neben dem Zusatz von ATP und GTP auch bei UTP eine längere Wanderungsstrecke. Die Zugabe von

tRNA zur Proteinlösung bewirkte wie beim NL63-X eine deutliche Verschiebung des Proteins im Vergleich zur Referenz.

3.2.2.3 Bindungspartner von IBV-X

Von den getesteten Liganden zeigte keiner einen Einfluss auf die Wanderung des IBV-X im ZIGE-Experiment. Abbildung 3.17 zeigt das Ergebnis unter anderem mit getesteten Liganden, welche eine deutliche Verschiebung des Proteins im Versuch mit dem Homolog aus HCoV-NL63 bewirkten.

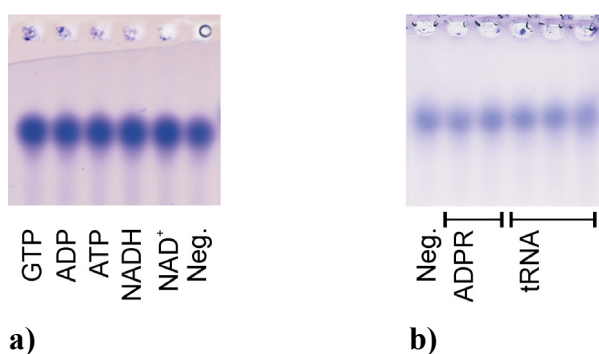


Abbildung 3.17: ZIGE zur Untersuchung der Wechselwirkung von IBV-X mit verschiedenen Nukleotiden und tRNA (*E. coli*). Proteinkonzentration: a) + b) 10 µM; Ligandenkonzentration: a) 1 mM, b) ADPR 1 mM, 100 µM und tRNA 8 µM, 32 µM, 64 µM; Neg.: Negativ-Probe, ADPR: ADP-Ribose.

Die Liganden ATP und NADH zeigten im Versuch mit dem homologen Protein aus HCoV-NL63 eine deutliche Verschiebung des Makromoleküls. Beim IBV-X sind die entsprechenden Proben auf gleicher Höhe wie die Negativ-Probe, die das Protein ohne Zusatz eines Liganden repräsentiert (Abbildung 3.17a). Das Produkt der ADPR-Aktivität, ADP-Ribose, zeigte ebenfalls keinen Einfluss (Abbildung 3.17b). Wie aus Abbildung 3.17b ersichtlich, bewirkte der Zusatz von tRNA auch bei höherer Konzentration (64 µM) keine Wanderung des Proteins weiter in Richtung Anode als die Negativ-Probe. Beim NL63-X (Abbildung 3.14) und beim 229E-X (Abbildung 3.16) zeigten die entsprechenden Proben bei einer Konzentration von 64 µM bzw. 32 µM eine starke Verschiebung der Proteinbanden im Vergleich zur Referenz.

Für das NL63-X/NL63-Xst und das 229E-X konnte eine Wechselwirkung mit ADP-Ribose aber auch mit NAD⁺, NADH und tRNA (*E. coli*) nachgewiesen werden. Für das

NL63-X/NL63-Xst konnte ebenfalls eine Interaktion mit ssDNA gezeigt werden, aber nicht mit dsDNA. Neuman *et al.* (2008) untersuchten ebenfalls das Bindungsverhalten der X-Domäne des SARS-CoV in Bezug auf Nukleinsäuren. Mit der EMSA-Methode (*electrophoretic mobility shift assay*) konnten sie keine Bindung von dsDNA oder ssRNA an die X-Domäne nachweisen. Für das IBV-X konnten keine Interaktionspartner im ZIGE-Experiment identifiziert werden.

3.2.3 Dissoziationskonstante des Komplexes aus X-Domäne und ADP-Ribose

Zur quantitativen Bestimmung der Bindungsaffinität der ADP-Ribose zur coronaviralen X-Domäne wurde die Methode der isothermischen Titrationskalorimetrie (ITC, Abschnitt 2.2.4.8) eingesetzt. Für die X-Domäne des HCoV-NL63 konnte so ein K_D -Wert von 31 μM und für die des HCoV-229E ein K_D -Wert von 29 μM bestimmt werden (Abbildung 3.18). Die Methode wurde auch für das IBV-X angewendet, allerdings konnte in der Auswertung durch die erhaltenen Messpunkte keine Gerade gelegt werden. Die Bestimmung eines K_D -Wertes war somit nicht möglich. Eine mit dieser Methode messbare Bindungsaffinität der ADP-Ribose an IBV-X war nicht vorhanden.

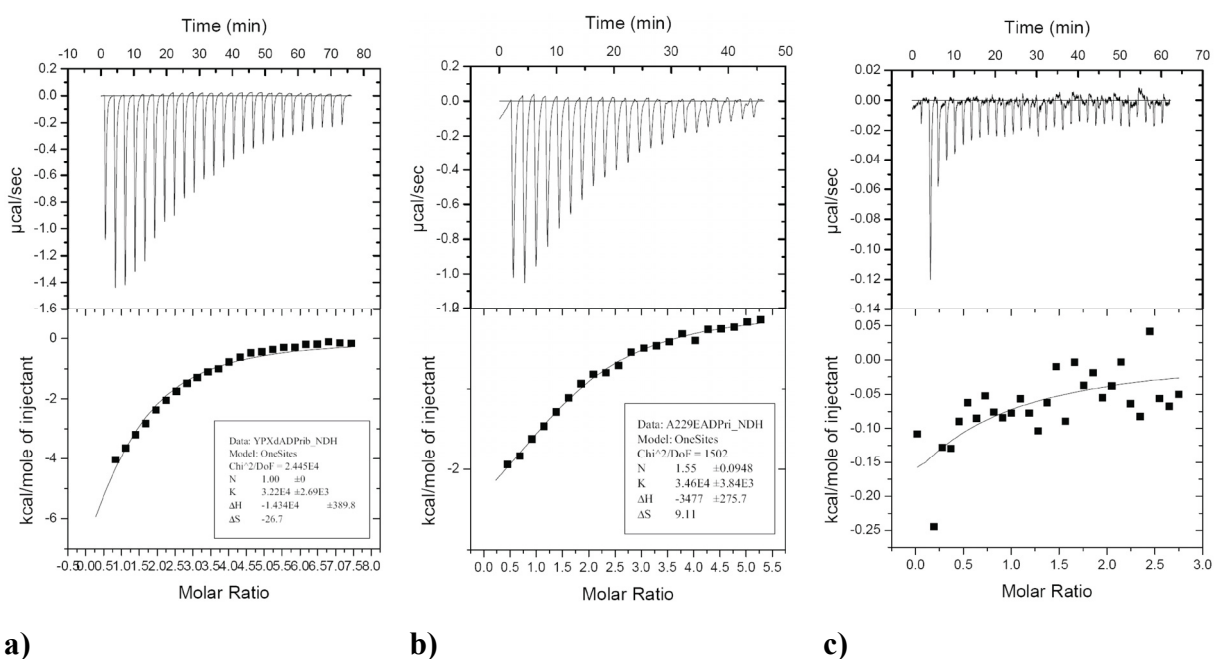


Abbildung 3.18: Graphiken der ITC-Experimente. a) X-Domäne von HCoV-NL63 mit ADP-Ribose; b) X-Domäne von HCoV-229E mit ADP-Ribose.; c) X-Domäne von IBV mit ADP-Ribose.

Für die X-Domäne des SARS-CoV wurde mit der isothermischen Titrationskalorimetrie ein K_D -Wert von 24 μM ermittelt (Egloff *et al.*, 2006). Mit Ausnahme der X-Domäne des IBV zeigen die Proteine dieser Arbeit ähnliche Werte. Die Bindungsaffinität der viralen Proteine ist jedoch deutlich geringer als die der Makrodomäne der Histon-Variante mH2A1.1 ($K_D = 2,7 \mu\text{M}$; Kustatscher *et al.*, 2005) und des Proteins AF1521 aus *Archaeoglobus fulgidus* ($K_D = 126 \text{ nM}$; Karras *et al.*, 2005).

Mit der Bestimmung der Dissoziationskonstanten für den Komplex aus NL63-X bzw. 229E-X mit ADP-Ribose konnten die Ergebnisse aus den ZIGE-Experimenten bestätigt werden. Eine Wechselwirkung von IBV-X mit ADP-Ribose konnte weder im ZIGE-Experiment noch durch ITC detektiert werden. Auch für den Komplex aus X-Domäne (HCoV-NL63) und NAD^+ wurde versucht, die Dissoziationskonstante mit der ITC-Methode zu bestimmen. Aus den gemessenen Werten konnte jedoch kein K_D -Wert bestimmt bzw. eine Bindung des NAD^+ an die X-Domäne des HCoV-NL63 ausgeschlossen werden. Eine Optimierung des Experimentes war im Rahmen dieser Arbeit leider nicht mehr möglich.

3.3 Kristallisation

3.3.1 Kristallisation von NL63-X und NL63-Xst

Im ersten Kristallisationsversuch von NL63-X wurden Ammoniumsulfat und Polyethylenglykol (PEG) 6000 in variierenden Konzentrationen (0,8 M, 1,6 M, 2,4 M und 3,2 M bzw. 5%, 10%, 20% und 30%) und bei verschiedenen pH-Werten (pH 4,0 [Zitronensäure], pH 5,0 [Zitronensäure], pH 6,0 [MES], pH 7,0 [HEPES], pH 8,0 [Tris], pH 9,0 [Bicine]) als Präzipitant verwendet. Insgesamt wurden so 48 unterschiedliche Konditionen mit der Methode des hängenden Tropfens (Abschnitt 2.2.5.2) getestet. Die Konzentration der Proteinlösung betrug 7,3 mg/ml.

Nach sechs Tagen Inkubation bei 12 °C wurde der Kristallisationsansatz das erste Mal unter dem Mikroskop untersucht. Deutlich zu erkennen war die Abhängigkeit der Kristallisation des Proteins vom verwendeten Präzipitanten. Bei einer Konzentration von 5-20% PEG 6000 und einem weiten pH-Bereich von 5,0-9,0 konnten Kristalle von NL63-X beobachtet werden (Abbildung 3.19), wohingegen bei Verwendung von Ammoniumsulfat als Präzipitant kein Kristallwachstum zu beobachten war.

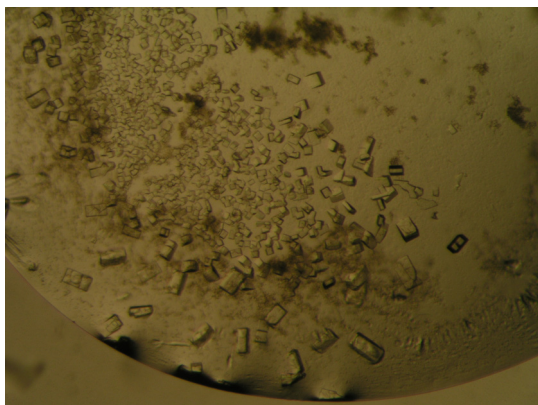


Abbildung 3.19: Kristalle des NL63-X aus dem ersten Kristallisationsversuch. Kondition: 20% PEG 6000, 0,1 M Zitronensäure pH 5,0.

Des Weiteren wurde ein Kristallisationsversuch mit dem kommerziellen Kristallisations-Screen von Sigma (*Crystallization Basic and Extension Kit for Proteins*) in der 96-Well Intelli-Plate angesetzt (Abschnitt 2.2.5.3). Die Proteinlösung hatte eine Konzentration von 6,8 mg/ml. Nach vier Tagen Inkubation bei 12 °C konnte in 14 der 96 Konditionen Kristallwachstum beobachtet werden (siehe Anhang 6.4). Bei 12 der 14 Bedingungen wurde PEG verwendet. Dabei war das Wachstum der Proteinkristalle in Anwesenheit sowohl niedriger (PEG 1500) als auch höherer Polyethylenglykole (PEG 20000) möglich. Die Konzentration des verwendeten PEGs variierte dabei von 10 bis 30%. Wie bereits im ersten Kristallisationsversuch beobachtet wurde, war auch hier die Proteinkristallisation über einen weiten pH-Bereich (pH 6,5-9,0) möglich. Lediglich bei Kondition #27 (*Basic Kit* [0,2 M Na-Citrat, 0,1 M HEPES pH 7,5, 20% 2-Propanol]) und #47 (*Extension Kit* [2 M MgCl₂, 0,1 M Bicine pH 7,5]) konnte Kristallwachstum auch ohne die Anwesenheit von PEG beobachtet werden.

Erste Diffraktionsexperimente zeigten, dass Kristalle, die bei pH 6,5-8,5 gezüchtet wurden, die besten Streubilder lieferten. Kristalle, die aus einer Bedingung mit pH 9,0 wuchsen, zeigten keine Streuung.

Für die weitere Kristallisation von NL63-X wurden PEG 6000/PEG 8000 und ein pH-Bereich von 6,0-8,5 als Basis verwendet. Weiter wurden verschiedene Additive wie z.B. Glycerol, 2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD) oder Ethylenglykol zugesetzt (Abbildung 3.20).

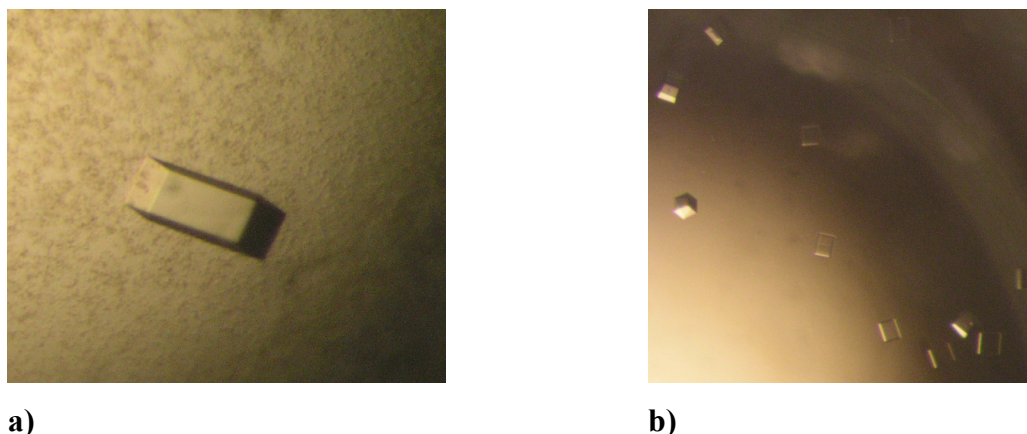


Abbildung 3.20: Kristalle des NL63-X nach Optimierung. a) 10% PEG 6000, 0,1 M MES pH 6,0, 3% Glycerol, b) 10% PEG 6000, 0,1 M HEPES, pH 7,5, 8% Ethylenglykol.

Am zuverlässigsten in Bezug auf das Wachstum der Proteinkristalle und eine gute Streuung der Kristalle (1,60-1,90 Å) war die Verwendung von 10% PEG 8000, 8% Ethylenglykol und 0,1 M HEPES pH 7,5. Der Zusatz von 8% Ethylenglykol war hierbei nicht zwingend notwendig, führte in den meisten Ansätzen aber zu besser geformten, dreidimensionalen Kristallen.

Für die Kristallisation von NL63-Xst (st = *short tag*, Anzahl der zusätzlichen Aminosäurereste am N-Terminus reduziert von 20 auf fünf) wurden die Bedingungen getestet, welche aus den Kristallisationsversuchen von NL63-X bereits bekannt waren. Kleine, einzelne Kristalle konnten auch in diesem Fall bereits wenige Minuten nach dem Ansetzen der Kristallisationsplatte in den getesteten Bedingungen beobachtet werden, welche innerhalb der nächsten 2-3 Tage an Größe zunahmen (Abbildung 3.21). Das Verhalten der Kristalle von NL63-Xst in den Diffraktionsexperimenten war analog zu NL63-X.



Abbildung 3.21: Kristalle des NL63-Xst. Kondition: 10% PEG 8000, 0,1 M HEPES pH 7,5, 8% Ethylenglykol.

3.3.2 Kristallisation von 229E-X

Bei einer Proteinkonzentration von 12,4 mg/ml wurden die 96 Bedingungen des Sigma-Screens (*Crystallization Basic and Extension Kit for Proteins*) für die Kristallisation von 229E-X im sitzenden Tropfen-Verfahren getestet (Abschnitt 2.2.5.3). In vier der 96 Konditionen konnten nach zwei Tagen Inkubation bei 12 °C Kristalle beobachtet werden (siehe Anhang 6.4). Basierend auf diesen Bedingungen wurde ein Screen mit 96 verschiedenen Konditionen angesetzt. Dabei wurden folgende Parameter jeweils miteinander kombiniert:

- 10%, 20% und 30% PEG 400, PEG 4000, PEG 6000 und PEG 10000
- 0,1 M HEPES pH 7,5 und 0,1 M Tris pH 8,5
- Zusätze: - 0,2 M Na-Acetat
 - 10% Propanol
 - 5% MPD
 - ohne Zusatz

Aus diesem Screen konnte das Kristallwachstum von 229E-X auf eine PEG-Konzentration von 20-30% eingegrenzt werden. Dabei war die Kristallisation des Proteins bei pH 7,5 genauso häufig wie bei pH 8,5. Zusätze waren nicht zwingend notwendig, bessere Ergebnisse konnten aber bei Verwendung von 5% MPD erzielt werden.

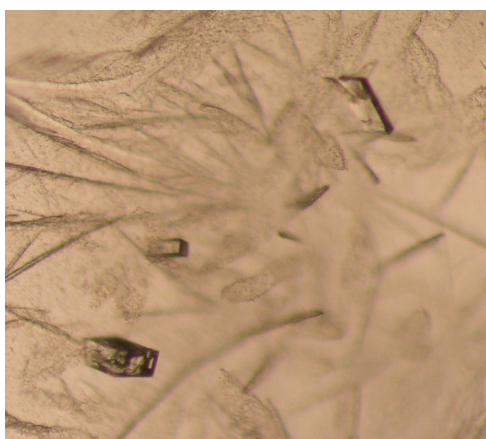
Im nächsten Ansatz wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Kristallisation genauer überprüft und weitere Zusätze getestet. Die folgenden Parameter wurden dabei miteinander kombiniert:

- 10%, 20% und 30% PEG 4000 und PEG 8000
- 0,1 M Na-Citrat pH 5,6, 0,1 M Bis-Tris pH 6,5, 0,1 M HEPES pH 7,5 und 0,1 M Tris pH 8,5
- Zusätze: - 5% und 8% MPD
 - 0,01 M und 0,05 M MgCl₂
 - 3% und 5% Glycerol
 - 5% und 8% Ethylenglykol

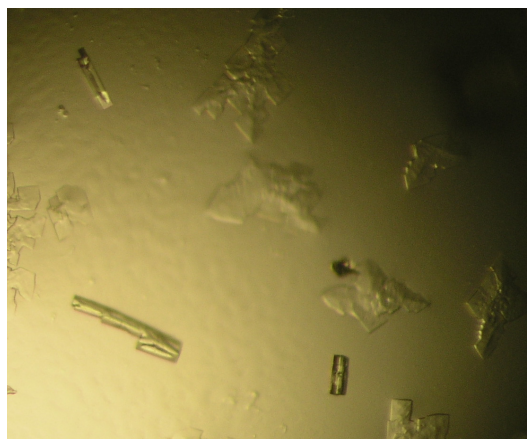
Bei pH 5,6 konnten keine und unter Verwendung von pH 6,5 konnten in einer Bedingung Kristalle beobachtet werden. Konditionen mit einem pH-Wert von 7,5 und 8,5

waren am besten geeignet für das Kristallwachstum (Abbildung 3.22a). In Bezug auf die unterschiedlichen Zusätze zeigte sich in den Ansätzen ein ähnliches Kristallwachstum.

Die Kristallisation von 229E-X war nicht in dem Maße reproduzierbar wie beim NL63-X. Kristallwachstum wurde häufiger beobachtet bei Verwendung der Methode des sitzenden Tropfens im Gegensatz zum hängenden Tropfen. Die einzelnen Bedingungen wurden teilweise mehrfach angesetzt, da trotz gleicher Zusammensetzung der Lösung nicht in jedem Fall Proteinkristalle wuchsen oder von schlechter Qualität waren (Abbildung 3.22b). Im Diffraktionsexperiment streuten die Kristalle bis 1,78 Å.



a)



b)

Abbildung 3.22: Kristalle des 229E-X. a) 20% PEG 8000, 0,1 M Tris pH 8,5, 5% MPD; b) 20% PEG 8000, 0,1 M HEPES pH 7,5.

3.3.3 Kristallisation von IBV-X

Mit der Methode des sitzenden Tropfens in der 96-Well Intelli-Plate wurden 96 Bedingungen des kommerziellen Sigma-Screens (*Crystallization Basic and Extension Kit for Proteins*) für die Kristallisation von IBV-X getestet (Abschnitt 2.2.5.3). Die Proteinkonzentration betrug 11,7 mg/ml. Nach Inkubation über Nacht bei 12 °C konnten in drei der 96 Konditionen Kristalle unter dem Mikroskop beobachtet werden:

- 0,2 M MgCl₂, 0,1 M Tris pH 8,5, 30% PEG 4000 (#6 *Basic*)
- 0,2 M Mg-Acetat, 0,1 M Na-Cacodylat pH 6,5, 20% PEG 8000 (#18 *Basic*)
- 0,2 M Kalium-, Natrium-Tartrat, 2 M (NH₄)₂SO₄, 0,1 M Na-Citrat pH 5,6 (#14 *Extension*)

In einem weiteren Experiment im 96er-Maßstab wurde überprüft, ob die Kristallisation von IBV-X mit diesen drei Bedingungen reproduzierbar war. Zudem wurde das Kristallisationsvermögen bei ähnlichen Bedingungen untersucht. Die folgenden Parameter wurden dabei miteinander kombiniert:

- 0,1 M Na-Citrat pH 5,6, 0,1 M Na-Cacodylat pH 6,5, 0,1 M HEPES pH 7,5 und 0,1 M Tris pH 8,5
- Präzipitanten: - 5%, 10%, 20% und 30% PEG 4000 und PEG 8000
- 1,8 M, 2,0 M, 2,2 M und 2,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Zusätze: - 0,2 M MgCl_2
- 0,2 M Mg-Acetat
- 0,2 M Kalium-, Natrium-Tartrat

Daraus ergaben sich 48 verschiedene Bedingungen. In den verbliebenen 48 Ansätzen wurde auf den Zusatz von MgCl_2 , Mg-Acetat bzw. Kalium-, Natrium-Tartrat verzichtet. Kristallwachstum konnte in den Bedingungen #6 und #14 des kommerziellen Sigma-Screens reproduziert werden. Beim Ansatz, welcher der #18 entsprach, kristallisierte das Protein bei pH 6,5 nicht. Bezüglich der Kristallisation mit PEG 4000 oder PEG 8000 lag die optimale Konzentration des Präzipitanten bei 20 bzw. 30%. Des Weiteren wurden die besten Ergebnisse bei pH-Werten von 7,5 und 8,5 erzielt. Speziell bei Verwendung von 30% PEG 8000 und 0,2 M Mg-Acetat war der Einfluss des pH-Wertes auf das Kristallwachstum sehr deutlich. So zeigten sich bei pH 6,5 Nadelbüsche, bei pH 7,5 kleinere, verwachsene Kristalle und bei pH 8,5 Einzelkristalle (Abbildung 3.23). Dringend notwendig war bei den Ansätzen mit PEG der Zusatz von MgCl_2 oder Mg-Acetat. In Abwesenheit der Mg^{2+} -Ionen blieben alle Tropfen mit PEG als Präzipitanten klar.

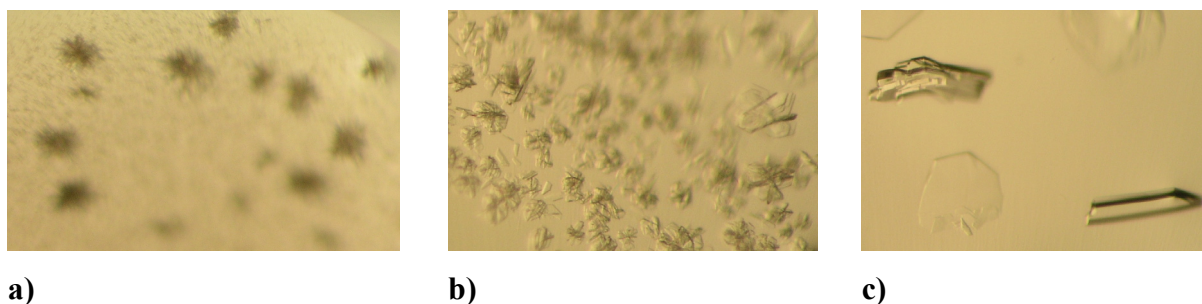
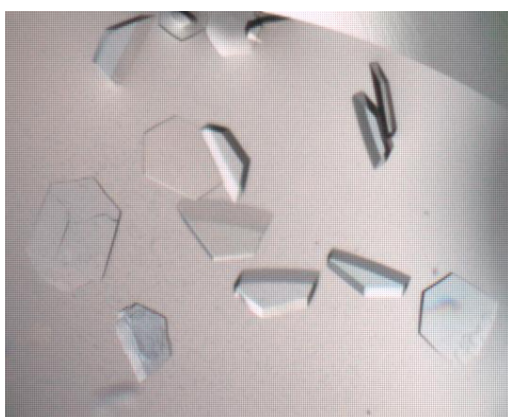


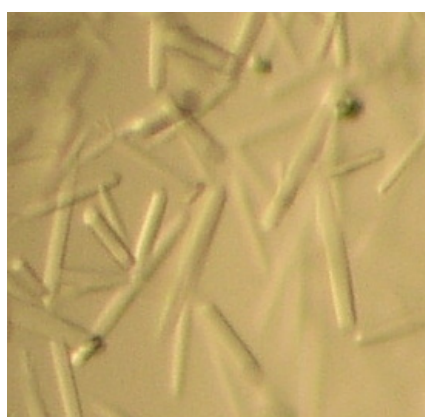
Abbildung 3.23: Abhängigkeit des Kristallwachstums von IBV-X vom pH-Wert. a) pH 6,5; b) pH 7,5; c) pH 8,5.

Die Kristallisation mit Ammoniumsulfat als Präzipitant war stark pH-abhängig. Proteinkristalle konnten nur bei pH 5,6 beobachtet werden. Die Anwesenheit von Kalium-, Natrium-Tartrat war nicht zwingend notwendig. Einzelne Kristalle geeigneter Größe wurden bei einer Ammoniumsulfat-Konzentration von 1,8 M gezüchtet.

Mit der Methode des sitzenden Tropfens konnte IBV-X während der weiteren Arbeit zuverlässig in zwei unterschiedlichen, dreidimensionalen Formen kristallisiert werden. Bei 30% PEG 4000 oder 8000, 0,1 M oder 0,2 M MgCl_2 und 0,1 M HEPES pH 7,5 oder Tris pH 8,5 hatten die Kristalle eine hexagonale bzw. halbhexagonale Form. Stäbchenförmige Kristalle wuchsen bei Verwendung von 1,8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 M Na-Citrat pH 5,6 mit und ohne 0,2 M oder 0,1 M Kalium-, Natrium-Tartrat. Direkt nach dem Ansetzen der Kristallisationsversuche blieben alle Tropfen klar. Nach Inkubation über Nacht bei 12 °C konnten einzelne Kristalle geeigneter Größe beobachtet werden (Abbildung 3.24).



a)



b)

Abbildung 3.24: Kristallformen des IBV-X. a) hexagonale bzw. halbhexagonale Form (30% PEG 4000, 0,2 M MgCl_2 , 0,1 M Tris pH 8,5), b) Stäbchenform (1,8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 M Kalium-, Natrium-Tartrat, 0,1 M Na-Citrat pH 5,6).

Die gezüchteten Kristalle des IBV-X zeigten bei Verwendung beider Präzipitanten ein reproduzierbares Verhalten in den Diffraktionsexperimenten. Kristalle in der hexagonalen bzw. halbhexagonalen Form (PEG als Präzipitant) streuten bis 1,60 Å und in der Stäbchenform (Ammoniumsulfat als Präzipitant) bis 1,90 Å.

3.3.4 Co-Kristallisation und *Soaking*-Experimente mit NL63-Xst

In den Interaktionsstudien konnte eine Affinität der X-Domäne von HCoV-NL63 und HCoV-229E zu ADP-Ribose und NAD^+ gezeigt werden (Abschnitt 3.2). Im Folgenden wurde versucht, die Struktur der Komplexe zu bestimmen, um die Protein-Ligand-Wechselwirkungen strukturell zu charakterisieren.

Für die Co-Kristallisation und die *Soaking*-Experimente wurde das NL63-Xst eingesetzt (Abschnitt 2.2.5.4 und 2.2.5.5). Das 229E-X wurde aufgrund der Instabilität der Proteinklösung und der Proteinkristalle nicht verwendet. Wie bereits erwähnt, wurde beim NL63-Xst (st = *short tag*) die Anzahl der zusätzlichen Aminosäurereste am N-Terminus von 20 (beim NL63-X) auf fünf reduziert. Ein Einfluss der zusätzlichen Aminosäurereste auf die Bindung der Liganden im Kristall sollte dadurch verringert werden.

3.3.4.1 Co-Kristallisation mit ADP-Ribose und NAD^+

Für die Kristallisation der Komplexe wurde die Proteinklösung zunächst mit der Ligandenlösung (Endkonzentration: 5 mM) 30 min bei 20 °C inkubiert und anschließend mit der Methode des hängenden Tropfens kristallisiert (Abschnitt 2.2.5.2). Das Kristallwachstum wurde bei pH 6,5, pH 7,5 und pH 8,5 getestet. Die Protein-Ligand-Kristalle hatten eine andere Morphologie als die Kristalle des Ligand-freien Proteins. Bei Verwendung von NAD^+ als Ligand war das Wachstum dreidimensionaler Kristalle auf einen pH von 6,5 beschränkt (Abbildung 3.25a, b). Die Co-Kristallisation mit ADP-Ribose war bei pH 7,5 möglich (Abbildung 3.25c). Alle getesteten Kristalle zeigten keine Streuung im Diffraktionsexperiment bei 100 K. Eine Optimierung der Co-Kristallisation von NL63-Xst mit ADP-Ribose und NAD^+ war im Rahmen dieser Arbeit leider nicht mehr möglich.

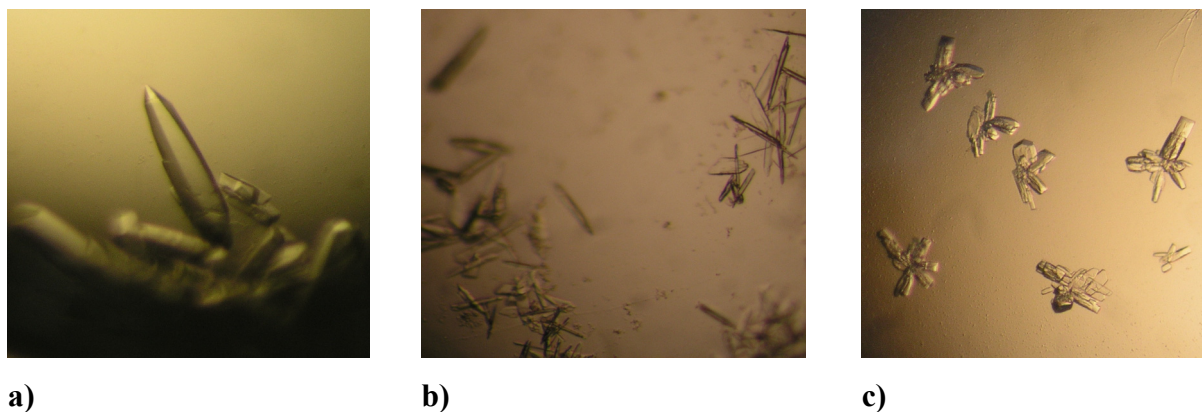


Abbildung 3.25: Co-Kristallisation von NL63-Xst mit NAD^+ (a, b) und ADP-Ribose (c). a) 10% PEG 8000, 0,1 M MES pH 6,5, 8% Ethylenglykol, 5 mM NAD^+ , b) 10% PEG 8000, 0,1 M HEPES pH 7,5, 5 mM NAD^+ , c) 10% PEG 8000, 0,1 M HEPES pH 7,5, 5 mM ADP-Ribose.

3.3.4.2 Soaking-Experimente mit ADP-Ribose und NAD^+

Das *Soaking* der NL63-Xst-Kristalle mit ADP-Ribose- und NAD^+ -Lösung hatte unterschiedliche Auswirkungen. Wenige Sekunden nach dem Transfer des Proteinkristalls in die *Soaking*-Lösung mit ADP-Ribose löste dieser sich bereits bei einer geringen Konzentration von ADP-Ribose auf. Bei Anwesenheit von NAD^+ in der *Soaking*-Lösung war eine morphologische Veränderung am Kristall sichtbar, die das Auflösen des Kristalls andeutete. Je nach Dauer der Inkubation streuten diese Kristalle bis zu einer Auflösung von 1,90 Å (2 h) bis 2,35 Å (5 h).

3.4 Diffraktionsmessung und Strukturaufklärung

3.4.1 NL63-X

Datensammlung

Der Kristall für die Diffraktionsmessung wurde zuvor aus der Kondition 0,1 M HEPES pH 7,5, 8% Ethylenglykol und 10% PEG 8000 gezüchtet. Zur Datensammlung wurde der Kristall kurz in der Cryoschutzlösung, bestehend aus Reservoirlösung und 30% PEG 400, inkubiert und anschließend in den 100 K kalten Stickstoffstrom überführt. Die Messung erfolgte an der X13-Beamline am DESY (Deutsches-Elektronen-Synchrotron) in Hamburg. Vom Kristall der Nsp3 X-Domäne von HCoV-NL63 konnte so ein vollständiger Datensatz mit einer maximalen Auflösung von 1,90 Å gesammelt werden. Die einzelnen Parameter und Werte der gesammelten Daten sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1: Statistik des NL63-X-Datensatzes. In Klammern sind die Werte für die Schale der höchsten Auflösung angegeben.

	NL63-X
Auflösung [Å]	22,98-1,90 (2,00-1,90)
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Einheitszellparameter	
a [Å]	53,97
b [Å]	54,77
c [Å]	57,33
α, β, γ [°]	90,0; 90,0; 90,0
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$	19,1 (5,8)
R_{merge}^1	0,070 (0,307)
Anzahl aller Reflexe	299.045
Anzahl der unabhängigen Reflexe	13923 (1995)
Redundanz	5,9 (6,0)
Vollständigkeit [%]	99,8 (100,1)
Anzahl der Moleküle/ASU	1
Matthews-Koeffizient [Å ³ Da ⁻¹]	2,32
Flüssigkeitsgehalt [%]	47,0

Molekularer Ersatz und Modellbau

Die Bestimmung der Struktur des NL63-X erfolgte durch molekularen Ersatz mit der Kristallstruktur der Nsp3 X-Domäne aus SARS-CoV (PDB 2ACF; Saikatendu *et al.*, 2005). Die Sequenzidentität der beiden Proteine liegt bei 30%. Das Modell des A-Monomers der SARS-CoV X-Domäne (vier Monomere/ASU) wurde modifiziert, indem größere Loop-Regionen entfernt und Aminosäurereste, die nach dem Sequenz-Alignment mit dem Programm FFAS03 stark voneinander abwichen, bis auf das C_γ-Atom gekürzt oder in Ala-Reste umgewandelt wurden. Dieses Modell wurde dann im molekularen Ersatz verwendet. Die Berechnung des Matthews-Koeffizienten ergab, dass nur ein Molekül pro asymmetrische Einheit möglich war. Das Programm PHASER ergab mit dem Modell und der Suche nach einem Molekül in der asymmetrischen Einheit eine eindeutige Lösung (*Z-Score* Rotationsfunktion (RZF) = 3,9, *Z-Score* Translationsfunktion (TFZ) = 7,9). Der *R*-Faktor nach der ersten Verfeinerung betrug 54,7%. Das Modell konnte durch manuelle Anpassung mit dem Programm COOT und Verfeinerung mit dem Programm REFMAC in mehreren Zyklen in die Elektronendichtekarte eingepasst und zu ca. 86% gebaut werden. Das fertige Modell von NL63-X enthält die Aminosäurereste 1-163 (von insgesamt 164). Alternative Konformationen konnten für Val28, Glu101, Ser105 und Asn140 bestimmt werden. Von den zusätzlichen 20 Aminosäureresten am N-Terminus konnten zehn Reste eingepasst werden,

wobei die Elektronendichte in diesem Bereich nicht sehr gut definiert war. Des Weiteren wurden zwei Ethylenglykol-Moleküle (EDO) eingebaut.

Qualität des Modells

Die Validierung des Strukturmodells für das NL63-X erfolgte während der Verfeinerung anhand der *R*-Faktoren und der geometrischen Daten. Die Qualität des fertigen Modells wurde mit dem Programm PROCHECK überprüft. Tabelle 3.2 zeigt die Parameter nach der letzten Verfeinerung. Die Struktur weist gute *R*- und *B*-Faktoren auf. Die Abweichungen von Standardbindungsängen und –winkeln sind gering. Nach dem Ramachandran-Plot liegen zwei Reste nicht im erlaubten Bereich, Ala-3² und Lys7 (siehe Anhang 6.5). Ala-3 ist einer der 20 zusätzlichen Aminosäurereste am N-Terminus. Die Elektronendichte in diesem Bereich ist nicht so interpretierbar und der korrekte Einbau dieses Restes somit erschwert. Lys7 befindet sich in der Mitte des Loops zwischen dem β 1- und dem β 2-Strang. Die Elektronendichte ist in diesem Bereich sehr gut definiert, so dass Lys7 nicht anders eingepasst werden konnte. Die Koordinaten und Strukturdaten wurden in der Protein-Datenbank (PDB) unter der Bezeichnung 2VRI hinterlegt.

Tabelle 3.2: Verfeinerungsstatistik des Modells für NL63-X.

	NL63-X
Auflösung [$\text{\AA}$]	39,59-1,90
R_{cryst}^3	0,185
R_{free}^4	0,243
Anzahl der Atome	
Protein	1338
Ethylenglykol	8
Wasser	97
Standardabweichungen	
Bindungsänge [$\text{\AA}$]	0,014
Bindungswinkel [$^\circ$]	1,520
<i>B</i> -Faktoren [$\text{\AA}^2$]	
Protein	20,6
Ethylenglykol	38,6
Wasser	28,6

3.4.2 229E-X

Datensammlung

Die Datensammlung für das 229E-X erfolgte an der I911-2-Beamline am MaxLab in Lund, Schweden. Der Kristall wurde zuvor aus der Kondition 20% PEG 8000, 0,1 M Tris pH

8,5 und 5% MPD gezüchtet. Als Cryoschutzlösung für die Messung bei 100 K diente die Reservoirlösung inklusive 30% PEG 400. Die maximale Auflösung betrug 1,78 Å. Die einzelnen Parameter und Werte sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

Tabelle 3.3: Statistik des 229E-X-Datensatzes. In Klammern sind die Werte für die Schale der höchsten Auflösung angegeben.

	229E-X
Auflösung [Å]	24,22-1,78 (1,88-1,78)
Raumgruppe	P2 ₁
Einheitszellparameter	
a [Å]	33,56
b [Å]	65,89
c [Å]	38,02
α, β, γ [°]	90,0; 110,1; 90,0
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$	19,6 (7,8)
R_{merge}	0,052 (0,155)
Anzahl aller Reflexe	101.730
Anzahl der unabhängigen Reflexe	14479 (1946)
Redundanz	4,2 (3,8)
Vollständigkeit [%]	96,9 (89,9)
Anzahl der Moleküle/ASU	1
Matthews-Koeffizient [Å ³ Da ⁻¹]	2,32
Flüssigkeitsgehalt [%]	47,0

Molekularer Ersatz und Modellbau

Als Suchmodell wurde die Struktur von NL63-X (diese Arbeit) verwendet (54% Sequenzidentität der Aminosäuresequenz). Dafür wurden die Seitenketten nicht-konservierter Aminosäurereste bis zum C_γ-Atom gekürzt. Nach der Berechnung des Matthews-Koeffizienten gab es nur ein Molekül in der asymmetrischen Einheit. Der molekulare Ersatz durch das Programm PHASER ergab eine eindeutige Lösung (RFZ = 13,6, TFZ = 9,2) für ein Molekül in der asymmetrischen Einheit. Der *R*-Faktor nach der ersten Verfeinerung betrug 46,0%. Nach mehreren Zyklen manueller Modellanpassung mit dem Programm COOT und Verfeinerung mit dem Programm REFMAC konnte das Modell zu ca. 88% gebaut werden. Das 229E-X ist aus 165 Aminosäureresten aufgebaut, von denen alle in die Elektronendichte eingepasst werden konnten. Für die zusätzlichen 28 Reste am N-Terminus, die den His₆-Tag beinhalten, war keine Elektronendichte sichtbar. Für Asp10, Lys56, Asp100 und Cys157 konnten alternative Konformationen in die Elektronendichte eingebaut werden.

Qualität des Modells

Tabelle 3.4 zeigt die Parameter nach der letzten Verfeinerung. Die Validierung des Modells erfolgte mit dem Programm PROCHECK. 91,7% der Aminosäurereste liegen im bevorzugten Bereich des Ramachandran-Plots (siehe Anhang 6.5). Asp82 liegt noch im erlaubten Bereich und Asp10 außerhalb des erlaubten Bereiches. Für Asp10 wurden zwei Konformationen eingebaut, die sich hinsichtlich der Seitenkette ab dem C_β-Atom unterscheiden. Für eine der beiden Konformationen inkl. des gemeinsamen C_α-Atoms, der Carbonyl und der Amidgruppe ist die Elektronendichte sehr gut interpretierbar. Für Asp82 ist die Elektronendichte ebenfalls sehr gut definiert. Die stereochemischen Parameter für das Modell und auch die *R*-Faktoren sind für die Auflösung von 1,78 Å akzeptabel. Die Koordinaten und Strukturfaktoren wurden in der PDB unter der Bezeichnung 3EJG hinterlegt.

Tabelle 3.4: Verfeinerungsstatistik des Modells für 229E-X.

	229E-X
Auflösung	24,22-1,78
<i>R</i> _{cryst}	0,165
<i>R</i> _{free}	0,205
Anzahl der Atome	
Protein	1283
Wasser	146
Standardabweichungen	
Bindungslänge [Å]	0,013
Bindungswinkel [°]	1,284
<i>B</i> -Faktoren [Å ²]	
Protein	14,3
Wasser	23,7

3.4.3 IBV-X*Datensammlung*

Da für das IBV-X zwei verschiedene Kristallformen vorhanden waren (hexagonale Plättchen und Stäbchen), wurden zwei Datensätze gesammelt. Zur weiteren Unterscheidung wird folgende Bezeichnung verwendet (basierend auf dem bei der Kristallisation verwendeten pH-Wert):

<u>IBV-X85</u>	Kristallisationsbedingung:	30% PEG 4000
		0,1 M Tris <u>pH 8,5</u>
		0,2 M MgCl ₂

<u>IBV-X56</u>	Kristallisationsbedingung:	1,8 M (NH ₄) ₂ SO ₄
		0,1 M Na-Citrat pH 5,6
		0,2 M Kalium-, Natrium-Tartrat

Für jede der beiden Kristallformen des IBV-X konnte ein vollständiger Datensatz bei einer Temperatur von 100 K gesammelt werden. Für IBV-X85 musste der Kristall zuvor nicht in eine Cryoschutzlösung überführt werden. In den Diffraktionsexperimenten konnten keine Eisinge beobachtet werden, so dass der Zusatz von 30% PEG 4000 während der Kristallisation als Cryoschutz bereits ausreichend war. Bei IBV-X56 setzte sich die Cryoschutzlösung aus der Reservoirlösung und 30% Glycerol zusammen. Die Datensammlung wurde an der X13-Beamline am DESY in Hamburg durchgeführt. Die maximale Auflösung für IBV-X85 betrug dabei 1,60 Å und für IBV-X56 2,10 Å. Die Parameter und Werte der Datensätze sind in Tabelle 3.5 dargestellt.

Tabelle 3.5: Statistik der Datensätze für IBV-X56 und IBV-X85. In Klammern sind die Werte für die Schale der höchsten Auflösung angegeben.

	IBV-X56	IBV-X85
Auflösung [Å]	31,28-2,10 (2,21-2,10)	40,00-1,60 (1,64-1,60)
Raumgruppe	P3 ₂ 2	C222 ₁
Einheitszellparameter		
a [Å]	78,20	42,21
b [Å]	78,20	79,81
c [Å]	81,70	99,74
α, β, γ [°]	90,0; 90,0; 120,0	90,0; 90,0; 90,0
<I>/<σ (I)>	25,6 (6,5)	21,7 (6,8)
<i>R</i> _{merge}	0,079 (0,401)	0,103 (0,244)
Anzahl aller Reflexe	503.497	158.270
Anzahl der unabhängigen Reflexe	17123 (2231)	22201 (1448)
Redundanz	11,5 (10,4)	7,1 (6,2)
Vollständigkeit [%]	98,4 (89,4)	97,9 (97,1)
Anzahl der Moleküle/ASU	1	1
Matthews-Koeffizient [Å ³ Da ⁻¹]	3,64	2,15
Flüssigkeitsgehalt [%]	66,3	42,7

Molekularer Ersatz und Modellbau

Für die Bestimmung der Struktur des IBV-X56 standen die coronavirale X-Domäne von SARS-CoV (Saikatendu *et al.*, 2005; Egloff *et al.*, 2006), HCoV-NL63 (diese Arbeit) und HCoV-229E (diese Arbeit) zur Verfügung. IBV-X weist die höchste Sequenzidentität (auf Basis der Aminosäurereste) mit NL63-X auf (25%). Die Struktur von NL63-X wurde daher

zunächst als Ausgangspunkt für den molekularen Ersatz verwendet. Die Seitenketten nicht konservierter Aminosäurereste wurden bis zum C_γ-Atom gekürzt und Loop-Regionen wurden entfernt. Der molekulare Ersatz erfolgte mit den Programmen PHASER und MOLREP. Das Strukturmodell konnte nur schwer in die Elektronendichte eingepasst werden. Nach mehreren Runden manuellem Modellbau mit Coot und Verfeinerung mit REFMAC zeigte sich keine Verbesserung der *R*-Faktoren. Das Modell ließ sich auch nicht durch das automatische Programm ARP/wARP bauen. Als nächstes wurde die X-Domäne des SARS-CoV (19% Sequenzidentität) in analoger Weise für den molekularen Ersatz verwendet. Dies führte ebenfalls nicht zum Erfolg.

Der molekulare Ersatz für das IBV-X56 wurde daraufhin von Dr. Guido Hansen aus dem Institut für Biochemie durchgeführt. Dies erforderte die Überlagerung von acht Koordinatensätzen (1YD9, 1ZR3, 2DX6, 1SPV, 1ZR5, 2ACF, NL63-X [diese Arbeit], 229E-X [diese Arbeit]). Flexible Regionen im Suchmodell wurden entfernt. Zur Verbesserung der initialen Elektronendichte wurde das Modell weiter angepasst. Dazu wurden die Seitenketten einiger Aminosäurereste in Ala umgewandelt und zwei Helices manuell angepasst. Der weitere Modellbau erfolgte mit dem Programm ARP/wARP. Das bis dahin erstellte Modell wurde im Rahmen dieser Arbeit weiter manuell mit dem Programm COOT gebaut und mit dem Programm REFMAC verfeinert. Das IBV-X ist aus 172 Aminosäureresten aufgebaut. Die Aminosäurereste 2-172 konnten in die Elektronendichte eingepasst werden, jedoch war die Elektronendichte erst ab dem sechsten Rest gut definiert. Für die fünf zusätzlichen Aminosäurereste am N-Terminus war keine Elektronendichte sichtbar. Eine alternative Konformation konnte nur für das Asp135 gebaut werden. Während der Kristallisation wurde Kalium-, Natrium-Tartrat verwendet. Im Laufe der Verfeinerung zeigte sich Differenzdichte für zwei Tartrat-Moleküle (TLA). Eines befindet sich in der Nähe des L10-Loops und bildet Wasserstoffbrückenbindungen mit der Amidgruppe des Asp117 und der Seitenkette von Arg77. Dieses Tartrat ist in der Bildung von Kristallkontakten involviert und interagiert mit Ser47 und Gly48 des Nachbarmoleküls. Das zweite Tartrat-Molekül befindet sich beim L5-Loop und am N-Terminus der α 2-Helix. Es interagiert mit den Amidgruppen des Rückgrates von His45, Gly46 und Ser47. Nach der letzten Verfeinerung mit dem Programm REFMAC gab es drei Bereiche mit Elektronendichte, die nicht interpretiert werden konnte. Der erste Bereich war in der Nähe des C-terminalen Lys172, der Sequenz Phe7-Tyr12, Arg144 und Phe167. Der zweite Bereich befand sich in der Nähe von Leu159-Glu162, sowie Pro81-Gln88 des Symmetriemoleküls. Der dritte Bereich befand sich im Innern der Struktur, nahe His45.

Die Elektronendichte könnte eine zweite Konformation des His45 darstellen, aber dies konnte nicht verfeinert werden.

Der molekulare Ersatz für das IBV-X85 erfolgte mit der Struktur vom IBV-X56. Die Berechnung des Matthews-Koeffizienten ergab ein Molekül in der asymmetrischen Einheit. Das Programm PHASER ergab mit dem Modell und der Suche nach einem Molekül in der asymmetrischen Einheit eine eindeutige Lösung (RFZ = 17,1, TFZ = 23,5). Der *R*-Faktor nach der ersten Verfeinerung betrug 43,6%. Die manuelle Modellanpassung erfolgte mit dem Programm COOT und die Verfeinerung mit dem Programm REFMAC. Für das IBV-X85 konnten die Aminosäurereste 6-171 sehr gut in die Elektronendichte eingebaut werden. Alternative Konformationen konnten für Lys51, His72, Met138, Glu148, Thr151 und Ser160 gebaut werden.

Qualität der Modelle

Die Validierung der Modelle erfolgte während der Verfeinerung anhand der *R*-Faktoren und der stereochemischen Parameter. Tabelle 3.6 zeigt die Parameter nach der letzten Verfeinerung mit dem Programm REFMAC.

Tabelle 3.6: Verfeinerungsstatistik der Modelle für IBV-X56 und IBV-X85.

	IBV-X56	IBV-X85
Auflösung [Å]	31,28-2,10	40,00-1,60
R_{cryst}	0,199	0,169
R_{free}	0,231	0,203
Anzahl der Atome		
Protein	1335	1325
TLA	20	
Wasser	75	212
Standardabweichungen		
Bindungslänge [Å]	0,022	0,011
Bindungswinkel [°]	1,896	1,349
<i>B</i> -Faktoren [Å ²]		
Protein	32,1	12,7
TLA	59,0	
Wasser	37,3	23,3

Die Struktur von IBV-X85 weist sehr gute *R*- und *B*-Faktoren sowie geringe Abweichungen von den Standardbindungslängen und –winkeln auf. Die entsprechenden Werte für die Struktur von IBV-X56 liegen etwas höher, sind aber für eine Auflösung von 2,10 Å akzeptabel. Lys31 liegt in beiden Modellen im Ramachandran-Plot außerhalb des erlaubten Bereiches (siehe Anhang 6.5). Dieser Rest befindet sich auf dem Loop L4 (α1-β3-

Loop). Die Dichte in diesem Bereich ist sehr gut definiert. Die Koordinaten und Strukturfaktoren wurden in der PDB unter der Bezeichnung 3EKE für IBV-X56 und 3EJF für IBV-X85 hinterlegt.

3.4.4 Komplexstrukturen mit NL63-Xst

Datensammlung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten drei Protein-Ligand-Strukturen der X-Domäne des HCoV-NL63 bestimmt werden. Die Kristallisation des NL63-Xst für die *Soaking*-Experimente erfolgte zuvor bei allen drei Ansätzen mit 10% PEG 8000 und 8% Ethylenglykol. Die Ansätze unterschieden sich beim verwendeten pH-Wert während der Kristallisation und den Inkubationszeiten bzw. -temperaturen während des *Soakings* der Kristalle mit der 20 mM-NAD⁺-Lösung. Die Parameter sind in Tabelle 3.7 aufgeführt.

Tabelle 3.7: Übersicht über den pH-Wert während der Kristallisation und den *Soaking*-Parametern für die einzelnen Komplexe.

Bezeichnung	Kristallisation	<i>Soaking</i>	
	pH-Wert	Inkubationszeit	Inkubationstemperatur
Komplex 1	pH 7,5	2 h	20 °C
Komplex 2	pH 6,5	2 h	20 °C
Komplex 3	pH 7,5	5 h	12 °C

Die Vermessung aller Kristalle erfolgte an der I911-2-Beamline am MaxLab in Lund, Schweden. Die Cryoschutzlösung bestand jeweils aus der Reservoirlösung inklusive 30% PEG 400 und der Ligandenlösung in der analogen Konzentration zum *Soaking*-Experiment. Die maximale Auflösung betrug 1,90 Å für den Komplex 1, 2,00 Å für den Komplex 2 und 2,35 Å für den Komplex 3. Die weiteren Werte der Datensätze sind in Tabelle 3.8 aufgelistet.

Tabelle 3.8: Statistik der Datensätze für die Komplexstrukturen. In Klammern sind die Werte für die Schale der höchsten Auflösung angegeben.

	Komplex 1	Komplex 2	Komplex 3
Auflösung [Å]	25,64-1,90 (2,00-1,90)	27,81-2,00 (2,11-2,00)	32,77-2,35 (2,48-2,35)
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Einheitszellparameter			
a [Å]	55,09	53,11	55,23
b [Å]	56,97	55,63	56,73
c [Å]	58,89	58,30	58,51
α, β, γ [°]	90,0; 90,0; 90,0	90,0; 90,0; 90,0	90,0; 90,0; 90,0
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$	27,2 (5,5)	24,2 (4,8)	21,9 (10,6)
R_{merge}	0,087 (0,557)	0,058 (0,425)	0,042 (0,128)
Anzahl aller Reflexe	501.733	221.110	45176
Anzahl der unabhängigen Reflexe	15158 (2141)	11999 (1592)	7920 (1136)
Redundanz	14,2 (14,4)	7,5 (6,5)	4,1 (4,2)
Vollständigkeit [%]	99,9 (100,0)	98,8 (92,4)	98,3 (98,1)
Anzahl der Moleküle/ASU	1	1	1
Matthews-Koeffizient [Å ³ Da ⁻¹]	2,43	2,33	2,41
Flüssigkeitsgehalt [%]	49,5	47,3	49,0

Molekularer Ersatz und Modellbau

Als Modell für den molekularen Ersatz wurde die Ligand-freie Struktur der X-Domäne des HCoV-NL63 verwendet (Abschnitt 3.4.1). In allen drei Fällen ergab die Berechnung des Matthews-Koeffizienten ein Molekül in der asymmetrischen Einheit. Die Lösungen nach dem molekularen Ersatz mit dem Programm PHASER waren jeweils eindeutig für ein Molekül in der asymmetrischen Einheit (Komplex 1: RFZ = 20,4, TFZ = 32,5; Komplex 2: RFZ = 24,1, TFZ = 30,9; Komplex 3: RFZ = 19,3, TFZ = 27,6). Die *R*-Faktoren nach der ersten Verfeinerung lagen bei 34,1% (Komplex 1), 30,3% (Komplex 2) und 31,2% (Komplex 3).

Von den 164 Aminosäureresten der X-Domäne des HCoV-NL63 konnten die Reste 1-163 im Komplex 1 und 3 in die Differenzdichte eingebaut werden. Im Komplex 2 wurden die Aminosäurereste 1-162 in die Elektronendichte eingepasst. Von den fünf zusätzlichen Aminosäureresten, welche nach Abspaltung des GST-Fusionsproteins durch die PreScission-Protease am N-Terminus des NL63-Xst verblieben, konnte in allen Kristallstrukturen nur Differenzdichte für den ersten Rest (Ser) ermittelt werden. Des Weiteren wurden vier Ethylenglykol-Moleküle (EDO) im Komplex 1 und jeweils zwei in den Komplexen 2 und 3 eingebaut.

Bereits nach der ersten Verfeinerung mit dem Programm REFMAC zeigte sich in allen drei Kristallstrukturen deutliche Differenzdichte, die nicht auf Wassermoleküle oder das bei der Kristallisation verwendete Ethylenglykol hindeutete. Nach mehreren Runden aus manueller Modellanpassung mit dem Programm COOT und Verfeinerung mit dem Programm REFMAC konnte in die Differenzdichte im Komplex 1 das NAD^+ -Molekül eingepasst werden (Abbildung 3.26).

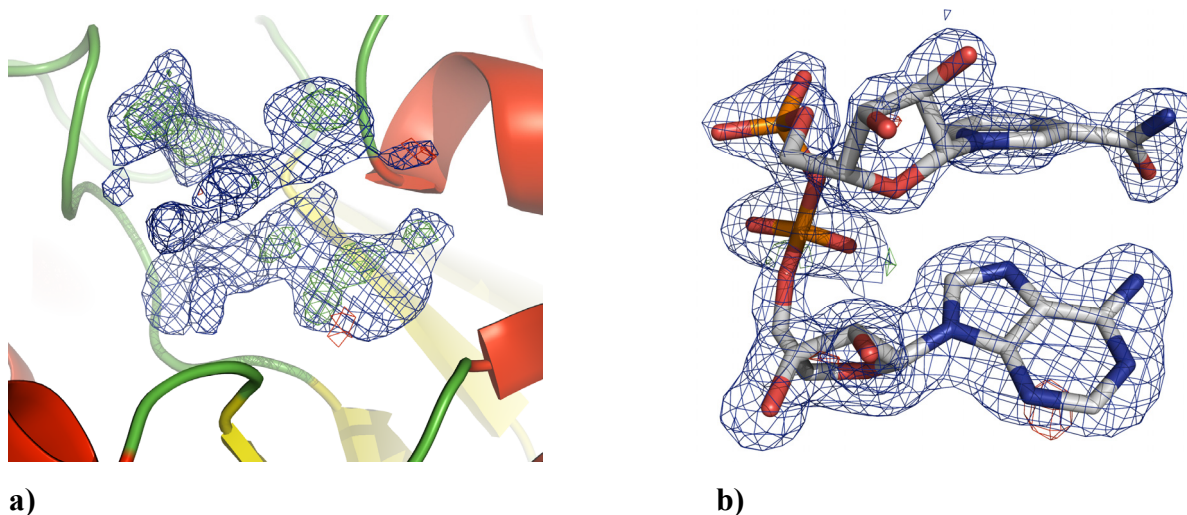


Abbildung 3.26: Einbau des NAD^+ in den Komplex 1. a) zeigt die Elektronendichte nach der ersten Verfeinerung. b) zeigt die Elektronendichte nach der letzten Verfeinerung mit eingepasstem NAD^+ (als Stab-Modell dargestellt). 2Fo-Fc -Elektronendichte ist blau (1σ), Fo-Fc -Elektronendichte ist grün (3σ) und rot (-3σ) dargestellt.

Im Komplex 2 zeigte sich Differenzdichte für zwei Konformationen des NAD^+ . Für die kompakte Form, wie sie auch im Komplex 1 zu sehen ist, war die Elektronendichte sehr gut sichtbar für den ADP-Teil des Moleküls, sowie für den Nikotinamid-Rest. Differenzdichte für die Nikotinamid-Ribose war kaum und für den zweiten Phosphatrest nur gering vorhanden. Die gestreckte Form konnte sehr gut in die Differenzdichte eingepasst werden, jedoch nur der ADP-Ribosyl-Rest des NAD^+ (Abbildung 3.27). Differenzdichte für den Nikotinamid-Rest war nicht sichtbar. Im Komplex 3 zeigte sich Differenzdichte nur für die gestreckte Form des ADP-Ribosyl-Restes des NAD^+ .

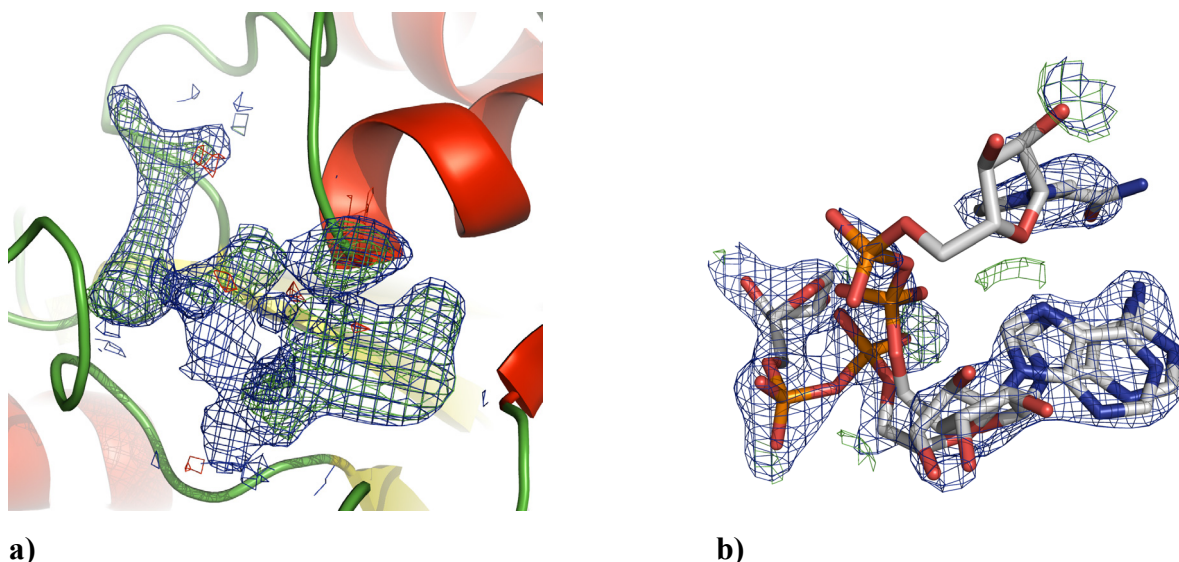


Abbildung 3.27: Einbau des NAD^+ in den Komplex 2. a) zeigt die Elektronendichte nach der ersten Verfeinerung. b) zeigt die Elektronendichte nach der letzten Verfeinerung mit eingepasstem NAD^+ bzw. ADP-Ribosyl-Rest (als Stab-Modell dargestellt). 2Fo-Fc -Elektronendichte ist blau (1σ), Fo-Fc -Elektronendichte ist grün (3σ) und rot (-3σ) dargestellt.

Qualität der Modelle

Die Validierung der Modelle erfolgte mit dem Programm PROCHECK. Tabelle 3.9 zeigt die Parameter nach der letzten Verfeinerung.

Tabelle 3.9: Verfeinerungsstatistik der Modelle der Protein-Ligand-Komplexe.

	Komplex 1	Komplex 2	Komplex 3
Auflösung [$\text{\AA}$]	58,93-1,90	58,32-2,01	40,72-2,35
Anzahl der unabhängigen Reflexe	14068	10933	7022
R_{cryst}	0,185	0,209	0,218
R_{free}	0,236	0,280	0,298
Anzahl der Atome			
Protein	1291	1240	1244
EDO/ NAD^+	16/44	8/79	8/35
Wasser	135	47	36
Standardabweichungen			
Bindungslänge [$\text{\AA}$]	0,021	0,022	0,022
Bindungswinkel [$^\circ$]	1,735	1,990	1,993
B -Faktoren [$\text{\AA}^2$]			
Protein	22,5	35,0	26,2
EDO/ NAD^+	41,9/33,5	48,5/46,8	40,6/44,3
Wasser	33,5	36,8	25,1

Für den Komplex 1 konnte ein sehr gutes Modell gebaut werden. Die *R*-Faktoren und die stereochemischen Parameter sind für eine Auflösung von 1,90 Å sehr gut. Die *R*-Faktoren für die Komplexe 2 und 3 sind relativ hoch, konnten aber nicht weiter verbessert werden. Bei allen drei Komplexen liegt das Lys7 außerhalb des erlaubten Bereiches (siehe Anhang 6.5). Wie auch in der Ligand-freien Struktur des NL63-X liegt dieser Rest im Loop zwischen dem β 1- und dem β 2-Strang. Die Elektronendichte für diesen Aminosäurerest ist in allen Komplexen gut definiert.

3.5 Analyse der Kristallstrukturen von NL63-X, 229E-X und IBV-X

3.5.1 Tertiärstruktur der X-Domänen

NL63-X und 229E-X sind aus einem zentralen β -Faltblatt aufgebaut, welches von drei α -Helices auf jeder Seite umgeben ist. Das β -Faltblatt besteht aus sieben β -Strängen, wobei die inneren parallel zueinander verlaufen und die beiden äußeren (β 1, β 4) antiparallel zu den restlichen β -Strängen verlaufen. Die Anordnung der Sekundärstrukturelemente im NL63-X und 229E-X ist wie folgt: β 1- β 2- α 1- β 3- α 2- α 3- β 4- β 5- α 4- β 6- α 5- β 7- α 6 (Abbildung 3.28).

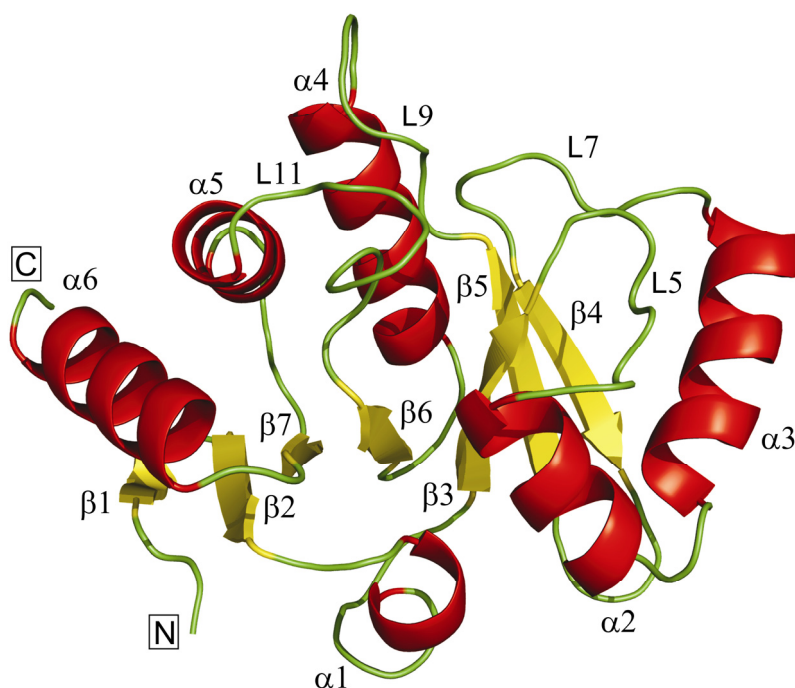


Abbildung 3.28: Struktur der Nsp3 X-Domäne von HCoV-NL63 mit Bezeichnung der Sekundärstrukturelemente. N- und C-Terminus sind gekennzeichnet (umrandet). Die α -Helices sind rot, die β -Stränge gelb und die Loop-Regionen (L) grün dargestellt.

Innerhalb der Strukturen gibt es vier größere Loop-Regionen. Diese befinden sich zwischen $\beta 3\text{-}\alpha 2$ (L5), $\alpha 3\text{-}\beta 4$ (L7), $\beta 5\text{-}\alpha 4$ (L9) und $\beta 6\text{-}\alpha 5$ (L11). NL63-X und 229E-X überlagern in ihrer Gesamtstruktur sehr gut miteinander und zeigen auch in diesen Bereichen einen sehr ähnlichen Verlauf (Abbildung 3.29a). IBV-X ist ebenfalls aus einem zentralen β -Faltblatt mit umgebenden α -Helices aufgebaut. Auffällig ist jedoch das Fehlen von $\beta 1$ in IBV-X (Abbildung 3.29b, rote Markierung). Die Anordnung der restlichen Sekundärstrukturelemente im IBV-X ist analog zu NL63-X und 229E-X.

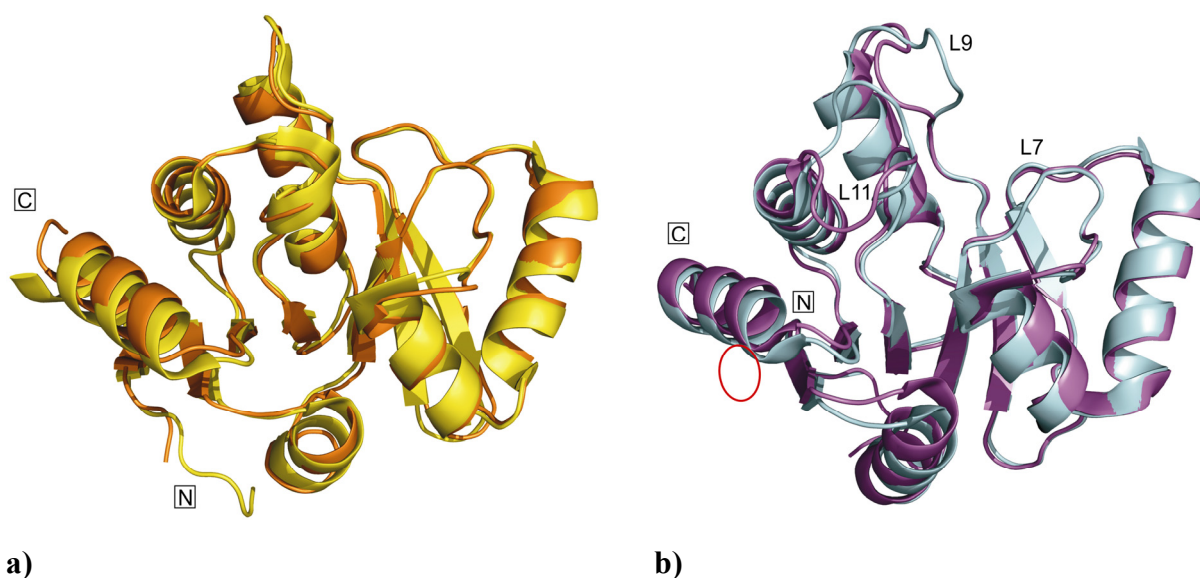


Abbildung 3.29: Strukturen der X-Domänen von HCoV-229E und IBV. a) Überlagerung von 229E-X (gelb) mit NL63-X (orange); b) Überlagerung von IBV-X56 (violett) mit IBV-X85 (türkis), rote Markierung: Position von $\beta 1$ in NL63-X und 229E-X; N- und C-Termini (umrandet) und ausgewählte Loop-Regionen sind gekennzeichnet.

Starke Abweichungen von IBV-X zu NL63-X und 229E-X gibt es in den Loop-Regionen L7, L9 und L11 (Abbildung 3.30). Die $\alpha 3\text{-}\beta 4$ -Region (L7) der zwei IBV-X-Strukturen lässt sich mit Abständen zwischen den C_α -Atomen von 0,21-0,61 Å sehr gut überlagern. Im Vergleich zur X-Domäne von HCoV-NL63 (und HCoV-229E) ist dieser Loop allerdings deutlich kürzer. L9 ($\beta 5\text{-}\alpha 4$ -Loop) zeigt im IBV-X56 teilweise einen ähnlichen Verlauf wie im NL63-X (und 229E-X). In der ersten Hälfte der Loop-Region lassen sich die C_α -Atome mit 0,26-0,82 Å Abstand gut überlagern. Die Abstände zwischen den C_α -Atomen in der zweiten Hälfte von L9 reichen von 1,28-1,99 Å. Deutlich größer sind die Abstände in diesem Bereich zwischen NL63-X und IBV-X85. Lassen sich die C_α -Atome der ersten Hälfte mit 0,57-1,21 Å noch gut überlagern, so werden die Abstände in der zweiten Hälfte mit 2,37-

6,12 Å deutlich größer. Die stärksten Abweichungen sind im $\beta 6$ - $\alpha 5$ -Loop (L11) zu erkennen (Abbildung 3.30). Sowohl innerhalb der IBV-X-Strukturen als auch im Vergleich zu NL63-X (und 229E-X) zeigt dieser Loop eine unterschiedliche Richtung. Die Abstände zwischen den C_{α} -Atomen betragen dabei bis zu 6,00 Å und 8,02 Å (NL63-X und IBV-X85 bzw. IBV-X56), sowie 11,11 Å zwischen den beiden IBV-X-Strukturen.

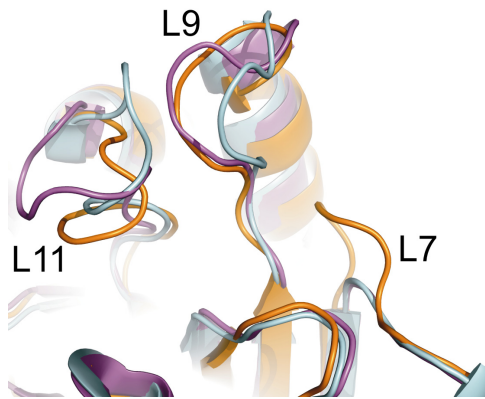


Abbildung 3.30: Vergrößerte Darstellung der abweichenden Loop-Regionen innerhalb der coronaviralen X-Domänen. NL63-X: orange; IBV-X56: violett; IBV-X85: türkis; L7: $\alpha 3$ - $\beta 4$; L9: $\beta 5$ - $\alpha 4$; L11: $\beta 6$ - $\alpha 5$.

Tabelle 3.10 gibt eine Übersicht über die Standardabweichungen zwischen den C_{α} -Atomen der einzelnen X-Domänen, die im Rahmen dieser Arbeit bestimmt wurden. Als Vertreter der Coronaviren der Gruppe 2 ist die X-Domäne des SARS-CoV (SARS-X, PDB 2ACF, Saikatendu *et al.*, 2005) zusätzlich aufgeführt.

Tabelle 3.10: Standardabweichungen [Å] zwischen den C_{α} -Atomen der einzelnen X-Domänen der Coronaviren der Gruppe 1 (NL63-X, 229E-X), 2 (SARS-X) und 3 (IBV-X). Die Anzahl der beteiligten C_{α} -Atome ist in Klammern angeben.

	NL63-X	229E-X	IBV-X56	IBV-X85
SARS-X	1,45 (155)	1,29 (150)	2,17 (145)	1,81 (142)
NL63-X		1,02 (161)	1,70 (146)	1,66 (147)
229E-X			1,81 (146)	1,72 (147)
IBV-X56				0,46 (152)

Die ermittelten Standardabweichungen der Tertiärstrukturen weisen die gleiche Tendenz auf wie der Vergleich der Primärstrukturen der Proteine. Wie auf Grund der Einteilung in dieselbe Gruppe zu erwarten war, besitzen NL63-X und 229E-X die höchste Sequenzidentität von 54% und ihre Strukturen weisen die geringste Standardabweichung (1,02 Å) auf. Die Sequenzidentität von Coronaviren der Gruppe 1 (NL63-X und 229E-X) und

der Gruppe 2 (SARS-X) nimmt deutlich auf 30% bzw. 33% ab. Dies spiegelt sich auch in den ermittelten Standardabweichungen wider (1,45 Å bzw. 1,29 Å). Die Aminosäuresequenz von IBV-X (Gruppe 3) weist mit 25% und 22% eine geringfügig höhere Identität mit NL63-X bzw. 229E-X (Gruppe 1) auf als mit SARS-X (19%, Gruppe 2). Sowohl IBV-X56 als auch IBV-X85 sind in ihrer Tertiärstruktur den Vertretern der Gruppe 1 ähnlicher als dem SARS-X, was sich durch die niedrigeren Standardabweichungen zeigt (Tabelle 3.12). Alle für IBV-X85 ermittelten Standardabweichungen mit den Strukturen der anderen X-Domänen sind kleiner als die entsprechenden Werte für IBV-X56. Die Standardabweichung zwischen IBV-X56 und IBV-X85 beträgt 0,46 Å.

3.5.2 Konservierte Bereiche innerhalb der X-Domänen

Beim Sequenzvergleich von NL63-X, 229E-X und IBV-X sind vier Regionen erkennbar, in denen die Aminosäurereste stark konserviert sind (Abbildung 3.31). Diese Übereinstimmungen sind größtenteils auch in anderen coronaviralen X-Domänen zu finden (siehe Abbildung 1.7 in der Einleitung). Tabelle 3.11 gibt einen Überblick über die Abweichungen in der Primärstruktur der vier konservierten Bereiche.

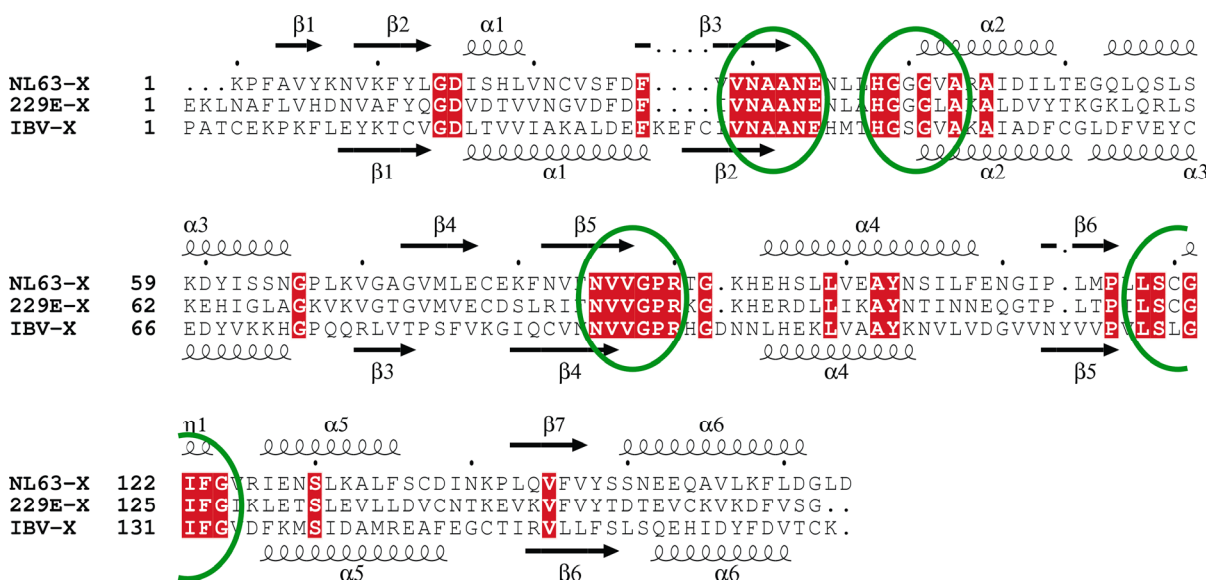


Abbildung 3.31: Sequenz-Alignment von NL63-X, 229E-X und IBV-X mit Zuordnung der Sekundärstrukturelemente und Kennzeichnung der konservierten Bereiche (grün). Obere Zuordnung: NL63-X, untere Zuordnung: IBV-X85, identische Aminosäurereste sind rot unterlegt.

Tabelle 3.11: Übersicht über die Abweichungen in der Primärstruktur der coronaviralen X-Domäne innerhalb der vier konservierten Bereiche.

Sequenz NL63-X	Coronavirus	Abweichung (unterstrichen)
²⁹ VNAAN ₃₃	BCoV, HCoV-OC43, HCoV-HKU1, MHV	VN <u>P</u> AN
³⁸ HGGGVA ₄₃	IBV	HG <u>S</u> GVA
	TGEV	H <u>M</u> GGA
	FIPV	H <u>V</u> GGA
	PEDV	HGGG <u>I</u> A
	HCoV-229E	HGGG <u>L</u> A
	MHV	HG <u>A</u> GVA
⁸⁵ NVVGVP ₈₉	TGEV, FIPV	N <u>A</u> VGP
	Bat-CoV, SARS-CoV	<u>H</u> VVGP
	HCoV-HKU1, MHV	N <u>I</u> VGP
¹¹⁹ SCGIF ₁₂₃	IBV	S <u>L</u> GIF
	TCoV	S <u>S</u> GIF
	TGEV, FIPV, PEDV	S <u>V</u> GIF
	Bat-CoV, SARS-CoV, BCoV, HCoV-OC43, HEV, HCoV-HKU1, HEV, MHV	S <u>A</u> GIF

Die Positionen der vier am stärksten konservierten Bereiche innerhalb der coronaviralen X-Domänen sind in Abbildung 3.31 und Abbildung 3.32 (Mitte) dargestellt. Die Bezeichnung und Nummerierung der konservierten Bereiche sowie der Sekundärstrukturelemente richten sich im Folgenden nach der X-Domäne von HCoV-NL63, falls nicht anders angegeben.

Beim Vergleich der Kristallstrukturen von NL63-X, 229E-X, IBV-X56 und IBV-X85 überlagern die in der Primärstruktur konservierten Aminosäurereste größtenteils in allen Strukturen (Abbildung 3.32). Der nach dem Sequenzvergleich konservierte Bereich ²⁹VNAAN₃₃ beginnt in $\beta 3$ und erstreckt sich bis in den Anfang des $\beta 3$ - $\alpha 2$ -Loops. Innerhalb der ²⁹VNAAN₃₃-Sequenz liegen die C $_{\alpha}$ -Atome sehr nah beieinander (maximale Distanz von 1,07 Å zwischen den C $_{\alpha}$ -Atomen von Asn33/NL63-X und Asn40/IBV-X56) und auch die Seitenketten haben die gleiche Orientierung. Die zweite konservierte Aminosäurereste-Reihenfolge (³⁸HGGGVA₄₃) ist im hinteren Teil des $\beta 3$ - $\alpha 2$ -Loops und übergehend in die $\alpha 2$ -

Helix lokalisiert. Die Atome der Hauptkette lassen sich ebenfalls gut überlagern (maximale Distanz von 1,22 Å zwischen den C_α-Atomen von Gly39/NL63-X und Gly46/IBV-X56). Eine deutliche Abweichung gibt es beim His45 von IBV-X56. In seiner Orientierung ist es um ~110° gegenüber den His-Resten der anderen X-Domänen verdreht. Die ₈₅NVVG₈₉-Sequenz befindet sich im C-terminalen Bereich von β5 und reicht bis in den Anfang des β5-α4-Loops. Der maximale Abstand zwischen zwei C_α-Atomen beträgt 1,21 Å (Gly88/NL63-X und Gly95/IBV-X85). Die vierte konservierte Sequenz ₁₁₉SCGIF₁₂₃ ist Teil des β6-α5-Loops (L11). Wie bereits erwähnt (Abschnitt 3.5.1), sind hier die größten Abweichungen zwischen den Kristallstrukturen zu beobachten. Dabei lässt sich dieser Bereich von NL63-X und 229E-X gut überlagern mit einer maximalen Distanz von 1,03 Å zwischen den C_α-Atomen von Gly121/NL63-X und Gly124/229E-X. Diese Loop-Region zeigt auch im IBV-X85 einen ähnlichen Verlauf, jedoch sind die Aminosäurereste teilweise weit voneinander entfernt. So liegen die C_α-Atome von Ser119/NL63-X und Ser128/IBV-X85 mit 0,87 Å noch nah beieinander, wird der Abstand der folgenden Reste zunehmend größer mit 1,93 Å (Cys120 und Leu129), 3,92 Å (Gly121 und Gly130), 5,34 Å (Ile122 und Ile131) und 5,77 Å (Phe123 und Phe132). IBV-X56 zeigt in diesem Bereich die stärksten Abweichungen zu NL63-X, 229E-X und auch zu IBV-X85. Der Übergang aus dem β6-Strang in den Loop ist in allen Strukturen noch sehr ähnlich. Mit Beginn der konservierten SXGIF-Sequenz (X = Cys für NL63-X und 229E-X bzw. Leu für IBV-X56) verläuft der Loop bei IBV-X56 jedoch in die entgegengesetzte Richtung. Dementsprechend zeigen sich auch größere Abstände zwischen den C_α-Atomen. Diese liegen bei 2,26 Å (Ser119/NL63-X und Ser128/IBV-X56), 4,78 Å (Cys120 und Leu129), 4,83 Å (Gly121 und Gly130), 3,24 Å (Ile122 und Ile131) und 7,63 Å (Phe123 und Phe132).

Aus Abbildung 3.32 (Mitte) wird weiterhin deutlich, dass die vier in der Primärstruktur konservierten Bereiche einen großen Teil der Bindungstasche im Protein ausmachen.

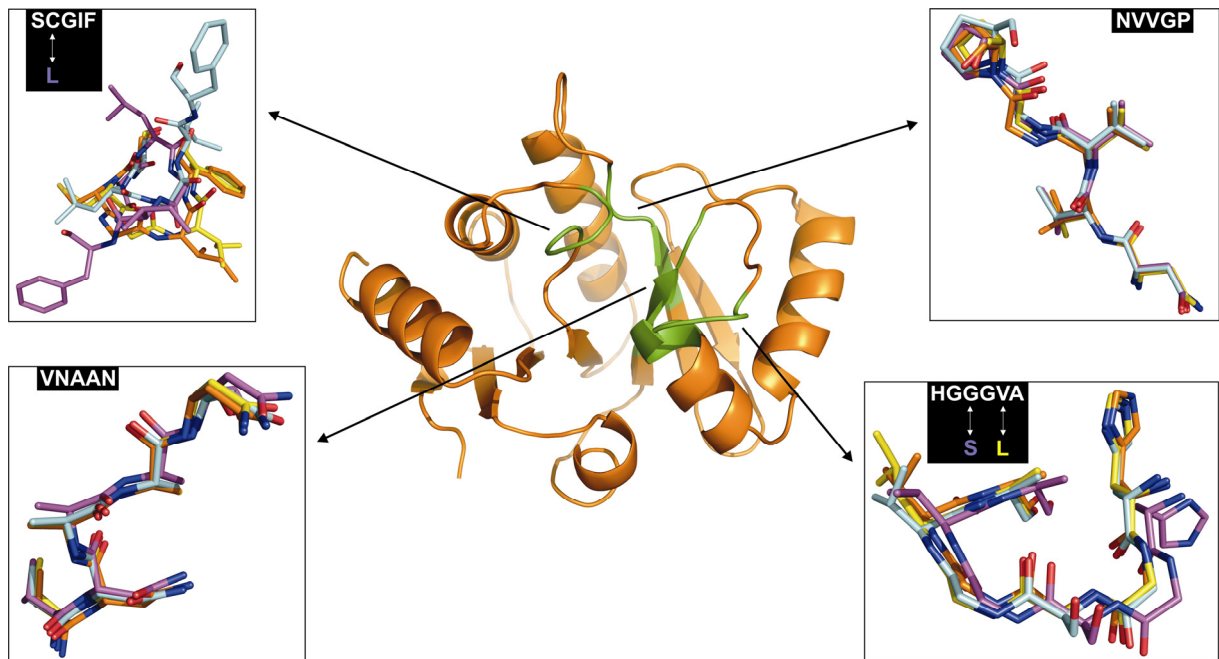


Abbildung 3.32: Die vier am stärksten konservierten Bereiche innerhalb der X-Domäne von Coronaviren. In der Mitte befindet sich die Struktur von NL63-X (orange) mit den vier konservierten Bereichen (grün). Links und rechts sind die überlagerten Aminosäurereste (Stab-Darstellung) der konservierten Bereiche vergrößert dargestellt. Die Sauerstoffatome sind rot, die Stickstoffatome blau und die Kohlenstoffatome orange (NL63-X), gelb (229E-X), violett (IBV-X56) bzw. türkis (IBV-X85) dargestellt. In den schwarz unterlegten Kästen befindet sich die Aminosäuresequenz von NL63-X (Abweichungen sind entsprechend des Farbschemas für die Kohlenstoffatome gekennzeichnet).

3.5.3 Vergleich der X-Domänen mit viralen und zellulären Proteinen

3.5.3.1 Datenbank-Recherche

Für die Suche nach strukturell ähnlichen Proteinen wurde das Programm DALI verwendet. Die Funktion dieser Proteine, sofern bekannt, könnte Hinweise auf die Funktion der coronaviralen X-Domäne liefern. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.12 dargestellt, wobei nur die Proteinstrukturen mit den höchsten *Z-Scores* aufgelistet sind.

Tabelle 3.12: Ergebnisse der Datenbank-Recherche für die einzelnen X-Domänen. MDmH2A1.1: Makrodomäne von mH2A1.1, MDmH2A1.2: Makrodomäne von mH2A1.2.

NL63-X	229E-X	IBV-X56	IBV-X85
Protein (PDB) <i>Z-Score</i>	Protein (PDB) <i>Z-Score</i>	Protein (PDB) <i>Z-Score</i>	Protein (PDB) <i>Z-Score</i>
229E-X (3EJG) 28,9	NL63-X 28,9	IBV-X85 (3EJF) 30,2	IBV-X56 (3EKE) 30,2
SARS-X (2ACF) 23,2	SARS-X (2ACF) 23,7	NL63-X 18,6	229E-X (3EJG) 19,5
Er58 (1SPV) 20,4	AF1521 (1HJZ) 20,5	Er58 (1SPV) 18,6	Er58 (1SPV) 19,2
MDmH2A1.1 (1YD9) 20,3	MDmH2A1.1 (1YD9) 20,3	229E-X (3EJG) 18,2	NL63-X 19,1
AF1521 (1HJZ) 20,2	Er58 (1SPV) 20,0	SARS-X (2ACF) 17,3	SARS-X (2ACF) 18,1
MDmH2A1.2 (1ZR5) 19,3	MDmH2A1.2 (1ZR5) 19,5	MDmH2A1.2 (1ZR5) 17,0	TTHA0132 (2DX6) 17,7
IBV-X85 (3EJF) 19,1	IBV-X85 (3EJF) 19,5	AF1521 (1HJZ) 17,0	AF1521 (1HJZ) 17,5
IBV-X56 (3EKE) 18,6	IBV-X56 (3EKE) 18,6	TTHA0132 (2DX6) 16,9	MDmH2A1.1 (1YD9) 17,5
TTHA0132 (2DX6) 17,5	TTHA0132 (2DX6) 17,6	MDmH2A1.1 (1YD9) 16,8	MDmH2A1.2 (1ZR5) 17,2

Die Durchsuchung der Datenbank ergab, dass sowohl virale als auch zelluläre Proteine homologe Strukturen zu NL63-X, 229E-X und IBV-X besitzen, jedoch ist von keinem der Proteine die Funktion genau geklärt. Er58 ist ein Protein aus *Escherichia coli*, die Makrodomänen von mH2A1.1 und mH2A1.2 sind zwei Isoformen einer humanen Histonvariante, AF 1521 ist ein Protein aus *Archaeoglobus fulgidus* und TTHA0132 aus *Thermus thermophilus*. Für die Makrodomäne von mH2A1.1 und AF1521 konnte durch isothermische Titrationskalorimetrie eine Affinität zu ADP-Ribose gezeigt werden (siehe Abschnitt 3.2.3), letzteres besitzt zudem eine Aktivität als ADP-Ribose-1“-Monophosphatase (Karras *et al.*, 2005).

NL63-X und 229E-X zeigen eine ähnliche Abfolge in den Übereinstimmungen aus der Recherche und auch die *Z-Scores* liegen nahe beieinander. Auffällig ist, dass die IBV-X-Strukturen erst im hinteren Bereich der Trefferliste auftauchen. IBV-X56 und IBV-X85 zeigen deutliche Abweichungen dazu, aber auch untereinander weichen die Ergebnisse voneinander ab. Generell sind die entsprechenden *Z-Scores* bei den IBV-X-Strukturen niedriger.

3.5.3.2 Vergleich der Tertiärstrukturen

Die strukturell ähnlichen Proteine aus der Datenbank-Recherche weisen in ihrer Tertiärstruktur ein zentrales β -Faltblatt mit umgebenden α -Helices auf, eine sogenannte Makrodomäne. Diese Bezeichnung geht zurück auf die Histon-Variante mH2A. Dieses Protein ähnelt im aminoterminalen Bereich dem Histon H2A, besitzt jedoch eine weitere Domäne, die den größten Teil des Proteins (etwa zwei Drittel) einnimmt (Ladurner, 2003). Diese Nicht-Histon-Domäne wird als Makrodomäne bezeichnet. Abbildung 3.33 zeigt die Überlagerung der Proteinstrukturen aus der Datenbank-Recherche mit NL63-X.

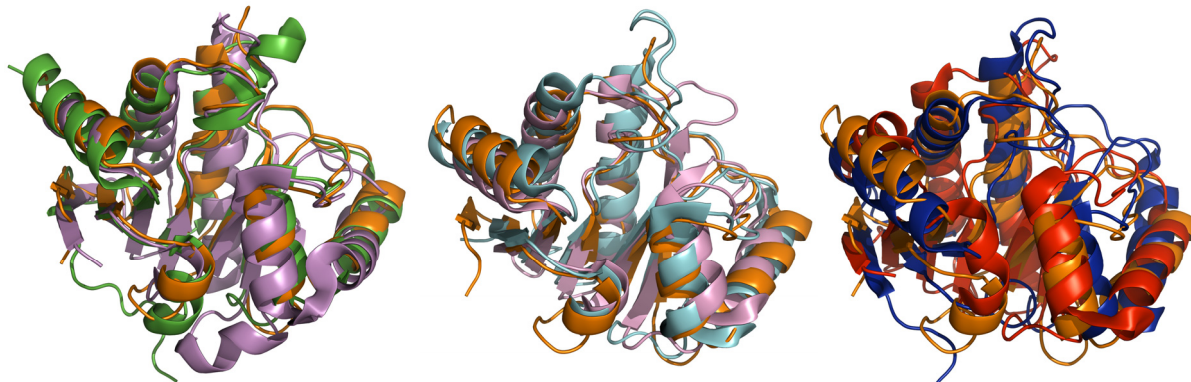


Abbildung 3.33: Überlagerung der viralen und zellulären Proteinstrukturen. Links: Überlagerung von NL63-X (orange) mit SARS-X (grün) und AF1521 (violett), Mitte: Überlagerung von NL63-X (orange) mit Er58 (türkis) und TTHA0132 (pink), rechts: Überlagerung von NL63-X (orange) mit der mH2A1.1-Makrodomäne (blau) und der mH2A1.2-Makrodomäne (rot).

Die Anordnung der Sekundärstrukturelemente ($\beta 1$ - $\beta 2$ - $\alpha 1$ - $\beta 3$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\beta 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 4$ - $\beta 6$ - $\alpha 5$ - $\beta 7$ - $\alpha 6$) ist im SARS-X wie erwartet identisch zu NL63-X und 229E-X. Die gleiche Abfolge ist ebenfalls bei den Makrodomänen der zwei Isoformen des mH2A (mH2A1.1 und mH2A1.2) zu finden. Beim Er58 und TTHA0132 dagegen fehlt wie beim IBV-X der erste β -

Strang. Die restliche Anordnung der Sekundärstrukturelemente ist analog. Im Protein AF1521 gibt es eine zusätzliche α -Helix, welche zwischen dem β 4- und dem β 5-Strang lokalisiert ist.

Tabelle 3.13 gibt eine Übersicht über die ermittelten Standardabweichungen der Tertiärstrukturen und die Sequenzidentität der Primärstrukturen. Der Vergleich der Sequenzidentitäten und der Standardabweichungen der Tertiärstrukturen von NL63-X, 229E-X, IBV-X56 und IBV-X85 mit SARS-X wurde bereits in Abschnitt 3.5.1 beschrieben.

AF1521 und TTHA0132 zeigen mit 19-22% die höchsten Sequenzidentitäten zellulärer Proteine mit den X-Domänen. Für das Er58 ist das nur in Bezug auf NL63-X und 229E-X gültig. Die Sequenzidentität zum IBV-X ist mit 15% deutlich geringer. Trotzdem liegen die Standardabweichungen der Tertiärstrukturen mit 1,54-1,67 Å in einem engen Bereich. Die Standardabweichungen von AF1521 und TTHA0132 zu den coronaviralen X-Domänen liegen etwas höher, die Strukturen lassen sich aber auch hier gut überlagern (Abbildung 3.33). Die Makrodomänen von mH2A1.1 und mH2A1.2 besitzen mit 11-13% eine sehr geringe Sequenzidentität zu den X-Domänen, dennoch lassen sich die Tertiärstrukturen gut überlagern (Standardabweichung 1,71-2,05 Å, Abbildung 3.33 rechts).

Tabelle 3.13: Vergleich der Tertiär- und Primärstrukturen der in dieser Arbeit behandelten X-Domänen mit den Treffern aus der Datenbanksuche. Obere Zeile: Standardabweichungen [Å] der Tertiärstrukturen, in Klammern: Anzahl der beteiligten C_{α} -Atome; untere Zeile: Sequenzidentitäten der Primärstrukturen [%].

Protein	PDB	NL63-X	229E-X	IBV-X56	IBV-X85
SARS-X	2ACF	1,45 (155)	1,29 (150)	2,17 (145)	1,81 (142)
		30	33	19	19
AF1521	1HJZ	1,75 (154)	1,59 (149)	1,95 (145)	1,85 (142)
		19	22	20	20
mH2A1.1- Makrodomäne	1YD9	1,88 (161)	1,71 (156)	2,05 (148)	1,81 (148)
		13	13	14	14
mH2A1.2- Makrodomäne	1ZR5	1,91 (157)	1,96 (156)	1,75 (150)	1,84 (150)
		11	11	15	15
Er58	1SPV	1,64 (147)	1,67 (144)	1,63 (147)	1,54 (143)
		20	20	15	15
TTHA0132	2DX6	2,35 (143)	1,77 (137)	1,86 (140)	1,78 (139)
		19	20	21	21

Bezüglich der vier konservierten Bereiche wie sie in Abschnitt 3.5.2 beschrieben worden sind, gibt Abbildung 3.34 einen Einblick in die entsprechende Aminosäurereste-Reihenfolge der homologen Kristallstrukturen.

NL63-X	VNAAN	HGGGVA	NVVGP	SCGIF
229E-X	VNAAN	HGGGLA	NVVGP	SCGIF
SARS-X	VNAAN	HGGGVA	HVVGP	SAGIF
IBV-X	VNAAN	HGSGVA	NVVGP	SLGIF
AF1521	VNAAN	HGGGVA	HTVGP	SAGIY
Er58	VNAAN	GGGGVD	HTVGP	STGVY
TTHA0132	VNAAN	LGAGVA	HAAVL	GTGVG
MDmH2A1.1	VHPTN	IGGEVG	HCNSP	GSGRN
MDmH2A1.2	(1) INPTN	(2) LKDDLK	(3) HCNSP	(4) GSGRN

Abbildung 3.34: Sequenz-Alignment der vier konservierten Bereiche von NL63-X, 229E-X und IBV-X mit den Treffern aus der Datenbank-Recherche. Identische Aminosäurereste sind blau unterlegt. MDmH2A1.1: Makrodomäne von mH2A1.1, MDmH2A1.2: Makrodomäne von mH2A1.2.

²⁹VNAAN₃₃-Sequenz

Die erste Sequenzbereich ist bis auf die mH2A1.1- und die mH2A1.2-Makrodomäne zu 100% konserviert und lässt sich in den entsprechenden Kristallstrukturen sehr gut überlagern. Im Vergleich zum NL63-X konnten Abstände zwischen den C_α-Atomen von 0,25-0,87 Å für SARS-X, AF1521 und Er58 ermittelt werden. Für das TTHA0132 lagen die Werte mit 0,81-1,55 Å etwas höher. Im Falle der mH2A1.1- und mH2A1.2-Makrodomäne ist die Abfolge der Aminosäurereste nur an jeweils zwei Positionen identisch, dennoch konnten die entsprechenden C_α-Atome mit Abständen von 0,74-1,71 Å relativ gut überlagert werden.

³⁸HGGGVA₄₃-Sequenz

Im Sequenz-Alignment (Abbildung 3.34) ist zu erkennen, dass das Gly-Triplet im zweiten konservierten Bereich mit Ausnahme von IBV-X innerhalb der aufgeführten coronaviralen X-Domänen, dem AF1521 und dem Er58 vorhanden ist. Die Abstände zwischen den C_α-Atomen des NL63-X und des AF1521 betragen 0,42-1,22 Å. Für Er58 und TTHA0132 konnten zum NL63-X Abstände von 0,97-2,36 Å bzw. 0,79-2,05 Å ermittelt werden. Die entsprechenden Sequenzen des zweiten Bereiches konnten in den Makrodomänen des mH2A1.1 und des mH2A1.2 nur mit größeren Abständen zwischen den C_α-Atomen überlagert werden. Die C_α-Atome der Gly-Reste der mH2A1.1-Makrodomäne sind dabei 2,13 bzw. 3,20 Å von denen des NL63-X entfernt. Die mH2A1.2-Makrodomäne

besitzt keine identischen Aminosäurereste in diesem Bereich mit den coronaviralen X-Domänen. Die Abstände zu den C $_{\alpha}$ -Atomen von NL63-X liegen im Bereich von 0,47-3,00 Å.

₈₅NVVGP₈₉Sequenz

Im dritten Bereich ist vor allem die VGP-Sequenz innerhalb der genannten X-Domänen, AF1521 und Er58 identisch. Die entsprechenden Bereiche in den Kristallstrukturen überlagern sehr gut und zeigen nur geringe Abstände zu den C $_{\alpha}$ -Atomen von NL63-X (0,10-0,93 Å für AF1521 und 0,20-0,69 Å für Er58). Die entsprechende Sequenz im TTHA0132 besitzt nur einen zum SARS-X konservierten His-Rest. Die C $_{\alpha}$ -Atome der überlagerten Aminosäurereste in diesem Bereich zeigen Abstände zum NL63-X von 1,16-2,83 Å. Der His-Rest ist ebenfalls in den mH2A1.1- und mH2A1.2-Makrodomänen zu finden. Des Weiteren ist der Pro-Rest konserviert. Die Abstände zu den C $_{\alpha}$ -Atomen von NL63-X betragen 0,70-1,40 Å bzw. 0,64-1,46 Å.

₁₁₉SCGIF₁₂₃-Sequenz

Der vierte Bereich zeigt beim Vergleich von NL63-X und 229E-X mit IBV-X56 und IBV-X85 die größten Abweichungen (Abschnitt 3.5.2). Dieser Bereich von SARS-X, AF1521 und Er58 lässt sich besser mit den Strukturen der Coronaviren der Gruppe 1 überlagern als mit denen des IBV-X, wobei die Unterschiede zum IBV-X56 stärker sind als zum IBV-X85. Dies lässt sich dadurch erklären, dass in SARS-X, AF1521 und Er58 der Loop 11 (inkl. ₁₁₉SCGIF₁₂₃-Sequenz) wie beim NL63-X, 229E-X und IBV-X85 in Richtung der α 4-Helix und nicht wie beim IBV-X56 in Richtung der α 6-Helix zeigt. Im Vergleich zum NL63-X betragen die Abstände der C $_{\alpha}$ -Atome 0,47-1,43 Å für SARS-X, 0,26-2,34 Å für AF1521 und 0,41-1,94 Å für Er58. Im Vergleich zum IBV-X85 zeigt sich eine gleiche Orientierung des Loop 11, doch die Abstände zwischen den C $_{\alpha}$ -Atomen nehmen wie schon beim Vergleich von IBV-X85 mit NL63-X (Abschnitt 3.5.2) zu. Sie reichen von 1,13-6,59 Å für SARS-X, 0,74-6,53 Å für AF1521 und 0,63-6,15 Å für Er58. Eine Überlagerung mit IBV-X56 ist aufgrund der unterschiedlichen Orientierung des Loops nicht möglich. Im TTHA0132 und in den Makrodomänen des mH2A1.1 und des mH2A1.2 ist nur der Gly-Rest konserviert, dennoch lässt sich dieser Bereich gut überlagern. Zu den C $_{\alpha}$ -Atomen von NL63-X betragen die Abstände 1,99-2,59 Å (TTHA0132), 1,20-1,66 Å (mH2A1.1-Makrodomäne) bzw. 0,73-1,48 Å (mH2A1.2-Makrodomäne).

Die X-Domänen von HCoV-NL63, HCoV-229E und IBV besitzen zu zellulären Makrodomänen eine Sequenzidentität wie sie auch zwischen den coronaviralen X-Domänen zu finden ist. So haben 229E-X und IBV-X bzw. 229E-X und AF1521 eine Sequenzidentität von 22%. Doch auch bei geringer Sequenzidentität (z.B. zur Makrodomäne von mH2A1.1) lassen sich die Proteinstrukturen gut überlagern.

3.6 Die X-Domäne des HCoV-NL63 im Komplex mit NAD⁺

Basierend auf den Ergebnissen der Interaktionsstudien mittels ZIGE wurden ADP-Ribose und NAD⁺ in der Co-Kristallisation und den *Soaking*-Experimenten eingesetzt (Abschnitt 3.3.4.1 und 3.3.4.2). Lediglich nach *Soaking* der Kristalle mit einer NAD⁺-Lösung konnten Komplexstrukturen bestimmt werden (Abschnitt 3.4.4).

Vom NAD⁺-Molekül sind zwei verschiedene Konformationen bekannt: eine kompakte, gefaltete und eine gestreckte. Letztere wird vorwiegend beobachtet, wenn das Molekül an Proteine gebunden ist. Durch kristallographische Analyse dieser Komplexe konnte die gestreckte Konformation des Moleküls relativ gut charakterisiert werden. Das NAD⁺ nimmt dagegen die kompakte Konformation an, wenn es sich in wässriger Lösung befindet. Von dieser Konformation sind nur wenige strukturelle Informationen vorhanden. Zudem wird vermutet, dass sich in wässriger Lösung ein Gleichgewicht zwischen der kompakten und der gestreckten Konformation des NAD⁺-Moleküls einstellt (Jardetzky & Wade-Jardetzky, 1966; Miles & Urry, 1968; Oppenheimer *et al.*, 1971).

Abhängig vom verwendeten pH-Wert und der Inkubationszeit während des *Soaking*-Experimentes konnte in den Komplexstrukturen sowohl die kompakte als auch die gestreckte Konformation des NAD⁺-Moleküls bestimmt werden (Abschnitt 3.4.4). Eine schematische Darstellung des NAD⁺-Moleküls mit der Bezeichnung einzelner Atome, wie sie im folgenden verwendet wird, ist im Anhang 6.6 zu finden.

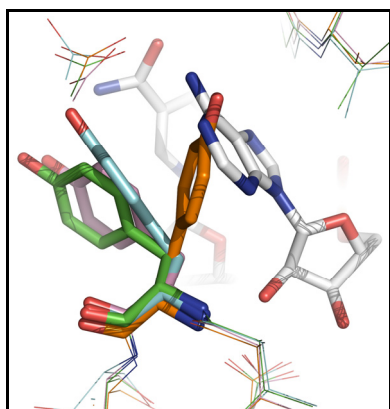
3.6.1 Vergleich der Ligand-freien Struktur mit den Komplexstrukturen

Beim Vergleich der NL63-X-Struktur mit den Strukturen im Komplex mit NAD⁺ sind keine Veränderungen in der Tertiärstruktur zu beobachten. Selbst die größeren Loop-Regionen sind in ihrem Verlauf gleich. Die Standardabweichungen der C_α-Atome zwischen NL63-X und den Komplexen liegen bei 0,35 Å für den Komplex 1 (pH 7,5, 2 h, RT) und Komplex 2 (pH 6,5, 2 h, RT), sowie 0,46 Å für den Komplex 3 (pH 7,5, 5 h, 12 °C). Beim

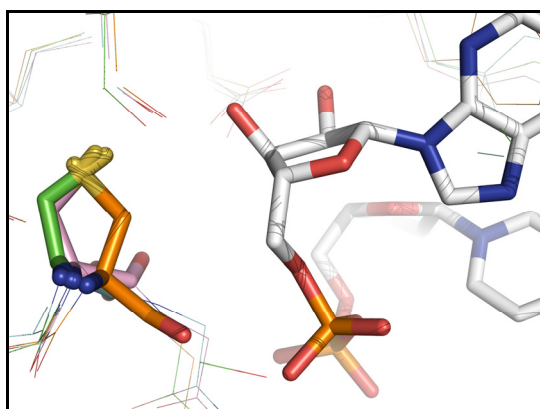
genaueren Betrachten der Strukturen zeigen sich bei sieben Aminosäureresten größere oder kleinere Veränderungen.

Mit die größte Veränderung zeigt die Seitenkette des Tyr148, welche ab dem C β -Atom um $\sim 80^\circ$ wegklappt. Wie aus Abbildung 3.35a ersichtlich ist, wäre ohne diese Umlagerung die Bindung des NAD $^+$ aufgrund einer Kollision der Tyr-Seitenkette mit der Adenin-Base nicht möglich. Eine weitere Abweichung in der Orientierung der Seitenkette ist beim Cys120 zu sehen (Abbildung 3.35b). Während die Cys-Seitenkette in der Ligand-freien Struktur ins Proteininnere zeigt, ändert sich dessen Orientierung nach Bindung des Liganden zur Bindungstasche hin. Relativ weit von der Bindungstasche entfernt, aber doch eine kleine Veränderung in der Orientierung zeigt die Seitenkette des Phe81 (Abbildung 3.35c).

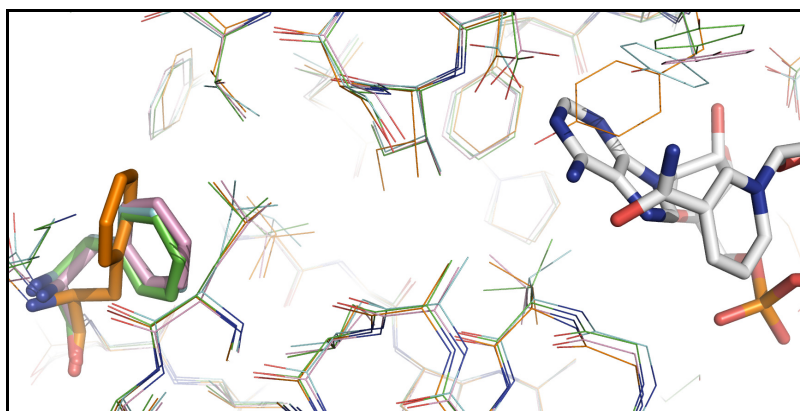
Beim Vergleich der Kristallstrukturen zeigen sich nicht nur Unterschiede zwischen der Ligand-freien Struktur und den Protein-Ligand-Strukturen, sondern auch zwischen den Letztgenannten selbst. Die Seitenketten von Val42, Ile122 und Phe123 des Komplexes 1 zeigen Abweichungen zu den anderen Strukturen (Abbildung 3.35d, e).



a)



b)



c)

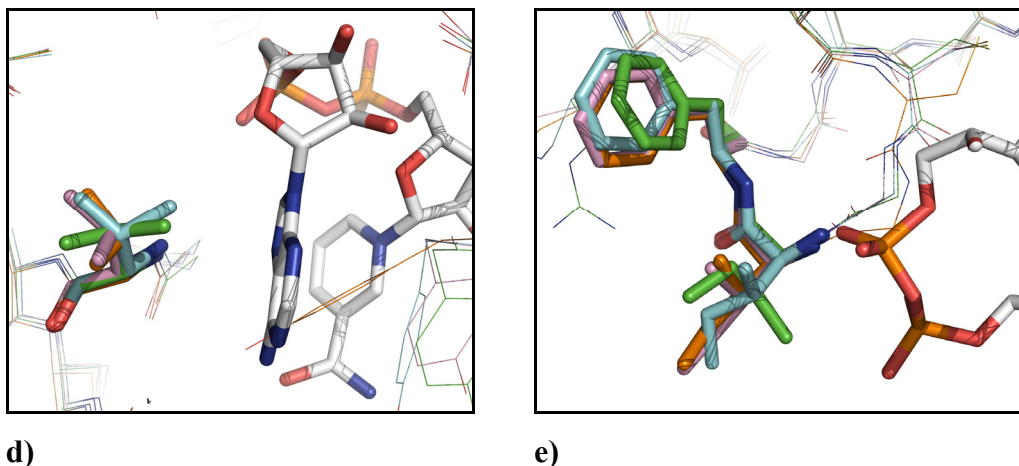


Abbildung 3.35: Stab-Darstellung einzelner Aminosäurereste der Ligand-freien Struktur und der Komplexe. a) Tyr148, b) Cys120, c) Phe81, d) Val42, e) Ile122, Phe123; C-Atome sind orange (NL63-X), grün (Komplex 1: pH 7,5, 2 h, RT), pink (Komplex 2: pH 6,5, 2 h, RT), türkis (Komplex 3: pH 7,5, 5 h, 12 °C), O-Atome sind rot und N-Atome sind blau dargestellt.

3.6.2 Bindung des NAD^+ in der kompakten Konformation

In der Kristallstruktur, welche aus dem *Soaking*-Experiment bei pH 7,5 für 2 h bei 20 °C bestimmt wurde (Komplex 1), liegt das NAD^+ -Molekül in einer kompakten Konformation vor. Es ist positioniert an den C-Termini des $\beta 6$ - und $\beta 7$ -Stranges und am N-Terminus der $\alpha 2$ -Helix (Abbildung 3.36). Der Ligand ist weiter umgeben vom $\beta 2$ - $\alpha 1$ -, $\beta 7$ - $\alpha 6$ - und $\beta 6$ - $\alpha 5$ -Loop.

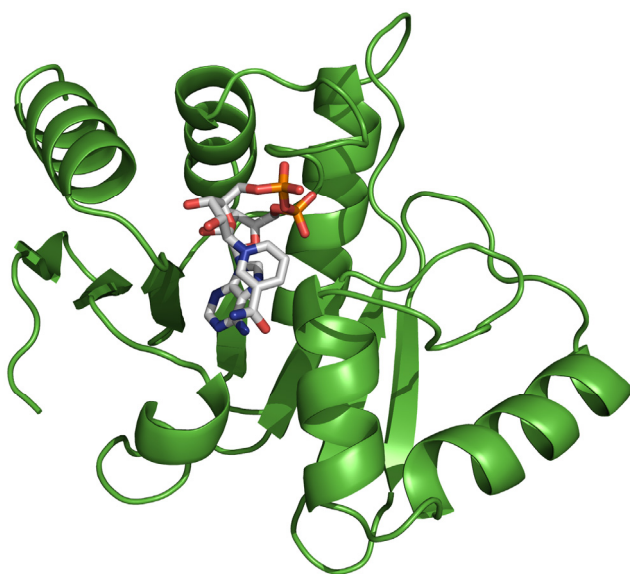


Abbildung 3.36: Struktur des NL63-Xst im Komplex mit NAD^+ (Stab-Darstellung) in der kompakten Konformation (Komplex 1).

Der Adenosinmonophosphat-Teil des NAD^+ ist eingebettet in die Bindungstasche des Proteins. Der Nikotinamid-Nukleotid-Rest (zweite Phosphatgruppe, Nikotinamid-Ribose und Nikotinamid) zeigt dagegen aus der Bindungstasche hinaus in die Lösung (Abbildung 3.37).

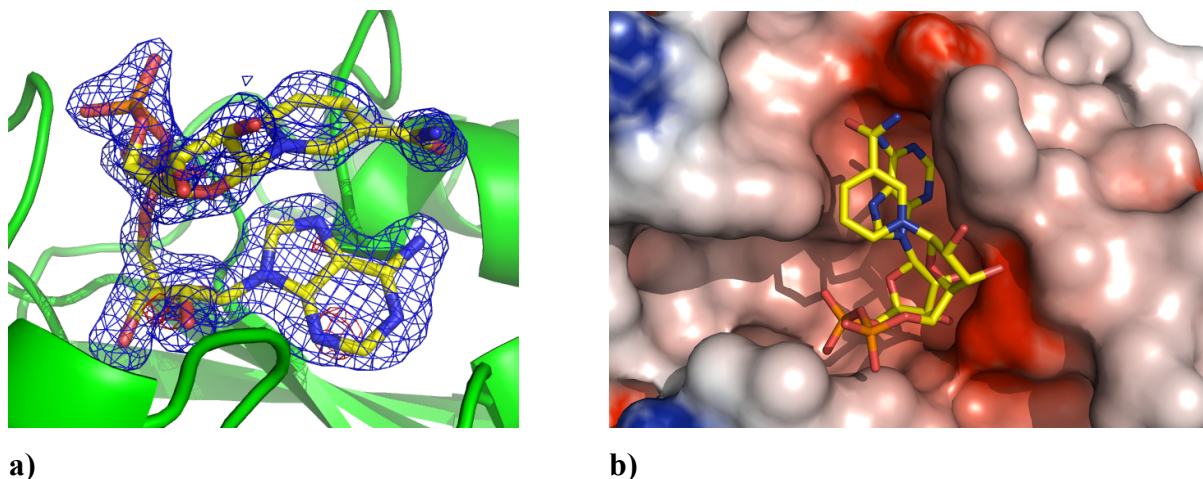
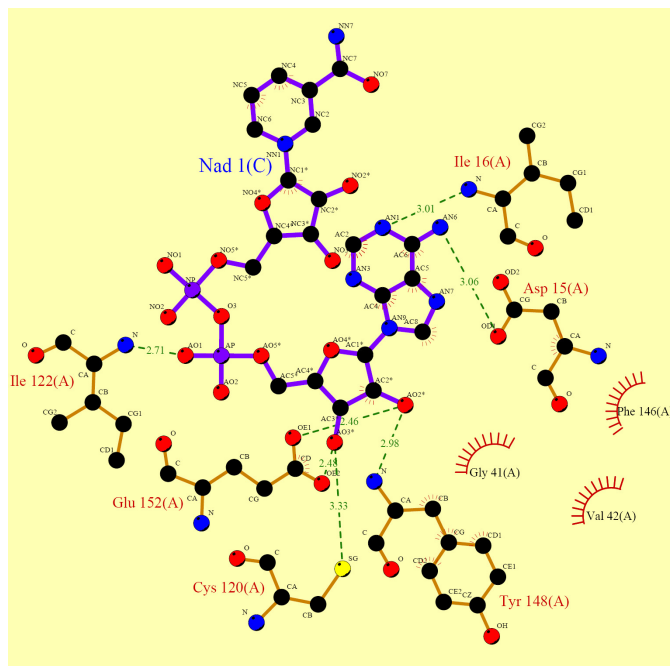


Abbildung 3.37: Darstellung des NAD^+ -Moleküls in der Protein-Bindungstasche. a) 2Fo-Fc-Elektronendichte (blau, 1 σ) und Fo-Fc-Elektronendichte (grün [3 σ] und rot [-3 σ]) des Liganden nach der letzten Verfeinerung, b) Oberflächendarstellung des Proteins und Stab-Darstellung des Liganden.

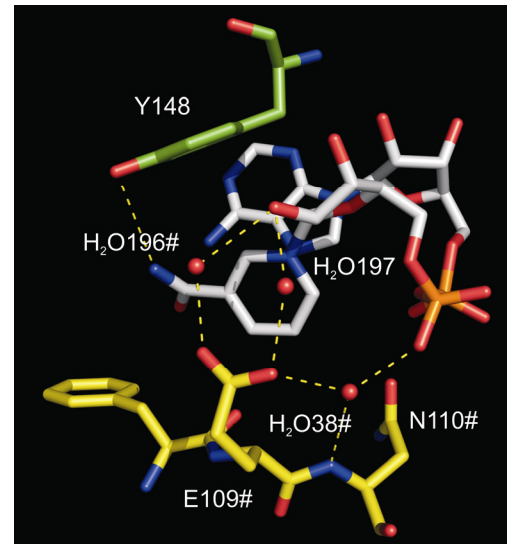
Abbildung 3.38 zeigt die Aminosäurereste des NL63-Xst, die an der Bindung des NAD^+ beteiligt sind. Die Bindung des Adenins erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen der Asp15-Seitenkette zum N6 (3,06 Å) und der Ile16-Amidgruppe zum N1 der Purinbase (3,01 Å). Die Ribose des Adenosins wird über die Seitenketten des Cys120 und des Glu152 gebunden. Die Cys-Seitenkette bildet dabei eine Wasserstoffbrückenbindung von 3,33 Å zum O3' der Ribose. O_{ε1} und O_{ε2} der Glu-Seitenkette bilden H-Brücken mit O2' (2,46 Å) bzw. O3' (2,48 Å) des Zuckers. Ebenfalls beteiligt an der Bindung der Adenosin-Ribose ist die Amidgruppe des Tyr148. Diese bildet eine H-Brücke von 2,98 Å zum O2'. Die Bindung der ersten Phosphatgruppe erfolgt über O1 zur Amidgruppe des Ile122 (2,71 Å).

Der Nikotinamid-Nukleotid-Rest des NAD^+ -Moleküls bildet H-Brücken mit den Aminosäureresten eines Symmetriemoleküls (dies wird im Folgenden gekennzeichnet durch “#”). Die Bindung der zweiten Phosphatgruppe des Liganden erfolgt dabei über das H₂O38 des Symmetriemoleküls (H₂O38#). Dieses bildet H-Brücken zum O1 des Phosphatrestes des Liganden (2,65 Å), zu O_{ε1} der Seitenkette von Glu109# (2,74 Å) und zur Amidgruppe des Asn110# (2,93 Å). Die Ribose des Nikotinamid-Nukleotid-Restes (Nikotinamid-Ribose) bildet über O2“ H-Brücken zum H₂O197 (2,51 Å) und zum H₂O196# (2,89 Å). Diese wiederum

interagieren mit der Seitenkette des Glu109# und bildeten dabei H-Brücken mit O_{ε1} (2,63 Å) bzw. O_{ε2} (2,57 Å).



a)



b)

Abbildung 3.38: Bindung des NAD⁺-Moleküls in der kompakten Konformation. a) schematische Darstellung der Bindung des Adenosinmonophosphat-Restes, grün-gestrichelte Linien: H-Brückenbindungen, : hydrophobe Wechselwirkungen; b) Stab-Darstellung der Bindung des Nikotinamid-Nukleotid-Restes, C-Atome sind weiß (NAD⁺), grün (Aminosäurereste) oder gelb (Aminosäurerest des Symmetriemoleküls), O-Atome sind rot, N-Atome sind blau und Wassermoleküle sind als rote Kugeln dargestellt.

Wie bereits erwähnt, nimmt das NAD⁺ bei Bindung an ein Protein vorwiegend die gestreckte Konformation an. Dadurch sind dessen einzelnen Gruppen (Base, Zucker, Phosphatrest) der Proteinoberfläche zugänglich, was die Erkennung und Bindung des Liganden durch das Protein erleichtert. Im Komplex 1 ist das NAD⁺ in der kompakten Konformation hauptsächlich durch den Adenosinmonophosphat-Rest über teils starke Wasserstoffbrückenbindungen an das Protein gebunden. Abweichungen von der gestreckten Konformation zeigt auch das NAD⁺ im Komplex mit dem Diphtherietoxin und das NADP⁺ im Komplex mit der Katalase aus Rinderleber (Bell *et al.*, 1997; Fita & Rossmann, 1985). Die Liganden sind ein wenig kompakter angeordnet, aber keiner von beiden weist das für die kompakte Struktur typische parallele Ring-Stacking mit einem Abstand von ca. 3,4 Å zwischen dem Nikotinamid und dem Adenin auf. Tanner *et al.* beschrieben erstmals eine Kristallstruktur

eines Proteins (Flavin-Reduktase P, PDB 2BKJ) im Komplex mit einem gefalteten NAD^+ (Tanner *et al.*, 1999). Der Abstand zwischen dem Nikotinamid (C2) und dem Adenin (C6) wurde mit 3,9 Å gemessen (Diphtherietoxin: 12,4 Å, Katalase: 8,3 Å). Der entsprechende Abstand im Komplex 1 dieser Arbeit ist 4,4 Å. Der Adenin- und der Nikotinamid-Rest sind nicht ganz parallel angeordnet.

3.6.3 Bindung des NAD^+ in der gestreckten Konformation

Die gestreckte Konformation des NAD^+ -Moleküls konnte in zwei Kristallstrukturen ermittelt werden. Zum einen zeigt sich diese Konformation nach *Soaking* des Kristalls mit der Ligandenlösung bei pH 6,5 für 2 h bei 20 °C (Komplex 2). In dieser Struktur ist ebenfalls die kompakte Konformation des NAD^+ -Moleküls zu sehen, welche analoge Bindungspartner aufweist wie im Komplex 1 (Abschnitt 3.6.2). Zum anderen konnte die gestreckte Konformation nach dem *Soaking* bei pH 7,5 für 5 h bei 12 °C bestimmt werden (Komplex 3). Wie bereits in Abschnitt 3.4.4 erwähnt, konnte das NAD^+ im Komplex 2 und Komplex 3 nicht vollständig in die Elektronendichte eingepasst werden. Für den Nikotinamid-Rest des NAD^+ in der gestreckten Konformation fehlte gänzlich die Elektronendichte. Es wurde versucht, diesen Rest manuell in die Bindungstasche einzupassen. Dabei konnte der Nikotinamid-Rest in zwei verschiedene Richtungen zeigen: (1) in die hinter der Nikotinamid-Ribose gelegene Tasche im Protein oder (2) aus der Proteinstruktur heraus. Ersteres resultierte in mehreren Kollisionen des Nikotinamids mit den Aminosäureresten des Proteins. Bei der zweiten Möglichkeit wäre genügend Raum vorhanden, doch würde das NAD^+ in einer angespannten Konformation vorliegen. Somit wurde nur der ADP-Ribosyl-Rest in die Kristallstruktur eingebaut. Das mögliche Vorhandensein eines Oxocarbeniumions wird im Abschnitt 3.6.3.1 besprochen.

Der Adenosinmonophosphat-Teil des ADP-Ribosyl-Restes befindet sich analog zur kompakten Konformation des NAD^+ an den C-Termini der $\beta 6$ - und $\beta 7$ -Stränge und am N-Terminus der $\alpha 2$ -Helix. Die zweite Phosphatgruppe und die Nikotinamid-Ribose sind am C-Terminus des $\beta 3$ -Stranges positioniert. Der Ligand in der gestreckten Konformation ist vom $\beta 2$ - $\alpha 1$ -, $\beta 3$ - $\alpha 2$ -, $\beta 6$ - $\alpha 5$ - und vom $\beta 7$ - $\alpha 6$ -Loop umgeben (Abbildung 3.39).

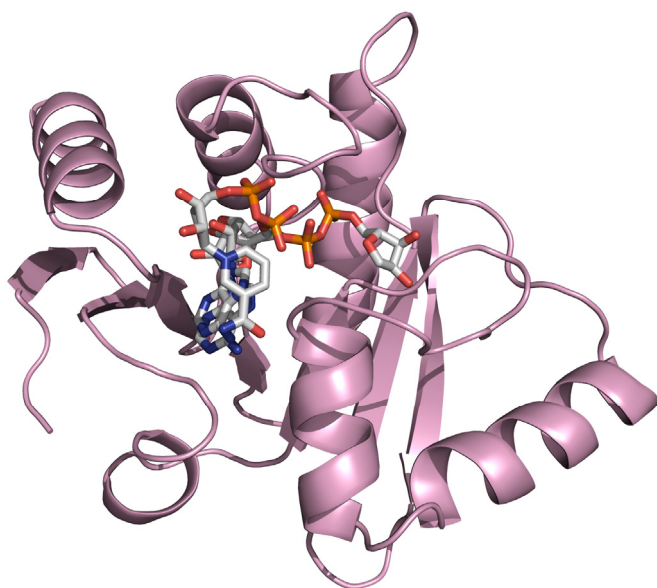
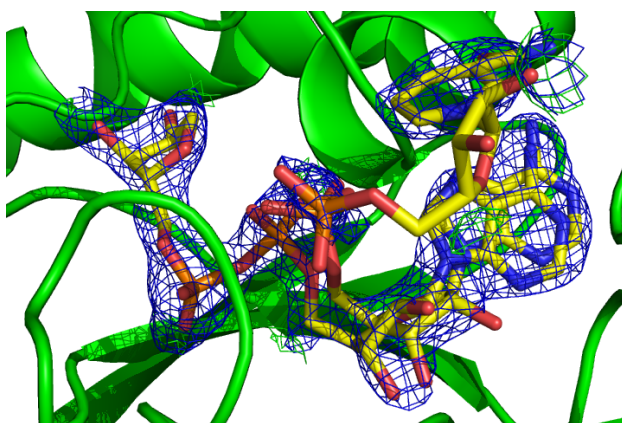
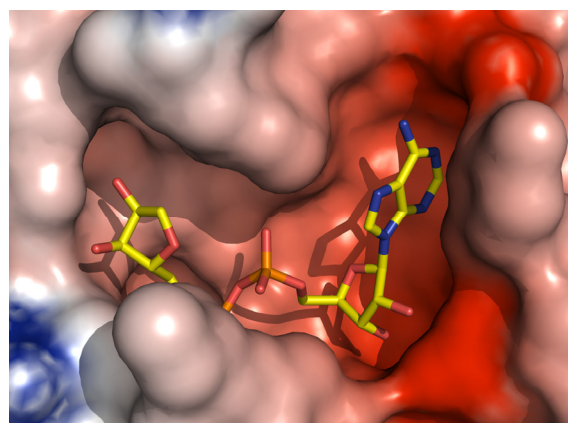


Abbildung 3.39: Struktur des NL63-Xst im Komplex mit NAD^+ (Stab-Darstellung) in der kompakten und gestreckten Konformation (Komplex 2).

Für die weitere Betrachtung der Bindung des NAD^+ in der gestreckten Konformation wird der Komplex 2 verwendet. Die Aussagen sind auch für Komplex 3 gültig (mit geringfügigen Abweichungen in den Längen der Wasserstoffbrückenbindungen). Im Gegensatz zum Komplex 1 füllt der Ligand im Komplex 2 die Bindungstasche des Proteins sehr gut aus (Abbildung 3.40).



a)



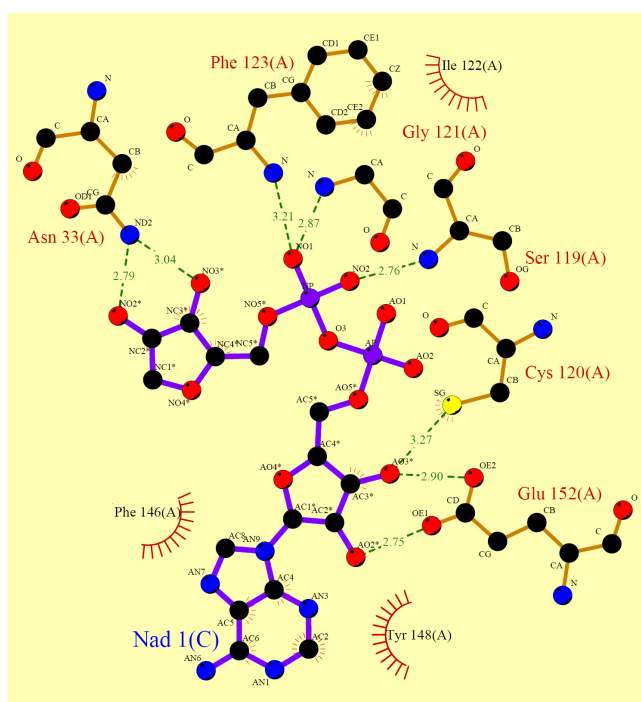
b)

Abbildung 3.40: Darstellung des NAD^+ -Moleküls in der Protein-Bindungstasche. a) 2Fo-Fc -Elektronendichte (blau, 1σ), Fo-Fc -Elektronendichte (grün [3σ]) und rot [-3σ]) nach der letzten Verfeinerung, b) Oberflächendarstellung des Proteins und Stab-Darstellung des Liganden.

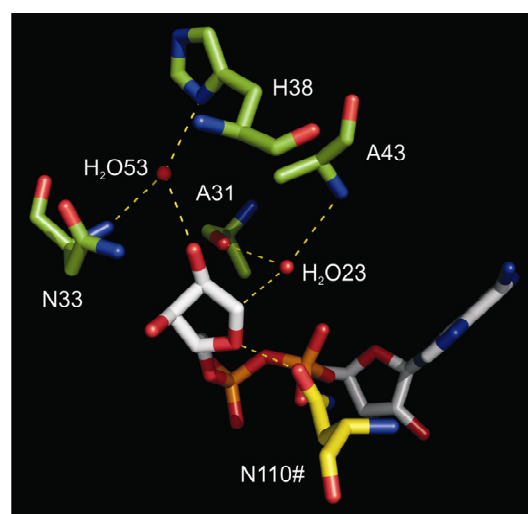
An der Bindung des Liganden in seiner gestreckten Konformation sind unter anderem die für die Bindung des NAD^+ in der kompakten Konformation beschriebenen Aminosäurereste beteiligt (Abschnitt 3.6.2, Abbildung 3.41a). Die Seitenkette des Asp15 und die Amidgruppe des

Ile16 bilden H-Brücken mit N6 bzw. N1 des Adenins, jedoch sind diese mit 3,81 Å und 3,35 Å deutlich schwächer als im Komplex 1 (kompakte Konformation, Abschnitt 3.6.2). Die Adenosin-Ribose wird auch hier über die OH-Gruppen mit den Seitenketten des Glu152 und des Cys120 gebunden. O_{ε1} und O_{ε2} des Glu152 bilden H-Brücken mit O2' (2,75 Å) bzw. O3' (2,90 Å) und die Seitenkette des Cys120 eine H-Brücke von 3,27 Å mit O3'.

Die Bindung der zweiten Phosphatgruppe des ADP-Ribosyl-Restes erfolgt durch die Aminosäurereste des β6-α5-Loops (L11) mit der ¹¹⁹SCGIF₁₂₃-Sequenz (Abbildung 3.41a). Dabei kommt es zur H-Brückenbildung zwischen dem O1 und der Amidgruppe des Gly121 (2,87 Å) und der des Phe123 (3,21 Å). Die Amidgruppe des Ser119 (2,76 Å) bildet eine H-Brückenbindung mit dem O2. Die Bindung der Nikotinamid-Ribose erfolgt durch die Seitenkette des Asn33. Dessen N_{δ2} bildet H-Brücken mit dem O3'' (3,04 Å) und dem O2'' (2,79 Å) des Zuckers.



a)



b)

Abbildung 3.41: Bindung des ADP-Ribosyl-Restes vom NAD⁺ in der gestreckten Konformation. a) schematische Darstellung der Bindung des Liganden, grün-gestrichelte Linien: H-Brückenbindungen, : hydrophobe Wechselwirkungen; b) Stab-Darstellung der durch H₂O-Moleküle vermittelten Kontakte und Beteiligung eines Aminosäurerestes des Symmetriemoleküls, C-Atome sind weiß (ADP-Ribosyl-Rest), grün (Aminosäurereste) oder gelb (Aminosäurerest des Symmetriemoleküls), O-Atome sind rot, N-Atome sind blau und Wassermoleküle sind als rote Kugeln dargestellt.

Ala31, Asn33, His38 und Ala43 sind ebenfalls an der Bindung der Nikotinamid-Ribose beteiligt. Sie interagieren nicht direkt mit dem ADP-Ribosyl-Rest, sondern über Wassermoleküle (Abbildung 3.41b). Das H₂O23 bildet eine H-Brücke zur Amidgruppe des Ala43 (3,21 Å) sowie zur Carbonylgruppe des Ala31 (2,81 Å). Das H₂O53 (2,80 Å) interagiert mit dem O2“ der Ribose als auch mit dem N_{δ1} der Seitenkette des His38 (2,84 Å) und der Amidgruppe des Asn33 (3,11 Å). Die Bildung von H-Brücken zu Aminosäureresten eines Symmetriemoleküls ist lediglich beim Asn110# der Fall. Dessen Seitenkette bildet über das O_{δ1} eine H-Brückenbindung mit dem O4“ (3,02 Å) der Nikotinamid-Ribose.

3.6.3.1 Das Oxocarbeniumion des ADP-Ribosyl-Restes

Für die gestreckte Konformation des NAD⁺ konnte während der Verfeinerung des Modells keine Elektronendichte für den Nikotinamid-Rest ausgemacht werden, so dass nur der ADP-Ribosyl-Rest eingepasst wurde (Abschnitt 3.4.4). Des Weiteren fehlte die Elektronendichte für eine vom C1 der Nikotinamid-Ribose (C1“) ausgehende Bindung, welche beim NAD⁺ die Verknüpfung mit dem Nikotinamid-Rest bildet (Abbildung 3.42). Das C1“ schien somit als Oxocarbeniumion vorzuliegen.

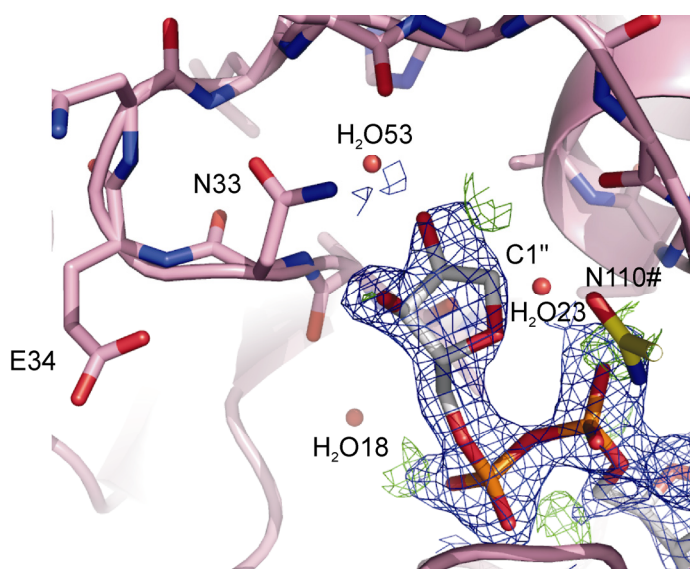


Abbildung 3.42: Das Oxocarbeniumion des ADP-Ribosyl-Restes in der Bindungstasche des NL63-Xst (Komplex 2). Stab-Darstellung des Liganden und ausgewählter Aminosäurereste: C-Atome sind weiß (Ligand), pink (NL63-Xst) und gelb (Aminosäurerest des Symmetriemoleküls), O-Atome sind rot, N-Atome sind blau, P-Atome sind orange und Wassermoleküle sind als rote Kugeln dargestellt. 2Fo-Fc-Elektronendichte ist blau (1 σ) und Fo-Fc-Elektronendichte ist grün (3 σ) bzw. rot (-3 σ) dargestellt (nach der letzten Verfeinerung).

Die Tatsache, dass für den Nikotinamid-Rest des NAD^+ keine Elektronendichte beobachtet werden konnte und auch der manuelle Einbau dieses Restes nicht möglich war (Abschnitt 3.4.4), lässt vermuten, dass während des *Soakings* der Liganden-Lösung in den Kristall eine Spaltung des NAD^+ an der N-glykosidischen Bindung zwischen dem Nikotinamid und der Ribose stattgefunden hat.

ADP-Ribosylierungsreaktionen

NAD^+ ist hauptsächlich als Cofaktor bei Redoxreaktionen bekannt. Es gibt aber auch eine Reihe von Enzymen, die NAD^+ als Cosubstrat nutzen und es in der enzymatischen Reaktion verbrauchen. Dabei kann das Dinukleotid zum einen an der N-glykosidischen Bindung zwischen dem Nikotinamid und der Ribose (ADP-Ribosylierung) und zum anderen an der Pyrophosphatbindung (Adenylierung) enzymatisch gespalten werden (Abbildung 3.43).

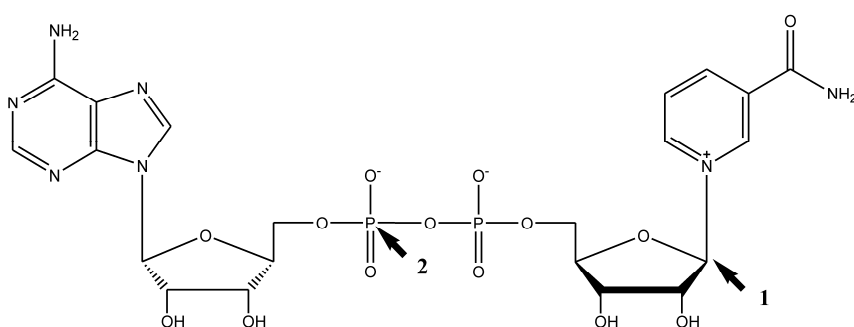


Abbildung 3.43: NAD^+ als Cosubstrat bei enzymatischen Reaktionen. Dargestellt ist das NAD^+ mit den entsprechenden Spaltstellen für die ADP-Ribosylierung (1) und die Adenylierung (2).

ADP-Ribosylierungsreaktionen spielen eine wichtige Rolle in vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen. Die sogenannten ADP-Ribosyltransferasen können in Mono-(ADP-Ribosyl-)Transferasen (mADPRTs) und Poly-(ADP-Ribosyl-)transferasen (pADPRTs) eingeteilt werden. Bakterielle Toxine wie das Pertussistoxin aus *Bordetella pertussis* und das Diphtherietoxin aus *Corynebacterium diphtheriae* sind mADPRTs und übertragen eine ADP-Ribose-Einheit von NAD^+ auf ein Zielprotein. Dadurch können sie beim Menschen gefährliche Krankheiten verursachen (Keuchhusten, Diphtherie), oft mit tödlichem Ausgang. Eukaryotische mADPRTs und pADPRTs wie z.B. die Poly(ADP-Ribosyl-)Polymerase 1 (PARP-1) sind dagegen nicht-toxische Enzyme, die u.a. an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt sind.

Bei der enzymatischen Spaltung der Bindung zwischen dem Nikotinamid und der Ribose entsteht intermediär ein Oxocarbeniumion (Oppenheimer, 1994). Dieses wird stabilisiert durch Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen eines katalytischen Glutamat-Restes mit den 2', 3'-OH-Gruppen der Ribose. Ein in den Strukturen konserviertes Wassermolekül trägt möglicherweise ebenfalls durch H-Brückenbildung zur 2'-OH-Gruppe der Ribose zur Stabilisierung bei (Liu *et al.*, 2006). In den Strukturen der PARP-1 und des Diphtherietoxins ist solch ein Glutamat-Rest in der aktiven Seite konserviert (Bell *et al.*, 1997; Berti *et al.*, 1997; Ruf *et al.*, 1998; Lin, 2007).

Stabilisierung des Oxocarbeniumions im Komplex 2

Abbildung 3.42 zeigt die Aminosäurereste und Wassermoleküle in der näheren Umgebung des Oxocarbeniumions. Glu34 (NL63-X) folgt in der Primärstruktur direkt der innerhalb der coronaviralen X-Domäne stark konservierten ₂₉VNAAN₃₃-Sequenz (Abschnitt 3.5.2). Auch in den Strukturen von 229E-X und IBV-X befindet sich an dieser Position ein Glu-Rest. In anderen coronaviralen X-Domänen wie z.B. dem SARS-X und auch im Makrodomänen-Protein AF1521 aus *Archaeoglobus fulgidus* ist dieser Rest jedoch nicht konserviert (Ile-Rest bzw. Lys-Rest). Mit 7,70 Å ist der Abstand von der Seitenkette des Glu34 zur 2'-OH-Gruppe der Ribose relativ groß. Deutlich näher befindet sich das Asn33. Die Seitenkette des Asn33 kann H-Brückenbindungen zur 2'- und 3'-OH-Gruppe der Ribose bilden (2,79 Å bzw. 3,04 Å). Eine Stabilisierung des Oxocarbeniumions durch einen Asn-Rest und ein Wassermolekül ist von Zhao *et al.* (2004) für das Sir2-Homolog yHst2 aus *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben worden. Sir2-Proteine (*silent information regulator 2*) sind NAD⁺-abhängige Deacetylasen und spalten das Dinukleotid ebenfalls an der N-glykosidischen Bindung zwischen dem Nikotinamid und der Ribose. Diese Enzyme sind weit verbreitet und spielen u.a. eine Rolle in der DNA-Reparatur. Der Asn33-Rest des NL63-X ist innerhalb der coronaviralen X-Domäne und auch innerhalb der in dieser Arbeit besprochenen Makrodomänen-Proteine konserviert (siehe Einleitung Abbildung 1.7, Abbildung 3.34). Für die X-Domäne des HCoV-229E und des SARS-CoV konnte gezeigt werden, dass eine Mutation dieses Aminosäurerestes zum Verlust der ADP-Ribose-1'-Monophosphatase-Aktivität führt (Putics *et al.*, 2005; Egloff *et al.*, 2006), bei der es zur Abspaltung eines Phosphatrestes vom C1' der Ribose kommt.

Die in Abbildung 3.42 dargestellten Wassermoleküle (H₂O18, H₂O23 und H₂O53) sind in den bekannten Strukturen der Makrodomänen-Proteine (inkl. coronavirale X-Domäne) konserviert. Das H₂O23-Molekül interagiert mit der Carbonylgruppe von Ala31 (2,81 Å) und der Amidgruppe von Ala43 (3,21 Å). Des Weiteren kann von diesem Wassermolekül ein Abstand

zum C1“ von 3,16 Å gemessen werden. Das H₂O53-Molekül bildet H-Brückenbindungen zur Seitenkette des His38 (2,84 Å), zur Amidgruppe des Asn33 (3,11 Å) und zum O2“-der Ribose. Vermutlich sind diese zwei Wassermoleküle (H₂O23 und H₂O53) zusammen mit dem Asn33-Rest an der Stabilisierung des Oxocarbeniumions und/oder der Katalyse der NAD⁺-Spaltung beteiligt. Das H₂O18-Molekül interagiert nicht mit dem ADP-Ribosyl-Rest im Komplex 2. Es bildet H-Brückenbindungen zur Carbonylgruppe von Ala32 (2,76 Å) und Val86 (3,11 Å), sowie zur Amidgruppe von Gly88 (2,82 Å).

3.6.3.2 NAD⁺-Spaltungsaktivität des NL63-X

Wie im vorherigen Abschnitt besprochen, lassen die Kristallstrukturen des Komplexes 2 und des Komplexes 3 der Nsp3 X-Domäne von HCoV-NL63 mit dem ADP-Ribosyl-Rest des NAD⁺ eine Spaltung des Dinukleotids während des *Soaking*-Experimentes vermuten. Im folgenden Versuch wurde daraufhin eine mögliche hydrolytische Aktivität der X-Domäne des HCoV-NL63 auf das NAD⁺ untersucht.

Das Protein NL63-Xst und NAD⁺ wurden bei verschiedenen pH-Werten, Zeiten und Temperaturen inkubiert (Abschnitt 2.2.4.9, Tabelle 3.14). Im Anschluss erfolgte eine chemische Modifikation des NAD⁺ und eine Absorptionsmessung bei 378 nm. Eine hydrolytische Spaltung des NAD⁺ zeigte sich somit durch einen geringeren Absorptionswert im Vergleich zur Negativ-Probe (Reaktionsansatz ohne Zugabe von Protein). Die ermittelten Absorptionswerte sind in Abbildung 3.44 dargestellt.

Tabelle 3.14: Zusammensetzung der Proben und die verschiedenen Parameter für die NAD⁺-Spaltungsreaktion.

Probe	Zusammensetzung	pH-Wert	Inkubation
1	NL63-Xst + NAD ⁺	6,5	20 °C über Nacht
2	NAD ⁺	6,5	
3	NL63-Xst + NAD ⁺	7,0	
4	NAD ⁺	7,0	
5	NL63-Xst + NAD ⁺	6,5	30 °C 5 h
6	NAD ⁺	6,5	
7	NL63-Xst + NAD ⁺	7,0	
8	NAD ⁺	7,0	

Für die Proben, die das Protein enthielten, konnten geringere Absorptionen gemessen werden als für die entsprechende Negativkontrolle (ohne Zusatz von NL63-Xst). Der Unterschied in den Absorptionswerten war größer bei pH 7,0 und Inkubation über Nacht bei 20 °C als in den entsprechenden Ansätzen bei pH 6,5. Für die Reaktionsansätze, die bei 30 °C für 5 h inkubiert wurden, konnten größere Unterschiede bei pH 6,5 als bei pH 7,0 ermittelt werden.

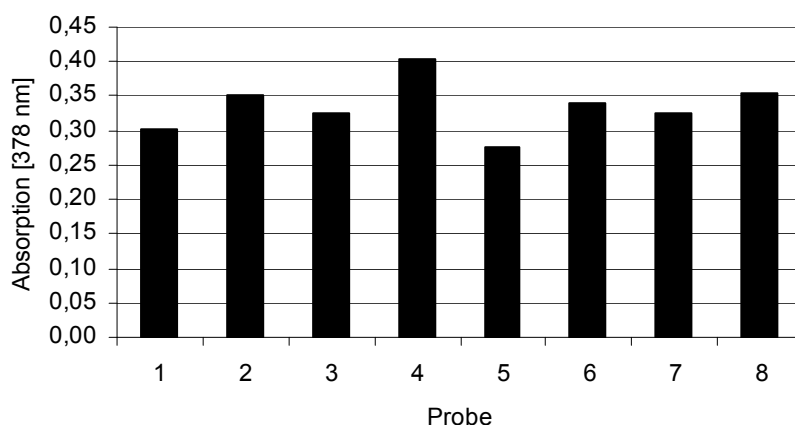


Abbildung 3.44: Säulendiagramm der ermittelten Werte aus der hydrolytischen Spaltung mit anschließender chemischen Modifikation des NAD^+ . Die Zusammensetzung der Proben ist in Tabelle 3.14 aufgeführt.

Während der ADP-Ribosylierungsreaktion von z.B. bakteriellen Toxinen wird das NAD^+ gespalten und der ADP-Ribosyl-Rest auf ein Akzeptorprotein übertragen. Für das Pertussistoxin und das Diphtherietoxin konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit des Akzeptorproteins die Hydrolyse des NAD^+ zu ADP-Ribose und Nikotinamid deutlich verlangsamt abläuft (Berti *et al.*, 1997). Das Fehlen eines Akzeptorproteins während der NAD^+ -Spaltungsreaktion könnte eine Erklärung sein für die geringen Unterschiede in der Absorption und somit einer sehr langsamen Hydrolyse des NAD^+ .

3.6.3.3 Mögliche Funktionen der X-Domäne als NAD^+ -spaltendes Enzym

Für Makrodomänen-Proteine konnte bereits gezeigt werden, dass sie Metabolite des NAD^+ wie ADP-Ribose oder O-Acetyl-ADP-Ribose binden können (Till & Ladurner, 2009). Die Identifizierung einer coronaviralen X-Domäne oder eines Makrodomänen-Proteins als NAD^+ -spaltendes Enzym ist aus der Literatur derzeit jedoch noch nicht bekannt. Eine strukturelle Ähnlichkeit zu den zuvor beschriebenen Enzymen, die NAD^+ an der N-glykosidischen Bindung

zwischen dem Nikotinamid und der Ribose spalten, ist ebenfalls nicht erkennbar (Abschnitt 3.6.3.1). Diese Proteinstrukturen traten auch nicht als einer der mehr als 500 Treffer in der Ergebnisliste der Datenbank-Recherche auf.

Eine mögliche enzymatische Aktivität der X-Domäne kann (1) zur hydrolytischen Spaltung des NAD^+ in ADP-Ribose und Nikotinamid und/oder (2) zur Spaltung des NAD^+ und anschließende ADP-Ribosylierung eines Akzeptor-Moleküls führen. Beide Reaktionen sind dabei vermutlich eher in Virus-Wirt-Interaktionen als direkt in der Replikation/Transkription des viralen Genoms involviert.

Hydrolytische Spaltung des NAD^+

Wie bereits in der Einleitung erwähnt (Abschnitt 1.4.2) besitzt das nicht-strukturelle Protein 3 (Nsp3) drei Transmembranregionen, von denen zwei die Doppelmembran durchspannen (Oostra *et al.*, 2006). Die Nsp3 X-Domäne befindet sich somit auf der zytosolischen Seite der Membranstrukturen, die den Replikations/Transkriptions-Komplex der Coronaviren schützen. Speziell bei der hydrolytischen Spaltung des Dinukleotids in ADP-Ribose und Nikotinamid wäre die Lage der X-Domäne auf der zytosolischen Seite der Membranstrukturen von Vorteil. Die X-Domäne könnte somit an der Regulation der zellulären NAD^+ -Konzentration beteiligt sein. NAD^+ ist ein wichtiges Coenzym und wird außerdem als Substrat für ADP-Ribosylierungsreaktionen verwendet. Des Weiteren nutzen NAD^+ -Glykohydrolasen/ADP-Ribosyl-Zyklasen das Dinukleotid als Substrat und generieren u.a. zyklische ADP-Ribose, ein sekundärer Botenstoff, der die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum bewirkt. Bei Säugetieren sind derzeit zwei ADP-Ribosyl-Zyklasen bekannt, CD38 und CD157 (Lin, 2007). ADP-Ribose wurde lange Zeit als Abbauprodukt des NAD^+ ohne biologische Funktion angesehen. Heutige Studien zeigen jedoch, dass extrazelluläre ADP-Ribose und extrazelluläres NAD^+ über einen noch unbekannten Mechanismus für das Einstromen von Ca^{2+} und somit für einen intrazellulären Konzentrationsanstieg verantwortlich sind (Ziegler & Niere, 2004).

ADP-Ribosylierung

Über die ADP-Ribosylierung, d.h. Aktivierung bzw. Inaktivierung verschiedener Enzyme, könnten ebenfalls zelluläre Abläufe im Wirt durch die X-Domäne reguliert werden. Die Poly(ADP-Ribosyl)-Polymerase 1 (PARP-1) besteht aus drei Domänen: einer N-terminalen DNA-Bindedomäne mit zwei Zink-Finger-Motiven, einer Automodifikationsdomäne (reich an Glutamat- und Aspartat-Resten) und der katalytischen Domäne am C-Terminus. Das

coronavirale Nsp3 besitzt am N-Terminus ebenfalls eine Domäne, die reich an Glutamat- und Aspart-Resten ist (saure Domäne, siehe Einleitung Abschnitt 1.4.1). Die PARP-1 überträgt die ADP-Ribose-Einheit des NAD^+ nicht nur auf verschiedene Akzeptorproteine wie z.B. Histone und DNA-Reparaturenzyme, sondern auch auf Glu- oder Asp-Reste der eigenen Automodifikationsdomäne. Eine Automodifikation durch ADP-Ribosylierung wäre auch für die coronavirale X-Domäne denkbar und könnte u.a. einen Einfluss auf die Aktivität der anderen Domänen des Nsp3 (PL1^{pro} , PL2^{pro}) haben.

3.6.3.4 Validierung der erzielten Ergebnisse

Eine Wechselwirkung der HCoV-NL63 X-Domäne mit dem NAD^+ konnte sowohl durch biochemische Methoden (ZIGE, Abschnitt 3.2.2.1) als auch durch die Bestimmung der Komplexstrukturen (Abschnitt 3.4.4) gezeigt werden. In zwei der drei Komplexstrukturen (Komplex 2 und Komplex 3, Abschnitt 3.4.4) scheint das C1“ der Nikotinamid-Ribose als Oxocarbeniumion vorzuliegen, woraus sich die Vermutung ableiten lässt, dass das NAD^+ an der N-glykosidischen Bindung zwischen dem Nikotinamid und der Ribose gespalten wurde. Ein enzymatischer Assay bestätigte die Spaltung des NAD^+ nach Inkubation des Dinukleotids mit der NL63-Xst-Proteinlösung (Abschnitt 3.6.3.2). Aus diesen Ergebnissen lassen sich mögliche regulatorische Funktionen der coronaviralen X-Domäne ableiten (vorheriger Abschnitt).

Die *Soaking*-Experimente, die zur Bestimmung der Komplexstrukturen führten, wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt, zeigten aber das gleiche Ergebnis. Die Aminosäurereste und auch der Ligand konnten während der Strukturaufklärung sehr gut in die Elektronendichte eingepasst werden. Die *R*-Faktoren sind jedoch für beide Strukturen nach der letzten Verfeinerung noch relativ hoch (Tabelle 3.9), konnten aber nicht weiter verbessert werden. Weitere Komplexstrukturen, auch mit ADP-Ribose, wären daher empfehlenswert.

Der enzymatische Assay zur hydrolytischen Spaltung des NAD^+ durch die Nsp3 X-Domäne des HCoV-NL63 (Abschnitt 3.6.3.2) wurde gegen Ende dieser Arbeit durchgeführt. Zur Verifizierung der NAD^+ -Spaltungsaktivität der coronaviralen X-Domäne ist eine Optimierung dieses Assays oder der Nachweis der hydrolytischen Spaltung des NAD^+ mit einer sensitiveren Methode (z.B. durch Verwendung von radioaktiv markiertem NAD^+) notwendig.

3.6.4 Vergleich mit anderen Komplexstrukturen

Von der X-Domäne des SARS-CoV und vom Protein AF1521 sind ebenfalls Komplexstrukturen bekannt. Beide beinhalten ein ADP-Ribose-Molekül. Eine schematische Darstellung der ADP-Ribose-Bindung ist in Abbildung 3.45 dargestellt.

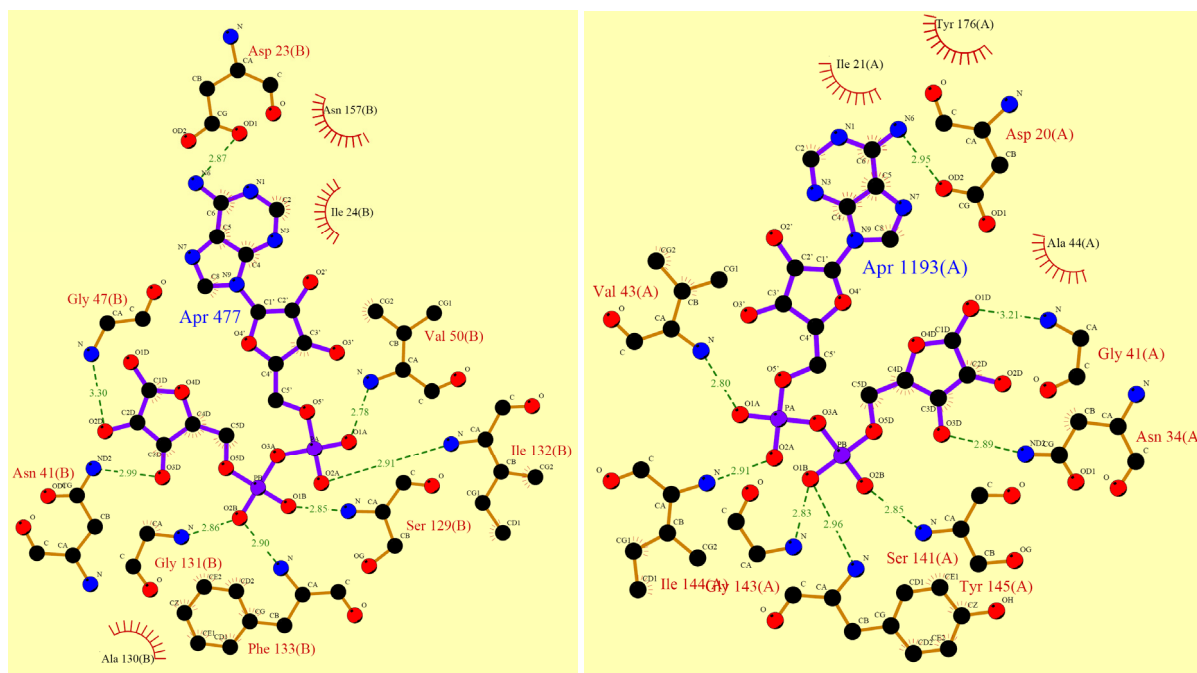


Abbildung 3.45: Schematische Darstellung der Bindungspartner des ADP-Ribose-Moleküls in SARS-X (links, PDB 2FAV) und AF1521 (rechts, PDB 2BFQ). H-Brückenbindungen sind durch grün-gestrichelte Linien und hydrophobe Wechselwirkungen durch  dargestellt.

Das ADP-Ribose-Molekül wurde in die X-Domäne des SARS-CoV (PDB 2FAV; Egloff *et al.*, 2006) durch *Soaking* und im Falle des AF1521 (PDB 2 BFQ; Karras *et al.*, 2005) durch Co-Kristallisation eingebracht. In beiden Strukturen nimmt das ADP-Ribose-Molekül eine gestreckte Konformation an und ist an der gleichen Stelle positioniert, wie es bereits für den Liganden in den Komplexen 2 und 3 beschrieben wurde (Abschnitt 3.6.3).

An der Bindung der ADP-Ribose im SARS-X und im AF1521 sind die gleichen Aminosäurereste beteiligt. Größtenteils sind diese Reste auch in der Bindung des Liganden in der X-Domäne des HCoV-NL63 zu finden. In allen drei Komplexstrukturen ist die Seitenkette eines Asp-Restes (Asp15 [NL63-X], Asp23 [SARS-X], Asp20 [AF1521]) an der Bindung des Adenins involviert. In allen untersuchten Proteinen ist der folgende Ile-Rest ebenfalls über hydrophobe Wechselwirkungen bzw. schwache H-Brückenbindung der Amidgruppe mit dem Adenin an der Bindung des Liganden beteiligt. Beim Vergleich der Primärstruktur der Proteine

sind diese beiden Aminosäurereste beim NL63-X und beim SARS-X konserviert. Beim AF1521 wird die Konservierung dieser Reste erst bei der Überlagerung der Tertiärstrukturen deutlich. Die anderen Aminosäurereste sind alle Bestandteil einer der vier konservierten Sequenz-Bereiche wie sie zuvor beschrieben worden sind (Abschnitt 3.5.2 und 3.5.3.2). So befindet sich der Asn-Rest (Asn33 [NL63-X], Asn41 [SARS-X], Asn34 [AF1521]) in der VNAAN-Sequenz (zweiter Asn-Rest). Der Aminosäurerest bildet auch in SARS-X und im AF1521 eine H-Brückenbindung zur 3'-OH-Gruppe der Nikotinamid-Ribose (2,99 Å bzw. 2,89 Å). Die stark an der Bindung der Phosphatgruppen beteiligten Aminosäurereste Ser, Gly und Ile sind Bestandteil der ebenfalls gut konservierten Loop-Region mit der Sequenz SXGIX (₁₁₉SCGIF₁₂₃ [NL63-X], ₁₂₉SAGIF₁₃₃ [SARS-X] und ₁₄₁SAGIY₁₄₅ [AF1521]). Abweichend ist hier der Cys120-Rest im NL63-X, welcher über die Seitenkette eine H-Brücke mit der Ribose des Adenosins eingeht. Solch eine Interaktion entfällt beim Ala im SARS-X und im AF1521.

Der Val-Rest (Val50 [SARS-X], Val43 [AF1521]) ist in den homologen Strukturen über die Amidbindung an der Bindung des ersten Phosphatrestes beteiligt. In der Komplexstruktur des NL63-X hat diese Bindung eine Länge von 3,65 Å. Gly47 von SARS-X und Gly41 von AF1521 sind jeweils Bestandteil der konservierten HGCGVA-Sequenz. Gly47 (SARS-X) bildet dabei eine H-Brücke (3,30 Å) mit dem O2' der Nikotinamid-Ribose. Die entsprechende Bindung mit dem Gly-Rest im AF1521 hat eine Länge von 3,66 Å und im NL63-X von 5,22 Å. Gly41 (AF1521) bildet eine H-Brücke (3,21 Å) mit der O1' der Nikotinamid-Ribose. Die entsprechende Bindung im SARS-X hat eine Länge von 3,40 Å. Im NL63-X konnte diese Bindung aufgrund des Fehlens der C1'-OH-Bindung nicht bestimmt werden. Der Glu152-Rest der X-Domäne des HCoV-NL63 ist stark in der Bindung der Adenosin-Ribose involviert. Dieser Aminosäurerest ist in den homologen Strukturen nicht konserviert. Im SARS-X befindet sich an dieser Stelle Leu161 und im AF1521 Ser180, welche keine Interaktionen mit dem Zuckermolekül zeigen.

Wenn es auch teilweise Unterschiede in einzelnen Bindungslängen gibt, so wird beim Vergleich der Komplexstrukturen deutlich, dass die Bindung der ADP-Ribose (SARS-X, AF1521) bzw. des ADP-Ribosyl-Restes (NL63-X Komplex 2 und Komplex 3) fast ausschließlich über konservierte Aminosäurereste erfolgt. Dies zeigt, dass die Funktion der X-Domäne womöglich nicht nur innerhalb der Coronaviren, sondern auch (teilweise) innerhalb der Makrodomänen-Proteine zu finden und somit weit verbreitet ist. Dabei kann es sich um die zuvor beschriebene enzymatische NAD⁺-Spaltung handeln oder eine andere mit ADP-Ribose-verbundene Aktivität. Im Nsp3 des SARV-CoV folgt der X-Domäne die SARS-*unique domain* (SUD). Tan *et al.* (2009) zeigten kürzlich, dass auch das SUD zwei Makrodomänen beinhaltet.

Diese zeigen jedoch keine Sequenzidentität zu den coronaviralen X-Domänen. Des Weiteren binden die zwei Makrodomänen oligo(G)- und oligo(dG)-Einheiten aber nicht ADP-Ribose (Tan *et al.*, 2007). Die genaue Funktion von SUD ist ebenfalls noch unklar. Tan *et al.* (2009), vermuten, dass es virale oder Wirts-RNA bindet und dadurch an der Regulation der viralen Replikation beteiligt ist oder die Abwehrmechanismen des Wirtes beeinflusst.

3.6.5 Mögliche Bindungstaschen im 229E-X und IBV-X

In den Interaktionsstudien konnte wie für das NL63-X auch für das 229E-X eine Affinität zu NAD^+ und ADP-Ribose gezeigt werden. Für das IBV hingegen waren die Ergebnisse negativ (Abschnitt 3.2). Eine Co-Kristallisation und das *Soaking* des 229E-X mit putativen Liganden war aufgrund der Instabilität der Proteinlösung bzw. der Proteinkristalle nicht möglich. Für das IBV-X wurden verschiedene *Soaking*-Experimente mit NAD^+ durchgeführt, sowohl bei pH 5,6 als auch bei pH 8,5. Nach Vermessung der Kristalle und Strukturbestimmung durch molekularen Ersatz konnte jedoch keine Elektronendichte für mögliche Liganden beobachtet werden, was die Ergebnisse der Interaktionsstudien bestätigt.

Die Kristallstrukturen von 229E-X und IBV-X (pH 5,6 bzw. pH 8,5) geben eine mögliche Erklärung für die oben beschriebenen Beobachtungen. Abbildung 3.46 zeigt die Oberflächendarstellung der Strukturen mit manuell eingebautem ADP-Ribosyl-Rest aus Komplex 2 des NL63-X (durch Überlagerung der Strukturen).

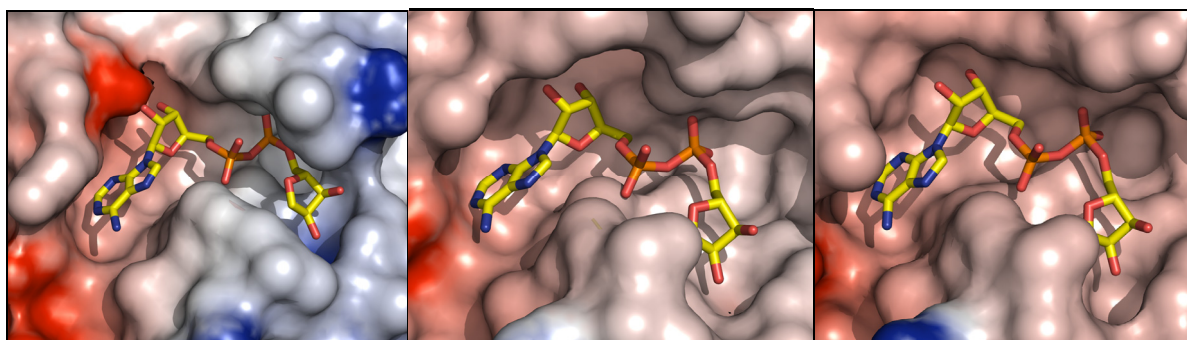


Abbildung 3.46: Bindungstaschen von 229E-X (links), IBV-X56 (Mitte) und IBV-X85 (rechts). Gezeigt ist die Oberflächendarstellung der Kristallstrukturen mit eingebautem ADP-Ribosyl-Rest (Stab-Modell) aus Komplex 2 der X-Domäne des HCoV-NL63.

In allen drei Strukturen lassen sich Vertiefungen in der Proteinoberfläche erkennen, die als Bindungstasche fungieren könnten. Im Falle des 229E-X füllt der eingebaute Ligand in Abbildung 3.46 (links) die Bindungstasche sehr gut aus. Bei den Strukturen des IBV-X ähnelt

die Bindungstasche im Bereich um den Adenosin-Rest der des 229E-X (und auch des NL63-X), ist aber im folgenden Bereich stark vergrößert. Wie für das NL63-X gezeigt wurde, erfolgt eine schwache Bindung des Adenins über die Seitenkette von Asp15 und die Amidgruppe des folgenden Ile16 (Abschnitt 3.6.3). Der Asp-Rest ist in allen Strukturen konserviert und könnte somit auch im 229E-X und im IBV-X mit dem Adenin-Ring interagieren. Der Ile-Rest ist nicht konserviert. Im 229E-X befindet sich an dieser Position ein Val-Rest und im IBV-X ein Leu-Rest. Da die Interaktion zwischen dem Adenin und der Amidgruppe des Rückgrates stattfindet, welches in allen Strukturen ähnlich verläuft, wäre auch diese Bindung möglich. Im NL63-X wird der Ligand in der gestreckten Konformation jedoch hauptsächlich gebunden durch: (1) Glu152, (2) ₁₁₉SCGIF₁₂₃-Sequenz und (3) Asn33 (Abschnitt 3.6.3). An der Position des Glu152 befindet sich im 229E-X das Glu155 und in den IBV-X-Strukturen das His163. Somit wären die zwei H-Brückenbindungen zur Ribose des Adenosins im 229E-X möglich, im IBV-X wären sie auf eine reduziert. Asn33 ist Teil der VNAAN-Sequenz, welche zu den vier konservierten Bereichen innerhalb der coronaviralen X-Domäne zählt (Abschnitt 3.5.2), und lässt sich in den Strukturen sehr gut überlagern (Abschnitt 3.5.2). Somit wäre die Bindung der Nikotinamid-Ribose durch diesen Aminosäurerest auch in 229E-X und IBV-X möglich. Den größten Anteil an der Bindung des Liganden im NL63-X hat die ₁₁₉SCGIF₁₂₃-Sequenz. Diese ist zumindest in der Primärsequenz der coronaviralen X-Domäne ebenfalls sehr gut konserviert (SXGIF, wobei X = Cys für NL63-X und 229E-X, X = Leu für IBV-X). In den Tertiärstrukturen ist sie Teil des $\beta 6$ - $\alpha 5$ -Loops (L11). Diese Loop-Region überlagert in NL63-X, 229E-X, SARS-X und AF1521 sehr gut, zeigt aber starke Abweichungen in IBV-X56 und IBV-X85 (Abschnitt 3.5.1 und 3.5.3.2), was folglich einen Einfluss auf die Größe der Bindungstasche im Protein hat.

Die Loop-Regionen in Proteinen sind zum Teil sehr flexibel. Daher ist die Elektronendichte in diesen Bereichen oft schlecht definiert oder gar nicht vorhanden. Der korrekte Einbau der Aminosäurereste ist dadurch erschwert bzw. nicht möglich. Wie in Abbildung 3.47 dargestellt, ist die Elektronendichte für den $\beta 6$ - $\alpha 5$ -Loop (L11) in den hier beschriebenen Strukturen gut definiert und die Aminosäurereste der SXGIF-Sequenz (X = C für NL63-X, 229E; X = L für IBV-X) konnten sehr gut eingepasst werden.

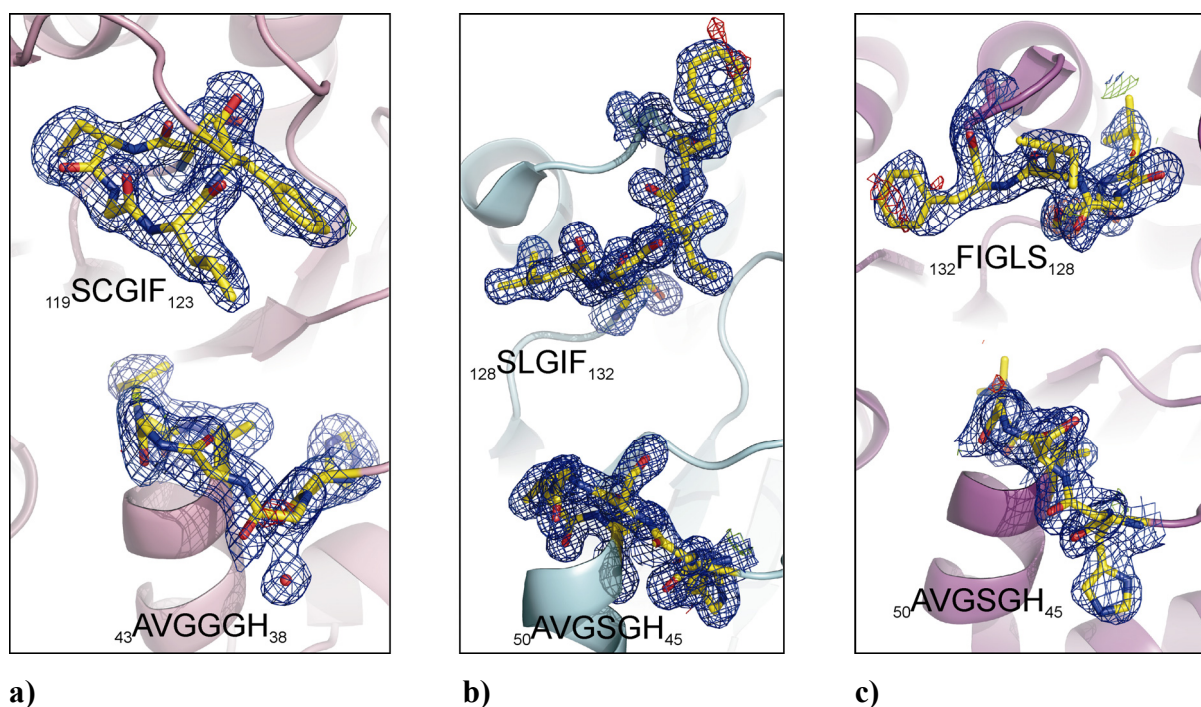


Abbildung 3.47: Darstellung der Elektronendichte für die SXGIF- und die HGXGVA-Sequenz. a) NL63-X (Komplex 2), b) IBV-X85, c) IBV-X56. Stab-Darstellung der Aminosäurereste: C-Atome sind gelb, O-Atome sind rot, N-Atome sind blau dargestellt; 2Fo-Fc-Elektronendichte ist blau (1 σ), Fo-Fc-Elektronendichte ist grün (3 σ) und rot (-3 σ) dargestellt (jeweils nach der letzten Verfeinerung).

Im NL63-X und 229E-X ist L11 nicht in der Bildung von Kristallkontakten involviert und somit nicht durch solche in seine Form „gezwungen“. Im IBV-X56 ist dieser Loop an der Hälfte aller H-Brückenbindungen mit dem entsprechenden Symmetriemolekül beteiligt. So bildet z.B. Phe132 über die Amidgruppe und den Carbonylsauerstoff H-Brückenbindungen mit der Carbonylgruppe des Gly88 (2,89 Å) bzw. dem N ϵ 2 des Gln88 (3,15 Å) eines Symmetriemoleküls. Im IBV-X85 gibt es eine H-Brückenbindung zwischen der Carbonylgruppe des Leu129 und der Seitenkette des Tyr68 (3,10 Å) des Symmetriemoleküls. Aufgrund der Packung im Kristall ist L11 (β 6- α 5-Loop) im IBV-X56 stark in der Bildung von Kristallkontakten involviert. Daraus ergibt sich auch die Orientierung dieses Loops hin zur α 6-Helix, während im IBV-X85 und in den anderen coronaviralen X-Domänen L11 zur α 4-Helix zeigt. Die weitere Betrachtung der Bindungstasche im Protein erfolgt daher am IBV-X85.

Die $_{38}\text{HGGGVA}_{43}$ -Sequenz befindet sich im NL63-X am N-Terminus der α 2-Helix. Dieser Bereich lässt sich in allen Strukturen sehr gut überlagern. Wie NL63-X so beinhalten auch 299E-X, SARS-X und AF1521 eine Sequenz von drei aufeinander folgenden Gly-Resten in diesem Bereich. Im IBV-X85 befindet sich anstelle des mittleren Gly-Restes ein Ser-Rest. Der konservierte Ile-Rest im β 6- α 5-Loop ist im NL63-X zur $_{38}\text{HGGGVA}_{43}$ -Sequenz orientiert, was

zur oberen Abgrenzung der Bindungstasche durch den $\beta 6$ - $\alpha 5$ -Loop führt. Im IBV-X85 ist diese Orientierung des Ile-Restes nicht möglich. Durch den Ser-Rest am N-Terminus der $\alpha 2$ -Helix wird der Loop inklusive der $^{128}\text{SLGIF}_{132}$ -Sequenz „weggedrückt“ (Abbildung 3.48).

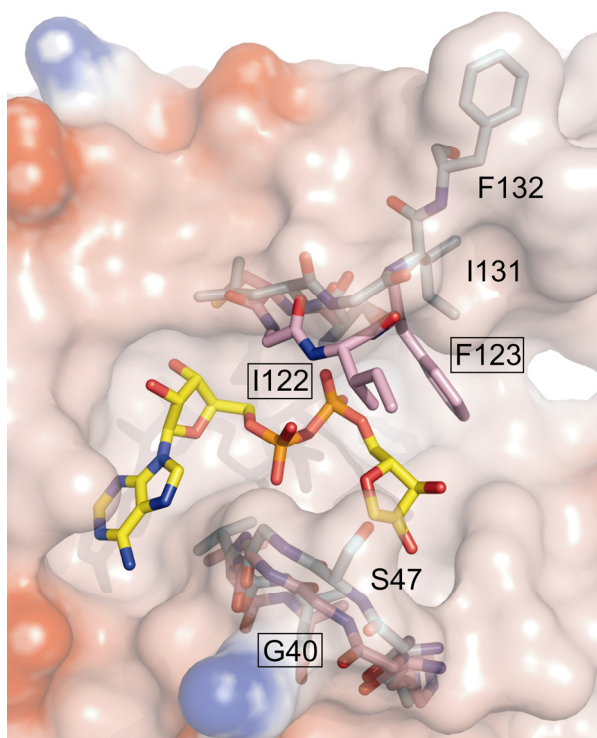


Abbildung 3.48: Bindungstasche des IBV-X85. Dargestellt ist die Proteinoberfläche des IBV-X85, die $^{45}\text{HGSGVA}_{50}$ - und $^{128}\text{SLGIF}_{132}$ -Sequenz des IBV-X85 als Stab-Modell, sowie die entsprechenden Aminosäurereste des NL63-X (Komplex 2, gerahmt). Die Sauerstoffatome sind rot, die Stickstoffatome sind blau und die Kohlenstoffatome sind gelb (ADP-Ribosyl-Rest), pink (NL63-X) bzw. türkis (IBV-X85) dargestellt.

Die Bindungstasche im IBV-X85 ist stark geweitet und die entsprechenden Aminosäurereste der $^{128}\text{SLGIF}_{132}$ -Sequenz können nicht mit dem Liganden interagieren. So konnte auch in den biochemischen Analysen (ZIGE, ITC) keine Interaktion des IBV-X mit den verschiedenen Liganden nachgewiesen werden (Abschnitt 3.2.2.3 und 3.2.3). Die Struktur des 229E-X und der Vergleich mit NL63-X im Komplex mit dem Liganden (sowohl in der kompakten als auch der gestreckten Konformation) zeigen, dass die strukturellen Voraussetzungen für eine Bindung des Liganden gegeben sind. Dies bestätigt die gezeigte Affinität des 229E-X zum NAD^+ und zur ADP-Ribose im ZIGE- und ITC-Experiment (Abschnitt 3.2.2.2 und 3.2.3).

Während der Erstellung dieser Arbeit wurden ebenfalls die Kristallstrukturen der X-Domänen von HCoV-229E und IBV, auch im Komplex mit ADP-Ribose, von Xu *et al.* (2009) veröffentlicht. Im Falle des HCoV-229E überlagert die X-Domäne dieser Arbeit sehr gut mit der Ligand-freien Struktur (PDB 3EWQ) und der Komplexstruktur (3EWR) von Xu *et al.* (2009). Die Standardabweichung für die C_α -Atome beträgt 0,371 Å bzw. 0,416 Å. An der Bindung der

ADP-Ribose in der Komplexstruktur sind die entsprechenden Aminosäurereste beteiligt, wie sie für das NL63-X im Komplex mit dem ADP-Ribosyl-Rest beschrieben (Abschnitt 3.6.2 und 3.6.3) und für das 229E-X dieser Arbeit vorhergesagt worden sind.

Beim Vergleich der X-Domänen aus dem IBV zeigen sich einige Unterschiede. Die Standardabweichung der C α -Atome des IBV-X85 (diese Arbeit) zur Ligand-freien Struktur (PDB 3EWO) beträgt 0,384 Å und 0,361 Å für die Komplexstruktur (PDB 3EWP). Für das IBV-X56 (diese Arbeit) liegen die Standardabweichungen mit 0,591 Å und 0,522 Å etwas höher. Signifikante Abweichungen zwischen den Strukturen gibt es im β 5- α 4-Loop (L9) und im β 6- α 5-Loop (L11). Diese verhalten sich in den Kristallstrukturen von Xu *et al.* (2009) wie beim NL63-X und beim 229E-X (diese Arbeit), d.h. der β 6- α 5-Loop zeigt eine Orientierung zur α 4-Helix und interagiert mit Aminosäureresten des β 5- α 4-Loops. In der Bindung der ADP-Ribose sind die bereits beschriebenen bzw. die entsprechenden Aminosäurereste involviert. Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse zum IBV-X dieser Arbeit und zu der von Xu *et al.* (2009) liegt in der Primärstruktur der verwendeten Proteine. Herkunft für das IBV-X dieser Arbeit war der IBV-Stamm Beaudette. Xu *et al.* (2009) verwendeten den M41-Stamm des IBV. Die Sequenzen beider Proteine sind zu 91% identisch. Die X-Domäne des Beaudette-Stammes enthält am N-Terminus der α 2-Helix die $_{45}\text{HGSGVA}_{50}$ -Sequenz, welche den gegenüberliegenden β 6- α 5-Loop „wegdrückt“, wodurch eine Bindung z.B. von ADP-Ribose nicht mehr möglich ist. Im M41-Stamm befindet sich anstelle des Ser-Restes ein Gly-Rest. Diese Sequenz ist analog zu NL63-X und 229E-X. Der β 6- α 5-Loop wird nicht „weggedrückt“ und die ADP-Ribose kann gebunden werden.

Abbildung 3.49 zeigt das Alignment der verfügbaren Sequenzen von verschiedenen IBV-Stämmen. Die Sequenzen unterscheiden sich nur in einzelnen Aminosäureresten. Speziell in den besprochenen vier konservierten Bereichen (grüne Kreise in Abbildung 3.49) sind sie identisch. Eine Ausnahme ist der Beaudette-Stamm. Dieser enthält die HGSGVA-Sequenz anstelle der HGGGVA-Sequenz (Stern in Abbildung 3.49).

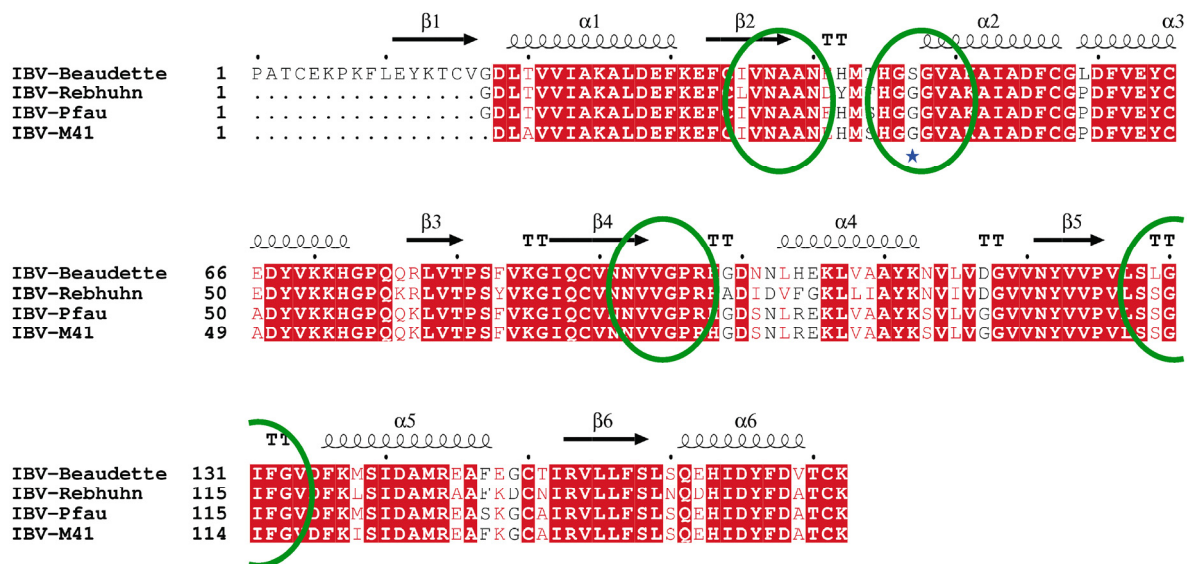


Abbildung 3.49: Sequenzalignement von der X-Domäne verschiedener IBV-Stämme mit Zuordnung der Sekundärstrukturelemente des IBV-X85 (Stamm Beaudette). Identische Aminosäurereste sind rot unterlegt. Die konservierten Bereiche sind durch grüne Kreise und der nicht konservierte Gly-Rest ist mit einem blauen Stern gekennzeichnet.

Die Tatsache, dass für die Nsp3 X-Domäne des IBV-Beaudette keine Affinität zu ADP-Ribose oder NAD^+ gezeigt werden konnte und das Nsp3 des SARS-CoV neben der X-Domäne zwei weitere Makrodomänen-Proteine enthält (Tan *et al.*, 2009), bestätigt, dass die coronavirale X-Domäne und teilweise auch andere Makrodomänen-Proteine möglicherweise regulatorische Funktionen besitzen, z.B. die bereits erwähnte Regulation des NAD^+ -, ADP-Ribose-Pools in der Zelle. Dabei ist denkbar, dass durch Anpassung an den Wirt, diese Funktionen keinen Selektionsvorteil mehr bieten und daher die X-Domäne des IBV-Beaudette inaktiv ist.

4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die coronavirale X-Domäne von HCoV-NL63 (NL63-X), HCoV-229E (229E-X) und IBV (IBV-X) untersucht. Für alle drei Proteine konnte systematisch eine effiziente Gen-Expression in *E. coli*-Zellen und ein reproduzierbares Protokoll für die Proteinreinigung etabliert werden. Die Bedingungen für die Proteinkristallisation konnten so weit optimiert werden, dass die Strukturen der Makromoleküle bei hoher Auflösung bestimmt werden konnten. Insgesamt wurden sieben Kristallstrukturen bestimmt. Diese stellen zum einen das NL63-X, das 229E-X und das IBV-X dar, wobei letzteres in zwei verschiedenen Kristallformen kristallisiert werden konnte. Zum anderen wurden drei Komplexstrukturen des NL63-X mit NAD^+ bestimmt.

Die Proteinstrukturen zeigen die sogenannte Makrodomänen-Faltung (zentrales β -Faltblatt aus sieben β -Strängen umgeben von drei α -Helices auf jeder Seite), wie sie bereits für die X-Domäne des SARS-CoV beschrieben wurde (Saikatendu *et al.*, 2005). Auffallend in den Strukturen des IBV-X ist der fehlende β 1-Strang am N-Terminus des Proteins. Trotz geringer Sequenzidentität konnten die Strukturen der coronaviralen X-Domäne teilweise gut mit den Strukturen anderer Makrodomänen-Proteine aus Pro- und Eukaryonten überlagert werden, so auch mit den Namensgebern dieser Faltung, den Makrodomänen der Histonvariante mH2A1.1 und mH2A1.2. Über die genaue Funktion der einzelnen Makrodomänen-Proteine ist derzeit jedoch wenig bekannt.

Für die Nsp3 X-Domäne von HCoV-229E und SARS-CoV (SARS-X) konnte bereits eine Aktivität als ADP-Ribose-1'-Monophosphatase (ADRP) nachgewiesen werden (Putics *et al.*, 2005; Saikatendu *et al.*, 2005; Egloff *et al.*, 2006). Ein Nachweis der ADRP-Aktivität der X-Domänen konnte in dieser Arbeit leider nicht durchgeführt werden, da das Substrat nicht zugänglich war. In den Interaktionsstudien konnte jedoch für NL63-X und 229E-X eine Wechselwirkung mit ADP-Ribose und anderen Liganden wie NAD^+ , ssDNA und tRNA (*E. coli*) gezeigt werden. Für das IBV-X konnten (zunächst) wider Erwarten keine Bindungspartner identifiziert werden.

Der Vergleich der Primärstruktur der coronaviralen X-Domänen zeigt deutlich vier Bereiche, in denen die Aminosäurereste stark konserviert sind. In der Tertiärstruktur der Proteine konnten diese Bereiche ebenfalls größtenteils sehr gut überlagert werden. Eine Ausnahme war auch hier wieder das IBV-X, welches in beiden Strukturen starke Abweichungen im β 6- α 5 –Loop (L11-Loop) zu den anderen Strukturen zeigt. Dieser Loop beinhaltet die konservierte SXGIF-Sequenz (X = nicht konservierter Aminosäurerest). Des

Weiteren sind die vier Bereiche in der Tertiärstruktur wesentlicher Bestandteil der Bindungstasche im Protein. Durch Bestimmung der Komplexstrukturen des NL63-X mit NAD^+ und strukturelle Charakterisierung der Protein-Ligand-Interaktionen konnte gezeigt werden, dass die Bindung des Liganden hauptsächlich durch Aminosäurereste dieser vier Bereiche erfolgt. Bestätigt wurden die Ergebnisse durch Vergleich mit den Strukturen des SARS-X und dem Protein AF1521 aus *Archaeoglobus fulgidus*, welche im Komplex mit ADP-Ribose bestimmt werden konnten (Karras *et al.*, 2005; Egloff *et al.*, 2006). In anderen Makrodomänen-Proteinen wie Er58 (*Escherichia coli*), TTHA0132 (*Thermus thermophilus*) und den Makrodomänen von mH2A1.1 und mH2A1.2 sind diese Aminosäurereste teilweise konserviert.

Für die X-Domäne des IBV konnte anhand der Kristallstruktur gezeigt werden, warum für dieses Protein keine Interaktionspartner durch Zonen-Interferenz-Gelelektrophorese identifiziert werden konnten. Der L11-Loop mit der konservierten SXGIF-Sequenz (X = Cys für NL63-X und Leu für IBV-X) wird in der IBV-X-Struktur durch den gegenüberliegenden Ser-Rest „weggedrückt“. In den anderen X-Domänen befindet sich an der Position des Ser-Restes der mittlere Gly-Rest des sonst konservierten Gly-Triplets (HGGGVA-Sequenz). Die Bindungstasche im IBV-X ist geweitet und Wechselwirkungen der Aminosäurereste des L11-Loops mit dem Liganden sind nicht mehr möglich.

Die in dieser Arbeit bestimmten Komplexstrukturen zeigen neue mögliche Funktionen für die coronavirale X-Domäne (und evtl. auch einiger Makrodomänen-Proteine). Fehlende Elektronendichte für den Nikotinamid-Rest des NAD^+ und für eine vom C1“ der Nikotinamid-Ribose ausgehende Bindung ließ vermuten, dass die N-glykosidische Bindung zwischen dem Nikotinamid und der Ribose während des *Soakings* der NAD^+ -Lösung in den Kristall gespalten wurde und das C1“ als Oxocarbeniumion vorlag. Der verbleibende ADP-Ribosyl-Rest des NAD^+ wurde in der gestreckten Konformation in die Struktur eingebaut, analog zur ADP-Ribose in den Komplexstrukturen von SARS-X und AF1521. In einem enzymatischen Assay konnte eine langsame Hydrolyse des NAD^+ gemessen werden. Die coronavirale X-Domäne könnte somit zum einen an der Regulation des NAD^+ -Pools in der Wirtszelle beteiligt sein. NAD^+ ist ein wichtiges Coenzym in Redoxreaktionen, kann aber auch von Wirts-eigenen Enzymen als Substrat für ADP-Ribosylierungsreaktionen oder für die Synthese sekundärer Botenstoffe wie z.B. zyklische ADP-Ribose verwendet werden. Zum anderen könnte die coronavirale X-Domäne die ADP-Ribose-Einheit des NAD^+ auf andere Akzeptorproteine übertragen und diese in ihrer Funktion beeinflussen. Möglich wäre auch eine Automodifikation ähnlich wie bei der Poly(ADP-Ribosyl-)Polymerase 1 durch

Übertragung der ADP-Ribose-Einheit auf die saure Domäne des Nsp3. Dadurch könnte die Aktivität der X-Domäne oder die der Papain-ähnlichen Proteasen reguliert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass die coronavirale X-Domäne starke strukturelle Ähnlichkeiten zu anderen Makrodomänen-Proteinen aus Pro- und Eukaryonten zeigt und auch die Affinität zur ADP-Ribose eine gemeinsame Eigenschaft dieser Proteine ist. Die anhand der Komplexstrukturen abgeleitete Aktivität als NAD^+ -spaltendes Enzym unterstützt die Annahme einer eher regulatorischen Funktion (z.B. innerhalb der Virus-Wirt-Interaktionen) der Nsp3 X-Domäne (und evtl. anderer Makrodomänen-Proteine). Weitere Studien sind erforderlich, um diese Aktivität zu bestätigen und im Detail zu bestimmen. Ein Ansatzpunkt wäre z.B. die Mutation konservierter Aminosäurereste, insbesondere der Asn-Rest der VNAAN-Sequenz (Asn33 in NL63-X). Des Weiteren wäre es notwendig, auch andere coronavirale X-Domänen und Makrodomänen-Proteine auf NAD^+ -Spaltungsaktivität zu testen.

5 Literatur

- Abrahams, J.P., Kraal, B. & Bosch, L. (1988): Zone-interference gel electrophoresis: a new method for studying weak protein-nucleic acid complexes under native equilibrium conditions. *Nucleic Acids Res.* **16**, 10099-10108.
- Allen, M.D., Buckle, A.M., Cordell, S.C., Löwe, J. & Bycroft, M. (2003): The crystal structure of AF1521 a protein from *Archaeoglobus fulgidus* with homology to the non-histone domain of macroH2A. *J. Mol. Biol.* **330**, 503-511.
- Almazán, F., Galán, C. & Enjuanes, L. (2004): The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *J. Virol.* **78**, 12683-12688.
- Anand, K., Palm, G.J., Mesters, J.R., Siddell, S.G., Ziebuhr, J. & Hilgenfeld, R. (2002): Structure of coronavirus main proteinase reveals combination of a chymotrypsin fold with an extra alpha-helical domain. *EMBO J.* **21**, 3213-3224.
- Anand, K., Ziebuhr, J., Wadhwani, P., Mesters, J.R. & Hilgenfeld, R. (2003): Coronavirus main proteinase (3CL^{pro}) structure: basis for design of anti-SARS drugs. *Science* **300**, 1763-1767.
- Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J. & McCammon, J.A. (2001): Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10037-10041.
- Bastien, N., Anderson, K., Hart, L., Van Caesele, P., Brandt, K., Milley, D., Hatchette, T., Weiss, E.C. & Li, Y. (2005): Human coronavirus NL63 infection in Canada. *J. Infect. Dis.* **191**, 503-506.
- Bell, C.E., Yeates, T.O. & Eisenberg, D. (1997): Unusual conformation of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) bound to diphtheria toxin: a comparison with NAD bound to the oxidoreductase enzymes. *Protein Sci.* **6**, 2084-2096.
- Benbacer, L., Kut, E., Besnardeau, L., Laude, H. & Delmas, B. (1997): Interspecies aminopeptidase-N chimeras reveal species-specific receptor recognition by canine coronavirus, feline infectious peritonitis virus, and transmissible gastroenteritis virus. *J. Virol.* **71**, 734-737.
- Berti, P.J., Blanke, S.R. & Schramm, V.L. (1997): Transition State Structure for the Hydrolysis of NAD Catalyzed by Diphtheria Toxin. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 12079-12088.
- Bhardwaj, K., Guarino, L. & Kao, C.C. (2004): The severe acute respiratory syndrome coronavirus Nsp15 protein is an endoribonuclease that prefers manganese as a cofactor. *J. Virol.* **78**, 12218-12224.
- Breslin, J.J., Mørk, I., Smith, M.K., Vogel, L.K., Hemmila, E.M., Bonavia, A., Talbot, P.J., Sjöström, H., Norén, O. & Holmes, K.V. (2003): Human coronavirus 229E: receptor binding domain and neutralization by soluble receptor at 37 degrees C. *J. Virol.* **77**, 4435-4438.

- Brierley, I., Bournsnel, M.E., Binns, M.M., Bilimoria, B., Blok, V.C., Brown, T.D. & Inglis, S.C. (1987): An efficient ribosomal frame-shifting signal in the polymerase-encoding region of the coronavirus IBV. *EMBO J.* **6**, 3779-3785.
- Brierley, I., Digard, P. & Inglis, S.C. (1989): Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudoknot. *Cell* **57**, 537-547.
- CCP4 (1994): The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Cryst.* **D50**, 760-763.
- Chen, Y., Cai, H., Pan, J., Xiang, N., Tien, P., Ahola, T. & Guo, D. (2009): Functional screen reveals SARS coronavirus nonstructural protein nsp14 as a novel cap N7 methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 3484-3489.
- Cheng, A., Zhang, W., Xie, Y., Jiang, W., Arnold, E., Sarafianos, S.G. & Ding, J. (2005): Expression, purification, and characterization of SARS coronavirus RNA polymerase. *Virology* **335**, 165-176.
- Chiu, S.S., Chan, K.H., Chu, K.W., Kwan, S.W., Guan, Y., Poon, L.L.M. & Peiris, J.S.M. (2005): Human coronavirus NL63 infection and other coronavirus infections in children hospitalized with acute respiratory disease in Hong Kong, China. *Clin. Infect. Dis.* **40**, 1721-1729.
- Clementz, M.A., Kanjanahaluethai, A., O'Brien, T.E. & Baker, S.C. (2008): Mutation in murine coronavirus replication protein nsp4 alters assembly of double membrane vesicles. *Virology* **375**, 118-129.
- Cohen, G.E. (1997): ALIGN: a program to superimpose protein coordinates, accounting for insertions and deletions. *J. Appl. Cryst.* **30**, 1160-1161.
- Collier, R.J. (1975): Diphtheria toxin: mode of action and structure. *Bacteriol. Rev.* **39**, 54-85.
- Cowley, J.A., Dimmock, C.M., Spann, K.M. & Walker, P.J. (2000): Gill-associated virus of *Penaeus monodon* prawns: an invertebrate virus with ORF1a and ORF1b genes related to arteri- and coronaviruses. *J. Gen. Virol.* **81**, 1473-1484.
- Culver, G.M., Consaul, S.A., Tycowski, K.T., Filipowicz, W. & Phizicky, E.M. (1994): tRNA splicing in yeast and wheat germ. A cyclic phosphodiesterase implicated in the metabolism of ADP-ribose 1",2"-cyclic phosphate. *J. Biol. Chem.* **269**, 24928-24934.
- Decroly, E., Imbert, I., Coutard, B., Bouvet, M., Selisko, B., Alvarez, K., Gorbalenya, A.E., Snijder, E.J. & Canard, B. (2008): Coronavirus nonstructural protein 16 is a cap-0 binding enzyme possessing (nucleoside-2'O)-methyltransferase activity. *J. Virol.* **82**, 8071-8084.
- DeLano, W.L. (2002): The PyMOL molecular graphics system. San Carlos, CA, USA: DeLano Scientific.
- Donaldson, E.F., Graham, R.L., Sims, A.C., Denison, M.R. & Baric, R.S. (2007): Analysis of murine hepatitis virus strain A59 temperature-sensitive mutant TS-LA6 suggests that

- nsp10 plays a critical role in polyprotein processing. *J. Virol.* **81**, 7086-7098.
- Dos Ramos, F., Carrasco, M., Doyle, T. & Brierley, I. (2004): Programmed -1 ribosomal frameshifting in the SARS coronavirus. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 1081-1083.
- Drosten, C., Günther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R.A.M., Berger, A., Burguière, A., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J., Müller, S., Rickerts, V., Stürmer, M., Vieth, S., Klenk, H., Osterhaus, A.D.M.E., Schmitz, H. & Doerr, H.W. (2003): Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *J. Med.* **348**, 1967-1976.
- Egloff, M.P., Ferron, F., Campanacci, V., Longhi, S., Rancurel, C., Dutartre, H., Snijder, E.J., Gorbalenya, A.E., Cambillau, C. & Canard, B. (2004): The severe acute respiratory syndrome-coronavirus replicative protein nsp9 is a single-stranded RNA-binding subunit unique in the RNA virus world. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 3792-3796.
- Egloff, M.P., Malet, H., Putics, A., Heinonen, M., Dutartre, H., Frangeul, A., Gruez, A., Campanacci, V., Cambillau, C., Ziebuhr, J., Ahola, T. & Canard, B. (2006): Structural and functional basis for ADP-ribose and poly(ADP-ribose) binding by viral macro domains. *J. Virol.* **80**, 8493-8502.
- Emery, S.L., Erdman, D.D., Bowen, M.D., Newton, B.R., Winchell, J.M., Meyer, R.F., Tong, S., Cook, B.T., Holloway, B.P., McCaustland, K.A., Rota, P.A., Bankamp, B., Lowe, L.E., Ksiazek, T.G., Bellini, W.J. & Anderson, L.J. (2004): Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for SARS-associated coronavirus. *Emerging Infect. Dis.* **10**, 311-316.
- Emsley, P. & Cowtan, K. (2004): Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Cryst.* **D60**, 2126-2132.
- Esper, F., Shapiro, E.D., Weibel, C., Ferguson, D., Landry, M.L. & Kahn, J.S. (2005): Association between a novel human coronavirus and Kawasaki disease. *J. Infect. Dis.* **191**, 499-502.
- Fita, I. & Rossmann, M.G. (1985): The NADPH binding site on beef liver catalase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1604-1608.
- Fouchier, R.A.M., Hartwig, N.G., Bestebroer, T.M., Niemeyer, B., de Jong, J.C., Simon, J.H. & Osterhaus, A.D.M.E. (2004): A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 6212-6216.
- Gallagher, T.M. & Buchmeier, M.J. (2001): Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. *Virology* **279**, 371-374.
- Glaser, S. (2005): Bachelor-Arbeit. Universität zu Lübeck, Deutschland.
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V. & Lai, M.M. (1991): Putative papain-related thiol proteases of positive-strand RNA viruses. Identification of rubi- and aphthovirus proteases and delineation of a novel conserved domain associated with proteases of rubi-, alpha- and coronaviruses. *FEBS Lett.* **288**, 201-205.

- Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D.I. & Métoz, F. (1999): ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**, 305-308.
- Graham, R.L., Sims, A.C., Brockway, S.M., Baric, R.S. & Denison, M.R. (2005): The nsp2 replicase proteins of murine hepatitis virus and severe acute respiratory syndrome coronavirus are dispensable for viral replication. *J. Virol.* **79**, 13399-13411.
- Granzow, H., Weiland, F., Fichtner, D., Schütze, H., Karger, A., Mundt, E., Dresenkamp, B., Martin, P. & Mettenleiter, T.C. (2001): Identification and ultrastructural characterization of a novel virus from fish. *J. Gen. Virol.* **82**, 2849-2859.
- 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.
- Hassa, P.O., Haenni, S.S., Elser, M. & Hottiger, M.O. (2006): Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 789-829.
- Herold, J., Raabe, T., Schelle-Prinz, B. & Siddell, S.G. (1993): Nucleotide sequence of the human coronavirus 229E RNA polymerase locus. *Virology* **195**, 680-691.
- Herold, J. & Siddell, S.G. (1993): An 'elaborated' pseudoknot is required for high frequency frameshifting during translation of HCV 229E polymerase mRNA. *Nucleic Acids Res.* **21**, 5838-5842.
- Hofmann, H., Pyrc, K., van der Hoek, L., Geier, M., Berkhout, B. & Pöhlmann, S. (2005): Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 7988-7993.
- Holm, L., Kääriäinen, S., Rosenström, P. & Schenkel, A. (2008): Searching protein structure databases with DaliLite v.3. *Bioinformatics* **24**, 2780-2781.
- Hsue, B., Hartshorne, T. & Masters, P.S. (2000): Characterization of an essential RNA secondary structure in the 3' untranslated region of the murine coronavirus genome. *J. Virol.* **74**, 6911-6921.
- Hussain, S., Pan, J., Chen, Y., Yang, Y., Xu, J., Peng, Y., Wu, Y., Li, Z., Zhu, Y., Tien, P. & Guo, D. (2005): Identification of novel subgenomic RNAs and noncanonical transcription initiation signals of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* **79**, 5288-5295.
- Imbert, I., Guillemot, J., Bourhis, J., Bussetta, C., Coutard, B., Egloff, M., Ferron, F., Gorbalenya, A.E. & Canard, B. (2006): A second, non-canonical RNA-dependent RNA polymerase in SARS coronavirus. *EMBO J.* **25**, 4933-4942.
- Ivanov, K.A., Thiel, V., Dobbe, J.C., van der Meer, Y., Snijder, E.J. & Ziebuhr, J. (2004): Multiple enzymatic activities associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus helicase. *J. Virol.* **78**, 5619-5632.

- Ivanov, K.A. & Ziebuhr, J. (2004): Human coronavirus 229E nonstructural protein 13: characterization of duplex-unwinding, nucleoside triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities. *J. Virol.* **78**, 7833-7838.
- Jardetzky, O. & Wade-Jardetzky, N.G. (1966): The conformation of pyridine dinucleotides in solution. *J. Biol. Chem.* **241**, 85-91.
- Jaroszewski, L., Rychlewski, L., Li, Z., Li, W. & Godzik, A. (2005): FFAS03: a server for profile--profile sequence alignments. *Nucleic Acids Res.* **33**, 284-288.
- Kabsch, W. & Sander, C. (1983): Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**, 2577-2637.
- Kameshita, I., Matsuda, Z., Taniguchi, T. & Shizuta, Y. (1984): Poly (ADP-Ribose) synthetase. Separation and identification of three proteolytic fragments as the substrate-binding domain, the DNA-binding domain, and the automodification domain. *J. Biol. Chem.* **259**, 4770-4776.
- Kan, B., Wang, M., Jing, H., Xu, H., Jiang, X., Yan, M., Liang, W., Zheng, H., Wan, K., Liu, Q., Cui, B., Xu, Y., Zhang, E., Wang, H., Ye, J., Li, G., Li, M., Cui, Z., Qi, X., Chen, K., Du, L., Gao, K., Zhao, Y., Zou, X., Feng, Y., Gao, Y., Hai, R., Yu, D., Guan, Y. & Xu, J. (2005): Molecular evolution analysis and geographic investigation of severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in palm civets at an animal market and on farms. *J. Virol.* **79**, 11892-11900.
- Karras, G.I., Kustatscher, G., Buhecha, H.R., Allen, M.D., Pugieux, C., Sait, F., Bycroft, M. & Ladurner, A.G. (2005): The macro domain is an ADP-ribose binding module. *EMBO J.* **24**, 1911-1920.
- Knoops, K., Kikkert, M., van den Worm, S.H.E., Zevenhoven-Dobbe, J.C., van der Meer, Y., Koster, A.J., Mommaas, A.M. & Snijder, E.J. (2008): SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol.* **6**, e226.
- Koonin, E.V., Gorbalenya, A.E., Purdy, M.A., Rozanov, M.N., Reyes, G.R. & Bradley, D.W. (1992): Computer-assisted assignment of functional domains in the non-structural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8259-8263.
- 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. (2003): A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *New Engl. J. Med.* **348**, 1953-1966.
- Kumaran, D., Eswaramoorthy, S., Studier, F.W. & Swaminathan, S. (2005): Structure and mechanism of ADP-ribose-1"-monophosphatase (Appr-1"-pase), a ubiquitous cellular processing enzyme. *Protein Sci.* **14**, 719-726.

- Kustatscher, G., Hothorn, M., Pugieux, C., Scheffzek, K. & Ladurner, A.G. (2005): Splicing regulates NAD metabolite binding to histone macroH2A. *Nature Struct. Mol. Biol.* **12**, 624-625.
- Ladurner, A.G. (2003): Inactivating chromosomes: a macro domain that minimizes transcription. *Mol. Cell* **12**, 1-3.
- Laemmli, U.K., Beguin, F. & Gujer-Kellenberger, G. (1970): A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J. Mol. Biol.* **47**, 69-85.
- Lamzin, V.S. & Wilson, K.S. (1993): Automated refinement of protein models. *Acta Cryst.* **D49** 129-147.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. & Higgins, D.G. (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.
- Leslie, A.G.W. (1992): Joint CCP4 + ESF-EAMCB newsletter on protein crystallography, no. 26: recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. Davesbury Laboratory, Warrington, UK, pp. 27-33.
- Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J.H., Wang, H., Crameri, G., Hu, Z., Zhang, H., Zhang, J., McEachern, J., Field, H., Daszak, P., Eaton, B.T., Zhang, S. & Wang, L. (2005): Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* **310**, 676-679.
- Lin, H. (2007): Nicotinamide adenine dinucleotide: beyond a redox coenzyme. *Org. Biomol. Chem.* **5**, 2541-2554.
- Lindwall, G., Chau, M., Gardner, S.R. & Kohlstaedt, L.A. (2000): A sparse matrix approach to the solubilization of overexpressed proteins. *Protein Eng.* **13**, 67-71.
- Liu, Q., Kriksunov, I.A., Graeff, R., Munshi, C., Lee, H.C. & Hao, Q. (2006): Structural basis for the mechanistic understanding of human CD38-controlled multiple catalysis. *J. Biol. Chem.* **281**, 32861-32869.
- Martzen, M.R., McCraith, S.M., Spinelli, S.L., Torres, F.M., Fields, S., Grayhack, E.J. & Phizicky, E.M. (1999): A biochemical genomics approach for identifying genes by the activity of their products. *Science* **286**, 1153-1155.
- Matthes, N., Mesters, J.R., Coutard, B., Canard, B., Snijder, E.J., Moll, R. & Hilgenfeld, R. (2006): The non-structural protein Nsp10 of mouse hepatitis virus binds zinc ions and nucleic acids. *FEBS Lett.* **580**, 4143-4149.
- Mayo, M.A. & Pringle, C.R. (1998): Virus taxonomy--1997. *J. Gen. Virol.* **79**, 649-657.
- Mihindukulasuriya, K.A., Wu, G., St Leger, J., Nordhausen, R.W. & Wang, D. (2008): Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray. *J. Virol.* **82**, 5084-5088.

- Miles, D.W. & Urry, D.W. (1968): Reciprocal relations and proximity of bases in pyridine dinucleotides. *J. Biol. Chem.* **243**, 4181-4188.
- Minskaia, E., Hertzog, T., Gorbalenya, A.E., Campanacci, V., Cambillau, C., Canard, B. & Ziebuhr, J. (2006): Discovery of an RNA virus 3'→5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 5108-5113.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A. & Dodson, E.J. (1997): Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Cryst.* **D53**, 240-255.
- Narayanan, K., Huang, C., Lokugamage, K., Kamitani, W., Ikegami, T., Tseng, C.K. & Makino, S. (2008): Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 suppresses host gene expression, including that of type I interferon, in infected cells. *J. Virol.* **82**, 4471-4479.
- Neuman, B.W., Joseph, J.S., Saikatendu, K.S., Serrano, P., Chatterjee, A., Johnson, M.A., Liao, L., Klaus, J.P., Yates, J.R., Wüthrich, K., Stevens, R.C., Buchmeier, M.J. & Kuhn, P. (2008): Proteomics analysis unravels the functional repertoire of coronavirus nonstructural protein 3. *J. Virol.* **82**, 5279-5294.
- Oostra, M., de Haan, C.A.M., de Groot, R.J. & Rottier, P.J.M. (2006): Glycosylation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus triple-spanning membrane proteins 3a and M. *J. Virol.* **80**, 2326-2336.
- Oostra, M., Hagemeijer, M.C., van Gent, M., Bekker, C.P.J., te Lintelo, E.G., Rottier, P.J.M. & de Haan, C.A.M. (2008): Topology and membrane anchoring of the coronavirus replication complex: not all hydrophobic domains of nsp3 and nsp6 are membrane spanning. *J. Virol.* **82**, 12392-12405.
- Oppenheimer, N.J. (1994): NAD hydrolysis: chemical and enzymatic mechanisms. *Mol. Cell. Biochem.* **138**, 245-251.
- Oppenheimer, N.J., Arnold, L.J. & Kaplan, N.O. (1971): A structure of pyridine nucleotides in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 3200-3205.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997): Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Meth. Enzymol.* **276**, 307-326.
- Pedersen, K.W., van der Meer, Y., Roos, N. & Snijder, E.J. (1999): Open reading frame 1a-encoded subunits of the arterivirus replicase induce endoplasmic reticulum-derived double-membrane vesicles which carry the viral replication complex. *J. Virol.* **73**, 2016-2026.
- Pehrson, J.R. & Fuji, R.N. (1998): Evolutionary conservation of histone macroH2A subtypes and domains. *Nucleic Acids Res.* **26**, 2837-2842.
- 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. (2003): Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* **361**, 1319-1325.

- Ponnusamy, R., Moll, R., Weimar, T., Mesters, J.R. & Hilgenfeld, R. (2008): Variable oligomerization modes in coronavirus non-structural protein 9. *J. Mol. Biol.* **383**, 1081-1096.
- Popova, R. & Zhang, X. (2002): The spike but not the hemagglutinin/esterase protein of bovine coronavirus is necessary and sufficient for viral infection. *Virology* **294**, 222-236.
- Posthuma, C.C., Pedersen, K.W., Lu, Z., Joosten, R.G., Roos, N., Zevenhoven-Dobbe, J.C. & Snijder, E.J. (2008): Formation of the arterivirus replication/transcription complex: a key role for nonstructural protein 3 in the remodeling of intracellular membranes. *J Virol.* **82**, 4480-4491.
- Prentice, E., Jerome, W.G., Yoshimori, T., Mizushima, N. & Denison, M.R. (2004): Coronavirus replication complex formation utilizes components of cellular autophagy. *J. Biol. Chem.* **279**, 10136-10141.
- Pringle, C.R. (1999): Virus taxonomy--1999. The universal system of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during 1998. *Arch. Virol.* **144**, 421-429.
- Putics, Á., Filipowicz, W., Hall, J., Gorbalenya, A.E. & Ziebuhr, J. (2005): ADP-ribose-1"-monophosphatase: a conserved coronavirus enzyme that is dispensable for viral replication in tissue culture. *J. Virol.* **79**, 12721-12731.
- Putics, Á., Gorbalenya, A.E. & Ziebuhr, J. (2006): Identification of protease and ADP-ribose 1"-monophosphatase activities associated with transmissible gastroenteritis virus non-structural protein 3. *J. Gen. Virol.* **87**, 651-656.
- Putt, K.S. & Hergenrother, P.J. (2004): An enzymatic assay for poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) via the chemical quantitation of NAD(+): application to the high-throughput screening of small molecules as potential inhibitors. *Anal. Biochem.* **326**, 78-86.
- Pyrce, K., Jebbink, M.F., Berkhout, B. & van der Hoek, L. (2004): Genome structure and transcriptional regulation of human coronavirus NL63. *Virol. J.* **1**, 7.
- Pyrce, K., Dijkman, R., Deng, L., Jebbink, M.F., Ross, H.A., Berkhout, B. & van der Hoek, L. (2006): Mosaic structure of human coronavirus NL63, one thousand years of evolution. *J. Mol. Biol.* **364**, 964-973.
- Pyrce, K., Jebbink, M.F., Berkhout, B. & van der Hoek, L. (2008): Detection of new viruses by VIDISCA. Virus discovery based on cDNA-amplified fragment length polymorphism. *Methods Mol. Biol.* **454**, 73-89.
- Roberts, A., Vogel, L., Guarner, J., Hayes, N., Murphy, B., Zaki, S. & Subbarao, K. (2005): Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of golden Syrian hamsters. *J. Virol.* **79**, 503-511.
- Ruf, A., Rolli, V., de Murcia, G. & Schulz, G.E. (1998): The mechanism of the elongation and branching reaction of poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal

- structures and mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **278**, 57-65.
- Saikatendu, K.S., Joseph, J.S., Subramanian, V., Clayton, T., Griffith, M., Moy, K., Velasquez, J., Neuman, B.W., Buchmeier, M.J., Stevens, R.C. & Kuhn, P. (2005): Structural basis of severe acute respiratory syndrome coronavirus ADP-ribose-1"-phosphate dephosphorylation by a conserved domain of nsP3. *Structure* **13**, 1665-1675.
- Schelle, B., Karl, N., Ludewig, B., Siddell, S.G. & Thiel, V. (2005): Selective replication of coronavirus genomes that express nucleocapsid protein. *J. Virol.* **79**, 6620-6630.
- Shapiro, L.H., Ashmun, R.A., Roberts, W.M. & Look, A.T. (1991): Separate promoters control transcription of the human aminopeptidase N gene in myeloid and intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 11999-12007.
- Shi, Z. & Hu, Z. (2008): A review of studies on animal reservoirs of the SARS coronavirus. *Virus Res.* **133**, 74-87.
- Shull, N.P., Spinelli, S.L. & Phizicky, E.M. (2005): A highly specific phosphatase that acts on ADP-ribose 1"-phosphate, a metabolite of tRNA splicing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **33**, 650-660.
- Schultze, B. & Herrler, G. (1992): Bovine coronavirus uses N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid as a receptor determinant to initiate the infection of cultured cells. *J. Gen. Virol.* **73**, 901-906.
- Smyth, D.R., Mrozkiewicz, M.K., McGrath, W.J., Listwan, P. & Kobe, B. (2003): Crystal structures of fusion proteins with large-affinity tags. *Protein Sci.* **12**, 1313-1322.
- Snijder, E.J., van Tol, H., Roos, N. & Pedersen, K.W. (2001): Non-structural proteins 2 and 3 interact to modify host cell membranes during the formation of the arterivirus replication complex. *J. Gen. Virol.* **82**, 985-994.
- Snijder, E.J., Bredenbeek, P.J., Dobbe, J.C., Thiel, V., Ziebuhr, J., Poon, L.L.M., Guan, Y., Rozanov, M., Spaan, W.J.M. & Gorbalenya, A.E. (2003): Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J. Mol. Biol.* **331**, 991-1004.
- Snijder, E.J., van der Meer, Y., Zevenhoven-Dobbe, J., Onderwater, J.J.M., van der Meulen, J., Koerten, H.K. & Mommaas, A.M. (2006): Ultrastructure and origin of membrane vesicles associated with the severe acute respiratory syndrome coronavirus replication complex. *J. Virol.* **80**, 5927-5940.
- Sutton, G., Fry, E., Carter, L., Sainsbury, S., Walter, T., Nettleship, J., Berrow, N., Owens, R., Gilbert, R., Davidson, A., Siddell, S., Poon, L.L.M., Diprose, J., Alderton, D., Walsh, M., Grimes, J.M. & Stuart, D.I. (2004): The nsp9 replicase protein of SARS-coronavirus, structure and functional insights. *Structure* **12**, 341-353.
- Suzuki, A., Okamoto, M., Ohmi, A., Watanabe, O., Miyabayashi, S. & Nishimura, H. (2005): Detection of human coronavirus-NL63 in children in Japan. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**, 645-646.

- Tan, J., Kusov, Y., Mutschall, D., Tech, S., Nagarajan, K., Hilgenfeld, R. & Schmidt, C.L. (2007): The "SARS-unique domain" (SUD) of SARS coronavirus is an oligo(G)-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **364**, 877-882.
- Tan, J., Vonnrhein, C., Smart, O.S., Bricogne, G., Bollati, M., Kusov, Y., Hansen, G., Mesters, J.R., Schmidt, C.L. & Hilgenfeld, R. (2009): The SARS-unique domain (SUD) of SARS coronavirus contains two macrodomains that bind G-quadruplexes. *PLoS Pathog.* **5**, e1000428.
- Tanner, J.J., Tu, S.C., Barbour, L.J., Barnes, C.L. & Krause, K.L. (1999): Unusual folded conformation of nicotinamide adenine dinucleotide bound to flavin reductase P. *Protein Sci.* **8**, 1725-1732.
- Thiel, V., Ivanov, K.A., Putics, A., Hertzog, T., Schelle, B., Bayer, S., Weissbrich, B., Snijder, E.J., Rabenau, H., Doerr, H.W., Gorbalenya, A.E. & Ziebuhr, J. (2003): Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J. Gen. Virol.* **84**, 2305-2315.
- Till, S. & Ladurner, A.G. (2009): Sensing NAD metabolites through macro domains. *Front. Biosci.* **14**, 3246-3258.
- Tyrell, D.A. & Bynoe, M.L. (1965) Cultivation of a novel type of common-cold virus in organ cultures. *Br. Med. J.* **1**, 1467-1470.
- Vabret, A., Mourez, T., Gouarin, S., Petitjean, J. & Freymuth, F. (2003): An outbreak of coronavirus OC43 respiratory infection in Normandy, France. *Clin. Infect. Dis.* **36**, 985-989.
- Vabret, A., Mourez, T., Dina, J., van der Hoek, L., Gouarin, S., Petitjean, J., Brouard, J. & Freymuth, F. (2005): Human coronavirus NL63, France. *Emerging Infect. Dis.* **11**, 1225-1229.
- Vlasak, R., Luytjes, W., Spaan, W. & Palese, P. (1988): Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4526-4529.
- van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M.F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R.J.M., Wolthers, K.C., Wertheim-van Dillen, P.M.E., Kaandorp, J., Spaargaren, J. & Berkhout, B. (2004): Identification of a new human coronavirus. *Nature Med.* **10**, 368-373.
- van der Hoek, L., Sure, K., Ihorst, G., Stang, A., Pyrc, K., Jebbink, M.F., Petersen, G., Forster, J., Berkhout, B. & Uberla, K. (2005): Croup is associated with the novel coronavirus NL63. *PLoS Med.* **2**, e240.
- van Hemert, M.J., van den Worm, S.H.E., Knoop, K., Mommaas, A.M., Gorbalenya, A.E. & Snijder, E.J. (2008): SARS-coronavirus replication/transcription complexes are membrane-protected and need a host factor for activity in vitro. *PLoS Pathog.* **4**, e1000054.
- Wallace, A.C., Laskowski, R.A. & Thornton, J.M. (1995): LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Prot. Eng.* **8**, 127-134.

- Wang, L., Shi, Z., Zhang, S., Field, H., Daszak, P. & Eaton, B.T. (2006): Review of bats and SARS. *Emerging Infect. Dis.* **12**, 1834-1840.
- Weiss, M., Steck, F. & Horzinek, M.C. (1983): Purification and partial characterization of a new enveloped RNA virus (berne virus). *J. Gen. Virol.* **64**, 1849-1858.
- Wentworth, D.E. & Holmes, K.V. (2001): Molecular determinants of species specificity in the coronavirus receptor aminopeptidase N (CD13): influence of N-linked glycosylation. *J. Virol.* **75**, 9741-9752.
- Xu, Y., Cong, L., Chen, C., Wei, L., Zhao, Q., Xu, X., Ma, Y., Bartlam, M. & Rao, Z. (2009): Crystal structures of two coronavirus ADP-ribose-1"-monophosphatases and their complexes with ADP-Ribose: a systematic structural analysis of the viral ADRP domain. *J. Virol.* **83**, 1083-1092.
- Zhai, Y., Sun, F., Li, X., Pang, H., Xu, X., Bartlam, M. & Rao, Z. (2005): Insights into SARS-CoV transcription and replication from the structure of the nsp7-nsp8 hexadecamer. *Nature Struct. Mol. Biol.* **12**, 980-986.
- Zhao, K., Harshaw, R., Chai, X. & Marmorstein, R. (2004): Structural basis for nicotinamide cleavage and ADP-ribose transfer by NAD(+)-dependent Sir2 histone/protein deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 8563-8568.
- Ziebuhr, J., Snijder, E.J. & Gorbalenya, A.E. (2000): Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *J. Gen. Virol.* **81**, 853-879.
- Ziebuhr, J., Thiel, V. & Gorbalenya, A.E. (2001): The autocatalytic release of a putative RNA virus transcription factor from its polyprotein precursor involves two paralogous papain-like proteases that cleave the same peptide bond. *J. Biol. Chem.* **276**, 33220-33232.
- Ziegler, M. (2000): New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signaling. *Eur. J. Biochem.* **267**, 1550-1564.
- Ziegler, M. & Niere, M. (2004): NAD⁺ surfaces again. *Biochem. J.* **382**, e5-6.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

1.1	Elektronenmikroskopisches Bild des HCoV-NL	2
1.2	Schematische Darstellung eines Coronavirus-Partikels	4
1.3	Schematische Darstellung des Genoms der Coronaviren	8
1.4	Schematische Darstellung der Anordnung der nicht-strukturellen Proteine in pp1a und pp1ab	9
1.5	Schematische Darstellung der subgenomischen mRNAs	11
1.6	Multi-Domänen-Organisation des Nsp3	15
1.7	Sequenz-Alignment der X-Domäne des Nsp3 mit ausgewählten Vertretern jeder Gruppe der Coronaviren und zellulären Proteinen	17
1.8	Struktur der Nsp3 X-Domäne des SARS-CoV und der mH2A1.1-Makrodomäne	20
1.9	Struktur verschiedener Makrodomänen-Proteine im Komplex mit ADP-Ribose	21
2.1	Prinzip der Zonen-Interferenz-Gelelektrophorese	48
3.1	Gen-Expression von nsp3-X mit N-terminalem His ₆ -Tag	55
3.2	Gen-Expression der X-Domäne von HCoV-NL63 mit N-terminalem GST-Tag	56
3.3	Löslichkeitstest von NL63-X als GST-Fusionsprotein	57
3.4	Aufreinigung mittels GST-Affinitätschromatographie von NL63-X mit Abspaltung des GST-Tags auf der Säule	58
3.5	Proben von NL63-X (19,9 kDa) und NL63-Xst (18,4 kDa) am Ende der Proteinreinigung	59
3.6	Löslichkeitstest von 229E-X mit N-terminalem His ₆ -Tag	60
3.7	Proteolytische Spaltung des His ₆ -229E-X mit der TEV-Protease	61
3.8	Aufreinigung von 229E-X mit N-terminalem His ₆ -Tag	61
3.9	Löslichkeitstest von IBV-X mit N-terminalem His ₆ -Tag	63
3.10	Proteolytische Spaltung des His ₆ -IBV-X mit der TEV-Protease	64
3.11	Aufreinigung des IBV-X	66
3.12	ZIGE-Experiment zur Untersuchung der Wechselwirkung von NL63-Xst mit verschiedenen Nukleotiden	67
3.13	ZIGE zur Untersuchung der Wechselwirkung von NL63-Xst mit NAD ⁺ , NADH, NADP ⁺ und ADP-Ribose	68
3.14	ZIGE zur Untersuchung der Wechselwirkung von NL63-X mit ssDNA, tRNA (<i>E. coli</i>) und ssDNA	68
3.15	ZIGE zur Untersuchung der Wechselwirkung von NL63-Xst mit dsDNA	69
3.16	ZIGE zur Untersuchung der Wechselwirkung von 229E-X mit Nukleotiden und tRNA (<i>E. coli</i>)	69
3.17	ZIGE zur Untersuchung der Wechselwirkung von IBV-X mit verschiedenen Nukleotiden und tRNA (<i>E. coli</i>)	70
3.18	Graphiken der ITC-Experimente	71
3.19	Kristalle des NL63-X aus dem ersten Kristallisationsversuch	73
3.20	Kristalle des NL63-X nach Optimierung	74
3.21	Kristalle des NL63-Xst	74
3.22	Kristalle des 229E-X	76
3.23	Abhängigkeit des Kristallwachstums von IBV-X vom pH-Wert	77
3.24	Kristallformen des IBV-X	78
3.25	Co-Kristallisation von NL63-Xst mit NAD ⁺ und ADP-Ribose	80

3.26	Einbau des NAD ⁺ in den Komplex 1	90
3.27	Einbau des NAD ⁺ in den Komplex 2	91
3.28	Struktur der Nsp3 X-Domäne von HCoV-NL63 mit Bezeichnung der Sekundärstrukturelemente	92
3.29	Strukturen der X-Domänen von HCoV-229E und IBV	93
3.30	Vergrößerte Darstellung der abweichenden Loop-Regionen innerhalb der coronaviralen X-Domänen	94
3.31	Sequenz-Alignment von NL63-X, 229E-X und IBV-X mit Zuordnung der Sekundärstrukturelemente	95
3.32	Die vier am stärksten konservierten Bereiche innerhalb der X-Domäne von Coronaviren	98
3.33	Überlagerung der viralen und zellulären Proteinstrukturen	100
3.34	Sequenz-Alignment der vier konservierten Bereiche von NL63-X, 229E-X und IBV-X mit den Treffern aus der Datenbank-Recherche	102
3.35	Stab-Darstellung einzelner Aminosäurereste der Ligand-freien Struktur und der Komplexe	106
3.36	Struktur des NL63-Xst im Komplex mit NAD ⁺ (Stab-Darstellung) in der kompakten Konformation (Komplex 1)	106
3.37	Darstellung des NAD ⁺ -Moleküls in der Protein-Bindungstasche	107
3.38	Bindung des NAD ⁺ -Moleküls in der kompakten Konformation	108
3.39	Struktur des NL63-Xst im Komplex mit NAD ⁺ (Stab-Darstellung) in der kompakten und gestreckten Konformation (Komplex 2)	110
3.40	Darstellung des NAD ⁺ -Moleküls in der Protein-Bindungstasche	110
3.41	Bindung des ADP-Ribosyl-Restes vom NAD ⁺ in der gestreckten Konformation	111
3.42	Das Oxocarbeniumion des ADP-Ribosyl-Restes in der Bindungstasche des NL63-Xst (Komplex 2)	112
3.43	NAD ⁺ als Cosubstrat bei enzymatischen Reaktionen	113
3.44	Säulendiagramm der ermittelten Werte aus der hydrolytischen Spaltung mit anschließender chemischen Modifikation des NAD ⁺	116
3.45	Schematische Darstellung der Bindungspartner des ADP-Ribose-Moleküls in SARS-X und AF1521	119
3.46	Bindungstaschen von 229E-X, IBV-X56 und IBV-X85	121
3.47	Darstellung der Elektronendichte für die SXGIF- und die HGXGVA-Sequenz	123
3.48	Bindungstasche des IBV-X85	124
3.49	Sequenzalignent von der X-Domäne verschiedener IBV-Stämme	126

6.2 Tabellenverzeichnis

1.1	Einteilung der Coronaviren	3
2.1	Verwendete Oligonukleotide	23
2.2	Verwendete Plasmide	24
2.3	Verwendete <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)-Stämme	25
2.4	Spezielle Chemikalien bzw. Biochemikalien	30
2.5	Verbrauchsmaterialien	31
2.6	Verwendete Geräte	32
2.7	Temperaturprogramm für die PCR	36
2.8	Zusammensetzung für 2 Gele der SDS-PAGE	46
2.9	Parameter für die verschiedenen ITC-Experimente	49
2.10	Verwendete Programme für die Darstellung und Analyse der Strukturen	53

3.1	Statistik des NL63-X-Datensatzes.....	81
3.2	Verfeinerungsstatistik des Modells für NL63-X.....	82
3.3	Statistik des 229E-X-Datensatzes.....	83
3.4	Verfeinerungsstatistik des Modells für 229E-X.....	84
3.5	Statistik der Datensätze für IBV-X56 und IBV-X85.....	85
3.6	Verfeinerungsstatistik der Modelle für IBV-X56 und IBV-X85.....	87
3.7	Übersicht über den pH-Wert während der Kristallisation und den <i>Soaking</i> -Parametern für die einzelnen Komplexe.....	88
3.8	Statistik der Datensätze für die Komplexstrukturen.....	89
3.9	Verfeinerungsstatistik der Modelle der Protein-Ligand-Komplexe.....	91
3.10	Standardabweichungen [Å] zwischen den C α -Atomen der einzelnen X-Domänen.....	94
3.11	Übersicht über die Abweichungen in der Primärstruktur der coronaviralen X-Domäne innerhalb der vier konservierten Bereiche.....	96
3.12	Ergebnisse der Datenbank-Recherche für die einzelnen X-Domänen.....	99
3.13	Vergleich der Tertiär- und Primärstrukturen der in dieser Arbeit behandelten X-Domänen mit den Treffern aus der Datenbanksuche.....	101
3.14	Zusammensetzung der Proben und die verschiedenen Parameter für die NAD ⁺ -Spaltungsreaktion.....	115

6.3 Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der Nsp3 X-Domäne

6.3.1 HCoV-NL63

```

1      AAACCTTTTGCTGTATATAAAAAATGTTAAATTTATTTAGGTGATATTCACACCTTGTA
1      K P F A V Y K N V K F Y L G D I S H L V

61     AACTGTGTTTCTTTTGACTTTGTTGTCAATGCTGCTAATGAAAATCTCTTGCATGGAGGC
21     N C V S F D F V V N A A N E N L L H G G

121    GGTGTTGCACGTGCTATTGATATTTTGAAGGTCAACTTCAGTCATTATCTAAAGAT
41     G V A R A I D I L T E G Q L Q S L S K D

181    TACATTAGTAGTAATGGTCCACTTAAGGTTGGAGCAGGTGTTATGTTGGAGTGTGAAAAA
61     Y I S S N G P L K V G A G V M L E C E K

241    TTCAACGTATTTAATGTTGTTGGTCCGCGAACTGGTAAACATGAGCATTCACTTGT
81     F N V F N V V G P R T G K H E H S L L V

301    GAAGCTTATAATTCTATTTTATTTGAAAATGGTATTCCACTTATGCCTCTTCTTAGTTGT
101    E A Y N S I L F E N G I P L M P L L S C

361    GGTATTTTGGTGTAAGGATTGAAAATTCTCTTAAAGCTTTGTTTAGTTGTGACATTAAT
121    G I F G V R I E N S L K A L F S C D I N

421    AAACCATGCAAGTTTTTGTATTCTTCAAATGAAGAACAAGCTGTTCTTAAGTTTTTA
141    K P L Q V F V Y S S N E E Q A V L K F L

481    GATGGTTTAGAT
161    D G L D

```

6.3.2 HCoV-229E

```

1      GAGAAGTTGAACGCCTTCCTCGTTCATGACAATGTAGCTTTCTACCAAGGTGATGTTGAT
1      E K L N A F L V H D N V A F Y Q G D V D

61     ACTGTTGTTAATGGTGTGACTTTGACTTTATTGTAAATGCTGCTAATGAGAACCTTGCT
21     T V V N G V D F D F I V N A A N E N L A

121    CATGGTGGAGGACTTGCCAAAGCTTTAGATGTGTACACTAAAGGTAACTTCAACGTTTA
41     H G G G L A K A L D V Y T K G K L Q R L

181    TCTAAAGAACACATTGGATTAGCGGGTAAAGTAAAAGTTGGTACAGGAGTTATGGTTGAG
61     S K E H I G L A G K V K V G T G V M V E

241    TGTGATAGCCTTAGAATTTTTAATGTTGTTGGTCCACGCAAGGGTAAACATGAACGTGAT
81     C D S L R I F N V V G P R K G K H E R D

301    TTACTCATAAAAGCTTACAACACTATTAATAATGAACAAGGCACACCTTTAACACCAATT
101    L L I K A Y N T I N N E Q G T P L T P I

361    TTGAGCTGTGGTATTTTTGGTATCAAACCTCGAACTTCATTAGAAGTTTTGCTTGATGTT
121    L S C G I F G I K L E T S L E V L L D V

421    TGTAATACAAAAGAAGTTAAAGTTTTTGTGTTATACAGACACAGAGGTTTGTAAGGTAAAG
141    C N T K E V K V F V Y T D T E V C K V K

481    GATTTTGTGTCTGGT
161    D F V S G

```

6.3.3 IBV

```

1      CCAGCCACATGTGAGAAACCTAAATTTTTGGAGTATAAAACATGTGTGGGTGATTTGACT
1      P A T C E K P K F L E Y K T C V G D L T

61     GTTGTAATTGCCAAAGCATTGGATGAGTTTAAAGAGTTCTGCATTGTAAATGCTGCAAAT
21     V V I A K A L D E F K E F C I V N A A N

121    GAGCATATGACTCATGGTAGTGGCGTTGCAAAGGCAATTGCAGACTTTTGTGGACTGGAT
41     E H M T H G S G V A K A I A D F C G L D

181    TTTGTTGAATATTGTGAGGACTATGTTAAGAAACATGGGCCACAACAGAGACTTGTTACA
61     F V E Y C E D Y V K K H G P Q Q R L V T

241    CCTTCGTTTGTCAAAGGCATTCAATGTGTGAATAATGTTGTAGGACCCCGCCACGGAGAC
81     P S F V K G I Q C V N N V V G P R H G D

301    AACAACTTGCATGAGAAGCTTGTGCTGCCTACAAGAATGTGCTTGTAGATGGCGTAGTC
101    N N L H E K L V A A Y K N V L V D G V V

361    AATTATGTTGTGCCAGTTCTTTCATTAGGAATTTTTGGTGTAGATTTTAAAATGTCAATA
121    N Y V V P V L S L G I F G V D F K M S I

421    GACGCAATGCGTGAAGCTTTTGAAGGTTGCACCATACGCGTTCTTTTGTGTTTCTCTGAGC
141    D A M R E A F E G C T I R V L L F S L S

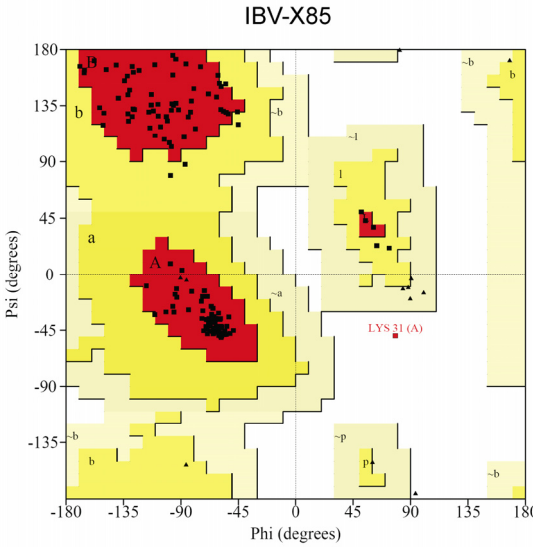
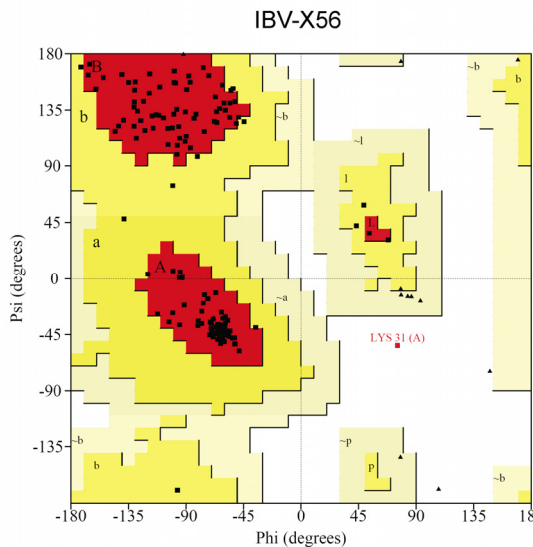
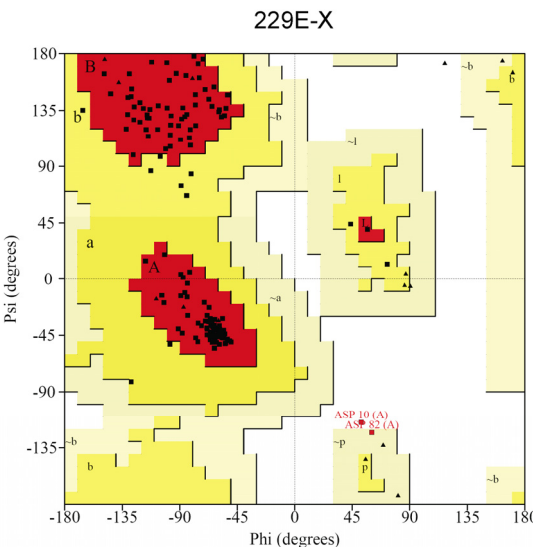
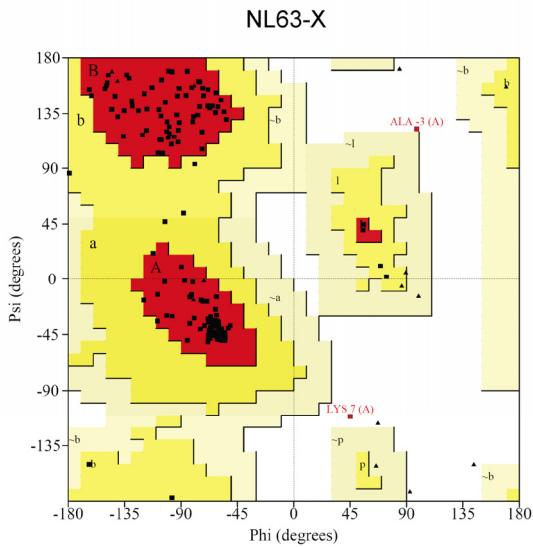
481    CAAGAACACATCGATTATTTTCGATGTAAGTTGCAAA
161    Q E H I D Y F D V T C K

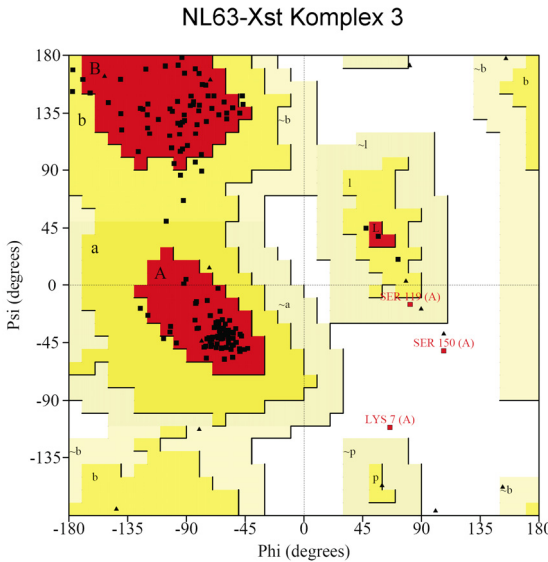
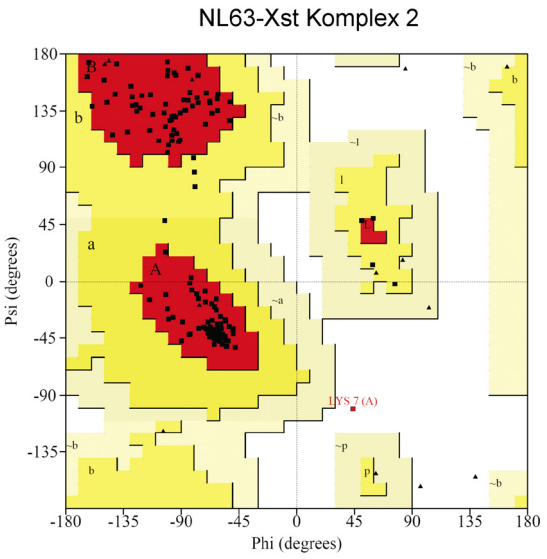
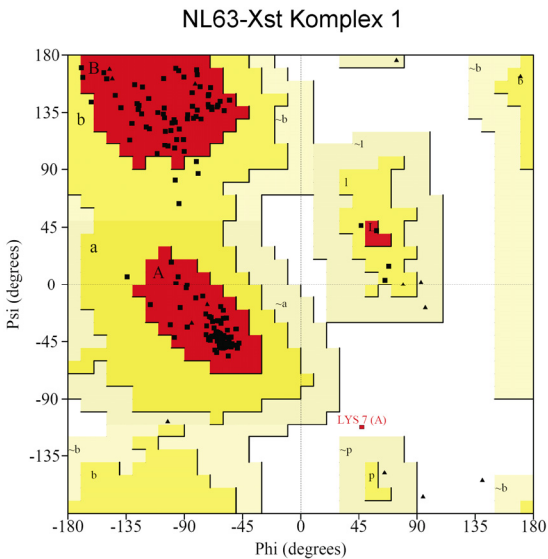
```

6.4 Kristallisationsbedingungen

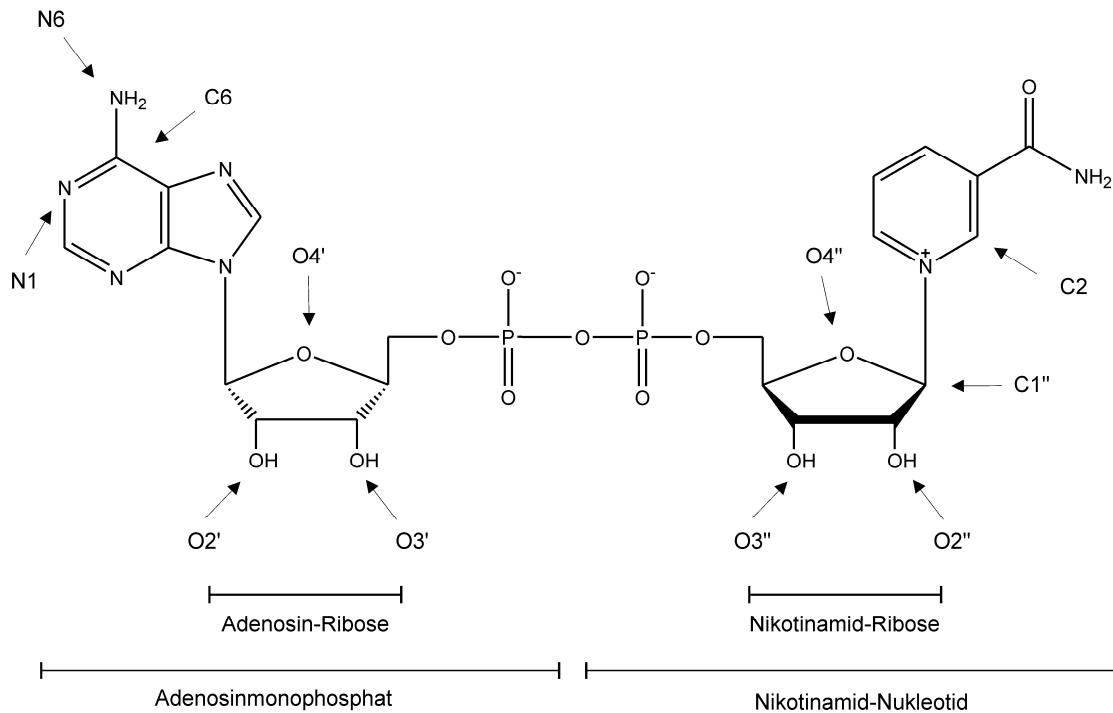
Protein	Sigma-Screen Nummer	Zusammensetzung
NL63-X	<i>Basic</i>	
	6	0,2 M MgCl ₂ , 0,1 M Tris-HCl pH 8,5, 30 % PEG 4000
	15	0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 M Na-Cacodylate pH 6,5, 30 % PEG 8000
	17	0,2 M Li-Sulfat, 0,1 M Tris-HCl pH 8,5, 30 % PEG 4000
	18	0,2 M Mg-Acetat, 0,1 M Na-Cacodylat pH 6,5, 20 % PEG 8000
	22	0,2 M Na-Acetat, 0,1 M Tris-HCl pH 8,5, 30 % PEG 4000
	27	0,2 M Na-Citrat, 0,1 M HEPES pH 7,5, 20 % 2-Propanol
	43	30 % PEG 1500
	<i>Extension</i>	
	22	0,1 M MES pH 6,5, 12 % PEG 20000
	26	0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 M MES pH 6,5, 30 % PEG MME 5000
	30	0,1 M HEPES pH 7,5, 5 % MPD, 10 % PEG 6000
	37	0,1 M HEPES pH 7,5, 8 % Ethylenglycol, 10 % PEG 8000
	38	0,1 M HEPES pH 7,5, 20 % PEG 10000
	47	2 M MgCl ₂ , 0,1 M Bicine pH 7,5
	48	0,1 M Bicine pH 9,0, 2 % Dioxan, 10 % PEG 20000
229E-X	<i>Basic</i>	
	22	0,2 M Na-Acetat, 0,1 M Tris-HCl pH 8,5, 30 % PEG 4000
	41	0,1 M HEPES pH 7,5, 20 % 2-Propanol, 20 % PEG 4000
	<i>Extension</i>	
	30	0,1 M HEPES pH 7,5, 5 % MPD, 10 % PEG 6000
	38	0,1 M HEPES pH 7,5, 20 % PEG 10000
IBV-X	<i>Basic</i>	
	6	0,2 M MgCl ₂ , 0,1 M Tris-HCl pH 8,5, 30 % PEG 4000
	18	0,2 M Mg-Acetat, 0,1 M Na-Cacodylat pH 6,5, 20 % PEG 8000
	<i>Extension</i>	
	14	0,2 M K ⁻ , Na-Tartrat, 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 M Na-Citrat pH 5,6

6.5 Ramachandran-Plots





6.6 Nikotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form, NAD⁺)



6.7 Fußnoten

$$^1 R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I(hkl)_i - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I(hkl)_i}$$

$I(hkl)_i$ = Intensität des *iten* Reflexes

$\langle I(hkl) \rangle$ = mittlere Intensität aller Reflexe

² Die Nummerierung der Aminosäurereste erfolgte wie folgt:

- Der erste Aminosäurerest der coronaviralen X-Domäne wurde mit eins bezeichnet und die anderen entsprechend mit zwei, drei und so weiter.
- Zusätzliche Aminosäurereste am N-Terminus des Proteins wurden, wie auf einem Zahlenstrahl, mit negativen Nummern versehen, wobei der erste zusätzliche Aminosäurerest mit Null bezeichnet wurde (vom Programm COOT vorgegeben).

$$^3 R_{cryst} = \frac{\sum_{hkl} |F_o(hkl) - F_c(hkl)|}{\sum_{hkl} F_o(hkl)}$$

$$^4 R_{free} = \frac{\sum_{hkl \in T} |F_o(hkl) - F_c(hkl)|}{\sum_{hkl \in T} F_o(hkl)}$$

$F_o(hkl)$ = gemessene Strukturfaktoramplitude des Reflexes h, k, l

$F_c(hkl)$ = anhand des Modells berechnete Strukturfaktoramplitude des Reflexes h, k, l

Für den freien R-Faktor, R_{free} wurden 5-10% der gemessenen Reflexe verwendet, die nicht für die Strukturverfeinerung eingesetzt wurden ($hkl \in T$).

Veröffentlichungen

- Piotrowski, Y., Hansen, G., Boomaars-van der Zanden, A.L., Snijder, E.J., Gorbalenya, A.E. & Hilgenfeld, R. (2009): Crystal structures of the X-domains of a group-1 and a group-3 coronavirus reveal that ADP-ribose-binding may not be a conserved property. *Protein Sci.* **18**, 6-16.
- Piotrowski, Y., Ponnusamy, R., Glaser, S., Daabach, A., Moll, R. & Hilgenfeld, R.: Production of coronavirus nonstructural proteins in soluble form for crystallization. In: *Methods in Molecular Biology* **454**: SARS- and other coronaviruses (Cavanagh, D., ed.), Humana Press, Totowa, 2008, pp. 139-159.
- Piotrowski, Y., van der Hoek, L., Pyrc, K., Berkhout, B., Moll, R. & Hilgenfeld, R.: Nonstructural proteins of human coronavirus NL63. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* **581**: The Nidoviruses – Toward control of SARS and other Nidovirus diseases (Perlman, S. & Holmes, K.V., eds.), Springer, New York, 2006, pp. 97-100.

Workshops und Konferenzen

1. Xth International Nidovirus Symposium toward control of SARS and Other Nidovirus Diseases. 25/06/2005 – 30/06/2005. Colorado Springs, USA.
Poster-Präsentation: Non-structural proteins of human coronavirus NL63
2. EMBO Practical Course on High Throughput Methods for Protein Production and Crystallization. 04/07/2005 – 13/07/2005. Marseille, Frankreich.
Vortrag: Non-structural proteins of human coronavirus NL63
3. 8th International Conference on Protein Crosslinking and Transglutaminases (PCL8). 01/09/2005 – 04/09/2005. Lübeck, Deutschland.
4. International Workshop on Discovery of Antiviral compounds. 25/04/2006 – 30/04/2006. Lübeck, Deutschland.
Poster-Präsentation: Human coronavirus NL63: Application of the GatewayTM system for cloning & expression of the non-structural proteins
5. Forum Innovative Therapies “Fit 2006” – Infectious Diseases and Host Defense – New Targets for Innovative Therapies. 05/10/2006 – 06/10/2006. Hamburg, Deutschland.
6. 24th European Crystallographic Meeting. 22/08/2007 – 26/08/2007. Marrakesch, Marokko.
Vortrag: The X domain of coronaviruses: An X-file ?
7. EMBO Workshop on RNA viruses: replication and drug design. 27/08/2007 – 30/08/2007. Wien, Österreich.
Poster-Präsentation: The X-domain of Nsp3 of HCoV-NL63
8. Third European Congress of Virology. 01/09/2007 – 05/09/2007. Nürnberg, Deutschland.
Poster-Präsentation: The X-domain of Nsp3 of HCoV-NL63